

(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
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/136978 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 1/10 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
B01D 69/00 (2006.01) *G01N 1/28* (2006.01)
B01D 71/04 (2006.01) *G01N 15/00* (2006.01)
C03C 11/00 (2006.01) *G02B 21/34* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055913
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 26 日(26.02.2016)
- (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 2015-036425 2015 年 2 月 26 日(26.02.2015) JP
- (71) 出願人: 旭硝子株式会社 (ASAHI GLASS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山崎 秀司(YAMAZAKI Shuji); 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 旭硝子株式会社内 Tokyo (JP). 木村 修一郎(KIMURA Shuichiro); 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 旭硝子株式会社内 Tokyo (JP). 北岡 賢治(KITAOKA Kenji); 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 旭硝子株式会社内 Tokyo (JP). 埴 優(HANAWA Yu); 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 旭硝子株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人サクラ国際特許事務所 (SAKURA PATENT OFFICE, P.C.); 〒1010048 東京都千代田区神田司町二丁目 8 番 1 号 P M O 神田司町 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, 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), 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))

(54) Title: MINUTE SUBSTANCE CAPTURING FILTER, MINUTE SUBSTANCE OBSERVATION GLASS SUBSTRATE, MINUTE SUBSTANCE OBSERVATION DEVICE, METHOD FOR CAPTURING MINUTE SUBSTANCE, AND METHOD FOR OBSERVING MINUTE SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 微小物質捕捉フィルター、微小物質観察用ガラス基板、微小物質観察装置、微小物質捕捉方法及び微小物質観察方法

(57) Abstract: Provided are a minute substance capturing filter capable of separating minute substances in a solution, and a minute substance observation glass substrate enabling even direct observation of minute substances on the filter. The minute substance capturing filter has pores an average pore diameter of which is 5-2500 nm, 90% or more by volume of the pores each having a pore diameter within 60-140% of the peak top in the pore diameter distribution thereof. The minute substance observation glass substrate can separate and capture minute substances being contained in a solution or a suspension and having an average particle diameter of 10-500 nm, the minute substance observation glass substrate having pores an average pore diameter of which is within 30-500% of the average particle diameter of the minute substances, and having the standard deviation of the average pore diameter on the outermost surface of the minute substance observation glass substrate being within 60% or less of the average particle diameter of the minute substances, 90% or more by volume of the pores each having a pore diameter within 60-140% of the peak top in the pore diameter distribution thereof.

(57) 要約: 溶液中の微小物質の分離を実施可能な微小物質捕捉フィルター及び該フィルター上での微小物質の直接観察をも可能とした微小物質観察用ガラス基板を提供する。細孔の平均細孔径が 5~2500 nm であり、かつ、体積基準で、細孔の 90% 以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の 60~140% の範囲内に含まれる微小物質捕捉フィルター、また、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径 10~500 nm の微小物質を分離、捕捉可能で、細孔の平均細孔径が、微小物質の平均粒子径の 30~500% の範囲内であり、かつ、微小物質観察用ガラス基板の最表面における平均細孔径の標準偏差が微小物質の平均粒子径の 60% 以下の範囲内であって、体積基準で、細孔の 90% 以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の 60~140% の範囲内に含まれる微小物質観察用ガラス基板。

WO 2016/136978 A1

明 細 書

発明の名称：

微小物質捕捉フィルター、微小物質観察用ガラス基板、微小物質観察装置、微小物質捕捉方法及び微小物質観察方法

技術分野

[0001] 本発明は、微小物質を分離、捕捉可能な微小物質捕捉フィルター、微小物質観察用ガラス基板、その微小物質観察用ガラス基板を用いた微小物質観察装置、微小物質捕捉方法及び微小物質観察方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、溶液中や懸濁液中に含まれる固形物質を液体と分離する技術としてフィルターによるろ過がよく知られている。ろ過に用いるフィルターとしてはその目的に応じて様々な孔径のものが知られている。平均粒子径が500nm以下のような微小物質を分離、捕捉可能なフィルターとしては、従来、樹脂製のものが一般的に使用されている。しかしながら、捕捉対象である微小物質の捕捉効率を所定以上に向上させるのは困難である。

[0003] また、ナノオーダーの細孔径を有する多孔質ガラスがガス分離膜として利用できることが知られている（例えば、特許文献1参照）。この多孔質ガラスは、ガラスを分相させた後、酸処理により一部の成分を溶出させて得られる。しかし、特許文献1には、溶液や懸濁液中に含まれる微小物質の分離に関することは全く記載されていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2010-195612号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ところで、捕捉した微小物質をフィルター上でそのまま観察できると、微

小物質の分析における手間やコスト等を省くことができ好ましい。

[0006] 本発明は、溶液又は懸濁液中の微小物質を分離、捕捉できる微小物質捕捉フィルター及び該微小物質捕捉フィルターを用いた微小物質捕捉方法の提供を目的とする。さらに、表面上で微小物質の直接観察を可能とした微小物質観察用ガラス基板、この微小物質観察用ガラス基板を適用した微小物質観察装置及び微小物質観察方法の提供も目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の微小物質捕捉フィルターは、多孔質のガラス基板からなる微小物質捕捉フィルターであって、該微小物質捕捉フィルターの有する細孔の平均細孔径が5～2500nmであり、かつ、体積基準で、前記細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする。

[0008] 本発明の微小物質観察用ガラス基板は、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を分離、捕捉可能な、多孔質ガラスからなる微小物質観察用ガラス基板であって、前記微小物質観察用ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記微小物質の平均粒子径の30～110%の範囲内であり、かつ、前記微小物質観察用ガラス基板の最表面における平均細孔径（以下、表面平均細孔径）の標準偏差が前記微小物質の平均粒子径の60%以下の範囲内であって、体積基準で、前記細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする。

[0009] 本発明の微小物質観察装置は、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を分離、捕捉するフィルターとして、上記微小物質観察用ガラス基板を有する捕捉手段と、前記微小物質観察用ガラス基板の表面に捕捉された微小物質を観察するための観察手段と、を有することを特徴とする。

[0010] 本発明の微小物質捕捉方法は、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を、多孔質ガラスからなるガラス基板に導入し、

前記ガラス基板により前記微小物質を分離、捕捉する方法であって、前記ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記微小物質の平均粒子径の30～500%の範囲内であり、かつ、体積基準で、前記細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする。

[0011] 本発明の微小物質観察方法は、平均粒子径10～500nmの微小物質を含有する溶液又は懸濁液から、上記微小物質観察用ガラス基板により前記微小物質を分離、捕捉する捕捉工程と、前記微小物質観察用ガラス基板の表面に捕捉された微小物質を観察する観察工程と、を有することを特徴とする。

発明の効果

[0012] 本発明の微小物質捕捉フィルター及び微小物質捕捉方法によれば、溶液又は懸濁液中の微小物質を効率的に分離、捕捉できる。また、本発明の微小物質観察用ガラス基板、微小物質観察装置及び微小物質観察方法によれば、捕捉した微小物質を、そのまま光学顕微鏡により該ガラス基板上で観察することができる。したがって、微小物質の観察、検査等を簡便な操作で、効率的に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明の微小物質観察装置の概略構成を示した図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の微小物質捕捉フィルター及び微小物質捕捉方法並びに微小物質観察用ガラス基板、微小物質観察装置及び微小物質観察方法について、それぞれ詳細に説明する。

