

(43) 国際公開日
2009年1月8日 (08.01.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/005117 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 25/16 (2006.01) G01N 35/08 (2006.01)
G01N 21/41 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

社神戸製鋼所 (KABUSHIKI KAISHA KOBE SEIKO SHO) [JP/JP]; 〒6518585 兵庫県神戸市中央区脇浜町2丁目10番26号 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/062055

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池袋 一典 (IKE-
BUKURO, Kazunori). 片山 亮 (KATAYAMA, Ryo). 高
橋 英二 (TAKAHASHI, Eiji).

(22) 国際出願日:

2008年7月3日 (03.07.2008)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(74) 代理人: 小谷 悦司, 外 (KOTANI, Etsuji et al.); 〒
5300005 大阪府大阪市北区中之島2丁目2番2号大
阪中之島ビル2階 Osaka (JP).

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2007-176313 2007年7月4日 (04.07.2007) JP

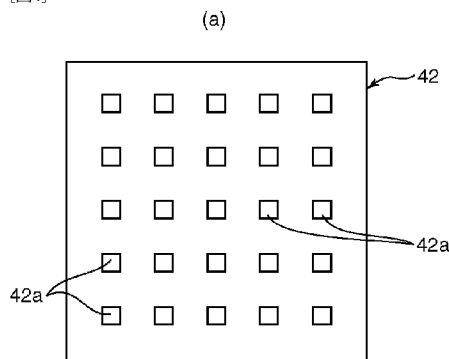
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,

[続葉有]

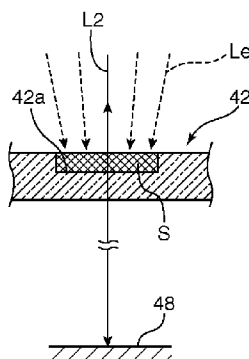
(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR DETECTION OF BIOMICROMOLECULE

(54) 発明の名称: 生体小分子の検出方法及び装置

[図4]



(b)



(57) Abstract: The object is to detect a biomicromolecule in a sample in a simple and inexpensive facility. For achieving the object, a biomicromolecule in a sample (S) is detected optically. Specifically, the sample (S) containing an aptamer capable of interacting with the biomicromolecule is irradiated with an excitation light (Le). At the same time, the sample (S) is also irradiated with a measurement light (L2) for measuring the photothermal effect in the sample (S) caused by the irradiation with the excitation light (Le). Based on the change in the phase of the measurement light (L2), the photothermal effect in the sample (S) caused by the irradiation with the excitation light (Le) is determined. Based on the change in the measurement signal over time, the presence or absence of the interaction between the biomicromolecule and the aptamer is determined.

(57) 要約: この発明は、簡易かつ安価な設備で、試料中の生体小分子を検出することを目的とする。そのために、試料S中の生体小分子が光学的に検出される。具体的には、生体小分子との相互作用が可能なアプタマーを含む試料Sに対して励起光Leが照射されるとともに、この励起光Leの照射により試料S内に生ずる光熱効果を測定するための測定光L2が照射される。この測定光L2の位相変化から、励起光Leによる試料Sの光熱効果が測定され、その測定信号の時間変化に基づいて生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の発生の有無が判断される。



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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,

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明 細 書

生体小分子の検出方法及び装置

技術分野

[0001] 本発明は、糖(糖鎖)、ヌクレオシド、ホルモン、ビタミンといった比較的分子量の小さい生体小分子を相互作用の利用により検出するための技術に関するものである。

背景技術

[0002] 生体分子の中には、例えば糖(糖鎖)、ヌクレオシド、ホルモン、ビタミンなどのように、比較的分子量の小さい生体小分子と呼ばれる分子が存在する。このような生体小分子は特徴的な光吸収スペクトルを持たない場合が多いので、その検出及び同定をいわゆる分光法のみで行うことは困難である。

[0003] このような生体小分子の検出を行うための手段として、当該生体小分子と他の物質との相互作用を利用する方法が考えられる。例えば特許文献1には、蛋白質と小分子との相互作用を検出する方法であって、蛋白質の活性化サイトに小分子が入り込むことにより生じる蛋白質の構造変化をNMRなどで分析し、さらに質量分析器を用いて前記小分子の構造を決定する方法が開示されている。また、特許文献2には、SPR(表面局在プラズモン共鳴)センサを用いる方法であって、基板上に形成された金属薄膜上に試料を固相結合し、この試料に所定のレーザー光を入射したときの前記試料の吸着度合いを前記SPRセンサによって検出するものが開示されている。

[0004] しかし、前記特許文献1に開示される方法は、液体クロマトグラフィー、NMR、さらには質量分析器といった多数の大掛かりで高価な装置を要する不都合がある。また、前記特許文献2により開示される方法では、金属表面に捕捉分子を固定する必要があり、その検出を高い再現性で実現するためにはきわめて高度な技術を要する。

[0005] なお、核酸と蛋白質との相互作用を簡便かつ高感度で検出する方法として、いわゆる蛍光法が知られているが、この方法は前記のような生体小分子の検出には不適である。この蛍光法は、相互作用する物質(例えば核酸と蛋白質)の双方を互いに異なる蛍光色素で標識し、これらの蛍光色素が互いに作用して蛍光を変化させ得るようにした上で、その実際の変化の有無を測定するものであるが、このような蛍光色素を

用いて小分子に標識を付することは非常に難しい。もしできたとしても、当該蛍光色素が活性部位に影響を与えて正常な反応を阻害するおそれがある。

特許文献1:特開2006-226880号公報

特許文献2:特開2005-283566号公報

発明の開示

[0006] 本発明は、このような事情に鑑み、簡単かつ安価な設備で試料中の生体小分子の検出を感度良く行うことができる技術の提供を目的とする。

[0007] 本発明者は、前記目的を達成するため、試料中で生体小分子の相互作用が生じているときに生ずる光熱効果、すなわち、当該試料に所定の励起光を入射した時にこの励起光を前記試料が吸収して発熱する効果に着目し、この光熱効果と、試料中の生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の有無との間に著しい相関関係があることを見出した。具体的に、前記光熱効果は一般に時間が経過するに従って減少するのであるが、前記生体小分子とそのアプタマーとの相互作用が生じている試料では少なくとも光熱効果の立上り直後に前記光熱効果の時間的減少がほとんどないことを見出した。これは、前記アプタマーの構造が標的である前記生体小分子との相互作用によって安定化することによるものであると推察される。

[0008] 本発明は、このような点に着目してなされたものであり、試料中の生体小分子を検出するための方法であって、前記生体小分子と相互作用可能なアプタマーを含む試料に対して励起光を照射するステップと、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果を測定するステップと、前記光熱効果の時間変化に基づいて前記生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の発生の有無を判断することにより前記生体小分子の有無を検出するステップとを含むものである。

[0009] また本発明は、試料中の生体小分子を検出するための装置であって、前記生体小分子と相互作用可能なアプタマーを含む試料を収容するための試料収容部と、前記試料収容部に収容された試料に対して励起光を照射する励起光照射系と、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果の測定信号を生成する測定装置とを含み、この測定装置は、前記測定信号の時間変化に関するデータを作成し、その作成したデータに基づいて前記相互作用の有無を判断することにより前記生体小分

子の有無を検出する信号処理装置を含むものである。

[0010] 以上の構成によれば、前記試料に励起光を照射してそのときの光熱効果を測定し、その光熱効果の時間変化を監視することにより、前記試料中での生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の発生の有無、ひいては当該生体小分子そのものの有無を的確に判断することができる。従って、試料中の生体小分子への標識付与や金属薄膜への試料の固着といった作業を要することなく、前記相互作用の有無ひいては前記生体小分子の有無を容易にかつ高感度で検出することができる。また、前記検出装置は、前記信号処理装置が前記相互作用の有無の判断に有用なデータを作成してそのデータに基づいて相互作用の有無を自動的に判断し、これにより前記生体小分子の有無の検出を行う。

