(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 5 月 12 日(12.05.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/072416 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/081029

(22) 国際出願日: 2015 年 11 月 4 日(04.11.2015)

(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 2014-224639 2014 年 11 月 4 日(04.11.2014) JP
特願 2015-022624 2015 年 2 月 6 日(06.02.2015) JP

(71) 出願人: 凸版印刷株式会社(**TOPPAN PRINTING CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1100016 東京都台東区台東１丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 牧野　洋一(**MAKINO Yoichi**); 〒1100016 東京都台東区台東１丁目５番１号　凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 小澤　知之(**OZAWA Tomoyuki**); 〒1100016 東京都台東区台東１丁目５番１号　凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 明石　秀一(**AKASHI Shuichi**); 〒1100016 東京都台東区台東１丁目５番１号　凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 國富　朋子(**KUNITOMI Tomoko**); 〒1100016 東京都台東区台東１丁目５番１号　凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 鈴木　史朗, 外(**SUZUKI Shirou** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

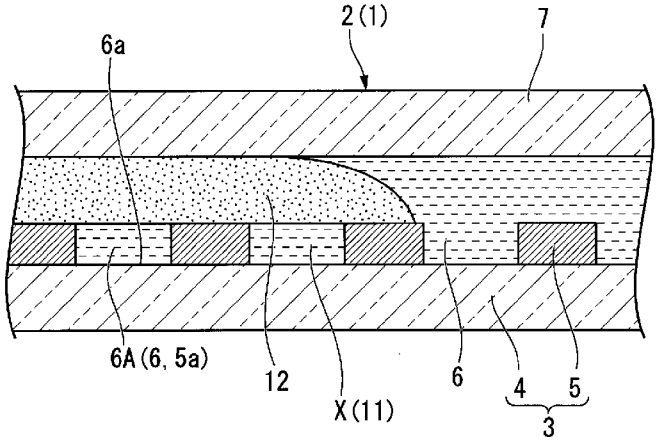
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR INTRODUCING NUCLEIC ACID, METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID, METHOD FOR ANALYZING BIOLOGICAL COMPONENT, ARRAY DEVICE FOR BIOLOGICAL COMPONENT ASSAY, AND KIT FOR ANALYZING BIOLOGICAL COMPONENT

(54) 発明の名称 : 核酸導入方法、核酸検出方法、生体成分解析方法、生体成分定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キット



(57) **Abstract**: An array device for biological component assay, provided with: a substrate having a plurality of wells; a cover part placed over the substrate so as to cover open portions of the plurality of wells, leaving a gap between the substrate and the cover part; an injection port communicated with the gap between the substrate and the cover part; and a discharge port formed at a position separated from the injection port and communicated with the gap between the substrate and the cover part; an aqueous solution being loaded between the substrate and the cover part and a liquid including a biological component being subsequently introduced to the gap between the substrate and the cover part from the injection port, whereby excess solution, which is the portion of the aqueous solution that is outside the plurality of wells, is discharged from the discharge port, and the biological component is transferred by diffusion into well-loaded aqueous solution, which is the portion of the aqueous solution that is in the plurality of wells.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/072416 A1

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

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

生体成分定量用アレイデバイスであって、複数のウェルを有する基材部と、前記基材部との間に隙間を有して前記複数のウェルの開口部分を覆うように前記基材部に重ねられたカバー部と、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に連通された注入口部と、前記注入口部から離れた位置に形成され、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に連通された排出口部と、を備え、前記基材部と前記カバー部との間に水性溶液を充填した後に、生体成分を含む液体が前記注入口部から前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に導入されることで、前記水性溶液のうち前記複数のウェル外にある余剰溶液は前記排出口部から排出され、前記水性溶液のうち前記複数のウェル内にあるウェル充填水性溶液に前記生体成分が拡散により移行する。

明　細　書

発明の名称 ：

核酸導入方法、核酸検出方法、生体成分解析方法、生体成分定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キット

技術分野

[0001] 本発明は、核酸導入方法、核酸検出方法、生体成分解析方法、生体成分定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キットに関する。

本願は、２０１４年１１月４日に日本に出願された特願２０１４－２２４６３９号、および２０１５年２月６日に日本に出願された特願２０１５－０２２６２４号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 従来、疾患や体質の診断を、生体分子を解析することによって行うことが知られている。たとえば、一塩基多型（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ：ＳＮＰ）解析による体質診断、体細胞変異解析による抗がん剤の投与判断、ウィルスのタンパク質やＤＮＡの解析による感染症対策などが知られている。

[0003] たとえば、がんの治療薬では、ＥＧＦＲ－ＴＫＩ（チロシンキナーゼ阻害薬）の投与前後で変異型ＥＧＦＲ（上皮成長因子受容体）のコピー数を定量することで、治療効果の指標とできることが示唆されている。従来、リアルタイムＰＣＲを用いた定量が行われていたが、検査に使用された核酸の総量が変化することが定量性に影響を与えることがわかっており、今日では核酸の総量が定量性に影響しないデジタルＰＣＲ技術が開発されている。

[0004] デジタルＰＣＲ技術とは、ＰＣＲ反応試薬と核酸との混合物を多数の微小液滴に分割し、これらの微小液滴に対して、混合物中の核酸のうち検出対象となる核酸を鋳型とするＰＣＲ増幅を行うことにより、鋳型核酸を含んだ微小液滴からＰＣＲ増幅による蛍光などのシグナルを検出し、微小液滴の全数のうちシグナルが検出された微小液滴の割合を求めることによって、試料中

の核酸を定量する技術である。

たとえば特許文献１や非特許文献１には、微少量の容積を有する微小空間内で酵素反応を行うことで、デジタルＰＣＲを利用して生体物質検査をすることができることが示されている。

[0005] デジタルＰＣＲに使用される微小液滴の作製方法として、試薬と核酸の混合物を封止液で分断化することで微小液滴を作製する方法や、基板上に孔を空けた中に試薬と核酸の混合物を入れた後に封止液で孔を封止することで微小液滴を作製する方法などが知られている。また、特許文献２には、少量の試薬で大量の実験データを短時間で獲得するためにマイクロチャンバー内でエマルジョンを製造する方法が開示されている。

[0006] デジタルＰＣＲでは、１つの微小液滴に存在する鋳型核酸が１個又は０個となるように、ＰＣＲ反応試薬と核酸との混合物は希釈されている。デジタルＰＣＲでは、核酸増幅の感度を高めるために、また多数の微小液滴に対して同時に核酸増幅を行うために、各微小液滴の体積は小さい方が好ましい。たとえば非特許文献１には、各ウェルの容積が６ｎｌとなるように形成されたマイクロアレイ状の反応容器が開示されている。また、非特許文献２には、深さ３μｍ、直径５μｍのウェルが流路内に多数形成されたマイクロアレイに対して流路に試料を流して各ウェルに試料を導入した後、流路内の余剰試薬を封止液で押し出すことによって、各ウェル内に試料を導入する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：日本国特表２００３－５１１００９号公報

特許文献2：日本国特許第４９１１５９２号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：ＰＬＯＳ　ＯＮＥ，３（８），ｅ２８７６，（２００８）

非特許文献2：ＬＡＢ　ＯＮ　Ａ　ＣＨＩＰ，ＤＯＩ：１０．１０３９／ｃ２１ｃ４０６３２ｂ，（２０１２）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、上記非特許文献１，２に開示された技術では、ウェル内に気泡が入ってしまった場合には各ウェルから気泡を除去する必要があり、精度のよい定量分析をするためには煩雑な操作が必要である。

[0010] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、本発明の目的は、ウェル内に気泡が入りにくい核酸導入方法（生体成分導入方法）、並びに精度のよい定量分析を簡便な操作で行える核酸検出方法、生体成分解析方法、生体成分核酸定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キットを提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明の第一態様に係る生体成分定量用アレイデバイスは、複数のウェルを有する基材部と、前記基材部との間に隙間を有して前記複数のウェルの開口部分を覆うように前記基材部に重ねられたカバー部と、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に連通された注入口部と、前記注入口部から離れた位置に形成され、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に連通された排出口部と、を備え、前記基材部と前記カバー部との間に水性溶液を充填した後に、生体成分を含む液体が前記注入口部から前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に導入されることで、前記水性溶液のうち前記複数のウェル外にある余剰溶液は前記排出口部から排出され、前記水性溶液のうち前記複数のウェル内にあるウェル充填水性溶液に前記生体成分が拡散により移行する。

[0012] 前記基材部と前記カバー部との間に充填された前記水性溶液を備えていてもよい。

[0013] 前記複数のウェルと前記カバー部との少なくともいずれかは光透過性を有していてもよい。

[0014] 前記複数のウェルは電極を有し、前記基材部は、前記電極に繋がる配線と、前記配線を検出回路に接続するためのコネクタと、を有していてもよい。

[0015] 前記基材部の厚さ方向から見たときに前記注入口部及び前記排出口部と重ならない領域内に、前記複数のウェルを有してシグナル増幅反応を行う領域が設定されていてもよい。

[0016] 前記排出口部と連通し、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間から前記排出口部を通じて液体が流入して貯まる廃液容器部をさらに備えていてもよい。

[0017] 前記基材部の厚さ方向から見たときに前記注入口部，前記廃液容器部，及び前記排出口部と重ならない領域内に、前記複数のウェルを有してシグナル増幅反応を行う領域が設定されていてもよい。

[0018] 本発明の第二態様に係る生体成分解析キットは、上記態様に係る生体成分定量用アレイデバイスと、前記生体成分に対する検出反応試薬と、前記基材部と前記カバー部との間に前記注入口部から送液可能な油性封止液と、を備え、前記水性溶液は核酸を含まない緩衝液である。

[0019] 本発明の第三態様に係る核酸導入方法は、流路内に複数のウェルが形成され前記流路内及び前記複数のウェル内に水性溶液が充填された核酸定量用アレイデバイスにおける前記流路内に鋳型核酸を含む混合液を送液し、前記流路内に送液された混合液を前記複数のウェル内の前記水性溶液に拡散させる。

[0020] 油性封止液を前記流路内に送液して前記複数のウェル内の前記混合液及び前記水性溶液を前記油性封止液により封止することにより前記複数のウェルを複数の独立した核酸検出反応容器としてもよい。

[0021] 前記混合液がシグナル増幅反応試薬を含み、前記核酸検出反応容器内でシグナル増幅反応を行い、前記核酸検出反応容器内に対してシグナル検出を行ってもよい。

[0022] 前記シグナル増幅反応が酵素反応であってもよい。

[0023] 前記酵素反応が等温反応であってもよい。

[0024] 前記酵素反応がインベーダー反応であってもよい。

[0025] 前記シグナル検出は、前記核酸検出反応容器内における前記鋳型核酸の有

無に対応した蛍光、発光、ｐＨ変化、吸光度変化、および電位変化のうちの少なくとも１つの検出によってもよい。

[0026] 本発明の第四態様に係る生体成分解析方法は、上記第三態様に係る核酸検出方法を用いた生体成分解析方法であって、解析対象物質となるＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、又はタンパク質のいずれかを前記混合液が含み、前記解析対象物質に対する特異的標識能を有する標識物質に前記鋳型核酸が含まれまたは結合可能な状態で前記標識物質が前記混合液と前記水性溶液との少なくともいずれかに含まれている。

[0027] 前記標識物質が、前記鋳型核酸とは異なるＤＮＡ鎖、酵素、粒子、抗体、及びリポソームのうちの少なくとも一つを含んでいてもよい。

発明の効果

[0028] 本発明の上記態様によれば、ウェル内に気泡が入りにくい核酸導入方法（生体成分導入方法）、並びに精度のよい定量分析を簡便な操作で行える核酸検出方法、生体成分解析方法、核酸定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]本発明の第１実施形態に係る生体成分解析キットの斜視図である。

[図2]図１のＡ－Ａ線における断面図である。

[図3]同生体成分解析キットの作用を説明するための図である。

[図4]同生体成分解析キットの作用を説明するための図である。

[図5]本発明の第２実施形態に係る生体成分解析キットにおける核酸定量用アレイデバイスの基材部を示す模式図である。

[図6]本発明の第３実施形態に係る生体成分解析キットにおける核酸定量用アレイデバイスの平面図である。

[図7]図６のＢ－Ｂ線における断面図である。

[図8]同実施形態（第３実施形態）の変形例（変形例１）の構成を示す断面図である。

[図9]同実施形態の他の変形例（変形例２）の構成を示す断面図である。

[図10]同実施形態のさらに他の変形例（変形例３）の構成を示す断面図である。

[図11]同実施形態のさらに他の変形例（変形例４）の構成を示す断面図である。

[図12]同実施形態のさらに他の変形例（変形例５）の構成を示す平面図である。

[図13]図１２のＣ－Ｃ線における断面図である。

[図14]同実施形態のさらに他の変形例（変形例６）の構成を示す平面図である。

[図15]図１４のＤ－Ｄ線における断面図である。

[図16]図１４のＤ－Ｄ線における断面を示す斜視図である。

[図17]同変形例（変形例６）におけるスペーサー部材を示す平面図である。

[図18A]スペーサー部材の他の構成を示す平面図である。

[図18B]スペーサー部材の他の構成を示す平面図である。

[図18C]スペーサー部材の他の構成を示す平面図である。

[図19]同実施形態の他の変形例（変形例６）の微小孔アレイ層を備えた基材部の平面図である。

[図20]同変形例（変形例６）の他の変形例の構成例を示す断面図である。

[図21]同構成例を示す斜視図である。

[図22]同構成例におけるスペーサー部材を示す平面図である。

[図23]同変形例のさらに他の構成例を示す断面図である。

[図24]同構成例を示す斜視図である。

[図25]同実施形態のさらに他の変形例（変形例７）の構成を示す断面図である。

[図26]同実施形態のさらに他の変形例（変形例８）の構成を示す平面図である。

[図27]図２６のＥ－Ｅ線における断面図である。

[図28]同実施形態のさらに他の変形例（変形例９）の構成を示す断面図であ

る。

[図29]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１０）の構成を示す断面図である。

[図30]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１１）の構成を示す断面図である。

[図31]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１２）の構成を示す断面図である。

[図32A]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１３）の構成を示す斜視図である。

[図32B]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１３）の構成を示す６面図である。

[図33A]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１４）の構成を示す斜視図である。

[図33B]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１４）の構成を示す６面図である。

[図34]同実施形態のさらに他の変形例（変形例１５）の作用を説明するための図である。

[図35]本発明の実施例における生体成分解析結果を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0030] （第１実施形態）

本発明の第１実施形態に係る核酸導入方法、核酸検出方法、生体成分解析方法、生体成分定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キットについて説明する。図１は、本実施形態に係る生体成分解析キットの斜視図である。図２は、図１のＡ－Ａ線における断面図である。図３及び図４は、本実施形態に係る生体成分解析キットの作用を説明するための図である。

[0031] 本実施形態に係る生体成分解析キット１は、生体成分を定量するためのアレイデバイス（生体成分定量用アレイデバイス）の一例として、核酸を定量することが可能なアレイデバイス（核酸定量用アレイデバイス２）を備えた

キットである。

まず、本実施形態に係る核酸定量用アレイデバイス２を備えた生体成分解析キット１の構成について説明する。図１に示す本実施形態に係る生体成分解析キット１は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、タンパク質、エクソソーム、リポソーム、及び細胞のいずれかが選ばれる物質を解析対象物質とするキットである。具体的には、本実施形態に係る生体成分解析キット１は、生体成分に含まれる解析対象物質の濃度を定量的に測定するキットである。

[0032] 本実施形態に係る生体成分解析キット１は、図１及び図２に示す核酸定量用アレイデバイス２と、検出反応試薬１１（図３参照）と、核酸定量用アレイデバイス２とともに使用される油性封止液１２（図４参照）とを備える。

[0033] 図１及び図２に示すように、核酸定量用アレイデバイス２は、複数のウェル６を有する基材部３と、カバー部７と、注入口部８と、排出口部９と、水性溶液１０とを備える。

[0034] 図２に示すように、基材部３は、基板４と、微小孔アレイ層５とを備える。

基板４は、実質的に透明な材料から形成される板状部材である。基板４の材質は、たとえば樹脂やガラスである。具体的には、基板４は、ポリスチレンやポリプロピレンから形成されていてもよい。基板４は、核酸定量用アレイデバイス２を搬送する装置や作業者の手作業による取扱い時に破損しない程度の剛性を持っていればよい。

[0035] 微小孔アレイ層５は、複数の貫通孔５ａが並べて形成された層である。微小孔アレイ層５の層厚は３μｍで、微小孔アレイ層５とカバー部７との間には１００μｍの隙間が空けられている。微小孔アレイ層５に形成された各貫通孔５ａは、直径が５μｍ、中心線方向の長さが３μｍの円柱形状である。（貫通孔５ａの直径が５μｍ、中心線方向の長さが３μｍの場合、１つの貫通孔５ａにより形成された微小空間の容量は約１００フェムトリットル（ｆｌ）となる。）。

各貫通孔５ａの容積は適宜設定されてもよいが一例としては、各貫通孔５ａの容積は、１０ピコリットル以下である。各貫通孔５ａ同士の中心線間の距離は、各貫通孔５ａの直径よりも大きければよい。各貫通孔５ａは微小孔アレイ層５に対して三角格子状を形成するように配列されている。なお、各貫通孔５ａの配列のされ方は特に限定されない。

微小孔アレイ層５に形成された貫通孔５ａと、基板４の表面４ａとによって、基材部３には、基板４を底面部６ａとする有底筒状のウェル６が構成されている。

[0036] 微小孔アレイ層５の材質は、樹脂やガラス等であってよい。微小孔アレイ層５の材質は、基板４の材質と同じでもよいし基板４の材質と異なっていてもよい。また、微小孔アレイ層５は基板４と同じ材料で一体化されていてもよい。また、微小孔アレイ層５は基板４と同じ材料で一体成型されていてもよい。樹脂からなる微小孔アレイ層５の材質の例としては、シクロオレフィンポリマー、シリコン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル、フッ素樹脂、アモルファスフッ素樹脂などが挙げられる。

なお、微小孔アレイ層５の例として示されたこれらの材質はあくまでも例であり、微小孔アレイ層５の材質はこれらの材質には限られない。

例えば、ガラスの基板４上に、疎水性樹脂であるシクロオレフィンポリマーを用いて微小孔アレイ層５を形成してもよい。このような構成においては、ガラス基板４の表面が親水性であるため、インベーダー反応により加熱して試料を分析する際に、親水性の試料をウェル６内に保持しやすい。

また、微小孔アレイ層５が疎水性樹脂のような疎水性材料で形成されていれば、検出対象である生体分子の疎水性部位が疎水性の微小孔アレイ層５に吸着および保持されやすいため、生体分子が微小孔アレイ層５に効率よく捕集され、ウェル６における生体分子の検出が容易となる。

なお、本実施形態における疎水性とは、接触角試験における水との接触角が７０°以上の範囲にあることと定義される。

なお、本実施形態において使用される材料の水との接触角の一例としては、シクロオレフィンポリマー（ＣＯＰ）の水との接触角は８５°であり、疎水性樹脂であるＣＹＴＯＰの水との接触角は１１０°程度である。

なお、接触角試験には、液滴法を用いた。

[0037] また、微小孔アレイ層５は着色されていてもよい。微小孔アレイ層５が着色されていると、ウェル６内で蛍光、発光、吸光度等の光を用いた測定をする場合に、測定対象となるウェル６に近接する他のウェル６からの光の影響が軽減される。

微小孔アレイ層５は、基板４上に積層されたベタパターンに対してエッチング，エンボス形成，あるいは切削等の加工が施されることによって貫通孔５ａが成形される。また、微小孔アレイ層５が基板４と一体成型される場合は、微小孔アレイ層５の貫通孔５ａに相当する部分は、基板４にエッチング，エンボス形成、あるいは切削等の加工が施されることによって形成される。

[0038] カバー部７は、基材部３とカバー部７との間に隙間を有して複数のウェル６の開口部分を覆うように基材部３に重ねられている。基材部３とカバー部７との間は、各種の液体が流れる流路となる。本実施形態では、基材部３とカバー部７との間を、注入口部８から排出口部９へ向かって各種の液体が流れる。

[0039] 図１に示す注入口部８は、基材部３とカバー部７との間の隙間に連通された管路形状を有している。本実施形態では、注入口部８はカバー部７に形成されている。なお、注入口部８は、基材部３に形成されていてもよい。