[0015] [微小物質捕捉フィルター]

本発明の微小物質捕捉フィルターは、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を分離、捕捉可能なガラス基板である。この微小物質捕捉フィルターは、微小物質と液体とを固液分離可能とするため、多数の細孔を有する多孔質ガラスで構成される。

[0016] 本発明における捕捉対象である微小物質は、平均粒子径が10～500nm

mであり、好ましくは50～150nmである。本明細書において、この微小物質の平均粒子径は、レーザー回折・散乱法、顕微鏡観察によって測定された体積基準の粒度分布から求められる50%積算値(D_{50})である。微小物質としては、例えば、石綿、カーボンブラック、インク、コロイド粒子、ウィルスや、アルブミン、抗体、エクソソーム等の生体分子等が挙げられる。近年、エクソソーム等の細胞外小胞は、がん等の病気の診断に用いられることがわかり注目されている。

[0017] ここで、微小物質捕捉フィルターの有する細孔の平均細孔径は5～2500nmであり、好ましくは5～550nm、より好ましくは10～300nm、さらに好ましくは20～200nm、特に好ましくは50～150nmである。ここで、平均細孔径は、ガス吸着法により窒素吸着等温線からB H J法により求められる細孔径分布に基づいて定まるピークトップの細孔径をさす。

また、この平均細孔径は、分離、捕捉対象となる微小物質の平均粒子径の30～500%（すなわち、微小物質の平均粒子径を基準（100%）としたときの割合が30～500%）の範囲が好ましい。より好ましくは50～110%、さらに好ましくは60～100%である。平均細孔径を微小物質の平均粒子径に対して500%以下（平均粒子径の5倍以下）とすることで、捕捉フィルター上又は細孔内に微小物質を捕捉できる。また、平均細孔径を微小物質の平均粒子径に対して110%以下（平均粒子径の1.1倍以下）とすることで、捕捉フィルター上に確実に微小物質を捕捉できる。また、平均細孔径を微小物質の平均粒子径の30%より大きくすることで、過度に小さい細孔径を有することがなくなるため、圧力損失を抑えることができ、微小物質を効率的に分離することができる。また、目的とする微小物質より過度に小さい平均粒子径を持つ物質を通過させ、対象となる微小物質のみを捕捉することが可能となる。

[0018] 体積基準で、微小物質捕捉フィルターにおける細孔の90%以上は、細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%（すなわち、ピーク

トップの細孔径を基準（１００％）としたときの割合が６０～１４０％）の範囲内に含まれる。これは、ピークトップの細孔径を基準（０％）としたときは、±４０％内に入ると言い換えることもできる（なお、このときの割合を算出する基準は上記と同様ピークトップの細孔径である）。細孔径分布の分布幅が狭いことで、安定して効率的に微小物質を分離、捕捉できる。さらには、上記細孔の９５％以上が、細孔径分布におけるピークトップの細孔径の６０～１４０％の範囲内に含まれることが好ましい。

[0019] 微小物質捕捉フィルターの気孔率は、強度を過度に低下させない観点から２０～９０体積％とすることが好ましく、３０～８０体積％とすることがより好ましく、４０～７０体積％とすることが特に好ましい。なお、本明細書において、気孔率は、ガラス基板の見掛け密度と真密度から算出した値である。見掛け密度及び真密度は、ピクノメーター法により、求めたものである。

[0020] また、微小物質捕捉フィルターは上記のように多孔質体であるため、溶液及び懸濁液の固液分離に安定して使用できるか否かについて、従来公知のガラス製のフィルターの知見をそのまま適用できない。本発明者らは、上記の特定の細孔を有するガラス基板において、固液分離を安定かつ確実に行うことができる条件について検討したところ、微小物質捕捉フィルターの板厚に対する主面の面積と平均細孔径の比（面積／板厚／ Log_{10} （平均細孔径））を所定の関係とすると効果的であることを見出した。

[0021] すなわち、本発明の微小物質捕捉フィルターにおいて、板厚に対する主面の面積及び平均細孔径の比（面積（ cm^2 ）／板厚（ mm ）／ Log_{10} （平均細孔径（ nm ））は、 $4.5 \text{ cm}^2 / \text{mm}$ 以下とすることが好ましく、 $0.01 \sim 2.5 \text{ cm}^2 / \text{mm}$ の範囲内とすることがより好ましく、 $0.01 \sim 2 \text{ cm}^2 / \text{mm}$ の範囲内とすることが特に好ましい。このような関係を満たすことで、溶液又は懸濁液中の微小物質の分離、捕捉の際における高い圧力に耐性を有する。さらに、このような関係を満たすことで、板厚を 0.5 mm 以下のように薄くしても、フィルターの反りの発生を有意に抑制できる。また、板

厚を薄くすることにより、分離、捕捉時の圧力損失を低減でき好ましい。

[0022] 微小物質捕捉フィルターの厚さは、0.1～5 mmが好ましく、0.1～1 mmがより好ましい。また、微小物質捕捉フィルターの面積は、0.1～10.5 cm²が好ましく、0.2～6 cm²がさらに好ましく、0.3～6 cm²が特に好ましい。このフィルターの形状は、板状であれば特に限定されるものではなく、例えば、その平面視形状が三角形、四角形等の多角形や、真円、楕円等の円形等、様々な形状とできる。なかでも、溶液又は懸濁液中の微小物質の分離、捕捉にあたっては、円形、特に真円、が液体成分からかかる負荷が均一となり、強度が良好となるため好ましい。

[0023] また、この微小物質捕捉フィルターを構成するガラスとしては、上記特性を有するものであれば特に限定されるものではない。なお、上記の特徴的な細孔径を形成するのが容易であることから、熱処理等によりスピノーダル型の分相を生じさせた分相ガラスを酸処理等により可溶部分を一部溶解して得られたガラス基板であることが好ましい。

[0024] また、この微小物質捕捉フィルターは、耐熱性、耐薬品性を有することが好ましい。分離操作において熱処理を行ったり、使用する溶液又は懸濁液が酸性又はアルカリ性であったり、する場合においても、このような物理的及び化学的耐久性が良好であることで、安定して分離、捕捉操作を行うことができる。

[0025] [微小物質捕捉フィルターの製造方法]

本発明の微小物質捕捉フィルターは、例えば、分相ガラスを経由して製造する方法や、機械的に均一で微細な貫通孔を形成する方法等により製造できる。以下、分相ガラスを経由して製造する方法を1つの例として説明する。

[0026] この分相ガラスを経由する製造方法は、材料となるガラス板を加熱処理により分相させる分相熱処理工程と、分相したガラス体を酸処理等により可溶部分を溶解して、ガラス板を多孔質化させる多孔質化工程と、により行うことができる。以下、各工程について説明する。

[0027] まず、ここで使用する材料となるガラス板は、スピノーダル分解により相

分離するガラスから構成されるものであれば特に限定されない。このようなガラスとしては、例えば、酸化ケイ素－酸化ホウ素－アルカリ金属酸化物、酸化ケイ素－酸化ホウ素－アルカリ金属酸化物に、アルカリ土類金属酸化物、酸化亜鉛、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウムの少なくとも1種が含有したもの、酸化ケイ素－リン酸塩－アルカリ金属酸化物、酸化ケイ素－酸化ホウ素－酸化カルシウム－酸化マグネシウム－酸化アルミニウム－酸化チタン、等の組成を有するガラスが挙げられる。

