

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/199741

発行日 平成30年3月22日 (2018. 3. 22)

(43) 国際公開日 平成28年12月15日 (2016. 12. 15)

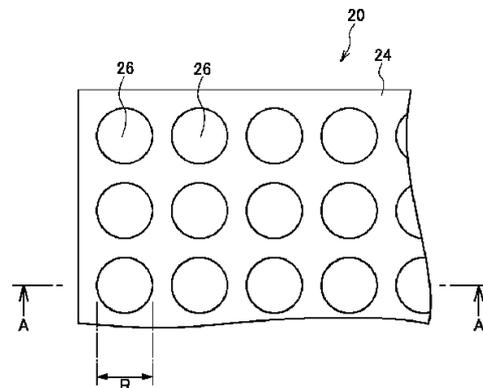
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
B 8 1 B 7/04 (2006.01)	B 8 1 B 7/04	2 G 0 4 5
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 2	3 C 0 8 1
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	4 G 0 7 5
B 0 1 J 19/00 (2006.01)	B 0 1 J 19/00 3 2 1	
G 0 1 N 33/544 (2006.01)	G 0 1 N 33/544 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)		

出願番号 特願2017-523637 (P2017-523637)	(71) 出願人 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
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/066834	
(22) 国際出願日 平成28年6月7日 (2016. 6. 7)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-116045 (P2015-116045)	(74) 代理人 230104019 弁護士 大野 聖二
(32) 優先日 平成27年6月8日 (2015. 6. 8)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100149076 弁理士 梅田 慎介
	(72) 発明者 渡邊 力也 東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法 人東京大学 工学研究科内
	(72) 発明者 野地 博行 東京都文京区本郷7-3-1 国立大学法 人東京大学 工学研究科内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高密度微小チャンバーアレイおよびこれを用いた測定方法

(57) 【要約】

透光性を有する平坦な基板と、複数の微小チャンバーが設けられた疎水層と、複数の微小チャンバーの開口部に形成された脂質二重膜とを備え、それぞれの微小チャンバー内に電極が設けられており、基板において、疎水層が設けられている側を上方とすると、下記A)およびB)の少なくともいずれか一方を満たすことにより、基板の下方から基板へと入射した光が基板を透過して微小チャンバーの内部へと進入し、かつ、微小チャンバーの内部から基板へと入射した光が基板を透過して基板の下方へと脱出するように構成されている。A) 電極が、それぞれの微小チャンバーの内側面に設けられている。B) 電極が、それぞれの微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

透光性を有する平坦な基板と、

前記基板上に設けられ疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンバーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、前記微小チャンバーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層と、

試験用液体が満たされた状態の前記複数の微小チャンバーの開口部に前記試験用液体を封止するように形成された脂質二重膜とを備え、

それぞれの前記微小チャンバー内に電極が設けられており、

前記基板において、前記疎水層が設けられている側を上方とするとき、

下記 A) および B) の少なくともいずれか一方を満たすことにより、前記基板の下方から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記微小チャンバーの内部へと進入し、かつ、前記微小チャンバーの内部から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記基板の下方へと脱出するように構成されている、

高密度微小チャンバーアレイ。

A) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの内側面に設けられている。

B) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。

【請求項 2】

前記電極が金属であって、それぞれの前記微小チャンバーの内側面に設けられている、請求項 1 に記載の高密度微小チャンバーアレイ。

【請求項 3】

前記金属がクロムである、請求項 2 に記載の高密度微小チャンバーアレイ。

【請求項 4】

前記微小チャンバーの内部に、生体高分子が集積されている、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の高密度微小チャンバーアレイ。

【請求項 5】

さらに、前記脂質二重膜の上方に反対電極を備える、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の高密度微小チャンバーアレイ。

【請求項 6】

前記微小チャンバーが形成された面が底面となる液体流路を備える、

請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の高密度微小チャンバーアレイ。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の高密度微小チャンバーアレイと、

前記電極と前記反対電極との間に電圧を印加する電圧印加装置とを備える、

高密度微小チャンバーアレイシステム。

【請求項 8】

請求項 2 または 3 に記載の高密度微小チャンバーアレイと、

前記電極内を前記基板と平行に電流を流すことで前記電極を発熱させる電流印加装置とを備える、

高密度微小チャンバーアレイシステム。

【請求項 9】

さらに、前記脂質二重膜の上方に設けられた反対電極と、

前記電極と前記反対電極との間に電圧を印加する電圧印加装置とを備える、

請求項 8 に記載の高密度微小チャンバーアレイシステム。

【請求項 10】

透光性を有する平坦な基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンバーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、前記微小チャンバーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層とを備え、それぞれの前記微小チャンバー内に電極が設けられており、前記基板において、前記

10

20

30

40

50

疎水層が設けられている側を上方とすると、下記 A) および B) の少なくともいずれか一方を満たすことにより、前記基板の下方から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記微小チャンバーの内部へと進入し、かつ、前記微小チャンバーの内部から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記基板の下方へと脱出するように構成されている、高密度微小チャンバーアレイを用意し、

前記複数の微小チャンバーの開口部に脂質二重膜を形成し、ここで前記脂質二重膜は膜タンパク質を保持するものであり、

前記電極と前記脂質二重膜の上方に設けられた反対電極との間に電圧を印加することで前記膜タンパク質の性質を変化させる、

膜タンパク質の解析方法。

10

A) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの内側面に設けられている。

B) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。

【請求項 1 1】

透光性を有する平坦な基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンバーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、前記微小チャンバーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層とを備え、それぞれの前記微小チャンバー内に電極が設けられており、前記基板において、前記疎水層が設けられている側を上方とすると、下記 A) および B) の少なくともいずれか一方を満たすことにより、前記基板の下方から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記微小チャンバーの内部へと進入し、かつ、前記微小チャンバーの内部から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記基板の下方へと脱出するように構成されている、高密度微小チャンバーアレイを用意し、

20

前記電極に電圧を印加することで、前記複数の微小チャンバーの内部に生体高分子を集積し、その後、

前記複数の微小チャンバーの開口部に前記生体高分子を封止するように脂質二重膜を形成する、方法。

A) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの内側面に設けられている。

B) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。

30

【請求項 1 2】

請求項 2 または 3 に記載の高密度微小チャンバーアレイを用意し、

前記電極に電流を流すことで前記電極を発熱させることで、前記微小チャンバー内に封止された前記試験用液体の温度を制御する、方法。

【請求項 1 3】

請求項 5 に記載の高密度微小チャンバーアレイを用意し、

前記電極と前記反対電極との間に電流を印加することにより前記脂質二重膜に細胞を融合させることで、前記細胞由来の膜タンパク質を前記脂質二重膜へと移行させる、方法。

【請求項 1 4】

前記高密度微小チャンバーアレイを用意するステップは、前記脂質二重膜の上方に反対電極を設けるステップを含み、

40

前記膜タンパク質は、前記電極と前記反対電極との間に電流を印加することにより前記脂質二重膜に細胞を融合させることで前記脂質二重膜へと導入された、前記細胞由来の膜タンパク質である、請求項 1 0 に記載の膜タンパク質の解析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高密度微小チャンバーアレイおよびこれを用いた測定方法に関する。

50

【背景技術】

【0002】

特許文献1は、平坦な基板と、基板の表面に疎水性の物質により規則的に高密度に配列するよう形成された容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下の複数の微小チャンパーと、試験用水溶液が満たされた状態の複数の微小チャンパーの開口部に試験用水溶液を液封するよう形成された脂質二重膜とを備える高密度微小チャンパーアレイを開示する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開第2015-040754号

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記従来の高密度微小チャンパーアレイを基礎として、その応用技術の開発が望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0005】

第1の側面にかかる高密度微小チャンパーアレイは、透光性を有する平坦な基板と、前記基板上に設けられ疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンパーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、前記微小チャンパーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層と、試験用液体が満たされた状態の前記複数の微小チャンパーの開口部に前記試験用液体を封止するように形成された脂質二重膜とを備え、それぞれの前記微小チャンパー内に電極が設けられており、前記基板において、前記疎水層が設けられている側を上方とすると、下記A)およびB)の少なくともいずれか一方を満たすことにより、前記基板の下方から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記微小チャンパーの内部へと進入し、かつ、前記微小チャンパーの内部から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記基板の下方へと脱出するように構成されている。

20

A) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンパーの内側面に設けられている。

B) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンパーの底面に透明電極として設けられている。

30

【0006】

第2の側面にかかる膜タンパク質の解析方法は、透光性を有する平坦な基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンパーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、前記微小チャンパーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層とを備え、それぞれの前記微小チャンパー内に電極が設けられており、前記基板において、前記疎水層が設けられている側を上方とすると、下記A)およびB)の少なくともいずれか一方を満たすことにより、前記基板の下方から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記微小チャンパーの内部へと進入し、かつ、前記微小チャンパーの内部から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記基板の下方へと脱出するように構成されている、高密度微小チャンパーアレイを用意し、前記複数の微小チャンパーの開口部に脂質二重膜を形成し、ここで前記脂質二重膜は膜タンパク質を保持するものであり、前記電極と前記脂質二重膜の上方に設けられた反対電極との間に電圧を印加することで前記膜タンパク質の性質を変化させる。

40

A) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンパーの内側面に設けられている。

B) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンパーの底面に透明電極として設けられている。

【0007】

第3の側面にかかる方法は、透光性を有する平坦な基板と、前記基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンパーの開口部が該層の主面上に規則的か

50

つ高密度に配列するよう設けられ、前記微小チャンバーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層とを備え、それぞれの前記微小チャンバー内に電極が設けられており、前記基板において、前記疎水層が設けられている側を上方とすると、下記 A) および B) の少なくともいずれか一方を満たすことにより、前記基板の下方から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記微小チャンバーの内部へと進入し、かつ、前記微小チャンバーの内部から前記基板へと入射した光が前記基板を透過して前記基板の下方へと脱出するように構成されている、高密度微小チャンバーアレイを用意し、前記電極に電圧を印加することで、前記複数の微小チャンバーの内部に生体高分子を集積し、その後、前記複数の微小チャンバーの開口部に前記生体高分子を封止するように脂質二重膜を形成する。

10

A) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの内側面に設けられている。

B) 前記電極が、それぞれの前記微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。

【発明の効果】

【0008】

高密度微小チャンバーアレイの応用技術が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイの概略構成の一例を示す平面図である。

20

【図2】図2は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイの図1における A-A 断面および該断面の一部を拡大して示す図である。

【図3】図3は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイシステムの一例を示す概念図である。

【図4】図4は、第1実施形態の変形例にかかる高密度微小チャンバーアレイの概略構成を示す平面図である。

【図5】図5は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイの製造方法の一例を示す工程図である。

【図6】図6は、第1実施形態における微小チャンバーデバイスの形成（工程 S100）の一例を示す工程図である。

30

【図7】図7は、第1実施形態における脂質二重膜の形成（工程 S120）の一例を示す工程図である。

【図8A】図8Aは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、基板を用意する工程を示す図である。

【図8B】図8Bは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、基板上に電極層を形成する工程を示す図である。

【図8C】図8Cは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、電極層上に物質膜を形成する工程を示す図である。

【図8D】図8Dは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、物質膜上にレジストを形成する工程を示す図である。

40

【図8E】図8Eは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、レジストをパターニングする工程を示す図である。

【図8F】図8Fは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、パターニングされたレジストをマスクとして物質膜をエッチングする工程を示す図である。

【図8G】図8Gは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、レジストを除去する工程を示す図である。

