

(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
2010年3月25日(25.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/032846 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) B81C 1/00 (2006.01)
B81B 1/00 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/066427
- (22) 国際出願日: 2009年9月18日(18.09.2009)
- (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 2008-243341 2008年9月22日(22.09.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学(The University of Tokyo) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 竹内 昌治(TAKEUCHI, Shoji) [JP/JP]; 〒1138654 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 Tokyo (JP). 栗林 香織(KURIBAYASHI,

Kaori) [JP/JP]; 〒1138654 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 Tokyo (JP). 中村 元(NAKAMURA, Hajime) [JP/JP]; 〒1138654 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 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 牛木 護(USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目14番1号 郵政福祉琴平ビル3階 Tokyo (JP).

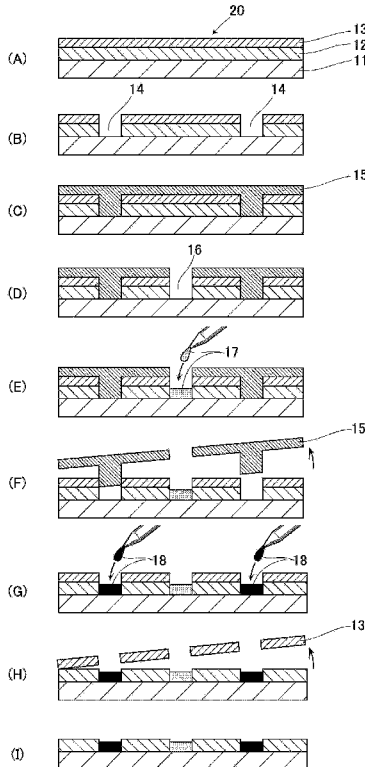
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: HIGH-ACCURACY PATTERNING METHOD FOR POLYMERIC BIOMATERIAL HAVING BIOCOMPATIBILITY

(54) 発明の名称: 生体適合性ポリマーバイオマテリアルの高精度パターンニング法

[図2]



(57) Abstract: To develop a method for patterning a biocompatible polymer, which inhibits the non-specific adsorption of a biological material, on a substrate including the inside of a channel of a microchannel device at a high accuracy of the micron level. Provided is a method for patterning a biocompatible polymer. The method for patterning a biocompatible polymer comprises a step for forming a layer of the biocompatible polymer, a step for forming a resin layer on the biocompatible polymer layer, a step for forming a spot in which the biocompatible polymer layer and the resin layer have been removed and thus the substrate is exposed, and a step for removing the resin layer. Also provided is a construct and a microchannel device comprising a substrate, a biocompatible polymer layer having been patterned by the aforesaid method and the aforesaid spot.

(57) 要約: 生物学的材料の非特異性吸着を抑制する生体適合性ポリマーを、マイクロ流路デバイスの流路内を含む基板上でマイクロオーダーの高精度でパターンニングする方法を開発すること。本発明は生体適合性ポリマーのパターンニング方法を提供する。前記生体適合性ポリマーのパターンニング方法は、生体適合性ポリマーの層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層の上に樹脂の層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層と樹脂の層とが除去されて基板が露出した、スポットを形成するステップと、前記樹脂の層を除去するステップとを含む。本発明は、基板と、本発明の方法によってパターンニングされた生体適合性ポリマーの層及び前記スポットとを含む、構造体及びマイクロ流路デバイスを提供する。



(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

生体適合性ポリマーバイオマテリアルの高精度パターンニング法

技術分野

[0001] 本発明は、生体適合性ポリマーのパターンニング方法と、該方法によってパターンニングされた生体適合性ポリマーの層を含む構造体及びマイクロ流路デバイスとに関し、より具体的には、パリレン樹脂の引き剥がし法を用いて生体適合性ポリマーをマイクロ流路デバイスの流路内でミクロンオーダーの高精度でパターンニングする方法と、該方法によってパターンニングされた生体適合性ポリマーの層と、該生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出したスポットと、該スポットに選択的に吸着された生物学的材料を含む構造体及びマイクロ流路デバイスに関する。

背景技術

[0002] 近年、シリコン、ガラス、ポリマー等の基板上に微細加工を施して、細胞、特に単一細胞のパターンニングを行う技術の開発が進んでいる。かかる技術は、再生医療などの分野で細胞の機能解析や培養環境の最適条件を知るうえで重要な技術である。また、細胞、タンパク質、DNA等の生物学的材料を基板上にパターンニングし、マイクロ流路と組み合わせて、生物学的材料の分析化学システムやセンサーに応用する研究も盛んにおこなわれるようになってきた。従来のパターンニング方法には、例えば、リン脂質極性基を側鎖に有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下、「MPC」という。）のような生体適合性ポリマーを利用し、基板表面をマイクロパターン化し、生物学的材料の非特異性吸着を抑制する方法が用いられている。しかし、基板上でミクロンオーダーの高精度でパターンニングする方法と、マイクロ流路デバイスの流路内でパターンニングする方法とはいずれも確立されていない。

非特許文献1：S. Takeuchiら、MEMS2004、pp208-2

10、(2004)

非特許文献2: B. Lilićら、Biomedical Microdevices、2、4、317-322、(2000)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0003] そこで、生物学的材料の非特異性吸着を抑制する生体適合性ポリマーを、マイクロ流路デバイスの流路内を含む基板上でミクロンオーダーの高精度でパターンニングする方法を開発する必要がある。

課題を解決するための手段

- [0004] 本発明は生体適合性ポリマーのパターンニング方法を提供する。前記生体適合性ポリマーのパターンニング方法は、生体適合性ポリマーの層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層の上に樹脂の層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層と樹脂の層とが除去されて基板が露出した、スポットを形成するステップと、前記樹脂の層を除去するステップとを含む。
- [0005] 本発明の生体適合性ポリマーのパターンニング方法は、生体適合性ポリマーの層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層の上に第1樹脂の層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層と第1樹脂の層とが除去されて基板が露出した、第1スポットを形成するステップと、残存する第1樹脂の層と、第1スポットの場所の基板との上に第2樹脂の層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層と、第1樹脂の層と、第2樹脂の層との全てが除去されて基板が露出した、第2スポットを形成するステップと、第2樹脂の層を除去するステップとを含む場合がある。
- [0006] 本発明の生体適合性ポリマーのパターンニング方法において、前記生体適合性ポリマーは、生物学的材料との非特異性吸着を抑制する両親媒性ポリマーの場合がある。
- [0007] 本発明の生体適合性ポリマーのパターンニング方法において、前記生体適合性ポリマーは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンの場合が

ある。

- [0008] 本発明の生体適合性ポリマーのパターニング方法において、前記基板は光透過性を有する場合がある。
- [0009] 本発明の生体適合性ポリマーのパターニング方法において、前記基板はガラスの場合がある。
- [0010] 本発明の生体適合性ポリマーのパターニング方法において、前記樹脂はポリパラキシリレンの場合がある。
- [0011] 本発明の生体適合性ポリマーのパターニング方法において、前記生体適合性ポリマー及び樹脂の層の一部を除去して基板が露出したスポットを形成するステップは、ドライエッチング法により実行される場合がある。
- [0012] 本発明は、基板と、本発明の方法によってパターニングされた生体適合性ポリマーの層及び前記スポットとを含む、構造体を提供する。
- [0013] 本発明の構造体は、前記基板を支持部を介して切断可能なように保持する基材を含む場合がある。
- [0014] 本発明の構造体は、前記支持部で前記基材から前記基板が切断することによって生じる前記基板の切断面を含み、該切断面は前記基板が露出している場合がある。
- [0015] 本発明の構造体は、前記基板上に設けられたマイクロ流路を含み、該マイクロ流路は前記スポットを通る場合がある。
- [0016] 本発明の構造体において、前記マイクロ流路はポリジメチルシロキサンで作成される場合がある。
- [0017] 本発明の構造体は、前記スポットに結合した生物学的材料を含む場合がある。
- [0018] 本発明の構造体は、基板と、該基板上に形成される、本発明の方法によってパターニングされた生体適合性ポリマーの層、第1スポット及び第2スポットとを含む場合がある。前記生体適合性ポリマーの層、第1スポット及び第2スポットは、生体適合性ポリマーの層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層の上に第1樹脂の層を形成するステップと、前記生体

適合性ポリマーの層と、第 1 樹脂の層とが除去されて基板が露出した、第 1 スポットを形成するステップと、第 1 樹脂の層の上に第 2 樹脂の層を形成するステップと、前記生体適合性ポリマーの層と、第 1 樹脂の層と、第 2 樹脂の層とが除去されて基板が露出した、第 2 スポットを形成するステップと、第 2 樹脂の層を除去するステップとを含む方法によってパターンニングされる。

