

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-509124

(P2009-509124A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

| (51) Int.Cl.                   | F I                   | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>  | GO 1 N 33/53 Q        |             |
| <b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b> | GO 1 N 33/543 5 2 1   |             |
| <b>GO 1 N 33/577 (2006.01)</b> | GO 1 N 33/543 5 2 5 C |             |
| <b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>  | GO 1 N 33/577 B       |             |
| <b>GO 1 N 5/02 (2006.01)</b>   | GO 1 N 37/00 1 0 2    |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2008-516948 (P2008-516948) | (71) 出願人 | 500025503   |
| (86) (22) 出願日 | 平成18年6月9日 (2006.6.9)         |          | ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ<br>ティ オブ カリフォルニア  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成20年2月13日 (2008.2.13)       |          | アメリカ合衆国 カリフォルニア 946<br>07-5200, オークランド, フラン<br>クリン ストリート 1111, 12ティ<br>ーエイチ フロア |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2006/022452            | (74) 代理人 | 100078282   |
| (87) 国際公開番号   | W02006/138161                |          | 弁理士 山本 秀策   |
| (87) 国際公開日    | 平成18年12月28日 (2006.12.28)     | (74) 代理人 | 100062409   |
| (31) 優先権主張番号  | 60/692, 046                  |          | 弁理士 安村 高明   |
| (32) 優先日      | 平成17年6月16日 (2005.6.16)       | (74) 代理人 | 100113413   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 森下 夏樹   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大型の平行の免疫ベースのアレルギー試験および蛍光のエバネセント場励起のためのデバイス

## (57) 【要約】

本発明は、哺乳類（例えば、ヒトまたはヒト以外の哺乳類）で1つ以上のアレルギー（例えば、I g E 媒介アレルギー反応（即時型過敏症）を引き起こす）の速やかな検出および/または診断および/または特徴付けのためのデバイスおよび方法を提供する。ある実施態様では、デバイスはマイクロカンチレバーアレイを備え、前記アレイを構成するカンチレバーは異なる抗原を有する。カンチレバーで I g E が抗原へ結合すると、カンチレバーが曲がり、容易に検出することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アレルギーを検出し、そして特徴付けを行うためのデバイスであって、  
サンプルチャンバと、

マイクロカンチレバーのアレイであって、検出したいそれぞれのアレルギーに対して異なる種の抗原が存在し、また異なる種の抗原が該アレイの異なるマイクロカンチレバーに存在するように、該アレイを構成するマイクロカンチレバーに抗原を付着させた、マイクロカンチレバーのアレイと、  
を備え、該マイクロカンチレバーの自由端は該サンプルチャンバに突出している、デバイス。

10

**【請求項 2】**

前記デバイスは、それぞれに異なる結合部分を付着させた少なくとも 4 つのマイクロカンチレバーを備える、請求項 1 に記載のデバイス。

**【請求項 3】**

前記デバイスは、それぞれに異なる結合部分を付着させた少なくとも 10 のマイクロカンチレバーを備える、請求項 1 に記載のデバイス。

**【請求項 4】**

前記デバイスは、それぞれに異なる結合部分を付着させた少なくとも 100 のマイクロカンチレバーを備える、請求項 1 に記載のデバイス。

**【請求項 5】**

前記デバイスは、タンパク質による結合に抵抗するよう処理されたネガティブコントロールマイクロカンチレバーを備える、請求項 1 に記載のデバイス。

20

**【請求項 6】**

前記デバイスは、I g E 抗体に結合する抗体を固着させたポジティブコントロールマイクロカンチレバーを備える、請求項 1 または 5 に記載のデバイス。

**【請求項 7】**

I g E 抗体に結合する前記抗体は単鎖抗体である、請求項 6 に記載のデバイス。

**【請求項 8】**

I g E 抗体に結合する前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載のデバイス。

30

**【請求項 9】**

前記カンチレバーの結合部分が標的検体に結合したときの該カンチレバーの偏向を検出する第 1 の手段をさらに備える、請求項 1 に記載のデバイス。

**【請求項 10】**

前記カンチレバーの結合部分が標的検体に結合したときの該カンチレバーの偏向を検出する第 2 の手段をさらに備える、請求項 9 に記載のデバイス。

**【請求項 11】**

前記第 1 の手段および前記第 2 の手段は、光学的検出手段、ピエゾ抵抗検出手段、圧電検出手段、およびエバネセント波検出手段から成る群から独立して選択される、請求項 9 または 10 のデバイス。

40

**【請求項 12】**

前記アレルギーは、ペットアレルギー、ほこり、カビ孢子、花粉、食物アレルギー、および虫刺されアレルギーから成る群から選択される、請求項 1 に記載のデバイス。

**【請求項 13】**

対象におけるアレルギーを特定する方法であって、

I g E 抗体を含む、該対象由来の生体サンプルを提供するステップと；

該生体サンプルまたはその成分を、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載のデバイスと接触させるステップと；

I g E による結合に反応する、該マイクロカンチレバーアレイの 1 つ以上のカンチレバーの偏向を検出するステップであって、該カンチレバーの結合は、該対象が該偏向された

50

カンチレバーに存在する該抗原に対してアレルギー反応を有することを示す、ステップと、  
を含む、方法。

【請求項 14】

前記検出は、光信号の検出、ピエゾ抵抗信号の検出、光信号の検出、エバネセント波信号の検出から成る群から選択される方法を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記検出するステップは、少なくとも 2 つの異なる検出方法を使用するステップを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記サンプルは、全血、血漿、または血清を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

複数の検体の存在、非存在、または量を検出するためのデバイスであって、  
サンプルチャンバと、

マイクロカンチレバーのアレイであって、検出されるそれぞれの種の検体の特異的に、または優先的に結合させる異なる種の結合部分が存在し、かつ異なる種の結合部分が該アレイの異なるマイクロカンチレバーに存在するように、該アレイを構成するマイクロカンチレバーに結合部分を付着させた、マイクロカンチレバーのアレイと、  
を備え、

該マイクロカンチレバーの自由端は該サンプルチャンバに突出している、デバイス。

【請求項 18】

前記デバイスは、それぞれに異なる結合部分を付着させた少なくとも 4 つのマイクロカンチレバーを備える、請求項 17 に記載のデバイス。

【請求項 19】

前記デバイスは、それぞれに異なる結合部分を付着させた少なくとも 10 のマイクロカンチレバーを備える、請求項 17 に記載のデバイス。

【請求項 20】

前記カンチレバーの結合部分が標的検体に結合したときの該カンチレバーの偏向を検出する第 1 の手段をさらに備える、請求項 17 に記載のデバイス。

【請求項 21】

前記カンチレバーの結合部分が標的検体に結合したときの該カンチレバーの偏向を検出する第 2 の手段をさらに備える、請求項 20 に記載のデバイス。

【請求項 22】

前記第 1 の手段および前記第 2 の手段は、ピエゾ抵抗検出手段、圧電検出手段、および光学的検出手段から成る群から独立して選択される、請求項 20 または 21 のデバイス。

【請求項 23】

前記第 1 の手段および前記第 2 の手段は、光ビーム偏向を検出する手段、光移相を検出する手段、光強度変動を検出する手段、および蛍光のエバネセント場励起を検出する手段から成る群から選択される光学的検出手段である、請求項 22 に記載のデバイス。

【請求項 24】

サンプルを支持し、そして全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) における蛍光のエバネセント場励起を提供するためのデバイスであって、

2 つの実質的に平行な面を備える、実質的に平面の光導波路と；

結合器から生成された光が該導波路に入るように、該導波路と付着または並列される能動型光結合器であって、蛍光プローブでない、能動型光結合器と、  
を備える、デバイス。

【請求項 25】

サンプルを支持し、そして全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) における蛍光のエバネセント場励起を提供するためのデバイスであって、

2 つの実質的に平行な面を備える、実質的に平面の光導波路と；

10

20

30

40

50

結合器から生成された光が該導波路に入るように、該導波路と付着または並列される能動型光結合器と、

屈折率が該導波路と空気との間にある材料から構成される角フィルターであって、所定範囲内の角度における該導波路での光伝搬を実質上低減するように、該導波路の表面に配置される角フィルターと、  
を備える、デバイス。

【請求項 26】

サンプルを支持し、そして全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) における蛍光のエバネセント場励起を提供するためのデバイスであって、

2つの実質的に平行な面を備える、実質的に平面の光導波路と；

結合器から供給される光が該導波路に入るように、該導波路と付着または並列される受動型光結合器と、  
を備える、デバイス。

【請求項 27】

前記能動型光結合器は電動結合器または光励起レーザーである、請求項 24 または 25 のいずれかひとつに記載のデバイス。

【請求項 28】

前記能動型光結合器は、発光ダイオード (LED)、半導体レーザー、エレクトロルミネセント素子、およびマイクロプラズマ放電デバイスから成る群から選択される電動結合器である、請求項 27 に記載のデバイス。

【請求項 29】

前記能動型光結合器は蛍光プローブである、請求項 25 に記載のデバイス。

【請求項 30】

前記受動型光結合器は、レンズ、プリズム、ファセット、格子、鏡、グラジエントインデックス構造、および散乱構造から成る群から選択される、請求項 26 に記載のデバイス。

【請求項 31】

前記デバイスは、屈折率が前記導波路と空気との間にある材料から構成される角フィルターをさらに備え、該角フィルターは該導波路での光伝搬を実質上低減するように、該導波路の表面に配置される、請求項 24 または 26 のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 32】

前記角フィルターは、前記導波路の表面に対して垂直、かつ該導波路内に引かれた直線に対して相対的に計測される、臨界角に満たない角度の該導波路での光伝搬を実質的に排除または低減し、該臨界角は約 35 度から約 70 度の範囲である、請求項 31 に記載のデバイス。

【請求項 33】

前記角フィルターは、前記導波路の表面に対して垂直、かつ該導波路内に引かれた直線に対して相対的に計測される、臨界角に満たない角度の該導波路での光伝搬を実質的に排除または低減し、該臨界角は約 35 度から約 70 度の範囲である、請求項 25 に記載のデバイス。

【請求項 34】

前記導波路は屈折指数が約 1.4 以上である、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 35】

前記導波路は、厚さが約 50  $\mu\text{m}$  から約 1 mm の範囲である、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 36】

前記導波路は、厚さが約 50  $\mu\text{m}$  から約 500  $\mu\text{m}$  の範囲である、請求項 35 に記載のデバイス。

【請求項 37】

前記導波路は、厚さが約 100  $\mu\text{m}$  から約 200  $\mu\text{m}$  の範囲である、請求項 35 に記載の

10

20

30

40

50

デバイス。

【請求項 38】

前記導波路は、ガラス、プラスチック、および結晶質材料から成る群から選択される材料から構成される、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 39】

前記導波路は、石英、サファイア、シリコン炭化物、フッ化カルシウム、窒化アルミニウム、窒化ガリウム、アルミニウム窒化ガリウム、フッ化マグネシウム、およびニオブ酸リチウムから成る群から選択される結晶質材料から構成される、請求項 38 に記載のデバイス。

【請求項 40】

前記導波路はカバーリップを備える、請求項 38 に記載のデバイス。

【請求項 41】

前記デバイスは、前記導波路のすぐ下に、実質上平面の低屈折率材料をさらに備える、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 42】

