

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/181488

発行日 令和2年2月6日 (2020. 2. 6)

(43) 国際公開日 平成30年10月4日 (2018. 10. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 1/00 (2006.01)	GO 1 N 1/00 1 O 1 G	2 G O 5 2
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 1	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	GO 1 N 21/78 C	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2019-509984 (P2019-509984)	(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/JP2018/012795	
(22) 国際出願日 平成30年3月28日 (2018. 3. 28)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-64794 (P2017-64794)	(74) 代理人 230104019 弁護士 大野 聖二
(32) 優先日 平成29年3月29日 (2017. 3. 29)	(74) 代理人 100149076 弁理士 梅田 慎介
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(72) 発明者 野地 博行 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
	(72) 発明者 小野 堯生 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小物質検出方法及び微小物質検出用デバイス

(57) 【要約】

簡易な操作で、核酸、タンパク質、ウイルス及び細胞等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、高感度な検出を可能とするための技術として、互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を検出する方法であって、(1) 前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、(2) 上記空間にガスを導入して、前記レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、(3) 前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び/又は磁氣的に検出する手順と、を含む、方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を検出する方法であって、

(1) 前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、

(2) 上記空間にガスを導入して、前記レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、

(3) 前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する手順と、を含む、方法。

10

【請求項 2】

互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を発色基質の吸光度変化及び / 又は蛍光に基づいて光学的に検出する方法であって、

(1) 前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、

(2) 上記空間にガスを導入して該空間内の前記溶媒をガスで置換するとともに、レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、

(3) 前記液滴内に存在する前記発色基質の吸光度変化及び / 又は蛍光を検出する手順と、を含む、方法。

20

【請求項 3】

前記液滴の蒸散を抑制する手段を含む、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記レセプタクルのアスペクト比が 1 以上である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記手順 (2) の前段に、前記ガスを水と接触させる手順をさらに含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

前記下層部に、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたりザーバが形成されている、請求項 3 記載の方法。

30

【請求項 7】

前記手順 (2) 及び手順 (3) が湿潤環境下で行われる、請求項 3 記載の方法。

【請求項 8】

前記溶媒が高水和性物質を含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 9】

微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板と、

該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、

該空間にガスを導入する送気部と、

前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する検出器と、を備える、物質検出用デバイス。

40

【請求項 10】

前記液滴の蒸散を抑制する手段を有する、請求項 9 記載のデバイス。

【請求項 11】

前記レセプタクルのアスペクト比が 1 以上である、請求項 10 記載のデバイス。

【請求項 12】

前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、請求項 10 記載のデバイス。

50

【請求項 13】

前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたりザーバを前記下層部に備える、請求項 10 記載のデバイス。

【請求項 14】

前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバを備える、請求項 10 記載のデバイス。

【請求項 15】

微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板を搭載可能であり、

該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、

該空間にガスを導入する送気部と、

前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する検出器と、を備える、物質検出用デバイス。

10

【請求項 16】

前記液滴の蒸散を抑制する手段を有する、請求項 15 記載のデバイス。

【請求項 17】

前記レセプタクルのアスペクト比が 1 以上である、請求項 16 記載のデバイス。

【請求項 18】

前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、請求項 16 記載のデバイス。

20

【請求項 19】

前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたりザーバを前記下層部に備える、請求項 16 記載のデバイス。

【請求項 20】

前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバを備える、請求項 16 記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、微小物質検出方法及び微小物質検出用デバイスに関する。より詳しくは、基板上に互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に微小物質が封入された微小な液滴を形成し、該液滴内に存在する微小物質を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

疾患や感染症等の診断のため、核酸、タンパク質、ウイルス及び細胞等のマーカーを迅速、簡便、かつ高感度に検出するための技術が求められている。例えば、体積 1mm^3 の腫瘍に含まれる 100 万個の癌細胞からマーカータンパク質（各細胞から 100 分子ずつ）が 5 L の血中に分泌された場合、マーカータンパク質の血中濃度は 30aM 程度である。

40

【0003】

このような技術として、核酸、タンパク質、ウイルス及び細胞等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、標識抗体を用いた免疫学的手法によって検出する「一分子酵素アッセイ」がある。一分子酵素アッセイによれば、検出対象物質を一分子単位の感度で検出することができる。

【0004】

特許文献 1 には、一分子酵素アッセイに応用可能な技術として、「ビーズを 1 個のみ収容可能な複数の収容部が、疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、当該下層部における当該収容部が形成されている面に対向している上層

50

部との間の空間に、当該ビーズを含む親水性溶媒を導入するビーズ導入工程と、上記ビーズ導入工程の後に上記空間に疎水性溶媒を導入する疎水性溶媒導入工程とを含むことを特徴とするビーズ封入方法」が開示されている。

【0005】

特許文献1に開示される技術は、「複数の収容部が疎水性の上面を有する側壁によって互いに隔てられて形成されている下層部と、上記下層部における上記収容部が形成されている面に対して空間を隔てて対向している上層部とを備えていることを特徴とするアレイ」を用いるものであり、下層部と上層部が空間を隔てて対向するフローセル構造を有するアレイを用いるものである。この技術によれば、「多数のビーズをアレイに効率よく封入させることができるので、低濃度のターゲット分子を高感度に検出可能」とされている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開2012/121310号

【特許文献2】特開2004-309405号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、簡易な操作で、核酸、タンパク質及びウイルス等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、高感度な検出を可能とするための技術を提供することを主な目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記の課題を解決するために、本発明は、以下の[1]～[20]を提供する。

