

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4302735号
(P4302735)

(45) 発行日 平成21年7月29日(2009.7.29)

(24) 登録日 平成21年5月1日(2009.5.1)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 G
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 21/35 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 9 5
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 37/00	

請求項の数 20 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-512864 (P2006-512864)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(86) (22) 出願日	平成17年4月21日(2005.4.21)	(74) 代理人	100097733 弁理士 北川 治
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/008312	(72) 発明者	宇理須 恒雄 日本国愛知県岡崎市岡町西神馬崎南側1-25
(87) 国際公開番号	W02005/106472	(72) 発明者	鈴木 光一 日本国愛知県岡崎市電美南2-4-1 電美ヶ岡公務員宿舎2-54
(87) 国際公開日	平成17年11月10日(2005.11.10)		
審査請求日	平成18年10月5日(2006.10.5)	審査官	白形 由美子
(31) 優先権主張番号	特願2004-133877 (P2004-133877)		
(32) 優先日	平成16年4月28日(2004.4.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオチップの製造方法、バイオチップ、バイオチップ解析装置、バイオチップ解析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 固体ベース上に金属層を形成し、(2) 前記金属層上に蒸着、スパッタリング又は化学気相堆積(CVD)法によって非金属材料を堆積させた後、アニーリングを行って赤外光波長より薄い膜厚を有すると共に表面の平坦度が高低差5nm以下である非金属材料製の活性層を形成し、(3) 次いで前記活性層の表面にプローブを固定化する、バイオチップの製造方法。

【請求項2】

前記アニーリングを不活性ガス雰囲気下に300°C~800°Cの温度で行う、請求の範囲1項に記載のバイオチップの製造方法。

【請求項3】

前記非金属材料として、半導体材料又は電気絶縁性材料を用いる、請求の範囲1項又は2項に記載のバイオチップの製造方法。

【請求項4】

固体ベース上に金属層を有し、前記金属層上には赤外光波長より薄い膜厚を有すると共に表面の平坦度が高低差5nm以下である非金属材料製の活性層を有し、かつ、前記活性層の表面にはプローブを固定化した、バイオチップ。

【請求項5】

前記プローブが、タンパク質、ポリヌクレオチド、糖鎖あるいは細胞である、請求の範囲4項に記載のバイオチップ。

【請求項 6】

前記活性層が半導体材料又は電気絶縁性材料からなる、請求の範囲 4 項又は 5 項に記載のバイオチップ。

【請求項 7】

前記活性層が、p 偏光の赤外光使用対応型においては 200 nm 以下の膜厚であり、s 偏光の赤外光使用対応型においては 600 nm 以上の膜厚である、請求の範囲 4 項～6 項のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項 8】

前記活性層の表層部には反応基を持つ修飾層が構成され、この反応基との化学的結合によってプローブが固定化されている、請求の範囲 4 項～7 項のいずれかに記載のバイオチップ。

10

【請求項 9】

前記プローブがタンパク質である場合において、前記活性層の表面に脂質二重膜が構成され、この脂質二重膜に埋設された状態でプローブが固定化されている、請求の範囲 4 項～8 項のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項 10】

前記活性層上には、更に、液溜部形成用のスペースをくり抜いたスペーサー層を設けた、請求の範囲 4 項～9 項のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項 11】

前記スペーサー層が 0.2～100 μm の範囲内の一定の厚さである、請求の範囲 10 項に記載のバイオチップ。

20

【請求項 12】

請求の範囲 4 項～11 項のいずれかに記載のバイオチップと、このバイオチップに対して被検物質を含む試料液を供給する通液手段と、前記バイオチップに赤外光を入射すると共にその反射赤外光を検出する光学系とを含む、バイオチップ解析装置。

【請求項 13】

前記光学系が、更に、バイオチップ上に設置されるプリズムを含む、請求の範囲 12 項に記載のバイオチップ解析装置。

【請求項 14】

前記バイオチップが、実質的に真空状態を実現できる空間に設置されている、請求の範囲 12 項又は 13 項に記載のバイオチップ解析装置。

30

【請求項 15】

前記通液手段が、スペーサー層を設けたバイオチップにおける液溜部と、この液溜部に対して試料液を流入及び流出させる通液路を設けた通液構造体とによって構成されている、請求の範囲 12 項～14 項のいずれかに記載のバイオチップ解析装置。

【請求項 16】

請求の範囲 12 項～15 項のいずれかに記載のバイオチップ解析装置を用いて、少なくとも以下の工程を行う、バイオチップ解析方法。

(1) 未だ被検物質と接触していないバイオチップに対して前記光学系により赤外光を入射し、その反射赤外光を赤外反射吸収スペクトルのバックグラウンドとして測定する工程

40

(2) バイオチップに対して試料液を供給して、試料液中の被検物質をプローブ接触させて吸着させた後、バイオチップに対して赤外光を入射し、その反射赤外光を赤外反射吸収スペクトルのシグナルとして測定する工程。

(3) 前記シグナルとバックグラウンドとの比のスペクトルを求め、これを被検物質の赤外反射吸収スペクトルとして被検物質を同定する工程。

【請求項 17】

前記(1)及び(2)の赤外光の入射と反射赤外光の集光とを、前記プリズムを經由して行う、請求の範囲 16 項に記載のバイオチップ解析方法。

【請求項 18】

50

前記バイオチップに対する赤外光の入射における入射角度を60°以上の斜入射に設定する、請求の範囲16項又は17項に記載のバイオチップ解析方法。

【請求項19】

前記(2)の試料液の供給が、スぺーサー層を設けたバイオチップにおける液溜部に対して行われる場合において、液溜部に入射されてバイオチップにより反射された赤外光を、更に液溜部に導いてバイオチップにより反射させる過程を少なくとも一回繰り返させる、請求の範囲16項～18項のいずれかに記載のバイオチップ解析方法。

【請求項20】

前記反射赤外光を更に液溜部に導く手段が、バイオチップ上に設置されたプリズムである、請求の範囲19項に記載のバイオチップ解析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、試料中における被検物質の存否を検出するためのバイオチップに関する。更に詳しくは本発明は、バイオチップの新規な製造方法と、この方法により製造される優れたバイオチップと、このようなバイオチップを組み込んで成立するバイオチップ解析装置と、このバイオチップ解析装置を利用するバイオチップ解析方法とに関する。

