

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4570945号
(P4570945)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月20日(2010.8.20)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 35/10	(2006.01)	GO 1 N 35/06	A
BO 1 J 19/00	(2006.01)	BO 1 J 19/00	3 2 1
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	C 1 2 M 1/34	A

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2004-349583 (P2004-349583)
 (22) 出願日 平成16年12月2日(2004.12.2)
 (65) 公開番号 特開2006-162264 (P2006-162264A)
 (43) 公開日 平成18年6月22日(2006.6.22)
 審査請求日 平成19年5月28日(2007.5.28)

(73) 特許権者 504296024
 一般社団法人オンチップ・セロミクス・コ
 ンソーシアム
 東京都千代田区丸の内1-3-1
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100126354
 弁理士 藤田 尚
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 岡野 和宣
 東京都新宿区三栄町23-3-204

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 液滴操作装置及び操作方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

表面の一つが撥水性とされた絶縁性の基板と、
 該基板の撥水性の表面に形成された複数の親水性の液滴保持領域と、
 前記基板の前記親水性の液滴保持領域から延伸されて形成された親水性の液滴移動ライ
 ンと、

前記基板の前記親水性の液滴保持領域に液滴を形成する液滴形成装置と、
 前記基板の前記親水性の液滴保持領域に保持された液滴を選択的に荷電する荷電装置と

、
 前記荷電された液滴の電荷と同じ極性の電荷を作用させ、前記荷電された液滴の電荷と
 反発力を生じさせる操作棒と、
 を有する液滴操作装置であって、

前記基板の前記親水性の液滴保持領域の内の特定の液滴保持領域は液滴を荷電および除
 電できる構造であり、

前記基板の前記親水性の液滴保持領域に保持された液滴を選択的に荷電する荷電装置は
 、液滴の接する絶縁基板に前記液滴とは直接接しない静電的な第1の電極と、液滴に接す
 ることのできる溶液を保持するキャピラリーで該キャピラリー内液に直接接する構造の第
 2の電極からなり、液滴とキャピラリー内部の液を分極させることで前記液滴部分を荷電
 することを特徴とする液滴操作装置。

【請求項2】

前記基板の前記親水性の液滴保持領域の内の特定の液滴保持領域は液滴の荷電を除電できる構造は、前記液滴保持領域に設けられた電極が接地されたものである請求項 1 記載の液滴操作装置。

【請求項 3】

前記基板の下部に配置され、前記基板が載置されたとき、前記基板の前記親水性の液滴保持領域に設けられた電極を接地するスイッチボードを備える請求項 1 又は 2 記載の液滴操作装置。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の液滴操作装置を用いて、撥水性とされた絶縁性の基板上の親水性のパターン上に形成された複数の液滴を荷電し、該荷電された液滴に、該液滴と同じ極性の荷電された可動棒を近接させて、両者の反発力により、前記液滴を前記パターンに沿って移動させることを特徴とする液滴操作方法。

10

【請求項 5】

前記移動された液滴が、所定の位置で除電され、当該位置に移動された他の液滴と合体される請求項 4 記載の液滴操作方法。

【請求項 6】

表面の一つが撥水性とされた絶縁性の基板と、
該基板の撥水性の表面に形成された複数の親水性の液滴保持領域と、
前記基板の前記親水性の液滴保持領域から延伸されて形成された親水性の液滴移動ラインと、

20

前記基板の前記親水性の液滴保持領域に絶縁層を介して設けられた荷電用電極と、
前記基板の他の親水性の液滴保持領域内に設けられた電極に対応し、絶縁層を介して設けられた、該電極と電気的に接続された除電用電極と、

前記液滴を形成するためのキャピラリーであって、前記液滴に接することができる電極を備えたキャピラリーと

を備え、

前記荷電用電極と前記キャピラリーの前記電極とを用いて前記液滴を分極させることによって該液滴を荷電させることができる、液滴操作のためのシステム。

【請求項 7】

さらに前記荷電用電極および前記除電用電極のそれぞれと接触する電極を備えたスイッチボードを備え、前記荷電用電極と接触する電極は電源と接続可能であり、前記除電用電極と接触する電極は接地される、請求項 6 に記載のシステム。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化学反応を極微量で行うマイクロデバイスや、細胞を 1 個ずつ取り扱い、細胞に対して種々反応を行ったり観測を行ったりするシステムを実現するための新しい技術に関する。

【背景技術】

【0002】

40

従来の生化学反応をはじめとする化学反応は、ある大きさを持つ容器の中で行うのが一般的である。たとえば、RNA ライゲーション反応では、蓋のできるマイクロチューブに 3' 末端リン酸基を持つ RNA 断片、この RNA に導入したい配列の合成オリゴ DNA、RNA リガーゼなどの混合液を入れ、15 で一昼夜放置して反応を進行させる。

【0003】

また、細胞を観察するには、一般的には、スライドガラス上に細胞を含む溶液をのせ、その上をカバーガラスで覆い、顕微鏡で観察する。あるいは、細胞培養シャーレやマイクロプレート上に所定量の培地を入れ、その中で細胞を培養し、容器の底面を通して細胞を観察するのが一般的である。細胞に対して薬効を見る場合などは、同様にマイクロプレートなどの容器に細胞を入れ、培養し、そこに、影響を見たい薬剤を添加して細胞の状態変

50

化を観察する。

【0004】

細胞を取り扱う技術には、空気中に液滴を形成しその中に確率的に細胞が一個入るような系を作成し、細胞を一細胞ずつ計測したり分離したりする技術がある。これはセルソーターと呼ばれる装置で行われる。セルソーターは蛍光染色処理後の細胞を電荷を持たせた液滴中に1細胞単位で単離して滴下し、この液滴中の細胞の蛍光の有無、光散乱量の大小を基に、液滴が落下する過程で、落下方向に対して法平面方向に高電界を任意の方向に印加することで、液滴の落下方向を制御して、下部に置かれた複数の容器に分画して回収する技術である。この技術について詳しくは非特許文献1に報告されている。

【0005】

【非特許文献1】Kamarck, M. E., Methods Enzymol. 第151巻第150頁から165頁(1987年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

