

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年2月5日 (05.02.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/016842 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C12M 1/00</i> (2006.01)	<i>G01N 21/78</i> (2006.01)
<i>C12M 1/26</i> (2006.01)	<i>G01N 33/53</i> (2006.01)
<i>C12N 5/06</i> (2006.01)	<i>G01N 37/00</i> (2006.01)
<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)	

CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/002058

(22) 国際出願日: 2008年7月31日 (31.07.2008)

(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2007-201373 2007年8月1日 (01.08.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京農工大学 (NATIONAL UNIVERSITY

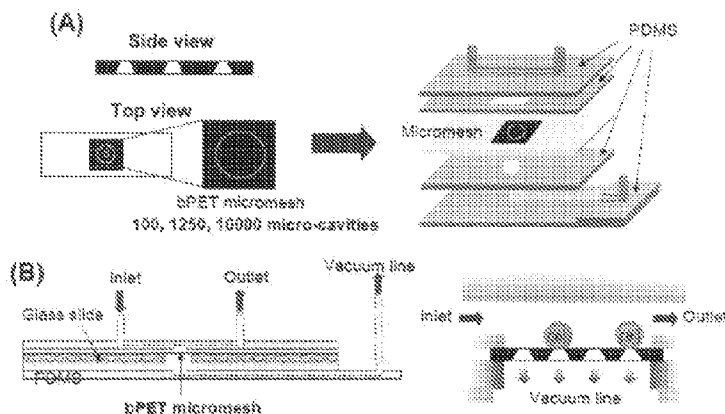
(72) 発明者; および  
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松永是 (MAT-SUNAGA, Tadashi) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 新垣篤史 (ARAKAKI, Atsushi) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 田口朋之 (TAGUCHI, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 細川正人 (HOSOKAWA, Masahito) [JP/JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: MICROFLUIDICDEVICE FOR TRAPPING SINGLE CELL

(54) 発明の名称: 単一細胞捕捉用マイクロ流路デバイス

[図2]



(57) Abstract: It is intended to provide a microfluidicdevice whereby a large amount cells in a sample can be highly efficiently isolated and trapped at the single cell level without damaging the cells by using a microfabrication technique. A microfluidicdevice which comprises, in the following order: a top substrate made of a plastic plate having a channel for forming a microchannel connecting a sample inlet to a sample outlet; an upper plastic plate constituting the microchannel together with the above-described top substrate and having an aperture for a micromesh; a holder plate holding a plastic micromesh having a plural number of micro-cavities for trapping cells; a lower plastic plate having an aperture for suction; and a bottom substrate made of a plastic plate having a groove for forming a suction channel, wherein the micro-cavities for capturing cells in the above-described micromesh have an inverted pot shape or a cylindrical shape and the above-described upper plate is made of a plastic material that is softer than the plastic material for the above-described top substrate.

(57) 要約: 微細加工技術を利用して、試料中の大量の細胞を、ダメージを与えることなく高効率で1細胞レベルで分離・捕捉するマイクロ流路デバイス (microfluidicdevice)

[続葉有]



WO 2009/016842 A1



(74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052  
東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル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, 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, 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.

(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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

) を提供するものである。試料供給口と試料排出口を連通するマイクロ流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる上部基板と、前記上部基板と協働してマイクロ流路を形成するとともに、マイクロメッシュ用開口窓が設けられたプラスチック製上部平板と、細胞捕捉用の複数の微細貫通孔を有するプラスチック製のマイクロメッシュを保持した保持平板と、吸引用開口窓が設けられたプラスチック製下部平板と、吸引流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる下部基板とを順次備え、前記マイクロメッシュの細胞捕捉用の微細貫通孔の形状が反すり鉢状又は円筒状であり、前記上部平板を前記上部基板に比較して軟質のプラスチックで構成する。

## 明 細 書

### 単一細胞捕捉用マイクロ流路デバイス

#### 技術分野

[0001] 本発明は、試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉することができる単一細胞捕捉用のマイクロ流路デバイスや、かかるマイクロ流路デバイスを用いた試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで分離・捕捉する方法や、前記マイクロ流路デバイスを利用した単一細胞の遺伝子発現の定量的解析方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 従来、単一細胞捕捉手段に関しては、まだ有効な手段は確立されていないため、世界的な競争が行われており、オプトエレクトロニックツィーザーズによる単一細胞の大量並行操作（例えば、非特許文献1参照）や、ポリスチレン製のマイクロチャンバーアレイチップによる単一細胞のマイクロアッセイ（例えば、非特許文献2参照）や、高密度ハイドロダイナミック細胞単離アレイによる単一細胞の分離（例えば、非特許文献3参照）等の論文の他、以下に示す細胞捕捉用の装置や方法に関する特許文献がある。

[0003] 例えば、一般の血液検査室に存在する器具を使用し、熟練を要することなく細胞を分離し、遺伝子解析を行うことを可能にする細胞分離用のスライドであって、細胞を付着させた後、1または複数個の細胞が付着した部分を切り取ることによって細胞を分離することを可能にした細胞分離用スライド（例えば、特許文献1参照）や、癌、感染性疾患又は他の病理学的過程についての診断キットであって、接着剤特性を有する選択領域を提供するように活性化され得る選択的活性化可能移送表面、及び正常組織からの細胞材料サンプルと異常組織からの細胞材料サンプルとを区別するために前記異常組織からの細胞材料サンプルに適用され得る少なくとも1つのプローブ又はマーカーを含んで成るキット（例えば、特許文献2参照）が知られている。

[0004] また、多数の細胞を含む細胞懸濁液に対して処理を行なって細胞を間隔を

隔てて整列させて流す細胞整列部と、細胞整列部で整列された細胞に対して検知処理を行って細胞に関する情報を検知する細胞情報検知部と、細胞情報検知部で検知された情報に基づいて細胞を選別する細胞選別部とを具備し、前記細胞整列部は、細胞懸濁液を流す第1通路と、第1通路にこれと交差する方向に連通すると共に第1通路の細胞懸濁液の流れを分断させる分断用液状物を流す第2通路とを備えている、細胞に与えるダメージを抑えつつ、径小の多数の細胞含有液滴を生成することができる細胞分離選別装置及び細胞整列用基板が知られている（例えば、特許文献3参照）。

