

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-259762
(P2007-259762A)

(43) 公開日 平成19年10月11日(2007.10.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34 E	2G058
GO1N 35/08 (2006.01)	GO1N 35/08 A	4B029
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00 I O 1	4B063
C12Q 1/25 (2006.01)	C12Q 1/25	

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2006-89429 (P2006-89429)	(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(22) 出願日	平成18年3月28日 (2006.3.28)	(74) 代理人	100110434 弁理士 佐藤 勝
		(72) 発明者	鈴木 博章 茨城県つくば市竹園3丁目6番地305-103
		Fターム(参考)	2G058 AA09 CC05 CC08 DA01 DA07 DA09 EA19 EB19 FA07 GA11 4B029 AA07 BB16 CC08 FA12 FA13 4B063 QA01 QQ26 QQ30 QQ36 QR03 QR57 QR82 QX05

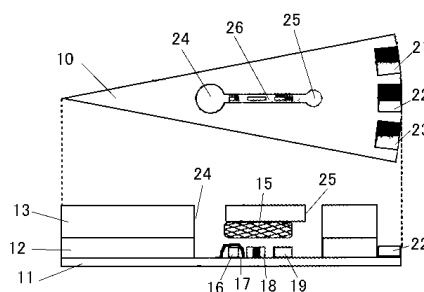
(54) 【発明の名称】 微小分析装置及び微量試料の分析方法

(57) 【要約】

【課題】 酵素活性等を利用して各種の検量を行なう微小分析装置において、測定に際しての試料や基質の取り扱い作業を大幅に軽減し、分析データに高い信頼性を付与できるようにする。

【解決手段】 本発明の微小分析装置は、基板上に微小流路を形成し、該微小流路に臨むように酵素を担持させる酵素担持部とその近傍に凍結乾燥された基質を配置させ、微小流路に試料液を流すことで基質に対応する試料中の酵素活性を分析すること、或いは微小流路に臨むように酵素Aを担持させる酵素A担持部を形成し、該酵素A担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された酵素Bを配置させ、前記微小流路に試料液を流すことで試料液中の酵素Bに対応する基質を分析することを特徴とする。このような本発明の装置では、微小流路内で凍結乾燥された基質または酵素材料の多孔質による毛細管現象との相乗効果が得られ、極めて短い時間での酵素反応による検量も実現される。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板上に微小流路を形成し、該微小流路に臨むように酵素を担持させる酵素担持部を形成し、該酵素担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された基質を含む担体を配置させ、前記微小流路に試料液を流すことで測定可能な酵素活性を生じさせ、基質に対応する試料中の酵素活性を分析する微小分析装置。

【請求項 2】

前記酵素担持部には電極が形成され、酵素は該電極の表面若しくは近傍に配置されていることを特徴とする請求項 1 記載の微小分析装置。

【請求項 3】

前記基板上には流路形成層が形成され、前記基板上の前記酵素担持部の周囲で該流路形成層を開口して前記微小流路を形成することを特徴とする請求項 1 記載の微小分析装置。

10

【請求項 4】

前記担持させる酵素は酸化還元酵素であり、前記試料液中のガンマ・グルタミルトランスぺプチダーゼ (GTP)、グルタミン・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン・ピルビック・トランスアミナーゼ (GPT)、ロイシナミノペプチダーゼ又はグルタミナーゼのいずれかを分析することを特徴とする請求項 1 記載の微小分析装置。

【請求項 5】

前記基質は、タンパク質及び架橋剤を混ぜた媒体により前記微小流路に臨むように配置されることを特徴とする請求項 1 記載の微小分析装置。

20

【請求項 6】

微小流路を形成すると共に該微小流路に臨むように酵素を担持させる酵素担持部を形成する工程と、該酵素担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された基質を含む担体を配置させる工程と、前記微小流路から前記凍結乾燥された基質に試料液を供給する工程とを有し、基質に対応する試料中の酵素活性を分析することを特徴とする微少試料の分析方法。

【請求項 7】

基板上に微小流路を形成し、該微小流路に臨むように酵素 A を担持させる酵素 A 担持部を形成し、該酵素 A 担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された酵素 B を配置させ、前記微小流路に試料液を流すことで試料液中の酵素 B に対応する基質を分析する微小分析装置。

30

【請求項 8】

前記酵素 A 担持部には電極が形成され、酵素 A は該電極の表面若しくは近傍に配されていることを特徴とする請求項 7 記載の微小分析装置。

【請求項 9】

前記基板上には流路形成層が形成され、前記基板上の前記酵素 A 担持部の周囲で該流路形成層を開口して前記微小流路を形成することを特徴とする請求項 7 記載の微小分析装置。

【請求項 10】

前記酵素 A は酸化還元酵素であり、酵素 B は加水分解酵素、脱水素酵素又はリン酸化酵素であり、前記試料液中のコレステロール、中性脂肪、クレアチニン、尿素、アンモニアのいずれかを分析することを特徴とする請求項 7 記載の微小分析装置。

40

【請求項 11】

前記酵素 B は、タンパク質及び架橋剤を混ぜた媒体により前記微小流路に臨むように配置されることを特徴とする請求項 7 記載の微小分析装置。

【請求項 12】

微小流路を形成する共に該微小流路に臨むように酵素 A を担持させる酵素 A 担持部を形成する工程と、該酵素 A 担持部の近傍の前記微小流路中に乾燥された酵素 B を配置させる工程と、前記微小流路から前記乾燥された酵素 B に酵素 B に対応する基質を含む試料液を供給する工程とを有し、試料中の基質を分析することを特徴とする微少試料の分析方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は微量な試料の分析や検出に用いられる微小分析装置及び微量試料の分析方法に関し、特に酵素活性を用いた測定を行なう微小分析装置及び微量試料の分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、化学センサの分野では、マイクロマシーニングの技術や、フォトリソグラフィーなどの半導体技術を利用して分析システムを微小化、集積化する研究が盛んに行われている。これらは微小化学物質分析システム (Micro Total Analysis System : μ TAS) と呼ばれている。 μ TASの利点としては、装置が小さいため場所をとらずにどこでも測定ができ、検体が微量で済み、迅速な分析が可能であることである。 μ TASの持つこれらの利点はまさに現在の医療の現場で求められているものであり、医療用としての μ TASの実現に向けた研究の意義は非常に大きい。