【図8H】図8Hは、第1実施形態の微小チャンバーデバイスの形成において、パターニングされた物質膜をマスクとして電極層をエッチングする工程を示す図である。

【図9A】図9Aは、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイでの脂質二重膜の形成において、試験用液体で液体流路を満たす工程を示す図である。

50

【図 9 B】図 9 B は、第 1 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイでの脂質二重膜の形成において、脂質を含有する有機溶媒を導入する工程を示す図である。

【図 9 C】図 9 C は、第 1 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイでの脂質二重膜の形成において、膜形成用液体を導入する工程を示す図である。

【図 1 0】図 1 0 は、第 1 実験例における、印加電圧（破線）と蛍光強度（実線）の変化を示す図である。

【図 1 1】図 1 1 は、第 2 実験例における、蛍光強度の時間変化と膜電位との関係を示す図である。

【図 1 2】図 1 2 は、第 2 実験例における、F 型 ATP 合成酵素のプロトン輸送速度（縦軸）と膜電位の大きさ（横軸）との関係を示す図である。

10

【図 1 3】図 1 3 は、第 2 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイシステムの概略構成の一例を示す図である。

【図 1 4】図 1 4 は、第 3 実施形態において生体高分子が集積された高密度微小チャンパーアレイの概略構成の一例を示す図である。

【図 1 5】図 1 5 は、第 3 実施形態における生体高分子集積高密度微小チャンパーアレイの製造方法の一例を示す工程図である。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、第 4 実施形態の脂質二重膜へと細胞を融合させる方法において、液体流路に細胞を導入する工程を示す図である。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、第 4 実施形態の脂質二重膜へと細胞を融合させる方法において、細胞が脂質二重膜へと融合された状態を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

脂質二重膜を介して生じる種々の生体分子反応、例えば膜輸送過程や膜透過反応、膜表面での酵素反応などでは、反応生成物の拡散に長時間かかることや、酵素活性に伴った物質濃度の変化は極めて緩やかであることなどから、脂質二重膜を介して生じる種々の生体分子反応を高感度に検出することが困難となりやすい。チャンパーの容量が大きいとチャンパー内の濃度変化が小さくなり、濃度変化としての検出が困難となる。チャンパー数が少ないと、生体分子の反応が極めて遅いために、全てのチャンパーで反応が生じない場合が生じ、検出が困難となる。したがって、脂質二重膜により液封された極めて容量が小さな多数の微小チャンパーが高密度で形成された高密度微小チャンパーアレイが必要となる。特許文献 1 は、かかる高密度微小チャンパーアレイを開示する。しかしながら、その応用技術については未検討の部分があった。

30

【0011】

発明者は、従来高密度微小チャンパーアレイの応用技術を見出すべく、鋭意検討した。その結果、以下の知見を得た。なお、以下の知見はあくまで本発明をなすきっかけとなったものであり、本発明を限定するものではない。

【0012】

すなわち、上記高密度微小チャンパーアレイが開発されたことにより、膜タンパクによる膜横断型の物質輸送等の計測が効率的に実施可能となった。ところで、膜タンパクの活性は膜電位の影響を受ける場合がある。生体内では、イオンの能動輸送により膜電位が積極的に制御され、これにより膜タンパクの活性が調節されている場合もある。高密度微小チャンパーアレイに形成した脂質二重膜において膜電位を制御することができれば、膜タンパクの性質をより詳細に解明できる可能性がある。しかしながら、従来高密度微小チャンパーアレイでは膜電位の制御ができなかった。

40

【0013】

かかる洞察に基づき、発明者は、従来高密度微小チャンパーアレイにおいて、チャンパー内部に電極を形成することで、脂質二重膜の膜電位を制御しうることに想到した。電極を用いて膜電位を制御することで、膜タンパクの性質が膜電位によってどのように変化するかを測定することが可能となった。

【0014】

50

電極をチャンパー内部に設けることは、従来の高密度微小チャンパーアレイについてのさらなる応用面も切り拓くことになった。すなわち、電極に電流を印加することで発熱させれば、チャンパーの温度を制御することが可能になる。電極を用いて電場を発生させることにより、生体高分子等をチャンパー内部に誘引して集積することも可能になる。細胞表面の膜タンパクをチャンパーに張られた脂質二重膜に移行させるには、細胞融合の技術を用いることが可能である。

【0015】

基板等は透光性を有するように構成する。基板の下方から基板へと入射した光が基板を透過して微小チャンパーの内部へと進入し、かつ、微小チャンパーの内部から基板へと入射した光が基板を透過して基板の下方へと脱出するように構成することで、微小チャンパー内の反応を効果的に検出することができる。

10

【0016】

以下、添付図面を参照しつつ、本発明の実施形態について説明する。なお、以下の実施形態はあくまで一例であり、本発明を限定するものではない。

【0017】

以下で説明する実施形態は、いずれも本発明の望ましい一具体例を示すものである。以下の実施形態で示される数値、形状、材料、構成要素、構成要素の配置位置及び接続形態、ステップ、ステップの順序などは、あくまで一例であり、本発明を限定するものではない。また、以下の実施形態における構成要素のうち、本発明の最上位概念を示す独立請求項に記載されていない構成要素については、より望ましい形態を構成する任意の構成要素として説明される。また、図面において、同じ符号が付いたものは、説明を省略する場合がある。また、図面は理解しやすくするために、それぞれの構成要素を模式的に示したもので、形状及び寸法比等については正確な表示ではない場合がある。また、製造方法においては、必要に応じて、各工程の順序等が変更されてもよいし、他の工程が追加されてもよい。

20

【0018】

(第1実施形態)

第1実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイは、透光性を有する平坦な基板と、基板上に設けられ疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンパーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、微小チャンパーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層と、試験用液体が満たされた状態の複数の微小チャンパーの開口部に試験用液体を封止するように形成された脂質二重膜とを備え、それぞれの微小チャンパー内に電極が設けられており、基板において、疎水層が設けられている側を上方とするとき、下記A)およびB)の少なくともいずれか一方を満たすことにより、基板の下方から基板へと入射した光が基板を透過して微小チャンパーの内部へと進入し、かつ、微小チャンパーの内部から基板へと入射した光が基板を透過して基板の下方へと脱出するように構成されている。

30

A) 電極が、それぞれの微小チャンパーの内側面に設けられている。

B) 電極が、それぞれの微小チャンパーの底面に透明電極として設けられている。

【0019】

上記高密度微小チャンパーアレイは、さらに、脂質二重膜の上方に反対電極を備えてもよい。

40

【0020】

上記高密度微小チャンパーアレイは、さらに、微小チャンパーが形成された面が底面となる液体流路を備えてもよい。

【0021】

上記液体流路は、疎水層の上面と、疎水層の上方に配置された天井の下面との間に形成されてもよい。天井は、ガラス板で構成されていてもよい。

【0022】

第1実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイシステムは、上記高密度微小チャン

50

バーアレイと、電極と反対電極との間に電圧を印加する電圧印加装置とを備える。

【0023】

第1実施形態にかかる膜タンパク質の解析方法は、透光性を有する平坦な基板と、基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンバーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、微小チャンバーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層とを備え、それぞれの微小チャンバー内に電極が設けられており、基板において、疎水層が設けられている側を上方とすると、下記A)およびB)の少なくともいずれか一方を満たすことにより、基板の下方から基板へと入射した光が基板を透過して微小チャンバーの内部へと進入し、かつ、微小チャンバーの内部から基板へと入射した光が基板を透過して基板の下方へと脱出するように構成されている、高密度微小チャンバーアレイを用意し、複数の微小チャンバーの開口部に脂質二重膜を形成し、ここで脂質二重膜は膜タンパク質を保持するものであり、電極と脂質二重膜の上方に設けられた反対電極との間に電圧を印加することで膜タンパク質の性質を変化させる。

10

A) 電極が、それぞれの微小チャンバーの内側面に設けられている。

B) 電極が、それぞれの微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。

【0024】

[装置構成]

図1は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイの概略構成の一例を示す平面図である。図2は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイの図1におけるA-A断面および該断面の一部を拡大して示す図である。以下、図1および図2を参照しつつ、第1実施形態の高密度微小チャンバーアレイ20の装置構成について説明する。

20

【0025】

図1および図2に例示されるように、高密度微小チャンバーアレイ20は、基板22と、疎水層24と、脂質二重膜30と、電極23とを備えている。

【0026】

基板22は、透光性を有し、かつ平坦である。基板22は、例えばガラス、アクリル樹脂等で構成される。基板22の材料、厚み、および形状等は、基板22の下方から基板22へと入射した光が基板22を透過して微小チャンバー26の内部へと進入し、かつ、微小チャンバー26の内部から基板22へと入射した光が基板22を透過して基板22の下方へと脱出可能であれば特に限定されない。具体的には例えば、厚みは、0.1mm以上5mm以下であってもよいし、0.3mm以上3mm以下であってもよいし、0.7mm以上1.5mm以下であってもよい。平面視における基板22の大きさは特に限定されない。

30

【0027】

疎水層24は、基板22上に設けられ疎水性物質からなる層である。疎水性物質としては、例えばフッ素樹脂などの疎水性の樹脂、およびガラスなどの樹脂以外の物質が含まれる。疎水層24の厚みは、後述する微小チャンバーの容積に応じて適宜に調整される。具体的には例えば、10nm以上100 μm 以下であってもよいし、100nm以上5 μm 以下であってもよいし、250nm以上1 μm 以下であってもよい。

【0028】

疎水層24には、複数の微小チャンバー26の開口部が、疎水層24の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられている。微小チャンバー26の容量は $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下($4000 \mu\text{m}^3$ 以下)である。微小チャンバー26の容量は、例えば、 $0.1 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以上 $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下であってもよいし、 $0.5 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以上 $400 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下であってもよいし、 $1 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以上 $40 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下であってもよい。

40

【0029】

図1および図2に示すように、微小チャンバー26は、筒状の形状をなしてもよい。図1および図2に示すように、微小チャンバー26は、基板22が底面をなし、疎水層24(または、疎水層24および電極23)が側面をなす、筒状の形状をなしてもよい。

50

【0030】

微小チャンパー26の容量を $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下としているから、第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイ20を生体分子反応の検出に用いることにより、微小チャンパー26内の生体分子数を少なくすることができる。この結果、生体分子1個の反応によるチャンパー内の濃度変化を大きくし、濃度変化として検出する際の検出感度を高くすることができ、生体分子の反応が極めて遅くても、生体分子の反応を高感度で検出することができる。また、こうした微小な微小チャンパー26を高密度に多数形成したアレイとしているから、生体分子の反応が生じる頻度が低くても、いずれかのチャンパーで反応が生じるため、生体分子の反応を高感度で検出することができる。ここで、微小チャンパー26の容量は、試験対象の生体分子の反応速度の大きさや生体分子の含有率などにより定められるものであり、生体分子の反応速度の大きさが大きいものであれば $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下とするのが好適であり、生体分子の反応速度の大きさが小さいとき等には、 $1000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下や $100 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下としてもよい。

10

【0031】

微小チャンパー26の深さは、例えば、 10 nm 以上 $100 \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、 100 nm 以上 $5 \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、 250 nm 以上 $1 \mu\text{m}$ 以下であってもよい。

【0032】

微小チャンパー26の開口部は、例えば円形とすることができる。円形とする場合の円の直径は、例えば、 $0.1 \mu\text{m}$ 以上 $100 \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、 $0.5 \mu\text{m}$ 以上 $50 \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、 $1 \mu\text{m}$ 以上 $10 \mu\text{m}$ 以下であってもよい。