[0028] より具体的には、 $\text{SiO}_2\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Na}_2\text{O}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Na}_2\text{O}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--CaO--MgO}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Na}_2\text{O--K}_2\text{O--CaO--MgO}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Li}_2\text{O--Na}_2\text{O--MgO}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Li}_2\text{O--Na}_2\text{O--CaO}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Na}_2\text{O--K}_2\text{O--CaO--ZrO}_2$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--B}_2\text{O}_3\text{--Na}_2\text{O}$ 系、 $\text{SiO}_2\text{--B}_2\text{O}_3\text{--CaO--MgO--Al}_2\text{O}_3\text{--TiO}_2$ 系、等のガラスが挙げられる。

[0029] なかでも、酸化ケイ素－酸化ホウ素－アルカリ金属酸化物を母組成とするガラスが好ましく、さらに、このガラス中における酸化ケイ素の含有量が45～80mol%が好ましく、50～80mol%がより好ましく、55～80mol%がさらに好ましく、60～70mol%が特に好ましい。

[0030] スピノーダル分解により相分離するガラスは、分相性を有しているガラスである。分相性とは、酸化ケイ素－酸化ホウ素－アルカリ金属酸化物を有するホウケイ酸系ガラスの場合を例に挙げると、加熱処理によって、ガラス内部で酸化ケイ素リッチ相とアルカリ金属酸化物－酸化ホウ素リッチ相とに、相分離することをいう。

[0031] 一般的に、上記のようなガラスを加熱処理することにより、ガラスを相分離させることができる。この加熱処理は、その加熱温度と処理時間に応じて形成される分相状態が変化するため、所望の特性が得られる条件に設定すればよい。加熱温度を大きくするほど、処理時間を長くするほど、分相状態が進行するため、結果としてより細孔径の大きい多孔質ガラスが得られる。ま

た、加熱温度の変化は分相の進行に大きな影響を与えるが、処理時間の変化は分相の進行に影響が小さいため、所望の細孔径を得る場合は、加熱温度で大まかな範囲を定め、処理時間で緻密な制御を行うと良い。例えば、加熱温度を400～800℃の範囲内とし、10分～200時間、さらには10分～100時間の範囲で処理することが好ましく、この条件は、特に、上記のホウケイ酸系ガラスにおいて好ましいものである。

[0032] ガラスを製造する際に、原料溶解時の融液の段階で相分離しているものは、溶解時の加熱が分相加熱処理を含んでいるため、上記のような個別の分相加熱処理を省略できる。

[0033] 次いで、分相されたガラス（分相ガラス）を酸処理することにより、酸可溶成分であるアルカリ金属酸化物－酸化ホウ素リッチ相を酸溶液と接触させ、溶解除去する。ここで使用される酸溶液としては、上記可溶成分を溶解できるものであれば特に限定されず、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、フッ酸、酢酸等の有機酸、またそれらの組合せ等が挙げられ、中でも、塩酸、硝酸等の無機酸が好ましい。

[0034] このような酸溶液としては、水溶液であることが好ましく、酸濃度は任意のpHに適宜設定すればよい。この酸処理においては、その溶液の温度を室温から100℃の範囲とし、処理時間は10分～200時間程度、さらには10分～150時間程度とすればよい。酸濃度が高い場合、又は温度が高い場合、リーチング処理が短時間で行えるが、リーチングによるガラスの割れや反りの頻度が増大する。これを防ぐため、酸溶液にアンモニウム塩、硼砂などの無機塩を添加する処理を行ってもよい。

[0035] さらに、酸処理を行ったガラスに対して、アルカリ溶液及び熱水の少なくとも1種による洗浄処理を行ってもよい。この洗浄処理は、酸処理により生じた残渣を溶解、除去することを目的に行う。なお、その際に、酸化ケイ素が加水分解等により除去され、多孔質化が促進される場合もあり、多孔質化の度合いの調整のために用いることもできる。特に、アルカリ溶液は多孔質化の度合いの調整に有効であり、熱水は残渣の溶解、除去に有効である。従

って、アルカリ溶液処理及び熱水処理を両方行う場合には、アルカリ溶液処理を行った後に熱水処理を行うのがよい。このようにアルカリ溶液処理の後、熱水処理を行うと、エッチング後の残渣の除去が効果的になされ、ガラス基板の透過率を向上させることができる。

[0036] ここで使用されるアルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、テトラメチルアンモニウムヒドロキシド、アンモニア等のアルカリ溶液が挙げられ、アルカリ水溶液であることが好ましい。このアルカリによる洗浄処理は、アルカリ溶液のアルカリ濃度が $0.01 \sim 2.0 \text{ mol/L}$ ($0.01 \sim 2.0$ 規定) の範囲内、特には $0.1 \sim 2.0 \text{ mol/L}$ ($0.1 \sim 2.0$ 規定) の範囲内で適宜設定すればよい。このアルカリ処理においては、その溶液の温度を $10 \sim 60^\circ\text{C}$ で行うことが好ましく、処理時間は5分～10時間、特には5分～2時間とすることが好ましい。

[0037] また、熱水としては、不純物の少ない純水等を使用し、 $50 \sim 90^\circ\text{C}$ に加熱したものを使用し、処理時間は5分～2時間とすることが好ましい。

[0038] ここで、アルカリ溶液での処理及び熱水での処理は、いずれか1つを行えばよいが、両方を行ってもよい。このように、酸処理後、アルカリ溶液及び熱水の少なくとも1種による洗浄処理を行うことで、スピノーダル分解により相分離して形成された、酸溶解部分が、酸処理により溶解され孔となり、この孔が一方の主面から他方の主面にまでほぼ等しい孔径で連結した貫通連続孔として形成される。

[0039] この酸処理や、それに追加するアルカリ及び熱水処理の処理時間により、ガラス体の多孔質化される度合いが変化し、それぞれの処理を長く行うことで細孔の大きさを調節することができる。したがって、所望の大きさの細孔が得られるように、処理条件を適宜変更すればよい。

[0040] また、分相条件及び酸処理等の処理時間により、ガラス板の強度が変化する。最適な分相条件は、ガラス組成に依存するが、最適な分相条件を見出すには、例えばT-T-T曲線を調べるのが有効である。T-T-T曲線で明らかになる、分相の最も進みややすい温度域よりも、例えば 100°C 程度低

い温度域で分相を進めることで、孔径を小さくすることができる。酸処理等の溶解処理は、それぞれの処理時間を長く行うことでやはり強度が低くなる傾向がある。したがって、溶液中の微小物質の分離に使用でき強度を確保するように、分相条件、酸処理等の処理条件を適宜変更すればよい。すなわち、ガラス板の組成、分相熱処理条件（温度と時間）、多孔質化条件（液種、液組成、液濃度、処理温度、処理時間）によって調整することができる。

[0041] さらに、微小物質捕捉フィルターにその他の物理的、化学的機能を付与するには、例えば、多孔質化した後、表面にポリマーや無機膜をディップコーティング、スピンコーティング、スパッタリング、インクジェットリングなどにより塗布することで、フィルター表面に所定の機能層を形成すればよい。この機能層としては、表面の親水性を改善してフィルタリング性能を向上させたり、特定物質のみを捕捉する吸着特異性を付与したり、特定物質をフィルター表面に吸着しにくくしたりするなど形成する機能層の種類により所望の特性を有するガラス基板を得ることができる。

