(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6758620号
(P6758620)

(45)発行日　令和2年9月23日(2020.9.23)　(24)登録日　令和2年9月4日(2020.9.4)

(51)Int.Cl.			F I		
C12M	1/26	(2006.01)	C12M	1/26	ZNA
C12N	1/20	(2006.01)	C12N	1/20	Z
C12N	1/02	(2006.01)	C12N	1/02	
G01N	33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M

請求項の数 9　(全 14 頁)

(21)出願番号　特願2016-46302(P2016-46302)
(22)出願日　平成28年3月9日(2016.3.9)
(65)公開番号　特開2017-158484(P2017-158484A)
(43)公開日　平成29年9月14日(2017.9.14)
審査請求日　平成31年2月26日(2019.2.26)

（出願人による申告）革新的研究開発推進プログラム（ＩｍＰＡＣＴ）「ナノ・マイクロポアを用いたＩｎＳＥＣＴシステムの開発」に係る委託業務、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願

(73)特許権者　504139662
国立大学法人東海国立大学機構
愛知県名古屋市千種区不老町１番
(73)特許権者　504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘１番１号
(73)特許権者　504145342
国立大学法人九州大学
福岡県福岡市西区元岡７４４
(73)特許権者　304021417
国立大学法人東京工業大学
東京都目黒区大岡山２丁目１２番１号
(74)代理人　100167689
弁理士　松本　征二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ナノワイヤデバイス、該ナノワイヤデバイスを含む分析装置、サンプルの加熱処理方法及びサンプルの分離方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
導電体層、一対の電極、および、ナノワイヤを含むナノワイヤデバイスであって、
前記ナノワイヤは前記導電体層上に形成され、且つ、前記ナノワイヤの一端が前記導電体層表面に接するように形成され、
前記一対の電極は、前記導電体層に接するように形成されている、
ナノワイヤデバイス。
【請求項２】
電気絶縁性基板を更に含み、
該電気絶縁性基板上に、前記導電体層の少なくとも一部が積層されている、
請求項１に記載のナノワイヤデバイス。
【請求項３】
前記導電体層が、前記電気絶縁性基板上に積層され、
前記一対の電極が、前記導電体層の上に形成されている、
請求項２に記載のナノワイヤデバイス。
【請求項４】
前記一対の電極が前記電気絶縁性基板上に形成され、
前記導電体層の一部が前記一対の電極の上に積層され、前記導電体層の他の部分が前記電気絶縁性基板上に積層されている、
請求項２に記載のナノワイヤデバイス。

【請求項５】
前記ナノワイヤが、捕捉対象サンプルを特異的に認識するペプチド及び／又は核酸で修飾されている、
請求項１～４の何れか一項に記載のナノワイヤデバイス。
【請求項６】
前記ペプチドが、加熱によりナノワイヤから離脱するペプチドである、
請求項５に記載のナノワイヤデバイス。
【請求項７】
請求項１～６の何れか一項に記載のナノワイヤデバイス、
分析部、
を含む分析装置。
【請求項８】
請求項１～５の何れか一項に記載のナノワイヤデバイスと、サンプルが含まれる溶液とを接触させるサンプル接触工程、
前記ナノワイヤデバイスの一対の電極に通電することで、導電体層を介してナノワイヤを加熱するナノワイヤ加熱工程、
加熱したナノワイヤでサンプルを加熱処理するサンプル加熱処理工程、
を含む、サンプルの加熱処理方法。
【請求項９】
請求項６に記載のナノワイヤデバイスと、捕捉対象サンプルが含まれる溶液とを接触させるサンプル捕捉工程、
前記ナノワイヤデバイスの一対の電極に通電することで、導電体層を介してナノワイヤを加熱するナノワイヤ加熱工程、
ナノワイヤを加熱することで、捕捉対象サンプルを捕捉したペプチドをナノワイヤから離脱させるサンプル離脱工程、
を含む、サンプルの分離方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ナノワイヤデバイス、該ナノワイヤデバイスを含む分析装置、サンプルの加熱処理方法及びサンプルの分離方法に関する。特に、導電体上にナノワイヤを形成し、導電体を介してナノワイヤを加熱できるナノワイヤデバイス、該ナノワイヤデバイスを含む分析装置、サンプルの加熱処理方法及びサンプルの分離方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
大気中、水中に含まれる細胞、ウィルス、真菌、細菌等（以下、「細菌等」と記載することがある。）は、ヒトなどの生体の健康状態に影響を与える可能性が指摘されている。そのため、ヒトが安全で快適な生活を送るために、大気中、水中に含まれる細菌等を分析したり、死滅させる必要がある。また、医学の分野では、生体サンプル中に含まれる細胞の大きさ、種類等を分析することで病気の診断を行っている。
【０００３】
細菌等を分析する方法としては、例えば、シリコン等の基板上に形成した細孔（マイクロポア）にサンプルを通過させ、細孔に印加した電圧によって細孔の内部を流れる定常電流の変化を測定する分析装置（非特許文献１参照）、マイクロ流路を形成した基板を横置きにし、サンプルが流路を通過する時の定常電流を測定する分析装置（非特許文献２参照）等が知られている。
【０００４】
ところで、分析装置で細菌等の分析を行う際には、分析のノイズを減少させるため、標的となる細菌等とその他の細菌等を分離・濃縮することが望ましい。細菌等の分離・濃縮方法としては、特定の温度（転移温度）以上では親水性を示し、その温度以下では疎水性

を示す感温性担体と、前記担体の表面に付着した、標的細胞に対する抗原結合構造を有する物質を結合した捕集細胞とを含む細胞分離キットを用い、温度制御により標的細胞を分離する方法が知られている（特許文献１参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【特許文献１】特開２００４－７３１１２号公報