本発明において、「バイオチップ」としては、タンパク質チップ、核酸チップ(DNAチップ)、細胞チップ等が代表的に例示される。

【背景技術】

従来、例えばタンパク質チップ(特定のタンパク質に反応する被検物質の存否を確認するためのチップ)の解析方法としては、タンパク質チップ表面のタンパク質と被検物質との反応によるタンパク質チップ表面の物性値の変化を参考にする表面プラズモン共鳴法(SPR: Surface Plasmon Resonance)や、被検物質との反応の結果としての蛍光や放射線の放出を検出する酵素免疫測定法(ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)等が知られている。下記の文献1には、表面プラズモン共鳴法の一例が記載されている。

〔文献1〕「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験方法」 永田和宏, 半田宏 編集、シュプリンガー・フェアラーク東京(株)

しかしながら、上記した従来のタンパク質チップにおける呈色反応や化学反応を利用する検出法等は、その全プロセスを遂行するためには手数がかかり、又、大量に検査することも困難であった。

更に上記の表面プラズモン共鳴法や酵素免疫測定法においては、プローブタンパク質と被検物質とが吸着したか否かを判定できるが、タンパク質の分子構造等は調べることができないため、吸着さえ起これば、本来は検出対象でない反応まで検出してしまう。そのために検出や測定の精度が悪いと言う問題があった。又、これらの方法でも、その全プロセスを遂行するためには多くの手順と大がかりな装置システムを必要とし、コスト高であった。

そこで、赤外分光解析等の光学的技術を利用した解析が可能ないように構成されたタンパク質チップあるいはバイオチップが注目される。例えば、下記の文献2には、フーリエ変換反射赤外分光法による抗体チップの例が開示されている。この抗体チップにおいては、表面処理した金コートのガラススライド上に、自己組織化単分子膜(SAM: self assembled monolayer)を形成させ、その上に特定の抗体を固定化している。

〔文献2〕日本化学会講演予稿集 第84巻 第1号(2004), A-7「簡易診断を目指した次世代チップの開発」 竹中繁織著

更に下記の文献3にも類似の分子アレイの開示がある。この分子アレイにおいては、基板に固定化された各種ペプチドを生体試料中のタンパク質と相互作用させ、その後、顕微フーリエ変換赤外分光測定装置にて、カルボニル基の赤外吸収を指針にして検出が可能である旨の記載が見られる。又、例えば、金をコートしたガラス基板等へ、チオール基と金との結合を利用してタンパク質や核酸等を固定化することも可能である旨の記載がある。

10

20

30

40

50

〔文献3〕特開2004-45390号公報

「分光法を利用した分子アレイによる検体の分析方法」

上記の文献2及び文献3に記載の技術は、金の表面にチオール系分子の自己組織化単分子膜を容易に堆積することができる点を利用している。しかしながら、最近、この種のバイオチップにおける1,2の大きな問題点がバイオチップの機能及び信頼性を低下させていることが、当業者間に周知されつつある。

第1の問題点は、金の表面にプローブとして固定化された機能性タンパク質の失活や、細胞活動の不活性化（又は死）である。即ち、活性な機能性タンパク質や生細胞が金に対して直接に接触することにより、失活したり細胞活動が不活性化したりして、プローブとして機能しなくなると言う問題である。

10

第2の問題点は更に本質的で、かつ克服することが困難である。即ち、本願発明者の経験によれば、従来チップ製造方法に従う限り、金の表面の平坦度をその高低差が数十nm以下であるように構成することが困難である。これに対して、例えば血清アルブミンの直径が約5nmであるように、通常の機能性タンパク質は10nm以下のサイズであることが多い。一般的なプローブ用の核酸は更にサイズが小さい。その結果、プローブが、そのサイズよりはるかに大きい表面凹凸を伴うベース上に固定化されるため、その固定時の配向や姿勢が著しくランダムになる。従って、検体に対するプローブの結合効率が低く、かつ、個々のチップ製品ごとに結合効率がばらつくと言う意味で、信頼性が低い。

そのような不具合は、特に近年、当該技術分野の専門家の間で注目されている。例えば、下記の文献4における第27頁の「1.2.1.7.2」の項の第2段落では、「・・測定対象として酵素を含むタンパク質を測定する場合、タンパク質は10nmのサイズであり、これをうまく捕捉できたとしても、チップのような板状の上で測定するのは非常に難しい。何故ならば、一般的なスライドガラスやプラスチックの表面は優に100nmを超える凹凸があり、この上で測定対象のタンパク質は凹み部分に入り込んでしまい、検出にばらつきが生じたり、感度も低下してしまうからである。」と記載されている。

20

〔文献4〕平成15年3月に財団法人 機械システム振興協会が発行（委託先：財団法人 バイオインダストリー協会）した「ナノバイオマシンの創製のための技術及び市場性に関する報告書」

【発明の開示】

本発明の目的は、上記の第1及び第2の問題点を解決できるバイオチップとその製造方法を提供することである。更に本発明の他の目的は、このようなバイオチップであって、汎用性があり、装置の小型化が可能で測定の手数が少なく、かつ測定の精度を確保できる各種のバイオチップと、それらのバイオチップの解析手段とを提供することである。

30

本願の第1発明は、(1)固体ベース上に金属層を形成し、(2)金属層上に蒸着、スパッタリング又は化学気相堆積(CVD)法によって非金属材料を堆積させた後、アニーリングを行って、赤外光波長より薄い膜厚を有すると共に表面の平坦度が高低差5nm以下である非金属材料製の活性層を形成し、(3)活性層の表面にプローブを固定化する、バイオチップの製造方法である。

上記の第1発明によれば、金属層上に非金属材料製の活性層を形成するので、プローブたるタンパク質や生細胞等は金等の金属に対して直接に接触することがなく、プローブたるタンパク質の失活や、プローブたる細胞の活動の不活性化を起こす恐れが少ない。

40

又、活性層の形成に当たり、まず金属層上に適宜な手段によって非金属材料を堆積させた後にアニーリングを行なうと、金属層及びその上層の活性層が極めて平坦に形成される。その平坦度は通常、高低差5nm以下である。特に、金属層上にアモルファスな非金属材料を堆積させた場合には、高低差1nm以下とすることもできる。このような活性層の表面に固定化されたプローブは、固定化面の凹凸による制約を殆ど受けることなく一定の配向や姿勢で固定化される。そのため、被検物質に対して高い効率で結合し、しかも個々のバイオチップごとの結合効率が安定すると言う意味で、信頼性が高い。

なお、金属層の構成材料も特段に限定されないが、例えばコバルト(Co)、コバルトシリサイド、白金、金、銀等やこれらの合金を用いることができる。特にコバルトが好ま

50

しい。コバルト以外の金属材料、例えば金や銀を用いる場合、金属層としての本来の機能には支障がないが、アニーリングの際に非金属材料層と剥離し易い場合がある。この場合、金属層と非金属材料層との間にCr等の第2の金属層を挿入することにより、剥離し易いと言う問題を改善することも考えられる。