[1] 互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を検出する方法であって、

(1) 前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、

(2) 上記空間にガスを導入して、前記レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、

30

(3) 前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び/又は磁氣的に検出する手順と、を含む、方法。

[2] 互いに隔てられて形成された複数のレセプタクル内に収容された微小物質を発色基質の吸光度変化及び/又は蛍光に基づいて光学的に検出する方法であって、

(1) 前記レセプタクルが形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、の間の空間に、前記微小物質を含む溶媒を導入する手順と、

(2) 上記空間にガスを導入して該空間内の前記溶媒をガスで置換するとともに、レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順と、

40

(3) 前記液滴内に存在する前記発色基質の吸光度変化及び/又は蛍光を検出する手順と、を含む、方法。

[3] 前記液滴の蒸散を抑制する手段を含む、[1]又は[2]の方法。

[4] 前記レセプタクルのアスペクト比が1以上である、[3]の方法。

[5] 前記手順(2)の前段に、前記ガスを水と接触させる手順をさらに含む、[3]の方法。

[6] 前記下層部に、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたりザーバが形成されている、[3]の方法。

[7] 前記手順(2)及び手順(3)が湿潤環境下で行われる、[3]の方法。

[8] 前記溶媒が高水和性物質を含む、[3]の方法。

50

【 0 0 0 9 】

[9] 微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板と、

該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、

該空間にガスを導入する送気部と、

前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する検出器と、を備える、物質検出用デバイス。

[1 0] 前記液滴の蒸散を抑制する手段を有する、[9]のデバイス。

[1 1] 前記レセプタクルのアスペクト比が1以上である、[1 0]のデバイス。

[1 2] 前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、[1 0]のデバイス。

[1 3] 前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたりザーバを前記下層部に備える、[1 0]のいずれかのデバイス。

[1 4] 前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバ を備える、[1 0]のデバイス。

【 0 0 1 0 】

[1 5] 微小物質を収容可能なレセプタクルが、互いに隔てられて複数形成されている下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向する上層部と、を備える基板を搭載可能であり、

該基板の前記下層部と前記上層部との間の空間に溶媒を導入する送液部と、

該空間にガスを導入する送気部と、

前記レセプタクル内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する検出器と、を備える、物質検出用デバイス。

[1 6] 前記液滴の蒸散を抑制する手段を有する、[1 5]のデバイス。

[1 7] 前記レセプタクルのアスペクト比が1以上である、[1 6]のデバイス。

[1 8] 前記送気部が、前記ガスが水と接触させられるタンクを備える、[1 6]のデバイス。

[1 9] 前記基板が、前記溶媒を内部に保持可能であり、その内容積が前記レセプタクルの内容積よりも大きくされたりザーバを前記下層部に備える、[1 6]のデバイス。

[2 0] 前記基板を湿潤環境下に維持するチャンバ を備える、[1 6]のデバイス。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 1 】

本発明により、簡易な操作で、核酸、タンパク質及びウイルス等の検出対象物質を極小容積の液滴中に封入し、高感度な検出を可能とするための技術が提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 - 1 】本発明に係る物質検出方法の手順を説明する図である。

【 図 1 - 2 】本発明に係る物質検出方法の手順を説明する図である。

【 図 2 】ウイルスの粒子表面に存在する酵素と発色基質との反応による反応生成物を説明するための図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 3 】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【 0 0 1 4 】

本発明に係る物質検出方法は、以下の手順 (A) ~ (C) を含む。

(A) レセプタクルが形成されているアレイ下層部と、当該下層部における当該レセプタクルが形成されている面に対向するアレイ上層部と、の間の空間に、微小物質を含む溶媒

10

20

30

40

50

を導入する手順（物質導入手順）。

（B）前記空間にガスを導入して該空間内の前記溶媒をガスで置換するとともに、レセプタクル内に、前記微小物質を包含する、溶媒の液滴を形成する手順（物質収容手順）。

（C）前記液滴内に存在する前記微小物質を光学的、電氣的及び/又は磁氣的に検出する手順（検出手順）。

【0015】

以下、本発明に係る物質検出方法の各手順について説明する。

【0016】

[検出対象物質]

本発明に係る物質検出方法等において、検出対象となる微小物質（microscopic body、以下「ターゲット物質」とも称する）は、レセプタクルに収容可能な大きさの物質であれば特に限定されない。ターゲット物質は、核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体、並びにウイルス等であってよい。ターゲット物質は、各種の疾患又は感染症のマーカーとなり得る、核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体であることが好ましい。

【0017】

核酸には、DNA及びRNA等の天然核酸及びLNA及びPNA等の人工核酸が含まれ、これらの重合体も含まれる。

【0018】

ターゲット物質は、担体に保持されたものであってもよい。担体としては、マイクロビーズが汎用されている。本発明において、「マイクロビーズ」は、「粒子」と同義に用いられ、当技術分野において慣用技術である。マイクロビーズの形状は、特に限定されないが、通常球形とされる。マイクロビーズの材料も、特に限定されず、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ポリプロピレン、メンブレン及び磁性体などであってよい。具体的な材料として、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルとアクリルアミドとのコポリマー、ジビニルベンゼン等と架橋されたポリスチレン、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレンデキストラン、ゴム、ケイ素、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然スポンジ、シリカゲル、ガラス、金属プラスチック、セルロース、架橋デキストラン（Sephadex（商標））およびアガロースゲル（セファロース（商標））などが挙げられる。ビーズは、多孔性であってよい。ビーズは、平均粒子径5 μ m以下であることが好ましく、例えば1 μ m～4 μ m程度とされる。なお、平均粒子径は、例えば電子顕微鏡観察又は動的光散乱法を用いて測定することができる。