[0005] また、トランスポーターを介して標識識別用の特定物質を目的細胞内に取り込ませる工程と、前記取り込まれた標識識別用の特定物質標識物を光学的に検出して前記目的細胞を分離する工程と、前記分離された目的細胞に取り込まれている標識識別用の特定物質を分離する工程とよりなり、細胞を標識し、目的細胞に電界による力を作用させて、他の細胞から分離する細胞分離装置を用いて細胞を分離回収するにあたり、細胞に与える影響を最小とし、回収した細胞の利用を容易とする細胞分離方法が知られている（例えば、特許文献4参照）。

[0006] また、細胞の捕捉および細胞の透過観察を容易且つ確実に行うことのできる細胞捕捉装置であって、細胞捕捉装置の細胞シャーレは、底板部の二箇所位置に、一对の貫通孔と、これら貫通孔の下開口部とを連続する吸入流路とを形成し、溝部を底板部の下方側から封着する透明板部材を設け、貫通孔の上開口部位置には捕捉用プレートを配置させ、貫通孔の上開口部には、吸引ポンプから通じる吸引チューブを接続する構成とした細胞捕捉装置が知られている（例えば、特許文献5参照）。

[0007] また、マイクロインジェクション法の実際の使用における種々の問題を解決し、顕微鏡で細胞を観察しながらの粒子の捕捉や針の刺入などが容易であって、効率良く粒子（例えば、細胞）に物質を注入することのできるマイクロチャンネルアレイ装置であって、基板を貫通する貫通孔を有する窪みと、該窪みと基板の端面の間を連通する多数の微細な溝とを該基板表面に有する第

1 基板と、透明な第2基板とからなり、前記第1基板の表面に前記第2基板を接合させることにより、前記第1基板と前記第2基板との接合部であって前記第1基板の端面に、前記溝によって形成される粒子捕捉用開口端が形成されているマイクロチャネルアレイ装置が知られている（例えば、特許文献6参照）。

[0008] 他方、本発明者らは、試料水中に含まれる対象微生物を分離して回収する微生物分離装置において、流体供給口および流体吸引口を含むフロー流路が内部に形成された平板基板と、平板基板の流体吸引口に設けられ対象微生物の最小径より小さい径の複数の貫通孔からなる捕捉部とを有するマイクロチップと、マイクロチップの捕捉部に接続され試料水を吸引する試料水吸引手段と、マイクロチップの平板基板の流体供給口に接続され試料水を供給する試料水供給手段とを備えた、試料水から対象微生物を選択的に精度良く分離して回収することができる微生物分離装置（例えば、特許文献7参照）を報告している。

[0009] 特許文献1：特開平10-332688号公報

特許文献2：特開2006-345868号公報

特許文献3：特開2004-144号公報

特許文献4：特開2006-42654号公報

特許文献5：特開2006-280231号公報

特許文献6：特開2002-27969号公報

特許文献7：特開2007-89566号公報

非特許文献1：Pei Yu Chiou, Aaron T. Ohta, Ming C. Wu, *AlI*, *nature* Vol. 436, 21 Jul. 2005, p370

非特許文献2：Shohei Yamamura他, *Anal. Chem.* 2005, Vol. 77, p8050-8056

非特許文献3：Dino Di Cario, Nima Aghdam, Luke P. Lee, *Anal. Chem.* 2006, Vol. 78, p4925-4930

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 近年、がんや自己免疫疾患という病態での免疫細胞の異常クローンが注目されているが、免疫のダイナミックな順応メカニズムを考えれば、個々の細胞の機能的性格が異なることは容易に想像できる。免疫応答の観点からしてもTCRや抗体遺伝子の変異も最初は1個の細胞から始まる現象であり、免疫細胞の機能研究においては、1細胞レベルでの研究はもはや避けては通れない時代である。このように、細胞解析のターゲットは細胞群から単一細胞、さらには細胞内分子へと細分化されつつある。単一細胞解析では、細胞を高速かつ網羅的に捕捉し、一括で解析することが望まれる。本発明の課題は、微細加工技術を利用して、試料中の大量の細胞を、ダメージを与えることなく高効率で1細胞レベルで分離・捕捉するマイクロ流路デバイス (microfluidic device) を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、先に試料水中に含まれる対象微生物を分離して回収する微生物分離装置を提案している (特許文献7参照)。すり鉢状の貫通孔が複数設けられている厚さ5 $\mu$ mのSUS304の薄板からなるマイクロチップを備えたこの微生物分離装置を用いると、クリプトスポリジウム模擬粒子等の微生物は効率よく捕捉しうるが、この微生物分離装置を用いて試料中の細胞を1細胞レベルで分離・捕捉しようと試みたところ、ダメージを与えることなく効率のよい1細胞レベルでの分離・捕捉が困難で、流体供給口及び流体吸引口を含むフロー流路内に細胞が吸着する上、細胞表面の観察が十分できず、分離・捕捉した細胞の分取に不便であることが判明した。

[0012] そこで、マイクロメッシュの材質の検討、マイクロメッシュの細胞捕捉用の微細貫通孔の形状の検討、マイクロ流路内での細胞吸着防止用界面活性剤の検討、マイクロ流路デバイス構成部材の材質・構造の検討、吸引圧の検討等を行った。そして、PET (polyethylene terephthalate) 基板に対して直径2 $\mu$ mの反すり鉢状の微細孔を100孔アレイ状に加工し、PETマイクロメッシュを作製し (図1参照)、PETマイクロメッシュを硬度の異なる2枚のPDMS (polydimethylsiloxane) 製平板から形成したマイクロ流路と