[0011] ここで、生体小分子とは、生体分子のうち分子量が数百あるいは数千程度までの比較的低分子量のものであって、糖、ヌクレオシド、ホルモン、ビタミンに代表される有機分子をいう。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明の第1の実施の形態に係る生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の検出装置の全体構成図である。

[図2]前記検出装置における試料収容部の一部断面正面図である。

[図3]前記試料収容部の要部を示す一部断面斜視図である。

[図4](a)は前記試料収容部に用いられるマイクロアレイの平面図、(b)はその要部断面図である。

[図5]前記検出装置が生成する測定信号の強度の時間変化を示すグラフである。

[図6](a)は本発明の第2の実施の形態で用いられるマイクロリアクタの平面図、(b)は(a)の6B-6B線断面図である。

[図7](a)は本発明の第2の実施の形態において得られる各測定位置A～Cでの測定信号の時間変化を示すグラフ、(b)はその測定信号を重ね合わせた信号の時間変化を示すグラフである。

[図8]前記第1の実施の形態に係る装置の実施により得られる測定信号を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

- [0013] 本発明の第1の実施の形態を、図1～図5を参照しながら説明する。
- [0014] 図1は、この実施の形態に係る検出装置の全体構成を示したものである。図示の検出装置は、励起光照射系(以下、単に「励起系」と称する。)10と、測定系(測定装置)20と、試料収容部40とを備える。そして、この試料収容部40に後述の試料が収容される。
- [0015] 前記励起系10は、前記試料収容部40の所定位置に収容される試料に励起光を照射するためのものであり、励起光源12と、分光機構14と、変調機構16と、ダイクロイックミラー17と、集光レンズ18とを備える。
- [0016] 前記励起光源12としては、例えば白色光を出力するキセノンランプや紫外光を出力する水銀ランプが好適である。この励起光源12から発せられる光は前記分光機構14で分光され、前記変調機構16で周期的に変調されて測定に好適な励起光 L_e となる。
- [0017] 前記ダイクロイックミラー17は、前記測定系20と前記試料収容部40との間に位置し、後述のように前記測定系20から送られてくる測定光はそのまま透過させる一方、前記励起光源12から送られてくる励起光 L_e を90° 反射させて前記測定光と同軸で前記試料収容部40側に導く。前記集光レンズ18は、前記ダイクロイックミラー17で反射した後の励起光 L_e を特定領域内に集光して前記試料収容部40に収容された試料に照射する。この励起光を前記試料が吸収して発熱することにより、その温度変化分だけ当該試料の屈折率が変化する。
- [0018] 前記測定系20は、前記試料の屈折率を測定するための測定光 L_2 を当該試料に照射し、かつ、その測定光の位相変化によって前記屈折率を測定するものである。この実施の形態では、前記測定系20は、測定光源22と必要な光学系、さらには光検出器36及び信号処理装置38を備えている。
- [0019] 前記測定光源22は、例えば出力1mWのHe-Neレーザ発生器からなり、この測定光源22から照射される測定光は、図1に示されるように、 $\lambda/2$ 波長板23で偏光面の調節を受けた後、偏光ビームスプリッタ24によって、互いに直交する2つの偏光、すなわち、参照光 L_1 と測定光 L_2 とに分光される。

- [0020] 前記参照光L1は、音響光学変調器25Aによって光周波数のシフト(周波数変換)を受けた後、ミラー26Aで反射して偏光ビームスプリッタ28に入力される。また、前記測定光L2は、音響光学変調器25Bによって光周波数のシフト(周波数変換)を受けた後、ミラー26Bで反射して前記偏光ビームスプリッタ28に入力され、このスプリッタ28で前記参照光L1と合成される。
- [0021] 前記参照光L1は、前記偏光ビームスプリッタ30をそのまま透過してミラー34で180°反射することにより前記偏光ビームスプリッタ30に戻る。このとき、前記偏光ビームスプリッタ30と前記ミラー34との間には1/4波長板33が介在していて、この1/4波長板33を往復で通過する前記参照光L1の偏光面を90°回転させる。従って、前記偏光ビームスプリッタ30に戻った参照光L1は前記試料収容部40と反対の側に90°反射する。この参照光L1は、偏光板35を通じて光検出器36に入力される。
- [0022] 一方、前記測定光L2は、前記偏光ビームスプリッタ30で前記試料収容部40側に90°反射され、1/4波長板32、前記ダイクロイックミラー17、及び前記集光レンズ18を通じて試料収容部40へ導かれる。この測定光L2は後述のように試料に入射され、さらに180°反射して、前記1/4波長板32を通じて前記偏光ビームスプリッタ30に戻る。この測定光L2は、前記1/4波長板32の往復透過によってその偏光面が90°回転した状態にあるので、今度は当該偏光ビームスプリッタ30をそのまま透過して前記参照光L1と合流し、前記偏光板35および前記光検出器36へ向かう。
- [0023] 前記偏光板35では、前記参照光L1と前記測定光L2とが互いに干渉し、その干渉光の光強度が前記光検出器36によって電気信号(測定信号)に変換される。
- [0024] 前記信号処理装置38は、前記測定信号を特定のサンプリング周期をおいてサンプリングし、その測定信号に基づいて前記測定光L2(測定光)の位相変化を演算する。さらに、この信号処理装置38は、前記位相変化の時間的変化に関するデータを作成し、かつ、後述のように、当該データに基づいて前記試料S内における相互作用の有無を自動的に判断する。
- [0025] ここで、前記干渉光強度S1は、次の(1)式で表される。
- $$S1 = C1 + C2 \cdot \cos(2\pi \cdot fb \cdot t + \phi) \cdots (1)$$
- [0026] 同式において、C1、C2は前記偏光ビームスプリッタ等の光学系や試料Sの透過率

により定まる定数、 ϕ は前記参照光L1と前記測定光L2の光路長差による位相差、 f は前記参照光L1と前記測定光L2の周波数差である。この(1)式より、前記干渉光強度S1の変化(前記励起光を照射しない或いはその光強度が小さいときとその光強度が大きいときとの差)から、前記位相差 ϕ の変化が求まることがわかる。前記信号処理装置38は、(1)式に基づいて前記位相差 ϕ の変化を算出する。

[0027] 前記励起光Leの強度が例えばチョッパの回転により周波数 f で周期的に強度変調されていると、試料Sの屈折率も前記周波数 f で変化し、測定光L2の光路長も前記周波数 f で変化し(参照光L1の光路長は一定)、前記位相差 ϕ も周波数 f で変化する。従って、前記位相差 ϕ の変化を前記周波数 f の成分(前記励起信号の強度変調周期と同周期成分)について測定(算出)すれば、周波数 f の成分を有しないノイズの影響を除去しつつ試料Sの屈折率変化のみを測定することが可能である。この測定は、前記位相差 ϕ の測定のS/N比を向上させる。

[0028] また、前記励起光源12にレーザダイオードやLEDなどが用いられる場合、その励起光源12の電源を電気回路でコントロールすることにより前記変調を行うことも可能である。

[0029] 前記試料収容部40は、図2に示すように、基台41と、試料収容器であるマイクロアレイ42と、移送手段であるマニピュレータ44とを備え、前記基台41上には、自動分注装置46、ヒータ47、及びミラー48が設置されている。