一般的に、生化学反応などに用いる反応体積は目的に応じて設定されるが、近年は微量反応が要求されるようになってきている。特に計測を目的とした反応では、計測装置の微量化が進んでいるが、それに見合うだけの前処理反応の微量化はなされていないのが現状である。たとえば、キャピラリーDNAシーケンサーでは内径が50 μ m程度のキャピラリーを用いて試料DNAが電気泳動により分離される。この場合、計測に必要なとされる試料体積は数十n μ lであるが、試料DNAを準備する処理では、実際には、少ない場合でも5 μ l程度の試料DNAが得られる反応を行っている。ナノLCでも同様である。すなわち、試料を準備する反応は数十 μ lの容量で行わせ、得られる試料のごく一部を計測に利用しているに過ぎない。

【0007】

従来は、使用されなかった試料の残りはストックしておき、何か問題があるときは、ストックしている試料をもう一度分析装置にかけることが行われていた。しかし、最近、解析装置の信頼性が向上し、残存試料をストックしておく必要性が低くなってきたことを考えると、無駄の多い処理といえる。

【0008】

一方、種々の化学合成やスクリーニングに関しても反応液の微量化が進んでいるが、液体ハンドリングは微量になると精度を維持しながら処理を進めることが困難になる。そのため、ビーズを使った固相と液相の界面で反応をおこない、色々な反応の組み合わせを同時に行う技術が開発されている。

【0009】

しかし、必ずしも固相を利用した反応が万能的に使われるとは限らず、液相での反応が必要な場合も多い。それは、固相表面では、反応物の片方が固体表面に固定されているため、反応速度が遅くなり、あるいは、立体障害で反応基質そのものが固相表面の反応基を攻撃できない、ゼータ電位の問題で不特定なものが固相表面に吸着する、あるいは、静電反発力で固相表面に近寄れない、など色々な問題があるからである。

【0010】

他方、液体での微量反応を実現するためには、特に、特定の溶質を含む反応媒体を含む液を如何に区分し、区分された反応媒体を含む液を他の溶質を含む反応媒体と如何に接触させるかにある。

【0011】

液滴を作成して液滴に細胞や溶質を溶かし込み種々反応を行う技術が特願2003-139773に記載されている。液滴を容器として利用するのは微量反応を行うには合理的である。このためには複数の液滴を試験管に見立て、これを所定のタイミングで混ぜ合わせ、反応を開始する必要がある。このためには液滴を所定の位置まで搬送する必要がある。

。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

上記特許出願には、液滴を搬送する方法として帯電した液滴を2枚の対向する電極の間を通し、2枚の電極に直流電界をかけることで細胞を任意の方向に打ち出す技術が開示されている。しかし、液滴の移動は初期に電極により与えられるエネルギーで移動するのみであり、より安定な液滴搬送を行うには、液滴の移動速度を制御したり液滴を停止させたりする技術を開発する必要がある。特に液滴が複数である場合、たとえば、異なる溶質を含む数十個の液滴が液滴のサイズの倍程度の間隔で並んでいるアレーから、任意の液滴のみを隣接する液滴に影響を受けず、あるいは、与えずに移動させるのに最適な液滴搬送技術はいまだ実現していない。

【 0 0 1 3 】

本発明は、基板上に密に並んだ液滴群から任意の液滴のみを所定の位置に移動させるに信頼のできるシステムと方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

本発明の液滴操作は、以下のように実現される。まず、絶縁体表面の全域が撥水性とされている基板上に、マトリックス状に配列された親水性の液滴移動ラインを形成し、これらのラインの両端部に親水性の液滴保持領域を形成する。液滴保持領域に液滴を形成し、移動させたい液滴のみを荷電する。荷電された液滴に、液滴の荷電と同じ極性の静電気を持つ電極を近接させて、液滴と電極との間の反発力で、親水性の液滴移動ライン上を移動させる。移動させた液滴は親水性の液滴保持領域で停止させ、この位置で除電し安定に保持する。移動させた液滴は、この液滴保持領域で他の液滴に接触させて、反応させる。

【発明の効果】

【 0 0 1 5 】

本発明では、基板上の液滴を自由に移動することを可能にしたことにより、基板上で液滴を接触させ、液滴中の基質や反応性生物の濃度をコントロールすることができ、したがって、一連の化学反応を液滴を容器として利用する微量反応を実現できる。すなわち、種々化学物質や細胞を保持する液滴を自在の組み合わせで反応させるハイスループットスクリーニングチップやマルチプルマイクロリアクターを実現できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 6 】

(実施例1)

図1(a)は、本発明の液滴操作に適用できる基板の斜視図、(b)は、基板表面に、反応させる個々の液滴を保持した状態を示す基板の斜視図、(c)は液滴操作の状態を模式的に示す基板の斜視図である。

【 0 0 1 7 】

図1(a)において、100は基板であり、絶縁体でできている。基板100の表面の全域は撥水性とされている。また、基板100の表面には、親水性の液滴移動ライン23, 24のマトリックスが作成されている。液滴移動ライン23, 24のマトリックスの両端には親水性の液滴保持領域a, b, - - -, pおよび親水性の液滴保持領域1, 2, - - -, 16が作成されている。ここでは、親水性の液滴保持領域a, b, - - -, pおよび親水性の液滴保持領域1, 2, - - -, 8は、反応させる個々の液滴を保持する液滴保持領域として利用し、親水性の液滴保持領域9, 10, - - -, 16は、液滴を衝突させて反応を起こさせた合体後の液滴を保持する液滴保持領域とする。ここで、想定される液滴量は0.1~1 μ lとし、液滴保持領域は、たとえば、30 μ mのドット状の親水性領域とする。また、液滴の移動のパスとなる親水性ライン23, 24は2 μ m幅とする。液滴は、液滴保持領域から、静電気による力を受けてこの親水性ライン23, 24の上に押し出され、この上を転がることができる。101は、位置合わせマークである。

【 0 0 1 8 】

液滴保持領域に形成された液滴が静電気による力を受けるためには、液滴が帯電している(荷電されている)ことが必要である。この荷電は、たとえば、Micro Total Analysis