- [0019] 本発明の構造体は、第 1 スポットに結合した第 1 生物学的材料と、第 2 スポットに結合した第 2 生物学的材料とを含む場合がある。
- [0020] 本発明の構造体において、前記生物学的材料の少なくとも 1 つは細胞の場合がある。
- [0021] 本発明の構造体において、前記スポットのそれぞれに 1 個の細胞が配置される場合がある。
- [0022] 本発明の構造体において、前記生物学的材料の少なくとも 1 つは特異的結合パートナーの場合がある。
- [0023] 本発明の構造体において、第 1 生物学的材料は第 1 特異的結合パートナーで、第 2 生物学的材料は第 2 特異的結合パートナーの場合がある。
- [0024] 本発明はマイクロ流路デバイスを提供する。前記マイクロ流路デバイスは、基板と、該基板上に形成される生体適合性ポリマーの層と、該生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出した第 1 及び第 2 スポットと、前記スポットを通るマイクロ流路と、第 1 及び第 2 スポットのそれぞれに結合した第 1 及び第 2 特異的結合パートナーと、第 1 及び第 2 特異的結合パートナーと特異的に結合する第 1 及び第 2 細胞とを含む。
- [0025] 本発明のマイクロ流路デバイスにおいて、第 1 及び第 2 スポットのそれぞれに第 1 及び第 2 細胞が 1 個配置される場合がある。
- [0026] 本発明の構造体において、前記生物学的材料の少なくとも 1 つは運動可能なオルガネラの場合がある。
- [0027] 本発明の構造体において、前記運動可能なオルガネラは単離された鞭毛の場合がある。

- [0028] 本発明の構造体において、前記スポットのそれぞれに前記単離された鞭毛が1個配置される場合がある。
- [0029] 本発明はマイクロ流路デバイスを提供する。前記マイクロ流路デバイスは、基板と、該基板上に形成される生体適合性ポリマーの層と、該生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出したスポットと、該スポットを通るマイクロ流路と、前記スポットに配置された運動可能なオルガネラとを含むマイクロ流路デバイスであって、前記オルガネラの運動は前記マイクロ流路を灌流するバッファーを変えることによって制御される。
- [0030] 本発明のマイクロ流路デバイスにおいて、前記オルガネラは単離された鞭毛の場合がある。
- [0031] 本発明はマイクロ流路デバイスを提供する。前記マイクロ流路デバイスは、基板上に形成された生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出したスポットに配置された鞭毛を含み、該鞭毛を回転させることによって前記スポットを通るマイクロ流路内を灌流する液体を輸送又は攪拌する。
- [0032] 本発明のマイクロ流路デバイスにおいて、前記スポットのそれぞれに1個の鞭毛が配置される場合がある。
- [0033] 本発明の生体適合性ポリマーのパターンニング方法は、第N-1樹脂の層の上に第N樹脂の層を形成するステップ（Nは3以上の自然数）と、前記生体適合性ポリマーの層と、第1樹脂の層ないし第N樹脂の層とが除去されて基板が露出した、第Nスポットを形成するステップと、第N-1樹脂の層を除去するステップとを含む場合がある。本発明の構造体及び／又はマイクロ流路デバイスは、基板と、該基板上に形成される、前記方法によってパターンニングされた生体適合性ポリマーの層、第1スポット、第2スポット、・・・、第Nスポットとを含む場合がある。また本発明の構造体及び／又はマイクロ流路デバイスは、第1スポットに結合した第1生物学的材料と、第2スポットに結合した第2生物学的材料と、・・・、第Nスポットに結合した第N生物学的材料とを含む場合がある。さらに、第N生物学的材料が第N特異的結合パートナーであって、第1特異的結合パートナー、第2特異的結合

パートナー、・・・、第N特異的結合パートナーがそれぞれ異なる特異性をもって結合するため、N種類の異なる細胞の懸濁液に前記構造体及び／又はマイクロ流路デバイスを接触させることにより、一度にN種類の細胞が所望のパターンで配置された構造体及び／又はマイクロ流路デバイスを作成することができる。以下、本明細書では樹脂の層及びスポットが1種類又は2種類の場合について説明するが、本発明の範囲は3種類以上の樹脂の層及びスポットを有する場合を排除しない。すなわち、3種類以上の樹脂の層及びスポットを有する場合であっても、本明細書に添付される特許請求の範囲に記載された発明に該当する場合には本発明の範囲に属する。

[0034] 本明細書において、生体適合性ポリマーとは、細胞、細胞内オルガネラ及び／又は生体分子のような生物学的材料を含むマイクロ流路デバイスに用いられるときに前記生物学的材料に対して特に有害な影響を及ぼさない高分子化合物をいう。本発明の生体適合性ポリマーは、生物学的材料との非特異性吸着を抑制する場合がある。かかる生体適合性ポリマーが本発明の構造体又はマイクロ流路デバイスの基板上にコーティングされ、該生体適合性ポリマーの層が形成されるとき、生物学的材料は前記構造体又はマイクロ流路デバイスに固着せず、容易に洗浄除去することができる。生体適合性ポリマーは、生物学的材料との非特異性吸着を抑制する両親媒性ポリマーが好ましく、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンがより好ましい。また、生物学的材料が細胞外オルガネラ又は生体分子の場合には、ウシ血清アルブミンのようなタンパク質を生体適合性ポリマーとして用いることができる。

[0035] 本明細書における生物学的材料とは、生物に由来するいずれかの材料を指し、生物個体、臓器、組織及び細胞と、鞭毛、繊毛、ミトコンドリア、葉緑体、染色体、分裂装置、リソソーム、ゴルジ体等の細胞内オルガネラと、ウイルス、DNA複製酵素複合体、転写／RNAプロセッシング複合体、リボソーム、イオンチャネル、細胞表面レセプター複合体等の分子集合体と、核酸、タンパク質、炭水化物等の生体高分子と、ホルモン、セカンドメッセ

ンジャー、酵素基質、代謝中間体等の他の生物学的材料と相互作用を起こす全ての化合物とを含むが、これらに限定されない。

[0036] 本発明の運動可能なオルガネラは、鞭毛と、繊毛と、分裂装置と、仮足又は偽足とを含むが、これらに限られない、形態又は位置が変化する全てのオルガネラをいう。好ましい運動可能なオルガネラは鞭毛であり、クラミドモナス鞭毛が特に好ましい。

[0037] 本発明で用いられる特異的結合パートナーは、レクチンと、レクチンの可溶性断片と、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体と、該抗体の抗原結合断片と、該抗原結合断片を含むキメラ抗体又は組換え抗体とからなるグループから選択される場合がある。抗体の抗原結合断片は、抗原結合に参加する抗体の部分を目指す。前記抗原結合部位は、重（H）鎖及び軽（L）鎖のN末端の可変（V）領域のアミノ酸残基によって形成される。

[0038] 抗体は、当業者に知られたさまざまな技術によって調製される場合がある。例えば、Harlow及びLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照せよ。

[0039] 本発明で用いられるポリクローナル抗体は、細胞表面抗原マーカーか、これらの断片かを免疫原として、ほ乳類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ又はヤギ）又は鳥類（例えばニワトリ）のいずれかの動物宿主に注射される。細胞表面抗原マーカーの断片を免疫原とする場合には、ウシ血清アルブミン又はスカシ貝ヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanine）のような担体タンパク質と連結される場合に優れた免疫応答が誘発される場合がある。前記免疫原は、1回又は2回以上のブースター免疫を取り込んだ予め定められたスケジュールに従って、前記動物宿主に注射されることが好ましい。前記免疫原は、完全又は不完全フロイントアジュバントその他の免疫増強剤に混合して前記動物宿主に注射される場合がある。本発明のポリクローナル抗体は、かかる抗血清から、例えば適当な固体支持体に結合された細胞表面抗原マーカーか、これらの断片かを用いるアフ

ィニティクロマトグラフィーによって精製される場合がある。

[0040] 本発明で用いられるモノクローナル抗体は、K o h l e r 及び M i l l s t e i n、E u r. J. I m m u n o l. 6 : 5 1 1 - 5 1 9、1 9 7 6 の技術と、その改良技術を用いて調製される場合がある。これらの方法は、所望の特異性を有する抗体を産生できる不死性細胞株の調製を伴う。かかる細胞株は上記のとおり免疫された動物宿主由来の脾臓細胞から作成される場合がある。前記脾臓細胞は、さまざまな方法で不死化され、抗体産生能を有する不死化細胞株が調製される。前記脾臓細胞は、例えば、前記免疫された動物と同種かあるいは異種の動物由来のミエローマ細胞との融合によって不死化される。当業者に周知のさまざまな融合技術を用いる場合がある。例えば、前記脾臓細胞とミエローマ細胞とは非イオン性界面活性剤と数分間混合され、それからハイブリッド細胞の増殖は支持するがミエローマ細胞の増殖は支持しない選択培地に低濃度でプレートされる。好ましい選択技術はH A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を用いる。通常約1ないし2週間の十分な時間の後、ハイブリッドのコロニーが観察される。シングルコロニーが選択され、その培養上清が前記ポリペプチドに対する結合活性についてテストされる。反応性及び特異性が高いハイブリドーマが好ましい。限界希釈法によるクローニングを繰り返すことにより、反応性及び特異性が高い抗体を安定的に大量に産生するハイブリドーマのクローンが選択される。モノクローナル抗体は増殖中の選択されたハイブリドーマクローン由来の細胞株のコロニーの上清から単離される場合がある。さらに、マウスのような適当な脊椎動物宿主の腹腔内に前記ハイブリドーマ細胞株を注射するような、収率を向上させるためのさまざまな技術が用いられる場合がある。モノクローナル抗体は前記ハイブリドーマ細胞腹水又は血液から回収される場合がある。汚染物は、クロマトグラフィー、ゲルろ過、沈殿及び抽出のような従来技術によって前記抗体から除去される場合がある。

