

(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
2015 年 10 月 1 日(01.10.2015)



(10) 国際公開番号

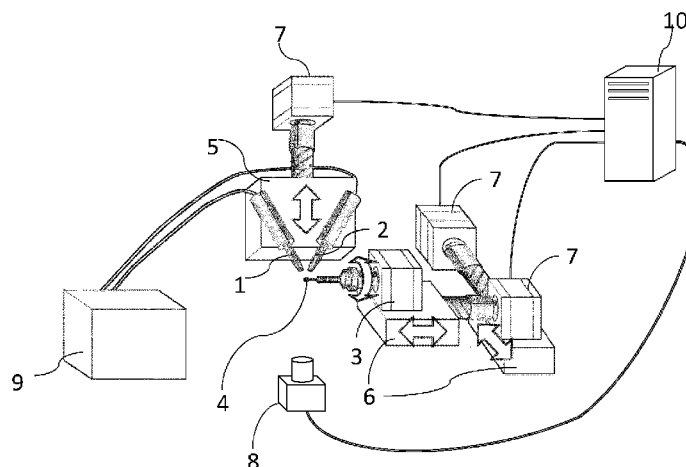
WO 2015/147147 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 1/28 (2006.01) G01N 23/20 (2006.01)
G01N 1/36 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/059332
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 26 日(26.03.2015)
- (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 2014-064710 2014 年 3 月 26 日(26.03.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 田中 勲(TANAKA Isao); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 篠田 晃(SHINODA Akira); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 姚 閔(YAO Min); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 田中 良和(TANAKA Yoshikazu); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 一入 章夫, 外(HITOSHIO Akio et al.); 〒0600062 北海道札幌市中央区南 2 条西 7 丁目 6 番 2 南 2 条ビル 5 階 I P アシスト特許事務所 Hokkaido (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, 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),

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR HIGH-SPEED FIXING OF BIOLOGICAL SPECIMEN BY USING HYDROGEL AND DEVICE THEREFOR

(54) 発明の名称: 生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法及びそのための装置



(57) Abstract: [Problem] The purpose of the present invention is to provide a novel biological specimen fixing means that is capable of reducing, as much as possible, the amount of time that the biological specimen is exposed to the environment and whereby there is little damage to the biological specimen. [Solution] The present invention provides a method for fixing a biological specimen at high speed by using hydrogel and includes: a step (A) in which a solution (1) and a solution (2) are prepared that form a hydrogel by being mixed; and a step (B) in which droplets of the solution (1) and the solution (2) are brought into contact with the surface of the biological specimen and the biological specimen is fixed at high speed by the hydrogel. As a result of the present invention, a biological specimen can be fixed at high speed, by using a hydrogel having high biocompatibility.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2015/147147 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

【課題】 本発明は、生物学的試料の環境への暴露時間を可能な限り短縮することができ、かつ生物学的試料に与えるダメージが少ない、新たな生物学的試料の固定手段を提供することを目的とするものである。 【解決手段】 本発明は、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、混合されることでハイドロゲルが形成される溶液 1 と溶液 2 とを用意する工程 A、並びに前記溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程 B を含む、前記方法を提供する。本発明によれば、生体適合性の高いハイドロゲルで生物学的試料を高速固定することができる。

明 細 書

発明の名称：

生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法及びそのための装置

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質結晶、細胞、生体組織その他の生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法、及びその方法を行うための装置に関する。

背景技術

[0002] タンパク質、タンパク質結晶、細胞、生体組織、核酸その他の生物学的試料は、一般に乾燥や高温などに対して不安定である。このような生物学的試料を、本来の機能を保ったまま安定に保護し、かつ測定や解析にほとんど影響を与えないように簡便に固定する方法は、基礎的研究から応用的研究のあらゆる段階において重要な基礎技術であり、かかる技術に対するニーズは依然として高い。

[0003] 生物学的試料を固定する方法の1つとして、生物学的試料に与える物理的又は化学的なダメージが少ないハイドロゲルの利用が挙げられる。例えば、特許文献1では、タンパク質結晶をアガロース等のハイドロゲルの中で形成させることが提案されている。また、特許文献2には、ゼラチンと極性アミノ酸とを含む細胞組織の長期保存及び増殖のためのヒドロゲル基質が提案されている。また、アルギン酸ナトリウムは、生体適合性に優れるハイドロゲルとして広く用いられている。

[0004] しかし、ハイドロゲル化は通常、生物学的試料の固定に求められる強度を有するまでに少なくとも分単位の時間を必要とする。このような分単位のハイドロゲル化は、可能な限り短時間に固定を完了させることが求められる場合、例えば細胞を生きたまま立体的に配列させる場合、あるいはタンパク質結晶を崩壊させることなく固定する場合には不利である。

[0005] また、生体適合性に優れるアルギン酸ナトリウムは、モノマーの粘性が高い一方でゲルの強度が弱いこと、ゲル化に高濃度のカルシウムイオンを必要

とすることなどの問題を有する。特に、カルシウムイオンは細胞の信号伝達に関与するイオンであるため、これを高濃度を含むハイドロゲルによる細胞の固定は、望ましくない影響を与え得る。

[0006] 一方、単にハイドロゲル化に要する時間を短縮することは、一般的には高濃度のラジカルを存在させること又はハイドロゲルモノマーの混合物を加温することなどによって可能である。しかし、殆どのラジカル及び加温処理は、生物学的試料にとって有害であり得る。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2009/091053号

特許文献2：特表2002-520013号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、生物学的試料を可能な限り短時間で固定することができ、かつ生物学的試料に与えるダメージが少ない、生物学的試料を固定する方法を新たに提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、ハイドロゲルを形成するモノマーを適切に選択して組み合わせ、これらを微小液滴の状態で接触させることで、さらに液滴の接触時にハイドロゲル化促進剤を共存させることで、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定することができることを見だし、下記の各発明を完成させた。

[0010] (1) 生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、混合されることでハイドロゲルが形成される溶液1と溶液2とを用意する工程A、並びに前記溶液1及び溶液2の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程Bを含む、前記方法。