10

20

30

40

50

Systems 2004, vol. 1, pp. 144-146 (Proceedings of μ TAS 2004, 8th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, ISBN 0-85404-643-7)記載の方法を改良して用いる。図2(a)、(b)は液滴保持領域で液滴を荷電させる手順を示した図であり、図2(a)は液滴を帯電させる初期の段階の状態を、図2(b)は液滴が帯電させられて液滴保持領域に移った状態を示す図である。

【0019】

基板100は絶縁体であり、201は図1で説明した液滴保持領域であり、この領域に液滴204が形成されているものとする。液滴保持領域201に対応する基板100の背面に電極112が設けられている。液滴保持領域201の上には、液滴204に自由に接触できるキャピラリー210があり、キャピラリー210内部には導電性の溶液211が充填されており、キャピラリー210の反対側において電極212と接している。電極112と電極212に所定の電圧をかけ、キャピラリー210先端の溶液211と液滴204とを接触させる。その結果、電極112が正極、電極212が負極になるように電圧が印加された場合には、液滴204とキャピラリー内部溶液211は全体として分極し、液滴204にはマイナス荷電221が過剰になる。この状態でキャピラリー210を速やかに引き上げ、液滴204から離すと、図2(b)のように液滴204はマイナスに帯電する。逆に、電極112が負極、電極212が正極になるように電圧が印加された場合には、液滴204をプラスに帯電させることができる。この電極112、電極212間に印加する電圧は、後述するように、スイッチボード74のスイッチ115を介して印加するかしないかを決めることができる。

【0020】

図3(a)は基板100の液滴保持領域の荷電用電極部分とスイッチボード74との関連を示す断面図であり、(b)は基板100の液滴保持領域の除電用電極部分とスイッチボード74との関連を示す断面図である。すなわち、図3(a)は反応させる個々の液滴を保持する液滴保持領域である親水性の液滴保持領域a, b, ..., pおよび親水性の液滴保持領域1, 2, ..., 8の電極部分を示す断面図、(b)は液滴を衝突させて反応を起こさせる液滴、および反応して合体した後の液滴を保持する液滴保持領域である親水性の液滴保持領域9, 10, ..., 16の電極部分を示す断面図である。

【0021】

図3(a)に示すように、反応させる個々の液滴を保持する液滴保持領域201₁には、この領域の基板100の背面に、電極112₁が設けられる。したがって、液滴保持領域201₁に液滴が形成されたとき、液滴と対応する位置の基板100の背面にある電極112₁が対峙することになる。一方、基板100の背面にはスイッチボード74が設けられる。スイッチボード74の、基板100の背面の電極112₁に対応する位置には接続電極114₁が設けられ、基板100をスイッチボード74に載置したとき、対応する位置の電極112₁と接続電極114₁が接続される。接続電極114₁は、それぞれ、選択的に開閉できるスイッチ115を介して電源116と接続される。スイッチ115を閉じて、図2(a)、(b)で説明したように、液滴保持領域201₁の液滴と電極112₁との間に電圧を印加すると、この液滴は荷電される。図では、スイッチ115が独立したものとして表示されているが、これは、スイッチボード74をシリコン基板として、半導体回路により構成して、オン、オフ制御を後述するパソコン76により制御するものとしても良い。

【0022】

図3(b)に示すように、同様に、液滴を衝突させて反応を起こさせた合体後の液滴を保持する液滴保持領域201₂では、液滴と接触するように、電極110が設けられる。これらの電極110は、基板100の背面の対応する位置に設けられた電極112₂と接続線111で接続される。スイッチボード74の電極112₂に対応する位置には接続電極114₂が設けられ、基板100をスイッチボード74に載置したとき、対応する位置の電極112₂と接続電極114₂が接続される。接続電極114₂は接地されている。したがって、これらの液滴保持領域201に液滴が入ると液滴は電荷を失い、安定に保持

10

20

30

40

50

される。実施例のスイッチボード74や回路の静電容量を極力小さくしなければならないことは言うまでもない。

【0023】

図1(b)には、基板100の液滴保持領域a, b, - - -, pおよび親水性の液滴保持領域1, 2, - - -, 8に液滴が形成された状態を示す。この液滴形成は、例えば、以下のようにして行う。

【0024】

図4は、細胞62を含む液滴をピペット61の先端に形成し、これを光学的にモニターしながら基板100の液滴保持領域に分配する構成を模式的示す図である。69はXY方向に駆動されるステージであり、77はステージ69の駆動装置である。ステージ69の上面には上述したスイッチボード74が設けられ、この上面に基板100が載置される。基板100の上部には、細胞62を含む懸濁液63があらかじめ吸い上げられて保持されているピペット61が配置される。ピペット61は、液滴に含むべき細胞が変更される時は、新しいものと交換され、汚染を防止する。ピペット61の根元部には、チューブ80を介してシリンジポンプ81が設けられ、シリンジポンプ81には駆動装置82が取り付けられている。シリンジポンプ81が駆動装置82により駆動されると、ピペット61内の懸濁液63が細胞62とともに押し出される。なお、ピペット61の根元部とチューブ80との接続部が離れたように図示されているのは、ピペット61を拡大して表示するためであり、分離されているわけではない。

【0025】

一方、ピペット61の先端部には、ピペット61の先端部に培養液を供給するための他のピペット70の先端が配置される。ピペット70の根元部にはチューブ84を介してシリンジポンプ85が設けられ、シリンジポンプ85には駆動装置86が取り付けられている。シリンジポンプ85が駆動装置86により駆動されると、シリンジポンプ85内の培養液がピペット70から押し出される。

【0026】

また、ピペット61の先端部に形成された液滴を基板100の液滴保持領域に移すためのピペットの上下動駆動装置87が設けられる。ここでは、上下動駆動装置87はピペット61に連係するものとする。上下動駆動装置87に、使用者により、ピペット61を下げる信号が与えられると、ピペット61は下に動き、ピペット61の先端部に形成された液滴を基板100の液滴保持領域に移す。上下動駆動装置87に、使用者により、ピペット61を復旧させる信号が与えられると、ピペット61は図に示す位置に戻る。ピペット61の図に示す位置への復旧は、下げ操作から、パソコン76により、タイムシーケンシャルに行われるものとしても良い。一点差線89は上下動駆動装置87とピペット61との連係を意味する。

