

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年12月21日 (21.12.2007)

PCT

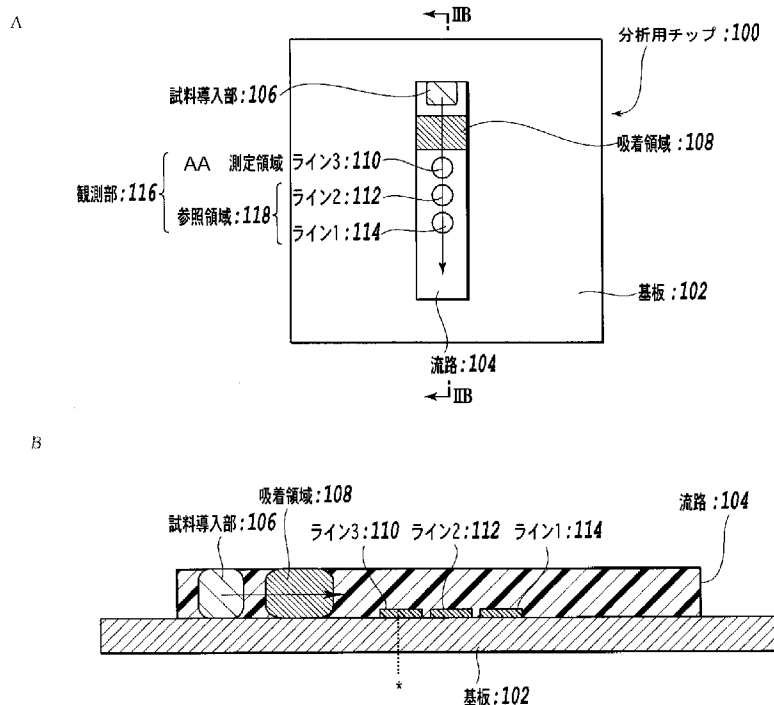
(10) 国際公開番号
WO 2007/145180 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/27 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/061757
- (22) 国際出願日: 2007年6月11日 (11.06.2007)
- (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2006-162879 2006年6月12日 (12.06.2006) JP
特願2006-165172 2006年6月14日 (14.06.2006) JP
特願2006-175682 2006年6月26日 (26.06.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本電信電話株式会社 (NIPPON TELEGRAPH AND TELEPHONE CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008116 東京都千代田区大手町二丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 瀬山 倫子 (SEYAMA, Michiko) [JP/JP]; 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT知的財産センタ内 Tokyo (JP). カムーセルジュ (CAMOU, Serge) [FR/JP]; 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT知的財産センタ内 Tokyo (JP). 岩崎 弦 (IWASAKI, Yuzuru) [JP/JP]; 〒1808585 東京都武蔵野市緑町3丁目9-11 NTT知的財産センタ内 Tokyo (JP). 三浦 達 (MIURA, Toru) [JP/JP]; 〒1808585

[続葉有]

(54) Title: OPTICAL ANALYSIS-USE CHIP

(54) 発明の名称: 光学分析用チップ



- 106...SAMPLE INTRODUCING UNIT
116...OBSERVING UNIT
AA...MEASURING REGION
110...LINE 3
118...REFERENCE REGION
- 112...LINE 2
114...LINE 1
100...ANALYSIS-USE CHIP
108...ADSORPTION REGION
102...SUBSTRATE
104...CHANNEL

(57) Abstract: An optical analysis-use chip. Especially, an analysis-use chip which is an optical sensor for handling a liquid sample, and can be used for selectively measuring chemical substances in a liquid to be measured such as biologically-relevant substances, environmental contaminants, or health-affecting substances. The optical analysis-use chip is characterized in that (1) an adsorption region (filter region) is provided between the sample introducing unit and observing unit of the channel of the analysis-use chip, (2) a bypass circuit is provided to the channel (main channel) of the analysis-use chip to provide time difference between samples passing through the main channel and the bypass circuit, and (3) a measuring region and a reference region are provided in the observing unit of the analysis-use chip. In this invention, embodiments in (1)-(3) can be executed individually or in a combination of two or more.

(57) 要約: 本発明は、光学分析用チップに関する。特に、本発明は、液体サンプルを扱う光学的センサであって、測定対象となる液体中の生体関連物質、環境汚染物質、または健康影響物質のような化学物質を選択的に測定するものに用い

[続葉有]

WO 2007/145180 A1



東京都武蔵野市緑町 3 丁目 9 - 1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 高橋 淳一 (TAKAHASHI, Jyunichi) [JP/JP]; 〒1808585 東京都武蔵野市緑町 3 丁目 9 - 1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 芳賀 恒之 (HAGA, Tsuneyuki) [JP/JP]; 〒1808585 東京都武蔵野市緑町 3 丁目 9 - 1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP). 堀内 勉 (HORIUCHI, Tsutomu) [JP/JP]; 〒1808585 東京都武蔵野市緑町 3 丁目 9 - 1 1 N T T 知的財産センタ内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 谷 義一, 外 (TANI, Yoshikazu et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂 2 丁目 6 - 2 0 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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, MT, 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。

ることができる分析用チップに関する。本発明の光学分析用チップは、(1) 分析用チップの流路の試料導入部と観測部の間に吸着領域 (フィルタ領域) を設けること、(2) 分析用チップの流路 (主流路) に迂回路を設け、主流路と迂回路を通る試料に時間差を生じさせること、および、(3) 分析用チップの観測部において、測定領域と参照領域を設けることにより特徴づけられる。本発明では、上記 (1) ~ (3) の態様を個別に、または、2 以上組み合わせ実施することができる。

明 細 書

光学分析用チップ

技術分野

[0001] 本発明は、光学分析用チップに関する。特に、本発明は、液体サンプルを扱う光学的センサであって、測定対象となる液体中の生体関連物質、環境汚染物質、または健康影響物質のような化学物質を選択的に測定するものに用いることができる分析用チップに関する。本発明の分析用チップは、分子選択性物質を用いることができる。また、本発明の分析用チップは、夾雑物を含む実サンプルを測定するものであり、測定の際の測定感度を高め、高精度化したものである。本発明の分析用チップは、測定の際の測定操作の簡易化と、測定の際の測定感度を高め、高精度化することを目的としたものである。

背景技術

[0002] 液体サンプル中の化学物質を測定する方法としては、例えば、分子選択性物質を予め固定化しておき、そこへ液体サンプルを流して、結合する分子を選択的に検出する電気学的測定方法および光学的測定方法がある。

[0003] 光学的方法では、蛍光物質や吸光物質を予め固定化しておいたプローブ分子を用いる手法がある。この他には、分子と固定化された分子選択性物質との結合を直接観察することができる全反射光学系を用いる方法がある。この方法は、励起されるエバネッセント波をプローブ光として用い、表面近傍での結合を直接的かつ高感度に測定する方法として知られている。全反射光学系の中でもよく用いられるのは、基板表面に形成された金属薄膜の全反射により励起される表面プラズモンがサンプルにより吸収されるのを利用する表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定法と、基板表面とサンプルとの屈折率差による全反射により励起されるエバネッセント波がサンプルにより吸収されるのを利用する減衰全反射型測定法である。

[0004] 全反射光学系で液体サンプルを測定するためには、基板上に流路を形成し、その流路内に予めプローブ分子を固定しておくか、または、プローブ分子を固定化した上に流路を形成する手段がとられる。そして、この流路に液体サンプルを通過させ、固

定化プローブ分子とサンプル中の測定対象物質の相互作用に基づいて、上記の全反射光学系を用いてサンプル中に測定対象物質が含まれているかどうかの測定、さらには測定対象物質の定量を行うことができる(例えば、前記流路に照射した測定光の反射光の状態から、液体中に特定の化学物質がどの程度含まれているか否かを測定することができる。)

[0005] さらに、全反射光学系と分子選択性物質を用いた測定は、クロマトグラフィーに代表される高コスト、高精度、かつ高感度な分析に比べ、現場試験にも適した低コストで短時間のスクリーニングに適していると考えられる。全反射光学測定を実施する簡易装置は、例えば特許文献1に記載されており、既に開発されている。

[0006] 特許文献1:特開2002-214131号公報

発明の開示

[0007] 光学測定において高感度な分析を実施するには、測定対象物を含まないリファレンスとなる参照サンプルを用意することが求められる。測定対象物質を含む実サンプルに対するリファレンスとして、測定対象物質を含まないサンプルを別途調製することも可能ではあるが、実サンプルそのものから測定対象物質を除去したものが、リファレンスとして理想的であると考えられる。このような観点から、実サンプルから測定対象物質を除去した参照サンプルを準備し、これをリファレンスとして用いることも行われている。しかし、この参照サンプルの作製について、煩雑な前処理操作が必要な場合があり、オンサイトあるいは簡易測定としては、このような前処理操作の必要性は好ましくない。

[0008] また、例えば、血清、血液、尿、その他の動物の体液、環境水、植物からの採取液のような、実際に測定するサンプルが液体サンプルである場合、このような液体サンプルには、測定対象物質以外の多くの夾雑物が存在している。全反射光学測定を実施する場合、このような夾雑物の影響を除去して選択的に測定対象物質を検出する必要が生じる。オンサイトでの測定を考慮した場合、このような夾雑物の除去処理も好ましいことではない。

[0009] 上述のような、基板上に予めプローブ分子を固定化した全反射光学系による測定では、測定領域の設けられている基板上の空間に多くの夾雑物が吸着または蓄積

するという問題がある。このような夾雑物の吸着による蓄積がある場合、従来では、プローブ分子を固定化していない領域を参照領域とし、測定領域と参照領域との差分測定を実施することにより、プローブ分子による反応以外の変化を差し引き、夾雑物の影響をある程度抑えていた。しかし、低濃度の測定対象物の検出を目的とする場合、プローブ分子が存在しない参照領域における夾雑物の吸着や蓄積が測定領域における吸着や蓄積と異なることが多かった。このため、参照領域と測定領域の差分をとっても、夾雑物の影響を除去できず、測定におけるベースラインが変化し、検出されるべき信号よりもベースラインが大きく変化してしまうという問題があった。

[0010] さらに、表面プラズモン共鳴測定法においては試料の屈折率の変化量を共鳴角度の変化から読み取る装置が一般的に用いられているが、液体である試料の屈折率は気体より大きく、試料の導入前後でその共鳴角度が15～20度程度も変化する場合がある。このような大きな共鳴角度の変化は、可動式の検出系を持った研究室用の分析装置であれば検出可能であるが、可動部分を持たない簡易装置においては、試料が導入されていない状態での共鳴角度を検出することが不可能であり、信号が得られない状態となってしまう。逆に、可動式の検出系を持ったものであっても、その検出動作に時間が掛かってしまうことから、素早い測定ができないという問題もある。

[0011] 本発明の目的は、測定液体から基準となる基準試料を調製して測定液体中における測定対象物の含有状態を極めて容易かつ簡便に行い得る光学分析用チップを提供することにある。

[0012] また、本発明は、実サンプルを分析用チップに投入するだけで、測定対象物質を除去した参照サンプルが調製できると共に、実サンプル中の測定対象物の選択的検出を可能にする光学分析用チップを提供することを目的とする。

[0013] さらに、本発明は、基板上に固定化されたプローブ分子と測定対象物質との相互作用に基づいて、測定対象物質を検出する測定法、例えば全反射光学系を用いた測定法において、測定領域と参照領域への夾雑物の吸着や蓄積の差から生じるシグナルノイズを抑えることができる分析用チップを提供することを目的とする。本発明の分析用チップにより夾雑物を多く含む液体サンプルを測定した場合でも、全反射光学系を用いた測定の高感度化および高精度化が達成できる。

- [0014] 本発明は光学分析用チップに関する。第1の実施形態の光学分析用チップは、基板と、該基板上の流路とを備える光学分析用チップであって、前記流路には、試料導入部と、観測部と、前記試料導入部と観測部の間の、測定対象物質を吸着する吸着領域を含む。
- [0015] さらに、この光学分析用チップは、試料導入部から観測部へ、吸着領域を迂回する流路をさらに含み、この迂回する流路を通る試料が、吸着領域を通る試料よりも多くの時間をかけて観測部に到達することができる。本発明の光学分析用チップでは、前記観測部に、少なくとも測定対象物質を検出する測定領域と、参照領域とを含むことができる。
- [0016] 前記測定領域に、抗体、抗原、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、シクロデキストリン修飾物、または、天然若しくは合成環状化合物であってイオノフォアとして機能する材料が固定化させることができる。
- [0017] 前記吸着領域は、吸着剤として、プロテインA、デキストランまたはその修飾物、有機被膜を有するシリカ、または有機被膜を有するアルミナを含むことができる。
- [0018] 上記の光学分析用チップには、基板と前記流路の間に金属薄膜をさらに有することができる。上記の光学分析用チップでは、前記流路および／または迂回する流路が多孔質膜であってもよい。
- [0019] 別の実施形態の光学分析用チップは、測定光に対して透明な基板と、この基板の表面に接合されるチップ本体と、このチップ本体に形成されて測定液体を導入するための導入ポートと、この導入ポートから導入された測定液体が導かれる第1の流路と、この第1の流路の、前記基板と前記チップ本体との間に配置され、測定光が照射される観測部と、前記観測部に位置し、前記第1の流路の壁面に設けられた金属薄膜層と、前記第1の流路から分岐して前記観測部よりも上流側で再び当該第1の流路に合流する第2の流路と、この第2の流路との分岐部分および合流部分との間に位置し、前記第1の流路内に組み込まれた、測定液体に含まれる所定の成分を捕捉するための吸着領域と、測定液体が前記分岐部分から前記第2の流路を通して前記観測部に達するよりも早く、前記分岐部分から前記第1の流路を通して前記観測部に達するように、前記観測部に到達するまでの時間に差を生じさせる手段と、を具備

る。

- [0020] このチップ本体は、これに組み込まれて前記観測部よりも下流側の前記第1の流路に接続し、前記観測部を通過した測定液体を吸収する液体吸収保持部をさらに具備することができる。
- [0021] 前記観測部には、少なくとも測定対象物質を検出する測定領域と、参照領域とを含むことができる。
- [0022] この実施形態の光学分析用チップでは、前記測定領域に到達するまでの時間に差を生じさせる手段が、(a)前記第2の流路の壁面に形成された親水性処理層、(b)前記第2の流路に臨む前記基板の表面から前記第2の流路内に突出する少なくとも1つの流路抵抗増大ブロック、(c)前記分岐部分から前記合流部分に至る前記第1の流路の容積よりも前記第2の流路の容積を大きく設定したこと、または(d)前記第2の流路の途中に設けられた測定液体を貯溜する液溜め部であってよい。
- [0023] また、この実施形態の光学分析用チップは、第1の流路の測定領域には、分子選択性材料が固定されてもよい。前記分子選択性材料は、抗体、抗原、酵素、オリゴヌクレオシド、リボヌクレオシド、およびシクロデキストリン修飾化合物からなる群から選択される少なくとも1つを含むことができる。また、この実施形態の光学分析用チップは、前記吸着領域はプロテインAを修飾剤とするデキストランゲル、有機膜被覆シリカ、および有機膜被覆アルミナから選択される少なくとも1つの吸着剤を含むことができる。
- [0024] 上記の各実施形態の光学分析用チップでは、前記測定領域には特定の分子と選択的に相互作用する第1の分子選択性物質が固定化され、前記参照領域には前記第1の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は前記第1の分子選択性物質と同等である第2の分子選択性物質が固定化され、前記第1の分子選択性物質と第2の分子選択性物質は、同じ方法で基板上に固定化されることができる。
- [0025] 本発明の別の実施形態の光学分析用チップは、基板と、該基板上の金属薄膜と、該金属箔膜上の観測部とを含む分析用チップであって、該観測部には、測定領域と参照領域が設けられており、前記測定領域には特定の分子と選択的に相互作用す

る第1の分子選択性物質が固定化され、前記参照領域には前記第1の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は前記第1の分子選択性物質と同等である第2の分子選択性物質が固定化され、前記第1の分子選択性物質と第2の分子選択性物質は、同じ方法で基板上に固定化される。

[0026] 本発明の上記各実施形態の光学分析用チップでは、前記第1の分子選択性物質および前記第2の分子選択性物質が、抗体または抗原であり、かつ、同一の系統であることが好ましい。前記第2の分子選択性物質が第1の分子選択性物質を不活性化したものであり、不活性化が、X線、 γ 線または電子線から選択される高エネルギー線の照射、熱処理、電気化学的酸化若しくは還元、または、酸性若しくはアルカリ性の緩衝液との接触により実現されることが好ましい。また、前記第1の分子選択性物質および前記第2の分子選択性物質が、DNAであり、かつ、前記第2の分子選択性物質が前記第1の分子選択性物質を構成する塩基の10%以下の塩基が置換されたものであることが好ましい。

[0027] 本発明の上記各実施形態の光学分析用チップでは、前記測定領域および前記参照領域を1組とする観測部が基板上の流路内に複数設けられており、各観測部の測定領域には互いに異なる第1の分子選択性物質が固定化されており、観測部がそれぞれ異なる分子を検出できる。

[0028] 本発明による光学分析用チップは、測定対象物質を含む液体サンプルを試料導入部に投入するだけで、測定対象物質を除いた参照サンプルを調製でき、この参照サンプルと測定対象物質が含まれる実サンプルを測定することが可能となる。さらに、本発明によれば、DNA、RNA、イオン、アミノ酸、ペプチドのセンシングを高感度かつ簡易に実施できるようになる。

[0029] 本発明の光学分析用チップによると、測定液体が分岐部分から第2の流路を通過して観測部に達するよりも早く、分岐部分から第1の流路を通過して観測部に達するようにさせる手段を具えているので、フィルタを通過した基準試料が最初に観測部に到達することとなる。このため、簡易的な表面プラズモン共鳴測定装置を用いた場合であっても、測定値の基準となる信号を最初に得ることができ、その後第2の流路を通過した測定液体が観測部に到達することで、測定液体の正確な分析を行うことができる。

本発明の光学分析用チップには、観測部に測定領域と参照領域を設けることができる。このような構成とすることで、測定液体を導入ポートから第1の流路に供給するだけで基準試料の調製がなされ、しかも測定領域に固定された分子選択性材料と測定対象物との相互作用に基づく測定対象物の検出および定量が可能である。

[0030] 本発明によれば、多くの夾雑物を含む実サンプルの測定時に起こるベースラインの変化を小さく抑えることができ、多くの夾雑物を含むサンプル中の少量の測定対象物質を検出することができる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]図1は、本発明による光学分析用チップを用いる表面プラズモン共鳴測定装置の模式図である。

[図2A]図2Aは、本発明の一実施形態の光学分析用チップを示す平面概略図である。

[図2B]図2Bは、本発明の一実施形態の光学分析用チップを示す断面概略図である。

[図3A]図3Aは、本発明の別の実施形態の光学分析用チップを示す平面概略図である。

[図3B]図3Bは、本発明の別の実施形態の光学分析用チップを示す断面概略図である。

[図4]図4は、(a)～(e)は本発明の光学分析用チップの製造工程を示す図である。

[図5]図5は、(a)～(d)は本発明の光学分析用チップの製造工程を示す図である。

[図6]図6は、流路上の＊の位置に到達した溶液中の測定対象物質の時間的变化を示す図である。

[図7]図7は、ライン1～3の位置における、測定された信号の強度の時間的变化を示す図である。

[図8]図8は、本発明による光学分析用チップの一実施形態の断面図である。

[図9]図9は、図8中のIX－IX矢視断面図である。

[図10]図10は、図8中のX－X矢視断面図である。

[図11]図11は、図8に示した光学分析用チップの測定領域の部分を透視した状態で

抽出拡大した立体投影図である。

[図12]図12は、図8に示した光学分析用チップを用いた測定結果を電流値の変化として模式的に示すグラフである。

[図13]図13は、本発明による光学分析用チップの他の実施形態において、第2の流路の一部を透視した状態で抽出拡大した立体投影図である。

[図14]図14は、本発明による光学分析用チップの別な実施形態の断面図である。

[図15]図15は、図14中のXV－XV矢視断面図である。

[図16A]図16Aは、本発明の光学分析用チップの一実施形態を示す平面概略図である。

[図16B]図16Bは、本発明の光学分析用チップの一実施形態を示す断面概略図である。

[図17]図17は、本発明の光学分析用チップの別の実施形態を示す概略図である。

[図18]図18は、(a)～(d)は、図16に示す光学分析用チップの製造工程を説明するための図である。

[図19]図19は、(a)～(d)は、図16に相当する光学分析用チップの別の製造工程を説明するための図である。

[図20A]図20Aは、図19の参照領域の分子選択性物質の不活化に使用する電気化学的装置の概略図である。

[図20B]図20Bは、本発明の光学分析用チップを示す概略図である。

[図21]図21は、光学分析用チップにフローセルを設置した場合の概略図である。

[図22]図22は、光学分析用チップの測定領域および参照領域の表面プラズモン共鳴を測定した場合の共鳴角度とシグナル強度の関係を示すグラフである。

[図23]図23は、光学分析用チップI、II、IIIおよびIVについて、表面プラズモン共鳴を測定した場合の、時間対 $\{\theta(\text{測定領域}) - \theta(\text{参照領域})\}$ の関係を示すグラフである。

[図24]図24は、光学分析用チップIについて、表面プラズモン共鳴を測定した場合の、時間対 $\{\theta(\text{測定領域}) - \theta(\text{参照領域})\}$ の関係を、抗原への応答結果と、ベースラインについて示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

- [0032] 本発明による光学分析用チップを表面プラズモン共鳴測定装置による液体試料の分析に応用した実施形態について、図面を参照しながら詳細に説明する。なお、本発明はこれらの実施形態のみに限らず、これらをさらに組み合わせたり、特許請求の範囲に記載された本発明の概念に包含されるあらゆる変更や修正が可能である。つまり、本発明はその精神に帰属する他の任意の技術にも当然応用することができるものであることに留意されたい。例えば、表面プラズモン共鳴測定装置のみならず、分子選択性材料をプローブ分子として全反射形の光学測定系を用いたセンシング、例えば紫外光、可視光、赤外光を用いた減衰全反射型測定法や、全反射光励起を用いた吸光／発光分析などにも適用可能である。
- [0033] 表面プラズモン共鳴測定装置の概念を図1に示す。表面プラズモン共鳴測定装置1は、光学分析用チップ10の測定領域に向けて測定光 L_m を照射する光源2と、光学分析用チップ10がマッチングオイルを介して重ね合わされる半円柱状をなす集光レンズ(シリンドリカルプリズム)3と、光学分析用チップ10の測定領域にて反射した反射光 L_r を検出する光検出器4と、この光検出器4によって検出された信号を処理する図示しない信号処理部とを有する。
- [0034] 光源2からの光は、集光レンズ3によって線状に集束され、光学分析用チップ10の測定領域に照射される。集光レンズ3と光源2あるいは検出器4とのいずれかの間に偏光子(図示せず)が入れられ、p偏光成分のみを検出する。その反射光 L_r が再び集光レンズ3を通して光検出器4に導かれるようになっており、信号処理部(図示せず)にてその信号が処理されて光学分析用チップ10に供給された測定液体の分析が行われる。図1に示す光学分析用チップ10は、基板11と、この基板11の表面に接合されるチップ本体12とから構成される。
- [0035] 上述のような光学分析用チップについて以下に詳細に説明する。本発明の光学分析用チップは、以下のような態様に分類できる。
- [0036] (1) 光学分析用チップの流路の試料導入部と観測部の間に吸着領域(フィルタ領域)を設ける。これにより、最初は測定対象物が吸着領域で吸着され、参照サンプルが観測部に到達する。次いで、吸着領域が測定対象物で飽和されるか、あるいは、

