

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5998217号  
(P5998217)

(45) 発行日 平成28年9月28日(2016.9.28)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 21/64	(2006.01)	GO 1 N 21/64		F
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		M
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5	
		GO 1 N 33/543	5 4 1 A	

請求項の数 13 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2014-523658 (P2014-523658)	(73) 特許権者	501387839
(86) (22) 出願日	平成25年6月12日(2013.6.12)		株式会社日立ハイテクノロジーズ
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/066143		東京都港区西新橋一丁目24番14号
(87) 国際公開番号	W02014/007034	(74) 代理人	100100310
(87) 国際公開日	平成26年1月9日(2014.1.9)		弁理士 井上 学
審査請求日	平成27年1月16日(2015.1.16)	(74) 代理人	100098660
(31) 優先権主張番号	特願2012-151993 (P2012-151993)		弁理士 戸田 裕二
(32) 優先日	平成24年7月6日(2012.7.6)	(74) 代理人	100091720
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 岩崎 重美
		(72) 発明者	濱崎 孝伸
			日本国東京都港区西新橋一丁目24番14号
			株式会社 日立ハイテクノロジーズ内
		(72) 発明者	齋藤 俊郎
			日本国東京都港区西新橋一丁目24番14号
			株式会社 日立ハイテクノロジーズ内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析装置及び分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光色素を用いて生体関連分子を定量する分析装置であって、

支持基体と、この支持基体上に生体関連分子を捕捉した磁気微粒子を接着するために設けられた接着層と、蛍光色素を励起する励起手段と、蛍光を検出する検出手段と、前記支持基体に対して磁力のオン/オフ、あるいは磁力の強弱の切り替えが可能な磁場発生手段と、を備え、

前記接着層の材料として、熱や光に応答して疎水性と親水性を可逆的に変化させる物質を用いた分析装置。

【請求項2】

請求項1において、

支持基体を移動させる可動ステージを設けた分析装置。

【請求項3】

請求項1において、

支持基体上に流路を備え、該流路は送液ポンプを接続した取水口と排水口を備える分析装置。

【請求項4】

請求項1において、

前記蛍光色素として量子ドットを用いる分析装置。

【請求項5】

請求項 1 において、  
前記接着層の材料として、アルキル鎖状分子、ビオチン分子のうちいずれかから選ばれる物質を用いた分析装置。

【請求項 6】

請求項 1 において、  
前記磁場発生装置として、電磁石、可動式の永久磁石、可動式の磁場遮蔽物が組み合わさった電磁石、および可動式の磁場遮蔽物が組み合わさった永久磁石のうちいずれかを用いる分析装置。

【請求項 7】

請求項 1 において、  
前記検出手段として、落射型光学顕微鏡を用いた分析装置。 10

【請求項 8】

請求項 1 において、  
2 種類以上の蛍光色素を同時に識別する落射型光学顕微鏡を用いた分析装置。

【請求項 9】

請求項 1 において、  
前記生体関連分子が抗原分子であり、前記磁気微粒子による捕捉が抗原抗体反応によって実施される分析装置。

【請求項 10】

請求項 1 において、  
前記生体関連分子が核酸分子であり、前記磁気微粒子による捕捉がハイブリダイゼーションによって実施される分析装置。 20

【請求項 11】

請求項 1 において、  
前記蛍光色素が、解析対象の生体分子の種類ごとに、配合割合が異なった複数種類の蛍光体を含むことを特徴とする分析装置。

【請求項 12】

請求項 1 において、  
特定の生体関連分子以外の生体関連分子に対しては同一の蛍光色素を用い、前記生体関連分子ごとに蛍光輝点数を計数した上で、総輝点数に対する特定の生体関連分子ごとの輝点数の比を算出することで、前記特定の生体関連分子ごとの存在量を評価することを特徴とする分析装置。 30

【請求項 13】

蛍光色素を用いて生体関連分子を定量する分析方法であって、  
生体関連分子を捕捉した磁気微粒子を接着するための接着層が設けられた支持基体上に磁気微粒子を配し、磁力により、磁気微粒子を支持基体に衝突させ、磁力をオフ又は弱くし、蛍光色素を励起して、蛍光を検出する分析方法であって、  
前記接着層の材料として、熱や光に応答して疎水性と親水性を可逆的に変化する物質を用いることを特徴とする、分析方法。

【発明の詳細な説明】 40

【技術分野】

【0001】

本発明は、磁気微粒子を用いた生体分子分析方法及び生体分子分析装置に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、癌診断の分野では、早期に癌発症の徴候を知るため様々な癌マーカーが研究され、実用化も進んでいる。癌マーカーとは癌細胞由来の分泌型の生体因子であり、癌の進行とともに増加し血中や尿中に現れる。例えば、ホルモン、サイトカイン等のタンパク質、マイクロRNA等の核酸が知られている。早期の癌ではこれらの癌マーカーの量は少なく検出が難しく、元々発現量の少ない癌マーカーが存在する場合も同様である。現在、主流 50

である高感度の癌マーカー検出方法は抗体を用いた免疫測定法で、E L I S A法やナノ微粒子アッセイといった手法が知られている。最近では、研究段階であるが、さらなる高感度な免疫測定法として、単分子で検出可能なデジタルE L I S Aが開発されている（非特許文献1）。血液中の癌マーカーを検出する場合、患者から採取できる血液量は限られており、その中から極微量の癌マーカーをできるだけ多く捕捉して検出することが求められる。例えば、50  $\mu$  lの血漿中から検出する場合、早期の癌では癌マーカーは $10^{-16} \sim 10^{-12}$  Mの濃度範囲であるため、50  $\mu$  l中に3000分子ある標的分子を定量する検出感度が必要になる。このように低濃度の癌マーカーを検出可能な超高感度の検出装置が要求されている。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Rissin DM et al, Nature Biotechnology, Jun 28(6); p595-599 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

極微量の生体分子を定量するため磁気微粒子で生体分子を特異的に捕捉し生体分子には蛍光標識を行う。磁気微粒子に捕捉された生体分子を支持基板に固定して検出を行う。液中に浮遊している生体分子を捕捉した磁気微粒子を磁場によって支持基板表面に引き付ける。磁場の存在下で磁気微粒子自体が帯磁するため、支持基板表面上において微粒子同士で引き合い、磁気微粒子は凝集する。磁気微粒子が凝集すると、支持基板上に板の表面とは垂直方向に磁気微粒子が重なり合ってしまう。また、凝集した微粒子が蛍光標識を内部に巻き込んでしまう。

20

【0005】

このように重なった磁気微粒子、または、内部に蛍光標識を巻き込んだ磁気微粒子は、蛍光観察時に精度良くカウントすることができないという問題がある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