20

【0033】

規則的とは、例えば、基板の厚み方向から見て、各チャンパーが基板上に、格子状、マトリクス状、千鳥状等に配列することを言う。規則的とは、例えば、各チャンパーが複数の列をなすように一定間隔で配列されていることを意味しうる。

【0034】

高密度とは、例えば、 1 mm^2 あたりのチャンパーの数が、 0.1×10^3 個以上 2000×10^3 個以下であってもよいし、 1×10^3 個以上 1000×10^3 個以下であってもよいし、 5×10^3 個以上 100×10^3 個以下であってもよい。 1 cm^2 ($1 \times 10^{-4} [\text{m}^2]$)あたりに換算すると、 10×10^3 個以上 200×10^6 個以下であってもよいし、 100×10^3 個以上 100×10^6 個以下であってもよいし、 0.5×10^6 個以上 10×10^6 個であってもよい。

30

【0035】

高密度微小チャンパーアレイ20において、複数の微小チャンパー26は、深さが $100 \mu\text{m}$ 以下で、円形に換算したときに直径が $100 \mu\text{m}$ 以下となるよう形成されているものとしたり、深さが $2 \mu\text{m}$ 以下で、円形に換算したときに直径が $10 \mu\text{m}$ 以下となるよう形成されているものとしたり、深さが $1 \mu\text{m}$ 以下で、円形に換算したときに直径が $5 \mu\text{m}$ 以下となるよう形成されているものとしたりすることもできる。こうすれば、基板20の表面に疎水性物質および電極層による薄膜を形成し、薄膜に複数の微小チャンパー26を形成する手法を用いて高密度微小チャンパーアレイ20を形成することができ、高密度微小チャンパーアレイ20を比較的容易に形成することができる。

40

【0036】

微小チャンパー26は、それぞれ厚さが 500 nm を含む所定厚範囲の疎水性物質および電極層による薄膜に、円形に換算したときに直径が $1 \mu\text{m}$ を含む所定直径範囲となるよう形成されているものとすることもできる。試験対象の生体分子の反応速度の大きさや生体分子の含有率を考慮すると共に製造の容易さも考慮すると、微小チャンパー26の深さや直径は数百 nm から数 μm が好適であると考えられる。ここで、「所定厚範囲」は、例えば、 500 nm の 0.1 倍の 50 nm 以上で 500 nm の 10 倍の $5 \mu\text{m}$ 以下の範囲としたり、 500 nm の 0.5 倍の 250 nm 以上で 500 nm の 2 倍の $1 \mu\text{m}$ 以下の範囲としたりすることができる。「所定直径範囲」は、例えば、 $1 \mu\text{m}$ の 0.1 倍の 100 n

50

m以上で1 μmの10倍の10 μm以下の範囲としたり、1 μmの0.5倍の500 nm以上で1 μmの2倍の2 μm以下の範囲としたりすることができる。

【0037】

「所定厚範囲」は、特に限定されない。例えば、10 nm以上500 nm以下であってもよいし、20 nm以上500 nm以下であってもよいし、30 nm以上500 nm以下であってもよい。「所定厚範囲」は、例えば、10 nm以上100 nm以下であってもよいし、20 nm以上100 nm以下であってもよいし、30 nm以上100 nm以下であってもよい。微小チャンパーの深さを小さく(数十nm)し、微小チャンパーの容積を小さく(数百aL程度)すると、測定感度は更に向上する(Soga, N. et al., 2015, Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, Scientific Reports, 5:11025)。

10

【0038】

一例において、それぞれの微小チャンパー26は、厚さDが1 μmの疎水層24と電極23に、直径Rが5 μmとなるよう形成されている。したがって、それぞれの微小チャンパー26の容量Lは、 $L = (2.5 \times 10^{-6})^2 \times 1 \times 10^{-6} [m^3] = 19.6 \times 10^{-18} [m^3]$ となる。仮に微小チャンパー26を縦横2 μmの間隔で配列したものとすると、1つの微小チャンパー26に必要な面積Sは一辺が7 μmの正方形となり、 $S = (7 \times 10^{-6})^2 [m^2] = 49 \times 10^{-12} [m^2]$ と計算される。したがって、ガラス基板22には、 $1 cm^2 (1 \times 10^{-4} [m^2])$ 当たり約 2×10^6 個(1平方mm当たり 20×10^3 個)の微小チャンパー26が形成されることになる。

20

【0039】

脂質二重膜30は、試験用液体が満たされた状態の複数の微小チャンパー26の開口部に試験用液体を封止するように形成されている。試験用液体は、脂質二重膜30を形成可能な液体であれば特に限定されないが、具体的には例えば水溶液とすることができる。

【0040】

脂質二重膜30は、脂質の親水基が微小チャンパー26側(図2中、下側)に向いた第1脂質膜32と、脂質の疎水基が微小チャンパー26側(図2中、下側)に向いた第2脂質膜34とが、疎水基が内側になるように重なるように形成されている。第1脂質膜32や第2脂質膜34を構成する脂質としては、大豆や大腸菌由来等の天然脂質、DOPE(ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)やDOPG(ジオレオイルホスファチジ

30

【0041】

脂質二重膜30は、膜タンパク質が再構成されているものとすることもできる。こうすれば、高密度微小チャンパーアレイ20を、種々の膜タンパク質を介しての生体分子反応等の検出に用いることができる。膜タンパク質を脂質二重膜30に再構成する方法については後述する。

【0042】

電極23は、それぞれの微小チャンパー26の内部に設けられている。各電極23は互いに電氣的に接続されていてもよい。基板22において、疎水層24が設けられている側を上方とするとき、以下のA)およびB)の少なくともいずれか一方を満たす。A)およびB)の両方を満たしてもよい。

40

A) 電極23が、それぞれの微小チャンパー26の内側面に設けられている。

B) 電極23が、それぞれの微小チャンパー26の底面に透明電極として設けられている。

【0043】

上記A、すなわち電極が微小チャンパーの内側面に設けられている構成を採用した場合には、上記Bのように透明電極を採用した場合に比べ、底面を通過する光の減衰が少なくなり、測定感度が向上する。上記Bにおいて透明電極表面の親水性が低い場合には、微小チャンパーからの液体の抜け出しが問題となりうるが、上記Aのように電極を微小チャンパーの内側面に設ける場合には、かかる問題が軽減されうる。

50

【0044】

図2に示す例では、電極23が、それぞれの微小チャンバー26の内側面に設けられている。電極23は、金属で構成されていてもよい。金属としては、例えば、銅、銀、金、白金、アルミ、クロム、塩化銀等を用いることができる。電極23は、金属以外の材料で構成されていてもよい。具体的には例えば、ITO (Indium - Tin - Oxide : 酸化インジウムスズ)、IZO (酸化インジウムスズと酸化亜鉛とからなる材料)、ZnO、IGZO (インジウム、ガリウム、亜鉛、酸素から構成される材料) 等で構成されていてもよい。

【0045】

電極23の厚みは、例えば、10nm以上100 μ m以下であってもよいし、100nm以上5 μ m以下であってもよいし、250nm以上1 μ m以下であってもよい。

10

【0046】

かかる構成において、基板22の下方から基板22へと入射した光は、基板22を透過して微小チャンバー26の内部へと進入し、かつ、微小チャンバー26の内部から基板22へと入射した光は、基板22を透過して基板22の下方へと脱出する。

【0047】

電極23を用いて電圧を印加することで、微小チャンバー26内の反応を促進することが可能である。よって、高密度微小チャンバーアレイ20を、検査装置および培養装置等に応用することもできる。

【0048】

図3は、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイシステムの一例を示す概念図である。図3に示す変形例では、高密度微小チャンバーアレイ20Aが、高密度微小チャンバーアレイ20の構成に加え、脂質二重膜30の上方に反対電極27を備えている。以下、図3を参照しつつ、第1実施形態にかかる高密度微小チャンバーアレイシステム100について説明する。

20

【0049】

図3に例示されるように、高密度微小チャンバーアレイシステム100は、基板22と、疎水層24と、脂質二重膜30と、電極23と、反対電極27と、電圧印加装置28とを備えている。基板22と、疎水層24と、脂質二重膜30と、電極23については、上述した通りであるので、詳細な説明を省略する。

30

【0050】

反対電極27は、脂質二重膜30の上方に設けられた電極である。反対電極27は、複数の微小チャンバー26に跨るように設けられていてもよい。反対電極27は、全ての微小チャンバー26に跨るように設けられていてもよい。反対電極27は、基板22の厚み方向から見た大きさおよび形状が、基板22と略一致していてもよい。反対電極27は、金属で構成されていてもよい。金属としては、例えば、銅、銀、金、アルミ、クロム等を用いることができる。基板22から反対電極27までの距離は、例えば、1 μ m以上10mm以下であってもよいし、2 μ m以上1mm以下であってもよいし、10 μ m以上100 μ m以下であってもよい。

【0051】

反対電極27は、それぞれの微小チャンバー26に対応するように設けられていてもよい。具体的には例えば、本実施形態にかかる微小チャンバーデバイス(図1、図2参照)を一对、微小チャンバーの開口部が互いに向き合うように張り合わせる場合において、一方の微小チャンバーデバイスの電極が電極23となり、他方の微小チャンバーデバイスの電極が反対電極27とされてもよい。

40

【0052】

電圧印加装置28は、電極23と反対電極27との間に電圧を印加する。電圧印加装置28は、例えば、直流電圧を印加するものであってもよい。電圧印加装置28としては、具体的には例えば、ファンクションジェネレーター(例えば、株式会社エヌエフ回路設計ブロック製)を用いることができる。

50

【 0 0 5 3 】

電極 2 3 と反対電極 2 7 との間に電圧を印加することで、微小チャンパー 2 6 内の反応を促進することが可能である。よって、高密度微小チャンパーアレイシステム 1 0 0 を、検査装置および培養装置等に応用することもできる。

【 0 0 5 4 】

[変形例]

図 4 は、第 1 実施形態の変形例にかかる高密度微小チャンパーアレイの概略構成を示す平面図である。以下、図 4 を参照しつつ、変形例にかかる高密度微小チャンパーアレイ 2 0 B について説明する。

【 0 0 5 5 】

図 4 に示す例において、高密度微小チャンパーアレイ 2 0 B は、基板 2 2 と、疎水層 2 4 と、脂質二重膜 3 0 と、電極 2 3 T とを備えている。基板 2 2 と、疎水層 2 4 と、脂質二重膜 3 0 とについては、上述した通りであるので、詳細な説明を省略する。

【 0 0 5 6 】

電極 2 3 T は、それぞれの微小チャンパー 2 6 の底面に透明電極として設けられている。図 4 に示す例では、電極 2 3 T は、基板 2 2 の全面を覆うように構成されている。電極 2 3 T としては、ITO (Indium - Tin - Oxide : 酸化インジウムスズ)、IZO (酸化インジウムスズと酸化亜鉛とからなる材料)、ZnO、IGZO (インジウム、ガリウム、亜鉛、酸素から構成される材料) 等で構成される。

【 0 0 5 7 】

かかる構成でも、基板 2 2 の下方から基板 2 2 へと入射した光は、基板 2 2 および電極 2 3 T を透過して微小チャンパー 2 6 の内部へと進入し、かつ、微小チャンパー 2 6 の内部から電極 2 3 T および基板 2 2 へと入射した光は、電極 2 3 T および基板 2 2 を透過して基板 2 2 の下方へと脱出する。