【0027】

さらに、ピペット61の先端部の近傍の内部および先端部に形成される液滴の大きさをモニターするための光学系を構成する光源66、集光レンズ67が設けられ、これに対向する位置で基板100の下部にコリメートレンズ68およびモニター75が設けられる。したがって、基板100、スイッチボード74およびステージ69は、光学的に透明である必要がある。76は、いわゆる、パソコンであり、モニター75からの入力信号に応じて、あらかじめ格納してある所定のプログラムから得られる制御信号、および、使用者がモニター75の表示画面を見ながら与える操作入力信号78に応じて駆動装置77, 82, 86および87に必要な信号を与える。なお、ここでは、図示しなかったが、モニター75の検出している画面と同一の表示をパソコン76のモニターに表示するのが便利である。そうすれば、モニター75は、小型のCCDカメラとすることができる。また、操作入力信号78は、パソコン76の入力装置を介して与えられるものである。

【0028】

ここで、ピペット61のサイズについて考えると以下のようなものである。ピペット61は、その先端に、必要な細胞数を持つ適当な大きさの液滴を構成できるようにすることが必要

10

20

30

40

50

である。一方、ピペット61内には、細胞を含む懸濁液63をピペット61で吸い上げてから使用するが、液滴を構成するとき、ピペット61の先端を通過する細胞がモニター75で誤り無く検出できることが必要である。したがって、ピペット61の先端部の直径は細胞1個あるいは所定の細胞数の塊が通過するのを許すが、計数できないほどの細胞が、一度に通過できないものとする。すなわち、現在、汎用的に使用されている培養用ピペットのように径が太いものではなく、透明で、先端部の直径が、一般的な動物細胞用として20~100 μm 、バクテリアなどの微生物用では5 μm 程度とするのが良い。

【0029】

基板100の液滴保持領域に細胞62を分配する操作について以下説明する。まず、システムが起動されると、使用者は、図1に示したマーカー101に着目して基板100が所定の起動位置にあるように位置決めする。次に、細胞62の最初の分配位置をピペット61および70の先端部に対応する位置に移動させる操作入力信号78に応じて、駆動装置77によりステージ69を操作する。基板100が所定の位置まで来ると、ピペット61内部の細胞懸濁液63を細胞62とともに排出する操作を行う。この際、ピペット61の先端部の外側と先端部近傍の内部を光源66とモニター75からなる光学系で監視する。モニター75の出力をパソコン76に取り込み、パソコン76の画像演算結果をもとに駆動装置82を動作させて、シリンジポンプ81の送液を制御することができる。

【0030】

モニター75でピペット61の先端を監視しながら、駆動装置82を動作させて、シリンジポンプ81を動かし、細胞62を含む懸濁液63をピペット61の先端から排出して、ピペット先端に液滴を形成する。このとき、液滴中に所定の細胞数が挿入されたことをモニター75を通してパソコン76が認識し、駆動装置82に停止指令を出して、シリンジポンプ81を停止させる。

【0031】

以下、説明をシンプルにするため、液滴に挿入される細胞62の数は1個として説明するが、細胞数は目的に応じて任意に使用者が決めればよい。たとえば、10個でもよい。細胞62の認識は、ピペット61の先端部の液滴71中に存在する細胞62を直接検出するだけでも良いが、より効率的には、ピペット61の内部を移動する細胞62をモニター75で監視し、パソコン76で細胞のピペット内での位置と移動速度を計算し、ピペット61の先端から液滴21内に排出される時を予測してシリンジポンプ81を制御してもよい。後者の認識方法を用いれば、たとえば短い間隔で複数の細胞がピペット内を移動している場合などに細胞を1個だけ液滴の中に入れる場合に有利となる。

【0032】

ここで、細胞懸濁液63の細胞濃度が低いときは、細胞がピペット61の先端から出る直前に液滴71を形成し始め、所定時間後に液滴形成を停止すれば、液滴71の大きさを一定にすることができる。液滴を形成したくないときは、たとえばブローアードピペット61の先端から出てくる液を吹き飛ばせばよい。あるいは、基板1の外にドレインを設け、そこに排出してもよい。

【0033】

一方、細胞懸濁液63の細胞濃度が高いと、ピペット61から排出される液量がまちまちとなる。すなわち、ピペット61から排出される細胞62の排出の頻度が上がるから、液を排出させる時間を所定の時間に固定していると、その時間内に次の細胞が液滴71の中に入ってしまう可能性がある。このようなケースでは、ピペット70を用いる。ピペット70とこれに連結されたシリンジポンプ85には、培養液あるいは細胞希釈液のみが入れられている。すなわち、モニター75を通して細胞62が液滴21に入るのをパソコン76が確認したとき、駆動装置82に停止指令を出して、シリンジポンプ81を停止させるとともに、このときまでに液滴71を形成するのに駆動されたシリンジポンプ81の繰り出し量から、その時点の液滴71の体積を割り出す。この体積と液滴71の所望の体積との差をパソコン76で計算する。この計算結果に応じて、その時点に出来ている液滴71にピペット70で培養液あるいは細胞希釈液を加えるように、パソコン76から駆動装

10

20

30

40

50

置 86 に動作信号を送り、シリンジポンプ 85 を駆動して、ピペット 70 を用いて液滴 21 の体積が所定の値になるまで液を加える。

【0034】

このとき、ピペット 70 に液滴中の細胞が逆流しないように、ピペット 70 の先端は細胞が通らない大きさ、たとえば $0.2 \mu\text{m}$ とするのが良い。あるいは、先端が $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター構造を有するものとするのが良い。