統合し、マイクロ流路内面を非イオン性界面活性剤で処理してマイクロ流路デバイスを構築し（図2参照）、Raji細胞懸濁液を流路内へ導入し、細胞をマイクロメッシュ上へ吸引捕捉したところ、最大で約80%という、従来のデバイスと比較して高効率での細胞捕捉が可能であり、捕捉細胞を等間隔にアレイ化することができることを見出した。また、細胞捕捉後にFISHプローブ導入のための膜透過処理を行い、続いて、ヒト $\beta$ -アクチンmRNAをターゲットとした蛍光標識プローブを流路に導入し、FISHによる染色を行った後、細胞の蛍光強度を測定し、個々の細胞のヒト $\beta$ -アクチンmRNA発現量を定量的に評価したところ、血清供給条件と血清飢餓条件で培養した細胞におけるヒト $\beta$ -アクチンmRNA発現量の変動を単一細胞レベルで明らかにすることができることを見出した。本発明は、以上の知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0013] すなわち本発明は、[1] マイクロメッシュにより試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉することができるマイクロ流路デバイスであって、表面に試料供給口及び試料排出口が形成され、下面に試料供給口と試料排出口を連通するマイクロ流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる上部基板と、前記上部基板と協働してマイクロ流路を形成するとともに、マイクロ流路の一部に相当する位置にマイクロメッシュ用開口窓が設けられたプラスチック製上部平板と、前記上部平板の開口窓の下方に相当する位置に、細胞捕捉用の複数の微細貫通孔を有するプラスチック製のマイクロメッシュと該マイクロメッシュを保持する保持板からなるマイクロメッシュ保持平板と、前記保持平板のマイクロメッシュの下方に相当する位置に吸引用開口窓が設けられたプラスチック製下部平板と、表面に吸引口が形成され、上面に前記下部平板と協働して前記吸引用開口窓と吸引口を連通する吸引流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる下部基板と、を順次備え、前記マイクロメッシュの細胞捕捉用の微細貫通孔の形状が反すり鉢状又は円筒状であり、前記上部平板が前記上部基板に比較して軟質のプラスチックで構成されており、前記上部基板と上部平板、又は上部平板とマイクロメ

ツシュ保持平板とが装脱着可能に構成されているマイクロ流路デバイスに関する。

[0014] また本発明は、[2] マイクロメッシュが、PET製又は着色PET製であることを特徴とする上記[1]記載のマイクロ流路デバイスや、[3] マイクロメッシュが、1000～10000の微細貫通孔を有することを特徴とする上記[1]又は[2]記載のマイクロ流路デバイスや、[4] 上部基板と上部平板が、PDMS (poly-dimethylsiloxane) を主剤とするプラスチック製であることを特徴とする上記[1]～[3]のいずれか記載のマイクロ流路デバイスや、[5] マイクロ流路内面が非イオン性界面活性剤で処理されていることを特徴とする上記[1]～[4]のいずれか記載のマイクロ流路デバイスや、[6] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンブロックコポリマー型非イオン性界面活性剤であることを特徴とする上記[5]記載のマイクロ流路デバイスや、[7] マイクロメッシュを保持する保持板が、ガラス製であることを特徴とする上記[1]～[6]のいずれか記載のマイクロ流路デバイスや、[8] 少なくとも、細胞捕捉率が50%以上であることを特徴とする上記[1]～[7]のいずれか記載のマイクロ流路デバイスに関する。

[0015] さらに本発明は、[9] 上記[1]～[8]のいずれか記載のマイクロ流路デバイスの試料供給口から細胞を含む試料を注入し、 $-10\text{ kPa} \sim -0.1\text{ kPa}$ の吸引圧で吸引することを特徴とする試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉する方法や、[10] 上記[1]～[8]のいずれか記載のマイクロ流路デバイスを用いて、試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉し、捕捉された各細胞に蛍光プローブを導入した後、蛍光励起により単一細胞の遺伝子発現を定量的に解析する方法に関する。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]細胞アレイとマイクロメッシュの模式図である。

[図2]本発明のマイクロ流路デバイスの模式図である。Aは組立図、Bは縦断面図。

[図3]細胞捕捉における吸引圧の検討結果を示す図である。圧力差  $90 \text{ kPa}$  ( $-90 \text{ kPa}$ ) で SUS 製マイクロメッシュ上に捕捉した Raji 細胞の蛍光顕微鏡写真で、A は上面、B は下面。Raji 細胞は DAPI で染色され、WU フィルターセット (ex. :330-385, em. :420 $\times$ ) で観察。スケールバーは  $50 \mu\text{m}$ 。

[図4]細胞捕捉における吸引圧の検討結果を示す図である。SUS 製マイクロメッシュ上に捕捉した Raji 細胞の蛍光顕微鏡写真で、A は圧力差  $40 \text{ kPa}$  ( $-40 \text{ kPa}$ ) ; B は圧力差  $20 \text{ kPa}$  ( $-20 \text{ kPa}$ ) ; C は圧力差  $10 \text{ kPa}$  ( $-10 \text{ kPa}$ ) ; D は圧力差  $5 \text{ kPa}$  ( $-5 \text{ kPa}$ ) で、左が上面、右が下面。Raji 細胞は DAPI で染色され、WU フィルターセット (ex. :330-385, em. :420 $\times$ ) で観察。スケールバーは  $100 \mu\text{m}$ 。

[図5]マイクロメッシュの材料の検討結果を示す図である。

[図6]PET 製マイクロメッシュと SUS 製マイクロメッシュにおける微細貫通孔の形状を示す図である。

[図7]PET 製マイクロメッシュと SUS 製マイクロメッシュにおける微細貫通孔の形状を示す図である。

[図8]SUS 製マイクロメッシュの走査型電子顕微鏡 (SEM) イメージを示す図である。A, B は上面、C, D は下面。

[図9]圧力差  $1.5 \text{ kPa}$  ( $-1.5 \text{ kPa}$ ) の吸引条件下、 $10000$  の微細貫通孔を有するブラック PET 製マイクロメッシュにおける細胞の捕捉効率を示す図である。A は走査イメージ、B はマイクロメッシュ上に捕捉された細胞数、C は捕捉効率。