(2) 工程Aが、ハイドロゲルを形成する少なくとも2種のモノマーの組合せの一方を含む溶液1と他方を含む溶液2とを用意する工程である、(1)

に記載の方法。

(3) 溶液 1 及び／又は溶液 2 がハイドロゲル化促進剤をさらに含む、(1) 又は(2)に記載の方法。

(4) 工程 A が、ハイドロゲルを形成する 1 種のモノマーを含む溶液 1 と、前記モノマーに対するハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 とを用意する工程である、(1)に記載の方法。

(5) 工程 A が、ハイドロゲルを形成する少なくとも 2 種のモノマーの組合せを含む溶液 1 と前記モノマーに対するハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 とを用意する工程である、(1)に記載の方法。

(6) 工程 B が、液体吐出ノズルから吐出させた溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程である、(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 生物学的試料がタンパク質結晶である、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 溶液 1 及び／又は溶液 2 が生物学的試料を含む溶液である、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(9) モノマーが多分岐ポリアルキレングリコール誘導体である、(2)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 生物学的試料を保持する手段、混合されることでハイドロゲルが形成される 2 種の溶液の液滴を前記保持手段に保持された生物学的試料にそれぞれ吐出させるための少なくとも 2 つの吐出ノズル、並びに前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置を自動調節する手段を備える、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定するための装置。

(11) 前記自動調節手段が、前記保持手段中の生物学的試料の位置を光学的に検出する手段、前記検出手段からの検出信号を解析して生物学的試料の表面で液滴を接触させるための前記保持手段の位置及び／又は吐出ノズルの位置を決定する手段、並びに決定された位置に前記保持手段及び／又は吐出ノズルを移動させる手段を含む、(10)に記載の装置。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、ハイドロゲルで生物学的試料を極めて短時間に固定することができる。また、液滴を接触させる位置を制御しながら連続的に移動させることにより、ハイドロゲルで固定された生物学的試料を含む立体成形物を調製することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ハイドロゲルで生物学的試料を高速固定するための装置の全体の概略図である。図中の符号は、1及び2がインクジェットノズル、3が回転モータ、4が生物学的試料の保持具、5がインクジェットノズルの位置を移動させるためのリニアステージ、6が保持具及び回転モータを移動させるためのX Yステージ、7がリニアステージ又はX Yステージの駆動モータ、8がC C Dカメラ、9が溶液を吸引及び／又は排出するポンプ、10がコントロールユニットを、それぞれ表す。

[図2]ハイドロゲルで生物学的試料を高速固定するための装置の中心部を表す概略図である。図中の符号は、1及び2がインクジェットノズル、3が回転モータ、4が生物学的試料の保持具、5がリニアステージ、及び6がX Yステージを表す。

[図3]保持具であるMounted Litho Loops上に固定されたりゾチーム結晶の拡大写真である。パネルA及びBは保持具とその上に固定化された結晶を上から及び横からそれぞれ写したものである。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、混合されることでハイドロゲルが形成される溶液1と溶液2とを用意する工程A、並びに前記溶液1及び溶液2の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程Bを含む、前記方法に関する。

[0014] 本発明において固定される対象となる生物学的試料としては、数mm四方以下の大きさの生体組織、その断片若しくは切片（以下、これらを生体組織

等とする)、分離細胞、真菌又は細菌、ミトコンドリア、小胞体又は細胞核などの細胞内オルガネラ、核酸又はタンパク質などの生体高分子などを挙げることができる。

[0015] 本発明の方法の好適な対象は細胞又はタンパク質であり、特に好ましい対象はタンパク質結晶である。なお、かかる生物学的試料は、水又は適当な緩衝液等の溶媒に懸濁された状態にあるものを好ましい例として含む。従って、本発明はかかる溶媒に懸濁された状態の生物学的試料をハイドロゲルで固定する方法も含むものである。

[0016] 本発明にいう高速とは、混合されることでハイドロゲルが形成される溶液 1 の液滴と溶液 2 の液滴とが接触してからハイドロゲルが形成されるまでに要する時間が少なくとも 10 秒以内、好ましくは 5 秒以内、より好ましくは 3 秒以内、さらに好ましくは 1 秒以内であることをいう。また固定には、生物学的試料の全部がハイドロゲルで覆われて固定されることが及びその一部がハイドロゲルで覆われて固定されることが含まれる。一部が固定される例としては、生物学的試料の一部とその他の物との間にハイドロゲルが形成される結果、生物学的試料が前記物に固定される場合を挙げることができる。

[0017] 本発明にいう固定は物を動かなくするという広い意味で用いられ、具体的には、細胞、オルガネラ、タンパク質結晶などの生物学的試料を、それらの生物学的又は生化学的機能を保持したまま、ハイドロゲルによって所望の位置から動かなくすることを含む。生物学的な標本作製する際に、自己分解や腐敗による劣化から保護するために、パラフィン又はホルマリンなどを用いてあらゆる生化学反応を停止させ、生物試料の保存性を高めることも固定と呼ばれるが、本発明における固定はかかる狭義の意味には限定されない。

[0018] 本発明の好ましい態様の一つは、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、ハイドロゲルを形成する少なくとも 2 種のモノマーの組合せの一方を含む溶液 1 と他方を含む溶液 2 とを用意する工程 A、並びに前記溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程 B を含む、前記方法である。