[0041] 本発明で用いられる抗体の抗原結合断片は、それぞれタンパク質分解酵素パパイイン又はペプシンでインタクトなポリクローナル抗体又はモノクローナ

ル抗体を分解して得られるF a b断片又はF (a b')₂断片の他、天然抗体分子の抗原認識能及び結合能の多くを保持する抗原結合部位を含む非共有結合的なV H及びV L領域のヘテロ2量体を含むF v断片を含む。

[0042] 本発明で用いられる組換え抗体は、適当な細菌宿主への形質転換か、適当なほ乳類細胞宿主へのトランスフェクションかを含む抗体遺伝子の発現クローニングによって調製される場合がある。本発明で用いられるキメラ抗体は、前記本発明の組換え抗体の抗原結合部位が細胞表面抗原マーカーと特異的に結合できるように同種又は異種の抗体の定常ドメインによって支持された融合タンパク質である。本発明で用いられるキメラ抗体には、抗体軽鎖可変領域（V L）に操作可能に連結された抗体重鎖可変領域（V H）を含む短鎖可変部抗体（s c F v）と、ラクダ科（C a m e l i d a e、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマを含む）の動物が産生する軽鎖がないI g Gのクラスであるラクダ重鎖抗体（H C A b）又はその重鎖可変部ドメイン（V H H）とを含む。本発明の組換え抗体は原核生物及び真核生物由来の遺伝子発現システムを用いて大量に調製することができる。

[0043] 本明細書において、生体適合性ポリマー、樹脂等の層を形成するには、スピン塗布法、真空蒸着法その他当業者に周知のいかなる方法によって、適用、塗布、蒸着又はコーティングされてもかまわない。

[0044] 本明細書において、生体適合性ポリマーの層の上に形成される樹脂の層は、本発明のスポットを形成するステップにおいて、該スポットで露出される場所以外の前記基板の上の前記生体適合性ポリマーの層を保護することが可能であること、及び、その後必要に応じて、前記樹脂の層を除去することが可能であることを条件として、いかなる材料でできていてもかまわない。本発明の第1樹脂の層の上に第2樹脂の層を形成するステップを含む、生体適合性ポリマーのパターンニング方法においては、第2スポットに第2生物学的材料が結合した後、第2生物学的材料と、残存する第1樹脂及び前記生体適合性ポリマーの層と、第1スポットの基板の表面とにいかなる影響を与えることなく第2樹脂の層を除去することができることが望ましい。また、第

2樹脂の層を除去してから、第1スポットに第1生物学的材料が結合した後に、第1生物学的材料と、残存する前記生体適合性ポリマーの層とに与える影響を与えることなく第1樹脂の層を除去することができることが望ましい。前記樹脂の層を除去することは、前記樹脂の層を引き剥がすこと（リフトオフ）によって実行される場合がある。好ましい樹脂はポリパラキシリレン（商品名：パリレン）である。第1樹脂と第2樹脂とは、同一の物質の場合もあれば、異なる物質の場合もある。

[0045] 本発明の生体適合性ポリマー及び樹脂の層が除去されて基板が露出したスポットを形成するステップは、光リソグラフィ法、ドライエッチング法その他当業者に周知のいかなる方法のいかなる組み合わせによって実行されてもかまわない。好ましいやり方は、 O_2 プラズマを用いるドライエッチング法である。

[0046] 本明細書において、スポットとは、基板の上にいったん形成された生体適合性ポリマーの層が除去されて、基板が露出した場所をいう。前記スポットと、該スポットが形成された後に残存する生体適合性ポリマーの層とは、本発明のパターンニング方法を利用して、所望の数、形状及び／又は寸法にすることができる。前記スポット及び／又は生体適合性ポリマーの層の寸法は $1\ \mu m$ 以上のいかなる寸法でも作成することができる。これによって、細菌、動植物細胞その他の生物学的材料をその寸法に近い間隔（例えば、数 μm ないし $10\ \mu m$ ）で本発明の構造体及び／又はマイクロ流路デバイス上に配置することができるので、細胞を高密度でパターンニングすることが可能になる。第1スポットは、第1樹脂及び生体適合性ポリマーの層が除去されて形成されるが、いったん露出した基板はその後第2樹脂の層に覆われ、第2スポットが形成されてから第2樹脂の層が除去されて、もう一度基板が露出する。これに対し第2スポットは、露出した基板が樹脂の層に覆われることは起こらない点でのみ第1スポットと異なる。第1スポットと第2スポットとの区別は、スポットの位置、形状及び／又は寸法によるものではない。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]本発明のパターンニング方法の手順を示す模式図。

[図2]本発明の別のパターンニング方法の手順を示す模式図。

[図3]本発明のパターンニング方法を利用するマイクロ流路デバイスの作成の手順を示す模式図。

[図4]M P Cポリマー層による非特異的な鞭毛吸着の抑制を示すグラフ。

[図5]M P Cポリマーのパターンニングの精度を示す蛍光写真。

[図6]異なる直径の円形のスポットが除去されたパターンニングを施されたM P Cポリマー層を含む構造体上での培養細胞の配置を示す光学顕微鏡写真。

[図7]異なる幅の帯状のスポットが除去されたパターンニングを施されたM P Cポリマー層を含む構造体上での培養細胞の配置を示す光学顕微鏡写真。

[図8]1本の鞭毛の回転を撮影した連続写真。

[図9]スポットのサイズと吸着した鞭毛のうち回転しているものの割合との関係を示すグラフ。

[図10]マイクロ流路デバイス中の流路を灌流する溶液変換による鞭毛の回転速度の制御を示すグラフ。

符号の説明

- [0048]
- 1、11 基板
 - 2、12 生体適合性ポリマーの層
 - 3 樹脂の層
 - 4 スポット
 - 10、20 構造体
 - 13 第1樹脂の層
 - 14 第1スポット
 - 15 第2樹脂の層
 - 16 第2スポット
 - 17 第2生物学的材料
 - 18 第1生物学的材料

発明を実施するための形態

[0049] 図 1 を参照して、本発明のある実施態様を説明する。図 1 は本発明のパターンニング方法の手順を示す模式図である。図 1 (A) には、基板 1 の上に生体適合性ポリマーの層 2 が形成され、生体適合性ポリマーの層 2 の上に樹脂の層 3 が形成された構造体 10 が示される。所望のパターンでスポット 4 が形成されて生体適合性ポリマーの層 2 が残存するように、生体適合性ポリマーの層 2 と、前記樹脂の層 3 とが除去され、基板の一部が露出し、スポット 4 が形成される (図 1 (B))。その後、樹脂の層 3 が除去されて (図 1 (C))、生体適合性ポリマーの層 2 と、スポット 4 とが所望のパターンで基板上に配置された構造体 10 が作成される。

[0050] 図 2 を参照して、本発明の別の実施態様を説明する。図 2 は本発明のパターンニング方法の別の手順を示す模式図である。図 2 (A) には、基板 11 の上に生体適合性ポリマーの層 12 が形成され、生体適合性ポリマーの層 12 の上に第 1 樹脂の層 13 が形成された構造体 14 が示される。所望のパターンで第 1 スポット 14 が形成されるように、生体適合性ポリマーの層 12 と、第 1 樹脂の層 13 とが除去され、基板 11 の一部が露出し、第 1 スポット 14 が形成される (図 2 (B))。その後、第 1 スポット 14 を埋めるように第 1 スポット 14 の場所の基板と、残存した第 1 樹脂の層 13 との上に第 2 樹脂の層 15 が形成される (図 2 (C))。