[図10]非イオン性界面活性剤 (プルロニック F127) で処理したマイクロ流路内面に付着する Raji 細胞の蛍光顕微鏡写真を示す図である。CellTracker Red CMTPX で染色した Raji 細胞  $1500$  個を PDMS マイクロ流路に導入し、WIG フィルターセット (ex. :520-550, em. :580) で観察。

[図11]捕捉した Raji 細胞を FISH により検出した蛍光顕微鏡写真を示す図である。

[図12] 捕捉したRaji細胞をFISHにより検出した蛍光強度のヒストグラムを示す図である。

[図13] 本発明の10000穴マイクロ流路デバイスを用いたヒト抹消血単核球細胞(PBMCs)から造血幹細胞(HSCs)の分離を示す模式図である。

[図14] 本発明の10000穴マイクロ流路デバイス上のCD34+細胞の検出結果を示す図である。幹細胞マーカーであるCD34発現細胞は写真中下段右から1番目の1点に赤色で示され、白血球共通抗原であるCD45は上段の4点全て及び下段の左から1～3番目の3点に緑色で示されている。スケールバーは60 $\mu$ mである。

[図15] PE及びFITCの蛍光強度相関関係を示す図である。各点は単一細胞の蛍光強度を示す。単一細胞に対しては、FITC標識抗CD45抗体及びPE標識抗CD34抗体で染色を行った。

[図16] RT-PCRを用いた単一細胞mRNA発現分析の結果を示す図である。10000穴ブラックPETマイクロメッシュで捕捉したPBMCsから分離した単一細胞(CD34+細胞及びCD45+細胞)に発現しているCD34mRNAの発現を解析した。 $\beta$ アクチンmRNAの発現についても解析し対照実験とした。

### 発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明のマイクロ流路デバイスとしては、マイクロメッシュにより試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉することができるマイクロ流路デバイスであって、表面に試料供給口及び試料排出口が形成され、下面に試料供給口と試料排出口を連通するマイクロ流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる上部基板と、前記上部基板と協働してマイクロ流路を形成するとともに、マイクロ流路の一部に相当する位置にマイクロメッシュ用開口窓が設けられたプラスチック製上部平板と、前記上部平板の開口窓の下方に相当する位置に、細胞捕捉用の複数の微細貫通孔を有するプラスチック製のマイクロメッシュと該マイクロメッシュを保持する保持板からなるマイク

ロメッシュ保持平板と、前記保持平板のマイクロメッシュの下方に相当する位置に吸引用開口窓が設けられたプラスチック製下部平板と、表面に吸引口が形成され、上面に前記下部平板と協働して前記吸引用開口窓と吸引口を連通する吸引流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる下部基板と、を順次備え、前記マイクロメッシュの細胞捕捉用の微細貫通孔の形状が反すり鉢状又は円筒状であり、前記上部平板が前記上部基板に比較して軟質のプラスチックで構成されており、前記上部基板と上部平板、又は上部平板とマイクロメッシュ保持平板とが装脱着可能に構成されている装置であれば特に制限されるものではなく、少なくとも、細胞捕捉率が50%以上、中でも60%以上である装置が好ましい。また、上記細胞としては、ヒト細胞、ヒト以外の哺乳動物細胞、昆虫細胞等の動物細胞を好適に例示することができ、T細胞、B細胞等の免疫細胞を特に好適に例示することができる。これら細胞はあらかじめ修飾、改変、標識化しておいてもよい。また、これら細胞を含む試料としては流体試料であれば特に制限されず、例えば、血液、リンパ液、培養細胞懸濁液、体細胞懸濁液等でもよいが、本発明のマイクロ流路デバイスの効果を十分享受し得るように、少なくとも100~100000個の細胞を含む試料が好ましい。

[0018] 前記上部基板としては、表面（上面又は側面）に試料供給口及び試料送出口が形成され、下面に試料供給口と試料送出口を連通するマイクロ流路形成用の溝が設けられたプラスチック製の平板であれば特に制限されず、上面は多少曲面となっていてよく、また、下面は前記上部平板の上面と液密に積層しうる限り多少曲面となっていてよいが、上下面とも水平面からなる平板が加工の簡便さの点で好ましい。マイクロ流路形成用の溝は、細胞の付着防止の点から、曲面状の内面となる溝、例えば半円筒状（断面半円弧状）の内面溝や断面が矩形の角形溝を好適に例示することができる。上記試料供給口に試料を供給するため、通常、試料供給ポンプ等の試料供給手段が試料供給ラインを介して接続されている。さらに試料供給ラインのうち試料供給ポンプの上流には、試料供給バルブ及び試料貯留槽が上流側から下流側に向っ

て順次接続しておくこともできる。また、上記試料送出口には、試料送出ポンプ等の試料送出手段が試料送出ラインを介して接続しておいてもよく、単に試料送出バルブを取付けておくこともできる。上記試料供給ポンプや試料送出ポンプとしては、チューブポンプもしくはプランジャポンプ等の微小流量を制御可能なマイクロポンプを具体的に例示することができる。

[0019] 前記上部平板としては、上記の上部基板と協働してマイクロ流路を形成するとともに、マイクロ流路の一部に相当する位置にマイクロメッシュ用開口窓が設けられたプラスチック製上部平板であれば特に制限されず、上部基板と協働してマイクロ流路を形成するため、上部基板に設けられたマイクロ流路形成用の溝に相当する上面位置に、マイクロ流路形成用の溝、例えば半円筒状（断面半円弧状）の内面溝を設けることもできるが、上面を平面としてマイクロ流路を形成することもできる。また、マイクロメッシュ用開口窓は、マイクロメッシュの全面が露出する大きさのものが好ましく、窓の形状は円形、正方形等の矩形を具体的に例示することができる。