【0019】

[アレイ]

本発明に係る物質検出方法に用いられるデバイスのアレイ1（図1（A）参照）は、ターゲット物質を収容する、複数のレセプタクル112が形成された下層部1aと、下層部1aに対向する上層部1bとを含んでなる。下層部1aと上層部1bは、空間1cを挟んで対向する。各レセプタクル112は、側壁113によって互いに隔てられている。各レセプタクル112は、側壁113と側壁113との間で空間1cと接する開口を有している。多数のレセプタクル112がアレイ1の下層部1aの面方向に配置され、それらの開口からターゲット物質がレセプタクル112内に捕捉され得る。

【0020】

アレイ1は、ガラス製基板層のウェットエッチングやドライエッチング、またはプラスチック製基板層のナノインプリントや射出成型、切削加工などの公知の技術を用いて形成できる。アレイ1の材質は、ターゲット物質を光学的に検出する場合には、光透過性を有する材質とされ、例えばガラスや各種プラスチック（PP、PC、PS、COC、COP、PDMS等）とされる。アレイ1の材質は、自家蛍光が少なく、波長分散が小さいため、光学誤差の少ない材質を選択するのが好ましい。

【0021】

下層部1aと上層部1bの対抗面間の距離（空間1cの高さ）は、特に限定されないが

10

20

30

40

50

、10 μm ~ 100 μm 程度である。

【0022】

レセプタクル112は、ターゲット物質を収容可能な大きさ（容積）及び形状とされる。レセプタクル112の大きさは、ターゲット物質が核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体；ウイルスのいずれかである場合には、例えば、底面の直径が0.1 μm ~ 10 μm 程度、高さ（深さ）が0.1 μm ~ 10 μm 程度であり、容積では1zeptoliter ~ 1attoliter程度である。ウェル11の形状は、成形のしやすさの観点から、円柱形あるいは角柱形であることが好ましい。

【0023】

さらに、レセプタクル112は、後述する物質収容手順における液滴形成のため、アスペクト比が1以上、好ましくは1.1以上、1.2以上、1.3以上、1.4以上、より好ましくは1.5以上、1.6以上、1.7以上、1.8以上、1.9以上、さらに好ましくは2.0以上、2.1以上、2.2以上、2.3以上、2.4以上あるいは2.5よりも大きい値とされる。

また、アスペクト比は、1 ~ 2.5、好ましくは1.5 ~ 2.5、より好ましくは2.0 ~ 2.5とされ得る。

アスペクト比とは、レセプタクル112の底面の直径（レセプタクル112が円柱形又は直方体である場合には、開口の直径に同一）をdとし、高さをtとした場合に、t/dで定義される比率である。ここで、レセプタクル112の底面が楕円形又は長方形等である場合には、直径dは、該底面の長手方向の直径をいうものとする。また、深さtは、レセプタクル112の最大深さをいうものとする。

【0024】

[物質導入手順]

はじめに、空間1cに、ターゲット物質3を含む第一溶媒S1を導入する（図1(A)参照）。

【0025】

ここでは、ターゲット物質3とともに、ターゲット物質3を吸光度変化及び/又は蛍光に基づいて光学的に検出するための発色基質4を導入する例を説明する。

【0026】

第一溶媒S1は、ターゲット物質3及び発色基質4を溶解又は懸濁するために適当な溶媒であればよく、核酸、タンパク質、糖、脂質及びこれらの複合体、並びにウイルス等を検出する際に通常用いられる溶媒が用いられる。第一溶媒S1は、例えば、水、アルコール、エーテル、ケトン、ニトリル系溶媒、ジメチルスルホキシド(DMSO)、及びN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)からなる群より選択される少なくとも1つ又はこれを含む混合物などであってよく、好ましくは水である。アルコールとしては、例えばエタノール、メタノール、プロパノール、グリセリン等が挙げられる。エーテルとしては、例えばテトラヒドロフラン、ポリエチレンオキサイド、1,4-ジオキササン等が挙げられる。ケトンとしては、例えばアセトン、メチルエチルケトン等が挙げられる。ニトリル系溶媒としては、例えばアセトニトリル等が挙げられる。

【0027】

第一溶媒S1は、緩衝物質を含んでいてもよい。緩衝物質としては、特に限定されないが、蛍光色素のpKaにあわせてMES(2-Morpholinoethanesulfonic acid)、ADA(N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid)、PIPES(Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid))、ACES(N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid)、BES(N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、TES(N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid)HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)等のいわゆるグッドバッファ(Good's Buffer)や、Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)、DEA(Diethanolamine)等が用いられ得る。

【0028】

また、第一溶媒は、界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤を含むことで、第一溶

10

20

30

40

50

液 S 1 は、溶液導入空間 1 1 a 及びレセプタクル 1 1 2 内へ導入され易くなる。界面活性剤としては、特に限定されないが、例えば T W E E N 2 0 (C A S 番号 : 9005-64-5、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン) 及び T r i t o n X - 1 0 0 (C A S 番号 : 9002-93-1、一般名ポリエチレングリコールモノ - 4 - オクチルフェニルエーテル (n 10)) などが挙げられる。第一の溶媒 2 0 への界面活性剤の添加濃度は、特に限定されないが、好ましくは 0 . 0 1 ~ 1 % である。