【0003】

ところで、医療診断に必要な測定を患者近傍で行なうベッドサイド診断用の分析 (POC (point of care) 分析) 可能なデバイスの一例として、一对の平板状部材間にキャピラリを形成し、該キャピラリ内に液体状の試薬と試料を流し、その混合液体中の所定成分を分析するチップ型の分析装置 (例えば特許文献1、特許文献2参照。) が知られている。また、肝臓機能の検査に特化した装置としては、チップ上でサンプルと基質を混合し、センシングを行なうGOT、GPT測定用のバイオセンサアレイも知られており (例えば非特許文献1参照。)、このバイオセンサにおいては、サンプルの入り口、混合のためのミアンダ状に引き回される流路、及びガラス基板に形成されたセンサチップからなり、サンプルの入り口からサンプルと基質を流し、センサチップでGOT、GPTの測定を行なう。

【0004】

このようなGOT、GPT測定が可能なバイオセンサーとしては、基板上にY字状の基質溶液の流路と試料液の流路が合流される微小流路を形成し、その微小流路の合流部に臨んで形成される複数の電極からなる電極系と、前記電極系の中の1つの電極の近傍に配置され所要の酵素を前記合流部で合流した前記基質溶液及び前記試料液と反応させる酵素供給手段とを設け、前記電極系に生ずる電流値によって前記試料液の酵素活性を検量するデバイスも知られている (例えば、特許文献3参照。)。

【0005】

【特許文献1】特開2001-165939号公報

【特許文献2】特開2000-2677号公報

【特許文献3】特開2005-351882号公報

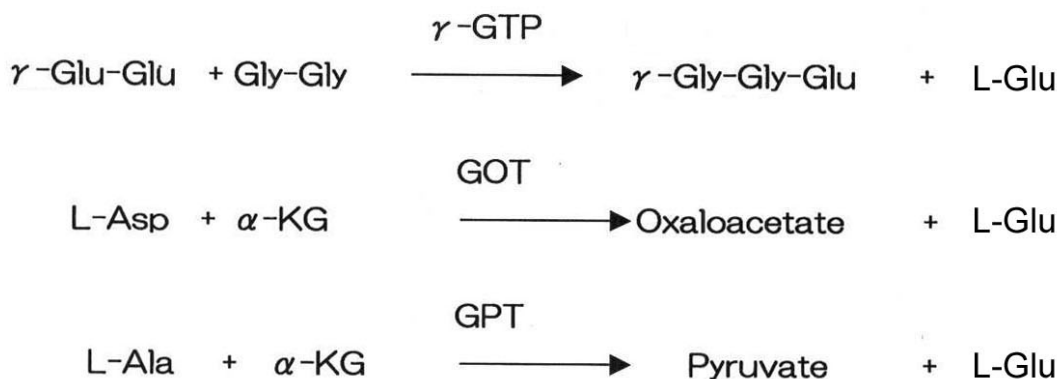
【非特許文献1】I.Moser, G. Jobst, P Svasek, M Varaham, G Urban "Rapid Liver Enzyme Assay with Miniaturized Liquid Handling System Comprising Thin Film Biosensor Array" Sensors and Actuators B, 1997, vol. 44, 377-380

【0006】

ところで、肝臓機能の検査項目である -GTP、GOT、GPTは、いずれも同じ反応生成物であるL-グルタミン酸を検出することで測定可能となり、グルタミン酸オキシダーゼを使用した酵素センサーを用いれば、これら -GTP、GOT、GPTの3項目を1つの分析システムで検出することができる。詳しくは、

【0007】

【化1】



10

γ -Glu-Glu は γ -L-グルタミル-L-グルタミン酸

Gly-Gly はグリシルグリシン

L-Ala はL-アラニン

L-Asp はL-アスパラギン酸

α -KG は α -ケトグルタル酸

γ -Gly-Gly-Glu は γ -L-グルタミル-グリシルグリシン

L-Glu はL-グルタミン酸

20

【0008】

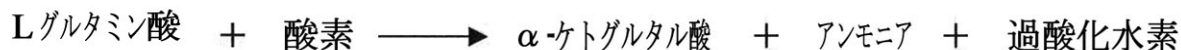
また、L-グルタミン酸オキシダーゼを用いた反応は次のようであり、L-グルタミン酸を酸化して脱アミノ化する酵素であって、反応生成物としては過酸化水素やアンモニアが生成される。この過酸化水素によって生ずる酸化電流値を測定することでL-グルタミン酸濃度が測定され、この測定から γ -GTP、GOT、GPTの値も検出可能となる。

30

【0009】

【化2】

グルタミン酸オキシダーゼ



40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

前述の公知技術では、それぞれ基板やチップ上に微小な流路を形成し、その流路に試料液と基質溶液を合流するように流すことで酵素反応を導くように設計されている。しかしながら、微小な流路に試料液や基質溶液を流すことは容易ではなく、遠心力などによって流体を流動させるシステムや、マイクロポンプやマイクロシリンジポンプなどの流体を流動させるための微小なデバイスを配することが必要であったり、流路を引き回す形状のも

50

のでは、酵素反応が発現するまでの時間が長くなってしまい、その結果、測定自体に時間がかかることになる。

【0011】

また、チップなどの形式で測定する場合、供給する液体は試料液だけである方が簡単であり、例えば -GTP、GOT、GPTの値を測定する肝機能検査の場合に、血液に加えて基質溶液もチップに供給する場合は、間違った基質溶液を加えてしまうこともあるため、測定データが間違ふこともあり、問題となり得る。