[0020] 前記マイクロメッシュ保持平板としては、細胞捕捉用の複数の反すり鉢状又は円筒状の微細貫通孔を有するプラスチック製のマイクロメッシュを保持した平板であれば特に制限されず、マイクロメッシュと、マイクロメッシュより少し小さめのマイクロメッシュ保持開口を有する保持板から構成されている。微細貫通孔の形状がすり鉢状の場合、細胞を1細胞レベルで分離・捕捉することができない場合があり、反すり鉢状又は円筒状の微細貫通孔とすることで、確実に細胞を1細胞レベルで分離・捕捉することが可能となる。微細貫通孔の上端開口径は、捕捉する細胞の径よりも少し小さい径とされ、 $2\sim 10\mu\text{m}$ とすることができる。また、微細貫通孔の数は、 $100\sim 10000$ 、好ましくは $1000\sim 10000$ である。また、微細貫通孔の中心間の距離を $30\sim 70\mu\text{m}$ 、好ましくは $40\sim 60\mu\text{m}$ 、より好ましくは $50\mu\text{m}$ とすることで細胞の捕捉効率を高めることができる。したがって、 $100000$ 個の微細貫通孔を備えたマイクロメッシュの大きさは、 $0.8\text{cm}\times 2\text{cm}$ 程度になる。

- [0021] また、マイクロメッシュの材質は、プラスチック製であることを必要とし、SUS製等の金属製では上端開口径が $2\mu\text{m}$ 以下の微細貫通孔の場合、均一なサイズ・均一な形状（反すり鉢状又は円筒状）に安定して加工することが困難である。捕捉対象が微生物の場合と異なり、細胞の場合は低減圧吸引条件が適用されるため、吸引圧による耐久性が低い、均一なサイズ・均一な形状の微細貫通孔を簡便に形成しうるなど安価で成形性に優れたプラスチック製とすることができる。かかるプラスチックの中でも、透明性があり、自家蛍光の少ない材質が好ましい。透明であることで細胞の表面を観察することができる。具体的には、PET、PMMA、PC、COP、エポキシ等のプラスチックを例示することができるが、レーザー加工による熱変形が少なく、加工精度が高い点でPETが好ましい。また、バックグラウンドの自家蛍光を低下させる目的で、黒、焦げ茶、濃紺等の着色プラスチックを有利に用いることができ、例えば、ブラックPETを特に好適に例示することができる。
- [0022] 前記プラスチック製下部平板としては、マイクロメッシュ保持平板のマイクロメッシュの下方に相当する位置に吸引用開口窓が設けられ、前記下部基板と協働して吸引流路を形成しうる平板であれば特に制限されず、吸引用開口窓の形状も特に制限されないが、通常円形として構成される。この下部平板は、減圧吸引条件下に、前記マイクロメッシュ保持平板と下部基板との隙間を気密に維持しうる平板形状に構成されている。
- [0023] 前記下部基板としては、表面に吸引口が形成され、上面に前記下部平板と協働して前記吸引用開口窓と吸引口を連通する吸引流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなるものであれば特に制限されず、吸引口は減圧吸引手段に連結され、マイクロメッシュ上の試料液は、微細貫通孔、吸引用開口窓、吸引流路、吸引口を順次経由して排出され、このときに細胞が微細貫通孔の上端開口部に1個ずつ捕捉されることになる。この吸引時には、前記上部基板の試料送出口の下流の試料送出バルブを閉塞しておくこともできる。また、下部基板の片側に、下から順次下部平板、マイクロメッシュ保

持平板、上部平板、上部基板を積層したときと同じ高さとなるような段差部を設けておくことが好ましい。このような段差部を設けることにより、減圧吸引時に下部基板上に下部平板、マイクロメッシュ保持平板、上部平板、上部基板を安定に積層載置することができ、吸引圧によりこれら平板を互いにボルト等により固着することなく、しっかりと固定することができ、逆に、減圧解放時には簡便にこれら平板を互いにとり外すことができる。

[0024] 前記上部基板、上部平板、下部平板、下部基板の材質としては、硬質のプラスチックが好ましく、これらは同じ材質でも異なる材質でも特に制限されず、PDMS、PMMA、PC、硬質ポリエチレン製等のプラスチック平板を例示することができるが、マイクロメッシュ保持平板との密着性の点でPDMSが好ましい。また、マイクロメッシュ保持平板の材質としては、ガラスの他、上記プラスチック等を例示することができるが、プラスチック製の平板との密着性及び貼り合わせ作業性の点でガラス（スライドガラス）が好ましい。

[0025] そして、前記のように、本発明は前記上部平板を前記上部基板に比較して軟質のプラスチックで構成する点に特徴を有する。高減圧吸引条件下では、マイクロメッシュ用開口窓が設けられた上部平板とスライドガラス製のマイクロメッシュ保持平板が密着するため、試料液の漏出なく送液を行うことができるが、動物細胞の捕捉は低減圧吸引条件下で行うため、上部基板と同じ固さの上部平板を用いたとき、密着性に問題が生じ、試料液が漏出するおそれがある。そこで、前記上部平板を前記上部基板に比較して軟質のプラスチックで構成することで、上部基板と上部平板とマイクロメッシュを保持する保持板との粘着性（密着性）を高めることにより、試料液の漏出を防止することができる。例えば、上部基板に比べて軟質材料で構成した上部平板は、PDMSの主剤に混合する硬化剤の配合割合を、上部基板に比べて1/10～1/2、好ましくは1/5～1/3とすることにより作製することができる。このように、上部基板に比べて軟質材料で構成した上部平板を用いると、上部基板と上部平板とマイクロメッシュを保持する保持板との液密性を高

めることができ、その結果、低減圧吸引条件下であっても、漏出なく送液操作を行うことができる上に、細胞を捕捉する前後に、少なくとも前記上部基板と上部平板、又は上部平板とマイクロメッシュ保持平板とを容易に装脱着することができ、捕捉細胞のピックアップや顕微鏡観察を簡便に行うことが可能となる。さらに、上部基板の下面と上部平板の上面をプラズマ処理を行い、プラズマ処理後すぐに張り合わせることで接着しておくこともできる。