【 0 0 2 9 】

さらに、界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性イオン界面活性剤、天然由来の界面活性剤などを広く用いることができる。

10

【 0 0 3 0 】

陰イオン性界面活性剤としては、例えば、カルボン酸型、硫酸エステル型、スルホン酸型、リン酸エステル型に分類される。このうち、具体的には、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、 α -スルホ脂肪酸メチルエステルナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルエトキシレート硫酸ナトリウムなどが挙げられ、中でも、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いることが好ましい。

【 0 0 3 1 】

陽イオン性界面活性剤としては、例えば、第四級アンモニウム塩型、アルキルアミン型、複素環アミン型に分類される。具体的には、例えば、ステアリルトリメチルアンモニウムクロライド、ジステアリルジメチルアンモニウムクロライド、ジデシルジメチルアンモニウムクロライド、セチルトリピリジニウムクロライド、ドデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライドなどが挙げられる。

20

【 0 0 3 2 】

非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン硬化ひまし油、ポリオキシエチレンモノ脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、アルキルポリグリコシド、N-メチルアルキルグルカミドなどが挙げられる。中でも、ドデシルアルコールエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレート、ラウロイルジエタノールアמידの他、Triton X (Triton X-100 など)、Pluronic (登録商標) (Pluronic F-123、F-68 など)、Tween (Tween 20、40、60、65、80、85 など)、Brij (登録商標) (Brij 35、58、98 など)、Span (Span 20、40、60、80、83、85) の名前で市販されているものが好ましい。

30

【 0 0 3 3 】

両性界面活性剤としては、例えば、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、ドデシルアミノメチルジメチルスルホプロピルベタイン、3-(テトラデシルジメチルアミノ)プロパン-1-スルホナートなどがあるが、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート (CHAPS)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホナート (CHAPSO) などを用いることが好ましい。

【 0 0 3 4 】

天然由来の界面活性剤としては、例えば、レシチン、サポニンが好ましく、レシチンとして称される化合物のうち、具体的には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロールなどが好ましい。また、サポニンとしてはキラヤサポニンが好ましい。

40

【 0 0 3 5 】

ターゲット物質 3 と発色基質 4 を含む第一溶媒 S 1 は、例えば上層部 1 b に設けられ、空間 1 c に接続されているインレットから注入すればよい。なお、空間 1 c のインレット接続側の反対側には、溶媒及びガスが排出されるアウトレットを接続することができる。空間 1 c に導入された第一溶媒 S 1 は、下層部 1 a と上層部 1 b との間を毛管現象により進み、空間 1 c に充填される (図 1 (B) 参照)。これによって、ターゲット物質 3 と発色

50

基質 4 がレセプタクル 1 1 2 内に導入される。

【 0 0 3 6 】

第一溶媒 S 1 中のターゲット物質 3 の濃度が低い場合、各レセプタクル 1 1 2 には、ターゲット物質 3 が 1 分子導入されるか全く導入されないかのどちらかとなる。また、第一溶媒 S 1 中のターゲット物質 3 の濃度がより高い場合には、各レセプタクル 1 1 2 には、ターゲット物質 3 が 2 以上導入され得る。

一方で、発色基質 4 は、ターゲット物質 3 の濃度に比して十分に高い濃度で第一溶媒 S 1 中に含まれることが好ましい。したがって、発色基質 4 は、ほとんど全てのレセプタクル 1 1 2 に 1 分子あるいは 2 分子以上導入される。

【 0 0 3 7 】

本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ 1 に加えて、空間 1 c に第一溶媒 S 1 を導入する送液部を含んでいてよい。送液部は、第一溶媒 S 1 が供給されるタンクと、該タンクと上記インレットとを接続するチューブ及びポンプ等を含む。

【 0 0 3 8 】

本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ 1 及び上記送液部に加えて、温度調節器を含んでいてもよい。温度調節器は、ペルチェ素子やジュール・トムソン素子等によりアレイ 1 の温度を制御可能なヒートブロックであってよい。

【 0 0 3 9 】

[物質収容手順]

次に、空間 1 b にガス G を導入する (図 1 (C) 参照) 。ガス G は、第一溶媒 S 1 と同じか又は異なるインレットから注入され、第一溶媒 S 1 と同じか又は異なるアウトレットから排出されてよい。本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ 1 、上記送液部に加えて、空間 1 c にガス G を導入する送気部を含んでいてよい。送気部は、ガス G が供給されるタンクと、該タンクと上記インレットとを接続するチューブ及びポンプ等を含む。

【 0 0 4 0 】

ガス G は、本手順の環境温度 (特に限定されないが、室温であってよい) において気体であればよく、特に限定されないが、例えば空気、又は窒素ガスを好適に用いることができる。

【 0 0 4 1 】

空間 1 c に導入されたガス G は、空間 1 c 内に充填されていた第一溶媒 S 1 を置換しながら、空間 1 c を進む。これによって、レセプタクル 1 1 2 内に、発色基質 4 を含む第一溶媒 S 1 の液滴 D が形成される (図 1 (C) 参照) 。レセプタクル 1 1 2 に形成された液滴 D のうち一定の割合には、発色基質 4 とともにターゲット物質 3 が封入される。

【 0 0 4 2 】

なお、ガス G の導入は、インレットからガス G を圧入する方法によって行っても、アウトレットから陰圧を加えることによりインレットからガス G が導入されるような方法によって行ってもよい。このとき、インレットを開放した状態でアウトレットに陰圧を加えることで、インレットから空気が導入されるようにしてもよい。さらに、インレットを開放した状態とした上で、アレイ 1 に対して、インレットからアウトレットに向かう方向への遠心力を付与することで、空間 1 c 内に充填されていた第一溶媒 S 1 がアウトレットから排出されるとともにインレットから空気が導入されるようにしてもよい。このような遠心力の付与方法としては、基板 1 を回転板上に載置する方法が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