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｗａｓｅｅｍ Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｌａｂ ｏｎ ａ Ｃｈｉｐ，Ｖｏｌ．１２，ｐｐ．２３４５－２３５２，２０１２

【非特許文献２】Ｎａｏｙａ．Ｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｔｒａｃｋｉｎｇ ｓｉｎｇｌｅ－ｐａｒｔｉｃｌｅ ｄｙｎａｍｉｃｓ ｖｉａ ｃｏｍｂｉｎｅｄ ｏｐｔｉｃａｌ ａｎｄ ｅｌｅｃｔｒｉｃａｌ ｓｅｎｓｉｎｇ”，ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ ＲＥＰＯＲＴＳ，Ｖｏｌ．３，ｐｐ．１－７，２０１３

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

抗原抗体反応等を利用して、標的となる細菌等のみを捕捉することは、上記特許文献１に記載されている等、良く知られた技術である。ところで、サンプル中の標的となる細菌等を捕捉した後は、捕捉目的に応じた処理を実施する。例えば、捕捉した細菌等を殺菌する場合は、捕捉した細菌等が死滅するまで加熱処理する必要があり、捕捉した細菌等を分離する場合は所定の方法により分離する必要がある。

【０００８】

しかしながら、特許文献１に記載されている分離方法は、容器内の液相中にビーズを分散して標的細胞を捕捉している。そのため、捕捉後に標的細胞を分離する場合、先ずビーズに捕捉した細胞を、メッシュを用いて未反応の細胞と分離し、その後にビーズから標的細胞を分離する必要があるため、操作が煩雑となる問題がある。更に、特許文献１に記載されている発明は、ビーズを分散している液相全体を加熱することでビーズから標的細胞を分離している。そのため、ビーズに捕捉した細胞を分離するために大きなエネルギーを要すると共に、迅速な分離が難しいという問題がある。現在のところ、ビーズ等の担体を、直接加熱できるデバイスは知られていない。

【０００９】

本発明は、上記従来の問題を解決するためになされた発明であり、鋭意研究を行ったところ、（１）絶縁性基板に導電体層を積層し、該導電体層の上にナノワイヤを形成し、そして導電体層に接するように一対の電極を形成したデバイスを作製する、（２）そして、一対の電極に通電することで、ナノワイヤを加熱できること、（３）また、通電する電流量を変えることでナノワイヤの加熱温度を調整できること、を新たに見出し、本発明を完成した。

【００１０】

すなわち、本発明の目的は、ナノワイヤの温度調整が可能なナノワイヤデバイス、該ナノワイヤデバイスを含む分析装置、サンプルの加熱処理方法及びサンプルの分離方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本発明は、以下に示す、ナノワイヤデバイス、該ナノワイヤデバイスを含む分析装置、サンプルの加熱処理方法及びサンプルの分離方法に関する。

【００１２】

（１）絶縁性基板、

該絶縁性基板上に、少なくとも一部が積層された導電体層、

該導電体層上に形成されたナノワイヤ、及び、
前記導電体層に接するように形成された一対の電極、
を含むナノワイヤデバイス。
（２）前記導電体層が、前記絶縁性基板上に積層され、
前記一対の電極が、前記導電体層の上に形成されている、
上記（１）に記載のナノワイヤデバイス。
（３）前記一対の電極が前記絶縁性基板上に形成され、
前記導電体層の一部が前記一対の電極の上に積層され、前記導電体層の他の部分が前記絶縁性基板上に積層されている、
上記（１）に記載のナノワイヤデバイス。
（４）前記ナノワイヤが、捕捉対象サンプルを特異的に認識するペプチド及び／又は核酸で修飾されている、
上記（１）～（３）の何れか一に記載のナノワイヤデバイス。
（５）前記ペプチドが、加熱によりナノワイヤから離脱するペプチドである、
上記（４）に記載のナノワイヤデバイス。
（６）上記（１）～（５）の何れか一に記載のナノワイヤデバイス、
分析部、
を含む分析装置。
（７）上記（１）～（４）の何れか一に記載のナノワイヤデバイスと、サンプルが含まれる溶液とを接触させるサンプル接触工程、
前記ナノワイヤデバイスの一対の電極に通電することで、導電体を介してナノワイヤを加熱するナノワイヤ加熱工程、
加熱したナノワイヤでサンプルを加熱処理するサンプル加熱処理工程、
を含む、サンプルの加熱処理方法。
（８）上記（５）に記載のナノワイヤデバイスと、捕捉対象サンプルが含まれる溶液とを接触させるサンプル捕捉工程、
前記ナノワイヤデバイスの一対の電極に通電することで、導電体を介してナノワイヤを加熱するナノワイヤ加熱工程、
ナノワイヤを加熱することで、捕捉対象サンプルを捕捉したペプチドをナノワイヤから離脱させるサンプル離脱工程、
を含む、サンプルの分離方法。
【発明の効果】
【００１３】
本発明のナノワイヤデバイスは、電極に通電する電流量を変えることで、ナノワイヤの加熱温度を調整することができる。したがって、ナノワイヤデバイスを細菌等の死滅や分離等、多様な用途に用いることができる。
また、導電体を介してナノワイヤ自身が加熱することから、従来のビーズを用いた分離方法と比較して、操作性が向上する。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】図１（Ａ）は、本発明のデバイス１の概略を説明するための断面図である。図１（Ｂ）は本発明のデバイス１の他の構成を示す断面図である。
【図２】図２（Ａ）～（Ｃ）は、捕捉対象サンプルを特異的に認識するペプチド及び／又は核酸でナノワイヤを修飾する例を示している。
【図３】図３（Ａ）は、デバイス１に被せるカバー部材８の概略を示す図で、図３（Ｂ）は図３（Ａ）のＡ－Ａ断面図である。
【図４】図４（Ａ）は図面代用写真で、作製したデバイス１の写真である。また、図４（Ｂ）は図面代用写真で、図４（Ａ）の一対の電極５の間部分の拡大写真である。
【図５】図５は、印加する電流の大きさとナノワイヤの温度の関係を示すグラフである。
【図６】図６は図面代用写真で、デバイス１の加熱前後のサンプルの蛍光写真である。

