

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2019年5月23日(23.05.2019)



(10) 国際公開番号

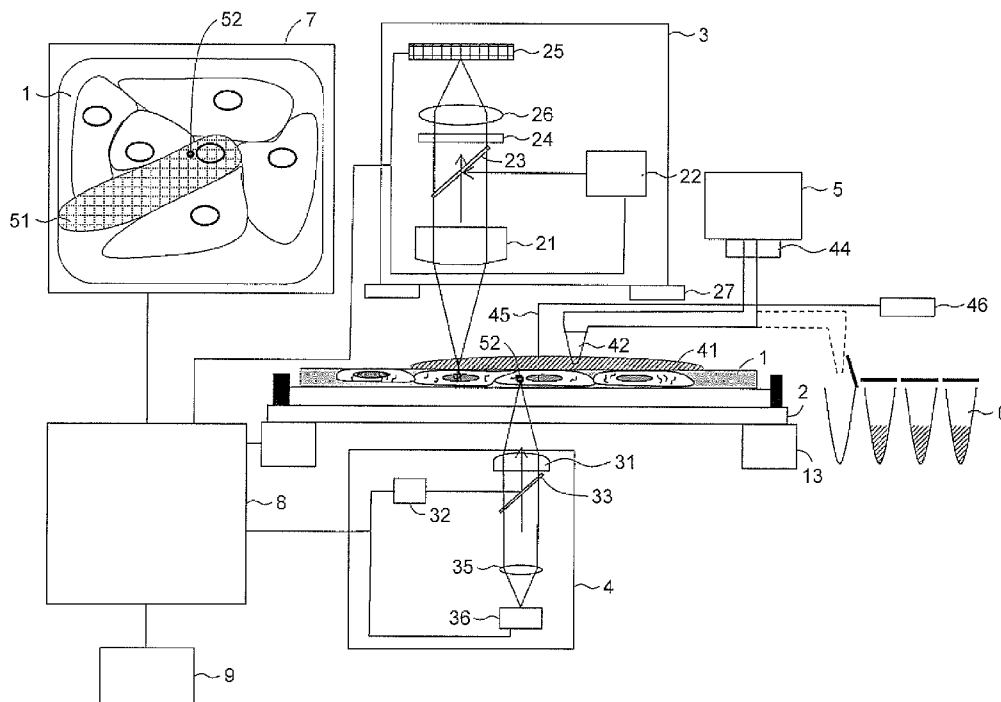
WO 2019/097873 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12M 1/26 (2006.01) C12Q 1/6844 (2018.01)  
C12M 1/42 (2006.01) G01N 1/28 (2006.01)
- (72) 発明者: 白井 正 敬 (SHIRAI Masataka);  
〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/036964
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー3 2階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2018年10月3日(03.10.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2017-221689 2017年11月17日(17.11.2017) JP
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
- (71) 出願人: 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.)  
[JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 Tokyo (JP).

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR COLLECTING BIOMOLECULES FROM SPECIFIC REGION OF TISSUE SECTION

(54) 発明の名称: 組織切片の特定領域からの生体分子採取方法および装置

図 2



(57) Abstract: Provided are a biomolecule analysis apparatus and a biomolecule analysis method, which are capable of analyzing samples of cells or micro-regions in a specified position with a microscope image of a tissue section by collecting biomolecules in a single cell or in a micro-region without wounding peripheral cells.

(57) 要約: 組織切片の顕微鏡イメージで指定された位置の細胞または微小領域のサンプルを、周辺の細胞を傷つけることなく、単一細胞内または微小領域中の生体分子を採取し、解析することができる生体分子解析装置および方法を提供する。

WO 2019/097873 A1

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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

### 組織切片の特定領域からの生体分子採取方法および装置

#### 技術分野

[0001] 本発明は、組織切片の特定の領域から選択的に生体分子（特に核酸）を採取、回収、抽出するための方法および装置に関する。特に、顕微鏡画像イメージに対応した位置の単一細胞から個別に核酸を採取、回収、抽出するための方法および装置に関する。

#### 背景技術

[0002] 近年、多数の細胞から構成される生体組織のゲノム解析や遺伝子発現解析、タンパク質解析を行う際に、個々の細胞のゲノムや遺伝子発現、タンパク質の違いに注目して解析を行う単一細胞解析の重要性が認識されている。

[0003] 単一細胞解析では、一般的に、生体組織から得られた細胞塊をトリプシン処理等の化学処理によって細胞間の結合を切断することにより、細胞の単離が可能である。しかし、組織中の細胞はバラバラになってしまうため、単離前に顕微鏡により得られる光学イメージ上の細胞と単離された細胞との対応付けを行うことができない。つまり、組織中の細胞の位置と単一細胞解析結果とを対応させることができない。また、単離のための化学処理によって、細胞の状態、すなわち遺伝子発現量やタンパク質量等が変化する可能性があることも大きな懸念事項であった。

[0004] 一方、病理診断などに用いられる組織切片の顕微鏡イメージに対応する特定の位置からの微小なサンプルの切り出しとサンプルの採取の技術として、非特許文献1に記載されているようなレーザマイクロダイセクションまたはレーザキャプチャマイクロダイセクションと呼ばれる技術が知られている。この技術はレーザ光の圧力と熱を利用して、特定の領域のサンプルを切り出し、採取する。採取されたサンプルは樹脂製容器などに入れられ、その後は通常の遺伝子解析やタンパク質解析のためのサンプル処理が行われる。しか

し、少なくとも細胞の大きさと同程度以上の厚さの組織切片をレーザー光の照射によって切り出すためには、数 $\mu\text{m}$ 以上の切りしろが必要である。この数 $\mu\text{m}$ という切りしろは細胞のサイズと同程度であるため、細胞が近接している場合には近接した細胞にダメージを与えずに単一の細胞を単離することは困難であった。また、周辺の細胞を破壊することによって、周辺の細胞中に含まれる生体分子がサンプル溶液の中に混入して、計測精度を低下させるという問題もあった。さらに、複数の層からなる切片からの細胞の単離は、従来の技術が2次元面内の切断を行う技術であるため困難であった。

[0005] また、組織切片から顕微鏡イメージ上の特定の位置のサンプルを採取可能な別の技術として特許文献1の技術がある。この技術は、特定の領域にあるサンプルを切り出し、採取するために、レーザーではなく化学的吸着性または静電的吸着性を有する選択的活性化可能接着剤が含まれたプローブを利用している。しかし、この技術でも選択的活性化可能接着剤が含まれたプローブの形状は個々の細胞に適合することが困難であるため、単一細胞の採取時に周辺の細胞に影響を与えてしまうことが課題となる。

[0006] さらに、特許文献2には細胞をレーザーで破砕する例が記載されているが、細胞は破砕前に液滴中に回収されている。組織切片から細胞を回収するためには、上述のようにレーザーマイクロダイセクション（非特許文献1）を用いるか、またはトリプシン処理などによって細胞をばらばらにする必要がある。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開W097/13838号

特許文献2：特開2006-101718号公報

#### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：BioTechniques 第27巻第2号第362-367頁，1999年

### 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0009] 病理診断向けの組織切片は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプルなどの樹脂で包埋したサンプルから作成された組織切片と、包埋を行わず、凍結処理または特別な処理を行ったまたは行わないサンプルから作成された組織切片の2種類が知られている。

[0010] 本発明は、組織切片の顕微鏡イメージで指定された位置の細胞または微小領域のサンプルを、周辺の細胞を傷つけることなく、単一細胞内または微小サンプル中の生体分子を採取し、解析することができる生体分子解析装置および方法を提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するため、本発明は、組織切片の特定の領域をエネルギー印加により破碎し、特定の領域に接して形成された液滴中に当該特定の領域内の生体分子を採取・回収することによって、組織切片の特定の領域から生体分子を採取、回収および／または抽出するための装置および方法を提供する。