[0040] 排出口部９は、注入口部８から離れた位置で基材部３とカバー部７との間の隙間に連通する。本実施形態では、基材部３及びカバー部７において注入口部８から液体の流路方向に沿って測ったときに最も離れた部分における基材部３とカバー部７との隙間から液体が漏れ出すように排出口部９が構成されている。

なお、排出口部９は、注入口部８から離れた位置で基材部３とカバー部７

との間の隙間に連通された管路形状を有するように基材部３又はカバー部７に形成され、封止可能であってもよい。この場合、基材部３とカバー部７との間に存在する液体が排出口部９を通じて蒸発することを防止できる。排出口部９の封止は、排出口部９を塞ぐシールや栓によって行われてもよい。

[0041] 図２に示すように、水性溶液１０は、基材部３とカバー部７との間に充填されている。

水性溶液１０は、解析対象物質を含む試料と混合可能な組成を有する液体である。本実施形態では、水性溶液１０は、核酸を含まない緩衝液である。なお、水性溶液１０は、各ウェル６内に満たされていればよい。すなわち、基材部３とカバー部７との間の流路部分の一部又は全部が気体で満たされていてもよい。

[0042] 検出反応試薬１１（図３，４参照）は、解析対象物質に関連する鋳型核酸に対する生化学的反応を行うための試薬である。鋳型核酸に対する生化学的反応は、たとえば、鋳型核酸が存在する条件下でシグナル増幅が起こるような反応である。本実施形態に係る検出反応試薬１１は、鋳型核酸に対する酵素反応を生じさせる試薬である。検出反応試薬１１は、たとえば核酸を検出可能な方法に応じて選択される。たとえば、インベーダー（登録商標）法や、ＴａｑＭａｎ（登録商標）法または、蛍光プローブ法やその他の方法に使用される試薬が本実施形態に係る検出反応試薬１１として生体成分解析キット１に含まれる。

[0043] 油性封止液１２（図４参照）は、基材部３とカバー部７との間に注入口部８（図１参照）から送液可能な溶液である。油性封止液１２は、解析対象物質を含む試料と混合しない材料から選ぶことができる。本実施形態に係る油性封止液１２はミネラルオイルである。

[0044] 次に、本発明の第１実施形態に係る核酸導入方法、核酸検出方法、及び生体成分解析方法として、本実施形態に係る生体成分解析キット１を用いた核酸導入方法、核酸検出方法、及び生体成分解析方法を、本実施形態に係る生体成分解析キット１の作用とともに示す。

[0045] 本実施形態では、生体成分解析キット１の使用前の状態では、図２に示すように基材部３とカバー部７との間に水性溶液１０があらかじめ充填された状態で、注入口部８（図１参照）と排出口部９（図１参照）との両方が水密に封止されている。このため、基材部３とカバー部７との間にある水性溶液１０は、注入口部８または排出口部９を開放するまで基材部３とカバー部７との間に閉じ込められている。

本実施形態では各ウェル６の容積が非常に小さいので、核酸定量用アレイデバイス２の製造時に各ウェル６内に水性溶液１０が満たされていれば、生体成分解析キット１の使用前に、多少の振動等が核酸定量用アレイデバイス２に伝わっても各ウェル６内の水性溶液１０（ウェル充填水性溶液）が空気に置き換わりにくい。

また、本実施形態では、生体成分解析キット１（核酸定量用アレイデバイス２）の製造時にあらかじめ各ウェル６内に水性溶液１０を充填しておけば、ユーザーが生体成分解析キット１を用いる際に、生体成分解析キット１から脱気する工程が不要となるため、ユーザーが簡便に生体成分解析キット１を使用することができる。

[0046] 生体成分解析キット１の使用時には、前処理として、解析対象物質を含む試料を、公知の溶媒で適宜希釈する。試料の希釈率は公知のデジタルＰＣＲにおける希釈率を参考にしてよい。また、解析対象物質を含む試料を希釈する溶媒は、各ウェル６内に満たされた水性溶液１０（ウェル充填水性溶液）と混合可能な組成であることが好ましい。また、解析対象物質を含む試料を希釈する工程において、検出反応試薬１１を規定の濃度で混合する。

以下では、解析対象物質が核酸であり、解析対象物質となる核酸を鋳型核酸としてシグナル増幅反応をインベーダー法により行う例を示す。なお、鋳型核酸は生体が産生した核酸であってもよいし、ＰＣＲ（ポリメラーゼチェーンリアクション）産物等の人工物であってもよい。また、鋳型核酸は、生体物質を捕捉可能な抗体や抗体を標識したビーズにおける標識核酸でもよい。なお、検出反応試薬１１の一部又は全部が水性溶液１０中に含まれている

場合には、上記の前処理における検出反応試薬１１の混合の一部又は全部が不要である。

[0047] まず、図１に示す注入口部８及び排出口部９が開放され、鋳型核酸を含む試料とインベーダー反応用の検出反応試薬１１との混合液Ｘが注入口部８を通じて基材部３とカバー部７との間の隙間へと、たとえば分注ピペット等によって送液される。試料と検出反応試薬１１との混合液Ｘは、複数のウェル６の全てを覆うように、基材部３とカバー部７との間の隙間内で広がる（図３参照）。また、試料と検出反応試薬１１との混合液Ｘが基材部３とカバー部７との間の隙間に送液されることにより、水性溶液１０は排出口部９から排出される。なお、このとき、試料と検出反応試薬１１との混合液Ｘが水性溶液１０と異なる色であると、試料と検出反応試薬１１との混合液Ｘが基材部３とカバー部７との間のどの部分に送液されたかを容易に把握できる。

[0048] 図３に示すように、基材部３とカバー部７とによって構成される流路には、基板４と微小孔アレイ層５とによって形成された複数のウェル６が配されている。複数のウェル６内に満たされた水性溶液１０（ウェル充填水性溶液）は、各ウェル６の内面に保持された状態で維持される。このため、試料と検出反応試薬１１との混合液Ｘは複数のウェル６内に満たされた水性溶液１０と置き換わることなく、水性溶液１０に混合液Ｘが重層された状態となる。しかしながら、水性溶液１０と混合液Ｘとは互いに容易に混合可能であるので、水性溶液１０に混合液Ｘが重層された状態となった後、混合液Ｘ中の溶質は水性溶液１０（ウェル充填水性溶液）中へと拡散する。

[0049] 次に、図４に示すように、基材部３とカバー部７とによって構成される流路内に、注入口部８（図１参照）から油性封止液１２を送液する。油性封止液１２は、混合液Ｘが水性溶液１０に拡散した状態で複数のウェル６内の液体（ウェル充填水性溶液）を封止することにより、複数のウェル６を複数の独立した核酸検出反応容器６Ａとする。また、油性封止液１２は、基材部３とカバー部７との間の隙間内で複数のウェル６の外部にある液体を排出口部９から押し出す。

上記の前処理における試料の希釈によって、核酸検出反応容器６Ａの１つにつき存在する鋳型核酸が１個又は０個となっている。試料の濃度が高すぎる場合には核酸検出反応容器６Ａの１つにつき複数の鋳型核酸が入る可能性もある。

[0050] 本実施形態では、インベーダー反応用の検出反応試薬１１と、鋳型核酸とが、鋳型核酸の濃度に応じてウェル６内（核酸検出反応容器６Ａ内）に封入されている。この状態で、核酸定量用アレイデバイス２を６２℃のオーブンにて所定時間インキュベートする。核酸定量用アレイデバイス２を６２℃のオーブンにて所定時間インキュベートすることで、核酸検出反応容器６Ａ内で、インベーダー反応において等温（等温反応）で行われるシグナル増幅が好適に進行する。

[0051] 続いて、インベーダー反応用の検出反応試薬１１及び鋳型核酸がウェル６内（核酸検出反応容器６Ａ内）に封入された核酸定量用アレイデバイス２が、あらかじめ定められた時間の後にオーブンから取り出され、蛍光を有する核酸検出反応容器６Ａ数および当該蛍光を有する核酸の蛍光量が計測される。なお、本実施形態では、核酸検出反応容器６Ａにおける蛍光の有無は、自家蛍光に対して所定のＳ／Ｎ比を超える蛍光量を閾値としてよい。また、本実施形態では、インベーダー法によるシグナル増幅が好適に進行して各核酸検出反応容器６Ａ内でシグナルが飽和すれば、蛍光を有する核酸検出反応容器６Ａにおける蛍光量に大きなばらつきが生じにくい。

[0052] 以上に説明したように、本実施形態に係る核酸導入方法、核酸検出方法、生体成分解析方法、核酸定量用アレイデバイス２、及び生体成分解析キット１では、鋳型核酸を含む液体が注入口部８から基材部３とカバー部７との間の隙間に導入されることで、水性溶液１０のうち複数のウェル６外にある余剰溶液は排出口部９から排出され、水性溶液１０のうち複数のウェル６内にある水性溶液１０（ウェル充填水性溶液１０）に鋳型核酸が拡散により移行する。このため、本実施形態に係る核酸導入方法、核酸検出方法、生体成分解析方法、核酸定量用アレイデバイス２、及び生体成分解析キット１によれ

ば、各ウェル６に対する鋳型核酸の移行の際に各ウェル６内に気泡が入りにくい。

[0053] また、本実施形態では各ウェル６に気泡が入り込む可能性が極めて低いので、本実施形態に係る核酸検出方法、生体成分解析方法、核酸定量用アレイデバイス２、及び生体成分解析キット１では、核酸を検出することが可能な核酸検出反応容器６Ａの数が気泡の存在によりばらつく可能性を低く抑えることができる。さらに、各ウェル６の容積がきわめて小さい場合、ウェル６内の気泡の体積を無視できず核酸検出反応の進行がウェル６ごとにばらつく可能性が考えられるが、本実施形態ではウェル６内に気泡が存在する可能性を考慮する必要がないのでウェル６から気泡を除去する操作が不要となり、精度のよい定量分析を簡便な操作で行える。

[0054] なお、本実施形態において、蛍光の検出以外に、可視光の発光、発色等をシグナルとして検出する検出系を適用してもよい。

また、タンパク質を解析するために本実施形態に係る構成を適用することも可能である。タンパク質を解析する場合には、目的のタンパク質に特異的に結合する分子にＤＮＡ鎖などの核酸で修飾しておく。この場合、修飾に用いたＤＮＡ鎖などの核酸を鋳型核酸としたインベーダー法のオリゴ設計をすることで、本実施形態におけるシグナル検出手順で目的タンパク質の有無を解析することができる。解析対象物質となる物質は、たとえば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、又はタンパク質のいずれかであってよい。この場合、本実施形態に係る核酸定量用アレイデバイス２及び生体成分解析キット１により定量される物質は修飾に用いたＤＮＡ鎖などの核酸であり、この核酸によって修飾された物質が間接的に定量される。また、目的のタンパク質に特異的に結合する分子に修飾する物質はＤＮＡ鎖に限らず、検出のためのシグナルを発生する物質であればよい。例えば蛍光ビーズや、ＨＰＲ（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）などが挙げられる。

[0055] さらに、上記の鋳型核酸により修飾された物質が標識物質となって特異的に結合する物質（相手となる物質）を本実施形態に係る核酸検出方法、生体

成分解析方法、核酸定量用アレイデバイス２、及び生体成分解析キット１によって解析することも可能である。この場合、上記の鋳型核酸により修飾された物質とは、鋳型核酸とは異なるＤＮＡ鎖、酵素、粒子、抗体、及びリポソームのうちの少なくとも一つを含んでいてもよい。

[0056] なお、上記の鋳型核酸に代えて、ウェル６内で蛍光，可視光，又は発色の反応を生じる生体由来物質を含む液体が注入口部８から基材部３とカバー部７との間の隙間に導入されることで、この生体由来物質を定量することができる。

たとえば、解析対象物質として定量される生体由来物質の例として、リポソーム，エクソソーム，細胞が挙げられる。これらの生体由来物質に特異的に存在する物質に対して蛍光標識その他の標識をすることで、これらの生体由来物質を定量することができる。このような標識をする標識物質としては、解析対象物質となる生体由来物質に特異的に結合する低分子リガンドや抗体などを構成要素に含む物質が挙げられる。

[0057] また、鋳型核酸を介して解析対象物質を定量することに代えて、解析対象となる生体由来物質自体が発するシグナルを本実施形態に係る生体成分定量用アレイデバイスを用いて検出することにより、生体由来物質の定量が可能である。

このような生体由来物質の一例として、蛍光蛋白質を発現するためのプロモータ及び目的遺伝子等を含む蛍光蛋白質発現カセットが遺伝子組み換えにより染色体およびその他の遺伝子領域等に組み込まれた細胞や、上記の蛍光蛋白質発現カセットを含むプラスミド等を保持する細胞が挙げられる。

たとえば、蛍光蛋白質発現カセットに対する転写を促進する所定の試薬と上記の細胞とがウェル６内において混合状態とされることによって蛍光蛋白質が発現することにより、蛍光を発する細胞を定量することができる。蛍光蛋白質発現カセットは、蛍光蛋白質以外の遺伝子の発現に対応して発現するレポーター遺伝子の発現カセットとして構築されてもよい。この場合、細胞外リガンドの存在その他のシグナル伝達に対応して所定の遺伝子を発現する

細胞内シグナル伝達がウェル６内で起こっている細胞を、レポーター遺伝子由来の蛍光蛋白質からの蛍光を利用して、本実施形態に係る生体成分定量用アレイデバイスを用いて定量できる。

[0058] このように、油性封止液１２により封止されたウェル６は、生体由来物質からのシグナルを検出するための独立したシグナル検出容器となり、生体由来物質の定量をすることができる。

上記のような定量方法を利用することで、生体由来物質として、生体内に存在するウィルスや細胞についても定量することができる。また、存在の有無を定性的に確認することも可能である。

なお、本実施形態に係る生体成分定量用アレイデバイスは、生体成分ではない物質を定量することもできる。たとえば、本実施形態に係る生体成分定量用デバイスを、ウィルス粒子定量用デバイスとして使用することもできる。

[0059] また、本実施形態に開示されたインベーダー法に代えて、インベーダー法とは異なるシグナル増幅反応試薬を用いた酵素反応によるシグナル増幅が採用されてもよい。このシグナル増幅反応試薬は、上記実施形態と同様に解析対象物質を含む試料に混合されてよい。

[0060] なお、本実施形態では複数のウェル６の底面部６ａとカバー部７との両方が実質的に透明な材料によって形成されている例が開示されているが、複数のウェル６の底面部６ａとカバー部７とのうち少なくともいずれか１つが光透過性を有していれば、複数のウェル６内における蛍光、発光、吸光度などの光学的な検出をすることができる。

[0061] また、本実施形態では鋳型核酸を含む試料が水性（極性）である場合に好適な構成が開示されているが、鋳型核酸を含む試料が油性（非極性）である場合には、水性溶液１０に代えて、有機溶媒等を含んだ非極性の封止液が採用されることが好ましい。さらに、鋳型核酸を含む試料が油性（非極性）である場合、ウェル６を封止するためには、本実施形態に示された油性封止液１２に代えて、極性の置換液が採用されることが好ましい。これらの溶液の

選択には、鋳型核酸を含む試料の溶媒への溶けやすさ並びに鋳型核酸及び解析対象物の安定性に応じて選択される溶媒の種類が考慮される。例えば、鋳型核酸を含む試料が水溶液の場合には封止液としてミネラルオイルを選ぶことができ、鋳型核酸を含む試料がミネラルオイルを溶媒としている場合には封止液は水や水性緩衝液等を選ぶことができる。

[0062] 核酸は極性分子なので非極性溶媒に対しては難溶性であるが、たとえば蛋白質や脂質を解析対象物質とする場合に、解析対象物質の定量のための標識核酸を解析対象物質に結合させた状態では、溶媒に対する標識核酸の溶解性に加えて溶媒に対する解析対象物質の溶解性が考慮されることが好ましい。この場合に、鋳型核酸（標識核酸）を含む試料が非極性溶媒により希釈されることがある。

[0063] （第２実施形態）

次に、本発明の第２実施形態について説明する。図５は、本実施形態に係る生体成分解析キットにおける核酸定量用アレイデバイスの基材部を示す模式図である。なお、以下の各実施形態において上述の第１実施形態に開示された構成要素と同様の構成要素には、第１実施形態と同一の符号が付され、重複する説明は省略される。

[0064] 図５に示す本実施形態に係る生体成分解析キット１Ａは、ウェル６内で電気化学的な測定をすることができる核酸定量用アレイデバイス２Ａを上記第１実施形態の核酸定量用アレイデバイス２に代えて備えている点で、上記第１実施形態と構成が異なっている。

本実施形態に係る核酸定量用アレイデバイス２Ａは、第１実施形態に開示された基材部３、ウェル６、カバー部７、水性溶液１０、注入口部８、及び排出口部９を有している。

[0065] さらに、本実施形態に係る複数のウェル６は、電極２０を底面部６ａに有する。さらに、本実施形態に係る基材部３は、ウェル６内の電極２０に繋がる配線２１と、配線２１を検出回路に接続するためのコネクタ２２とを有している。

[0066] 電極２０は、たとえばウェル６内の溶液の電位変化や電気抵抗の変動を検出することができる。

配線２１及びコネクタ２２は、基材部３に対してたとえば印刷等によって形成されている。一例を挙げると、配線２１及びコネクタ２２は、基板４と微小孔アレイ層５との間に挟まれるように、基板４の外面にパターン形成される。

電極２０、配線２１、及びコネクタ２２の材質は特に限定されない。

[0067] 本実施形態では、ウェル６の底面部６ａの電極２０を用いて、鋳型核酸の存在の有無に対応したｐＨ変化や電位変化をシグナルとして核酸の定量をすることができる。

[0068] （第３実施形態）

次に、本発明の第３実施形態について説明する。図６は、本実施形態に係る生体成分解析キットにおける核酸定量用アレイデバイスの平面図である。図７は、図６のＢ－Ｂ線における断面図である。

[0069] 図６に示す本実施形態に係る生体成分解析キット１Ｂは、第１実施形態に開示された基材部３、ウェルを有する微小孔アレイ層５、カバー部７、水性溶液１０、注入口部８、及び排出口部９を有している。さらに、本実施形態に係る生体成分解析キット１Ｂは、排出口部９と連通する廃液容器部３１をさらに備える。

[0070] 廃液容器部３１は、基材部３とカバー部７との間の隙間から排出口部９を通じて液体が流入して貯まる空間を有し、カバー部７の外部に配されている。本実施形態では、第１実施形態に開示されたカバー部７に代えて、注入口部８、排出口部９、及び廃液容器部３１が形成されたカバー部７Ａを有している。

[0071] また、本実施形態では、第１実施形態に開示された核酸定量用アレイデバイス２に代えて、複数（本実施形態では９６個）の独立した核酸定量用アレイデバイス２Ｂ１、２Ｂ２、・・・Ｂ９６を有する。核酸定量用アレイデバイス２Ｂ１、２Ｂ２、・・・Ｂ９６は、正方格子状に並べて互いに連結され

ている。複数の独立した核酸定量用アレイデバイス２Ｂ１、Ｂ２、・・・Ｂ９６は、基材部３とカバー部７Ａとを繋ぐスペーサー部材３２によって水密に区切られている。本実施形態に係るスペーサー部材３２は、基材部３の微小孔アレイ層５とカバー部７Ａとの間の隙間の大きさが１００μｍとなるように微小孔アレイ層５とカバー部７Ａとを保持する。本実施形態に係るスペーサー部材３２は、注入口部８と排出口部９とを繋ぎ微小孔アレイ層５の各貫通孔５ａを囲む貫通孔３２ａを有している。

[0072] 本実施形態では、排出口部９から排出される各種の液体が廃液容器部３１に貯まるので、廃液処理が容易である。

なお、本実施形態に係る生体成分解析キット１Ｂは水性溶液１０を有していなくてもよい。

なお、排出口部９から各種の液体が注入され、注入口部８から余剰の液体が排出されるようになっていてもよい。

[0073] （変形例１）

次に、本実施形態に係る変形例１について説明する。図８は、本変形例の構成を示す断面図である。

図８に示すように、本変形例では、基材部３の厚さ方向において基材部３を下側、カバー部７Ａを上側と定義したときに、注入口部８における注入口開口端８ａの位置が排出口部９における廃液容器部側開口端９ａよりも下にある。さらに、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａは、廃液容器部３１の底面よりも上にある。

