

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/062823

発行日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(43) 国際公開日 平成15年7月31日(2003.7.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F 1
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 T
GO 1 N 25/16	GO 1 N 25/16 C
GO 1 N 37/00	GO 1 N 37/00 1 O 1

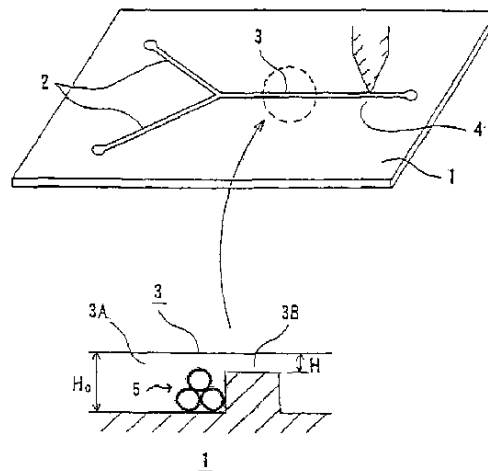
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 9 頁)

出願番号	特願2003-562635 (P2003-562635)	(71) 出願人	591243103 財団法人神奈川科学技術アカデミー 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/011679	(74) 代理人	100093230 弁理士 西澤 利夫
(22) 国際出願日	平成14年11月8日(2002.11.8)	(72) 発明者	北森 武彦 東京都文京区本郷2-32-2-304
(31) 優先権主張番号	特願2002-16203 (P2002-16203)	(72) 発明者	渡慶次 学 神奈川県川崎市高津区久本3-2-22 ヴァンドーム403
(32) 優先日	平成14年1月24日(2002.1.24)	(72) 発明者	佐藤 記一 東京都板橋区中台3-27-G-2103
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	CA, JP, US		

(54) 【発明の名称】 酵素免疫分析チップと酵素免疫分析方法

(57) 【要約】

反応液導入流路部、反応流路部並びに検出流路部がマイクロチャンネルとして基板上に順次に連通配設された分析チップにおいて、反応流路部マイクロチャンネルには、抗体を支持させたビーズ体の装入部とともに、このビーズ体の流れせき止め部とが設けられている酵素免疫分析チップを構成し、これを用いて流れせき止め部を越えて流れる酵素反応生成物を分析する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

反応液導入流路部、反応流路部並びに検出流路部がマイクロチャンネルとして基板上に順次に連通配設された分析チップにおいて、反応流路部マイクロチャンネルには、抗体を支持させたビーズ体の装入部とともに、このビーズ体の流れせき止め部とが設けられていることを特徴とする酵素免疫分析チップ。

【請求項 2】

抗体を支持させたビーズ体の流れせき止め部においては、反応流路部マイクロチャンネルの幅もしくは深さが、このビーズ体の流れをせき止めるに十分な狭さもしくは浅さであることを特徴とする請求項 1 の酵素免疫分析チップ。

10

【請求項 3】

複数の並列配置された反応流路部マイクロチャンネルが、検出点の前方で一つの検出流路部マイクロチャンネルに各々連通されていることを特徴とする請求項 1 または 2 の酵素免疫分析チップ。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のいずれかの分析チップによる酵素免疫分析方法であって、反応流路部マイクロチャンネル内での酵素を標識とする抗原抗体反応によって生成した酵素反応生成物を検出流路部マイクロチャンネルにおいて検出することを特徴とする分析チップによる酵素免疫分析方法。

【請求項 5】

非接触で酵素反応生成物を検出することを特徴とする請求項 4 の酵素免疫分析方法。

20

【請求項 6】

熱レンズ顕微鏡システムにより酵素反応生成物を検出することを特徴とする請求項 5 の酵素免疫分析方法。

【発明の詳細な説明】**技術分野**

この出願の発明は、酵素免疫分析チップと酵素免疫分析方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、マイクロチップ上において、高い精度で効率的に酵素免疫分析を行うことのできる、新しいマイクロチップとこれを用いた分析方法に関するものである。