[0012] 一態様において、組織切片の特定の領域から生体分子を採取するための装置であって、

組織切片を固定する試料台、

前記組織切片の光学イメージを取得する顕微鏡システム、

前記組織切片の特定の領域の少なくとも一部を破碎するエネルギー印加システム、

前記組織切片上に液滴を形成する分注ピペットシステム、

前記顕微鏡システムで取得した光学イメージ上で前記組織切片上の前記特定の領域を指定するコンピュータシステム

を備え、前記液滴に、破碎された前記特定の領域からの生体分子が溶解または分散することを特徴とする装置を提供する。

[0013] 別の態様において、組織切片の特定の領域から生体分子を採取する方法であって、

組織切片を顕微鏡観察する工程、  
前記組織切片の特定の領域を指定する工程、  
形成される液滴が前記特定の領域を含むように前記組織切片上に回収溶液を分注し、液滴を形成する工程、  
前記液滴が前記組織切片上に存在する状態で前記特定の領域の少なくとも一部にエネルギーを印加する工程、  
前記液滴を回収する工程  
を含む方法を提供する。

### 発明の効果

[0014] 本発明によれば、FFPE切片や凍結切片などから作成された組織切片の顕微鏡イメージ上で指定した位置にある細胞または微小領域に存在する生体分子を、周辺の組織にダメージを与えることなく、短時間に採取することができる。これにより、周辺の組織を別のサンプルとして生体分子を採取することが可能となるだけでなく、組織切片上の指定した領域以外の領域からの生体分子の混入を回避して、指定した領域のみからの生体分子を解析することが可能となる。上記した以外の課題、構成および効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

### 図面の簡単な説明

[0015] [図1]本発明の実施例に係る生体分子採取方法のフロー図である。  
[図2]本発明の実施例1に係る生体分子採取装置の構成図である。  
[図3]試料台の一例の上面図である。  
[図4]試料台の別の例の上面図である。  
[図5]本発明の実施例2に係る生体分子採取装置の構成図である。  
[図6]本発明の実施例3に係る生体分子採取装置の構成図である。  
[図7]本発明の実施例4に係る生体分子採取装置の構成図である。

### 発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。  
本発明は、組織切片上の顕微鏡画像イメージに対応した位置の微小領域か

ら選択的に生体分子を採取、回収および／または抽出するための装置および方法に関する。特に、顕微鏡画像イメージに対応した位置の単一細胞から個別に核酸を採取、回収および／または抽出するための装置および方法に関する。

[0017] ここで採取とは、組織切片の特定の領域（特定の細胞または微小領域）を取り出すことを指す。回収とは、前記特定の領域内の生体分子を溶液中に溶解または懸濁し、容器に収めること指す。抽出とは、目的の生体分子（例えば核酸のみ）が濃縮された溶液を調製することを指す。

[0018] 本発明においては、生体分子を採取するための特定の細胞（単一細胞もしくは複数個の細胞）または特定の微小領域を指定するが、微小とは、直径数十nmから数mm程度の領域を指す。

[0019] 生体分子とは、細胞内に含まれる生体分子であれば特に限定されるものではなく、核酸（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）、非コードRNA（ncRNA）、microRNA、ゲノムDNA、およびそれらの断片など）、タンパク質（例えば、酵素、抗体など）、低分子化合物などが含まれる。本発明では、解析目的に応じて、1種以上の生体分子を採取、回収および／または抽出する。

[0020] 本開示の生体分子採取装置は、  
組織切片（例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片や凍結切片など）を固定する試料台、

組織切片上の特定の領域（単一細胞または微小領域）を光学イメージ上で指定するための、前記組織切片の光学イメージを取得する手段としての顕微鏡システム、

前記組織切片の特定の領域の少なくとも一部を破砕する手段としてのエネルギー印加システム、

生体分子を溶解または分散するための回収溶液を、形成される液滴が特定の領域を含むまたは覆うように前記組織切片上に分注し、液滴を形成する手段としての分注ピペットシステム、

前記顕微鏡システムで取得した光学イメージ上で前記組織切片上の前記特

定の領域を指定するコンピュータシステム

を備え、前記液滴には、破碎された前記特定の領域からの生体分子が溶解または分散する。

- [0021] 試料台は、組織切片、組織切片を貼り付けた透明板、基板上に接着した培養細胞などのサンプルを固定することができる台であれば特に限定されるものではない。顕微鏡システムでの観察を行うことができるように、試料台が透明な材料で作製されるか（例えば図3）または試料台に切り抜き領域を設ける（例えば図4）ことが好ましい。また、試料台にサンプルを固定するための固定具を設けることが好ましく、これによりサンプルの設置が容易となると共に、固定位置を安定化させることができる。
- [0022] 顕微鏡システムもまた、光学イメージ（画像データ）を取得できる手段であれば特に限定されるものではなく、光学顕微鏡、大気圧電子顕微鏡などを用いることができる。得られる光学イメージにおいて、組織切片などのサンプル上の位置および領域に関する情報を決定し保存するため、顕微鏡システムはコンピュータシステムに接続される。
- [0023] コンピュータシステムは、当技術分野で公知のコンポーネントから構成されるものであり、他のシステムまたは要素（例えば顕微鏡システム、表示部、入力部など）と有線または無線で接続される。コンピュータシステムは、組織切片上の特定の領域（単一細胞または微小領域）を指定する、後述するような透明板上のマーカを認識するなどを実行できるものである。
- [0024] エネルギー印加システムは、組織切片の特定の領域の少なくとも一部を破碎することができる手段であれば特に限定されるものではない。例えば、光（レーザ光）照射システム（例えばパルスレーザ照射システム）、振動発生デバイス（例えば超音波印加システム）などが挙げられる。
- [0025] ここで組織切片の特定の領域（細胞または微小領域）のエネルギー印加システムによる破碎とは、光や振動や熱などを当該領域などに加えることで、この領域にある組織切片が（場合によっては樹脂と共に）数nmから数 $\mu\text{m}$ 以下の微小な断片に分解し、組織切片を構成する板状の領域から分離されること



を指す。その結果、組織切片の該当領域に空隙が形成される。

[0026] 分注ピペットシステムは、特定の領域を含むまたは覆うように組織切片上に液滴を形成することができる手段であれば特に限定されるものではない。具体的には、特定の領域を含むまたは覆うように、適切な量および位置に回収溶液を組織切片上に分注し、液滴を形成することができる手段を使用する。ここで、「組織切片上に液滴を形成する」とは、液滴と組織切片とが直接的または間接的に接していればよく、組織切片に直接接して液滴が形成されること、組織切片上に存在する撥水性薄膜を介して液滴が形成されることのいずれも含む。なお、分注ピペットシステムは、液滴を回収するための手段としても機能することが好ましい。

[0027] 一実施形態では、分注ピペットシステムは、液滴にピペットの先端が接触したままとなるように制御する機構を有していてもよく、これにより、液滴を形成した後にその液滴の移動を制御することができる。

[0028] 別の実施形態では、本開示の装置は、組織切片上に形成した液滴の位置を安定化させるための針状部品（例えばニードル）と、その針状部品を組織切片の表面近傍に維持する機構を備えるものである。これにより、組織切片上に液滴を形成した後に、針状部品がその液滴の移動を制御することが可能となる。

[0029] また、本開示の生体分子採取方法は、  
組織切片を顕微鏡観察する工程、  
前記組織切片の特定の領域（単一細胞または微小領域）を指定する工程、  
生体分子を溶解または分散するための回収溶液を、形成される液滴が前記特定の領域を含むまたは覆うように前記組織切片上に分注し、液滴を形成する工程、  
前記液滴が前記組織切片上に存在する状態で前記特定の領域の少なくとも一部にエネルギーを印加（例えばレーザー光照射、超音波照射など）する工程、  
前記液滴を回収する工程

を含む。

[0030] さらに、組織切片が凍結切片などの親水性の高い切片の場合には、上記方法は、組織切片を観察する工程の前または後において、撥水性薄膜を塗布する工程を含む。

[0031] 本開示の装置および方法は、組織切片上の細胞全体を単離して生体分子を採取するのではなく、生体分子を採取しようとする細胞または微小領域を破碎し、破碎によって断片化し拡散した生体分子（核酸など）を液滴（回収溶液）中に採取・回収する。そのため、レーザマイクロダイセクションによる切り出しのための切りしろは発生しない。また、選択した細胞の周辺へのレーザによるダメージを最小限に抑制することができる。特に望ましい形態として、採取しようとする生体分子が電気双極子を持っており親水的な分子である場合には、破碎と同時に液滴（回収溶液）中に生体分子が溶解するため、樹脂を化学的に除去することなく、組織切片上に形成させた液滴（回収溶液）中に効率的に生体分子が回収される。なお、破碎と同時の生体分子の液滴（回収溶液）への溶解が十分でない場合でも、生体分子が含まれる樹脂断片もまた液滴（回収溶液）中に回収できるため、生体分子が効率よく回収できることには変わりない。この場合には、樹脂の除去のための化学処理（有機溶媒による分離処理）が必要な場合がある。