磁気微粒子を支持基板に引き付けるために支持基板裏面にオン/オフを切り替えられる磁場発生装置を、支持基板表面には磁気微粒子を保持する接着層を設ける。はじめに支持基板表面の磁場をオフの状態に磁気微粒子の分散溶液を支持基板表面に置く。次に、磁場をオンにして液中の磁気微粒子を支持基板表面に引き付ける。支持基板に衝突した磁気微粒子を支持基板表面の接着層に固着させ、さらに磁場をオフにする。

30

【発明の効果】

【0007】

本発明により、液中の大部分の磁気微粒子を支持基体表面に引き付けることができ、接着層によって保持することができる。さらに磁場をオフの状態にすることによって、磁気微粒子同士の凝集を解消することができ、支持基板上の磁気微粒子層を一層にすることができる。磁気微粒子を一層にすることで支持基板上の蛍光色素に対する焦点合わせが容易にでき、磁気微粒子の凝集による蛍光色素の抱き込みを防ぐことで定量性が向上する。本発明を用いた生体分子分析により解析対象の生体分子捕獲率を大幅に向上できるため、従来技術より高感度な検出が可能になる。さらに複雑な構造を有するデバイスが不要なため従来技術に比べて非常に簡便であり、自動制御ユニットと組み合わせることで大幅なスループットの向上が得られる。

40

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本実施例の解析方法の一例を説明するための図。

【図2】本実施例の解析方法に用いるデバイスの構成の一例を説明するための図。

【図3】本実施例の解析方法に用いるデバイスの構成の一例を説明するための図。

【図4】本実施例の抗原分子の捕捉方法と抗原分子の蛍光標識する方法の一例を説明する

50

ための図。

【図5】本実施例の核酸断片の捕捉方法と核酸断片の蛍光標識する方法の一例を説明するための図。

【図6】本実施例の生体分子分析装置の構成の一例を説明するための図。

【図7】本実施例の磁石を用いた磁気微粒子固定方法の一例を説明するための図。

【図8】本実施例の磁石を用いて固定された磁気微粒子の顕微鏡観察画像。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の一実施例の核酸分析デバイスでは、解析対象の生体分子が磁気微粒子に捕捉されており、当該微粒子を二次元に提示するための平滑な支持基板を持ち、支持基板の表面には抗体付き磁気微粒子を固定するための接着層が存在する。支持基板としては磁力をよく透過する薄い石英ガラス基板やシリコン基板などがよく、接着層の種類に応じて金属薄膜を堆積させた石英ガラス基板やシリコン基板を使い分ける。タンパク質で修飾した磁気微粒子を固定するための接着面が疎水性の接着層、あるいはビオチンを導入した接着層であり、疎水性の接着剤としてアルキル基の自己組織膜を使用する。また、接着層の接着力の強弱を可逆的に切り替えられる接着剤として光応答性のアゾベンゼンを使用することを開示する。支持基板に固定するための官能基は、基板が石英または酸化処理したシリコン基板ならシラノール基、金堆積基板ならチオール基、酸化チタン堆積基板ならリン酸基を使用する。支持基板の直下には接着層に生体分子付き磁気微粒子を引き付けるための磁場発生装置が設置してあり、さらに磁場発生装置は磁場のオン/オフあるいは強弱を切り替える機能が付いている。磁場発生装置は電磁石、可動式の永久磁石、可動式の電磁石、支持基板と磁石の間に可動式の磁場遮断板が備わった永久磁石、または電磁石から選ばれる。本デバイスは撮像装置を固定した状態で支持基板全面をスキャンして蛍光観察できるように支持基板を可動ステージ上に設置して使用する。

【0010】

観察手順について説明する。はじめに支持基板上に目的の生体分子を捕捉した磁気微粒子を含んだ反応液を配し、次に磁場発生装置をオンにして磁場を発生させ、反応液内のすべての磁気微粒子を支持基板上に引き付け、接着層に接した磁気微粒子を支持基板上に固定する。一度目で接着層に接しなかった磁気微粒子は、磁場のオン/オフ、あるいは強弱を繰り返すことで磁気微粒子の接着層に対する衝突機会を増やす。磁気微粒子を接着層に固定後、洗浄液を流すことで浮遊している未反応の蛍光標識抗体を洗い流す。支持基板上に固定した磁気微粒子とそれに結合した蛍光標識された抗原に励起光を照射して撮影する。観察された輝点数をカウントすることで目的の生体分子濃度を求める。

【0011】

接着層の接着力を可逆的に変化させる機能を持ったデバイスを用いた観察手順について、磁気微粒子を固定する際はアゾベンゼンに紫外光を照射してシス型にしておき、磁場をオフにした状態で一定量の反応液を入れる。それから磁場を発生して、反応液中の磁気微粒子を支持基板上に引き付け、接着層に接した磁気微粒子は支持基板上に固定する。磁気微粒子を接着層に固定後、洗浄液を流すことで浮遊している未反応の蛍光標識抗体を洗い流す。支持基板上に固定した磁気微粒子とそれに結合した蛍光標識された抗原に励起光を照射して撮影し、観察された輝点数をカウントすることで目的の生体分子濃度を求める。観察終了後、支持基板に可視光あるいは熱を与えることで、アゾベンゼンが親水化して磁気微粒子を支持基板から剥がす。紫外光、可視光照射は検出系とは別に光源と波長分離フィルタを用意して、支持基板全面に照射できるようにする。熱を与える方法として、加熱した温水を流路に通す。洗浄が完了したら、再び紫外光を照射してシス型に戻し、新たな試料を入れて同様に固定、および観察を行う。二回目以降の試料の持ち込みを低減するには、繰り返し洗浄を実施する。あるいは測定の回次毎に標識に使用する蛍光色素の波長と検出フィルタを変えることでコンタミネーションを除去する。

【0012】

実施例では、解析対象の生体分子がペプチド、タンパク質、核酸断片群であることを開

10

20

30

40

50

示する。解析対象の抗原を用意し、抗原に対する抗体を結合した磁気微粒子と蛍光体標識された抗体に前記解析対象の抗原と結合させ、標識された蛍光体を検出することを特徴とする免疫学的分析方法を開示する。あるいは解析対象の核酸断片群を用意し、既知の塩基配列を有しかつ蛍光体標識された核酸分子を前記解析対象の核酸断片群とハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイゼーションした核酸分子に標識された蛍光体を検出することを特徴とする核酸分析方法を開示する。

