

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6775223号  
(P6775223)

(45) 発行日 令和2年10月28日(2020.10.28)

(24) 登録日 令和2年10月8日(2020.10.8)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 B
GO 1 N 21/03 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 21/03 Z
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	GO 1 N 37/00 I O 1
	C 1 2 M 1/34 B

請求項の数 4 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2018-547122 (P2018-547122)	(73) 特許権者 000005049 シャープ株式会社 大阪府堺市堺区匠町 1 番地
(86) (22) 出願日 平成29年7月20日 (2017.7.20)	(73) 特許権者 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号
(86) 国際出願番号 PCT/JP2017/026180	(74) 代理人 110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK
(87) 国際公開番号 W02018/078967	(72) 発明者 飯塚 邦彦 大阪府堺市堺区匠町 1 番地 シャープ株式 会社内
(87) 国際公開日 平成30年5月3日 (2018.5.3)	
審査請求日 平成31年4月25日 (2019.4.25)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-211121 (P2016-211121)	
(32) 優先日 平成28年10月27日 (2016.10.27)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光検査システム、分子検査方法及び蛍光検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検査対象に励起光を照射する励起用光源と、  
フォトダイオードにより光を検知する光子検知部を備えたシリコン集積回路と、  
上記フォトダイオード上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔を備えた保持層と

、  
保持された上記検査対象に上記励起用光源にて励起光を照射させ、上記検査対象から放出される蛍光を上記励起光の消光後に、上記光子検知部にて検知させる制御部とを備え、  
上記保持層の対向位置には、隔壁部を有する蓋が上記保持層の方向に向かって移動可能に設けられていると共に、上記蓋を移動して上記隔壁部を上記保持層に接触させることによつて、上記隔壁部を有する蓋によつて形成される凹部、及び上記保持層の貫通孔にて上記検査対象を隔離する隔離室が形成されることを特徴とする蛍光検査システム。

【請求項 2】

検査対象に励起光を照射する励起用光源と、  
フォトダイオードにより光を検知する光子検知部を備えたシリコン集積回路と、  
上記フォトダイオード上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔を備えた保持層と

、  
保持された上記検査対象に上記励起用光源にて励起光を照射させ、上記検査対象から放出される蛍光を上記励起光の消光後に、上記光子検知部にて検知させる制御部とを備え、  
上記シリコン集積回路は、ヒーターと温度センサとを内蔵していることを特徴とする蛍

光検査システム。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の蛍光検査システムを用いて、複数の隔離室にて並列的に遺伝子増幅反応を行うことを特徴とする分子検査方法。

【請求項 4】

検査対象に励起光を照射する励起用光源と、

フォトダイオードにより光を検知する光子検知部を備えたシリコン集積回路と、

上記フォトダイオード上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔を備えた保持層と、

保持された上記検査対象に上記励起用光源にて励起光を照射させ、上記検査対象から放出される蛍光を上記励起光の消光後に、上記光子検知部にて検知させる制御部とを備え、上記貫通孔は、上記フォトダイオードの上に、複数個設けられている蛍光検査システムを用いた蛍光検査方法であって、

励起光の照射中にフォトダイオードに入射する該励起光の光子を検知する光子検知工程と、

上記励起光を照射した後、上記検査対象から放射される蛍光を上記励起光の消光後に検知する蛍光検知工程と、

検査対象である生体又は非生体の微粒子を含む液体を上記蛍光検査システムの上に形成されたマイクロ流体路に流す流液工程と、

上記光子検知工程で検知された励起光の光子の情報に基づいて、フォトダイオードの上に形成されている貫通孔のうち、何個の貫通孔に上記微粒子が捕捉されているかを推定する推定工程とを含んでいることを特徴とする蛍光検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微小な生体又は非生体試料等の検査対象からの蛍光現象を観察することによって、特定の検査対象を検出する蛍光検査システム、分子検査方法及び蛍光検査方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、蛍光検査によって多数の細胞を一括して検査する手法として、例えば非特許文献 1 に開示された方法が知られている。

【0003】

非特許文献 1 に開示されたバイオ分子検出方法は、検体溶液を極めて多数の微小溶液に分割し、各微小溶液から出射される蛍光信号を 2 値化し、「検出バイオ分子が存在するか又は存在しないか」だけを判別して、検体溶液中のバイオ分子の分子濃度を推定する方法である。この方法は、既存のアナログ計測による方法と比較した場合、検出感度及び定量性の点で格段に優れている。

【0004】

しかしながら、各微小溶液から蛍光信号を検出するためには、蛍光顕微鏡を用いて、該蛍光信号を出力している微小溶液の数を数え上げることが必要である。そのため、装置が大型、複雑化するという課題がある。

【0005】

ところで、DNA (deoxy ribo nucleic acid: デオキシリボ核酸) を高感度に検出するために、例えば、PCR (polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) により特定の遺伝子を増幅する PCR 法がよく使われている。PCR で増幅した DNA は、アガロースゲル電気泳動法、蛍光プローブ法等により定量化される。

【0006】

PCR 法を用いて DNA (deoxy ribo nucleic acid: デオキシリボ核酸) を高精度及び高感度に検出するために、例えば、非特許文献 1 及び非特許文献 2 に記載されている

10

20

30

40

50

ような、多数のチャンバーに試料溶液を分取して、各チャンバーにてPCRを行い、PCRが確認されたチャンバー数から、試料中の初期DNAの分子数を推定するデジタルPCR法も使われている。

#### 【0007】

デジタルPCR法は、多数のチャンバーでのPCR後の反応を確認することによって、ポジティブチャンバーの割合から、平均サンプル数を推定するものである。ポジティブ反応を示したチャンバーの全チャンバーに対する割合を  $p$  とし、各チャンバーに初期状態で存在したDNAの平均数を  $n$  とすると、平均数  $N$  は、ポワソン分布に基づいて、

$$N = - \ln(1 - p)$$

となることが知られている。例えば、図8の(a)に示すように、96個のチャンバーのうち、白丸以外がポジティブチャンバーであり、その数は  $96 - 35 = 61$  である。その結果、  $p = 61 / 96 = 0.635$  であり、図8の(b)に示すように、  $1 - p = 35 / 96 = 0.365$  である。

#### 【0008】

この結果、例えば、  $n$  が7の場合、ネガティブセルの割合が0.1%未満となり、その数が有意に検出できるためには、数千個以上のセルが必要になる。1万セルを使った場合、推定できる  $n$  の上限は10程度になる。それ以上の  $n$  に対しては、ネガティブセルの確率が有意に検出できなくなり、  $n$  の推定が不可能になる。

#### 【0009】

一方、上記蛍光プローブ法を使うリアルタイムPCRにおいては、蛍光を観測しながら増幅過程を進め、検出閾値への到達時間から初期サンプル数を推定するため、推定できる  $n$  の範囲を格段に広げることができる。ただし、その精度は、一般にデジタルPCRと比較して劣る。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0010】

【非特許文献1】Monya Baker, "Digital PCR hits its stride," Nature Methods VOL.9, JUNE2012, P.541-544

【非特許文献2】野地博行, 「バイオ分子の1分子デジタル係数法」、physics News, 2011, パリティ Vol27 No.01 2012-01, P.75-77

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

しかしながら、上記従来の非特許文献1・2に開示された蛍光検査システムでは、多数の微小検体からの蛍光信号を一括検出するデジタル計測において、蛍光顕微鏡を使用するので、蛍光検査システムが大型化、複雑化するという問題点を有している。

#### 【0012】

本発明は、上記従来の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システム、分子検査方法及び蛍光検査方法を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

本発明の一態様における蛍光検査システムは、上記の課題を解決するために、検査対象に励起光を照射する励起用光源と、フォトダイオードにより光を検知する光子検知部を備えたシリコン集積回路と、上記フォトダイオード上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔を備えた保持層と、保持された上記検査対象に上記励起用光源にて励起光を照射させ、上記検査対象から放出される蛍光を上記励起光の消光後に、上記光子検知部にて検知させる制御部とを備え、上記保持層の対向位置には、隔壁部を有する蓋が上記保持層の方向に向かって移動可能に設けられていると共に、上記蓋を移動して上記隔壁部を上記保持

10

20

30

40

50

層に接触させることによって、上記隔壁部を有する蓋によって形成される凹部、及び上記保持層の貫通孔にて上記検査対象を隔離する隔離室が形成されることを特徴としている。

【0014】

本発明の一態様における分子検査方法は、上記の課題を解決するために、前記記載の蛍光検査システムを用いて、複数の隔離室にて並列的に遺伝子増幅反応を行うことを特徴としている。

