(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第7212940号
(P7212940)
(45)発行日　令和5年1月26日(2023.1.26)　(24)登録日　令和5年1月18日(2023.1.18)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 1/00	*(2006.01)*	G01N	1/00	101G
G01N 37/00	*(2006.01)*	G01N	37/00	101
G01N 21/78	*(2006.01)*	G01N	37/00	102
C12Q 1/68	*(2018.01)*	G01N	21/78	C
C12Q 1/70	*(2006.01)*	C12Q	1/68	

請求項の数 4　(全 14 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-509984(P2019-509984)
(86)(22)出願日　平成30年3月28日(2018.3.28)
(86)国際出願番号　PCT/JP2018/012795
(87)国際公開番号　WO2018/181488
(87)国際公開日　平成30年10月4日(2018.10.4)
審査請求日　令和3年3月2日(2021.3.2)
(31)優先権主張番号　特願2017-64794(P2017-64794)
(32)優先日　平成29年3月29日(2017.3.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　503360115
国立研究開発法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　230104019
弁護士　大野　聖二
(74)代理人　100149076
弁理士　梅田　慎介
(72)発明者　野地　博行
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　小野　尭生
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】微小物質検出方法及び微小物質検出用デバイス

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を検出する方法であって、
（１）前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、
（２）前記空間にガスを導入して該空間内の前記微小物質を含む前記溶媒を当該ガスによって置換し、前記レセプタクル内に前記微小物質を包含する前記溶媒の液滴を形成する手順と、
（３）前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する手順と、を含み、
（ｉ)前記レセプタクルのアスペクト比を１以上とすること、
（ｉｉ)前記手順（２）の前段に、前記ガスを水と接触させること、
（ｉｉｉ）前記下層部に、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバを形成し、前記空間内の水蒸気飽和度を高めるための水供給元として機能させること、
（ｉｖ）前記手順（２）及び手順（３）を湿潤環境下で行うこと、及び／又は、
（ｖ）前記溶媒に高水和性物質を含有させること、
によって、前記レセプタクル内に形成された前記液滴の前記ガス中への蒸散を抑制するこ

とを特徴とする、方法。
【請求項２】
互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を発色基質の吸光度変化及び／又は蛍光に基づいて光学的に検出する方法であって、
（１）前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、
（２）前記空間にガスを導入して該空間内の前記微小物質を含む前記溶媒をガスによって置換し、前記レセプタクル内に前記微小物質を包含する前記溶媒の液滴を形成する手順と、
（３）前記液滴内に存在する前記発色基質の吸光度変化及び／又は蛍光を検出する手順と、を含み、
（ｉ）前記レセプタクルのアスペクト比を１以上とすること、
（ｉｉ)前記手順（２）の前段に、前記ガスを水と接触させること、
（ｉｉｉ）前記下層部に、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバを形成し、前記空間内の水蒸気飽和度を高めるための水供給元として機能させること、
（ｉｖ）前記手順（２）及び手順（３）を湿潤環境下で行うこと、及び／又は、
（ｖ）前記溶媒に高水和性物質を含有させること、
によって、前記レセプタクル内に形成された前記液滴の前記ガス中への蒸散を抑制することを特徴とする、方法。
【請求項３】
請求項１又は２に記載の検出方法に用いられる物質検出用デバイスであって、
微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板と、
該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、
該空間にガスを導入する送気部と、
前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する検出器と、を備え、
（ｉ)前記レセプタクルのアスペクト比が１以上である、
（ｉｉ)前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、
（ｉｉｉ）前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバを前記下層部に備える、及び／又は、
（ｉｖ）前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバ―を備える、
物質検出用デバイス。
【請求項４】
請求項１又は２に記載の検出方法に用いられる物質検出用デバイスであって、
微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板を搭載可能であり、
該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、
該空間にガスを導入する送気部と、
前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する検出器と、を備え、
（ｉ)前記レセプタクルのアスペクト比が１以上である、
（ｉｉ)前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、
（ｉｉｉ）前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバを前記下層部に備える、及び／又は、
（ｉｖ）前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバ―を備える、