[0030] 前記マイクロアレイ42は、前記自動分注装置46から分注される試料を収容するものであり、図2～図4に示すような平坦な基板により構成される。このマイクロアレイ42の上面部には、縦横に並ぶ複数(図4(a)に示す例では $5 \times 5 = 25$ 個)の試料収容凹部42aが形成され、各試料収容凹部42a内に図4(b)に示すような試料Sが分注される。本発明では試料収容器の具体的な材質を問わないが、この実施の形態に係るマイクロアレイ42は、前記励起光Le及び測定光L2を透過させる材質を有する必要がある。具体的には、合成石英、石英、PDMSなどが好適である。

[0031] 前記マニピュレータ44は、前記マイクロアレイ42の外形に対応する形状の窓44aを有し、この窓44a内に前記マイクロアレイ42が嵌まり込んだ状態で同アレイ42を保持する。換言すれば、このマイクロアレイ42を上下に開放した状態で同アレイ42を四方

外側から保持する。

- [0032] 前記自動分注装置46は、前記基台41上に立設され、前記試料Sを適量(すなわち前記各試料収容凹部42aを満たす量)だけ滴下する。
- [0033] 前記ミラー48は、前記自動分注装置46から水平方向に離れた位置で前記基台41上に設置され、前記測定系20から下向きに導入される測定光L2を上向きに180°反射させる。
- [0034] 前記ヒータ47は、本発明に係る温度調節機構を構成するもので、前記ミラー48のすぐ上に配設され、このヒータ47上に移送されるマイクロアレイ42を所定温度まで加熱する。この加熱温度は、前記試料Sにおける生体小分子とそのアプタマーとの相互作用を促進させる温度(反応温度)に設定されている。このヒータ47において前記励起光Le及び前記測定光L2が照射される位置には切欠部47aが形成され、この切欠部47aにおいて前記ミラー48が上方に開放されている。
- [0035] なお、本発明に係る温度調節機構は、前記ヒータ47に限らない。逆に試料の温度を低下させる冷却器も含まれ得る。
- [0036] 前記マニピュレータ44は、前記自動分注装置46による分注位置、前記ヒータ47上の加熱位置、及び前記ミラー48上の励起光Le及び測定光L2の照射位置の順に前記マイクロアレイ42を搬送する。
- [0037] 次に、この検出装置の作用を説明する。
- [0038] 前記試料収容部40では、マイクロアレイ42を保持するマニピュレータ44が同アレイ42をまず分注位置に移送する。そして、前記マイクロアレイ42の各試料収容凹部42aが順に前記自動分注装置46の直下に位置するように同アレイ42を走査する。これらの分注位置で、前記自動分注装置46から各試料収容凹部42a内に試料Sが分注される。
- [0039] 全ての試料収容凹部42aへの試料Sの分注が完了した後、前記マニピュレータ44は前記マイクロアレイ42を前記ヒータ47上の加熱位置へ移送する。この加熱位置は、前記マイクロアレイ42が前記ヒータ47に直接接触する位置であってもよいし、当該ヒータ47から若干離間する位置であってもよい。この加熱位置に前記マイクロアレイ42が所定時間保持されることにより、各試料収容凹部42a内の試料Sにおける反応(

生体小分子とそのアプタマーとの相互作用)が促される。

[0040] その後、前記マニピュレータ44は、前記マイクロアレイ42を図4(b)に示すような前記励起光Le及び前記測定光L2の照射位置(前記ヒータ47の切欠部47aに対応する位置であって前記ミラー48の直上位置)へ移送する。そして、前記マイクロアレイ42の各試料収容凹部42a内の試料Sに対して順に前記励起光Le及び前記測定光L2が照射されるように、前記マイクロアレイ42を走査する。

[0041] この照射位置では、前記励起系10から前記試料収容部40に導かれる励起光Leが前記試料Sに入射され、透過する。このとき、試料Sが前記励起光Leを吸収して発熱する(光熱効果)。一方、前記測定系20から試料収容部40に導入される測定光L2は、前記励起光Leと同軸で前記各試料収容凹部42aに入射され、その凹部42a内の試料Sを透過する。さらに、この測定光L2はミラー48で上向きに反射して前記試料Sをさらに透過する。このとき、前記光熱効果による発熱の量に応じて前記試料Sでの屈折率が変わり、該屈折率に応じて前記位相差 ϕ が変わっているため、当該発熱の量に応じて前記測定系20に戻る測定光L2とこの測定系20における前記参照光L1との干渉光強度が変わる。この干渉光強度に対応する測定信号が前記測定系20の光検出器36により生成され、信号処理装置38に入力される。

[0042] この信号処理装置38は、前記測定信号を所定のサンプリング周期で取り込み、この測定信号の時間変化を示すデータ、例えば図5に示すように経過時間と信号強度との関係を示すグラフを作成する。ここで、前記試料S中に生体小分子が存在しない場合、すなわち当該生体小分子とそのアプタマーとの相互作用が生じていない場合は、時間経過とともに前記信号強度が低下していくのに対し、前記相互作用が生じていると時間経過にかかわらず信号強度はほぼ一定値を維持する。そこで、この信号処理装置38は、前記信号強度の時間減衰率を求め、その時間減衰率が一定以下の場合に前記相互作用が存在していると判断する。これにより、前記試料S中の生体小分子の有無の検出が実現される。

[0043] この時間減衰率は、前記グラフに基づいて測定者が判定することも可能であるが、この実施の形態では前記信号処理装置38が自動的に前記時間減衰率を演算して前記相互作用の有無を判定する。その具体例としては、前記信号処理装置38がサ

ンプリング周期毎に取り込んだ信号強度に基づいて当該信号強度の時間変化を表す直線近似式を演算し、その直線の傾きが一定以下の場合に前記相互作用が生じていると判断することが考えられる。また、前記直線近似式からの各サンプリング信号のばらつきが過度に大きい場合に測定不良と判断するようにしてもよい。

[0044] このような方法及び装置によれば、前記試料Sにおいて検出対象となる生体小分子やそのアプタマーへの標識等を行うことなく、当該試料Sにおける生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の有無を検出することができる。これにより、分子量の小さい生体小分子を高感度で検出することが可能になる。

[0045] 次に、第2の実施の形態を図6及び図7を参照しながら説明する。なお、装置全体の構成は前記図1に示したものと同等であるので、ここでは省略する。

[0046] この第2の実施の形態では、前記第1の実施の形態のように試料収容器であるマイクロアレイ42そのものを移送する手段に代え、図6に示されるように試料を特定方向に流すための流路60をもったマイクロリアクタ50が使用される。すなわち、このマイクロリアクタ50は、試料収容器としての役割と、試料を移送方向に案内する手段としての役割を兼ねる。

[0047] このマイクロリアクタ50は、下側基板52と、その上に重ねられる上側基板54とを備える。これらの基板52、54は、前記マイクロアレイ42と同様に前記励起光Le及び前記測定光L2を透過する材料により形成されている。

[0048] 前記流路60は、前記下側基板52の上面部に形成された溝により構成されている。そして、この下側基板52の上に前記上側基板54が載せられて接合されることにより、前記流路60が封止されている。

[0049] この流路60は、その上流側から順に、第1供給部61N及び第2供給部61Pと、各供給部61N、61Pの下流側の供給流路62N、62Pと、これらの供給流路62N、62Pが合流する合流流路64と、検出対象となる生体小分子とそのアプタマーとを反応させるための反応部65と、前記励起光Le及び前記測定光L2が基板厚み方向に照射される光照射部66と、試料排出部68とを有する。

[0050] 前記第1供給部61Nは、検出されるべき生体小分子が含まれる可能性のある第1液体(つまり検出の対象となる液体)が供給される部分であり、前記第2供給部61Pは