【 0 0 5 8 】

本変形例において、電極 2 3 T の厚さは、基板 2 2 の下方から基板 2 2 へと入射した光が基板 2 2 を透過して微小チャンパー 2 6 の内部へと進入し、かつ、微小チャンパー 2 6 の内部から基板 2 2 へと入射した光が基板 2 2 を透過して基板 2 2 の下方へと脱出可能であれば特に限定されない。

【 0 0 5 9 】

なお、微小チャンパー 2 6 の内側面に設けられた電極と、底面に透明電極として設けられた電極とを組み合わせることで 1 の電極として構成してもよい。具体的には例えば、図 1 に示す電極 2 3 と、図 4 に示す電極 2 3 T とを組み合わせることで 1 の電極としてもよい。

【 0 0 6 0 】

[製造方法]

以下、第 1 実施形態の高密度微小チャンパーアレイ 2 0 の製造方法について説明する。図 5 は、第 1 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイの製造方法の一例を示す工程図である。

【 0 0 6 1 】

第 1 実施形態の高密度微小チャンパーアレイ 2 0 は、まず、脂質二重膜 3 0 により開口部が液封されていない微小チャンパーデバイスを形成し (工程 S 1 0 0)、形成した微小チャンパーデバイスに試験用液体を導入し (工程 S 1 1 0)、試験用液体が各微小チャンパー 2 6 に満たされた状態で各微小チャンパー 2 6 の開口部を液封するように脂質二重膜 3 0 を形成して (工程 S 1 2 0)、完成する。微小チャンパーデバイスの形成 (工程 S 1 0 0) は、例えば図 6 に示す工程図により行なわれ、脂質二重膜 3 0 の形成 (工程 S 1 2 0) は、例えば図 7 に示す工程図により行なわれる。以下、微小チャンパーデバイスの形成について説明し、その後、脂質二重膜 3 0 の形成について説明する。

【 0 0 6 2 】

1 . 微小チャンパーデバイスの形成

微小チャンパーデバイスの形成工程は、例えば、基板 2 2 の表面に電極材料と疎水性物

10

20

30

40

50

質の薄膜を順次形成し、薄膜表面の複数の微小チャンバー26を形成する部分以外の部分にレジストを形成し、ドライエッチングにより疎水性物質の薄膜に複数の微小チャンバー26の一部を形成し、レジストを除去し、さらに疎水性物質の層をマスクとしたウエットエッチングにより電極材料の薄膜に複数の微小チャンバー26の残部を形成するものとする。こうすれば、高精度で比較的容易に高密度微小チャンバーアレイ20を製造することができる。なお、ドライエッチング以外の手法、例えばナノインプリンティングなどの手法を用いて疎水性物質の薄膜に複数の微小チャンバー26の一部を形成するものとしてもよいのは勿論である。

【0063】

図6は、第1実施形態における微小チャンバーデバイスの形成(工程S100)の一例を示す工程図(工程S200~S270)である。図8A~図8Hに微小チャンバーデバイスの形成の各工程の状態を示す。微小チャンバーデバイスの形成は、まず、ガラス基板22のガラス表面を洗浄するための表面処理として、10Mの水酸化カリウム(KOH)溶液にガラス基板22を24時間程度浸す(工程S200、図8A)。

10

【0064】

次に、ガラス基板22の表面に、真空蒸着装置を用いて金属を蒸着することで、電極層23aを形成する(工程S210、図8B)。金属の種類としては、例えば、銀、金、クロム等を用いることができる。厚みとしては、例えば、500nm程度とすることができる。

20

【0065】

次に、疎水性の物質(例えば、旭硝子株式会社製のフッ素樹脂(CYTOP))をスピコートして物質膜24aを形成し、物質膜24aを電極層23aの表面に密着させる(工程S220、図8C)。スピコートの条件としては、例えば、4000rpm(revolution per second)で30秒を用いることができ、この場合、物質膜24aは膜厚が約500nmとなる。物質膜24aの電極層23a表面への密着は、例えば、180のホットプレートで1時間バークすることにより行なうことができる。

30

【0066】

次に、物質膜24aの表面にレジスト25aをスピコートにより形成し、レジスト25aを物質膜24aの表面に密着させる(工程S230、図8D)。レジスト25aとしては、AZ Electronic Materials製のAZ-4903などを用いることができる。スピコートの条件としては、例えば、4000rpm(revolution per second)で60秒を用いることができる。レジスト25aの物質膜24aの表面への密着は、例えば、110のホットプレートで5分間バークして、レジスト25a内の有機溶媒を蒸発させることにより行なうことができる。

40

【0067】

次に、微小チャンバー26のパターンのマスクを用いてレジスト25aを露光し、レジスト専用の現像液に浸して現像して微小チャンバー26を形成する部分が除かれたレジスト25bを形成する(工程S240、図8E)。露光の条件は、例えば、SAN-EI製の露光機によりUV power 250Wで7秒照射する条件を用いることができる。現像の条件としては、例えば、AZ Electronic Materials製のAZ developerに5分浸す条件を用いることができる。

【0068】

次に、レジスト25bによりマスクされた物質膜24aをドライエッチングすることにより、物質膜24aから微小チャンバー26となる部分を取り除いた物質膜24bとし(工程S250、図8F)、レジスト25bを除去する(工程S260、図8G)。ドライエッチングは、例えば、Samco製のReactive ion etching装置で、エッチング条件として、O₂ 50sccm, Pressure 10Pa, Power 50W, Time 30minを用いることができる。レジスト25bの除去は、アセトンに浸し、イソプロパノールで洗浄した後に純水で洗浄することにより行なうことができる。

50

【0069】

次に、金属層 23a をウェットエッチングすることにより、微小チャンバー 26 を完成させる（工程 S 270、図 8H）。ウェットエッチングは、例えば、形成途中の微小チャンバーデバイスを金属エッチング液に浸漬した後で純水で洗浄することにより行なうことができる。

【0070】

かかる方法により、ガラス基板 22 の表面に疎水層 24 と電極 23 とにより複数の微小チャンバー 26 が形成された微小チャンバーデバイスが完成せらる。

【0071】

微小チャンバー 26 の形状や大きさは生体分子の反応速度の大きさなどにより適宜定めればよい。例えば、深さ D が $10\ \mu\text{m}$ で直径 R が $40\ \mu\text{m}$ となるように微小チャンバー 26 を形成したり、深さ D が $2\ \mu\text{m}$ で直径 R が $10\ \mu\text{m}$ となるように微小チャンバー 26 を形成したりしてもよい。実用的で実現可能な微小チャンバー 26 の最小のサイズとしては深さ D および直径 R がともに数 $100\ \text{nm}$ 程度のもと考えられる。また、試験対象の生体分子の反応速度の大きさや生体分子の含有率を考慮すると共に製造の容易さも考慮すると、微小チャンバー 26 の深さや直径は数百 nm から数 μm が実的に好適であると考えられる。したがって、微小チャンバー 26 を、深さが $500\ \text{nm}$ を含む所定深さ範囲で、円形に換算したときに直径が $1\ \mu\text{m}$ を含む所定直径範囲となるよう形成すればよい。

【0072】

「所定深さ範囲」としては、 $500\ \text{nm}$ を含むオーダーとして考えればよく、例えば、 $500\ \text{nm}$ の 0.1 倍の $50\ \text{nm}$ 以上で $500\ \text{nm}$ の 10 倍の $5\ \mu\text{m}$ 以下の範囲を用いたり、 $500\ \text{nm}$ の 0.5 倍の $250\ \text{nm}$ 以上で $500\ \text{nm}$ の 2 倍の $1\ \mu\text{m}$ 以下の範囲を用いればよい。

【0073】

「所定厚範囲」は、特に限定されない。例えば、 $10\ \text{nm}$ 以上 $500\ \text{nm}$ 以下であってもよいし、 $20\ \text{nm}$ 以上 $500\ \text{nm}$ 以下であってもよいし、 $30\ \text{nm}$ 以上 $500\ \text{nm}$ 以下であってもよい。「所定厚範囲」は、例えば、 $10\ \text{nm}$ 以上 $100\ \text{nm}$ 以下であってもよいし、 $20\ \text{nm}$ 以上 $100\ \text{nm}$ 以下であってもよいし、 $30\ \text{nm}$ 以上 $100\ \text{nm}$ 以下であってもよい。微小チャンバーの深さを小さく（数十 nm ）し、微小チャンバーの容積を小さく（数百 μL 程度）すると、測定感度は更に向上する（Soga, N. et al., 2015, Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, Scientific Reports, 5:11025）。

【0074】

「所定直径範囲」としては、 $1\ \mu\text{m}$ を含むオーダーとして考えればよく、例えば、 $1\ \mu\text{m}$ の 0.1 倍の $100\ \text{nm}$ 以上で $1\ \mu\text{m}$ の 10 倍の $10\ \mu\text{m}$ 以下の範囲を用いたり、 $1\ \mu\text{m}$ の 0.5 倍の $500\ \text{nm}$ 以上で $1\ \mu\text{m}$ の 2 倍の $2\ \mu\text{m}$ 以下の範囲を用いればよい。

【0075】

生体分子の反応に対する検出感度は、微小チャンバー 26 内の分子数に反比例するため、生体分子反応を高感度で検出するための実用的で実現可能な微小チャンバー 26 の最大の容量 L は $4000 \times 10^{-18} [\text{m}^3]$ 程度でよいと考えられる。例えば、深さが $5\ \mu\text{m}$ で直径 R が $30\ \mu\text{m}$ の微小チャンバー（容量 L が $3532.5 \times 10^{-18} [\text{m}^3]$ ）を形成して実験を行なったが、良好な生体分子の反応に対する検出感度を得ることができた。この場合、隣接する微小チャンバーの間隔を $4\ \mu\text{m}$ とすると、1つの微小チャンバーに必要な面積 S は一辺が $34\ \mu\text{m}$ の正方形となり、 $S = (34 \times 10^{-6})^2 [\text{m}^2] = 1156 \times 10^{-12} [\text{m}^2]$ と計算される。したがって、ガラス基板には、 $1\ \text{cm}^2$ （ $1 \times 10^{-4} [\text{m}^2]$ ）当たり約 0.86×10^5 個の微小チャンバーが形成されることになり、生体分子の反応が生じる頻度が低くても、いずれかの微小チャンバーで反応が生じるため、生体分子の反応を高感度で検出することができるものとなる。

【0076】

2. 脂質二重膜 30 の形成

脂質二重膜 30 の形成工程は、例えば、複数の微小チャンバー 26 が形成された面が略

10

20

30

40

50

水平な底面を形成する液体流路48に試験用液体を流すことにより複数の微小チャンバー26に試験用液体を充填し、液体流路48に脂質二重膜30を形成する脂質を含有する脂質含有有機溶媒を流すことにより脂質の親水基が複数の微小チャンバー26の試験用液体側に向いた状態の第1脂質膜32を微小チャンバー26の開口部に形成し、液体流路48に膜形成用液体を流すことにより脂質の疎水基が第1脂質膜32側に向いた状態の第2脂質膜34を第1脂質膜32に重ねるように形成することにより脂質二重膜30を形成するものである。