本願の第2発明においては、前記第1発明に係るアニーリングを不活性ガス雰囲気下に300°C~800°Cの温度で行う。

即ち、アニーリングの条件としては、不活性ガスの雰囲気下、300°C~800°Cと言う条件が特に好ましい。アニーリングを好氣的な条件下で行うと、活性層の表面(固定化面)により大きな凹凸を発生し易くなることが懸念される。アニーリングを300°C未満の条件で行うと、金属層や活性層(非金属材料層)が脆弱となり、その後の化学処理工程で剥離し易くなることが懸念される。一方、アニーリングを800°Cを超える条件で行うと、金属層や活性層の破壊が懸念される。

本願の第3発明においては、前記第1発明又は第2発明に係る非金属材料として半導体材料又は電気絶縁性材料を用いる。

活性層を構成する非金属材料(好ましくは、アモルファスな非金属材料)の種類は限定されないが、プローブの失活防止、プローブ固定のための化学処理のし易さ、活性層自体に化学薬品への耐性が要求される点、等の理由から、半導体材料又は電気絶縁性材料を用いることが好ましい。

本願の第4発明は、固体ベース上に金属層を有し、金属層上には赤外光波長より薄い膜厚を有すると共に表面の平坦度が高低差5nm以下である非金属材料製の活性層を有し、かつ活性層の表面にはプローブを固定化した、バイオチップである。

第4発明のバイオチップは、第1発明に関して上記したように、金属層上に非金属材料製の活性層を持つことによって、プローブたるタンパク質の失活や、プローブたる細胞の活動の不活性化を有効に防止でき、又、活性層の表面が極めて平坦であるため、固定化されたプローブの被検物質に対する結合効率が高く、かつ個々のバイオチップにおける結合効率が一貫して信頼性が高い。

又、第4発明のバイオチップは、赤外反射吸収分光解析を行うチップであって、プローブが被検物質に結合する前後の赤外反射吸収スペクトルの対比から被検物質を同定することができる。従って、従来型の呈色反応や化学反応を利用するバイオチップに比較して、測定の手数が少なく簡易である。しかも、被検物質を同定できるために、検出や測定の精度が良い。

更に、活性層を赤外光波長よりも薄い膜厚、より好ましくは十分に薄い膜厚に形成し、かつその下層に金属層を埋め込み型に設けると、赤外光に対してチップが金属層の性質を示し、赤外反射吸収分光解析を有効に行うことができる。

このバイオチップはプリズムに比較して著しく安価に構成できる。従ってバイオチップを利用する赤外反射吸収分光解析装置の光学系に高価なプリズムを組み込むとしても、プリズムは1個あれば良く、安価なバイオチップを多数使用することで多くの被検物質解析を行うことができる。

本願の第5発明においては、前記第4発明に係るプローブが、タンパク質、ポリヌクレオチド、糖鎖あるいは細胞である。

本発明のバイオチップとしては、第5発明のように、タンパク質チップ、核酸チップ(DNAチップ)、糖鎖チップ及び細胞チップが好ましく例示される。この第5発明において、「タンパク質」の種類は限定されないが、抗原又は抗体であるタンパク質、レセプターであるタンパク質等が含まれ、より広義には、特定のリガンドと特異的に結合し得るタンパク質が含まれる。ここに「リガンド」とは、有機又は無機の各種の化学物質、タンパク質、癌細胞等の各種の細胞も含む概念である。ポリヌクレオチドとしては1本鎖に限定されないDNAやRNAが含まれる。細胞としては、特に生細胞が有用である。

本願の第6発明においては、前記第4発明又は第5発明に係る活性層が、半導体材料又は電気絶縁性材料からなる。

即ち、活性層の構成材料は、非金属材料である限りにおいて特段に限定されないが、第

10

20

30

40

50

3 発明に関して前記した理由から、半導体材料又は電気絶縁性材料が特に好ましい。

本願の第7発明においては、前記第4発明～第6発明のいずれかに係る活性層が、p偏光の赤外光使用対応型においては200nm以下の膜厚であり、s偏光の赤外光使用対応型においては600nm以上の膜厚である。

活性層は赤外光波長よりも薄い膜厚とされるが、より具体的には、入射光と反射光の位相シフトがタンパク質の固定化された表面でゼロ又は2に近い値で検出感度が高くなるという理由から、p偏光の赤外光使用に対応するタンパク質チップにおいては200nm以下の膜厚、s偏光の赤外光使用に対応するタンパク質チップにおいては600nm以上の膜厚であることが好ましい。

又、異なる見地から言えば、本発明のバイオチップは活性層の厚みを600nm以上とすることは容易であるため、後述の実施例3で具体的に述べるように、s偏光でのスペクトル測定も可能となり、タンパク質等のより精度の高い同定が可能となる。

本願の第8発明においては、前記第4発明～第7発明のいずれかに係る活性層の表層部には反応基を持つ修飾層が構成され、この反応基との化学的結合によってプローブが固定化されている。

活性層の表面にプローブタンパク質を固定化する方法は必ずしも限定されないが、一つの好ましい方法が化学修飾法である。即ち、活性層の表面に反応基を持つ修飾層を構成し、この反応基との化学的結合によってプローブタンパク質を固定化する方法である。

本願の第9発明においては、前記第4発明～第8発明のいずれかに係るプローブがタンパク質である場合において、前記活性層の表面に脂質二重膜が構成され、この脂質二重膜に埋設された状態でプローブが固定化されている。

活性層の表面にプローブタンパク質を固定化する好ましい方法として、活性層の表面に脂質二重膜を構成し、この脂質二重膜に埋設された状態でプローブタンパク質を固定化する方法も挙げられる。この方法による場合、プローブタンパク質の疎水性領域を脂質膜貫通状態で脂質二重膜に埋設させることにより、固定化されたプローブタンパク質の配向を制御することが可能である。この方法は、特に、構造が複雑で失活し易いイオンチャンネルや受容体タンパク質等の脂質膜貫通型のタンパク質を固定化するのに適している。

このような脂質二重膜を利用する方法は、プローブタンパク質を一定した配向又は姿勢で固定化できる優れた方法として従来から提案されている。しかし、従来のタンパク質チップにおいては、前記したように、脂質二重膜のベース層の表面が大きな凹凸を伴うため、脂質二重膜も必然的に大きな凹凸を伴って形成される。このような脂質二重膜では、プローブタンパク質を一定した配向あるいは姿勢で固定化することは困難である。

