

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5470989号  
(P5470989)

(45) 発行日 平成26年4月16日(2014.4.16)

(24) 登録日 平成26年2月14日(2014.2.14)

(51) Int.Cl.		F 1	
GO 1 N 35/02	(2006.01)	GO 1 N 35/02	D
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 1

請求項の数 2 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2009-94568 (P2009-94568)</p> <p>(22) 出願日 平成21年4月9日(2009.4.9)</p> <p>(65) 公開番号 特開2010-243419 (P2010-243419A)</p> <p>(43) 公開日 平成22年10月28日(2010.10.28)</p> <p>審査請求日 平成23年10月4日(2011.10.4)</p>	<p>(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号</p> <p>(74) 代理人 110001449 特許業務法人プロフィック特許事務所</p> <p>(74) 代理人 100091432 弁理士 森下 武一</p> <p>(74) 代理人 100124729 弁理士 谷 和紘</p> <p>(72) 発明者 東野 楠 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノ ルタテクノロジーセンター株式会社内</p> <p>(72) 発明者 山東 康博 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノ ルタテクノロジーセンター株式会社内 最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 反応試験方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験液中に分散された試験物質と反応し得る反応物質が固定化された反応部をその一部に有する微細流路を、試験液が往復送液されることにより、前記微細流路に試験液を複数回繰り返して流通させる工程と、

前記微細流路の一方側及び他方側の少なくとも一方において、前記試験液中における試験物質の濃度分布を均一化するように試験液を動作させる工程と、

を備え、

前記試験液の均一化動作は、前記微細流路の一方側及び他方側の少なくとも一方において、試験液の液量以上の容積を有する試験液の貯留部にて行われること、

を特徴とする反応試験方法。

【請求項 2】

前記反応部での反応が抗原と抗体との免疫反応であることを特徴とする請求項 1 に記載の反応試験方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、反応試験方法、特に、抗原などの試験物質を含む試験液を微細流路で送液し、試験物質を抗体などの反応物質に反応させるための反応試験方法に関する。

【背景技術】

## 【 0 0 0 2 】

従来、血漿中に含まれる各種抗原を抗体に反応させるための微細流路を備えた試験デバイスは、図9に示すように、微細流路50の底部に反応物質が固定された反応部51が設けられ、試験物質Tが分散された試験液を微細流路50の一方から他方に（矢印A参照）送液するように構成されている。反応部51では試験物質が固相化面の近傍でしか反応しないので、微細流路50の上部を流れる試験物質Tは反応に寄与せず、微細流路50をそのまま通過してしまうため、反応効率が悪いという問題点を有していた。

## 【 0 0 0 3 】

その対策として、試験液を微細流路で往復させることで、未反応の試験物質を再度反応部を通過させて反応効率を上げる方法が考えられる。例えば、特許文献1には、ピペットなどの送液手段により試験液を反応部に往復送液することが記載されている。特許文献2には、液体を可逆的かつ制御可能に流すシステム及び方法が記載されている。

10

## 【 0 0 0 4 】

しかし、前記往復送液方法を用いても以下のような問題点が残されている。即ち、試験物質を反応部に近付けて反応効率を上げるには、微細流路の深さは送液に支障を及ぼさない範囲でできるだけ浅いことが望ましく、概ね1mm以下が望ましい。また、試験液の流速は、微細流路内の送液圧力が過度に上昇するのを防ぐために、数十mm/sec以下に抑えることが好ましい。このような送液系においてはレイノルズ数が低いために流れが層流になり、試験液を往復させても反応物質は試験液中ではほとんど混合されず、微細流路の上部を流れた試験物質は往復させても常に流路上部を繰り返して流れるだけであり、何度往復させても反応に寄与しないのである。

20

## 【 0 0 0 5 】

なお、レイノルズ数とは、流体力学の分野で一般的に使われる指標値であり、その値が概ね2000を超えると乱流となるが、それ以下である場合は層流となることが知られている。溶媒が水系であり、流路の寸法、流速が前記の場合、レイノルズ数は概ね100以下であり、層流になるので、特別な工夫を講じない限り、反応効率は上昇しないのである。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【特許文献1】特開2006-90717号公報

【特許文献2】特表2002-540405号公報

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 7 】

そこで、本発明の目的は、微細流路のサイズは従来そのまま反応効率を向上させることのできる反応試験方法を提供することにある。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