- [0019] ハイドロゲルを形成する少なくとも2種のモノマーの組合せとは、対になって架橋構造を形成する官能基がそれぞれ別々に導入され、当該官能基間の架橋反応によりハイドロゲルが形成されるモノマーの組合せである。
- [0020] 本態様における溶液1は、前記組合せの一方を含み、溶液2は前記組合せの他方を含むものであるが、それぞれの溶液はハイドロゲルを形成するモノマーの別の組合せをさらに含んでもよい。すなわち1つの溶液が1つのモノマーを含む一溶液一溶質の形態に加え、1つの溶液が二以上の溶質を含む一溶液多溶質の形態も、一溶液中で望ましくない現象が生じない限り、本発明における溶液として利用可能である。
- [0021] また、本態様ではハイドロゲルを形成する少なくとも2種のモノマーの組合せの一方を含む溶液1と他方を含む溶液2とを利用するが、これらの2種類の溶液のみを利用することを意味するものではない。したがって、ハイドロゲルの形成が損なわれない限り、ハイドロゲルを形成するモノマーの別の組合せを含む溶液をさらに追加して利用してもよい。すなわち、溶液の組合せは1つ又は複数であってもよく、溶液1及び溶液2に含まれる組合せとは別の組合せのモノマーその他の物質を含む、溶液1及び溶液2とは別の溶液を溶液1及び2とともに使用する実施形態も本態様に含まれる。
- [0022] 対になって架橋構造を形成する異なる2種の官能基は、いわゆるクリック反応が生じる官能基の組合せであり、例えばチオールマイケル付加反応（Devathara, Chem. Mater., 2014年、第26巻、724-744ページ）が生じる官能基の組合せ、例えばチオール基とマレイミド基、カルボキシル基、ビニルスルホン基、 α , β 不飽和アクリレート基、 α , β 不飽和メタクリレート基、 α , β 不飽和アクリルアミド基又は α , β 不飽和メタクリルアミド基との組合せ、カルボキシル基とアミノ基との組み合わせなどを挙げることができる。
- [0023] ハイドロゲルを形成することのできるモノマーとしては、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（2-ヒドロキシエチルアクリレート）、ポリ（2-ヒドロキシプロピルアクリレート）、ポリ（2-ヒドロキシ

プロピルメタクリレート)、ポリ(2-ヒドロキシブチルアクリレート)、ポリ(2-ヒドロキシブチルメタアクリレート)などの水酸基含有ポリ(メタ)アクリレートに官能基が導入された誘導体、ポリ(メトキシポリエチレングリコールアクリレート)、ポリ(メトキシポリエチレングリコールメタクリレート)などのポリエチレングリコール鎖を含有するポリ(メタ)アクリレートに官能基が導入された誘導体、ポリ(2-メタクリルオキシエチルホスホリルコリン)などのリン脂質類似構造を有するリン酸基含有ポリメタクリレートに官能基が導入された誘導体、及びポリ(アリルアミン)などのアミノ基含有ポリマーに官能基が導入された誘導体などの、生体適合性高分子モノマーが例示される。また、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸等の天然多糖類又はそれらの塩若しくは変性体などに官能基が導入された誘導体も利用可能である。

[0024] 前記の官能基をモノマーに導入する方法は官能基ごとに公知であり、例えばカルボキシル基及びアミンの場合には、Sakaiら(Macromolecules、2008年、第41巻、5379-5384ページ)に記載された方法を利用することができる。

[0025] 本発明で利用可能なモノマーの組合せの1つは、特表2010-532396号公報に記載された、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸その他の生体適合性高分子にチオール基を導入した生体適合性高分子チオール化誘導体と、チオール基反応性官能基を含む多分岐ポリエチレングリコール誘導体との組合せである。特表2010-532396号公報の教示に従い、各誘導体を含む溶液の性質を調節し、酸アルカリを選択的に加えて反応性混合物溶液のpH値を調節することにより、ゲル化を10秒以下、特に数秒間で行うことができる。

[0026] 本発明で利用可能なモノマーの組合せのもう一つは、多分岐ポリアルキレングリコール誘導体、好ましくはチオール基を含む多分岐ポリエチレングリコール(PEG)誘導体とチオール基反応性官能基を含む多分岐PEG誘導体との組合せである。

[0027] かかる多分岐PEG誘導体の組合せは、例えば日油株式会社から市販されているSUNBRIGHTシリーズのSHシリーズ（チオール基を有する多分岐PEG誘導体）とMAシリーズ（マレイミド基を有する多分岐PEG誘導体）との組合せ、PAシリーズ（アミンを有する多分岐PEG誘導体、例えばPTE-150PA又はHGE0-150PAなど）とHSシリーズ（スクシニミジルカルボキシペンチル基を有する多分岐PEG誘導体）、GSシリーズ（スクシニミジルグルタレート基を有する多分岐PEG誘導体）又はCSシリーズ（スクシニミジルスクシネート基を有する多分岐PEG誘導体）との組合せ、NPシリーズ（p-ニトロフェニルカルボネート基を有する多分岐PEG誘導体、例えばHGE0-200NP）と前記PAシリーズとの組合せなどを挙げることができる。

[0028] なお、PEGの分岐数と置換基の種類には特別な制限はない。したがって、市販されている多分岐PEG誘導体には見られない構造、例えばマレイミド基を有する8分岐PEG誘導体又はチオール基を有する6分岐PEG誘導体などは、市販されている多分岐PEG誘導体の合成法に準じて任意に調製することができるが、本発明ではこのような多分岐PEG誘導体も利用可能である。

[0029] 本発明では、特にハイドロゲル化促進剤、すなわち重合開始剤又は重合促進剤などのハイドロゲルの形成を促進することのできる物質をモノマーの置換基に応じて選択し、利用することが好ましい。ハイドロゲル化促進剤としては、架橋反応がチオール基とマレイミド基との間で行われる場合にはTEMED、Tris、リン酸水素2ナトリウムなどを挙げることができる。少なくとも2種のモノマーの組合せの一方を含む溶液1と他方を含む溶液2とを利用する上記の態様において、ハイドロゲル化促進剤は、一方又は両方の溶液に含まれていてもよい。

[0030] 本発明における別の好ましい態様は、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、ハイドロゲルを形成する1種のモノマーを含む溶液1と、前記モノマーに対するハイドロゲル化促進剤を含む溶液2とを用意す

る工程 A、並びに前記溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程 B を含む、前記方法である。

[0031] 自身が単独でハイドロゲルを形成することができるモノマーを利用するときは、かかるモノマーを含む溶液 1 と、そのモノマーに対する重合開始剤又は重合促進剤などのハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 を用意し、溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させることでも、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定することができる。そのようなモノマーの例としてはチオール基を有する多分岐 PEG 誘導体を、またこれらモノマーに対するハイドロゲル化促進剤の例はテトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を挙げることができる。