本願の第10発明においては、前記第4発明～第9発明のいずれかに係る活性層上に、更に液溜部形成用のスペースをくり抜いたスペーサー層を設けた。

活性層上に更に液溜部形成用のスペースをくり抜いたスペーサー層を設けたバイオチップを用いる場合、被検物質(例えば、タンパク質)を変性し難い試料液の状態に導入してプローブと接触させ、かつ赤外反射吸収分光解析に供することができる。

本願の第11発明においては、前記第10発明に係るスペーサー層が0.2～100μmの範囲内の一定の厚さである。

スペーサー層の厚さ(液溜部の深さ)は0.2～100μmの範囲内、より好ましくは0.2～10μmの範囲内であることが好ましい。厚さが100μmを超えると赤外光が液溜部の水に吸収され、タンパク質にとって重要な1700cm⁻¹付近のノイズが大きくなって、測定が困難となる恐れがある。厚さが0.2μm未満であると、液溜部の試料液の流動に支障を来す恐れがある。

本願の第12発明は、第4発明～第11発明のいずれかに係るバイオチップと、このバイオチップに対して被検物質を含む試料液を供給する通液手段と、前記バイオチップに赤外光を入射すると共にその反射赤外光を検出する光学系とを含む、バイオチップ解析装置である。

第12発明のバイオチップ解析装置は、バイオチップと、通液手段と、光学系とからなるので、呈色反応や化学反応等を利用する場合のような面倒で高価な反応・分析系システ

10

20

30

40

50

ムを必要とせず、かつ、測定及び解析の結果を迅速に得ることができる。

本願の第13発明においては、前記第12発明に係る光学系が、更にバイオチップ上に設置されるプリズムを含む。

上記した第12発明のバイオチップ解析装置においては、詳しくは後述するように、バイオチップ上に設置されるプリズムを含むことが好ましい。

本願の第14発明においては、前記第12発明又は第13発明に係るバイオチップが、実質的に真空状態を実現できる空間に設置されている。

バイオチップを実質的な真空状態に設置することにより、大気中の水や炭酸ガス等の影響を受けることなく赤外吸収スペクトルを測定でき、より感度の高い測定が可能となる。また、物質による吸収が大きいためプリズム等を用いることができない、テラヘルツ領域等の数百 cm^{-1} 以下の低周波領域の分光も可能となる。

本願の第15発明においては、前記第12発明～第14発明のいずれかに係る通液手段が、スペーサー層を設けたバイオチップにおける液溜部と、この液溜部に対して試料液を流入及び流出させる通液路を設けた通液構造体とによって構成されている。

バイオチップ解析装置に設ける通液手段の構成は限定されないが、好ましくは、第15発明のように、バイオチップのスペーサー層により形成される液溜部と、液溜部に試料液を流入及び流出させる通液路を設けた通液構造体とによって構成される。

本願の第16発明は、第12発明～第15発明のいずれかに係るバイオチップ解析装置を用いて、少なくとも以下の(1)～(3)の工程を行う、バイオチップ解析方法である。

(1) 未だ被検物質と接触していないバイオチップに対して前記光学系により赤外光を入射し、その反射赤外光を赤外反射吸収スペクトルのバックグラウンドとして測定する工程。

(2) バイオチップに対して試料液を供給し、試料液中の被検物質をプローブと接触させて吸着させた後、バイオチップに対して赤外光を入射し、その反射赤外光を赤外反射吸収スペクトルのシグナルとして測定する工程。

(3) 前記シグナルとバックグラウンドとの比のスペクトルを求め、これを被検物質の赤外反射吸収スペクトルとして被検物質を同定する工程。

第16発明のバイオチップ解析方法は、(1)のバックグラウンドとしての赤外反射吸収スペクトルと、(2)のシグナルとしての赤外反射吸収スペクトルとの比のスペクトルから被検物質を同定するので、その解析が容易かつ迅速であり、検出対象でない吸着反応は排除できるので解析が正確である。

本願の第17発明においては、前記第16発明に係る(1)及び(2)の赤外光の入射と反射赤外光の集光とを、前記プリズムを經由して行う。

上記したバイオチップ解析方法において、測定対象に対する赤外光の入射と反射赤外光の集光とを、プリズムを經由して行うことが好ましい。

本願の第18発明においては、前記第16発明又は第17発明に係るバイオチップに対する赤外光の入射における入射角度を、 60° 以上の斜入射に設定する。

バイオチップに対する赤外光の入射角度は、 60° 以上の斜入射に設定することが好ましい。プリズムの使用において入射角度が過剰に大きいと、赤外光がプリズム底面で反射してしまい、バイオチップに到達する赤外光が弱くなって、感度が低下する恐れがある。

本願の第19発明においては、前記第16発明～第18発明のいずれかに係る(2)の試料液の供給がスペーサー層を設けたバイオチップにおける液溜部に対して行われる場合において、液溜部に入射されてバイオチップにより反射された赤外光を、更に液溜部に導いてバイオチップにより反射させる過程を少なくとも一回繰り返させる。

第19発明のように赤外光反射を繰り返させることにより、吸収スペクトルが強くなって測定感度を高めることができる。

本願の第20発明においては、前記第19発明に係る反射赤外光を更に液溜部に導く手段が、バイオチップ上に設置されたプリズムである。

上記した第19発明のような赤外光反射の繰り返しは、バイオチップ上に設置されたプ

10

20

30

40

50

リズムによって行うことができる。

【図面の簡単な説明】

第1図はバイオチップの例示としてのタンパク質チップの実施形態を示す。第2図は実施例で製造したバイオチップの活性層表面の凹凸の程度を示す。第3図はアビジンの赤外吸収スペクトル図を示す。第4図はアビジンを固定化したバイオチップの表面の原子間力顕微鏡像を示す。第5図及び第6図はバイオチップの赤外反射吸収スペクトル測定の感度の活性層厚みに対する依存性を示す。第7図は試料ホルダーの実施形態を示す。第8図は第7図の平面図である。第9図はバイオチップ解析装置の実施形態を示す。第10図は第9図の平面図である。第11図はバイオチップの他の実施形態を示す。第12図はバイオチップ解析方法の好ましい実施形態を示す。

10

発明を実施するための最良の形態及び実施例

次に本願の第1発明～第20発明の実施形態及び実施例を、その最良の実施形態及び実施例を含めて説明する。以下において単に「本発明」と言う時は第1発明～第20発明の内の該当する発明群を一括して指している。

〔実施形態1：タンパク質チップ〕

本発明に係るタンパク質チップの一例を第1図に基づいて説明する。このタンパク質チップにおいては、固体ベース1上に金属層2を設け、この金属層2上に非金属材料からなる薄膜の活性層3を設けている。この活性層3の表層部には後述の修飾層4が形成され、この修飾層4に対して、被検物質（例えば、被検タンパク質）6を吸着し得るプローブタンパク質5が固定化されている。このタンパク質チップは、以上の構成により、赤外反射吸収分光解析用として利用できる点に大きな特徴がある。