[0051] つぎに、所望のパターンで第 2 スポット 16 が形成されるように、生体適合性ポリマーの層 12 と、第 1 樹脂の層 13 と、第 2 樹脂の層 15 とが除去される。このようにして基板 11 が露出した第 2 スポット 16 が形成される (図 2 (D))。この段階で第 2 スポット 16 に第 2 生物学的材料 17 が適用される場合がある (図 2 (E))。図 2 (E) 及び (G) では生物学的材料がピペットで滴下されるように描かれるが、これは例示にすぎず、当業者に周知のいかなる方法によって実行されてもかまわない。適用する場所を正確に指定することができないやり方、例えば、蒸着、噴霧その他のやり方では、第 2 スポットだけしか基板が露出していない図 2 (E) の段階で第 2 生物学的材料 17 を適用することが好ましい。第 2 樹脂の層 15 の上に堰堤 (

図示されない)を設けて、該堰堤で囲まれた領域全体を液溜めとして第2生物学的材料を含む流体を流し込むことによって第2生物学的材料を第2スポットの基板と接触させる場合もある。第2スポット16に第2生物学的材料17を適用した後で、第2樹脂の層15が除去される(図2(F))。すると、第2樹脂の層で覆われていた第1スポット14の場所の基板がふたたび露出する。

[0052] 図2(G)の段階で第1生物学的材料18を第1スポット14に適用する場合がある。第2生物学的材料の適用の場合と同じく第1生物学的材料の適用においても、当業者に周知のいかなる方法によって実行されてもかまわない。その後、第1樹脂の層13が除去される(図2(H))と、生体適合性ポリマーの層12と、第1スポット14と、第2スポット16とが所望のパターンで基板上に配置された構造体20が作成される(図2(I))。

[0053] 第1樹脂の層13が除去されてから、第1生物学的材料を第1スポット14に適用する場合も考えられる。適用する場所を正確に指定することができないやり方で第1生物学的材料が適用される場合には、第2スポット17の第2生物学的材料に第1生物学的材料が混入する可能性がある。このような適用方法を採用する場合には、例えば、第2生物学的材料に、第1生物学的材料を中和又は不活性化する成分を添加しておくことで混入による影響を軽減又は解消することができる。第1生物学的材料がレクチンの場合には、該レクチンと特異的に結合する糖を第2生物学的材料に含めることが好ましい。第1生物学的材料が抗体の場合には、該抗体と特異的に結合する抗原を第2生物学的材料に含めることが好ましい。

[0054] 図3を参照して、本発明のパターンニング方法を利用するマイクロ流路デバイスの作成の手順を示す模式図である。ガラス製基板の上に生体適合性ポリマー(MPCポリマー)の層が形成され(図3(A)(i))、該生体適合性ポリマーの層の上に、樹脂(ポリパラキシリレン)の層が形成される(図3(A)(ii))。その上にアルミニウム及び光犠牲層が形成される(図3(A)(iii))。アルミニウム及び光犠牲層の上からO₂プラズマが照射さ

れることによって、アルミニウム及び光犠牲層で保護されていない部分の樹脂及び生体適合性ポリマーの層が除去され、ガラス基板が露出したスポットが形成される（図3（A）（iv））。ポリパラキシリレンの樹脂の層が剥ぎ取られ（図3（A）（v））、生体適合性ポリマー（MPCポリマー）のパターンが形成されたガラス基板が露出する。一方で、従来の微細加工技術によるポリジメチルシロキサン（PDMS）によるマイクロ流路が用意され、 O_2 プラズマが照射された後、（図3（A）（v））、生体適合性ポリマー（MPCポリマー）のパターンが形成されたガラス基板に永久的に、かつ、水密に貼り付けられる（図3（B））。このようにして、マイクロ流路の灌流のために、マイクロシリンジ等の送液手段を介して1個又は2個以上の液体供給源に接続されるインレットと、廃液溜めに接続されるアウトレットとを更に備えた、本発明のマイクロ流路デバイスが作成される。図3（C）は完成した本発明のマイクロ流路デバイスに細胞その他の生物学的材料を添加した様子を示す。図3（C）上のA-B間の断面模式図が図3（C）下である。マイクロシリンジを通じて細胞の懸濁液をデバイス内部に流入させると、生体適合性ポリマー（MPCポリマー）層は細胞の基質接着を阻害するため、該生体適合性ポリマー（MPCポリマー）層の上に細胞が付着することはできない。そこで、前記生体適合性ポリマー（MPCポリマー）層が存在せずガラス基板が露出した部分にのみ細胞が付着する。このようにして作成されるマイクロ流路デバイス内のスポットに細胞その他の生物学的材料が配置される。なお、前記マイクロ流路デバイスに細胞懸濁液を添加する前に、フィブロネクチン、コラーゲン等の細胞－基質間接着を促進する物質を前記マイクロ流路デバイスに適用する場合もある。

[0055] 以下に実施例を示すが、これらは実施態様の例示を意図しており本発明の範囲を限定することは意図しない。

実施例 1

[0056] MPCポリマーによるガラス基板への生物学的材料の非特異性吸着の抑制
ガラス基板への生物学的材料の非特異性吸着をMPCポリマーがどの程度

抑制するかを検討するために、さまざまな回転速度でスピン塗布されたMPCポリマー及びウシ血清アルブミン（BSA）でコーティングされたガラス表面と、無処理で露出したガラス表面とにクラミドモナス鞭毛を適用した。前記クラミドモナス鞭毛は、3－4日液体培養したクラミドモナスにジブカイン－塩酸を添加した後、超遠心により回収した（S. Aoyamaら、*Biophysical J.*、89：3261－3268（2005））。その結果、図3に示すとおり、BSAではスピン塗布する回転速度が低いほど鞭毛の吸着が減少した。MPCポリマーでは、回転速度が最高の条件でもいかなる条件のBSAよりも鞭毛の吸着が少なかった。この結果からMPCポリマーは、生物学的材料の吸着を抑制する活性が強力であることがわかった。そこで、MPCポリマーのパターンニングによって生物学的材料を所望のパターンで配置できることが期待される。

実施例 2

- [0057] パリレン樹脂リフトオフ法によるMPCポリマーの高精度パターンニング
スピン塗布法によりガラス基板の表面にMPCポリマー層を形成した。つぎに、前記MPCポリマーの上に2 μ m厚のパリレン層を蒸着した。そして、ドライエッチングのマスクとしてフォトレジスト及びアルミニウムを用い、 O_2 プラズマにより所望の位置の前記パリレン層及びMPCポリマー層を除去した。その後、パリレン層を引き剥がしてMPCポリマー層を露出させた。MPCポリマーは生物学的材料の基板への非特異性吸着を抑制するため、生物学的材料はMPCポリマー層が除去されてガラス基板が露出したスポットに優占的に保持される。ガラス基板が露出した前記部位をマイクロ流路デバイスの流路内に配置する場合には、常法に従ってポリジメチルシロキサン（PDMS）を前記ガラス基板上に積層して、前記部位を通過するマイクロ流路を形成する。
- [0058] 図5は、予めローダミンを添加したMPCポリマーを用いてパターンニングした結果を示す蛍光写真である。MPCポリマーの幅が1.5 μ mまでの精度でパターンニングすることができた。本発明では光リソグラフィ法で生

体適合性ポリマーの層及び樹脂の層を除去するため、MPCポリマーは、光リソグラフィ法と同じ精度でパターンニングすることができる。

実施例 3

[0059] 培養細胞のパターンニング

使用された細胞は、ウシ血管内皮細胞である。10%のウシ胎仔血清（FBS、F7524、SIGMA）と、5%のペニシリンーストレプトマイシン溶液（p4333、SIGMA）とを添加したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、11885、Gibco）を用いて37°C、5%CO₂雰囲気下で培養された。

[0060] さまざまなパターンでパターンニングされたMPCポリマー層を含む構造体にウシ血管内皮細胞を播種して培養後、構造体上での細胞の配置パターンを観察した。図6は、各フレームに記載された直径のスポットが除去されたパターンニングを施されたMPCポリマー層を含む構造体上での培養4時間後の細胞の配置を示す光学顕微鏡写真である。図6に示すとおり、MPCポリマー層の上では細胞がほとんど存在せず、MPCポリマーが除去されたスポットにだけ細胞が配置された。直径200 μ m（左上）及び100 μ m（右上）のスポット内では、細胞はほぼ均一に分布していた。スポットの直径が小さいほどスポットあたりの細胞数は減少し、直径20 μ m（右下）では各スポットに1個ずつの細胞が配置された。この状態では、細胞は基質接着によって伸展することができず、丸くなっていることが観察された。

[0061] 図7は、各フレームに記載された幅の帯状のスポットが除去されたパターンニングを施されたMPCポリマー層を含む構造体上での培養3日後の細胞の配置を示す光学顕微鏡写真である。図7に示すとおり、MPCポリマーが除去されたスポットにだけ細胞が配置された。スポットの幅が50 μ m（下のフレーム）では細胞がスポットの長手方向に、4ないし5個ずつ並んで配向した。スポットの幅が5 μ mになると、細胞が1個ずつ1列に並んで配向した。スポットの幅が3 μ mになると、細胞が細長く伸張して配向した。そこで、本発明のパターンニング処理を施された環境で細胞が所望の配向パタ