30

背景技術

従来より、免疫分析は医療や生化学などの分野で重要な分析方法のひとつであることが知られている。しかし酵素免疫分析方法（E L I S A）など従来の方法では分析に一日以上の時間を要し、また操作が煩雑、試薬コストが高いという欠点がある。そこでこの出願の発明者らは、これまで一枚のガラスチップ等の基板上に μm オーダーのマイクロチャンネル（微細溝）を形成したマイクロチップを使用することにより、その特性である短い拡散移動距離、大きな比界面積を利用して様々な化学システムを集積化してきたことの実績と知見を踏まえて、そのひとつとして免疫分析法のマイクロチップへの集積化を行ってきた。その結果の一つとして、金コロイドを標識としてポリスチレンビーズ表面を熱レンズ顕微鏡：T L M で測定する分析法がすでに開発されてきている。これにより分析時間の短縮、試薬の少量化を実現した。だが、この方法では、球体の微小表面を測定するため測定点毎のばらつきが大きく、ダイナミックレンジがせまく、測定に熟練が必要であるといった問題点があった。

40

この出願の発明は、以上のとおりの従来技術の問題点を解消し、高い精度で効率よく免疫分析を行うことを可能とする、新しい免疫分析用マイクロチップとこれを用いた分析方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するための方策として、ビーズ表面ではなく、比較的容易に測定できる液相を測定するシステムにすることで、上記問題点が解決できると着想し、酵素を標識として基質溶液を呈色させ測定する酵素免疫分析システムをマイクロチ

50

ップ内に集積化することで、この出願の発明を完成した。

すなわち、この出願の発明は、第1には、反応液導入流路部、反応流路部並びに検出流路部がマイクロチャンネルとして基板上に順次に連通配設された分析チップにおいて、反応流路部マイクロチャンネルには、抗体を支持させたビーズ体の装入部とともに、このビーズ体の流れせき止め部とが設けられていることを特徴とする酵素免疫分析チップを提供する。

第2には、抗体を支持させたビーズ体の流れせき止め部においては、反応流路部マイクロチャンネルの幅もしくは深さが、このビーズ体の流れをせき止めるに十分な狭さもしくは浅さであることを特徴とする上記の酵素免疫分析チップを提供し、第3には、複数の並列配置された反応流路部マイクロチャンネルが、検出点の前方で一つの検出流路部マイクロチャンネルに各々連通されていることを特徴とする酵素免疫分析チップを提供する。

10

そして、この出願の発明は、第4には、上記第1ないし第3のいずれかの発明の分析チップによる酵素免疫分析方法であって、反応流路部マイクロチャンネル内での酵素を標識とする抗原抗体反応によって生成した酵素反応生成物を検出流路部マイクロチャンネルにおいて検定することを特徴とする分析チップによる酵素免疫分析方法を提供し、第5には、非接触で酵素反応生成物を検出することを特徴とする酵素免疫分析方法を、第6には、熱レンズ顕微鏡システムにより酵素反応生成物を検出することを特徴とする酵素免疫分析方法を提供する。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

20

まず、この出願の発明の酵素免疫分析チップにおいては、たとえば図1に模式的に示した例に沿って説明すると、ガラス、シリコン、樹脂等の基板(1)上に、反応液導入流路部(2)、反応流路部(3)並びに検出流路部(4)がマイクロチャンネル(微細溝)として順次に連通配設されたマイクロチップにおいて、反応流路部(3)マイクロチャンネルには、抗体を支持させたビーズ体(5)の装入部(3A)とともに、このビーズ体(5)の下流域への流れ(移動)をせき止める流れせき止め部(3B)とが設けられている。この図1の例では、流れせき止め部(3B)は、反応流路部(3)のマイクロチャンネルの深さ(H₀)よりもその深さ(H)を浅くしてビーズ体(5)の流れをせき止めるようにしている。

30

流れせき止め部(3B)については、この例のようなマイクロチャンネルの深さ調整による方法だけでなく、マイクロチャンネルの幅(W)を狭くしてビーズ体(5)の流れをせき止める構造とする等の各種の方策が採用されてもよい。磁性ビーズ体を用い、外部磁場の印加手段の配置をもって流れせき止め部(3B)を構成するようにしてもよい。

たとえばマイクロチャンネルの構造の調整によって、深さ(H)や幅(W)でビーズ体をせき止めるには、ビーズ体の径(D)との関係が、マイクロチャンネル装入部(3A)に装入されるビーズ体の装入量(体積)、その比重、そしてマイクロチャンネル内での液流速等を考慮して定められることになる。たとえば一般的目安としては、 $H < D$ 、 $W < D$ が考慮されるが、 $H < (2/3)D$ 、 $W < (2/3)D$ がより好ましく考慮される。