前記低屈折率材料は、前記導波路より少なくとも 0.05 下回る屈折性、および少なくとも 1 μm の厚さを有する、請求項 41 に記載のデバイス。

【請求項 43】

前記光結合器は、前記導波路に積層される、請求項 24、25、または 26 に記載のデバイス。

【請求項 44】

前記デバイスは、すべてまたは一部のサンプルが前記光導波路からエバネセント場にさらされるように、該サンプルを支持するか、または付着させるための手段をさらに備える、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 45】

前記手段は 1 つ以上の液体レザバを備える、請求項 44 に記載の前記デバイス。

【請求項 46】

前記デバイスは、励起光の強度を測定するための手段をさらに備える、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 47】

励起強度を測定する前記手段は、目的の前記サンプルを励起するのに使用されるものと同じエバネセント場によって励起され、そして励起強度に比例する蛍光を放射する、1 つ以上の蛍光プローブを備える、請求項 46 に記載のデバイス。

【請求項 48】

前記蛍光プローブは、既知の、かつ容易に区別できるパターンで前記導波路の表面上に分散される、請求項 47 に記載のデバイス。

【請求項 49】

励起強度を測定する前記手段は、前記励起光の一部を遮断する光ダイオードを備える、請求項 46 に記載のデバイス。

【請求項 50】

前記デバイスは、前記導波路の表面からのサンプル距離を定量化するための手段をさらに備える、請求項 24、25、または 26 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 51】

サンプル距離を定量化する前記手段は、前記導波路の表面から既知の距離に蛍光マーカーを備える、請求項 50 に記載のデバイス。

【請求項 52】

サンプル距離を定量化する前記手段は、有意に異なる波長の光によって励起することができるサンプル蛍光プローブとともに、有意に異なる波長の光を放射する 2 つ以上の結合器を備える、請求項 50 に記載のデバイス。

【請求項 53】

前記デバイスは、前記導波路の表面から既知の距離に蛍光マーカーを備える、請求項 52 に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

前記デバイスは、前記導波路の表面に配置された流体の境界、またはそれらの流体を含有する構造の境界で、励起光の分散を低減する構造をさらに備える、請求項 2 4、2 5、または 2 6 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 5 4】

前記構造は、反射防止層および / または吸収層を備える、請求項 5 3 に記載のデバイス。

【請求項 5 5】

前記構造と前記基板との間の接点で分散される光が前記構造の別の部分によってその後遮断および吸収されるように、該構造は、該含有される流体とほとんど等しい屈折指数を有する材料から製作される構造、およびリエントリ型を有する構造から成る群から選択される、請求項 5 3 に記載のデバイス。

10

【請求項 5 6】

前記サンプルの反対側の前記平面は、厚さが約 1 マイクロメートルより厚く、屈折指数が前記導波路より低い、滑らかで透明な層でコーティングされ、該導波路で全反射によって捕捉される光が、該層の該表面に一過性的に浸透しないようにする、請求項 2 4、2 5、または 2 6 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 5 7】

前記平面に対していくらかの範囲の伝搬角度以内で前記導波路内に伝搬する励起光が、前記基板から出て固体または液体層へ伝達され、続いて前記デバイスから離れて伝達されるか、または吸収されるように、該固体または液体層が該基板に配置される、請求項 2 4、2 5、または 2 6 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

20

【請求項 5 8】

選択された波長のサンプル蛍光のみが前記フィルターを通して伝達されるように、前記サンプルと反対側の平面は、吸収性または反射性光学フィルターでコーティングされる、請求項 2 4、2 5、または 2 6 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【請求項 5 9】

前記デバイスは使い捨てである、請求項 2 4、2 5、または 2 6 のいずれか 1 つに記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

発明の分野

本発明は診断の分野に関する。特に、本発明は免疫学的アレルギー検査のための微細加工大型デバイスを提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

アレルギーの診断においては 3 つの主要な手法が使用されてきた。これらは、皮膚試験、I g E 血中濃度のアッセイ、およびヒスタミン遊離試験を含む。皮膚試験はアレルギーの診断に最も一般に利用される手段である。従来の皮膚試験は、皮膚に取り込まれた抗原が、前もって産生されたメディエーター放出、血管透過性亢進、局所浮腫および搔痒を引き起こす、I 型膨疹および発赤反応アッセイである。かかる皮膚試験は、治療的背景に基づいて行われる特異的なアレルギーの診断に対して有用な補強証拠を提供する。しかしながら、不適切に行われると、皮膚試験は偽陽性または偽陰性の結果につながる場合がある。とりわけ、陽性反応は、アレルギーのない一部の個人では、どんなアレルギー症状もなく皮膚検査に対して膨疹および発赤反応を引き起こす特異的な I g E 抗体を有するので、疾患が事実上アレルギー性であることを必ずしも意味しないことが問題である。

40

【0003】

皮膚試験で観察される I g E 媒介の偽陽性現象は、患者血清中のアレルギー特異的な I g E を分析するための *in vitro* 方法では観察されない (Homburger および Katzmann (1993) *Methods in Laboratory Immu*

50

nology: Principles and Interpretation of Laboratory Tests for Allergy, Po. 554 - 572 In: Allergy Principles and Practice、編集者 Middletonら、Mosby出版、第4版、第1巻、第21章参照)。通常、アレルギー特異的なIgE値は、患者の血清が、抗原コーティングされた吸収剤粒子でインキュベートされ、標識抗体により抗原に結合される特異的なIgEが検出される、放射性アレルギー吸着試験(RAST)によって測定される(例えば、Schellengerら(1975) J. Immunol.、115: 1577 - 1583参照)。

#### 【0004】

血清IgE総値もまた、アレルギーの診断に使用される。IgE総値は通常、HomburgerおよびKatzmannによって説明された上記の放射免疫検出法または免疫測定検定法によって測定されてきた。IgE値はアレルギー性疾患でしばしば上昇し、寄生虫の繁殖で著しく上昇する。アトピー性疾患の存在について小児または成人を評価すると、正常なIgE総値はアトピーを除外しないが、IgE値が上昇すると診断の助けとなる。臨床症状の発生に重要な役割を果たす遺伝因子および環境因子があるので、総IgEの単独の測定により、アレルギー状態が予測されることはない。アレルギー診断での血清IgE総値の数値データはまた、健常人では広範囲のIgE血清濃度によって制限される。成人健常者でのIgE濃度の度数分布は、幅広の95パーセントイル限界値および不均衡な数の低いIgE値により著しく非対称になる。したがって、正常なIgE値の95パーセントイル限界値を計算する際は、ほとんどの治験責任医師は、算術的平均と比較すると非常に高くなる正常血清IgEの上限を設定する対数変換によってデータを処理する。正常血清IgEのこれらの最上限により、臨床アレルギーのスクリーニングでの血清IgE検査の診断価値を損なう。

#### 【0005】

ヒスタミン遊離試験は、患者血清での機能的な、アレルギー特異的なIgEを検出する方法を提供する。通常、ヒスタミン遊離試験は、患者で発生するアレルギー特異的な反応を模倣する(例えば、非特許文献1参照)。この反応は、患者の血液と異なるアレルギーを混合し、その後続いて起こるアレルギー反応のそれぞれの間遊離したヒスタミンの量を測定することによって体外で生成されてきた。in vitroヒスタミン遊離試験は最初に、全血および/または遊離型ヒスタミンの多様な抽出から白血球が単離することが必要である。細胞単離およびヒスタミン抽出を回避するために、白血球ヒスタミン遊離試験は続いて精密化および自動化される(例えば、非特許文献2参照)。現在のところ、市販の白血球ヒスタミン遊離試験キットは、2.5mlの全血を使用して最大100の分離測定が可能である。しかしながら、血液サンプルは、アッセイに先立ち24時間より前には保存することができない。さらに、試験は、アレルギー抽出の毒性またはその他の要因によって生成される非特異的なヒスタミン遊離により、偽陽性の結果を生み出す。さらに、品質管理研究は、ヒスタミンの測定において研究室間で相当数のばらつきを報告している(非特許文献3)。

#### 【0006】

さらに、アレルギー症状、陽性皮膚試験および明らかに検出可能なIgE抗体を有する特異的な患者では、in vitroヒスタミン遊離は、アレルギーを有する患者の好塩基球から得ることができない。ポジティブコントロールが利用できない場合、これによりヒスタミン遊離の結果を解明することが不可能となり、アレルギー性疾患を診断する際の試験の有用性が限定される。非特許文献4は、アレルギー特異的なIgE、続いて体外のアレルギーチャレンジで受動感作すると、アレルギーのない個人のわずか20から30%からの白血球がヒスタミン遊離を示すと報告した。非特許文献5は、重水(D<sub>2</sub>O)による白血球のインキュベーションは、抗ブタクサ血清を有する白血球およびブタクサ抗原を有するチャレンジの受動感作によって誘導されるヒスタミン遊離を増進することを示すことによって試験の有用性を拡大した。非特許文献6は、遊離しないアレルギー患者からの血清、続いてアレルギー誘導性ヒスタミン遊離を有するアレルギーのない患者からの、

10

20

30

40

50

単離した、IgE喪失の白血球の受動感作を報告した。しかしながら、この方法は、アレルギーのないドナーの全血からの制御白血球の単離、続いてドナー細胞へ結合されるIgEの除去が必要となる。さらに、多様な手順は、上記のその他のヒスタミン遊離試験の有用性を限定する同じヒスタミンアッセイのばらつきに影響を受けやすい。

【非特許文献1】der Zeeら(1988) J. Allergy Clin. Immunol.、82:270-281

【非特許文献2】Siraganiら(1976) J. Allergy Clin. Immunol.、57:525-540

【非特許文献3】GleichおよびHull(1980) J. Allergy Clin. Immunol.、66:295-298

【非特許文献4】LevyおよびOsler(1967) J. Immunol.、99:1062-1067

【非特許文献5】Ishizakaら(1973) J. Immunol.、111:500-511

【非特許文献6】Prahlaら(1988) アレルギー、43:442-448

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の要旨

本発明は、哺乳類(例えば、ヒトまたはヒト以外の哺乳類)で1つ以上のアレルギー(例えば、IgE媒介アレルギー反応(即時型過敏症)を引き起こす)の速やかな検出および/または診断および/または特徴付けのためのデバイスおよび方法を提供する。ある実施態様では、デバイスはマイクロカンチレバーアレイを備え、前記アレイを構成する異なるカンチレバーは異なる抗原を有する。カンチレバーでIgEが抗原へ結合すると、カンチレバーが曲がり、容易に検出することができる。