[0032] さらに、2次元面内での特定の微小領域の細胞サンプルの採取だけでなく、切片の厚さ方向にも任意の形状を持つように破碎を行うことが可能であるため、同じ形状でのサンプルの採取も可能である。

[0033] 本開示の方法および装置を適用するサンプルは、樹脂で包埋した切片、凍結切片、培養細胞（基板上に接着した培養細胞）などとすることができる。例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片に適用する場合は、撥水性薄膜を塗布する工程を含めず、液滴を形成することができる。なぜなら、樹脂で包埋した切片の場合には、液滴を形成したときに組織切片中の生体分子が破碎前に液滴中に溶解することが最小限に抑制されるためである。凍結切片または培養細胞の場合には、液滴と接する切片の表面に撥水性の薄膜

を形成することによって、この液滴形成時の生体分子の液滴中への拡散と溶解を防ぐことができる。これらの、親水性の高い切片を扱う場合には液滴との間に撥水性薄膜を形成することが必要である。

[0034] 本開示の方法および装置を凍結切片や培養細胞に適用する場合には、一実施形態では、液滴（回収溶液）として、非極性溶媒を用いることができる。別の実施形態では、本開示の方法を、凍結切片、培養細胞などの上に撥水性薄膜を形成し、その撥水性薄膜上に液滴を形成する工程を含むものとする。本開示の装置では、そのような凍結切片または培養細胞とその上に配置された撥水性薄膜とから構成される切片をサンプルとして使用する。

[0035] 具体的な一実施形態では、本開示の生体分子採取方法は、基板上の凍結切片または接着性培養細胞の特定の細胞中の生体分子を採取する方法であり、  
基板上の凍結切片または接着性培養細胞上に撥水性薄膜を形成する工程、  
前記凍結切片または培養細胞を顕微鏡観察する工程、  
前記凍結切片または培養細胞の特定の細胞を指定する工程、  
形成される液滴が前記特定の細胞を含むように前記撥水性薄膜上に回収溶液を分注し、液滴を形成する工程、  
前記液滴が前記撥水性薄膜上に存在する状態で前記特定の細胞の少なくとも一部にエネルギーを印加する工程、  
前記液滴を回収する工程  
を含む。

[0036] また、回収後の反応効率向上のためにバッファ交換を容易にすることを目的として、特定の領域（単一細胞または微小領域）にエネルギーを印加することによって破碎することで液滴中に分散した生体分子を、液滴中に溶解した核酸プローブ上に捕捉する工程または手段を設けてもよい。つまり、液滴（回収溶液）が核酸プローブを含むようにする。あるいは、液滴中に分散した生体分子を、液滴中に懸濁したビーズ上に捕捉する工程または手段を設けてもよい。つまり、液滴（回収溶液）が、生体分子と特異的に結合する分子が固定されたビーズを含むようにする。たとえば、生体分子が核酸（mRNA）

の場合にはその少なくとも一部の配列と相補的な配列を含む核酸（DNA）プローブをビーズに固定し、生体分子がタンパク質などの場合にはこれに特異的に結合する抗体をビーズに固定する。

[0037] 本開示の方法および装置は、回収された液滴から生体分子を採取する工程または手段をさらに有してもよい。また本開示の方法および装置は、回収された液滴から生体分子を採取し、該生体分子を増幅し、配列決定する工程または手段をさらに有してもよい。

[0038] さらに、回収後の反応効率を向上させるために、液滴中で生体分子を分解するなどの反応を行う工程または手段を含んでもよい。

[0039] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0040] [実施例 1]

本実施例は、レーザを用いてホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルから作成した組織切片中の一部の微小領域を破砕し、この領域中の生体分子を採取・回収・抽出する装置および方法に関する例である。

[0041] （組織切片上の特定の領域の生体分子を採取・回収する方法）

図 1 に本実施例で示す組織切片からの生体分子の採取・回収方法のフローを示す。以下の説明で（番号）は図 1 中の各ステップの番号を示す。

[0042] （1）まず、FFPEなどの樹脂で包埋したサンプルを組織切片にスライスし、試料台に配置する。このとき、組織切片は透明板（スライドガラスやカバーガラスなどのガラス板、透明な樹脂製の板など）に貼り付け固定した後に、この透明板を試料台に配置してもよい。このとき、透明板には位置合わせ用のマーカを設けることによって、試料台に対する位置を調整することが望ましい。細胞切片の代わりに、実施例 4 に記載のような凍結切片や培養細胞を使用することも可能である。

[0043] （2）次に、顕微鏡システムで組織切片の光学イメージ（画像データ）を取得する。このステップで、ユーザに光学イメージを示して、生体分子を採取すべき細胞または微小領域を指定させる。指定する細胞または微小領域は単

数でも複数でもよい。また、取得する光学イメージは、前処理としてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色や蛍光免疫染色などの染色を行い、組織切片上の採取すべき細胞や領域をユーザが指定しやすくすることが望ましい。本実施例では蛍光免疫染色法を採用した。そのため、顕微鏡システムは蛍光顕微鏡システムを採用した。HE染色の場合には通常の光学顕微鏡を用いればよい。顕微鏡システムは必要な解像度に合わせて必要なシステムを採用することが望ましい。その後、取得した光学イメージはコンピュータに読み込む。

[0044] （3）ユーザは組織切片の顕微鏡光学イメージが表示された画面上で、ポインティングデバイス等の入力装置を用いて採取すべき細胞または微小領域を指定する。指定された細胞または微小領域の位置情報は試料台に設定した座標軸上の値でコンピュータシステムが計算し、保存する。保存した位置座標情報は、組織切片を試料台から取り外したときまたは移動したときに失われるため、再度顕微鏡システムを用いて細胞または領域の位置を決定しなければならない。このような位置座標情報の不安定性を解消するために、組織切片を貼り付け固定した透明版上に少なくとも2箇所以上の位置合わせマーカを設置することが望ましい。これによって、透明板を試料台に設置したとき、この位置合わせマーカの試料台座標に対する位置情報を読み取ることによって、採取する領域の座標を決定した後に、透明板を試料台から移動しても、透明板上のマーカの試料台上の座標を再度読み取ることによって、指定した領域の試料台に対する位置座標を算出することができるため、再度細胞位置の決定を行う必要がなくなる。また、細胞または領域の指定に関しては、ユーザの代わりに取得した画像データを他のコンピュータシステムに転送し、このコンピュータシステムが画像解析を行って、採取する組織切片上の細胞や領域を指定してもよい。

[0045] （4）ユーザまたは他のコンピュータシステムが、組織切片上の細胞や領域を複数指定した場合、ユーザまたは他のコンピュータシステムがそれぞれの細胞や領域をどの順序でその中の生体分子を採取するかを決定する。分注・回収用ピペットシステムを用いて、生体分子回収溶液の液滴が、目標領域と

しての前記細胞または領域（の一つ）を含むまたは覆うかたちで形成されるように回収溶液を分注する。好ましくは、分注が完了後もピペットシステムの分注のノズル（チップ）の先端が液滴との接触を維持することによって、表面張力を利用して、液滴が組織切片上の該当領域から制御されずに移動することを防ぐようにする。

[0046] （５）パルスレーザを用いて目標領域の少なくとも一部に一定のエネルギーを照射することによって、パラフィンと生体組織はレーザ光の熱と圧力で破碎され、組織切片中の生体分子は（４）のステップで形成した液滴内に採取される。