物質検出用デバイス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、微小物質検出方法及び微小物質検出用デバイスに関する。より詳しくは、基板上に互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に微小物質が封入された微小な液滴を形成し、該液滴内に存在する微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する方法等に関する。
【背景技術】
【０００２】
疾患や感染症等の診断のため、核酸、タンパク質、ウイルス及び細胞等のマーカーを迅速、簡便、かつ高感度に検出するための技術が求められている。例えば、体積１ｍｍ^{3}の腫瘍に含まれる１００万個の癌細胞からマーカータンパク質（各細胞から１００分子ずつ）が５Ｌの血中に分泌された場合、マーカータンパク質の血中濃度は３０ａＭ程度である。このような非常に低濃度の物質をも検出しうる技術が求められている。
【０００３】
このような技術として、核酸、タンパク質、ウイルス及び細胞等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、標識抗体を用いた免疫学的手法によって検出する「一分子酵素アッセイ」がある。一分子酵素アッセイによれば、検出対象物質を一分子単位の感度で検出することができる。
【０００４】
特許文献１には、一分子酵素アッセイに応用可能な技術として、「ビーズを１個のみ収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層部との間の空間に、当該ビーズを含む親水性溶媒を導入するビーズ導入工程と、上記ビーズ導入工程の後に上記空間に疎水性溶媒を導入する疎水性溶媒導入工程とを含むことを特徴とするビーズ封入方法」が開示されている。
【０００５】
特許文献１に開示される技術は、「複数の収容部が疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、上記下層部における上記収容部が形成されている面に対して空間を隔てて対向している上層部とを備えていることを特徴とするアレイ」を用いるものであり、下層部と上層部が空間を隔てて対向するフローセル構造を有するアレイを用いるものである。この技術によれば、「多数のビーズをアレイに効率よく封入させることができるので、低濃度のターゲット分子を高感度に検出可能」とされている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】国際公開２０１２／１２１３１０号
【特許文献２】特開２００４－３０９４０５号
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明は、簡易な操作で、核酸、タンパク質及びウイルス等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、高感度な検出を可能とするための技術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】
【０００８】
上記の課題を解決するために、本発明は、以下の［１］～［２０］を提供する。
［１］　互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を検出する方法であって、

（１）前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、
（２）上記空間にガスを導入して、前記レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、
（３）前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する手順と、を含む、方法。
［２］　互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を発色基質の吸光度変化及び／又は蛍光に基づいて光学的に検出する方法であって、
（１）前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、
（２）上記空間にガスを導入して該空間内の前記溶媒をガスで置換するとともに、レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、
（３）前記液滴内に存在する前記発色基質の吸光度変化及び／又は蛍光を検出する手順と、を含む、方法。
［３］　前記液滴の蒸散を抑制する手段を含む、［１］又は［２］の方法。
［４］　前記レセプタクルのアスペクト比が１以上である、［３］の方法。
［５］　前記手順（２）の前段に、前記ガスを水と接触させる手順をさらに含む、［３］の方法。
［６］　前記下層部に、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバが形成されている、［３］の方法。
［７］　前記手順（２）及び手順（３）が湿潤環境下で行われる、［３］の方法。
［８］　前記溶媒が高水和性物質を含む、［３］の方法。
【０００９】
［９］　微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板と、
該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、
該空間にガスを導入する送気部と、
前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する検出器と、を備える、物質検出用デバイス。
［１０］　前記液滴の蒸散を抑制する手段を有する、［９］のデバイス。
［１１］　前記レセプタクルのアスペクト比が１以上である、［１０］のデバイス。
［１２］　前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、［１０］のデバイス。
［１３］　前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバを前記下層部に備える、［１０］のいずれかのデバイス。
［１４］　前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバ―を備える、［１０］のデバイス。
【００１０】
［１５］　微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板を搭載可能であり、
該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、
該空間にガスを導入する送気部と、
前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する検出器と、を備える、物質検出用デバイス。
［１６］　前記液滴の蒸散を抑制する手段を有する、［１５］のデバイス。
［１７］　前記レセプタクルのアスペクト比が１以上である、［１６］のデバイス。

［１８］　前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、［１６］のデバイス。
［１９］　前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたリザーバを前記下層部に備える、［１６］のデバイス。
［２０］　前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバ―を備える、［１６］のデバイス。
【発明の効果】
【００１１】
本発明により、簡易な操作で、核酸、タンパク質及びウイルス等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、高感度な検出を可能とするための技術が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１－１】本発明に係る物質検出方法の手順を説明する図である。
【図１－２】本発明に係る物質検出方法の手順を説明する図である。
【図２】ウイルスの粒子表面に存在する酵素と発色基質との反応による反応生成物を説明するための図である。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
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。
【００１４】
本発明に係る物質検出方法は、以下の手順（Ａ）～（Ｃ）を含む。
（Ａ）レセプタクルが形成されているアレイ下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向するアレイ上層部と、の間の空間に、微小物質を含む溶媒を導入する手順（物質導入手順）。
（Ｂ）前記空間にガスを導入して該空間内の前記溶媒をガスで置換するとともに、レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順（物質収容手順）。
（Ｃ）前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する手順（検出手順）。
【００１５】
以下、本発明に係る物質検出方法の各手順について説明する。
【００１６】
［検出対象物質］
本発明に係る物質検出方法等において、検出対象となる微小物質（microscopic body、以下「ターゲット物質」とも称する）は、レセプタクルに収容可能な大きさの物質であれば特に限定されない。ターゲット物質は、核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体、並びにウイルス等であってよい。ターゲット物質は、各種の疾患又は感染症のマーカーとなり得る、核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体であることが好ましい。
【００１７】
核酸には、ＤＮＡ及びＲＮＡ等の天然核酸及びＬＮＡ及びＰＮＡ等の人工核酸が含まれ、これらの重合体も含まれる。
【００１８】
ターゲット物質は、担体に保持されたものであってもよい。担体としては、マイクロビーズが汎用されている。本発明において、「マイクロビーズ」は、「粒子」と同義に用いられ、当技術分野において慣用技術である。マイクロビーズの形状は、特に限定されないが、通常球形とされる。マイクロビーズの材料も、特に限定されず、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ポリプロピレン、メンブレン及び磁性体などであってよい。具体的な材料として、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルとアクリルアミドとのコポリマー、ジビニルベンゼン等と架橋されたポリスチレン、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、