【0008】

したがって、ある実施態様では、本発明は、アレルギーを検出して特性を示すためのデバイスを提供する。前記デバイスは通常、サンプルチャンバと、マイクロカンチレバーのアレイであって、検出したいそれぞれのアレルギーに対して異なる種の抗原があり、また異なる種の抗原が前記アレイの異なるマイクロカンチレバーにあるように、前記アレイを構成するマイクロカンチレバーに抗原を付着させた、マイクロカンチレバーのアレイとを備え、前記マイクロカンチレバーの自由端は前記サンプルチャンバに突出する。ある実施態様では、前記デバイスは、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも4つ、6つまたは10、より好ましくは少なくとも20、50、100、または500、最も好ましくは少なくとも1000のマイクロカンチレバーを備え、それぞれに異なる結合部分を付着させる。様々な実施態様では、前記デバイスは、タンパク質による結合に抵抗するよう処理された1つ以上のネガティブコントロールマイクロカンチレバー、または生体サンプルに存在することができるその他の部分を備える。様々な実施態様では、前記デバイスは、IgE抗体に結合する抗体を固着させた、1つ以上のポジティブコントロールマイクロカンチレバーを備える。ある実施態様では、IgE抗体に結合する前記抗体は単鎖抗体、または全抗体、または抗体フラグメントである。ある実施態様では、前記抗体はモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。前記デバイスは、カンチレバーの結合部分が標的検体を結合したときの前記カンチレバーの偏向を検出する第1の手段をさらに任意に備えることができ、またカンチレバーの結合部分が標的検体を結合したときの前記カンチレバーの偏向を検出する第2の手段を任意に備えることができる。様々な実施態様では、前記第1の手段および存在する場合には前記第2の手段は、ピエゾ抵抗検出手段、圧電検出手段、および光学的検出手段より成る群から独立して選択され、後者は、光ビーム偏向、光移相、光強度変動、および/または蛍光のエバネセント場励起を検出するための手段を備える。ある実施態様では、前記アレルギーは、ペットアレルギー、ほこり、カビ孢子、花粉、食物アレルギー、および虫刺されアレルギーより成る群から選択される。

10

20

30

40

50

## 【0009】

様々な実施態様では、本発明は、対象のアレルギーを特定する方法を提供する。前記方法は通常、IgE抗体を含む前記対象からの生体サンプルを用意するステップと、前記生体サンプルまたはその成分を、本明細書に説明するマイクロカンチレバーデバイスと接触させるステップと、IgEによる結合に反応して前記マイクロカンチレバーアレイの1つ以上のカンチレバーの偏向を検出するステップであって、前記カンチレバーの結合は、前記対象が前記偏向されたカンチレバーに存在する前記抗原に対してアレルギー反応を有することを示す、ステップとを必要とする。ある実施態様では、前記検出するステップは、光信号を検出するステップ、ピエゾ抵抗信号を検出するステップ、光信号を検出するステップ、エバネセント波信号を検出するステップより成る群から選択される方法を含む。ある実施態様では、前記検出するステップは、少なくとも2つの異なる検出方法を使用するステップを含む。様々な実施態様では、前記サンプルは、全血、血漿、血清、リンパ液、口腔液、または脳脊髄液を含む。

10

## 【0010】

さらにその他の実施態様では、本発明は、複数の検体の存在、非存在、または量を検出するためのデバイスを提供する。前記デバイスは通常、サンプル領域またはチャンバと、マイクロカンチレバーのアレイであって、検出されるそれぞれの種の検体を特異的に、または優先的に結合させる異なる種の結合部分があり、また異なる種の結合部分が前記アレイの異なるマイクロカンチレバーにあるように、前記アレイを構成するマイクロカンチレバーに結合部分を付着させた、マイクロカンチレバーのアレイとを備え、マイクロカンチレバーの自由端は前記サンプルチャンバに突出する。ある実施態様では、前記デバイスは少なくとも2つ、好ましくは少なくとも4つ、6つまたは10、より好ましくは少なくとも20、50、100、または500、最も好ましくは少なくとも1000のマイクロカンチレバーを備え、それぞれに異なる結合部分を付着させる。適切な結合部分は、核酸、抗体、受容体、炭水化物、タンパク質、糖タンパク質、および同等物を含むが、それらに限定されない。前記デバイスは、カンチレバーの結合部分が標的検体を結合したときの前記カンチレバーの偏向を検出する第1の手段をさらに任意に備えることができ、またカンチレバーの結合部分が標的検体を結合したときの前記カンチレバーの偏向を検出する第2の手段を任意に備えることができる。様々な実施態様では、前記第1の手段および存在する場合には前記第2の手段は、光学的検出手段、ピエゾ抵抗検出手段、圧電検出手段、およびエバネセント波検出手段より成る群から独立して選択される。

20

30

## 【0011】

本発明はまた、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)で使用するための改良されたデバイスを提供する。すなわち、ある実施態様では、本発明は、サンプルを支持するための、また全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)のエバネセント場励起を提供するためのデバイスであって、前記デバイスは、実質上平行な面を2つ備える実質上平面の光導波路と、結合器から生成された光が前記導波路に入るように前記導波路と付着または並列される能動型光結合器であって、蛍光プローブでない能動型光結合器とを備える。ある実施態様では、前記デバイスは、サンプルを支持するための、また全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)のエバネセント場励起を提供するためのデバイスであって、前記デバイスは、実質上平行な面を2つ備える実質上平面の光導波路と、結合器から生成された光が前記導波路に入るように、前記導波路と付着または並列される能動型光結合器と、屈折率が前記導波路と空気との間にある材料を備える角フィルターであって、前記導波路での光伝搬を実質上低減するために、前記導波路の表面に配置される角フィルターとを備える。ある実施態様では、前記デバイスは、サンプルを支持するための、また全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)のエバネセント場励起を提供するためのデバイスであって、前記デバイスは、実質上平行な面を2つ備える実質上平面の光導波路と、結合器から供給される光が前記導波路に入るように、前記導波路と付着または並列させる受動型光結合器とを備える。ある実施態様では、前記能動型光結合器は電動結合器または光励起レーザーである。様々な実施態様では、前記能動型光結合器は、発光ダイオード(LED)、半導体レーザーより成る群から選択される電動

40

50

結合器である。様々な実施態様では、前記能動型光結合器は蛍光プローブである。ある実施態様では、前記受動型光結合器は、レンズ、プリズム、ファセット、格子、鏡、グラジエントインデックス構造、および散乱構造より成る群から選択される。様々な実施態様では、前記デバイスは、屈折率が前記導波路と空気との間にある材料を備える角フィルターをさらに備え、前記角フィルターは前記導波路での光伝搬を実質上低減するために、前記導波路の表面に配置される。様々な実施態様では、前記角フィルターは、前記導波路の表面に対して垂直な、前記導波路内に引いた直線に対して相対的に計測される、ある臨界角に満たない角度で前記導波路での光伝搬を実質上排除または低減し、用途に応じて、前記臨界角は約35度から約70度に及ぶ。様々な実施態様では、前記導波路は屈折指数が約1.4以上である。ある実施態様では、前記導波路は、厚さが約50 $\mu\text{m}$ から約1mm、好ましくは約50 $\mu\text{m}$ から約500 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約100 $\mu\text{m}$ から約200 $\mu\text{m}$ に及ぶ。適切な導波路は通常、ガラス、プラスチック、および結晶質材料（例えば、石英、サファイア、シリコン炭化物、フッ化カルシウム、窒化アルミニウム、窒化ガリウム、アルミニウム窒化ガリウム、ニオブ酸リチウムなど）より成る群から選択される材料を含む。ある実施態様では、前記導波路はカバースリップを備える。

#### 【0012】

ある実施態様では、前記光結合器は、前記導波路に積層、化学吸着、またはセメント接着される。ある実施態様では、前記光結合器は前記導波路の本来の位置で製作される。様々な実施態様では、前記デバイスは、すべてまたは一部のサンプルが前記光導波路からエバネセント場にさらされるように、前記サンプルを支持する、または付着させるための手段（例えば、液体レザバ、台座、ウェルなど）をさらに任意に備える。前記デバイスは、励起光の強度を測定するための手段をさらに任意に備えることができる（例えば、エバネセント場）。ある実施態様では、励起強度を測定する前記手段は、当該の前記サンプルを励起するのに使用されるものと同じエバネセント場によって励起され、また励起強度に比例する蛍光を放射する1つ以上の蛍光プローブを備える。前記蛍光プローブは、容易に区別できる既知のパターン、または任意的および/または偶然的パターンで前記導波路の表面上に分散することができる。ある実施態様では、励起強度を測定する前記手段は、前記励起光の一部を遮断する光ダイオードを備える（例えば、エバネセント場）。前記デバイスは、前記導波路の表面からのサンプル距離を定量化するための手段をさらに任意に備えることができる。ある実施態様では、サンプル距離を定量化する前記手段は、前記導波路の表面から既知の距離に蛍光マーカを備える。ある実施態様では、サンプル距離を定量化する前記手段は、有意に異なる波長の光によって励起することができるサンプル蛍光プローブとともに、有意に異なる波長の光を放射する2つ以上の結合器を備える。前記デバイスは、前記導波路の表面に配置された流体の境界、またはそれらの流体を含有する構造の境界で、励起光の分散を低減する構造をさらに含むことができる。ある実施態様では、前記構造は、反射防止層および/または吸収層を備える。ある実施態様では、前記構造と前記基板との間の接点で分散される光が前記構造のその他の部分によってその後遮断および吸収されるように、前記構造は、前記含有流体とほとんど等しい屈折指数を有する材料から製作される構造、およびリエントリ型を有する構造より成る群から選択される。様々な実施態様では、前記サンプルの反対側の前記平面は、厚さが約1マイクロメートルより厚く、屈折指数が前記導波路より低い、滑らかで透明な層でコーティングされ、前記導波路で全反射によって捕捉される光が、前記層の前記表面に一過性的に浸透しないようにする。このようにして、様々な実施態様では、前記デバイスは、前記導波路のすぐ下に、実質上平面の低屈折率材料をさらに備える。通常、前記低屈折率材料は、屈折性が前記導波路より少なくとも0.02、好ましくは少なくとも0.05、より好ましくは少なくとも0.10下回り、厚さが少なくとも1 $\mu\text{m}$ 、好ましくは少なくとも2 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは少なくとも5 $\mu\text{m}$ または10 $\mu\text{m}$ である。ある実施態様では、前記平面に対していくらかの範囲の伝搬角度以内で前記導波路内に伝搬する励起光が、前記基板から出て固体または液体層へ伝達され、続いて前記デバイスから離れて伝達される、または吸収されるように、前記固体または液体層は前記基板に配置される。様々な実施態様では、選択された

10

20

30

40

50

波長のサンプル蛍光のみが前記フィルターを通して伝達されるように、前記サンプルと反対側の平面は、吸収性または反射性光学フィルターでコーティングされる。

【0013】

ある実施態様では、前記能動型結合器は蛍光プローブではない。前記除外は、自然放出ではなく誘導放出によって放射する、光励起レーザーの内側での蛍光プローブを使用することを除外することを意図するものではない。したがって、別に指定がない限り、前記除外は自然放出によって放射する蛍光プローブのみを排除する。その他のある実施態様では、誘導放出によって放射する蛍光プローブを除外する

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

定義

本明細書で使用する際は、「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質上コード化される1つ以上のポリペプチドより成るタンパク質を指す。存在が認められている免疫グロブリン遺伝子は、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子と同様に、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子を含む。軽鎖はカッパまたはラムダのどちらかに分類されている。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類されていて、それらは免疫グロブリンクラス、I g G、I g M、I g A、I g DおよびI g Eをそれぞれ定義する。