本発明の一形態である反応試験方法は、試験液中に分散された試験物質と反応し得る反応物質が固定化された反応部をその一部に有する微細流路を、試験液が往復送液されることにより、前記微細流路に試験液を複数回繰り返して流通させる工程と、

40

前記微細流路の一方側及び他方側の少なくとも一方において、前記試験液中における試験物質の濃度分布を均一化するように試験液を動作させる工程と、

を備え、

前記試験液の均一化動作は、前記微細流路の一方側及び他方側の少なくとも一方において、試験液の液量以上の容積を有する試験液の貯留部にて行われること、

を特徴とする。

## 【 0 0 1 1 】

50

なお、本発明において、「試験液中における試験物質の濃度分布を均一化するように試験液を動作させる」とは、必ずしも完全に均一化することを意味するのではなく、均一化する方向に試験液を動作させることを意味する。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、微細流路の一方側及び他方側の少なくとも一方において、試験液中での試験物質の濃度分布を均一化させるため、試験液を複数回繰り返して流通させることで試験物質が反応する割合が増加し、反応効率が向上する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】第1実施例である試験デバイスを示す断面図である。

【図2】第2実施例である試験デバイスを示す断面図である。

【図3】第3実施例である試験デバイスを示す断面図である。

【図4】第3実施例に使用されているポンプを示す正面図である。

【図5】第4実施例である試験デバイスを示す断面図である。

【図6】第4実施例に用いられている螺旋状溝部を示す断面図である。

【図7】第5実施例である試験デバイスを示す断面図である。

【図8】第6実施例である試験デバイスを示す断面図である。

【図9】従来における試験液の送液状態を示す説明図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明に係る反応試験方法の実施例について、添付図面を参照して説明する。なお、各図面において、同一部材、部分に関しては同じ符号を付し、重複する説明は省略する。

【0015】

(第1実施例、図1参照)

第1実施例である試験デバイス10Aは、図1に示すように、微細流路11の一方側に第1の貯留部21を設け、他方側に第2の貯留部22を設け、第2の貯留部22の一端に連通する廃液溜め23と空気注入・排出口24を設けたものである。空気注入・排出口24には空気ポンプ30が接続されている。貯留部21, 22は送液される試験液(図1でクロスハッチングで示す)の液量以上の容積を有している。本第1実施例において、試験デバイス10Aに空気ポンプ30を加えたものを反応装置と称する。

【0016】

微細流路11の一部には、試験液中に分散された試験物質と反応し得る反応物質が固定化された反応部12が設けられている。第1の貯留部21の側壁部には振動子28が貼着されている。この振動子28は第1の貯留部21に溜められた試験液を、試験物質の濃度を均一化するように攪拌・混合させるためのものである。例えば、PZT(チタン酸ジルコン酸鉛)を材料とした圧電アクチュエータを好適に用いることができる。

【0017】

試験液としては、例えば、生体から採取された血液を遠心分離して得られた血漿を用いる。この場合、試験液に含まれる試験物質は、血液中に存在する各種抗原である。反応部に固定化された反応物質とは、抗原に対して特異的に反応し得る抗体である。

【0018】

第1実施例である試験デバイス10Aにおいて、試験液はまず貯留部21に注入され、空気ポンプ30を駆動することによって、空気圧で図1(A)の状態から図1(B)に示すように、貯留部22に向かって送液され、さらに、図1(A)の状態に逆方向に送液される。即ち、試験液は微細流路11を往復送液されて反応部12を複数回繰り返して流通され、これにて抗原が抗体と反応する。試験液が貯留部21に溜められている間に、振動子28を動作させ、試験液中における抗原の濃度分布を均一化するように試験液を攪拌・混合させる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 9 】

本第 1 実施例によれば、微細流路 1 1 の一方に設けた貯留部 2 1 において試験液中での抗原の濃度分布を均一化させ、試験液を複数回繰り返して流通させることで抗原が反応部 1 2 の抗体に反応する割合が増加し、反応効率が向上する。