本変形例では、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａから廃液容器部３１内に液体が入るまで注入口開口端８ａから各種の液体を送液した後、注入口開口端８ａが開放されると、注入口部８と排出口部９とのそれぞれの液面の高さが重力により一致する過程で、注入口開口端８ａから、排出口部９内にある液量を上限として液体が逆流する。このため、注入口開口端８ａ近傍に気泡があってもその気泡は液体の逆流により流されて注入口開口端８ａから外に押し出される。本変形例では、注入口部８の近傍において、基材

部３とカバー部７Ａとの間に気泡が留まりにくい。

さらに、本変形例では、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａが廃液容器部３１の底面よりも上にあるので、廃液容器部３１内に入った液体が排出口部９を通じて基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間に逆流しにくい。

[0074] （変形例２）

次に、本実施形態に係る変形例２について説明する。図９は、本変形例の構成を示す断面図である。

図９に示すように、本変形例では、基材部３の厚さ方向において基材部３を下側、カバー部７Ａを上側と定義したときに、注入口部８における注入口開口端８ａの位置が排出口部９における廃液容器部側開口端９ａよりも上にある。本変形例では、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａから廃液容器部３１内に液体が入るまで注入口開口端８ａから各種の液体を送液した後、注入口開口端８ａが開放されると、注入口部８と排出口部９とのそれぞれの液面の高さが重力により一致する過程で、注入口部８にある液体が基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間にさらに入り込む。また、試料と検出反応試薬１１との混合液Ｘ及び油性封止液１２を基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間に注入口部８を通じて送液すると、排出口部９から廃液容器部３１に押し出された液体の一部は排出口部９から基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間へ重力により戻ろうとするが、注入口部８内にある液体の質量と拮抗することで廃液容器部３１からの液体の逆流が抑えられる。

[0075] （変形例３）

次に、本実施形態に係る変形例３について説明する。図１０は、本変形例の構成を示す断面図である。

図１０に示すように、本変形例では、注入口部８の開口面積よりも排出口部９の開口面積の方が小さい。

排出口部９の開口面積は、注入口部８からの送液圧力がかからなければ排出口部９を液体が通過できない程度の管路抵抗を得ることができる面積に設定されている。排出口部９の具体的な開口面積は、排出口部９から排出され

ることが想定される液体の組成に応じて決められてよい。

本変形例では、注入口部８からの送液時には基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間から排出口部９を通じて廃液容器部３１に液体が移動可能であり、注入口部８から当該隙間への送液の終了後は、排出口部９を通じた液体の流れは起こらない。このため、本変形例では、廃液容器部３１から基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間への液体の逆流が抑えられる。

なお、排出口部９から各種の液体が注入され、注入口部８から余剰の液体が排出されるようになっていてもよい。

[0076] （変形例４）

次に、本実施形態に係る変形例４について説明する。図１１は、本変形例の構成を示す断面図である。

[0077] 図１１に示すように、本変形例では、上記第３実施形態の生体成分解析キット１Ｂと比較して廃液容器部３１の底面３１ａを構成する部位が厚い。さらに本変形例では、上記の変形例１と同様に、基材部３の厚さ方向において基材部３を下側、カバー部７Ａを上側と定義したときに、注入口部８における注入口開口端８ａの位置が排出口部９における廃液容器部側開口端９ａよりも下にある。本変形例では、注入口部８における注入口開口端８ａの位置が排出口部９における廃液容器部側開口端９ａよりも下にあることにより、上記の変形例１と同様の効果を奏する。また、注入口部８における注入口開口端８ａの位置が排出口部９における廃液容器部側開口端９ａよりも上にあってもよい。この場合には、本変形例は上記の変形例２と同様の効果を奏する。

[0078] 本変形例では、基材部３の厚さ方向における下側（下面）（図１１に符号Ｄ１に示す方向）から蛍光，発光，又は発色などの検出を行う場合に、廃液容器部３１の底面３１ａを構成する部位が厚いので、廃液容器部３１内にたまった廃液からの蛍光や廃液自体の色等の影響を緩和することができる。

なお、排出口部９から各種の液体が注入され、注入口部８から余剰の液体が排出されるようになっていてもよい。

[0079]（変形例５）

次に、本実施形態に係る変形例５について説明する。図１２は、本変形例の構成を示す平面図である。図１３は、図１２のＣ－Ｃ線における断面図である。

[0080] 本変形例の生体成分解析キット１Ｃでは、注入口部８と排出口部９との間に設けられ、基材部３の厚さ方向において廃液容器部３１と重ならない領域Ａ１において反応及び検出が可能である。この領域Ａ１では、基材部３の厚さ方向における下側（下面）から（図１３に符号Ｄ１に示す方向）又は基材部３の厚さ方向における上側（上面）から（図１３に符号Ｄ２に示す方向）、蛍光，発光，又は発色などの検出をすることが可能な領域が設けられている。

本変形例では、廃液の有無や廃液の量の影響を受けずに微小孔アレイ層５における蛍光，発光，又は発色などの検出を行うことができる。

なお、排出口部９から各種の液体が注入され、注入口部８から余剰の液体が排出されるようになっていてもよい。

[0081]（変形例６）

次に、本実施形態に係る変形例６について説明する。図１４は、本変形例の構成を示す平面図である。図１５は、図１４のＤ－Ｄ線における断面図である。図１６は、図１４のＤ－Ｄ線における断面を示す斜視図である。図１７は、本変形例におけるスペーサー部材３２を示す平面図である。図１８Ａ，図１８Ｂ，及び図１８Ｃは、スペーサー部材３２の他の構成を示す平面図である。図１９は、本変形例の微小孔アレイ層５を備えた基材部３の平面図である。

[0082] 図１４から図１６までに示すように、本変形例の生体成分解析キット１Ｄでは、上記の変形例５と同様に、廃液の有無や廃液の量の影響を受けずに微小孔アレイ層５における蛍光，発光，又は発色などの検出を行うことができるように、注入口部８と排出口部９との間に、基材部３の厚さ方向において廃液容器部３１と重ならないように微小孔アレイ層５が配された領域Ａ１を

有している。

[0083] また、本変形例では注入口部８は漏斗状に形成されており、注入口部８に対して液体を注入するためのピペットチップ等をスムーズに案内することができる。注入口部８の位置は、既存の９６ウェルプレートにおける各ウェルの中央位置に対応していてもよい。すなわち、本変形例では、９６ウェルプレートにおける各ウェルの中央位置（９６か所）のうちの４８か所に注入口部８が配置されていてもよい。これにより、既存のＥＬＩＳＡ装置における分注動作に容易に対応させることができる。

[0084] また、廃液容器部３１に繋がる排出口部９は、上記の変形例１と同様に、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａが、廃液容器部３１の底面よりも上にあるように成形されている。

[0085] 図１７に示すように、スペーサー部材３２は、図１５に示す注入口部８と排出口部９とを繋ぎ、注入口部８と排出口部９との間に試薬等の液体を貯留させることができる隙間を生じさせる。

[0086] また、図１８Ａ及び図１８Ｂに示すように、スペーサー部材３２は、注入口部８の位置に対応する入口部３２ｘ，排出口部９の位置に対応する出口部３２ｚ，及び入口部３２ｘと出口部３２ｚとを繋ぐ流路部３２ｙを有していれば、図１７に示す構造には限られない。

[0087] たとえばスペーサー部材３２の他の構成例として図１８Ａに示された構成では、廃液容器部３１と重ならない領域Ａ１（図１９参照）のうちの２つを繋ぐように流路部３２ｙが設けられている。

[0088] また、たとえばスペーサー部材３２の他の構成例として図１８Ｂに示された構成では、廃液容器部３１と重ならない領域Ａ１（図１９参照）を間に挟んで入口部３２ｘと、入口部３２ｘの反対の位置に流路部３２ｙの一端が設けられ、流路部３２ｙの他端が、入口部３２ｘ側まで引き回されて出口部３２ｚが入口部３２ｘの近傍に位置している。

[0089] また、図１８Ｃに示すように、スペーサー部材３２において注入口部８の近傍に、固体状の試薬を保持するための窪み３２Ａが形成されていてもよい

。この窪みには、検出の直前に混合されるべき各種の試薬が保持されてよい。注入口部８を通じて試薬等の液体が流れることによってこの液体に窪みに配された試薬が溶け出すことにより、反応を生じさせることができる。

[0090] 本変形例では、注入口部８と排出口部９との間に位置する略長方形状の領域Ａ１（図１５参照）内で蛍光，発色，又は発光の反応を検出することができる。

[0091] 図１４及び図１９に示すように、本変形例では、微小孔アレイ層５において最大４８か所で互いに異なる反応をさせることができる。なお、微小孔アレイ層５において互いに異なる反応をさせることができる上限は４８か所には限られない。

[0092] なお、カバー部７Ａ及びスペーサー部材３２の形状は、上記の形状に限られない。

たとえば、図２０から図２２に示すように、注入口部８及び排出口部９がいずれも漏斗状であってよい。

また、図２３及び図２４に示すように、注入口部８の内面が複数の平面からなり、注入口部８がテーパー状に形成されて基材部３側へ向かって漸次小さく窄まるように（注入口部８の径が小さくなるように）構成されていてもよい。

なお、排出口部９から各種の液体が注入され、注入口部８から余剰の液体が排出されるようになっていてもよい。

[0093]（変形例７）

次に、本実施形態に係る変形例７について説明する。図２５は、本変形例の構成を示す断面図である。

[0094] 図２５に示すように、本変形例では、注入口部８が漏斗状を有している。注入口部８の内部形状は、毛細管現象で注入口部８に液体が留まることがないように、比較的大きく構成されている。本変形例では、注入口部８に試薬等の液体を滴下することにより、試薬等の液体の自重により、試薬等の液体が送液される。

[0095] たとえば、注入口部８を通じて検出対象物や試薬等を含む液体を当該液体の自重により送液した後、当該液体よりも比重の高いオイルを注入口部８に重層すると、オイルが自重により注入口部８から排出口部９へと流れる過程で、微小孔アレイ層５の各ウェル６（第１実施形態参照）を個別に封止できる。

本変形例では、検出対象物や試薬等を含む液体の比重がほぼ１である場合に、オイルの比重は、例えば１．８程度であってよい。

[0096]（変形例８）

次に、本実施形態に係る変形例８について説明する。図２６は、本変形例の構成を示す平面図である。図２７は、図２６のＥ－Ｅ線における断面図である。

[0097] 図２６及び図２７に示すように、本変形例の生体成分解析キット１Ｅでは、注入口部８側にも廃液容器部３１が構成されている。注入口部８側に構成された廃液容器部３１は、排出口部９から注入口部８側へと液体を送液した時に注入口部８からあふれる液体を貯めることができる。

本変形例では、検出対象物や試薬等を含む液体は注入口部８から送液され、その後、排出口部９からオイルが送液されるという使い方が可能である。排出口部９からオイルが送液された場合、注入口部８からあふれた試薬及びオイルは、注入口部８側に設けられた廃液容器部３１に貯まる。注入口部８側に設けられた廃液容器部３１に貯まった液体は排出口部９側に設けられた廃液容器部３１に貯まった液体とは混ざらない。

なお、排出口部９から各種の液体が注入され、注入口部８から余剰の液体が排出されるようになっていてもよい。

[0098]（変形例９）

次に、本実施形態に係る変形例９について説明する。図２８は、本変形例の構成を示す断面図である。

[0099] 図２８に示すように、本変形例は、上記の第３実施形態に開示された生体成分解析キット１Ｂにおいて、カバー部７Ａが光不透過の材料からなる点が

異なっている。この場合、基材部３の厚さ方向において、下側から蛍光，発光，又は発色を検出する場合に、廃液容器部３１にたまった廃液の影響を受けにくい。

また、本変形例では、カバー部７Ａが特定の波長の光を選択的に不透過とする材料からなっていてもよい。本変形例における不透過とは、特定の波長の光を吸収することであってもよいし、特定の波長の光を反射することであってもよい。たとえば、カバー部７Ａは、可視光を透過するが紫外線は不透過であるなどの構成を有していてもよい。この場合、カバー部７Ａは、蛍光を検出するための励起光は透過するがこの励起光によって生じる蛍光は透過しない。この結果、基材部３の厚さ方向において下側（下面）から励起光を照射して且つ下側（下面）から蛍光を観察する場合に廃液容器部３１内の液体の影響を受けにくく、またカバー部７Ａを透過する可視光を照明光とする明視野の観察も可能となる。

[0100]（変形例１０）

次に、本実施形態に係る変形例１０について説明する。図２９は、本変形例の構成を示す断面図である。

[0101] 図２９に示すように、本変形例では、微小孔アレイ層５とカバー部７Ａとの間に入った気泡をカバー部７Ａの外へと移動させるためのフィルター３３をカバー部７Ａが有している。フィルター３３は、気体を透過させることは可能であるが液体を透過させることができない構造を有している。

また、本変形例では上記の第３実施形態と同様に、注入口部８及び排出口部９が設けられている。

本変形例においてカバー部７Ａに設けられたフィルター３３は、注入口部８の下流且つ注入口部８の近傍に配置される。これにより、試薬やオイル等に混入した気泡は、微小孔アレイ層５のうち検出に利用される領域に到達する前にフィルター３３に捕捉される。

[0102]（変形例１１）

次に、本実施形態に係る変形例１１について説明する。図３０は、本変形

例の構成を示す断面図である。

[0103] 本変形例では、上記の変形例１０に開示されたフィルター３３に代えて、気泡を貯めるための窪み３３Ａがカバー部７Ａに形成されている。

カバー部７Ａに形成された窪み３３Ａの位置は、上記の変形例１０と同様に、注入口部８の下流且つ注入口部８の近傍であることが好ましい。このような構成であっても上記の変形例１０と同様の効果を奏する。

また、本変形例では、上記の変形例１０に開示されたフィルター３３を備えた場合よりも、大きな気泡を効率よく捕捉することもできる。

[0104] （変形例１２）

次に、本実施形態に係る変形例１２について説明する。図３１は、本変形例の構成を示す断面図である。

[0105] 本変形例では、注入口部８の注入口開口端８ａに当接し、ピペットチップ４０を注入口部８に挿通可能な貫通孔３４ａが形成されたアダプタ３４を有している。

アダプタ３４は、試薬やオイルを送液する際に使用されるピペットチップ４０と組み合わされた状態で使用される。アダプタ３４の外形形状は特に限定されない。本実施形態に係るアダプタ３４の外形形状は、アダプタ３４にピペットチップ４０が取り付けられた際のピペットチップ４０の先端に向かって漸次径が小さくなる円錐台状である。

[0106] 本変形例では、たとえば、アダプタ３４がピペットチップ４０に取り付けられ、ピペットチップ４０の先端が注入口部８に挿入されると、アダプタ３４が注入口開口端８ａに当接する。これにより、カバー部７Ａは基材部３側へと押される。その結果、カバー部７Ａと基材部３との間の隙間の容積が減少することで、カバー部７Ａと基材部３との間にある液体が注入口部８及び排出口部９から僅かに漏れ出る。このときに、注入口部８の注入口開口端８ａ近傍に気泡があった場合には気泡が注入口開口端８ａから押し出されることにより、ピペットチップ４０内の試薬やオイルの送液時に、注入口開口端８ａ近傍に位置する気泡が巻き込まれにくい。

[0107] （変形例１３）

次に、本発明の実施形態に係る変形例１３について説明する。図３２Ａは、本変形例の生体成分解析キット１Ｆの構成を示す斜視図である。また、図３２Ｂには、生体成分解析キット１Ｆにおける平面図１Ｆ１（カバー部７Ａの平面図７Ａａに相当する）、Ａ－Ａ断面における断面図１Ｆ２、Ｂ－Ｂ断面における断面図１Ｆ３、および側面図１Ｆ４、ならびに、シール部材１０１の平面図、および、カバー部７Ａの底面図７Ａｂが示されている。

[0108] 図３２Ａおよび３２Ｂに示すように、本変形例の生体成分解析キット１Ｆは、上記の変形例６と同様に、廃液の有無や廃液の量の影響を受けずに微小孔アレイ層５における蛍光，発光，又は発色などの検出を行うことができるように、注入口部８と排出口部９との間に、基材部３の厚さ方向において廃液容器部３１と重ならないように微小孔アレイ層５が配された領域Ａ１を有している。

[0109] また、本変形例では注入口部８は漏斗状に形成されており、注入口部８に対して液体を注入するためのピペットチップ等をスムーズに案内することができる。

[0110] また、本変形例における廃液容器部３１に繋がる排出口部９は、図３２Ａおよび図３２Ｂに示すように、注入口部８と同様に排出口部９が漏斗状であり、排出口部９はピペットチップ等をスムーズに案内することができる形状を有している。

本変形例では、変形例８と同様に、検出対象物や試薬等を含む液体は注入口部８から送液され、その後、排出口部９からオイルが送液されるという使い方が可能である。

注入口部８から検出対象物や試薬等を含む液体を注入した後は、排出口部９を通じてカバー部７Ａと基材部３の間の隙間より廃液容器部３１に液体が流入する。廃液容器部３１および排出口部９周辺に液体が存在するので、排出口部９よりピペット等を用いてオイルを注入する際に、カバー部７Ａと基材部３の間の隙間の液体に空気が混入しにくい。

すなわち、本変形例によれば、カバー部７Ａと基材部３の間の隙間の液体に、オイルを注入する際に、空気が混入することを防ぎやすい。

そのため、本変形例によれば、仮に液体の注液時に、カバー部７Ａと、基材部３との間の隙間に充填された液体中に気泡が入る可能性が低減されるため、精度のよい定量分析を簡便な操作で行うことができる。

[0111] 図３２Ｂに示すように、シール部材１０１は、他の変形例におけるスペーサー部材３２と同様に、図３２Ｂに示す注入口部８と排出口部９とを繋ぎ、注入口部８と排出口部９との間に試薬等の液体を貯留させることができる隙間を生じさせる。

[0112] また、図１８Ａ及び図１８Ｂに示されたスペーサー部材３２と同様に、シール部材１０１は、注入口部８の位置に対応する入口部，排出口部９の位置に対応する出口部，及び入口部と出口部とを繋ぐ流路部を有していれば、図３２Ｂに示す構造には限られない。

[0113] 本変形例では、注入口部８と排出口部９との間に位置する略長方形状の領域Ａ１（図３２Ｂ参照）内で蛍光，発色，又は発光の反応を検出することができる。

[0114] なお、図３２Ａおよび図３２Ｂに示された一列式のキットのうち、「１つの注入口部８、１つの領域Ａ１、１つの排出口部９および１つの廃液容器部３１」を１つのユニットとして用いることもできる。すなわち、本変形例に係る生体成分解析キット１Ｆは、一列式のキットとして用いてもよく、当該一列式のキットより１ユニットごとに切り離して個別の分析キットとして用いてもよい。

[0115] また、図３２Ａには、一列式のキットが示されているが、他の変形例に示したように、本変形例に係る生体成分解析キット１Ｆは９６穴式の形状を有していてもよい。この場合、注入口部８の位置は、既存の９６ウェルプレートにおける各ウェルの中央位置に対応していてもよい。すなわち、本変形例では、９６ウェルプレートにおける各ウェルの中央位置（９６か所）のうちの４８か所に注入口部８が配置されていてもよい。これにより、既存のＥＬ

ＩＳＡ装置における分注動作に容易に対応させることができる。

[0116] また、図３２Ｂには、シール部材１０１が、基板４および微小孔アレイ層５から形成される基材部３と別途設けられる構成を示したが、シール部材１０１と基材部３とが一体形成された構成を有していてもよい。

[0117] （変形例１４）

次に、本発明の実施形態に係る変形例１４について説明する。図３３Ａは、本変形例の生体成分解析キット１Ｇの構成を示す斜視図である。また、図３３Ｂには、生体成分解析キット１Ｇにおける平面図１Ｇ１（カバー部７Ａの平面図７Ａａに相当する）、Ａ－Ａ断面における断面図１Ｇ２、左側面図１Ｇ３、および右側面図１Ｇ４、シール部材１０１の平面図、および、カバー部７Ａの底面図７Ａｂが示されている。