前記生体小分子との相互作用が可能なアプタマーを含む液体が供給される部分であり、前記第1液体と前記第2液体とが前記合流流路64で合流することにより試料が生成される。

- [0051] 前記供給部61N, 61Pに対応して前記上側基板54に同基板54を厚み方向に貫通する供給孔57が形成され、同様に、前記試料排出部68に対応して前記上側基板54に排出孔58が形成されている。前記供給孔57には、それぞれ、試料移送手段としての生体小分子供給用シリンジ及びアプタマー供給用シリンジが接続される。これらのシリンジは、前記供給孔57を通じて前記第1供給部61N及び第2供給部61Pにそれぞれ前記第1液体及び前記第2液体を供給する。
- [0052] 前記上側基板54には、前記反応部65の上方に位置するようにヒータ56が組み込まれている。このヒータ56は、前記試料を、前記生体小分子とアプタマーとの反応温度(相互作用のための温度)まで加熱する。また、この加熱時間すなわち反応時間を十分に確保するために(例えば10分)、前記反応部65が蛇行してその流路長を稼いでいる。
- [0053] 前記光照射部66は、直線状をなし、その長手方向(すなわち試料の流れ方向)に並ぶ複数の位置(図例では3つの位置A, B, C)に前記励起光Le及び前記測定光L2の照射位置が設定されている。そして、これらの照射位置に対して順に前記励起光Le及び前記測定光L2が照射されるように、当該光Le, L2の照射位置またはマイクロアクタ50が動かされる。
- [0054] また、下側基板52の底面には、前記測定光L2を180° 反射させるための反射膜(例えば誘電多層膜)がコーティングされている。この反射膜は、前記測定光L2の反射によって当該測定光L2に前記試料S内を往復させる。
- [0055] なお、前記流路60の寸法は適宜設定可能であるが、一般には幅200 μ m程度、深さ100 μ m程度が好適である。試料の送液は比較的ゆっくりとした速度であることが好ましく、例えば0.5 mm/sec程度が好適である。
- [0056] このマイクロアクタ50では、前記試料の生成、相互作用、及び光熱効果の測定が全て行われるため、生体小分子の検出がコンパクトな構成で効率よく行われる。
- [0057] この第2の実施の形態での信号処理は例えば次のようにして行われる。前記試料

中に検出対象となる生体小分子が存在しない場合、すなわち当該試料中で生体小分子とそのアプタマーとの相互作用が生じていない場合、前記励起光Leの照射による光熱効果は時間経過とともに減衰していくため、測定開始位置である位置Aからその下流側の位置Bさらには位置Cに向かうに従って検出信号の強度は低下していく。しかしながら、前記試料中に前記相互作用が生じた部分が存在している場合、その部分については光熱効果の減衰がほとんどないため、当該部分が位置B及び位置Cを通過した時に信号強度が一時的に高くなる。すなわち、その信号強度の時間変化は例えば図7(a)のようになる。

[0058] ただし、各位置A～Cでの検出信号には時間的なずれがあるので、そのずれ分を補正して各位置A～Cでの検出信号を同図(b)に示すように重ね合わせると、前記相互作用が生じた部分(同図P)においてのみ信号強度が著しく高くなる。従って、この局所的に信号強度が高い部分で相互作用が生じていることを把握することができる。これにより、前記試料中に前記生体小分子が存在することを確認することができる。

[0059] 前記信号処理装置38は、前記図7(b)に示されるような重ね合わせデータの出力に加え、その重ね合わせデータでのピーク値の大小から相互作用の有無ひいては前記生体小分子の有無を自動的に判定する。なお、この第2の実施の形態においても、前記第1の実施の形態と同様に励起光Le及び測定光L2の照射位置を単一の位置にのみ設定し、その時間変化を監視するようにしてもよい。あるいは、前記光照射部66での試料の流れ速度と同等の速度で前記励起光Le及び測定光L2の照射位置を追従させるようにしてもよい。

[0060] また、本発明において、前記励起光による試料の光熱効果を測定する方法は前記のような光干渉法に限られない。例えば、熱レンズ法のように、溶媒の屈折率の変化に伴う測定光の強度変化を測定する方法も利用可能である。

実施例 1

[0061] 前記図1～図4に示す装置による生体小分子の検出を実証する。

[0062] 図4(a)(b)に示されるマイクロアレイ42には合成石英製のものを用い、その各試料収容凹部42aの形状は0.5mm×0.5mm×1.0mmの直方体とする(ただし、この形状は例えば直径0.5mmの円柱でも可。)

- [0063] 前記各試料収容凹部42aに、生体小分子であるアデノシンと特異的に反応するアプタマー(核酸からなる機能性高分子)を含む溶液を分注し、ヒータ47により75°Cまで加熱して15分保持する。そして、ヒータ47にて15分間、25°Cに保温する。その後、アデノシンを含む試料の作成のために、アデノシンアプタマーの最終濃度が1.3 μ M、アデノシンの最終濃度が7.4 μ Mとなるようにこれらを混合する。この混合は、アデノシンを含まない試料の作成では行わない。
- [0064] 次に、試料をヒータ47にて25°Cに保ち、この状態を反応(相互作用)のために必要な時間(5分間)維持する。その後、当該試料を励起光Le及び測定光L2の照射位置にセットしてその光熱効果の測定を行う。励起光Leの光源12には高圧水銀ランプを用い、その波長250nm付近の発光極大域をバンドパスフィルタで取り出してオプティカルチョッパーで80Hz程度に変調し、直径5mmの領域に集光して前記試料に照射する。さらに、この励起光Leと同軸で測定光L2を試料に照射し、この測定光L2と参照光L1との干渉光の強度を測定する。この測定信号を信号処理装置38に電圧値として表示させ、さらにデータロガーにより連続的に記録する。
- [0065] その測定結果を図8に示す。同図線71に示されるように、試料がアプタマーのみを含む場合は測定信号の強度がその立上り後に時間経過とともに徐々に低下していく。また、同図線72に示されるように、試料がアデノシンのみを含む場合は信号強度の立上りすら存しない。これに対し、試料がアデノシンとそのアプタマーの双方を含む場合は、同図線70に示されるように、信号強度が立ち上がってからその低下がほとんど見られない。
- [0066] 従って、この測定信号の立上り後の低下速度を比較することにより、試料中におけるアデノシンの存在を判定することができる。具体的には、アプタマーと混合されるアデノシンの存在を40nM程度まで検出できることが確認されている。
- [0067] 以上のように、本発明に係る検出方法及び装置は、試料への励起光の照射に起因する当該試料中の光熱効果の時間変化に基づき、前記試料中における生体小分子の検出を簡易かつ安価な設備で確実に検出することを可能にする。具体的に、前記検出方法は、前記生体小分子と相互作用可能なアプタマーを含む試料に対して励起光を照射するステップと、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果

を測定するステップと、前記光熱効果の時間変化に基づいて前記生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の発生の有無を判断することにより前記生体小分子の有無を検出するステップとを含む。また、前記検出装置は、試料中の生体小分子を検出するための装置であって、前記生体小分子と相互作用可能なアプタマーを含む試料を収容するための試料収容部と、前記試料収容部に収容された試料に対して励起光を照射する励起光照射系と、前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果の測定信号を生成する測定装置とを含み、この測定装置は、前記測定信号の時間変化に関するデータを作成し、その作成したデータに基づいて前記相互作用の有無を判断することにより前記生体小分子の有無を検出する信号処理装置を含む。