【0015】

標準的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体より成ることが知られている。それぞれの四量体は、2つの相同対のポリペプチド鎖から成り、それぞれの対は1つの「軽」鎖（約25 kD）および1つの「重」鎖（約50～70 kD）を有する。それぞれの鎖のN端は、抗原認識に対して最終的な要因である約100から110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。用語可変軽鎖（V<sub>L</sub>）および可変重鎖（V<sub>H</sub>）とは、これらの軽鎖および重鎖をそれぞれ指す。

【0016】

抗体は無傷免疫グロブリンとして、または各種ペプチダーゼによる消化によって生成される、十分特徴付けられている多くのフラグメントとして存在する。このようにして、例えばそれ自体がジスルフィド結合によってV<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1に結合される軽鎖であるF(ab)<sub>2</sub>、Fabの二量体を生成するために、ペプシンはヒンジ領域でジスルフィド結合よりも下位で抗体を消化する。F(ab)<sub>2</sub>は軽度の状態では低減される場合があり、ヒンジ領域でのジスルフィド結合を分離することによって、(Fab)<sub>2</sub>二量体をFabモノマーに変換する。Fabモノマーは本質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである（その他の抗体フラグメントのより詳細な説明については、Fundamental Immunology、編集者W. E. Paul、Raven Press、ニューヨーク（1993）を参照）。様々な抗体フラグメントは無傷抗体の消化されたものとして定義されているが、当業者は、かかるFabフラグメントを化学的に、または組み換えDNA方法論を使用することによって新たに合成してもよいことを理解するであろう。このようにして、用語抗体はまた、本明細書で使用する際は、全抗体を修正することによって生成される、または組み換えDNA方法論を使用して新たに合成される抗体フラグメントを含む。好ましい抗体は、単鎖抗体（単一のポリペプチド鎖として存在する抗体）、より好ましくは、可変重鎖と可変軽鎖が結合され（直接またはペプチドリンカーにより）、連続ポリペプチドを形成する、一本鎖Fv抗体（sFvまたはscFv）を含む。一本鎖Fv抗体は、共有結合しているV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ヘテロ二量体であり、それは直接結合される、またはペプチドコードリンカーによって結合されるV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>コード配列を含む核酸から発現する場合がある。Hustonら（1988）Proc. Nat. Acad. Sci. 米国、85:5879-5883。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>は単一のポリペプチド鎖としてそれぞれに結合するが、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>領域は非共有結合する。線状ファージの表面に発現する第1の機能的抗体分子は一本鎖Fv's（scFv）であったが、しかしながら、代替の発現戦

10

20

30

40

50

略もまた成功であった。例えば、鎖（重または軽）のうちの1つが、g3カプシドタンパク質と融合し、相補鎖が可溶性分子としてペリプラズムへ転送されたならば、Fab分子はファージに示すことができる。2つの鎖は、同じ、または異なるレプリコンでコード化することができ、重要な点は、それぞれのFab分子の2つの抗体鎖が翻訳後に結集し、二量体は、例えば、g3pへの、鎖のうちの1つの結合によってファージ粒子に組み込まれることである（例えば、U.S. Patent No: 5733743参照）。scFv抗体、および自然に会合するが、化学的に分離するポリペプチド軽鎖および重鎖を、抗体V領域から、抗原結合部位の構造と実質上類似している三次元構造に折り畳まる分子に変換する多くのその他の構造が当業者に知られている（例えば、米国特許第5,091,513号、第5,132,405号および第4,956,778号参照）。とりわけ好ましい抗体は、ファージに示されたすべてを含むべきである（例えば、scFv, Fv, Fabおよびジスルフィド結合Fv（Reiterら（1995）Protein Eng. 8:1323-1331））。

10

## 【0017】

用語「結合パートナー」または「捕捉剤」、または「結合対」の員とは、その他の分子に特異的に結合して、抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビジンなどのような結合複合体を形成する分子を指す。

## 【0018】

用語「特異的に結合した」とは、本明細書で使用する際には、生体分子（例えば、タンパク質、核酸、抗体など）を指す場合、分子（例えば、タンパク質およびその他の生物製剤）の不均一集団では存在生体分子を決定する結合反応を指す。したがって、指定条件では（例えば、抗体の場合は免疫測定条件、または核酸の場合はストリンジェントハイブリダイゼーション条件）。特異的リガンドまたは抗体は、特異的な「標的」分子に結合し、サンプルに存在する他の分子にかなりの量が結合するわけではない。

20

## 【0019】

用語「優先的に結合する」とは、同じサンプルに存在する他の標的よりも大きな親和性または結合活性を有する特異的な標的に結合する部分を指す。したがって、優先的な結合は、標的検体（例えば、特異的なIgE）の存在および/または量がサンプルに存在する手段を提供する。

## 【0020】

用語「サンプル」または「生体サンプル」とは、例えば、アレルギーアッセイに関して本明細書で使用する場合は、通常IgE抗体を含有する生体物質のサンプルを指す。かかるサンプルは、例えば、全血、血清などを含む。サンプルは、対象から単に採取された「生」サンプルであってもよく、またはサンプルは、例えば、細胞残屑を除去するなど処理することもできる。

30

## 【0021】

用語「アレルギー」とは、体が物質（例えば、カビ胞子、花粉、昆虫毒、動物の鱗屑、ある種の薬物および食物など）に対して過剰反応を有する状態を指す。過敏性としてもまた知られている。

## 【0022】

「アレルゲン」とは、アレルギー反応を誘発する物質を指す。

40

## 【0023】

用語「抗原」とは、免疫系によって抗体の産生を刺激する、通常体に対して異質である物質を指す。抗原は、異種タンパク、細菌、ウイルス、花粉、その他の物質を含む。

## 【0024】

光結合器とは、光を導波路に取り込むことができるデバイスを指す。光結合器は、例えば、電気入力または光入力に反応して光を生成する能動型光結合器、および入射光線を単に分散、反射、さもなければ方向を変える受動型光結合器を含むが、それらに限定されない。

## 【0025】

50

高角度光とは、光導波路の平面から浮上する光を指す。

【0026】

詳細な説明

ある実施態様では、本発明は、哺乳類（例えば、ヒトまたはヒト以外の哺乳類）で1つ以上のアレルギー（例えば、IgE媒介アレルギー反応（即時型過敏症）を引き起こす）の速やかな検出および/または診断および/または特徴付けのためのデバイスおよび方法を提供する。従来の方法による1つまたは少数のアレルゲンを一度に試験する代わりに、本明細書に説明する本デバイスおよび方法は、何百ものアレルゲンの同時検査を可能にする。前記方法は、速やかで、経済的で、患者の不快感を大幅に低減させる。通常、アッセイは数分程度しか時間がかからず、1mlに満たない血液サンプルを必要とする。

10

【0027】

現在のところ、即時型過敏性には2つの主なアレルギー試験、皮膚検査および血清中のアレルギー特異的なIgE検査がある。皮膚試験の間は、可能性があるアレルゲンを皮膚に付着させ、反応を観測する。血清中のアレルゲン特異的なIgEを検出するためには、患者の血清を試験管内の基板に固着させたアレルゲンと混合し、血清IgEがアレルゲンと反応するかどうか決定するために、放射活性物質で標識した（放射性アレルギー吸着試験、RAST）抗IgE抗体をその後で加える（二次抗体もまた、化学発光/蛍光マーカーで標識化することができる）。

【0028】

皮膚検査は一般に、アレルゲンに対して最も信頼性のある試験と見なされているが、現在の環境での多くの異なるアレルゲンが存在するため、多くの異なる少数のアレルゲンの皮膚試験を実施することは、時間と費用がかかり実用的ではない。様々なアレルゲンを試験する多くの皮膚試験はまた、患者に著しい不快感を与え、まれに、皮膚試験は生命にかかわる可能性のある過敏症、重度のアレルギー反応を誘発する可能性がある。

20

【0029】

様々な実施態様では、本発明のアレルゲンアッセイは、微細加工カンチレバーアレイ（例えば、図1および図2参照）、およびカンチレバーの自由端の変位を監視するための検出システムを使用する。マイクロカンチレバーは、様々なソリッドステート製作技術（例えば、フォトリソグラフィ）を使用して容易に製作することができる。様々な実施態様では、それぞれのカンチレバーは、一端が支持基盤に固着された状態の細長いビームを備える（例えば、図2参照）。抗原を有するそれぞれのカンチレバーが、一種類の抗原を有するように、マイクロカンチレバーアレイを構成する様々なカンチレバーは、抗原を付着させている。アレイを構成する異なるカンチレバーは、異なる種の抗原を有することができる。アレイ全体では、通常複数の異なる抗原種を備える。したがって、ある実施態様では、カンチレバーアレイは、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも5または10、より好ましくは少なくとも20または少なくとも50、さらにより好ましくは少なくとも75または少なくとも100、最も好ましくは少なくとも150、200、500、または少なくとも1000の異なる抗原を備える。

30

【0030】

ある実施態様では、カンチレバーアレイは、流体のかん流および交換を可能とする小さな流体セル（例えば、容積 $< 0.2 \text{ cm}^3$ ）に設置される（例えば、図3参照）。ある実施態様では、流体セルは、カンチレバーへの光アクセスを可能にする、光学的に透明な表面（例えば、薄いガラスカバースリップ）によって、上部および下部に留められる。流体かん流システムおよび流体セルの温度は通常、制御および監視することができる。例えば、本明細書に説明する、任意の蛍光顕微鏡イメージングシステムを取り付けることができる。

40

【0031】

それぞれの「試験」カンチレバーでは、精製した特異的なアレルゲン抽出の種を、カンチレバーに固着、例えば、共有結合させる。ある実施態様では、アレルゲンはマイクロカンチレバーの一面だけに結合するが、どんなタンパク質の固着も回避するために、対辺は

50

化学修飾される。

【0032】

対象が特異的なアレルゲンにアレルギーがあれば、そのアレルゲンに特定して結合する I g E が血清中に存在するはずである。血清が取り込まれた場合、特異的な I g E は、カンチレバーアレイでの多くのカンチレバーのうちのそれぞれに各標的アレルゲンに結合する。特定のカンチレバーでの優先的な結合は、これらのカンチレバーの自由端で変位（曲げ）を誘発する（例えば、図4参照）。特定のカンチレバーの変位は、固着したアレルゲンに特異的な I g E のサブクラスが存在を示す。カンチレバーの変位は、様々な方法のいずれにより、例えば、光学的な位置決定/検出方法を使用して、ピエゾ抵抗または圧電材料でカンチレバーを製作すること、および同等物により検出し、任意に定量化することができる。

10

【0033】

様々な実施態様では、カンチレバーのアレイは、「試験」カンチレバーに割り当てられた特定のカンチレバーと、「コントロール」カンチレバーに割り当てられた特定のカンチレバーとを含むことができる。「試験」カンチレバーは通常、I g E 結合を検出するのに使用される抗原を持っている。

【0034】

「コントロール」カンチレバーは、ポジティブコントロールおよび/またはネガティブコントロールカンチレバーを含むことができる。ネガティブコントロールカンチレバーの表面は通常化学的に修飾されるので、タンパク質はこれらのカンチレバーに固着しない。参照としてすぐ近くに取り付けるネガティブコントロールカンチレバーを使用して、流体の乱れおよび気温の変動のための、カンチレバーの動きを減じ、ひいては最小限にすることが可能である。

