

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5589616号  
(P5589616)

(45) 発行日 平成26年9月17日(2014.9.17)

(24) 登録日 平成26年8月8日(2014.8.8)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 575
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C

請求項の数 4 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2010-148819 (P2010-148819)	(73) 特許権者	000002185 ソニー株式会社 東京都港区港南1丁目7番1号
(22) 出願日	平成22年6月30日(2010.6.30)	(74) 代理人	100112874 弁理士 渡邊 薫
(65) 公開番号	特開2011-85578 (P2011-85578A)	(72) 発明者	町田 賢三 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内
(43) 公開日	平成23年4月28日(2011.4.28)	(72) 発明者	岸井 典之 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内
審査請求日	平成25年6月6日(2013.6.6)	(72) 発明者	坂本 直久 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2009-213360 (P2009-213360)		
(32) 優先日	平成21年9月15日(2009.9.15)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロビーズ解析方法及びマイクロビーズ解析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

略平行に対向した上面及び下面とこれらの面に連続する側面とからなる柱体形状に成形され、上面及び下面の少なくとも一方に識別パターンが形成され、かつ、検出対象物質に親和性を有する物質が表面に固相化されたマイクロビーズを解析する方法であって、

表面が凹凸処理された測定基板に前記マイクロビーズを上面又は下面が接触する状態で載置する手順と、

測定基板面に対向して配設された画像取得手段によってマイクロビーズの蛍光像を取得し、前記検出対象物質と前記検出対象物質に親和性を有する物質との相互作用に起因してマイクロビーズ表面において検出される蛍光を、前記上面及び前記下面のうち前記識別パターンが形成されていない領域と、輪郭領域と、を含み、前記識別パターンが形成されている領域を含まない領域から検出する手順と、を含むマイクロビーズ解析方法。

【請求項2】

さらに、前記画像取得手段によって前記識別パターンを含むマイクロビーズの透過像を取得し、該透過像から識別パターンを検出する手順を含む請求項1に記載のマイクロビーズ解析方法。

【請求項3】

さらに、前記マイクロビーズを前記検出対象物質と混合する手順を含む請求項1又は2に記載のマイクロビーズ解析方法。

【請求項4】

略平行に対向した上面及び下面とこれらの面に連続する側面とからなる柱体形状に成形され、上面及び下面の少なくとも一方に識別パターンが形成され、かつ、検出対象物質に親和性を有する物質が表面に固相化されたマイクロビーズの解析に供されるマイクロビーズ解析装置であって、

表面に凹凸処理がなされている測定基板と、

前記測定基板と対向して配設されている、マイクロビーズの透過像及び蛍光像を撮像する画像取得手段と、

透過像から識別パターンを検出する手段と、

蛍光像において、前記マイクロビーズの上面及び下面のうち識別パターンが形成されていない領域と、輪郭領域と、を含み、前記識別パターンが形成されている領域を含まない領域からの蛍光を検出する手段と、を備えるマイクロビーズ解析装置。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロビーズ解析方法及びマイクロビーズ解析装置に関する。より詳しくは、個々のビーズを画像識別するためのパターンが形成されたマイクロビーズを用いたマイクロビーズ解析等に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸やタンパク等を対象とした生化学分析において、従来、「マイクロビーズ」と称される粒子状担体を用いられている。例えば、核酸分析においては、ターゲット核酸鎖に対して相補的な塩基配列を有するプローブ核酸鎖を表面に固相化したマイクロビーズを用い、ターゲット核酸鎖をプローブ核酸鎖との相互作用に基づいて分離することが行われている。また、タンパク分析では、ターゲットタンパクに対する抗体を表面に固相化したマイクロビーズを用いて、同様にターゲットタンパクを分離することが行われている。

20

【0003】

マイクロビーズ表面に捕捉、分離されたターゲット核酸鎖あるいはターゲットタンパクは、これらを予め蛍光物質で標識しておくことによって光学的に検出することができる。また、ビーズ表面の蛍光強度を測定すれば、分離されたターゲット物質を定量することもできる。ターゲット物質が核酸鎖である場合には、ターゲット核酸鎖とプローブ核酸鎖の相互作用によって形成されるハイブリッド鎖間に取り込まれて蛍光を発するインターカレータを用いて、分離されたターゲット核酸鎖を光学的に検出することも行われている。

30

【0004】

近年、これらのマイクロビーズを用いた生化学分析では一層のハイスループット化が求められており、分析の高速化を図るための技術が種々開発されてきている。

【0005】

例えば、特許文献1には、「試料内の多数の分析物であり、それぞれの分析反応物によって認識される分析物を検出する方法であって、a) 集団のそれぞれが異なる蛍光シグナル及び異なる分析反応物を有する蛍光粒子の集団であり、前記分析反応物が特異的に試料内の1つの分析物に結びつき、前記各蛍光粒子がそれぞれの蛍光染料で標識された少なくとも1つのナノ粒子を表面に有してなる蛍光粒子の集団を多数、試料と接触させ、b) 標識試薬へ前記試料を加え、c) 前記標識を検出することにより、前記分析反応物が分析物に結びついたことを示す前記蛍光粒子を分析し、同時に、d) 前記各集団に関連付けられた前記異なる蛍光シグナルの機能から、それぞれの分析物と結びついた前記蛍光粒子の集団を決定すること、を含んでなる方法。」(請求項23参照)が開示されている。

40

【0006】

この技術に基づきLuminex社が提供する「Suspension Array Technology」では、2種類の蛍光色素を発光の色味に変化を持たせてマイクロビーズに標識することにより、最大100種類のマイクロビーズを識別することが可能である。「Suspension Array Technology」によれば、100種類のマイクロビーズにそれぞれ異なるプローブ核酸鎖や抗体を固

50

相化することによって、一回の分析で100種類の異なるターゲット核酸鎖やターゲットタンパクを同時に分析することができる。

【0007】

また、上記文献には、「前記蛍光粒子の集団がさらに、それらのサイズと形状によって決定される」（請求項25参照）と記載され、マイクロビーズを識別するための追加的なパラメータとして、ビーズのサイズや形状を採用できる旨が開示されている（当該文献段落0037等参照）。

【0008】

これに関連して、非特許文献1には、マイクロビーズに画像識別可能なドットコードを形成する技術が開示されている。この技術によれば、100万種類を超える超多形状のマイクロビーズを作製することができる。この文献には、流路中でのフォトリソグラフィを用いて、ビーズの楕円表面の半分にドットコードを形成し、もう半分にプローブ核酸鎖を固相化したマイクロビーズを作製したことが記載されている（当該文献図1参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特許第3468750号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】“Multifunctional encoded particles for high-throughput biomolecule analysis.” Science, 2007, Vol.315, No.5817, p.1393-6.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

ドットコードのような識別パターンを形成したマイクロビーズでは、ビーズ表面に分離されたターゲット物質に標識された蛍光物質やインターカレータから発生する蛍光を検出する際に、識別パターンそのものから蛍光が発生することがある。このような識別パターンに起因した蛍光は、ビーズ表面の蛍光強度に基づいてターゲット物質の量を測定しようとするときに、ノイズ蛍光となり測定誤差の要因となる。

【0012】

さらに、各マイクロビーズにはパターン形状の異なる多数の識別パターンを形成しているため、パターン形状の違いによって各ビーズで発生するノイズ蛍光の強度にばらつきが生じる場合がある。この場合には、ビーズごとにノイズ蛍光の影響を補正して、ターゲット物質の量を算出する処理が必要となり、解析速度が低下する原因となる。

【0013】

非特許文献1に開示されるマイクロビーズでは、ドットコードを形成する領域とプローブ核酸鎖を固相化する領域をビーズの楕円表面の半分ずつに分けて設けている。このマイクロビーズでは、プローブ核酸鎖が固相化された領域のみからの蛍光を検出することで、識別パターンに起因したノイズ蛍光の影響を受けることなく、ターゲット核酸鎖に標識された蛍光物質からの蛍光を検出できる可能性もある。ただし、当該文献には、この可能性についての言及はなされていない。

【0014】

しかしながら、このようなドットコード形成領域とプローブ核酸鎖固相化領域とを分けたマイクロビーズを形成するためには、非常に複雑な作製工程が必要となる。すなわち、ドットコード形成領域となるモノマー層流とプローブ核酸鎖固相化領域となる層流を接触させた状態で流路に流し、ドットコード形成領域のモノマー層流に紫外線を照射してフォトリソグラフィを行う工程が必要である（当該文献図1参照）。また、ドットコード形成領域とプローブ核酸鎖固相化領域とを作り分けることによって、マイクロビーズ全体のサイズが大きくなってしまいうという問題もある。

【0015】

10

20

30

40

50

そこで、本発明は、複雑な作製工程を要さず、ターゲット物質に標識された蛍光物質等からの蛍光を、識別パターンに起因したノイズ蛍光の影響を排除して高精度に検出できるマイクロビーズ解析方法を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

上記課題解決のため、本発明は、略平行に対向した上面及び下面とこれらの面に連続する側面とからなる柱体形状に成形され、上面及び下面の少なくとも一方に識別パターンが形成され、かつ、検出対象物質に親和性を有する物質が表面に固相化されたマイクロビーズを解析する方法であって、表面が凹凸処理された測定基板に前記マイクロビーズを上面又は下面が接触する状態で載置する手順と、測定基板面に対向して配設された画像取得手段によってマイクロビーズの蛍光像を取得し、前記検出対象物質と前記検出対象物質に親和性を有する物質との相互作用に起因してマイクロビーズ表面において検出される蛍光を、前記上面及び前記下面のうち前記識別パターンが形成されていない領域と、輪郭領域と、を含み、前記識別パターンが形成されている領域を含まない領域から検出する手順と、を含むマイクロビーズ解析方法を提供する。