## 【 0 0 2 0 】

また、貯留部 2 1 , 2 2 の容積はいずれも試験液の流量以上に設定されているため、試験液の全量が微細流路 1 1 を流れるように往復送液させても、試験液が貯留部 2 1 , 2 2 から漏れ出るおそれはない。さらに、貯留部 2 1 の底部は「お椀形」とされ、かつ、上部の開口面積は広い目に設定されている。これにて、振動子 2 8 によって振動を与えられた試験液が動きやすくなり、攪拌効率が高くなる。貯留部 2 1 の上部の開口面積は、試験液と同じ体積の球を想定し、該球の平面投影面積を基準として、概ね、該投影面積の 1 / 1 0 倍以上とすれば、開口面積を広くした効果が現れる。

## 【 0 0 2 1 】

なお、振動子 2 8 の振動周波数は任意であるが、試験液の共振周波数又はそれに近い周波数であることが攪拌効率化の点で好ましい。試験液の共振周波数は、液量によっても変化することが予測されるため、送液による貯留部 2 1 内の液量の増減に合わせて振動子 2 8 の駆動周波数を変更することが好ましい。あるいは、駆動周波数を任意にスイープさせることによって、間欠的に共振モードとし、試験液のランダムな動きを誘発して抗原の混合を促進することもできる。

## 【 0 0 2 2 】

試験液を所定回数だけ往復送液した後は、試験液を空気ポンプ 3 0 で吸引し、廃液溜め 2 3 に捨てる。そして、貯留部 2 1 に洗浄液を滴下し、該洗浄液を空気ポンプ 3 0 で微細流路 1 1 に吸引送液して反応部 1 2 に残った未反応の抗原を除去する。その後、反応部 1 2 の面の光学的特性の変化を図示しない検出器で検出することによって、抗原と抗体の免疫反応を測定する。なお、この種の免疫反応の測定は周知であり、詳細な説明は省略する。

## 【 0 0 2 3 】

( 第 2 実施例、図 2 参照 )

第 2 実施例である試験デバイス 1 0 B は、図 2 に示すように、試験デバイス 1 0 B の一部に貯留部 2 1 に隣接した共鳴エリア ( 空洞 ) 2 5 を設けたものである。他の構成は前記第 1 実施例と同様である。第 2 実施例の作用効果は第 1 実施例と同様であり、特に、共鳴エリア 2 5 を設けることで、振動子 2 8 による共振振動を増幅させ、試験液の攪拌混合効率を高めることができる。

## 【 0 0 2 4 】

( 第 3 実施例、図 3 及び図 4 参照 )

第 3 実施例である試験デバイス 1 0 C は、図 3 に示すように、前記空気ポンプ 3 0 に代えて、蠕動式のチューブポンプ 3 5 を設けたものである。このチューブポンプ 3 5 は、図 4 に示すように、複数のローラ 3 6 を中央部のローラ 3 7 によって回転 ( 自転 ) させ、壁部 3 5 a とローラ 3 6 との間に挟み込まれたチューブ 3 8 内の試験液を回転 ( 自転 ) 方向に送液するものである。

## 【 0 0 2 5 】

試験デバイス 1 0 C には、振動子 2 8 を設けた貯留部 2 1 と反応部 1 2 を含む微細流路 1 1 が設けられている。チューブ 3 8 の一端は貯留部 2 1 に臨み、他端は微細流路 1 1 の他端開口部 2 6 に接続されている。このチューブポンプ 3 5 によって試験液は、貯留部 2 1 から微細流路 1 1 を繰り返して循環送液され、振動子 2 8 による共振振動で貯留部 2 1 において試験液中での抗原の濃度分布が均一化され、抗原が反応部 1 2 の抗体に反応する割合が増加し、反応効率が向上する。特に、この循環送液方式は、液量が比較的多いときに有効である。

## 【 0 0 2 6 】

なお、前記チューブポンプ 3 5 は、扱きポンプ、ペリスタルティック ( peristaltic )

10

20

30

40

50

ポンプ、蠕動ポンプなど種々の名称で呼ばれることもある。

【0027】

(第4実施例、図5及び図6参照)

第4実施例である試験デバイス10Dは、図5に示すように、第1の貯留部21の内壁面に螺旋状の溝部41を設けたものである。他の構成は前記第1実施例と同様である。第1実施例で説明したように、試験液は貯留部21, 22間を往復送液され、貯留部21の螺旋状の溝部41を通過することで回転攪拌されて混合され、試験液中での抗原の濃度分布が均一化される。貯留部21の上部の開口面積は、溝部41による試験液の攪拌混合が生じやすいように、広い目に設定されることが好ましい。試験液と同じ体積の球を想定し、該球の平面投影面積を基準として、概ね、該投影面積の1/10倍以上の開口面積とすれば効果的である。