[0047] （６）分注・回収用ピペットシステムで前記採取が完了した液滴を吸引し、所定の容器（チューブ）内に溶液を分注し回収する。

[0048] （７）事前に指定したすべての細胞または微小領域からの回収が完了するまで、（４）、（５）、（６）のステップを繰り返す。

[0049] （８）回収した溶液から、必要に応じて抽出ステップを実行したのち、計測（シーケンシング等）に必要なサンプル調製を行う。

[0050] （９）計測（シーケンシング等）とデータ解析を行い、光学イメージ（画像データ）と対応する。

[0051] 本発明では、上記ステップを実行することで、組織切片上の複数の特定の微小領域、好ましくは複数の単一細胞について、それぞれの領域または細胞における生体分子に関する解析を行うことが可能である。仮に、微小領域または単一細胞に隣接した複数の細胞をユーザが指定したとしても、指定された細胞や領域以外からの生体分子が混入したり、回収効率が低下しないようにするために、細胞同士が隣接した境界線の内側にレーザ光を照射して、指定した部分の切片を破碎する。レーザ光照射は、レーザ光を可能な限り小さい照射領域が得られるように集光し、領域または細胞を走査することによって指定した領域または細胞の破碎を行う。使用するレーザは、切片を破碎できるものであれば特に限定されるものではなく、パルスレーザ、連続発振レーザなどが挙げられるが、連続発振レーザよりパルスレーザが望ましい。特

にピコ秒オーダーのパルスレーザが望ましい。これはレーザ光の平均パワーを抑制し、1パルスあたりの光エネルギーを高めることができるため、レーザ光照射による切片を熱する効果を抑制し、光による圧力を加える効果を高めて切片を破碎し、照射部分を分散させる力を強めることができる。本実施例では数ピコ秒のパルス幅を持つパルスレーザを用いた。

[0052] 次に回収溶液について説明する。回収溶液は、生体分子回収後の処理方法、つまり計測用途に応じて、以下の3種類に分類される。第1の方法は、組織切片から分散したサンプルを溶液中に分散し、分注・回収用ピペットシステムで容器に回収する方法である。このとき、パラフィン等の組織切片を構成する樹脂を分散させる目的で塩や界面活性剤を混入させてもよい。また、切片表面やピペットや容器（チューブ）の内壁への非特異的な吸着を抑制するために界面活性剤を混和してもよい。また、容器（チューブ）に回収した後の、核酸やタンパク質を抽出する方法は一般的な抽出方法を用いることができる。

[0053] 第2の方法は、回収する生体分子と結合する分子を回収溶液中に混入させて、安定して高効率に回収する方法である。具体的には、回収しようとする生体分子がmRNAである場合は、オリゴdTプローブを固定した磁性ビーズを回収溶液に混和させて、mRNAを磁性ビーズ上のオリゴdTプローブとハイブリダイゼーションにより結合させて、この溶液を分注・回収用ピペットシステムで回収する。また、特定の遺伝子（mRNA）やノンコーディングRNAの場合には、遺伝子やノンコーディングRNAの一部の配列に相補的な配列を有する核酸プローブ（DNAプローブ）をビーズ上に固定し、液滴中でビーズ上に回収しようとするRNAを捕捉し、抽出溶液中に回収する。さらに、生体分子がタンパク質である場合には、回収しようとするタンパク質と特異的に結合する抗体をビーズ上に固定し、ターゲットのタンパク質を抗体で捕捉して溶液中で抽出する。このような第2の方法による生体分子を捕捉する前に、細胞や組織中の回収対象分子以外の分子を分解するための、プロテアーゼや界面活性剤を加えてレーザ照射した後に、ビーズを含む溶液を加えて、生体分子をビーズ上に捕

捉してもよい。また、前記のビーズが磁性ビーズである場合には、生体分子の抽出がより容易になる。すなわち、容器（チューブ）に回収溶液を分注してサンプルを回収したのちに、磁石を用いて、ビーズを容器の底に集めた後、上澄みを除去し、新たに抽出しようとする生体分子に好適な緩衝液を容器に分注することで、解析対象としている生体分子以外の分子を除去することが可能である。

[0054] 最後に第3の方法は、液滴中で生体分子と液滴（回収溶液）中の分子との間の反応を含む方法である。たとえば、回収しようとする生体分子がゲノムDNAの場合は、回収溶液として、DNAの断片化のための制限酵素と6~8塩基長のランダム配列を含むDNAプローブを固定したビーズを含む溶液を分注ピペットで分注してもよい。これによって、断片化されたDNAがビーズ上のプローブに捕捉されることとなり、第2の方法と同様な方法でゲノムDNAを抽出可能である。なお、この方法ではビーズは必ずしも必要ではない。

[0055] （組織切片の一部の領域から生体分子を採取する装置（パルスレーザを用いる））

次に組織切片上の複数の単一細胞または領域中から生体分子を採取・回収する装置について説明する。図2に装置の構成例を示した。装置は樹脂包埋した組織切片1を固定する試料台2と顕微鏡システム3とレーザ照射システム4、分注ピペットシステム5、溶液回収チューブ6、組織切片の顕微鏡イメージを表示する表示装置7とこれらのシステムを制御し取得した画像を保存し位置情報に変換するためのコンピュータシステム8およびこのコンピュータシステムに採取する細胞や領域を入力するための入力デバイス9から構成されている。この入力デバイスの代わりに細胞や領域を指定する他のコンピュータシステムをコンピュータシステム8に接続してもよい。以下に詳細を記す。

[0056] まず、試料台2周辺について記す。図3に試料台2の上面図を示す。本実施例では組織切片（FFPE）は透明なガラス板11の上に貼り付け固定されており、このガラス板11を試料台2に設置する。試料台2上には位置合わせ用のL字状の突起12が固定されており、ガラス板11をこれに合わせて設置することで、



加工精度の範囲内で、位置合わせが可能となる。この試料台2はガラス板面上の水平移動と面に垂直の移動をコンピュータシステム8で制御する。試料台の移動は3軸のモータドライブステージ13で実施する。また、上述したように、ガラス板11上に顕微鏡システムで確認できるマーカ14を4つ設定し、ガラス板を固定後に4つのマーカの座標を顕微鏡システムによって取得する。この座標は、試料台2に対する相対的な前記3軸の座標である。また、同時に、組織切片上の採取すべき細胞または微小領域の位置の座標を試料台に対する前記マーカに対する相対的な座標を取得する。一度、ガラス板11を取り外して、試料台2に対するガラス板11の位置がずれたとしても、ガラス板上のマーカの試料台に対する座標を顕微鏡システムで計測することで、前記指定した領域または細胞のマーカに対する相対座標を用いて、指定領域または細胞の位置の試料台に対する座標を算出することができる。

[0057] また、レーザ照射システムの対物レンズによる集光能力を高めるために開口数が大きくワーキングディスタンスが小さい対物レンズを用いる場合には、ガラス板11を薄くするとともに、試料台2に図4の15で示す領域を切り抜きにして対物レンズがガラス板11の裏面近傍まで近づけるようにする。

[0058] 顕微鏡システム3は本実施例では蛍光顕微鏡システムを採用しているが、微分干渉顕微鏡や位相差顕微鏡、レーザ励起協焦点蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、大気圧走査型電子顕微鏡などさまざまな顕微鏡システムを用いることもできる。本実施例で用いた蛍光顕微鏡システム3は対物レンズ21、蛍光励起用レーザ（波長488nm）22、蛍光と（散乱した）レーザ励起光を波長で分離するためのダイクロイックミラー23、ダイクロイックミラーを通過した励起光を波長で除去し、蛍光のみを通過させるバンドパスフィルタ24、CCDカメラ25とカメラの撮像素子上に結像蛍光を結像させる結像レンズ26から構成されている。カメラの撮像エリアはモータドライブステージ27によって試料台2に対して、移動させることができる。

[0059] レーザ照射システム4は、レーザ光を集光する対物レンズ31、パルスレーザ32、レーザ光と蛍光を分離するダイクロイックミラー33、結像レンズ35と撮

像素子36から構成される。撮像素子で蛍光スポットのサイズを計測することで、レーザ光の集光の状態を確認することができる。パルスレーザの波長は532nmでパルス幅は10psec程度、パルスエネルギーは1p~10 $\mu$ Jまで可変なレーザモジュールを用いた。採取する細胞や領域のサイズ、切片の厚さ、組成等に合わせて調整する。