【0035】

このようにして作成した細胞が 1 個含まれる液滴 71 は、ピペット 61 の上下動駆動装置 87 により、ステージ 69 の上に置かれた基板 100 の上の細胞保持領域に接触させられ、液滴 71 は基板 100 の細胞保持領域に移動する。細胞 62 を含む液滴 71 が基板 100 の細胞保持領域、すなわち、基板 100 の液滴保持領域に移動したことが確認されると、使用者は操作信号 28 を与えて、ステージ駆動装置 77 を動かし、次の液滴を置く位置にピペット先端が位置するように、基板 100 を移動させる。この移動は、親水性領域 4 の配置の情報をパソコン 76 に与えておけば、パソコン 76 によって自動的に行うことができる。そして、この新しい位置で、上述のようにしてピペット 61 の先端に新たな液滴を形成し、基板 100 の液滴保持領域に移動させる。これを繰り返して、基板 100 の液滴保持領域の必要な部位に液滴を置く。形成する液滴が細胞等を含まないものであれば、液滴のサイズを調整するためのピペット 70 とこれの関連のものは必要ない。

【0036】

図 1 (c) には、基板 100 の液滴保持領域 a, b, - - -, p および親水性の液滴保持領域 1, 2, - - -, 8 に液滴が形成された状態から任意の液滴を合体させ、反応を起こさせる手順の概念を示す。図 1 (c) では、液滴保持領域 3 に有った液滴 102 が液滴保持領域 11 に移されて電荷を放出した状態にあり、液滴保持領域 c にあった負に帯電した液滴 103 が、液滴保持領域 e から伸びている液滴移動ラインと液滴保持領域 3 から伸びている液滴移動ラインの交点の位置まで移動している状態を、液滴保持領域 1 にあった負に帯電した液滴 105 が、液滴保持領域 1 から伸びている液滴移動ライン上を移動している状態を示している。これらの、帯電している液滴を移動させるのは、負に帯電させられている操作棒 107 による。操作棒 107 は、移動させるべき液滴と同じ極性の電荷で帯電しているから、液滴を移動させたい方向の液滴の背後から液滴に接近させるだけで、非接触により、移動させることができる。他の液滴は、たとえ、隣接していてもチャージアップされていないので動くことは無い。なお、図では、液滴 103, 105 が、ともに、移動途中のように示したが、液滴の移動は、一つずつ行う。操作棒 107 による液滴の移動をより詳細に述べると以下のようなものである。

【0037】

図 5 は、図 1 に示される液滴移動ラインの一つの上で、操作棒 107 により液滴 105 を移動させている状態を模式的示す図である。この場合、ピペット 61 を帯電している絶縁性の操作棒 107 に置換し、図 4 で説明した液滴の形成と同様に、モニター 75 により操作棒 107 の先端部と液滴 105 とを監視しながら、操作信号 78 により、上下動駆動装置 87 により、操作棒 107 の上下動を制御し、操作棒 107 と液滴 105 が接触しないように注意しながら、ステージ 69 の移動方向を制御する。ここでは、上下動駆動装置 87 は、上下動の単純動作のみとして説明したが、例えば、図 1 (c) を参照して明らかのように、移動させられる液滴は、方向転換も必要であるから、駆動装置 87 は、これらの機能にも対応しやすいものとするのが良い。すなわち、液滴に対する力が常に背後から作用するのに好適な位置と形を取れるようにするのである。

【0038】

操作棒 107 と液滴 105 との反発力に押されて移動した液滴 105 は親水性の液滴保持領域間で移動されると、接地された電極に接触することになるから、電荷を失い、エネルギーの低い位置に自動的に停止する。駆動装置 87 は、この段階で、操作棒 107 を上に持ち上げ、液滴 105 と接触するのを避ける。

【0039】

10

20

30

40

50

図5では棒状の操作棒107で液滴操作を行うが、液滴の移動の方向制御や停止などには、図6に示すリング状の操作棒107'の構造がより実用的である。たとえば親水性ライン23、24にそってマイナスに荷電した液滴105を移動させる場合、マイナスにチャージしたリング状の操作棒107'のリング内に液滴が来るように液滴上部からリングを下ろす。液滴105と操作棒リング107'はともにマイナスに荷電しているため、液滴はリング内の中央近傍に安定してとどまる。このためリングを移動させると液滴もリングの中央近傍に保持されたまま移動する。図5に示した棒の場合は液滴を後ろから押す形となるために移動方向に対して左右のぶれを防ぐことができない。このため、棒の移動速度が速いと液滴が親水性ラインから外れてしまう可能性が否定できない。また、停止位置も基板側との相互作用で安定な位置に止まるが、速度が速いと慣性で液滴が泊まりきれないことも起こりうる。これに対してリングを用いると平面方向の全周囲から液滴を保持して移動することになるので、親水性ラインから脱線したり、慣性で停止位置で止まりきれなかったりする事故を低減できより確実な液滴搬送が可能となる。

10

【0040】

なお、実施例1では、基板上の液滴位置の確認には基板を観察する光学系を構成する光源66、集光レンズ67、これに対向する位置で基板100の下部にコリメートレンズ68およびモニター75を用いることとした。このため基板100には透明の材質を用いることが求められる。あるいは、薄層のシリコン基板を用い、観察に用いる光としては水に吸収のある赤外領域の波長を用いることで容易に液滴の位置を確認できるようになる。もちろん、基板上面から実体顕微鏡のような光学系を用いることもでき、より自由な基板組成を用いることができる。光学系については、後述する実施例2、3でも同様である。

20

【0041】

このように移動させ、停止した液滴に、別の液滴を同様に移動させて、衝突させて種々反応を起こさせることができる。あるいは、細胞を一個ずつ液滴に封入したものをアレー状に並べた細胞ストアと種々化学物質などを含む液滴のアレーを準備し、細胞と液滴の任意の組み合わせの細胞と反応液を反応部に移動させ細胞に対する化学物質の影響を調べるなどの使い方ができる。

【0042】

(実施例2)

実施例2では液滴の帯電方法の他の例について説明する。実施例2では、液滴に帯電粒子を打ち込む方法を取るため、実施例1の電荷を付与するための電極100およびこれに関連する接続線、電極、スイッチボードおよび電源は不要である。