【0012】

そこで、本発明は上述の技術的な課題に鑑み、酵素活性を利用して各種の検量を行なう微小分析装置及び微量試料の分析方法において、測定に際しての試料や基質の取り扱い作業を大幅に軽減し、分析データに高い信頼性を付与できるような微小分析装置及び微量試料の分析方法の提供を目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

上述の技術的な課題を解決するため、本発明の微小分析装置は、基板上に微小流路を形成し、該微小流路に臨むように酵素を担持させる酵素担持部を形成し、該酵素担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された基質を含む担体を配置させ、前記微小流路に試料液を流すことで測定可能な酵素活性を生じさせ、基質に対応する試料中の酵素活性を分析することを特徴とする。

【0014】

本発明の好適な一例によれば、前記酵素担持部には電極が形成され、酵素は該電極の表面若しくは近傍に配される。電極によって電気化学反応を測定することができ、例えば、2電極、より好ましくは3電極を以って構成される。3電極方式の場合、作用電極、参照電極、及び対極で電極系が形成され、例えば、板状部材上に所要のパターンで薄膜の金属膜を形成し、その金属薄膜の一部を微小流路に臨ませることで、電流を流しての測定が可能となる。金属薄膜を形成する場合の金属材料としては種々のものを用いることが可能であるが、白金や銀などの材料を用いることができ、更には使い捨て用途ではカーボン系の導電ペーストなどを利用して電極とすることも可能である。3電極方式の場合、作用電極近傍に酵素担持部を形成することができる。

20

【0015】

担持させる酵素としては、過酸化水素等の電極にて測定可能な反応生成物を生成するものであればよく、例えば、グルタミン酸オキシダーゼ等の酸化還元酵素を使用すればよい。

30

【0016】

このような酵素を担持させる方法としては、担体結合法、架橋法、包括法或いはこれらの組み合わせからなる方法で電極近傍に酵素を固定する方法や、透過膜などを流路に臨むように形成して、該透過膜を介して酵素を供給する方法などが挙げられる。担体結合法は酵素を水不溶性の担体に固定する方法であり、その結合様式によって、物理吸着法、イオン結合法、共有結合法などが知られている。架橋法は、2個以上の官能基を持つ試薬を用いて酵素を架橋することで固定する方法である。架橋法では、温和な条件で簡単に固定できるため、酵素の失活も少なく、適切な担体を用いることで酵素の安定性を上昇させることもできる。一例として、L-グルタミン酸を対象とし、酵素としてL-グルタミン酸オキシダーゼが用いられる場合では、ウシ血清アルブミン(BSA)を高分子担体とし、二官能性試薬グルタルアルデヒドを用いて酵素を架橋し、膜状に成形したものを電極に被着して酵素担持部を構成しても良い。包括法は酵素を高分子ゲルの細かい格子の中に取り込む格子型と、半透膜の高分子膜によって被覆するマイクロカプセル型に分けることができ、酵素自体は結合反応を起こしていないため、多くの酵素固定に利用できる。

40

【0017】

前記基板としては、ガラス、合成樹脂、セラミック、金属、木材、紙、これらの複合材など種々の材料を用いることが可能であり、所要の形状で微小流路を形成し、試料液を流

50

して当該基板に形成される微小流路に電極などを保持できる機能を有していれば良い。本発明の一例によれば、ガラス基板上にフォトレジストで流路パターンを形成し、その上にPDMS（ポリジメチルシロキサン）などの透明樹脂層からなる流路形成層を形成し、パターン化されたフォトレジストを除去して流路を形成することもできる。基板自体は使用者の取扱いの便宜性から、所要の剛性を有していても良く、可とう性を有していても良い。このような基板には、任意の形状を有する微小流路が形成されるが、酵素担持部の周囲で流路形成層を開口するようにすることで前記微小流路を形成しても良い。

【0018】

本発明の微小分析装置では、試料中の測定対象の酵素に対応した基質が凍結乾燥されて配設されており、試料液によって溶解して酵素反応が開始する構造とされ、基質が従来のように液体で供給されるものではない。凍結乾燥は、基質溶液を微小流路に充填し、その微小流路中の基質溶液の凍結後、真空凍結乾燥を行なうことができる。より好ましくは、前記基質は、牛血清アルブミン等タンパク質及びグルタルアルデヒド等の架橋剤を混ぜた媒体により前記微小流路に臨むように配置される。このような凍結乾燥法を用いて基質溶液を処理した場合は、より多孔質の状態となり、液体に対しては毛細管現象によって溶解や混合を早く、より均一に進行させることができる。

10

【0019】

また、本発明の微小分析装置の測定対象の酵素としては、種々の酵素を対象とすることができる。測定対象の酵素、凍結乾燥基質、及び担持酵素をまとめると、たとえば以下の通りであり、これらの基質を選んで微小流路内に導入し、凍結乾燥させたものを配置することで、被験者の血液などの試料液を導入した際に、極めて短い時間での測定が実現されることになる。

20

【0020】

- (a) 測定酵素：ガンマ・グルタミルトランスぺプチダーゼ（GTP）
凍結乾燥基質：L - - グルタミル - L - グルタミン酸とグリシル - グリシン
担持酵素：グルタミン酸オキシダーゼ
- (b) 測定酵素：グルタミック・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ（GOT）
凍結乾燥基質：L - アスパラギン酸と - ケトグルタル酸
担持酵素：グルタミン酸オキシダーゼ
- (c) 測定酵素：グルタミック・ピルビック・トランスアミナーゼ（GPT）
凍結乾燥基質：L - アラニンと - ケトグルタル酸
担持酵素：グルタミン酸オキシダーゼ
- (d) 測定酵素：ロイシンアミノペプチダーゼ
凍結乾燥基質：ロイシルグルタミン酸
担持酵素：グルタミン酸オキシダーゼ
- (e) 測定酵素：グルタミナーゼ
凍結乾燥基質：グルタミン
担持酵素：グルタミン酸オキシダーゼ