ポリスチレンデキストラン、ゴム、ケイ素、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然スポンジ、シリカゲル、ガラス、金属プラスチック、セルロース、架橋デキストラン（Ｓｅｐｈａｄｅｘ（商標））およびアガロースゲル（セファロース（商標））などが挙げられる。ビーズは、多孔性であってもよい。ビーズは、平均粒子径５μｍ以下であることが好ましく、例えば１μｍ～４μｍ程度とされる。なお、平均粒子径は、例えば電子顕微鏡観察又は動的光散乱法を用いて測定することができる。

【００１９】

［アレイ］

本発明に係る物質検出方法に用いられるデバイスのアレイ１（図１（Ａ）参照）は、ターゲット物質を収容する、複数のレセプタクル１１２が形成された下層部１ａと、下層部１ａに対向する上層部１ｂとを含んでなる。下層部１ａと上層部１ｂは、空間１ｃを挟んで対向する。各レセプタクル１１２は、側壁１１３によって互いに隔てられている。各レセプタクル１１２は、側壁１１３と側壁１１３との間で空間１ｃと接する開口を有している。多数のレセプタクル１１２がアレイ１の下層部１ａの面方向に配置され、それらの開口からターゲット物質がレセプタクル１１２内に捕捉され得る。

【００２０】

アレイ１は、ガラス製基板層のウェットエッチングやドライエッチング、またはプラスチック製基板層のナノインプリントや射出成型、切削加工などの公知の技術を用いて成形できる。アレイ１の材質は、ターゲット物質を光学的に検出する場合には、光透過性を有する材質とされ、例えばガラスや各種プラスチック（ＰＰ、ＰＣ、ＰＳ、ＣＯＣ、ＣＯＰ、ＰＤＭＳ等）とされる。アレイ１の材質は、自家蛍光が少なく、波長分散が小さいため、光学誤差の少ない材質を選択するのが好ましい。

【００２１】

下層部１ａと上層部１ｂの対抗面間の距離（空間１ｃの高さ）は、特に限定されないが、１０μｍ～１００μｍ程度である。

【００２２】

レセプタクル１１２は、ターゲット物質を収容可能な大きさ（容積）及び形状とされる。レセプタクル１１２の大きさは、ターゲット物質が核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体；ウイルスのいずれかである場合には、例えば、底面の直径が０．１μｍ～１０μｍ程度、高さ（深さ）が０．１μｍ～１０μｍ程度であり、容積では１ゼプトリットル～１アトリットル程度である。ウェル１１の形状は、成形のしやすさの観点から、円柱形あるいは角柱形であることが好ましい。

【００２３】

さらに、レセプタクル１１２は、後述する物質収容手順における液滴形成のため、アスペクト比が１以上、好ましくは１．１以上、１．２以上、１．３以上、１．４以上、より好ましくは１．５以上、１．６以上、１．７以上、１．８以上、１．９以上、さらに好ましくは２．０以上、２．１以上、２．２以上、２．３以上、２．４以上あるいは２．５よりも大きい値とされる。

また、アスペクト比は、１～２．５、好ましくは１．５～２．５、より好ましくは２．０～２．５とされ得る。

アスペクト比とは、レセプタクル１１２の底面の直径（レセプタクル１１２が円柱形又は直方体である場合には、開口の直径に同一）をｄとし、高さをｔとした場合に、ｔ／ｄで定義される比率である。ここで、レセプタクル１１２の底面が楕円形又は長方形等である場合には、直径ｄは、該底面の長手方向の直径をいうものとする。また、深さｔは、レセプタクル１１２の最大深さをいうものとする。