【0015】

本発明の一態様における蛍光検査方法は、上記の課題を解決するために、検査対象に励起光を照射する励起用光源と、フォトダイオードにより光を検知する光子検知部を備えたシリコン集積回路と、上記フォトダイオード上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔を備えた保持層と、保持された上記検査対象に上記励起用光源にて励起光を照射させ、上記検査対象から放出される蛍光を上記励起光の消光後に、上記光子検知部にて検知させる制御部とを備え、上記貫通孔は、上記フォトダイオードの上に、複数個設けられている  
蛍光検査システムを用いた蛍光検査方法であって、励起光の照射中にフォトダイオードに入射する該励起光の光子を検知する光子検知工程と、上記励起光を照射した後、前記検査対象から放射される蛍光を上記励起光の消光後に検知する蛍光検知工程と、検査対象である生体又は非生体の微粒子を含む液体を上記蛍光検査システムの上に形成されたマイクロ流体路に流す流液工程と、上記光子検知工程で検知された励起光の光子の情報に基づいて  
、フォトダイオードの上に形成されている貫通孔のうち、何個の貫通孔に上記微粒子が捕捉されているかを推定する推定工程とを含んでいることを特徴としている。

【発明の効果】

【0016】

本発明の一態様によれば、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システム、分子検査方法及び蛍光検査方法を提供するという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の実施形態1における蛍光検査システムの構成を示すものであって、シリコン集積回路上のマイクロ流体路を検査対象を含む溶液が流れ、検査対象が、マイクロウェルに保持された状態を示す断面図である。

【図2】上記蛍光検査システムの一例の構成を示す断面図である。

【図3】本発明の実施形態2における蛍光検査システムの構成を示すものであって、蛍光検査システムの構成を示す断面図である。

【図4】上記蛍光検査システムを用いて検査対象を測定する状態を示すものであって、透明板が保持層側に移動して検査対象を隔離するマイクロチャンバーが形成された状態を示す断面図である。

【図5】本発明の実施形態3の蛍光検査システムを示すものであって、蛍光検査システムの構成を示す断面図である。

【図6】本発明の実施形態4の分子検査方法を示すものであって、蛍光検査システムの構成を示す断面図である。

【図7】(a)は本発明の実施形態5の蛍光検査システムを示すものであって、保持層を省略した蛍光検査システムの構成を示す平面図であり、(b)は蛍光検査システムの構成を示すものであって、マイクロウェルの直下部を除く領域に遮光用メタルを配したシリコン回路基板を示す断面図である。

【図8】(a)(b)は、従来のデジタルPCR法による試料中の初期DNAの分子数を推定する方法を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

〔実施の形態1〕

10

20

30

40

50

本発明の一実施形態について図1及び図2に基づいて説明すれば、以下のとおりである。

【0019】

(蛍光検査システムの構成)

本実施の形態の蛍光検査システムの構成について、図2に基づいて説明する。図2は、本実施の形態の蛍光検査システムの一例の構成を示す断面図である。

【0020】

本実施の形態の蛍光検査システム1は、図2に示すように、フォトダイオード12により光を検知する光子検知部13を備えたシリコン集積回路10と、フォトダイオード12上に検査対象としての例えばタンパク質を保持する保持層30と、励起用光源23と、励起用光源23の発光動作と光子検知部13の検知動作とを同期的に制御する制御部24とを備えている。

10

【0021】

上記シリコン集積回路10は、シリコン回路基板11の上側に配線埋設層15が積層されてなっている。

【0022】

シリコン回路基板11には、フォトダイオード12、及びフォトダイオード12を用いて光を検知する光子検知部13からなる回路が形成されている。フォトダイオード12としては、例えば、シングル・フォトン・アバランシェ・ダイオード(SPAD)を用いることができる。

20

【0023】

上記配線埋設層15には、図示しない配線が埋設されている。

【0024】

また、シリコン集積回路10における配線埋設層15の上側には、保持層30が設けられており、保持層30には貫通孔としてのマイクロウェル31が設けられている。

【0025】

上記保持層30は、例えば、ポリイミド、二酸化珪素( $\text{SiO}_2$ )、ジメチルポリシロキサン(PDMS)等の材料で形成されている。保持層30は、不透明体であることが好ましい。

【0026】

上記マイクロウェル31は、例えば水平断面が円形であると共に、縦断面は保持層30において底部が狭まった逆円錐台の形状となっている。これによって、マイクロウェル31には、数個の検査対象であるタンパク質が保持可能な容量となっている。

30

【0027】

次に、上記保持層30の上方には蓋としての透明板21が設けられており、その結果、保持層30と透明板21との間には流路であるマイクロ流体路22が形成されている。このマイクロ流体路22には、検査対象であるタンパク質が流されるようになっている。

【0028】

また、本実施の形態では、この透明板21は、保持層30側に移動するようになっている。

40

【0029】

上記透明板21の上方には、上記励起用光源23が設けられている。上記励起用光源23は、フォトダイオード12に向けて透明板21を介して励起光を照射させる。励起用光源23は、例えば、半導体発光素子(LED)や有機EL、半導体レーザー等の種々の光源を使用することができる。複数の光源を用いることも可能である。

【0030】

本実施の形態では、励起用光源23により検査対象である例えばタンパク質に励起光を照射してタンパク質又はタンパク質に付加された蛍光プローブから蛍光を放出させる。このため、励起用光源23は、例えば紫外光、近紫外光又は可視光が使用されている。すなわち、蛍光は、紫外光、近紫外光又は可視光を吸収したタンパク質又はタンパク質に付加

50

された蛍光プローブの分子・イオンが励起され、次いで、その分子・イオンが中間励起状態に遷移し、そこから励起光よりも長波長の光を放出して基底状態に戻る現象である。したがって、励起用光源 2 3 によりタンパク質又はタンパク質に付加された蛍光プローブに照射される励起光の波長は、タンパク質又はタンパク質に付加された蛍光プローブから放出される蛍光の波長よりも低波長の成分を含むことが要求される。

#### 【 0 0 3 1 】

制御部 2 4 は、励起用光源 2 3 の点滅と光子検知部 1 3 の駆動とを制御する。

#### 【 0 0 3 2 】

ところで、従来のこの種の蛍光検査システムでは、励起光の波長と蛍光の波長とが異なることを利用して、光学的なフィルタにより両者を分離して、蛍光のみを検知していた。このため、組み込んだフィルタに適した蛍光物質しか検査に使えないということになり、蛍光の種類適用範囲が限定されるという問題点を有していた。

10

#### 【 0 0 3 3 】

ここで、励起状態から基底状態に戻るまでの平均時間を蛍光寿命と呼ぶ。換言すれば、蛍光寿命は、蛍光強度が  $1/e$  に低下するのに要する時間である。尚、その時間を超えると蛍光が無くなるわけではない。実用的にはともかく、理論的には、励起光消光後に蛍光を検知することはいつでも可能である。実用的観点からは、励起光消光後、できるだけ早い時期に検知した方が蛍光が強いので検出し易くなる。目安としては、蛍光寿命の数倍の期間以内で検知することが望ましい。

20

#### 【 0 0 3 4 】

この結果、蛍光寿命を利用すると、励起光と蛍光とを波長により分離する光学フィルタを使わず、励起光の消光後に、放出される蛍光を観測することが可能になる。

#### 【 0 0 3 5 】

そこで、本実施の形態の制御部 2 4 は、保持層 3 0 のマイクロウェル 3 1 に保持された検査対象としてのタンパク質に対して励起用光源 2 3 に励起光を照射するように制御する。そして、その後、励起用光源 2 3 の点灯を停止させる。次いで、光子検知部 1 3 を駆動させて、検査対象としてのタンパク質又はタンパク質に付加された蛍光プローブから放出される蛍光を測定させる。

30

#### 【 0 0 3 6 】

詳細には、制御部 2 4 は励起用光源 2 3 がパルス的に励起光を照射するように制御する。この励起光のパルスの消灯期間中に光子検知部 1 3 を駆動させるように予め設定されている。この結果、光子検知部 1 3 が駆動される期間は、検査対象であるタンパク質又はタンパク質に付加された蛍光プローブからの蛍光のみが放出されるので、光学フィルタを使わず、光子検知部 1 3 は励起光消光後の蛍光を検知するものとなる。