【図７】図７（Ａ）は図面代用写真で、実施例２で撮影した蛍光写真である。図７（Ｂ）は図面代用写真で、比較例１で撮影した蛍光写真である。図７（Ｃ）は図面代用写真で、比較例２で撮影した蛍光写真である。
【図８】図８は、ペプチドの配列と離脱温度の関係を調べるための実験手順を示す図である。
【図９】図９は、実施例３におけるペプチドのＺｎＯ粒子への結合率を示すグラフである。
【図１０】図１０は、実施例３におけるペプチドのＺｎＯ粒子からの離脱率を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
以下に、ナノワイヤデバイス（以下、単に「デバイス」と記載することがある。）、該デバイスを含む分析装置、サンプルの加熱処理方法及びサンプルの分離方法について詳しく説明する。
【００１６】
図１（Ａ）は、本発明のデバイス１の概略を説明するための断面図である。図１（Ａ）に示すデバイス１は、絶縁性基板２、絶縁性基板２上に積層された導電体層３、導電体層３上に形成されたナノワイヤ４、及び、導電体層３に接するように形成された一対の電極５を含んでいる。なお、一対の電極５は、導電体層３に接するように形成されていればよい。例えば、図１（Ｂ）は本発明のデバイス１の他の構成を示す断面図で、絶縁性基板２の上に一対の電極５が形成され、導電体層３の一部が一対の電極５の上に積層され、導電体層３の他の部分が絶縁性基板２上に積層されている。つまり、一対の電極５は、導電体層３の上に形成されてもよいし、絶縁性基板２と導電体層３の間に挟まれるように形成されていてもよい。
【００１７】
絶縁性基板２は、電気を通さない物であれば特に制限は無く、ガラス；サファイア；シリコン；脂環式オレフィン重合体、エポキシ化合物、マレイミド樹脂、（メタ）アクリル樹脂、ジアリルフタレート樹脂、トリアジン樹脂、ポリフェニレンエーテル等の樹脂；が挙げられる。
【００１８】
導電体層３は、一対の電極５に通電することで電気が流れ、発熱できる材料であれば特に制限はない。例えば、ＺｎＯ、Al_2O_3、Ｓｉ、Ｃｒ、Ｔｉ、Ｃｕ等が挙げられる。導電体層３に通電した時に、抵抗が高い程発熱する。したがって、ナノワイヤの発熱量が所期の温度となるようにするために、材料の選択に加え、積層する導電体層３の厚さを適宜調整すればよい。
【００１９】
ナノワイヤ４は、導電体層３上に公知の方法により作製すればよい。例えば、ナノワイヤ形成用粒子又は触媒を塗布し公知の方法でナノワイヤ４を成長させればよい。ナノワイヤ形成用粒子としては、例えば、ＺｎＯが挙げられる。ＺｎＯを用いたナノワイヤは、水熱合成方法を用いて作製することができる。具体的には、先ず、ＺｎＯを導電体層３上に塗布する。次いで、硝酸亜鉛六水和物（$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$）、ヘキサメチレンテトラミン（$C_6H_{12}N_4$）を脱イオン水に溶解した前駆体溶液に、加熱した絶縁性基板２を浸漬させることで、ＺｎＯナノワイヤを成長させることができる。なお、導電体層３としてＺｎＯを用いた場合は、導電体層３自体がナノワイヤ形成用粒子の役割をするので、別途ＺｎＯを導電体層３に塗布する必要は無い。
【００２０】
ナノワイヤ４作製用の触媒としては、例えば、金、プラチナ、アルミニウム、銅、鉄、コバルト、銀、錫、インジウム、亜鉛、ガリウム、クロム、チタン等が挙げられる。触媒を用いたナノワイヤは、次の手順で作製することができる。
（ａ）触媒を導電体層３上に堆積する。

（ｂ）SiO_2、Li_2O、ＭｇＯ、Al_2O_3、ＣａＯ、TiO_2、Mn_2O_3、Fe_2O_3、ＣｏＯ、ＮｉＯ、ＣｕＯ、ＺｎＯ、Ga_2O_3、ＳｒＯ、In_2O_3、SnO_2、Sm_2O_3、ＥｕＯ等の材料を用い、パルスレーザーデポジション、ＶＬＳ（Ｖａｐｏｒ－Ｌｉｑｕｉｄ－Ｓｏｌｉｄ）法等の物理蒸着法でナノワイヤ４を形成する。なお、触媒を用いて作製するナノワイヤ４は、分岐鎖を有しないナノワイヤであってもよいし、分岐鎖を有するナノワイヤであってもよい。