[0026] 同様に、前記下部平板を前記下部基板に比較して軟質のプラスチックで構成することで、下部基板と下部平板とマイクロメッシュを保持する保持板との粘着性（密着性）を高めることにより、試料液の漏出を防止することができる。このように、本発明において軟質のプラスチックとは、減圧吸引時にマイクロメッシュを保持する保持板との粘着性（密着性）を高め、試料液の漏出を防止しうる軟度のプラスチックをいう。例えば、下部基板に比べて軟質材料で構成した下部平板は、PDMSの主剤に混合する硬化剤の配合割合を、下部基板に比べて1/10～1/2、好ましくは1/5～1/3とすることにより作製することができる。このように、下部基板に比べて軟質材料で構成した下部平板を用いると、下部基板と下部平板とマイクロメッシュを保持する保持板との液密性を高めることができ、その結果、低減圧吸引条件下であっても、漏出なく吸引操作を行うことができる。さらに、下部基板の上面と下部平板の下面をプラズマ処理を行い、プラズマ処理後すぐに張り合わせることで接着しておくこともできる。

[0027] 前記上部基板と上部平板とで協働して形成されたマイクロ流路の内面、好ましくはマイクロ流路の内面に加えてマイクロメッシュの上面を非イオン性界面活性剤であらかじめ処理しておくことが、マイクロ流路内面への細胞の付着を防除する上で好ましい。この非イオン性界面活性剤処理に先だって、表面プラズマ処理をすることがより好ましい。陰イオン界面活性剤を用いて表面を被覆することにより、表面電位が負に帯電している微生物の吸着を防除することはできるが、細胞は十分に防除することができず、非イオン性界面活性剤で処理する必要がある。かかる非イオン性界面活性剤としては、ブ

ロックポリマー型エーテル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、シヨ糖脂肪酸エステル（シュガーエステル）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステルを例示することができるが、ブロックポリマー型エーテル、特にポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー型非イオン性界面活性剤が好ましい。上記ブロックポリマー型エーテルとしては、例えば、ポリオキシエチレン（196）ポリオキシプロピレン（67）グリコール（プルロニックF127）、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（プルロニックF68）、ポリオキシエチレン（42）ポリオキシプロピレン（67）グリコール（プルロニックP123）、ポリオキシエチレンオキシプロピレンセチルエーテル（20E. O4P. O）を挙げることができる。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油としては、例えば、水素添加ヒマシ油ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレン水素添加ヒマシ油等を挙げることができる。ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えば、ポリソルベート40（ツイーン40）、ポリソルベート60（ツイーン60）、ポリソルベート65、ポリソルベート80（ツイーン80）、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（20E. O）を挙げることができる。例えば、プルロニックF127などのポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー型非イオン性界面活性剤を用いる場合、その濃度は0.5~10%、好ましくは1~5%程度である。

[0028] 本発明の試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉する方法としては、上記の本発明のマイクロ流路デバイスの試料供給口から細胞を含む試料を注入し、 $-10\text{ kPa} \sim -0.1\text{ kPa}$ 、好ましくは $-5\text{ kPa} \sim -1\text{ kPa}$ の吸引圧で吸引する方法であれば特に制限されず、 $-10\text{ kPa}$ より高い吸引圧（圧力差 $10\text{ kPa}$ 超）、例えば吸引圧 $-20\text{ kPa}$ で吸引すると細胞が破壊され、 $-0.1\text{ kPa}$ より小さい吸引圧（圧力差 $0.1\text{ kPa}$ 未満）では捕捉効率が悪くなる。

[0029] 本発明の解析方法としては、上記の本発明のマイクロ流路デバイスを用い

て、試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉し、捕捉された各細胞に蛍光プローブを導入した後、蛍光励起により単一細胞の遺伝子発現を定量的に解析するFISH法等であれば特に制限されず、より具体的には、マイクロ流路デバイスに細胞を1個ずつ捕捉させた後、50%エタノール/PBSをマイクロ流路に導入し、ホットプレート上にマイクロ流路デバイスをセットして、細胞の透過化処理を行い、この透過化処理が施された細胞に、特定の遺伝子mRNAに対するCy3標識化オリゴヌクレオチドプローブなど蛍光標識化オリゴヌクレオチドプローブを導入して、ハイブリダイズを行わせた後、個々の単一細胞の蛍光強度を測定することにより、単一細胞の遺伝子発現を定量的に解析することが可能となる。

[0030] また、本発明のマイクロ流路デバイスを用いることにより、試料中に含まれるT細胞やB細胞を1細胞レベルに分離・捕捉することができ、がん特異的抗原ペプチドを認識するTCRを細胞膜上に発現する1個のT細胞レベルでの機能的なT細胞レセプター(TCR)の解析・同定や、がん特異的抗原ペプチドを認識する抗体を細胞膜上に発現する1個のB細胞レベルでの機能的な抗体の解析・同定が可能となり、免疫応答のモニタリングを行うことができる。このようにして、がん患者のがん特異的TCRや抗体の遺伝子を解析・同定することにより、患者個人の体内で産生されているがん抗原特異的TCRや抗体の種類全体像に関する情報を得ることができ、テイラーメイド的な患者個人の診断が可能となる。

[0031] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[0032] [マイクロ流路デバイスの構築]

マイクロ流路(深さ; 1mm, 幅; 1mm)作製のための鋳型を、CAD-CAMM(computer-aided design-computeraided modeling machineシステム; PNC-300, ローランド株式会社製)を用いて、厚さ3mmのPMM A(polymethylmethacrylate)の基板を切削することにより作製した。この鋳型を超音波洗浄した後に乾燥させ、PDMS(poly-dimethylsiloxane)の