#### 【 0 0 3 7 】

##### ( 蛍光検査システムの測定動作 )

上記構成の蛍光検査システム 1 を用いて検査対象を測定する場合の具体的動作について、図 1 及び図 2 に基づいて説明する。図 1 は、本実施の形態における蛍光検査システム 1 において、シリコン集積回路 1 0 上のマイクロ流体路 2 2 を検査対象であるタンパク質、及びタンパク質に付加された蛍光プローブを含む溶液が流れ、タンパク質及び蛍光プローブが、マイクロウェル 3 1 に保持された状態を示す断面図である。尚、本実施の形態では、検査対象が、例えば、蛍光プローブが付着した特定のタンパク質であるとして説明する。

40

#### 【 0 0 3 8 】

図 2 に示すように、配線埋設層 1 5 とその上方に設けられた透明板 2 1 との間のマイクロ流体路 2 2 に検査対象である蛍光プローブが付加されたタンパク質を供給する。これによって、蛍光プローブが付加されたタンパク質が保持層 3 0 のマイクロウェル 3 1 に保持

50

される。

【 0 0 3 9 】

この状態から、図 1 に示すように、透明板 2 1 を押し下げてマイクロウェル 3 1 に蓋をしたチャンバーを形成する。これによって、蛍光プローブが付加された複数のタンパク質が保持層 3 0 のマイクロウェル 3 1 に充填された状態となる。

【 0 0 4 0 】

次に、制御部 2 4 は、励起用光源 2 3 を点灯させ、一定期間後に消灯させ、その後、減衰しながら発光が継続している蛍光を検知するよう、光子検知部 1 3 を駆動する。具体的には、励起用光源 2 3 はマイクロウェル 3 1 に向けて励起光 L 1 をパルス的にオンオフして照射する。そして、励起用光源 2 3 のオン期間において、測定対象である特定のタンパク質に付加された蛍光プローブは励起用光源 2 3 からの励起光 L 1 を吸収する。これにより、蛍光プローブは蛍光を放出する。このとき、励起光 L 1 も照射されている。そこで、本実施の形態では、励起用光源 2 3 は、パルス的に励起光 L 1 を照射しているので、励起光 L 1 が消光するときがある。これにより、励起光 L 1 が消光しているときであって蛍光が継続している期間中に光子検知部 1 3 が駆動され、光子検知部 1 3 には蛍光のみが受光され、この蛍光のみを検出することができる。

【 0 0 4 1 】

このように、本実施の形態の蛍光検査システム 1 では、検査対象である蛍光プローブが付加されたタンパク質に励起光 L 1 を照射する励起用光源 2 3 と、フォトダイオード 1 2 により光を検知する光子検知部 1 3 を備えたシリコン集積回路 1 0 と、フォトダイオード 1 2 上に設けられて蛍光プローブが付加されたタンパク質を保持する貫通孔としてのマイクロウェル 3 1 を備えた保持層 3 0 と、保持された蛍光プローブが付加されたタンパク質に励起用光源 2 3 にて励起光 L 1 を照射させ、蛍光プローブが付加されたタンパク質から放出される蛍光を励起光 L 1 の消光後に、光子検知部 1 3 にて検知させる制御部 2 4 とを備えている。

【 0 0 4 2 】

この結果、励起光 L 1 の消光後では、蛍光のみが光子検知部 1 3 にて検知される。したがって、励起光 L 1 と蛍光とを光学的なフィルタにより分離することなく蛍光プローブが付加されたタンパク質から放出された蛍光のみを測定することができる。したがって、蛍光の種類に対応する光学的フィルタを使用する必要がなくなるので、蛍光検査システム 1 が複雑化するのを防止することができる。

【 0 0 4 3 】

また、本実施の形態の蛍光検査システム 1 では、フォトダイオード 1 2 による光子検知部 1 3 をシリコン集積回路 1 0 に集積し、フォトダイオード 1 2 上に微小なマイクロウェル 3 1 からなるチャンバーを構成し、チャンバーに保持した蛍光プローブが付加されたタンパク質からの蛍光信号の検出を自動化することができる。

【 0 0 4 4 】

この結果、蛍光検査システム 1 を大型化及び複雑化させる蛍光顕微鏡や観察した蛍光像からの検出数の数え上げのための画像処理が不要になり、所望検査対象のカウント等のデジタル計測が容易にできるようになる。

【 0 0 4 5 】

したがって、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システム 1 を提供することができる。

【 0 0 4 6 】

〔実施の形態 2〕

本発明の他の実施の形態について図 3 及び図 4 に基づいて説明すれば、以下のとおりで

10

20

30

40

50

ある。尚、本実施の形態において説明すること以外の構成は、前記実施の形態 1 と同じである。また、説明の便宜上、前記の実施の形態 1 の図面に示した部材と同一の機能を有する部材については、同一の符号を付し、その説明を省略する。

【 0 0 4 7 】

本実施の形態の蛍光検査システム 2 は、前記実施の形態 1 の蛍光検査システム 1 の構成に加えて、複数の第 1 光子検知部 1 3 a 及び第 2 光子検知部 1 3 b を備えている点と、透明板 4 2 が蓋部 4 2 a と隔壁部 4 2 b とからなっている点と、保持層 4 0 の一部が二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) で形成されている点が異なっている。

【 0 0 4 8 】

( 蛍光検査システムの構成 )

本実施の形態の蛍光検査システム 2 の構成について、図 3 に基づいて説明する。図 3 は、本実施の形態における蛍光検査システム 2 の構成を示す断面図である。尚、図 3 においては、励起用光源 2 3 及び制御部 2 4 を省略している。

【 0 0 4 9 】

本実施の形態の蛍光検査システム 2 は、図 3 に示すように、前記前記実施の形態 1 の蛍光検査システム 1 の構成に加えて、複数の第 1 光子検知部 1 3 a 及び第 2 光子検知部 1 3 b をそれぞれ備えている。これにより、保持層 4 0 には、第 1 光子検知部 1 3 a 及び第 2 光子検知部 1 3 b の上方にそれぞれマイクロウェル 4 1 ・ 4 1 が形成されている。これにより、複数箇所の第 1 光子検知部 1 3 a 及び第 2 光子検知部 1 3 b にて検査対象を同時に検査することが可能となる。尚、本実施の形態では、第 1 光子検知部 1 3 a 及び第 2 光子検知部 1 3 b は 2 つとなっているが、必ずしもこれに限らず、より多くの複数とすることが可能である。

【 0 0 5 0 】

また、保持層 4 0 は、本実施の形態では、その一部が二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) からなっている。具体的には、保持層 4 0 はフォトダイオード 1 2 の近傍が二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) からなっている。これにより、保持層 4 0 は蛍光以外の外光等の迷光を遮断して該迷光がフォトダイオード 1 2 に入射するのを防止すると共に、二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) は自家蛍光が少ないので、検査対象から放射される以外の蛍光がフォトダイオード 1 2 に入射するのを防止することができる。

【 0 0 5 1 】

また、本実施の形態では、保持層 4 0 の上方に設けられた蓋としての透明板 4 2 は、蓋部 4 2 a と隔壁部 4 2 b とからなっている。この結果、蓋部 4 2 a と隔壁部 4 2 b とによって、凹部としての窪み 4 2 c が形成されている。そして、本実施の形態では、透明板 4 2 は保持層 4 0 に向けて移動可能となっている。この結果、後述する図 4 に示すように、透明板 4 2 を移動して隔壁部 4 2 b を保持層 4 0 に接触させることによって、窪み 4 2 c と保持層 4 0 のマイクロウェル 4 1 とによって検査対象を隔離する隔離室としてのマイクロチャンバ 4 3 が形成されるようになっている。

【 0 0 5 2 】

( 蛍光検査システムの測定動作 )

上記構成の蛍光検査システム 2 における測定動作について、図 3 及び図 4 に基づいて説明する。図 4 は、蛍光検査システム 2 用いて検査対象を測定する状態を示すものであって、透明板 4 2 が保持層 4 0 側に移動して検査対象を隔離するマイクロチャンバ 4 3 が形成された状態を示す断面図である。尚、図 4 においては、励起用光源 2 3 及び制御部 2 4 を省略している。

【 0 0 5 3 】

上記構成の蛍光検査システム 2 では、図 3 に示すように、配線埋設層 1 5 とその上方に設けられた透明板 4 2 との間のマイクロ流体路 2 2 に図示しない検査対象である蛍光プローブが付加されたタンパク質を供給する。そして、この状態において、図 4 に示すように、透明板 4 2 を押し下げて、隔壁部 4 2 b の底面を、マイクロウェル 4 1 が形成された二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) からなる保持層 4 0 に密着させる。これによって、窪み 4 2 c とマ

10

20

30

40

50

マイクロウェル 4 1 とによって、マイクロチャンバー 4 3 が形成される。この結果、マイクロチャンバー 4 3 の内部に図示しない蛍光プローブが付加されたタンパク質が充填される。