【0013】

また、実施例では、前記生体分子分析方法において、前記蛍光体標識が、解析対象の生体分子の種類ごとに、配合割合が異なった複数種類の蛍光体を含む微粒子であることを特徴とする核酸分析方法を開示する。また、実施例では、前記生体分子分析方法において、特定の分子種以外の分子種に対しては同一の蛍光体標識を用い、前記分子ごとに蛍光輝点数を計数した上で、総輝点数に対する特定の分子種ごとの輝点数の比を算出することで、前記特定の分子種ごとの存在量を評価することを特徴とする生体分子分析方法を開示する。また、実施例では、前記核酸分析方法において、解析対象の生体分子群に対して共通の蛍光体標識を施し、前記蛍光体とは蛍光波長あるいは蛍光強度が異なる蛍光体で標識された生体分子を特異的に結合反応させる工程を含み、前者と後者の蛍光体の輝点数の比を算出することで、前記解析対象の生体分子の種類ごとの存在量を評価することを特徴とする生体分子分析方法を開示する。

10

【0014】

また、実施例では、解析対象の生体分子を二次元的に展開して固定するデバイスと、デバイスを搭載した生体分子分析装置、前記蛍光体の蛍光を測定するための手段を具備することを特徴とする生体分子分析装置を開示する。

20

【0015】

以下、上記及びその他の本発明の新規な特徴と効果について、図を参照して説明する。ここでは、本発明を完全に理解してもらうため、特定の実施形態について詳細な説明を行うが、本発明はここに記した内容に限定されるものではない。

【実施例1】

【0016】

本実施例の解析方法およびデバイスの構成の一例を、図1を用いて説明する。はじめに検出したい生体分子を、事前に磁気微粒子で捕捉し、さらに蛍光標識でラベルする。これらの反応はすべて常温下、緩衝液中で行う磁気微粒子と生体分子の反応、蛍光標識と生体分子の反応はどちらが先でもよく、同時に行ってもよい。捕獲する磁気微粒子の作製法、蛍光標識の方法は実施例3と実施例4で詳細に記載する。

30

【0017】

本実施例では、検出したい生体分子が抗原101であり、抗体付き磁気微粒子102で抗原101を捕捉し、さらに蛍光標識抗体103でラベルする方法を例として、反応方法について図1を用いて説明する。はじめに、反応容器110内に抗体付き磁気微粒子102を入れ、よく攪拌しておく。この溶液に検出したい抗原101の入った溶液を入れてから、よく混合して数分間インキュベートする。このとき、反応容器を上下に回転させるか、振とうして攪拌することで反応が早まる。混合する比率は、抗体付き磁気微粒子102が抗原101に比べて過剰になるように混合する。さらに、この反応液に蛍光標識抗体103を入れて、さらに数分間インキュベートする。このように反応させた混合液中には、大量の未反応の磁気微粒子102と、蛍光標識抗体103が存在し、その中に磁気微粒子102と抗原101と蛍光標識抗体103の混合体が少量存在する。この混合液を以下、反応液Aと呼称する。反応液Aを支持基板に二次元に展開して、蛍光検出することによって抗原量を測定する。

40

【0018】

次に蛍光検出用のデバイスの構成に関して図1を用いて説明する。本デバイスは磁気微粒子102を二次元提示するための平滑な支持基板104を持ち、支持基板104の表面には磁気微粒子102を固定するための接着層105が存在する。支持基板104として

50

は磁力をよく透過する薄い石英ガラス基板やシリコン基板などがよく、接着層105の種類に応じて金属薄膜を堆積させた石英ガラス基板やシリコン基板を使い分ける。タンパク質で修飾した磁気微粒子102は疎水性の層によく吸着することから、アルキル基を支持基板104の表面に固定することで接着層105を形成する。接着剤として、官能基付きのアルキル鎖を使用することができる。官能基は支持基板104の材質が石英または酸化処理したシリコン基板なら官能基はシラノール基、金堆積基板ならチオール基、酸化チタン堆積基板ならリン酸基を使用する。反応を行うと官能基は支持基板104に固定され、アルキル鎖はアルキル鎖疎水的相互作用で密集して支持基板104表面に自己集積膜(SAM)を形成する。この方法によって支持基板104上に均一に疎水化することができる。支持基板104の直下には接着層105に磁気微粒子102を引き付けるための磁場発生装置106が設置してある。さらに磁場発生装置106は磁場のオン/オフあるいは強弱を切り替える機能が付いている。本デバイスは支持基板104全面をスキャンできるように可動ステージ107上に設置して使用する。

10

#### 【0019】

以下、デバイスの役割と観察手順について説明する。はじめに支持基板104にピペット108で反応液Aを載せる。支持基板104上の四方を囲う側壁を作ることによって、支持基板面積当たりの溶液量を厳密に調整することができ、液滴をそのまま載せる方法に比べて液厚を均一にすることができる。つまり、磁気微粒子102の固定を均一にすることができる。磁場発生装置106をオンにした状態で、入れたところから磁気微粒子102が引き付けられるため、不均一に固定される。そのため、反応液Aを入れるときはオフにし、入れてから磁場発生装置106をオンにして磁場を発生させ、反応液A内のすべての磁気微粒子102を支持基板104上に引き付ける。接着層105に接した磁気微粒子102は支持基板104上に固定される。本検討で使用する抗体付き磁気微粒子102は常磁性体であるため、外部から磁場を与えることで磁性化する。しかし、各々の磁気微粒子102が磁性化すると、互いに引き合い数珠状に連なるように凝集する。そのため外部から磁場を与えた状態で観察を行うと、磁性微粒子102は支持基板104に対して垂直方向に向けて立体的な構造を持つため、観察の際に焦点が合わせ難くなり、あるいは蛍光標識抗体103を凝集体内部に巻き込むことで、励起光が不均一となり本来の定量性を損なう。そこで磁場をオフにして、磁気微粒子102同士の凝集を解消することで接着層105に固定された磁気微粒子102のみが支持基板104上に提示され、一層の磁気微粒子層が形成することができる。この場合、接着層105に接しなかった磁気微粒子は支持基板104上に提示されないことになるが、磁場のオン/オフ、あるいは強弱を繰り返すことで衝突機会を増やせば、ほとんどの磁気微粒子102が接着層105に固定される。磁気微粒子102を接着層105に固定後、洗浄液を流すことで浮遊している未反応の蛍光標識抗体103はすべて洗い流すことができる。ただし、未反応の蛍光標識抗体103は、事前に反応容器110内で行っておいてもよい。支持基板104上に一層に固定した磁気微粒子102とそれに結合した蛍光標識された抗原101に励起光を照射して撮影する。観察された輝点数をカウントすることで抗原濃度を求めることができる。