主剤と硬化剤（シルガード184；ダウコーニング社製）とを10：1で混合し、鋳型に注入後、減圧下において脱気し、上部基板を作製した。また、マイクロメッシュ用開口窓が設けられた上部平板はPDMSと硬化剤を50：1で配合したものを使用した。このPDMSを85℃で20分間以上加熱することにより硬化させた。これらの表面に20秒間プラズマ処理を行い、プラズマ処理後すぐに張り合わせることでPDMSを接着し、マイクロ流路部材を作製した。また、試料供給口と試料送出口にはシリコンチューブ（内径1mm×外径3mm）を接続した。同様に、PDMSと硬化剤とを10：1で混合し、鋳型に注入後、減圧下において脱気し、下部基板を作製した。また、下部平板は主剤と硬化剤を50：1で配合したものを使用した。このPDMSを85℃で20分間以上加熱することにより硬化させた。これらの表面に20秒間プラズマ処理を行い、プラズマ処理後すぐに張り合わせることでPDMSを接着し、吸引流路部材を作製した。また、吸引口にはシリコンチューブを接続した。

[0033] マイクロメッシュを作製するため、厚さ38 $\mu$ mの黒色のbPET (black polyethylene terephthalate；村中医療器社製) を使用した。各微細貫通孔は反すり鉢状をしており、孔径が小さい側の直径が2 $\mu$ mになるように設計した。さらにこれらの中心間距離を30 $\mu$ mとして、10×10の合計100孔、中心間距離を60 $\mu$ mとして25×50の合計1250孔、及び中心間距離を60 $\mu$ mとして100×100の合計10000孔をそれぞれアレイ状に配置した。この設計を基にクロムを蒸着したガラス基板によりフォトマスクを作製した。このマスクを用いて、エキシマレーザー微細加工機 (Optec Micro-Master System, Optec社) により波長248nm、周波数150Hzのレーザーを用いて、bPET基板に微細貫通孔を加工した。このbPET基板を直径10mmの貫通孔をあけたスライドガラスにエポキシ接着剤を用いて接着してマイクロメッシュ保持平板を作製した。最終的に、前記マイクロ流路部材と吸引流路部材の間にマイクロメッシュ保持平板を挟み込み、マイクロ流路デバイスの構築を行った。

## [0034] [予備実験；吸引圧の検討]

Raji細胞（ヒトバーキットリンパ腫）を供試細胞とし、細胞にダメージを与えない方法として、厚さ $38\mu\text{m}$ のブラックPET（bPET）に代えて厚さ $5\mu\text{m}$ のSUS304の薄板からなるマイクロメッシュを備えた以外は図2に示されるマイクロ流路デバイスを用いて、細胞捕捉における吸引圧の検討を行った。その結果、図3に示すように、微生物の場合と異なり細胞の場合は圧力差 $90\text{kPa}$ （ $-90\text{kPa}$ ）では細胞が破壊した。そこで、吸引圧を、 $-40\text{kPa}$ （圧力差 $40\text{kPa}$ ）、 $-20\text{kPa}$ （圧力差 $20\text{kPa}$ ）、 $-10\text{kPa}$ （圧力差 $10\text{kPa}$ ）、 $-5\text{kPa}$ （圧力差 $5\text{kPa}$ ）に変えて同様に細胞捕捉における吸引圧の検討を行った。結果を図4に示す。その結果、 $-5\text{kPa}$ という低減圧吸引条件下で細胞を効率よく捕捉可能なことがわかった。

## [0035] [マイクロメッシュの材料の検討]

マイクロメッシュの材料として、厚さ $5\mu\text{m}$ のSUS304の薄板、厚さ $5\mu\text{m}$ のPETフィルム（村中医療器社製）、厚さ $38\mu\text{m}$ のブラックPETフィルム（村中医療器社製）を用いて、バックグラウンドの自家蛍光について調べた。結果を図5に示す。その結果、透明のPETよりも、SUSや半透明のブラックPETの方が自家蛍光が少ないことがわかった。

## [0036] [PET製マイクロメッシュとSUS製マイクロメッシュにおける微細貫通孔の形状観察]

PET製マイクロメッシュとSUS製マイクロメッシュにおける反すり鉢状微細貫通孔の形状を調べた。走査型電子顕微鏡（SEM）イメージを図6～図8に示す。図6～図8より、PETの方がSUSよりも均一な微細加工を精度よく行うことができることがわかった。

## [0037] [細胞の捕捉効率]

10000の微細貫通孔を有するブラックPET製マイクロメッシュが装着されたマイクロ流路デバイスに、圧力差 $1.5\text{kPa}$ （ $-1.5\text{kPa}$ ）の吸引条件下、1000個、3000個、5000個及び10000個のRaj

i細胞を注入し、マイクロメッシュ上に捕捉された細胞数をスキャナーで測定した。走査イメージ、マイクロメッシュ上に捕捉された細胞数、捕捉効率を図9に示す。図9からわかるように、本発明のマイクロ流路デバイスを用いると、細胞捕捉率60%以上を達成することができる。

[0038] [捕捉細胞の生存率]

Calcein-AMで染色した1000個のRaji細胞を、圧力差1.5kPa（-1.5kPa）の吸引条件下、ブラックPET製マイクロメッシュが装着されたマイクロ流路デバイスに捕捉させる前後の生存率を求めた。捕捉前後のCalcein-AM染色Raji細胞をPI溶液を導入し、NIBAフィルターセット（ex. :470-490, em. :515-550）及びWIGフィルターセット（ex. :520-550, em. :580）を用いて、蛍光顕微鏡写真（合成画像）により観察した。その結果、捕捉前の細胞生存率は96.8%であり、捕捉後の細胞生存率は91.3%であったことから、本発明の細胞の捕捉方法によると、捕捉細胞の生存率はきわめて高いものと評価できる。

[0039] [非イオン性界面活性剤によるPDMSマイクロ流路への細胞の付着防止]