30

【0021】

例えば、肝臓機能の検査項目であるガンマ・グルタミルトランスぺプチダーゼ（GTP）、グルタミック・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ（GOT）、グルタミック・ピルビック・トランスアミナーゼ（GPT）は、いずれも同じ反応生成物であるL - グルタミン酸を検出することで測定可能となり、担持させる酵素としてグルタミン酸オキシダーゼを用いれば、これら - GTP、GOT、GPTの3項目を1つの分析システムで検出することができる。この場合において、作用極若しくはその近傍に固定される酵素は、例えば、牛血清アルブミン（BSA）にL - グルタミン酸オキシターゼ及びグルタルアルデヒドを混ぜた媒体により前記微小流路に臨むようにすれば良い。

40

【0022】

また、本発明の微小試料の分析方法は、微小流路を形成すると共に該微小流路に臨むように酵素を担持させる酵素担持部を形成する工程と、該酵素担持部の近傍の前記微小流路

50

中に凍結乾燥された基質を含む担体を配置させる工程と、前記微小流路から前記凍結乾燥された基質に試料液を供給する工程とを有し、基質に対応する試料中の酵素活性を分析することを特徴とする。

【0023】

さらに、本発明の微小分析装置は、基板上に微小流路を形成し、該微小流路に臨むように酵素Aを担持させる酵素A担持部を形成し、該酵素担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された酵素Bを配置させ、前記微小流路に試料液を流すことで試料液中の酵素Bに対応する基質を分析することを特徴とする。

【0024】

本発明の好適な一例によれば、前記酵素A担持部には電極が形成され、酵素Aは該電極の表面若しくは近傍に配される。電極によって電気化学反応を測定することができ、例えば、2電極、より好ましくは3電極を以って構成される。3電極方式の場合、作用電極、参照電極、及び対極で電極系が形成され、例えば、板状部材上に所要のパターンで薄膜の金属膜を形成し、その金属薄膜の一部を微小流路に臨ませることで、電流を流しての測定が可能となる。金属薄膜を形成する場合の金属材料としては種々のものを用いることが可能であるが、白金や銀などの材料を用いることができ、更には使い捨て用途ではカーボン系の導電ペーストなどを利用して電極とすることも可能である。3電極方式の場合、作用電極近傍に酵素A担持部を形成することができる。

10

【0025】

担持させる酵素Aとしては、過酸化水素等の電極にて測定可能な反応生成物を生成するものであればよく、例えば、グルタミン酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロリン酸オキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ等の酸化還元酵素を使用すればよい。

20

【0026】

酵素Aを担持させる方法としては、前記と同様に、担体結合法、架橋法、包括法或いはこれらの組み合わせからなる方法で電極近傍に酵素Aを固定する方法や、透過膜などを流路に臨むように形成して、該透過膜を介して酵素Aを供給する方法などが挙げられる。

【0027】

前記基板も、前記と同様に、ガラス、合成樹脂、セラミック、金属、木材、紙、これらの複合材など種々の材料を用いることが可能であり、所要の形状で微小流路を形成し、試料液を流して当該基板に形成される微小流路に電極などを保持できる機能を有していれば良い。

30

【0028】

本発明の微小分析装置では、酵素Bが凍結乾燥されて配設されており、試料液によって溶解して酵素反応が開始する構造となっている。配置する酵素Bとしては、酵素Aの基質を誘導するものであればよく、具体的には、リポプロテインリパーゼ、コレステロールエステラーゼ、グルセロールキナーゼ、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、グルタミナーゼ等の加水分解酵素、グルタミン酸脱水素酵素等の脱水素酵素又はリン酸化酵素を1種若しくは複数種用いればよい。なお、アンモニアあるいは尿素を測定する場合には、グルタミン酸脱水素酵素が酵素Bであり、その基質の一つである ケトグルタル酸を酵素Bと共に凍結乾燥する必要がある。

40

【0029】

このような酵素Bの凍結乾燥は、酵素溶液を微小流路に充填し、その微小流路中の酵素B溶液の凍結後、真空凍結乾燥を図ることで行なうことができる。より好ましくは、前記酵素Bは、牛血清アルブミン等タンパク質及びグルタルアルデヒド等の架橋剤を混ぜた媒体により前記微小流路に臨むように配置される。一般に、このような凍結乾燥法を用いて酵素溶液を処理した場合、より多孔質の状態となり、液体に対しては毛細管現象によって溶解や混合を早く、より均一に進行させることができる。さらに、凍結乾燥による酵素Bの安定性低下を防ぐために、ガンマ-ポリ-L-グルタミン酸のごとき新酵素安定化剤を酵素B溶液に0.001%から0.1%、好ましくは0.01%程度加えて凍結乾燥する

50

とよい。

【0030】

本発明の微小分析装置の測定対象の物質としては、酵素Aの基質を生成する酵素Bの基質又は複数の酵素Bによって最終的に酵素Aの基質に導かれる酵素Bの基質であればよく、種々の基質を対象とすることができる。たとえば、以下に示したような酵素A及びBを用いることで、被験者の血液などの試料液を導入した際に、極めて短い時間で、測定対象の基質の測定が実現されることになる。

【0031】

(i) 測定基質：コレステロール

酵素A： コルステロールオキシダーゼ

酵素B： リポプロテインリパーゼ及びコレステロールエステラーゼ

10

(ii) 測定基質：中性脂肪

酵素A： グリセロリン酸オキシダーゼ

酵素B： リポプロテインリパーゼ及び/又はグリセロールキナーゼ

(iii) 測定基質：クレアチニン

酵素A： サルコシンオキシダーゼ

酵素B： クレアチナーゼ及び/又はクレアチナーゼ

【0032】

さらにまた、本発明の微小試料の分析方法は、微小流路を形成すると共に該微小流路に臨むように酵素Aを担持させる酵素A担持部を形成する工程と、該酵素A担持部の近傍の前記微小流路中に凍結乾燥された酵素Bを配置させる工程と、前記微小流路から前記乾燥された酵素Bに酵素Bに対応する基質を含む試料液を供給する工程とを有し、試料中の基質を分析することを特徴とする。