[0032] 本発明におけるさらに別の態様は、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、ハイドロゲルを形成する少なくとも 2 種のモノマーの組合せを含む溶液 1 と前記モノマーに対するハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 とを用意する工程 A、並びに前記溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程 B を含む、前記方法である。

[0033] 単に混合されるだけではハイドロゲルが形成されない又は形成しにくい 2 種のモノマーを利用するときは、かかる 2 種のモノマーを含む溶液 1 と、それらのモノマーによるハイドロゲル形成に対する重合開始剤又は重合促進剤などのハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 を用意し、溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させることでも、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定することができる。そのような 2 種のモノマーの組合せの例としてはチオール基を有する多分岐 PEG 誘導体とマレイミド基を有する多分岐 PEG 誘導体の組み合わせを、またこれらモノマーに対するハイドロゲル化促進剤の例はテトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、リン酸水素 2 ナトリウムを挙げることができる。なお、2 種のモノマーを含む溶液 1 には、ハイドロゲル化に

対する阻害剤を同時に含ませる、又はハイドロゲル化しない pH に調節するその他の、溶液 2 との接触前に溶液 1 内でハイドロゲルが形成されない条件を付加しておくことが好ましい。

[0034] 本発明では、上記モノマーは溶液、特に水溶液の形態で使用される。溶液の pH は、適当な酸、アルカリ又はこれらと緩衝剤によって、溶液同士が接触する際の pH が、モノマーのゲル化反応に好適な pH となるように調節されることが望ましい。ハイドロゲル化促進剤を利用する場合も同様である。チオール基を有する多分岐 PEG 誘導体とマレイミド基を有する多分岐 PEG 誘導体との組合せの場合には、溶液同士が接触する際の pH は 5 ～ 8 の範囲内、好ましくは pH 6.5 ～ 7.5 の範囲内となるように調節されることが好ましい。特にチオールマイケル付加反応の場合には、溶液同士が接触する際の pH は 7 以上であることが好ましい。さらに溶液は、高速ゲル化を妨げない範囲で塩化ナトリウムその他の塩、等張化のための糖類などの任意の成分を含んでいてもよい。

[0035] 溶液中のモノマーの濃度は、用いられる組合せにおいて高速ゲル化が可能となる濃度以上であることが必要であるが、いずれの組合せの場合でも下限は 5 重量%以上であればよく、ハイドロゲル化促進剤を用いるときは下限を 3 重量%以上、又は 1 重量%以上とすることもできる。一方、濃度の上限は吐出する液滴の体積に依存するが、本発明では 30 重量%以下、好ましくは 20 重量%以下であればよい。

[0036] 本発明は、前記溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程 B を含む。

[0037] 工程 B の好ましい態様のひとつは、適当な保持具で支持された生物学的試料に対して、前記溶液 1 の液滴と溶液 2 の液滴とを生物学的試料の表面で接触させることで、生物学的試料の全部又は一部をハイドロゲルで固定する方法である。

[0038] 溶液は、一滴が数十ピコリットル (pL) ～ 1 μ L の範囲の量 (体積) である液滴として、適当な液体吐出ノズルから吐出されることが好ましい。例

えば、適当な保持部材の上に置かれたタンパク質結晶の一部を、タンパク質結晶が保持部材に固定されるようにハイドロゲルで高速固定するときは、一滴滴当たりの体積が50～200 pLである液滴をタンパク質結晶に向けて吐出することが好ましい。かかる微量の液滴は接触後短時間で混ざりあうことができ、より短時間でハイドロゲルを形成させることができる。ただし、大きな生物学的試料を固定するとき又は細胞が含まれる液滴の場合は、吐出される液滴の一滴滴当たりの体積はより大きいものであってもよい。

[0039] 液体吐出ノズルとしては、上記の液滴を吐出できるものであれば、プランジャー式、エアー圧送式、スクリーバルブ式などの液体吐出ノズルのいずれも利用することができる。また、マイクロインジェクターや低容量自動ピペッターなども利用可能である。

[0040] 本発明の目的において特に好ましい液体吐出ノズルは、インクジェットノズルである。一滴が数十ピコリットル (pL) ～1 μ Lの範囲の量 (体積) の液滴を吐出するためのノズルとしては、 piezo素子を有するインクジェットノズル又は加熱式のインクジェットを利用することができるが、piezo素子を有するインクジェットノズルの使用がより好ましい。

[0041] また、2つの溶液の液滴は、生物学的試料の表面上若しくはその直近で液滴同士が接触するように、方向及び吐出ノズルと接触位置との間の距離を調節して吐出される。

[0042] 工程Bの別の好ましい態様は、前記溶液1及び溶液2の液滴と、生物学的試料例えば細胞を含む溶液3の液滴とを、実質的に同時に又は連続して一点に向けて吐出し、これら溶液を接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法である。

[0043] この態様において、溶液を接触させる位置を制御しながら連続的に移動させることによって、生物学的試料がハイドロゲルで固定された成形物を製造することができる。また、異なる生物学的試料をそれぞれ含む複数の溶液を用意し、それらを吐出する順序又は接触させる位置などを適切に制御することで、異なる生物学的試料が制御された位置においてハイドロゲルで固定さ

れた立体成形物を製造することもできる。

[0044] 生物学的試料への３－Ｄプリンタ技術の適用は、化学と生物、２０１３年、第５１２巻の特集、例えば中村ら（同巻、第３０～３４ページ）、古川ら（同巻第３６～３７ページ）を始め、様々な提唱がなされている。本発明の方法は、この様な積層造形型の３－Ｄプリンタ技術を利用することにより、簡便に行うことができる。具体的には、３－Ｄプリンタ技術で用いられるＡＢＳ樹脂や光硬化性樹脂その他の立体物成形用材料を本発明にいうモノマー、好ましくは生体適合性モノマーの溶液に置き換え、所望の生物学的試料を含む溶液と合わせて吐出を制御することで、生物学的試料がハイドロゲルで固定された立体成形物を作製することができる。