[0068] 前記検出方法において前記光熱効果を測定するステップとしては、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定する操作を含むものが、好適である。同様に、前記検出装置における測定装置は、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定するものが、好適である。前記試料が光熱効果により発熱すると、当該試料での光の屈折率が変化するので、この試料に測定光を透過させてその位相変化を測定することにより、前記試料の光熱効果を容易にかつ的確に把握することができる。

[0069] この場合、前記測定装置は、測定用光源と、この測定用光源から発せられる測定光を前記試料収容部に収容された試料に透過させ、この透過した測定光と参照光とを干渉させる光学系と、その干渉した光の強度を検出する光検出器とを含むものが、好適である。

[0070] この測定装置によれば、前記測定光と前記参照光との干渉光の強度を検出するだけの簡単な構成で、前記試料を透過する測定光の位相変化を容易に計測することができる。

[0071] 一方、前記試料収容部は、前記試料を収容する試料収容器と、この試料収容器内の試料を前記生体小分子とそのアプタマーとの反応温度に調節する温度調節機構と、その加熱された試料を前記励起光の照射位置まで移送する移送手段とを含むものが、好ましい。

[0072] この構成によれば、前記試料収容器内で、前記試料中における生体小分子とその

アプタマーとの反応(相互作用)を行わせ、かつ、そのまま当該試料に対して励起光の照射を行うことができる。

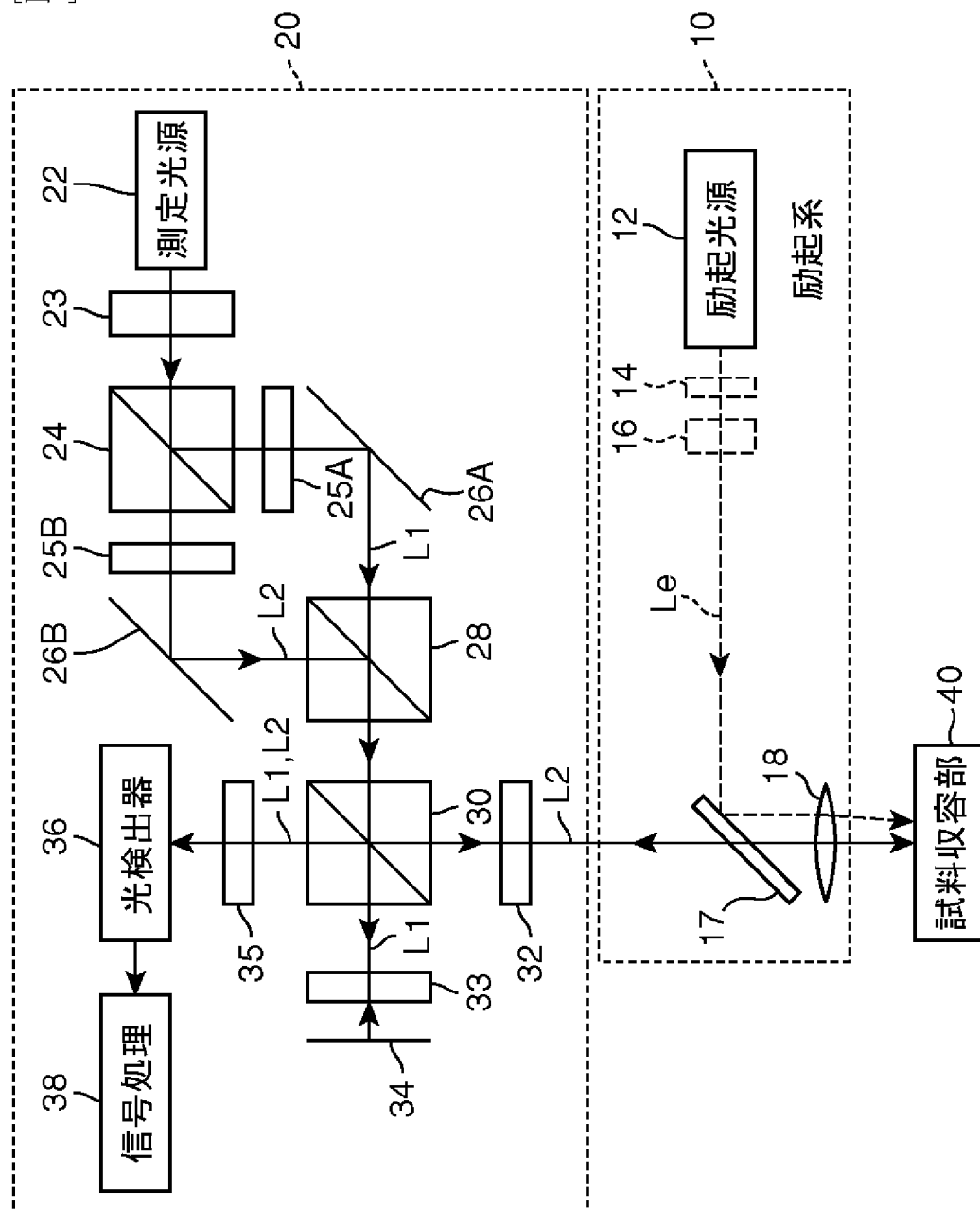
- [0073] 前記移送手段としては、前記試料収容器を、この試料収容器内に前記試料を注入するための注入位置と、その注入された試料の温度を前記温度調節機構により調節するための温度調節位置と、前記励起光の照射位置の順に移送するものが、好適である。
- [0074] また、前記試料収容器が、前記試料を流すための流路を有し、この流路は、その上流側から順に、前記生体小分子の検出の対象となる第1液体及び当該生体小分子のアプタマーを含む第2液体がそれぞれ導入される第1導入部及び第2導入部と、その導入された第1液体と第2液体とを合流させて混合する混合部と、その混合液の温度を前記温度調節機構により調節して前記生体小分子と前記アプタマーとの反応を行わせるための反応部と、前記励起光が照射される励起光照射部とを有するものであってもよい。この試料収容器は、コンパクトな構成で効率の高い生体小分子の検出を行うことを可能にする。
- [0075] また、前記励起光照射部が、その試料の流れ方向に並ぶ複数の位置に前記励起光が照射されるものであれば、その各位置で光熱効果を測定することによって、当該光熱効果の時間変化を適正に検出することができる。