【 0 0 5 4 】

ここで、二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) からなる保持層 4 0 は、蛍光を発しないため、タンパク質に付加された蛍光プローブからの蛍光と混同する虞れがなく、蛍光検出の精度の向上が見込まれる。また、二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) からなる保持層 4 0 に深いマイクロウェル 4 1 を形成するのは困難であるが、透明板 4 2 の方に形成した窪み 4 2 c と合わせて、マイクロチャンバー 4 3 の深さを大きくすることが可能になる。

【 0 0 5 5 】

このように、本実施の形態における蛍光検査システム 2 は、保持層 4 0 の少なくとも一部は、二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) を用いて形成されている。

【 0 0 5 6 】

例えば、保持層 4 0 が蛍光を発する物質で形成されている場合には、検査対象からの蛍光と保持層 4 0 からの蛍光との両方がフォトダイオード 1 2 に入射するので、検査対象からの蛍光の正確な検出ができなくなる。

【 0 0 5 7 】

この点、二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) は蛍光を発しないため、検査対象に含まれる蛍光からの蛍光と混同する虞れがなく、蛍光検出の精度の向上を図ることができる。

【 0 0 5 8 】

また、本実施の形態における蛍光検査システム 2 は、隔壁部 4 2 b を有する蓋としての透明板 4 2 保持層 4 0 の方向に向かって移動可能に設けられていると共に、透明板 4 2 を移動して隔壁部 4 2 b の底面を保持層 4 0 に接触させることによって、隔壁部 4 2 b を有する透明板 4 2 によって形成される窪み 4 2 c、及び保持層 4 0 のマイクロウェル 4 1 にて検査対象を隔離する隔離室としてのマイクロチャンバー 4 3 が形成される。

【 0 0 5 9 】

これにより、二酸化珪素 (  $\text{SiO}_2$  ) からなる保持層 4 0 に深いマイクロウェル 4 1 を形成するのは困難であるが、保持層 4 0 に対向する、隔壁部 4 2 b を有する透明板 4 2 によって形成される窪み 4 2 c と合わせて、隔離室であるチャンバーとしてのマイクロチャンバー 4 3 の深さを大きくすることが可能になる。

【 0 0 6 0 】

〔 実施の形態 3 〕

本発明のさらに他の実施の形態について図 5 に基づいて説明すれば、以下のとおりである。尚、本実施の形態において説明すること以外の構成は、前記実施の形態 1・2 と同じである。また、説明の便宜上、前記の実施の形態 1・2 の図面に示した部材と同一の機能を有する部材については、同一の符号を付し、その説明を省略する。

【 0 0 6 1 】

本実施の形態の蛍光検査システム 3 では、前記実施の形態 1・2 の構成に加えて、シリコン集積回路 1 0 には、ヒーター 5 2 と温度センサ 5 3 とが設けられている点が異なっている。

【 0 0 6 2 】

( 蛍光検査システムの構成 )

本実施の形態の蛍光検査システム 3 の構成について、図 5 に基づいて説明する。図 5 は、本実施の形態の蛍光検査システム 3 の構成を示す断面図である。尚、図 5 においては、励起用光源 2 3 及び制御部 2 4 を省略している。

【 0 0 6 3 】

本実施の形態の蛍光検査システム 3 は、図 5 に示すように、シリコン集積回路 1 0 にヒーター 5 2 と温度センサ 5 3 とが内蔵されている。

【 0 0 6 4 】

すなわち、マイクロチャンバー 5 1 において P C R ( polymerase chain reaction : ポ

10

20

30

40

50

リメラーゼ連鎖反応)法を用いてDNA (deoxy ribo nucleic acid:デオキシリボ核酸)を増幅するためのPCRサイクルは、マイクロチャンバー51内の溶液を94 程度、60 程度、及び72 程度に設定する3つのサイクルが必要になる。

【0065】

そこで、本実施の形態の蛍光検査システム3では、シリコン集積回路10内にヒーター52と温度センサ53とを組み込むことによって、マイクロチャンバー51に含まれる試料溶液を含む限定された領域の温度制御を行うようになっている。この結果、従来のデバイスを含む環境温度を制御する場合と比較して、より高速に、正確な制御が可能になる。

【0066】

上記ヒーター52は、例えば、抵抗素子に周期的に電圧を印加し、そのデューティを変更することによって、発熱量を制御するようになっている。

【0067】

(蛍光検査システムの測定動作)

本実施の形態の蛍光検査システム3による測定動作について、図5に基づいて説明する。

【0068】

まず、検査対象、ポリメラーゼ、プライマー、蛍光プローブを混釈した溶液をマイクロ流体路22に流し、透明板21にて蓋をして、マイクロチャンバー51に蛍光プローブを付加した検査対象を保持する。この状態にて、PCR法によるDNAの増幅を行う。

【0069】

具体的には、以下の工程を行う。

【0070】

(1)(熱変性)温度センサ53にて温度をモニターしながらヒーター52で加熱を行い、マイクロチャンバー51内の溶液が94 程度になるように温度を制御する。これによって、DNA二本鎖の熱変性が起こり、一本鎖に解離する。

【0071】

(2)(アニーリング)ヒーター52の発熱量を下げて、マイクロチャンバー51内の溶液温度を60 程度に下げる。これにより、プライマーが一本鎖DNAに結合する。

【0072】

(3)(伸長反応)ヒーター52の発熱量を増やし、マイクロチャンバー51内の溶液温度を72 程度に変更する。これにより、ポリメラーゼにより元のDNAの塩基配列を基にして相補鎖が合成される。

【0073】

上記の(1)(2)(3)の一連の過程を繰り返すことによって、DNAが倍に増幅される。この一連の過程を一回のPCR増幅過程と呼ぶ。

【0074】

一回のPCR増幅過程を行う度に、実施の形態1の場合と同様に、蛍光検査を行い、それぞれのマイクロチャンバー51の蛍光量が、予め定めた閾値を超えるまでに要したPCR増幅過程の数を計測する。

【0075】

一方、段階希釈したスタンダートサンプルに対して、PCR増幅過程を繰り返し、一回毎の蛍光反応の強度を計測する。

【0076】

これにより、蛍光出力が閾値を超えるまでに要したPCR増幅過程数と初期DNA数との関係が推定できる。

【0077】

最後まで反応がネガティブなマイクロチャンバー51が、例えば1%以上存在するときは、ネガティブなマイクロチャンバー51の割合をnとして、

$$= -\ln(n)$$

10

20

30

40

50

として、初期DNA数を推定する。

【0078】

全てのマイクロチャンバー51がポジティブの場合、各マイクロチャンバー51で推定された初期DNA数の平均として初期DNA数を推定する。

【0079】

通常のリアルタイムPCR法と比較して、本実施の形態の蛍光検査システム3では、多数のマイクロチャンバー51での計測値を平均化するため、高精度に初期DNA数を推定することが可能である。また、従来のデジタルPCR法と比較して、ネガティブチャンバーが無くても初期DNA数の推定が可能であり、検査対応できるDNA濃度のレンジ(ダイナミックレンジ)を拡大することができる。

10

【0080】

このように、本実施の形態における分子検査方法は、蛍光検査システム1・2を用いて、複数のマイクロチャンバー51にて並列的にポリメラーゼ連鎖反応等の遺伝子増幅反応を行う。

【0081】

この結果、通常のパリメラーゼ連鎖反応等の遺伝子増幅反応を用いた特定の遺伝子を増幅する遺伝子増幅反応と比較して、多数のチャンバーでの計測値を平均化するため、初期DNA数の推定を高精度に行うことが可能である。

【0082】

また、従来のデジタルPCR法と比較して、ネガティブチャンバーが無くても初期DNA数の推定が可能である。この結果、検査対応できるDNA濃度のダイナミックレンジを拡大することができる。

20

【0083】

したがって、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システムを用いた分子検査方法を提供することができる。

【0084】

〔実施の形態4〕

本発明のさらに他の実施の形態について図6に基づいて説明すれば、以下のとおりである。尚、本実施の形態において説明すること以外の構成は、前記実施の形態1と同じである。また、説明の便宜上、前記の実施の形態1の図面に示した部材と同一の機能を有する部材については、同一の符号を付し、その説明を省略する。

30

【0085】

本実施の形態では、前記実施の形態1に示した蛍光検査システム1を用いて、特定タンパク質の検出及び定量を、従来のELISA法と比較して、より高感度、高精度に実施する分子検査方法について説明する。