【００２４】

［物質導入手順］

はじめに、空間１ｃに、ターゲット物質３を含む第一溶媒Ｓ１を導入する（図１（Ａ）参照）。

【００２５】

ここでは、ターゲット物質３とともに、ターゲット物質３を吸光度変化及び／又は蛍光に基づいて光学的に検出するための発色基質４を導入する例を説明する。

【００２６】

第一溶媒Ｓ１は、ターゲット物質３及び発色基質４を溶解又は懸濁するために適当な溶媒であればよく、核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体、並びウイルス等を検出する際に通常用いられる溶媒が用いられる。第一溶媒Ｓ１は、例えば、水、アルコール、エーテル、ケトン、ニトリル系溶媒、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）からなる群より選択される少なくとも１つ又はこれを含む混合物などであってよく、好ましくは水である。アルコールとしては、例えばエタノール、メタノール、プロパノール、グリセリン等が挙げられる。エーテルとしては、例えばテトラヒドロフラン、ポリエチレンオキサイド、１，４－ジオキサン等が挙げられる。ケトンとしては、例えばアセトン、メチルエチルケトン等が挙げられる。ニトリル系溶媒としては、例えばアセトニトリル等が挙げられる。

【００２７】

第一溶媒Ｓ１は、緩衝物質を含んでいてもよい。緩衝物質としては、特に限定されないが、蛍光色素のｐＫａにあわせてＭＥＳ（2-Morpholinoethanesulfonic acid）、ＡＤＡ（N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid）、ＰＩＰＥＳ（Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)）、ＡＣＥＳ（N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid）、ＢＥＳ（N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid）、ＴＥＳ（N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid）ＨＥＰＥＳ（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）等のいわゆるグッドバッファー（Good's Buffer）や、Ｔｒｉｓ（Tris(hydroxymethyl)aminomethane）、ＤＥＡ（Diethanolamine）等が用いられ得る。

【００２８】

また、第一溶媒は、界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤を含むことで、第一溶液Ｓ１は、溶液導入空間１１ａ及びレセプタクル１１２内へ導入され易くなる。界面活性剤としては、特に限定されないが、例えばＴＷＥＥＮ２０（ＣＡＳ番号：9005-64-5、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン）及びＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（ＣＡＳ番号：9002-93-1、一般名ポリエチレングリコールモノ－４－オクチルフェニルエーテル（ｎ＝10））などが挙げられる。第一の溶媒２０への界面活性剤の添加濃度は、特に限定されないが、好ましくは０．０１～１％である。

【００２９】

さらに、界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性イオン界面活性剤、天然由来の界面活性剤などを広く用いることができる。

【００３０】

陰イオン性界面活性剤としては、例えば、カルボン酸型、硫酸エステル型、スルホン酸型、リン酸エステル型に分類される。このうち、具体的には、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、α-スルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルエトキシレート硫酸ナトリウムなどが挙げられ、中でも、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いることが好ましい。

【００３１】

陽イオン性界面活性剤としては、例えば、第四級アンモニウム塩型、アルキルアミン型、複素環アミン型に分類される。具体的には、例えば、ステアリルトリメチルアンモニウムクロライド、ジステアリルジメチルアンモニウムクロライド、ジデシルジメチルアンモニウムクロライド、セチルトリピリジニウムクロライド、ドデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライドなどが挙げられる。

【００３２】

非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンモノ脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステ

ル、アルキルポリグリコシド、N-メチルアルキルグルカミドなどが挙げられる。中でも、ドデシルアルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、ラウロイルジエタノールアマイドの他、Triton X（Triton X-100など）、Pluronic（登録商標）（Pluronic F-123、F-68など）、Tween (Tween 20、40、60、65、80、85など)、Brij（登録商標）（Brij 35、58、98など）、Span (Span 20、40、60、80、83、85)の名前で市販されているものが好ましい。

【００３３】

両性界面活性剤としては、例えば、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、ドデシルアミノメチルジメチルスルホプロピルベタイン、3-(テトラデシルジメチルアミニオ)プロパン-1-スルホナートなどがあるが、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート（CHAPS）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホナート（CHAPSO）などを用いることが好ましい。

【００３４】

天然由来の界面活性剤としては、例えば、レシチン、サポニンが好ましく、レシチンとして称される化合物のうち、具体的には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロールなどが好ましい。また、サポニンとしてはキラヤサポニンが好ましい。

【００３５】

ターゲット物質３と発色基質４を含む第一溶媒Ｓ１は、例えば上層部１ｂに設けられ、空間１ｃに接続されているインレットから注入すればよい。なお、空間１ｃのインレット接続側の反対側には、溶媒及びガスが排出されるアウトレットを接続することができる。空間１ｃに導入された第一溶媒Ｓ１は、下層部１ａと上層部１ｂとの間を毛管現象により進み、空間１ｃに充填される（図１（Ｂ）参照）。これよって、ターゲット物質３と発色基質４がレセプタクル１１２内に導入される。

【００３６】

第一溶媒Ｓ１中のターゲット物質３の濃度が低い場合、各レセプタクル１１２には、ターゲット物質３が１分子導入されるか全く導入されないかのどちらかとなる。また、第一溶媒Ｓ１中のターゲット物質３の濃度がより高い場合には、各レセプタクル１１２には、ターゲット物質３が２以上導入され得る。