反応液導入流路部(2)、反応流路部(3)、そして検出流路部(4)ともに、従来と同様にリソグラフィによるエッチング等の手段で形成することができる。深さ(H)や幅(W)の調整についても同様である。これら流路部マイクロチャンネルの通常の深さや幅については、目的や対象物の種類、そして反応に応じて定めることができ、たとえば、その幅については $500\mu\text{m}$ 以下、深さは $300\mu\text{m}$ 以下を一般的な目安とすることができる。

40

反応液導入流路部(2)の先端には導入溝穴部を、また検出流路部(4)の終端には排出用溝穴部を設けること等の従来より知られているマイクロチップへの集積化の手段が適宜に採用されてよい。基板(1)上へのカバープレートの積層等も同様である。

たとえば以上のようなこの出願の発明の分析チップを用いることにより、従来のようにビーズ表面を測定対象とせず、酵素を標識として、流れせき止め部(3B)を越えて流れ

50

る基質溶液の反応による呈色等を測定対象とすることが可能になり、より高精度での簡便、効率的な酵素免疫分析 (E L I S A) が可能となる。

なお、反応・分析時には、マイクロチャンネルやビーズ体の装入部に気泡が混入すると分析上好ましくない場合があることから、たとえばマイクロチャンネル上部のチップ表面に配置する透明カバー体やチップ基板に微小孔や微小排気路を設けることや、図1の平面Y字型のマイクロチャンネル流路の一方に試料や試薬を供給する際に、他方のマイクロチャンネル流路にまでこれらが流れ込むように気泡の混入を抑えること等のことが、そして、そのための流路設計が考慮されることになる。ビーズ体の振動あるいは攪拌等によって気泡を取り除くこと等も考慮される。

また、定量分析のために一定量のビーズを導入することが必要な場合には、ビーズの個数を数えるのではなく、流路設計により体積、すなわち流路長さにより判定できるようにすることも考慮されている。

もちろん図1は、マイクロチップの基本構成を説明したものであって、これに限定されることはない。たとえば一枚の基板(1)上に、複数の反応流路部と複数の検出流路部が配設されていてもよいし、さらには、たとえば図2に例示したように、検出点を一点にし、一つの検出流路部(4)に、並列配置した複数の反応流路部(3)の各々が連通されるようにしてもよい。この場合には、同時に他種類の分析を行うことを目的とし、まず初めに各反応流路部(3)のチャンネルに反応に必要な試薬溶液などを同時に導入して一斉に反応させた後、酵素反応基質溶液を各チャンネルごとに順次導入して、反応生成物を合流部より下流で検出することができる。

各チャンネルの分析結果を一方所の検出点で測ることができ、検出器を複数準備したり、検出器もしくはチップを移動させたりする必要がないため、簡便で迅速な分析が可能となる。

免疫分析のための検出については非接触で、たとえば光学的に行うことなどが可能である。たとえば、この出願の発明者らが開発してきた熱レンズ顕微鏡(TLM)システムを有効に用いることができる。

この出願の発明によって、標識物質に酵素を用い、抗体を支持させた樹脂のビーズ体をマイクロチャンネルに装入してその流れをせき止めることで、反応生成物を液相中で簡便に測定することが可能になる。

そこで以下に実施例を示し、さらに詳しくこの出願の発明について説明する。もちろん、以下の例によって発明が限定されることはない。

実施例

実施例1

3cm×7cmの石英ガラス製基板に、図1に示したように、深さ(H₀)100μm、幅250μmで、中央部のみをビーズをせき止めるために深さ(H)を10μmにしたせき止め部(3B)を設けた平面配置がY字型状のマイクロチャンネルを作製した。このマイクロチャンネル内に反応固相としてあらかじめヒトインターフェロンガンマ(IFN-γ)抗体を固定化した直径50μm程度のポリスチレンビーズを導入し、チップ内でそのまま抗原抗体反応および洗浄操作などを行った。反応生成物の検出には、図1に示したような流路位置において、高感度な分析法である熱レンズ顕微鏡を用いた。