[0045] 工程Ｂのさらに別の好ましい態様は、溶液１と溶液２の一方又は両方に生物学的試料、例えば細胞を含ませておき、これら溶液１と溶液２の液滴を一点に向けて吐出して接触させることで生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法である。

[0046] この態様においても、溶液を接触させる位置を制御しながら連続的に移動させることによって、生物学的試料がハイドロゲルで固定された成形物を製造することができる。また、異なる生物学的試料をそれぞれ含む溶液を複数用意し、それらの液滴を吐出する順序又は接触させる位置などを適切に制御することで、異なる生物学的試料が制御された位置においてハイドロゲルで固定された立体成形物を製造することもできる。この様な成形物の製造もまた、前記のような３－Ｄプリンタ技術を利用することにより、簡便に行うことができる。

[0047] なお、生物学的試料を含む溶液の液滴を吐出させる場合には、その溶液は、モノマーによる高速ハイドロゲル化を妨げない範囲において、生物学的試料を安定に保つことのできる適切な溶媒、典型的にはＰＢＳ（リン酸緩衝化生理食塩水）などの生体適合性の高い緩衝液を基に調製されることが望ましい。その他、必要に応じて安定化剤、防腐剤などの任意成分を添加してもよい。

[0048] 本発明は、生物学的試料を保持する手段、混合されることでハイドロゲルが形成される２種の溶液の液滴を前記保持手段に保持された生物学的試料にそれぞれ吐出させるための少なくとも２つの吐出ノズル、並びに前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置を自動調節する手段を備える、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定するための装置を提供する。特に、前記自動調節手段が、前記保持手段中の生物学的試料の位置を光学的に検出する手段、前記検出手段からの検出信号を解析して生物学的試料の表面で液滴を接触させるための前記保持手段の位置及び／又は吐出ノズルの位置を決定する手段並びに決定された位置に前記保持手段及び／又は吐出ノズルを移動させる手段を含む、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定するための装置を提供する。

[0049] 前記装置の構成の一態様を例として図１及び図２に示す。図１は装置全体の概略図、図２は装置の中心部の概略図である。図１に示される装置は、タンパク質の結晶を固定化することを目的とした装置の例であり、インクジェットノズル１及び２、回転モータ３、保持具４、リニアステージ５、ＸＹステージ６、駆動モータ７、ＣＣＤカメラ８、ポンプ９及びコントロールユニット１０を含む。

[0050] 本態様において、インクジェットノズル１及び２は、Ｚ軸方向に稼働するリニアステージ５にとりつけられている。また、保持具４が回転軸に連結された回転モータ３は、Ｘ軸及びＹ軸方向に稼働するＸＹステージ６にとりつけられている。リニアステージ５及びＸＹステージ６は、コントロールユニット１０の指令によってそれぞれのステージを移動させる駆動モータ７をそれぞれ含む。

[0051] インクジェットノズル１及び２には、溶液１及び２がそれぞれ充填された２つの容器からポンプ９によって溶液が送られ、インクジェットノズル１から溶液１の液滴が、インクジェットノズル２から溶液２の液滴がそれぞれ吐出される。なお、インクジェットノズルの先端と容器内の液面は垂直方向において同じ高さに配置されることが望ましい。

- [0052] CCDカメラ8は、回転モータ3の回転軸に連結された保持具4の先端を撮影するように配置される。回転モータ3が駆動することで保持具4が回転し、生物学的試料の位置が複数の角度からCCDカメラ8によって撮影される。CCDカメラ8が撮影した画像データはコントロールユニット10に送られる。
- [0053] コントロールユニット10は、プログラム制御によって、画像データとしてCCDカメラ8から送られる生物学的試料の詳細な位置情報を解析し、生物学的試料の表面で吐出された液滴が接触するように、インクジェットノズル1及び2並びに回転モータ3を移動させるための信号をリニアステージ5及びXYステージ6の駆動モータ7に送信する。また、試料の向きを調整する信号を回転モータ3に、溶液の吐出を行う信号をインクジェットノズル1及び2に、それぞれ送信する。
- [0054] 所定の位置に配置されたインクジェットノズル1及び2から、溶液1及び2の液滴がそれぞれ生物学的試料に向けて吐出され、生物学的試料の表面で接触することによってハイドロゲルの形成が開始される。また、吐出と共に、リニアステージ5、XYステージ6の駆動モータ7及び／又は回転モータ3を適宜駆動させることで、生物学的試料の表面上で液滴が接触する位置を微調整することができる。
- [0055] 生物学的試料を保持する手段は、挟む、すくう、穿刺する、吊す、載せるその他の方法によって、生物学的試料を保持することができる部材であればいずれでもよい。生物学的試料がタンパク質結晶である場合の当該手段の好ましい例はタンパク質結晶保持具であり、メッシュ構造を有するProtein Wave社のMounted LithoLoops（メッシュ径0.4 μ m）、ループ構造を有するHampton Research製のMounted CryoLoopなどを挙げることができる。また、保持手段は、作業者がマニュアルで作業できるように独立した部材であってもよく、又は他の部材、例えば回転モータ3の回転軸などと一体的に成形されたものであってもよい。