請求の範囲

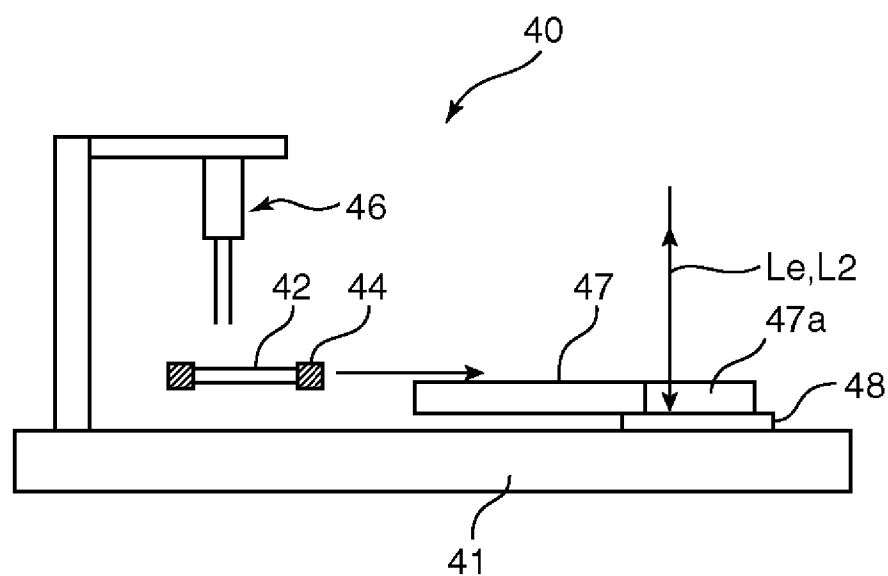
- [1] 試料中の生体小分子を検出するための方法であって、
前記生体小分子と相互作用可能なアプタマーを含む試料に対して励起光を照射するステップと、
前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果を測定するステップと、
前記光熱効果の時間変化に基づいて前記試料中での前記生体小分子と前記アプタマーとの相互作用の発生の有無を判断することにより前記生体小分子の有無を検出するステップとを含む。
- [2] 請求項1記載の生体小分子の検出方法であって、
前記光熱効果を測定するステップは、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定することを含む。
- [3] 試料中の生体小分子を検出するための装置であって、
前記生体小分子と相互作用可能なアプタマーを含む試料を収容するための試料収容部と、
前記試料収容部に収容される試料に対して励起光を照射する励起光照射系と、
前記励起光の照射により前記試料内に生ずる光熱効果の測定信号を生成する測定装置とを含み、
前記測定装置は、前記測定信号の時間変化に関するデータを作成し、その作成したデータに基づいて前記試料中での前記生体小分子とそのアプタマーとの相互作用の有無を判断することにより前記生体小分子の有無を検出する信号処理装置を含む。
- [4] 請求項3記載の生体小分子の検出装置において、
前記測定装置は、前記試料に前記励起光とは別の測定光を透過させてこの透過した測定光の位相変化を測定する。
- [5] 請求項4記載の生体小分子の検出装置において、
前記測定装置は、測定用光源と、この測定用光源から発せられる測定光を前記試料収容部に収容された試料に透過させ、この透過した測定光と参照光とを干渉させる光学系と、その干渉した光の強度を検出する光検出器とを含む。

- [6] 請求項3～5のいずれかに記載の生体小分子の検出装置において、
前記試料収容部は、前記試料を収容する試料収容器と、この試料収容器内の試料を前記生体小分子とそのアプタマーとの反応温度に調節する温度調節機構と、その加熱された試料を前記励起光の照射位置まで移送する移送手段とを含む。
- [7] 請求項6記載の生体小分子の検出装置において、
前記移送手段は、前記試料収容器を、この試料収容器内に前記試料を注入するための注入位置と、その注入された試料の温度を前記温度調節機構により調節するための温度調節位置と、前記励起光の照射位置の順に移送する。
- [8] 請求項6記載の生体小分子の検出装置において、
前記試料収容器は、前記試料を流すための流路を有し、この流路は、その上流側から順に、前記生体小分子の検出の対象である第1液体及び当該生体小分子のアプタマーを含む第2液体がそれぞれ導入される第1導入部及び第2導入部と、その導入された第1液体と第2液体とを合流させて混合する混合部と、その混合液の温度を前記温度調節機構により調節して前記生体小分子と前記アプタマーとの反応を行わせるための反応部と、前記励起光が照射される励起光照射部とを有する。

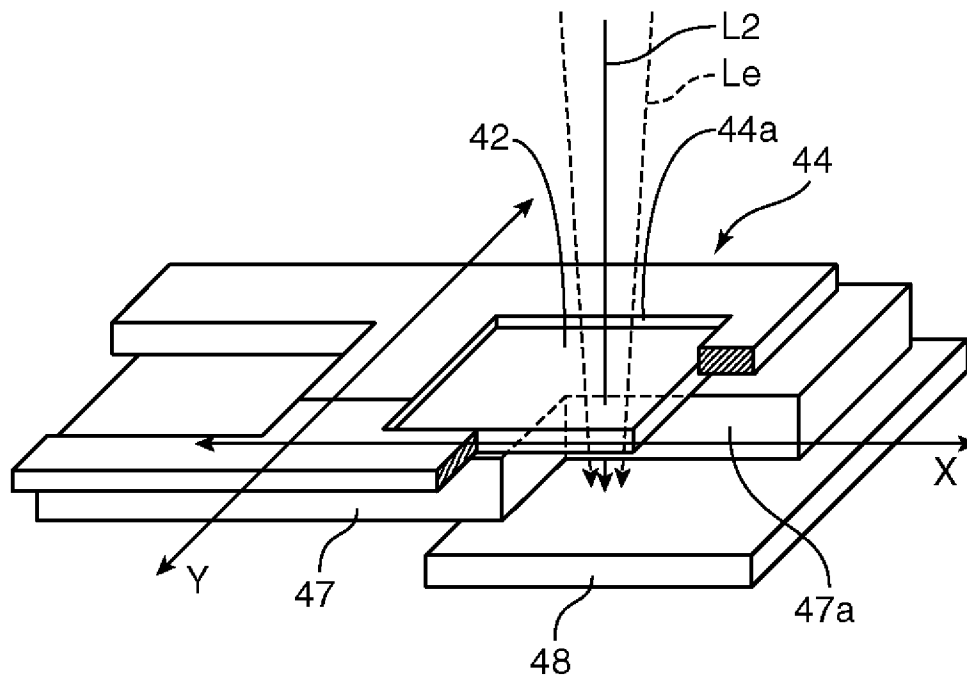
[図1]



[図2]

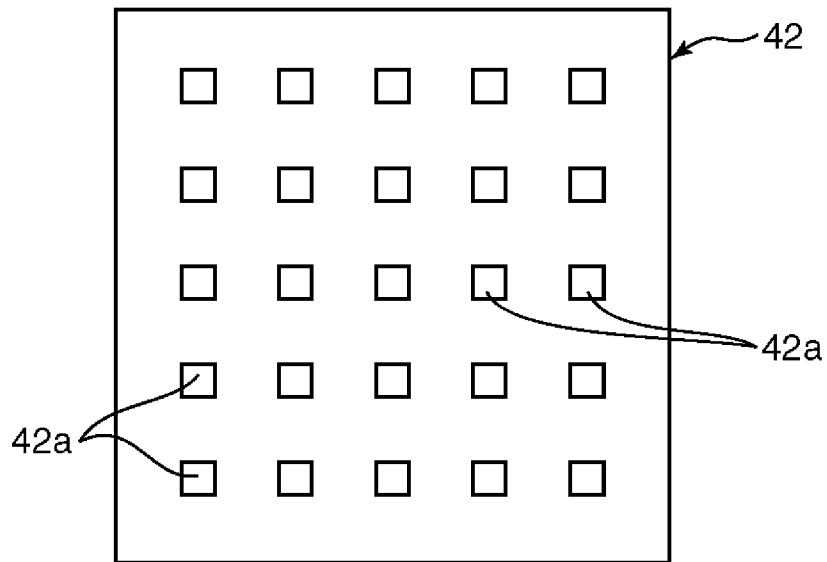


[図3]

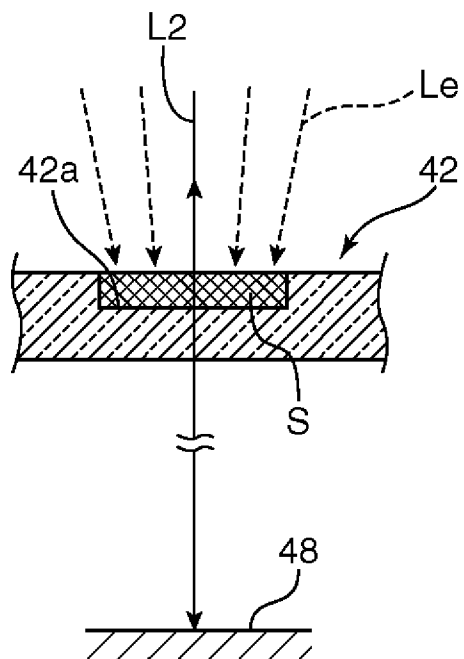


[図4]