【0086】

本実施の形態の分子検査方法について、図6に基づいて説明する。図6は、本実施の形態の分子検査方法を説明するための蛍光検査システム1の断面図である。

【0087】

本実施の形態の分子検査方法は、図6に示すように、実施の形態1に示した蛍光検査システム1を用いる。

40

【0088】

具体的には、捕捉抗体を付けたマイクロビーズと検出抗体とを混釈し、捕捉されたターゲット分子にさらに検出抗体を結合させる。検出抗体は、例えばアルカリホスファターゼ(A P : Alkaline Phosphatase)、西洋わさびペルオキシダーゼ(H R P : peroxidase)、ガラクトシダーゼ等の酵素標識で予め標識されている。

【0089】

この溶液をマイクロ流体路22に流し、次に、マイクロ流体路22に図示しない蛍光物質を流すと、酵素標識と反応して図示しない蛍光物質が生成される。次に、マイクロ流体路にオイルを流すと、マイクロウェル31がオイル層により蓋をされ、各マイクロウェル

50

31が独立したマイクロチャンバーを形成する。その結果、ターゲット分子を捕捉しているマイクロビーズが捕捉されているマイクロチャンバー下部のフォトダイオード12からは蛍光が検知され、蛍光検知されたフォトダイオードでの光量数から、ターゲット分子の数が推定される。

【0090】

蛍光物質の生成がマイクロチャンバーの限られた領域で行われるため、蛍光がフォトダイオード12の上に集中して発生し、数少ないターゲット分子でも検出が可能になる。

【0091】

従来、このような分子検査方法は、蛍光顕微鏡を用いて行われていたが、本実施の形態によれば、蛍光顕微鏡及びその撮像画像を画像処理する必要がない。そのため、蛍光基質と酵素標識との反応により、蛍光物質が生成されていく過程において、蛍光が増加していく様子をリアルタイムで観測することもでき、蛍光検知されたフォトダイオード12の数だけでなく、蛍光量が予め定めた閾値を超えた時刻を計測することができる。これにより、各マイクロチャンバーに捕捉されたターゲット分子の量が推定でき、ターゲット分子の濃度のより正確な推定が可能となる。

【0092】

このように、本実施の形態における分子検査方法は、捕捉抗体を付けたマイクロビーズと検出抗体とを混釈し、捕捉されたターゲット分子にさらに検出抗体を結合させ、そのマイクロビーズを含む溶液を蛍光検査システム1に設けられたマイクロ流体路22に流す第1工程と、マイクロ流体路22に蛍光基質を流す第2工程と、マイクロ流体路にオイルを流す第3工程と、蛍光基質が酵素標識と反応して生成された蛍光物質を、蛍光検査システム1により検出する第4工程とを含む。

【0093】

この結果、特定タンパク質の検出及び定量を、従来のELISA法と比較して、より高感度、高精度に実施する分子検査方法を提供することができる。さらに、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システムを用いた分子検査方法を提供することができる。

【0094】

〔実施の形態5〕

本発明のさらに他の実施の形態について図7に基づいて説明すれば、以下のとおりである。尚、本実施の形態において説明すること以外の構成は、前記実施の形態4と同じである。また、説明の便宜上、前記の実施の形態4の図面に示した部材と同一の機能を有する部材については、同一の符号を付し、その説明を省略する。

【0095】

本実施の形態の蛍光検査システム4及び蛍光検査方法は、前記実施の形態1～4の蛍光検査システム1～3と同様に、励起光の消光後に蛍光を検知するという構成及び工程を備えている。その上で、本実施の形態の蛍光検査システム4及び蛍光検査方法は、さらに、新たに、励起光の照射中にフォトダイオード12に入射する励起光の光子を検知する構成及び工程を備えている点が異なっている。

【0096】

本実施の形態の蛍光検査システム4について、図7の(a)(b)に基づいて説明する。図7の(a)は、本実施の形態の蛍光検査システム4を示すものであって、保持層60を省略した蛍光検査システム4の構成を示す平面図である。図7の(b)は、蛍光検査システム4の構成を示すものであって、マイクロウェル61の直下部を除く領域に遮光用メタル62を配したシリコン回路基板11を示す断面図である。

【0097】

本実施の形態の蛍光検査システム4は、図7の(a)(b)に示すように、各フォトダイオード12の上に複数のマイクロウェル61が形成される。マイクロウェル61のサイズは、実施の形態4で説明したマイクロビーズが、一個は捕捉され得るが、複数個が捕捉されることは困難であるようなサイズとなっている。

【0098】

10

20

30

40

50

また、本実施の形態の蛍光検査システム4では、フォトダイオード12の上に、貫通孔としてのマイクロウェル61の直下部を除いて、遮光用の金属層としての遮光用メタル62が形成されている。

【0099】

本実施の形態における蛍光検査システム4及びそれを用いた蛍光検査方法は、励起光の消光後に蛍光を検知するという構成及び工程に加えて、新たに、励起光の照射中にフォトダイオード12に入射する励起光の光子を検知する光子検知工程を有している。

【0100】

すなわち、本実施の形態では、一個のマイクロビーズを捕捉するマイクロウェル61が複数形成されており、マイクロウェル61以外は、遮光用メタル62にて遮光されている。このため、フォトダイオード12の上に存在する複数のマイクロウェル61の一部にマイクロビーズが捕捉されていれば、その一部のマイクロウェル61では、励起光がマイクロビーズにより遮光される。

10

【0101】

その結果、励起光の照射中に、光子検知部13で励起光の光子を検知すると、マイクロビーズが捕捉されるマイクロウェル61が増加することによって、フォトダイオード12に入射する光子数が少なくなる。

【0102】

ここで、本実施の形態では、マイクロウェル61の直下以外の部分を遮光しているため、フォトダイオード12への入射光は全て、マイクロウェル61を通過してフォトダイオード12に入ることになる。そして、複数のマイクロウェル61のうち、マイクロビーズを捕捉しているマイクロウェル61の占める割合と入射光の光子数とは強い相関がある。この結果、励起光の入射光量を測定することによって、各フォトダイオード12上のマイクロウェル61のうち、マイクロビーズを捕捉しているマイクロウェル61の割合を推定することができる。

20

【0103】

前記実施の形態4で説明したターゲット分子推定方法においては、検知され得る最小のターゲット濃度は、分子検査システムにおいて検査できる総マイクロビーズ数で決まる。

【0104】

すなわち、前記実施の形態4で説明したターゲット分子推定方法においては、図6に示すように、マイクロウェル31のマイクロチャンバー内に、ターゲット分子を捕捉しているマイクロビーズ及びターゲット分子を捕捉していないマイクロビーズが捕捉される。そして、蛍光検知されたフォトダイオードでの光量数から、ターゲット分子の数が推定される。したがって、マイクロチャンバーに捕捉されたマイクロビーズの数が多ければ、検知され得る最小のターゲット濃度は、小さくなる。つまり、小さい濃度のターゲット分子を測定することが可能となる。

30

【0105】

例えば、検査可能な総ビーズ数が1万個であれば、1万個のうちの一つのマイクロビーズで捕捉されたターゲット分子が検知され得る。一方、総ビーズ数が10万個であれば、10万個のうちの一つのマイクロビーズで捕捉されたターゲット分子が検知され得る。したがって、小さい濃度のターゲット分子を測定することが可能となる。

40

【0106】

ここで、検知されたターゲット分子の濃度の定量化のためには、実際に検査したマイクロビーズの総数を算出することが必要になる。例えば、検査可能な総マイクロビーズ数が1万個であっても、実際に捕捉されていたマイクロビーズ数が1000個であり、そのうち1個のマイクロビーズを捕捉したマイクロチャンバーから蛍光が検出される場合がある。その場合には、マイクロビーズ1000個のうち、一つがターゲット分子を捕捉したことを示す濃度となる。しかし、その濃度は、1万個のマイクロビーズのうちの一つがターゲット分子を捕捉したことを示す濃度とは異なる。

【0107】

50

本実施の形態においては、マイクロウェル61の大きさをマイクロビーズが一つだけ捕捉されるように最適化すると共に、フォトダイオード12に入射する励起光の光量を測定している。そして、この構成によって、フォトダイオード12上のマイクロウェル61のうち、マイクロビーズを捕捉しているマイクロウェル61の割合を推定できるようにしている。これにより、各フォトダイオード12上に捕捉されているマイクロビーズの数を推定し、検査している総マイクロビーズの数を推定することができる。これにより、検査の定量化を高めることが可能となる。

【0108】

また、本実施の形態においては、各フォトダイオード12上に複数のマイクロウェル61を形成することによって、検査可能な総マイクロビーズの数を増やすことができる。このことは、検出可能なターゲット分子濃度を低くすることにつながる。