- [0056] 吐出ノズルはインクジェットノズルであることが好ましく、吐出される液滴の液量に合わせ、市販のインクジェットノズルから適宜選択して利用すればよく、特殊な材質や形状などは特に必要ではない。好適な例としては、Microjet社のIJHDシリーズ(IJHD-100、IJHD-300など)を挙げることができる。
- [0057] 前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置を自動調節する手段は、前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置情報を基に、生物学的試料の表面で溶液1の液滴と溶液2の液滴とが接触するように、前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置を自動的に調節する手段である。前記自動調節手段の一態様は、前記保持手段中の生物学的試料の位置を光学的に検出する手段、前記検出手段からの検出信号を解析して生物学的試料の表面で液滴を接触させるための前記保持手段の位置及び／又は吐出ノズルの位置を決定する手段、並びに決定された位置に前記保持手段及び／又は吐出ノズルを移動させる手段を含む自動調節手段である。
- [0058] 検出手段は、保持具によって保持されている生物学的試料の位置を少なくともmmオーダー好ましくは μ mオーダーで測定ないし識別できる程度の解像度及び感度を有している光学的検出機器であればよい。光学的検出機器は、撮影した画像データを検出信号として後に説明する空間位置決定手段に送信できるものであることが好ましく、典型的には当該光学的検出手段はCCDカメラであることが好ましい。ただしこれに限定されるものではなく、赤外線カメラその他の光学的検出機器を利用してもよい。
- [0059] 検出手段からの検出信号を解析して生物学的試料に液滴を吐出するための前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置を決定する手段は、典型的には高速演算プロセッサを有するコンピュータであるコントロールユニットである。当該決定手段であるコントロールユニットには、検出手段から送信される検出信号すなわち画像データを元に保持手段及び／又は吐出ノズルの生物学的試料に液滴を吐出するための位置を算出する処理と、その位置に向けて保持手段及び／又は吐出ノズルを移動させるための指令を以下に説明する移動

手段に送信する処理とを行うプログラムが組み込まれる。

[0060] 保持手段及び／又は吐出ノズルを移動させる手段は、前記決定手段からの指令に従って保持手段及び／又は吐出ノズルを3次元空間的に移動させることのできる駆動手段である。そのような駆動手段としては、電気モータその他の電氣的に駆動するもの、油圧又は水圧等によって駆動するもの、圧搾空気等によって駆動するもの、その他の駆動手段を挙げることができる。本発明では、空間的位置すなわちX軸方向、Y軸方向及びZ軸方向それぞれについて微調整が可能であり、また装置の組み立てが容易で装置全体を小型化しやすい電氣的駆動手段、具体的にはリニアステージ、自動ステージ、サーボモータ又はステッピングモータを用いることが好ましい。また駆動手段により移動させる対象は、保持手段又は吐出ノズル若しくはそれらの両方のいずれであってもよい。

[0061] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

実施例

[0062] <実施例1>

1) 高速固定装置の製作

2つの液体保持容器にそれぞれ連結させた2つのインクジェットノズル（いずれもMicrojet社のIJHD-100）、中央精機製のズームレンズTV-Z-Hを組み合わせたCCDカメラ（Watec社 WAT-231S2）、回転モータ（オムロン社）、回転モータの回転軸の先端に連結可能なProtein Wave社のMounted LithoLoops、回転モータの位置をX軸方向及びY軸方向に調節するXYステージ、2つのインクジェットノズルの位置をZ軸方向に調節するリニアステージ、及び両ステージの位置制御プログラムが組み込まれたコンピュータユニットを含む高速固定装置を作製した。前記位置制御プログラムは自作した。

[0063] 2) タンパク質結晶の高速固定

前記1)の高速固定装置の液体保持容器1に日油株式会社の高純度活性化PEG誘導体であるSUNBRIGHT（登録商標）PTE-100MA溶

液（１０重量％、ハイドロゲル化促進剤として２ｍＭのＴＥＭＥＤを含む）を、液体保持容器２に同社のＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）ＰＴＥ－１００ＳＨ溶液（１０重量％）を、それぞれ１５０μＬ充填した。

[0064] １．２５Ｍの塩化ナトリウムを含む０．１Ｍ酢酸ナトリウム緩衝溶液（ｐＨ４．６）中のリゾチーム結晶（１００×１００×３０μｍ^３の立方体）をＰｒｏｔｅｉｎ Ｗａｖｅ社のＭｏｕｎｔｅｄ ＬｉｔｈｏＬｏｏｐｓ（メッシュ径０．４Φ）を用いて緩衝液約１μＬごとすくい取り、１）の高速固定装置の回転モータの回転軸に連結させた。高速固定装置を作動させて、保持具上の生物学的試料に向けて溶液１及び溶液２の液滴（２００ｐＬ／滴）をインクジェットノズルからそれぞれ吐出して、リゾチーム結晶の表面上で接触させてハイドロゲルを形成させた。この吐出を、保持具の位置を連続的に移動させながら行い、リゾチーム結晶を保持具に固定した。液滴の吐出から固定までに要した時間は約３秒であった。保持具であるＭｏｕｎｔｅｄ ＬｉｔｈｏＬｏｏｐｓ上にハイドロゲルで固定されたリゾチーム結晶の拡大写真を図３に示す。各パネルの左側にある透明な立方体が、緩衝液ごとハイドロゲルで固定化されたリゾチーム結晶である。

[0065] 保持具を回転モータの軸から外し、固定されたリゾチーム結晶を１．２５Ｍの塩化ナトリウムを含む０．１Ｍ酢酸ナトリウム緩衝溶液（ｐＨ４．６）に浸けたが、結晶は保持具から脱落したり、崩壊したりすることなく安定に保たれ、その後のＸ線結晶構造解析を用いた阻害剤探索に利用可能であった。

産業上の利用可能性

[0066] 本発明は、生物学的試料をより短時間で固定することが可能であり、例えばタンパク質結晶解析、タンパク質結晶を使った医薬品開発（阻害剤探索）、細胞又は生体組織の機能解析等に利用することができる。また生物学的試料を含む立体成形物の製造にも利用可能である。

符号の説明

[0067] １ インクジェットノズル１

- 2 インクジェットノズル 2
- 3 回転モータ
- 4 保持具
- 5 リニアステージ
- 6 X Y ステージ
- 7 駆動モータ
- 8 CCD カメラ
- 9 ポンプ
- 10 コントロールユニット