本手順において、レセプタクル 1 1 2 内に第一溶媒 S 1 が保持されやすくして、液滴 D が形成されることを促進するためあるいは形成された液滴 D の蒸散を抑制するため、レセプタクル 1 1 2 のアスペクト比が 1 以上、好ましくは 1 . 1 以上、 1 . 2 以上、 1 . 3 以上、 1 . 4 以上、より好ましくは 1 . 5 以上、 1 . 6 以上、 1 . 7 以上、 1 . 8 以上、 1 . 9 以上、さらに好ましくは 2 . 0 以上、 2 . 1 以上、 2 . 2 以上、 2 . 3 以上、 2 . 4 以上あるいは 2 . 5 よりも大きい値とされる。

また、アスペクト比は、 1 ~ 2 . 5 、好ましくは 1 . 5 ~ 2 . 5 、より好ましくは 2 .

10

20

30

40

50

0 ~ 2.5 とされ得る。

アスペクト比がこの範囲よりも小さいと、レセプタクル 112 内の第一溶媒 S1 までもがガス G によって置換されたり、形成された液滴 D が蒸散により失われてしまったりして、液滴 D の形成効率が低下する場合がある。なお、レセプタクル 112 の空間 1c への開口径に比して深さを大きくすることでレセプタクル 112 内に第一溶媒 S1 を保持されやすくできる。

【0044】

液滴 D の形成を促進するためあるいは形成された液滴 D の蒸散を抑制してこれを維持するため、本手順の前段に、ガス G を水と接触させる手順を行うことが好ましい。ガス G を水と接触させて空間 1c に導入されるガス G の水蒸気飽和度を予め高めておくことにより、レセプタクル 112 内に保持された第一溶媒 S1 の蒸発を抑制して液滴 D の形成を促進し得るとともに、形成された液滴 D の蒸散を抑制し得る。

乾燥空気は溶媒の蒸発を促し、飽和空気は動作が不安定になる可能性がある。そのため本発明において、所定の操作がほぼ常温付近で行われるとして、気体に含まれる水分を相対湿度で定義した場合、およそ 50 ~ 80 % 程度にすることが好ましい。

本発明に係る物質検出用デバイスは、送気部に、ガス G が水と接触させられるタンクを備えることが好ましい。

【0045】

また、レセプタクル 112 内に保持された第一溶媒 S1 の蒸発及び形成された液滴 D の蒸散を抑制するためには、空間 1c の水蒸気飽和度を高く維持することも好ましい。このために、下層部 1a に、第一溶媒 S1 を内部に保持可能であり、その内容積がレセプタクル 112 の内容積よりも大きくされたりリザーバを形成しておくことが有効となり得る。リザーバを設けることにより、物質導入手順においてリザーバ内に導入された第一溶媒 S1 が、本手順において空間 1c の水蒸気飽和度を高めるための水供給元（液溜まり）として機能できる。リザーバは、下層部 1a において、ターゲット物質 3 の検出に影響を与えない領域に、1つ又は2つ以上設けることができる。

さらに、レセプタクル 112 内に保持された第一溶媒 S1 の蒸発及び形成された液滴 D の蒸散を抑制するためには、本手順及び次の検出手順を、湿潤環境下で行うことも有効となり得る。このために、本発明に係る物質検出用デバイスは、基板 1 を内部に保持して湿潤環境下に維持するためのチャンバを備えることが好ましい。

【0046】

レセプタクル 112 内に保持された第一溶媒 S1 の蒸発及び形成された液滴 D の蒸散を抑制するため、第一溶媒 S1 が水である場合においてこれに高水和性物質を添加してもよい。高水和性物質が水を保持することで、第一溶媒 S1 の蒸発を抑制できる。

高水和性物質は、後述する検出手順における、ターゲット物質 3 の光学的、電氣的及び / 又は磁氣的検出に影響を及ぼさない限り特に限定はされないが、例えば、アガロース及びアクリルアミド等のゲル；ポリエチレングリコール及びセルロース等の親水性高分子；並びにグリシン、ベタイン、ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース及び尿素等のオスモライトなどが好適に用いられ得る。これらの高水和性物質の第一溶媒 S1 への添加濃度は、例えば 0.1 ~ 5 % 程度、好ましくは 0.5 ~ 2 % 程度である。

【0047】

次の検出手順では、液滴 D 内に存在するターゲット物質 3 を光学的、電氣的及び / 又は磁氣的に検出する。ここで説明する例は、発色基質 4 の吸光度変化及び / 又は蛍光を検出することによってターゲット物質 3 を光学的に検出するものであるが、より具体的に、ターゲット物質 3 が、発色基質 4 に対する基質切断活性を有する酵素を表面又は内部に有するウイルスであって、発色基質 4 が、該酵素により切断されて発色団としての反応生成物を遊離させる物質である場合を例として説明する。ただし、発色基質 4 は、酵素との反応後に反応前とは異なる光学特性を有する反応生成物を生成するものであればよく、反応前後で吸光度や旋光度が変化する物質や、反応後に蛍光を呈するようになる物質であってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