【0077】

図7は、第1実施形態における脂質二重膜30の形成(工程S120)の一例を示す工程図(工程S300~S310)である。図9A~9Cに脂質二重膜30の形成の各工程の状態を示す。脂質二重膜30の形成の前段階として、微小チャンバーデバイスにスペーサ42を介在させつつ、液体導入孔46が形成されたガラス板44を載せる。これにより、微小チャンバーデバイスの微小チャンバー26が形成された面が略水平な底面となる液体流路48が形成される。液体導入孔46から試験用液体を導入して試験用液体で液体流路48を満たしておく(図9A)。ここで、試験用液体の組成としては、例えば、水溶液とすることができ、具体的には例えば、10mMのpH緩衝液(pH5~9)と、20μMの蛍光指示薬(Cal520やpHrodoなど)と、10mMの塩化ナトリウムとを含有する液体など、種々のものを用いることができる。

10

【0078】

試験用液体で液体流路48が満たされた状態で液体導入孔46から脂質35を含有する有機溶媒を導入する(図7の工程S300、図9B)。ここで、脂質35としては、大豆や大腸菌由来等の天然脂質、DOPE(ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)やDOPG(ジオレオイルホスファチジルグリセロール)等の人工脂質を用いることができる。有機溶媒としては、ヘキサデカンやクロロホルムを用いることができる。脂質35を含有する有機溶媒が導入されると、微小チャンバー26に試験用液体が満たされた状態で、脂質35の親水基が微小チャンバー26側に向いた状態の第1脂質膜32により微小チャンバー26の開口部が液封される。

20

【0079】

そして、液体導入孔46から脂質二重膜30を形成するための膜形成用液体を導入して(図7の工程S310、図9C)、脂質二重膜30を形成する。膜形成用液体の組成としては、例えば、10mMのpH緩衝液(pH5~9)と、10mMの塩化ナトリウムとを含む液体を用いることができる。なお、第1実施形態の高密度微小チャンバーアレイ20は、脂質二重膜30を形成した後に、ガラス板44とスペーサ42を取り除くことにより完成する。

30

【0080】

脂質二重膜30の形成工程の後に、脂質二重膜30に膜タンパク質を再構成する再構成工程を備えるものとすることもできる。こうすれば、脂質二重膜30に膜タンパク質が再構成された高密度微小チャンバーアレイ20を得ることができる。こうした脂質二重膜30に膜タンパク質が再構成された高密度微小チャンバーアレイ20は、膜タンパク質を介しての生体分子反応等の検出に用いることができる。この態様とした場合、再構成工程は、膜タンパク質を含む細胞膜断片、タンパク質を埋め込んだ脂質二重膜、水溶性タンパク質、タンパク質を取り込んだリポソーム、界面活性剤により可溶化させたタンパク質のいずれかを脂質二重膜30に導入し、脂質二重膜30にタンパク質を組み込んで膜タンパク質とする工程であってもよい。脂質二重膜にタンパク質を組み込む手法としては、リポソームの場合には膜融合などを用いることができ、界面活性剤により可溶化させたタンパク質の場合には熱揺動などを用いることができる。

40

【0081】

以上説明した第1実施形態の高密度微小チャンバーアレイ20の製造方法によれば、比較的容易に、脂質二重膜30により液封された極めて容量が小さな多数の微小チャンバー26を高密度に形成した高密度微小チャンバーアレイ20を製造することができる。

50

【0082】

第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイ20によれば、各微小チャンパー26の容量Lが $19.6 \times 10^{-18} [m^3]$ と極めて小さいから、第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイ20を生体分子反応の検出に用いることにより、微小チャンパー26内の生体分子数を少なくすることができる。この結果、生体分子1個の反応による微小チャンパー26内の濃度変化の程度を大きくし、濃度変化として検出する際の検出感度を高くすることができる。生体分子の反応が極めて遅くても、生体分子の反応を高感度で検出することができる。また、微小な微小チャンパー26を $1cm^2 (1 \times 10^{-4} [m^2])$ 当たり約 2×10^6 個と高密度に多数形成したアレイとしているから、生体分子の反応が生じる頻度が低くても、いずれかの微小チャンパー26で反応が生じるため、生体分子の反応を高感度で検出することができる。

10

【0083】

[膜タンパク質の解析方法]

第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイ20は、更に、脂質二重膜30に膜タンパク質を再構成することで、膜タンパク質の解析に用いることができる。すなわち、第1実施形態にかかる膜タンパク質の解析方法は、第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイを用意し、複数の微小チャンパーの開口部に脂質二重膜を形成する。脂質二重膜には膜タンパク質を保持させる。その上で、電極と脂質二重膜の上方に設けられた反対電極との間に電圧を印加することで膜タンパク質の性質を変化させる。

20

【0084】

膜タンパク質の性質としては、例えば、脂質二重膜を介した物質の輸送特性、膜タンパク質の触媒特性、膜タンパク質のコンフォメーション等が含まれうる。

【0085】

まず、脂質二重膜30に膜タンパク質を再構成する手法について説明する。脂質二重膜にタンパク質を組み込む手法としては、リボソームの場合には膜融合などを用いることができ、界面活性剤により可溶化させたタンパク質の場合には熱揺動などを用いることができる。以下、より具体的に説明する。

【0086】

膜タンパク質の再構成は、微小チャンパーデバイスにスペーサ42を介してガラス板44を乗せて液体流路48が形成された状態(図9A参照)で、ガラス板44の液体導入孔46から容量 $50 \mu L$ のリボソームに再構成させた膜タンパク質の溶液を導入し、1時間インキュベートして、膜融合により膜タンパク質を脂質二重膜30に組み込むことにより行なうことができる。

30

【0087】

図9Aに示されているように、液体流路48は、疎水層24と、疎水層24の上方に配置された天井との間に形成される。液体流路48は、厚みが一定の空間であってもよい。図9Aに示す例では、天井はガラス板44の下面である。

【0088】

均一な脂質膜を効率的に形成するためには、一定の流速で水溶液および脂質溶液を流す必要がある。微小チャンパーの上方に液体流路を配置することで、全ての微小チャンパーに対して同時かつ均一に流体を供給することができる。これにより、効率的に脂質膜を形成することが可能となる。

40

【0089】

機能的な脂質膜を形成する場合、脂質膜を薄膜化する必要がある。薄膜化には流体によるせん断力が有効である。液体流路を配置することで、脂質膜上に水溶液を流すことができ、そのせん断力により効率的に脂質膜を薄膜化することが可能となる。

【0090】

流路の天井部に金属をパターニングすることで、反対電極27も容易に設置できる。例えば、ガラス板44の表面に反対電極27が形成されうる。反対電極27は、膜電位の制御および、その他の生体分子の操作に活用できる。

50

【0091】

膜タンパク質の溶液の組成としては、例えば、10 nMのF_oF₁（膜タンパク質であるATP合成酵素）と、1 mMのpH7のMOPS（3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸）と、10 mMの塩化ナトリウム（NaCl）と、2 mMの塩化マグネシウム（MgCl₂）とを含む溶液を用いることができる。

【0092】

このように第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイ20の脂質二重膜30に膜タンパク質を再構成したものとすれば、第1実施例の高密度微小チャンパーアレイ20を、膜タンパク質を介しての生体分子反応等の検出に用いることができる。

【0093】

なお、脂質二重膜30に膜タンパク質を再構成する手法は、リポソームを用いる方法に限定されない。例えば、界面活性剤で可溶化させた膜タンパク質や水溶性タンパク質などを導入して脂質二重膜30に再構成するものとしてもよい。例えば、界面活性剤で可溶化させた膜タンパク質を脂質二重膜30に再構成する場合、ガラス板44の液体導入孔46から容量50 μLの界面活性剤で可溶化された膜タンパク質溶液を導入し、1時間インキュベートして、熱揺動により膜タンパク質を脂質二重膜30に組み込むものとするればよい。膜タンパク質溶液の組成としては、例えば、10 nMのF_oF₁（膜タンパク質であるATP合成酵素）と、0.01~0.1%のデシルマルトシド（n-decyl-β-maltoside：界面活性剤）と、1 mMのpH7のMOPS（3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸）と、10 mMの塩化ナトリウム（NaCl）と、2 mMの塩化マグネシウム（MgCl₂）とを含む溶液を用いることができる。

【0094】

第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイ20の脂質二重膜30に膜タンパク質を再構成する手法としては、微小チャンパーデバイスに脂質二重膜30を形成する前の段階、即ち、液体導入孔46から試験用液体を導入して試験用液体で液体流路48を満たす段階において、試験用液体として、試験用液体に少なくともタンパク質を可溶化または懸濁化した状態のタンパク質含有液体を用いてもよい。即ち、液体導入孔46から試験用液体としてタンパク質含有液体を導入してこのタンパク質含有液体で液体流路48を満たしておく。液体導入孔46から、脂質35を含有する有機溶媒と脂質二重膜30を形成するための膜形成用液体（膜形成用水溶液でもよい）とを順次導入することで、微小チャンパー26にタンパク質含有液体が満たされた状態で脂質二重膜30により微小チャンパー26の開口部を液封する。微小チャンパー26は脂質二重膜30によって液封されており、微小チャンパー26内のタンパク質含有液体中のタンパク質は、膜融合や熱揺動などにより脂質二重膜30に再構成される。なお、タンパク質含有液体におけるタンパク質としては、膜タンパク質を含む細胞膜断片、タンパク質を埋め込んだ脂質二重膜、水溶性タンパク質、タンパク質を取り込んだリポソーム、界面活性剤により可溶化させたタンパク質などを用いることができる。

【0095】

第1実施形態の高密度微小チャンパーアレイによれば、電極23と脂質二重膜30の上方に設けられた反対電極27との間に電圧を印加することで膜タンパク質の性質を変化させることができる。印加電圧は、例えば、-300 mV~+300 mVの間で適宜に調整しうる。

【0096】

ここで、基板22の下方から基板22へと入射した光は、基板22および電極23Tを透過して微小チャンパー26の内部へと進入し、かつ、微小チャンパー26の内部から電極23Tおよび基板22へと入射した光は、電極23Tおよび基板22を透過して基板22の下方へと脱出する。膜タンパク質の性質の変化は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、微小チャンパー26の内部に収容されている試験用液体に含まれる蛍光物質が発する光を検出すること等により解析することができる。顕微鏡として、落射型共焦点顕微鏡が用いられてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

具体的には、図 3 に例示するように、レーザ光源 1 2 から射出された光 L 1 をダイクロイックミラー 1 4 で反射させ、基板 2 2 へと入射する。基板 2 2 へ入射された光は、基板 2 2 を透過して微小チャンパー 2 6 へと進入する。微小チャンパー 2 6 内の蛍光物質は、該進入した光を受けて、異なる波長の光を放射する。該放射された光 L 2 は、基板 2 2 へと入射し、基板 2 2 を透過して基板 2 2 の下方へと脱出する。さらに光は、ダイクロイックミラー 1 4 を透過して、カメラ 1 0 へと到達する。なお、レーザ光源 1 2 とダイクロイックミラー 1 4 との間およびダイクロイックミラー 1 4 とカメラ 1 0 との間に適宜に光学系が挿入されてもよい。

【 0 0 9 8 】

10

1. 第 1 実験例

第 1 実験例では、第 1 実施形態の高密度微小チャンパーアレイ 2 0 A (図 1、図 2、図 3 参照) と蛍光性膜電位指示薬とを用いて膜電位の検出を行った。本実験例の実験条件は、以下の通りとした。

基板 2 2 の材料：無色ガラス

基板 2 2 の厚み：0.12 mm

基板 2 2 の形状：2.4 mm × 3.2 mm の矩形

反対電極 2 7 の材料：金

反対電極 2 7 の形状：1.8 mm × 1.8 mm の矩形

基板 2 2 から反対電極 2 7 までの距離：0.2 mm

20

疎水層 2 4 の材料：旭硝子株式会社製のフッ素樹脂 (C Y T O P)