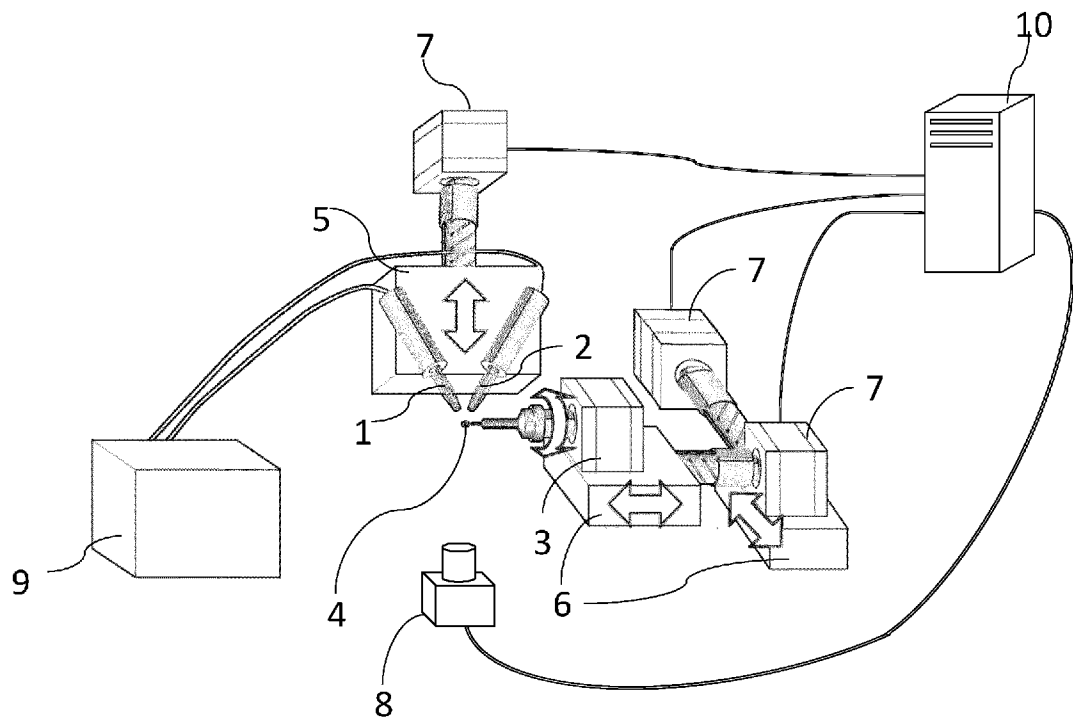
請求の範囲

- [請求項1] 生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する方法であって、混合されることでハイドロゲルが形成される溶液 1 と溶液 2 とを用意する工程 A、並びに前記溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程 B を含む、前記方法。
- [請求項2] 工程 A が、ハイドロゲルを形成する少なくとも 2 種のモノマーの組合せの一方を含む溶液 1 と他方を含む溶液 2 とを用意する工程である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 溶液 1 及び／又は溶液 2 がハイドロゲル化促進剤をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- [請求項4] 工程 A が、ハイドロゲルを形成する 1 種のモノマーを含む溶液 1 と、前記モノマーに対するハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 とを用意する工程である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項5] 工程 A が、ハイドロゲルを形成する少なくとも 2 種のモノマーの組合せを含む溶液 1 と前記モノマーに対するハイドロゲル化促進剤を含む溶液 2 とを用意する工程である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項6] 工程 B が、液体吐出ノズルから吐出させた溶液 1 及び溶液 2 の液滴を生物学的試料の表面で接触させて生物学的試料をハイドロゲルで高速固定する工程である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] 生物学的試料がタンパク質結晶である、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。
- [請求項8] 溶液 1 及び／又は溶液 2 が生物学的試料を含む溶液である、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。
- [請求項9] モノマーが多分岐ポリアルキレングリコール誘導体である、請求項 2 ～ 8 のいずれかに記載の方法。
- [請求項10] 生物学的試料を保持する手段、混合されることでハイドロゲルが形成される 2 種の溶液の液滴を前記保持手段に保持された生物学的試料

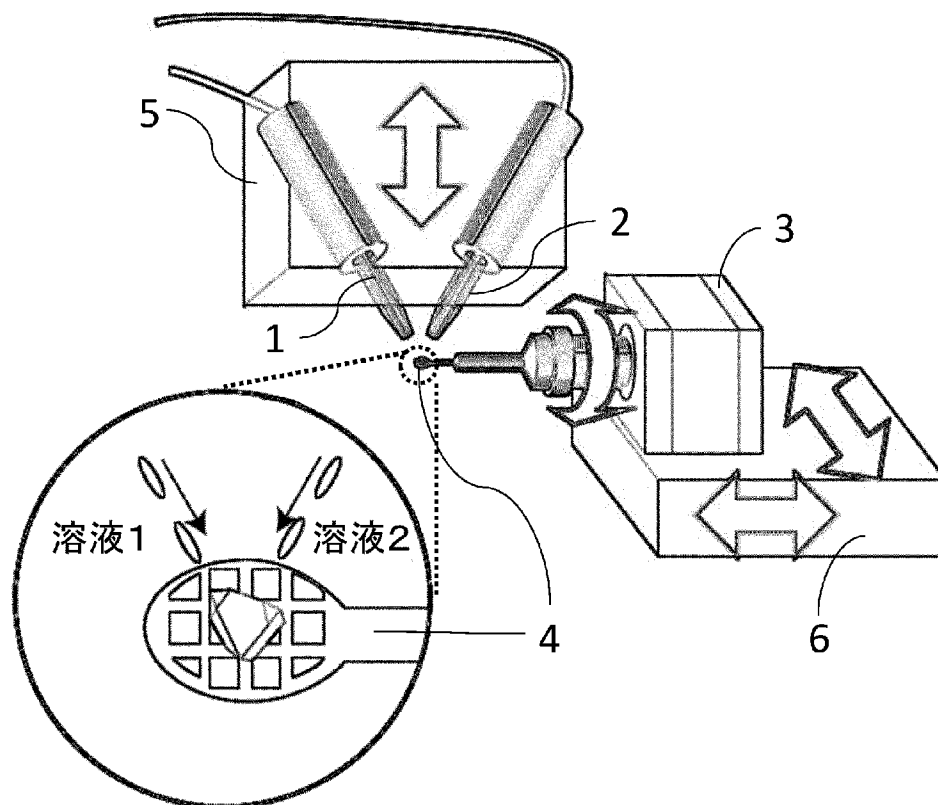
にそれぞれ吐出させるための少なくとも2つの吐出ノズル、並びに前記保持手段及び／又は吐出ノズルの位置を自動調節する手段を備える、生物学的試料をハイドロゲルで高速固定するための装置。