[0060] 回収溶液の分注・回収のための分注ピペットシステム5は回収溶液41を適切な位置に分注し、レーザの照射の間、形成された液滴をチップの先端の表面張力を使って保持し、その後、液滴を回収し、適切な容器6に分注・回収するためのシステムである。FFPE切片は親水性が低く、接触角が大きいため、小さい領域を覆うような液滴を形成することが可能であり、液滴形成時には親水性の高い核酸などが溶け出しにくい。一方、レーザで破碎後は、該当の領域は分散され、生体分子のうちDNAやRNAは極性溶媒である水によく溶けるため、生体分子は回収溶液中に水和して安定化する。また、樹脂片から核酸が回収溶液中に溶出されない場合でも界面活性剤が回収溶液中に存在することによって、組織切片への再吸着を防止することができ、効率よく回収溶液中に生体分子を回収することが可能である。ピペットシステム5は、ピペットの先端に使い捨てチップ（樹脂製のコーン型分注用円筒）42をとりつけ、吸引用モータドライブ44を用いて、チップ42を回収溶液を保存するボトルに移動させ、ボトルから回収溶液を所定の量だけ吸引する。次に、ステップ（3）で指定した細胞または領域を含むように液滴を組織切片上に分注する。分注後、液滴が組織切片上を移動しないようにするために、形成した液滴に分注に用いたチップ42の先端が接触する高さを維持するようにする。レーザによる指定の領域または細胞の破碎が完了後、組織切片上の液滴をピペット中に吸引し、指定の容器6に吐出する。また、液滴分注後、別の種類の溶液を追加する場合は、溶液ボトルから溶液や試薬を吸引するときに、第1の溶液を吸引後に空気を吸引し、さらに第2の溶液を吸引することで第1と第2の溶液の混合を防ぐようにする。組織切片上に液滴を形成するときには第1の溶液を分注後、所定のプロセスの後、第2の溶液を分注するようにする。2種類以上の溶液

を分注する場合、チップ42以外に液滴を安定用ニードル45とこのニードルを移動させるモータドライブ46を設置することによって、チップが液滴から離れて試薬ボトルに移動しているあいだも、液滴を安定させることができる。このとき液滴安定用ニードルの先端は親水的な表面を持つことが望ましい。

[0061] 組織切片上の所定の細胞や領域を指定するためにコンピュータシステム8に接続した表示装置7上に組織切片1の蛍光顕微鏡像（顕微鏡の種類によって像の種類も変わる）を表示する。ここで生体分子を採取したい細胞（または領域）51を入力デバイス9を用いて指定する。切片上の複数の細胞や領域を指定してもよい。コンピュータ上で51の領域の試料台上での位置座標（範囲）と試料台の位置座標の情報から走査すべきレーザフォーカス位置52の範囲を算出する。レーザフォーカス位置走査範囲はレーザのフォーカス領域の大きさなどから事前にコンピュータシステムに保存したパラメータをもちいる。たとえば、指定した範囲より $0.3\mu\text{m}$ ほど内側の領域をフォーカスの中心が走査するように制御する。レーザフォーカス位置制御には試料台をモータドライブ13を用いて制御してもよいが、レーザ照射システムの中にガルバノスキャナを設置して、パルスレーザのフォーカス位置を走査してもよい。

[0062] また、複数の細胞または領域を指定した場合は、生体分子を採取する（レーザ光を照射する）順序も入力デバイスを用いて指定することができる。

[0063] [実施例2]

本実施例は分注回収用ピペットシステム上の分注チップが複数配置された場合の装置構成に関するものである。

[0064] 図5に装置例を示す。この例では4つのチップ42が分注ピペットシステム5に装着されて、4箇所の領域または細胞からの採取を並列に行うことができる。回収溶液を組織切片上の指定した4箇所の領域または細胞を覆うように分注後、これらの溶液が混ざらないように、少量の回収溶液を分注する。組織切片を作成する場合の樹脂表面は親水度が低い（撥水度が高い）ことが望ましい。

[0065] [実施例3]

本実施例は、振動発生デバイス（超音波ニードル）を用いて組織切片を破碎する例である。図2のレーザ照射システムの代わりに、振動発生デバイスとして超音波を組織切片の特定の位置に印加するためのシステムを設置している。図6に装置の構成例を示す。圧電素子61に圧電ニードル（硬度の高い金属ニードルまたはセラミック製のニードル）63を固定し、超音波振動が組織切片の特定の領域または細胞中の一部の領域に伝わる構成にする。特定の領域または細胞に超音波を印加するためにニードルをモータドライバ62で印加位置を選択する。超音波振動発生させるために特定の周波数の高周波を発生させる高周波発生装置64を圧電素子（超音波素子）に接続した。ここで示した装置では、超音波印加システムは顕微鏡システムと組織切片に対して同じ側に配置しなければならないため、顕微鏡システムを用いて光学イメージを取得し、生体分子を採取する領域または細胞を指定した後に、対応する座標に対して、超音波が印加させるようにコンピュータシステム8を用いてモータドライブ62を制御する。超音波振動を用いることによって、物理的振動が直接組織切片に伝達されるため、生体分子への影響を最小限に抑えて、組織を破碎することができる。

[0066] [実施例4]

本実施例は実施例1に記載の装置を基礎として、凍結切片およびシャーレ上培養細胞からの生体分子を採取する例である。実施例2のように液滴形成を複数にすることも可能であるとともに、実施例3のようにレーザによらず超音波を使った破碎を併用することも可能である。

[0067] FFPEと凍結切片および培養細胞の相違は、切片が疎水性の材料に埋め込まれていないことである。そのため、凍結切片または培養細胞上に液滴形成ができず、一部に破碎した細胞が混入していると、液滴中に破碎した細胞中の生体分子が混入してしまうという問題が生じることもある。そのような場合には、撥水性（または疎水性）薄膜を凍結切片または培養細胞上に形成する。図7にシステム構成図の例を示す。これは、ほぼ図2の構成と同じであるが、切片がFFPEから乾燥後の凍結切片71に置き換わり、その上に1 $\mu$ m以下の

撥水性樹脂膜72を塗布している。FFPE切片から脱パラフィン処理をして得られる切片を使用する場合には、凍結切片と同様に撥水性薄膜を塗布する必要がある。本実施例ではUVを照射することによって硬化するシリコーン樹脂を用いた。この樹脂は硬化前は液状であり、凍結切片71上に滴下し、スピコート（たとえば5000rpm 30sec）し、 $0.3\mu\text{m}$ の薄膜を形成し、UVライト（365nmのUV光で $2\text{J}/\text{cm}$ ）照射することで撥水性樹脂膜を形成した。シリコーン樹脂材料としては、UV硬化PDMSまたはラジカル重合型シリコーンが挙げられる。後者を使用するときは窒素雰囲気中でのUV照射を行った。

[0068] 薄膜の厚さは、溶液状態のときの粘度とスピコート時の回転数で制御できる。薄膜の厚さは $0.05\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ が望ましい。特に、 $0.2\mu\text{m}\sim 0.5\mu\text{m}$ が望ましい。

[0069] 撥水性薄膜の撥水性の度合いは液滴を形成したときに、液滴があまり大きくならないようにするために必要であり、接触角で評価して、30度以上180度以下であることが望ましい。特に、液滴サイズの制御には、分注量を少なくして、接触角が70度程度以上であれば、図7のチップ42の先端のサイズ（外径）を分注する液滴サイズとほぼ同程度にすることが可能であり、液滴と薄膜との接触面積を減らすことが可能である。このとき、チップ42の先端（下端）と撥水性薄膜表面の距離は液滴の半径と同程度に設定する。

[0070] また、薄膜は、顕微鏡観察のために透明である（光を5%以上透過する）必要がある。透過する光の波長は顕微鏡中で使われる照明または励起レーザーの波長である。また、撥水性の定義は、接触角で定義し、本発明では接触角が45度以上（ここで、接触角の定義は、液滴の高さが観測できない状態の接触角を0度とし、液滴と薄膜と空気の境界における液滴と空気の境界に沿った接線と平坦な薄膜上面のなす角度で定義する）の薄膜と溶液の組み合わせを撥水膜とする。

## 符号の説明

[0071] 1…組織切片、2…試料台、3…顕微鏡システム、4…レーザー照射システム、5…分注ピペットシステム、6…溶液回収チューブ、7…表示装置、8…コンピュ

ータシステム、9…入力デバイス、21…対物レンズ、22…蛍光励起用レーザ、23…ダイクロイックミラー、24…バンドパスフィルタ、25…CCDカメラ、26…結像レンズ、27…モータドライブステージ、31…対物レンズ、32…パルスレーザ、33…ダイクロイックミラー、35…結像レンズ、36…撮像素子、41…回収溶液、42…チップ、44…吸引用モータドライブ、45…安定用ニードル、46…モータドライブ、51…指定した細胞または領域、52…レーザフォーカス位置