20

【発明の効果】

【0033】

本発明の微小分析装置では、極めて空間的に狭い領域である微小流路に凍結乾燥された基質又は酵素が配設されるため、そこに試料液が導入された場合には、素早く混合することになり、酵素反応の立ち上がりも早く、微小流路での毛細管現象と、凍結乾燥された基質又は酵素材料の多孔質による毛細管現象との相乗効果が得られることになり、特に電気化学的な測定法によれば2、3分程度の時間で酵素反応による検量ができることになり、例えば医療現場での迅速な測定結果の提供もできることになる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

以下、本発明の好適な実施の形態について図面を参照しながら説明する。本実施形態の微小分析装置10は、小さな扇状の平板ガラス基板11上に電極群を形成し、微小流路26が形成されるポリイミド絶縁層12とPDMS(ポリジメチルシロキサン)基板13とが積層される構造を有しており、特に肝臓機能の検査項目であるガンマ・グルタミルトランスペプチダーゼ(GTP)、グルタミン酸・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸・ピルピック・トランスアミナーゼ(GPT)に対して短い時間で酵素活性に基づく検量が可能となる。

40

【0035】

ガラス基板11は、後述するように例えば3インチの直径、厚み500 μ mのガラスウエハを半径方向を分割線とするように分割して形成されたものであり、このガラス基板11上には、電極群を構成する作用極16、参照極18、及び対極19が流路内の領域で直線状に点在して形成された構造を有している。これら作用極16、参照極18、及び対極19はガラス電極基板11上にスパッタ法などにより形成される金属薄膜からなり、作用極16と参照極18は、クロム・白金系の金属薄膜からなるが、対極19は銀・塩化銀層34が積層する構造とされる。

【0036】

作用極16は、微小流路26への試料液の導入部となる注入開口部24に最も近い位置に

50

配され、ガラス基板 11 の表面を作用極 16 から L 字状に引き出された配線を介して作用極パッド部 21 まで延在され、その作用極パッド部 21 で電流計に接続される。参照極 18 は作用極 16 の直ぐ下流に形成されており、ガラス基板 11 の表面を参照極 18 から L 字状に引き出された配線を介して参照極パッド部 23 まで延在され、その参照極パッド部 23 で電流計に接続される。対極 19 は、参照極 18 の更に下流側に形成され、ガラス基板 11 の表面を対極 19 から略直線状に引き出された配線を介して対極パッド部 22 まで延在され、その対極パッド部 22 で電流計に接続される。

【0037】

作用極 16 の表面には、グルタルアルデヒドを用いて架橋して固定された L - グルタミン酸オキシダーゼを膜状に形成し、微小流路 26 に臨むように酵素を担持させる酵素担持膜 17 が形成されている。詳しくは、例えば 0.1 mg の L - グルタミン酸オキシダーゼがマトリクスとしての 10 重量 % の牛血清アルブミンに混合され、同じく 10 重量 % のグルタルアルデヒドをそれぞれ 2 μ L (リットル) 混合して架橋したものである。従って、作用極 16 の周囲を L - グルタミン酸が通過する場合、前述の化 2 の式の反応が生じ、その L - グルタミン酸に L - グルタミン酸オキシダーゼが作用して過酸化水素が生成され、その過酸化水素濃度に応じた電流が流れることになる。

10

【0038】

ガラス基板 11 上に形成された作用極 16、参照極 18、及び対極 19 からの配線を電氣的に互いに絶縁するように、ポリイミド絶縁層 12 がガラス基板 11 上に形成される。ポリイミド絶縁層 12 は、ガラス基板 11 の扇形状に沿った外形形状を有しており、作用極 16、参照極 18、及び対極 19 が臨む微小流路 26 で注入開口部 24 と排出開口部 25 の間を略直線的に連絡するパターンで切り抜かれた形状を有し、そのポリイミド絶縁層 12 の切り抜かれた部分が微小流路 26 として機能することになる。

20

【0039】

このようなガラス基板 11 側の構成を有する本実施形態の微小分析装置 10 では、流路形成層として機能する PDMS 基板 13 がその微小流路 26 に凍結乾燥された基質材料部 15 を配置しながら張り合わされる。PDMS 基板 13 は、厚膜のフォトレジストを利用してテンプレート上に形成されたものであり、このテンプレートに微小流路 26 と、注入開口部 24 と排出開口部 25 の型を作り込むことで、これらの型を反映して微小流路 26、注入開口部 24、および排出開口部 25 が形成される。微小流路 26 の形状の一例としては、単純な矩形状に延長される流路であって、例えば長さ、高さ、幅がそれぞれ 15 mm、800 μ m、1 mm とされる。注入開口部 24 は微小流路 26 の幅よりやや直径が大きい円形に開口した略円筒状であり、この部分に試料液を容易に導入するためにシリコーンゴム部材を設けることも可能である。

30

【0040】

注入開口部 24 が微小流路 26 に接続する部分の近傍の微小流路 26 内に、凍結乾燥された基質材料部 15 が配置される。このような凍結乾燥による基質材料部 15 の形成法の一例について説明すると、初めに、適量の基質を含む溶液を準備し、この基質溶液と牛血清アルブミン溶液とグルタルアルデヒドを用いて混合し、ガラス基板 11 を張り合わせていない PDMS 基板 13 の微小流路 26 に直ぐに注入し、微小流路 26 内で架橋による固定化を図る。このような数分の固定化の後、PDMS 基板 13 ごと冷凍機に入れて 1 時間ほど - 25 に保って架橋反応を更に進行させた後、続いて真空凍結乾燥を約 30 分ほど施して、凍結乾燥による基質材料部 15 を得ることができる。