[0042] 捕捉する対象である微小物質が細胞外小胞である場合、細胞外小胞がフィルターに接着して剥がれなくなることを防ぐ観点から、タンパク質付着防止剤から形成された被覆層を有する細胞捕捉フィルターを用いるのが好ましい。この被覆層は、タンパク質付着防止剤をそのまま塗布して形成してもよく、溶媒または分散媒等の媒体に分散させた後、媒体を除去する等して形成してもよい。ここで、タンパク質付着防止剤として、生体親和性基を有する構成単位を有するポリマーを用いることができる。具体的には、ポリエチレングリコール、2-メタクロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする重合体の他、WO2016/002796に記載される生体親和性基を有する含フッ素重合体を用いることができる。

[0043] [微小物質捕捉方法]

次に、本発明の微小物質捕捉フィルターを適用した微小物質捕捉方法について説明する。

[0044] 本発明の微小物質の捕捉方法は、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径

10～500nmの微小物質を、多孔質ガラスからなるガラス基板に導入し、前記ガラス基板により前記微小物質を分離、捕捉する方法である。

このとき、使用するガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、微小物質の平均粒子径の30～500%の範囲内であり、かつ、体積基準で、細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれる。

ここで、捕捉は、微小物質を含有する溶液又は懸濁液を捕捉手段である上記微小物質捕捉フィルター上に供給し、固液分離を行うものである。この固液分離により、液体は微小物質捕捉フィルターを通過し、捕捉手段を通液させて液体をこの捕捉手段の下部から排出される。一方、固体成分である微小物質は、微小物質捕捉フィルターの細孔を通過できず、その表面及び細孔内の少なくとも一方に捕捉される。

[0045] なお、このとき固液分離を効率的に行うことができるように、分離前の溶液又は懸濁液の粘度を $2 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 以下となるように調製することが好ましい。このような粘度とするための液体成分としては、水、アルコール等が挙げられる。

[0046] また、この捕捉において圧力をかける場合には、その圧力は0.1～100MPaとするのが好ましい。この圧力を0.1MPa以上とすることで固液分離を促進でき、また、100MPa以下とすることで、微小物質捕捉フィルターの破損を抑制できる。

[0047] [微小物質観察用ガラス基板]

本発明の微小物質観察用ガラス基板は、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を分離、捕捉可能な板状のガラス基板である。この微小物質観察用ガラス基板は、微小物質と液体とを固液分離可能とするため、多数の細孔を有する多孔質ガラスからなる。

[0048] この微小物質観察用ガラス基板としては、上記説明した微小物質捕捉フィルターのうち、フィルター上での表面観察に好適なものが挙げられる。以下、微小物質観察用ガラス基板について説明するが、微小物質捕捉フィルター

と共通する構成要件のうち、特に説明のないものの好ましい態様は、微小物質捕捉フィルターと同一である。

[0049] 本発明の観察対象となる微小物質の平均粒子径は10～500nmであり、好ましくは50～150nmである。本明細書において、この微小物質の平均粒子径は、レーザー回折・散乱法、顕微鏡観察によって測定された体積基準の粒度分布から求められる50%積算値(D_{50})である。微小物質としては、例えば、石綿、カーボンブラック、インク、コロイド粒子、ウィルスや、アルブミン、抗体、エクソソーム等の生体分子等が挙げられる。

[0050] 本発明の微小物質観察用ガラス基板は、このような微小物質を分離、捕捉する対象としているため、多数の細孔を有する多孔質ガラスで構成される。

[0051] ここで、微小物質観察用ガラス基板の有する細孔の平均細孔径は5～550nmであり、好ましくは10～300nm、さらに好ましくは20～200nm、特に好ましくは50～150nmである。ここで、平均細孔径は、ガス吸着法により窒素吸着等温線からB H J法により求められる細孔径分布に基づいて定まるピークトップの細孔径をさす。

[0052] また、この平均細孔径は、分離、捕捉対象となる微小物質の平均粒子径の30～110%（すなわち、微小物質の平均粒子径を基準（100%）としたときの割合が30～110%）の範囲が好ましい。より好ましくは50～110%、さらに好ましくは60～110%である。平均細孔径を微小物質の平均粒子径に対して110%以下（平均粒子径以下）とすることで、ガラス基板上に確実に微小物質を捕捉でき、その後の微小物質の観察を効率的に行うことができる。また、平均細孔径を微小物質の平均粒子径の30%より大きくすることで、過度に小さい細孔径を有することがなくなるため、圧力損失を抑えることができ、微小物質を効率的に分離することができる。また、目的とする微小物質より過度に小さい平均粒子径を持つ物質を通過させ、対象となる微小物質のみを捕捉することが可能となる。

[0053] さらに、上記平均細孔径は、分離、捕捉対象となる微小物質の平均粒子径の30～100%（すなわち、微小物質の平均粒子径を基準（100%）と

したときの割合が30～100%)の範囲が好ましい。より好ましくは、50～100%、さらに好ましくは60～100%である。平均細孔径を微小物質の平均粒子径に対して100%以下(平均粒子径以下)とすることで、ガラス基板上により確実に微小物質を捕捉でき、その後の微小物質の観察を効率的に行うことができる。

[0054] 体積基準で、微小物質観察用ガラス基板における細孔の90%以上は、細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%(すなわち、ピークトップの細孔径を基準(100%)としたときの割合が60～140%)の範囲内に含まれる。これは、ピークトップの細孔径を基準(0%)としたときは、±40%内に入ると言い換えることもできる(なお、このときの割合を算出する基準は上記と同様ピークトップの細孔径である)。細孔径分布の分布幅が狭いことで、安定して効率的に微小物質を分離、捕捉できる。さらには、上記細孔の95%以上が、細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることが好ましい。

[0055] また、微小物質観察用ガラス基板の表面平均細孔径の標準偏差は、微小物質の平均粒子径の60%以下の大きさ(すなわち、微小物質の平均粒子径を100%としたときの60%以下の大きさ)が好ましい。より好ましくは50%以下、さらに好ましくは40%以下である。このような標準偏差とすることで、捕捉対象物が同じ高さでトラップされるようになり、後述する観察手段による観察を良好に行うことができる。

[0056] なお、表面平均細孔径の標準偏差は、下記の方法によって求めたものである。

すなわち、微小物質観察用ガラス基板表面を走査型電子顕微鏡で観察し、画像データを得る。さらに、この画像データを画像解析ソフトウェア「Image J」によって解析する。そして、得られた解析結果から表面平均細孔径及び標準偏差を算出する。この画像データの解析にあたって2値化処理を行うが、その際に閾値を選定する方法としては、判別分析法、Kittler法、モード法、Pタイル法、3 σ 法などがある。本発明のようなガラス

基板においては、モード法又はK i t t l e r法が好ましい。より詳しくは、実施例に記載された方法によって測定できる。

なお、この測定方法による表面平均細孔径及び標準偏差は、上記平均細孔径と必ずしも一致しない。これは、平均細孔径がガス吸着法によるバルク全体の平均情報であるのに対し、この測定方法で得られる表面平均細孔径は表面の細孔径のみを評価しているためである。例えば、熱処理及び酸処理によって多孔質ガラスを得る場合、処理は常に表面から行われていくため、バルク表面から内部へ進むに従って、細孔径分布はわずかに変化していくのである。