10

【0109】

このように、本実施の形態における蛍光検査システム4では、貫通孔としてのマイクロウェル61は、フォトダイオード12の上に、複数個設けられている。尚、各マイクロウェル61は、1個の検査対象を保持する大きさを有することが好ましい。

【0110】

これにより、マイクロウェル61に保持する検査対象の個数を増加することができ、検出可能なターゲット濃度を低くすることが可能となる。特に、各マイクロウェル61が1個の検査対象を保持する大きさを有することによって、正確な検査対象の濃度を求めることが可能となる。

20

【0111】

また、本実施の形態における蛍光検査システム4は、フォトダイオード12の上に、マイクロウェル61の直下部を除いて、遮光用の金属層としての遮光用メタル62が形成されている。

【0112】

これにより、フォトダイオード12への入射光を、マイクロウェル61を通過した励起光L1のみとすることが可能となる。この結果、外部からの迷光がフォトダイオード12に入射されるのを防止することができる。

【0113】

また、本実施の形態雄における蛍光検査方法は、本実施の形態の蛍光検査システム4を用いた蛍光検査方法であって、励起光L1の照射中にフォトダイオード12に入射する励起光L1の光子を検知する光子検知工程と、励起光L1を照射した後、検査対象から放射される蛍光を励起光L1の消光後に検知する蛍光検知工程とを含む。

30

【0114】

これにより、蛍光検知工程によって、励起光L1と蛍光とを光学的なフィルタにより分離することなく検査対象から放出された蛍光のみを測定することができる。

【0115】

また、本実施の形態では、マイクロウェル61は、フォトダイオード12の上に、複数個設けられている。このため、マイクロウェル61に検査対象が保持されている場合には、励起光L1の光子は検査対象によって遮蔽される一方、マイクロウェル61に検査対象が保持されていない場合には、励起光L1の光子がフォトダイオード12に入射される。この結果、励起光L1の照射中にフォトダイオード12に入射する励起光L1の光子を検知する光子検知工程を設けることによって、検査対象の個数を推定することが可能となる。

40

【0116】

また、本実施の形態における蛍光検査方法は、検査対象である生体又は非生体の微粒子を含む液体を蛍光検査システム4の上に形成されたマイクロ流体路22に流す流液工程と、光子検知工程で検知された励起光L1の光子の情報に基づいて、フォトダイオード12の上に形成されているマイクロウェル61のうち、何個のマイクロウェル61に微粒子が捕捉されているかを推定する推定工程とを含んでいる。

50

## 【 0 1 1 7 】

これにより、推定工程によって、光子検知工程で検知された励起光 L 1 の光子の情報に基づいて、フォトダイオード 1 2 の上に形成されているマイクロウェル 6 1 のうち、何個のマイクロウェル 6 1 に微粒子が捕捉されているかを推定することが可能となる。

## 【 0 1 1 8 】

したがって、検査対象の正確な濃度を求めることが可能となる。

## 【 0 1 1 9 】

〔まとめ〕

本発明の態様 1 における蛍光検査システム 1 ~ 4 は、検査対象に励起光 L 1 を照射する励起用光源 2 3 と、フォトダイオード 1 2 により光を検知する光子検知部 1 3 を備えたシリコン集積回路 1 0 と、上記フォトダイオード 1 2 上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔（マイクロウェル 3 1 ・ 4 1 ・ 6 1 ）を備えた保持層 3 0 ・ 4 0 ・ 6 0 と、保持された上記検査対象に上記励起用光源 2 3 にて励起光 L 1 を照射させ、上記検査対象から放出される蛍光を上記励起光 L 1 の消光後に、上記光子検知部 1 3 にて検知させる制御部 2 4 とを備えていることを特徴としている。

10

## 【 0 1 2 0 】

上記発明の態様によれば、蛍光検査システムは、検査対象に励起光を照射する励起用光源と、フォトダイオードにより光を検知する光子検知部を備えたシリコン集積回路と、上記フォトダイオード上に設けられて上記検査対象を保持する貫通孔を備えた保持層とを備えている。

20

## 【 0 1 2 1 】

従来のこの種の蛍光検査システムでは、励起光の波長と蛍光の波長とが異なることを利用して、光学的なフィルタにより両者を分離して、蛍光のみを検知していた。このため、組み込んだフィルタに適した蛍光物質しか検査に使えないということになり、蛍光の種類の適用範囲が限定される欠点があった。

## 【 0 1 2 2 】

ここで、蛍光とは、紫外光又は可視光等を吸収した分子・イオンが励起され、その後、中間励起状態に遷移し、そこから励起光よりも長波長の光を放出して基底状態に戻る現象であり、励起状態から基底状態に戻るまでの平均時間を蛍光寿命と呼ぶ。このため、蛍光寿命を利用すると、励起光と蛍光とを波長により分離する光学フィルタを使わず、励起光の消光後に、放出される蛍光を観測することが可能になる。

30

## 【 0 1 2 3 】

そこで、本発明では、蛍光を発する検査対象を検出する場合には、検査対象に励起用光源にて励起光を照射させ、検査対象から放出される蛍光を励起光の消光後に、光子検知部にて検知させる。

## 【 0 1 2 4 】

この結果、励起光の消光後では、蛍光のみが光子検知部にて検知される。したがって、励起光と蛍光とを光学的なフィルタにより分離することなく検査対象から放出された蛍光のみを測定することができる。したがって、蛍光の種類に対応する光学的フィルタを使用する必要がなくなるので、蛍光検査システムが複雑化するのを防止することができる。

40

## 【 0 1 2 5 】

また、本発明の態様の蛍光検査システムでは、フォトダイオードによる光子検知部をシリコン集積回路に集積し、フォトダイオード上に微小な貫通孔からなるチャンバーを構成し、各チャンバーに保持した検査対象からの蛍光信号の検出を自動化することができる。

## 【 0 1 2 6 】

この結果、蛍光検査システムを大型化及び複雑化させる蛍光顕微鏡や観察した蛍光像からの検出数の数え上げのための画像処理が不要になり、所望検査対象のカウント等のデジタル計測が容易にできるようになる。

## 【 0 1 2 7 】

50

したがって、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システムを提供することができる。

【0128】

本発明の態様2における蛍光検査システム2は、態様1における蛍光検査システムにおいて、前記保持層40の少なくとも一部は、二酸化珪素( $\text{SiO}_2$ )を用いて形成されている。尚、少なくとも一部とは、保持層におけるフォトダイオード近傍の部分を用いる。

【0129】

例えば、保持層が蛍光を発する物質で形成されている場合には、検査対象からの蛍光と保持層からの蛍光との両方がフォトダイオードに入射するので、検査対象からの蛍光の正確な検出ができなくなる。

【0130】

この点、二酸化珪素( $\text{SiO}_2$ )は蛍光を発しないため、検査対象に含まれる蛍光からの蛍光と混同する虞れがなく、蛍光検出の精度の向上を図ることができる。

【0131】

本発明の態様3における蛍光検査システム2は、態様1又は2における蛍光検査システムにおいて、隔壁部42bを有する蓋(透明板42)が上記保持層40の方向に向かって移動可能に設けられていると共に、上記蓋(透明板42)を移動して上記隔壁部42bを上記保持層40に接触させることによって、上記隔壁部42bを有する蓋(透明板42)によって形成される凹部(窪み42c)、及び上記保持層40の貫通孔(マイクロウェル41)にて前記検査対象を隔離する隔離室(マイクロチャンバー43)が形成されることが好ましい。

【0132】

これにより、二酸化珪素( $\text{SiO}_2$ )からなる保持層に深い貫通孔を形成するのは困難であるが、保持層に対向する隔壁部を有する蓋によって形成される窪みと合わせて、隔離室であるチャンバーの深さを大きくすることが可能になる。

【0133】

本発明の態様4における蛍光検査システム3は、態様1、2又は3における蛍光検査システムにおいて、前記シリコン集積回路10は、ヒーター52と温度センサ53とを内蔵していることが好ましい。

【0134】

これにより、チャンバーに含まれる検査対象を含む限定された領域の温度制御が可能となる。この結果、従来のデバイスを含む環境温度を制御する場合と比較して、より高速に、正確な温度制御が可能になる。

【0135】

本発明の態様5における分子検査方法は、前記記載の蛍光検査システムを用いて、複数の隔離室にて並列的に遺伝子増幅反応を行うことを特徴としている。

【0136】

上記の発明の形態によれば、通常の遺伝子増幅反応を用いた特定の遺伝子を増幅する遺伝子増幅反応と比較して、多数のチャンバーでの計測値を平均化するため、初期DNA数の推定を高精度に行うことが可能である。