[0118] 図３３Ａおよび３３Ｂに示すように、本変形例の生体成分解析キット１Ｇは、上記の変形例６と同様に、廃液の有無や廃液の量の影響を受けずに微小孔アレイ層５における蛍光，発光，又は発色などの検出を行うことができるように、注入口部８と排出口部９との間に、基材部３の厚さ方向において廃液容器部３１と重ならないように微小孔アレイ層５が配された領域Ａ１を有している。

[0119] また、本変形例では注入口部８は漏斗状に形成されており、注入口部８に対して液体を注入するためのピペットチップ等をスムーズに案内することができる。

[0120] 図３３Ｂに示すように、本変形例では、基材部３の厚さ方向において基材部３を下側、カバー部７Ａを上側と定義したときに、注入口部８における注入口開口端８ａの位置が排出口部９における廃液容器部側開口端９ａよりも下にある。さらに、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａは、廃液容器部３１の底面よりも上にある。

本変形例では、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａから廃液容器部３１内に液体が入るまで注入口開口端８ａから各種の液体を送液した後、注入口開口端８ａが開放されると、注入口部８と排出口部９とのそれぞれの

液面の高さが重力により一致する過程で、注入口開口端８ａから、排出口部９内にある液量を上限として液体が逆流する。このため、注入口開口端８ａ近傍に気泡があってもその気泡は液体の逆流により流されて注入口開口端８ａから外に押し出される。本変形例では、注入口部８の近傍において、基材部３とカバー部７Ａとの間に気泡が留まりにくい。

さらに、本変形例では、排出口部９における廃液容器部側開口端９ａが廃液容器部３１の底面よりも上にあるので、廃液容器部３１内に入った液体が排出口部９を通じて基材部３とカバー部７Ａとの間の隙間に逆流しにくい。

[0121] なお、本変形例の生体成分解析キット１Ｇにおいては、廃液容器部３１の容積が試薬およびオイルの注入量の合計よりも大きくなるように廃液容器部３１は形成されている。そのため、試薬およびオイルを注入した際に、廃液容器部３１から生体成分解析キット１Ｇの外部に液体が漏れだすおそれがない。

[0122] 図３３Ｂに示すように、シール部材１０１は、上述の第１３変形例と同様に、図３３Ｂに示す注入口部８と排出口部９とを繋ぎ、注入口部８と排出口部９との間に試薬等の液体を貯留させることができる隙間を生じさせる。

[0123] また、第１３変形例と同様に、シール部材１０１は、注入口部８の位置に対応する入口部，排出口部９の位置に対応する出口部，及び入口部と出口部とを繋ぐ流路部を有していれば、図３３Ｂに示す構造には限られない。

[0124] 本変形例では、注入口部８と排出口部９との間に位置する略長方形状の領域Ａ１（図３３Ｂ参照）内で蛍光，発色，又は発光の反応を検出することができる。

[0125] なお、図３３Ａおよび図３３Ｂに示された一列式のキットのうち、「１つの注入口部８、１つの領域Ａ１、１つの排出口部９および１つの廃液容器部３１」を１つのユニットとして用いることができる。すなわち、本変形例の生体成分解析キット１Ｇは、一列式のキットとして用いてもよく、当該一列式のキットより１ユニットごとに切り離して個別の分析キットとして用いてもよい。

[0126] また、図３３Ａには、一列式のキットが示されているが、他の変形例に示したように、キットは９６穴式の形状を有していてもよい。この場合、注入口部８の位置は、既存の９６ウェルプレートにおける各ウェルの中央位置に対応していてもよい。すなわち、本変形例では、９６ウェルプレートにおける各ウェルの中央位置（９６か所）のうちの４８か所に注入口部８が配置されていてもよい。これにより、既存のＥＬＩＳＡ装置における分注動作に容易に対応させることができる。

[0127] また、図３３Ｂには、シール部材１０１が、基板４および微小孔アレイ層５から形成される基材部３と別途設けられる構成を示したが、シール部材１０１と基材部３とが一体形成された構成を有していてもよい。

[0128]（変形例１５）

次に、本発明の実施形態に係る変形例１５について説明する。図３４は、本変形例の作用を説明するための図である。

上述の変形例１３および１４において、一列式のキットを１つのユニットごとに切り出して使うことが可能であることを示したが、図３４に示すように、基材部３とシール部材１０１とを一体形成し、ビーカー状、チューブ状を有する容器１０３を用いることもできる。

この場合、流路は形成されず、バッチ式の容器１０３に液体が満たされた状態で、核酸等の生体成分１０２をウェル６に導入する操作、および、検出操作が可能である。

また、容器１０３には、ウェル６を複数設けることが可能である。

図３４に示すようなバッチ式の容器１０３を用いた場合にも、製造工程の際にあらかじめ水性溶液１０をウェル６に充填しておけば、キットの使用者が現場で分析試験を行う際に、検出対象である核酸等の生体成分１０２がウェル６内に拡散し、ウェル６内に生体成分１０２が導入され、検出が可能となる。

一方、製造工程においてあらかじめ水性溶液１０をウェル６に充填していない場合には、キットの使用者が現場での分析試験を行う際に、ウェル６内

に入り込んだ気泡を脱気することが困難である。

そのため、本変形例においては、製造工程の際にあらかじめ水性溶液１０がウェル６に充填されていることが好ましい。

なお、本変形例における核酸等の生体成分の導入操作、検出および観察等の分析操作は、上述した実施形態と同様に実施することができる。

[0129] なお、上述の実施形態における生体成分の導入方法では、核酸の導入方法を一例として示したが、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、タンパク質、エクソソーム、リポソーム、及び細胞等を含む生体成分の導入方法であってもよい。

本実施形態に係る生体成分の導入方法は、上述の核酸導入方法と同様に行うことができ、生体成分は核酸のみに限定されない。

また、同様に、上述の実施形態に係る核酸検出方法、生体成分解析方法、生体成分定量用アレイデバイス、及び生体成分解析キットにおいても、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、タンパク質、エクソソーム、リポソーム、及び細胞等を含む生体成分などを対象としてよく、分析対象は上述の実施形態に限定されない。

実施例

[0130] 次に、本発明の上記実施形態に係る核酸導入方法（生体成分導入方法）、生体成分解析方法、核酸定量用アレイデバイス２、及び生体成分解析キット１について、実施例を示して詳細に説明する。なお、下記の実施例は、本発明が適用された具体的な一例であり、本発明を何ら限定しない。

[0131] ＜核酸定量用アレイデバイスの作製＞

０．５ｍｍ厚のガラス製の基板４に、疎水性樹脂であるＣＹＴＯＰ（登録商標）（旭硝子製）をスピンコートし、１８０℃で３時間熱硬化させ、フォトリソグラフィー技術を使って直径５μｍの孔を１００万個持つ基材部３を作製した。ＣＹＴＯＰ（登録商標）をスピンコートすることにより基板４に形成された層がフォトリソグラフィーにより成形されることにより、上記実施形態に開示された微小孔アレイ層５を形成した。ＣＹＴＯＰ（登録商標）

をスピンコートすることにより基板４に形成された層の厚さは３μｍである。

[0132] 続いて、基材部３との隙間が１００μｍとなるように、カバー部７としてカバーガラスを基材部３上に設置した。基材部３とカバー部７との間には、粘着テープからなるスペーサーが配された。さらに、基材部３とカバー部７との間に、核酸を含まない水性液体を置換液として送液し、直径５μｍの孔と、基材部３とカバー部７との間の隙間との全体に、水性液体を満たした。本実施例では水性液体の組成は２０μＭ　ＭＯＰＳ　ｐＨ７．５、１５ｍＭ　ＮａＣｌ、６．２５ｍＭ　$MgCl_2$である。

[0133] ＜試料と検出反応試薬との混合液の送液＞

インベーダー反応試薬（２μＭ　アレルプローブ、１μＭ　インベーダーオリゴ、１μＭ　ＦＡＭ標識アーム、２０μＭ　ＭＯＰＳ　ｐＨ７．５、１５ｍＭ　ＮａＣｌ、６．２５ｍＭ　$MgCl_2$、５０Ｕ／μＬ　クリベース（登録商標））と、人工合成ＤＮＡとを混合し、この混合液Ｘを基材部３とカバー部７との間の隙間に送液した。ここで、人工合成ＤＮＡの濃度については、基材部３に形成された直径５μｍの孔の１つに１分子が入るように、人工合成ＤＮＡの濃度が３０ｐＭとなるように人工合成ＤＮＡを混合液Ｘに添加した。

直径５μｍ高さ３μｍの円柱の微小孔は５９ｆＬの体積となり、ポアソン分布に従うと仮定すると３０ｐＭの人工合成ＤＮＡ濃度では１００万個の微小孔のうち６５％の微小孔に入ると推定される。インベーダー反応試薬と人工合成ＤＮＡとの混合物を送液した後、油性封止液１２として、基材部３とカバー部７との間の隙間にＦＣ－４０（ＳＩＧＭＡ）を送液し、直径５μｍの孔を封止することで、１００万個の独立した核酸検出反応容器６Ａを構成した。

[0134] ＜蛍光強度の測定＞

次に、１００万個の独立した核酸検出反応容器６Ａを有する本実施例の核酸定量用アレイデバイス２を、６２℃のオーブンにてインキュベートし、１

５分後に取り出し、蛍光顕微鏡で撮影し各孔の蛍光強度を観察した。ここでは、反応後の核酸検出反応容器６Ａは、蛍光顕微鏡（ツァイス社、ＡＸ１０）、光源（ＬＥＪ社、ＦｌｕｏＡｒｃ００１．２６Ａ　Ｕｓａｂｌｅ　ｗｉｔｈ　ＨＢＯ　１０）、センサー（浜松ホトニクス社、ＥＭ－ＣＣＤ　Ｃ９１００）、フィルター（オリンパス社、Ｕ－ＭＮＩＢＡ２）、解析ソフト（浜松ホトニクス社、ＡＱＵＡＣＯＳＭＯＳ　２．６：露光時間　４８８ｍｓ、ＥＭゲイン　１２０、オフセット　０、ビニング　×１）を用いて撮影され、自家蛍光に対して十分なＳ／Ｎ比を有して蛍光を発する核酸検出反応容器６Ａの数が計測された。

[0135] 図３５は、本実施例における生体成分解析結果を示す写真である。本実施例では、図３５に示されるように、核酸検出反応容器６Ａの全数のうち、おおよそ６５％の核酸検出反応容器６Ａからインベーダー反応による蛍光発光が観察された。これは、上記のポアソン分布に基づく推定と一致しており、核酸検出反応容器６Ａに対して好適にインベーダー反応試薬と人工合成ＤＮＡが入ってインベーダー反応が進行し、人工合成ＤＮＡの濃度に対応した計測結果が得られたことを示している。

[0136] 以上、本発明の実施形態について図面及び実施例を参照して詳述したが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。

符号の説明

[0137] １，１Ａ，１Ｂ，１Ｃ，１Ｄ，１Ｅ，１Ｆ，１Ｇ　生体成分解析キット

２，２Ａ，２Ｂ１～２Ｂ９６　核酸定量用アレイデバイス

３　基材部

４　基板

４ａ　基板の表面

５　微小孔アレイ層

５ａ　貫通孔

６　ウェル

６ａ　底面部

６Ａ　核酸検出反応容器

７，７Ａ　カバー部

８　注入口部

８ａ　注入口開口端

９　排出口部

９ａ　廃液容器部側開口端

１０　水性溶液

１１　検出反応試薬

１２　油性封止液

２０　電極

２１　配線

２２　コネクタ

３１　廃液容器部

３２　スペーサー部材

３２ａ　貫通孔

３３　フィルター

３４　アダプタ

４０　ピペットチップ

１０１　シール部材

１０２　生体成分

１０３　容器

請求の範囲

[請求項1] 生体成分定量用アレイデバイスであって、

複数のウェルを有する基材部と、

前記基材部との間に隙間を有して前記複数のウェルの開口部分を覆うように前記基材部に重ねられたカバー部と、

前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に連通された注入口部と、

前記注入口部から離れた位置に形成され、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に連通された排出口部と、

を備え、

前記基材部と前記カバー部との間に水性溶液を充填した後に、生体成分を含む液体が前記注入口部から前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間に導入されることで、前記水性溶液のうち前記複数のウェル外にある余剰溶液は前記排出口部から排出され、前記水性溶液のうち前記複数のウェル内にあるウェル充填水性溶液に前記生体成分が拡散により移行する

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項2] 請求項１に記載の生体成分定量用アレイデバイスであって、

前記基材部と前記カバー部との間に充填された前記水性溶液を備えた

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項3] 請求項１に記載の生体成分定量用アレイデバイスであって、

前記複数のウェルと前記カバー部との少なくともいずれかは光透過性を有している

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項4] 請求項１に記載の生体成分定量用アレイデバイスであって、

前記複数のウェルは電極を有し、

前記基材部は、

前記電極に繋がる配線と、

前記配線を検出回路に接続するためのコネクタと、

を有する

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項5] 請求項１に記載の生体成分定量用アレイデバイスであって、

前記基材部の厚さ方向から見たときに前記注入口部及び前記排出口部と重ならない領域内に、前記複数のウェルを有してシグナル増幅反応を行う領域が設定されている

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項6] 請求項１に記載の生体成分定量用アレイデバイスであって、

前記排出口部と連通し、前記基材部と前記カバー部との間の前記隙間から前記排出口部を通じて液体が流入して貯まる廃液容器部をさらに備える

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項7] 請求項６に記載の生体成分定量用アレイデバイスであって、

前記基材部の厚さ方向から見たときに前記注入口部，前記廃液容器部，及び前記排出口部と重ならない領域内に、前記複数のウェルを有してシグナル増幅反応を行う領域が設定されている

生体成分定量用アレイデバイス。

[請求項8] 請求項１に記載の生体成分定量用アレイデバイスと、

前記生体成分に対する検出反応試薬と、

前記基材部と前記カバー部との間に前記注入口部から送液可能な油性封止液と、

を備え、

前記水性溶液は核酸を含まない緩衝液である、

生体成分解析キット。

[請求項9] 核酸導入方法であって、

流路内に複数のウェルが形成され前記流路内及び前記複数のウェル

内に水性溶液が充填された核酸定量用アレイデバイスにおける前記流路内に鋳型核酸を含む混合液を送液し、

前記流路内に送液された混合液を前記複数のウェル内の前記水性溶液に拡散させる

核酸導入方法。

[請求項10] 請求項９に記載の核酸導入方法を用いた核酸検出方法であって、

油性封止液を前記流路内に送液して前記複数のウェル内の前記混合液及び前記水性溶液を前記油性封止液により封止することにより前記複数のウェルを複数の独立した核酸検出反応容器とする、

核酸導入方法。

[請求項11] 請求項１０に記載の核酸導入方法を用いた核酸検出方法であって、

前記混合液がシグナル増幅反応試薬を含み、前記核酸検出反応容器内でシグナル増幅反応を行い、

前記核酸検出反応容器内に対してシグナル検出を行う

核酸検出方法。

[請求項12] 請求項１１に記載の核酸検出方法であって、

前記シグナル増幅反応が酵素反応である

核酸検出方法。

[請求項13] 請求項１２に記載の核酸検出方法であって、

前記酵素反応が等温反応である

核酸検出方法。

[請求項14] 請求項１３に記載の核酸検出方法であって、

前記酵素反応がインベーダー反応である

核酸検出方法。

[請求項15] 請求項１１に記載の核酸検出方法であって、

前記シグナル検出は、前記核酸検出反応容器内における前記鋳型核酸の有無に対応した蛍光、発光、ｐＨ変化、吸光度変化、および電位変化のうちの少なくとも１つの検出による

核酸検出方法。

[請求項16] 請求項１１から請求項１５のいずれか一項に記載の核酸検出方法を用いた生体成分解析方法であって、

解析対象物質となるＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、又はタンパク質のいずれかを前記混合液が含み、

前記解析対象物質に対する特異的標識能を有する標識物質に前記鋳型核酸が含まれまたは結合可能な状態で前記標識物質が前記混合液と前記水性溶液との少なくともいずれかに含まれている

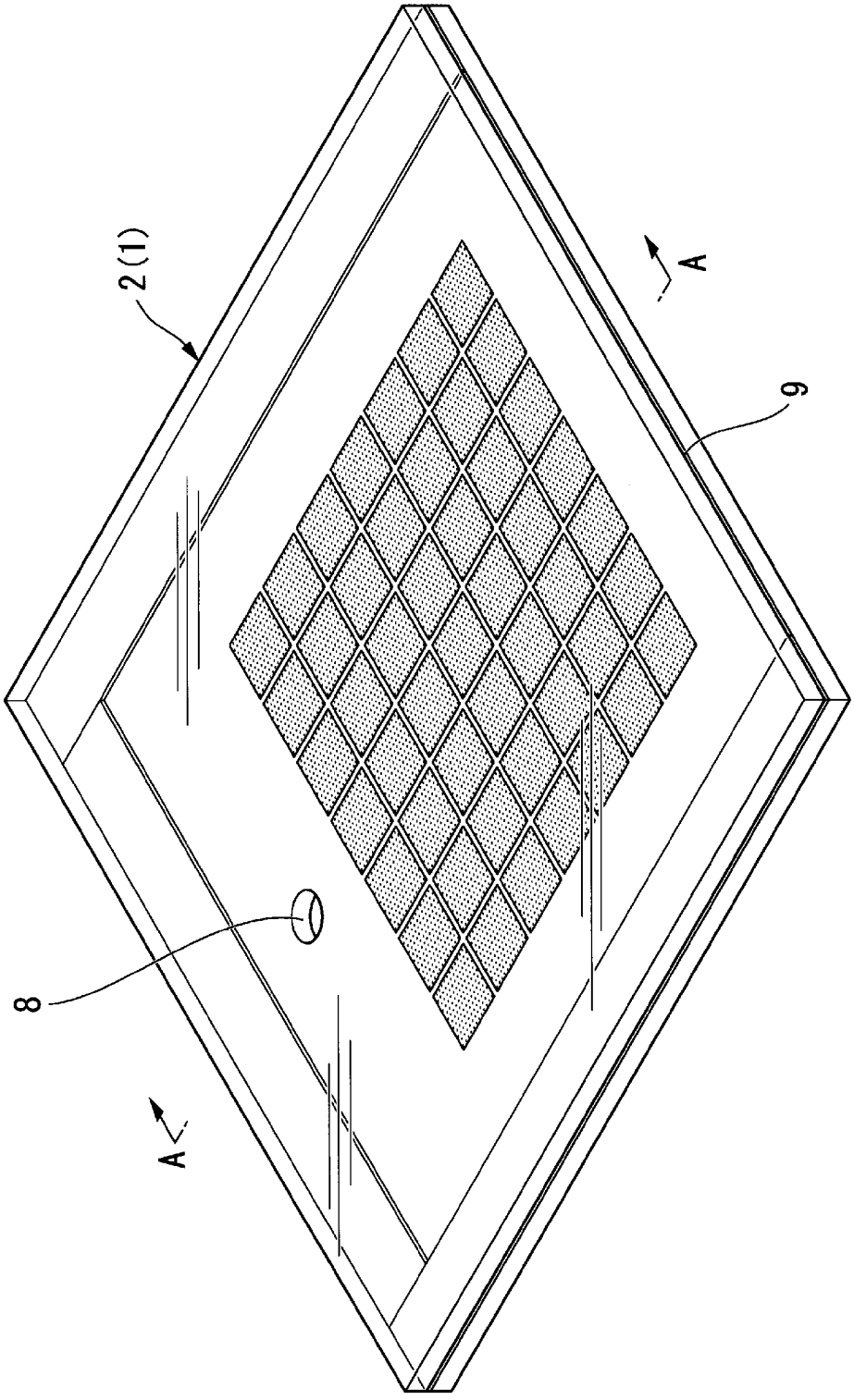
生体成分解析方法。

[請求項17] 請求項１６に記載の生体成分解析方法であって、

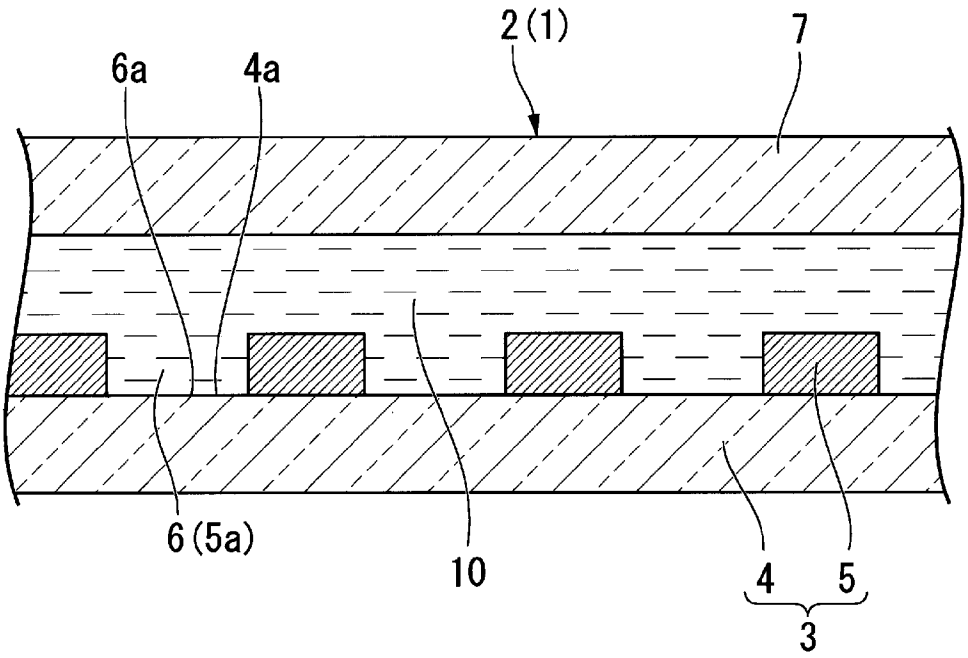
前記標識物質が、前記鋳型核酸とは異なるＤＮＡ鎖、酵素、粒子、抗体、及びリポソームのうちの少なくとも一つを含む