11…ガラス板、12…突起、13…モータドライブステージ、14…マーカ、15…切り抜き領域

61…圧電素子、62…モータドライバ、63…圧電ニードル、64…高周波発生装置

71…凍結切片、72…撥水性樹脂膜

## 請求の範囲

- [請求項1] 組織切片の特定の領域から生体分子を採取するための装置であって、
- 組織切片を固定する試料台、
- 前記組織切片の光学イメージを取得する顕微鏡システム、
- 前記組織切片の特定の領域の少なくとも一部を破碎するエネルギー印加システム、
- 前記組織切片上に液滴を形成する分注ピペットシステム、
- 前記顕微鏡システムで取得した光学イメージ上で前記組織切片上の前記特定の領域を指定するコンピュータシステム
- を備え、前記液滴に、破碎された前記特定の領域からの生体分子が溶解または分散することを特徴とする装置。
- [請求項2] 前記エネルギー印加システムが、パルスレーザを含むレーザ照射システム、または圧電素子を含む振動発生デバイスである、請求項1に記載の装置。
- [請求項3] 前記組織切片上に形成した液滴の位置を安定化させるための針状部品、および
- 前記針状部品を前記組織切片の表面近傍に維持する機構
- をさらに備える、請求項1に記載の装置。
- [請求項4] 前記試料台には、前記組織切片を貼り付けた透明板を固定することができ、
- 前記コンピュータシステムが、前記透明板上のマーカを認識する機構を備える、請求項1に記載の装置。
- [請求項5] 前記特定の領域が単一細胞または微小領域である、請求項1に記載の装置。
- [請求項6] 前記組織切片がホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片である、請求項1に記載の装置。
- [請求項7] 前記組織切片が、凍結切片または培養細胞とその上に配置された撥

水性薄膜とから構成されるものである、請求項 1 に記載の装置。

- [請求項8] 組織切片の特定の領域から生体分子を採取する方法であって、  
組織切片を顕微鏡観察する工程、  
前記組織切片の特定の領域を指定する工程、  
形成される液滴が前記特定の領域を含むように前記組織切片上に回収溶液を分注し、液滴を形成する工程、  
前記液滴が前記組織切片上に存在する状態で前記特定の領域の少なくとも一部にエネルギーを印加する工程、  
前記液滴を回収する工程  
を含むことを特徴とする方法。
- [請求項9] エネルギーの印加がレーザー光照射または超音波照射である、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項10] 前記液滴中に核酸プローブが含まれる、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項11] 前記液滴中にビーズに固定された核酸プローブが含まれる、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項12] 前記液滴中にビーズに固定された抗体が含まれる、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項13] 前記組織切片が凍結切片であり、該凍結切片上に撥水性薄膜を形成し、該撥水性薄膜上に液滴を形成する工程をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項14] 基板上に接着した培養細胞の特定の細胞中の生体分子を採取する方法であって、  
基板上に接着した培養細胞上に撥水性薄膜を形成する工程、  
前記培養細胞を顕微鏡観察する工程、  
前記培養細胞の特定の細胞を指定する工程、  
形成される液滴が前記特定の細胞を含むように前記撥水性薄膜上に回収溶液を分注し、液滴を形成する工程、  
前記液滴が前記撥水性薄膜上に存在する状態で前記特定の細胞の少