20

【0035】

ポジティブコントロールカンチレバーは通常、カンチレバーに固着された抗 I g E 抗体を有する。抗 I g E はすべての I g E 分子と結合することになる。これらのポジティブコントロールを使用して、検出システムの感度を測定することができる。

【0036】

基本的に、マイクロカンチレバーアレイを構成するどんなカンチレバーも、「試験」またはポジティブおよび/またはネガティブの「コントロール」用を使用することができる。ある実施態様では、少数の正および/またはネガティブコントロールカンチレバーと、多数の「試験」カンチレバーがあってもよく、すなわち、試験カンチレバーはコントロールカンチレバーより、例えば、少なくとも1、5、2、3、またはさらに4、または5以上だけ数が多くてもよい。ある実施態様では、それぞれの「試験」カンチレバーは、関連する正および/またはネガティブコントロールカンチレバーを有する。したがって、例えば、図5に図示するように、それぞれの「試験」カンチレバーは、関連する正およびネガティブコントロールカンチレバーを有することができる。

30

【0037】

本発明のマイクロカンチレバーアレイを一般的な単一の平面アレイとして図示したが、その他の配置もまた適切あることが理解されるであろう。すなわち、例えば、図6Aは、支持材の両側に突出しているマイクロカンチレバーを図示する。任意に、支持材は任意のバリアで二等分し、2つの別個のサンプルチャンバを形成することができる。ある実施態様では、マイクロカンチレバーは、単一の平面に限定される必要はない。すなわち、例えば、図6Bは、2つの平面にカンチレバー備えるマイクロカンチレバーアレイを図示する。

40

【0038】

前述の実施態様は、例示的であり、限定的でないことを意図する。本明細書に記載された教示を使用すると、その他の適切な実施態様が当業者には明白となるであろう。

【0039】

検出

50

カンチレバーの曲げは、当業者に知られている多くの方法のいずれにより検出し、また任意に定量化することができる。すなわち、例えば、簡易的な実施態様では、曲げは、ビーム偏向の簡易的な視覚化によって（例えば、顕微鏡を使用して）測定することができる。ある実施態様では、ビーム偏向は、デジタル画像解析を伴う光学顕微鏡法を使用してさらに分析することができる。

【0040】

ある実施態様では、カンチレバー偏向は、微細加工プロセスの間にマイクロカンチレバーの上面および/または下面に形成される、金属または半導体ひずみゲージの伝導率の変化によって測定することができる。さらに、またはあるいは、カンチレバーは圧電性または piezo 抵抗性材料から製作することができ、曲げは、デバイスの電位の発生および/または電気抵抗の変化によって測定することができる。

10

【0041】

ビーム偏向はまた、様々な反射性および/または干渉法によって測定することができる。すなわち、例えば、図7に図示する一実施態様では、光源（例えば、レーザー）はカンチレバーに向けられ、例えば、光電子増倍管、CCDデバイス、またはその他の検出器を使用して、反射ビームは検出することができる。ビームが屈曲すると、反射光は移動するか、または強度を変えることによってビーム検出を測定する。

【0042】

ある実施態様では、アレルゲン特異的な IgE の検出は、二次的な抗体を使用することによってさらに増進することができる。特異的な IgE をカンチレバーへ結合した後で、カンチレバーアレイを食塩緩衝液で洗浄し、非結合 IgE 分子を除去し、続いて流体セルへ抗 IgE 抗体をかん流させる。抗 IgE 抗体は、IgE を固着させた状態で優先的にカンチレバーに結合し、それはまた優先的なカンチレバーの変位を誘発し、アレルゲン特異的な IgE が存在するものを示す。蛍光的に共役した抗 IgE 抗体を使用する場合は、IgE への抗 IgE 抗体の結合もまた確認することができる。

20

【0043】

ある実施態様では、検出は、本明細書に説明するエバネセント場励起を伴うことも可能である。

【0044】

全反射蛍光顕微鏡用の改良されたデバイス

様々な実施態様では、顕微鏡を用いた方法は、マイクロカンチレバーの変位を検出および/または定量化するのに使用することができる。ある好ましい実施態様では、顕微鏡を用いた方法は全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を含むが、それに限定されない。TIRFM では、全反射によって導波路内に捕捉される光は、導波路の表面でエバネセント光場を生成する。導波路の表面でのエバネセント光場は、照射する、例えば、導波路の表面からさらに離れた種で蛍光を励起することなく、導波路の表面に近接している、当該の分子、粒子、物体（例えば、マイクロカンチレバー）、またはセルでの蛍光を励起するのに使用される。

30

【0045】

TIRFM 方法は当業者によく知られているが、様々な実施態様では、本発明は改良された TIRFM 方法を提供する。とりわけある実施態様では、本発明はエバネセント場照射および/または蛍光の励起のための改良されたデバイスを提供する。本発明は、従来の TIRFM 方法に関連する経費および配置問題の両方を排除し、簡易的な光学顕微鏡を使用した TIRFM 測定を可能にさせる。

40

【0046】

顕微鏡使用では、導波路から出て、血清、細胞培養基、サンプル移動に使用される緩衝液、マイクロデバイス、および同等物などの、当該のサンプルを含有する領域へ分散される励起光の量を制限することはとりわけ重要である。かかる分散光は、観察下に置かれる成分と同様の、または異なる、他のサンプル成分で蛍光を励起する場合がある。付加的な蛍光は信号対バックグラウンド比を低下させ、当該のサンプルでの特性を観察または測定

50

する能力を制限することになる。本発明のある革新は、この分散を制限する構造である。

【0047】

エバネセント場顕微鏡法またはセンシングでは、エバネセント光場がサンプルに浸透する距離は、カップリングプリズムなど、全反射に使用される、表面への励起光の入射有効角によって決定する。現在の技術では、入射の角度は光成分を調整することによって測定し、使用に当たっては注意深く測定しなければならない。本発明のその他の革新は、製造中に固定、または一連の入射角から選択するようユーザーによって可変の簡易的なフィルターを使用することであり、確実に制御することができるエバネセント場侵入度をもたらす。

【0048】

定量的 TIRF 顕微鏡法もしくはセンシング、または長期にわたるサンプル蛍光の監視のために、励起光の強度は好ましくは、制御または監視をしなければならない。本発明の革新は、励起強度を監視するために、導波路の表面と一体化される手段を含むことである。ある実施例では、モニターは、当該のサンプル蛍光プローブを励起するのに使用される同じ光によって能率的に励起する蛍光プローブを含み、広範囲の励起強度にわたる励起強度に比例する蛍光を含む。様々な実施態様では、時間、温度、総露出、および化学環境に対して安定している蛍光プローブが選択される。モニター蛍光プローブは、これらの性質をいずれも改善することができる屈折指数がサンプルまたはサンプルを含有する流体に近い保護層で覆うことができる。モニター蛍光プローブが容易に区別できる既知のパターンで導波路の表面に分散されるべき場合に、モニター蛍光プローブは、サンプル蛍光に重なる波長に放射する。あるいは、モニター蛍光プローブが導波路の表面のわたり任意に分散してもよい場合は、モニター蛍光プローブは、分光フィルタリングによってサンプル蛍光および励起波長の両方から容易に分離される波長に放射してもよい。励起強度を監視する代替の手段は、励起強度に比例する信号（例えば、電気信号）が生成されるように、モニター光ダイオードまたはその他の光学検出器を導波路の表面に組み込むことである。

【0049】

TIRF 顕微鏡法では、表面からのサンプル蛍光プローブ（例えば、生体細胞または細胞成分、マイクロカンチレバー、蛍光プローブを有するマイクロカンチレバーなど）の距離を測定し、長期にわたりまたは刺激に反応した時点でこの距離を監視することはしばしば望ましい。サンプルが安定して蛍光プローブを含有する場合は、蛍光強度は、全反射の表面、この場合は、導波路の表面からの距離の相対的適応として働く。本発明の革新は、定量的な距離の測定のための距離マーカーとして働く、導波路の表面からの既知の距離で、サンプルでの蛍光種と同一または類似の蛍光マーカーを組み込むことである。かかる蛍光プローブの薄層は、顕微鏡の視界と比較して小さな領域での、導波路の表面に直接、および/または導波路の表面の上の既知の厚さを有する透明な層に配置することができるので、かかる距離測定の1つ以上のマーカーは常に可視的である。

【0050】

導波路の表面からの距離を定量的に測定するための代替の手段は、波長が長いほど深く浸透する、エバネセント場侵入度の波長依存性を頼りにする。したがって、有意に異なる波長により励起することができる蛍光プローブは吸収係数および量子収量を適切に測定した後には、比較的長い波長励起により比較的明るく蛍光を発することになる。

【0051】

ある実施態様では、異なる励起波長を有する2つ以上蛍光プローブ、または2つ以上異なる励起波長を要する蛍光プローブを組み込む。かかる実施態様では、異なる励起波長からの蛍光強度比は、導波路の表面からのサンプル蛍光プローブの距離を計算するのに使用することができる。

【0052】

本発明の例示的な一実施例は、図8に図式的に示す。滑らかな、おおよそ平行な2つの面を備える実質上平面の光導波路5は、観察されるサンプル蛍光の励起および発光波長の両方に対して透過的な材料から製作される。通常、光導波路は、約1.2または1.4よ

10

20

30

40

50

り大きく、好ましくは約 1.6 より大きく、より好ましくは約 2.0 より大きく、約 1.4 と 2.4 との間が適当な範囲である屈折率を有する。

【0053】

平面導波路の厚さは通常、約 25  $\mu\text{m}$  から約 1 mm、好ましくは約 50  $\mu\text{m}$  から約 400  $\mu\text{m}$  または 300  $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約 75  $\mu\text{m}$  から約 250  $\mu\text{m}$ 、また最も好ましくは約 100  $\mu\text{m}$  から約 200  $\mu\text{m}$  に及ぶ。ある実施態様では、平面導波路の厚さは、おおよそ 100 ~ 200 マイクロメートルであり、一般的な倒立顕微鏡対物レンズ 10 を使用する高拡大表示に適している。

【0054】

この実施例では波長 1 の光 15 である一次的な励起源は、波長 1 で能率的に励起され、波長 2 で能率的に放射する、この実施例ではポンプ蛍光プローブ 20 である能動型結合器に向けられる。この蛍光性光結合器から放射される光は、多数の角度で平面基板に合わせられる。2つの光線 25 および 30 でここに示すように、この光の一部は導波路から出て、一部は導波路内に全反射によって捕捉される。屈折率が導波路とサンプルを含む媒体との間（通常、サンプルが空気中に含まれる場合は 1.0、またはサンプルが水中に含まれる場合は 1.34）にある材料 40 は、導波路の少なくとも 1つの平面上に配置され、光結合器 20 と見るべきサンプル 35 との間に位置付けられ、全反射に対して特定の臨界角（導波路の表面に対して垂直な、導波路内に引いた直線に対して相対的に計測される、通常約 35 度から約 70 度）を得るために選ばれる。臨界角を下回る角度で、導波路と材料 40 との間の接合部分への入射光線は、導波路から出て材料 40 へ部分的に伝達される。臨界角より大きな角度での入射光線は、全体的に反射されることになる。材料 40 に伝達される光 45 は吸収される可能性があり、または任意の第 2 の材料 50（例えば、非蛍光性染料または色素、ポリマー、アモルファスまたは結晶半導体など）にさらに伝達され、吸収される可能性がある。導波路内で何度か反射した後、材料 40 に沿って経路を横切ると、高角度光 25 は実質上排除されるが、材料 40 が角フィルターとして働くように、低角度光 30 は実質上伝達される。