ーンに配置された状態で良好に培養増殖することが示された。

実施例 4

[0062] マイクロ流路デバイスの流路内での鞭毛アレイの作成

MPCポリマー層をパターンニングしたガラス基板に前記クラミドモナス鞭毛を適用して鞭毛のアレイを作成した。鞭毛が吸着したスポットを通るマイクロ流路にATP及びカルシウムイオンを含むバッファーを灌流させると、鞭毛の回転が観察された。図8は1本の鞭毛の回転を撮影した連続写真である。図9は、ガラス基板が露出したスポットのサイズと、吸着した鞭毛のうち回転しているものの割合との関係を示すグラフである。スポットのサイズが小さいほど回転する鞭毛の割合が多くなり、スポットの直径が $5\mu\text{m}$ のときには73%の鞭毛が回転した。スポットに吸着した鞭毛の回転速度は0.5ないし3.0 rpsであった。

[0063] 図10は、マイクロ流路デバイス中の流路を灌流する溶液変換による鞭毛の回転速度の制御を示すグラフである。回転速度の変化を比較しやすくするため、どちらもStep1での平均回転速度を1として正規化した。Step2において、バッファーを変換しなかった鞭毛は回転速度が2割程度上がったのに対し、バッファー変換した鞭毛は元の半分以下まで回転速度が下がった。このことより、バッファー中のCaイオン濃度が高くなると基板に固定されている鞭毛の回転速度は下がるということがいえる。なお、回転速度の実測値は、Step1において平均2.0 rps、Step2において平均0.8 rpsであった。Step3では、バッファー変換しなかった鞭毛も最初の6割程度まで回転速度が下がった。これは、時間の経過によって鞭毛の活性が落ちたためだと考えられる。逆にバッファー変換した鞭毛は、Step2とStep3との間で回転速度の低下は見られなかった。これは、時間経過によって回転速度は下がっていったが、Caイオン濃度が上昇したためその影響で鞭毛運動は活性化され、結果として同じ程度の回転速度を保ったためだと考えられる。以上の結果より、Caイオン濃度の異なるバッファー変換によって、固定された鞭毛の回転速度を変えることができるという結

論が導かれる。このことは、鞭毛をアクチュエータとして用いる際に、その回転速度や移動速度をコントロールできる可能性があるということを示唆している。

請求の範囲

- [請求項1] 生体適合性ポリマーの層を形成するステップと、
前記生体適合性ポリマーの層の上に樹脂の層を形成するステップと、
、
前記生体適合性ポリマーの層と前記樹脂の層とが除去されて基板が露出した、スポットを形成するステップと、
前記樹脂の層を除去するステップとを含むことを特徴とする、生体適合性ポリマーのパターニング方法。
- [請求項2] 生体適合性ポリマーの層を形成するステップと、
前記生体適合性ポリマーの層の上に第1樹脂の層を形成するステップと、
前記生体適合性ポリマーの層と第1樹脂の層とが除去されて基板が露出した、第1スポットを形成するステップと、
残存する第1樹脂の層と、第1スポットの場所の基板との上に第2樹脂の層を形成するステップと、
前記生体適合性ポリマーの層と、第1樹脂の層と、第2樹脂の層とが除去されて基板が露出した、第2スポットを形成するステップと、
第2樹脂の層を除去するステップとを含むことを特徴とする、生体適合性ポリマーのパターニング方法。
- [請求項3] 前記生体適合性ポリマーは、生物学的材料との非特異性吸着を抑制する両親媒性ポリマーであることを特徴とする、請求項1又は2に記載の生体適合性ポリマーのパターニング方法。
- [請求項4] 前記生体適合性ポリマーは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであることを特徴とする、請求項3に記載の生体適合性ポリマーのパターニング方法。
- [請求項5] 前記基板は光透過性を有することを特徴とする、請求項1ないし4のいずれかに記載の生体適合性ポリマーのパターニング方法。
- [請求項6] 前記基板はガラスであることを特徴とする、請求項5に記載の生体

適合性ポリマーのパターンニング方法。

- [請求項7] 前記樹脂はポリパラキシリレンであることを特徴とする、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の生体適合性ポリマーのパターンニング方法。
- [請求項8] 前記スポットを形成するステップはドライエッチング法により実行されることを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の生体適合性ポリマーのパターンニング方法。
- [請求項9] 基板と、該基板上に形成される、請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の方法によってパターンニングされた生体適合性ポリマーの層及び前記スポットとを含むことを特徴とする、構造体。
- [請求項10] 前記基板を支持部を介して切断可能なように保持する基材を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の構造体。
- [請求項11] 前記支持部で前記基材から前記基板が切断することによって生じる前記基板の切断面を含み、該切断面は前記基板が露出していることを特徴とする、請求項 10 に記載の構造体。
- [請求項12] 前記基板上に設けられたマイクロ流路を含み、該マイクロ流路は前記スポットを通ることを特徴とする、請求項 9 ないし 11 のいずれかに記載の構造体。
- [請求項13] 前記マイクロ流路はポリジメチルシロキサンで作成されることを特徴とする、請求項 12 に記載の構造体。
- [請求項14] 前記スポットに結合した生物学的材料を含むことを特徴とする、請求項 9 ないし 13 のいずれかに記載の構造体。
- [請求項15] 基板と、該基板上に形成される、請求項 2 に記載の方法によってパターンニングされた生体適合性ポリマーの層、第 1 スポット及び第 2 スポットとを含むことを特徴とする、構造体。
- [請求項16] 第 1 スポットに結合した第 1 生物学的材料と、第 2 スポットに結合した第 2 生物学的材料とを含むことを特徴とする、請求項 15 に記載の構造体。

- [請求項17] 前記生物学的材料の少なくとも1つは細胞であることを特徴とする、請求項14ないし16のいずれかに記載の構造体。
- [請求項18] 前記スポットのそれぞれに1個の細胞が配置されることを特徴とする、請求項17に記載の構造体。
- [請求項19] 前記生物学的材料の少なくとも1つは特異的結合パートナーであることを特徴とする、請求項14ないし17のいずれかに記載の構造体。
- [請求項20] 第1生物学的材料は第1特異的結合パートナーで、第2生物学的材料は第2特異的結合パートナーであることを特徴とする、請求項15に記載の構造体。
- [請求項21] 基板と、該基板上に形成される生体適合性ポリマーの層と、該生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出した第1及び第2スポットと、前記スポットを通るマイクロ流路と、第1及び第2スポットのそれぞれに結合した第1及び第2特異的結合パートナーと、第1及び第2特異的結合パートナーと特異的に結合する第1及び第2細胞とを含むことを特徴とする、マイクロ流路デバイス。
- [請求項22] 第1及び第2スポットのそれぞれに第1及び第2細胞が1個配置されることを特徴とする、請求項21に記載のマイクロ流路デバイス。
- [請求項23] 前記生物学的材料の少なくとも1つは運動可能なオルガネラであることを特徴とする、請求項14ないし16のいずれかに記載の構造体。
- [請求項24] 前記運動可能なオルガネラは単離された鞭毛であることを特徴とする、請求項23に記載の構造体。
- [請求項25] 前記スポットのそれぞれに前記単離された鞭毛が1個配置されることを特徴とする、請求項24に記載の構造体。
- [請求項26] 基板と、該基板上に形成される生体適合性ポリマーの層と、該生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出したスポットと、該スポットを通るマイクロ流路と、前記スポットに配置された運動可能

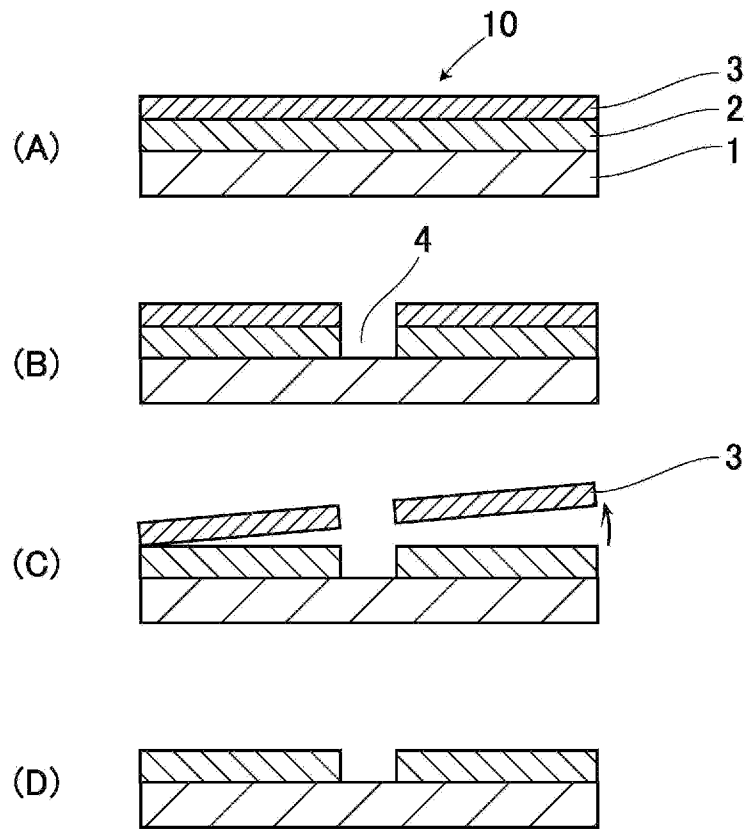
なオルガネラとを含むマイクロ流路デバイスであって、前記オルガネラの運動は前記マイクロ流路を灌流するバッファーを変えることによって制御されることを特徴とする、マイクロ流路デバイス。