40

【0041】

なお、本実施形態では、PDMS 基板 13 の微小流路 26 に基質溶液を注いで真空凍結乾燥させる例を説明したが、本発明はこれに限定されず、基質溶液を真空凍結乾燥させた状態の断片を配するような構造であっても良く、微小なストローの如き流路に基質溶液を凍結乾燥させたもの固定し、それを各チップごとに切断して実装するような構造であっても良く、最終的に基質溶液を真空凍結乾燥させた状態の断片が電極近傍に配置されるような構造であれば、他の構造であっても良い。

50

【0042】

凍結乾燥させる基質溶液は、活性を測定する酵素によって替えることができるものである。例えば、前述の化1に示すように、ガンマ・グルタミルトランスぺプチダーゼ（GTP）について測定する場合は、L - - グルタミル - L - グルタミン酸とグリシルグリシンとを含んだ基質を用いることができ、グルタミン・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ（GOT）について測定する場合は、L - アスパラギン酸と - ケトグルタル酸を含んだ基質を用いることができ、グルタミン・ピルビック・トランスアミナーゼ（GPT）について測定する場合は、L - アラニンと - ケトグルタル酸を含んだ基質を用いることができる。

【0043】

また、本実施形態では、肝臓機能の検査項目に好適なように設計された微小分析装置10を提供するが、本発明にかかる微小分析装置は、肝臓機能の検査に限らず、他の酵素活性を利用するセンサーにも適用可能であり、さらには抗体・抗原反応を用いるものなどにも適用可能である。例えば、ELISA法による検出が可能な微小流路装置を得るためには、凍結乾燥した基質を予め微小流路に配置し、抗体を微小流路の内壁に固定化した上で、抗原、酵素標識抗体を順次供給することで、ELISA法による識別も実現されることになる。また、生活習慣病を検知できるセンサーの応用としては、ウリカーゼを用いて尿酸値を検量する方法にも、本発明にかかる微小分析装置を適用することができ、さらには肝臓機能の検査と同時に尿酸値検査も実現できる単一のバイオセンサチップも可能である。

【0044】

以上の如き、微小流路26に基質溶液を注いで真空凍結乾燥させた基質材料部15を有するPDMS基板13と、ポリイミド絶縁層12に保護された作用極16、対極18、及び参照極19が形成されたガラス基板11とを張り合わせることで、微小分析装置10が作成される。ポリイミド絶縁層12をPDMS基板13の裏面側に形成し、その後張り合わせるようにすることも可能である。

【0045】

次に、図2、図3を参照して、本実施形態の微小流路装置10の動作について説明する。例えば、ガンマ・グルタミルトランスぺプチダーゼ（GTP）について測定する場合は、PDMS基板13の微小流路26に配置されるのは、L - - グルタミル - L - グルタミン酸とグリシルグリシンとを含んだ基質を凍結乾燥させた基質材料部15であり、一方、作用極16の表面に形成される膜は、グルタルアルデヒドを用いて架橋して固定されたL - グルタミン酸オキシダーゼを微小流路26に臨むように形成した酵素担持膜17である。

【0046】

この状態で、PDMS基板13に開口された注入開口部24より、試料液30が微小流路26に導入され、図2に示すように、試料液30は円筒状の注入開口部24の部分に溜まる。すると、試料液30は隣接する凍結乾燥された基質材料部15の表面に到達し、試料液30は更にその基質材料部15の綿のような多孔質の表面を毛細管現象によって急速に下流側に進行して行くことになる。この試料液30の下流側への流れは毛細管現象により自動的に生ずるものであり、特にマイクロポンプやマイクロシリンジポンプの如き機構部を要せずに、下流への流れが形成されるものである。

【0047】

このように凍結乾燥された基質材料部15に誘導される試料液30の下流側への流れは、図3に示すように作用極16の表面に固定された酵素担持膜17にも到達する。試料液30が凍結乾燥された基質材料部15を溶解させることで、試料液30に含まれる検量すべき酵素であるガンマ・グルタミルトランスぺプチダーゼ（GTP）が、L - - グルタミル - L - グルタミン酸とグリシルグリシンの基質によって活性となり、L - グルタミン酸を生成する。この生成されたL - グルタミン酸は、直ちに作用極16の表面に固定された酵素担持膜17にも到達することになり、ここで固定されていたL - グルタミン酸オキシダーゼと生成されたL - グルタミン酸の反応によって過酸化水素が発生し、その過

10

20

30

40

50

酸化水素による電流値の変化がセンサー出力として得られることになる。

【0048】

前述の如き本実施形態の微小分析装置の作用極16、対極19、及び参照極18は、それぞれポテンシオスタットに接続することで測定が可能であり、作用極パッド部21が電流計を介して、参照極パッド部23がポテンシオスタットに接続される。

【0049】

このような構造を有する本実施形態の微小分析装置10は、極めて空間的に狭い領域である微小流路26に凍結乾燥された基質材料部15が配設されるため、そこに試料液30が導入された場合には、試料液10は基質材料部による毛細管現象を利用して素早く混合することになり、酵素反応の立ち上がりも早いものとなる。微小流路26内に凍結乾燥された基質材料部15を配することで、微小流路26に試料液30を供給した場合には、微小流路26での毛細管現象と、凍結乾燥された基質材料部15の多孔質による毛細管現象との相乗効果が得られることになり、特に電気化学的な測定法によれば1分以内の時間で酵素反応による検量ができることになり、例えば医療現場での迅速な測定結果の利用もできることになる。