10

20

【0055】

導波路に残留している波長 2 の光は、サンプル 35 の付近にさらに伝播される可能性があり、導波路の表面 55 からさらにサンプル成分を照射することなく、導波路に近接してサンプル成分に一過性的に照射する（例えば、蛍光を励起する）。波長 360 でのサンプル蛍光は、従来手段によって収集および分析される、顕微鏡対物 10 に向かって放射される。

30

【0056】

レンズの開口数を増加させ、分解能を向上させるために、対物レンズと顕微鏡用スライドまたはカバーガラスとの間に少量の水または油 65 を使用する、液浸対物レンズを使用することは、高分解能光学顕微鏡法では一般的な方法である。この場合は、サンプル蛍光波長 3 に対して透過的であり、導波路 5 よりも低い屈折率の、材料 70 の層を、顕微鏡対物の最も近い導波路の表面に配置することができる。層 70 の厚さは通常、励起光 30 のエバネセント場が層の外表面に著しく浸透しない、また浸漬の液滴のメニスカスからの分散しないように選ばれる。

40

【0057】

血清、細胞培養基、バッファ、および同等物など、流体に浸漬したサンプルを観察することは多くの顕微鏡使用で一般的である。その場合には、液体レザバ 75 は導波路に構成することができる。液体レザバ構造によって液体レザバへのポンプ光 30 の分散 80 を低減するために、導波路と接触する液体レザバの一部は、屈折率が含有流体 85 とほぼ一致している材料から製作することができる。あるいは、図 8 に示すように、液体レザバ構造はリエントリ型に、また分散光が液体レザバ構造によって大部分が遮断されて吸収されるように、波長 2 に吸収できる材料から製作することができる。

【0058】

本明細書に記載した教示を使用すると、多数の修正は当業者の 1 人にとって利用可能と

50

なる。例えば、図では20と示した結合器は、能動型または受動型結合器であり得る。結合器が能動型構造の場合は、一次的な励起エネルギー、例えば、導波路の表面に対しておおよそ垂直に向けられる波長1の光を、導波路の表面对してほぼ平行に向けられる、波長2の二次的な励起光に変換する。ある実施態様では、これは蛍光プローブを用いて達成することができる。蛍光プローブは当業者によく知られており、有機分子または無機分子、原子、イオン、宿主に注入されたイオン、誘電体、半導体、または金属ナノ粒子、半導体層、および同等物を含むが、それらに限定されない。例示的な蛍光プローブは、シアニン色素、クマリン色素、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミン（ローダミンおよびローダミン誘導体）、テキサスレッド色素、ピレンおよびピレン誘導体ならびに同等物を含むが、それらに限定されない。

10

**【0059】**

一般に、様々な励起光源のために有用である蛍光プローブが利用でき、顕微鏡で使用される発光波長はよく知られている。一実施例では、473 nmから850 nm、または450 nmから800 nmの波長で有効な蛍光を有するポリイミド材料が利用でき、基本的に可視スペクトル全体を覆う。しかしながら、近赤外線および紫外線での蛍光プローブを使用し、サンプルならびに利用可能な照射源および検出に対して適切な環境を与えてもよい。

**【0060】**

他の能動型結合器は、一次的電氣的励起源を光学的励起源に変換する、光励起レーザー、電気ポンプ発光ダイオード（LED）、ダイオードレーザー、および同等物を含むが、それらに限定されない。ある実施態様では、結合器は、そのような場合に波長2となるよう選ばれる、一次的励起光（15）を単に捕捉し、方向を変える受動型構造であってもよい。適切な受動型結合器は、以下の微細加工レンズ、プリズム、ファセット、格子、鏡、グラジエントインデックス構造、散乱構造のうちの一つ以上を含むが、それらに限定されない。これらの様々な結合器の代替の位置は、導波路の平面と導波路の端部のどちらか、または両方を含む。

20

**【0061】**

能動型電気/光結合器を使用した、本発明の例示的な実施例を図9に図式的に示す。平面光導波路105は、屈折指数が比較的低い基板110上に製作される。LED130からの一部分の放射が導波路層に入り、導波路の上面および下面で全反射によってその内側に捕捉されるように、比較的低い接点115、発光120、および上部接点125層を備える発光ダイオードは導波路上に製作される。LED構造の上面および側面からの光の放射は、誘電体層140によって構造の一部から単離される接点金属135によって遮られ、導波路に近接していない蛍光種の励起を回避する。導波路内で捕捉されないLEDの下端から放射される光145は、反射防止層150および/または吸収層155を併用することによってデバイスの下面で吸収することができ、サンプルの方へ戻る反射を回避する。

30

**【0062】**

デバイスへの第2の電気接触は、導体パッド160を通して行うことができる。様々な実施態様では、表面165に近接しているサンプルの蛍光種または領域は蛍光を発するが、表面170から離れたサンプルの種または領域は、エバネセント場によって励起せず蛍光を発しないように、サンプルは直接導波路の表面に設置される。蛍光175は、導波路および基板が蛍光の光に対して透過的であれば導波路の下方から、または導波路の上方から、一般的な顕微鏡光学により観察することができる。任意に、スペクトルフィルター180を加えて、異なる蛍光の種を区別する、または背景光からの蛍光をさらに分離させることができる。センシング使用では、蛍光は光検出器、画像センサ、または視覚的に検出してもよい。図8に示す実施例と同様に、低分散のために設計されたサンプルの液体レザバは、図9の実施例に組み込むことができる。明確にするために、これは図9から削除されている。

40

**【0063】**

50

図9の実施態様を実施するための1つの方法は、照明用途および表示目的のためにすでに大量生産されているLEDデバイスと類似している、(Al、Ga、In)Nの合金、サファイア基板のエピタキシャル成長から製作することである。しかしながら、一般的なLEDsと異なって、様々な実施態様では、金属接点は全く不透明で、LED構造の端部まで広がり、サンプル領域へのLED放射を除去する。基板の下面での光分散は、基板に蒸着された反射防止層および/または吸収層により除去される。エピタキシャル層の厚さは、導波路へのLED放射の効率的結合、およびエバネセント場によるサンプルへの効率的結合のために最適化することができる。LEDの形状および大きさ、ならびに導波路層は、使用目的に応じて、サンプル領域の激しく均一な照射を得るために調整することができる。いくつかの選択可能物を、図10、パネルAの平面図に示す。このパネルは、比較的広い面積を図示することができる、ストライプ配置を示す。導波路での光学的励起出力を監視する光ダイオードとして動作する、第2のLED構造を示す。図10、パネルBは、比較的狭い面積にわたる比較的高い照度を提供するリング配置を示す。図10、パネルCは、LEDの電力散逸によって生成される熱からサンプルを隔離すると同時に高照度を得るための、楕円鏡の一点での円盤状LED、および他の焦点に設置されたサンプルを示す。楕円鏡は、導波路層を所望の形状にエッチングし、次いで反射性材料で側壁をコーティングすることによって形成することができる。同様の集束または平行設計は、成形するために導波路をエッチングまたは研磨し、続いて端部へ反射性または半反射性コーティングを施すことにより、図8に図示する実施例に組み込み製作してもよい。

10

20

**【0064】**

図9に図示する実施態様を実施するためのその他の手法は、GaAsまたはGaP基板で、(Al、Ga、In)(As、P)などの(Al、Ga、In)Nにより、接近可能な比較的長い波長で励起するためのその他の材料系を使用することである。そのような場合には、導波路層のすぐ下の低屈折率材料は、AlAsもしくはAlGaAsをAlO<sub>x</sub>へ酸化させることによって、または半導体導波路層の有無に関わらず、ガラスまたはプラスチックなどの新しい比較的低い屈折率基板に半導体LED構造を移動させることによって形成することができる。かかるエピタキシャル転位またはウェハー融着技術は、デバイスのウェハースケール加工が、遠紫外線から近赤外線への励起波長に接近することを可能にする。

30

**【0065】**

可能性のある変形物は、一連の適用を容易に適合するために、LED/導波路構造を、顕微鏡用スライド、培養皿、マイクロアレイプレート、および他の一般的なサンプルを取り扱うデバイスに組み込むことを含む。

**【0066】**

図11は、倒立光学顕微鏡で使用する際の、本発明の一変形を図式的に示す。例えば、図8のTIRFMデバイス(205)は、倒立顕微鏡210のステージに載っている。簡易的な電源220によって電力供給されるLED215は、カップリング構造225を照射する。TIRFMチップに載っているサンプル230の液滴内のセルからの蛍光は、倒立顕微鏡210の対物レンズによって収集される。

40

**【0067】**

本明細書に説明されているTIRFMデバイスは、簡易的な電源または電池によって電力供給することができる、大量生産できる成分を提供することが理解されるであろう。デバイス全体は、頑丈で、アライメントフリーで、使い捨てにできるほど費用のかからないものである。TIRFMの機能を標準蛍光顕微鏡に付加するのに使用してもよく、また簡易的な放射フィルターをデバイスに含めた状態で、蛍光およびTIRFMの機能を一般的な光学顕微鏡に付加するのに使用してもよい。遠紫外線から近赤外線への励起波長は、デバイスが製作される材料を選ぶことにより利用可能となる。デバイスは広範囲のサンプルセルまたは顕微鏡用スライドに容易に組み込むことが可能であり、また基本発明の適合は、運搬可能で、感度がよく、高多重生化学センサーの基礎を形成する。

**【0068】**

50

ある実施態様では、TIRFMデバイスは、マイクロカンチレバー偏向を測定する際に使用することを意図している。したがって、ある実施態様では、導波路は、マイクロカンチレバーアレイ（例えば、液体レザバ中に配置された、など）で1つ以上のカンチレバーを備えることができることが理解されるであろう。サンプルがアレイに接して、抗アレルギーIgEの特異的な結合を得た後、マイクロカンチレバーアレイは、例えば、捕捉されたIgEに特異的に結合することによって、エバネセント場により励起し、マイクロカンチレバーにIgE（または他の検体）の存在を示す信号を生成することができる、マイクロカンチレバー表面に近接する蛍光の種を置く、蛍光標識された抗体と接することができる。

#### 【0069】

ある実施態様では、蛍光の材料を組み込む、またはかかる材料を付着させることができるように、マイクロカンチレバーを製作することができる。マイクロカンチレバー（例えば、抗原結合に反応して）の偏向は、例えば、上述のサンプル距離（例えば、導波路からの）を検出する方法および手段を使用して、検出/定量化することができる。

#### 【0070】

本明細書に説明するTIRFMデバイスは、マイクロカンチレバー偏向を測定する際に使用するよう意図しているが、デバイスはかかる使用に限定される必要はなく、蛍光顕微鏡法において感度およびコントラストを向上させるのに一般に有用となり、また蛍光顕微鏡法サンプルの限られた断面を検査できることがさらに留意される。このようにして、本発明はまた、薬剤開発、臨床スクリーニング、環境モニタリング、科学捜査、安全確保、および同等物に適用する場合に、生化学センシング（例えば、抗体結合、核酸交配、リガンド/受容体結合などを検出すること）に対して有用である。