具体的には、濃度の異なるIFN-γを含む試料、ビオチン化IFN-γ抗体、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体を順番にポンプで流し反応させる。反応後前記Y字のマイクロチャンネルの一方から4-AA(アミノアンチピリン)、他方からTOOS、H₂O₂を流し、酵素と反応させる。反応により生じた550nmに吸収極大波長を持つ生成物をせき止め部の下流で熱レンズ顕微鏡(励起光:YAGレーザー532nm、プローブ光学導体レーザー670nm)で測定した。

作製したマイクロチップ酵素免疫分析システムでIFN-γの分析を試みたところ、定量的な酵素反応生成物の信号が確認できた。さらに測定に十分な信号強度を得るため、試薬の濃度や流速、反応時間を変えて最適条件を求めた。抗原/抗体反応時は、流速1μl/min、反応時間15分以上、測定時は基質濃度1×10⁻⁴M、流速0.1μl/min

n以下で良好な信号が確認できた。この条件下で試料濃度に対する信号強度の検量線を作成した。バルクでの分析と比較して、分析時間は2日から90分に減少し、検出限界は約8桁、マイクロチップ内で金コロイド標識した方法と比較して検出限界が約2桁向上した。

さらに温度と信号強度の関係を調べたところ、約50℃で信号が最大となり、室温の約5倍の信号強度となった。温度を変化させ信号強度をあげることによりさらに検出限界が下がることが確認された。

実施例2

イボニシなどの海産巻き貝一個体中に微量に含まれる、内分泌攪乱物質の一種とされる性ホルモン17 β -estradiolの定量を行った。

10

まず、数cm角のバイレックスガラス基板中に、深さ100 μ m、幅250 μ mで、中央部のみビーズをせき止めるために深さを10 μ mにしたせき止め部を設けたマイクロチャンネルを作製した。このチップに反応固相として直径15-50 μ m程度のポリスチレンビーズを導入し、ここに試料および各種試薬溶液を添加し、チップ内でそのまま抗原抗体反応および洗浄操作、酵素反応などを行った。生じた酵素反応生成物の検出には高感度な分析法である熱レンズ顕微鏡を用いた。

より具体的には、作製したチップのマイクロチャンネル内にあらかじめ抗17 β -estradiol抗体を吸着させたビーズを導入した後、シリンジポンプを用いて17 β -estradiolを含む試料と一定量のペルオキシダーゼ標識した17 β -estradiolを混合した溶液を流し入れ、競合的に抗原抗体反応を行わせた。未反応物をバッファ

20

で洗浄後、酵素基質(4-アミノアンチピリン、N-ヒドロキシスルホプロピルアニリン誘導体、H₂O₂)を導入して酵素反応させ、そこで生成する発色物質を下流部で検出することにより定量を試みた。

その結果、図3に例示したように、1,000pg/mLまでの比較的低濃度の濃度範囲で検量線を作成することができた。アッセイに必要な試料体積が極めて少量であることとあわせると、小型の巻き貝一個体からの抽出液から測定するのに十分な感度を有していることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、より高精度に、簡便、かつ効率的な酵素免疫分析が可能とされる。

30

【図面の簡単な説明】

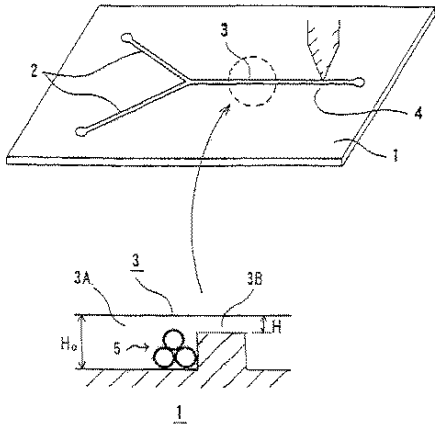
図1は、この出願の発明の分析チップの構成について模式的に例示した斜視図と要部縦断面図である。