【００２１】

また、ナノワイヤ４の周りには、必要に応じて被覆層を形成してもよい。被覆層としては、デバイス１をサンプルの加熱処理用に用いる場合は、熱伝導率の高い材料であれば特に制限はない。デバイス１をサンプルの分離用に用いる場合は、後述するように、ナノワイヤ４をペプチド及び／または核酸で修飾する必要があるので、ペプチド及び／または核酸と結合性があり且つ熱伝導率の高い材料が好ましい。被覆層は、ナノワイヤ４を形成後、スパッタリング、ＥＢ（Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｂｅａｍ）蒸着、ＰＶＤ（Ｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｖａｐｏｒ　Ｄｅｐｏｓｉｔｉｏｎ）、原子層堆積装置（ＡＬＤ装置：Ａｔｏｍｉｃ　Ｌａｙｅｒ　Ｄｅｐｏｓｉｔｉｏｎ）等の一般的な蒸着法により形成すればよい。

【００２２】

一対の電極５は、白金、金、Ｔｉ、Ｃｒ等、一般的に用いられている電極の材料であれば特に制限はない。スパッタ等の方法により、絶縁性基板２又は導電体層３上に形成すればよい。なお、一対の電極５は、前記材料を積層してもよい。

【００２３】

図１（Ａ）に示すデバイス１は、先ず、絶縁性基板２の上に導電体層３をスパッタ等により積層し、次いで、一対の電極５を導電体層３の上にスパッタ等により形成する。そして、一対の電極５の間の導電体層３に必要に応じてナノワイヤ４の形成用粒子又は触媒を塗布し、ナノワイヤ４を成長させればよい。

【００２４】

図１（Ｂ）に示すデバイス１は、先ず、絶縁性基板２の上に一対の電極５をスパッタ等により形成し、次いで、導電体層３をスパッタ等により絶縁性基板２及び一対の電極５の上に積層する。そして、必要に応じてナノワイヤ４の形成用粒子又は触媒を導電体層３に塗布し、ナノワイヤ４を成長させればよい。

【００２５】

図２は、捕捉対象サンプルを特異的に認識するペプチド及び／又は核酸（以下、「ペプチド等」と記載することがある。）６でナノワイヤ４を修飾する例を示している。図２（Ａ）はペプチド等で修飾したナノワイヤ４を示しており、ペプチド等６は、ナノワイヤ吸着部位６１とサンプル認識部位６２とを少なくとも含んでいる。ナノワイヤ吸着部位６１は、後述する実施例で示すとおり、ペプチド等の配列を変えることで、加熱によりナノワイヤ４から離脱、又は加熱してもナノワイヤ４に吸着の何れも作製することができる。サンプル認識部位６２は、捕捉対象サンプルを特異的に認識できる配列であれば特に制限は無く公知の配列、又は抗原抗体反応等の公知の技術により、捕捉対象サンプルに応じた配列を決めればよい。捕捉対象サンプルが核酸の場合は、ナノワイヤ吸着部位６１をナノワイヤ４に吸着する核酸で構成し、サンプル認識部位６２を捕捉対象核酸にハイブリダイズする配列とすればよい。ペプチド及び核酸とも、配列が決まれば、公知のペプチド合成装置、核酸合成装置で合成すればよい。又は、ペプチド・核酸の受託合成サービスを利用してもよい。ナノワイヤ４へのペプチド等の修飾は、ペプチド等の溶液にナノワイヤ４を浸漬すればよい。

【００２６】

図２（Ｂ）は、ペプチド等６で修飾したナノワイヤ４のサンプル認識部位６２に、捕捉対象サンプル７が捕捉されたことを示す図である。ナノワイヤ吸着部位６１が加熱をしてもナノワイヤから離脱しない配列の場合、ナノワイヤ４を加熱することで捕捉対象サンプル７を加熱することができる。したがって、サンプル溶液中の特定の細菌等を捕捉し、加熱殺菌する場合等に用いることができる。