20

30

#### 【実施例2】

#### 【0020】

次に流路と組み合わせた蛍光検出用のデバイスの構成に関して図2を用いて説明する。本デバイスは実施例1と同様に磁気微粒子201を二次元提示するための平滑な支持基板203を持ち、支持基板203の表面には磁気微粒子201を固定するための接着層204、支持基板203の直下には接着層204に磁気微粒子201を引き付けるための磁場のオン/オフあるいは強弱を切り替えが可能な磁場発生装置205が設置してある。さら支持基板203の四方に側壁206と、さらにその上に平滑で透明なカバー材207で蓋をする。例えば、側壁206の材料としてはPDMS(ポリジメチルシロキサン)、カバー材207の材料は石英を使用することができる。側壁の二か所に溶液を出し入れするためのチューブ208を取り付ける。チューブ208の材料としてはシリコンゴムが使用できる。支持基板203の直下には接着層204に磁気微粒子201を引き付けるための磁

40

50

場発生装置 205 が設置してある。本デバイスは支持基板 203 全面をスキャンできるように可動ステージ 209 上に設置して使用する。あるいは、対物レンズ 210 側に可動機構を付加してスキャンする。

#### 【0021】

以下、デバイスの役割と観察手順について説明する。はじめに磁場をオフにした状態で一定量の反応液 A を入れる。それから磁場を発生して、反応液 A 中の磁気微粒子 201 を支持基板 203 上に引き付ける。接着層 204 に接した磁気微粒子 201 は支持基板 203 上に固定される。本磁気微粒子 201 を接着層 204 に固定後、洗浄液 211 を流すことで浮遊している未反応の蛍光色素 202 はすべて洗い流すことができる。支持基板 203 上に一層に固定した磁気微粒子 201 とそれに結合した蛍光色素 202 に励起光を照射して撮影する。観察された輝点数をカウントすることで生体分子濃度を求めることができる。

10

#### 【実施例 3】

#### 【0022】

次に接着層 304 の接着力を可逆的に変化させる機能を持ったデバイスの構成に関して図 3 を用いて説明する。本デバイスは実施例 2 と同様に磁気微粒子 302 を二次元提示するための平滑な支持基板 303 を持ち、支持基板 303 の表面には磁気微粒子 302 を固定するための接着層 304、支持基板 303 の直下には接着層 304 に磁気微粒子 302 を引き付けるための磁場のオン/オフあるいは強弱を切り替えが可能な磁場発生装置 305 が設置してある。さら支持基板 303 の四方に側壁 306 と、さらにその上を平滑なカバー材 307 で蓋をする。側壁 306 の二か所に溶液を出し入れするためのチューブを取り付ける。支持基板 303 の直下には接着層 304 に磁気微粒子 302 を引き付けるための磁場発生装置 305 が設置してある。さらに、接着層 304 の接着力を可逆的に変化させる物質で形成する。例えば、温度や熱を利用して表面の水濡れ性を疎水性から親水性又は親水性から疎水性に変える物質を接着剤として用いる。接着層 304 の接着力を可逆的に変化することによって、観察後に磁気微粒子 302 を固定した支持基板 303 から磁気微粒子 302 を剥がして洗浄することができ、さらに吸着力を再び戻すことで新たな試料を観察することができる。つまり、支持基板 303 を何度も再利用することができる。再利用を実現する接着剤として、光応答性のアルキルアゾベンゼンを使用することができる。アゾベンゼンは二つのアゾ基に二つのベンゼン環が付いた構造をしており、紫外光 308 を照射するとシス体に、可視光 310 あるいは熱を与えることでより安定なトランス体に異性化する。例えば、アルキル鎖の一方の端にアゾベンゼン、もう一方の端に基板側と反応する官能基を結合させた官能基付きアルキルアゾベンゼンを用意する。基板が石英または酸化処理したシリコン基板なら官能基はシラノール基、金堆積基板ならチオール基、酸化チタン堆積基板ならリン酸基を使用する。反応を行うと官能基は基板に固定され、アルキル鎖はアルキル鎖疎水的相互作用で密集して基板表面に自己集積膜 (SAM) を形成する。この方法によって基板上に均一にアゾベンゼンを導入することができる。磁気微粒子 302 を固定する際はアゾベンゼンに紫外光 308 を 5 分間程度照射してシス型にしておく。

20

30

#### 【0023】

以下、デバイスの役割と観察手順について説明する。はじめに磁場をオフにした状態で一定量の反応液 A を入れる。それから磁場を発生して、反応液 A 中の磁気微粒子 302 を支持基板上に引き付ける。接着層 304 に接した磁気微粒子 302 は支持基板 303 上に固定される。本磁気微粒子 302 を接着層 304 に固定後、洗浄液 309 を流すことで浮遊している未反応の蛍光標識抗体はすべて洗い流すことができる。支持基板 303 上に一層に固定した磁気微粒子 302 とそれに結合した蛍光標識された抗原に励起光を照射して撮影する。観察された輝点数をカウントすることで抗原濃度を求めることができる。

40

#### 【0024】

観察が完了した磁気微粒子 302 が固定された支持基板 303 に可視光 310 あるいは熱を与えることで、アゾベンゼンが親水化して磁気微粒子 302 が支持基板 303 から剥

50

がれる。可視光310照射は検出系とは別に光源と波長分離フィルタを用意して、支持基板303全面に照射できるようにする。熱を与えるには、35以上に加熱した温水を流路に通す。いずれの親水化の方法でも、界面活性剤を含む水溶液を流しながら行うことでより高い磁気微粒子302の除去効果が得られる。洗浄が完了したら、再び紫外光308を五分間程度照射してシス型にしておき、新たな試料を入れて同様に固定、および観察を行う。

#### 【0025】

このように繰り返し固定と除去を行う場合、前の回で固定した蛍光色素301が残留して、二回目以降の定量の際に加算されてしまう可能性がある。これを防ぐには事前に、磁気微粒子302を完全に、あるいは許容される量になるまで除去できる洗浄条件を求めておく。極微量の試料を定量する場合、数輝点の差が定量結果に大きく影響する場合がある。その時は、測定の間毎に標識に使用する蛍光色素301の波長と検出フィルタを変えることでコンタミネーションを完全に除去することができる。

#### 【実施例4】

#### 【0026】

本実施例の試料調整方法に関して、図4を用いて説明する。検出したい生体分子が抗原401である場合、事前に抗体402付き磁気微粒子403で捕捉し、さらに蛍光標識抗体405でラベルする。これらの反応はすべて常温下、反作用バッファ(トリスバッファ(pH8.0)、50mM NaCl、0.1% Tween20)中で行う。抗体402付き微粒子と抗原401の反応と蛍光標識抗体405と抗原401の反応はどちらが先でもよく、同時に行ってもよい。抗原401はあらゆる種類のものが使用できるが、抗体402は抗原401に対して特異的の高いものを選択する方がよい。例えば、抗原401として前立腺がんの腫瘍マーカーであるPSA(前立腺特異抗原)を選択した場合、PSA抗体が必要である。PSA抗体は磁気微粒子側に結合するものと、蛍光色素標識のものをそれぞれ必要とする。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、抗原401の種類に合わせて適切なものを選択する。