#### 【0071】

本発明は、具体的に図示された実施態様に限定されるものではないことが理解されるであろう。本明細書に記載の技術を使用すると、他の実施態様は当業者に利用可能となるであろう。

#### 【0072】

##### 製作

##### TIRFM装置の製作

本明細書に説明されるTIRFM装置は、光学コーティングおよび/またはアセンブリおよび/または微細加工のための標準方法を使用して製作することができる。かかる方法は、例えば、以下に説明するような、フォトリソグラフィエッチングおよび/または蒸着法と同様に、積層法、セメント接着法、溶接法を含むが限定されない。

#### 【0073】

##### マイクロカンチレバーアレイの製作

好ましい一実施態様では、マイクロカンチレバーアレイは、固体エレクトロニクス産業ではよく知られているマイクロマシニングプロセス（例えば、フォトリソグラフィ）を使用して製作することができる。一般に、マイクロデバイスは、集積回路を形成するために使用される半導体ウエハーの形で広く利用できる結晶シリコンなどの半導体基板、またはガラスから構築される。材料の共通性のために、半導体ウエハー基板からのマイクロデバイス製作は、集積回路（IC）製造のための半導体プロセス産業によって開発された表面エッチングおよびバルクエッチングの両方での広範囲の経験を活用することができる。

#### 【0074】

半導体ウエハーでの薄い表面パターンを定義するためのIC製造で使用される表面エッチングは、可動要素を作り出すために半導体材料の薄層の犠牲アンダーカットエッチングを可能にするよう修正することができる。深堀りが異方性エッチングプロセスを使用してウエハーに形成される場合に通常IC製造で使用されるバルクエッチングは、マイクロデバイスでの機械端部または堀り部に精密に使用することができる。ウエハーの表面エッチングおよびバルクエッチングの両方は、非マスク材料をウエハーから除去するために溶液中の水酸化カリウムなどの化学物質を使用して、「湿式処理」を進めることができる。マ

10

20

30

40

50

マイクロデバイス構築するために、材料の異なる結晶方位、または様々なチャネル要素を定義するために、電気化学エッチング停止の使用に依存する異方性湿式処理技術を使用することはさらに可能性がある。

【0075】

マイクロデバイス設計の自由度を大幅に許容するその他のエッチングプロセス技術は、「乾式エッチングプロセス」として一般に知られている。このプロセス技術は、微細構造の異方性エッチングにとりわけ適している。乾式エッチングプロセスは、ウエハー原子を気相（例えば、イオンビーム加工）に置き換えるために、ウエハーを高エネルギー原子またはイオンを衝突させる高異方性スパッタリングプロセスから、揮発性反応生成物の生成を誘導するために、化学反応性の高いイオンを含むプラズマ流をウエハーに向ける、やや等方性の低エネルギープラズマ技術に及ぶ気相またはプラズマ相エッチング技術を包含する。

10

【0076】

高エネルギースパッタリング技術およびエネルギープラズマ技術の中間物は、反応性イオンエッチングとして知られている乾式エッチングプロセスにとりわけ有用である。反応性イオンエッチングは、イオンを含むプラズマ流を半導体、または同時に起こるスパッタリングおよびプラズマエッチングのための他のウエハーに向けるステップを伴う。反応性イオンエッチングは、反応性プラズマイオンとウエハーとの接触に反応する気相反応生成物の形成のために反応性プラズマイオンをまだ提供する一方で、スパッタリングに関連する異方性の利点のいくつかを保持する。実際のところは、ウエハー材料除去の割合は、どちらか単独で使用されるスパッタリング技術または低エネルギープラズマ技術に対して大いに高まる。したがって反応性イオンエッチングは、比較的高い異方性エッチング速度を維持できる状態で、マイクロデバイスを構築するための優れたエッチングプロセスとなる可能性を有する。多くの他のものと同様に、上述のマイクロマシニング技術は、当業者によく知られている（例えば、Choudhury (1997) The Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication, Soc. Photo-Optical Instru. Engineer, Bard & Faulkner (1997) Fundamentals of Microfabrication 参照）。さらに、シリコンまたはホウケイ酸ガラスチップのマイクロマシニング技術の使用の例は、米国特許 5,194,133、5,132,012、4,908,112、および 4,891,120に見出だすことができる。

20

30

【0077】

一実施態様では、チャネルは、カンチレバー、チャンバ、任意のチャネル、サンプル処理チャンバ、接続ポート、および同等物をパターン化するための標準フォトリソグラフィ技術を使用して、シリコンウエハーにマイクロマシニングされる。ある実施態様では、エチレンジアミンピロカテコール（EDP）は2段階エッチングに使用することができ、Pyrex 7740 オーバプレートは、液体閉鎖系を提供するために、シリコンの表面に陽極的に接合することができる。この場合には、液体接続はシリコンの裏面に行うことができる。

40

【0078】

上述のように、ある実施態様では、デバイスはガラス、石英、または他の同様な材料から製作することができる。

【0079】

抗原または他の結合部分の結合

様々な固体表面への生体分子（例えば、抗原、抗体など）の固定化のための多くの方法が当技術で知られている。所望の成分は、特異的または非特異的結合により、共有結合または非共有結合することができる。

【0080】

化合物と表面との共有結合が所望であるならば、表面は通常多官能性であるか、または

50

多官能性になることができる。表面に存在する可能性があり、結合に使用される官能基は、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基および同等物を含む。多種多様な化合物を様々な表面に結合させる方法はよく知られており、文献に十分に例証されている。例えば、Ichiro Chibata (1978) Immobilized Enzymes, Halsted Press、ニューヨーク、および Cuatrecasas、(1970) J. Biol. Chem. 245 : 3059 を参照されたい。

#### 【0081】

共有結合に加えて、成分（例えば、抗原）を非共有結合するための様々な方法を使用することができる。非共有結合は通常、表面に対する化合物の非特異的な吸収である。様々な実施態様では、カンチレバー表面は、標的の非特異的結合を防止するために、第2の化合物で閉鎖される。あるいは、表面は、非特異的な1つの成分に結合するが、特異的にもう1つに結合しないように設計される。例えば、コンカナバリンAなどのレクチンを有する表面は炭水化物含有化合物と結合するが、グリコシル化が足りない標識タンパク質には結合しないことになる。アッセイ成分の非共有結合で使用するための様々な固体表面は、米国特許第4,447,576号および第4,254,082号で概説されている。

10

#### 【0082】

ある実施態様では、結合部分（例えば、抗原、抗IgE抗体など）は、リンカー（例えば、ホモまたはヘテロ二官能性リンカー）を用いることでカンチレバーに固定化される。生物学的結合パートナーを結合するために適切なリンカーは、当業者によく知られている。例えば、タンパク質または核酸分子は、ペプチドリinker、直鎖または分鎖炭素リンカーを含むが、それらに限定されない様々なリンカー、または複素環炭素リンカーによって結合してもよい。N-エチルマレイミドの活性エステルなどのヘテロ二官能性架橋剤が広く使用されてきた（例えば、Lernerら(1981) Proc. Nat. Acad. Sci. 米国、78:3403-3407およびKitagawaraら(1976) J. Biochem., 79:233-236、ならびにBirchおよびLennox(1995) Monoclonal Antibodies 第4章: Principles and Applications, Wiley-Liss、ニューヨーク参照）。

20

#### 【0083】

一実施態様では、抗原、結合部分、または抗体は、ビオチン/アビジン相互作用を利用して、カンチレバーに固定化される。一手法では、光解離性保護基を有するビオチンまたはアビジンは、カンチレバー表面に固着させることができる。はっきりと識別できるカンチレバーの照射は、その場所に照射されるカンチレバーへのビオチンまたはアビジンの結合をもたらす。次いで、それぞれのビオチンまたはアビジンを有する抗原または他の結合部分は、それぞれの結合パートナーに結合し、また照射を受けたカンチレバーに局限するチャンネル内に設置される。前記プロセスは、結合パートナーに結合するよう所望されるそれぞれの異なった位置で反復することができる。

30

#### 【0084】

その他の適切な光化学結合手法は、Sigristら(1992) Bio/Technology、10:1026-1028によって説明されている。この手法では、リガンドと有機または無機表面との相互作用は、リンカー分子として働く、カルベン生成トリフルオロメチルアリアルジジンに有する光活性化することができるポリマーによって媒介される。350nmでのアリアルジジンの光活性化は、極めて反応性に富むカルベンを生成し、また共有結合は、リガンドおよび不活性な表面の両方へカルベンを同時に挿入することによって達成される。このようにして、反応性官能基はリガンドにも、支持材にも必要とされない。

40

#### 【0085】

さらにその他の手法では、マイクロカンチレバーは、カンチレバー表面を有機コーティングで覆うために、エポキシ(Epotek 350)の薄層でコーティングされる。かかる表面をエポキシでコーティングするためのプロトコルは、Liuら(1996) J. C

50

hromatogr. 723:157-167によって説明されている。コーティングを施したマイクロカンチレバーは次いで、特異的な結合部分の溶液で洗い流すことができる。溶液はマイクロカンチレバーと反応し、疎水性および静電相互作用によって、アレルゲンまたは他の結合部分を結合してもよい。

【0086】

タンパク質結合の阻害

ある実施態様では、マイクロカンチレバーアレイは、タンパク質の結合を防止するために処理されるネガティブコントロールマイクロカンチレバーを備える。タンパク質結合を防止するための表面処理の方法は、当業者に知られている。かかる方法は、pp4G、プラズマ重合テトラグリム（例えば、Haneinら（2001）Sensors and Actuators B81:49-54参照）、界面活性剤、および同等物などの材料で表面をコーティングすることを含むが、それに限定されない。

【0087】

キット

ある実施態様では、本発明は、本明細書に説明する様々な方法を実践するためのキットを提供する。キットは、例えば、マイクロカンチレバーアレイ、および/または本明細書に説明するTIRFMデバイスを含むことができる。様々な実施態様では、マイクロカンチレバーは、TIRFMデバイスの要素として提供することができる（例えば、本明細書に説明する導波路のウェルに配置される）。

【0088】

マイクロカンチレバーデバイスおよび/またはTIRFMデバイスが液体レザバを包含する場合には、液体レザバは任意に、要求に応じて1つ以上のバッファ、標識および/または生物活性剤（例えば、抗IgE抗体、蛍光プローブなど）を含むことができる。ある実施態様では、生物活性剤または他の薬剤は、保存期間を長くするために、流体状態よりも乾燥状態で提供される。

【0089】

キットは任意に、本明細書に説明するアッセイのうちの1つ以上を実行するために、バッファ、シリンジ、サンプルコレクターおよび/または他の試薬および/またはデバイスをさらに備えてもよい。

【0090】

キットを構成する要素は通常、1つ以上の容器に入っている。ある好ましい実施態様では、容器は殺菌してあるか、または殺菌することができる（例えば、施設内での殺菌プロトコルを許容する）。