【００２７】
図２（Ｃ）は、サンプル認識部位６２に捕捉した捕捉対象サンプル７が離脱することを示す図である。ナノワイヤ吸着部位６１が加熱をするとナノワイヤ４から離脱する配列の場合、ナノワイヤ４を加熱することで、捕捉した細菌等の捕捉対象サンプル７は、ナノワイヤ４に修飾したペプチド等６と共にナノワイヤから離脱する。したがって、サンプル溶液中の特定の細菌等を捕捉し、サンプル液を洗い流した後にナノワイヤ４を加熱することで、捕捉対象サンプル７のみをサンプル液から分離することができる。
【００２８】
なお、図２（Ｃ）はペプチド等６を用いて捕捉対象サンプル７を捕捉・分離しているが、加熱により脱着できれば、ペプチド等６以外であってもよい。例えば、特許文献１に記載されている特定の温度（転移温度）以上では親水性を示し、その温度以下では疎水性を示す感温性材料に抗体等を結合し、ナノワイヤ４を被覆してもよい。
【００２９】
図３は、本発明のデバイス１を用いたサンプルの加熱処理、サンプルの分離の一例を示す図で、デバイス１を用いて連続的にサンプルの処理を行う場合の例を示している。図３（Ａ）は、デバイス１に被せるカバー部材８の概略を示す図で、図３（Ｂ）は図３（Ａ）のＡ－Ａ断面図である。カバー部材８は、デバイス１に被せた際にナノワイヤ４を形成した部分を覆う流路８１が基材に形成されている。また、流路８１の一端にはサンプル投入孔８２及び他端にはサンプル回収孔８３が、カバー部材８の表面と流路８１を貫通するように形成されている。カバー部材８は、プラスチック等を切削加工により形成してもよいし、鋳型を作製し、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）等に転写して作製してもよい。
【００３０】
デバイス１を用いてサンプルを加熱処理（殺菌処理）する場合は、サンプル投入孔８２からサンプルが含まれている液体（以下、「サンプル液」と記載することがある。）を投入し、一対の電極５に図示しない電源から通電することで導電体層３を介してナノワイヤ４を加熱すればよい。サンプル中の特定の細菌等の加熱処理が目的でない場合は、ナノワイヤ４はペプチド等６で修飾していなくてよい。この場合、サンプル液全体を加熱処理することができるので、例えば、水の浄化等に使用できる。サンプル液の加熱処理後は、サンプル回収孔８３からサンプル液を回収すればよい。なお、サンプル液全体を加熱処理する場合、サンプル液中の特定の細菌等をより確実に加熱処理（殺菌処理）したい場合は、ナノワイヤ吸着部位６１がナノワイヤ４から離脱しない配列で、サンプル認識部位６２が特定の細菌等を認識する配列のペプチド６でナノワイヤ４を修飾しておけばよい。
【００３１】
サンプル液から捕捉対象の細菌等を捕捉・分離する場合は、ナノワイヤ吸着部位６１がナノワイヤ４から加熱により離脱する配列で、サンプル認識部位６２が捕捉対象の細菌等を認識する配列のペプチド６でナノワイヤ４を修飾しておけばよい。先ず、サンプル投入孔８２からサンプル液を投入し、サンプル回収孔８３から捕捉対象の細菌等がナノワイヤ４に吸着・除去されたサンプル液を回収する。そして、サンプルが含まれていない、水、又はリン酸バッファー等の溶液をサンプル投入孔８２から投入し、一対の電極５に通電することで導電体層３を介してナノワイヤ４を加熱する。ナノワイヤ４の加熱により、ナノワイヤ吸着部位６１はナノワイヤ４から離脱するので、サンプル液中から捕捉対象サンプル７のみを分離することができる。
【００３２】
なお、図３（Ａ）に示すカバー部材８は、サンプル投入孔８２、サンプル回収孔８３が各１個形成された例を示しているが、複数の孔を形成してもよい。例えば、サンプル液から捕捉対象の細菌等を捕捉・分離する場合は、サンプル投入孔８２に加え、水、又はリン酸バッファー等の溶液を投入するための孔を形成してもよい。また、サンプル回収孔８３も２つ形成し、一方を捕捉対象の細菌等がナノワイヤ４に吸着・除去されたサンプル液を回収する孔とし、他方を分離した捕捉対象サンプルのみが含まれる溶液を回収する孔としてもよい。

【００３３】
流路８１の高さは、デバイス１の処理目的に応じて適宜調整すればよい。デバイス１のナノワイヤ４がペプチド等６で修飾されておらず、且つ、デバイス１をサンプル液の加熱処理に用いる場合は、サンプル液全体に熱が伝わりやすくするため、流路８１の高さはナノワイヤ４の高さとほぼ同じ高さにすることが望ましい。
【００３４】
一方、デバイス１のナノワイヤ４がペプチド等６で修飾されている場合は、捕捉対象サンプル７はサンプル認識部位６２に捕捉される。そのため、流路８１の高さは、ナノワイヤ４より高くてもよい。また、サンプル投入孔８２及びサンプル回収孔８３にチューブを介して接続しているポンプ等を用い、サンプル液の吸引・噴出等を交互に繰り返し制御することで、流路８１内のサンプル液に乱流を生じさせて、捕捉対象サンプル７をサンプル認識部位６２に捕捉されやすくしてもよい。流路８１を高くする、つまり、流路８１の断面積を大きくすると、サンプル液を流す圧力が低くなるので、サンプル液を流し易くなるので好ましい。
【００３５】
なお、図３（Ａ）及び（Ｂ）は、カバー部材８を用いたデバイス１の使用例を示しているが、デバイス１を用いて、サンプル液を加熱処理、サンプル液から捕捉対象サンプル７を分離できればその他の方法であってもよい。例えば、シャーレ等に入れたサンプル液にデバイス１のナノワイヤ４部分を浸漬してもよい。サンプル液から捕捉対象サンプルを分離する場合は、サンプル液に浸漬してナノワイヤ４に修飾したペプチド等６のサンプル認識部位６２に捕捉対象サンプル７を捕捉し、次いで、別のシャーレ内の水等にナノワイヤ４を浸漬し、一対の電極５に通電することで、別のシャーレ内の水等に捕捉対処サンプル７を分離してもよい。
【００３６】
本発明のデバイス１は、分析装置のサンプル前処理用のデバイスとして用いることもできる。例えば、サンプル液中から捕捉対象サンプル７を分離した後、分離した捕捉対象サンプル７が含まれるサンプル液を分析装置の分析部に導入することで、サンプルの分析を行うことができる。分析部は、サンプルが分析できれば特に制限はないが、例えば、上記非特許文献１及び２に記載されている分析部を用いると、装置全体が小型化できる。
【００３７】
以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。
【実施例】
【００３８】
＜実施例１＞
［デバイス１の作製］
以下の手順によりデバイス１を作製した。
（１）ＤＣスパッタ装置（ＳＣ－７０１ＭｋＩＩ　ＡＤＶＡＮＣＥ、Ｓａｎｙｕ　Ｄｅｎｓｈｉ）を用いて、シリコン基板（アドバンテック社製）上に、Al_2O_3を３ｗｔ％ドープした酸化亜鉛（ＺｎＯ）を約１００ｎｍの厚さとなるように積層した。
（２）次に、ナノワイヤ４を形成する部分にマスクをした後、上記のスパッタ装置を用い、チタン（Ｔｉ）を１０ｎｍ、その上に白金（Ｐｔ）が１００ｎｍとなるように積層することで、一対の電極を作製した。電極の作製後は、マスクを除去した。
（３）５０ｍＬビーカーにヘキサメチレンテトラミン０．２２５ｇと、硝酸亜鉛６水和物０．４７６ｇを入れて撹拌し、ナノワイヤ成長液を作製した。
（４）上記（２）で作製したシリコン基板を、上記（３）で作製したナノワイヤ成長液に浸漬し、９５℃で３時間、水熱合成することで、一対の電極の間のＺｎＯ層（導電体層）上にナノワイヤを形成した。