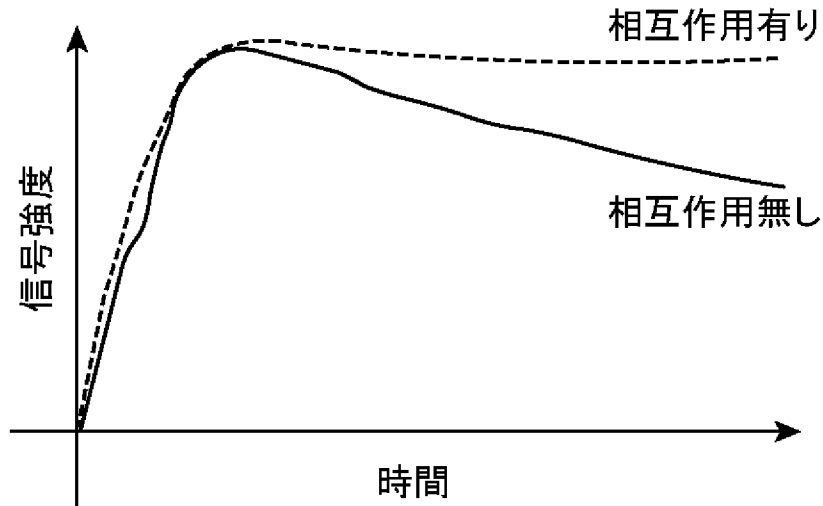
(a)



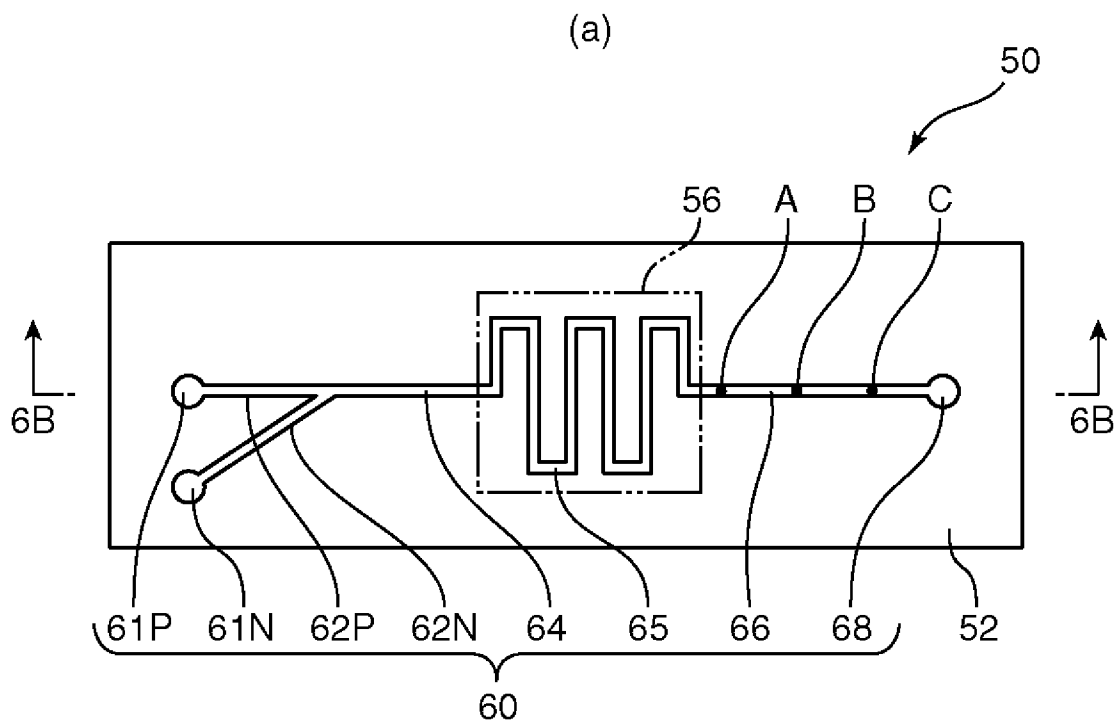
(b)



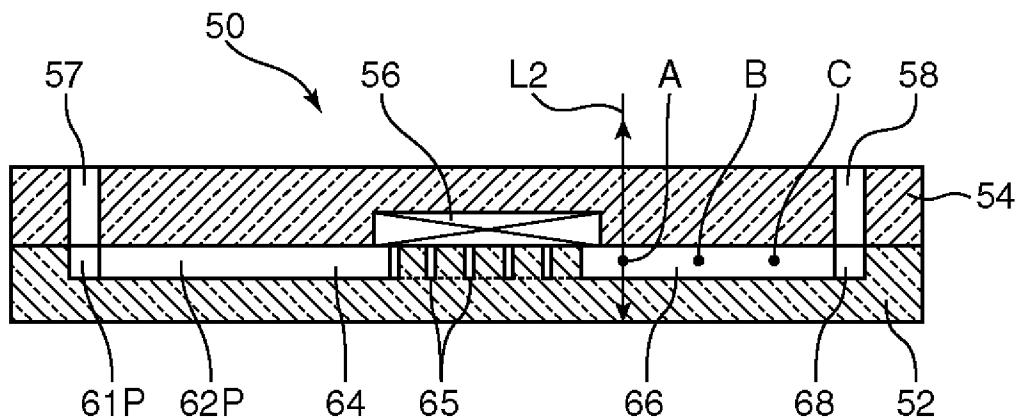
[図5]



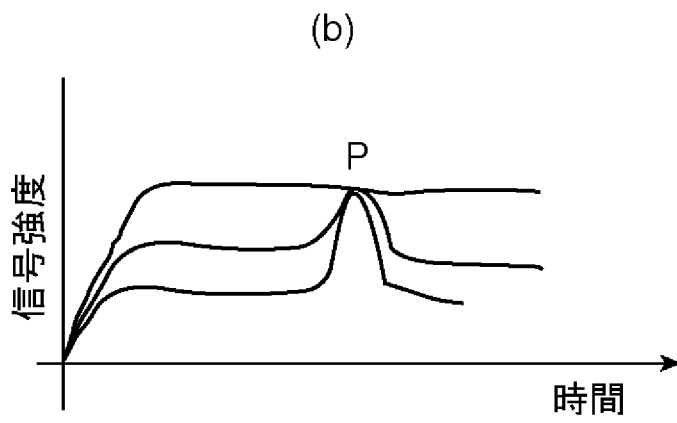
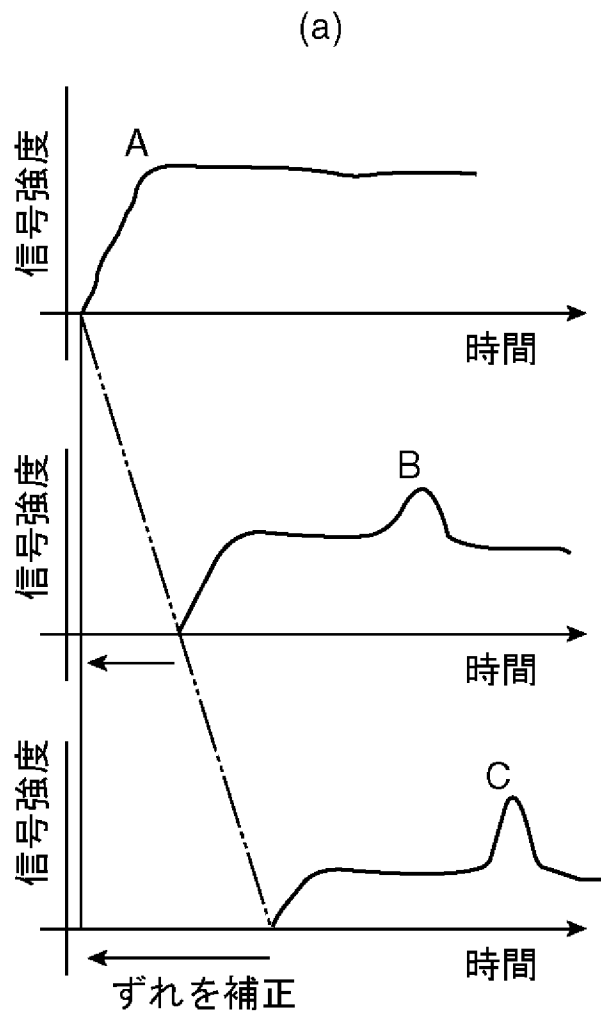
[図6]