測定対象物の吸着を停止させると、測定対象物を含む試料が観測部に到達し、測定対象物の観測を行うことができる。

[0037] (2) 光学分析用チップの流路(主流路)に迂回路を設け、主流路と迂回路を通る試料に時間差を生じさせる。この態様では、さらに、主流路に吸着領域(フィルタ領域)を設けることが好ましい。この態様では、測定対象物は主流路の吸着領域で吸着され、参照サンプルが観測部に到達する。一方、迂回路には、測定対象物を含む試料が流れ、主流路を流れる参照サンプルよりも遅れて試料が観測部に到達する。

[0038] (3) 光学分析用チップの観測部において、測定領域と参照領域を設ける。この態様では、測定領域には、分子選択性物質を固定し、参照領域には分子選択性がなく、他の特性は測定領域に固定される分子選択性物質と同等な物質を固定する。この態様では、測定領域と参照領域に同時に夾雑物を含むサンプル液が流れ、夾雑物が測定領域および参照領域に同時に吸着されたり蓄積されたりする。その結果、測定領域および参照領域の差分を測定すると、夾雑物の吸着や蓄積の影響が相殺され、測定上のベースラインの変化を小さく抑えることができる。

[0039] 本発明では、上記(1)～(3)の態様を個別に、または、2以上組み合わせて実施することができる。

[0040] 以下に、本発明の第1の実施形態および第2の実施形態に係る光学分析用チップについて説明する。第1の実施形態は、上記(1)および(3)の組み合わせの態様に相当する。また、第2の実施形態は、吸着領域を設けた場合の上記(2)および(3)の組み合わせの態様に相当する。

[0041] 第1の実施形態に係る光学分析用チップは、基板と、該基板上の多孔質膜からなる流路とを備える光学分析用チップであって、前記流路には、試料導入部と、観測部と、前記試料導入部と観測部の間の、測定対象物質を吸着する吸着領域を含み、前記観測部には、少なくとも測定対象物質を検出する測定領域と、参照領域とを含む。

[0042] また、第2の実施形態に係る光学分析用チップは、試料導入部から観測部へ、吸着領域を迂回する流路をさらに含み、この迂回する流路を通る試料が、吸着領域を通る試料よりも多くの時間をかけて観測部に到達するようにしたものである。

[0043] 以下に、これらの本発明を図面を参照しながら説明する。

- [0044] Aおよび図2Bは、本発明の第1の実施形態に対応する光学分析用チップ100を示す図である。図2Aはその平面図であり、図2BはそのIIB—IIB断面図である。
- [0045] 本発明の光学分析用チップは、基板102上に、多孔質膜から成る流路104が設けられている。この流路の一端には、サンプルを滴下する試料導入部106が設けられている。なお、試料導入部は、液体サンプルを滴下できる構造であればどのようなものでもよく、流路の他の領域と区別できる明確な領域として形成される必要はない。従って、流路と同じ材料から形成されることが好ましい。また、流路には、ライン1から3(114、112、110)からなる観測部116が含まれる。観測部116は、ライン1および2(114、112)からなる参照領域118と、測定対象物質を検出するための測定領域(図2Aおよび図2Bの場合、110)を含む。なお、図2Aおよび図2Bでは、参照領域に2種類のラインを設ける例を示したが、ラインは1種類であってもよい。さらに流路は、試料導入部と観測部の間に、測定対象物質を吸着する吸着領域108が設けられる。吸着領域に固定される吸着剤は、測定対象物質を選択的に吸着してもよく、または、測定対象物質を含む複数の物質を吸着してもよい。
- [0046] 測定領域には、測定対象物質に対して選択的に結合する分子選択性物質を固定化する。具体的には、抗体、抗原、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、シクロデキストリン修飾物、または、天然若しくは合成環状化合物であってイオノフォアとして機能する材料を挙げることができる。例えば、ヒトIgG抗原を検出する場合には、抗ヒトIgGを固定化すればよい。
- [0047] 参照領域には、測定対象物質とは結合しないが、分子選択性物質に類似の参照物質を固定化する。例えば、測定領域に固定化した分子選択性物質と測定対象物質との相互作用が異なる参照物質を固定化すればよい。具体的には、例えば、抗体(例えば、抗ヒトIgG)を測定領域に固定化した場合、この抗体と起源若しくは種が異なる抗体(例えば、抗ヤギIgG)を参照領域に固定化すればよい。なお、図2Aおよび図2Bに示したように参照領域に2つのラインを設ける場合には、その1つに上記のような参照物質を固定化し、他方にブロッキング剤(例えば、ウシ血清アルブミン)のような、分子選択性物質および参照物質を含まない材料からなる部分を形成することが好ましい。このようにすることで、測定領域および参照物質を固定化した領域にもブロ

ッキング剤を適用したような場合に、より高精度の検出が可能となる。

- [0048] 参照領域に1種類のラインのみを設ける場合、ラインには、上記のように参照物質を固定化してもよく、分子選択性物質および参照物質を含まないラインとしてもよい。
- [0049] 吸着領域には、吸着剤として測定対象物質を吸着できる材料を固定化する。例えば、プロテインA、デキストランまたはその修飾物、例えばプロテインAを修飾剤とするデキストランゲル、修飾デキストランの微粒子など、有機被膜を有するシリカ、有機被膜を有するアルミナなどの測定対象物質を吸着できる材料を用いる。なお、吸着剤は、測定対象物質を含む複数の物質を吸着してもよい。
- [0050] 流路に使用する材料は、液体サンプルが、試料導入部から観測部へ吸引などの特別な操作を用いなくても移動することができる、多孔質膜を形成できるものであれば特に限定されない。例えば、セルロース、またはセルロースアセテート、ニトロセルロースのようなセルロース誘導体を用いることができる。
- [0051] 基板は、光学分析用チップを装着する測定装置（例えば表面プラズモン共鳴（SPR）装置）で使用する光に対して透明である材料であれば特に限定されることなく、いずれの材料も用いることができる。例えば、ガラス基板、プラスチック基板などを用いることができる。
- [0052] 図2Aおよび図2Bには図示していないが、本発明の光学分析用チップは、基板と流路の間に金属薄膜を含むことが好ましい。金属薄膜は例えば、金のような材料を用いることができる。金薄膜のような金属薄膜を設けることで、本発明の光学分析用チップを表面プラズモン共鳴装置用の分析チップとして使用することができる。
- [0053] 第1の実施形態の光学分析用チップについて、その動作を説明する。測定対象物質を含む液体サンプルを試料導入部から光学分析用チップに導入すると、流路を形成する多孔質材料の毛管現象により、液体サンプルは流路に沿って観測部の方向へ流れる。液体サンプルが流れると、まず、吸着剤の存在する吸着領域へ液体サンプルが到達する。吸着領域には、測定対象物質を吸着する吸着剤が含まれているため、測定対象物質が吸着され、その他の物質は観測領域へ流れる。ここで、観測領域へ流れる液体サンプルは、測定対象物質を含まないものとなっているので、リファレンス用サンプルが観測領域へ到達したことになる。

- [0054] 液体サンプルをさらに流し続けると、吸着領域の吸着剤は限られた量であるため、吸着領域の吸着剤は飽和して、測定対象物質を吸着しなくなる。この状態になると、観測領域へ測定対象物質が到達することになり、測定対象物質の測定が可能となる。
- [0055] このように、第1の実施形態の光学分析用チップは、吸着領域が測定対象物質で飽和されるまでの、液体サンプルを導入した直後はリファレンス用サンプルが観測部に到達する。この液体サンプルを導入した直後のリファレンス用サンプルの測定結果が測定上のベースラインとなる。次いで時間をおいて測定対象物質を含む液体サンプルが観測部に到達し、測定対象物質の測定が行われる。
- [0056] 本発明の光学分析用チップは、リファレンス用サンプルを別途調製する必要なく、測定対象物質を含む液体サンプルを光学分析用チップに投入する操作のみで、測定上のベースラインとなる信号と、測定対象物質を含むサンプルの測定信号の双方を連続して取得することが可能となる。
- [0057] 次に、図3Aおよび図3Bを参照して、本発明の第2の実施形態に対応する光学分析用チップ200を説明する。図3Aは第2の実施形態の光学分析用チップの平面図であり、図3Bは、図3AのIIIB-IIIB断面図である。図3Aおよび図3Bに示されるように、第2の実施形態の光学分析用チップは、基板202上に図2Aおよび図2Bで説明したのと同様の主流路204が設けられている。主流路は、その一端に、サンプルを滴下する試料導入部206が設けられている。また、主流路には、ライン1から3(214、212、210)からなる観測部208が含まれる。観測部208は、ライン1および2(214、212)からなる参照領域216と、測定対象物質を検出するための測定領域(図3Aおよび図3Bの場合、210)を含む。さらに主流路は、試料導入部と観測部の間に、測定対象物質を選択的に吸着する吸着領域218が設けられる。なお、図3Aおよび図3Bでは、参照領域に2種類のラインを設ける例を示したが、ラインは1種類であってもよい。基板、吸着領域、観測部等の主流路の構造、材料等の特徴は、第1の実施形態で説明した通りである。
- [0058] 第2の実施形態の光学分析用チップは、試料導入部から観測部へかけて、吸着領域を迂回する迂回路220を含む。迂回路は、多孔質膜からなり、この迂回路を通る試

料が、吸着領域を通る試料よりも多くの時間をかけて観測部に到達するように配置される。この条件を満たす限り、迂回路の形状、材料等は自由である。例えば、迂回路は、図3Aおよび3Bに示されるような矩形、または、後述する図8に示すようなラダー状であってもよい。本発明の光学分析用チップでは、主流路と迂回路を形成する多孔質膜材料は同じ材料を用いることが好ましい。

[0059] 本発明の光学分析用チップにおいて、多孔質膜からなる流路は、厚さ300～10、000nm (10 μ m)、好ましくは300～1000nmである。また、流路の全長、測定領域および参照領域の基板上の位置などは、光学的測定法(例えば、表面プラズモン共鳴測定法)に適合するように適宜選択すればよく、このような選択は当業者が容易に行いうるものである。

[0060] 次に、第2の実施形態の光学分析用チップの動作について説明する。測定対象物質を含む液体サンプルを試料導入部から光学分析用チップに導入すると、多孔質材料の毛管現象により、液体サンプルは、主流路方向と迂回路方向へ流れる。

[0061] 主流路方向へ流れた液体サンプルは、まず、吸着剤の存在する吸着領域へ液体サンプルが到達する。吸着領域には、測定対象物質を吸着する吸着剤が含まれているため、測定対象物質が吸着され、その他の物質は観測領域へ流れる。ここで、観測領域へ流れる液体サンプルは、測定対象物質を含まないものとなっているので、リファレンス用サンプルが観測領域へ到達したことになる。

[0062] 一方、迂回路方向へ流れた液体サンプルは、吸着領域を通ることなく、直接観測部に到達するので、測定対象物質を含んだままである。また、迂回路を経由する液体サンプルは、吸着領域を通る試料(主流路を経由する試料)よりも多くの時間をかけて観測部に到達するため、主流路を経由し、測定対象物質が除去されたリファレンス用サンプルが観測部に到達するよりも後に、観測部に到達することになる。

[0063] このように、主流路を経由した液体サンプルはリファレンス用サンプルとなり、迂回路を経由する液体サンプルは測定試料となり、主流路と迂回路を経由したそれぞれの液体サンプルは観測部に到達するのに時間差が生じるので、一回の試料の導入で、リファレンス用サンプルと測定対象物質の測定が可能となる。

[0064] 次に、本発明の光学分析用チップの製造方法について図面を参照しながら説明す

る。

[0065] まず、基板302上に蒸着などにより、金のような金属薄膜304を形成する(図4(a))。金属薄膜は、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)装置用であれば、50nm程度の膜厚を有する。次に、金属薄膜上に、レジストまたはテープ306により、流路の形状が露出するようなパターンを作製する(図4(b))。図3Aおよび図3Bに示すような迂回路220を有する光学分析用チップの場合には、迂回路を含むパターンを形成すればよい。次に、セルロースアセテートのようなセルロース誘導体の有機溶媒溶液をスピンコート法などでコーティングし、乾燥させて有機溶媒を除去し、レジストまたはテープを除去して、流路部分308を形成する(図4(c))。

[0066] 次に、流路の吸着領域310に相当する部分に、測定対象物質を吸着する吸着剤を含む溶液を適用し、吸着剤を流路に固定化させる(図4(d))。吸着剤を適用する際、必要に応じて吸着領域に相当する部分を活性化してもよい。例えば、プロテインAを吸着剤として用いる場合、カルボジイミドの水溶液を吸着領域に適用して多孔質材料を活性化しておくことが好ましい。

[0067] 次に、流路の観測部に相当する部分に、分子選択性物質および参照物質を固定化する。観測部312の測定領域314に、分子選択性物質316を含む溶液を滴下し、乾燥することで分子選択性物質を固定化することができる。観測部の参照領域318には、測定対象物質とは結合しないが、分子選択性物質に類似の参照物質320を含む溶液を滴下し、乾燥して、参照物質を固定化することができる(図4(e))。なお、図2Aおよび図2Bと同様に、参照領域に2つのライン322、324を設ける場合には、その1つに上記のようにして参照物質を固定化し、他方にブロッキング剤326を含む溶液を滴下し、乾燥させ、分子選択性物質および参照物質を含まない参照領域を形成することもできる。なお、ブロッキング剤を含む領域は、測定領域、および参照物質を含む参照領域に滴下して、これらの領域をブロッキングした場合に、測定条件を均質化するために設けることが好ましい。

[0068] 次に、本発明の光学分析用チップの別の製造方法について説明する。

[0069] 上述のように、基板302上に金属薄膜304を形成し、金属薄膜上に、レジストまたはテープ306により、流路の形状が露出するようなパターンを作製する。この際、流

路の吸着領域310に相当する部分は露出しないようにしておく(図5(a))。また、図3に示すような迂回路220を形成する場合には、迂回路を含むパターンを形成すればよい。次に、セルロースアセテートのようなセルロース誘導体の有機溶媒溶液をスピコート法などでコーティングし、乾燥させて有機溶媒を除去し、レジストまたはテープを除去して、吸着領域の部分で分離された流路部分402を形成する(図5(b))。

[0070] 次に、吸着領域310に、測定対象物質を吸着する吸着剤を含む溶液(好ましくは、流路を形成する多孔質材料との混合溶液)を適用し、溶媒等を除去して、流路部分402と連結するように吸着領域を形成する(図5(c))。次いで、上述のように、観測部を形成して流路308が形成された光学分析用チップを製造することができる(図5(d))。

[0071] 本明細書で、「固定化」とは、上述のように、吸着剤、分子選択性物質、参照物質等を流路に吸着させる場合を含め、流路上に化学的または物理的に結合させることを含む。

[0072] なお、上記の、第1および第2の実施形態の説明では、流路に多孔質膜を用いて、試料が毛管現象により移動する例を示したが、本発明はこれに限定されない。例えば、流路に多孔質膜を用ず、流路の下流部分にポンプ等の吸い上げ手段を設ける構成とすることもできる。また、上記第1の実施形態では、上記本発明の態様の(1)と(3)を組み合わせ、第2の実施形態では上記本発明の態様の(2)(吸着領域を設けた場合)と(3)を組み合わせたが、本発明はこれらに限定されない。上記本発明の態様の(1)単独、または、上記本発明の態様の(2)単独で、光学分析用チップを構成することもできる。この場合、観測部で適宜目的の物質を測定できるように構成すればよい。

[0073] 次に、上記の表面プラズモン共鳴測定装置1に用いられる別の実施形態(第3の実施形態)の光学分析用チップ10について説明する。この光学分析用チップは、上記本発明の態様の(2)(吸着領域を設けた場合)および(3)の組み合わせに相当する。

[0074] 光学分析用チップ10の断面構造を図8に示す。また、そのIX-IX矢視断面構造およびX-X矢視断面構造をそれぞれ図9および図10に示す。本実施形態における光学分析用チップ10は、基板11と、この基板11の表面に接合されるチップ本体12

とを有する。本実施形態における基板11は、縦、横、高さが例えば10mm、16mm、1mmの薄板状をなし、測定光Lmに対して透明なガラスまたはプラスチックで形成される。また、本実施形態におけるチップ本体12は、縦、横、高さが例えば7mm、10mm、4mmの直方体形状をなし、機械加工やエッチング加工などが容易な樹脂、本実施形態ではポリジメチルシロキサン(PDMS)を所定形状に加工したものを採用している。

[0075] 基板11の表面には、チップ本体12を接合した場合に図8中、二点鎖線で囲まれた観測部Zmに位置する第1の流路13に臨む約50nmの厚みの矩形パターンの金薄膜層14(図11参照)が蒸着法などによって形成されうる。観測部Zmは基板11のほぼ中央部に設定されることが好ましい。この金薄膜層14の部分の外観を図11に拡大して示す。金薄膜層14の上の観測部には、分子選択性材料である抗体が固定されて抗体固定領域A、B、Cを画成している。本実施形態においては、金薄膜層14に対する抗体を含む液体の滴下量を制限することにより、第1の流路13を横切るように3つの抗体固定領域A、B、Cが形成されうる。本実施形態におけるこれら3つの抗体固定領域A、B、Cは、異なる抗原に対して選択性を持つ抗ヒトIgG、抗ウサギIgG、抗ヤギIgGを含むことができる。これらの抗体固定領域A、B、Cは、対応した抗体を含む液体を金薄膜層14の所定の抗体固定領域A、B、Cにそれぞれ滴下し、所定時間放置した後に残留している液体を吸い取り、液体中に含まれる抗体の一部を金薄膜層14の表面に付着させることによって形成することができる。

[0076] 一方、チップ本体12の長手方向(図8中、左右方向)一端側の幅方向(図8中、上下方向)中央部には、排出ポートとなる0.6mm程度の貫通穴15が形成されている。また、チップ本体12の長手方向他端側の幅方向中央部には、第1の流路13の一部を画成する段付き穴16が形成されている。導入ポートとなる段付き穴16の小径部16aの内径は、例えば、約0.45mmであり、後述するフィルタ17が充填される大径部16bの内径は例えば0.6mmである。また、この段付き穴16に隣接して第2の流路18の液溜め部となる、例えば2.5mmの内径の止まり穴19がチップ本体12の長手方向他端側の一方の隅部に形成されている。この止まり穴19の底部と段付き穴16の大径部16bとは第2の流路18の一部となる連通穴20を介して連通している。つまり、連通

穴20と段付き穴16の大径部16bとの接続部が本発明における分岐部分となる。本実施形態では、連通穴20の径および長さに対して止まり穴19の径が非常に大きく設定されているため、この止まり穴19から連通穴20を穿設するためのドリルヘッドを止まり穴19に差し込んで連通穴20を形成することができる。これ以外の形成方法も可能であるが、加工工数が増大したり、液漏れ防止のための追加の工程が必要な場合がある。このチップ本体12の基板11との接合面21には、貫通穴15と段付き穴16の大径部16bとに連通して第1の流路13の一部となる幅が、例えば0.5mmで深さ、つまり高さが、例えば50 μ mの一直線状をなす溝22と、一端側がこの溝22の途中に連通すると共に他端側が止まり穴19に連通して第2の流路18の一部となる幅が、例えば0.3mmで高さが50 μ mのラダー状の溝23とが刻設されている。このラダー状の溝23の末端と一直線状をなす溝22との接続部分が2つの流路13、18の合流部分となり、その下流側の一直線状をなす溝22の長手方向中央部に位置する第1の流路13が観測部Zmとなる。ラダー状の溝23に代えて渦巻き状または迷路状の溝とする 것도可能であり、基本的にこれらの形状や断面構造などは任意の選択的事項である。

[0077] 段付き穴16の大径部16bの連通穴20との接続部分よりも第1の流路13の下流側には、測定液体中に含まれる所定の成分を捕捉するためのフィルタ(本明細書では吸着剤とも称する)17が充填される。本実施形態におけるフィルタ17は、活性炭や、モルキュラーシーブや、デキストラン、セルロース、アガロース、カードランを主材料とするゲル状微粒子や、疎水性基を含む有機物で修飾されたシリカや、アルミナ微粒子などを採用することができる。このフィルタ17は、段付き穴16の大径部16bに圧入されるグラスファイバ製の多孔質保持部材24にて連通穴20の入口部分を塞がないように段付き穴16の大径部16bの中央部分に保持される。

[0078] このように作られたチップ本体12の接合面21にプラズマ処理を施し、先の基板11の表面に形成された金薄膜層14が一直線状をなす溝22の所定位置、つまり観測部Zmに位置するように、チップ本体12の接合面21と基板11の表面とを重ね合わせて相互に押し付け、チップ本体12の接合面21を基板11の表面に対して一体的に接合する。このようにして、段付き穴16の小径部16aから大径部16b介して一直線状をなす溝22に至る第1の流路13と、連通穴20から止まり穴19を通過してラダー状の溝2

3に至る第2の流路18とを形成した光学分析用チップ10が作製される。第1の流路13の容積が第2の流路18の容積よりも充分小さければ、これらの流路13、18の形態はどのようなものであってもよく、上述したような実施形態にのみ限定されるものではないことに注意されたい。

[0079] 図1に示した表面プラズモン共鳴測定装置を用いて測定を行う場合、光学分析用チップ10の導入ポート、つまり段付き穴16の小径部16aに図示しない測定液体供給管を接続し、図示しないマイクロシリンジポンプを用いて測定対象物となる抗原、すなわちヒトIgG (サンプルa)、ウサギIgG (サンプルb) および夾雑物であるアルブミンを含む0.1モル/Lの濃度のリン酸緩衝液を測定液体として光学分析用チップ10内に供給する。そして、観測部Zmを通過した測定済みの測定液体を排出ポート、つまり貫通穴15につなげた図示しない廃液管を用いて光学分析用チップ10の外部に排出させ、その間に光源2から測定光を光学分析用チップ10の基板11から観測部Zmに照射し、光検出器4に導かれるその反射光Lrを信号処理部にて処理し、その屈折率およびその変化量を求める。この測定結果を図12に示す。