[0057] この微小物質観察用ガラス基板は、後述する微小物質の観察を、容易、かつ、確実に行うために、自家蛍光が小さいことが好ましく、例えば、波長400nm～800nmの量子変換効率は5%以下が好ましく、3%以下がより好ましく、1%以下が特に好ましい。なお、本明細書における量子変換効率は、励起光を照射したときの、発光としてサンプルから出されたフォトン数と、サンプルにより吸収されたフォトン数との比率で表され、フォトン数は積分球法で測定する。

[0058] [微小物質観察用ガラス基板の製造方法]

本発明の微小物質観察用ガラス基板は、上記微小物質捕捉フィルターで説明した製造方法と同一の方法により製造できる。

[0059] なお、本実施形態においては、分相させて酸処理を行ったガラスに対して、アルカリ溶液処理及び熱水処理の両処理を施すのが好ましい。その際、アルカリ溶液処理を行った後に熱水処理を行うのがよい。このようにアルカリ溶液処理の後、熱水処理を行うと、エッチング後の残渣の除去が効果的になされ、ガラス基板の光透過率を向上させることができ、観察時におけるノイズ等が効果的に減少する。

[0060] 次に、本発明の微小物質観察用ガラス基板を適用した、微小物質観察装置及び微小物質観察方法について図面を参照しながら説明する。

[0061] [微小物質観察装置]

本発明の微小物質観察装置は、溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径 10～500nmの微小物質を分離、捕捉するフィルターとして、上記の微小物質観察用ガラス基板を有する捕捉手段と、微小物質観察用ガラス基板の表面に捕捉された微小物質を観察するための観察手段と、を有するものである。

[0062] この微小物質観察装置について、図1を参照しながら説明する。この図1に示した微小物質観察装置10は、微小物質観察用ガラス基板11aを有する捕捉手段11と、この微小物質観察用ガラス基板11aの表面を観察するための光学顕微鏡12と、を有して構成される。

[0063] ここで、捕捉手段11は、上記のように微小物質観察用ガラス基板11aを固液分離用のフィルターとして有する。したがって、例えば、捕捉手段11の上方から微小物質を含有する溶液又は懸濁液を流入させ、捕捉手段11を通液させて液体をこの捕捉手段11の下方から排出すると、微小物質を微小物質観察用ガラス基板11aの表面に捕捉することができる。

[0064] なお、この微小物質観察用ガラス基板11aは、その細孔径が小さく、単に溶液又は懸濁液をガラス基板上に供給しただけでは通液が困難であるため、圧力をかけて通液させることが一般的である。圧力をかけるにあたっては、供給した溶液又は懸濁液側からポンプ等の使用により加圧してもよいし、遠心分離機等により遠心力を加えて加圧してもよい。ただし、溶液量がごく少量の場合、もしくは溶液の粘度が水と同等以下の場合は、毛細管現象による浸透のみでガラス基板へ流入させることも可能である。

[0065] なお、捕捉手段11は、上記のように微小物質観察用ガラス基板11aの一方に溶液又は懸濁液を供給し、収容する空間を有するように、ガラス、樹脂、ゴム等の材質で形成された筒状や管状の部材を使用し、その内部に微小物質観察用ガラス基板11aを固定して形成することが好ましい。

[0066] また、観察手段12は、捕捉手段11で微小物質を捕捉した微小物質観察用ガラス基板11aの表面を観察して、捕捉された微小物質の性状等を調べるものである。この観察手段12としては、例えば、電子顕微鏡、光学顕微

鏡等が挙げられる。また、観察対象の微小物質を蛍光染色、もしくは蛍光物質を付与してラベル化する場合、蛍光顕微鏡が好ましい。特に対象の微小物質が生体物質である場合、蛍光顕微鏡が好適に用いられる。

[0067] この観察手段 1 2 は、ろ過手段 1 1 により得られた表面に微小物質を捕捉した微小物質観察用ガラス基板 1 1 a を固定する基板固定台 1 2 b と、固定された微小物質観察用ガラス基板 1 1 a の表面を観察する光学機構 1 2 a と、からなる。

[0068] なお、上記説明では、捕捉手段 1 1 としては、微小物質観察用ガラス基板 1 1 a を 1 つ設けた例を記載して説明したが、異なる平均細孔径を有する他の微小物質観察用ガラス基板を設けたり、本発明の微小物質観察用ガラス基板には該当しないが、異なる平均細孔径を有するガラスフィルターや樹脂フィルターを設けたり、してもよい。このように異なる細孔径を有するフィルターを組み合わせることで、溶液又は懸濁液中に含有する大きさの異なる粒子を段階的に分離、捕捉することができる。

[0069] [微小物質観察方法]

本発明の微小物質観察方法は、平均粒子径 1 0 ~ 5 0 0 n m の微小物質を含有する溶液又は懸濁液を、上記の微小物質観察用ガラス基板により固液分離する捕捉工程と、捕捉工程により得られた微小物質観察用ガラス基板の表面を観察する観察工程と、を有する。

[0070] 以下、図 1 の微小物質観察装置を使用する場合を例に、本発明の微小物質観察方法について説明する。

[0071] 捕捉工程は、微小物質を含有する溶液又は懸濁液を捕捉手段 1 1 の内部に導入し、微小物質観察用ガラス基板 1 1 a により固液分離を行うものである。この固液分離により、液体は微小物質観察用ガラス基板 1 1 a を通過し、下部から排出される。一方、固体成分である微小物質は、微小物質観察用ガラス基板 1 1 a の細孔を通過できず、その表面または細孔内に捕捉される。

[0072] なお、このとき固液分離を効率的に行うことができるように、分離前の溶液又は懸濁液の粘度を $2 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 以下となるように調製することが

好ましい。このような粘度とするための液体成分としては、水、アルコール等が挙げられる。

[0073] また、捕捉工程において捕捉手段 11 に圧力をかける場合には、その圧力は 0.1 ~ 100 MPa とするのが好ましい。この圧力を 0.1 MPa 以上とすることで固液分離を促進でき、また、100 MPa 以下とすることで、微小物質観察用ガラス基板 11 の破損を抑制できる。

[0074] また、観察工程は、捕捉工程で微小物質を捕捉した微小物質観察用ガラス基板 11a の表面を観察して、捕捉された微小物質の性状等を調べる工程である。この観察工程を行うにあたっては、まず、捕捉手段 11 から微小物質観察用ガラス基板 11a を取り外し、図 1 の破線で示したように観察手段 12 へ移動させ、その基板固定台 12b 上に固定する。そして、この固定された微小物質観察用ガラス基板 11a を光学機構 12a により観察し、性状等の情報を得る。

実施例

[0075] 以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの記載によって何ら限定されるものではない。なお、例 1 ~ 4、6 ~ 8 が実施例、例 5 が比較例である。

[0076] (例 1)

原料である SiO_2 、 B_2O_3 、 Na_2CO_3 の各粒子を、酸化物基準のモル百分率表示で、 SiO_2 65%、 B_2O_3 27%、 Na_2O 8% の 3 成分系組成 ($\text{SiO}_2 - \text{B}_2\text{O}_3 - \text{Na}_2\text{O}$) となるように混合して、ガラス原料 900 g を得た。