#### 【0027】

磁気微粒子403に抗体402を結合する場合、抗体402の活性を保ったまま結合できるプロテインA、またはプロテインG修飾の磁気微粒子403を用意する。これらの磁気微粒子403は市販されており、容易に入手することができる。例えば、常磁性微粒子であるアダムテック社のプロテインA修飾アダムビーズ(300nm)を利用することができる。プロテインA修飾磁気微粒子403に対して約10倍以上のPSA抗体を混合しインキュベートする。次に磁気微粒子403を磁石で捕捉してから溶液を除去し清浄なバッファで懸濁する。この操作を未反応の抗体402が除去できるまで繰り返す。磁気微粒子403としてストレプトアビジンの修飾磁気微粒子403を使用することができる。例えば、アダムテック社のストレプトアビジン修飾アダムビーズ(100nm、200nm、300nm)を利用することができる。この磁気微粒子403を使用する場合は、ビオチン化した抗体402を使用して、磁気微粒子403表面に抗体402を結合させる。使用する磁気微粒子403の直径は励起波長よりも小さいものから選ばれることが望ましく、磁気微粒子403の散乱光によるバックグラウンドの増加を防ぐことができる。

#### 【0028】

蛍光標識抗体405は様々な種類のものが市販されている。例えば、FITC、Alexa(登録商標)、CY5などがよく知られている。しかし、本検討では少なくとも一分子の抗原401の検出を可能にするため、輝度が高く、消光時間の長い蛍光色素を利用することが望ましい。このような蛍光色素として、例えば、数百分子の蛍光色素が一つの枝状の炭素鎖に結合した dendrimer 型蛍光色素や、量子ドット404を使用することができる。

#### 【0029】

本実施例では量子ドット404を用いた抗体の蛍光標識方法について説明する。量子ドット404は直径数ナノ~数十ナノの半導体微粒子である。従来の蛍光色素に比べて高寿

10

20

30

40

50

命、高輝度で、粒径によって異なる波長の蛍光を発する。量子ドット404は複数のメーカーから市販されており、様々な官能基で修飾されているものもある。任意の蛍光標識抗体405を結合できる量子ドット404として、例えば、インビトロジェン社のQdot（登録商標）抗体標識キットが利用できる。本キットでは表面にチオール基を導入した量子ドット404と、ジスルフィド結合を還元した蛍光標識抗体405を混合し反応させることで、蛍光標識抗体405に量子ドット404を標識できる。

#### 【0030】

以上のように作製した抗体402付き磁気微粒子403と蛍光標識抗体405を用いて抗原401の捕捉と検出を行う。はじめに、反応容器内に抗体402付き磁気微粒子403を入れ、よく攪拌しておく。この溶液に検出したい抗原401の入った溶液を入れてから、よく混合して1時間インキュベートする。このとき、反応容器を上下に回転させるか、振とうして攪拌することで抗原401と抗体402の反応が早まる。混合する比率は、抗体402付き磁気微粒子403が抗原401に比べて過剰になるように混合する。具体的には、想定される抗原量に対して100から10000倍量の抗体402付き磁気微粒子403を入れる。次いで、この反応液に蛍光標識抗体405を入れて、さらに数分間インキュベートする。蛍光標識抗体405も同様に抗原量に対して過剰になるように100から10000倍量投入する。それぞれを過剰量入れることによって、抗原401との衝突頻度が上がり、抗原401の捕捉率と蛍光標識率が向上する。このように反応させた混合液を実施例3の反応液と同様に観察し、抗原401を定量する。

#### 【実施例5】

#### 【0031】

本検討における試料調整方法について図5を用いて説明する。検出したい生体分子が核酸断片である場合、検出対象の試料核酸断片501を磁気微粒子507で捕捉し、さらに試料核酸断片501に対して相補的な配列を持つ蛍光色素506付き核酸断片505でラベルする。これらはハイブリダイゼーションによる特異的な反応であり、反作用バッファ（PBSバッファ（pH7.4）、50mM~1M NaCl、0.1% Tween20）中で行う。核酸付き磁気微粒子507と試料核酸断片501、蛍光色素506付き核酸断片505と試料核酸断片501の反応はどちらが先でもよく、同時に行ってもよい。核酸断片505は一本鎖のDNAやRNAが使用できる。具体的な解析対象としてマイクロRNAを例に取り、詳細を説明する。

#### 【0032】

マイクロRNAは20mer程度の一本鎖の核酸断片である。最も単純な検出方法は、試料核酸断片501に対して直接蛍光標識する方法である。この場合、試料核酸断片501の3'末端側にピオチン化dUTPを結合して、ピオチン化した試料核酸断片501を作製する。この試料核酸断片501に対してアビジン標識の量子ドットを反応させる。同様に試料核酸断片501の相補鎖を付けた磁気微粒子507を作製しておき、量子ドットと反応させた試料核酸断片501と反応させる。磁気微粒子507に捕捉された試料核酸断片501の量を蛍光色素504から測定する。

#### 【0033】

全体のマイクロRNA総量のうち、特定のマイクロRNA量を測定したい時は、予め試料核酸断片501であるマイクロRNAに共通配列503と捕捉配列508を含む核酸断片を末端にライゲーションで付加しておく。共通配列503とは、種類を問わずすべてのマイクロRNAに蛍光標識するための配列を指し、捕捉配列とは、磁気微粒子507で捕捉するための配列を指す。共通配列および捕捉配列は、測定したい試料のTm値に合わせて、GC含量と塩基長を任意に合成することができる。以下、共通配列と捕捉配列を含む核酸断片をタグ断片502と呼称する。はじめに、共通配列の相補鎖に蛍光色素504標識したものと、試料核酸断片501の相補鎖に蛍光色素506標識したものを用意する。これらをタグ分子502を付加した試料核酸断片501と混合しハイブリダイズさせる。このとき、試料核酸断片501が複数種類存在する場合は、種類ごとに試料核酸断片501の相補鎖を用意し、それぞれ異なる波長の蛍光標識をしておく。このように蛍光標識し