このようなウイルスと酵素の組み合わせとしては以下が例示される。

【表 1】

コロナウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
SARS ウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
MARS ウイルス	ヘマグルチニンエステラーゼ
インフルエンザウイルス	ノイラミニダーゼ
ムンプウイルス (おたふく風邪)	ノイラミニダーゼ
麻疹ウイルス	ノイラミニダーゼ
ニパウイルス	ノイラミニダーゼ
イヌジステンパーウイルス	ノイラミニダーゼ

10

【 0 0 4 9 】

レセプタクル 1 1 2 に形成された液滴 D 中では、極小容積中で共存する、ターゲット物質 3 (ウイルス) の粒子表面又は内部に存在する酵素と発色基質 4 との反応が進行し、反応生成物が生成する。図 2 を参照して詳しく説明する。ウイルスの粒子表面又は内部には酵素 3 1 が存在している (図には酵素 3 1 がウイルス表面に存在する場合を示した)。発色基質 4 が、酵素 3 1 と接触し反応すると、反応生成物 6 が生成する。反応生成物 6 は、発色基質 4 と異なる光学特性を示し、吸光度や旋光度のシフトや、蛍光 (又は発光) を示す。

20

【 0 0 5 0 】

酵素 3 1 と発色基質 4 との反応によって液滴 D の極小容積 (zeptoliter ~ attoliter のオーダー) 中に反応生成物 6 が生成、蓄積される。さらに、液滴 D は他の溶媒や溶液と界面接触していないため、液滴 D に生成、蓄積された反応生成物 6 が液滴 D から漏れ出すことがない。これらによって、次の検出手順において検出可能な濃度に至るまで反応生成物 6 の生成が迅速に進むこととなるため、検出手順における反応生成物 6 の高感度検出が可能とされる。

30

【 0 0 5 1 】

ウイルスがインフルエンザウイルスであり (表 1 参照)、発色基質 4 に 4 - メチルウンベリフェリル - D - ノイラミン酸 (4 - Methylumbelliferyl - N - acetyl - D - neuraminic acid : 4 MU - NANA) を用いる場合を例にさらに具体的に説明する。

【 0 0 5 2 】

インフルエンザウイルスの粒子表面にはノイラミニダーゼ (酵素 3 1) が存在している。4 MU - NANA (発色基質 4) がノイラミニダーゼと接触し反応すると、4 MU - NANA のノイラミニダーゼによる加水分解に由来して蛍光を呈する発色団として 4 - メチルウンベリフェロン (反応生成物 6) が生成する。4 - メチルウンベリフェロンは液滴 D の極小容積中に蓄積され、蓄積された 4 - メチルウンベリフェロンが増強された蛍光を発する。

40

【 0 0 5 3 】

なお、反応生成物 6 は、本手順前にも、第一溶媒 S 1 中において発色基質 4 と酵素 3 1 が接触すれば生成し得るものであるが、本手順においてターゲット物質 3 と発色基質 4 を包含する第一溶媒 S 1 の液滴 D が形成される前には、生成した反応生成物 6 が極小容積中に蓄積されることがない。このため、反応生成物 6 の検出において、本手順前に生成した反応生成物 6 の影響は無視できる程度に小さい。

【 0 0 5 4 】

[検出手順]

50

本手順では、液滴D内に存在するターゲット物質3を光学的、電氣的及び/又は磁氣的に検出する(図1(D)参照)。ここで説明する具体例では、液滴D内に生成した反応生成物6(4-メチルウンベリフェロン)が発する蛍光を検出することにより、ターゲット物質3としてのインフルエンザウイルスを検出する。

【0055】

光学検出は、光源と、光源からの光をレセプタクル112内に集光しかつレセプタクル112内からの発生する光をセンサに集光する光学経路と、センサとを備える検出器7によって行うことができる。本発明に係る物質検出用デバイスは、アレイ1、上記送液部、及び上記送気部に加えて、検出器7を含んでいてもよい。光源からの光は、アレイ1の下方側(ウェル11の開口面と逆面側)からレセプタクル112内に照射され、レセプタクル112内からの発生する光も同側から集光される。光源とアレイ1の間、及びアレイ1とCMOSイメージセンサ等のセンサの間には、通常使用されるレンズやフィルタなどが配設される。

10

【0056】

また、本発明に係る微小物質検出用デバイスは、アレイ1の温度を制御する温度調節器を含んでいてもよい。温度調節器には、特許文献2に開示される加熱機構又は温度調節機構を採用できる。温度調節器は、例えばペルチェ素子やジュール・トムソン素子等により温度制御可能なヒートブロックであってよい。

【0057】

上述のとおり、反応生成物6は、物質収容手順前にも、第一溶媒S1中に生成し得るものであるが、物質収容手順前に生成した反応生成物6の多くは、物質収容手順において、ガスGによって第一溶媒S1が置換されるとともに外部に取り除かれる。このため、本手順における反応生成物6の検出において、物質収容手順前に生成した反応生成物6がノイズとなることがなく、液滴Dの極小容積中で生成、蓄積した反応生成物6からのシグナルを選択的に検出できる。

20

【0058】

物質導入手順における第一溶媒S1中のターゲット物質3の濃度が比較的高い場合には、各液滴Dには、ターゲット物質3が2以上導入され得る。この場合、液滴D中の4-メチルウンベリフェロン(反応生成物6)の蛍光検出を行い、取得された蛍光強度と、予め作成した蛍光強度とノイラミニダーゼ活性との関係を規定した標準曲線とを用いてノイラミニダーゼの酵素活性を算出する。さらに、算出された酵素活性と、予め作成した酵素活性とウイルス粒子数との関係を規定した標準曲線を用いてインフルエンザウイルスの存在の有無の判定あるいは粒子数の定量を行う(アナログ定量)。これにより、ターゲット物質3としてのインフルエンザウイルスを検出ことができ、ウイルス量を定量的に決定することもできる。