10

上記領域からの蛍光を検出することにより、識別パターンに起因した蛍光ノイズを排除して高い強度の蛍光を検出することができる。

また、マイクロビーズを上記のように方向付けして測定基板上に保持することで、画像取得手段により撮像される透過像に確実に識別パターンが含まれるようにできる。

さらに、前記マイクロビーズ解析方法は、前記画像取得手段によって前記識別パターンを含むマイクロビーズの透過像を取得し、該透過像から識別パターンを検出する手順を含んでいてもよく、前記マイクロビーズを前記検出対象物質と混合する手順を含んでいてもよい。

20

マイクロビーズを前記測定基板上に載置することで、干渉縞の発生がない透過像及び蛍光像を取得することができる。

【0017】

本発明は、併せて、略平行に対向した上面及び下面とこれらの面に連続する側面とからなる柱体形状に成形され、上面及び下面の少なくとも一方に識別パターンが形成され、かつ、検出対象物質に親和性を有する物質が表面に固相化されたマイクロビーズの解析に供されるマイクロビーズ解析装置であって、表面に凹凸処理がなされている測定基板と、前記測定基板と対向して配設されている、マイクロビーズの透過像及び蛍光像を撮像する画像取得手段と、透過像から識別パターンを検出する手段と、蛍光像において、前記マイクロビーズの上面及び下面のうち識別パターンが形成されていない領域と、輪郭領域と、を含み、前記識別パターンが形成されている領域を含まない領域からの蛍光を検出する手段と、を備えるマイクロビーズ解析装置をも提供する。

30

【0018】

本発明において、「識別パターン」とは、マイクロビーズに形成される所定の形状であって、CCDカメラ及び画像解析ソフトウェア等から構成される汎用の画像識別手段によって識別可能な形状をいう。識別パターンは、個々のマイクロビーズを他と区別して認識するための形状であり、具体的な形や大きさ等は特に限定されない。識別パターンの具体例としては、いわゆるドットコートやバーコードなどが挙げられる。

40

【0019】

また、本発明において、「検出対象物質」は、マイクロビーズを用いた生化学分析において従来分析対象とされている核酸やタンパク、ペプチド等の化合物を広く含むものとする。検出対象物質は、例えば、ステロイドホルモンやカテコールアミンなどの生体内小分子や、小胞体やミトコンドリア等の細胞内小器官や、ウイルス、細菌や哺乳類細胞等の各種細胞などともできる。

「検出対象物質に親和性を有する物質」には、検出対象物質と相互作用し、検出対象物質に親和性をもって結合し得る核酸やタンパク、ペプチド、糖鎖、各種合成化合物あるいは天然化合物等の化合物が広く包含されるものとする。

50

## 【 0 0 2 0 】

検出対象物質と検出対象物質に親和性を有する物質の組み合わせとしては、例えば「核酸 - 核酸」、「タンパク（あるいはペプチド） - タンパク（抗体も含む）」、「タンパク（あるいはペプチド） - 核酸（アプタマー）」、「タンパク - 糖鎖」が挙げられる。「核酸 - 核酸」の組み合わせの場合、「相互作用」とは、相補的な塩基配列を有する核酸間の二本鎖形成である。また、「タンパク - タンパク」の組み合わせの場合、「相互作用」とは、例えば受容体タンパクとリガンドタンパクとの結合や、抗原タンパクと抗体との結合のようなタンパク質間結合である。

## 【 0 0 2 1 】

なお、糖鎖とは、単糖の結合鎖やこの結合鎖に脂質やタンパク質がさらに結合したものを意味し、オリゴ糖や糖脂質、糖タンパク質などを含む。また、核酸には、DNAやRNAの他、これらのリボース部分やリン酸バックボーン部分の構造を改変して得られる核酸類似体（例えば、LNA（Locked Nucleic Acid）やPNAなど）等も含み得るものとする。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 2 2 】

本発明により、複雑な作製工程を要さず、標的物質に標識された蛍光物質等からの蛍光を、識別パターンに起因したノイズ蛍光の影響を排除して、高精度に検出できるマイクロビーズ解析方法が提供される。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 3 】

【 図 1 】本発明に係るマイクロビーズ解析方法で用いられるマイクロビーズの一例を説明する模式図である。（A）は上面図、（B）は側面図である。

【 図 2 】マイクロビーズのコード領域に形成された識別パターンを説明する模式図である。

【 図 3 】マイクロビーズの表面に固相化されたプローブ物質を説明する模式図である。

【 図 4 】識別パターンが形成されたマイクロビーズの透過像及び蛍光像の一例を説明する図面代用写真である。（A）は透過像、（B）は蛍光像である。

【 図 5 】本発明に係るマイクロビーズ解析装置（第 1 例）の概略構成を説明する模式図である。

【 図 6 】本発明に係るマイクロビーズ解析装置の測定基板の構成を説明する模式図である。

【 図 7 】蛍光検出手段による蛍光検出領域を説明する模式図である。

【 図 8 】本発明に係るマイクロビーズ解析装置（第 2 例）の概略構成を説明する模式図である。

【 図 9 】識別パターンが形成されたマイクロビーズの透過像及び蛍光像の他の例を説明する図面代用写真である。（A）は透過像、（B）は蛍光像である。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 2 4 】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。なお、説明は以下の順序で行う。

## 1. マイクロビーズ

(1) 識別パターン

(2) プローブ物質

(3) マイクロビーズの作製方法

(i) 製膜工程

(ii) 成形工程

(iii) 剥離工程

(iv) プローブ物質固相化工程

10

20

30

40

50

## 2. マイクロビーズ解析方法 (第1例)

- (1) マイクロビーズ解析方法の概要
- (2) マイクロビーズ解析装置 (第1例)
- (3) マイクロビーズ解析方法の具体的手順
  - (i) 反応手順
  - (ii) 保持手順
  - (iii) 検出手順
    - (a) 識別パターンの検出
    - (b) 蛍光の検出

## 3. マイクロビーズ解析方法 (第2例)

- (1) マイクロビーズ解析装置 (第2例)
- (2) マイクロビーズ解析方法の具体的手順
  - (i) 通流手順
  - (ii) 検出手順
    - (a) 識別パターンの検出
    - (b) 蛍光の検出

10

## 【0025】

## 1. マイクロビーズ

## (1) 識別パターン

本発明に係るマイクロビーズ解析方法では、表面に、識別パターンが形成され、検出対象物質に親和性を有する物質が固相化されたマイクロビーズを用いる。図1に、本発明に係るマイクロビーズ解析方法で用いられるマイクロビーズの一例を示す。図1(A)は、上面模式図、図1(B)は側面模式図である。

20

## 【0026】

図1中、符号1で示すマイクロビーズは、略平行に対向した上面11及び下面12とこれらの面に連続する側面13とからなる柱体形状に成形されている。ここでは、上面11及び下面12を上方視円形として、マイクロビーズ1全体を円柱形状とした場合を例に説明するが、本発明で用いられるマイクロビーズは、三角柱形状や四角柱形状あるいはその他の多角柱形状であってよい。ただし、後述する方法に従って識別パターンを含む透過像を取得するため、上面11及び下面12が略平行に対向する柱体形状に成形されていることが必要である。

30

## 【0027】

マイクロビーズ1の厚みH及び上面11(あるいは下面12)の径Dは、適宜設定され得るが、厚みHを径Dより小さく設定してマイクロビーズ1全体を盤形状とすることが好ましい。

## 【0028】

マイクロビーズ1の上面11及び下面12の少なくとも一方(図1では上面11)には、個々のビーズを画像識別するためのパターンが形成されるコード領域111が設けられている。上面11のコード領域111以外の領域は、識別パターンが形成されていない非コード領域112とされている。コード領域111は、下面12、あるいは上面11と下面12の両方に設けてもよい。

40

## 【0029】

図2は、マイクロビーズ1のコード領域111に形成された識別パターンを説明する上面模式図である。ここでは、マイクロビーズ1を、異なる識別パターンを形成した3種類のマイクロビーズ1A、1B、1Cから構成されるビーズセットであるものとして説明する。

## 【0030】

図2(A)~(C)に示すマイクロビーズ1A、1B、1Cのコード領域111には、ビーズの上面11から下面12へ貫通する貫通孔2が複数形成されている(図中、ドットパターン塗り円参照)。貫通孔2は、コード領域111に縦横5列ずつの計25箇所形成

50

され得るものであり、マイクロビーズ1を識別するための識別パターンを構成している。すなわち、マイクロビーズ1A, 1B, 1Cでは、貫通孔2がこれら25箇所のいずれの位置に形成されているかによって、各マイクロビーズ1A, 1B, 1Cを識別することが可能である。

#### 【0031】

具体的には、図2(A)に示すマイクロビーズ1Aでは、25箇所のうち9箇所に貫通孔2が形成されている。図中、貫通孔2が形成されている箇所はドットパターンの塗り円で、形成されていない箇所は白抜き円で示す。図2(B)に示すマイクロビーズ1Bでは、同じく9箇所に貫通孔2が形成されているが、その形成位置がマイクロビーズ1Aと異なっている。従って、この貫通孔2の形成位置の違いに基づけば、マイクロビーズ1Aとマイクロビーズ1Bとを識別することが可能である。

10

#### 【0032】

また、図2(C)に示すマイクロビーズ1Cでは、貫通孔を10箇所に形成している。従って、この貫通孔2の形成数の違いに基づけば、マイクロビーズ1Cとマイクロビーズ1Aあるいはマイクロビーズ1Bとを識別することが可能である。