【００３９】
図４（Ａ）は作製したデバイス１の写真である。また、図４（Ｂ）は、図４（Ａ）の一対の電極５の間部分の拡大写真である。図４（Ｂ）に示すように、一対の電極の間のＺｎＯ層（導電体層）上にナノワイヤが形成されたことを確認した。
【００４０】
［デバイス１の動作検証］
実施例１で作製したデバイス１の一対の電極５の部分を導電性のクリップで挟み、クリップを電源（ＡＬＩＮＣＯ社製ＤＭ－３０５ＭＶ）に接続した。また、接触型温度計（ｔｅｓｔｏ社製９０５－Ｔ２）をナノワイヤ４に当接させ、一対の電極５に印加する電流の大きさを変化させた時のナノワイヤ４の温度を測定した。図５は、印加する電流の大きさとナノワイヤの温度の関係を示すグラフである。図５に示すように、印加する電流を大きくするほどナノワイヤ４の温度は、ほぼ直線状に高くなることが明らかとなった。したがって、ナノワイヤ４の温度は、印加する電流の大きさにより調整することができる。
【００４１】
［デバイス１を用いたサンプルの加熱実験］
サンプルとして枯草菌（ＡＴＣＣ社）を準備し、定法によりＯＤが０．４になるまで培養した。細菌の生死を検出する蛍光試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製：ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）ＢａｃＬｉｇｈｔ（登録商標）　Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ｋｉｔ）を用い、細胞膜透過性の異なる２つの核染色試薬であるＳＹＴＯ　９（生細胞検出用）、及びＰＩ（死胞検出用）を同時染色した。
次に、核染色試薬で染色した細胞をピペットでデバイス１の上に滴下し、４０ｍＡの電流を３０秒印加した。
図６はデバイス１の加熱前後のサンプルの蛍光写真である。加熱前には、生細胞の蛍光を確認できた。一方、加熱後は生細胞の蛍光は確認できなかったが、死細胞の蛍光を確認した。
以上の結果から、本発明のデバイス１は、細胞等の加熱処理（加熱滅菌）等に使用できることを確認した。
【００４２】
［サンプルの分離実験］
＜実施例２＞
次に、サンプルの分離実験を行った。なお、ペプチドが離脱する温度を調べる際に、ナノワイヤ４の周囲にサンプル液がある状態では、接触型温度計を用いてナノワイヤ４の温度を測定することは困難である。そのため、サンプルの分離実験は、ペプチドで修飾したナノワイヤ４への大腸菌の捕捉実験と、蛍光色素で標識したペプチドを修飾したビーズを加熱した際のペプチドの離脱の２通りの実験で、サンプルの分離について検証した。
【００４３】
［デバイス１の作製］
以下の手順で、実施例２のデバイス１を作製した。
（１）上記実施例１で作製したデバイス１において、一対の電極を形成する工程を除いた以外は、実施例１と同様の手順でデバイス１を作製した。
（２）以下のアミノ酸配列のペプチドを定法により合成し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に１００μＭとなるように溶解し、ペプチド溶液を作製した。
［Ｎ］－ＧＲＨＩＦＷＲＲＧＧＧＨＫＶＰＲ－［Ｃ］（配列番号：１）
上記配列の内、Ｃ末端側の「ＨＫＶＰＲ」がＺｎＯナノワイヤに結合する配列で、Ｎ末端側の「ＧＲＨＩＦＷＲＲ」が大腸菌を認識する配列である。なお、大腸菌を認識する配列は、グラム陰性細菌の細胞表層のリポ多糖を認識する配列であることから、大腸菌以外にも応用が可能である。
（３）デバイス１に、上記（２）で作製したペプチド溶液を２００μＬ滴下し、２時間室温で静置した。
（４）ペプチド溶液を除去し、ＰＢＳ　１ｍＬを加え、５分間振とうした。