図2は、マイクロチャンネルの配置の別の例を示した平面図である。

図3は、実施例2についての検量線図である。

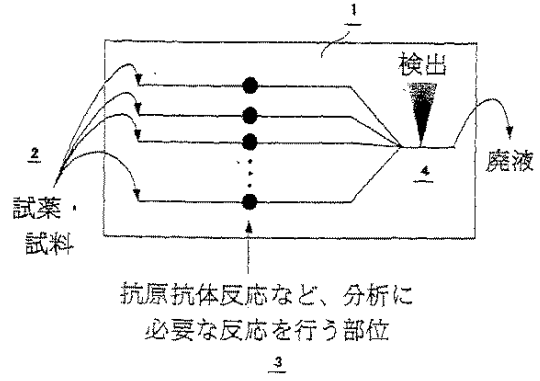
【図 1】

図 1



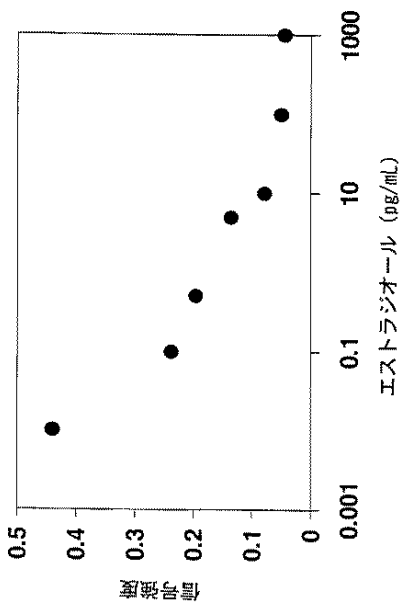
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3



【国際調査報告】


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/11679

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. ⁷ G01N33/543, G01N33/552, G01N37/00, G01N35/08		
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)		
Int.Cl. ⁷ G01N33/543, G01N33/552, G01N37/00, G01N35/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-4628 A (The Kanagawa Academy of Science), 12 January, 2001 (12.01.01), (Family: none)	1-6
Y	JP 5-240872 A (Canon Inc.), 21 September, 1993 (21.09.93), & EP 545284 A & US 5370842 A & DE 69217331 A	1-6
Y	JP 2000-162184 A (Hitachi, Ltd.), 16 June, 2000 (16.06.00), (Family: none)	3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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		"I" 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 10 January, 2003 (10.01.03)		Date of mailing of the international search report 28 January, 2003 (28.01.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/11679	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. ⁷ G01N 33/543 G01N 33/552 G01N 37/00 G01N 35/08			
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. ⁷ G01N 33/543 G01N 33/552 G01N 37/00 G01N 35/08			
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 1971-2002年			
日本国登録実用新案公報 1994-2002年			
日本国実用新案登録公報 1996-2002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)			
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	JP 2001- 4628 A(財団法人神奈川科学技術アカデミー)2001.01.12 (ファミリーなし)	1-6	
Y	JP 5-240872 A(キャノン株式会社)1993.09.21 & EP 545284 A & US 5370842 A & DE 69217331 A	1-6	
Y	JP 2000-162184 A(株式会社日立製作所)2000.06.16 (ファミリーなし)	3	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 10.01.03		国際調査報告の発送日 28.01.03	
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) 宮澤 浩 	
		2 9407 電話番号 03-3581-1101 内線 3251	

(注) この公表は、国際事務局（WIPO）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	酶免疫测定芯片和酶免疫测定方法		
公开(公告)号	JPWO2003062823A1	公开(公告)日	2005-05-26
申请号	JP2003562635	申请日	2002-11-08
申请(专利权)人(译)	科学技术研究院神奈川		
[标]发明人	北森武彦 渡慶次学 佐藤記一		
发明人	北森 武彦 渡慶次 学 佐藤 記一		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 G01N25/16 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	B01L3/502753 B01L2200/0668 B01L2300/0816 B01L2300/0867 G01N33/54346 G01N33/54366 G01N33/54386		
FI分类号	G01N33/53.T G01N25/16.C G01N37/00.101		
代理人(译)	西泽俊夫		
优先权	2002016203 2002-01-24 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种酶免疫测定芯片，其具有作为微通道的反应液导入流路部分，反应流路部分和检测流路部分，它们依次连续地设置在基板上，包括用于支撑珠体的安装部分抗体和在反应流动通道部分的微通道中形成的珠体流动停止部分，其中可以通过使用芯片分析流过流动停止部分的酶反应产物。