20

固体ベースの形状及びサイズは限定されない。固体ベースの構成材料も任意に選択することができるが、例えばSi、SiO₂、石英、チタニア等のセラミックスが好ましく例示される。

金属層の構成材料も特段に限定されないが、例えばコバルト、クロム、コバルトシリサイド、白金、金、銀等を用い、又はこれらを組み合わせて用い、あるいはこれらの合金を用いることができる。金属層の厚さは任意に設定すれば良いが、例えば0.5～1μm程度とすることができる。固体ベース上に金属層を設けるにあたっては、例えば公知の蒸着法やスパッタリングあるいは化学気相堆積(CVD)等の方法を利用することができる。

活性層は、赤外光波長よりも薄い膜厚、より好ましくは赤外光波長よりも十分に薄い膜厚とされる。使用する赤外光に対応して活性層の好適な膜厚が異なり、p偏光の赤外光使用対応型においては200nm以下の膜厚が、s偏光の赤外光使用対応型においては600nm以上の膜厚が、それぞれ好ましい。

30

活性層を構成する非金属材料の種類は特段に限定されないが、より好ましくは、半導体材料又は電気絶縁性材料が用いられる。半導体材料としては、ケイ素、ガリウム砒素、ゲルマニウム等が例示される。電気絶縁性材料としては、シリカ、アルミナ等の各種セラミックス、高分子材料等が例示される。金属層上に活性層を設けるにあたっては、例えば蒸着、スパッタリング、CVD等の方法を利用できる。活性層は、その表面が高度に平坦であること、例えば高低差が5nm以下の平坦度であることが好ましい。

活性層の表面にはプローブタンパク質を固定化する役割があり、そのために、例えば活性層の表層部を前記のように反応基を持つ修飾層としたり、活性層の表面に自己組織化した有機単分子膜を形成したりすることができる。

40

上記の修飾層を構成する場合、活性層の表層部に、公知の各種の化学修飾法によってカルボキシル基やアミノ基等の反応基を付加する。このような化学修飾法は種々知られているが、個々の具体的な方法の記載は省略する。これらの反応基との化学結合により、プローブタンパク質を固定化することができる。

修飾層において、反応基に対して一旦アビジン(avidin)を結合させ、プローブタンパク質にはビオチンを導入しておいて、アビジン-ビオチン結合によってプローブタンパク質を固定化することもできる。このような手法自体はタンパク質チップ等において公知であるが、この方法による場合、プロセスは複雑化するが、プローブタンパク質の変

50

性を防止する効果が大きく、更に固定化されたプローブタンパク質の配向を制御して被検タンパク質に対する吸着効果を鋭敏にすることができる。

活性層の表面に上記の「自己組織化した有機単分子膜」を構成する場合として、脂質二重膜を構成する場合は好ましく例示される。このような場合における脂質二重膜の形成方法としては、例えば下記の「文献5」に記載された方法を例示することができる。

〔文献5〕 Discrete membrane arrays Y. Cheng, S. D. Ogier, R. J. Ushby, S. D. Evans, Molecular Biotechnology 74 (2000) 159 - 174

この方法による場合も、プロセスは複雑化するが、プローブタンパク質の変性を防止する効果が大きく、更に固定化されたプローブタンパク質の配向を制御して被検物質に対する吸着効果を鋭敏にすることができる。

【実施例1】

次に、本発明者が特に工夫した化学修飾法（金属層及び活性層の構成方法）によるバイオチップ製造の実施例を述べる。

即ち、（1）固体ベース上に金属層を形成し、（2）金属層上に蒸着、スパッタリング又は化学気相堆積（CVD）法によって非金属材料を堆積させた後、アニーリングを行って、赤外光波長より薄い膜厚を有すると共に表面の平坦度が高低差5nm以下である非金属材料製の活性層を形成し、（3）次いで活性層の表面にプローブを固定化する。プローブの固定化に当り、例えば活性層の表面にシランカップリング剤を反応させ、更に加水分解反応等を加えて、表面にカルボキシル基やアミノ基等の反応基を付加した修飾層とすることができる。

上記のようにして得られる活性層の表面は、平坦度が高低差5nm以下である。金属層上にアモルファスな非金属材料を堆積させた場合、その平坦度を高低差1nm以下とすることも特段に困難ではない。このような活性層の表面に、適宜な方法でプローブを固定化することができる。

この実施例の具体的な一例として、次のケースを挙げる事ができる。即ち、ケイ素質の固体ベースの表面に、スパッタリングによって、コバルトを20～100nm程度の厚さに堆積させ、その上にスパッタリングによってアモルファスSiO₂活性層を100～250nmの厚さに堆積させ、これを窒素雰囲気下、300～800℃にて30分～1時間アニーリングする。こうして得られた活性層の一例について、表面の凹凸の程度を第2図に示すが、高低差が優に1nm以下であって、驚異的な平坦度である。

更に、実施例1により製造したバイオチップ（活性層の表面をカルボキシル化した後、そのカルボキシル基に対するアミノ基の反応により、プローブタンパク質としてのアビジンを固定化したもの）について、第3図にアビジンの赤外吸収スペクトル図を示す。第3図において、スペクトル線a, bは本実施例に係る測定結果である。スペクトル線c, dは、スペクトル線a, bの場合のような化学修飾によらず、単なる物理吸着によりアビジンを吸着させた比較例に係る測定結果である。そして、スペクトル線a, cは垂直偏光に対する赤外吸収スペクトル、スペクトル線b, dは水平偏光に対する赤外吸収スペクトルである。図中、縦方向の「Absorbance」は、物質による光吸収の強さの程度を表す単位であるアブソーバンスのスケールを表している。

第3図において、スペクトル線c, dの間にはピークのズレが見られないが、スペクトル線a, bの間には明らかなピークのズレが認められる。このことは、偏光によりスペクトルのピークがシフトしていること、即ち、固定化された多数のプローブタンパク質の向きが揃っていることを意味する。

更に、アビジンを固定化した上記バイオチップの表面の原子間力顕微鏡像を第4図に示す。数ナノメートルの大きさを持つアビジンが、1分子ずつ、黒地の中に白く見える斑点として撮像されている。この図は、本発明者が知る限り、赤外反射吸収スペクトルを測定できる基板上で測定されたタンパク質1分子の世界で最初の像である。