[0080] 測定液体は、第1の流路13からフィルタ17を通過し、その間に抗原および夾雑物であるアルブミンがフィルタ17に吸着されて基準試料となり、第1の流路13の観測部Zmに t_1 時に到達する。ここで検出される表面プラズモン共鳴角度の信号、つまり屈折率Nが測定の基準となる。次に、第2の流路18からの夾雑物および抗原を含んだ測定液体が第1の流路13との合流部分から第1の流路13内に流れ込み、 t_1 時よりも遅い t_2 時に観測部Zmに到達して t_3 時以降にこれらの混合比が安定状態となる。ここで、測定液体中の夾雑物および測定対象物である抗原が、観測部の抗体固定領域A、B、Cにそれぞれ吸着する。夾雑物であるアルブミンは、3つの抗体固定領域A、B、Cすべてに等しく吸着するが、抗原であるヒトIgGおよびウサギIgGはそれぞれ対応する抗体固定領域A、Bに選択的に吸着する。この結果、抗ヤギIgGが固定された抗体固定領域Cと、他の2つの抗体固定領域A、Bとの差分がそれぞれヒトIgGおよびウサギIgGによる信号に対応した屈折率の変化量a、bとして検出される。全反射型の光学系を用いた表面修飾形式の抗原抗体反応においては、反応速度が抗原濃度と比例し、表面プラズモン共鳴角度の時間変化から測定液体中のヒトIgGの定量

が可能となる。つまり、屈折率の変化量 a 、 b として表わされる表面プラズモン共鳴角度の時間変化から、ヒトIgGおよびウサギIgGの定量ができる。

[0081] 第1の流路13に組み込まれたフィルタ17を通過しにくい、夾雑物を多く含む測定液体や粘性の高い測定液体の場合、分岐部分から第1および第2の流路13、18を通過して観測部Zmに到達するまでの時間 t_1 、 t_2 により大きな差を生じさせる必要がある。このような目的のため、第2の流路18の壁面に親水性処理層を形成するようにしてもよい。例えば、先の実施形態におけるラダー状の溝23の内周壁およびこれと共に第2の流路18を画成する基板11の表面にアミノ基を有するシランカップリング剤を塗布し、これを親水性処理層とすることができる。親水性のシランカップリング材は、これに接する第2の流路18内のリン酸緩衝液中の水分を引き付けるような作用を持つため、第2の流路18内のリン酸緩衝液の流動が抑制され、観測部Zmに達するまでの時間 t_2 をさらに遅延させることができる。

[0082] 同様に、分岐部分から第1および第2の流路13、18を通過して観測部Zmに到達するまでの時間 t_1 、 t_2 に大きな差を生じさせる手段として、図13に示すような第2の流路18に臨む基板11の表面から第2の流路18内に突出する1つ以上の流路抵抗増大ブロック25を所定間隔で形成したり、ランダムに形成したりすることも有効である。この実施形態における流路抵抗増大ブロック25は、例えば、直径が $50\mu\text{m}$ で高さが $30\mu\text{m}$ の円柱状をなし、レジストを用いて基板11の表面にパターン形成されている。このように、第2の流路18内に流路抵抗増大ブロック25を介在させることにより、第2の流路18の抵抗を増大させることができ、観測部Zmに達するまでの時間を遅延させることが可能である。

[0083] 上述した第3の実施形態では、測定後の液体を排出ポート、つまり貫通穴15から光学分析用チップ10の外に排出するようにしたが、光学分析用チップ10内に保持させるようにすることも可能である。

[0084] このような変形形態に係る光学分析用チップ10の例を図14および図15に示す。図14は断面構造を示し、図15は図14のXV-XV矢視断面構造を示す。これらの図において、先の実施形態と同一機能の要素にはこれと同じ符号を記すに止め、重複する説明は省略する。この実施形態においては、先の貫通穴15に代えて吸収体26

を収容する空隙部27が第1の流路13の末端に接続するようにチップ本体12内に形成されている。この空隙部27内には、液体を吸収し、保持するための、パルプやゲル状高分子のような吸収体26が収容されている。本実施形態においては、測定流体が第1の流路13から空隙部27の吸収体26に達すると、吸収体26が測定流体を吸収し、保持するため、測定流体の供給ポンプを作動させなくても導入ポート、つまり段付き穴16の小径部16aから光学分析用チップ10内に導入された測定流体を自動的に吸引して第2の流路18からも測定流体を吸収体26へと導くことができる。

[0085] なお、第3の実施形態の光学分析用チップでは、流路は細管であってよいが、この他、流路を多孔質材料で形成することもできる。多孔質材料には、第1および第2の実施形態で説明したものが含まれる。また、第3の実施形態では、上記本発明の態様の(2)(吸着領域を設けた場合)と(3)を組み合わせた例を示したが、本発明はこれに限定されない。上記本発明の態様の(2)単独で、光学分析用チップを構成することもできる。この場合、観測部で適宜目的の物質を測定できるように構成すればよい。

[0086] 上述のような第3の実施形態に係る光学分析用チップによれば、測定液体が分岐部分から第2の流路を通して観測部に達するよりも早く、分岐部分から第1の流路を通して観測部に達するようにさせる手段を具えていることによる上述の効果に加え以下のような効果を有する。

[0087] チップ本体に組み込まれて観測部よりも下流側の第1の流路に接続し、観測部を通過した測定液体を吸収する液体吸収保持部を具えている場合、測定液体をこの光学分析用チップ内に流すための電動ポンプなどを省略することが可能となる。また、測定後の廃液が液体吸収保持部に保持されて外部に流出しないため、後処理が容易となる。

[0088] 第2の流路の壁面に親水性処理層を形成した場合、第2の流路を通る測定液体中の水成分が親水性処理層に親和性を持つため、第2の流路内での測定液体の流動が抑制されることとなる。この結果、測定液体が分岐部分から第2の流路を通して観測部に達するよりも早く、分岐部分から第1の流路を通して観測部に達するようにさせることができる。

- [0089] 第2の流路に臨む基板の表面から第2の流路内に突出する少なくとも1つの流路抵抗増大ブロックを形成した場合、流路抵抗増大ブロックが第2の流路内の測定液体の流動を阻害することとなる。この結果、測定液体が分岐部分から第2の流路を通過して観測部に達するよりも早く、分岐部分から第1の流路を通過して観測部に達するようにさせることができる。
- [0090] 分岐部分から合流部分に至る第1の流路の容積よりも第2の流路の容積を大きく設定した場合、測定液体が分岐部分から第2の流路を通過して観測部に達するよりも早く、分岐部分から第1の流路を通過して観測部に達するようにさせることができる。特に、第2の流路の途中に測定液体を貯溜する液溜め部を配した場合、フィルタを通過して観測部に達する基準試料と、第2の流路を通過して観測部に達する測定流体との到達時間を大きくずらすことが可能となる。
- [0091] 第1の流路の観測部に抗体や抗原などの分子選択性材料を固定した場合、生体に関わる免疫反応の測定が可能となる。特に、分子選択性材料が酵素の場合には生体関連物質または医薬、食品の品質管理や、環境作用物質の検出が可能である。オリゴヌクレオシドやリボヌクレオシドの場合には測定対象物質の遺伝子レベルの情報の特定が可能となる。シクロデキストリン修飾化合物の場合にはイオンやアミノ酸の選択的測定が可能である。さらに、フィルタがプロテインAを修飾剤とするデキストランゲルを含む場合、IgG系免疫物質を除去した基準試料をこの光学分析用チップ内で調整することができ、IgG系免疫物質を測定対象とする光学分析用チップを得ることができる。有機膜被覆シリカおよび有機膜被覆アルミナの少なくとも一方を含む場合、IgG以外のタンパク質、アミノ酸、イオンを除去した基準試料を光学分析用チップ内で調整することができ、IgG以外のタンパク質、アミノ酸、イオンを検出対象とする光学分析用チップを得ることができる。測定対象物が多様な種類の夾雑物を含む場合、プロテインAを修飾剤とするデキストランゲルを下部に、有機膜被覆シリカあるいは有機膜被覆アルミナを上部に充填して利用することもできる。
- [0092] 次に、本発明の第4および第5の実施形態について説明する。第4および第5の実施形態は、本発明の上記態様の(3)に相当する。
- [0093] 第4の実施形態の光学分析用チップは、基板と、該基板上の金属薄膜と、該金属

箔膜上の観測部を有し、該観測部には、測定領域と参照領域が設けられている。この光学分析用チップでは、前記測定領域に特定の分子と選択的に相互作用する第1の分子選択性物質が固定化され、前記参照領域に、前記第1の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は前記第1の分子選択性物質と同等である第2の分子選択性物質が固定化され、前記第1の分子選択性物質と第2の分子選択性物質は、同じ方法で基板上に固定化されることが好ましい。

[0094] 以下に、第4の実施形態の光学分析用チップを図面を参照して本発明を説明する。

[0095] 本発明の第4の実施形態の光学分析用チップは、図16Aおよび図16Bに示すようなものである。図16Bは、図16AのXVIB-XVIB断面図である。この光学分析用チップは、基板1001上に、蒸着のような方法により形成された金属薄膜1002、好ましくは金薄膜を有し、この金薄膜上に、測定領域1003および参照領域1004が設けられている。測定領域1003および参照領域1004は、図に示されるように、直線上に並列して並ぶように配置されることが好ましい。

[0096] 測定領域および参照領域は、後述するように試料を輸送するフローセルの流路に沿って配置されるが、測定領域または参照領域のいずれをフローセルの入口側に近い方に配置してもよい。

[0097] 測定領域および参照領域に用いられる分子選択性物質には、抗体、抗原、酵素、DNA、RNA、タンパク質などの生体関連物質、イオノフォア、デキストラン修飾物などの非生体関連物質などが含まれる。さらに、プロテインエンジニアリングにより得られた、相互に選択性が異なり、立体構造が類似した抗体同士なども用いることができる。

[0098] 測定領域および参照領域に用いられる分子選択性物質は、測定対象物質との選択性のみが異なるように設計したものであることが好ましい。このような設計は、測定対象物質との選択性のみが異なるように合成(化学的、生物学的などのいずれの手段でもよい)すること、あるいは、測定対象物質との選択性のみが異なるように分子選択性物質を不活性化させることが含まれる。

- [0099] 具体的には、測定領域には、光学分析用チップで測定すべき測定対象物質と選択的に相互作用する第1の分子選択性物質が固定化される。第1の分子選択性物質は、測定対象物質と選択的に相互作用できるものであり、具体的には、上述のような生体関連物質、非生体関連物質、プロテインエンジニアリングの手法により得られたものなどが含まれる。
- [0100] 参照領域には第2の分子選択性物質が固定される。第2の分子選択性物質は、第1の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は第1の分子選択性物質と同等であれば特に限定されない。すなわち、第2の分子選択性物質は、測定対象物質以外の他の分子に対して相互作用しない以外、前記第1の分子選択性物質と特性が同等である物質である。本発明では、第1の分子選択性物質と同種類または同系統の物質を第2の分子選択性物質として用いることが好ましい。
- [0101] 第2の分子選択性物質には、例えば第1の分子選択性物質を不活性化したものを用いることができる。ここで、不活性化とは、第1の分子選択性物質に特定の処理を施し、測定対象物質に対する選択性のみを、第1の分子選択性物質と異なるようにすることをいう。このような不活性化処理には、例えば、X線、 γ 線、電子線などの高エネルギー線を照射すること、熱処理、電気化学的酸化若しくは還元、または、酸性若しくはアルカリ性の緩衝液との接触などが含まれる。
- [0102] 上述の方法で第2の分子選択性物質を得ることができるほか、第1の分子選択性物質が抗体である場合、第2の分子選択性物質には、同系統の抗-抗体を用いることもできる。例えば、測定対象物質cに対して選択性を有する抗体Cを測定領域に固定する場合を考える。このとき、参照領域には、測定対象物質cとは異なる物質を、抗体Cを得たのと同じ動物（例えば、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ラクダ等）へ抗原として投与して調製した抗-抗体（抗体C'）を固定化する。抗体Cが、IgG、IgA、IgM、IgE、IgDなどの場合、抗体C'は、それぞれ、抗IgG、抗IgA、抗IgM、抗IgE、抗IgD等である。これら抗-抗体は、FcであるかまたはFabであるかについても同一であり、測定対象物質に対する選択性のみが異なるものである。
- [0103] また、第1の分子選択性物質として、測定対象物質dに選択性を有する抗原Dを用

いる(すなわち、測定領域に抗原Dを固定化する)場合を考えると、参照領域に固定する第2の分子選択性物質は、抗原Dとは、測定対象物質dに対する選択性のみが異なる抗原D'を用いることができる。

[0104] さらに、第1の分子選択性物質として、DNA、RNA、タンパク質等を用いることができる。これらは、測定対象物質と、複合体形成のような選択的なカップリングができるものであれば特に制限されない。

[0105] DNAやRNAを第1の分子選択性物質として用いる場合、第2の分子選択性物質は第1の分子選択性物質を構成する塩基のいくつかが追加、置換、欠失等されたものとすることができる。具体的には、DNAを第1の分子選択性物質として用いる場合、第2の分子選択性物質は第1の分子選択性物質を構成する塩基の10%以下の塩基が置換されたものであることが好ましい。

[0106] 基板は、光学分析用チップを装着する測定装置(例えば表面プラズモン共鳴(SPR)装置)で使用する光に対して透明である材料であれば特に限定されることなく、いずれの材料も用いることができる。例えば、ガラス基板、プラスチック基板などを用いることができる。

[0107] 本発明で測定領域に抗体のような生体関連物質を用いると、生体関連物質の選択性は極めて高いので、サンプル溶液中に多くの夾雑物が存在していても、生体関連物質と測定対象物質との相互作用、例えば抗原-抗体反応そのものの反応速度に対する影響は少ない。従って、サンプル溶液中に多くの夾雑物が存在していても、高感度かつ高精度で測定対象物質を検出および/または定量することができる。

[0108] 本明細書において、相互作用とは、分子選択性物質が測定対象物質と化学的または物理的に作用し合うことをいい、例えば水素結合、イオン結合、分子間結合、分子内への物質の取り込み、複合体形成、吸着などがある。例えば、上記生体関連物質であれば、抗原-抗体反応、酵素-基質間相互作用、DNAやRNAが二本鎖を形成する際の塩基対結合などがある。

[0109] 次に本発明の第5の実施形態について説明する。第5の実施形態の光学分析用チップは、図17に示すようなものである。この光学分析用チップは、基板1001上に、蒸着のような方法により形成された金属薄膜1002、好ましくは金薄膜を有し、この金薄

膜上に、複数の測定領域1013、1015および参照領域1014、1016が並列に設けられている。この実施形態では、測定領域1013および参照領域1015と、測定領域1014および参照領域1016が1組となって、観測部1010および1011を形成する。観測部1010および観測部1011は、それぞれ異なる種類の分子を検出できるように異なる種類の第1の分子選択性物質をそれぞれの測定領域に固定する。また、第1の分子選択性物質に合わせて第2の分子選択性物質を固定する。第1の分子選択性物質および第2の分子選択性物質は、上述の通りである。なお、この実施形態では、2つの観測部を設ける例を示したが、本発明はこれに限定されず、さらに多くの観測部を設けてもよい。

[0110] 複数の観測部を基板上に設ける場合、各観測部は、試料を輸送するフローセルの流路に沿って、好ましくは各観測部が直線上に並列して並ぶように配置されることが好ましい。

[0111] 本発明の光学分析用チップにおける、測定領域および参照領域の基板上的位置などは、光学的測定法(例えば、表面プラズモン共鳴測定法)に適合するように適宜選択すればよい。このような選択は、当業者によって適宜行いうる。

[0112] 本発明の光学分析用チップは、上述のように第1の分子選択性物質を測定領域に適用し、第1の分子選択性物質と測定対象物質との選択性のみが異なる第2の分子選択性物質を参照領域に適用することにより、サンプルを測定する際、夾雑物の吸着や蓄積の影響が相殺され、測定上のベースラインの変化を小さく抑えることができる。

[0113] 次に、第4の実施形態と第5の実施形態の光学分析用チップの製造方法を、図面を参照しながら説明する。

[0114] 第4の実施形態の光学分析用チップは、例えば図18(a)から(d)に示す手順で調製することができる。まず、基板上1001に蒸着などにより、金のような金属薄膜1002を形成する(図18(a))。金属薄膜は、例えばSPR装置用であれば、50nm程度の膜厚を有する。次に、金属薄膜上に、測定領域1003および参照領域1004に相当する開口部1030、1032を有するカバーシール1034を貼付する(図18(b)(i)および(ii))。この開口部の各々に第1の分子選択性物質および第2の分子選択性物質を含

む溶液(例えば、抗体または抗-抗体のリン酸バッファ溶液)1021、1022をそれぞれ滴下し、所定時間静置する(図18(c))。この後、溶液を除去し、カバーシールを剥がして、測定領域および参照領域に、それぞれ第1の分子選択性物質および第2の分子選択性物質が固定化された光学分析用チップを得ることができる(図18(d))。静置の時間は、固定する材料により異なるが、例えば抗体のリン酸バッファ溶液を用いた場合、数分から60分、好ましくは20分程度である。本発明で、「固定化」とは、上述のように、第1の分子選択性物質および第2の分子選択性物質を基板、好ましくは金属薄膜上に載置する場合を含め、基板または金属薄膜上に化学的または物理的に結合させることを含む。

[0115] 第5の実施形態の光学分析用チップは、図18(b)で示した、カバーシールに、複数の観測部に相当する開口部を設けたものを用いて、各観測部に、測定対象物質に応じた分子選択性物質を固定化することで調製することができる。

[0116] 次に、1つの観測部を有する光学分析用チップの別の製造方法について図19および図20を参照して説明する。まず、基板1001上をマスク1040で覆う。このマスクは、金属薄膜1048、1049、1050を成膜する部分にけられた3つの開口と、パット部1044、1045に相当する開口と、金属薄膜1049およびパット部1045、金属薄膜1050およびパット部1044をそれぞれ結ぶ連結部1046、1047に相当する開口を有する。これらの開口を通して、蒸着のような手段により、金のような材料から成る金属薄膜1048、1049、1050を成膜する(図19(a))。

[0117] 次に、マスクを除去し、金属薄膜1048、1049の部分に開口部1051、1052を有するカバーシール1054を貼付し、この開口部1051、1052に第1の分子選択性物質1055の溶液を滴下し、所定時間静置する(図19(b))。この後、溶液を除去し、カバーシールを剥がして、金属薄膜1048、1049上に第1の分子選択性物質1055が固定化された基板を得る(図19(c))。

[0118] 次に、図19(d)に示すような、連結部1046、1047の一部を覆い、金属薄膜1049、1050の部分でウェル状になった開口部1053を有するパターンのカバーシール1056を貼付する。このウェル状の開口部1053に電解質溶液を保持することができるようになっている。このようにした基板の前記ウェル1053に、電解質溶液(例えばリン酸

バッファ溶液)を滴下し、図20Aに示すように、銀・塩化銀参照電極、ポテンシオスタット、ファンクションジェネレータを用いて、金属薄膜1049上の第1の分子選択性物質を不活性化して、第2の分子選択性物質1058とする。最後に、参照電極、電解質溶液、カバーシール、ポテンシオスタット、ファンクションジェネレータ等を取り除き、光学分析用チップを得ることができる(図20B)。

[0119] 本発明の光学分析用チップの製造方法において、第2の分子選択性物質を第1の分子選択性物質を不活性化して調製する場合、第1の分子選択性物質の不活性化は、参照領域に予め第1の分子選択性物質を固定化した後に行ってもよいし、予め第1の分子選択性物質を不活性化した後に参照領域に不活性化した第1の分子選択性物質を固定化してもよい。

[0120] このようにして得られた光学分析用チップは、例えば表面プラズモン共鳴装置(例えば特許文献1に記載の装置)に設置し、図21に示すように、上部にポリジメチルシロキサン(PDMS)製フローセルを取付けて使用される。なお、フローセルへは、マイクロシリンジポンプから液体サンプルを、チューブを介して導入することができる。

[0121] 液体サンプルが導入されると、測定領域と参照領域に同時に夾雑物を含むサンプル液が流れ、夾雑物が測定領域および参照領域に同時に吸着されたり蓄積されたりする。その結果、測定領域および参照領域の差分を測定すると、夾雑物の吸着や蓄積の影響が相殺され、測定上のベースラインの変化を小さく抑えることができる。従って、液体サンプル中の低濃度の測定対象物質を検出したときに得られる信号の変化に比べ、ベースラインの変化が小さく抑えられるので、高感度かつ高精度で測定対象物質を検出または定量することができる。

[0122] なお、第4および第5の実施形態は、本発明の上記態様の(3)に相当するが、本発明はこれに限定されず、上記態様の(1)および／または(2)と上記態様(3)を組み合わせることができる。

[0123] 本発明の光学分析用チップは、全反射光学系および分子選択性物質を固定化して用いる測定系に適用することが可能であり、表面プラズモン共鳴測定法に限らず、プリズムあるいは回折格子を利用した全反射測定法に基づく吸収測定用チップとして適用することができる。

実施例

[0124] 以下に、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

(実施例1)

本実施例は、図2Aおよび図2Bに示すような迂回路を持たない流路の光学分析用チップであって、吸着剤としてプロテインA吸着剤を用いる例を示す。

[0125] 有機溶媒にセルロースアセテートを溶解して、セルロースアセテート溶液を調製した。BK7ガラス基板上に金薄膜(厚さ50nm)を蒸着により形成した。この金薄膜上に、レジスト膜またはテープを適用し、流路に相当する一部の金薄膜が露出したパターンを形成した。パターン化した、金／ガラス基板をスピコーターに設置し、先に調製したセルロースアセテート溶液を滴下した後、基板を回転させ、有機溶媒を蒸発させて白色の膜状の流路を形成した。次に、プロテインAのバッファ溶液を調製し、これを流路の吸着領域に滴下し、プロテインAを流路に吸着させて吸着領域を形成した。なお、プロテインAを吸着させた領域は、予めカルボジイミドの水溶液を滴下し、乾燥させて、活性化しておいた。このようにして、長さ10mm×幅1mm×厚さ1 μ mの流路を形成した。