一方で、発色基質４は、ターゲット物質３の濃度に比して十分に高い濃度で第一溶媒Ｓ１中に含まれることが好ましい。したがって、発色基質４は、ほとんど全てのレセプタクル１１２に１分子あるいは２分子以上導入される。

【００３７】

本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ１に加えて、空間１ｃに第一溶溶媒Ｓ１を導入する送液部を含んでいてよい。送液部は、第一溶媒Ｓ１が供給されるタンクと、該タンクと上記インレットとを接続するチューブ及びポンプ等を含む。

【００３８】

本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ１及び上記送液部に加えて、温度調節器を含んでいてもよい。温度調節器は、ペルチェ素子やジュール・トムソン素子等によりアレイ１の温度を制御可能なヒートブロックであってよい。

【００３９】

［物質収容手順］

次に、空間１ｂにガスＧを導入する（図１（Ｃ）参照）。ガスＧは、第一溶媒Ｓ１と同じか又は異なるインレットから注入され、第一溶媒Ｓ１と同じか又は異なるアウトレットから排出されてよい。本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ１、上記送液部に加えて、空間１ｃにガスＧを導入する送気部を含んでいてよい。送気部は、ガスＧが供給されるタンクと、該タンクと上記インレットとを接続するチューブ及びポンプ等を含む。

【００４０】

ガスＧは、本手順の環境温度（特に限定されないが、室温であってよい）において気体

であればよく、特に限定されないが、例えば空気、又は窒素ガスを好適に用いることができる。

【００４１】

空間１ｃに導入されたガスＧは、空間１ｃ内に充填されていた第一溶媒Ｓ１を置換しながら、空間１ｃを進む。これよって、レセプタクル１１２内に、発色基質４を含む第一溶媒Ｓ１の液滴Ｄが形成される（図１（Ｃ）参照）。レセプタクル１１２に形成された液滴Ｄのうち一定の割合には、発色基質４とともにターゲット物質３が封入される。

【００４２】

なお、ガスＧの導入は、インレットからガスＧを圧入する方法によって行っても、アウトレットから陰圧を加えることによりインレットからガスＧが導入されるような方法によって行ってもよい。このとき、インレットを開放した状態でアウトレットに陰圧を加えることで、インレットから空気が導入されるようにしてもよい。さらに、インレットを開放した状態とした上で、アレイ１に対して、インレットからアウトレットに向かう方向への遠心力を付与することで、空間１ｃ内に充填されていた第一溶媒Ｓ１がアウトレットから排出されるとともにインレットから空気が導入されるようにしてもよい。このような遠心力の付与方法としては、基板１を回転板上に載置する方法が挙げられる。

【００４３】

本手順において、レセプタクル１１２内に第一溶媒Ｓ１が保持されやすくして、液滴Ｄが形成されることを促進するためあるいは形成された液滴Ｄの蒸散を抑制するため、レセプタクル１１２のアスペクト比が１以上、好ましくは１．１以上、１．２以上、１．３以上、１．４以上、より好ましくは１．５以上、１．６以上、１．７以上、１．８以上、１．９以上、さらに好ましくは２．０以上、２．１以上、２．２以上、２．３以上、２．４以上あるいは２．５よりも大きい値とされる。

また、アスペクト比は、１～２．５、好ましくは１．５～２．５、より好ましくは２．０～２．５とされ得る。

アスペクト比がこの範囲よりも小さいと、レセプタクル１１２内の第一溶媒Ｓ１までもがガスＧによって置換されたり、形成された液滴Ｄが蒸散により失われてしまったりして、液滴Ｄの形成効率が低下する場合がある。なお、レセプタクル１１２の空間１ｃへの開口径に比して深さを大きくすることでレセプタクル１１２内に第一溶媒Ｓ１を保持されやすくできる。

【００４４】

液滴Ｄの形成を促進するためあるいは形成された液滴Ｄの蒸散を抑制してこれを維持するため、本手順の前段に、ガスＧを水と接触させる手順を行うことが好ましい。ガスＧを水と接触させて空間１ｃに導入されるガスＧの水蒸気飽和度を予め高めておくことにより、レセプタクル１１２内に保持された第一溶媒Ｓ１の蒸発を抑制して液滴Ｄの形成を促進し得るとともに、形成された液滴Ｄの蒸散を抑制し得る。

乾燥空気は溶媒の蒸発を促し、飽和空気は動作が不安定になる可能性がある。そのため本発明において、所定の操作がほぼ常温付近で行われるとして、気体に含まれる水分を相対湿度で定義した場合、およそ５０～８０％程度にすることが好ましい。