【実施例2】

上記の実施例1において述べた活性層表面のカルボキシル化に関して、以下の第1工程

10

20

30

40

50

及び第2工程からなる方法が特に優れている。

第1工程：実施例1のアニーリングを完了したチップを、0.5 mM / リッターのカルボメトキシエチルトリクロロシランのトルエン溶液に - 8 ° C で約1時間浸漬し、次いでトルエン、アセトン、メタノール、純水で順次洗浄する。

第2工程：次に、濃塩酸溶液に3 ~ 8時間浸漬し、加水分解を行う。

【実施例3】

本願の第7発明に関し、上記の実施例1のようにSiO₂の活性層を形成したバイオチップについて、赤外反射吸収スペクトル測定の感度：R/Rの活性層厚みに対する依存性を、1000 cm⁻¹、2000 cm⁻¹、3000 cm⁻¹の3種類の波長について計算した結果を第5図及び第6図に示す。第5図はp偏光の赤外光の場合であり、第6図はs偏光の赤外光の場合である。第5図及び第6図において、横軸の数字はnm単位で示す活性層の厚みである。

10

第5図から明らかのように、p偏光の場合、活性層の厚みが約200 nm以下である限り、全ての波長に対して高い感度での測定が可能である。一方、第6図から明らかのように、s偏光の場合、活性層の厚みが薄いと感度はゼロであり、これを厚くして行くと、周期的に感度が高くなり、かつ、その感度のピークが波長ごとに異なる。しかし、一般的に、数百nm以上の厚みを100 nmの精度で制御することは困難であるため、およそ600 nm以上の厚みに設定すれば、厚みのバラツキのため、どの波長に対しても、s偏光の吸収が現れることが分かる。

即ち、従来の金基板の場合は、活性層にあたる自己組織化膜の厚みは、通常、数nm ~ 数十nmと薄いので、p偏光にしか感度がなく、s偏光での測定はできない。本発明の場合、活性層の厚みを600 nm以上とすることは容易であり、s偏光での測定も可能となるため、タンパク質等のより精度の高い同定が可能となる。

20

〔実施形態2：タンパク質チップ解析装置及びタンパク質チップ解析方法〕

本発明に係るタンパク質チップ解析装置は、少なくとも、上記したタンパク質チップと、このタンパク質チップに対して被検物質を含む試料液を供給する通液手段と、前記タンパク質チップに赤外光を入射すると共にその反射赤外光を検出する光学系とを含んで構成される。

上記のタンパク質チップが実質的に真空状態を実現できる空間に設置されていることが好ましい。上記の光学系には、タンパク質チップ上に設置されるプリズムを含むことが好ましいが、プリズムに代えて反射鏡を用いたり、グラスファイバー等の導光管を使用することも可能である。更に、上記の通液手段が、スパーサー層を設けたタンパク質チップにおける液溜部と、この液溜部に対して試料液を流入及び流出させる通液路を設けた通液構造体とによって構成されていることが好ましい。言うまでもないが、通液手段の繋ぎ部等の構成においては、真空シールの確保に十分に注意する必要がある。

30

本発明に係るタンパク質チップ解析方法は、上記のタンパク質チップ解析装置を用い、少なくとも以下の工程を行うことにより行う。

(1) 未だ被検物質と接触していないタンパク質チップに対して前記光学系により赤外光を入射し、その反射赤外光を赤外反射吸収スペクトルのバックグラウンドとして測定する工程。この工程では、液溜部には試料液ではない適宜な液体を流通させて行う。このような液体としては、プローブタンパク質を変性させないように、緩衝液が特に好ましい。緩衝液は、例えばHEPES等の多種の緩衝液から任意に選択できるし、これらにCaCl₂、NaCl又はNaOH等を加えてpHをコントロールしたのも使用できる。

40

(2) タンパク質チップに対して試料液を供給して、試料液中の被検物質をプローブタンパク質に接触させて吸着させた後、タンパク質チップに対して赤外光を入射し、その反射赤外光を赤外反射吸収スペクトルのシグナルとして測定する工程。

(3) 前記シグナルとバックグラウンドとの比のスペクトルを求め、これを被検物質の赤外反射吸収スペクトルとして被検物質を同定する工程。

赤外反射吸収スペクトルのバックグラウンドとシグナルとを測定して比のスペクトルを求め、これから被検物質を同定する方法自体は、赤外スペクトルの測定において極めて一

50

般的に用いられる手法である。

上記の(1)及び(2)における赤外光の入射と反射赤外光の集光とはプリズムを経由して行うことが特に好ましく、タンパク質チップに対する赤外光の入射角度は 60° 以上の斜入射に設定することが特に好ましく、更には、タンパク質チップの液溜部に入射されてタンパク質チップにより反射された赤外光を、更に液溜部に導いてタンパク質チップにより反射させる過程を少なくとも一回繰り返させることが、特に好ましい。

本発明に係るタンパク質チップ解析装置の一例を、第7図、第8図に基づいて説明する。第7図に示すように、タンパク質チップPを試料台11の所定の位置に載置して、その周囲を取り囲むようにしてO-リング10を置く。O-リング10は弾性変形が可能な材料からなり、タンパク質チップPよりも厚みが大きい。タンパク質チップP上には、赤外光透過性のプリズム7を重ねている。

10

このプリズム7は、押さえ金具8を用いることにより、O-リング10を圧縮した状態でタンパク質チップPの上面に密着されている。従って、タンパク質チップPは、試料台11と、プリズム7と、O-リング10とによって外界から気密に遮断することができる。

タンパク質チップPの活性層上には、第8図において破線で示す形状にスペースをくり抜いたスペーサー層を設けており、このスペーサー層によって、タンパク質チップPの活性層上には液溜部26が形成されている。そして、プリズム7と押さえ金具8には、液溜部26と連通した通液路9が設けられている。これらによって上記の通液手段が構成されており、この通液手段によって、タンパク質チップPの液溜部26に対して被検物質を含む試料液(あるいは緩衝液)を流入させ、及び流出させることができる。

20

このような通液手段の構成により、タンパク質の反応系が狭い空間に閉じ込められた、いわゆるマイクロチャネルの構成となる。従って、測定に要する試料液が極めて少量で済むと言う利点が得られることに加えて、更に重要なことに、タンパク質の変性を防止できる溶液系においてタンパク質の分子認識反応を行い、かつ赤外吸収スペクトルを測定することができる。

試料台11は支台14上に支柱13によって支持され、かつ試料台11の下部には、試料台11と共にタンパク質チップPの温度を制御するためのペルチエ素子12が取り付けられている。第7図及び第8図に示した装置の全体を、以後、試料ホルダーSHと呼ぶ。

第9図及び第10図に示すように、試料ホルダーSHを主真空槽15内に設置する。そして、図示省略のフーリエ変換赤外分光装置(F T I R)により出力される赤外光ビーム(IR)を、ダクト18を通して、集光ミラー16によりタンパク質チップPの表面に入射させる。19は排気ダクトである。