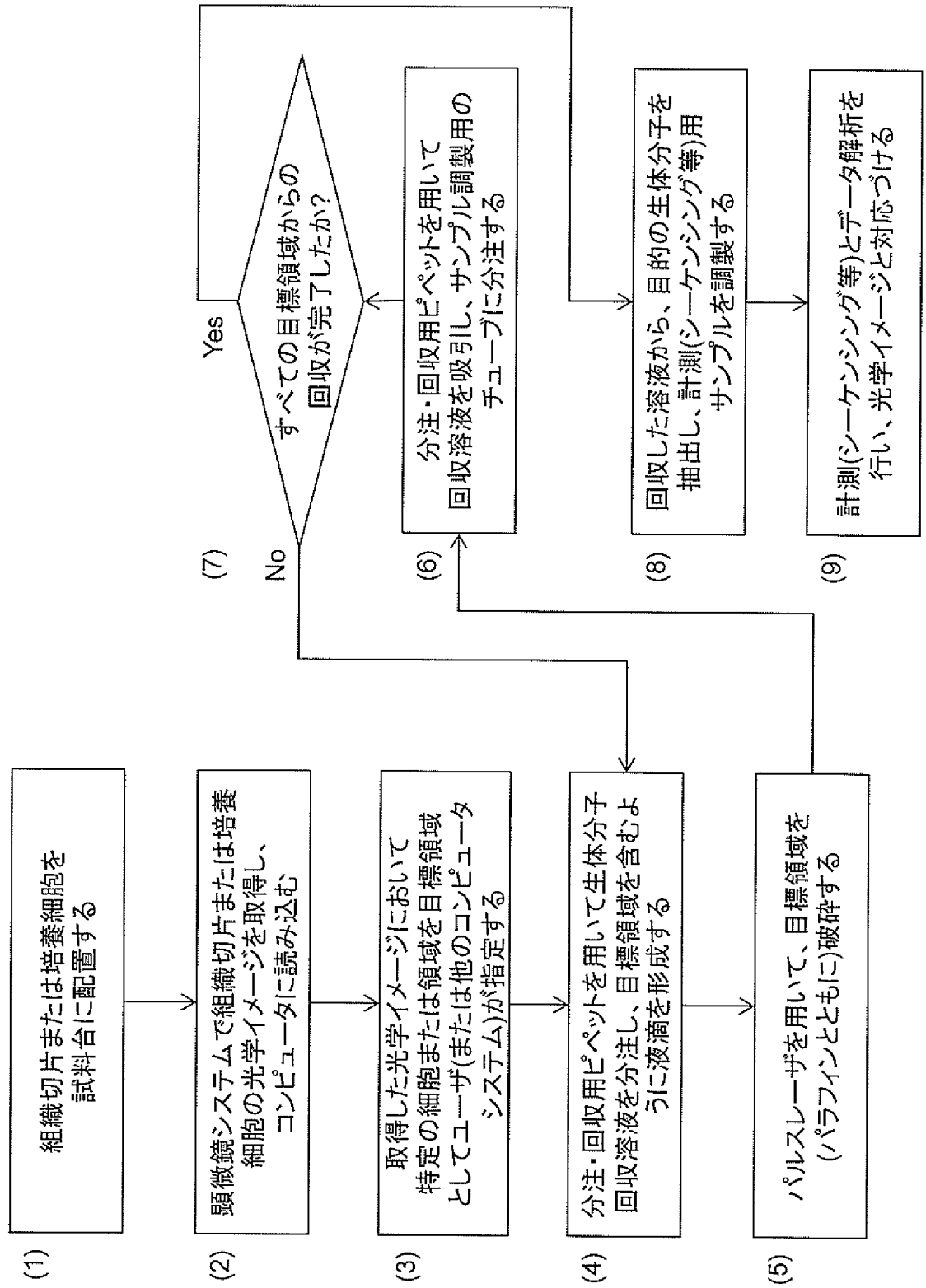


なくとも一部にエネルギーを印加する工程、  
前記液滴を回収する工程  
を含むことを特徴とする方法。

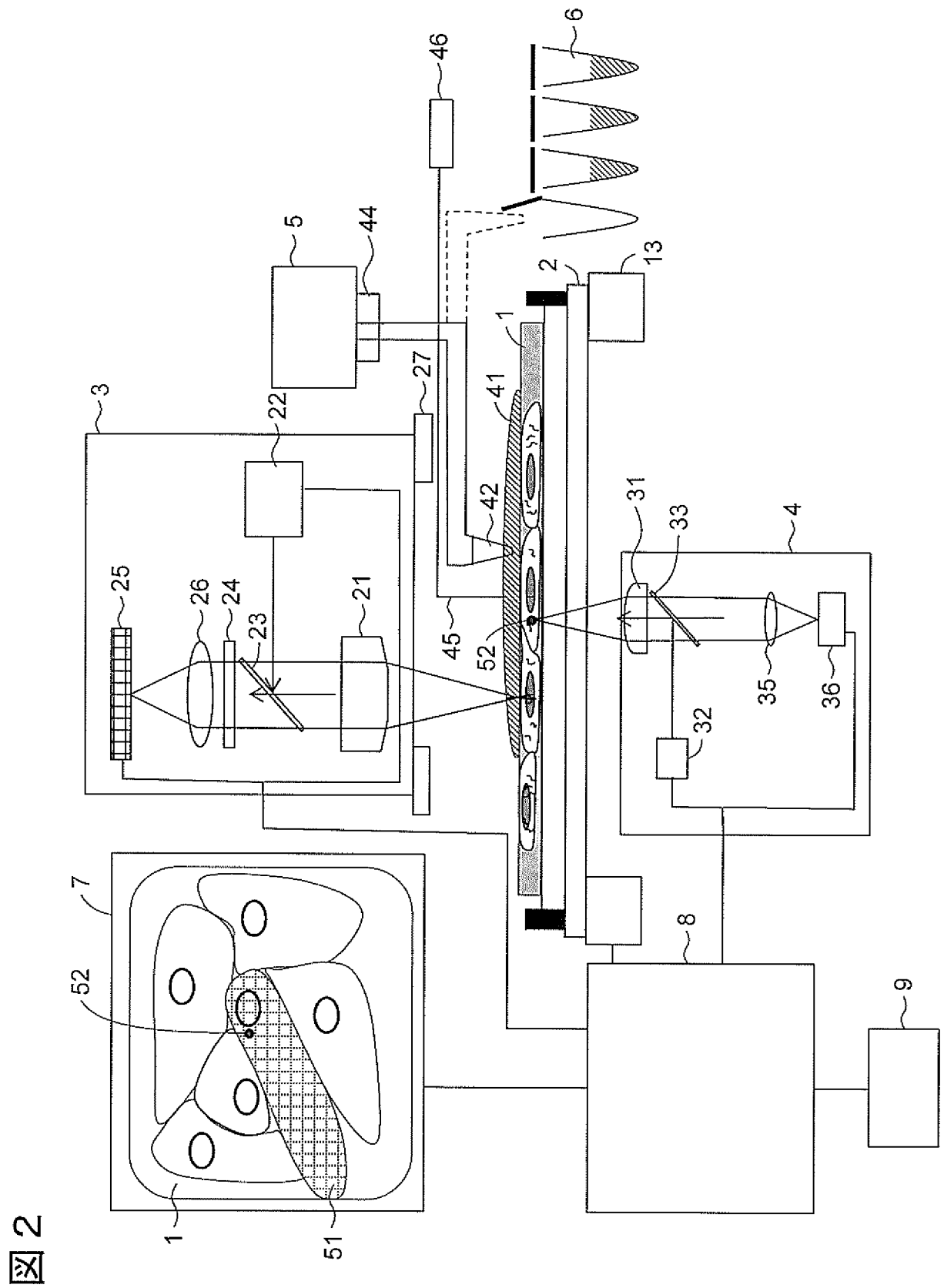
[請求項15] 前記回収された液滴から生体分子を採取する工程、および／または  
前記回収された液滴から生体分子を採取し、該生体分子を増幅し、  
配列決定する工程  
をさらに含む、請求項8または14に記載の方法。

図 1

図 1

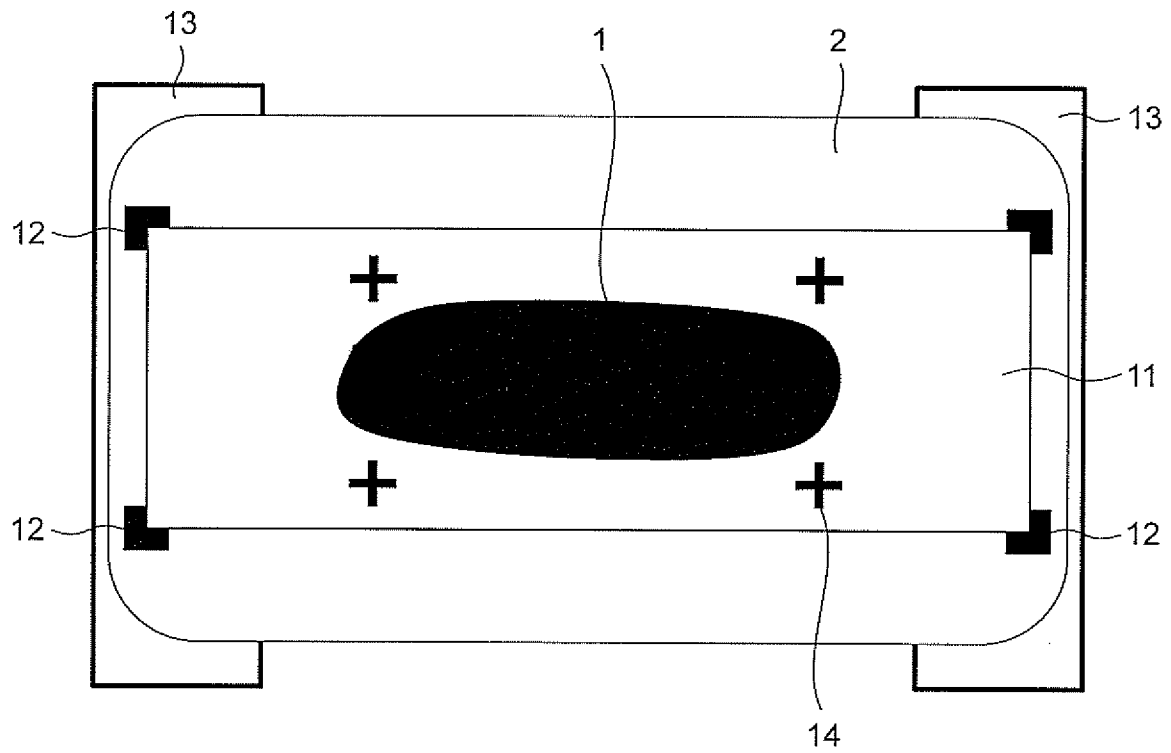


[図2]



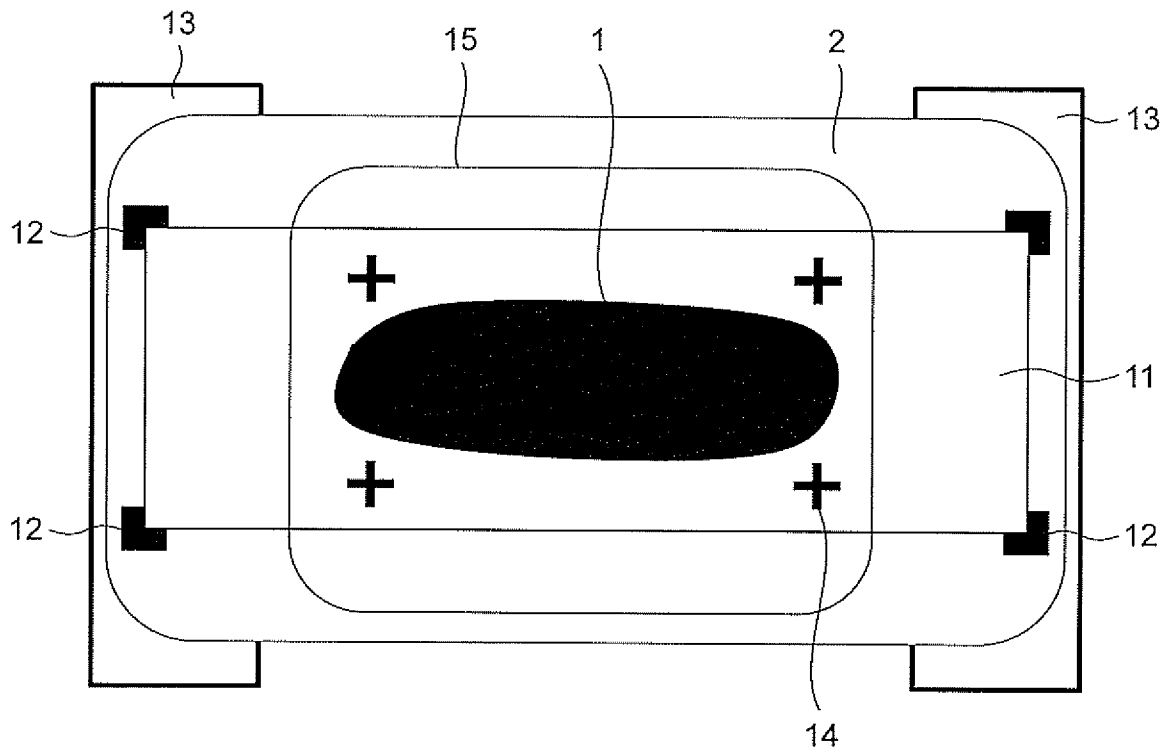
[図3]