#### 【0033】

コード領域111内に形成する貫通孔2は、0以上25以下の任意数であってよく、25箇所から選択される任意の位置に形成される。このように、マイクロビーズ1では、貫通孔2の形成数及び形成位置を任意に設定することで、各ビーズのコード領域111に異なるパターンを形成することができる。そして、このパターンを画像識別手段により検出することによって、最大で2の25乗の種類のマイクロビーズを識別することが可能とされている。

20

#### 【0034】

なお、ここで説明した識別パターンは一例に過ぎない。本発明に用いられるマイクロビーズに形成される識別パターンは、従来公知の画像識別手段によって識別可能な形状であれば、具体的な形や大きさ等は限定されない。

#### 【0035】

##### (2) プローブ物質

マイクロビーズ1の表面には、検出対象物質に親和性を有する物質が固相化されている。図3に、マイクロビーズ1の表面に固相化された検出対象物質に親和性を有する物質を模式的に示す。以下、検出対象物質を「ターゲット物質」と、検出対象物質に親和性を有する物質を「プローブ物質」というものとする。

30

#### 【0036】

図3(A)に示すマイクロビーズ1Aの表面には、符号PAで示すプローブ物質が固相化されている。プローブ物質PAは、ターゲット物質に応じて、所定の塩基配列の核酸や所定のアミノ酸配列のタンパク又はペプチド、あるいは糖鎖等の化合物とされる。プローブ物質PAは、マイクロビーズ1A表面のうち、コード領域111及び非コード領域112の双方を含む上面11と側面13に少なくとも固相化されており、これらに加えて下面12に固相化されていてもよい。なお、識別パターンを下面12にも形成する場合には、下面12についてもコード領域及び非コード領域の両方にプローブ物質PAが固相化されてよい。

40

#### 【0037】

プローブ物質PAは、ターゲット物質を核酸とする場合には、ターゲット核酸鎖に対して相補的な塩基配列を有する核酸鎖とされる。これにより、サンプル中のターゲット核酸鎖を、プローブ物質PAとのハイブリダイズ(二本鎖)形成によってマイクロビーズ1A上に捕捉し、分離することができる。なお、この場合のプローブ物質PAの塩基数(長さ)は任意であり、ターゲット核酸鎖の塩基配列の少なくとも一部に相補的な塩基配列を有し、所定のハイブリダイゼーション反応条件下で二本鎖形成が可能な限りにおいて、塩基数は特に限定されない。通常、プローブ物質PAの塩基数は、数塩基~数十塩基であり、好ましくは10塩基~30塩基程度である。

50

## 【0038】

また、プローブ物質PAは、ターゲット物質をタンパクとする場合には、ターゲットタンパク（例えば、レセプタータンパク）と相互作用し得るペプチド（例えば、リガンドタンパクの一部アミノ酸配列）や抗体等とされる。これにより、サンプル中のターゲットタンパクを、プローブ物質PAとの相互作用によってマイクロビーズ1A上に捕捉し、分離することができる。

## 【0039】

他方、図3(B)、図3(C)に示すマイクロビーズ1B、1Cの表面には、それぞれ符号PB、PCで示すプローブ物質が固相化されている。プローブ物質PB、PCも、ターゲット物質に応じて、所定の塩基配列の核酸や所定のアミノ酸配列のタンパク又はペプチド、あるいは糖鎖等の化合物とされる。マイクロビーズ1B、1Cにおいても、これらのプローブ物質は、コード領域111及び非コード領域112の双方を含む上面11と側面13に少なくとも固相化されている。

10

## 【0040】

マイクロビーズ1A表面に固相化するプローブ物質PAとマイクロビーズ1B、1C表面に固相化するプローブ物質PB、PCを、異なるターゲット物質に対して親和性を発揮する物質とされる。これにより、それぞれのマイクロビーズ1A、1B、1C表面に異なるターゲット物質(TA、TB、TC)を捕捉、分離することができる。この場合、プローブ物質PA、PB、PCは、例えば、配列を互いに異にする核酸やタンパク又はペプチド、あるいは抗原性の異なる抗体などとされる。

20

## 【0041】

ターゲット物質を捕捉したマイクロビーズ1A、1B、1Cは、プローブ物質PA、PB、PCとターゲット物質TA、TB、TCとの相互作用に基づいて蛍光を発するようになる。この蛍光は、例えば、ターゲット物質に標識された蛍光物質や、プローブ物質とターゲット物質との間に取り込まれたインターカレータから発せられるものとできる。本発明に係るマイクロビーズ解析方法は、これらの蛍光を検出すると同時に、各マイクロビーズに形成された識別パターンを画像識別手段によって識別することで、複数種類のターゲット物質を同時に分析する。

## 【0042】

## (3) マイクロビーズの作製方法

本発明に係るマイクロビーズ解析方法で用いられるマイクロビーズは、例えば以下の工程により作製することができる。

30

## 【0043】

## (i) 製膜工程

まず、マイクロビーズの材料となる薄膜を基板上に製膜する。基板には、例えば、ガラス基板やシリコン基板などが用いられる。基板の材質は特に限定されず、通常のフォトリソグラフィ技術に用いられる材質を適宜採用し得る。

## 【0044】

これらの基板に、各種のポリマーや二酸化珪素、金属（アルミニウムやクロム、金、銀など）の薄膜を製膜する。製膜は、薄膜の材料に応じて、スピコートやスリットコート、吹き付け等による塗布、又は物理蒸着(PVD)や化学蒸着(CVD)による蒸着などの従来公知の手法によって行うことができる。薄膜の製膜厚は、作製するマイクロビーズの厚み(図1中、符号H参照)によって適宜設定される。

40

## 【0045】

薄膜の材料には、SU-8などのエポキシ系レジストや、ポリイミド系レジスト、アクリル系レジスト、ノボラック系レジストなどのフォトレジストを好適に採用できる。ポリマーフォトレジスト薄膜を用いることで、二酸化珪素薄膜や金属薄膜に比して、低コストにマイクロビーズを作製することができ、かつ、低比重のマイクロビーズを得られる。分析時、マイクロビーズはターゲット物質を含むサンプルと混合され、液相中に分散される。このとき、マイクロビーズの比重が大きいと、液相中での分散状態を長く維持すること

50



ができない。

【0046】

さらに、ポリマーには、SU-8を採用することが特に好適となる。SU-8は、化学増幅型のエポキシベースのネガ型フォトレジストである。SU-8は、レジストの超薄膜形成技術とフォトリソグラフィ技術とを組み合わせることで微細構造を形成するための材料として、米IBM社によって開発された。

【0047】

SU-8はスピンコートによる製膜で簡単に厚みを調整することができる。また、SU-8は高い光透過性を有し、各種溶媒や酸、アルカリに対する耐溶性と耐温性を備えている。従って、このSU-8を用いることにより、様々な厚みのマイクロビーズを簡便に作製することが可能である。また、マイクロビーズの作製工程及びマイクロビーズを用いた分析工程において、安定したパフォーマンスを得ることができる。

10

【0048】

(ii) 成形工程

次に、製膜した薄膜をフォトリソグラフィによって所定の形状に成形する。マイクロビーズの材料としてSU-8のようなレジストを製膜した場合には、薄膜を必要に応じて加熱し固化する(プリベーク)。次に、マイクロビーズの全体形状及び識別パターン形状を描いたフォトマスク(以下、単に「マスク」ともいう)を用いて露光を行う。露光した基板を現像液に浸し、余分な部分の薄膜を除去する。さらに、リンス液(イソプロピルアルコール:IPA)ですすぎ、不要部分を完全に除去する。その後、ポストベークを行うと、基板上に残された薄膜にマイクロビーズの形状が現れる。

20

【0049】

このとき、作製するマイクロビーズの識別パターン形状に応じて、マスクの形状を設計することにより、基板上に任意の識別パターン形状を有するマイクロビーズを成形することが可能となる。また、露光は、マスクレス露光機を用いてもよい。

【0050】

また、マイクロビーズの材料として二酸化珪素や各種金属を製膜した場合には、薄膜の表面に、通常使用されるレジストをスピンコートし、必要に応じてプリベークを行う。次に、上記と同様のマスクを用いて露光を行う。露光した基板を現像液に浸し、余分な部分のレジストを除去する。さらに、リンス液(主に超純水)で数回すすぎ、不要部分を除去し、ポストベークを行う。その後、薄膜をエッチングによりパターンニングした後、レジストを完全に除去する。これにより、基板上に残された薄膜にマイクロビーズの形状が現れる。

30

【0051】

(iii) 剥離工程

成形後の薄膜を基板から剥離する。薄膜の剥離は、例えば、基板をアルカリ性又は酸性の剥離液に浸漬することにより行うことができる。また、浸漬と同時に、超音波処理を行うことで剥離を進行させてもよい。

【0052】

剥離されたマイクロビーズは、薄膜に由来して略平行に対向する2つの面を備えた柱体形状を有する。略平行に対向する2つの面間の距離、すなわちマイクロビーズ厚み(図1中、符号H参照)は、製膜厚を調整することによって任意に設定できる。

40

【0053】

(iv) プローブ物質固相化工程

続いて、薄膜を剥離して得られたマイクロビーズの表面に、プローブ物質を固相化するための官能基修飾を行う。

【0054】

修飾する官能基は、例えば、ヒドロキシル基や、アミノ基、カルボキシル基、イソチオシアネート基、エポキシ基、マレインイミド基などであってよい。官能基による修飾は、従来、DNAチップやプロテインチップの製造において、基板表面に核酸鎖やペプチドを固

50

相化するためのリンカーを導入するために行われている。本発明においても、同様の手法を採用し得る。

【0055】

具体例として、ビーズ表面にヒドロキシ基を修飾する場合について説明する。この場合、まず、ビーズ表面をアミノプロピルトリエトキシシラン処理した後、ビーズを  $\gamma$ -バレロラク톤を溶解したジメチルホルムアミド (DMF) に浸漬し、反応させることにより、ヒドロキシル基修飾を行うことができる。又は、ビーズ表面をグリシドキシプロピルトリメトキシシラン処理した後、ビーズをテトラエチレングリコールに少量の濃硫酸を添加した混合液中に浸漬し、反応させることにより行うこともできる。