30

ここで、赤外光ビームの入射角度は、感度に大きく影響する重要なパラメーターである。例えば、 800 cm^{-1} 付近の低波数まで透明な BaF_2 のプリズムを用いたとすると、水の吸収ピークの位置の波長 $6\text{ }\mu\text{m}$ において水及び BaF_2 の屈折率はそれぞれ1.25と1.45であるので、プリズム底面への入射角度を55度、57度あるいは58度とすると、タンパク質チップ表面への赤外光ビームの入射角度はそれぞれ71.9度、76.6度、79.6度となる。

金属層を使用した赤外反射吸収分光では入射角度 $80\sim 85$ 度が望まれることを考慮すると、プリズム底面への赤外光ビームの入射角度(第4図の)を、58度程度とすることが望ましい。入射角度が過剰に大きいと、赤外光がプリズム底面で反射してしまい、タンパク質チップに到達する赤外光が弱くなって、感度が低下する恐れがある。例えば が58度の場合、反射ロス(波長 $6\text{ }\mu\text{m}$ で約19%(計算値))である。

40

CaF_2 が BaF_2 よりも水に対する耐性が強いことから、測定領域の下限が 1000 cm^{-1} 付近となることが不都合でなければ、 CaF_2 をプリズム材料として用いることもある。入射角も BaF_2 の場合と同様に計算して設定される。例えば、プリズム底面への赤外光ビームの入射角度については、 CaF_2 の屈折率は BaF_2 と比べやや小さいので、71度となる。この場合、水中入射角度は約83度となる。

集光ミラー16は、タンパク質チップPの表面で赤外光が集光されるように焦点距離を

50

設定しておく。必要に応じて主真空槽 15 の真空状態をダクト 18 から遮断できるように、BaF₂ の窓板 17 を取り付けても良い。

タンパク質チップ P 上で反射した赤外光は、ミラー槽 22 に設置された集光ミラー 23 によって、検出器 24 に集光される。検出器 24 としては、例えば水銀カドミウムテルライド検出器等が用いられる。

第 9 図を平面視した第 10 図に示すように、エアロックチャンバー 20 を気密バルブ 21 を介して主真空槽 15 に接続して、試料ホルダー S H が、主真空槽 15 とエアロックチャンバー 20 間で往復移動できる機構を装置しても良い。例えば、試料ホルダー S H について組み立てやタンパク質チップ P の取り替え等を行いたい場合、試料ホルダー S H をエアロックチャンバー 20 に移動させて気密バルブ 21 を閉鎖した後に、エアロックチャンバー 20 の真空を解除した所要の作業を行い、次いでエアロックチャンバー 20 を密閉して気密バルブ 21 を開き、試料ホルダー S H を主真空槽 15 に戻してから脱気するのである。このような手順を踏むことにより、主真空槽 15 を必要な真空度に到達させるまでの所要時間を大幅に短縮することができる。

〔実施形態 3：タンパク質チップの変更例〕

第 11 図においては、上半部にタンパク質チップの平面図を示し、下半部にその正面図を対応して示す。第 11 図に示すタンパク質チップにおいては、前記第 1 図に示す構成のタンパク質チップ P の上面（即ち、活性層上）に、破線で示す形状にスペースをくり抜いたスペーサー層 25 を設け、このスペーサー層 25 によって、タンパク質チップ P の活性層上には液溜部 26 が形成されている。

第 11 図に示すタンパク質チップの使用方法及び使用上の利点については、第 7 図及び第 8 図に関して前記したところであるが、そのような使用においては、「第 9 発明の効果」欄で前記した理由により、スペーサー層 25（ひいては、液溜部 26）の厚さが重要なパラメータである。

仮に、スペーサー層 25 の厚さを 1 μm とし、液溜部 26 における液流の幅（第 11 図の幅 L）を 10 mm とし、液溜部 26 中の水による赤外光の吸収を評価して見る。水の吸収ピークの位置の波長 6 μm では吸収係数 $= 0.2742 \times 10^4$ なので、水の吸収による損失は、プリズム面への赤外光ビームの入射角度を 55 度、57 度あるいは 58 度とすると、タンパク質チップ表面への赤外光ビームの入射角度はそれぞれ 71.9 度、76.6 度、79.6 度となるので、損失はそれぞれ 83%、91%、95% となる。

前記第 7 図及び第 8 図で示した通液手段を構成する場合、より具体的には、試料液が接触するプリズムの底面や通液路等は、タンパク質が吸着し難いテフロン（登録商標）等でコーティングしておくことも重要である。又、タンパク質チップをマイクロチャンネルの構成にする点から、図示のような単純な通液路構造に限らず、合成や分析等の他機能を同時に付与した構造とすることも容易である。

〔実施形態 4：タンパク質チップの変更使用例〕

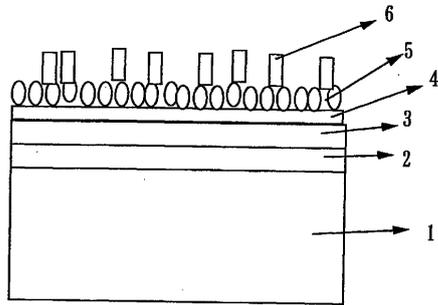
第 12 図に示す実施形態においては、タンパク質チップ P の液溜部に照射され反射された赤外光がプリズム 7 に戻り、プリズム 7 で全反射して再び液溜部中のタンパク質チップ P を照射し、タンパク質の赤外吸収スペクトルを複数回測定している。この方法により、測定感度を高めることができる。

【産業上の利用可能性】

本発明によって、赤外反射吸収分光解析に供するタンパク質チップと言う新たなカテゴリーの解析手段が提供される。又、このタンパク質チップを用いることにより、汎用的で構成の簡易なタンパク質チップ解析装置と、測定の手数が少なく測定精度の良いタンパク質チップ解析方法とが提供される。