このガラス原料を、白金製るつぼに入れ、抵抗加熱式電気炉により 1500℃ に加熱し、溶融した。4 時間、脱泡、均質化を行った後、得られた溶融ガラスを型材に流し込み、〔ガラス転移点 (T_g : 486℃) + 50℃〕の温度から 30℃/分の速度で室温まで冷却し、ガラスブロックを得た。

[0077] このガラスブロックを、600℃ で 3 時間加熱処理することにより分相処理を行った。この分相したガラスブロックを切断、研削し、最後に両面を鏡

面に加工して、直径 7 mm ϕ 、厚みが 0.5 mm の板状ガラスと、直径 7 mm ϕ 、厚みが 1.0 mm の板状ガラスの、2 種類の板状ガラスを得た。

次に、これら板状ガラスを、1 N の HNO_3 に 16 時間浸漬してリーチング処理した後、1 N の NaOH 及び 60 °C の熱水で洗浄して、微小物質観察用のガラス基板 1 A（厚さ 0.5 mm）及びガラス基板 1 B（厚さ 1.0 mm）を得た。

[0078] 得られたガラス基板の、フィルター種類、分相処理条件（熱処理温度、熱処理時間）に加え、平均細孔径、細孔径分布における分布幅、表面細孔径の標準偏差、板厚、主面の面積、（面積／板厚／ Log_{10} （平均細孔径（nm）））、50 nm ビーズ捕捉率、100 nm ビーズ補足率、350 nm ビーズ捕捉率の各特性について調べ、併せて表 1 に示した。ここで、細孔径分布幅はピークトップを 0 % とした。

[0079] （試験例 1）

[ビーズ捕捉率の測定]

平均粒子径が 50 nm、350 nm の蛍光ビーズを、それぞれ水に分散した分散溶液を調製した。次に、得られたガラス基板を円筒状のチューブ内に固定し、内部を密閉できるようにして、500 μL の分散溶液が処理可能な捕捉手段を作成した。

[0080] これらの捕捉手段に、上記調製した分散溶液をそれぞれ 500 μL 収容し、遠心分離機により 10000 G（圧力 1.3 MPa）で 10 分間遠心分離処理をした。その後、ろ過液の蛍光強度をプレートリーダーにより測定し、それぞれの蛍光ビーズの捕捉率を算出した。その結果を表 1 に併せて示した。

[0081] また、上記試験例 1 で得られた捕捉手段からガラス基板を取り出し、ガラス基板表面を蛍光顕微鏡で観察したところ、全てのガラス基板において捕捉された蛍光ビーズが確認できた。

[0082] （例 2 ～ 例 4）

分相処理の条件（熱処理温度）を表 1 に示したもののとした以外は、例 1 と

同様の操作により微小物質観察用のガラス基板を得た。得られたガラス基板をそれぞれガラス基板 2 A～3 A（厚さ 0.5 mm）、ガラス基板 2 B～4 B（厚さ 1.0 mm）とする。

[0083]（例 5）

比較例として、市販の樹脂製のフィルターを用意した。この樹脂製のフィルターは、ExoMir（コスモ・バイオ株式会社製、商品名）に用いられている 2 種類のフィルターの、ボトムフィルターを例 5 の樹脂フィルターとして、特性を評価したものである。

また、ExoMir において、樹脂製のフィルターを評価するフィルターのみ（1 種類のフィルターを有するもの）として捕捉手段を作製した。

この捕捉手段については、付属の手動ポンプにより完全に通液を行った。ろ過液の蛍光強度をプレートリーダーにより測定し、蛍光ビーズの捕捉率を算出した。その結果を表 1 に併せて示した。なお、この樹脂製のフィルターは強度が弱く、また表面が平滑でないため、蛍光顕微鏡による観察は困難であった。

[0084]（例 6～例 8）

例 1 で得られたガラスブロックを、表 2 に記載の所定温度及び所定時間で加熱処理することにより分相処理を行った。この分相したガラスブロックを切断、研削し、最後に両面を鏡面に加工して、5 mm×20 mm で厚みが 0.1 mm、0.5 mm、1 mm の板状ガラスを得た。

[0085] 次に、これら板状ガラスを、1 N の HNO_3 に 16 時間浸漬してリーチング処理した後、1 N の NaOH 及び 60℃ の熱水で洗浄して、ガラス基板 C（厚さ 0.1 mm）、ガラス基板 D（厚さ 0.5 mm）及びガラス基板 E（厚さ 1.0 mm）を得た。

[0086] 得られたガラス基板のうち、600℃ で分相処理した厚さ 1.0 mm のガラス基板 1 E（例 6）、700℃ で分相処理した厚さ 0.5 mm のガラス基板 3 D 及び 1.0 mm のガラス基板 3 E（例 7）、600℃ で分相処理した厚さ 0.1 mm のガラス基板 1 C（例 8）について、フィルター種類、分相

処理条件（熱処理温度、熱処理時間）に加え、平均細孔径、板厚、主面の面積、（面積／板厚／ Log_{10} （平均細孔径（nm）））の各特性について調べ、併せて表2に示した。さらに、これらの3点曲げ強度を測定したところ、板厚に対する主面の面積及び平均細孔径の比（面積（ cm^2 ）／板厚（mm）／ Log_{10} （平均細孔径（nm）））が、 $4.5 \text{ cm}^2/\text{mm}$ 以下のガラス基板において高い強度を有することがわかった。

[0087]（試験例2）

[3点曲げ強度の測定]

3点曲げ強度は、テンシロンUTA-5kN（オリエンテック社製、商品名）を用い、10個のサンプルに対し、JIS R 1601:2008に準じて測定した。

[0088]

[表1]

フィルター種類		例1		例2		例3		例4	例5
		基板1A	基板1B	基板2A	基板2B	基板3A	基板3B	基板4B	樹脂フィルター
分相条件	熱処理温度(°C)	600		650		700		700	—
	熱処理時間(時間)	3		3		3		24	—
基板特性	平均細孔径 (nm)	38		120		180		290	20
	細孔径分布における分布幅	±40%以内		±40%以内		±40%以内		±40%以内	±50%以内
	表面細孔径の標準偏差 (nm)	16		53		78		47	337
	板厚 (mm)	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0	0.1
	面積 (cm ²)	0.385		0.385		0.385		0.385	4.91
	(面積/板厚/Log10細孔径)	0.5	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	37.7
	50nmビーズ捕捉率(%)	99<	99<	—	—	—	—	—	15
	100nmビーズ捕捉率(%)	—	—	—	—	—	94	95	—
	350nmビーズ捕捉率(%)	—	—	—	—	—	96	91	15

[0089] [表2]

		例6	例7		例8
フィルター種類		基板1E	基板3D	基板3E	基板1C
分相条件	熱処理温度(°C)	600	700		600
	熱処理時間(時間)	3	3		3
基板特性	平均細孔径(nm)	38	180		38
	板厚(mm)	1.0	0.5	1.0	0.1
	面積(cm ²)	0.75	0.75		0.75
	(面積/板厚/Log10細孔径)	0.5	0.7	0.3	4.7
3点曲げ強度(N)		24.3	12.2	33.4	0.2

[0090] [平均細孔径、細孔径分布]

細孔径分布は、ガス吸着法により窒素吸着等温線からB H J法により求めた。また、平均細孔径は、上記得られた細孔径分布に基づいて定まるピークトップの細孔径を指す。細孔径分布の分布幅は、ピークトップの細孔径を基準(100%)として表した。