30

【0043】

図7は、図1に示される基板100の液滴保持領域に、図4で説明したのと同様に形成された液滴に電荷を付与するための構成と操作法を説明する図である。液滴33₁、33₂、---、33₈が親水性の液滴保持領域32の上に静止している。この状態では液滴は電荷を持っていない。任意の液滴33₄を帯電させるには、帯電粒子打ち込み装置200を用いる。帯電粒子打ち込み装置200は溶液45を送り込むガス加圧装置40、溶液保持容器41、電極42₁と42₂、電源部43、ソレノイドバルブ44からなる。溶液保持容器41は先端部の出口46が導電性で電源部43と電極42₁を介して接続されているが、溶液保持容器41や回路全体は電氣的に浮いた状態で接地から絶縁されている。溶液保持容器41は一部中の様子が見えるように図示してある。電源は電源43₁とコンデンサー43₂、閉塞器43₃とその他の回路で構成されている。ここで、帯電粒子打ち込み装置200は、図4で説明した液滴の形成手段の上段に設けられることができるので、液滴の形成後に、液滴の形成手段を待避させた後、図5の状況にすることができる。また、ここでは、液滴の形成手段の光学系の基板より下側の部分のみを利用している形としているが、上側の部分が帯電粒子打ち込み装置200の邪魔にならない構造にすることにより、光学系は同じものとする事ができる。

40

【0044】

50

ソレノイドバルブ 4 4 および閉塞器 4 3₃ は、図 4 で説明したパソコン 7 6 により、同期して作動させるシーケンスとなっている。パソコン 7 6 により、まず、コンデンサー 4 3₂ に電源 4 3₁ により、静電蓄電される。閉塞器 4 3₃ は開いているので、電極 4 2₁ と 4 2₂ 間には電界がかからない。溶液保持容器 4 1 は常にガス加圧装置 4 0 で加圧されているが、この状態ではソレノイドバルブ 4 4 により出口 4 6 が閉じているので液滴 4 8 が打ち出されない。パソコン 7 6 の指令によりソレノイドバルブ 4 4 を瞬時開くと、溶液保持容器 4 1 は加圧されているので、溶液が出口 4 6 から打ち出される。液滴 4 5 が出口 4 6 から離れる直前にパソコン 7 6 指令により閉塞器 4 3₃ を閉じる。すると、出口 4 6 はマイナスに帯電し、電極 4 2₂ はプラスに帯電する。これにより出口 4 6 から離れる液滴 4 8 も帯電する。プラス電極 4 2₂ にはスリット 4 7 が開いており、帯電した液滴 4 8 はスリット 4 7 を通過して基板 1 0 0 上の液滴 3 3₄ に衝突する。このため、液滴 3 3₄ 自体もマイナスに荷電される。一つの液滴の荷電が終わった後、モニター 7 5 で監視しながら、ステージを移動させて、他の必要な液滴を荷電することができる。

【 0 0 4 5 】

液滴 3 3 のシリーズの体積は 0 . 1 ~ 1 μ l であるので、液滴 3 3 に打ち込むための帯電液滴 4 8 の大きさも、それに比べて十分小さい必要がある。このような微小液滴を作成する技術は既存のものを使用すればよい。ソレノイドバルブ 4 4 を用いる方法はナノリットルレベルの液滴を作成することができる技術で、すでに DNA マイクロアレーの作成装置として実用化されている。この技術をそのまま使用してもよい。あるいは、既存のセルソーターで用いられているようなソレノイドバルブの代わりにピエゾなどの振動子を用いて液滴を作成する技術を用いてもよい。

【 0 0 4 6 】

(実施例 3)

実施例 2 では、帯電液滴 4 8 が帯電粒子打ち込み装置 2 0 0 の直下の液滴に打ち込まれるから、帯電粒子の打ち込みの標的となる液滴 3 3 の選択には、ステージを移動させる（または、帯電粒子打ち込み装置 2 0 0 を移動させる）ことが必要である。実施例 3 では、液滴に打ち込む粒子が荷電されていることに着目して、荷電液滴の飛翔をコントロールするものとした。

【 0 0 4 7 】

図 8 は、図 1 に示される基板 1 0 0 の液滴保持領域に、図 4 で説明したのと同様に形成された液滴に電荷を付与するために荷電液滴 5 8 の飛翔をコントロールする構成と操作法を説明する図である。荷電液滴 5 8 を打ち込むべき液滴 3 3₁ , 3 3₂ , - - - , 3 3₈ が親水性の液滴保持領域 3 2 の上に静止している。電極 4 2₁ と 4 2₂ 間に電界を掛けた状態で荷電液滴 5 8 を打ち出し、偏向電極 5 1₁ と 5 1₂ の板の間に電界を掛ける。たとえば、液滴 5 8 がマイナスに荷電しているとする、偏向電極 5 1₁ 側がプラスになるように電界を掛ける。荷電液滴 5 8 の打ち込まれる液滴位置に応じて、偏向電極 5 1₁ と 5 1₂ の板の間の電界の大きさを制御することで、荷電液滴 5 8 を打ち込むべき液滴を任意に選択することができる。一方、たとえば、電界は 3 0 0 0 V で常に掛けておき、偏向電極 5 1₁ を偏向電極 5 1₁' のように角度を変えるように制御するものとすることもできる。偏向電極 5 1₁ のときは荷電液滴 5 8 にかかる電界強度が大きくなるので液滴 5 8 は外側の液滴 3 3₁ の方に打ち込まれる。角度が 5 1₁' のようなときには電界が小さくなるので液滴 3 3₂ に荷電液滴 5 8 が打ち込まれる。同様に電極 5 1₂ の位置を変えることで液滴 3 3₄ や 3 3₅ に自在に荷電液滴 5 8 を打ち込むことができる。電極 5 1 に加える電圧の大きさ、あるいは、電極 5 1 の角度、荷電粒子の放出等の制御は、パソコン 7 6 で行う。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 8 】

【 図 1 】 ((a) は、本発明の液滴操作に適用できる基板の斜視図、 (b) は、基板表面に、反応させる個々の液滴を保持した状態を示す基板の斜視図、 (c) は液滴操作の状態を模式的に示す基板の斜視図である。

10

20

30

40

50

【図2】(a)、(b)は液滴保持領域で液滴を荷電させる手順を示した図であり、(a)は液滴を帯電させる初期の段階の状態を、(b)は液滴が帯電させられて液滴保持領域に移った状態を示す図である。

【図3】(a)は基板100の液滴保持領域の荷電用電極部分とスイッチボード74との関連を示す断面図であり、(b)は基板100の液滴保持領域の除電用電極部分とスイッチボード74との関連を示す断面図である。