[請求項27] 前記オルガネラは単離された鞭毛であることを特徴とする、請求項22に記載のマイクロ流路デバイス。

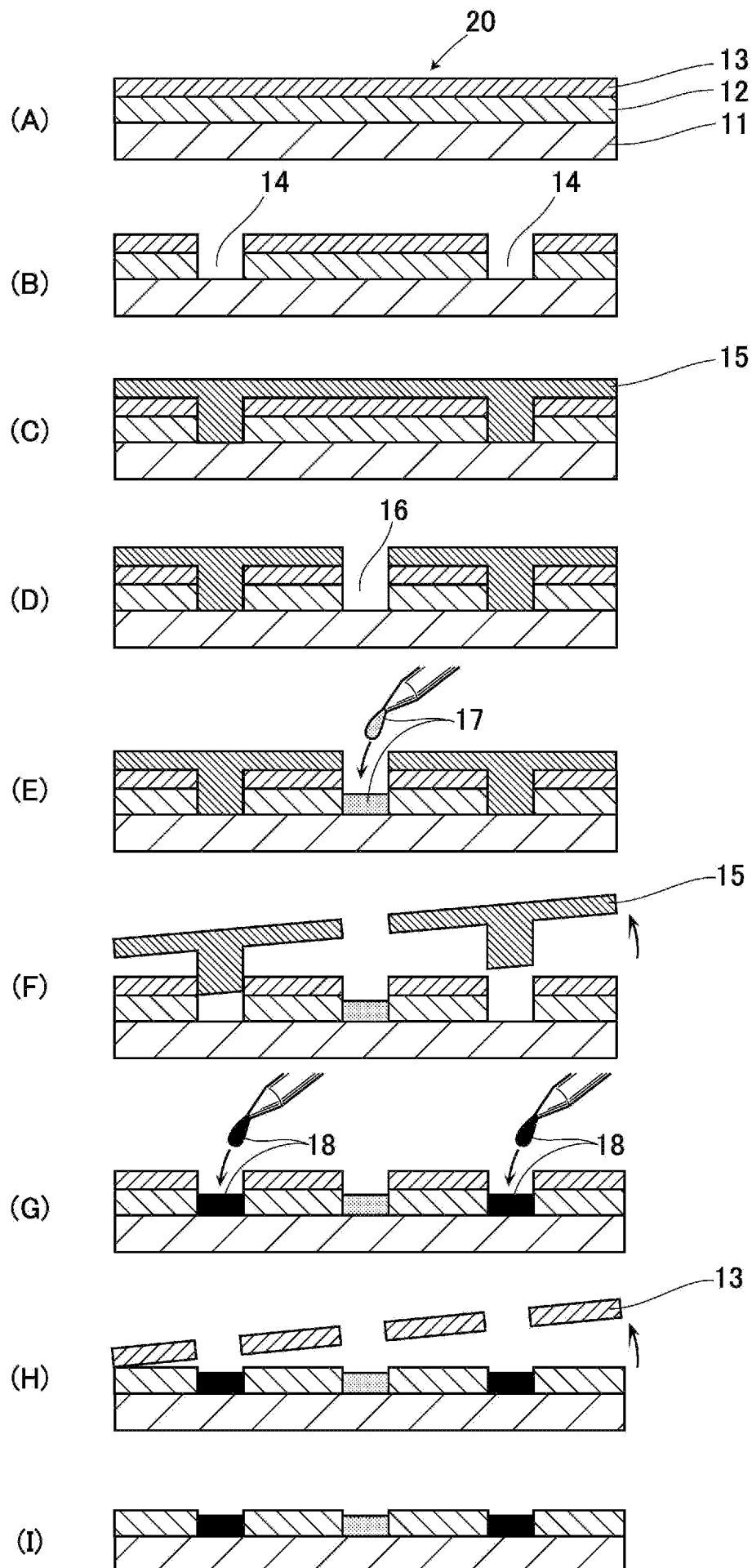
[請求項28] 基板上に形成された生体適合性ポリマーの層が除去されて前記基板が露出したスポットに配置された鞭毛を含み、該鞭毛を回転させることによって前記スポットを通るマイクロ流路内を灌流する液体を輸送又は攪拌することを特徴とする、マイクロ流路デバイス。

[請求項29] 前記スポットのそれぞれに1個の鞭毛が配置されることを特徴とする、請求項27又は28に記載のマイクロ流路デバイス。

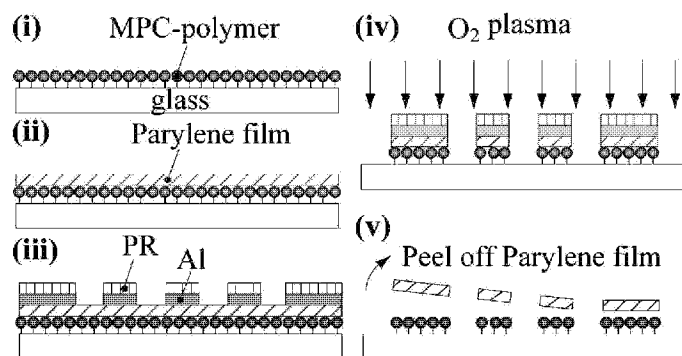
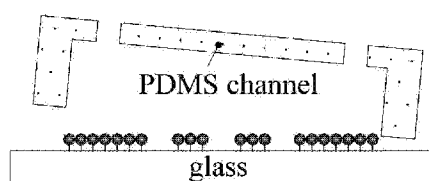
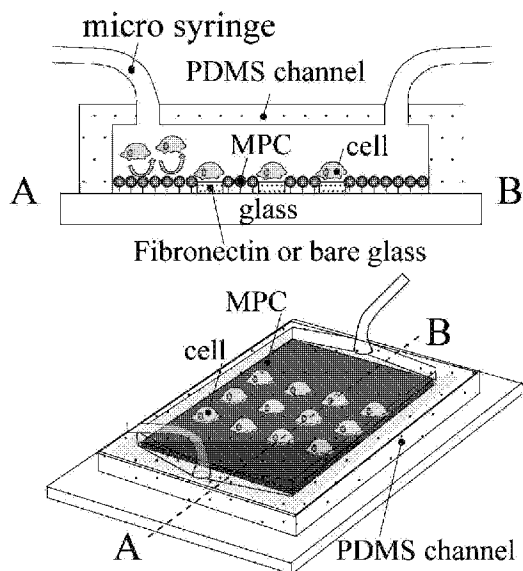
[図1]



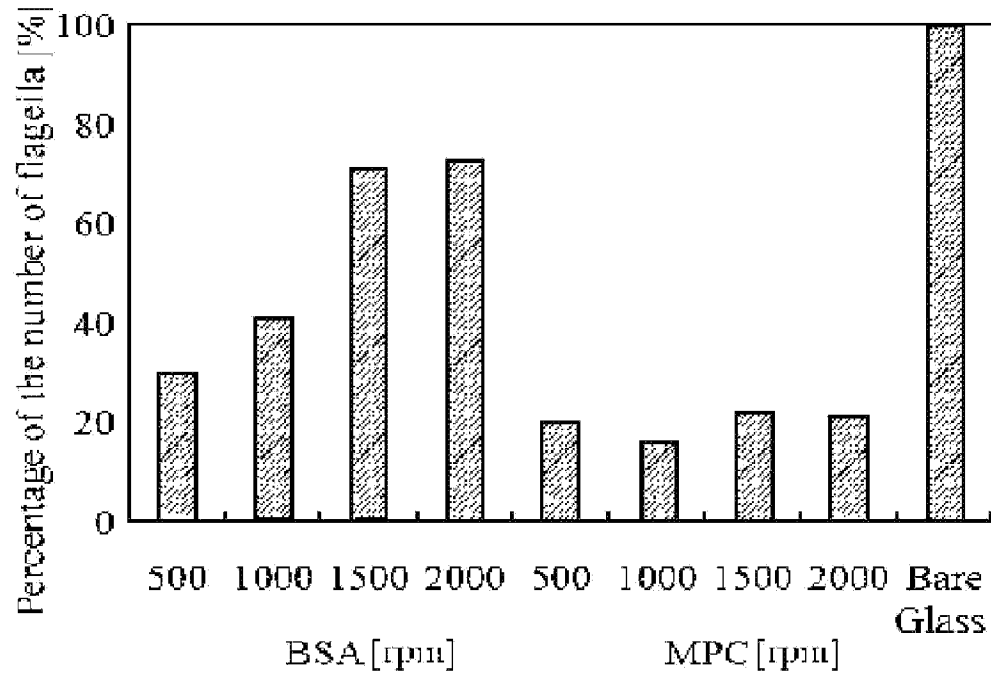
[図2]