[0091] [表面細孔径の標準偏差]

表面細孔径の標準偏差は、以下に示すようにして測定した。各サンプルの表面を走査型電子顕微鏡で観察し、画像データを得た。さらに、この画像データを画像解析ソフトウェア「Image J」によって画像処理、解析した。

・画像処理

まず、走査型電子顕微鏡(SEM)観察により得られた画像を、画像解析ソフトウェア(アメリカ国立衛生研究所[NIH]オープンソース、名称「Image J」)を用いて2値化を行った。

ガラス構造がSEM画像上で明部で表示されるため、2値化においては、まず明暗反転を実施し、ガラス構造が暗部で表示されるようにした。その後、ガラス構造が際立つように、明るさ及びコントラストを補正し、また、閾値を設定することによって、ガラス構造のみを選択し、2値化画像を得た。閾値を選定する方法には、K i t t l e r法を用いた。

・画像解析

次に、得られた２値化画像を横断するように水平線を引き、線上におけるガラスとガラスの距離、すなわち細孔幅を計測した。なお、水平線は１画像につき少なくとも５本以上取り、また、計測点は５０点以上とした。本実施例のガラスはスピノーダル分相の性質により、その構造がランダムであるため、画像において表示される面積が異なり得ると考えられる。しかしながら、本方法においては、その形状にかかわらず、上記の操作により一律に解析した。

上記のように条件設定して画像解析により求めた細孔幅から、表面平均細孔径及び標準偏差を算出した。

[0092] 以上のとおり、本発明の微小物質観察用ガラス基板は、液体又は懸濁液中に含まれる平均粒子径１０～５００ｎｍの微小物質を確実に捕捉できる。このような微小物質の固液分離においては、液体を通液させるために圧力損失を不必要に増大させないことが求められるが、本発明のガラス基板は、これらの特性も良好なものであることがわかった。また、この微小物質観察用ガラス基板を用いた微小物質の観察装置及び観察方法は、捕捉した微小物質をそのまま観察できるため、微小物質の観察、検査等を効率的に行うことができる。

産業上の利用可能性

[0093] 本発明の微小物質観察用ガラス基板は、微小物質の捕捉、観察が可能な微小物質観察用ガラス基板であり、微小物質の捕捉、観察に好適である。さらに、この微小物質観察用ガラス基板は、微小物質よりも大きな粒子径を有する物質の捕捉にも適用できる。

符号の説明

[0094] １０…微小物質観察装置、１１…捕捉手段、１１ａ…微小物質観察用ガラス基板、１２…観察手段、１２ａ…光学機構、１２ｂ…基板固定台。

請求の範囲

- [請求項1] 多孔質のガラス基板からなる微小物質捕捉フィルターであって、
該微小物質捕捉フィルターの有する細孔の平均細孔径が5～2500nmであり、かつ、体積基準で、前記細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする微小物質捕捉フィルター。
- [請求項2] 前記ガラス基板の板厚に対する主面の面積及び平均細孔径の比（面積（ cm^2 ）／板厚（mm）／ Log_{10} （平均細孔径（nm）））が、 $4.5 \text{ cm}^2/\text{mm}$ 以下である請求項1に記載の微小物質捕捉フィルター。
- [請求項3] 前記ガラス基板の気孔率が、20～90%である請求項1または2に記載の微小物質捕捉フィルター。
- [請求項4] 微小物質が細胞外小胞である請求項1～3のいずれか1項に記載の微小物質捕捉フィルター。
- [請求項5] 前記ガラス基板の表面に、タンパク質付着防止剤から形成された被覆層を有する請求項4に記載の微小物質捕捉フィルター。
- [請求項6] 溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を分離、捕捉可能な、多孔質ガラスからなる微小物質観察用ガラス基板であって、
前記微小物質観察用ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記微小物質の平均粒子径の30～110%の範囲内であり、かつ、前記微小物質観察用ガラス基板の最表面における平均細孔径（表面平均細孔径）の標準偏差が前記微小物質の平均粒子径の60%以下の範囲内であって、
体積基準で、前記細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする微小物質観察用ガラス基板。
- [請求項7] 前記微小物質観察用ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記

微小物質の平均粒子径の30～100%の範囲内である請求項6に記載の微小物質観察用ガラス基板。

[請求項8] 前記微小物質観察用ガラス基板の板厚に対する主面の面積及び平均細孔径の比（面積（ cm^2 ）／板厚（ mm ）／ Log_{10} （平均細孔径（ nm ）））が、 $4.5 \text{ cm}^2/\text{mm}$ 以下である請求項6又は7に記載の微小物質観察用ガラス基板。

[請求項9] 前記微小物質観察用ガラス基板の気孔率が、20～90%である請求項6～8のいずれか1項に記載の微小物質観察用ガラス基板。

[請求項10] 前記微小物質観察用ガラス基板が、分相ガラスから形成されたものである請求項6～9のいずれか1項に記載の微小物質観察用ガラス基板。

[請求項11] 前記微小物質観察用ガラス基板を構成するガラスが、 $\text{SiO}_2-\text{B}_2\text{O}_3-\text{Na}_2\text{O}$ の3成分組成系である請求項10に記載の微小物質観察用ガラス基板。

[請求項12] 溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を分離、捕捉するフィルターとして、請求項6～11のいずれか1項に記載の微小物質観察用ガラス基板を有する捕捉手段と、

前記微小物質観察用ガラス基板の表面に捕捉された微小物質を観察するための観察手段と、

を有することを特徴とする微小物質観察装置。

[請求項13] 前記観察手段が、蛍光顕微鏡である請求項12に記載の微小物質観察装置。

[請求項14] 溶液又は懸濁液中に含まれる平均粒子径10～500nmの微小物質を、多孔質ガラスからなるガラス基板に導入し、前記ガラス基板により前記微小物質を分離、捕捉する方法であって、

前記ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記微小物質の平均粒子径の30～500%の範囲内であり、かつ、体積基準で、前記細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の

60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする微小物質捕捉方法。

[請求項15] 前記ガラス基板の板厚に対する主面の面積及び平均細孔径の比（面積（ cm^2 ）／板厚（ mm ）／ Log_{10} （平均細孔径（ nm ）））が、 $4.5 \text{ cm}^2/\text{mm}$ 以下である請求項14に記載の微小物質捕捉方法。

[請求項16] 平均粒子径10～500nmの微小物質を含有する溶液又は懸濁液を、多孔質ガラスからなるガラス基板に導入し、前記ガラス基板により前記微小物質を分離、捕捉する捕捉工程と、該ガラス基板に捕捉された前記微小物質を観察する観察工程と、を有する微小物質観察方法であって、

前記ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記微小物質の平均粒子径の30～110%の範囲内であり、かつ、前記ガラス基板の最表面における平均細孔径（表面平均細孔径）の標準偏差が前記微小物質の平均粒子径の60%以下の範囲内であって、

体積基準で、前記ガラス基板の有する細孔の90%以上が、その細孔径分布におけるピークトップの細孔径の60～140%の範囲内に含まれることを特徴とする微小物質観察方法。

[請求項17] 前記微小物質観察用ガラス基板の有する細孔の平均細孔径が、前記微小物質の平均粒子径の30～100%の範囲内である請求項16に記載の微小物質観察方法。