【0056】

最後に、官能基修飾を行ったビーズ表面にプローブ物質を固相化する。例えば、プローブ物質として核酸やペプチドを固相化する場合、ビーズ表面にヌクレオシド溶液又はアミノ酸溶液 (以下、「モノマー溶液」と総称する) を滴下し、ビーズ上でのステップ合成によって固相化を行うことができる。

【0057】

核酸又はペプチドのステップ合成は、所望の塩基配列又はアミノ酸配列に従って、マイクロビーズとなる部分の薄膜上に順次対応する塩基又はアミノ酸を含むモノマー溶液を滴下し、結合反応させる合成サイクルを繰り返すことにより行うことができる。

【0058】

例えば、核酸を固相化する場合、まず、ヌクレオシドを含むモノマー溶液をピペットで滴下し、続けて5-エチルチオテトラゾール溶液を滴下して反応させる。洗浄・乾燥後、酸化溶液を滴下し、反応させて、ヌクレオシド垂リン酸トリエステルをヌクレオシドリノ酸トリエステルに転化する。洗浄後、無水酢酸/テトラヒドロフラン混合溶液を滴下し反応させて、官能基修飾により導入された未反応ヒドロキシル基をキャップ化する。さらに、洗浄・乾燥後、ジクロロ酢酸を含むジクロロメタン溶液を滴下し、ビーズに連結されたヌクレオシドの5'-ヒドロキシル基からジメトキシトリチル保護基を除去する。この後、洗浄・乾燥を行い、以上の(a)ヌクレオシド連結、(b)洗浄、(c)酸化、(d)洗浄、(e)ジメトキシトリチル保護基の除去及び(f)洗浄の各工程を繰り返し、最後に核酸塩基部の脱保護を行う。これにより、所望の塩基配列の核酸を固相化することができる。

【0059】

また、ペプチドを固相化する場合には、例えば、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を含むモノマー溶液を滴下し、各種縮合方法に従いビーズ上で縮合させる工程を繰り返し、最後に各種保護基を除去する。これにより、所望のアミノ酸配列のペプチドを固相化できる。

【0060】

核酸又はペプチドの固相化は、予め合成した核酸又はペプチドを含む溶液を、マイクロビーズ上に滴下して、導入した官能基と結合させることにより、固相化することもできる。

【0061】

モノマー溶液、及び予め合成した核酸又はペプチド溶液の滴下は、ピペットやマイクロディスペンサーによるスポッティングや、インクジェット式のスポッティングにより行うことができる。なお、上述した剥離工程はプローブ物質の固相化工程後に行ってもよい。この場合、成形工程により基板上に形成されたマイクロビーズとなる部分の薄膜表面にプローブ物質を固相化した後、薄膜を剥離しマイクロビーズを得る。

【0062】

## 2. マイクロビーズ解析方法 (第1例)

### (1) マイクロビーズ解析方法の概要

本発明に係るマイクロビーズ解析方法では、上記で説明したマイクロビーズ1のような表面に識別パターンが形成され、プローブ物質が固相化されたマイクロビーズを用いて、蛍光検出と識別パターン検出を行う。そして、これにより、複数種類のターゲット物質を

10

20

30

40

50

同時に分析する。

【 0 0 6 3 】

具体的には、例えば、マイクロビーズ1を用いて一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) 分析を行う場合、プローブ物質 P A の塩基配列を一の S N P に対応する塩基配列とし、プローブ物質 P B , P C の塩基配列をそれぞれ他の S N P に対応する塩基配列とする。このマイクロビーズ1 A , 1 B , 1 C からなるビーズセットを蛍光標識したサンプル核酸と混合し、各プローブ物質とのハイブリダイゼーション反応を行なう。そして、反応後、各マイクロビーズ表面の蛍光強度の測定と識別パターンの検出を行うことにより、サンプル核酸中に含まれる各 S N P 型の量を測定する。

【 0 0 6 4 】

このように、表面に形成された識別パターンと固相化されたプローブ物質が一对に対応されたマイクロビーズを用いた解析では、蛍光検出と識別パターン検出によって、複数のターゲット物質を同時に分析できる。しかし、一方で、ターゲット物質に標識された蛍光物質やインターカレタから発生する蛍光を検出する際に、識別パターンそのものからノイズ蛍光が発生するという問題がある。

【 0 0 6 5 】

図4に、識別パターンが形成されたマイクロビーズの透過像及び蛍光像の一例を示す。図4は、プローブ物質に蛍光物質を直接標識して固相化したマイクロビーズ1をサンプルホルダー上に分散させて載置し、上方から撮影した画像を示している。図4(A)は透過像、図4(B)は蛍光像である。

【 0 0 6 6 】

図4(B)に示す蛍光像では、マイクロビーズ1に形成された識別パターンから強い蛍光が発生していることが確認される。なお、プローブ物質に標識された蛍光物質からの蛍光は、ビーズの輪郭に沿って強く検出されていることに注意を要する(詳しくは後述する)。

【 0 0 6 7 】

このような識別パターンに起因した蛍光は、ビーズ表面の蛍光強度に基づいてターゲット物質の量を測定しようとするときに、ノイズ蛍光となり、測定誤差の要因となる。さらに、各マイクロビーズにはパターン形状の異なる識別パターンが形成されており(図2、マイクロビーズ1 A , 1 B , 1 C 参照)、パターン形状の違いによって各ビーズで発生するノイズ蛍光の強度にばらつきが生じる場合がある。この場合には、各マイクロビーズ間でノイズ蛍光の影響を補正して、ターゲット物質の量を算出する処理が必要となり、解析速度が低下する原因となる。

【 0 0 6 8 】

また、図4(A)に示す透過像では、干渉縞(ニュートンリング)の発生が確認される。このような干渉縞は、部材同士(ここでは、マイクロビーズとサンプルホルダー)が密着する際に両者の間に生じる隙間(空気層)が一定間隔以下の場合に発生する。干渉縞の発生は、画像識別手段による透過像からの識別パターンの検出を困難とし、また蛍光像に蛍光強度のムラを生じさせる原因ともなる。

【 0 0 6 9 】

本発明に係るマイクロビーズ解析方法では、識別パターンに起因したノイズ蛍光や干渉縞を排除して、ターゲット物質に標識された蛍光物質等からの蛍光を検出するために、次のような手順を採用する。以下、本発明に係るマイクロビーズ解析方法に用いられるマイクロビーズ解析装置の概略構成の第1例を示す図5、図6も参照しながら、上記のマイクロビーズ1を用いる場合を例に、マイクロビーズ解析方法の具体的手順を説明する。

【 0 0 7 0 】

(2) マイクロビーズ解析装置(第1例)

始めに、マイクロビーズ解析装置の構成概略を説明する。図5中、符号32は、測定基板31上に載置されたマイクロビーズ1の透過像を取得するための光源を、符号33は蛍光像を取得するための光源を示す。光源32にはハロゲンランプや水銀灯などが、光源3

10

20

30

40

50

3には半導体レーザーなどが用いられる。光源32からマイクロビーズ1に照射されて反射、透過等した光は、レンズ34によって画像取得手段35に集光される。同様に、光源33からのレーザー光照射によって、マイクロビーズ1表面に分離されたターゲット物質に標識された蛍光物質等から発生する蛍光は、レンズ34によって画像取得手段35に集光される。画像取得手段35は、CCDやCMOS素子等のエリア撮像素子によって構成でき、マイクロビーズ1の透過像と蛍光像を撮像して、それぞれ画像識別手段36及び蛍光検出手段37に出力する。符号38は、画像識別手段36及び蛍光検出手段37から検出された識別パターンと蛍光強度の出力を受けて、これらを統合して解析結果を提示する解析手段を示す。なお、図5では、画像識別手段36及び蛍光検出手段37、解析手段38を別体に構成した場合を示しているが、これらは汎用のコンピューターとプログラム、ディスプレイ等によって一体に構成してもよい。

10

#### 【0071】

測定基板31の表面には、干渉縞の発生を防止するため、凹凸処理が施されている(図6参照)。干渉縞は、測定基板31とこれに保持されたマイクロビーズ1との間に一定間隔以下の間隙(空気層)が存在する場合に発生する。測定基板31の表面に形成された凹凸構造311は、凸部によってマイクロビーズ1を支持して、凹部とマイクロビーズ1との間隙を一定間隔以上に維持することによって干渉縞の発生を防止する。測定基板31の凹凸処理は、表面をサンドブラストであらしたり、表面にアンチニュートンリング性フィルムを積層したりすることによって行うことができる。アンチニュートンリング性フィルムには、部材上に無機顔料を分散した塗布液を塗布することなどにより部材の片面あるいは両面を凹凸処理したフィルムを用いることができる。アンチニュートンリング性フィルムは、ガラスビーズや樹脂粒子などをバインダに分散した塗布液により凹凸を有する塗膜を形成した透明性に優れたフィルムを用いることが好ましい。

20

#### 【0072】

##### (3) マイクロビーズ解析方法の具体的手順

##### (i) 反応手順

まず、マイクロビーズ1を、ターゲット物質を含むサンプルと混合し、ビーズ表面に固相化されたプローブ物質とターゲット物質とを相互作用させ、ビーズ表面にターゲット物質を捕捉する。

#### 【0073】

マイクロビーズ1とサンプルの混合は、ターゲット物質を蛍光物質で標識した後に行うか、ターゲット物質とプローブ物質の相互作用によって形成される複合体に取り込まれて蛍光を発するインターカレータの存在下で行う。