た試料核酸断片501を、捕捉配列付き磁気微粒子507で捕捉する。この反応もハイブリダイゼーションで行う。蛍光標識された試料核酸断片501を補足した磁気微粒子507を支持基板上の接着層に固定して実施例1、2と同様に輝点観察を行う。このとき、共通配列数側の蛍光輝点はマイクロRNAの全数に相当し、試料側の蛍光輝点数は試料核酸断片501の分子数に相当する。両者の輝点数の比を、各種の核酸試料分子の存在比率と判断することも、特定の核酸分子だけの発現量を調べたい時には有効である。

#### 【0034】

磁気微粒子507は市販されており、容易に入手することができる。例えば、常磁性微粒子であるアデムテック社のストレプトアビジンの修飾磁気微粒子を使用することができる。例えば、アデムテック社のストレプトアビジン修飾アデムビーズ(100nm、200nm、300nm)を利用することができる。この磁気微粒子を使用する場合は、ビオチン化した核酸断片を使用して、磁気微粒子507表面のアビジン509に核酸を結合させる。使用する磁気微粒子507の直径は励起波長よりも小さいものから選ばれることが望ましく、磁気微粒子507の散乱光によるバックグラウンドの増加を防ぐことができる。蛍光色素は様々な種類のものが市販されている。例えば、FITC、Alexa(登録商標)、CY5などがよく知られている。しかし、本検討では少なくとも一分子の試料核酸断片501の検出を可能にするため、輝度が高く、消光時間の長い蛍光色素を利用することが望ましい。このような蛍光色素として、例えば、数百分子の蛍光色素が一つの枝状の炭素鎖に結合した dendrimer 型蛍光色素や、量子ドットを使用することができる。本実施例では量子ドットを用いた核酸断片の蛍光標識方法について説明する。例えば、インピトロジェン社のストレプトアビジン修飾 Qdot(登録商標)が利用できる。量子ドットと核酸断片との結合は混合して30分間以上インキュベートすればよく、反応後に50kDaカットオフのスピナラムで未反応の核酸断片を除去する。

#### 【0035】

以上のように作製した捕捉配列付き磁気微粒子507と蛍光色素標識核酸断片を用いて試料核酸断片501を捕捉する。はじめに、反応容器内に捕捉配列付き磁気微粒子507を入れ、よく攪拌しておく。この溶液に検出したい試料核酸断片501の入った溶液を入れてから、よく混合して6時間インキュベートする。このとき、反応容器を上下に回転させるか、振とうして攪拌することでハイブリダイゼーション反応が早まる。混合する比率は、磁気微粒子507が目的の核酸断片に比べて過剰になるように混合する。具体的には、想定される試料分子数に対して100から10000倍量の磁気微粒子507を入れる。以上のように処理した反応液を実施例1、2と同様に観察する。

#### 【実施例6】

#### 【0036】

本実施例では、生体分子分析装置の好ましい構成の一例について図6を参照しながら説明する。本実施例の生体分子分析装置は、生体分子を二次元に展開するための支持基板601に対して、解析対象の生体分子溶液、洗浄液を供給する手段と、磁気微粒子を支持基板上に引き付けるための手段、磁気微粒子を支持基板上に保持するための手段、支持基板において洗浄液に加温するための温度調節する手段と、支持基板に光を照射する手段と、蛍光標識付き分子の蛍光体の蛍光を測定する発光検出手段、支持基板601をスキャンする手段、を備える。

#### 【0037】

より具体的には、支持基板を601可動ステージ604上に置き、流路を設けた流路部材をその上に貼り合わせることで反応チャンバ605を形成する。流路部材には、例えばPDMS(ポリジメチルシロキサン)を使用することができる。注入口606には送液ポンプ607が接続されており、解析対象の生体試料溶液槽602、洗浄液槽603から生体試料溶液と洗浄液が順次、支持基板601へ供給され、使用后、廃液槽612に捨てられる。生体試料溶液が反応チャンバ内に入ると、磁場発生装置608が磁場を発生させ、支持基板601表面に磁気微粒子を引き付ける。引き付けられた磁気微粒子は支持基板表面の接着層に接触し、固定される。送液ポンプ607から洗浄液を反応チャンバ605内に

10

20

30

40

50

入れ洗浄を行う。洗浄後、蛍光検出を行う。励起光源609は、用いる蛍光体の種類によって適切なものを選択できる。例えば、蛍光標識用の蛍光色素として、量子ドットを用いる場合には、光源に532nm(YAGレーザー)、または水銀ランプで対応できる。励起光源609から発する励起フィルタ616と励起光をレンズ617を通し、ダイクロイックミラー610によって対物レンズ611に導き、支持基板601上に照射する。支持基板601上の蛍光標識付き分子から発せられる蛍光は、励起光と同軸光路を逆に進み、対物レンズ611で集められた後ダイクロイックミラー610を通過し、結像レンズに613より2次元CCDカメラ614の感光面上に結像される。励起光の散乱光は吸収フィルタ615によって除去される。定量性を高めるためには観察する輝点数を増やす必要がある。可動ステージ604を動作させ、支持基板601全面をスキャンすることによって輝点数を増やすことができる。上記のように、送液ポンプ607、注入口606、励起光源609及び蛍光検出ユニット、磁場発生装置608、可動ステージ604で生体分子分析装置を組み上げることにより、自動分析を行うことができ高速化が図れる。

#### 【実施例7】

##### 【0038】

本実施例では、磁気微粒子701の固定に用いられる磁石と支持基板との配置に関して、実施例1~5との組み合わせで用いることが望ましい構成の一つを、図7を参照しながら説明する。本発明で使用する装置は平滑な支持基板702の表面をスキャンするため、面積あたりに固定される磁気微粒子701が多いほうがスループットの面で有利である。一方で面積あたりの磁気微粒子701が多すぎると多層化してしまい、対物レンズの焦点深度内に収まらない磁気微粒子701が増え検出数が低下する。したがって、効率的な検出を実現するためには磁気微粒子701は高密度で固定されつつ、薄い層を形成していることが望ましい。そこで、支持基板702に対して平行な磁力線704を持つ強力な磁石703を用いた磁気微粒子701の固定方法を考案した。

##### 【0039】

配置方法は次のとおりである。図7に示すように、はじめに支持基板702の上に磁気微粒子701を載せ、次に支持基板702を磁場発生装置703上に配置した。予め磁石703の磁力線の向きと強さを調べておき、支持基板702表面の中央部分における磁力線704の方向が平行になるように支持基板702を配置した。さらに数秒間固定反応を行うことで図8のようにライン状に磁気微粒子701を固定することができた。以上の配置位置を鋭意検討した結果、支持基板702は磁石703の表面かつ両極間のできるだけ中央部分に配置すること、支持基板702よりも大きい磁石703を使用すること、さらに磁束密度の高い磁石703を用いることで、より均一で迅速に固定できること分かった。