[請求項11] 前記自動調節手段が、前記保持手段中の生物学的試料の位置を光学的に検出する手段、前記検出手段からの検出信号を解析して生物学的試料の表面で液滴を接触させるための前記保持手段の位置及び／又は吐出ノズルの位置を決定する手段、並びに決定された位置に前記保持手段及び／又は吐出ノズルを移動させる手段を含む、請求項10に記載の装置。

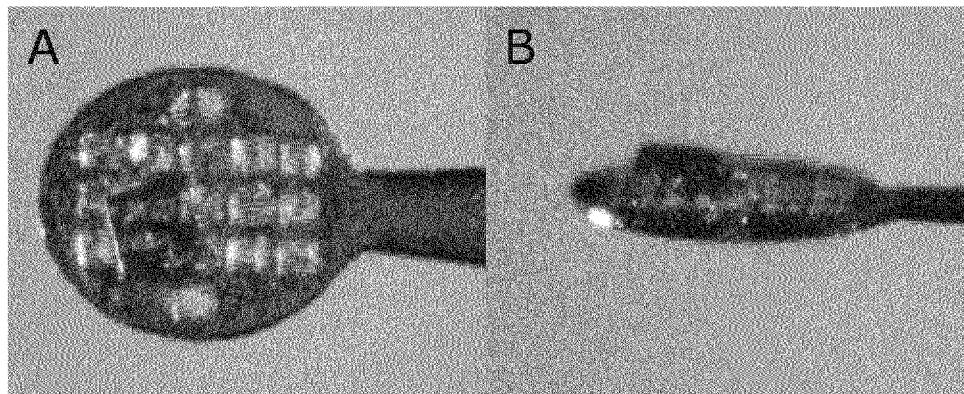
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N1/28(2006.01)i, G01N1/36(2006.01)i, G01N23/20(2006.01)i, G01N33/48(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)

G01N1/28, G01N1/36, G01N23/20, G01N33/48

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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.
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2004-533500 A (Biocept, Inc.), 04 November 2004 (04.11.2004), claims; paragraphs [0015] to [0041] & US 2004/0029241 A1 & WO 2002/081662 A1 & EP 1373472 A	<u>1-5, 7, 8</u> <u>6, 9-11</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	US 2003/0134294 A1 (Andrew F. Sandford et al.), 17 July 2003 (17.07.2003), claims; paragraphs [0080] to [0192] & WO 2003/050234 A2 & EP 1456371 A	<u>1-5, 7-9</u> <u>6, 10, 11</u>
Y	JP 2010-261929 A (NTN Corp.), 18 November 2010 (18.11.2010), claims; fig. 1 & US 2011/0262891 A1 & WO 2010/079580 A1 & EP 2377917 A1	6, 10, 11

☒ 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
28 May 2015 (28.05.15)

Date of mailing of the international search report
09 June 2015 (09.06.15)

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/JP2015/059332

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-522175 A (Samsung Electronics Co., Ltd.), 22 July 2004 (22.07.2004), claims; paragraphs [0013] to [0023] & US 2003/0108917 A1 & WO 2003/020978 A1 & EP 1421216 A	9
A	JP 2012-254969 A (Riken, Japan), 27 December 2012 (27.12.2012), claims; paragraphs [0007] to [0010], [0012] to [0052]; fig. 1 & US 2013/0196160 A1	1-11
A	JP 6-258206 A (Mitsui Petrochemical Industries, Ltd.), 16 September 1994 (16.09.1994), claims; paragraphs [0013] to [0069] (Family: none)	1-11
A	JP 2010-532396 A (Biolegen Biomedical (Changzhou) Co., Ltd.), 07 October 2010 (07.10.2010), claims; paragraphs [0027] to [0095]; fig. 1, 2 & US 2010/0144902 A1 & WO 2009/006780 A1 & EP 2177236 A1	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N1/28(2006.01)i, G01N1/36(2006.01)i, G01N23/20(2006.01)i, G01N33/48(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. G01N1/28, G01N1/36, G01N23/20, G01N33/48

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 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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
<u>X</u> Y	JP 2004-533500 A（バイオセプト インコーポレイテッド） 2004.11.04, 【特許請求の範囲】，【0015】 - 【0041】 & US 2004/0029241 A1 & WO 2002/081662 A1 & EP 1373472 A	<u>1-5, 7, 8</u> 6, 9-11
<u>X</u> Y	US 2003/0134294 A1 (Andrew F. Sandford et al.) 2003.07.17, Claims, [0080]-[0192] & WO 2003/050234 A2 & EP 1456371 A	<u>1-5, 7-9</u> 6, 10, 11

☒ 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

2 8 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 6 . 2 0 1 5

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）

廣田 健介

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

2 J

3 8 0 7

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 2010-261929 A (NTN株式会社) 2010. 11. 18, 【特許請求の範囲】, 図 1 & US 2011/0262891 A1 & WO 2010/079580 A1 & EP 2377917 A1	6, 10, 11
Y	JP 2004-522175 A (サムスン エレクトロニクス カンパニー リ ミテッド) 2004. 07. 22, 【特許請求の範囲】, 【0013】 - 【0023】 & US 2003/0108917 A1 & WO 2003/020978 A1 & EP 1421216 A	9
A	JP 2012-254969 A (独立行政法人理化学研究所) 2012. 12. 27, 【特許請求の範囲】, 【0007】 - 【0010】, 【0012】 - 【0052】, 図 1 & US 2013/0196160 A1	1-11
A	JP 6-258206 A (三井石油化学工業株式会社) 1994. 09. 16, 【特許請求の範囲】, 【0013】 - 【0069】 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2010-532396 A (常州百瑞吉生物医薬有限公司) 2010. 10. 07, 【特許請求の範囲】, 【0027】 - 【0095】, 図 1, 2 & US 2010/0144902 A1 & WO 2009/006780 A1 & EP 2177236 A1	1-11