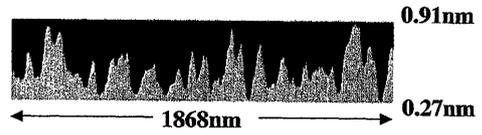
【 図 1 】

〔第1図〕



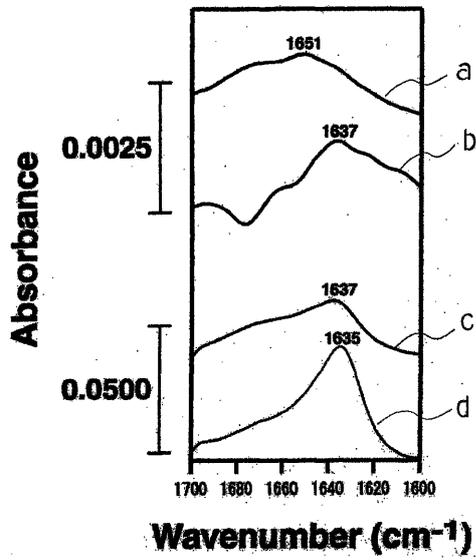
【 図 2 】

〔第2図〕



【 図 3 】

〔第3図〕



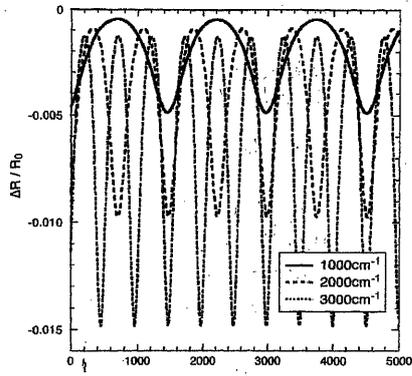
【 図 4 】

〔第4図〕



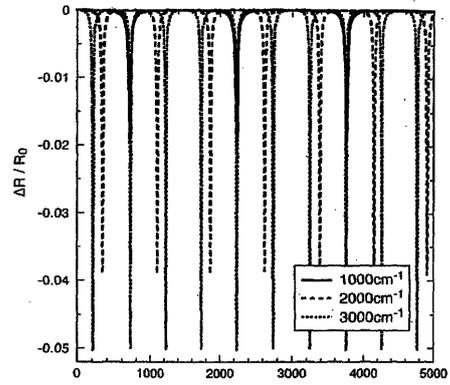
【 図 5 】

〔第5図〕



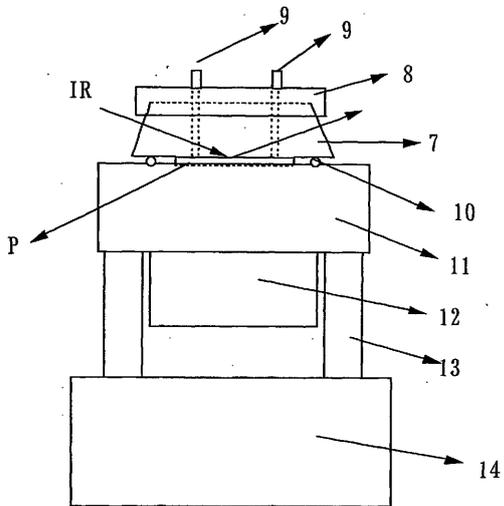
【 図 6 】

〔第6図〕



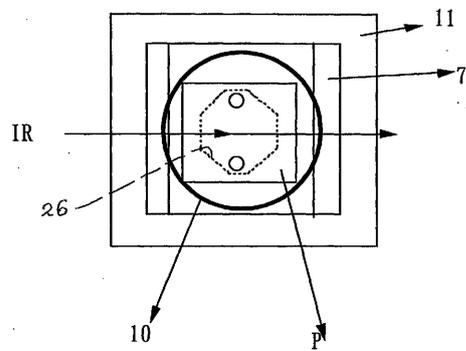
【 図 7 】

〔第7図〕



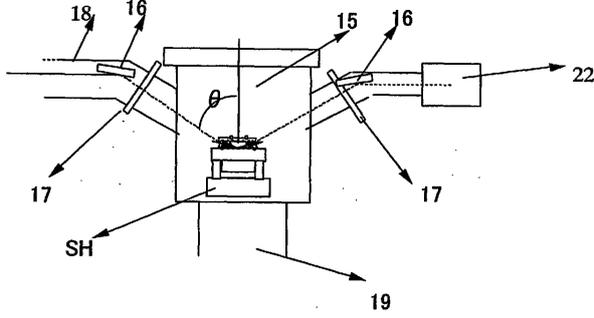
【 図 8 】

〔第8図〕



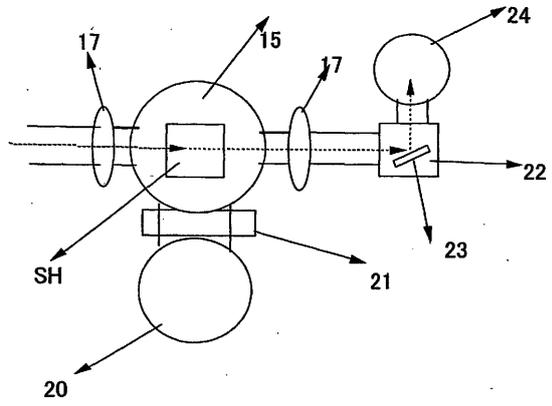
【図 9】

〔第9図〕



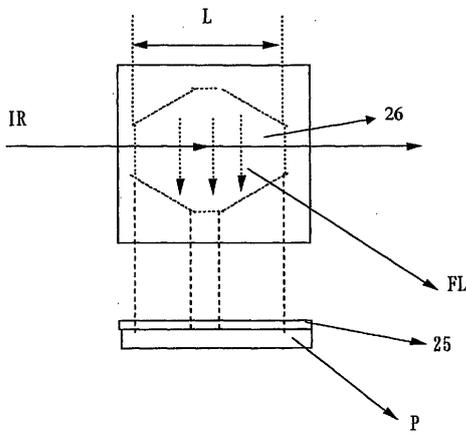
【図 10】

〔第10図〕



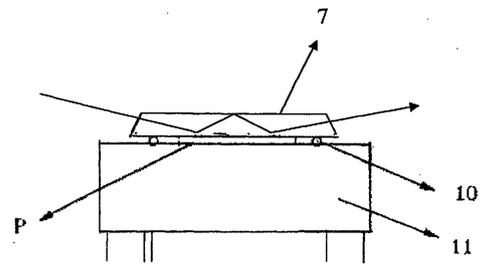
【図 11】

〔第11図〕



【図 12】

〔第12図〕



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I	
<i>C 1 2 M</i>	<i>1/00</i>	<i>(2006.01)</i>	G 0 1 N 21/35	Z
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2006.01)</i>	G 0 1 N 21/27	C
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/02</i>	<i>(2006.01)</i>	C 1 2 M 1/00	A
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/09</i>	<i>(2006.01)</i>	C 1 2 Q 1/68	A
			C 1 2 Q 1/02	
			C 1 2 N 15/00	F

(56) 参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 7 6 9 6 3 (U S , A 1)
特開 2 0 0 2 - 3 6 5 2 9 3 (J P , A)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-33/98
G01N 37/00
G01N 21/27
G01N 21/35