生体成分解析方法。

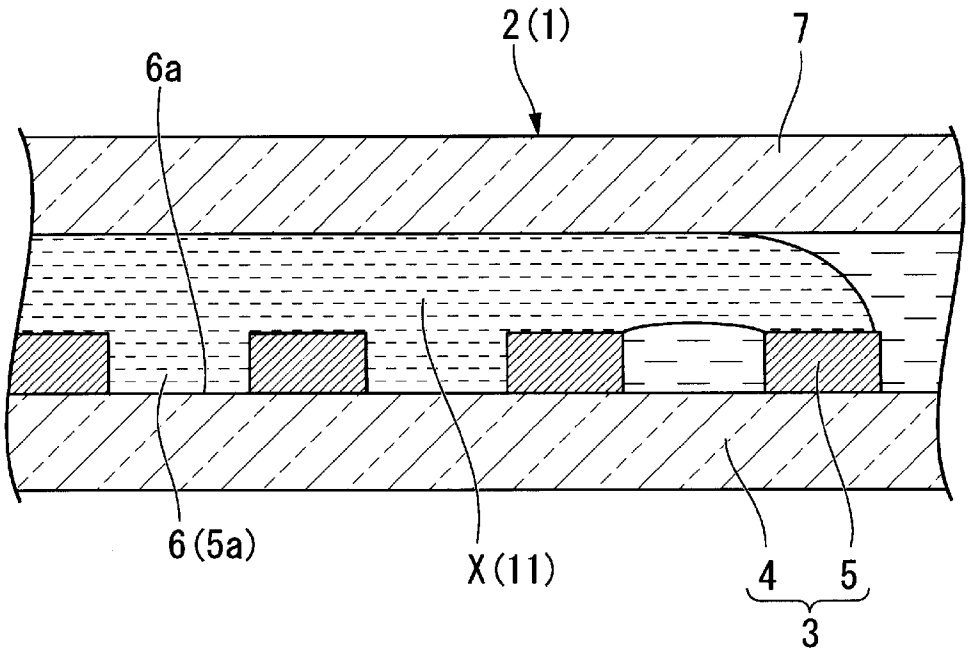
[図1]



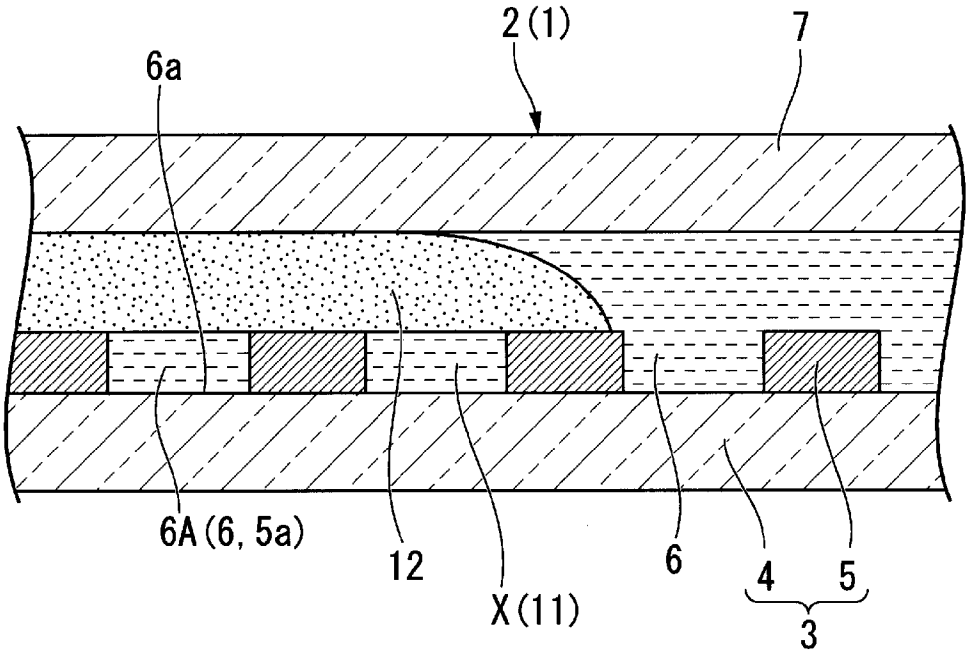
[図2]



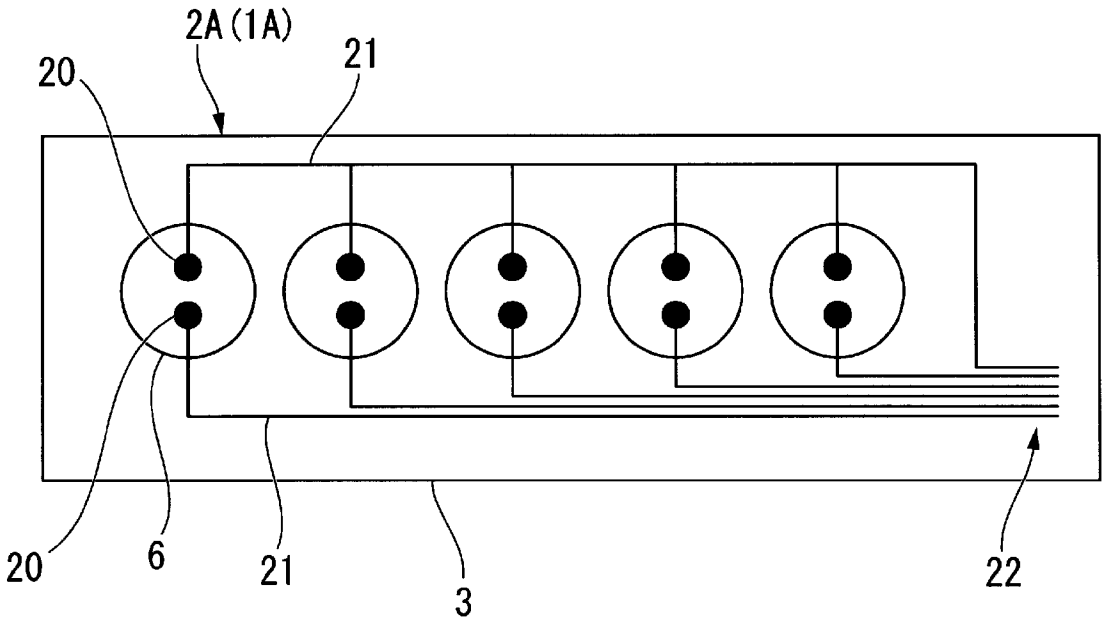
[図3]



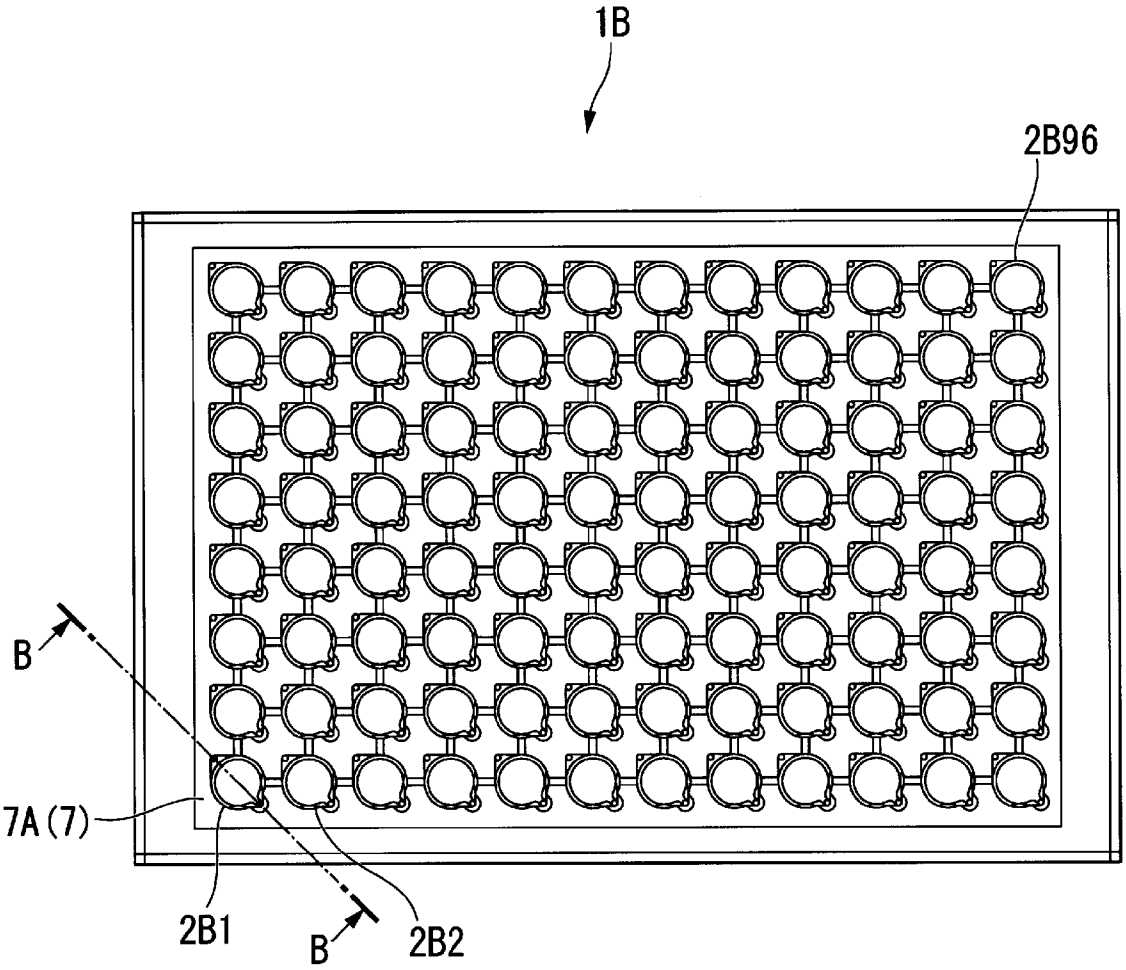
[図4]



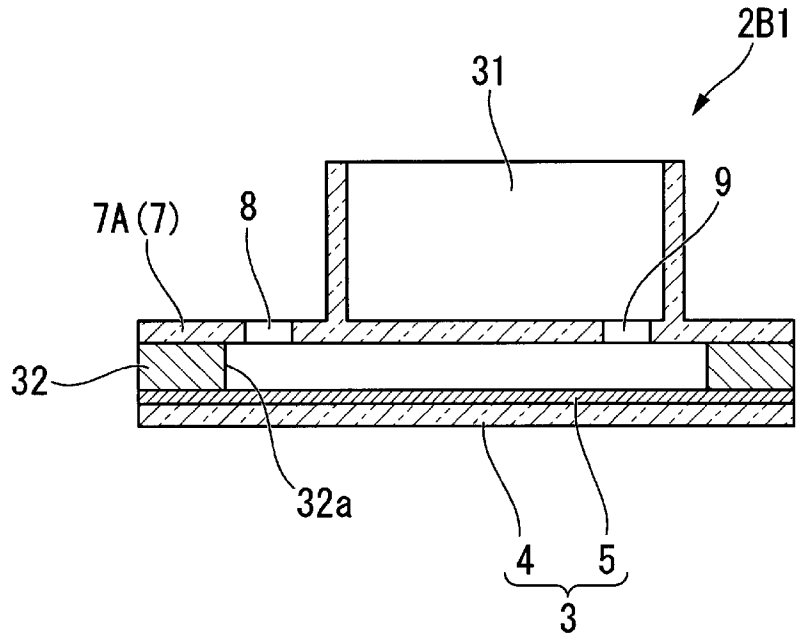
[図5]



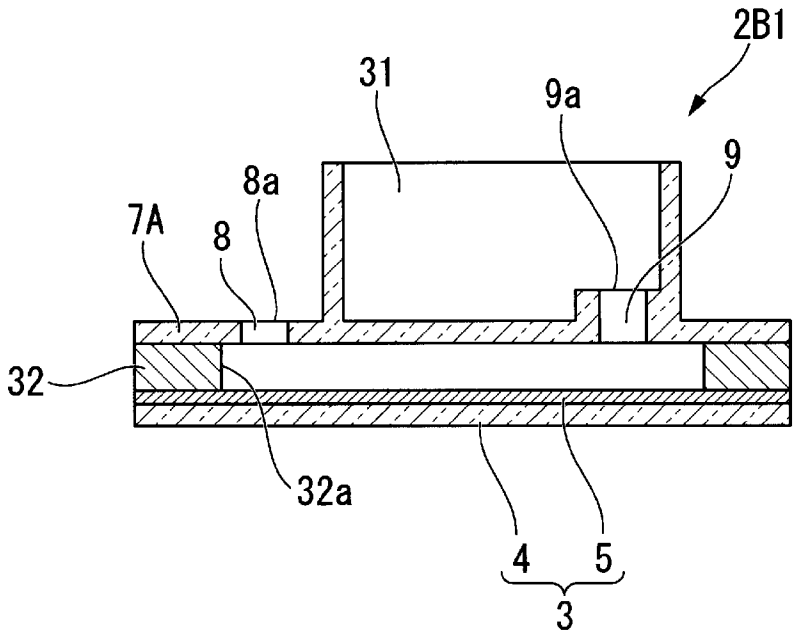
[図6]



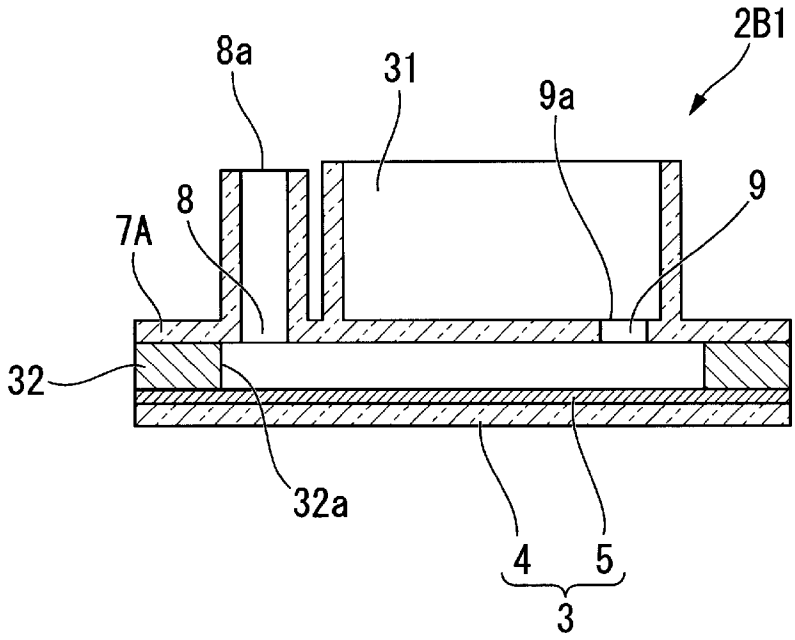
[図7]



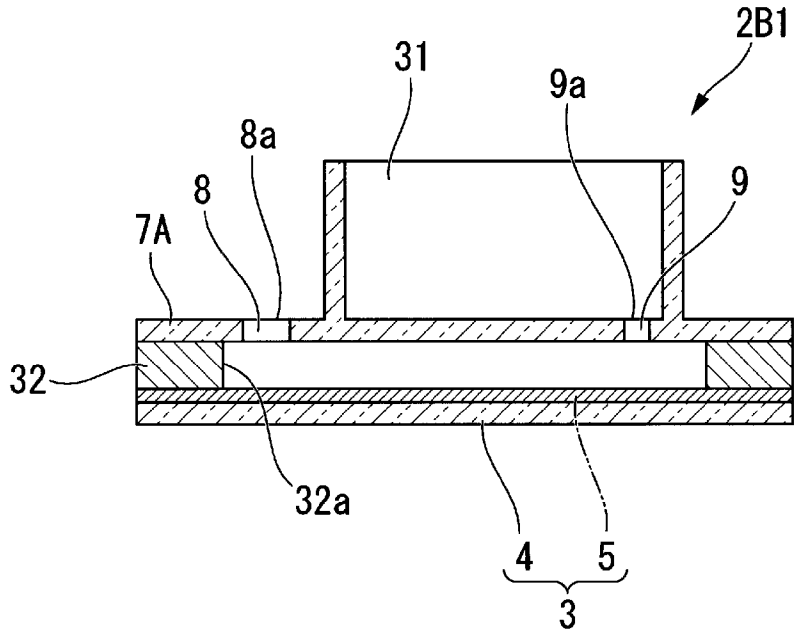
[図8]



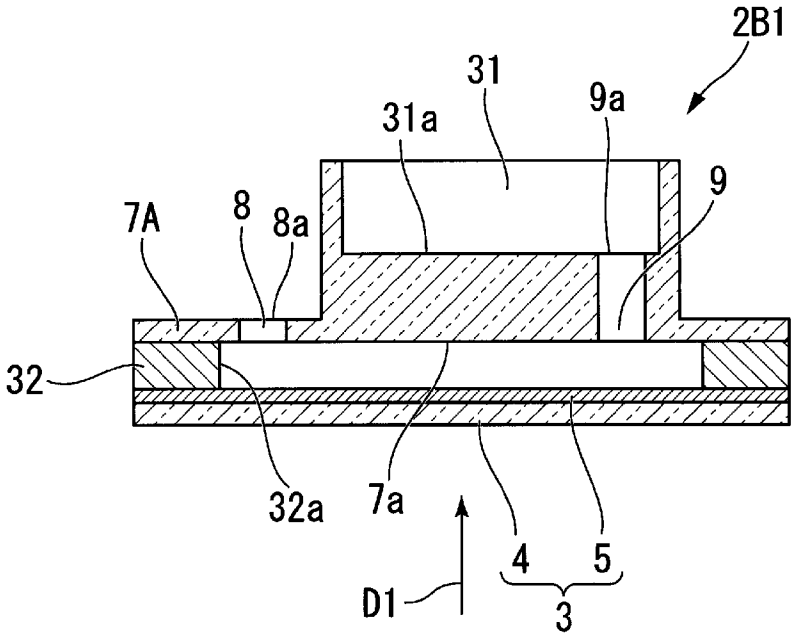
[図9]