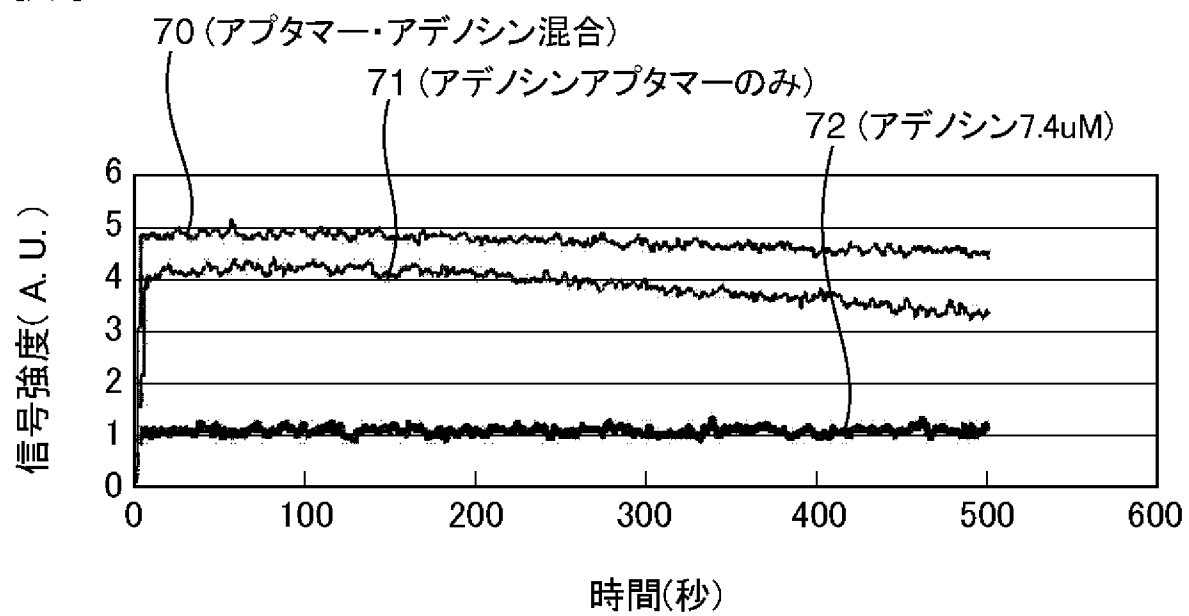
(b)



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N25/16(2006.01)i, G01N21/41(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N35/08(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)

G01N25/16, G01N21/41, G01N33/543, G01N35/08, G01N37/00

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 1996-2008

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

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

JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kazunori Ikebukuro, Kazuhiro Shiota et al., "IER-ho o Riyo shita Shinki Tanpakushitsu Kenshutsukei no Kochiku", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 25 August, 2004 (25.08.04), page 241	1-8
Y	WO 2006/033348 A1 (Tokyo University of Agriculture and Technology), 30 March, 2006 (30.03.06), Par. Nos. [0016], [0021] & DE 112005002316 T	1-8

☒ 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
29 August, 2008 (29.08.08)

Date of mailing of the international search report
09 September, 2008 (09.09.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/062055

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Naokazu SAKODA, Eiji TAKAHASHI et al., "Laser Kansho Konetsu Henkanho ni yoru Biryo Seitai Bunshi no Kenshutsu (II)", Extended Abstracts, Japan Society of Applied Physics and Related Societies, 29 March, 2005 (29.03.05), Vol.52, Separate Vol.3, page 1135	1-8
Y	Eiji TAKAHASHI, Ryo MAWATARI et al., "Laser Kansho Konetsu Henkanho ni yoru Kokando Kyuko Bunseki (2)", Abstracts of the Symposium of the Japan Society for Analytical Chemistry, 29 April, 2006 (29.04.06), Vol.67, page 87	1-8
Y	WO 2002/090912 A1 (Kanagawa Academy of Science and Technology), 14 November, 2002 (14.11.02), Full text; all drawings (Family: none)	6-8
Y	JP 2001-165939 A (Asahi Kasei Corp.), 22 June, 2001 (22.06.01), Par. No. [0096]; Fig. 2 (Family: none)	6-8
A	JP 2004-156925 A (JSR Corp.), 03 June, 2004 (03.06.04), Claim 6; Par. Nos. [0019], [0051], [0056], [0057]; all drawings (Family: none)	1-8
A	JP 2004-301520 A (Kobe Steel, Ltd.), 28 October, 2004 (28.10.04), Full text; all drawings (Family: none)	1-8
A	JP 2006-84431 A (Kobe Steel, Ltd.), 30 March, 2006 (30.03.06), Full text; all drawings (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N25/16(2006.01)i, G01N21/41(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N35/08(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. G01N25/16, G01N21/41, G01N33/543, G01N35/08, G01N37/00

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 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 8 年

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

JSTPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	池袋一典、塩田和宏、他、I E R 法を利用した新規タンパク質検出系の構築, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2004.08.25, 第241頁	1 - 8
Y	WO 2006/033348 A1 (国立大学法人東京農工大学) 2006.03.30, [O O 1 6], [O O 2 1] & DE 112005002316 T	1 - 8
Y	迫田尚和、高橋英二、他、レーザ干渉光熱変換法による微量生体分子の検出(II), 応用物理学関係連合講演会講演予稿集, 2005.03.29,	1 - 8

☒ 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

2 9 . 0 8 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 9 . 2 0 0 8

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)

2 J

9 1 1 6

▲高▼見 重雄

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 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
	第 5 2 回、第 3 分冊、第 1 1 3 5 頁	
Y	高橋英二、馬渡亮、他、レーザ干渉光熱変換法による高感度吸光分析 (2), 分析化学討論会講演要旨集, 2006. 04. 29, 第 6 7 回, 第 8 7 頁	1 - 8
Y	WO 2002/090912 A1 (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2002. 11. 14, 全文, 全図 (ファミリーなし)	6 - 8
Y	JP 2001-165939 A (旭化成株式会社) 2001. 06. 22, 【0 0 9 6】, 図 2 (ファミリーなし)	6 - 8
A	JP 2004-156925 A (J S R 株式会社) 2004. 06. 03, 【請求項 6】, 【0 0 1 9】, 【0 0 5 1】, 【0 0 5 6】, 【0 0 5 7】, 全図 (ファミリーなし)	1 - 8
A	JP 2004-301520 A (株式会社神戸製鋼所) 2004. 10. 28, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1 - 8
A	JP 2006-84431 A (株式会社神戸製鋼所) 2006. 03. 30, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1 - 8