##### 【0040】

固定原理は次のとおりである。図7のように通常の磁石は両極間に弧を描くような磁力線704を形成する。そのとき、磁石703表面の中央部分では両極間を平行に結ぶ帯状の磁力線704が形成される。本実施例で使用する磁気微粒子701は常磁性を有することから外部から磁場を与えることで各々磁化し、平行な磁力線704に従って磁気微粒子701同士で数珠状の直鎖を形成した(図8)。この際、磁石703の中心に発生する平行な磁力は両極に生じる磁力に比べると非常に弱い。そのため、配置した磁気微粒子701が両極に引っ張られないように極から十分に距離を置くことが望ましい。つまり、両極の中央部分に配置することが望ましく、十分に距離をおくことで固定の偏りを低減することができる。ここで言う十分とは、例えば、4mm角の支持基板702の中心から各極までの距離を40mmにすることで達成できる。また、磁石703の中心部に発生する平行磁場は支持基板702上に磁気微粒子701を固定するため磁石703に対して垂直な磁力成分を要する。そのため比較的強力な磁力を持つ磁石703を選ぶことで固定速度を上げることができる。これは磁気微粒子701を高密度に固定する点においても有利であり、具体的には0.1T以上の表面磁束密度が望ましい。本実施例では8cmで0.5Tのネオジム磁石と4mm角の支持基板702を使用した。磁石703の極付近で磁気微粒子を引き付けると、支持基板に対して垂直方向に磁気微粒子の鎖が伸びてしまう。実際、同体

10

20

30

40

50

積内(4×4×0.13mm)に等量(20pM)の磁気微粒子701(300nm)を導入し、支持基板702に対して平行な磁束と垂直な磁束をそれぞれ与えた場合、支持基板702表面の同一の焦点深度内に収まる磁気微粒子密度は平行な磁束の方が約8倍高かった。これにより平行な磁束が磁気微粒子の高密度固定に有効であることが確認できた。

【符号の説明】

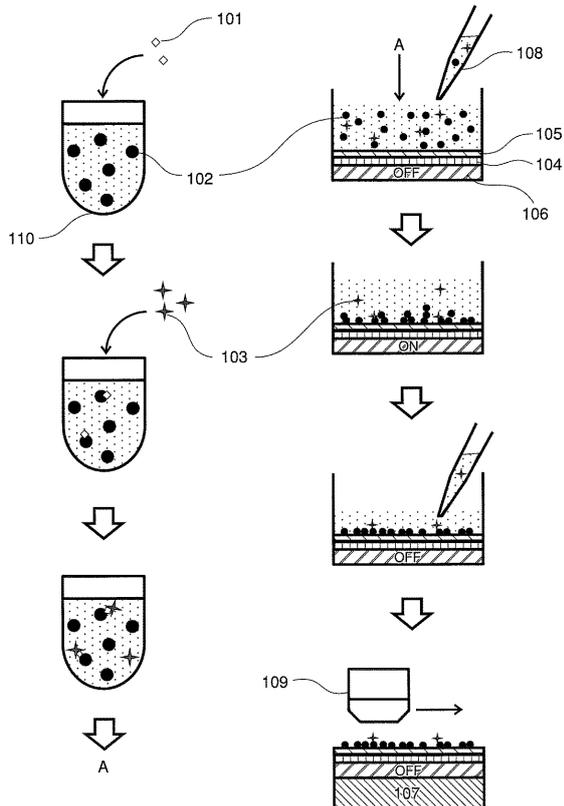
【0041】

101、401	抗原	
102、201、302、403、507	磁気微粒子	
103、405	蛍光標識抗体	10
104、203、303、406、601	支持基板	
105、204、304、407、511	接着層	
106、205、305、608	磁場発生装置	
107、209、604	可動ステージ	
108	ピペット	
109、210、611	対物レンズ	
110	反応容器	
202、301、504、506	蛍光色素	
206、306	側壁	
207、307	カバー材	20
208	チューブ	
211、309	洗浄液	
308	紫外光	
310	可視光	
311	捕捉分子	
402	抗体	
404	量子ドット	
501	試料核酸断片	
502	タグ分子	
503	共通配列	30
505	核酸断片	
508	捕捉配列	
509	アビジン	
510	支持基体	
602	生体試料溶液槽	
603	洗浄液槽	
605	反応チャンバ	
606	注入口	
607	送液ポンプ	
609	励起光源	40
610	ダイクロイックミラー	
612	廃液槽	
613	結像レンズ	
614	2次元CCDカメラ	
615	吸収フィルタ	
616	励起フィルタ	
617	レンズ	
701	磁気微粒子	
702	支持基板	
703	磁石	50

7 0 4 磁力線 (磁束)