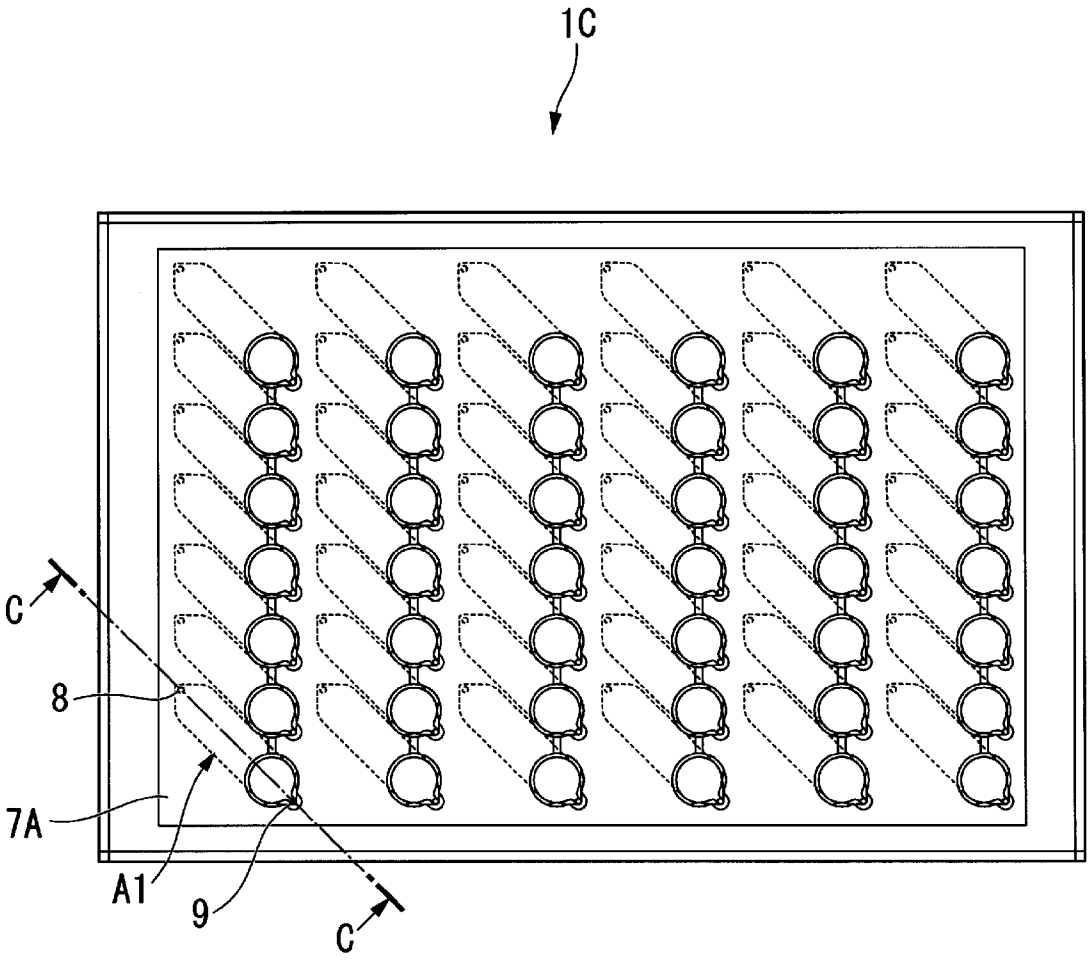
[図10]



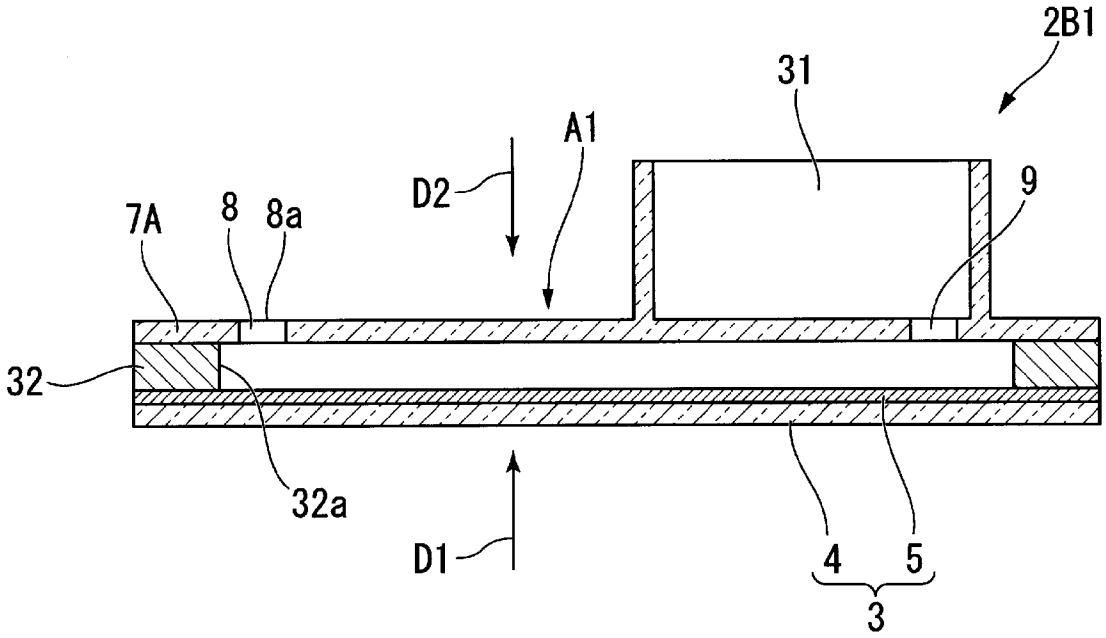
[図11]



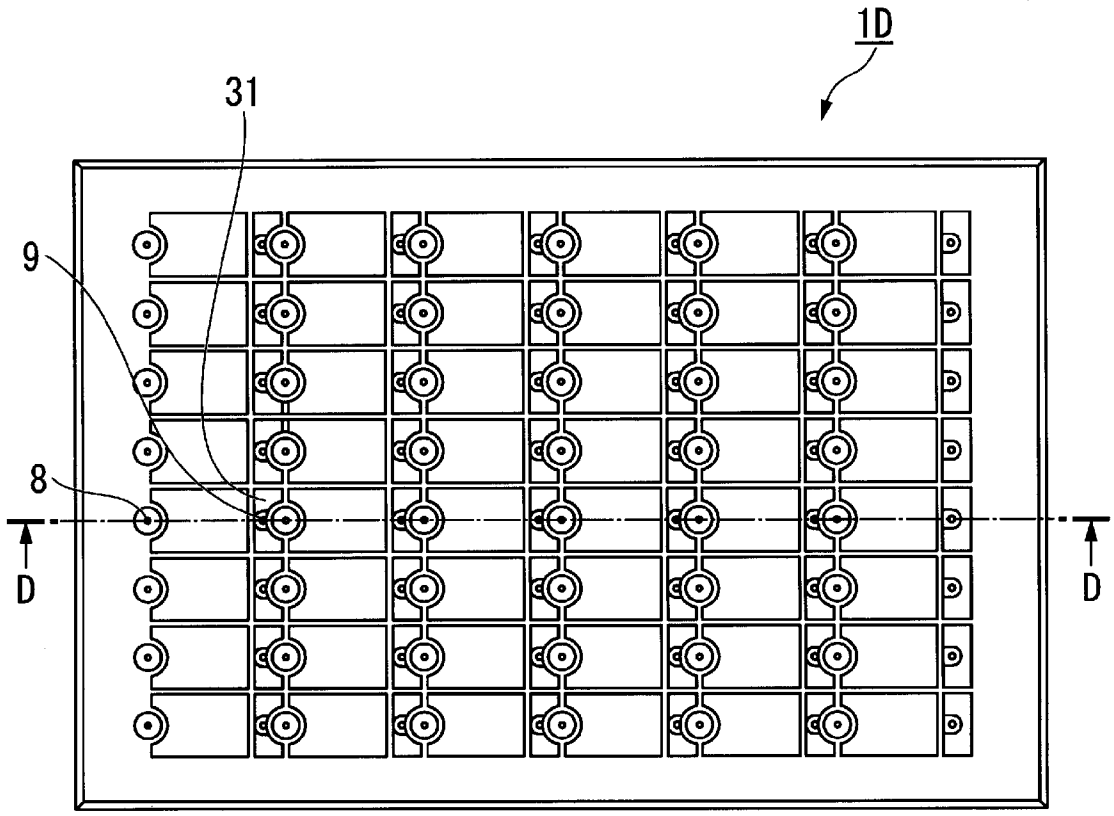
[図12]



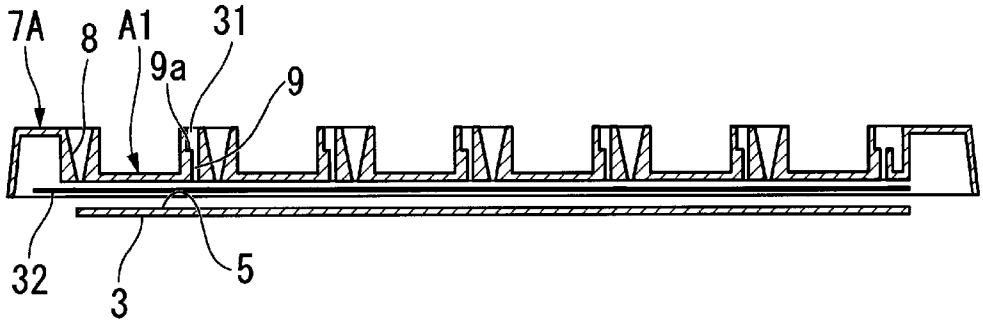
[図13]



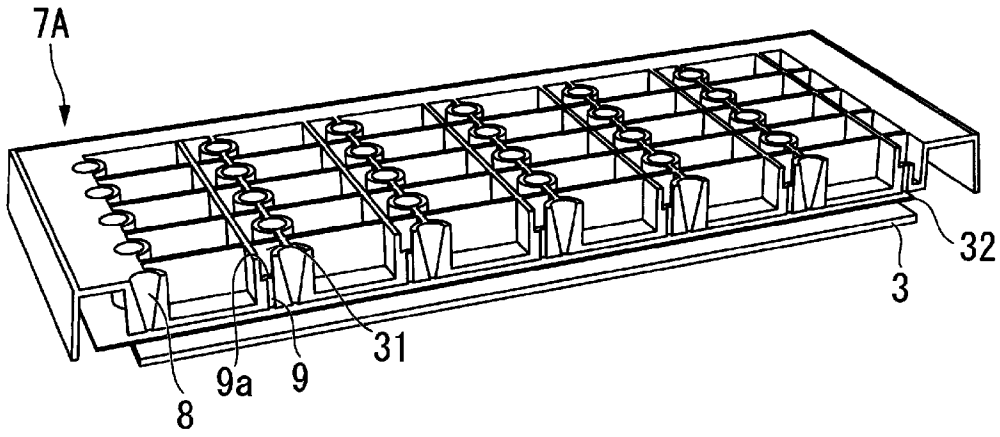
[図14]



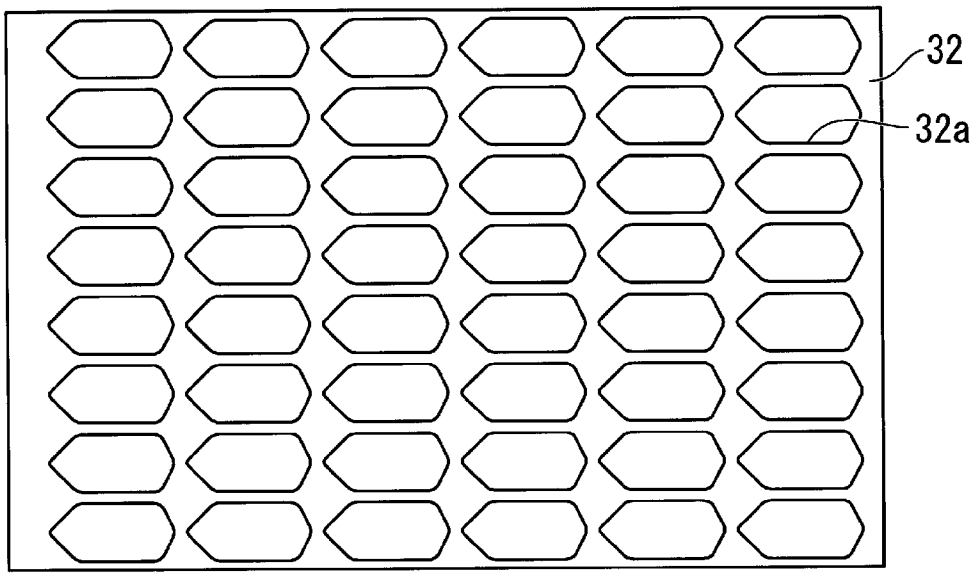
[図15]



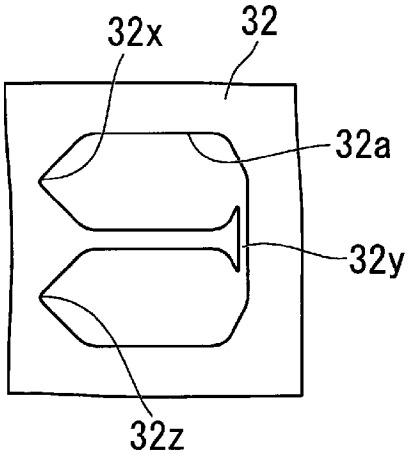
[図16]



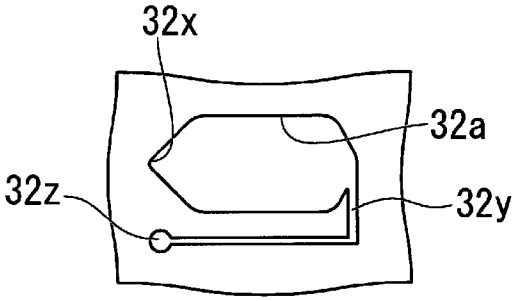
[図17]



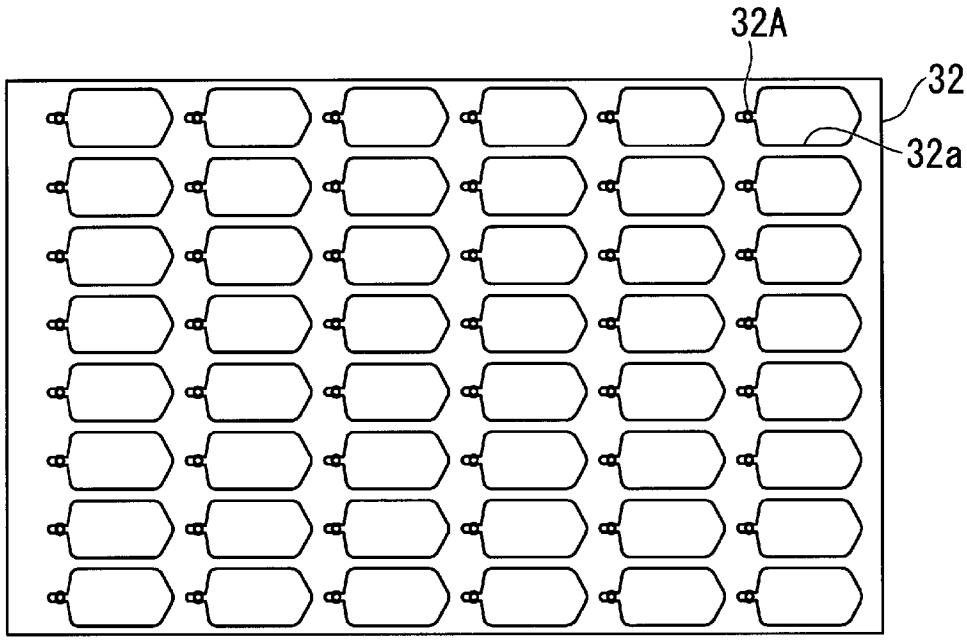
[図18A]



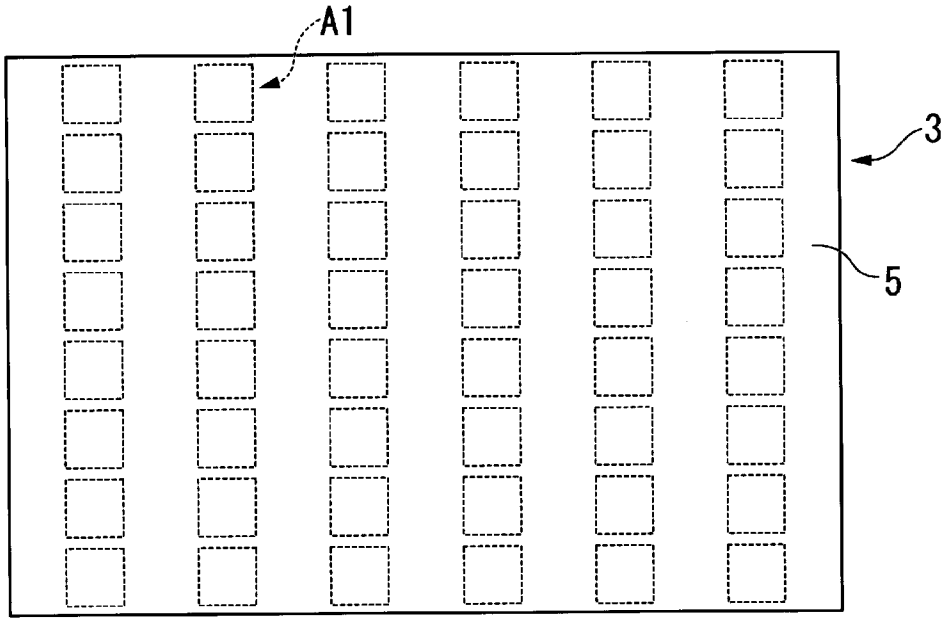
[図18B]



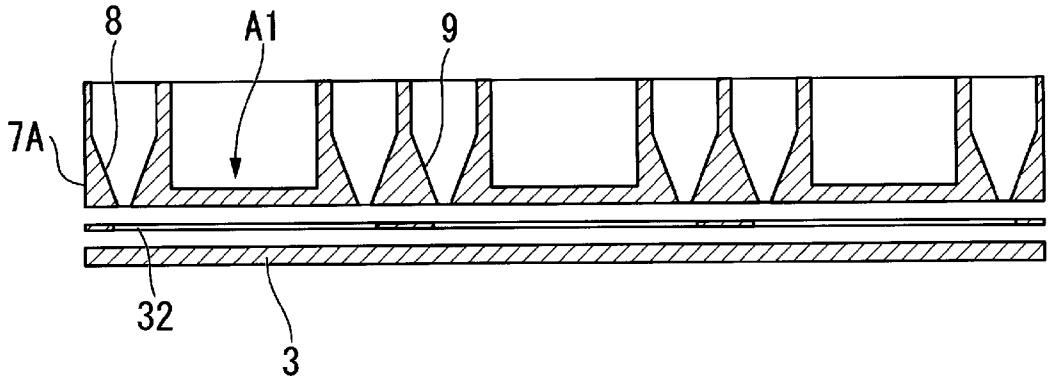
[図18C]



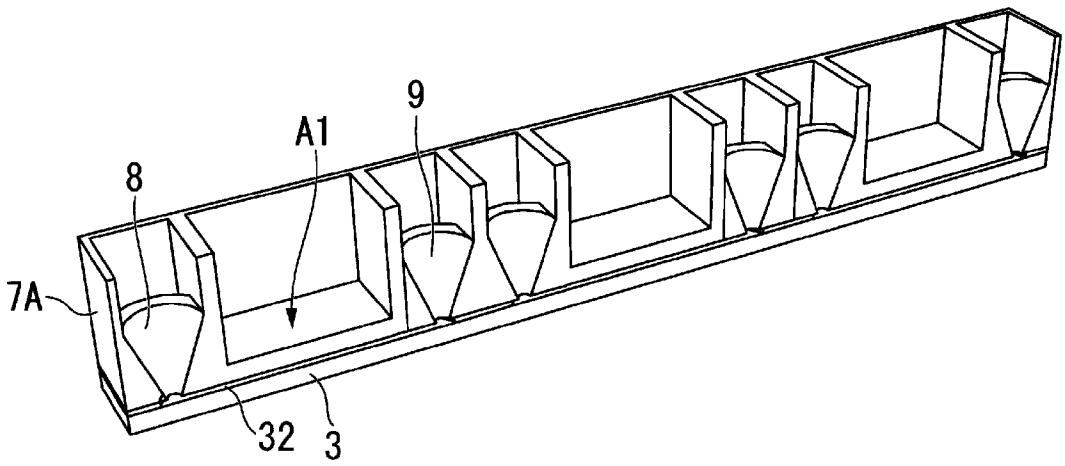
[図19]