本発明に係る物質検出用デバイスは、送気部に、ガスＧが水と接触させられるタンクを備えることが好ましい。

【００４５】

また、レセプタクル１１２内に保持された第一溶媒Ｓ１の蒸発及び形成された液滴Ｄの蒸散を抑制するためには、空間１ｃの水蒸気飽和度を高く維持することも好ましい。このために、下層部１ａに、第一溶媒Ｓ１を内部に保持可能であり、その内容積がレセプタクル１１２の内容積よりも大きくされたリザーバを形成しておくことが有効となり得る。リザーバを設けることにより、物質導入手順においてリザーバ内に導入された第一溶媒Ｓ１が、本手順において空間１ｃの水蒸気飽和度を高めるための水供給元（液溜まり）として機能できる。リザーバは、下層部１ａにおいて、ターゲット物質３の検出に影響を与えない領域に、１つ又は２つ以上設けることができる。

さらに、レセプタクル１１２内に保持された第一溶媒Ｓ１の蒸発及び形成された液滴Ｄの蒸散を抑制するためには、本手順及び次の検出手順を、湿潤環境下で行うことも有効となり得る。このために、本発明に係る物質検出用デバイスは、基板１を内部に保持して湿潤環境下に維持するためのチャンバ―を備えることが好ましい。

【００４６】

レセプタクル１１２内に保持された第一溶媒Ｓ１の蒸発及び形成された液滴Ｄの蒸散を抑制するため、第一溶媒Ｓ１が水である場合においてこれに高水和性物質を添加してもよい。高水和性物質が水を保持することで、第一溶媒Ｓ１の蒸発を抑制できる。

高水和性物質は、後述する検出手順における、ターゲット物質３の光学的、電気的及び／又は磁気的検出に影響を及ぼさない限り特に限定はされないが、例えば、アガロース及びアクリルアミド等のゲル；ポリエチレングリコール及びセルロース等の親水性高分子；並びにグリシン、ベタイン、ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース及び尿素等のオスモライトなどが好適に用いれ得る。これらの高水和性物質の第一溶媒Ｓ１への添加濃度は、例えば０．１～５％程度、好ましくは０．５～２％程度である。

【００４７】

次の検出手順では、液滴Ｄ内に存在するターゲット物質３を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する。ここで説明する例は、発色基質４の吸光度変化及び／又は蛍光を検出することによってターゲット物質３を光学的に検出するものであるが、より具体的に、ターゲット物質３が、発色基質４に対する基質切断活性を有する酵素を表面又は内部に有するウイルスであって、発色基質４が、該酵素により切断されて発色団としての反応生成物を遊離させる物質である場合を例として説明する。ただし、発色基質４は、酵素との反応後に反応前とは異なる光学特性を有する反応生成物を生成するものであればよく、反応前後で吸光度や旋光度が変化する物質や、反応後に蛍光を呈するようになる物質であってもよい。

【００４８】

このようなウイルスと酵素の組み合わせとしては以下が例示される。

【表１】

コロナウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
SARS ウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
MARS ウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
インフルエンザウイルス	ノイラミニダーゼ
ムンプウイルス（おたふく風邪）	ノイラミニダーゼ
麻疹ウイルス	ノイラミニダーゼ
ニパウイルス	ノイラミニダーゼ
イヌジステンパーウイルス	ノイラミニダーゼ

【００４９】

レセプタクル１１２に形成された液滴Ｄ中では、極小容積中で共存する、ターゲット物質３（ウイルス）の粒子表面又は内部に存在する酵素と発色基質４との反応が進行し、反応生成物が生成する。図２を参照して詳しく説明する。ウイルスの粒子表面又は内部には酵素３１が存在している（図には酵素３１がウイルス表面に存在する場合を示した）。発色基質４が、酵素３１と接触し反応すると、反応生成物６が生成する。反応生成物６は、発色基質４と異なる光学特性を示し、吸光度や旋光度のシフトや、蛍光（又は発光）を示す。

【００５０】

酵素３１と発色基質４との反応によって液滴Ｄの極小容積（ゼプトリットル～アトリットルのオーダー）中に反応生成物６が生成、蓄積される。さらに、液滴Ｄは他の溶媒や溶液と界面接触していないため、液滴Ｄに生成、蓄積された反応生成物６が液滴Ｄから漏れ

出すことがない。これらによって、次の検出手順において検出可能な濃度にまで反応生成物６の生成が迅速に進むこととなるため、検出手順における反応生成物６の高感度検出が可能とされる。

【００５１】

ウイルスがインフルエンザウイルスであり（表１参照）、発色基質４に４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－ノイラミン酸（４－Ｍｅｔｈｙｌｕｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－Ｎ－ａｃｅｔｙｌ－α－Ｄ－ｎｅｕｒａｍｉｎｉｃ　ａｃｉｄ：４ＭＵ－ＮＡＮＡ）を用いる場合を例にさらに具体的に説明する。