30

#### 【0074】

##### (ii) 保持手順

次に、マイクロビーズ1を回収し、必要に応じて洗浄を行ってビーズに吸着したターゲット物質以外の物質(夾雑物)を取り除いた後、マイクロビーズ解析装置の測定基板31上にマイクロビーズ1を分散させて載置する(図6参照)。

#### 【0075】

測定基板31上に分散されたマイクロビーズ1は、略平行に対向する2つの面(上面11及び下面12)のいずれかが測定基板面に接触するように方向付けされ、測定基板31上に保持される。この方向にマイクロビーズ1を保持することで、測定基板面に対向して配設された画像取得手段35により、上面11及び/又は下面12のコード領域に形成された識別パターンを撮像することが可能となる。

40

#### 【0076】

この測定基板31上でのマイクロビーズ1の方向付けは、マイクロビーズ1の厚みHを、上面11(あるいは下面12)の径Dより小さく設定してマイクロビーズ1全体を盤形状とすることで、より確実に行われるようにすることができる。

#### 【0077】

##### (iii) 検出手順

50

## (a) 識別パターンの検出

続いて、測定基板 3 1 上に保持されたマイクロビーズ 1 に対して、光源 3 2 , 3 3 からの光を照射し、画像取得手段 3 5 によってマイクロビーズ 1 の透過像及び蛍光像を撮像する。

## 【 0 0 7 8 】

このとき、上記保持手順において、マイクロビーズ 1 を上面 1 1 又は下面 1 2 のいずれかが測定基板面に接触するように方向付けして測定基板 3 1 上に保持したことで、画像取得手段 3 5 により撮像される透過像に確実に識別パターンが含まれるようにできる。また、測定基板 3 1 の表面に凹凸構造 3 1 1 を形成したことによって干渉縞のない透過像と、

10

## 【 0 0 7 9 】

画像取得手段 3 5 によって撮像された透過像は、画像識別手段 3 6 に出力される。画像識別手段 3 6 は、透過像から識別パターンを検出し、電氣的信号として解析手段 3 8 に出力する。識別パターンの検出は、汎用の画像解析プログラム又はこれを適宜改良したものをを用いて行うことができる。

## 【 0 0 8 0 】

なお、干渉縞の発生は、液体中においてマイクロビーズ 1 を測定基板 3 1 上に載置する方法によっても防止することができる。干渉縞は、測定基板 3 1 とこれに保持されたマイクロビーズ 1 との間に一定間隔以下の間隙（空気層）が存在する場合に発生する。このため、マイクロビーズ 1 を液体中において測定基板面上に載置すれば、測定基板 3 1 とマイ

20

## 【 0 0 8 1 】

具体的には、マイクロビーズ 1 を液体に懸濁された状態で測定基板 3 1 に滴下し、測定基板 3 1 上に載置する。滴下した液体が乾燥により失われるおそれがある場合には、適宜液体を追加滴下し、ビーズが常時液体中に含まれた状態で測定基板 3 1 上に載置されているようにする。なお、ここで使用される液体は、マイクロビーズ 1 と同じ屈折率の液体であることが好ましいが、上記反応手順で用いられる緩衝液やそれよりも塩濃度を高めた緩衝液が望ましい。

## 【 0 0 8 2 】

## (b) 蛍光の検出

画像取得手段 3 5 によって取得された蛍光像は、蛍光検出手段 3 7 に出力される。蛍光検出手段 3 7 は、この蛍光像の所定領域からの蛍光を検出して、蛍光強度を電氣的信号に変換して解析手段 3 8 に出力する。

30

## 【 0 0 8 3 】

図 7 に、蛍光検出手段 3 7 による蛍光検出領域（図中、符号 L 参照）を示す。

## 【 0 0 8 4 】

既に説明したように、マイクロビーズ 1 は、上面 1 1 又は下面 1 2 のいずれかが測定基板面に接触するように方向付けして測定基板 3 1 上に保持される。このため、測定基板面に対向して配設された画像取得手段 3 5 により取得される蛍光像は、図に示すように、上面 1 1 あるいは下面 1 2 方向から撮像された画像となる。

40

## 【 0 0 8 5 】

蛍光検出手段 3 7 は、この蛍光像のうち、上面 1 2 又は下面 1 3 のうち識別パターンが形成されていない領域（非コード領域 1 1 2）からの蛍光を検出する。識別パターンが形成されたコード領域 1 1 1 を含まない領域からの蛍光を検出することで、コード領域 1 1 1 に形成された識別パターンから発生するノイズ蛍光（図 4（B）参照）を排除して蛍光の検出を行うことができる。

## 【 0 0 8 6 】

さらに、蛍光検出手段 3 7 は、蛍光像のうち、マイクロビーズ 1 の輪郭領域からの蛍光をも同時に検出する。マイクロビーズ 1 の輪郭領域では、側面 1 3 からの蛍光が集積されて強い蛍光が検出される（図 4（B）参照）。そのため、輪郭領域からの蛍光を同時に検

50

出することで、S/N比を大きくして解析手段38への信号出力を高めることが可能となる。

【0087】

蛍光検出手段37による蛍光検出領域Lの設定は、例えば以下のようにして行うことができる。

【0088】

まず、蛍光像から任意の色配列を取り出すことによって、あるいは色情報から再計算することによって、蛍光像をモノクロ画像として算出し、画像の2値化を行う。次に、所定の輝度を閾値として0, 1に2値化する。続いて、輝度が0から1又は1から0に変化する点を計算し、エッジ(輪郭)を抽出する。

10

【0089】

次に、予め記憶されたコード領域111の大きさを参照して、エッジ内の領域のうち非コード領域112を特定する。そして、エッジを含む周領域(輪郭領域)を設定し、その周幅wを該領域に非コード領域112が含まれ、かつコード領域111が含まれない幅にまで拡張し、蛍光検出領域Lとして設定する。

【0090】

蛍光検出領域Lは、コード領域111を含まず、輪郭領域を含む領域であればよく、図に示したように、輪郭領域の全部と非コード領域112の一部を含む場合に限られず、輪郭領域の全部と非コード領域112の全部、あるいは両領域のそれぞれ一部を含む領域であってもよい。また、蛍光検出領域Lの設定は、上記方法に限られず、使用するマイクロピーズの形状(三角柱形状や四角柱形状等の多角柱形状)に応じて適切な方法によって設定され得るものとする。

20

【0091】

以上のように、本発明に係るマイクロピーズ解析方法では、マイクロピーズの非コード領域と輪郭領域からの蛍光を検出することで、コード領域に形成された識別パターンから発生するノイズ蛍光を排除して高い強度の蛍光を検出することができる。そのため、この方法によれば、ターゲット物質の分析を高感度に行うことができ、高精度な定量を行うことが可能である。

【0092】

以上は、蛍光像を上面11あるいは下面12方向から撮像する場合について説明したが、本発明はこれに限定されるものではない。

30

【0093】

3. マイクロピーズ解析方法(第2例)

(1) マイクロピーズ解析装置(第2例)

図8は本発明に用いるマイクロピーズ解析装置の第2例を示している。なお、上述した第1例のマイクロピーズ解析装置と同じ部材には同じ符号を付して説明する。

【0094】

第2例のマイクロピーズ解析装置では、図5、6のように、測定基板31上のマイクロピーズ1を撮像してもよいが、図8のように流路61を設け、該流路61内のマイクロピーズ1を撮像することもできる。

40

【0095】

流路61は特に限定されないが、ガラス、石英、透明樹脂等の可視光及び蛍光が透過可能な透明材料をエッチングして流路61を形成したもの、或いは成型加工して流路61を形成したもの、或いは透明材料の管を用いることが望ましい。流路61の構造や、流路61に液体を送りこむポンプ等の設定は特に限定されないが、流路61内でのマイクロピーズ1の向きを、後述する光源や画像取得手段に対して固定する手段を設けることが望ましい。

【0096】

固定手段としては、例えば、マイクロピーズが通過しない程度の間隔で配置されたピラー構造を設けて堰き止めたり、マイクロピーズの厚みHより浅く、かつ、マイクロピーズ

50

より一回り大きいディンプル構造を設け、そこに流し込んで固定したり、あるいは、いわゆるフローサイトメーターのようにマイクロビーズを1つずつ流して、流路61内のマイクロビーズ1の向きを方向付けても良い。

【0097】

光源32、33からの光を、流路61内又は測定基板31上のマイクロビーズ1に照射し、画像取得手段65、66によって透過像及び蛍光像を撮像する。画像取得手段65、66はCCDやCMOS等のエリア撮像素子により構成することができる。また、第1例のマイクロビーズ解析装置と同様に、レンズ63、64によって集光した光を、撮像することが望ましい。

【0098】

透過像を取得するための画像取得手段65と、蛍光像を取得するための画像取得手段66は別々に設けることができる。例えば、透過像用の画像取得手段65はマイクロビーズ1の上面11又は下面12と対面し、上面11又は下面12から反射、透過等した光を取得し、上面11又は下面12の透過像を撮像する。また、蛍光像用の画像取得手段66はマイクロビーズ1の側面13と対面し、その側面13から放出された蛍光を取得して、側面13の蛍光像を撮像する。

【0099】

なお、画像取得手段65、66の設置場所は特に限定されない。例えば、反射鏡等の反射により、上面11又は下面12の透過像と、側面13の蛍光像を撮像可能であれば、透過像用の画像取得手段65を上面11、下面12のいずれとも対面しない位置に配置してもよく、蛍光像用の画像取得手段66を側面13と対面しない位置に配置してもよい。