図 3



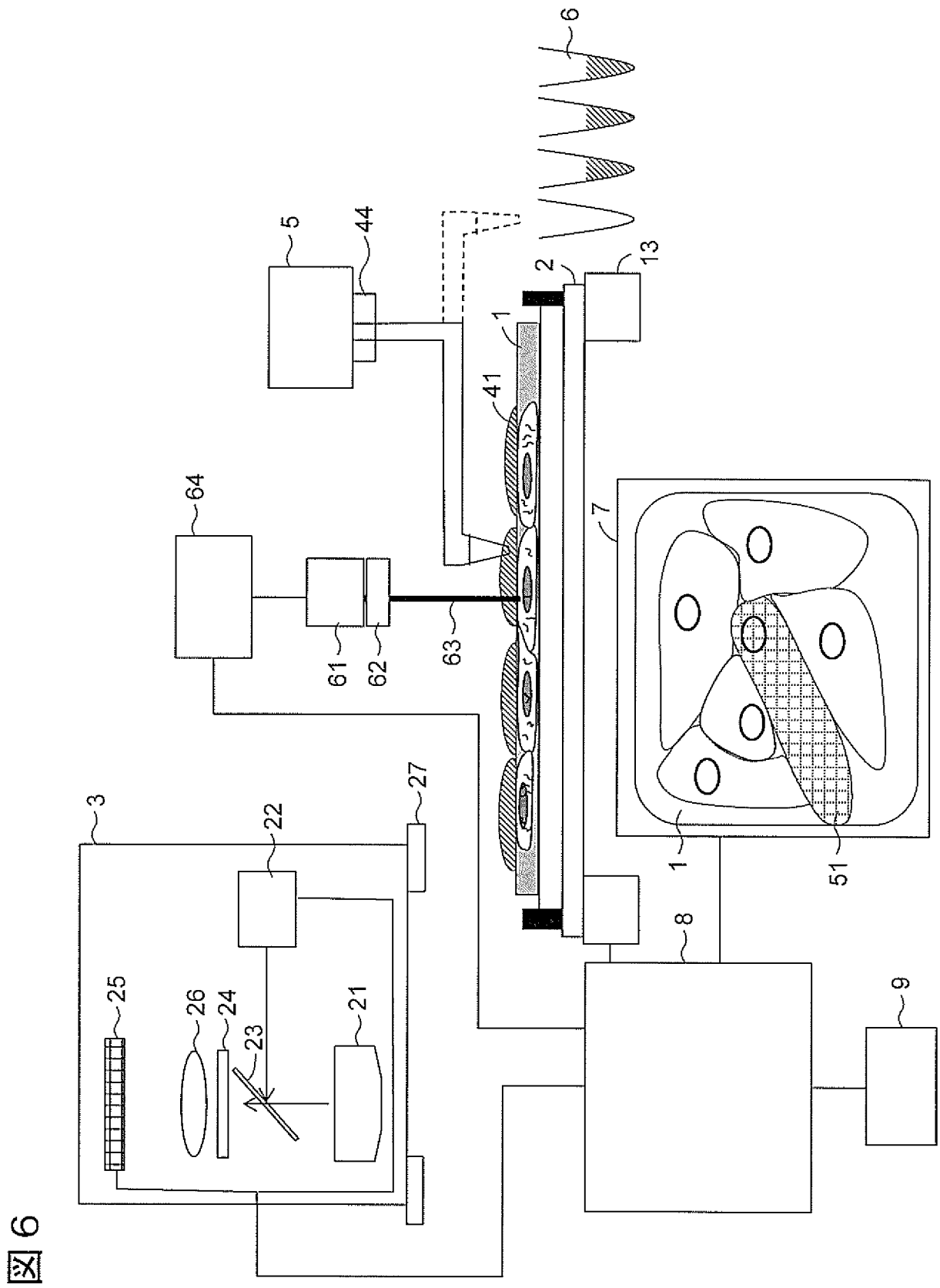
[図4]

図 4





[図6]







**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/036964

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C12M1/26(2006.01) i, C12M1/42(2006.01) i, C12Q1/6844(2018.01) i, G01N1/28(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)

Int.Cl. C12M1/26, C12M1/42, C12Q1/6844, G01N1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2018 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2018 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2018 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                              | Relevant to claim No.     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Y<br>A    | WO 2015/097858 A1 (HITACHI, LTD.) 02 July 2015, claims, paragraphs [0009], [0014], [0015], [0024]-[0040], fig. 1, 11 & US 2017/0016814 A1, claims, paragraphs [0012], [0033], [0034], [0043]-[0059], fig. 1, 11 | 1-6, 8-12, 15<br>7, 13-14 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "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                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "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                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "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 |
| "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) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "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                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                         |                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>17.12.2018 | Date of mailing of the international search report<br>08.01.2019 |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|

|                                                                                                                          |                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japan Patent Office<br>3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,<br>Tokyo 100-8915, Japan | Authorized officer<br><br>Telephone No. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/036964

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                    | Relevant to claim No.     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Y<br>A    | JP 2003-130866 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.)<br>08 May 2003, claims 1-2, paragraphs [0001],<br>[0009], [0024]<br>& US 2003/0081209 A1, claims 1-2, paragraphs<br>[0001], [0011], [0012], [0030] | 1-6, 8-12, 15<br>7, 13-14 |
| A         | JP 2006-101718 A (ONCHIP CELLOMICS CONSORTIUM) 20<br>April 2006, claims<br>& US 2007/0059763 A1, paragraph [0176], fig. 142 &<br>EP 1626278 A2                                                        | 1-15                      |
| A         | JP 2017-138263 A (AKITA UNIV) 10 August 2017,<br>claims<br>(Family: none)                                                                                                                             | 1-15                      |
| A         | JP 2002-505856 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF<br>CALIFORNIA) 26 February 2002, claims<br>& US 6156576 A & WO 2001/007910 A1, claims & KR<br>10-2001-0074440 A                                    | 1-15                      |

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12M1/26(2006.01)i, C12M1/42(2006.01)i, C12Q1/6844(2018.01)i, G01N1/28(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. C12M1/26, C12M1/42, C12Q1/6844, G01N1/28

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

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2018年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2018年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2018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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号            |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Y<br>A          | WO 2015/097858 A1（株式会社日立製作所）2015.07.02,<br>請求の範囲、[0009]、[0014]-[0015]、[0024]-[0040]、<br>図1、図11<br>& US 2017/0016814 A1, 請求の範囲、[0012]、[0033]-[0034]、<br>[0043]-[0059]、図1、図11 | 1-6, 8-12, 15<br>7, 13-14 |

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

|                                                              |                                                                    |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| * 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<br>17.12.2018 | 国際調査報告の発送日<br>08.01.2019 |
|--------------------------|--------------------------|

|                                                                        |                           |    |      |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----|------|
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ISA/J P）<br>郵便番号100-8915<br>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）<br>吉田 知美  | 4B | 3335 |
|                                                                        | 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |    |      |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                    |                           |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号            |
| Y<br>A                | JP 2003-130866 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 2003.05.08,<br>請求項1～2、[0001]、[0009]、[0024]<br>& US 2003/0081209 A1, 請求項1～2、[0001]、[0011]-[0012]、<br>[0030]      | 1-6, 8-12, 15<br>7, 13-14 |
| A                     | JP 2006-101718 A (有限責任中間法人 オンチップ・セラミクス・<br>コンソーシアム) 2006.04.20,<br>請求の範囲<br>& US 2007/0059763 A1, [0176]、図142 & EP 1626278 A2                      | 1-15                      |
| A                     | JP 2017-138263 A (国立大学法人秋田大学) 2017.08.10,<br>請求の範囲<br>(ファミリーなし)                                                                                    | 1-15                      |
| A                     | JP 2002-505856 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテイ<br>オブ カリフォルニア) 2002.02.26,<br>請求の範囲<br>& US 6156576 A & WO 2001/007910 A1, 請求の範囲<br>& KR 10-2001-0074440 A | 1-15                      |