【図4】細胞62を含む液滴をピペット61の先端に形成し、これを光学的にモニターしながら基板100の液滴保持領域に分配する構成を模式的示す図である。

【図5】図1に示される液滴移動ラインの一つの上で、操作棒107により液滴105を移動させている状態を模式的示す図である。

10

【図6】図1に示される液滴移動ラインの一つの上で、操作棒107により液滴105を移動させている状態を模式的示す他の図である。

【図7】図1に示される基板100の液滴保持領域に、図4で説明したのと同様に形成された液滴に電荷を付与するための構成と操作法を説明する図である。

【図8】図1に示される基板100の液滴保持領域に、図4で説明したのと同様に形成された液滴に電荷を付与するために荷電液滴58の飛翔をコントロールする構成と操作法を説明する図である。

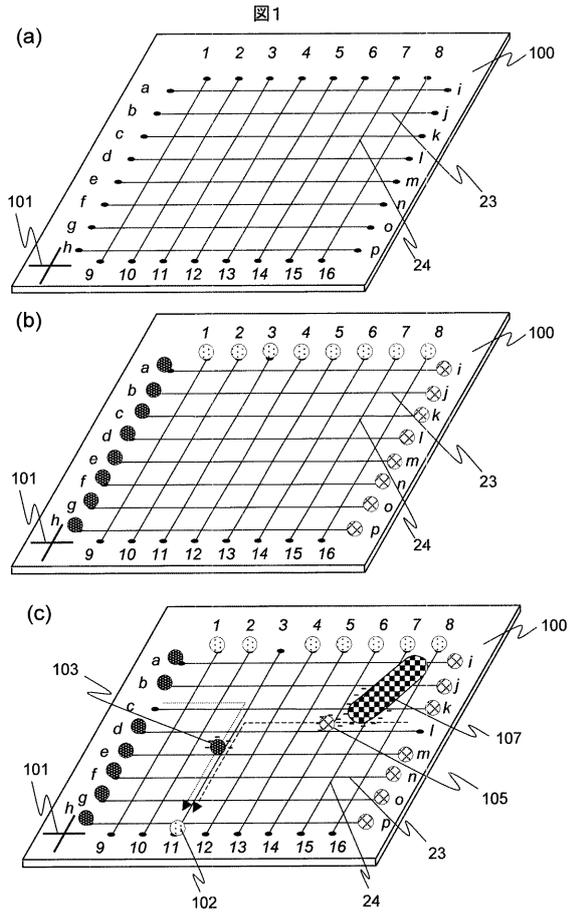
【符号の説明】

【0049】

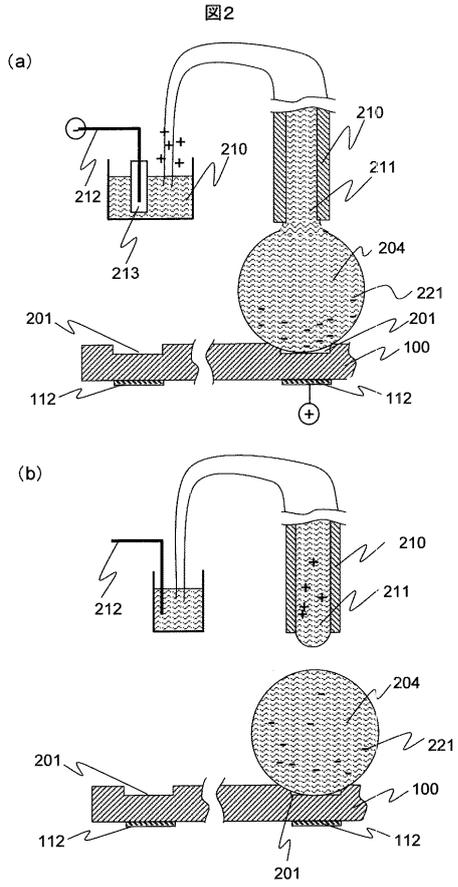
100...基板、23, 24...親水性の液滴移動ライン、1, 2, - - - 16, a, b, - - -, p...親水性の液滴保持領域、84, 80...チューブ、32...液滴保持領域、33₁, 33₂, - - -, 33₈...液滴、40...ガス加圧装置、41...溶液保持容器、42₁, 42₂...電極、43₁, 43₂...電源部とコンデンサー、44...ソレノイドバルブ、45...溶液、46...出口、43₃...閉塞器、61, 70...ピペット、62...細胞、63...懸濁液、66...光源、67...集光レンズ、68...コリメートレンズ、74...スイッチボード、75...モニター、76...パソコン、77...ステージ69の駆動装置、81, 85...シリンジポンプ、82, 86, 87...駆動装置、101...位置合わせマーク、107, 107'...操作棒、110, 112, 114...電極、111...接続線、116...電源、200...帯電粒子打ち込み装置。