10

【0028】

螺旋状溝部41を構成する板部材は図6に示す形状をなしており、溝部41の段数は任意である。試験液の回転混合を効率よく行うために、溝部41の幅寸法D1、(外径D2 - 内径D3) / 2、は溝部41の高さHより大きく設定することが好ましい。これにて、試験液が溝部41より内側の貫通穴部分42を通過する場合の流路抵抗より、溝部41を通過する場合の流路抵抗が小さくなるため、試験液が溝部41を通過しやすくなり、試験液の回転混合効果が向上する。

【0029】

なお、図6において、溝部41を構成する板部材の断面形状は矩形形状であるが、下方に傾斜させたり、角部に丸みを付けることにより、試験液の通過後の液残りを低減させることができる。

20

【0030】

(第5実施例、図7参照)

第5実施例である試験デバイス10Eは、図7に示すように、第1の貯留部21の内壁面に設けた螺旋状の溝部43を構成する板部材の断面形状を、内側に細いテーパ形状としたものである。他の構成や作用効果は、前記第1実施例及び前記第4実施例と同様である。

【0031】

(第6実施例、図8参照)

第6実施例である試験デバイス10Fは、図8に示すように、第1の貯留部21の内壁面に螺旋状の階段部44を設けたものである。他の構成は前記第1実施例と同様である。本第6実施例では、貯留部21において螺旋状の階段部44にて試験液が回転攪拌されて混合され、試験液中での抗原の濃度分布が均一化される。

30

【0032】

(他の実施例)

なお、本発明に係る反応試験方法は前記実施例に限定するものではなく、その要旨の範囲内で種々に変更できる。以下に、前記実施例に記載した以外の種々の実施例について説明する。

【0033】

特に、反応部での反応については、前記抗原と抗体の免疫反応以外に種々の反応であってもよい。但し、抗原と抗体の免疫反応の場合は、抗原の分子サイズが比較的大きくて自発的な拡散をしにくい特性を持っているため、本発明のように、積極的に濃度分布を均一化するように試験液を動作させることは非常に有効である。

40

【0034】

試験液に振動を与える振動子は、試験デバイス自体に貼着したのではなく、外部から圧電アクチュエータ、電磁アクチュエータなどを押し付ける形態であってもよい。また、振動子は第2の貯留部に設けてもよく、第1及び第2の貯留部の両方に設けてもよい。振動子は、部分的に振動を与えるのではなく、試験デバイスを全体的に振動させるものであってもよい。

50

## 【0035】

反応の検出方法についても、光学的特性の検出以外に、電気的特性などの検出や、着色状態を目視で検出する方法であってもよい。検出手段は反応装置に含まれていてもよく、反応装置とは別の装置として構成されていてもよい。光学的な検出を補助するために、レンズ、導波路、プリズムなどが試験デバイスに組み込まれていてもよい。

## 【0036】

また、検出効率を上げるために、蛍光体などの標識物質を用いてもよい。即ち、固定化された抗体（固相抗体）と抗原の免疫反応の場合、別途、抗原に対して特異的に反応し得る標識用の抗体（標識抗体）を蛍光体で予め修飾しておいたものを用いてもよい。

## 【0037】

固相抗体と反応して反応部に捕捉された抗原に対して、さらに、前記標識抗体が含まれる溶液を送液することによって、反応部に捕捉された抗原に対して蛍光体を標識させることもできる。あるいは、予め蛍光体を修飾させた標識抗体を抗原と反応させて蛍光標識させた複合体を生成させ、該複合体を反応部に送液することによって固相抗体と抗原との反応を検出しやすくすることもできる。これらの標識抗体、あるいは、抗原と標識抗体とが反応した複合体を微細流路に送液する場合においても、複数回の送液途中に濃度を均一化することで反応効率の向上が期待できる。

## 【0038】

濃度分布を均一化するように試験液を動作させる手段としては、以下の態様を採用してもよい。例えば、反応部を含む微細流路の上流側又は下流側の少なくとも一方にスターラー（磁気回転子）を入れておき、試験デバイスの外部で磁石を回転させたり、電磁石をオン/オフさせるなどの方法で磁場を変化させ、スターラーを回転させて試験液を攪拌してもよい。スターラーに代えて磁気ビーズを用いることもできる。