【００５２】

インフルエンザウイルスの粒子表面にはノイラミニダーゼ（酵素３１）が存在している。４ＭＵ－ＮＡＮＡ（発色基質４）がノイラミニダーゼと接触し反応すると、４ＭＵ－ＮＡＮＡのノイラミニダーゼによる加水分解に由来して蛍光を呈する発色団として４－メチルウンベリフェロン（反応生成物６）が生成する。４－メチルウンベリフェロンは液滴Ｄの極小容積中に蓄積され、蓄積された４－メチルウンベリフェロンが増強された蛍光を発する。

【００５３】

なお、反応生成物６は、本手順前にも、第一溶媒Ｓ１中において発色基質４と酵素３１が接触すれば生成し得るものであるが、本手順においてターゲット物質３と発色基質４を包含する第一溶媒Ｓ１の液滴Ｄが形成される前には、生成した反応生成物６が極小容積中に蓄積されることがない。このため、反応生成物６の検出において、本手順前に生成した反応生成物６の影響は無視できる程度に小さい。

【００５４】

［検出手順］

本手順では、液滴Ｄ内に存在するターゲット物質３を光学的、電気的及び／又は磁気的に検出する（図１（Ｄ）参照）。ここで説明する具体例では、液滴Ｄ内に生成した反応生成物６（４－メチルウンベリフェロン）が発する蛍光を検出することにより、ターゲット物質３としてのインフルエンザウイルスを検出する。

【００５５】

光学検出は、光源と、光源からの光をレセプタクル１１２内に集光しかつレセプタクル１１２内からの発生する光をセンサに集光する光学経路と、センサとを備える検出器７によって行うことができる。本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ１、上記送液部、及び上記送気部に加えて、検出器７を含んでいてもよい。光源からの光は、アレイ１の下方側（ウェル１１の開口面と逆面側）からレセプタクル１１２内に照射され、レセプタクル１１２内からの発生する光も同側から集光される。光源とアレイ１の間、及びアレイ１とＣＭＯＳイメージセンサ等のセンサとの間には、通常使用されるレンズやフィルタなどが配設される。

【００５６】

また、本発明に係る微小物質検出用デバイスは、アレイ１の温度を制御する温度調節器を含んでいてもよい。温度調節器には、特許文献２に開示される加熱機構又は温度調節機構を採用できる。温度調節器は、例えばペルチェ素子やジュール・トムソン素子等により温度制御可能なヒートブロックであってよい。

【００５７】

上述のとおり、反応生成物６は、物質収容手順前にも、第一溶媒Ｓ１中に生成し得るものであるが、物質収容手順前に生成した反応生成物６の多くは、物質収容手順において、ガスＧによって第一溶媒Ｓ１が置換されるとともに外部に取り除かれる。このため、本手順における反応生成物６の検出において、物質収容手順前に生成した反応生成物６がノイズとなることがなく、液滴Ｄの極小容積中で生成、蓄積した反応生成物６からのシグナルを選択的に検出できる。

【００５８】

物質導入手順における第一溶媒Ｓ１中のターゲット物質３の濃度が比較的高い場合には

、各液滴Ｄには、ターゲット物質３が２以上導入され得る。この場合、液滴Ｄ中の４－メチルウンベリフェロン（反応生成物６）の蛍光検出を行い、取得された蛍光強度と、予め作成した蛍光強度とノイラミニダーゼ活性との関係を規定した標準曲線とを用いてノイラミニダーゼの酵素活性を算出する。さらに、算出された酵素活性と、予め作成した酵素活性とウイルス粒子数との関係を規定した標準曲線を用いてインフルエンザウイルスの存在の有無の判定あるいは粒子数の定量を行う（アナログ定量）。これにより、ターゲット物質３としてのインフルエンザウイルスを検出することができ、ウイルス量を定量的に決定することもできる。

【００５９】

一方、第一溶媒Ｓ１中において、ターゲット物質３が十分に低い濃度に希釈されている場合、１つのレセプタクル１１２に入るターゲット物質３の数は０又は最大で１となり得る。この場合、ターゲット物質３が検出されたレセプタクル１１２の数と、ターゲット物質３が検出されないレセプタクル１１２の数との比率を用いて、予め作成した第一溶媒Ｓ１中のターゲット物質３の濃度と当該比率との関係を規定した標準曲線に基づいて、ターゲット物質３の濃度を決定することもできる（デジタル定量）。

物質収容手順においては、第一溶媒Ｓ１の液滴Ｄ中に反応生成物６を高濃度に蓄積させることができるため、ターゲット物質３としてのウイルスが１粒子のみレセプタクル１１２に入っている場合であっても、反応生成物６の検出を高感度に行うことができる。従って、本発明に係る物質検出方法によれば、ウイルス等のごく微量のターゲット物質３であっても高感度に検出でき、その存在量を高精度に決定することが可能となる。