[0126] 次に、流路の測定領域に相当する部分(図2Aおよび図2Bのライン3に相当する部分)に、抗ヒトIgGを100 μ g $\cdot$ mL⁻¹含むリン酸バッファ溶液(0.1M、pH6.8)を少量滴下し、乾燥させて抗体を固定化した。同様に、抗ヒトIgGを固定化した領域と並んだ部分(図2Aおよび図2Bのライン2の部分)に、抗ヤギIgGを100 μ g $\cdot$ mL⁻¹含むリン酸バッファ溶液を滴下し、乾燥させて参照抗体を固定化した。

[0127] 次に、ブロッキング剤溶液として、4mg $\cdot$ mL⁻¹のウシ血清アルブミンのリン酸バッファ溶液を調製し、この溶液を、抗体を固定化した測定領域および参照領域(図2Aおよび図2Bのライン3および2)の部分と、さらに参照領域の別の領域(図2Aおよび図2Bのライン1の部分)に滴下して乾燥させた。

[0128] 作製した光学分析用チップを表面プラズモン共鳴測定装置のプリズム上に、マッチングオイルを介して取り付けた。光学分析用チップの流路の試料導入部に液体サンプルとしてヒトIgGを含むリン酸バッファ溶液を滴下した。液体サンプル中の測定対象物質であるヒトIgGは、吸着領域のプロテインAに吸着され、ヒトIgGを含まないリン酸

バッファ溶液が観測領域に到達してSPRが観測される。図2Bにおいて、*で示された部分へ到達する、ヒトIgGの液体サンプル中の濃度プロファイルを図6に示した。図6から明らかなように、時間 t_0 において、ヒトIgGを含まないリファレンス用サンプルが測定領域に到達する。時刻 t_0 からヒトIgGを含む液体サンプルが測定領域に到達する時刻 t_1 までの間に観測されるSPRの角度が測定上のベースレベルとなる。

[0129] 次に、さらに液体サンプルを滴下するか、あるいは、吸着領域をプラスチックなどで保護し、吸着剤領域を飽和させるか、あるいは測定対象物質が吸着剤に吸着されないようにした後、大量の液体サンプルを試料導入部から導入すると、ヒトIgGを含む液体サンプルが測定領域に到達し、ヒトIgGが測定領域の抗ヒトIgGと選択的に結合する。一方、参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域およびブロッキング剤のみを固定した領域はヒトIgGとは結合しない。従って、この段階では、図7に示すように測定領域（図2Aおよび図2Bのライン3の部分）のみSPRの角度が増大し、参照領域（図2Aおよび図2Bのライン2および1の部分）のSPRの角度の上昇はごく僅かとなる。測定領域（ライン3）と参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域（ライン2）の差が、ヒトIgGの抗ヒトIgGへの選択的な結合を表し、この角度の増大の時間変化からヒトIgGの定量が可能となる。

[0130] プロテインA吸着剤は、IgGのFc部分と選択的に接合する性質を有するので、本実施例はサンプルからIgGのみを除去してリファレンス用サンプルを調製したい場合に適する。

（実施例2）

本実施例は、図2Aおよび図2Bに示すような迂回路を持たない流路の光学分析用チップであって、吸着剤として修飾デキストラン微粒子吸着剤を用いる例を示す。

[0131] 有機溶媒にセルロースアセテートを溶解したセルロースアセテート溶液と、このセルロースアセテート溶液に修飾デキストラン微粒子（メタクリル酸修飾デキストランをラジカル重合で微粒子化したもの）（直径 $15\sim 30\ \mu\text{m}$ ）を混合したセルロースアセテート・デキストラン微粒子混合溶液を調製した。BK7ガラス基板上に金薄膜（厚さ50nm）を蒸着により形成した。この金薄膜上に、レジスト膜またはテープを適用し、流路に相当する一部の金薄膜が露出したパターンを形成した。この際、流路の吸着領域を露

出ないようにし、吸着領域にはセルロースアセテート溶液が堆積しないようにした。次に、パターン化した、金／ガラス基板をスピコーターに設置し、先に調製したセルロースアセテート溶液を滴下した後、基板を回転させ、有機溶媒を蒸発させて白色の膜状の流路を形成した。次に、吸着領域に、先に調製したセルロースアセテート・デキストラン微粒子混合溶液を滴下し、乾燥させて、先に形成した白色の膜状の流路と連結するように吸着領域を形成した。このようにして、長さ10mm×幅1mm×厚さ1 μ mの流路を形成した。

[0132] 次に、流路の測定領域に相当する部分(図2Aおよび図2Bのライン3に相当する部分)に、抗ヒトIgGを $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 含むリン酸バッファ溶液(0.1M、pH6.8)を少量滴下し、乾燥させて抗体を固定化した。同様に、抗ヒトIgGを固定化した領域と並んだ部分(図2Aおよび図2Bのライン2の部分)に、抗ヤギIgGを $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 含むリン酸バッファ溶液を滴下し、乾燥させて参照抗体を固定化した。

[0133] 次に、ブロッキング剤溶液として、 $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ のウシ血清アルブミンのリン酸バッファ溶液を調製し、この溶液を、抗体を固定化した測定領域および参照領域(図2のライン3および2)の部分と、さらに参照領域の別の領域(図2Aおよび図2Bのライン1の部分)に滴下して乾燥させた。

[0134] 作製した光学分析用チップを表面プラズモン共鳴測定装置のプリズム上に、マッチングオイルを介して取り付けた。光学分析用チップの流路の試料導入部に液体サンプルとしてヒトIgGを含むリン酸バッファ溶液を滴下した。液体サンプル中の測定対象物質であるヒトIgGは、吸着領域のデキストラン微粒子に吸着され、ヒトIgGを含まないリン酸バッファ溶液が観測領域に到達してSPRが観測される。このヒトIgGを含まないリファレンス用サンプルが観測されるSPRの角度が測定上のベースレベルとなる。

[0135] 次に、さらに液体サンプルを滴下するか、あるいは、吸着領域をプラスチックなどで保護し、吸着剤領域を飽和させるか、あるいは測定対象物質が吸着剤に吸着されないようにした後、大量の液体サンプルを試料導入部から導入すると、ヒトIgGを含む液体サンプルが測定領域に到達し、ヒトIgGが測定領域の抗ヒトIgGと選択的に結合する。一方、参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域およびブロッキング剤のみを固定した領域はヒトIgGとは結合しない。従って、この段階では、図7に示すように測定領域(

図2Aおよび図2Bのライン3の部分)のみSPRの角度が増大し、参照領域(図2Aおよび図2Bのライン2および1の部分)のSPRの角度の上昇はごく僅かとなる。測定領域(ライン3)と参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域(ライン2)の差が、ヒトIgGの抗ヒトIgGへの選択的な結合を表し、この角度の増大の時間変化からヒトIgGの定量が可能となる。

- [0136] 本実施例は、デキストラン微粒子は、IgG以外のタンパク質も吸着することから、多様なタンパク質類を除去したリファレンス用サンプルを調製したい場合に適する。すなわち、測定対象物質であるIgG以外のタンパク質も除去したい場合や、IgG以外のタンパク質を測定対象物質とする場合にデキストラン微粒子を吸着剤として用いることができる。

(実施例3)

この実施例は、図3Aおよび図3Bに示すような迂回路を持つ流路の光学分析用チップであって、吸着剤としてプロテインAを吸着剤を用いる例を示す。

- [0137] 有機溶媒にセルロースアセテートを溶解して、セルロースアセテート溶液を調製した。BK7ガラス基板上に金薄膜(厚さ50nm)を蒸着により形成した。この金薄膜上に、レジスト膜またはテープを適用し、主流路および迂回路に相当する一部の金薄膜が露出したパターンを形成した。パターン化した、金/ガラス基板をスピンコーターに設置し、先に調製したセルロースアセテート溶液を滴下した後、基板を回転させ、有機溶媒を蒸発させて白色の膜状の主流路および迂回路を形成した。次に、プロテインAのバッファ溶液を調製し、これを流路の吸着領域に滴下し、プロテインAを流路に吸着させて吸着領域を形成した。なお、プロテインAを吸着させた領域は、予めカルボジイミドの水溶液を滴下し、乾燥させて、活性化しておいた。このようにして、長さ10mm×幅1mm×厚さ1 μ mおよび迂回路の全長8mmの流路を形成した。

- [0138] 次に、主流路の測定領域に相当する部分(図3Aおよび図3Bのライン3に相当する部分)に、抗ヒトIgGを100 μ g $\cdot$ mL⁻¹含むリン酸バッファ溶液(0.1M、pH6.8)を少量滴下し、乾燥させて抗体を固定化した。同様に、抗ヒトIgGを固定化した領域と並んだ部分(図3Aおよび図3Bのライン2の部分)に、抗ヤギIgGを100 μ g $\cdot$ mL⁻¹含むリン酸バッファ溶液を滴下し、乾燥させて参照抗体を固定化した。

- [0139] 次に、ブロッキング剤溶液として、 $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ のウシ血清アルブミンのリン酸バッファ溶液を調製し、この溶液を、抗体を固定化した測定領域および参照領域(図3Aおよび図3Bのライン3および2)の部分と、さらに参照領域の別の領域(図3Aおよび図3Bのライン1の部分)に滴下して乾燥させた。
- [0140] 作製した光学分析用チップを表面プラズモン共鳴測定装置のプリズム上に、マッチングオイルを介して取り付けた。光学分析用チップの流路の試料導入部に液体サンプルとしてヒトIgGを含むリン酸バッファ溶液を滴下した。液体サンプル中の測定対象物質であるヒトIgGは、吸着領域のプロテインAに吸着され、ヒトIgGを含まないリン酸バッファ溶液が観測領域に到達してSPRが観測される。このヒトIgGを含まないリファレンス用サンプルで観測されるSPRの角度が測定上のベースレベルとなる。
- [0141] 一方、迂回路を流れたヒトIgGを含む液体サンプルは、リファレンス用サンプルが測定領域に到達した後に、測定領域に到達し、ヒトIgGが測定領域の抗ヒトIgGと選択的に結合する。一方、参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域およびブロッキング剤のみを固定した領域はヒトIgGとは結合しない。従って、この段階では、図7に示すように測定領域(図3Aおよび図3Bのライン3の部分)のみSPRの角度が増大し、参照領域(図3Aおよび図3Bのライン2および1の部分)のSPRの角度の上昇はごく僅かとなる。測定領域(ライン3)と参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域(ライン2)の差が、ヒトIgGの抗ヒトIgGへの選択的な結合を表し、この角度の増大の時間変化からヒトIgGの定量が可能となる。
- [0142] 測定対象物質を含むサンプルが、迂回路を経て観測領域に到達することから、粘性が低く、流路内の進行が早いサンプルを測定したい場合には、本実施例に示した迂回路を設けることで、リファレンス用サンプルが観測領域に到達した後に測定対象物質を含む液体サンプルが観測領域に到達するように、時間差の調整が可能となる。また、本実施例のようにプロテインA吸着剤は、IgGのFc部分と選択的に接合する性質を有するので、本実施例はサンプルからIgGのみを除去してリファレンス用サンプルを調製したい場合に適する。

(実施例4)

本実施例は、図3Aおよび図3Bに示すような迂回路を持つ流路の光学分析用チップ

プであって、吸着剤としてデキストラン微粒子吸着剤を用いる例を示す。

[0143] 有機溶媒にセルロースアセテートを溶解したセルロースアセテート溶液と、このセルロースアセテート溶液に修飾デキストラン微粒子(メタクリル酸修飾デキストランをラジカル重合で微粒子化したもの)(直径 $15\sim 30\ \mu\text{m}$)を混合したセルロースアセテート・デキストラン微粒子混合溶液を調製した。BK7ガラス基板上に金薄膜(厚さ 50nm)を蒸着により形成した。この金薄膜上に、レジスト膜またはテープを適用し、流路に相当する一部の金薄膜が露出したパターンを形成した。この際、流路の吸着領域を露出しないようにし、吸着領域にはセルロースアセテート溶液が堆積しないようにした。次に、パターン化した、金／ガラス基板をスピコートに設置し、先に調製したセルロースアセテート溶液を滴下した後、基板を回転させ、有機溶媒を蒸発させて白色の膜状の流路を形成した。次に、吸着領域に、先に調製したセルロースアセテート・デキストラン微粒子混合溶液を滴下し、乾燥させて、先に形成した白色の膜状の流路と連結するように吸着領域を形成した。このようにして、長さ $10\text{mm}\times$ 幅 $1\text{mm}\times$ 厚さ $1\ \mu\text{m}$ および迂回路の全長 8mm の流路を形成した。

[0144] 次に、主流路の測定領域に相当する部分(図3Aおよび図3Bのライン3に相当する部分)に、抗ヒトIgGを $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 含むリン酸バッファ溶液(0.1M 、 $\text{pH}6.8$)を少量滴下し、乾燥させて抗体を固定した。同様に、抗ヒトIgGを固定した領域と並んだ部分(図3Aおよび図3Bのライン2の部分)に、抗ヤギIgGを $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 含むリン酸バッファ溶液を滴下し、乾燥させて参照抗体を固定化した。

[0145] 次に、ブロッキング剤溶液として、 $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ のウシ血清アルブミンのリン酸バッファ溶液を調製し、この溶液を、抗体を固定化した測定領域および参照領域(図3Aおよび図3Bのライン3および2の部分と、さらに参照領域の別の領域(図3Aおよび図3Bのライン1の部分)に滴下して乾燥させた。

[0146] 作製した光学分析用チップを表面プラズモン共鳴測定装置のプリズム上に、マッチングオイルを介して取り付けた。光学分析用チップの流路の試料導入部に液体サンプルとしてヒトIgGを含むリン酸バッファ溶液を滴下した。液体サンプル中の測定対象物質であるヒトIgGは、吸着領域のデキストラン微粒子に吸着され、ヒトIgGを含まないリン酸バッファ溶液が観測領域に到達してSPRが観測される。このヒトIgGを含まない

リファレンス用サンプルが観測されるSPRの角度が測定上のベースレベルとなる。

[0147] 一方、迂回路を流れたヒトIgGを含む液体サンプルは、リファレンス用サンプルが測定領域に到達した後に、測定領域に到達し、ヒトIgGが測定領域の抗ヒトIgGと選択的に結合する。一方、参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域およびブロッッキング剤のみを固定した領域はヒトIgGとは結合しない。従って、この段階では、図7に示すように測定領域(図2のライン3の部分)のみSPRの角度が増大し、参照領域(図3Aおよび図3Bのライン2および1の部分)のSPRの角度の上昇はごく僅かとなる。測定領域(ライン3)と参照領域の抗ヤギIgGを固定した領域(ライン2)の差が、ヒトIgGの抗ヒトIgGへの選択的な結合を表し、この角度の増大の時間変化からヒトIgGの定量が可能となる。

[0148] 測定対象物質を含むサンプルが、迂回路を経て観測領域に到達することから、粘性が低く、流路内の進行が早いサンプルを測定したい場合には、本実施例に示した迂回路を設けることで、リファレンス用サンプルが観測領域に到達した後に測定対象物質を含む液体サンプルが観測領域に到達するように、時間差の調整が可能となる。また、本実施例では、デキストラン微粒子は、IgG以外のタンパク質も吸着することから、多様なタンパク質類を除去したリファレンス用サンプルを調製したい場合に適する。すなわち、測定対象物質であるIgG以外のタンパク質も除去したい場合や、IgG以外のタンパク質を測定対象物質とする場合にデキストラン微粒子を吸着剤として用いることができる。

(実施例5)

本実施例は、測定領域および参照領域に用いる分子選択性物質の組み合わせとしてどのようなものが適切かを判断するためのものである。

[0149] 金薄膜(厚さ約50nm)を蒸着形成したBK7ガラス基板(縦16mm×横16mm)に、図18(b)に示すように、2つの開口部1030、1032が設けられたカバーシール1034を貼り付けた。この開口部1030に、ヤギから抽出した抗ヒトIgG(Fc)のリン酸バッファ溶液を滴下し、開口部1032にヤギから抽出した抗ウサギIgG(Fc)のリン酸バッファ溶液とをそれぞれ滴下して、室温環境下で20分以上静置した。この後、溶液を吸い取り、カバーシールを剥がして、チップIを作製した。

- [0150] 同様に、2つの開口部1030、1032が設けられたカバーシール付き金／ガラス基板について、開口部1030にヤギから抽出した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を滴下し、室温下で上述のように静置し、後処理したチップIIと、開口部1030にヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc) のリン酸バッファ溶液を滴下し、開口部1032にヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fab) のリン酸バッファ溶液を滴下して、上記と同様に処理したチップIIIと、開口部1030にヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc) のリン酸バッファ溶液を滴下し、開口部32にウサギから抽出した抗エンテロトキシンIgG (Fc) のリン酸バッファ溶液を滴下して、上記と同様に処理したチップIVを作製した。
- [0151] 作製したチップは、表面プラズモン共鳴測定装置(特許文献1)に設置し、チップの上部に図21に示すような、PDMS製フローセルを貼り付けた。フローセルへは、マイクロシリンジポンプから供給される液体サンプルが、チューブを介して導入されるようにしてある。さらに、液体スイッチを併用することで、液体サンプルの種類を瞬時に切り替えられるようににセッティングした。
- [0152] 基板上の開口部1030に相当する部分を測定領域1003とし、開口部1032に相当する部分を参照領域1004とした。この2つの領域において表面プラズモン共鳴を測定すると、測定結果から、図22に示すような共鳴角度(θ (測定領域)、 θ (参照領域))が得られる。この共鳴角度の時間変化を測定すると、それらの差分で表される $\{\theta$ (測定領域) $- \theta$ (参照領域) $\}$ / 時間 $[\text{deg} \cdot \text{s}^{-1}]$ が2つの領域における分子選択性物質の活性の差を表すことになる。
- [0153] 夾雑物を多く含む、液体サンプルとして、市販の牛乳を用い、フローセルを用いたセッティングがなされたチップへ、牛乳を導入すると、牛乳中に含まれる脂肪、カゼイン、タンパク質などが、抗体の固定化された観測部および抗体の固定化されていない金の表面に吸着および蓄積される。牛乳を流す時間が長くなると、表面プラズモン共鳴装置で測定される共鳴角度の位置も大きくなっていく。
- [0154] 牛乳内に、測定対象物質として、牛乳に含まれることのないヒトIgG抗原を混ぜておくと、抗ヒトIgGが固定化された測定領域の θ (測定領域)の増加速度 $[\text{deg} \cdot \text{s}^{-1}]$ が、 θ (参照領域)の増加速度 $[\text{deg} \cdot \text{s}^{-1}]$ を上回ることが期待される。数 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ レベルの低濃度の抗原を測定する場合、 $10^{-6}[\text{deg} \cdot \text{s}^{-1}]$ 台のシグナルとなる。従って、ベ

ースラインは、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ レベル以下に抑える必要がある。ベースラインは、本実施例の場合、抗ヒトIgGが含まれていない牛乳、すなわち、牛乳のみをチップに導入した場合の差分となる。

[0155] チップII、チップIIIおよびチップIVを用いて測定した場合、 10^{-5} から $10^{-4}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ の範囲でベースラインの変化が生じた。一方、チップIでは、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下にベースラインの変化を抑えることができた(図23参照)。

[0156] このように、同じ動物から抽出した選択性のみ異なる同じ系統のIgGであって、IgG抗体として物理的な大きさが等しいFc同士を測定領域および参照領域用の抗体として用いることで、多くの夾雑物を含む液体サンプルを測定する際の、夾雑物の吸着および蓄積に起因する、ノイズとなるベースラインの変化を抑えることができる。

(実施例6)

2つの開口部1030、1032が設けられたカバーシール付き金／ガラス基板について、これら2つの開口部1030、1032にヤギから抽出した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を滴下し、開口部1032の参照領域に相当する部分にのみ電子線を照射して抗体の選択性を低下させた。その他は、実施例5と同様に処理して、光学分析用チップVを得た。この光学分析用チップVを実施例5と同様に表面プラズモン共鳴装置に設置し、フローセルをセッティングし、牛乳を導入して表面プラズモン共鳴を測定した。測定領域と参照領域との差分測定におけるベースラインの変化は、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下に抑えることができた。

(実施例7)

参照領域1004用の分子選択性物質を調製するため、ヤギから抽出した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を40℃の恒温槽で1時間温め、室温に戻した。これにより、不活性化した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を得た。

[0157] 次に、2つの開口部1030、1032が設けられたカバーシール付き金／ガラス基板について、開口部1030にヤギから抽出した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を滴下し、先に調製した、不活性化した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を、開口部1032の参照領域に相当する部分に滴下した。その他は、実施例5と同様に処理して、光学分析用チップVIを得た。この光学分析用チップVIを実施例5と同様に表面プラズモン

共鳴装置に設置し、フローセルをセッティングし、牛乳を導入して表面プラズモン共鳴を測定した。測定領域と参照領域との差分測定におけるベースラインの変化は、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下に抑えることができた。

(実施例8)

図19(a)に示すような、金属薄膜を形成するための3つの開口と、パッド部1044、1045を形成するための開口と、連結部1046、1047を形成するための開口を有するマスクを、BK7ガラス基板に設置した。この開口を通して、蒸着のような手段により、金薄膜1048、1049、1050を成膜した。次に、マスクを除去し、開口部1041、1042の位置に設けられた金薄膜1048、1049の部分に開口部1051、1052が一致するように、開口部1051、1052を有するカバーシールを貼付した(図19(b))。この開口部1051、1052にヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc)のリン酸バッファ溶液を滴下し、室温で20分間静置した後、溶液を除去し、カバーシールを剥がした。

[0158] 次に、図19(c)に示すような、連結部1046、1047の一部を覆い、パッド部1044、1045が露出し、ヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc)が固定化された金薄膜1049と、ヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc)が固定化されていない1050の部分が露出した開口部1053を有するカバーシールを貼付する。ここで、金薄膜1049および金薄膜1050を露出させている開口部は、ウェル状になっており、溶液を保持できる。このようにした基板のウェル状の開口部分に、リン酸バッファ溶液を滴下した。次に、図20に示すように、銀・塩化銀参照電極の先端がウェル状の開口部内のリン酸バッファ溶液に接するように配置し、ポテンシオスタットに接続した。金薄膜1049の部分を作用極とし、金薄膜1050の部分を対極としてポテンシオスタットに接続した。次に、ポテンシオスタットおよびファンクションジェネレータを用いて、作用極へ印加する電位を -0.3 から $1.2[\text{V vs. 銀}\cdot\text{塩化銀参照電極}]$ まで掃引し、さらに 1.2 から $-0.3[\text{V vs. 銀}\cdot\text{塩化銀参照電極}]$ まで戻るといった電位サイクルを与えた。この電位サイクルの適用により、金属薄膜1049上のヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc)を不活性化した。最後に、参照電極、リン酸バッファ溶液、カバーシール、ポテンシオスタット、ファンクションジェネレータ等を取り除き、光学分析用チップVIIを得た。