## 【0039】

あるいは、反応部を含む微細流路の上流側又は下流側の少なくとも一方に、試験液よりも比重の大きいセラミック微粒子を入れておき、試験デバイスの外部から振動を与えることで試験液中で該微粒子を振動させてもよい。あるいは、反応部を含む微細流路の上流側又は下流側の少なくとも一方に電極を配置し、該電極に交流電圧を印加することで試験液中のイオン、その他の電気的特性を有する物質を振動させてもよい。該電極に交流電圧を印加したときに、抗原などの試験物質そのものが電気的な力によって試験液中を移動する現象を利用してもよい。

ところで、前記試験デバイス及び反応装置を要約すると以下の特徴を備えたものである。

試験デバイスは、試験液中に分散された試験物質と反応し得る反応物質が固定化された反応部をその一部に有する微細流路と、前記微細流路の一方側又は他方側の少なくとも一方に、前記試験液中における試験物質の濃度分布を均一化するように試験液を動作させる均一化手段と、を備え、前記微細流路には試験液が複数回繰り返して流通されること、を特徴とする。

前記試験デバイスは、前記微細流路の一方側及び他方側に、前記試験液の液量以上の容積を有する試験液の貯留部を備えたこと、を特徴とする。また、前記均一化手段は少なくとも一度前記反応部を通過して前記貯留部に送液された試験液を攪拌する手段であることを特徴とする。また、前記均一化手段は振動子であることを特徴とする。また、前記均一化手段は螺旋状の溝部であることを特徴とする。また、前記均一化手段は螺旋状の階段部であることを特徴とする。また、前記反応部での反応が抗原と抗体との免疫反応であることを特徴とする。

また、搬送装置は、微細流路の一部に試験液中に分散された試験物質と反応し得る反応物質が固定化された反応部を有する試験デバイスと、前記微細流路に試験液を複数回繰り返して流通させるための送液手段と、前記微細流路の一方側又は他方側の少なくとも一方に、前記試験液中における試験物質の濃度分布を均一化するように試験液を動作させる均一化手段と、を備えたことを特徴とする。

10

20

30

40

50

前記搬送装置は、前記送液手段は前記試験液を往復送液するものであることを特徴とする。また、前記送液手段は前記試験液を循環送液するものであることを特徴とする。また、前記微細流路の一方側及び他方側に、前記試験液の液量以上の容積を有する試験液の貯留部を備えたこと、を特徴とする。また、前記均一化手段は少なくとも一度前記反応部を通過して前記貯留部に送液された試験液を攪拌する手段であることを特徴とする。また、前記均一化手段は振動子であることを特徴とする。また、前記均一化手段は螺旋状の溝部であることを特徴とする。また、前記均一化手段は螺旋状の階段部であることを特徴とする。また、前記反応部での反応が抗原と抗体との免疫反応であることを特徴とする。

【産業上の利用可能性】

【0040】

以上のように、本発明は、微細流路を有する反応試験方法に有用であり、特に、反応効率が向上する点で優れている。

【符号の説明】

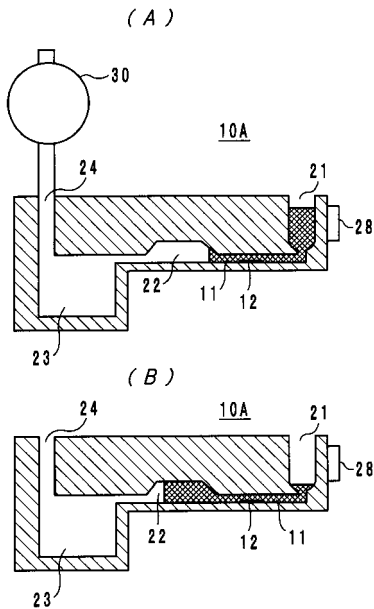
【0041】

- 10A ~ 10F ... 試験デバイス
- 11 ... 微細流路
- 12 ... 反応部
- 21, 22 ... 貯留部
- 28 ... 振動子
- 30 ... 空気ポンプ
- 35 ... チューブポンプ
- 41, 43 ... 螺旋状溝部
- 44 ... 螺旋状階段部