疎水層 2 4 の厚み：約 500 nm

電極 2 3 の材料：金

電極 2 3 の厚み：約 500 nm

微小チャンパ：直径約 5 μm、高さ約 1 μm の円筒形状

脂質二重膜：1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D O P E) と 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホグリセロール (D O P G) との 1 : 1 (重量比) 混合物のクロロホルム溶液を用いて形成

試験用液体：10 mM の pH 緩衝液 (pH 5 ~ 9) と、20 μM の蛍光性膜電位指示薬 (D i B a c 4) と、10 mM の塩化ナトリウムを含む水溶液

30

電圧印加装置：ファンクションジェネレータ (株式会社エヌエフ回路設計ブロック製)

共焦点レーザー顕微鏡：A 1 R (N i k o n 社製)

蛍光性膜電位指示薬：D i B A C 4 (D o j i n d o 社製)

なお、D i B A C 4 は、Bis-oxonol 型のアニオン性膜電位感受性色素であり、細胞膜の脱分極に伴って、細胞質中への分布が増し、蛍光増強する。

【 0 0 9 9 】

図 1 0 は、第 1 実験例における、印加電圧 (破線) と蛍光強度 (実線) の変化を示す図である。印加電圧は、電極 2 3 を基準 (0 V) として、反対電極 2 7 の電位により示す (他の実験例でも同様)。図 1 0 に示すように、D i B A C 4 の蛍光強度は、印加電圧に追従するように変化している。蛍光強度の変化は、印加電圧の変化よりも若干遅れていることが分かる。本実験例の結果から、第 1 実施形態の高密度微小チャンパーアレイを用いれば、電極への電圧印加により膜電位 (脱分極および過分極) を制御できることが分かる。

40

【 0 1 0 0 】

2. 第 2 実験例

第 2 実験例では、第 1 実験例と同様の高密度微小チャンパーアレイ 2 0 A (図 1、図 2、図 3 参照) において、膜タンパクとして大腸菌由来の F 型 A T P 合成酵素 (F o F 1) を、リポソームを用いて脂質二重膜 3 0 に導入し、プロトンの能動輸送を検出した。

【 0 1 0 1 】

微小チャンパー 2 6 の内側の試験用液体としては、組成が 10 μM の T r i c i n e 緩衝液 (pH 8) と、10 mM の塩化ナトリウム (N a C l) と、10 mM の塩化カルシウ

50

ム (CaCl_2)、2 m M の塩化マグネシウム (MgCl_2) と、1 μ M のアデノシン三リン酸 (A D P : Adenosine diphosphate) と、2 0 μ M の蛍光 p H 指示薬 (R h P - M) とを含む水溶液を用いた。

【 0 1 0 2 】

微小チャンパー 2 6 の外側の液体としては、1 0 μ M の M O P S (3-Morpholinopropanesulfonic acid) 緩衝液 (p H 8) と、1 0 m M の塩化ナトリウム (NaCl) と、1 0 m M の塩化カルシウム (CaCl_2) と、2 m M の塩化マグネシウム (MgCl_2) と、2 4 0 μ M のアデノシン三リン酸 (A T P : Adenosine Triphosphate) とを含む水溶液を用いた。

【 0 1 0 3 】

その他の装置構成については、第 1 実験例と同様としたので、詳細な説明を省略する。

【 0 1 0 4 】

図 1 1 は、第 2 実験例における、蛍光強度の時間変化と膜電位との関係を示す図である。図 1 2 は、第 2 実験例における、F 型 A T P 合成酵素のプロトン輸送速度 (縦軸) と膜電位の大きさ (横軸) との関係を示す図である。

【 0 1 0 5 】

図 1 1 に示すように、膜電位が高い程、蛍光強度の変化は速くなり、プロトン輸送速度が高くなっていることが分かる。

【 0 1 0 6 】

(第 2 実施形態)

第 2 実施形態では、電極に電流を通流することで微小チャンパーの内部を加熱する。

【 0 1 0 7 】

第 2 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイは、第 1 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイであって、さらに、電極が金属であって、それぞれの微小チャンパーの内側面に設けられている。

【 0 1 0 8 】

上記高密度微小チャンパーアレイにおいて、金属がクロムであってもよい。

【 0 1 0 9 】

第 2 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイシステムは、上記いずれかの高密度微小チャンパーアレイと、電極内を基板と平行に電流を流すことで電極を発熱させる電流印加装置とを備える。

【 0 1 1 0 】

上記高密度微小チャンパーアレイシステムは、さらに、脂質二重膜の上方に設けられた反対電極と、電極と反対電極との間に電圧を印加する電圧印加装置とを備えてもよい。

【 0 1 1 1 】

第 2 実施形態にかかる方法は、上記いずれかの高密度微小チャンパーアレイを用意し、電極に電流を流すことで電極を発熱させることで、微小チャンパー内に封止された試験用液体の温度を制御する。

【 0 1 1 2 】

[装置構成]

図 1 3 は、第 2 実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイシステムの概略構成の一例を示す図である。以下、図 1 3 を参照しつつ、第 2 実施形態の高密度微小チャンパーアレイシステム 2 0 0 の装置構成について説明する。

【 0 1 1 3 】

図 1 3 に例示されるように、高密度微小チャンパーアレイシステム 2 0 0 は、基板 2 2 と、電極 2 3 と、疎水層 2 4 と、微小チャンパー 2 6 と、脂質二重膜 3 0 と、電流印加装置 2 9 とを備えている。

【 0 1 1 4 】

基板 2 2 と、疎水層 2 4 と、微小チャンパー 2 6 と、脂質二重膜 3 0 とは、第 1 実施形態と同様に構成することができるので、詳細な説明を省略する。

10

20

30

40

50

【0115】

電極23は、発熱体として使用しうるものであればどのような材料で構成されていてもよい。具体的には例えば、電極23は、金属で構成されていてもよい。さらに具体的には例えば、電極23は、クロムで構成されていてもよい。

【0116】

あるいは電極23は、発熱体として使用でき、かつ、試験用液体による変質を受けにくい材料で構成されていてもよい。具体的には例えば、電極23は、クロムで構成されていてもよい。

【0117】

図13示す例では、複数の微小チャンパー26に対応する電極23は互いに電氣的に接続されている。すなわち、図1に示す疎水層24と同様、電極23が複数の微小チャンパー26を取り囲むように連続的に構成されてもよい。かかる構成では、複数の微小チャンパー26をまとめて加熱できる。

10

【0118】

電流印加装置29は、電極23内を基板22と平行に電流を流すことで電極23を発熱させる。電流印加装置29としては、具体的には例えば、ファンクションジェネレータ(株式会社エヌエフ回路設計ブロック製)を用いることができる。

【0119】

[方法]

第2実施形態の方法では、電流印加装置29を用いて電極23に電流を流し、もって電極23を発熱させることで、微小チャンパー26内に封止された試験用液体、脂質二重膜30、膜タンパク等の温度を制御することができる。

20

【0120】

電極23を用いて試験用液体、脂質二重膜30、膜タンパク等の温度を制御することで、より多様な条件での膜タンパク質の挙動を解析できる。

【0121】

第2実施形態においても、第1実施形態と同様の変形が可能である。例えば、高密度微小チャンパーアレイシステム200が、電流印加装置29に加え、電圧印加装置28を備えてもよい。電圧印加装置28については、第1実施形態と同様に構成することができるので、詳細な説明を省略する。

30

【0122】

(第3実施形態)

第3実施形態では、脂質二重膜で封止された微小チャンパーの内部に生体高分子を集積する。

【0123】

第3実施形態にかかる高密度微小チャンパーアレイは、第1実施形態および第2実施形態の少なくともいずれか一方にかかる高密度微小チャンパーアレイであって、微小チャンパーの内部に、生体高分子が集積されている。

【0124】

第3実施形態にかかる方法は、透光性を有する平坦な基板と、基板上に設けられた疎水性物質からなる層であって、複数の微小チャンパーの開口部が該層の主面上に規則的かつ高密度に配列するよう設けられ、微小チャンパーの容量が $4000 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ 以下である、疎水層とを備え、それぞれの微小チャンパー内に電極が設けられており、基板において、疎水層が設けられている側を上方とすると、下記A)およびB)の少なくともいずれか一方を満たすことにより、基板の下方から基板へと入射した光が基板を透過して微小チャンパーの内部へと進入し、かつ、微小チャンパーの内部から基板へと入射した光が基板を透過して基板の下方へと脱出するように構成されている、高密度微小チャンパーアレイを用意し、電極に電圧を印加することで、複数の微小チャンパーの内部に生体高分子を集積し、その後、複数の微小チャンパーの開口部に生体高分子を封止するように脂質二重膜を形成する。

40

50

- A) 電極が、それぞれの微小チャンバーの内側面に設けられている。
B) 電極が、それぞれの微小チャンバーの底面に透明電極として設けられている。

【0125】

[装置構成]

図14は、第3実施形態において生体高分子が集積された高密度微小チャンバーアレイの概略構成の一例を示す図である。以下、図14を参照しつつ、第3実施形態の高密度微小チャンバーアレイ300の装置構成について説明する。

【0126】

図14に例示されるように、高密度微小チャンバーアレイ300は、基板22と、電極23と、疎水層24と、微小チャンバー26と、脂質二重膜30とを備えている。

10

【0127】

基板22と、電極23と、疎水層24と、脂質二重膜30とは、第1実施形態および第2実施形態の少なくともいずれか一方と同様に構成することができるので、詳細な説明を省略する。

【0128】

微小チャンバー26の内部には、生体高分子36が集積されている。生体高分子とは、例えば、タンパク質、DNA、RNA等が含まれる。

【0129】

[製造方法]

以下、第3実施形態の高密度微小チャンバーアレイ300の製造方法について説明する。図15は、第3実施形態における生体高分子集積高密度微小チャンバーアレイの製造方法の一例を示す工程図である。

20

【0130】

第3実施形態の高密度微小チャンバーアレイ300は、まず、脂質二重膜30により開口部が液封されていない微小チャンバーデバイスを形成し(工程S400)、形成した微小チャンバーデバイスに試験用液体を導入し(工程S410)、各微小チャンバーに生体高分子を集積させ(工程S420)、試験用液体が各微小チャンバー26に満たされ、かつ、生体高分子が各微小チャンバー26に集積した状態で、各微小チャンバー26の開口部を液封するように脂質二重膜30を形成して(工程S430)、完成する。

【0131】

工程S400は、図5の工程S100と同様とすることができるので、詳細な説明を省略する。

30

【0132】

工程S410は、図5の工程S110あるいは図9Aと同様とすることができるので、詳細な説明を省略する。

【0133】

工程S430は、図5の工程S120あるいは図9B~図9Cと同様とすることができるので、詳細な説明を省略する。

【0134】

工程S420において、生体高分子36は、例えば、電極23を用いて微小チャンバー26の内部に誘引される。生体高分子36は電荷を有していてもよい。この場合、電極23を生体高分子36と反対極性に帯電させることで、生体高分子36を微小チャンバー26へと誘引できる。

40

【0135】

生体高分子36は、誘電泳動により微小チャンバー26に誘引されてもよい。誘電泳動では、電氣的に中性な粒子であっても、不均一な電界を印加することで粒子を分極させ、移動させることができる。誘電泳動は流体と粒子の誘電率の関係、および電界の空間勾配によって生じる。誘電泳動を用いる場合には、生体高分子36が電荷を有しない場合でも、生体高分子36を微小チャンバー26へと誘引できる。本実施形態では、チャンバーの開口部に電界が集中することから、チャンバー内部へと物質を誘導できる。