【0100】

次に、第2例のマイクロビーズの解析装置を用いた解析方法の具体的手順について説明する。

(2) マイクロビーズ解析方法の具体的手順

例えば、上記「2. マイクロビーズ解析方法(第1例)」の「(i)反応手順」と同様の方法でマイクロビーズ1にターゲット物質を捕捉させ、そのマイクロビーズ1を検出作業に用いる。

【0101】

(i) 通流手順

マイクロビーズ1を液体と懸濁した状態で流路61内を流し、画像取得手段65、66により撮像される撮像位置を通過させる。この液体は、マイクロビーズ1と同じ屈折率であることが好ましいが、ターゲット物質捕捉の際に用いた緩衝液やそれよりも塩濃度を高めた緩衝液のように、ターゲット物質を変性・解離させず、ターゲット物質の保持に適した液体が望ましい。また、流路61内に空気等の泡が入り込まないようにすることが望ましい。

【0102】

(ii) 検出手順

(a) 識別パターンの検出

流路61の撮像位置を通るマイクロビーズ1に光源32、33からの光を照射し、画像取得手段65、66により、透過像及び蛍光像を撮像する。透過像用の画像取得手段65が、直接又は光学手段(レンズ63、反射鏡等)を介して識別パターンが形成された領域と対面していれば、撮像される透過像には確実に識別パターンが含まれる。

【0103】

第1例のマイクロビーズ解析装置の場合と同様に、撮像された透過像は画像識別手段36に出力され、解析手段38で識別パターンを検出することができる。

【0104】

(b) 蛍光の検出

蛍光像用の画像取得手段66は、直接又は光学手段(レンズ64、反射鏡等)を介してマイクロビーズ1の側面13とは対面するが、上面11又は下面12とは対面しない。す

10

20

30

40

50

なわち、蛍光用の画像取得手段 6 6 は識別パターンが形成された面と対面せず、識別パターンに起因した蛍光が入射しないから、ノイズ蛍光を排除して蛍光の検出を行うことができる。

【 0 1 0 5 】

図 9 ( A )、( B ) はマイクロビーズ 1 の側面 1 3 を撮影した蛍光像であり、図 9 ( A ) は相補的なターゲット物質を作用させたもの (フルマッチ)、図 9 ( B ) は非相補的なターゲット物質を作用させたもの (ミスマッチ) である。

【 0 1 0 6 】

蛍光物質からの蛍光は、マイクロビーズ 1 の輪郭部分、即ち、マイクロビーズ 1 の側面 1 3 で集光され、強く放出されるから、図 9 ( A )、( B ) に示すように、側面 1 3 から  
10  
の蛍光像は、フルマッチとミスマッチの差が顕著になる。すなわち、側面 1 3 から蛍光像を撮像することで、S / N 比を大きくして、蛍光検出手段 3 7 から解析手段 3 8 への信号出力を高めることが可能となる。

【 0 1 0 7 】

なお、識別パターンをより高精度に検出するには、透過像用の画像取得手段 6 5 の光軸を上面 1 1 又は下面 1 2 に対して垂直にし、上面 1 1 又は下面 1 2 に垂直な方向から透過像を撮影することが望ましく、また、S / N 比を高めるためには、蛍光像用の画像取得手段 6 6 の光軸を側面 1 3 に対して垂直にし、側面 1 3 に垂直な方向から蛍光像を撮影することが望ましい。ここで、画像取得手段 6 5、6 6 の光軸とは、例えばその受光部を構成  
20  
するレンズの光軸のことである。

【 0 1 0 8 】

以上説明した通り、本発明のマイクロビーズ解析装置及びマイクロビーズ解析方法は、S / N 比が大きいから、高感度に蛍光を評価できる。また、マイクロビーズ 1 の側面 1 3 から蛍光像を撮影する場合、上面 1 1 又は下面 1 2 に非コード領域 1 1 2 を形成する必要が無いから、マイクロビーズ 1 の小型化が可能であり、スループット (単位時間当たりの処理能力) を高くすることができる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 0 9 】

本発明に係るマイクロビーズ解析方法は、ターゲット物質に標識された蛍光物質等からの蛍光を、識別パターンに起因したノイズ蛍光の影響を排除して、高精度に検出できるため、マイクロビーズを用いた各種生化学分析の一層のハイスループット化・高速化に寄与  
30  
し得る。

【 符号の説明 】

【 0 1 1 0 】

- 1, 1 A, 1 B, 1 C   マイクロビーズ
- 1 1   上面
- 1 2   下面
- 1 3   側面
- 1 1 1   コード領域
- 1 1 2   非コード領域
- 2   貫通孔
- P A, P B, P C   プローブ物質
- 3 1   測定基板
- 3 1 1   凹凸構造
- 3 2, 3 3   光源
- 3 4、6 3、6 4   レンズ
- 3 5   画像取得手段
- 3 6   画像識別手段
- 3 7   蛍光検出手段
- 3 8   解析手段