[0159] この光学分析用チップVIIを実施例5と同様に表面プラズモン共鳴装置に設置し、

フローセルをセッティングし、牛乳を導入して表面プラズモン共鳴を測定した。測定領域と参照領域との差分測定におけるベースラインの変化は、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下に抑えることができた。

(実施例9)

2つの開口部1030、1032が設けられたカバーシール付き金／ガラス基板について、これら2つの開口部1030、1032にヤギから抽出した抗ヒトIgGのリン酸バッファ溶液を滴下し、開口部1032の参照領域に相当する部分にのみpH1.68の標準緩衝液(ナカライ社製)を滴下し、抗体の選択性を低下させた。その他は、実施例5と同様に溶液を吸い取って、光学分析用チップVIIIを得た。この光学分析用チップVIIIを実施例5と同様に表面プラズモン共鳴装置に設置し、フローセルをセッティングし、牛乳を導入して表面プラズモン共鳴を測定した。測定領域と参照領域との差分測定におけるベースラインの変化は、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下に抑えることができた。

(実施例10)

以下のA鎖(配列番号1)およびB鎖(配列番号2)を有するDNAを含むリン酸バッファ溶液を準備した。A鎖は測定領域用のDNAであり、B鎖は参照領域用のDNAである。

[0160] A鎖:5'-CCT CTG ACT TCA ACA GCG ACA CT-3' (配列番号1)

B鎖:5'-CCT CAG ACT TCA ACA GGG ACA CT-3' (配列番号2)

2つの開口部1030、1032が設けられたカバーシール付き金／ガラス基板について、開口部1030にA鎖を含むリン酸バッファ溶液を滴下し、開口部1032にB鎖を含むリン酸バッファ溶液を滴下し、実施例5と同様に溶液を吸い取って、DNAを金薄膜状に固定して、光学分析用チップXを得た。この光学分析用チップXを実施例5と同様に表面プラズモン共鳴装置に設置し、フローセルをセッティングし、牛乳を導入して表面プラズモン共鳴を測定した。測定領域と参照領域との差分測定におけるベースラインの変化は、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下に抑えることができた。

(実施例11)

図17に示すような、複数の観測部を有する光学分析用チップを調製した。ヤギから抽出した抗ヒトIgG (Fc) のリン酸バッファ溶液と、ヤギから抽出した抗ウサギIgG (Fc)

のリン酸バッファ溶液を、観測部1010の測定領域および参照領域にそれぞれ滴下した。また、観測部1011には、実施例10で用いたDNAのA鎖およびB鎖を、観測部1011の測定領域および参照領域にそれぞれ滴下した。各領域の溶液を吸い取った後、抗体およびDNAの両方を固定化した光学分析用チップXIを得た。この光学分析用チップXを実施例5と同様に表面プラズモン共鳴装置に設置し、フローセルをセッティングし、牛乳を導入して表面プラズモン共鳴を測定した。抗体を固定した測定領域および参照領域と、DNAを固定した測定領域および参照領域の差分測定におけるベースラインの変化は、それぞれ、 $10^{-6}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ 以下に抑えることができた。

(実施例12)

実施例5で作製した光学分析用チップIを用いて、 $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ のヒトIgG抗原を含む牛乳から成る液体サンプルを、実施例5で説明したような表面プラズモン共鳴装置とフローセルを備えた測定装置に導入し、表面プラズモン共鳴を測定した。その結果、ベースラインのレベルと比較して、 $\{\theta(\text{測定領域}) - \theta(\text{参照領域})\}$ で表されるシグナルの、明らかに傾きの大きな応答が得られた(図24参照)。なお、ベースラインのレベルは、液体サンプルを導入する前に、ヒトIgGを含まない牛乳を用いて測定して得られたものである。

[0161] 上記の結果は、不活性化していない抗ヒトIgGを固定化した測定領域において、より多くのヒトIgG抗原が結合したことを示すものである。一方、上記の結果は、参照領域に固定化した不活性化された抗ヒトIgGのヒトIgG抗原に対する選択性は、測定領域に比べ低くなっていることを示している。

[0162] 次に、実施例6から9で調製した光学分析用チップV、VI、VIIおよびVIIIについても、 $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ のヒトIgG抗原を含む牛乳から成る液体サンプルを用いて、同様に表面プラズモン共鳴を測定した。測定の結果、図24に示したのと同様の傾きを持つ応答が得られた。このことは、不活性化を行っていないか、あるいは、プロテインエンジニアリングを受けていない抗ヒトIgG抗体を固定化した測定領域において、より多くのヒトIgG抗原が結合されたことを示すものである。一方、上記の結果は、参照領域に固定化した不活性化された抗ヒトIgGのヒトIgG抗原に対する選択性は、測定領域

に比べ低くなっていることを示している。

[0163] 次に、光学分析用チップXを用いて、A鎖と特異的な結合を形成するC鎖(配列番号3)からなるDNAを $1\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 含有する牛乳を調製し、上述と同様に表面プラズモン共鳴を測定した。

[0164] C鎖:3'-GGA GAC TGA AGT TGT CGC TGT GGG TG-5' (配列番号3)

その結果、DNAを含まない牛乳から得られたベースラインのレベルより大きな傾き、 $3\times 10^{-5}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ の応答が得られた。

[0165] また、抗体およびDNAを固定化した光学分析用チップXIを用いて、 $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ のヒトIgG抗原およびC鎖からなるDNAを含む牛乳サンプルについて、同様に表面プラズモン共鳴を測定した。その結果、 $\{\theta(\text{測定領域}) - \theta(\text{参照領域})\}$ で表されるシグナルとして、抗体を固定化した観測部では、ベースラインレベルより大きく、かつ図24に示したのと同じ傾きの応答が得られ、DNAを固定化した観測部では、前述と同様の $3\times 10^{-5}[\text{deg}\cdot\text{s}^{-1}]$ の応答が得られた。

産業上の利用可能性

[0166] 本発明の光学分析用チップは、分子と固定化された分子選択性物質との結合を直接観察することができる全反射光学系を用いる光学的測定方法に利用可能である。

請求の範囲

- [1] 基板と、該基板上の流路とを備える光学分析用チップであって、前記流路には、試料導入部と、観測部と、前記試料導入部と観測部の間の、測定対象物質を吸着する吸着領域を含むことを特徴とする光学分析用チップ。
- [2] 試料導入部から観測部へ、吸着領域を迂回する流路をさらに含み、この迂回する流路を通る試料が、吸着領域を通る試料よりも多くの時間をかけて観測部に到達することを特徴とする請求項1に記載の光学分析用チップ。
- [3] 前記観測部には、少なくとも測定対象物質を検出する測定領域と、参照領域とを含むことを特徴とする請求項1または2に記載の光学分析用チップ。
- [4] 前記測定領域に、抗体、抗原、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、シクロデキストリン修飾物、または、天然若しくは合成環状化合物であってイオノフォアとして機能する材料が固定化されていることを特徴とする請求項3に記載の光学分析用チップ。
- [5] 前記吸着領域が、吸着剤として、プロテインA、デキストランまたはその修飾物、有機被膜を有するシリカ、または有機被膜を有するアルミナを含むことを特徴とする請求項3に記載の光学分析用チップ。
- [6] 前記基板と前記流路の間に金属薄膜をさらに有することを特徴とする請求項1から5のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。
- [7] 前記流路および／または迂回する流路が多孔質膜であることを特徴とする請求項1から6のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。
- [8] 測定光に対して透明な基板と、
この基板の表面に接合されるチップ本体と、
このチップ本体に形成されて測定液体を導入するための導入ポートと、
この導入ポートから導入された測定液体が導かれる第1の流路と、
この第1の流路の、前記基板と前記チップ本体との間に配置され、測定光が照射される観測部と、
前記観測部に位置し、前記第1の流路の壁面に設けられた金属薄膜層と、
前記第1の流路から分岐して前記観測部よりも上流側で再び当該第1の流路に合

流する第2の流路と、

この第2の流路との分岐部分および合流部分との間に位置し、前記第1の流路内に組み込まれた、測定液体に含まれる所定の成分を捕捉するための吸着領域と、

測定液体が前記分岐部分から前記第2の流路を通過して前記観測部に達するよりも早く、前記分岐部分から前記第1の流路を通過して前記観測部に達するように、前記観測部に到達するまでの時間に差を生じさせる手段と

を具備したことを特徴とする光学分析用チップ。

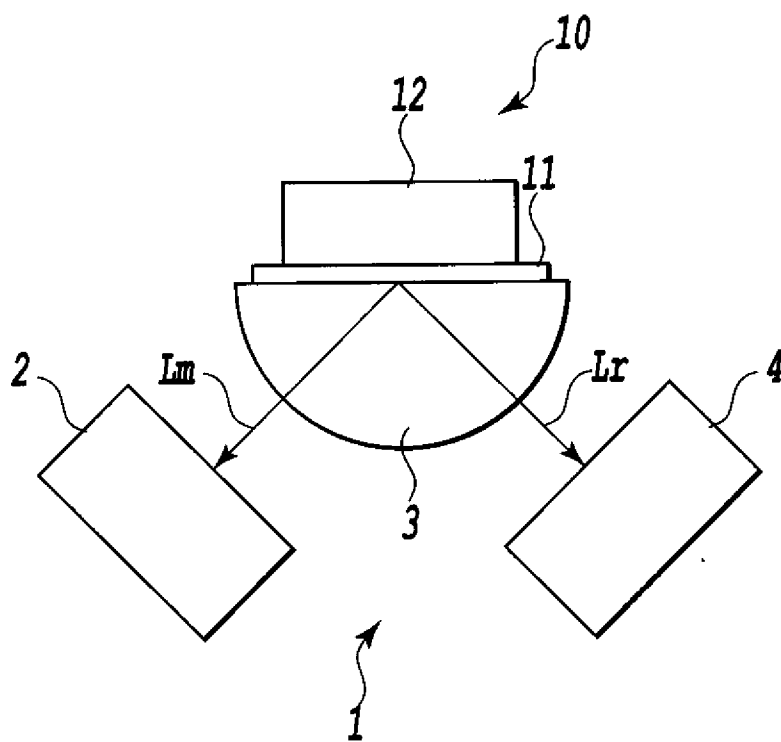
- [9] 前記チップ本体に組み込まれて前記観測部よりも下流側の前記第1の流路に接続し、前記観測部を通過した測定液体を吸収する液体吸収保持部をさらに具備したことを特徴とする請求項8に記載の光学分析用チップ。
- [10] 前記観測部には、少なくとも測定対象物質を検出する測定領域と、参照領域とを含むことを特徴とする請求項8または9に記載の光学分析用チップ。
- [11] 前記測定領域に到達するまでの時間に差を生じさせる手段が、前記第2の流路の壁面に形成された親水性処理層であることを特徴とする請求項8から10のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。
- [12] 前記測定領域に到達するまでの時間に差を生じさせる手段が、前記第2の流路に臨む前記基板の表面から前記第2の流路内に突出する少なくとも1つの流路抵抗増大ブロックであることを特徴とする請求項8から10の何れか1項に記載の光学分析用チップ。
- [13] 前記測定領域に到達するまでの時間に差を生じさせる手段が、前記分岐部分から前記合流部分に至る前記第1の流路の容積よりも前記第2の流路の容積を大きく設定したことであることを特徴とする請求項8から10の何れか1項に記載の光学分析用チップ。
- [14] 前記測定領域に到達するまでの時間に差を生じさせる手段が、前記第2の流路の途中に設けられた測定液体を貯溜する液溜め部であることを特徴とする請求項8から10のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。
- [15] 前記第1の流路の測定領域には、分子選択性材料が固定されていることを特徴とする請求項10に記載の光学分析用チップ。

- [16] 前記分子選択性材料が抗体、抗原、酵素、オリゴヌクレオシド、リボヌクレオシド、およびシクロデキストリン修飾化合物からなる群から選択される少なくとも1つを含むことを特徴とする請求項15に記載の光学分析用チップ。
- [17] 前記吸着領域がプロテインAを修飾剤とするデキストランゲル、有機膜被覆シリカ、および有機膜被覆アルミナから選択される少なくとも1つの吸着剤を含むことを特徴とする請求項8に記載の光学分析用チップ。
- [18] 基板と、該基板上の金属薄膜と、該金属箔膜上の観測部とを含む光学分析用チップであって、該観測部には、測定領域と参照領域が設けられており、前記測定領域には特定の分子と選択的に相互作用する第1の分子選択性物質が固定化され、前記参照領域には前記第1の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は前記第1の分子選択性物質と同等である第2の分子選択性物質が固定化され、前記第1の分子選択性物質と第2の分子選択性物質は、同じ方法で基板上に固定化されることを特徴とする光学分析用チップ。
- [19] 前記測定領域には特定の分子と選択的に相互作用する第1の分子選択性物質が固定化され、前記参照領域には前記第1の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は前記第1の分子選択性物質と同等である第2の分子選択性物質が固定化され、前記第1の分子選択性物質と第2の分子選択性物質は、同じ方法で基板上に固定化されることを特徴とする請求項3または10に記載の光学分析用チップ。
- [20] 前記第1の分子選択性物質および前記第2の分子選択性物質が、抗体または抗原であり、かつ、同一の系統であることを特徴とする請求項3、10または18のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。
- [21] 前記第2の分子選択性物質が第1の分子選択性物質を不活性化したものであり、不活性化が、X線、 γ 線または電子線から選択される高エネルギー線の照射、熱処理、電気化学的酸化若しくは還元、または、酸性若しくはアルカリ性の緩衝液との接触により実現されることを特徴とする請求項3、10または18のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。
- [22] 前記第1の分子選択性物質および前記第2の分子選択性物質が、DNAであり、か

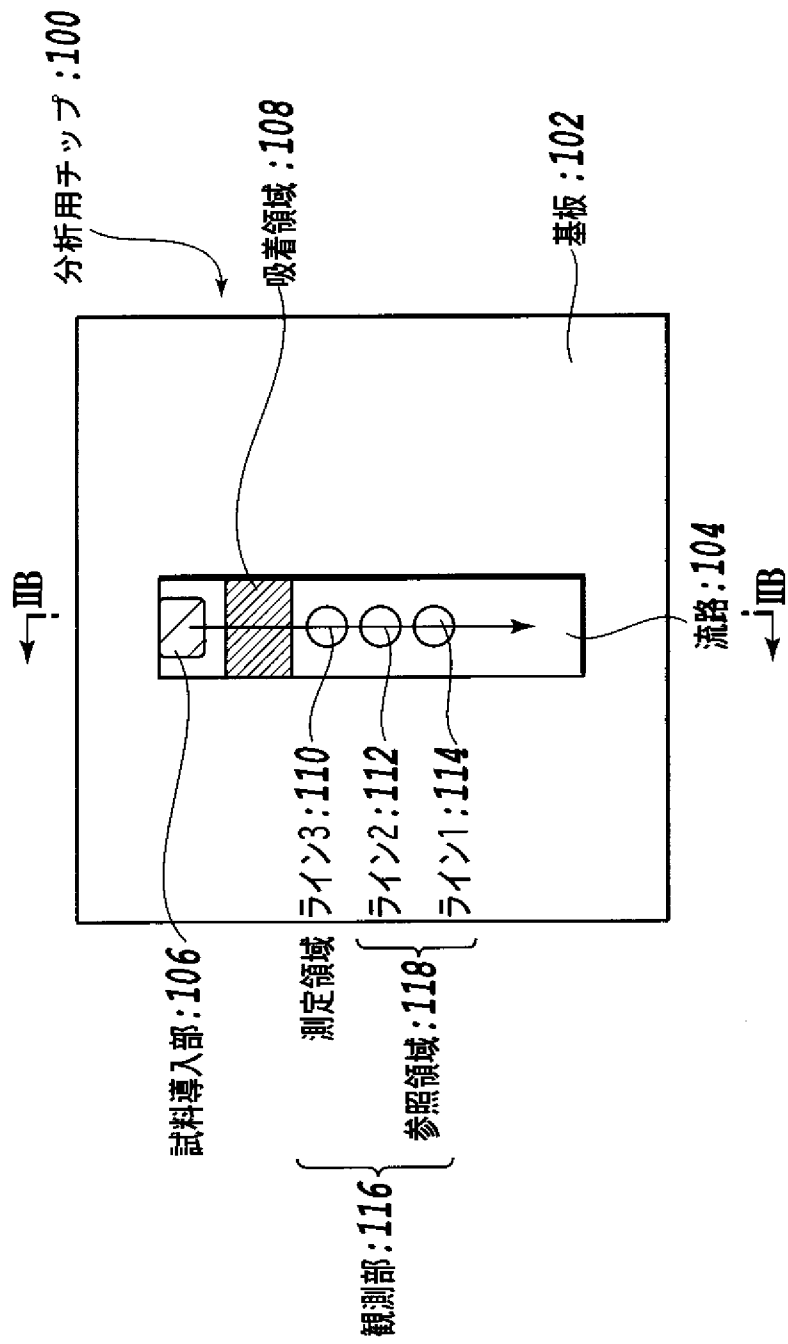
つ、前記第2の分子選択性物質が前記第1の分子選択性物質を構成する塩基の10%以下の塩基が置換されたものであることを特徴とする請求項3、10または18のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。

- [23] 前記測定領域および前記参照領域を1組とする観測部が基板上の流路内に複数設けられており、各観測部の測定領域には互いに異なる第1の分子選択性物質が固定化されており、観測部がそれぞれ異なる分子を検出できることを特徴とする請求項3、10または18のいずれか1項に記載の光学分析用チップ。

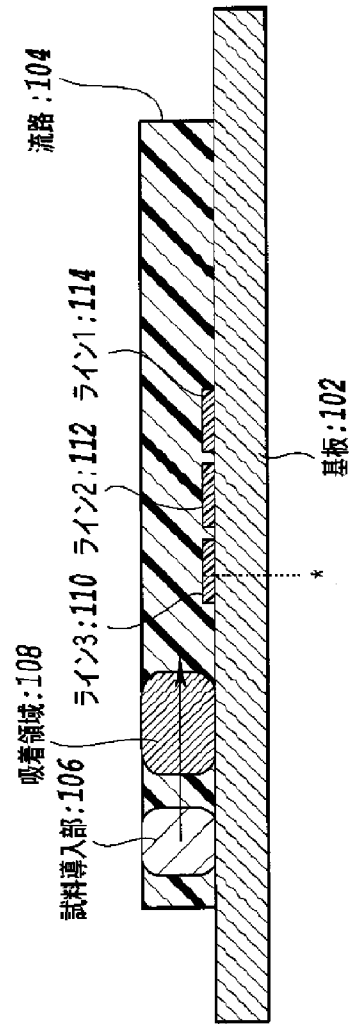
[図1]



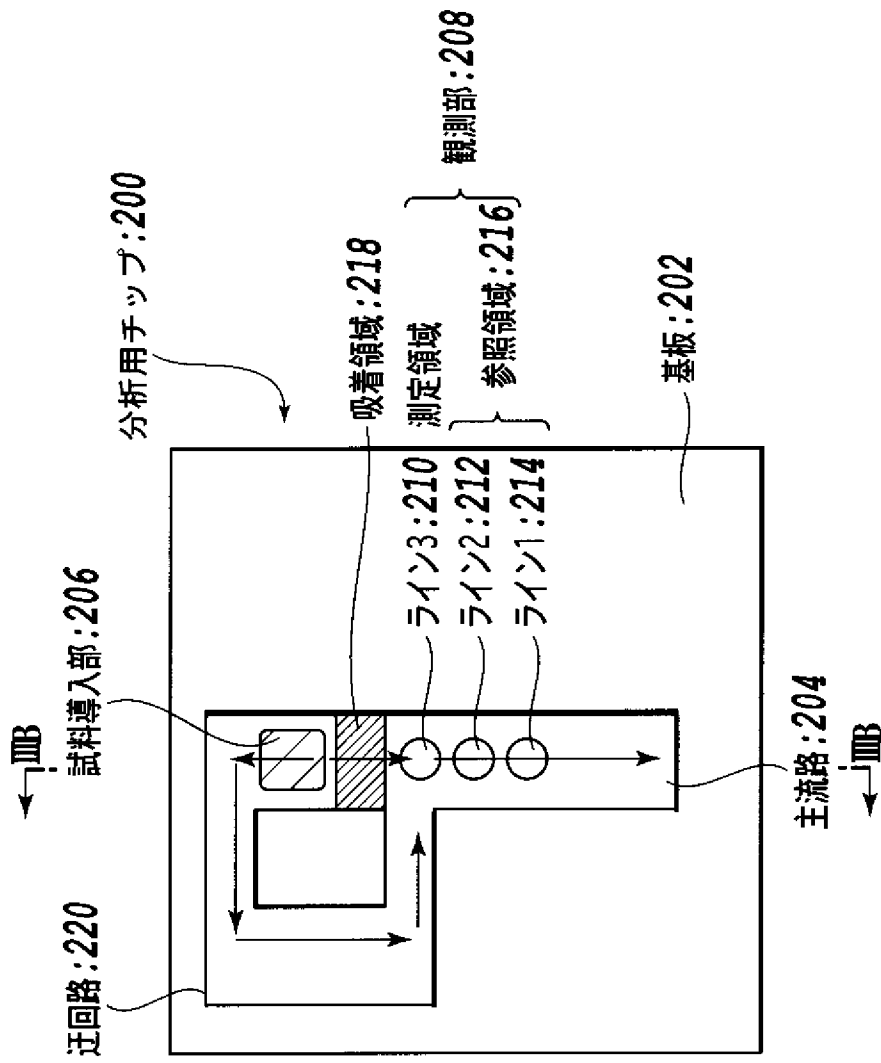
[図2A]