30

【0059】

一方、第一溶媒S1中において、ターゲット物質3が十分に低い濃度に希釈されている場合、1つのレセプタクル112に入るターゲット物質3の数は0又は最大で1となり得る。この場合、ターゲット物質3が検出されたレセプタクル112の数と、ターゲット物質3が検出されないレセプタクル112の数との比率を用いて、予め作成した第一溶媒S1中のターゲット物質3の濃度と当該比率との関係を規定した標準曲線に基づいて、ターゲット物質3の濃度を決定することもできる(デジタル定量)。

40

物質収容手順においては、第一溶媒S1の液滴D中に反応生成物6を高濃度に蓄積させることができるため、ターゲット物質3としてのウイルスが1粒子のみレセプタクル112に入っている場合であっても、反応生成物6の検出を高感度に行うことができる。従って、本発明に係る物質検出方法によれば、ウイルス等のごく微量のターゲット物質3であっても高感度に検出でき、その存在量を高精度に決定することが可能となる。

【0060】

本実施形態によれば、多数のウェル11及びレセプタクル112を有する大面積のアレイ1を実現することが可能である。例えば、100万個以上のレセプタクル112を有す

50

るアレイ 1 であっても、効率よくターゲット物質 3 を各レセプタクル 1 1 2 に収容することが可能である。したがって、本実施形態であれば、ターゲット分子 3 を高感度に検出することができるため、 10^{-10} M 程度の非常に低濃度のターゲット分子 3 であっても検出することが可能となり、例えば Digital ELISA や ELISA - PCR などのアプリケーションに応用できる。

【符号の説明】

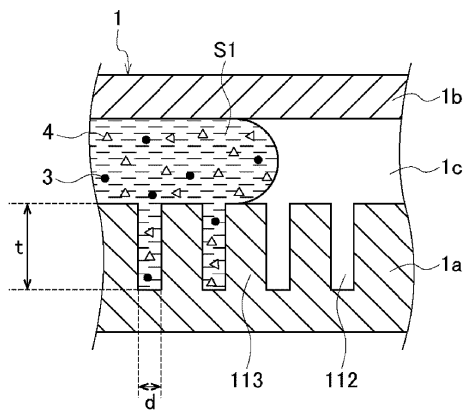
【0061】

1 : アレイ、1 a : 下層部、1 b : 上層部、1 c : 空間、1 1 2 : レセプタクル、1 1 3 : 側壁、3 : ターゲット物質、4 : 発色基質、6 : 反応生成物、7 : 検出器、D : 液滴、G : ガス、S 1 : 第一溶媒

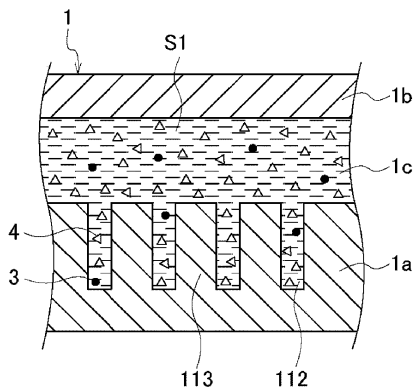
10

【図 1 - 1】

(A)

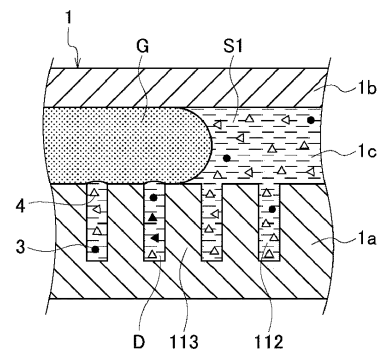


(B)

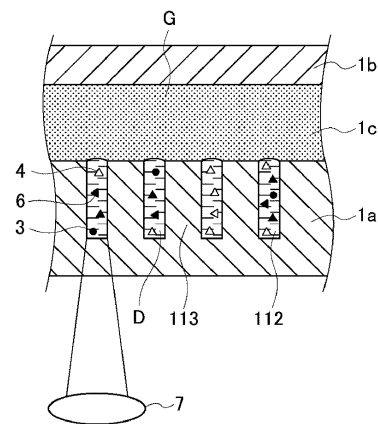


【図 1 - 2】

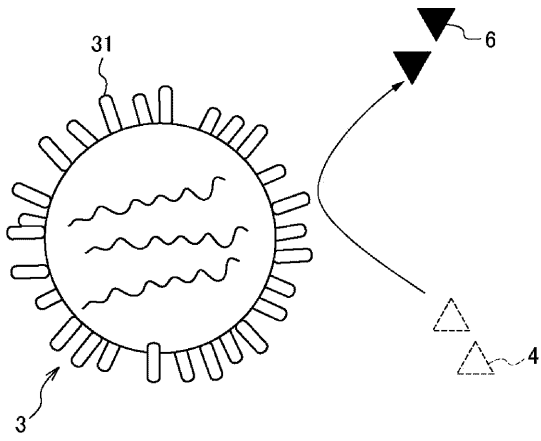
(C)



(D)