10

20

30

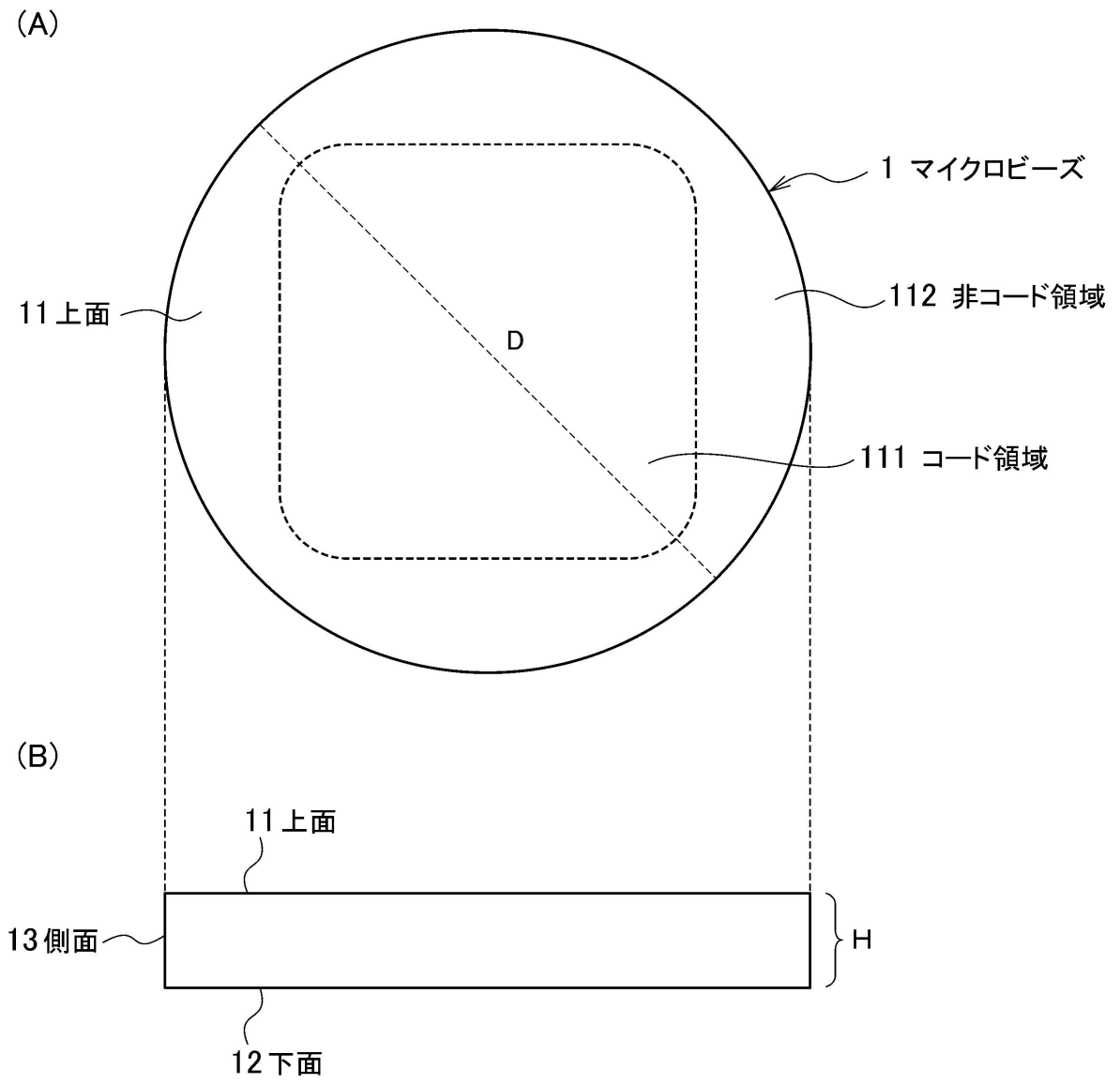
40

50

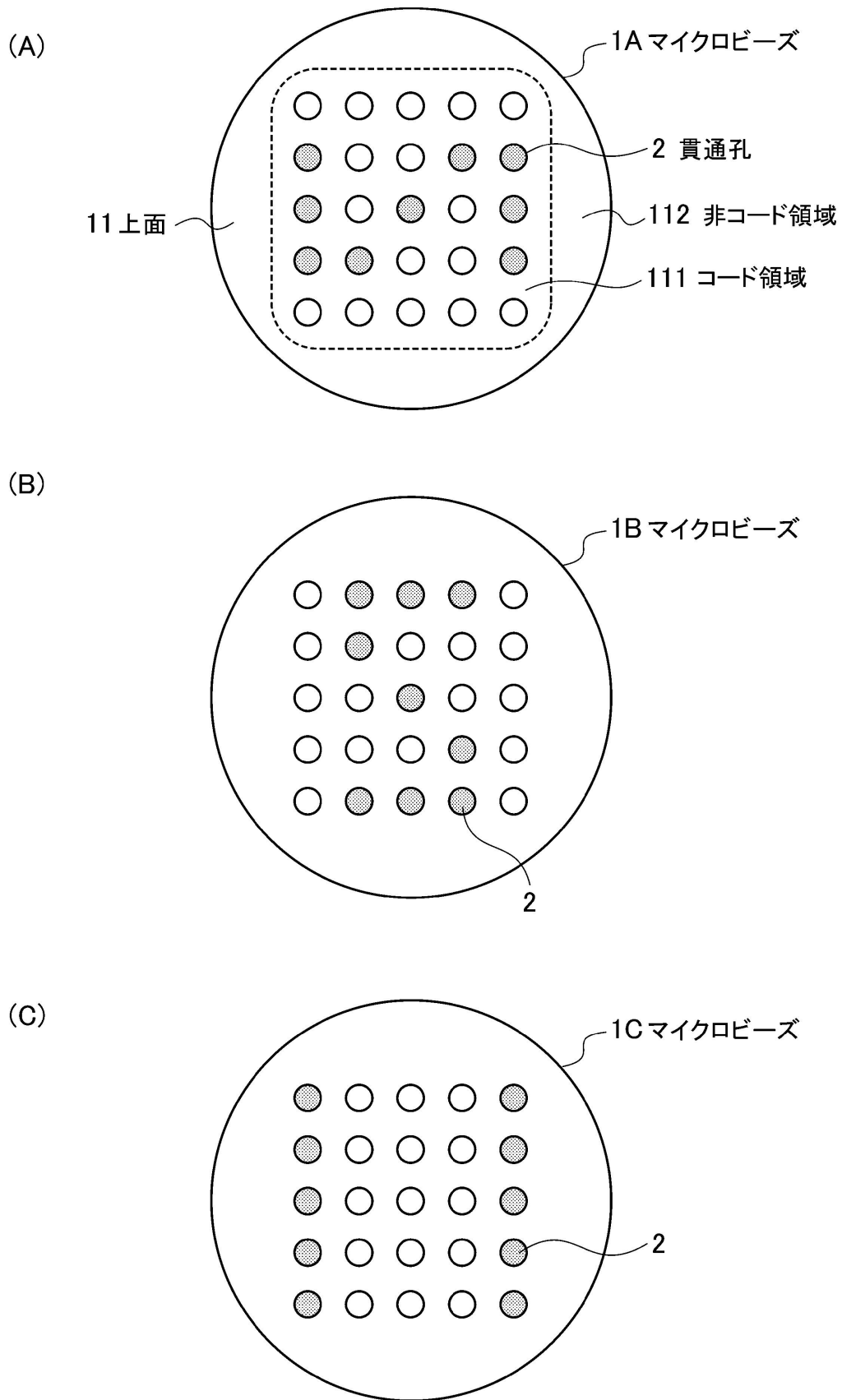


- 6 1 流路
- 6 5 透過像用の画像取得手段
- 6 6 蛍光像用の画像取得手段
- L 蛍光検出領域

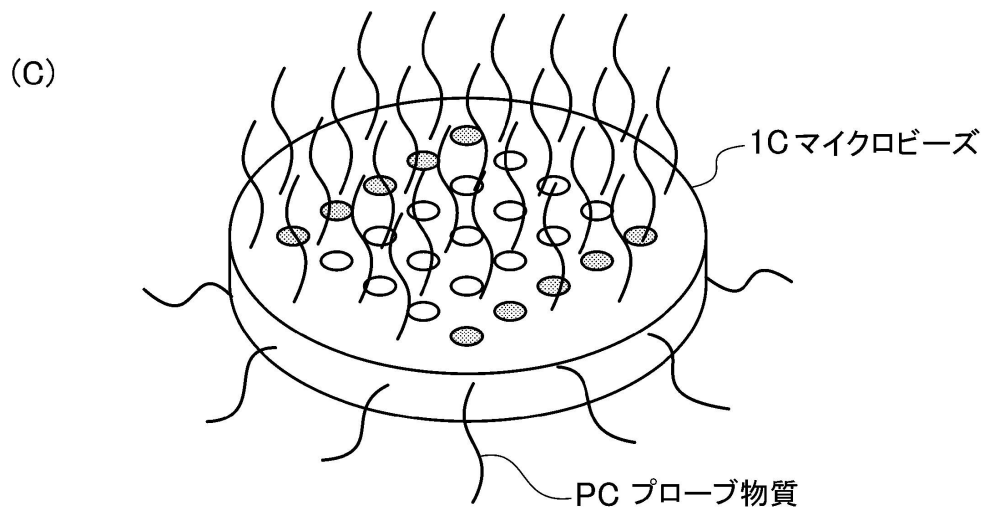
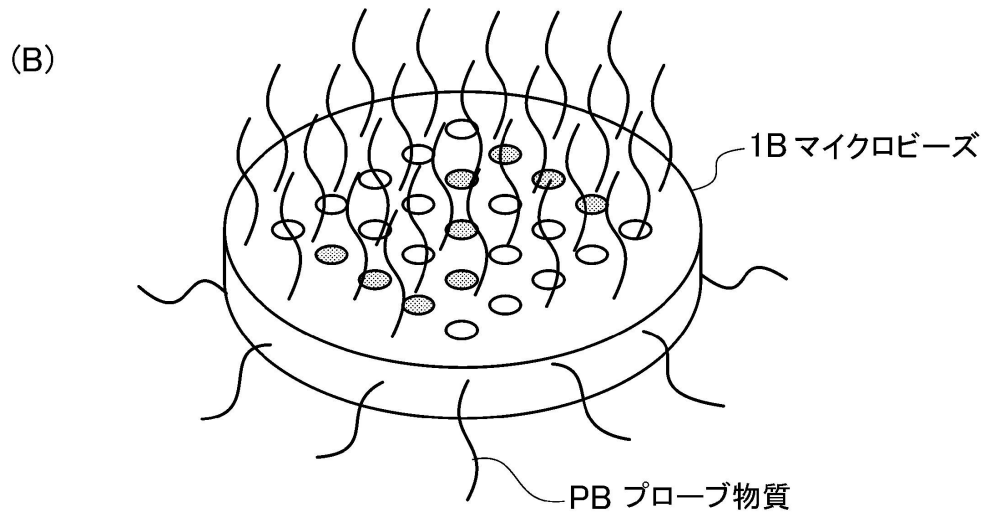
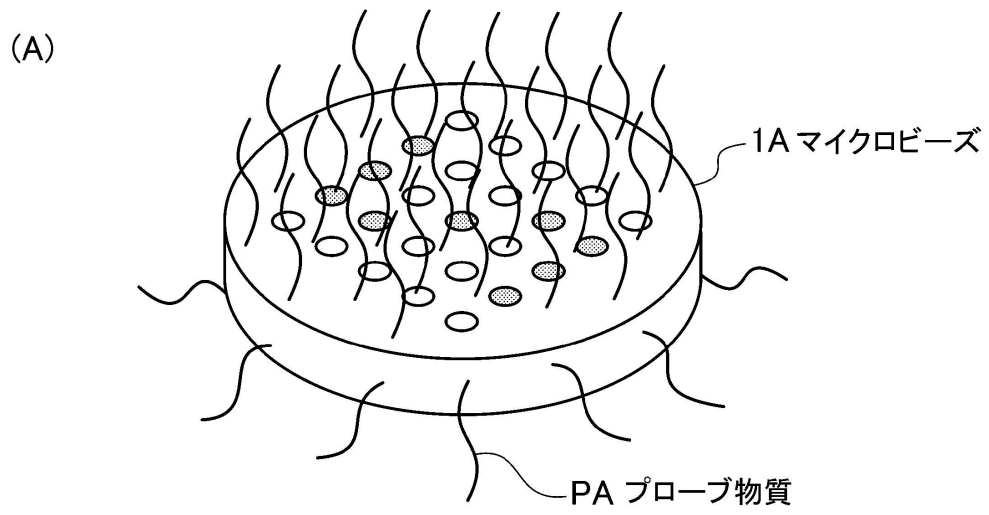
【図1】