10

【0050】

次に、図4、図5を参照して、本実施形態の微小分析装置10の組み立て方法についてさらに説明すると、図4のように、本実施形態の微小分析装置10では、円盤状のガラスウエハ31に前述の如き電極群を順次並べて形成し、その電極群が形成されたガラスウエハ31をそれぞれ扇状に分割することで、個々のガラス基板11を形成することができ、同様に、円盤状のPDMS基板32に複数の微小流路パターン33を有するように形成し、このPDMS基板32をそれぞれ扇状に分割することで、個々のPDMS基板13を形成することができる。それぞれ扇状に分割する工程は、円盤状のPDMS基板32と円盤状のガラスウエハ31を張り合わせた後で行なうこともでき、円盤状のPDMS円盤基板32と円盤状のガラスウエハ31をそれぞれ扇状に分割して、それぞれ張り合わせるようにしても良い。

20

【0051】

図5は本実施形態の微小分析装置10の分解斜視図であり、特に層間絶縁膜として機能するポリイミド絶縁層12にも流路パターンが形成されるが、そのパターンは円盤状のPDMS円盤基板32に形成される複数の微小流路パターン33と同じであり、同じマスクを使用した加工で良い。

30

【0052】

なお、本実施形態の微小分析装置10では、その基板形状を扇型として説明したが、この形状に限定されず、他の円盤形状や矩形状、円筒状、角柱状など種々の形状にすることが可能である。また、電極配線の引き回しパターンも任意であり、パッド部に片側だけではなく、例えば両端部や両面に設けるようにすることも可能である。

【0053】

次に図6乃至図11を参照しながら、本件発明者らが行なった実験例に基づき、本実施形態の利点について説明する。初めに、凍結乾燥による基質材料部が、通常の乾燥による固定化をしたもの、従来のY字状流路を用いたものに対して優位であることについて検証した。図6は、これら3つの乾燥法と流路構造の組み合わせを対比した図である。図6に示すように、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)が最も曲線の立ち上がりが早く、次いで、室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)の立ち上がりが早く、最も遅いものはY字状の流路に試料液と基質溶液を流したもの(c)となった。

40

【0054】

特に、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例では、10秒若しくはそれ以下程度で曲線の立ち上がりが得られ、4、5分程度で安定するという曲線が得られている。また、この実験では、牛血清アルブミンやグルタルアルデヒドの濃度も重要であることが分かり、それぞれ牛血清アルブミンの濃度が10重量%以上で、グルタルアルデヒド

50

の濃度が2重量%以上であると、支持層が膨らみ粘っこくなってしまっていて反応が鈍くなることも分かった。

【0055】

次に、微小流路のサイズについても実験を行なった。ここでは次の表1のようなサイズの微小流路を形成して実験を行なった。

【0056】

【表1】

微小流路番号	流路幅 (μm)	流路高さ (μm)
1	1000	800
2	1000	250
3	500	800

【0057】

このような各サイズの流路を形成して、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)、室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)、Y字状の流路に試料液と基質溶液を流した例(c)のそれぞれについてデータを取得した。図7の(a)は、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例について、表1の流路を調べたものであり、最も顕著に流路断面積が大きい番号1のものが、素早い反応曲線を示していることが分かる。図7の(b)は、室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)についてデータを取ったものであり、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)と同様の傾向が得られているが、その曲線の立ち上がりは鈍いものとなり、Y字状の流路に試料液と基質溶液を流した例(c)では更に立ち上がりが鈍くなっていることが分かった。

【0058】

次に、微小流路と試料液の粘度についても実験を行なった。ここではグルタミン酸・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ(GOT)が試料水溶液に含まれる例と、GOTがヒト血清試料に含まれる例を、それぞれ前述の3つの流路、すなわち凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)、室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)、Y字状の流路に試料液と基質溶液を流した例(c)のそれぞれについて調べた。

【0059】

この微小流路と試料液の粘度の関係を図8に示す。凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)では、GOTが試料水溶液に含まれる例と、GOTがヒト血清試料に含まれる例で異なる結果が得られ、GOTがヒト血清試料に含まれる例の方が試料水溶液に含まれる例に比べて曲線の立ち上がりが鈍く、粘度の点で毛細管現象がやや妨げられていると思われる現象が観察された。これは次の室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)と好対照であり、例(b)では差は少なくなっていることが明らかであるものの、全体としては凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)の方が反応速度が速いことも分かる。また、Y字状の流路に試料液と基質溶液を流した例(c)では全体的に立ち上がりが緩やかであり、粘度の高い方が反応が鈍いことも示されている。

【0060】

次に、L-アスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンなどの電極活性の干渉物質についても実験を行なった。図9はその実験結果を示す図であり、本実施形態の微小分析装置を用い、干渉物質だけのもの、グルタミン酸・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ(GOT)45U/Lと干渉物質を混合したもの、GOTを45U/Lだけのものの3通りについて反応曲線を調べた。結果は、干渉物質だけのものの場合、電流値が定常的な値となり時間変化の極めて少ないデータとなった。これに対して反応すべき酵素が含まれた場合には確実に反応曲線が描かれており、多少の干渉物質を仮に含んでいてもセンサーと

10

20

30

40

50

して十分に機能することが分かった。

【0061】

図10、図11は、表1の微小流路番号1の流路を用い各試料液濃度のグルタミン酸・オキサロアセテック・トランスアミナーゼ(GOT)(図10、図11の各(a))、グルタミン酸・ピルビック・トランスアミナーゼ(GPT)(図10、図11の各(b))、ガンマ・グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)(図10、図11の各(c))についてそれぞれ反応を調べてまとめたものである。これら図10より、GOT、GPT、 γ -GTPのそれぞれについて、濃度に応じた検量線が示されていることが分かり、これらの図10のデータにより作成された図11からはそれぞれ直線的な傾きが得られることが示されているため、本実施形態の微小分析装置を用いてセンサーとして感度の良いものが期待できることが裏づけられた。 10

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】本発明の微小分析装置の一例の上面および断面を示す図である。