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/012795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. G01N35/08(2006.01)i, G01N1/00(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)n, C12Q1/06(2006.01)n, C12Q1/70(2006.01)n 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. G01N35/08, G01N1/00, G01N21/78, G01N33/483, C12M1/34, C12Q1/06, C12Q1/70 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.
X/A	JP 2014-503831 A (QUANTERIX CORPORATION) 13 February 2014, entire text, all drawings, in particular, see paragraphs [0044], [0046], [0084], [0171], [0172], fig. 8A-G, etc. & JP 2017-78717 A & US 2012/0196774 A1, entire text, all drawings, see paragraphs [0073], [0111], [0201], [0202], fig. 8A-G, etc. & WO 2012/103447 A1 & EP 2668509 A1	1-4, 6-11, 13-17, 19-20/5, 12, 18
A	WO 2016/006208 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 14 January 2016, see entire text, all drawings & US 2017/0176430 A1 & US 2015/0087547 A1 & EP 3168624 A1	1-20
<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 20 June 2018 (20.06.2018)		Date of mailing of the international search report 03 July 2018 (03.07.2018)
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/JP2018/012795

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/121310 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 13 September 2012, see entire text, all drawings & US 2013/0345088 A1 & US 2015/0087547 A1 & US 2016/0223531 A1 & US 2017/0115284 A1 & EP 2685266 A1	1-20
A	JP 2004-309405 A (PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TOKYO) 04 November 2004, see entire text, all drawings (Family: none)	1-20
A	JP 2010-054492 A (SONY CORP.) 11 March 2010, see entire text, all drawings & JP 2010-169701 A & JP 2011-64706 A & US 2009/0283148 A1 & US 2014/0216179 A1 & US 2016/0332162 A1 & EP 2123358 A1 & EP 2923758 A2	1-20
A	JP 2012-103252 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES) 31 May 2012, see entire text, all drawings & US 2012/0111506 A1 & EP 2453220 A1	1-20
A	JP 2004-521315 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 15 July 2004, see entire text, all drawings & US 2003/0070677 A1 & WO 2002/007884 A2 & EP 1303352 A24,	1-20
A	JP 2012-522237 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 20 September 2012, see entire text, all drawings & US 2012/0070911 A1 & WO 2010/112699 A1 & EP 2414099 A1	1-20

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 2 7 9 5													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N35/08(2006.01)i, G01N1/00(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)n, C12Q1/06(2006.01)n, C12Q1/70(2006.01)n															
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. G01N35/08, G01N1/00, G01N21/78, G01N33/483, C12M1/34, C12Q1/06, C12Q1/70															
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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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	1971-2018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				
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 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 2014-503831 A (クワンテリクス コーポレーション) 2014.02.13, 全文・全図、特に、段落[0044]、[0046]、[0084]、[0171]、[0172]、[図8A-G]等参照 & JP 2017-78717 A & US 2012/0196774 A1, 全文・全図、段落[0073]、[0111]、[0201]、[0202]、[Fig. 8A-G]等参照 & WO 2012/103447 A1 & EP 2668509 A1	1-4, 6-11, 13-17, 19-20/ 5, 12, 18													
A	WO 2016/006208 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 2016.01.14, 全文・全図参照 & US 2017/0176430 A1 & US 2015/0087547 A1 & EP 3168624 A1	1-20													
<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、一般的な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、一般的な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、一般的な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 20.06.2018		国際調査報告の発送日 03.07.2018													
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) 草川 貴史 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 4075												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 2 7 9 5
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	WO 2012/121310 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2012. 09. 13, 全文・ 全図参照 & US 2013/0345088 A1 & US 2015/0087547 A1 & US 2016/0223531 A1 & US 2017/0115284 A1 & EP 2685266 A1	1-20
A	JP 2004-309405 A (東京大学長) 2004. 11. 04, 全文・全図参照 (ファミリ ーなし)	1-20
A	JP 2010-054492 A (ソニー株式会社) 2010. 03. 11, 全文・全図参照 & JP 2010-169701 A & JP 2011-64706 A & US 2009/0283148 A1 & US 2014/0216179 A1 & US 2016/0332162 A1 & EP 2123358 A1 & EP 2923758 A2	1-20
A	JP 2012-103252 A (コミサリア ア レネルジー アトミック エ オ ゼネルジー アルテルナティブ) 2012. 05. 31, 全文・全図参照 & US 2012/0111506 A1 & EP 2453220 A1	1-20
A	JP 2004-521315 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシティー オブ ミシガン) 2004. 07. 15, 全文・全図参照 & US 2003/0070677 A1 & WO 2002/007884 A2 & EP 1303352 A24,	1-20
A	JP 2012-522237 A (サントル ナショナル ドウ ラ ルシエルシュ シ アンティフィク) 2012. 09. 20, 全文・全図参照 & US 2012/0070911 A1 & WO 2010/112699 A1 & EP 2414099 A1	1-20

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
G 0 1 N 21/77 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B
	C 1 2 M 1/34	Z
	G 0 1 N 21/77	D

(81) 指定国・地域 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, 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, JP, 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, 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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. T R I T O N
3. S P A N

(72) 発明者 皆川 慶嘉

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 2G052 AA29 AA33 AA36 AB16 AB20 AB27 AD06 AD15 AD22 AD29
AD49 BA17 CA11 CA38 DA06 DA09 DA22 HC23
2G054 AA03 AB10 CA20 CA22 CA23 EA03 EA04 FA17 FA19 GB02
GE01 JA06
4B029 AA07 BB01 BB13 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA01 FA15
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ10 QQ15 QQ16 QQ17
QQ18 QQ42 QQ52 QR66 QR83 QS12 QS32 QX01 QX02

(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。