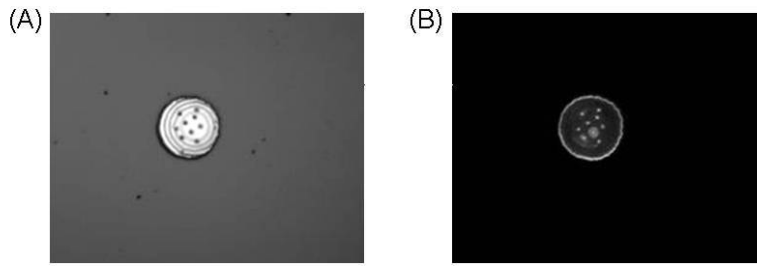
【図2】



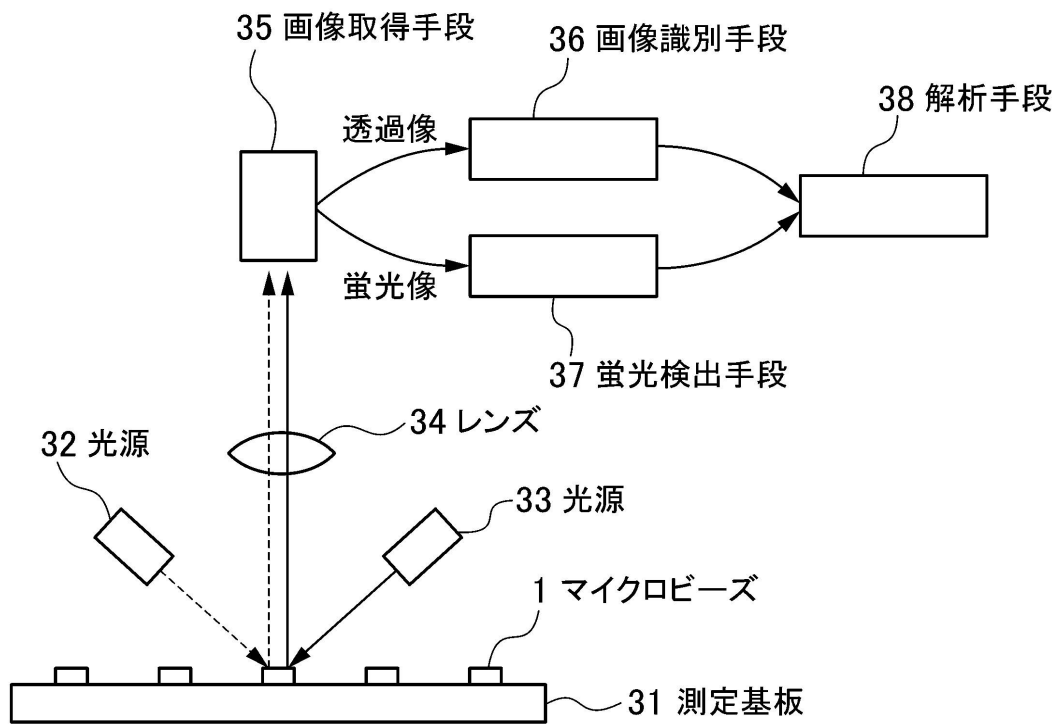
【図3】



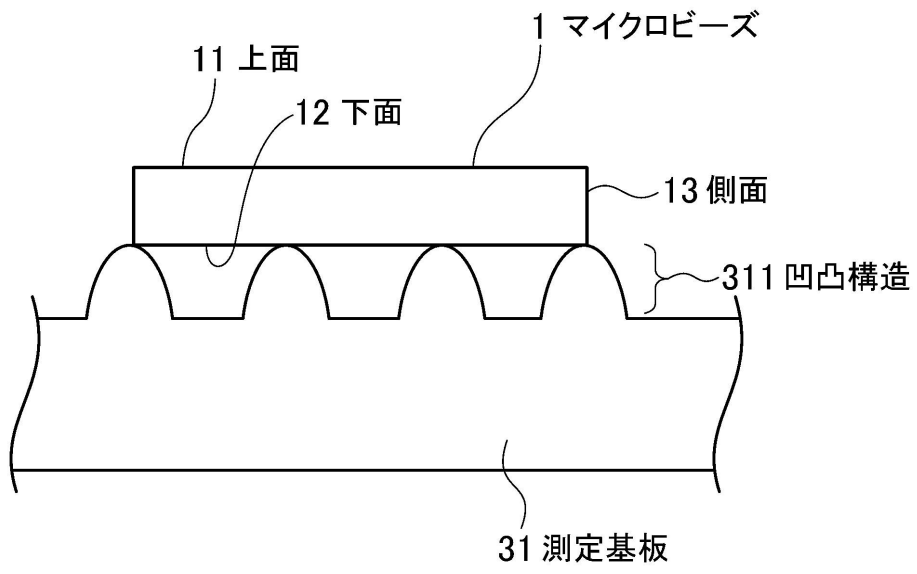
【図4】



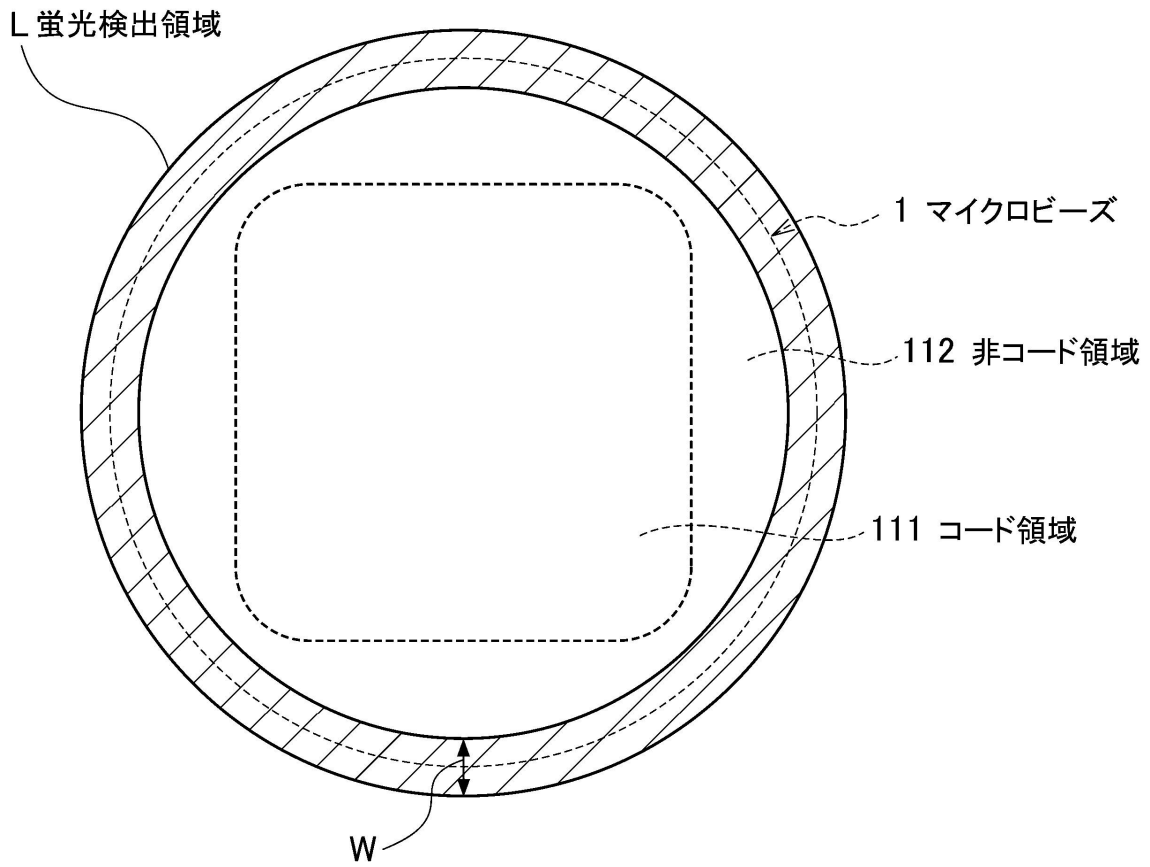
【図5】



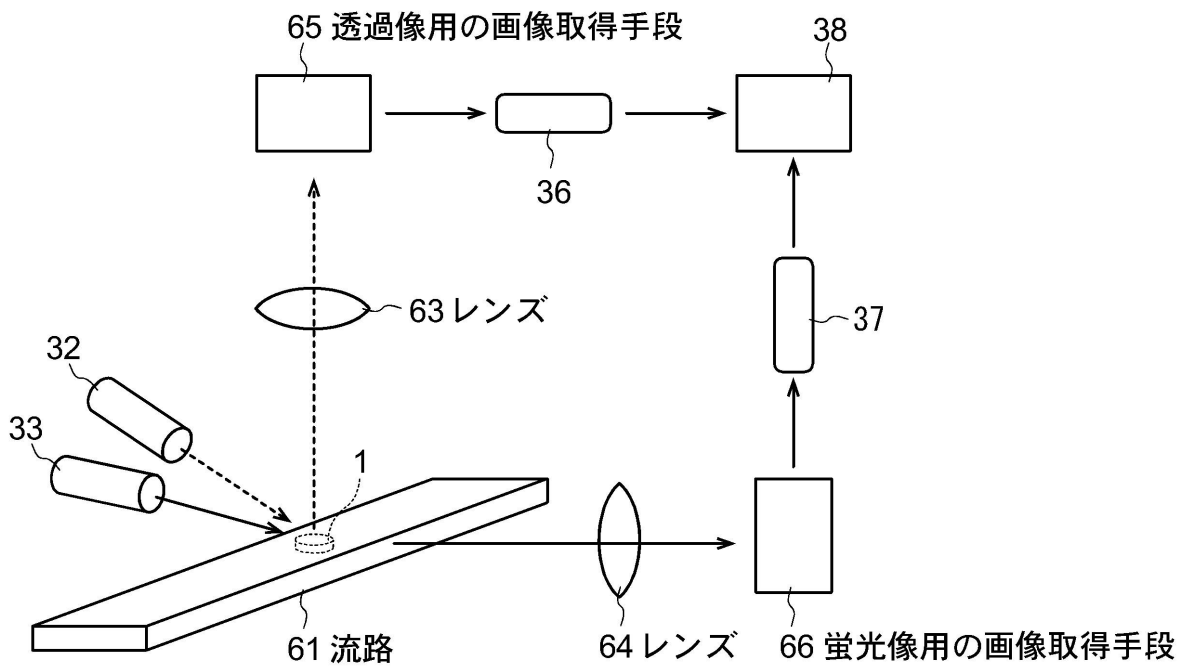
【図6】



【図7】



【図8】



【 図 9 】



(A)



(B)



## フロントページの続き

- (72)発明者 市村 真理  
東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内
- (72)発明者 伊東 和峰  
東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内
- (72)発明者 岸本 拓哉  
東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内

審査官 田中 洋介

- (56)参考文献 特表2010-506174(JP,A)  
国際公開第2008/063758(WO,A2)  
特表2005-535874(JP,A)  
特表2005-536725(JP,A)  
特開2009-270946(JP,A)  
特開2009-098049(JP,A)  
特開2008-304440(JP,A)  
Daniel C. Pregibon et al., Multifunctional Encoded Particles for High-Throughput Biomolecule Analysis, Science, 2007年, Vol.315 No.5817, pp.1393-1396

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/74  
G01N 33/48 - 33/98  
JMEDPlus(JDreamIII)  
JSTPlus(JDreamIII)