【0091】

キットは、ユーザーにキットのデバイスの使用法を指導する教材を備えることができる。例えば、教材は、対象（例えば、ヒトの患者）の1つ以上のアレルギーを診断するために、および/またはTIRFMデバイスを動作するために、アッセイデバイス（例えば、マイクロカンチレバーアレイおよび/またはアレイ読取器）の使用に関する指示を与えることができる。

【0092】

教材は通常、資料または印刷物を含むが、そのようなものに限定されない。かかる使用説明書を保存し、それをエンドユーザーに伝達できるどんな媒体も本発明によって意図される。かかる媒体は、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光媒体（例えば、CDROM）、および同等物を含むが、それらに限定されない。かかる媒体は、かかる教材を提供するインターネットサイトへのアドレスを含んでもよい。

【0093】

本明細書に説明した実施例および実施態様は単なる例示目的であり、その観点から様々な修正または変化が当業者に提案され、本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるものであることが理解される。本明細書に引用したすべての出版物、

10

20

30

40

50

特許、および特許出願は、参照することによりその全体が本明細書において組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】図1は、本発明のカンチレバーアレイの一実施態様を図示する。寸法は通常、約1から3cmである。

【図2】図2は、アレイを構成する別個のカンチレバーを図示する。

【図3】図3は、流体セルの中のカンチレバーを図示する。

【図4】図4は、カンチレバーの変位（曲げ）を引き起こす、カンチレバー表面で架橋された抗原へのIgEの結合を図示する。

10

【図5】図5は、検出するようアレイを設計した3つの抗原のそれぞれに対して、正およびネガティブコントロールのカンチレバーと同様に「試験」カンチレバーを示す、マイクロカンチレバーアレイの実例となる1つの構成を提供する。

【図6】図6Aおよび図6Bは、本発明のマイクロカンチレバーアレイの可能性のある多様な構成を図示する。図6Aは、2つのサンプルチャンバに突出している双数のカンチレバーを図示する。図6Bは、マイクロカンチレバーアレイの複数の平面構成を図示する。

【図7】図7は、マイクロカンチレバーからの光源（例えば、レーザー）の反射に基づく検出システムを図示する。

【図8】図8は、方法による、蛍光のエバネセント場励起のためのデバイスの一実施態様を図式的に示す。

20

【図9】図9は、本明細書に説明した方法による、蛍光のエバネセント場励起のためのデバイスの一実施態様を図式的に示す。

【図10】図10のパネルA、B、およびCは、LEDおよび導波路構造のための異なる配置を図示する。LED電気接点を薄灰色および濃い灰色で示す。

【図11】図11は、倒立光学顕微鏡で使用中の、本明細書に説明した、エバネセント場ベースの検出システムの一実施態様を図式的に示す。

【 図 1 】

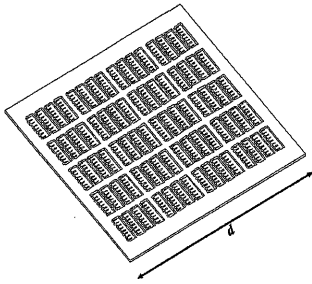


Fig. 1

【 図 2 】

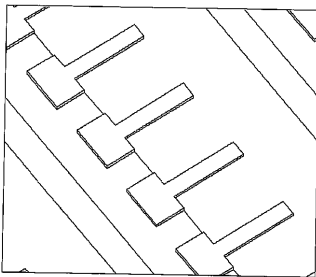


Fig. 2

【 図 4 】

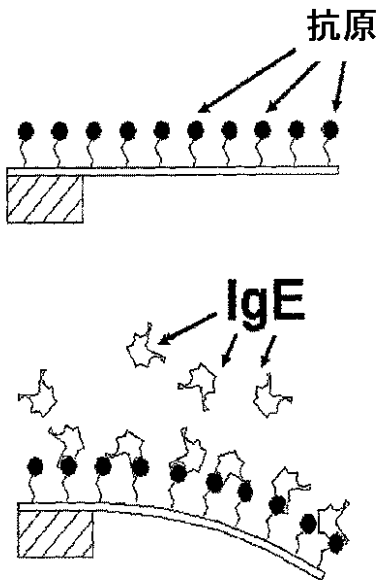


Fig. 4

【 図 3 】

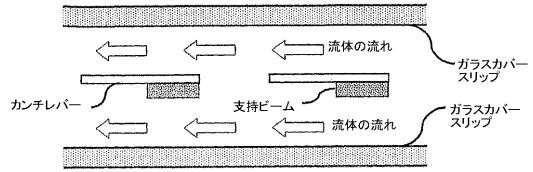


Fig. 3

【 図 5 】

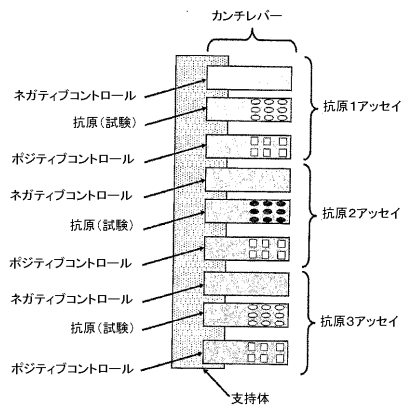


Fig. 5

【 図 6 】

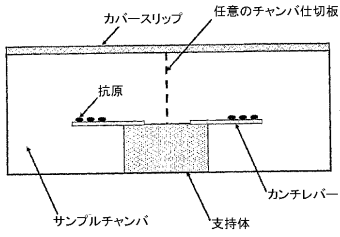


Fig. 6A

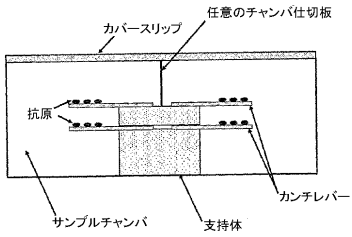


Fig. 6B

【 図 7 】

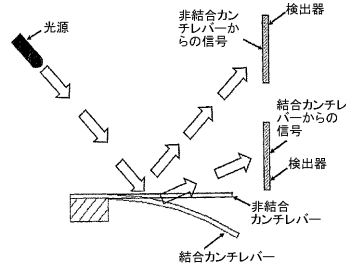


Fig. 7

【 図 8 】

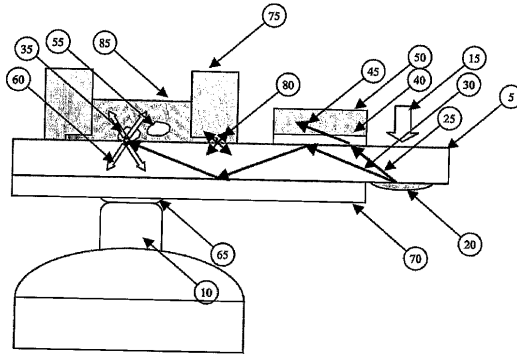


Fig. 8

【 図 9 】

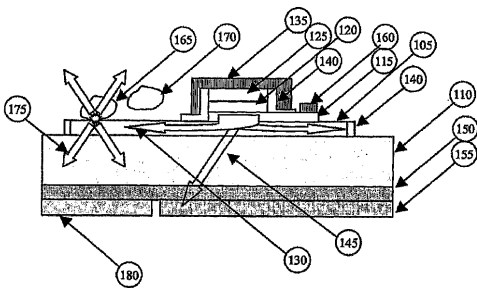


Fig. 9

【 図 1 1 】

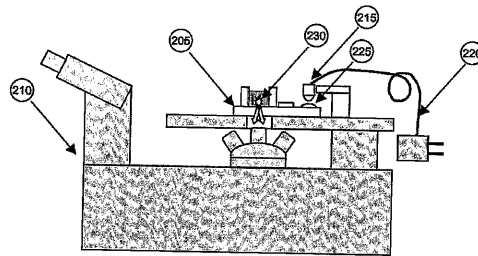


Fig. 11

【 図 1 0 】

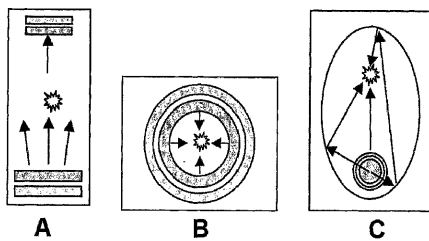


Fig. 10

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 5/02 Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . P Y R E X

- (72) 発明者 ラル , ラトネシュ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 7 , ゴレタ , ヒル ビュー ドライブ 2 1 8
- (72) 発明者 コーエン , ダニエル エー .  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 1 , サンタ バーバラ , アガニャ ドライブ 5  
4 6 7
- (72) 発明者 リン , ハイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 7 , ゴレタ , ヨーク プレイス 5 6 2 2
- (72) 発明者 クイスト , アルジャン  
アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 1 4 8 , ロンバード , エス . フィンリー ロード 1 3 4  
2 , アpartment ナンバー 1 キュー
- (72) 発明者 ラマチャンドラン , スリニバサン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 7 , ゴレタ , マンダリン アベニュー 5 8 3 2  
, アpartment シー

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 大型并行免疫过敏试验和荧光消逝场激发装置  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2009509124A</a>   | 公开(公告)日 | 2009-03-05 |
| 申请号            | JP2008516948  | 申请日     | 2006-06-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 加利福尼亚大学董事会  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 加州大学董事会   |         |            |
| [标]发明人         | ラルラトネシュ<br>コーエンダニエルエー<br>リンハイ<br>クイストアルジャン<br>ラマチャンドランスリニバサン                      |         |            |
| 发明人            | ラル, ラトネシュ<br>コーエン, ダニエル エー.<br>リン, ハイ<br>クイスト, アルジャン<br>ラマチャンドラン, スリニバサン          |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N37/00 G01N5/02                                |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/54373 G01N21/648 G01N33/6854 G01N2800/24                                   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.Q G01N33/543.521 G01N33/543.525.C G01N33/577.B G01N37/00.102 G01N5/02.Z |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下  |         |            |
| 优先权            | 60/692046 2005-06-16 US   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明涉及在哺乳动物（例如，人或非人哺乳动物）中快速检测和/或诊断和/或表征一种或多种过敏（例如，引起IgE介导的过敏反应（即刻型过敏反应））。在一种设备和方法中。在一个实施方案中，该装置包括微悬臂梁阵列，并且包含所述阵列的悬臂具有不同的抗原。当IgE与悬臂结合抗原时，悬臂弯曲并且可以容易地检测到。

【 図 5 】

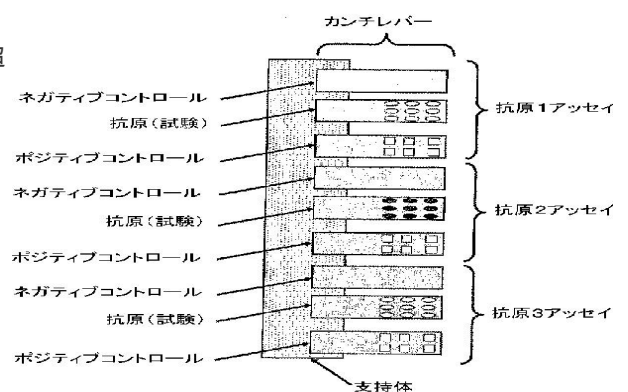


Fig. 5