50

【0136】

第3実施形態では、脂質二重膜30で封止された微小チャンパー26の内部に生体高分子36を集積できる。よって、生体高分子36同士の相互作用や、脂質二重膜30に保持された膜タンパクと生体高分子36との相互作用などを解析する上で有利となる。

【0137】

(第4実施形態)

第4実施形態では、細胞融合により膜タンパク質を脂質二重膜へと導入する。

【0138】

第4実施形態の方法は、反対電極を有する第1実施形態から第3実施形態の少なくともいずれかの高密度微小チャンパーアレイを用意し、電極と反対電極との間に電流を印加することにより脂質二重膜に細胞を融合させることで、細胞由来の膜タンパク質を脂質二重膜へと移行させる。

10

【0139】

第4実施形態の方法は、第1実施形態から第3実施形態の少なくともいずれかの方法において、脂質二重膜の上方に反対電極を設けるステップを含み、膜タンパク質が、電極と反対電極との間に電流を印加することにより脂質二重膜に細胞を融合させることで脂質二重膜へと導入された、細胞由来の膜タンパク質であってもよい。

【0140】

図16Aは、第4実施形態の脂質二重膜へと細胞を融合させる方法において、液体流路に細胞を導入する工程を示す図である。図16Bは、第4実施形態の脂質二重膜へと細胞を融合させる方法において、細胞が脂質二重膜へと融合された状態を示す図である。以下、図16Aおよび図16Bを参照しつつ、第4実施形態の方法について説明する。なお、図16Aおよび図16Bにおいて、図3と共通する構成要素については、第1実施形態と同様の構成としうることから、同一の符号および名称を付して詳細な説明を省略する。

20

【0141】

細胞融合技術を用いた脂質二重膜30への膜タンパク質54の導入は、例えば以下のように行われる。すなわち、微小チャンパーデバイスにスペーサ42を介してガラス板44を乗せて液体流路48を形成する。この状態で、ガラス板44の液体導入孔46から膜タンパク質54を有する細胞52を含む溶液を導入し(図16A)、電極23と反対電極27との間に、電流印加装置28(図示省略)を用いてパルス状の直流電流を印加することで、細胞融合により膜タンパク質54を脂質二重膜30に組み込む(図16B)。溶液の組成としては、例えば、10nMのF_oF₁(ATP合成酵素)と、1mMのpH7のMOPS(3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸)と、10mMの塩化ナトリウム(NaCl)、2mMの塩化マグネシウム(MgCl₂)とを含む溶液を用いることができる。

30

【0142】

第1実施形態から第3実施形態のいずれかの高密度微小チャンパーアレイの脂質二重膜30に膜タンパク質54を再構成したものとすれば、高密度微小チャンパーアレイを、膜タンパク質を介しての生体分子反応等の検出に用いることができる。膜タンパク質54は、細胞52から脂質二重膜30へと直接導入できるため、操作を簡潔化できる。細胞52が有する膜タンパク質54をそのまま解析できることから、細胞が発現している未知の膜タンパク質を解析することも可能となる。

40

【0143】

細胞融合では、脂質二重膜における内(細胞質側)と外(細胞外マトリクス側)とが保存される。よって、細胞融合を利用することで、脂質二重膜30へと導入された膜タンパク質54の配向を適切に制御できる。微小チャンパー26の外部から脂質二重膜30へ細胞を融合すれば、微小チャンパー26の内部が細胞質側となる。微小チャンパー26の内部に細胞を集積し、微小チャンパー26の内部から脂質二重膜30へ細胞を融合すれば、微小チャンパー26の内部が細胞外マトリクス側となる。

【0144】

50

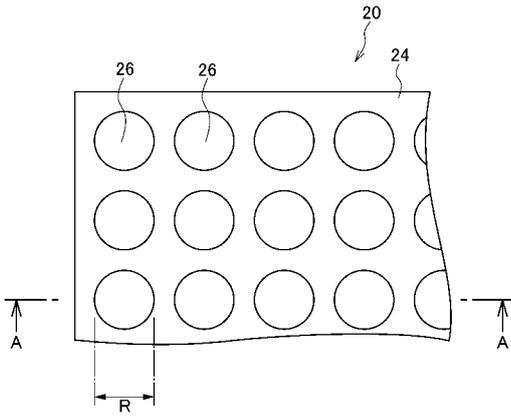
上記説明から、当業者にとっては、本発明の多くの改良や他の実施形態が明らかである。従って、上記説明は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実行する最良の態様を当業者に教示する目的で提供されたものである。本発明の精神を逸脱することなく、その構造および/又は機能の詳細を実質的に変更できる。

【符号の説明】

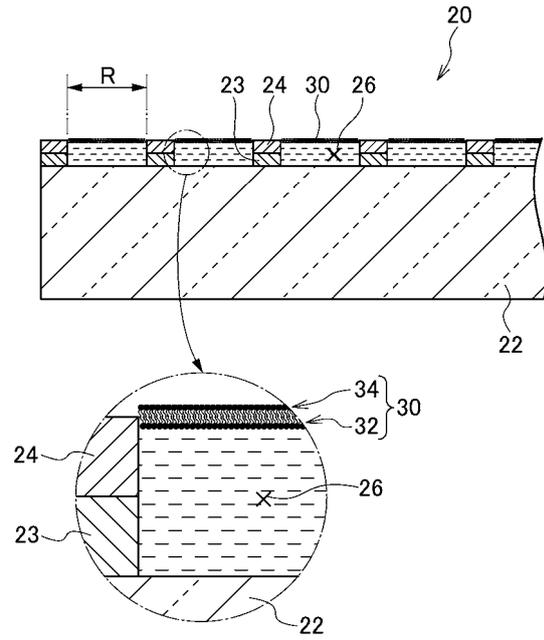
【0145】

10	カメラ	
12	レーザー光源	
14	ダイクロイックミラー	
20	高密度微小チャンパーアレイ	10
22	基板	
23	電極	
23a	電極層	
24	疎水層	
24a	物質膜	
24b	物質膜	
25a	レジスト	
25b	レジスト	
26	微小チャンパー	
27	反対電極	20
28	電圧印加装置	
29	電流印加装置	
30	脂質二重膜	
32	第1脂質膜	
34	第2脂質膜	
35	脂質	
36	生体高分子	
42	スペーサ	
44	ガラス板	
46	液体導入孔	30
48	液体流路	
52	細胞	
54	膜タンパク質	
100	高密度微小チャンパーアレイシステム	
200	高密度微小チャンパーアレイシステム	
300	高密度微小チャンパーアレイ	

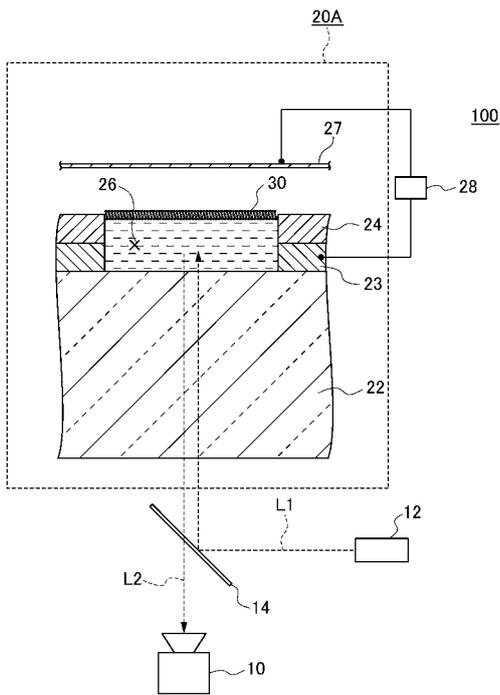
【 図 1 】



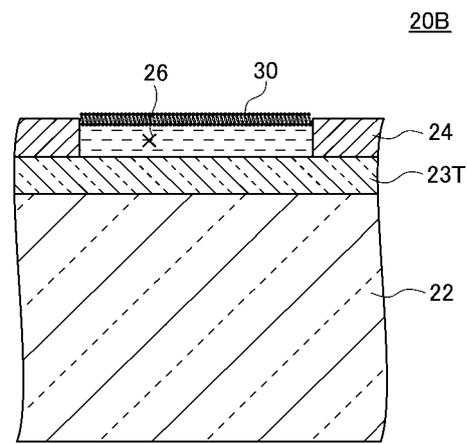
【 図 2 】



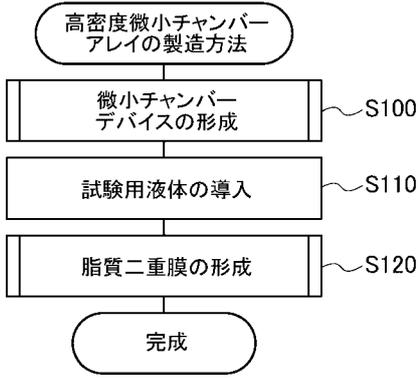
【 図 3 】



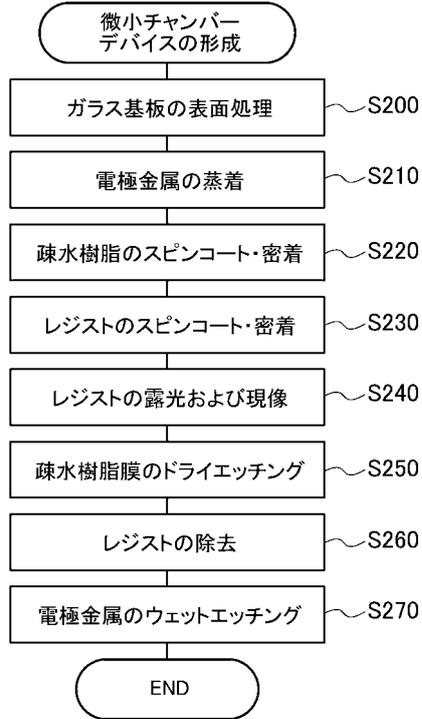
【 図 4 】



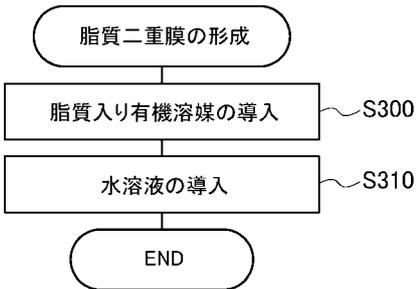
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 A 】