（５）デバイス１上のＰＢＳを除去し、更に、新たなＰＢＳ　１ｍＬでリンスした。
以上の手順により、実施例２で用いるデバイス１を作製した。
【００４４】
［大腸菌サンプルの作製］
以下の手順により、大腸菌を蛍光染色したサンプルを調整した。
（１）大腸菌（ＤＨ５α；タカラバイオ株式会社）のＰＢＳ懸濁液に、ＳＹＴＯ９を１．５μＭとなるように添加した。
（２）遮光して、３０分間室温で静置した。
（３）５，０００×ｇで遠心分離し、上清を除去した。
（４）遠心沈降物を、ＰＢＳ　１ｍＬに懸濁した。
（５）上記（３）及び（４）の手順を、３回繰り返した。
（６）5×10^{7}　ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるようにＰＢＳで希釈して、大腸菌懸濁液を作製した。
【００４５】
［デバイス１への大腸菌の捕捉］
以下の手順により、上記実施例２の［デバイス１の作製］で作製したデバイス１が、大腸菌を捕捉できるか確認を行った。
（１）作製した大腸菌懸濁液を、デバイス１上に１００μＬ滴下した。
（２）遮光し、２時間室温で静置した。
（３）デバイス１上の液を除き、ＰＢＳ　５００μＬを添加したディッシュにデバイス１を沈め、５分間振とうした。この操作は、２回繰り返した。
（４）ＰＢＳ　５００μＬで、デバイス１の表面をリンスした。
（５）デバイス１にカバーガラスを被せて、蛍光顕微鏡で観察した。
図７（Ａ）は、実施例２で撮影した蛍光写真である。
【００４６】
＜比較例１＞
大腸菌を含まないＰＢＳをサンプル液とした以外は、実施例２と同様の手順で実験を行った。図７（Ｂ）は比較例１で撮影した蛍光写真である。
【００４７】
＜比較例２＞
実施例２のデバイスにおいて、ナノワイヤをペプチドで修飾しなかった以外は、実施例２と同様の手順で実験を行った。図７（Ｃ）は比較例２で撮影した蛍光写真である。
【００４８】
図７（Ａ）～（Ｃ）に示すように、実施例２のペプチドで被覆したデバイス１を用いた場合、ナノワイヤに多くの大腸菌が捕捉されていた。一方、比較例２のペプチドで修飾していないナノワイヤを形成したデバイス１では、大腸菌の捕捉はほとんど見られなかった。なお、比較例２でみられる蛍光は、ナノワイヤ４の先端等に引っ掛かった大腸菌と思われる。
【００４９】
［ペプチドの離脱条件の確認］
次に、ペプチドの配列と離脱温度の関係を調べた。図８は実験の手順を示しており、詳細な手順を以下に記載する。
（１）ＴＢＳ－Ｔ（ｐＨ７．５のトリス緩衝液＋０．５％　ＴＷＥＥＮ２０）に、ＺｎＯ粒子（住友大阪セメント社製、Ｄｐ＝１５～３５ｎｍ）を０．４ｍｇ／ｍｌとなるように懸濁した。
（２）上記（１）の懸濁液を１．５ｍｌ遠沈管に９０μｌずつ分注し、１０μＭペプチド溶液（ＴＢＳ）を１５μｌずつ加え１ｈ攪拌した。なお、ペプチドには、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）で標識した、ＲＣＡＲＲＹ（配列番号：２）、ＨＹＱＳＮＷ（配列番号：３）を用いた。
（３）上記（２）の遠沈管を、１６，９００ｇで１５ｍｉｎ、遠心分離した。

（４）上清１００μｌを９６穴マイクロタイタープレートに分注し、残りを破棄した。
（５）ＴＢＳ－Ｔ　１１５μｌに再懸濁し、加温（２０℃、４０℃、６０℃）しながら１ｈ攪拌した。
（６）上記（５）の遠沈管を、１６，９００ｇで１５ｍｉｎ、遠心分離した。
（７）上清１００μｌを９６穴マイクロタイタープレートに分注した。
（８）プレートリーダー（ＤＳ　Ｐｈａｒｍａ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ社製、ＰＯＷＥＲ ＳＣＡＮ　４）を用いて、上記（４）及び（７）でマイクロタイタープレートに分注した上清の蛍光強度を、励起波長が４９５ｎｍ、蛍光波長が５１７ｎｍで測定した。

【００５０】

図９は、１０μＭペプチド溶液（ＴＢＳ）１５μｌにＺｎＯ粒子を含まないＴＢＳ－Ｔを９０μｌ加えた溶液の上清１００μｌから得られた蛍光強度と、上記（４）のマイクロタイタープレートに分注した上清の蛍光強度から算出したペプチドのＺｎＯ粒子への結合率を示すグラフである。図９から明らかなように、配列により、ＺｎＯ粒子への結合率が異なることが明らかとなった。

【００５１】

図１０は、１０μＭペプチド溶液（ＴＢＳ）１５μｌにＺｎＯ粒子を含まないＴＢＳ－Ｔを９０μｌ加えた溶液の上清１００μｌから得られた蛍光強度と上記（８）で測定した測定結果から算出した離脱率を示すグラフである。図１０から明らかなように「ＲＣＡＲＲＹ」配列のペプチドは、温度依存的にＺｎＯ粒子から離脱することが明らかとなった。上記のとおり、ペプチドの離脱温度を調べる関係上、実施例２ではＺｎＯ粒子を用いたが、同じ組成のナノワイヤであれば、ナノワイヤを加熱することでペプチドが離脱することは明らかである。その場合、ナノワイヤを加熱することで、ナノワイヤに結合したペプチドに迅速に熱が伝わる。したがって、粒子を含む溶液全体を加熱する場合と比較して、迅速に捕捉したサンプルを分離することができ、且つ、溶液全体を加熱する必要が無いことから、捕捉したサンプルを生きた状態で分離できることが予想される。

【００５２】

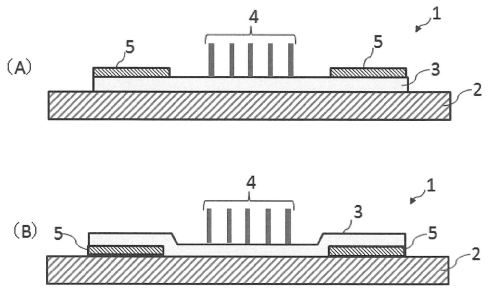
以上の結果より、ナノワイヤ吸着部位６１及びサンプル認識部位６２を含むペプチドでナノワイヤを修飾すると、ナノワイヤの温度を調整することで、捕捉対象サンプルを分離することができる。また。ペプチドでナノワイヤを修飾しない場合は、ナノワイヤを加熱することでサンプルを殺菌処理することもできる。したがって、本発明のナノワイヤを加熱できるデバイス１は、多様な使い方ができる。