20

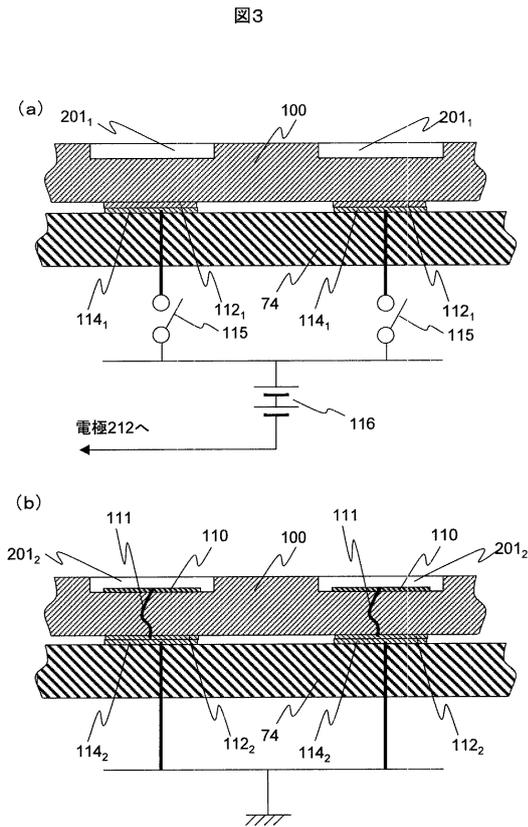
【 図 1 】



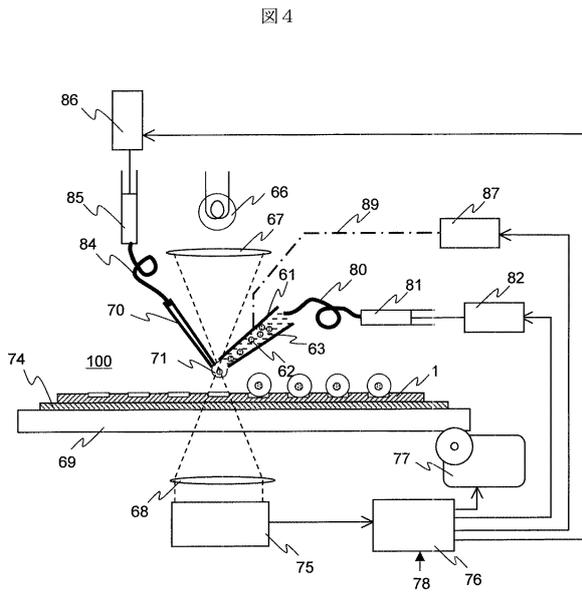
【 図 2 】



【 図 3 】

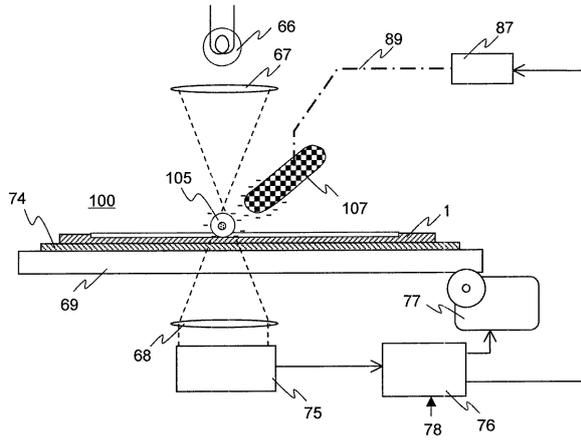


【 図 4 】



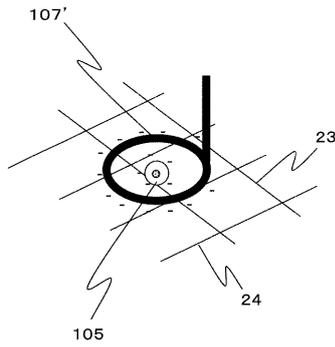
【 図 5 】

図 5



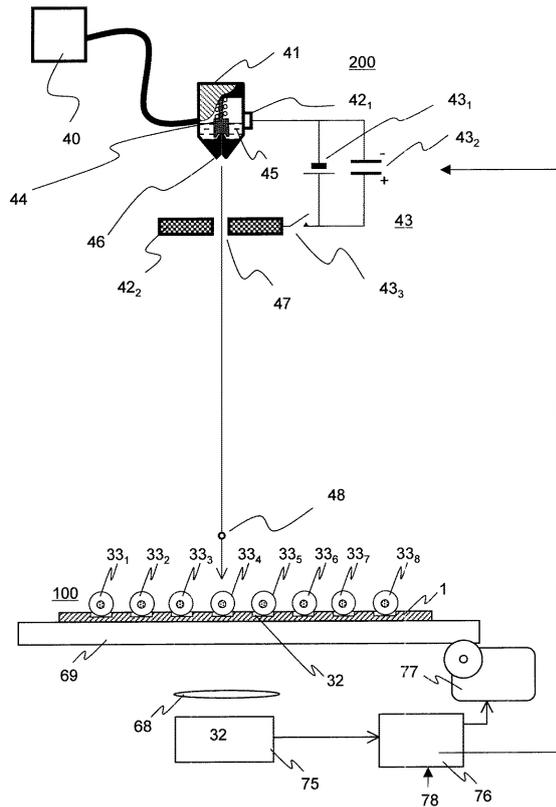
【 図 6 】

図 6



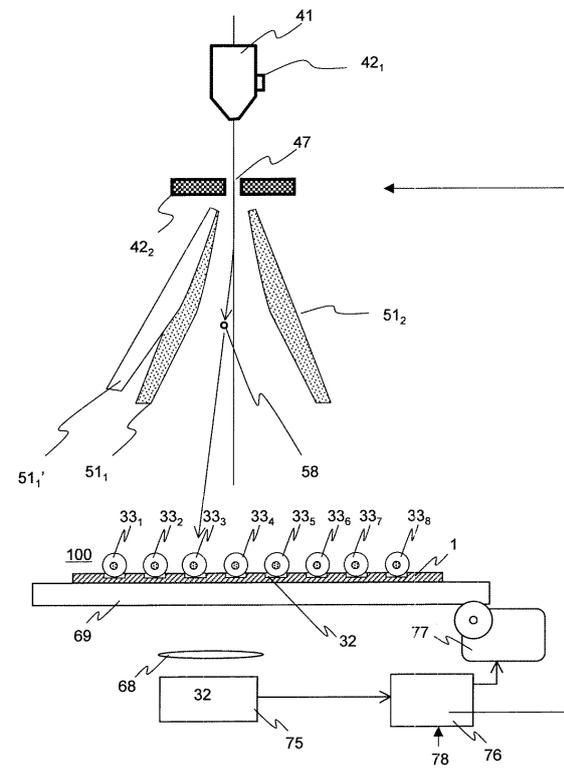
【 図 7 】

図 7



【 図 8 】

図 8



フロントページの続き

(72)発明者 安田 賢二

東京都江東区潮見2-8-14-1014

審査官 福田 裕司

(56)参考文献 特表2004-517335(JP,A)

特表2004-518127(JP,A)

特開2004-336898(JP,A)

国際公開第02/066992(WO,A1)

特開2003-242921(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/00 - 37/00

H01J 37/00 - 37/36

H02K 44/00 - 44/28

C12M 1/00 - 3/00

B01J 19/00 - 19/32