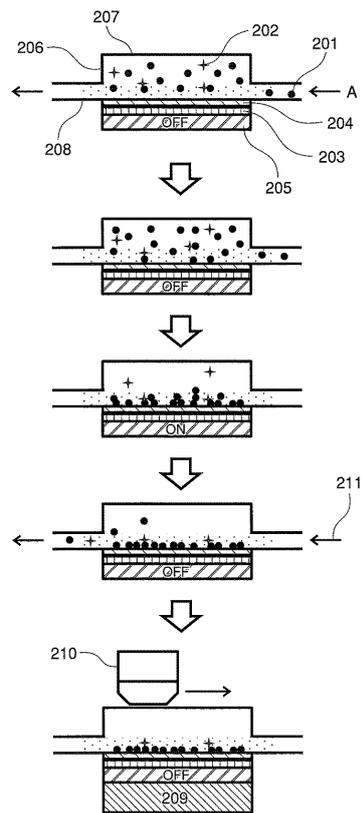
【 図 1 】

図 1

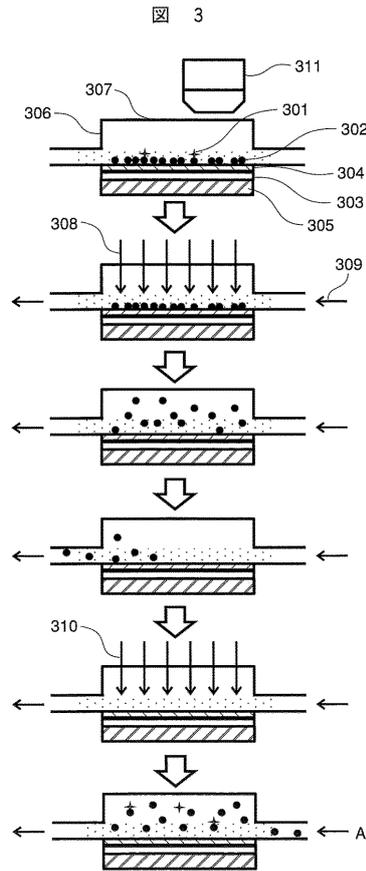


【 図 2 】

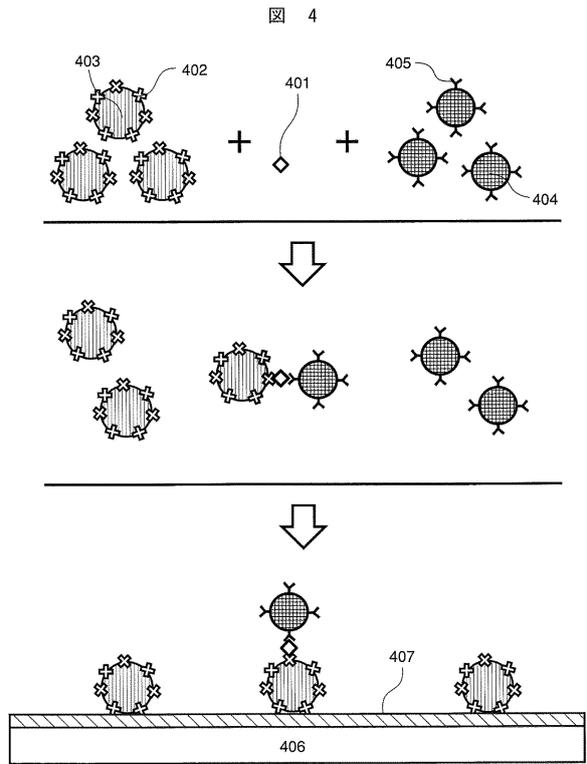
図 2



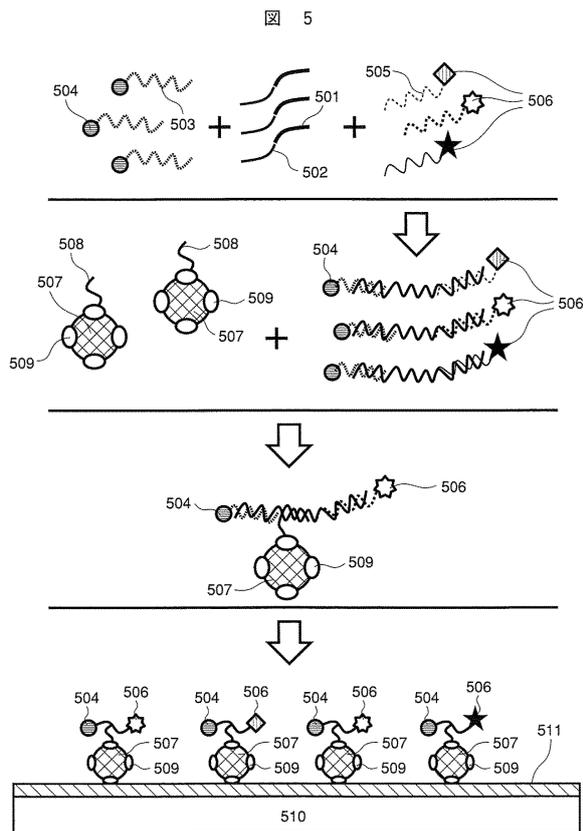
【 図 3 】



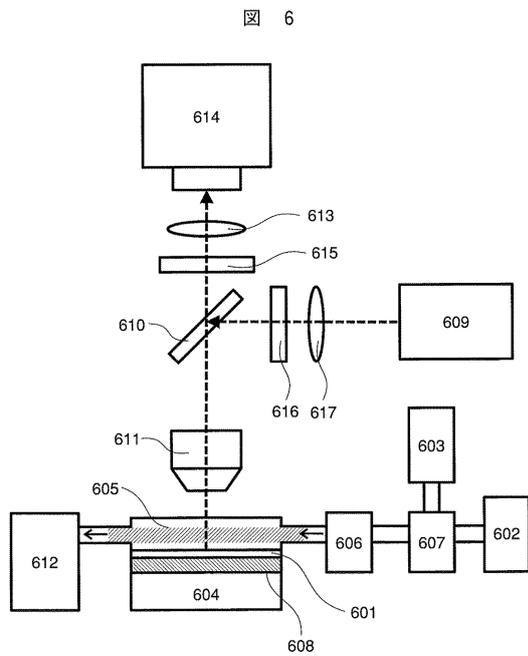
【 図 4 】



【 図 5 】

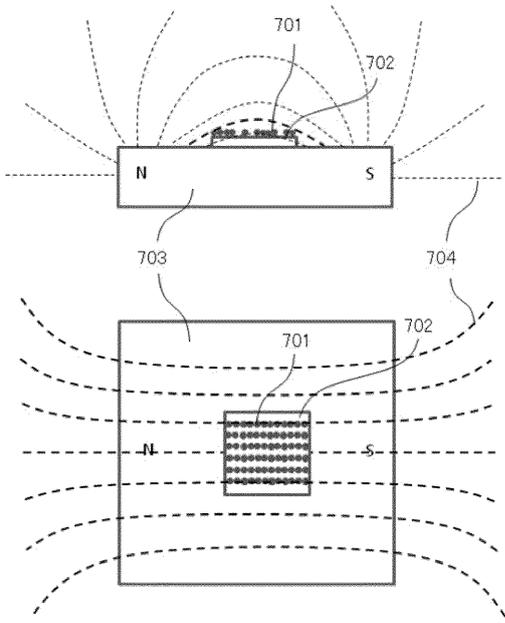


【 図 6 】



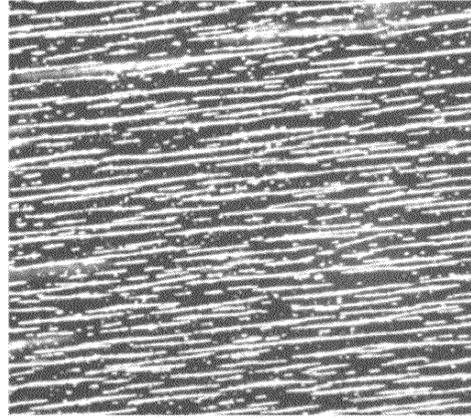
【 図 7 】

図7



【 図 8 】

図8



---

フロントページの続き

審査官 波多江 進

(56)参考文献 国際公開第2005/093416(WO, A1)

特開2010-008247(JP, A)

特表平06-508203(JP, A)

特開2004-333168(JP, A)

特開平07-248330(JP, A)

特表2003-523185(JP, A)

特許第5816291(JP, B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/83

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)