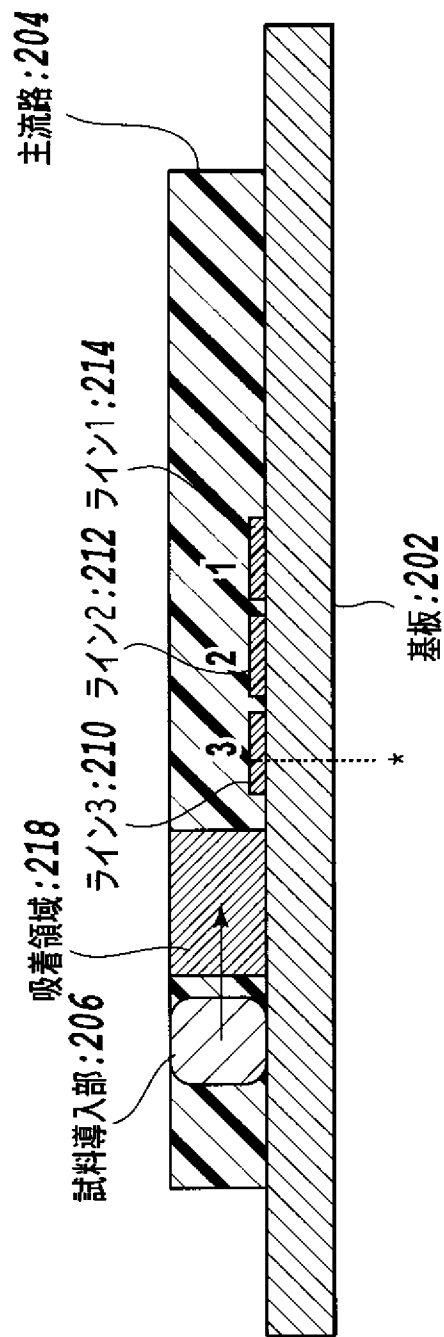
[図2B]



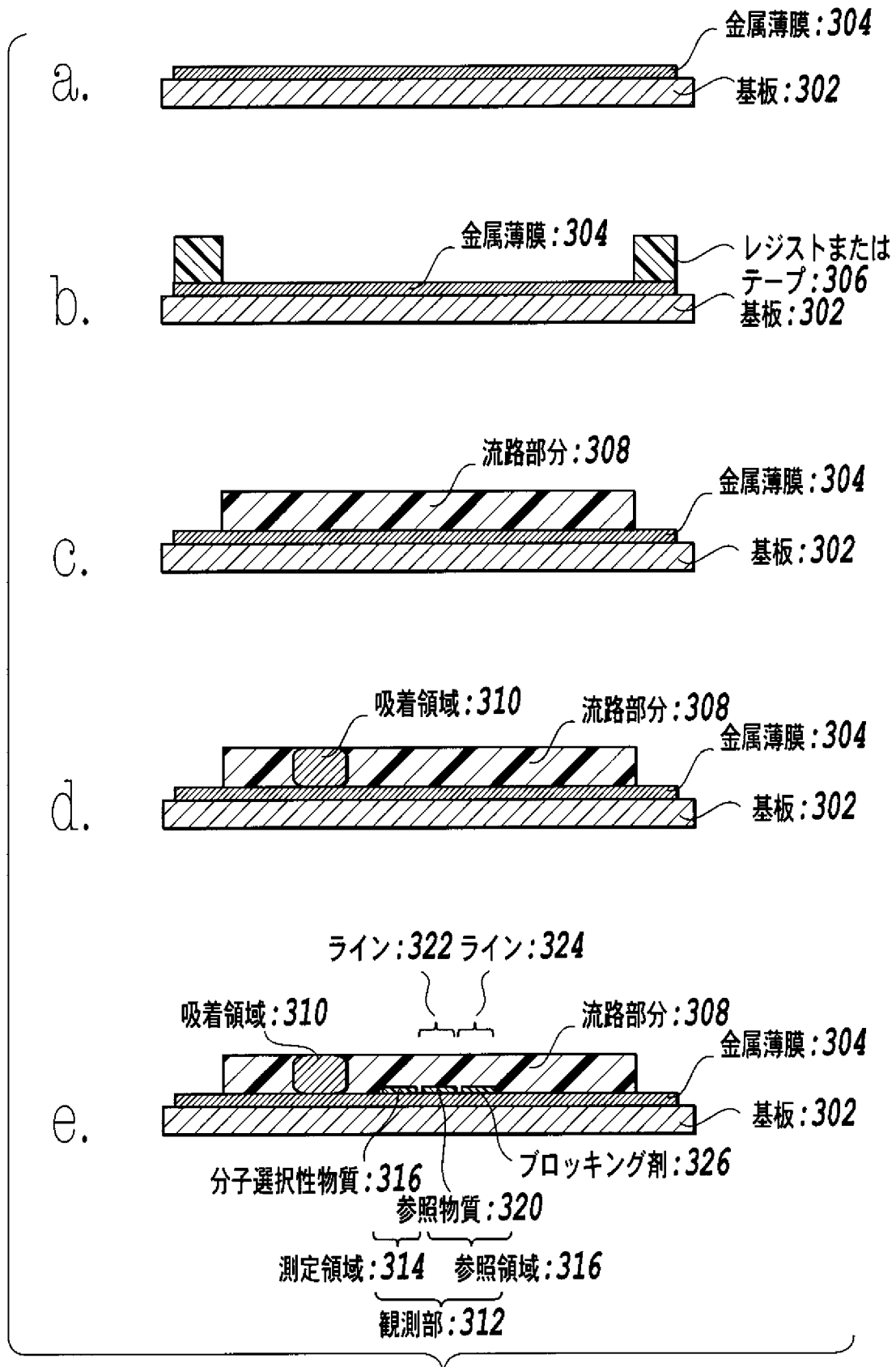
[図3A]



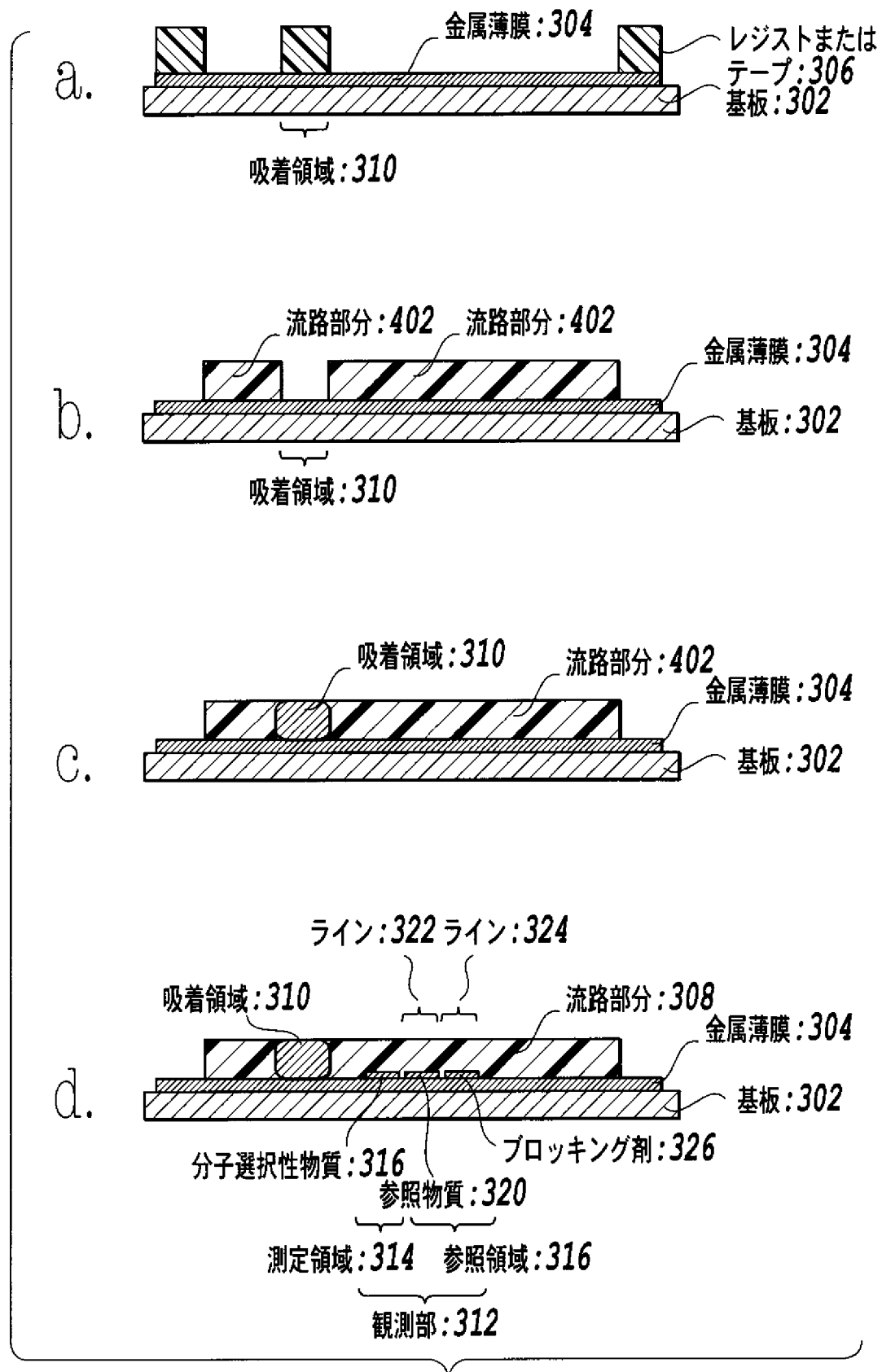
[図3B]



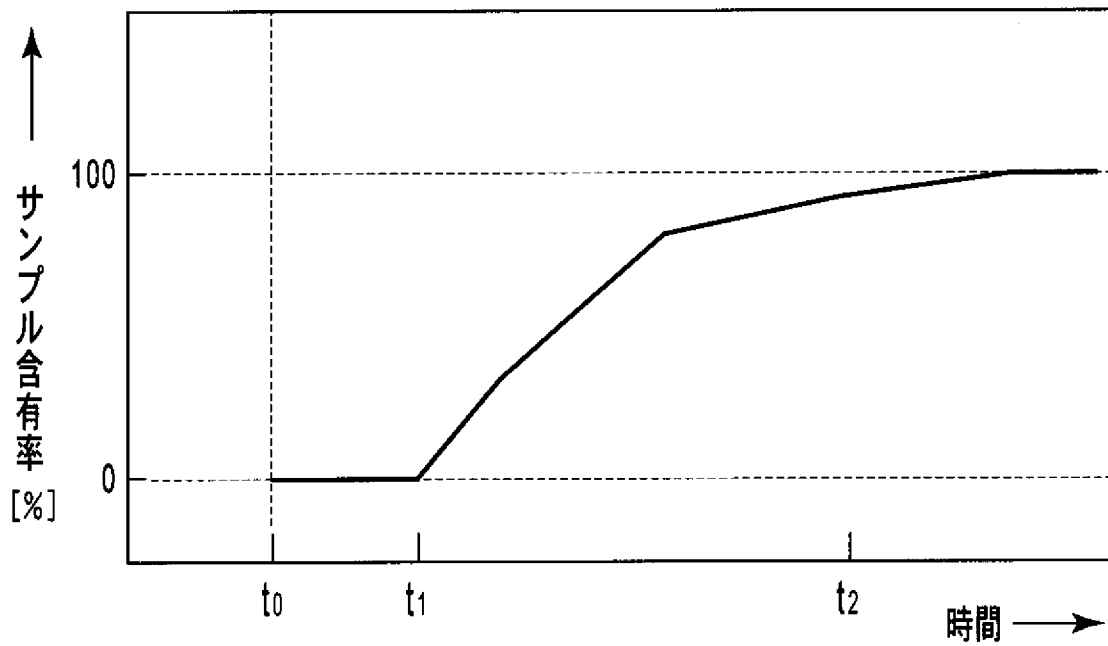
[図4]



[図5]

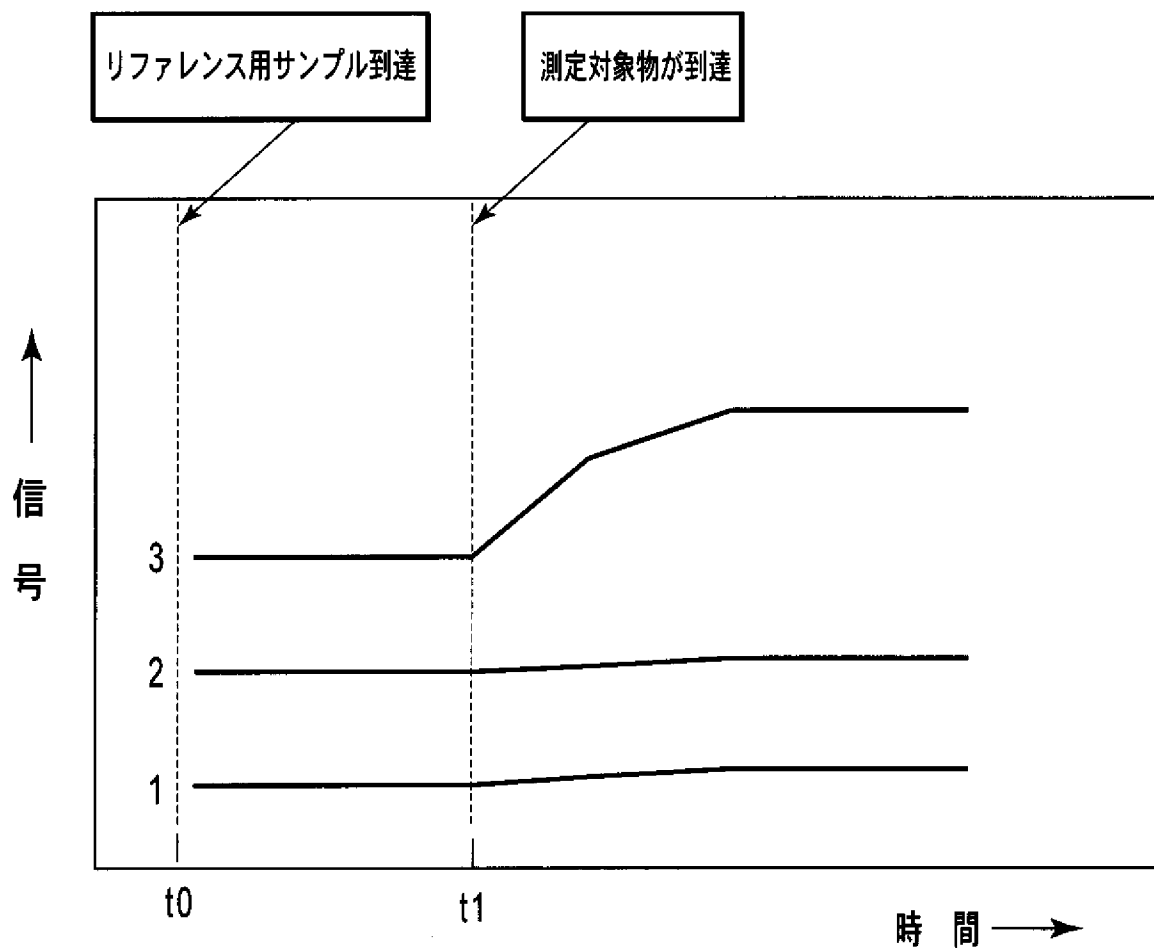


[図6]

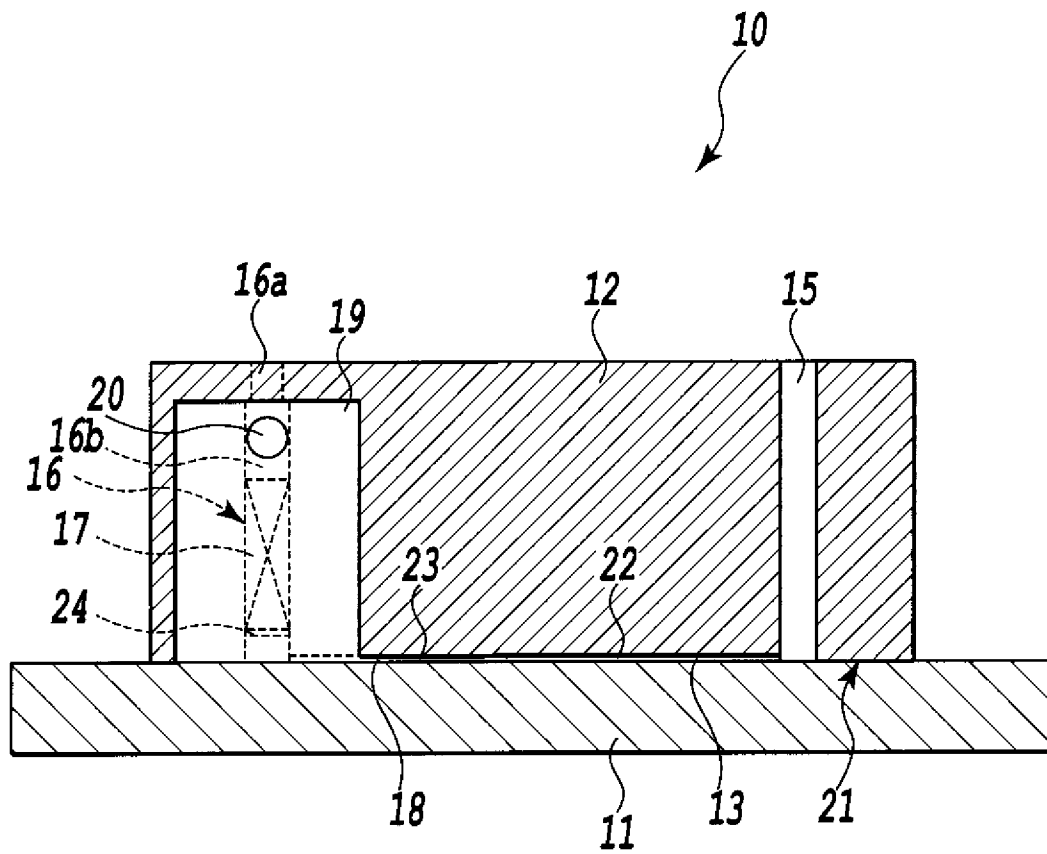


流路上の*の位置に到達する溶液中のサンプル
(測定対象物) 含有率の時間的变化

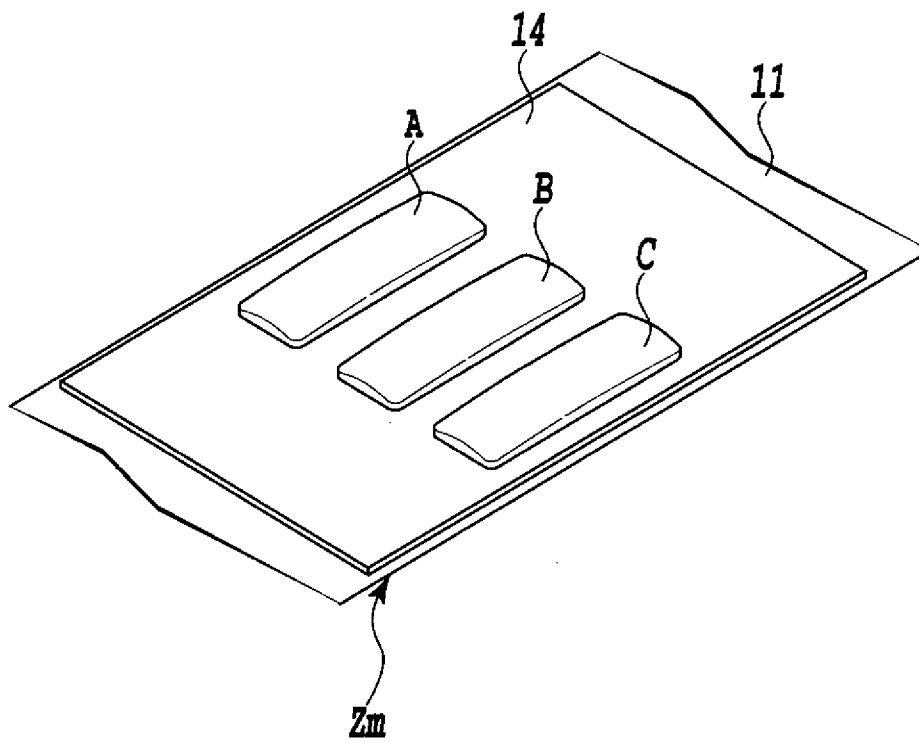
[図7]



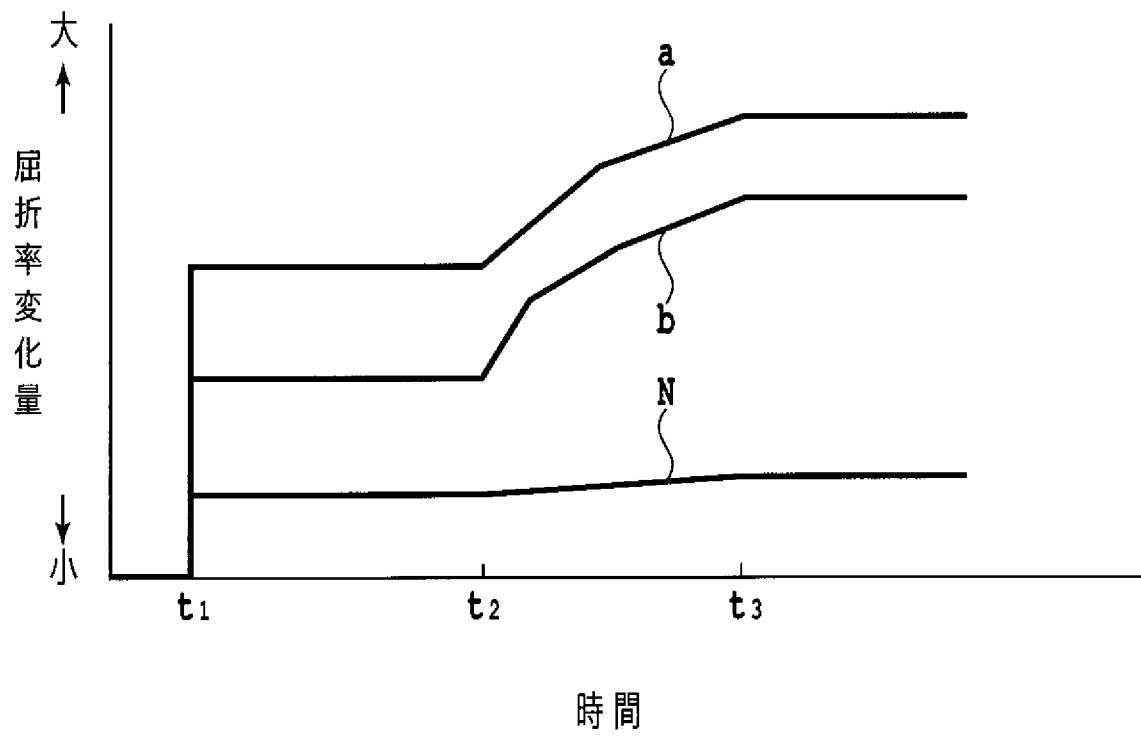
[図10]