【図2】本発明の微小分析装置の一例の断面図であって、試料液を注入したところを示す図である。

【図3】本発明の微小分析装置の一例の断面図であって、試料液により基質材料部が溶解したところを示す図である。

【図4】本発明の微小分析装置の一例を組み立てる際に用いられる円盤状基板を示す斜視図である。 20

【図5】本発明の微小分析装置の一例の分解斜視図である。

【図6】本発明の微小分析装置の一例を対比して説明するための図であって、流路と基質の乾燥方法の違いに応じた酵素反応の時間変化を示す図である。

【図7】本発明の微小分析装置の一例を対比して説明するための図であって、各サイズの流路を形成して、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)、室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)、Y字状の流路に試料液と基質溶液を流した例(c)のそれぞれについての酵素反応の時間変化を示した図である。

【図8】本発明の微小分析装置の一例を対比して説明するための図であって、試料の粘度を変えて、凍結乾燥による基質材料部が微小流路に形成される例(a)、室温で基質を乾燥させたものが微小流路に形成される例(b)、Y字状の流路に試料液と基質溶液を流した例(c)のそれぞれについての酵素反応の時間変化を示した図である。 30

【図9】本発明の微小分析装置の一例について干渉物質の影響を検証したものであって、酵素反応の時間変化を示した図である。

【図10】本発明の微小分析装置の一例について各試料液濃度での酵素反応の時間変化を示した図であり、(a)はGOT、(b)はGPT、(c)は γ -GTPの図である。

【図11】本発明の微小分析装置の一例について図10の結果に基づき得られた反応曲線の傾きの図であり、(a)はGOT、(b)はGPT、(c)は γ -GTPの図である。

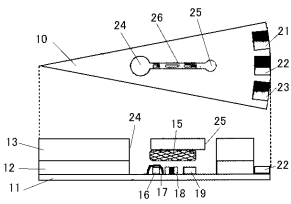
【符号の説明】

【0063】

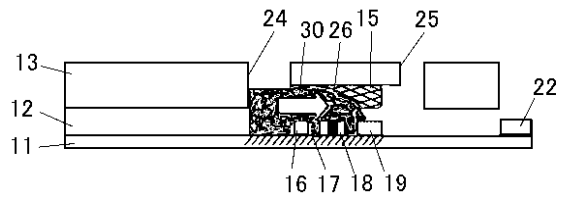
- | | | |
|----|------------|----|
| 10 | 微小分析装置 | 40 |
| 11 | ガラス基板 | |
| 12 | ポリイミド絶縁層 | |
| 13 | P D M S 基板 | |
| 16 | 作用極 | |
| 17 | 酵素担持膜 | |
| 18 | 参照極 | |
| 19 | 対極 | |
| 21 | 作用極パッド部 | |
| 22 | 対極パッド部 | |
| 23 | 参照極パッド部 | 50 |

- 2 4 注入開口部
- 2 5 排出開口部
- 2 6 微小流路
- 3 0 試料液
- 3 1 ガラスウエハ
- 3 2 P D M S 円盤基板
- 3 3 微小流路パターン

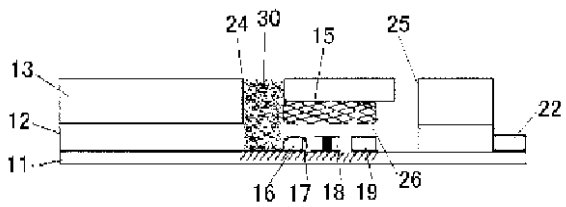
【 図 1 】



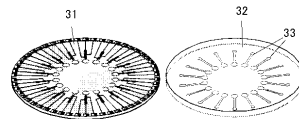
【 図 3 】



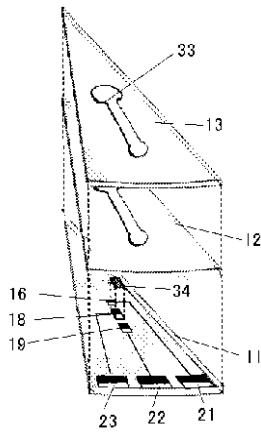
【 図 2 】



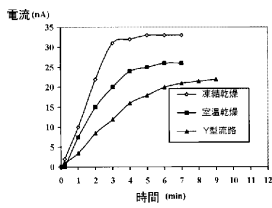
【 図 4 】



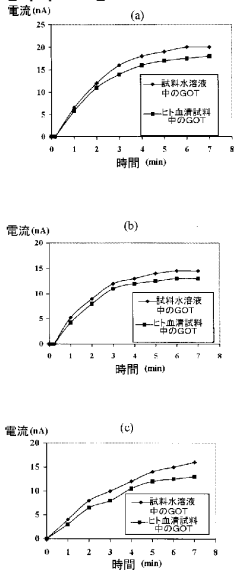
【 図 5 】



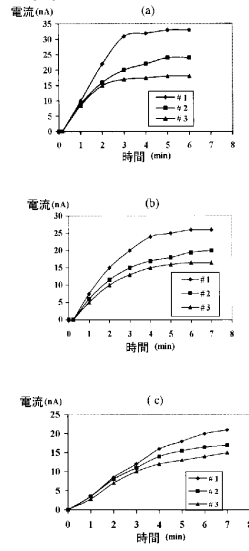
【 図 6 】



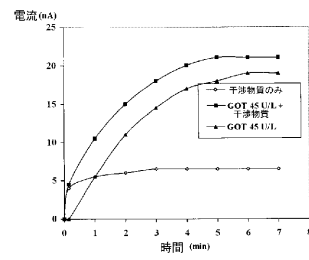
【 図 8 】



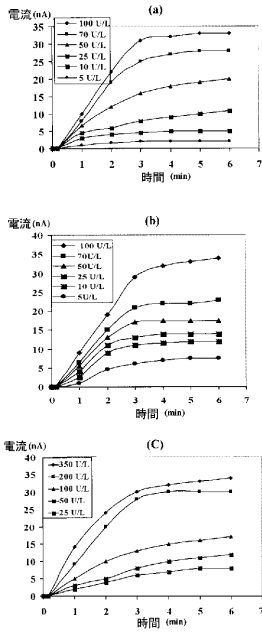
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