【0137】

また、従来のデジタルPCR法と比較して、ネガティブチャンバーが無くても初期DNA数の推定が可能である。この結果、検査対応できるDNA濃度のダイナミックレンジを拡大することができる。

【0138】

したがって、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システムを用いた分子検査方法を提供することができる。

【0139】

本発明の態様6における分子検査方法は、態様1における蛍光検査システム1を用いた分子検査方法であって、捕捉抗体を付けたマイクロビーズと検出抗体を混釈し、捕捉され

10

20

30

40

50

たターゲット分子にさらに上記検出抗体を結合させ、そのマイクロビーズを含む溶液を態様 1 における蛍光検査システム 1 に設けられたマイクロ流体路 2 2 に流す第 1 工程と、上記マイクロ流体路 2 2 に蛍光基質を流す第 2 工程と、上記マイクロ流体路 2 2 にオイルを流す第 3 工程と、上記蛍光基質が酵素標識と反応して生成された蛍光物質を上記蛍光検査システム 1 により検出する第 4 工程とを含む。

【0140】

これにより、特定タンパク質の検出及び定量を、従来の ELISA 法と比較して、より高感度、高精度に実施する分子検査方法を提供することができる。また、大型化及び複雑化を回避し得る蛍光検査システム 1 を用いた分子検査方法を提供することができる。

【0141】

本発明の態様 7 における蛍光検査システム 4 では、前記貫通孔（マイクロウェル 6 1）は、前記フォトダイオード 1 2 の上に、複数個設けられている。尚、各貫通孔は、1 個の検査対象を保持する大きさを有することが好ましい。

【0142】

これにより、貫通孔に保持する検査対象の個数を増加することができ、検出可能なターゲット濃度を低くすることが可能となる。特に、各貫通孔が 1 個の検査対象を保持する大きさを有することによって、正確な検査対象の濃度を求めることが可能となる。

【0143】

本発明の態様 8 における蛍光検査システム 4 は、前記フォトダイオード 1 2 の上に、前記貫通孔（マイクロウェル 6 1）の直下部を除いて、遮光用の金属層（遮光用メタル 6 2）が形成されている。

【0144】

これにより、フォトダイオードへの入射光を、貫通孔を通過した励起光のみとすることが可能となる。この結果、外部からの迷光がフォトダイオードに入射されるのを防止することができる。

【0145】

本発明の態様 9 における蛍光検査方法は、前記記載の蛍光検査システム 4 を用いた蛍光検査方法であって、励起光 L 1 の照射中にフォトダイオード 1 2 に入射する該励起光 L 1 の光子を検知する光子検知工程と、上記励起光 L 1 を照射した後、前記検査対象から放射される蛍光を上記励起光 L 1 の消光後に検知する蛍光検知工程とを含むことを特徴としている。

【0146】

これにより、蛍光検知工程によって、励起光と蛍光とを光学的なフィルタにより分離することなく検査対象から放出された蛍光のみを測定することができる。

【0147】

また、本発明の一態様では、貫通孔は、フォトダイオードの上に、複数個設けられている。このため、貫通孔に検査対象が保持されている場合には、励起光の光子は検査対象によって遮蔽される一方、貫通孔に検査対象が保持されていない場合には、励起光の光子がフォトダイオードに入射される。この結果、励起光の照射中にフォトダイオードに入射する該励起光の光子を検知する光子検知工程を設けることによって、検査対象の個数を推定することが可能となる。

【0148】

本発明の態様 10 における蛍光検査方法は、前記記載の蛍光検査方法において、検査対象である生体又は非生体の微粒子を含む液体を前記蛍光検査システム 4 の上に形成されたマイクロ流体路 2 2 に流す流液工程と、前記光子検知工程で検知された励起光 L 1 の光子の情報に基づいて、フォトダイオード 1 2 の上に形成されている貫通孔（マイクロウェル 6 1）のうち、何個の貫通孔（マイクロウェル 6 1）に前記微粒子が捕捉されているかを推定する推定工程とを含んでいることが好ましい。

【0149】

10

20

30

40

50

これにより、推定工程によって、光子検知工程で検知された励起光の光子の情報に基づいて、フォトダイオードの上に形成されている貫通孔のうち、何個の貫通孔に微粒子が捕捉されているかを推定することが可能となる。

【0150】

したがって、検査対象の正確な濃度を求めることが可能となる。

【0151】

尚、本発明は、上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。さらに、各実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を組み合わせることにより、新しい技術的特徴を形成することができる。

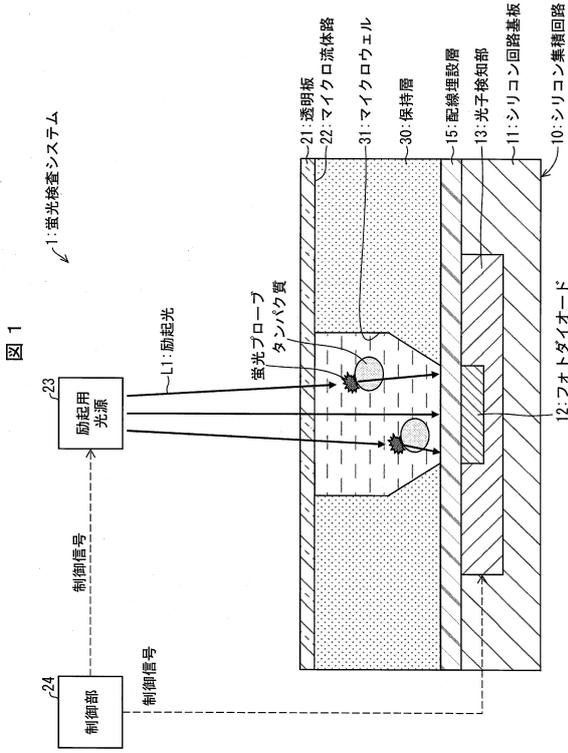
10

【符号の説明】

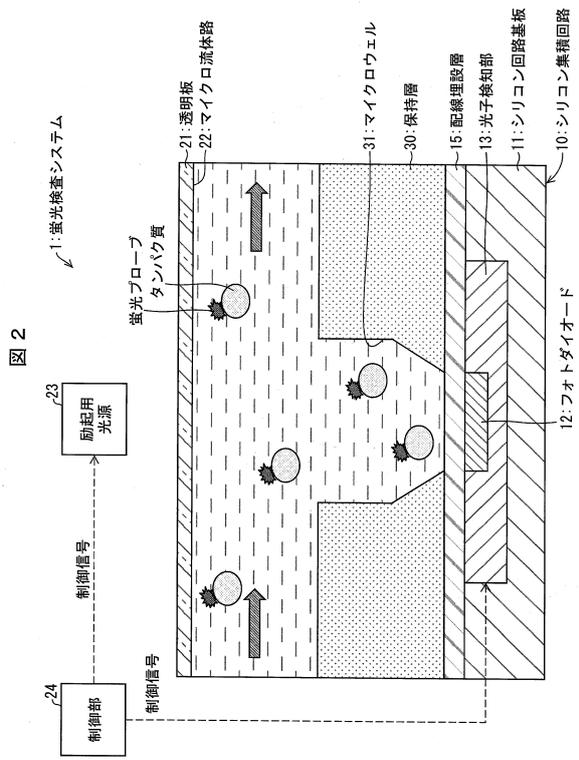
【0152】

1 ~ 4	蛍光検査システム	
1 0	シリコン集積回路	
1 1	シリコン回路基板	
1 2	フォトダイオード	
1 3	光子検知部	
1 3 a	第1光子検知部	
1 3 b	第2光子検知部	20
1 5	配線埋設層	
2 1	透明板(蓋)	
2 2	マイクロ流体路	
2 3	励起用光源	
2 4	制御部	
3 0	保持層	
3 1	マイクロウェル(貫通孔)	
4 0	保持層	
4 1	マイクロウェル(貫通孔)	
4 2	透明板(蓋)	30
4 2 a	蓋部	
4 2 b	隔壁部	
4 2 c	窪み(凹部)	
4 3	マイクロチャンバー(隔離室)	
5 1	マイクロチャンバー(隔離室)	
5 2	ヒーター	
5 3	温度センサ	
6 0	保持層	
6 1	マイクロウェル(貫通孔)	
6 2	遮光用メタル(遮光用の金属層)	40
L 1	励起光	