【００６０】

本実施形態によれば、多数のウェル１１及びレセプタクル１１２を有する大面積のアレイ１を実現することが可能である。例えば、１００万個以上のレセプタクル１１２を有するアレイ１であっても、効率よくターゲット物質３を各レセプタクル１１２に収容することが可能である。したがって、本実施形態であれば、ターゲット分子３を高感度に検出することができるため、１０ａＭ程度の非常に低濃度のターゲット分子３であっても検出することが可能となり、例えばＤｉｇｉｔａｌＥＬＩＳＡやＥＬＩＳＡ－ＰＣＲなどのアプリケーションに応用できる。

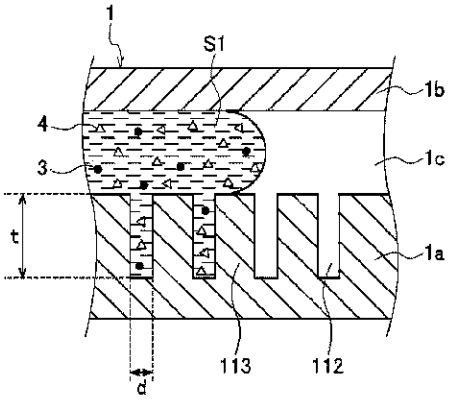
【符号の説明】

【００６１】

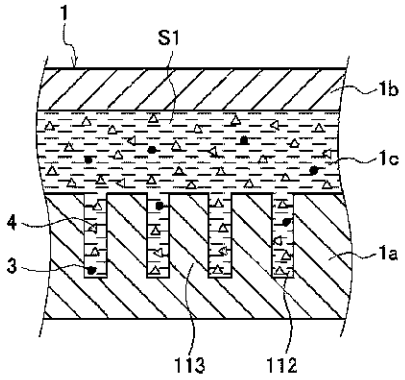
１：アレイ、１ａ：下層部、１ｂ：上層部、１ｃ：空間、１１２：レセプタクル、１１３：側壁、３：ターゲット物質、４：発色基質、６：反応生成物、７：検出器、Ｄ：液滴、Ｇ：ガス、Ｓ１：第一溶媒

【図１－１】

(A)

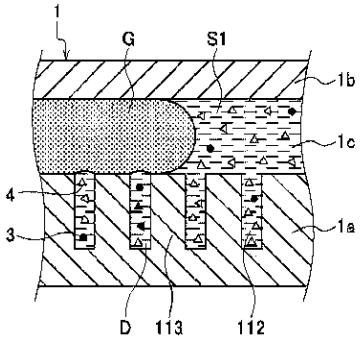


(B)

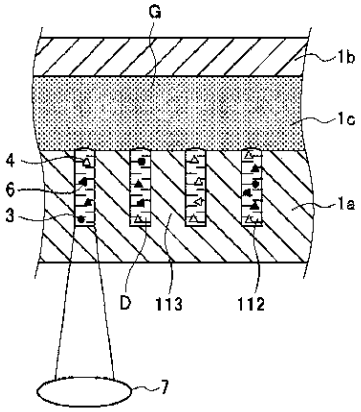


【図１－２】

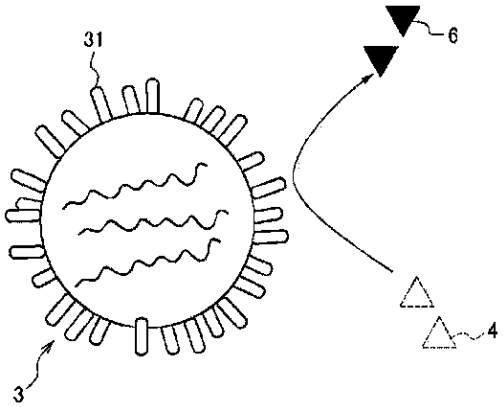
(C)



(D)



【図２】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C12M	1/34	(2006.01)	C12Q	1/70	
G01N	21/77	(2006.01)	C12M	1/34	B
			C12M	1/34	Z
			G01N	21/77	D

(72)発明者　皆川　慶嘉
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　草川　貴史

(56)参考文献　米国特許出願公開第２０１７／０００７９９８（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１６／０１０７１５９（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１４－５０３８３１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１６／００６２０８（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／１２１３１０（WO，Ａ１）
特開２００４－３０９４０５（ＪＰ，Ａ）
特開２０１０－０５４４９２（ＪＰ，Ａ）
特開２０１２－１０３２５２（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５２１３１５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５２２２３７（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)

G01N	１／００－１／４４
G01N	３５／００－３７／００
G01N	３３／４８－３３／９８
G01N	２１／７８
C12Q	１／６８
C12Q	１／７０
C12M	１／３４
G01N	２１／７７