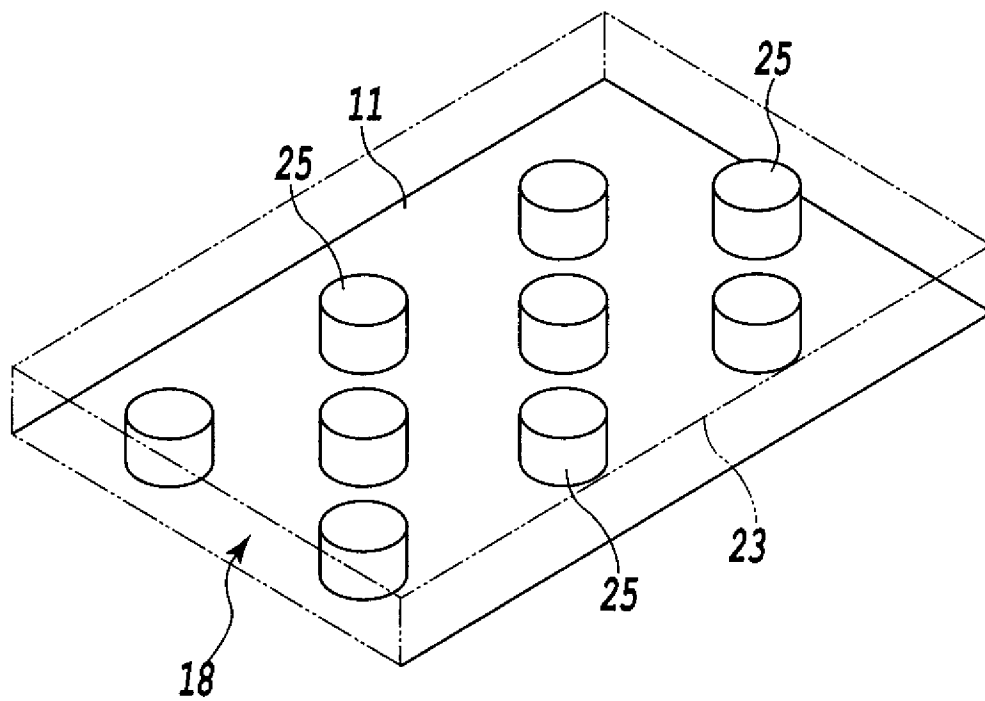
[図11]



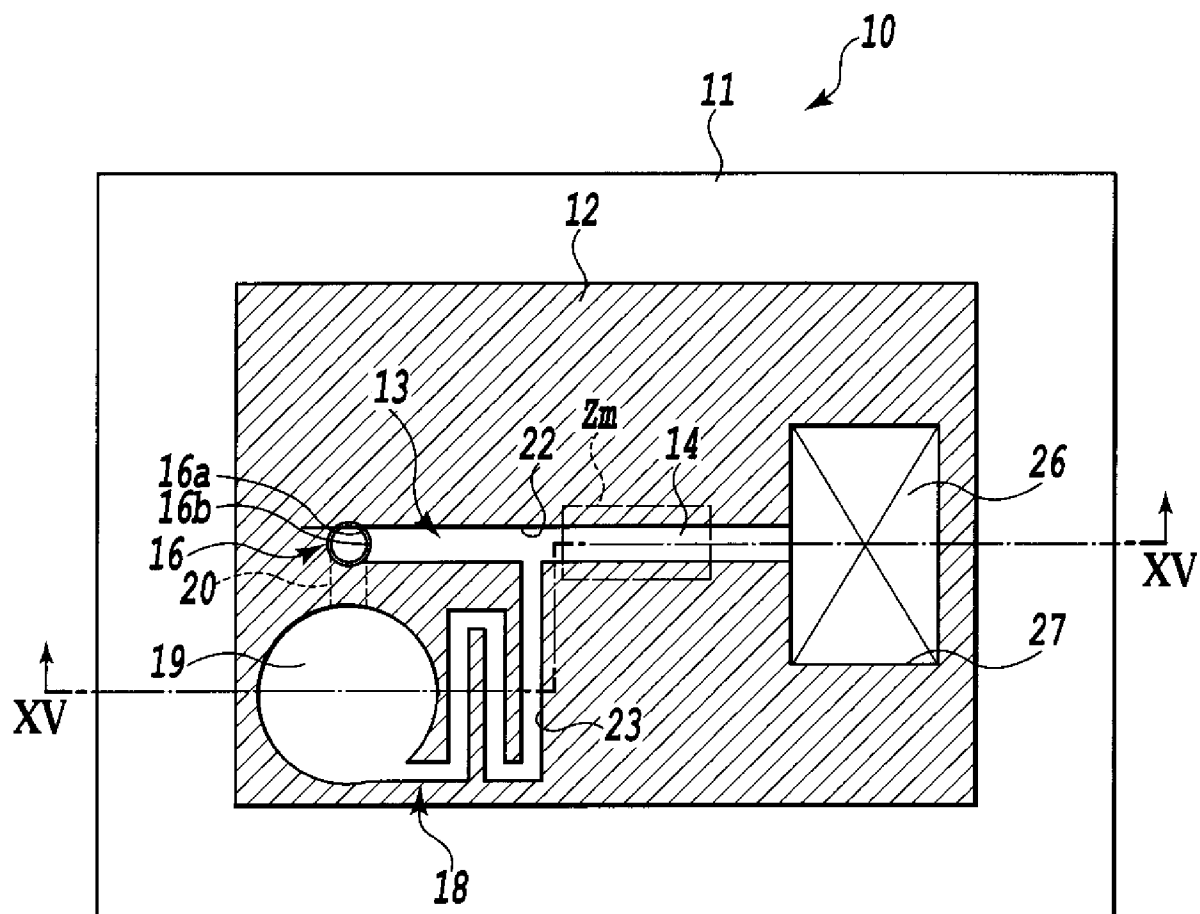
[図12]



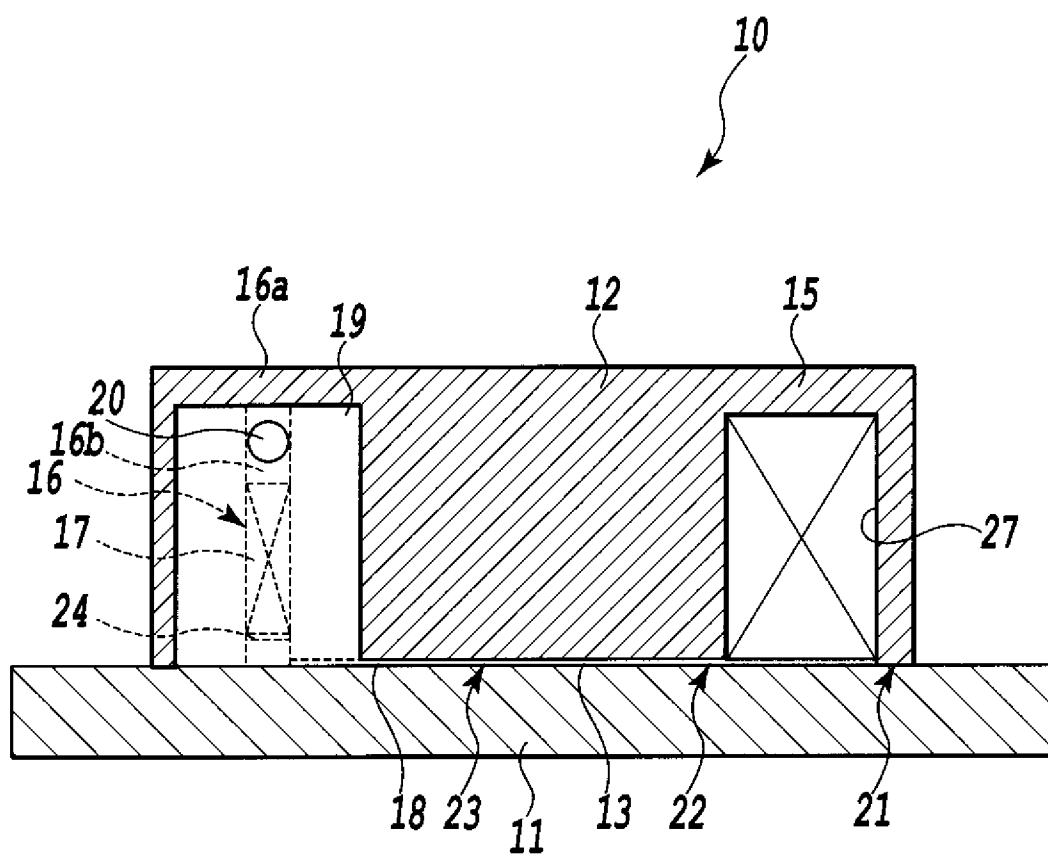
[図13]



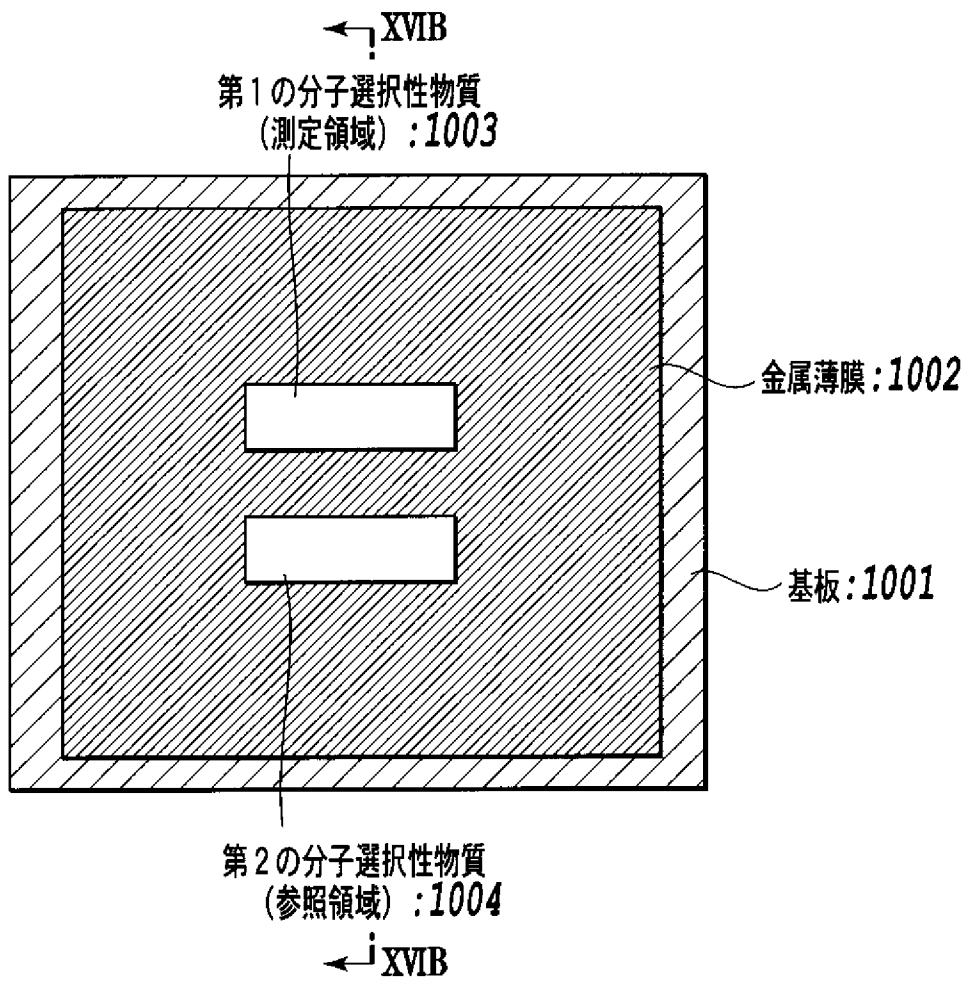
[図14]



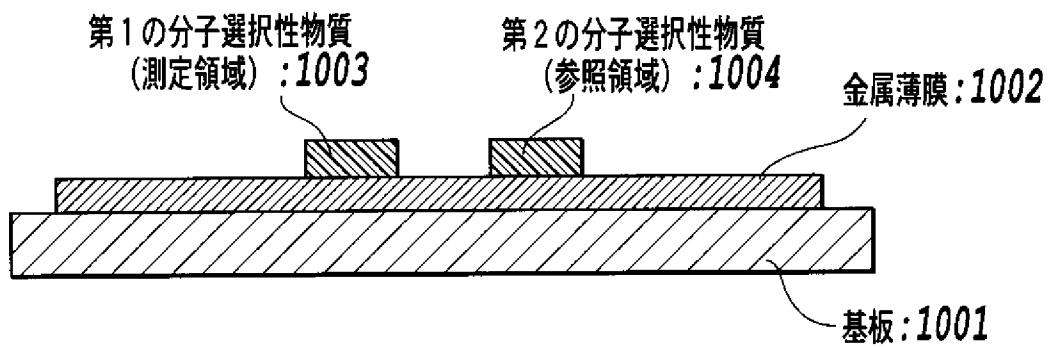
[図15]



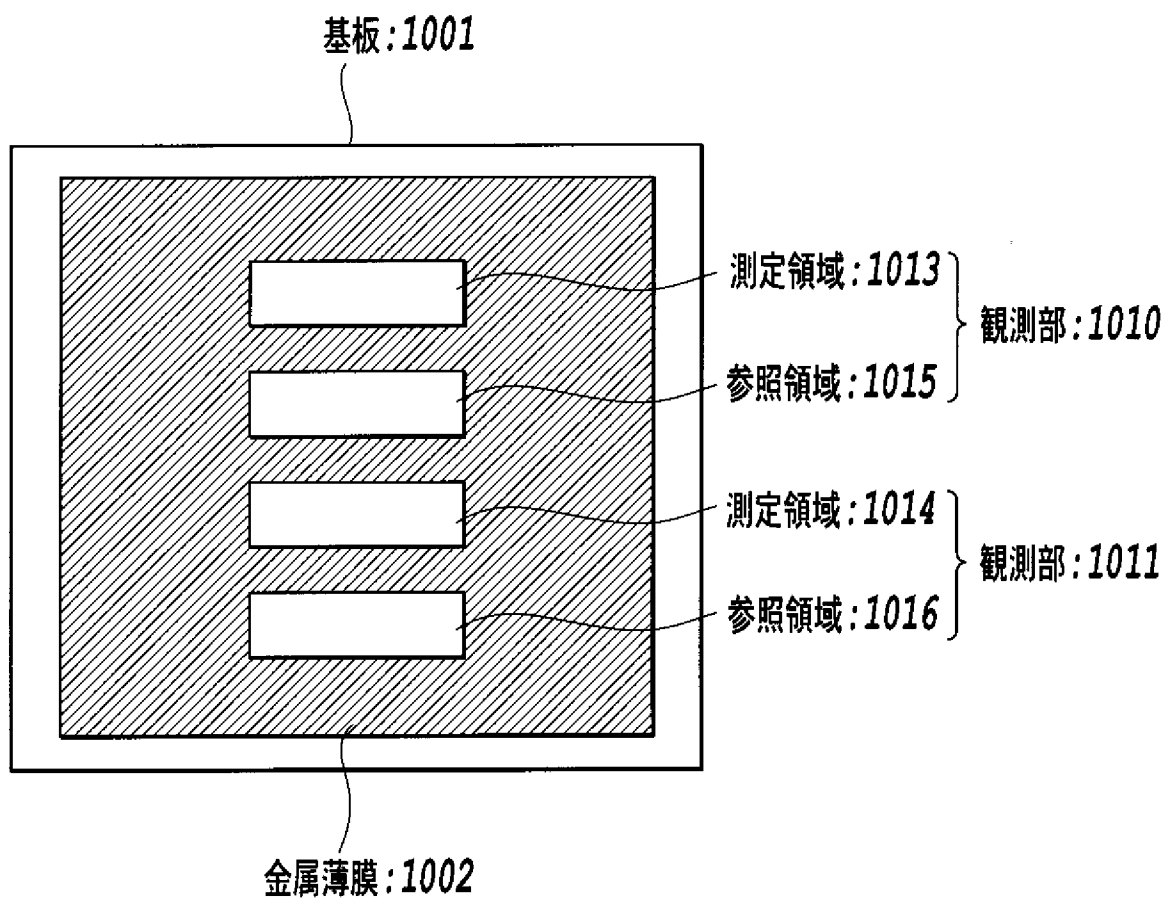
[図16A]



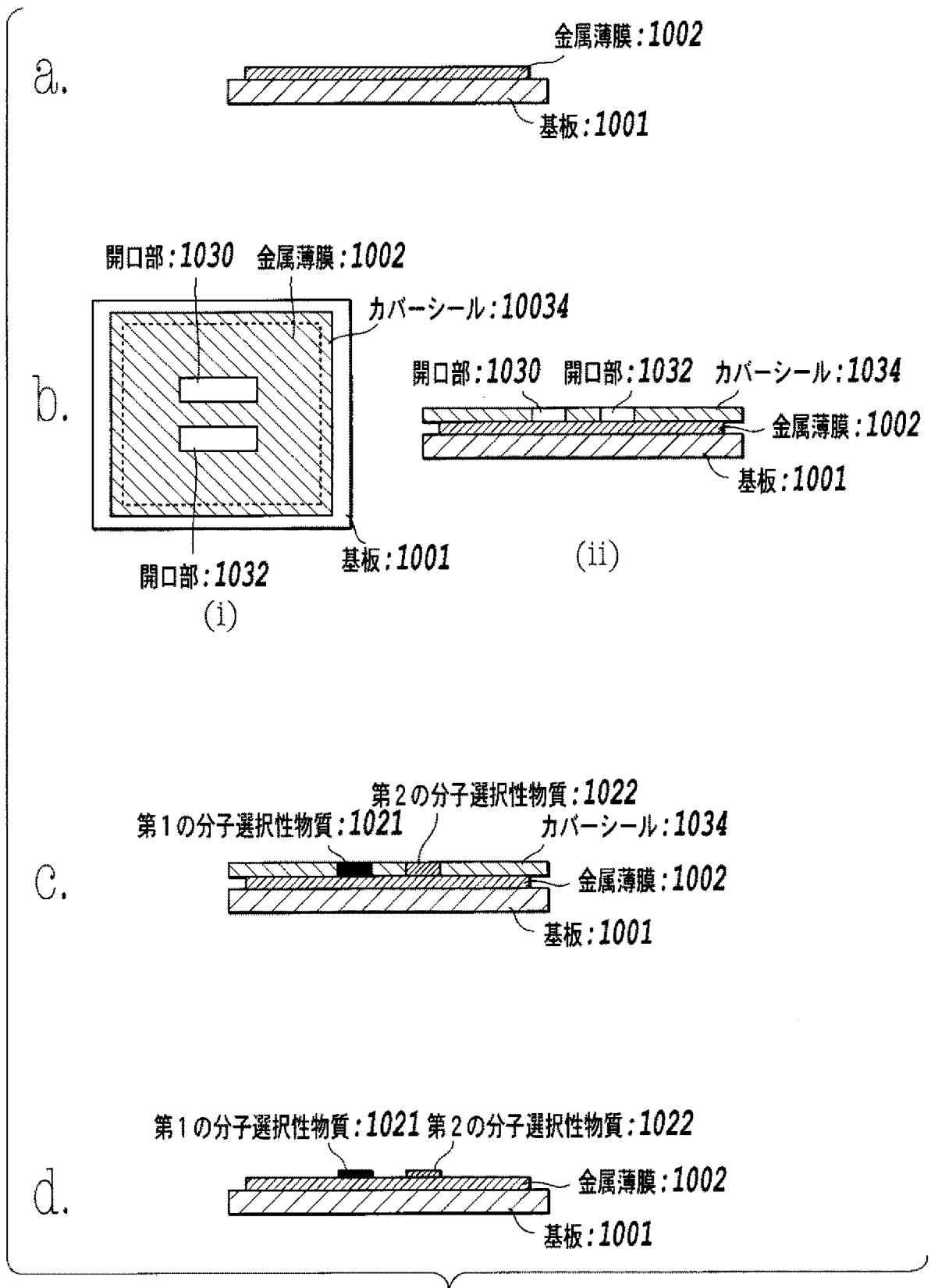
[図16B]



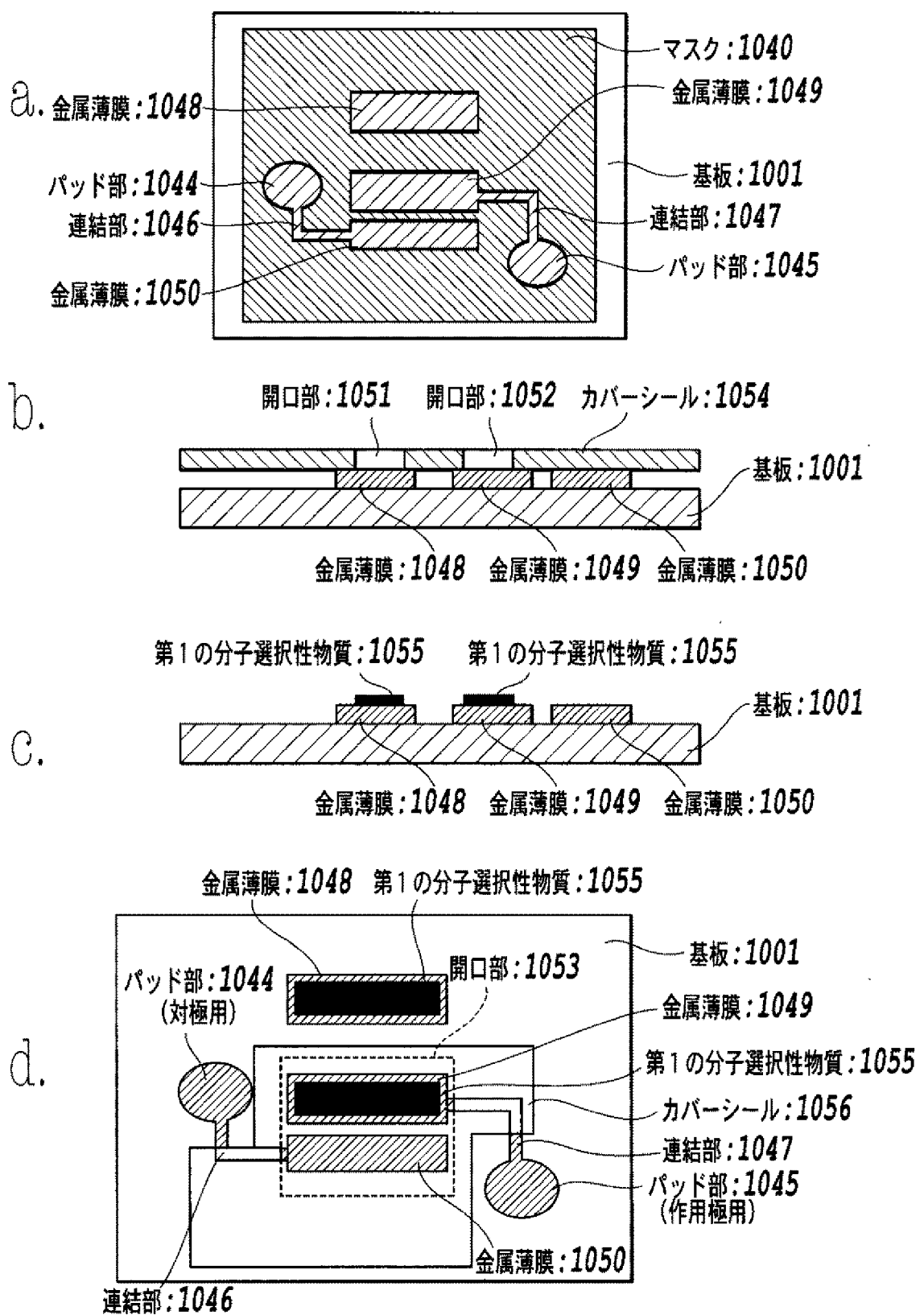
[図17]