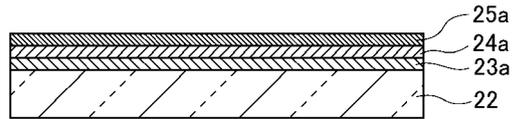
【 図 8 B 】



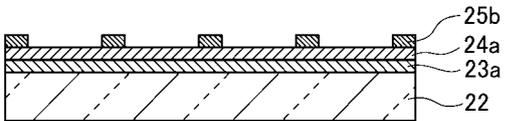
【 図 8 C 】



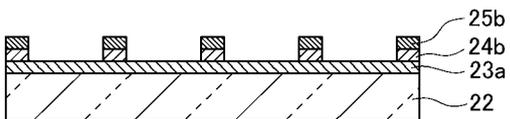
【 図 8 D 】



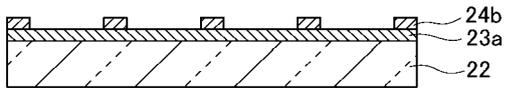
【 図 8 E 】



【 図 8 F 】



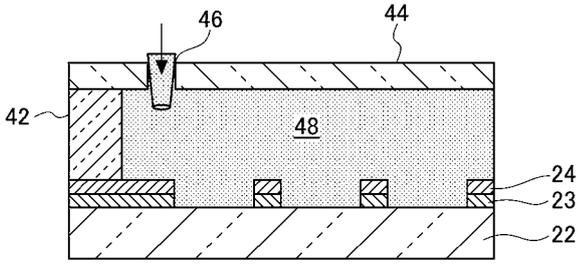
【 図 8 G 】



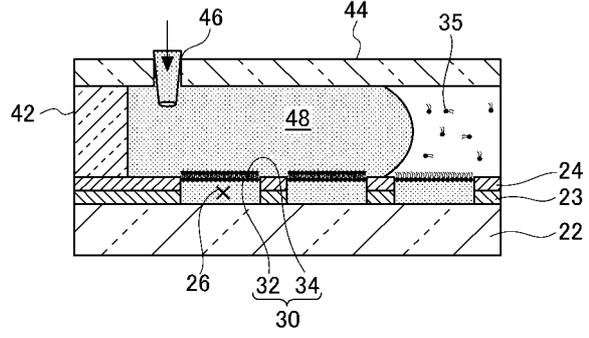
【 図 8 H 】



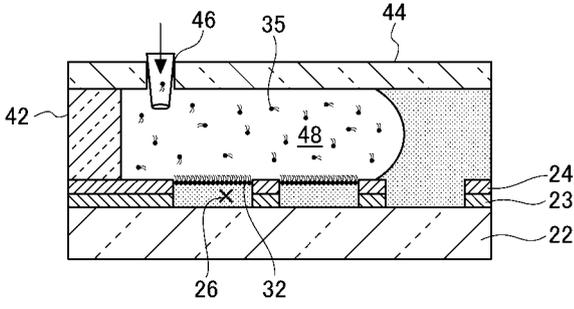
【 図 9 A 】



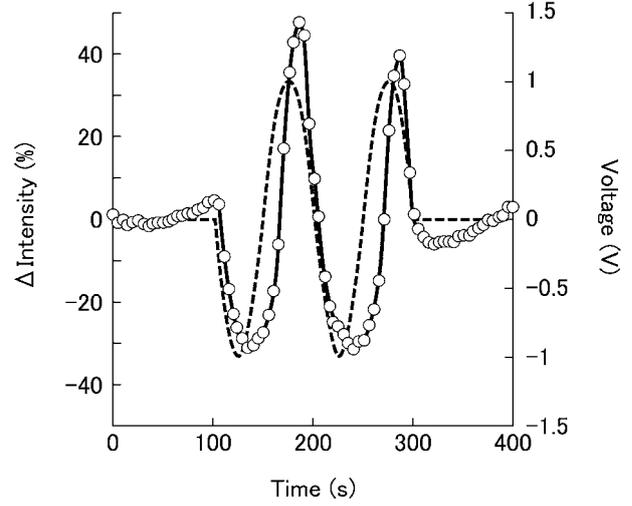
【 図 9 C 】



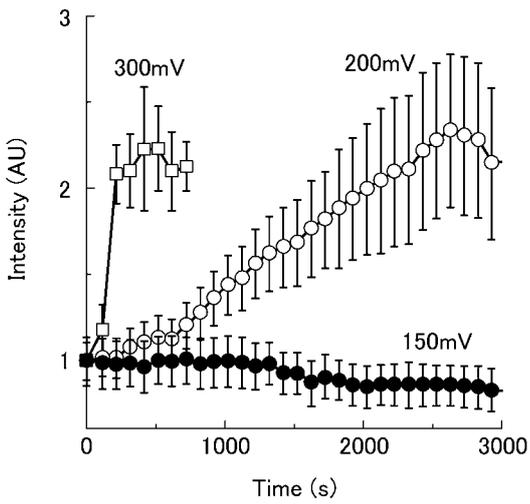
【 図 9 B 】



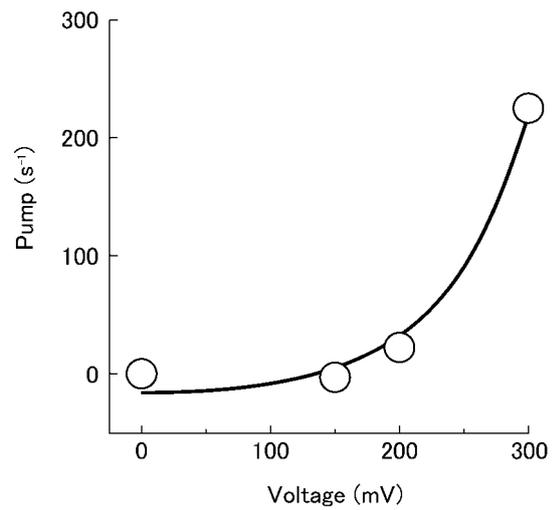
【 図 1 0 】



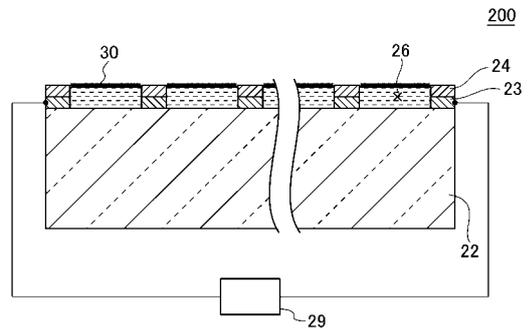
【 図 1 1 】



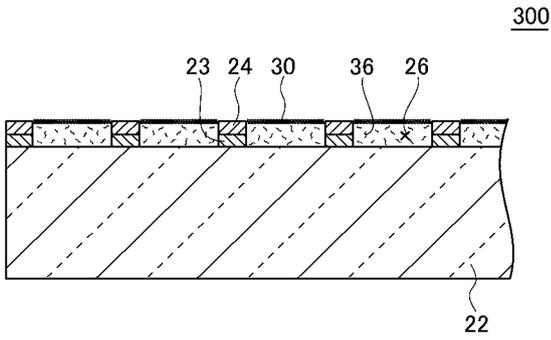
【 図 1 2 】



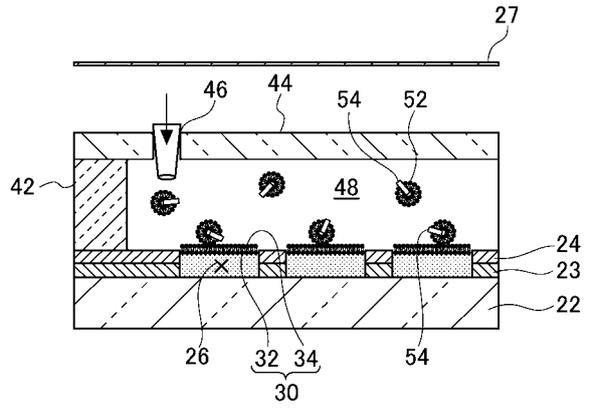
【 図 1 3 】



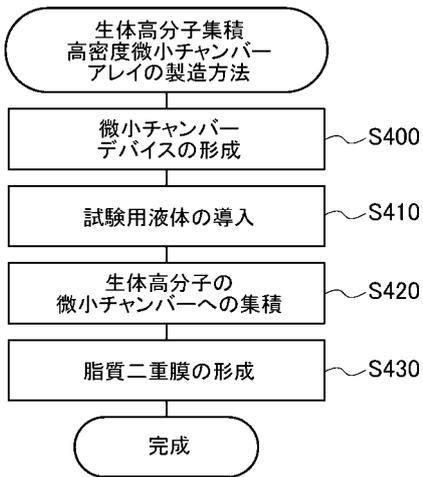
【図14】



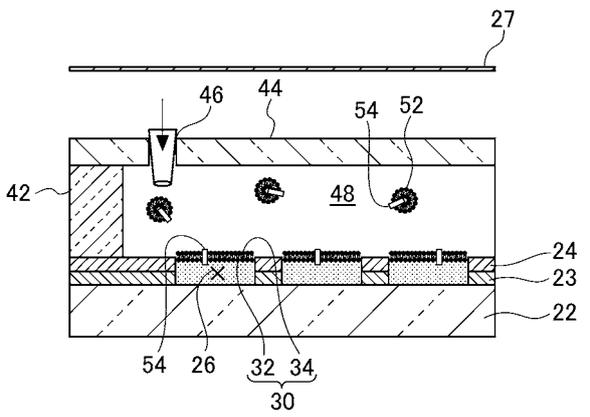
【図16A】



【図15】



【図16B】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/066834
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER B81B1/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B81B1/00, C12M1/00, G01N33/48, G01N37/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2011-506994 A (Oxford Nanopore Technologies Ltd.), 03 March 2011 (03.03.2011), paragraphs [0067], [0070], [0089], [0097] to [0098], [0101], [0125] to [0127], [0213]; fig. 1 to 3 & US 2009/0167288 A1 paragraphs [0094], [0097], [0116], [0124] to [0125], [0128], [0151] to [0153], [0243]; fig. 1 to 3 & GB 724736 D & WO 2009/077734 A2 & EP 2232261 A & AU 2008337348 A & CA 2708624 A & KR 10-2010-0114038 A & CN 101932933 A	1, 4-5, 7, 10-11, 13-14 2-3, 6, 8-9, 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 August 2016 (12.08.16)		Date of mailing of the international search report 30 August 2016 (30.08.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066834

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-21025 A (Taishi TONOOKA), 03 February 2014 (03.02.2014), (Family: none)	2-3, 6, 8-9, 12
A	JP 2014-178121 A (Nippon Telegraph and Telephone Corp.), 25 September 2014 (25.09.2014), (Family: none)	2-3, 6, 8-9, 12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 6 8 3 4													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. B81B1/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. B81B1/00, C12M1/00, G01N33/48, G01N37/00															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
X A	JP 2011-506994 A (オックスフォード ナノポア テクノロジーズ リミテッド) 2011.03.03, [0067], [0070], [0089], [0097]-[0098], [0101], [0125]-[0127], [021 3], 図 1-3 & US 2009/0167288 A1, [0094], [0097], [0116], [0124]-[0125], [0128], [0151]-[0153], [0 243], 図 1-3 & GB 724736 D & WO 2009/077734 A2 & EP 2232261 A & AU 2008337348 A & CA 2708624 A & KR 10-2010-0114038 A & CN 101932933 A	1, 4-5, 7, 10-11, 13-14 2-3, 6, 8-9, 12													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 12.08.2016		国際調査報告の発送日 30.08.2016													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 細川 翔多 電話番号 03-3581-1101 内線 3363	3 P 5271												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 6 8 3 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2014-21025 A (外岡 大志) 2014.02.03, (ファミリーなし)	2-3, 6, 8-9, 12
A	JP 2014-178121 A (日本電信電話株式会社) 2014.09.25, (ファミリーなし)	2-3, 6, 8-9, 12

フロントページの続き

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

(72)発明者 曾我 直樹

東京都文京区本郷7 - 3 - 1 国立大学法人東京大学 工学研究科内

Fターム(参考) 2G045 DA36

3C081	AA13	BA04	BA23	BA32	BA72	CA02	CA14	CA15	DA06	DA10
	DA22	DA27	EA27	EA28	EA29					
4G075	AA15	AA39	AA56	AA63	AA65	BA10	CA02	CA13	DA02	DA18
	EA06	EB50	EC21	FB02	FB06	FB11	FC04	FC20		

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。