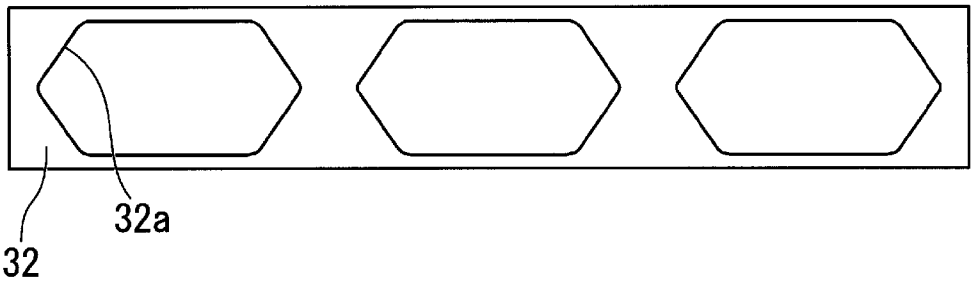
[図20]



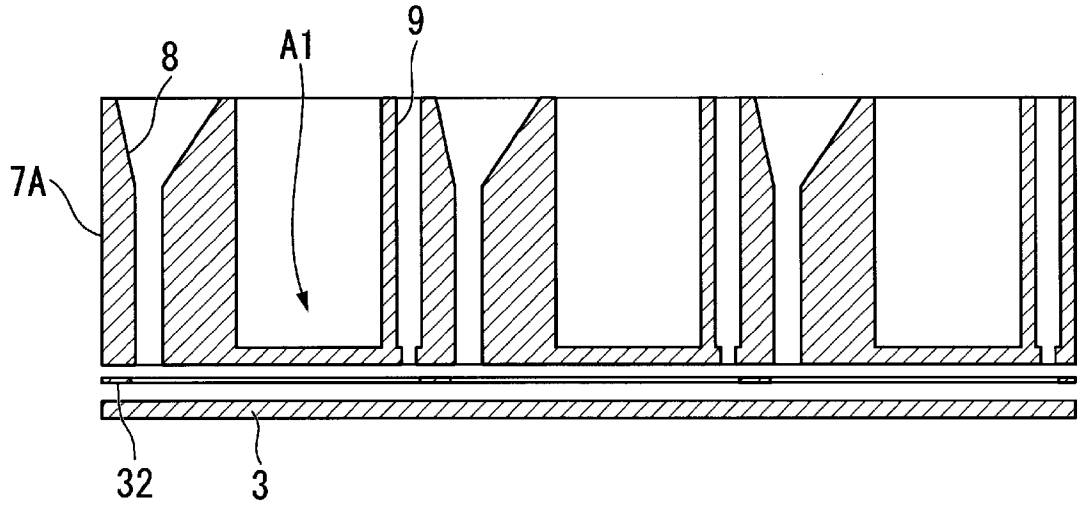
[図21]



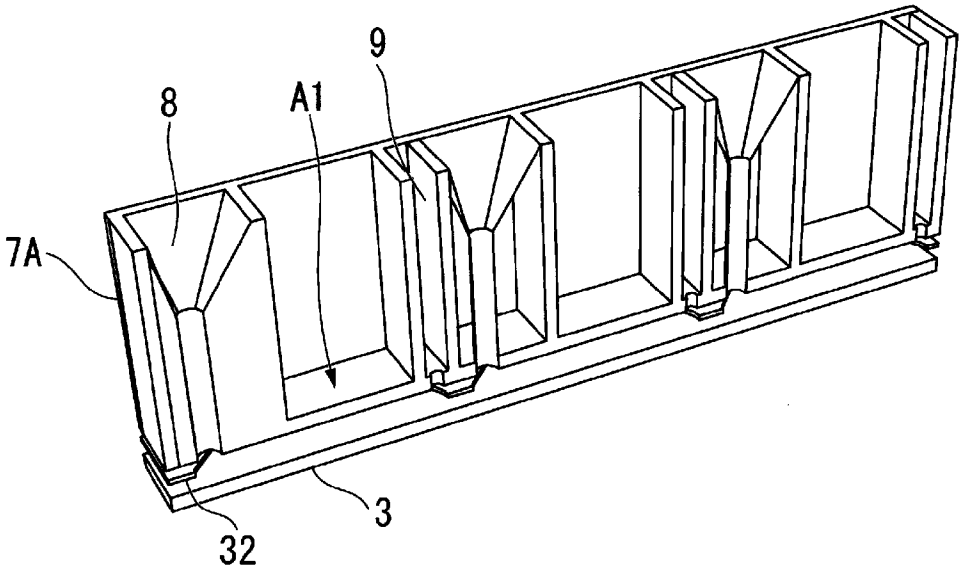
[図22]



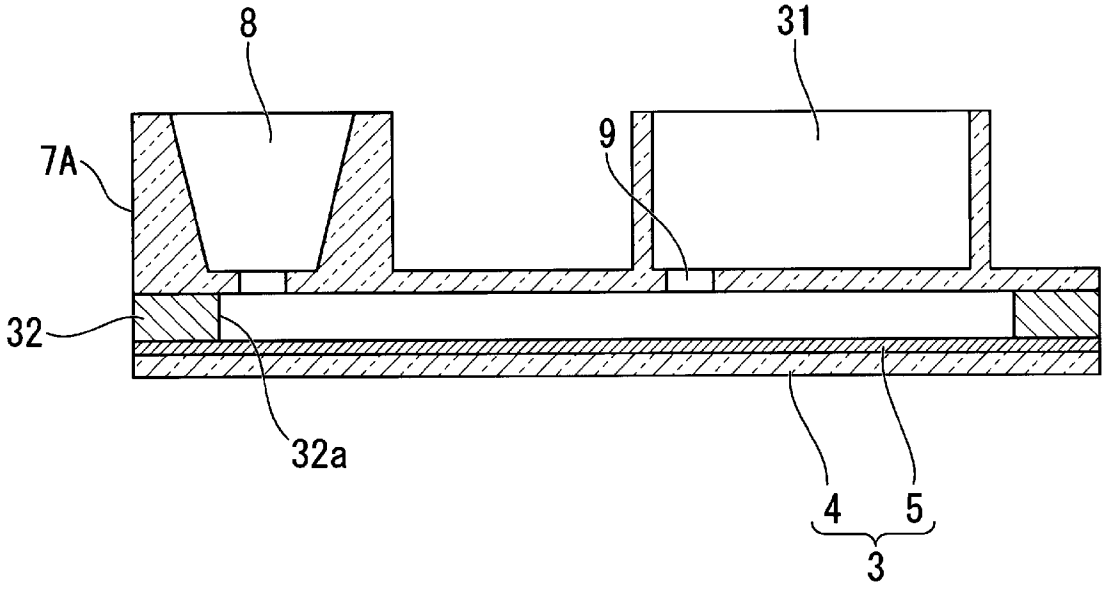
[図23]



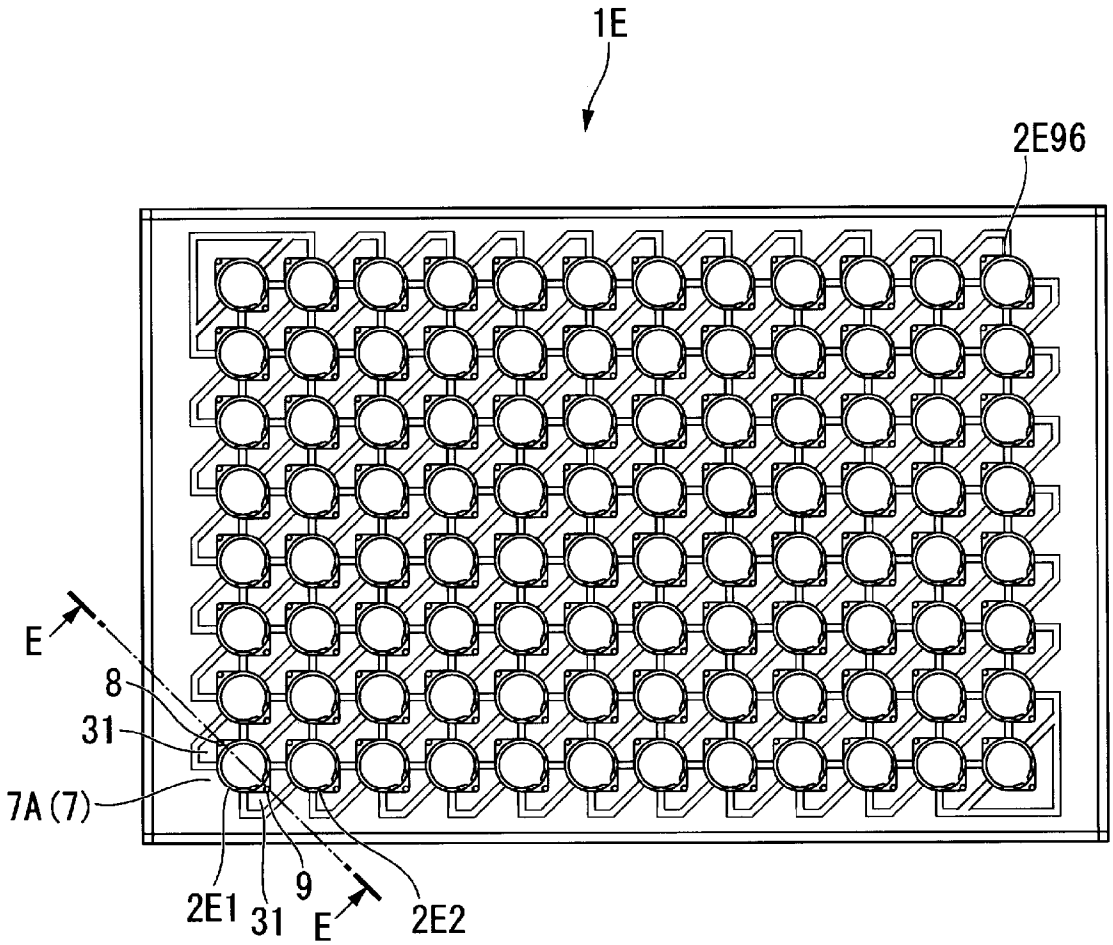
[図24]



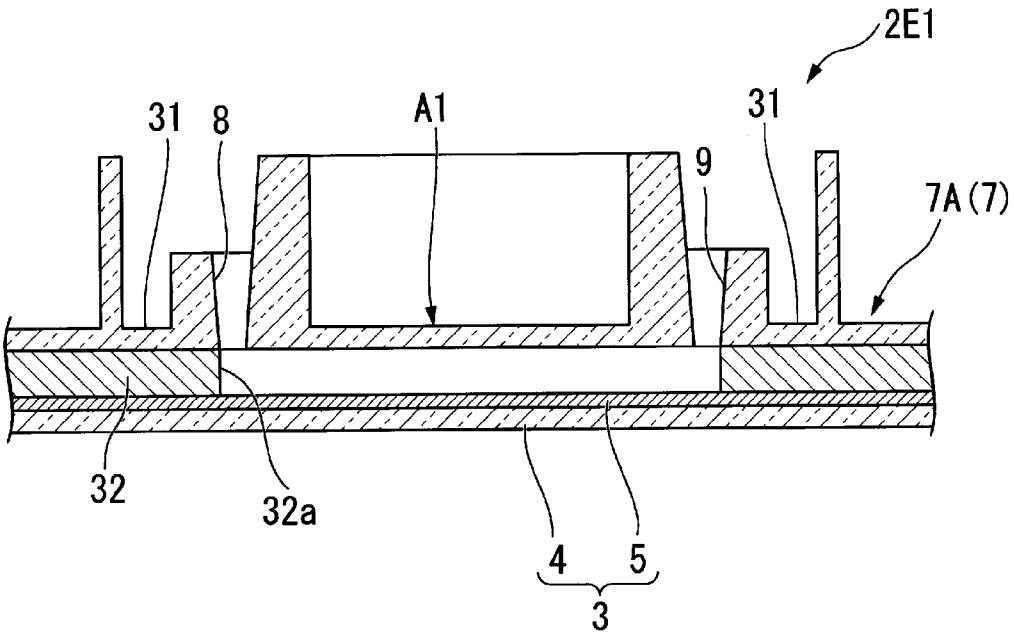
[図25]



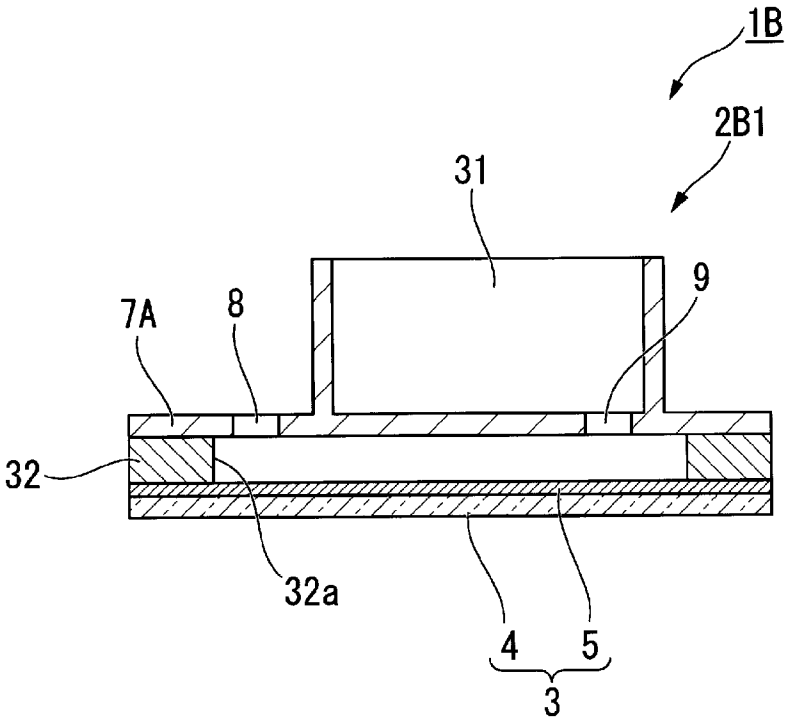
[図26]



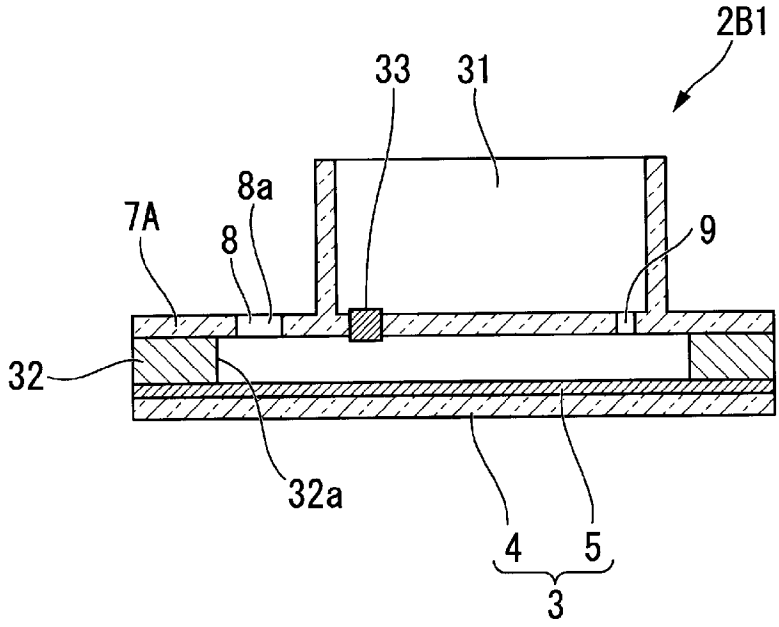
[図27]



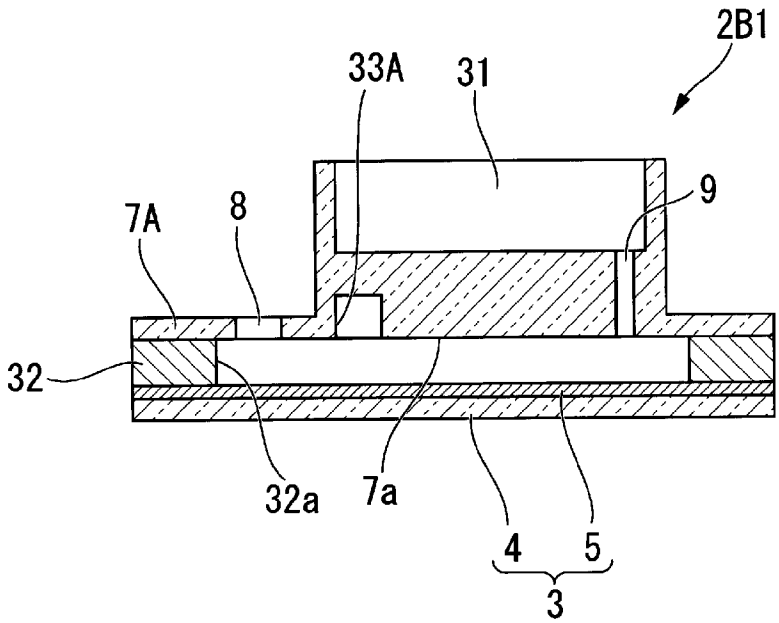
[図28]



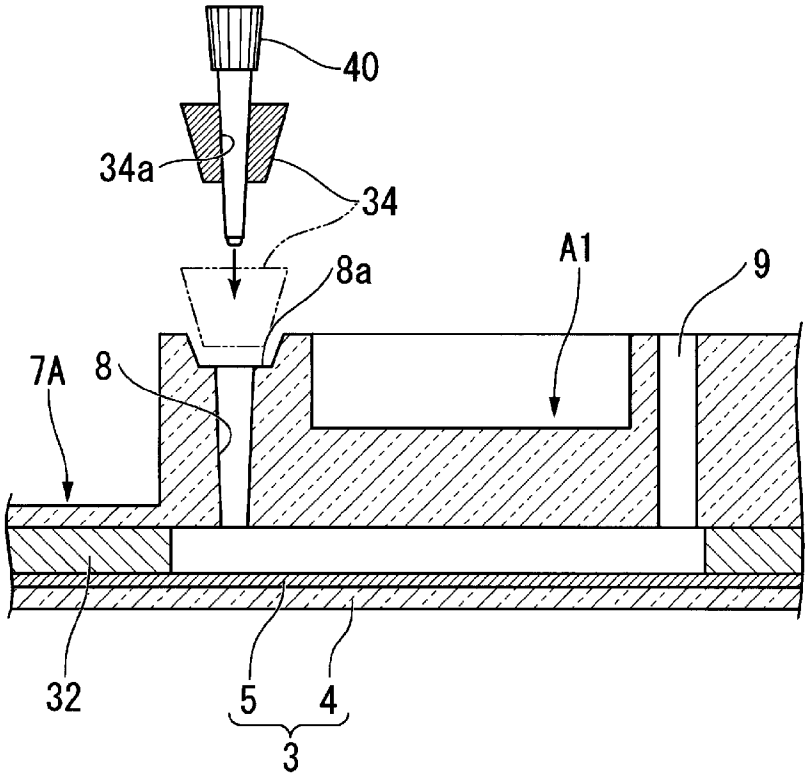
[図29]



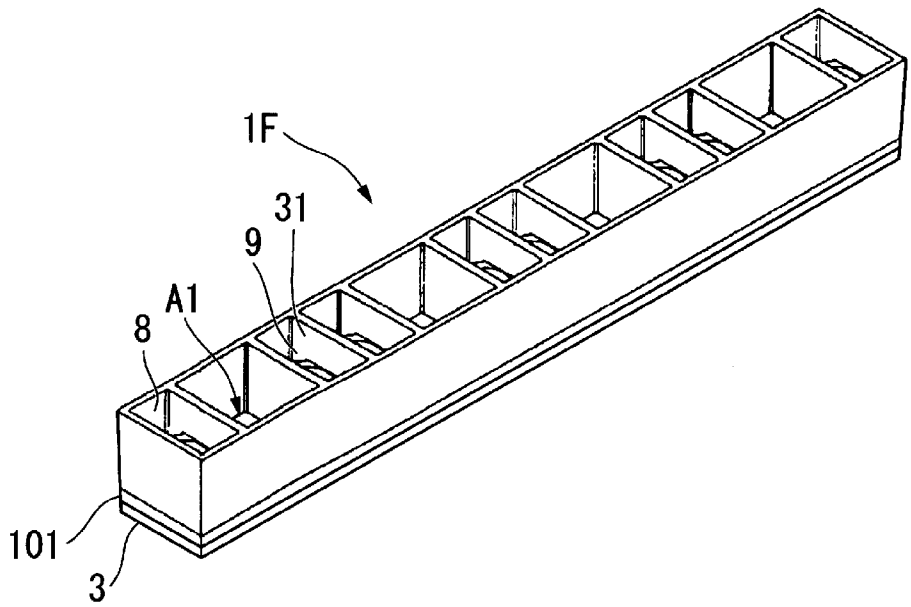
[図30]