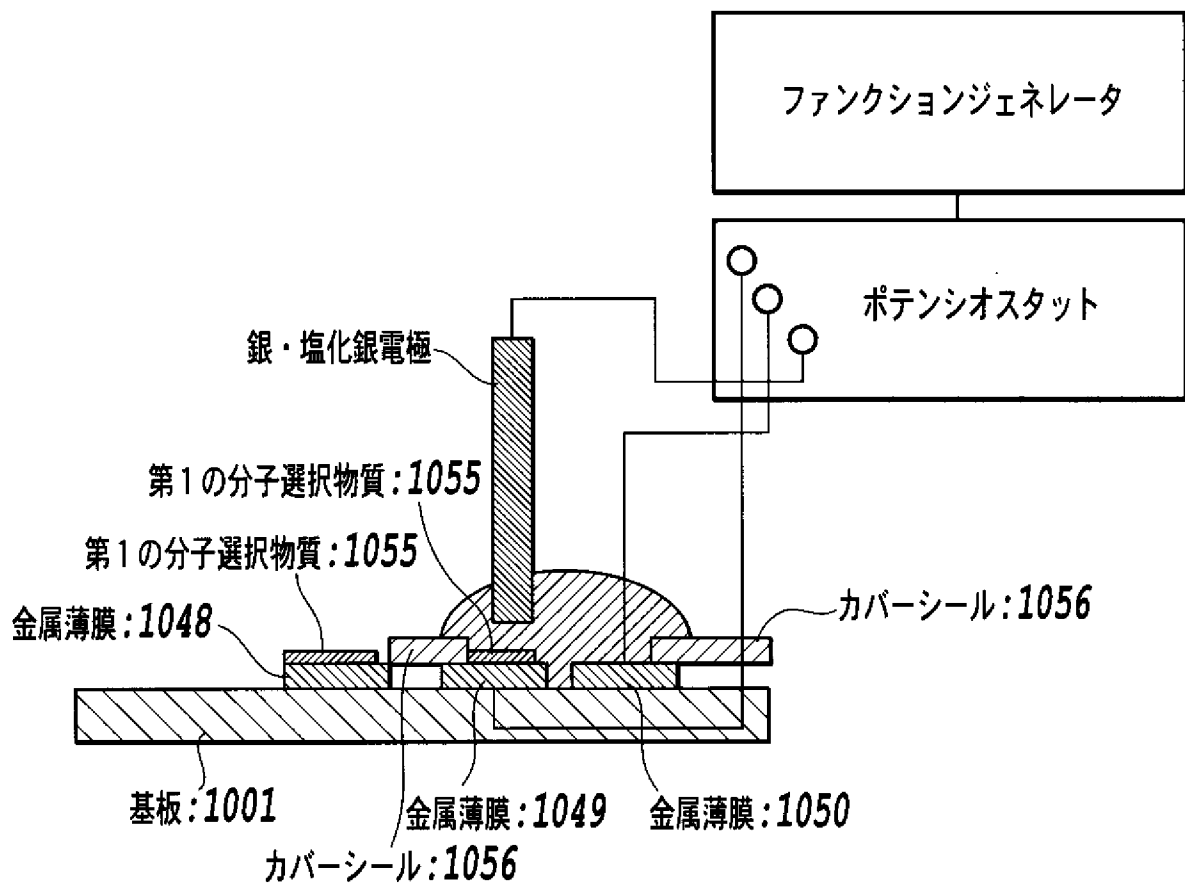
[図18]



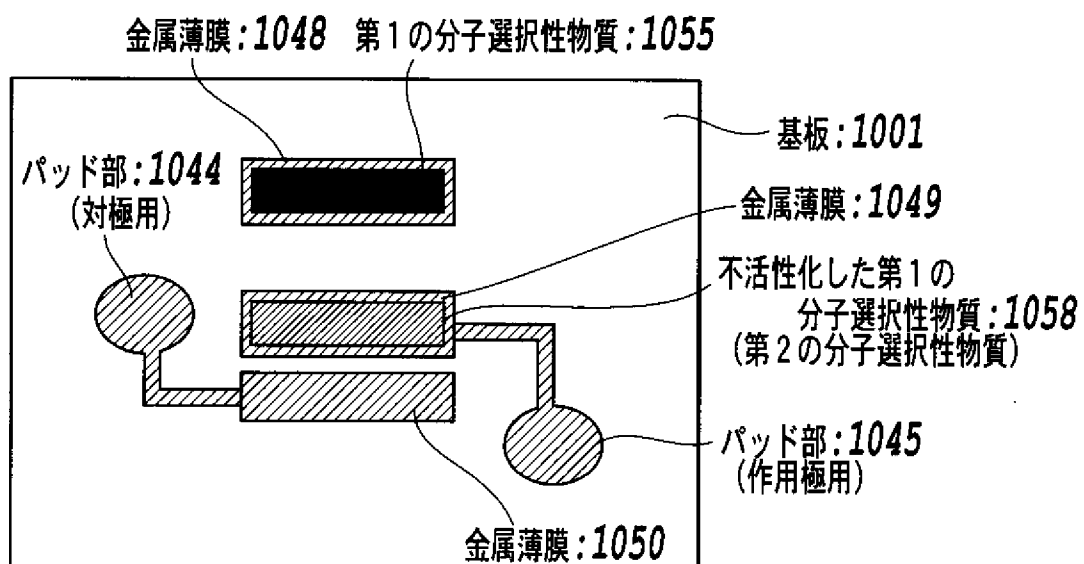
[図19]



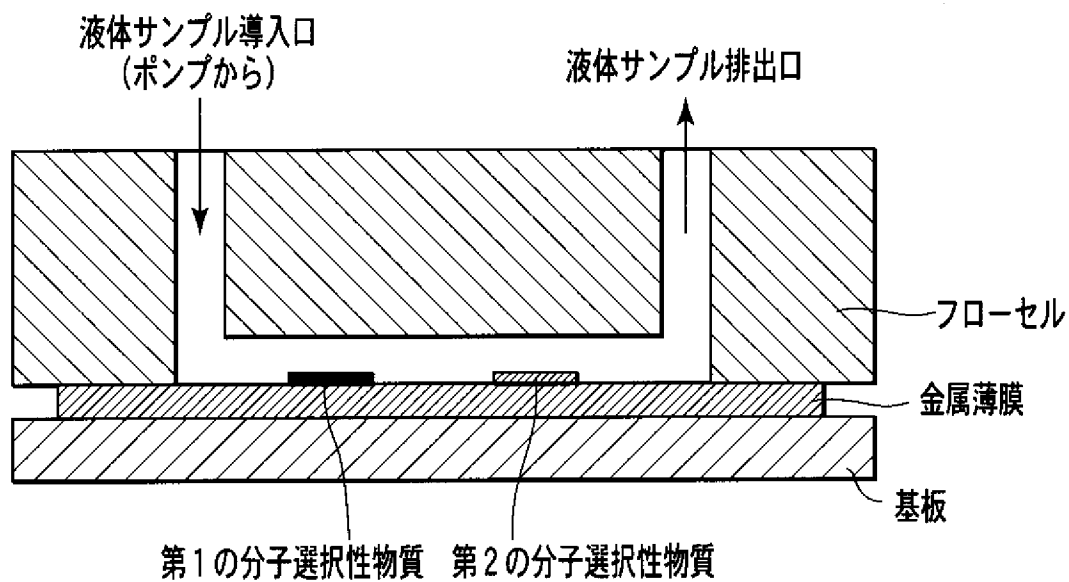
[図20A]



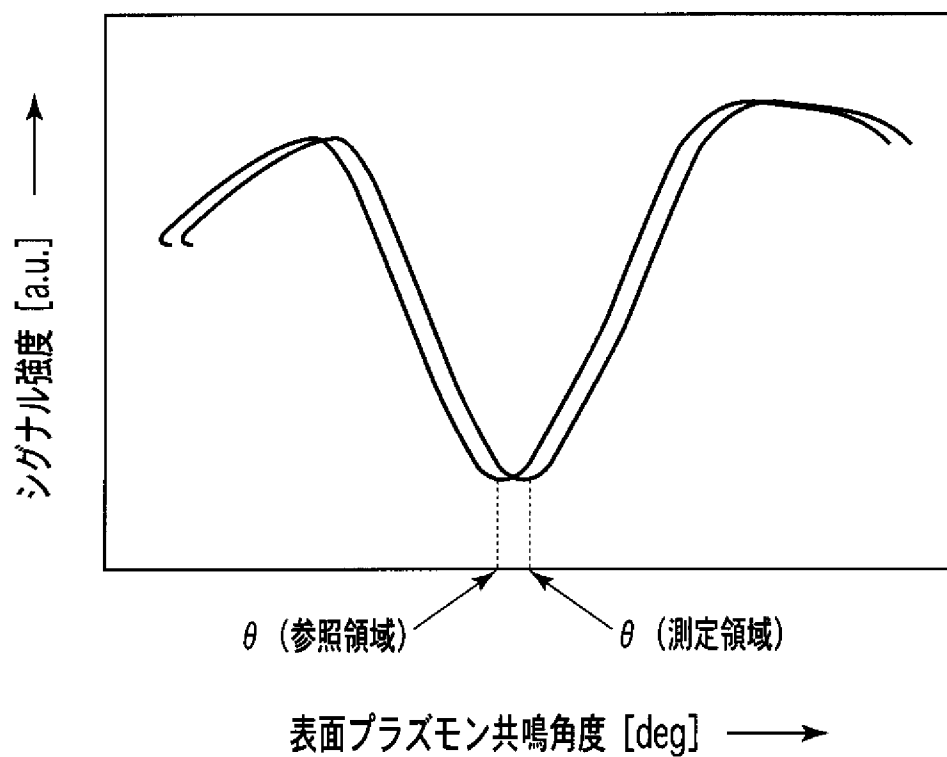
[図20B]



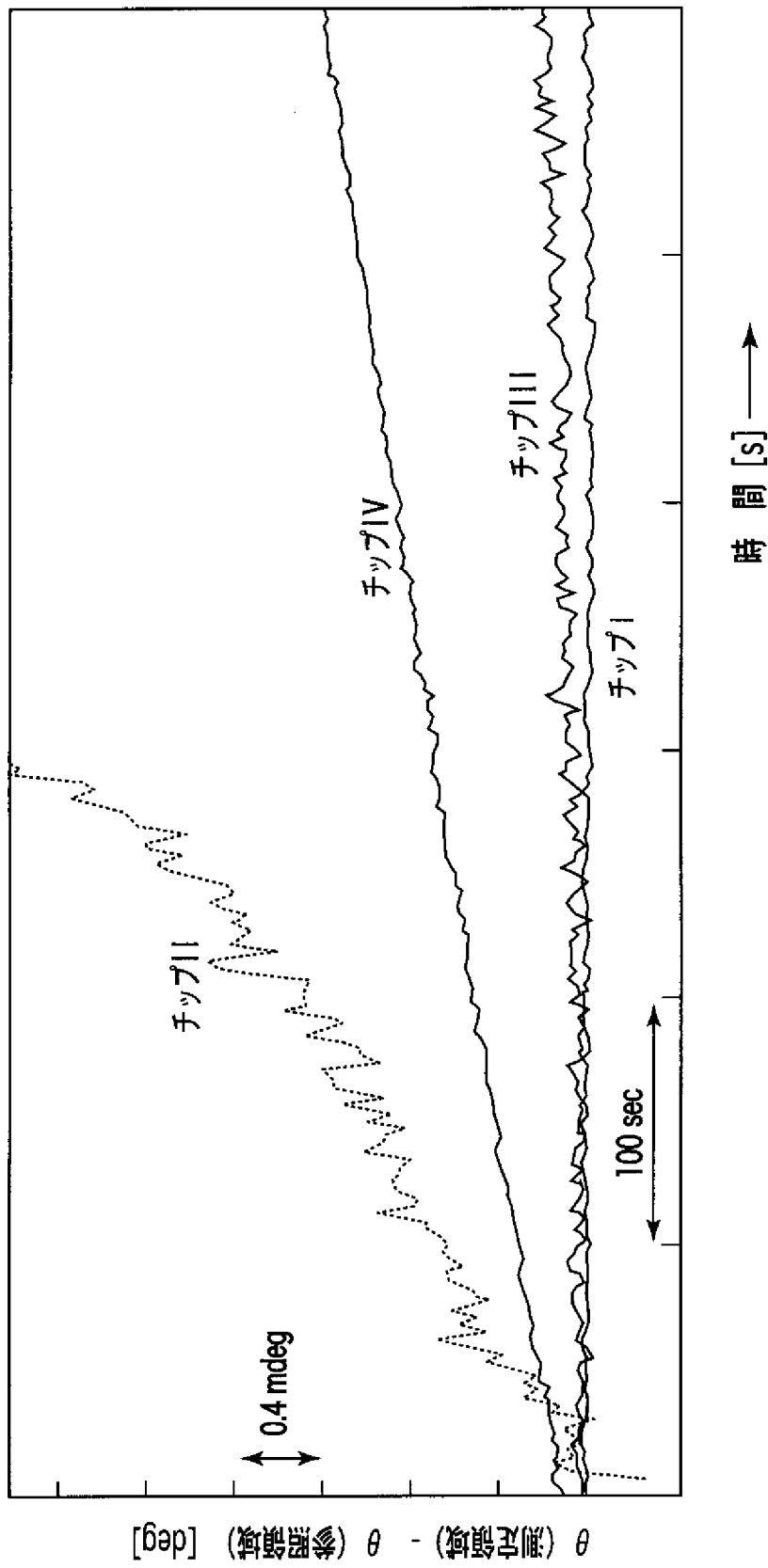
[図21]



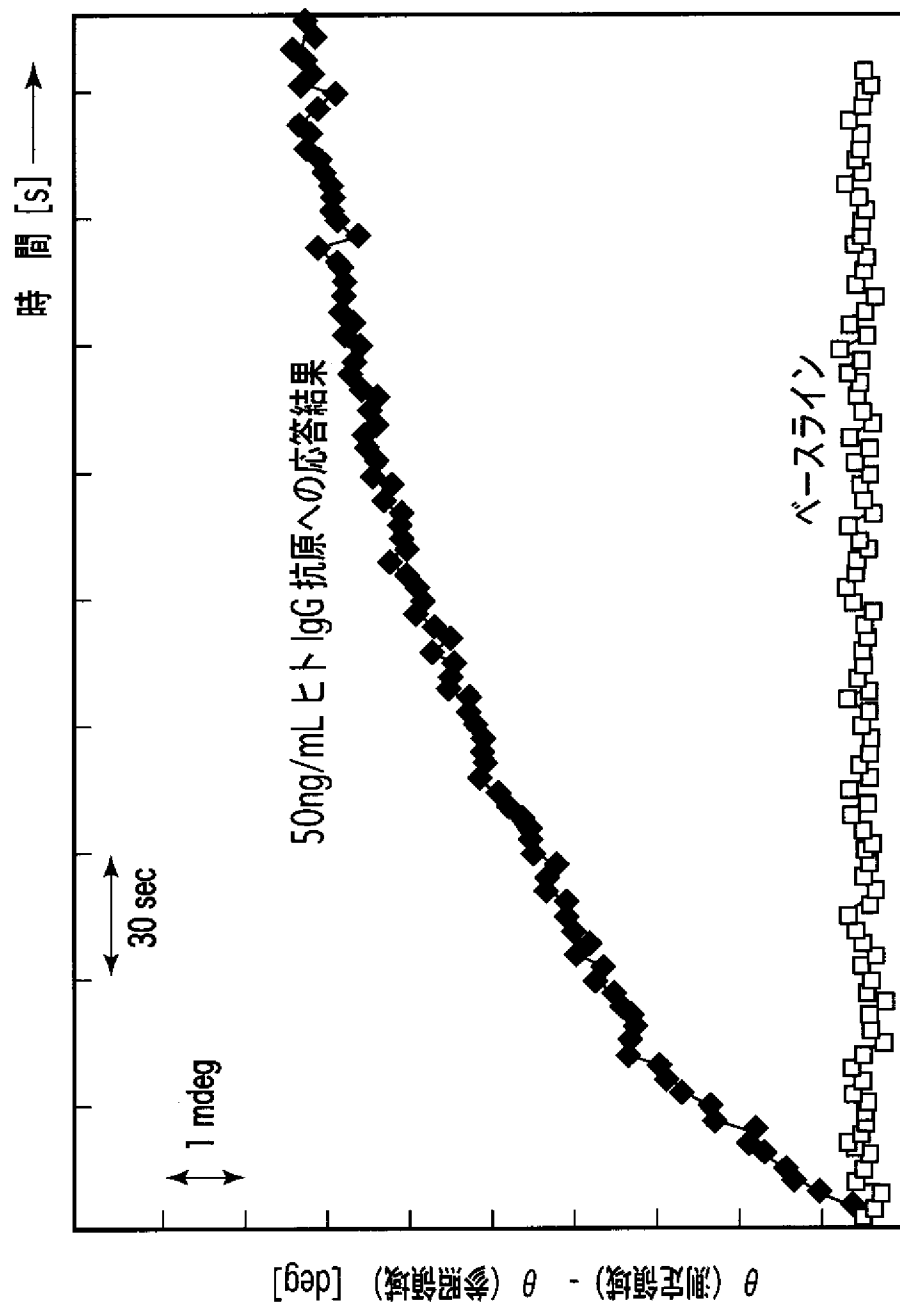
[図22]



[図23]



[図24]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/27(2006.01) i, G01N21/05(2006.01) i, G01N37/00(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/00-21/74, G01N33/48-33/98

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-053372 A (Omron Corp.), 19 February, 2004 (19.02.04), Full text; all drawings (Family: none)	1-23
A	JP 2003-121350 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 April, 2003 (23.04.03), Full text; all drawings & WO 03/014711 A1 & US 2004/0155309 A1 & EP 1424549 A1	1-23
A	JP 2006-098345 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 13 April, 2006 (13.04.06), Full text; all drawings & US 2006/0078985 A1 & EP 1643237 A1	18,20-23

☒ 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

"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

"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
03 September, 2007 (03.09.07)

Date of mailing of the international search report
11 September, 2007 (11.09.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061757

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 2005-283145 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 13 October, 2005 (13.10.05), Full text; all drawings & US 2005/0216205 A1	18, 20-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061757

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061757

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Document 1: JP 2004-053372 A (Omron Corp.), 19 February, 2004 (19.02.04), full text, all drawings

Document 1 discloses an invention on a surface plasmon resonance device-use sample cassette having a measurement specimen injecting inlet and a metal thin film for inspecting the quantity of an antibody adsorbed due to light reflectance (see paragraphs 0025-0040, Figs. 7-9, Fig. 13).

Accordingly, "the special technical feature" of the inventions in claims 1-17 relates to "including an adsorption region for adsorbing a measurement object material between a sample introducing unit and an observing unit", "the special technical feature" of the invention in claim 18 relates to "a measurement region including a measuring region where a first molecule selecting matter selectively interacting with a specific molecule is immobilized and a reference region where a second molecule selecting matter different only in selectivity to the specific molecule with which the first molecule selecting matter interact from the first molecule selecting matter but equivalent in other characteristics to it is immobilized, and to the immobilizing of the first molecule selecting matter and the second molecule selecting matter on a substrate by the same method".

Accordingly, these inventions are not considered to be so linked as to form a single general inventive concept, because there is no technical relationship among those inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
 Int.Cl. G01N21/27(2006.01)i, G01N21/05(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））
 Int.Cl. G01N21/00-21/74, G01N33/48-33/98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 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）
 JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)

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
A	JP 2004-053372 A（オムロン株式会社）2004.02.19, 全文、全図（ファミリーなし）	1-23
A	JP 2003-121350 A（三菱化学株式会社）2003.04.23, 全文、全図 & WO 03/014711 A1 & US 2004/0155309 A1 & EP 1424549 A1	1-23
A	JP 2006-098345 A（富士写真フイルム株式会社）2006.04.13, 全文、全図 & US 2006/0078985 A1 & EP 1643237 A1	18, 20-23

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献
--	---

国際調査を完了した日 0 3 . 0 9 . 2 0 0 7	国際調査報告の発送日 1 1 . 0 9 . 2 0 0 7		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 横尾 雅一	2W	3 7 1 6
	電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 9 2		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2005-283145 A (富士写真フイルム株式会社) 2005. 10. 13, 全文、 全図 & US 2005/0216205 A1	18, 20-23

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

別紙参照のこと。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄 別紙

文献１：JP 2004-053372 A（オムロン株式会社）2004.02.19, 全文、全図

文献１には、測定検体注入口と、光の反射率により吸着した抗体の量を検査する金属薄膜部とを有する表面プラズモン共鳴装置用試料カセットの発明が記載されている（段落００２５－段落００４０、図７－図９、図１３を参照）。

したがって、請求の範囲１－１７に係る発明の「特別な技術的特徴」は、「試料導入部と観測部の間の、測定対象物質を吸着する吸着領域を含むこと」に関し、

請求の範囲１８に係る発明の「特別な技術的特徴」は、「測定領域には特定の分子と選択的に相互作用する第１の分子選択性物質が固定化された測定領域と、前記第１の分子選択性物質が相互作用する特定の分子に対する選択性のみが異なり、他の特性は前記第１の分子選択性物質と同等である第２の分子選択性物質が固定化された参照領域と、前記第１の分子選択性物質と第２の分子選択性物質は、同じ方法で基板上に固定化されること」に関するものである。

よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。