【産業上の利用可能性】

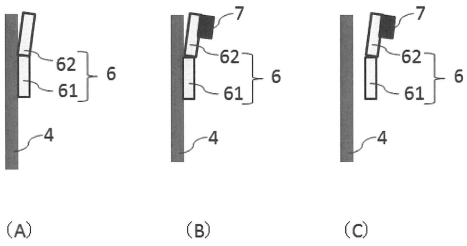
【００５３】

本発明のデバイスは、同一のデバイスでサンプルの殺菌処理やサンプルの分離を行うことができる。したがって、分析装置のサンプル調整装置の他、食品の殺菌装置としても使用できることから、分析装置産業や食品産業にとって有用である。

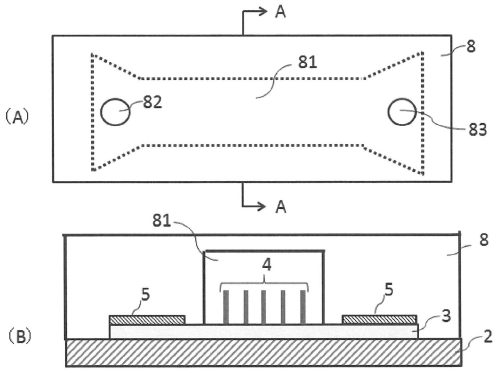
【図１】



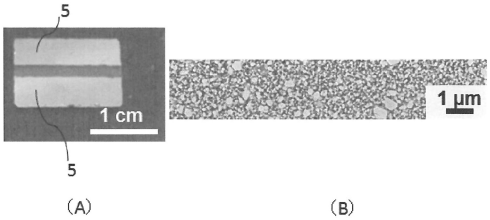
【図２】



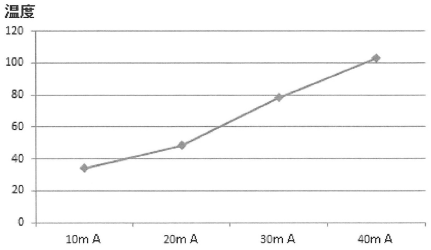
【図３】



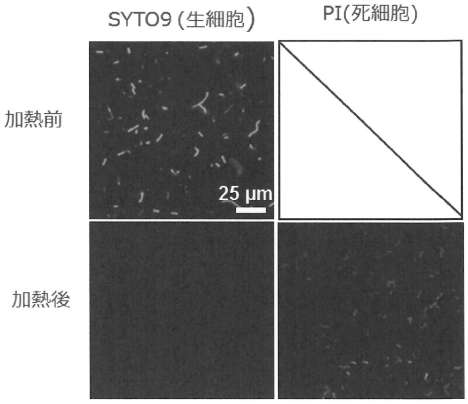
【図４】



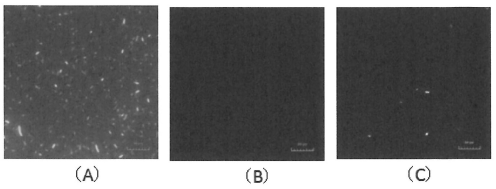
【図５】



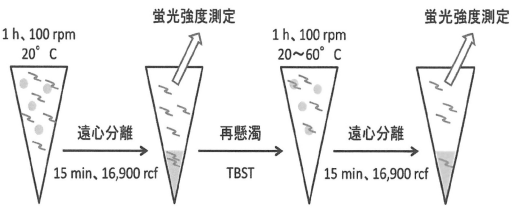
【図６】



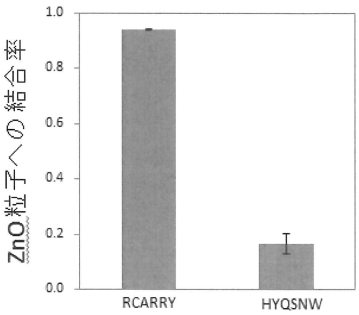
【図７】



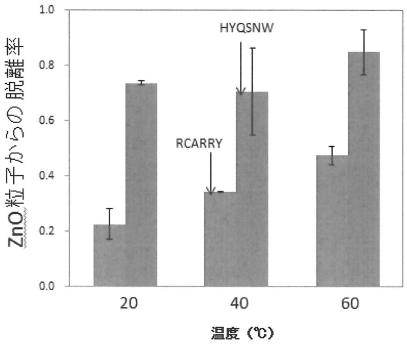
【図８】



【図９】



【図１０】



【配列表】

0006758620000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　安井　隆雄
愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内
(72)発明者　馬場　嘉信
愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内
(72)発明者　加地　範匡
愛知県名古屋市千種区不老町１番　国立大学法人名古屋大学内
(72)発明者　川合　知二
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内
(72)発明者　柳田　剛
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号　国立大学法人九州大学内
(72)発明者　大河内　美奈
東京都目黒区大岡山２丁目１２番１号　国立大学法人東京工業大学内
(72)発明者　田中　祐圭
東京都目黒区大岡山２丁目１２番１号　国立大学法人東京工業大学内

審査官　松浦　安紀子

(56)参考文献　特開２０１６－０２８２３８（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－２４９７０５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５２０６８７（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５０７１９９（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－０５０２４８（ＪＰ，Ａ）
特開２００９－１２７０９２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５２２８１４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１５／１３７４２７（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／１３６９１３（WO，Ａ１）
特開２０１１－１８７９０１（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－０３５２４８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５０５６８８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／０６５１９２（WO，Ａ１）
国際公開第２００５／１２０２０５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ　　１／２６
Ｃ１２Ｎ　　１／０２
Ｃ１２Ｎ　　１／２０
Ｇ０１Ｎ　３３／５３
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）