[請求項18] 平均粒子径10～500nmの微小物質を含有する溶液又は懸濁液から、請求項6～11のいずれか1項に記載の微小物質観察用ガラス基板により前記微小物質を分離、捕捉する捕捉工程と、

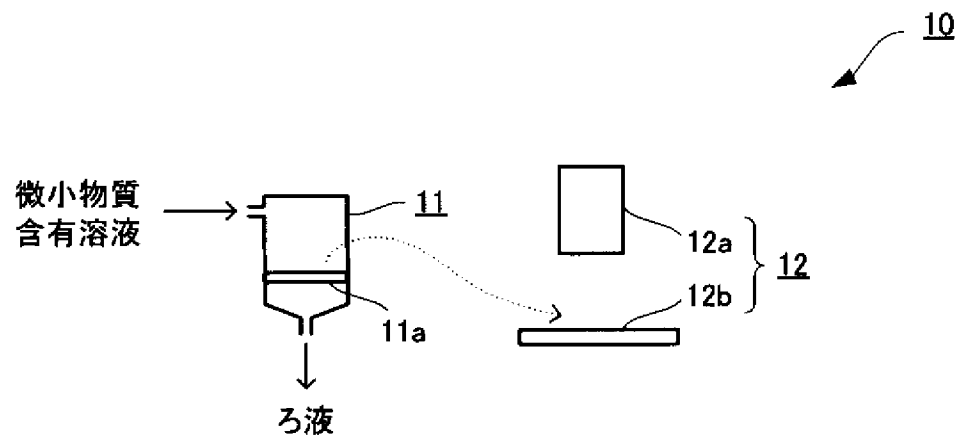
前記微小物質観察用ガラス基板の表面に捕捉された微小物質を観察する観察工程と、

を有することを特徴とする微小物質観察方法。

[請求項19] 前記観察工程における観察を、蛍光顕微鏡により行う請求項16～

18のいずれか1項に記載の微小物質観察方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N1/10(2006.01)i, B01D69/00(2006.01)i, B01D71/04(2006.01)i, C03C11/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N15/00(2006.01)i, G02B21/34(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)

G01N1/00-1/44, B01D69/00, B01D71/04, C03C11/00, C12M1/00, G01N15/00, G02B21/34

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus(JDreamIII), 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	JP 8-502200 A (The United States of America), 12 March 1996 (12.03.1996),	1-3, 6-9, 14-15
Y	page 5, lines 16 to 18; page 6, lines 10 to 20; page 10, lines 17 to 26; page 12, lines 4 to 7; page 13, line 13 to page 14, line 7 & US 5234594 A column 2, lines 3 to 6; column 2, lines 30 to 45; column 3, lines 47 to 51; column 5, lines 6 to 20; column 6, lines 3 to 7; column 7, lines 11 to 27 & GB 2284362 A & WO 1993/025301 A1	4-5, 10-13, 16-19

☒ 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
13 May 2016 (13.05.16)

Date of mailing of the international search report
24 May 2016 (24.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055913

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 62-501678 A (EHRNFORD, Edgar, Lars, Martin), 09 July 1987 (09.07.1987), page 3, upper left column, line 1 to lower left column, line 10; page 4, lower left column, lines 4 to 7; page 4, lower right column, lines 2 to 6; page 5, upper left column, lines 4 to 6 & WO 1986/004088 A1 page 4, line 28 to page 7, line 2; page 10, lines 30 to 34; page 11, lines 28 to 34; page 12, lines 30 to 33	1-3, 6-9, 14-15 4-5, 10-13, 16-19
Y	WO 2011/040525 A1 (Japan Health Sciences Foundation), 07 April 2011 (07.04.2011), paragraph [0040] & US 2012/0231970 A1 paragraphs [0060] to [0061]	4-5
Y	JP 2008-515668 A (The Research Foundation of the State University of New York), 15 May 2008 (15.05.2008), paragraph [0098] & US 2010/0323573 A1 paragraph [0120], example 6 & WO 2007/001405 A2 & CA 2583469 A1 & CN 101039798 A	5
Y	WO 2014/192919 A1 (Tosoh Corp.), 04 December 2014 (04.12.2014), paragraph [0036] (Family: none)	5
Y	JP 5-222091 A (Tokuyama Soda Co., Ltd.), 31 August 1993 (31.08.1993), paragraphs [0009], [0026] (Family: none)	10-13
Y	JP 2003-139704 A (Asahi Breweries, Ltd.), 14 May 2003 (14.05.2003), paragraphs [0138] to [0146] (Family: none)	12-13, 16-19
A	JP 2001-232163 A (Kabushiki Kaisha Nakamura Sogo Kenkyusho), 28 August 2001 (28.08.2001), paragraphs [0012] to [0013]; fig. 1(b) (Family: none)	1-11, 14-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N1/10(2006.01)i, B01D69/00(2006.01)i, B01D71/04(2006.01)i, C03C11/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N15/00(2006.01)i, G02B21/34(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. G01N1/00-1/44, B01D69/00, B01D71/04, C03C11/00, C12M1/00, G01N15/00, G02B21/34

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JDreamIII), 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	JP 8-502200 A (アメリカ合衆国) 1996.03.12	1-3, 6-9,
Y	第5頁第16-18行、第6頁第10-20行、第10頁第17-26行、第12頁第4-7行、第13頁第13行-第14頁第7行 & US 5234594 A Column 2 Line 3-6, Column 2 Line 30-45, Column 3 Line 47-51, Column 5 Line 6-20, Column 6 Line 3-7, Column 7 Line 11-27 & GB 2284362 A & WO 1993/025301 A1	14-15 4-5, 10-13, 16-19

☑ 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

13.05.2016

国際調査報告の発送日

24.05.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山口 剛

2 J

9806

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
X	JP 62-501678 A (エールンフオード, エドガー・ラルス・マーチン) 1987. 07. 09 第3頁左上欄第1行ー同頁左下欄第10行、第4頁左下欄第4ー7	1ー3, 6ー9, 14ー15
Y	行、第4頁右下欄第2ー6行、第5頁左上欄第4ー6行 & WO 1986/004088 A1 Page 4 Line 28 - Page 7 Line 2, Page 10 Line 30-34, Page 11 Line 28-34, Page 12 Line 30-33	4ー5, 10ー13, 16ー19
Y	WO 2011/040525 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2011. 04. 07 段落0040 & US 2012/0231970 A1 [0060]-[0061]	4ー5
Y	JP 2008-515668 A (ザ リサーチ ファウンデーション オブ ス テイト ユニバーシティー オブ ニューヨーク) 2008. 05. 15 段落0098 & US 2010/0323573 A1 [0120] Example 6 & WO 2007/001405 A2 & CA 2583469 A1 & CN 101039798 A	5
Y	WO 2014/192919 A1 (東ソー株式会社) 2014. 12. 04 段落0036 (ファミリーなし)	5
Y	JP 5-222091 A (徳山曹達株式会社) 1993. 08. 31 段落0009、段落0026 (ファミリーなし)	10ー13
Y	JP 2003-139704 A (アサヒビール株式会社) 2003. 05. 14 段落0138ー段落0146 (ファミリーなし)	12ー13, 16ー19
A	JP 2001-232163 A (株式会社中村総合研究所) 2001. 08. 28 段落0012ー段落0013、図1 (b) (ファミリーなし)	1ー11, 14ー15