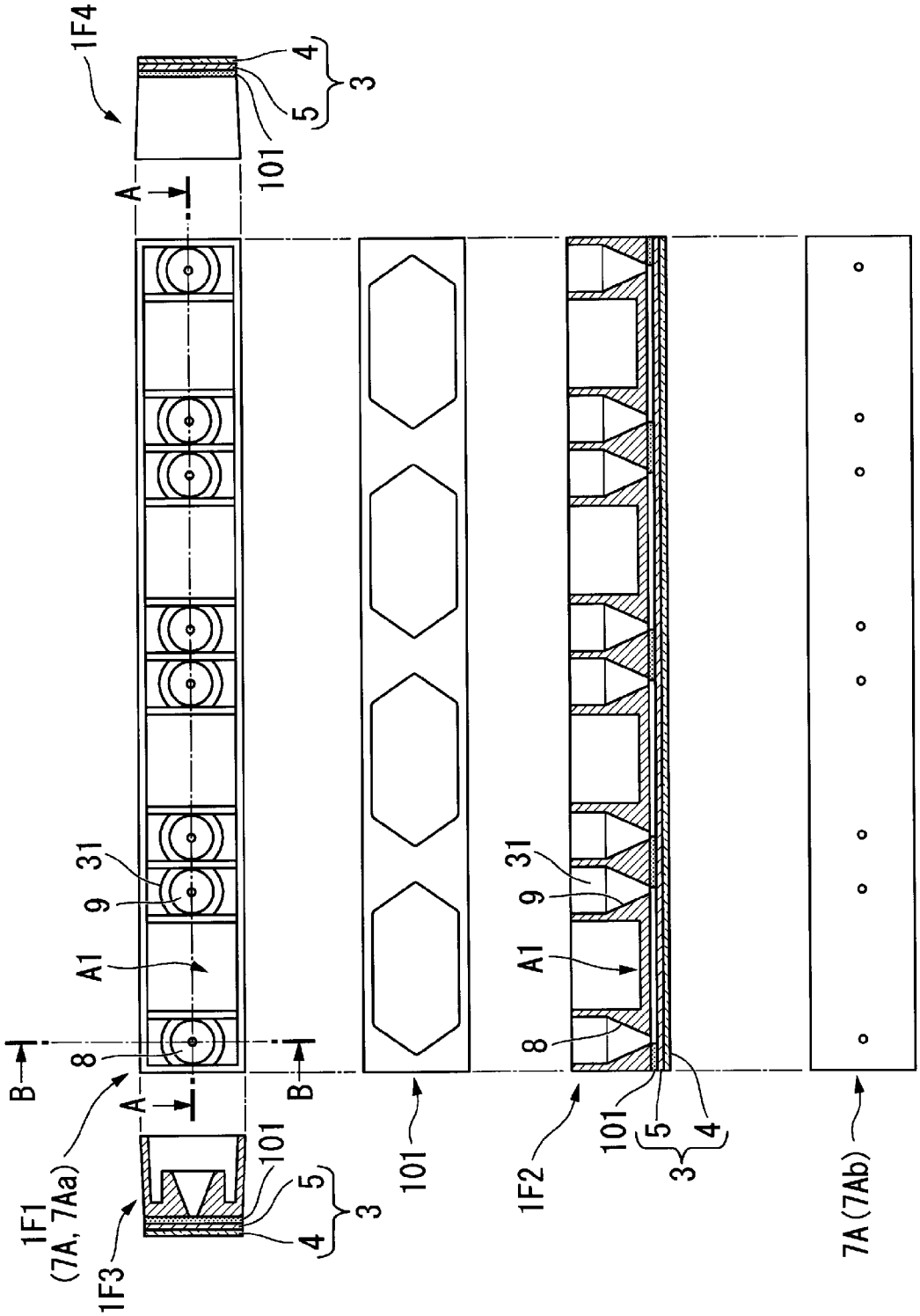
[図31]



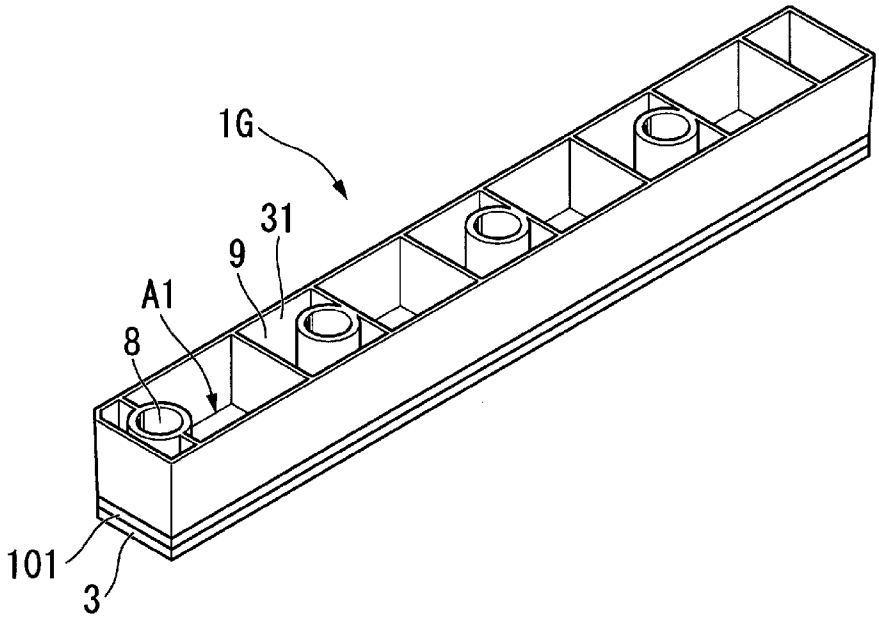
[図32A]



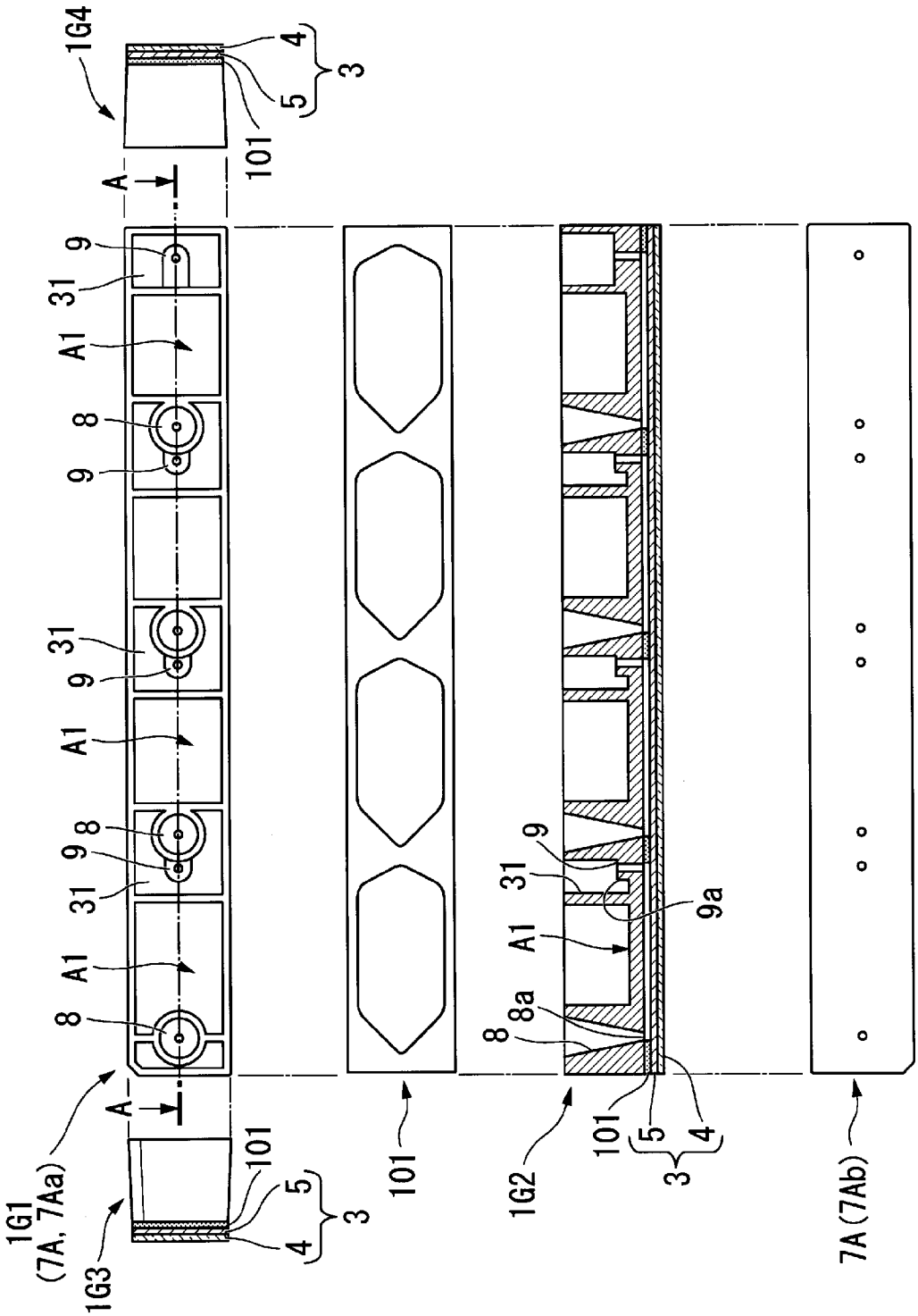
[図32B]



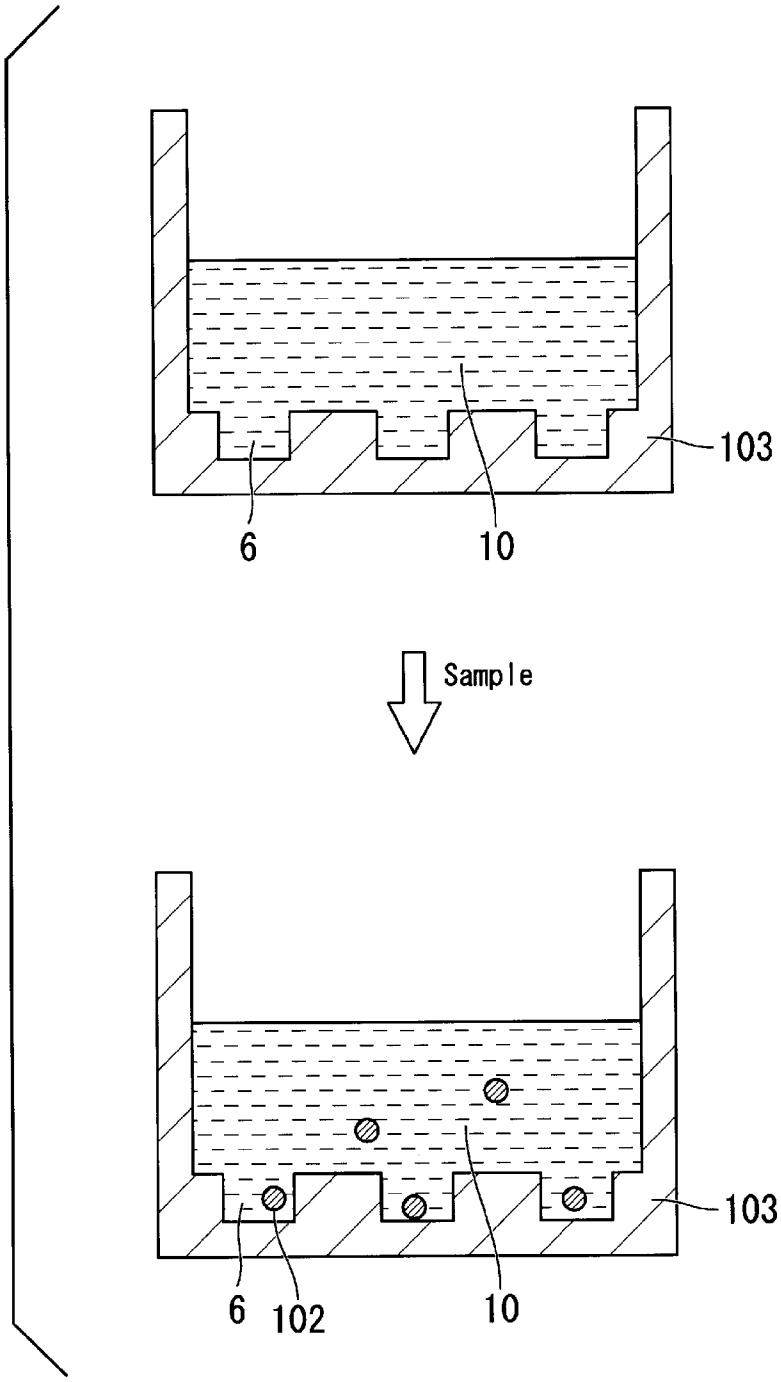
[図33A]



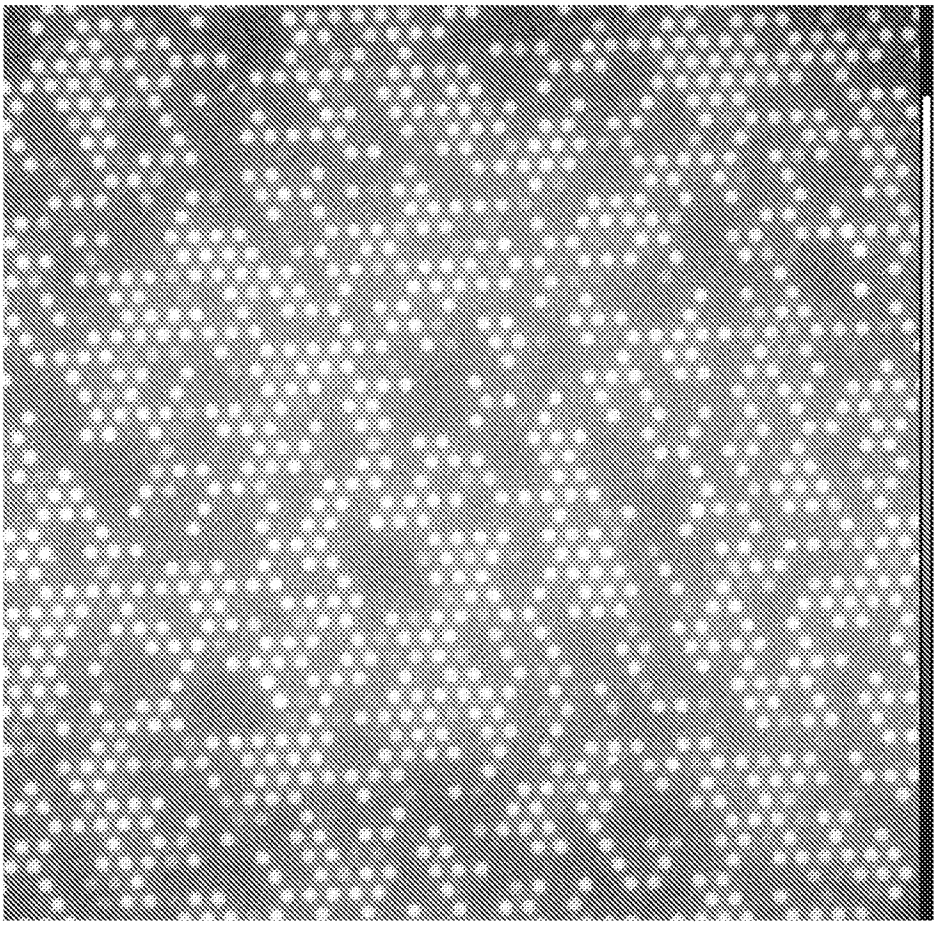
[図33B]


1G4
4
5
3
101
A
9
31
A1
8
9
31
9
A1
8
9
31
A1
8
A
101
5
4
3
1G1
(7A, 7Aa)
1G3
101
1G2
9
31
A1
8a
8
9a
101
5
4
3
7A (7Ab)

[図34]



[図35]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/081029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/00(2006.01)i, *C12Q1/68*(2006.01)i, *G01N33/53*(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)
C12M1/00, C12Q1/68, G01N33/53, 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 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2011-506998 A (Gong Hai-Qing), 03 March 2011 (03.03.2011), claims; paragraphs [0018] to [0035]; fig. 1 to 4 & WO 2009/078812 A1 claims; pages 8 to 24; fig. 1 to 4 & US 2010/0252128 A1 & EP 2237886 A1	1,3,5-8 1-17
X Y	ZHANG, R., et al., A microfluidic liquid phase nucleic acid purification chip to selectively isolate DNA or RNA from low copy/single bacterial cells in minute sample volume followed bydirect on-chip quantitative PCR assay, Anal. Chem., 2013, vol.85, no.3, p.1484-1491, ISSN 0003-2700, particularly, ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS, Figure 1-4	1,3.5-8 1-17

☒ 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	Date of mailing of the international search report
14 January 2016 (14.01.16)	26 January 2016 (26.01.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/081029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/051266 A1 (Atsushi MURAGUCHI), 17 June 2004 (17.06.2004), pages 26 to 27; examples; fig. 2, 3 & US 2006/0134704 A1 paragraphs [0100] to [0106]; EMBODIMENTS; fig. 2, 3 & EP 1566635 A1	1-3,5
X Y	WO 2014/034781 A1 (The University of Tokyo), 06 March 2014 (06.03.2014), claims; paragraphs [0014], [0019] to [0029], [0045] to [0055]; fig. 4, 11 (Family: none)	1-5,8-10 1-17
Y	NOMURA, S., et al., Development of a novel nano-Invader DNA chipsystem, J. Biochem. Biophys. Methods, 2007, vol.70, issue 5, p.787-795, ISSN 0165-022X, particularly, Abstract, Materials and methods	1-17
Y	WO 2008/088395 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OT TECHNOLOGY), 24 July 2008 (24.07.2008), page 4; fig. 1D & US 2009/0258383 A1	1-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８１０２９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/00, C12Q1/68, G01N33/53, 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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、DWPI (Thomson Innovation)

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	関連する請求項の番号
X	JP 2011-506998 A (ゴング　ハイーチング)	1,3,5-8
Y	2011.03.03, 特許請求の範囲, 段落[0018]-[0035], 図１－４ & WO 2009/078812 A1, 請求の範囲, p.8-24, 図１－４ & US 2010/0252128 A1 & EP 2237886 A1	1-17

☑　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	国際調査報告の発送日
１４．０１．２０１６	２６．０１．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３７６５
森井　文緒
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	関連する請求項の番号
X Y	ZHANG, R., et al., A microfluidic liquid phase nucleic acid purification chip to selectively isolate DNA or RNA from low copy/single bacterial cells in minute sample volume followed by direct on-chip quantitative PCR assay, Anal. Chem., 2013, vol.85, no.3, p.1484-1491, ISSN 0003-2700, 特に、ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS, Figure 1-4	1,3.5-8 1-17
X	WO 2004/051266 A1 (村口　篤) 2004.06.17, p.26-27, 実施例, 図２, 図３ & US 2006/0134704 A1, 段落[0100]-[0106], EMBODIMENTS, 図２, 図３ & EP 1566635 A1	1-3,5
X Y	WO 2014/034781 A 1 (国立大学法人東京大学) 2014.03.06, 請求の範囲, 段落[0014],[0019]-[0029], [0045]-[0055], 図４, 図１１ （ファミリーなし）	1-5,8-10 1-17
Y	NOMURA, S., et al., Development of a novel nano-Invader DNA chip system, J. Biochem. Biophys. Methods, 2007, vol.70, issue 5, p.787-795, ISSN 0165-022X, 特に、Abstract, Materials and methods	1-17
Y	WO 2008/088395 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OT TECHNOLOGY) 2008.07.24, p.4, Figure 1D & US 2009/0258383 A1	1-17