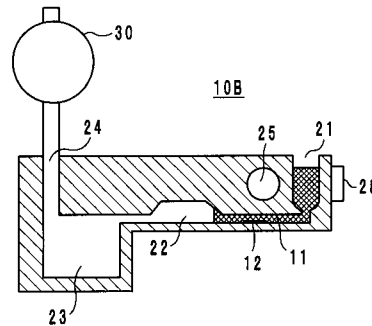
10

20

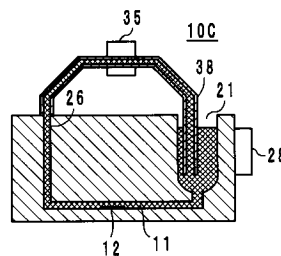
【図1】



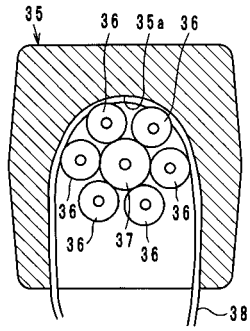
【図2】



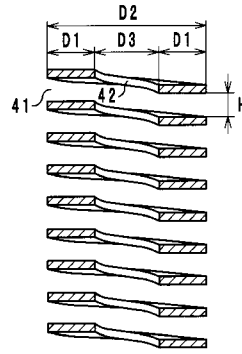
【図3】



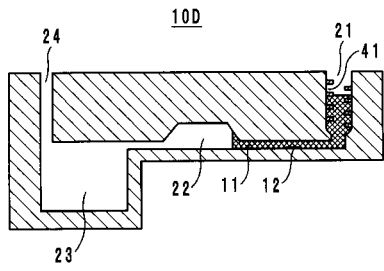
【 図 4 】



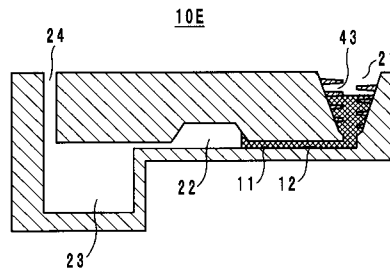
【 図 6 】



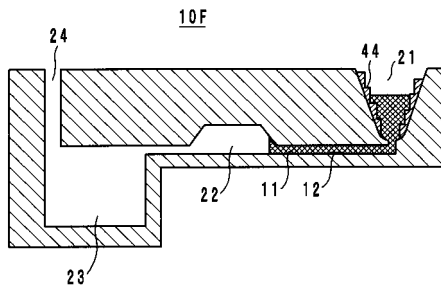
【 図 5 】



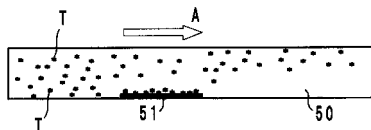
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 宮田 謙一

東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内

審査官 柏木 一浩

(56)参考文献 特開2005-134372(JP,A)

特開2006-142210(JP,A)

特開2008-212882(JP,A)

特開2007-209236(JP,A)

特開2002-214241(JP,A)

特開2004-321063(JP,A)

特開2005-028531(JP,A)

特開2006-284323(JP,A)

特開平10-170495(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 35/02

G01N 33/53

G01N 37/00

专利名称(译)	反应试验方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5470989B2</a>	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	JP2009094568	申请日	2009-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达控股公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	東野 楠 山東 康博 宮田 謙一		
发明人	東野 楠 山東 康博 宮田 謙一		
IPC分类号	G01N35/02 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	G01N35/02.D G01N33/53.D G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G058/AA09 2G058/CC05 2G058/CC08 2G058/FA08		
审查员(译)	柏木和弘		
其他公开文献	JP2010243419A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够在保持微通道尺寸的同时提高反应效率的试验装置，并提供反应装置和反应试验方法。解决方案：测试装置包括具有反应部分12的微通道11，其中在测试装置的一部分中固定了能够与设置在测试液体中的测试物质反应的反应物质。测试装置包括位于微通道11两侧的存储部分21,22，并且振荡器28粘附到存储部分21。注入存储部分21的测试液体在存储部分21,22之间往复地进给到通过驱动空气泵30使测试物质与反应部分12反应。在往复液体进料的中间，通过振荡器28在存储部分21的振动使测试液体共振，以搅拌和混合以统一浓度。测试物质。Z

3 ]