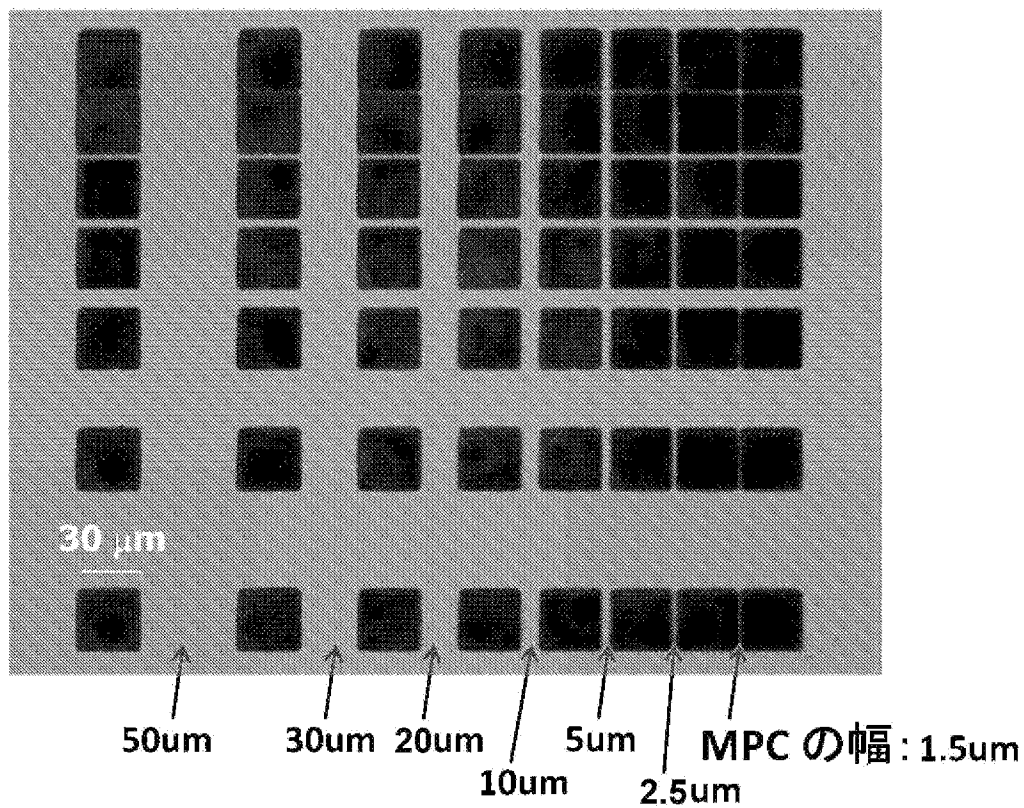
[図3]

(A) Patterning MPC polymer on a glass**(B) Bonding permanently PDMS with glass****(C) Patterning cells inside microchannel**

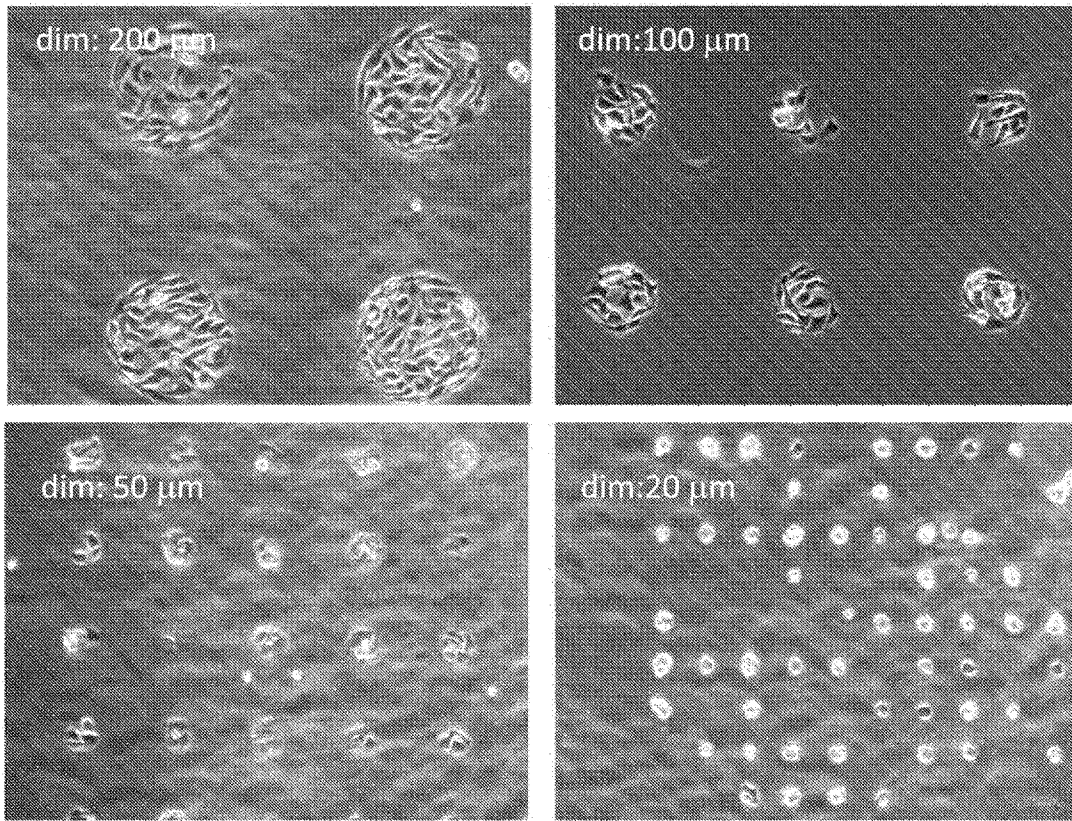
[図4]



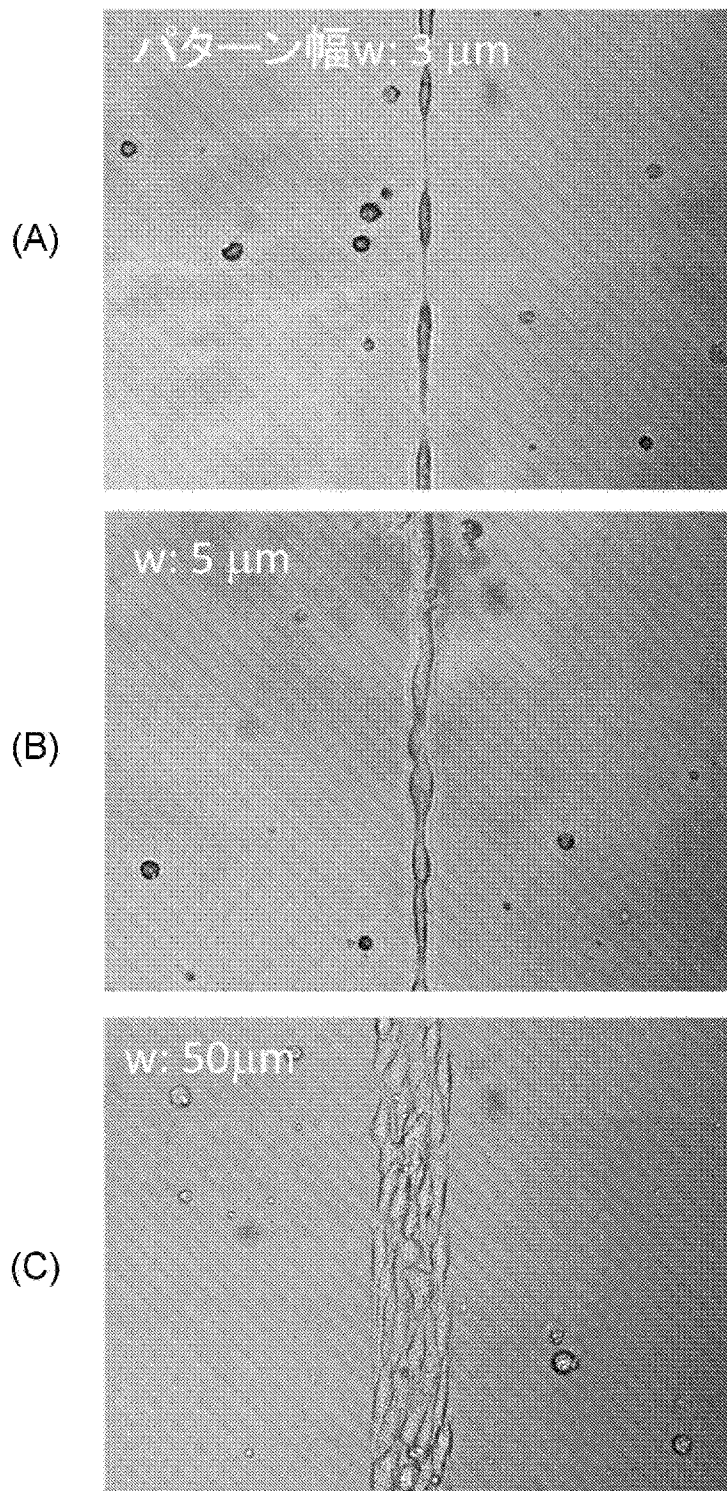
[図5]