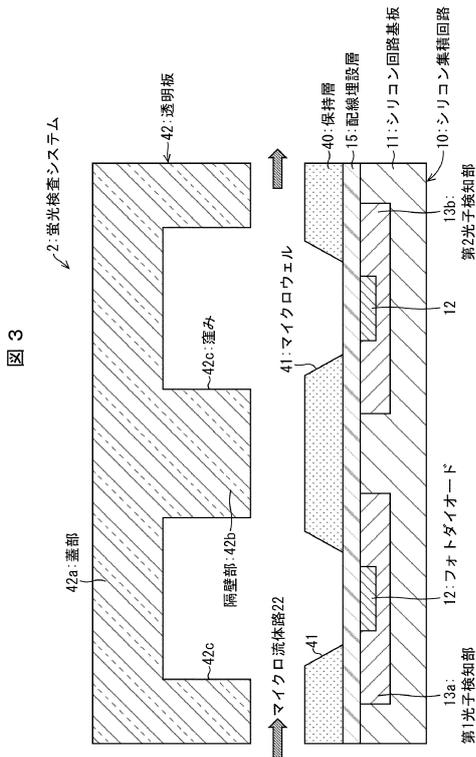
【図1】



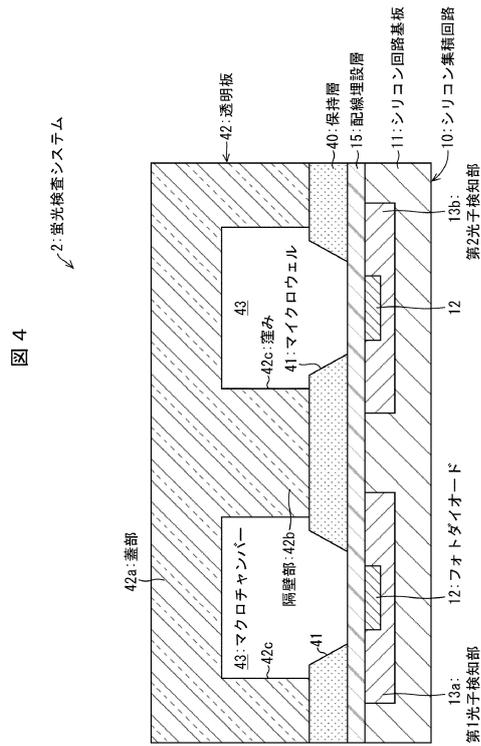
【図2】



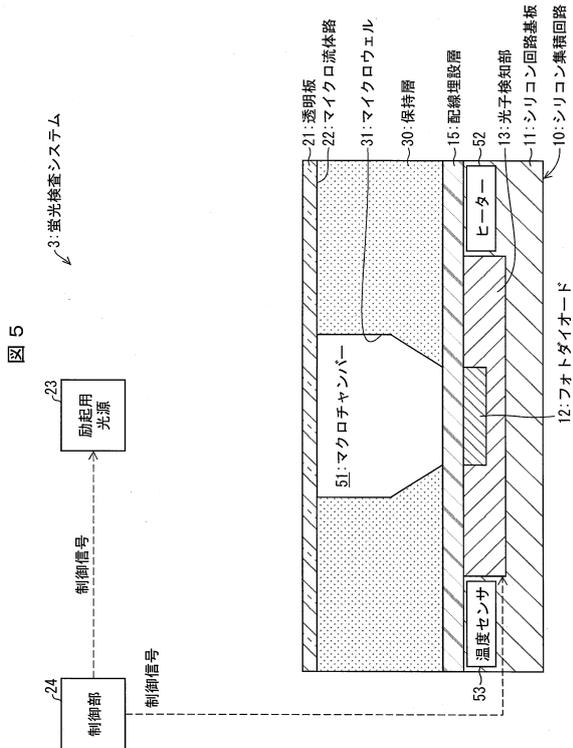
【図3】



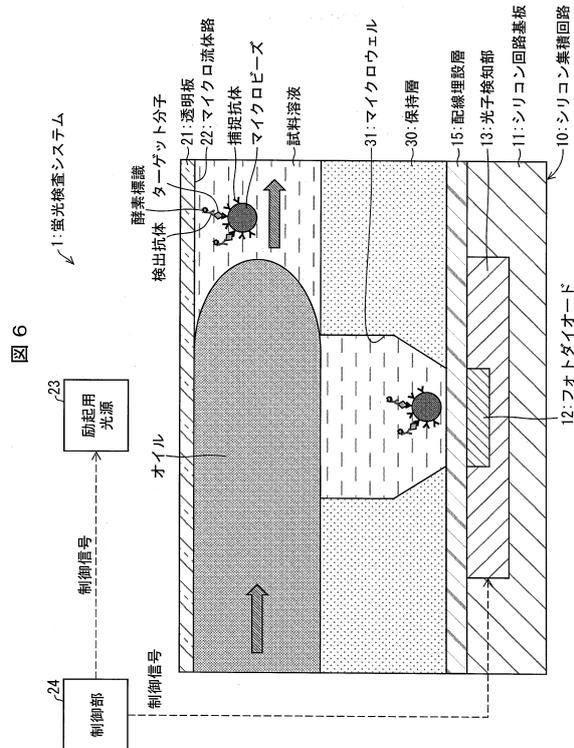
【図4】



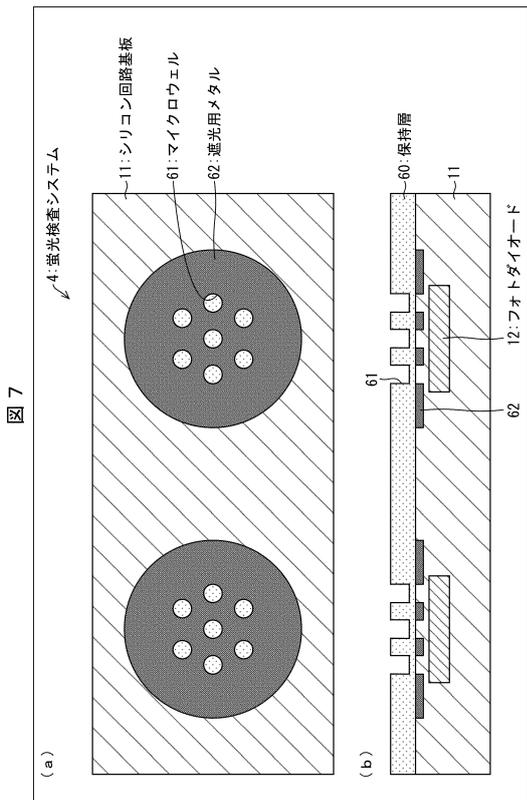
【 図 5 】



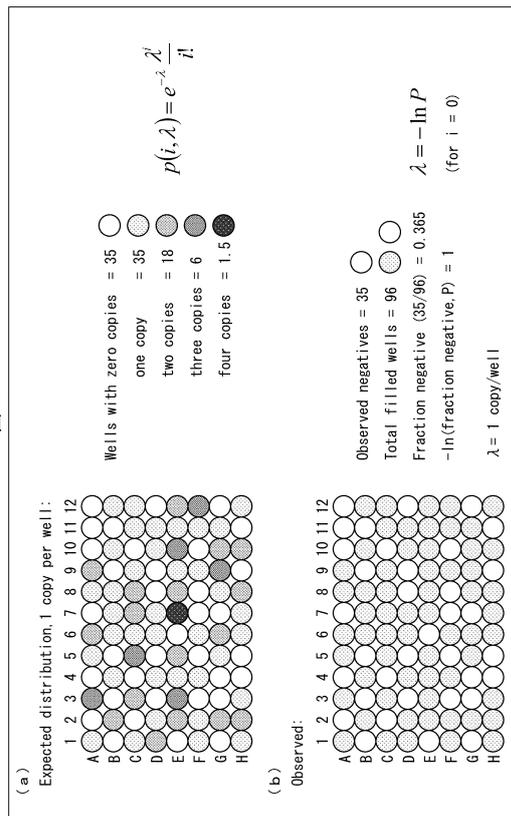
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 藤本 義久  
大阪府堺市堺区匠町1番地 シャープ株式会社内
- (72)発明者 金 秀 弦  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 藤井 輝夫  
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 国際公開第2014/034781(WO, A1)  
特表2007-504477(JP, A)  
特表平11-503022(JP, A)  
特開2015-055568(JP, A)  
特開2002-350346(JP, A)  
特開2014-066687(JP, A)  
Soo Hyeon Kim, Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single bio molecules, Lab on a Chip, 2012年12月7日, Iss.23, PP.4986-4991

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/00-83  
33/543  
37/00

C12M 1/34

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)