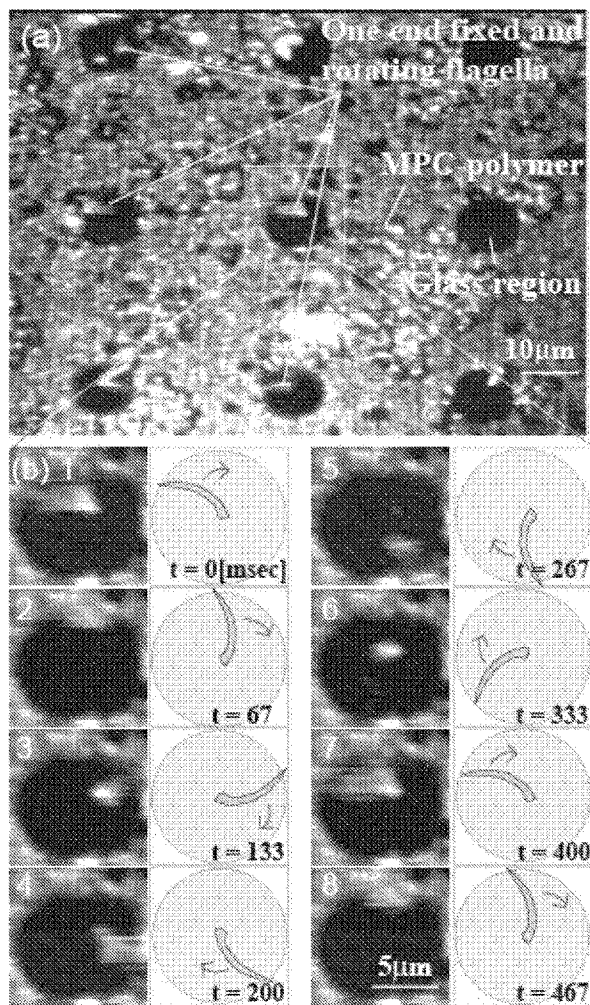
[図6]



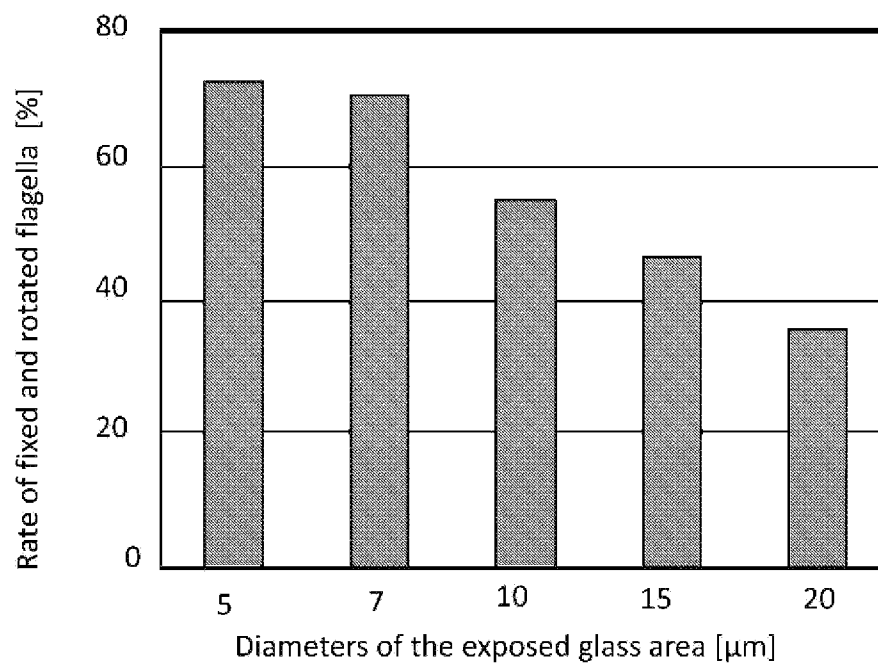
[図7]



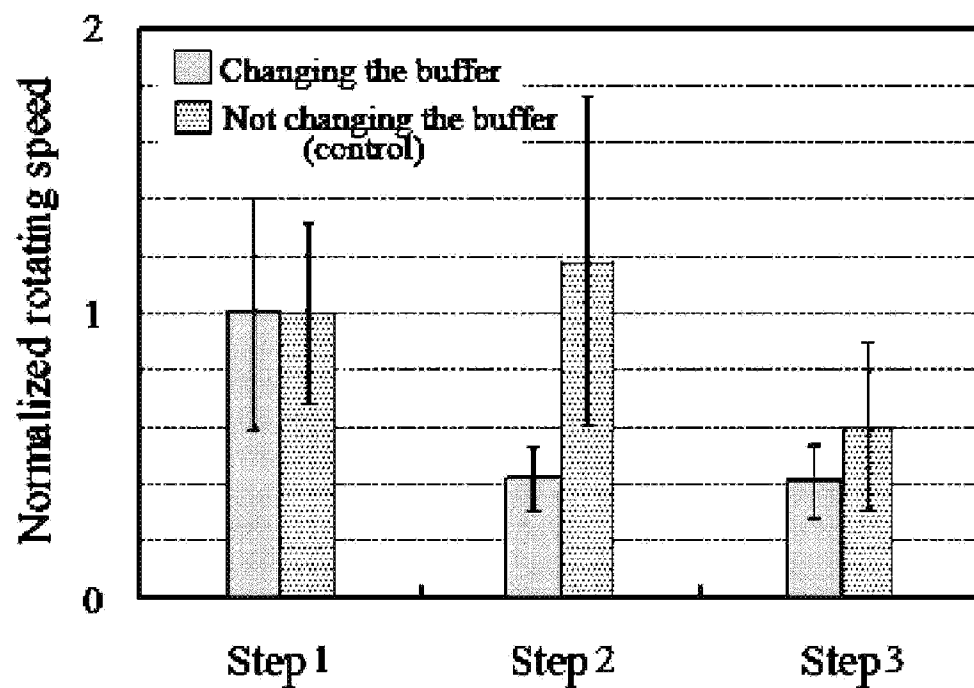
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/34(2006.01)i, B81B1/00(2006.01)i, B81C1/00(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)

C12M1/34, B81B1/00, B81C1/00, 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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-098323 A (The Foundation for the Promotion of Industrial Science), 19 April 2007 (19.04.2007), examples; fig. 2 (Family: none)	1-29
Y	JP 2007-187560 A (The Foundation for the Promotion of Industrial Science), 26 July 2007 (26.07.2007), paragraph [0036] (Family: none)	1-29
Y	JP 2004-309405 A (President of The University of Tokyo), 04 November 2004 (04.11.2004), entire text (Family: none)	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
30 October, 2009 (30.10.09)

Date of mailing of the international search report
10 November, 2009 (10.11.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, B81B1/00(2006.01)i, B81C1/00(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 (I P C))

Int.Cl. C12M1/34, B81B1/00, B81C1/00, 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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII), PubMed

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
Y	JP 2007-098323 A (財団法人生産技術研究奨励会) 2007.04.19, 実施例、図 2 (ファミリーなし)	1 - 2 9
Y	JP 2007-187560 A (財団法人生産技術研究奨励会) 2007.07.26, 【0036】段落 (ファミリーなし)	1 - 2 9

☒ 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

「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

「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

「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)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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

「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

「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

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 0 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

1 0 . 1 1 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

福澤 洋光

4 B

3 9 6 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
Y	JP 2004-309405 A (東京大学長) 2004.11.04, 全文 (ファミリーなし)	1 - 2 9