PDMS製マイクロ流路部材を備えたマイクロ流路デバイスのマイクロ流路を、0.1%、1%、10%の各濃度の非イオン性界面活性剤（プルロニックF127）で処理した後、CellTracker RedCMTPXで染色したRaji細胞1500個を注入し、マイクロ流路内面に付着したRaji細胞をWIGフィルターセット（ex. :520-550, em. :580）の蛍光顕微鏡写真により観察した。結果を図10に示す。1%のプルロニックF127溶液処理で、PDMSマイクロ流路への細胞の付着を防止できることがわかった。

[0040] [蛍光励起による単一細胞の遺伝子発現の定量的解析]

Raji細胞をブラックPET製マイクロメッシュが装着されたマイクロ流路デバイスに捕捉させた後、50%エタノール/PBSをマイクロ流路に導入し、ホットプレート上にマイクロ流路デバイスをセットして、細胞の透過化処理を行った。透過化処理が施された細胞に、ヒトβ-アクチンに対するCy3標識化オリゴヌクレオチドプローブを用いて、42°Cで2時間ハイブリ

ダイズを行った。蛍光顕微鏡写真を図 1 1 に示す。また、Galcein-AM で標識した血清飢餓Raji細胞 (n = 38) と血清処理Raji細胞 (n = 28) との混合懸濁液を、マイクロ流路デバイスに導入後、ブラックPET製マイクロメッシュ上に捕捉させた後、ヒト $\beta$ -アクチンmRNAに対して、ヒト $\beta$ -アクチンmRNA用Cy3標識化オリゴヌクレオチドプローブを用いてFISHをマイクロ流路デバイス上で行った。次いで、単一細胞の蛍光強度を測定した。結果を図 1 2 に示す。血清処理によりヒト $\beta$ -アクチンmRNAの発現が増強した細胞の蛍光強度は、ヒト $\beta$ -アクチンmRNAの発現が抑制された血清飢餓細胞よりも強かった。これらのことから、マイクロ流路デバイスを用いることにより、単一細胞の遺伝子発現の定量的解析が可能であることがわかる。

[0041] [マイクロ流路デバイスによるCTLの1細胞レベルでの分離・捕捉]

CTLマーカーであるCD8と、gp100ペプチドへの抗原レセプターとをともに発現している細胞のみを単離する目的で、FITC標識抗CD8抗体+PE標識gp100-HLA-A2-テトラマーで二重蛍光免疫染色したCTL細胞懸濁液をマイクロ流路デバイスに導入し、 $-2.0\text{ kPa}$ で減圧吸引を行うことで、細胞をブラックPETマイクロメッシュ上へ捕捉した。蛍光顕微鏡 (BX-51; Olympus社製) を用いて、ブラックPETマイクロメッシュ上の細胞を観察したところ、1細胞レベルで分離・捕捉できていることを確認した。

[0042] [マイクロ流路デバイスによる稀少細胞の分離・捕捉]

マイクロ流路デバイスを用いたヒト末梢血単核球細胞 (PBMCs) 中に約0.1%の割合で存在する稀少細胞である造血幹細胞 (HSCs) の分離・捕捉の概要を図 1 3 に示す。FITC標識抗CD45抗体及びPE標識抗CD34抗体を用いて二重蛍光免疫染色を行った $10^4$ 個のPBMCsを10000穴ブラックPET製マイクロメッシュが装着されたマイクロ流路デバイスに捕捉させた後、電動ステージを配した蛍光顕微鏡下でNIBA及びWIGフィルターセットを用いて観察を行い、マイクロメッシュ全体の蛍光画

像を取得した。この蛍光顕微鏡写真を図14に示す。写真は、緑色に染色されたCD45<sup>+</sup>細胞（上段の4点全て及び下段の左から1～3番目の3点）、及び、赤色に染色されたCD34<sup>+</sup>細胞（写真中下段右から1番目の1点）を示す。また、二重蛍光免疫染色を行った10<sup>4</sup>個のPBMCsのPE及びFITCの蛍光強度の相関関係を図15に示す。

[0043] この結果、本発明にかかるマイクロメッシュを用いることにより、PBMCs中にわずか0.1%程度の存在率しかないHSCs細胞を、1万穴に9割以上の極めて高い確率で細胞1個の単位で捕捉することができたので、ごく稀少な細胞（赤色に染色された細胞）でもロスなく確実に回収することができることが確認できた。このように本発明のマイクロ流路デバイスを使用すると、免疫染色法を用いた細胞の多重染色により、末梢血中に含まれる細胞のプロファイリング解析に利用できる。また、基板材として顔料を含有したプラスチックを用いていることで、目的細胞の超高感度検出が可能であることがわかった。

[0044] [キャピラリーによる単一細胞分離]

上述のようにしてマイクロメッシュ上に捕捉された細胞群の中から、赤色に染色されたCD34<sup>+</sup>細胞（HSCs細胞）のみを手動でキャピラリーにより分離し、ピッキングした。また対照として、CD45<sup>+</sup>細胞のみを手動でキャピラリーにより分離し、ピッキングした。そして、ピッキングしたCD34<sup>+</sup>細胞及びCD45<sup>+</sup>細胞を試料として用い、RT-PCRを行った。逆転写反応は、42℃で60分間の条件で行い、PCRは94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で30秒の各条件で50サイクルずつ行った。増幅産物に対し電気泳動を行い、細胞内に発現しているmRNAについて解析した。このRT-PCRを用いた単一細胞mRNA発現分析によるCD34 mRNA及びβアクチンmRNAの発現結果を図16に示す。

[0045] この結果、マイクロメッシュ上に捕捉された細胞を、その状態のままでプラスチック製上部平板を剥がして表面に露出させ、露出した細胞群からキャピラリーで単一細胞として回収することができるので、細胞がダメージを受

けることなく、発現解析試料に供することができ、また一細胞ずつ分離した試料を分析することで、細胞とその内部に発現している核酸の関連性を比較的容易に直接調べることができることがわかった。

### 産業上の利用可能性

[0046] 本発明のマイクロ流路デバイスを用いると、試料中の大量の細胞を、ダメージを与えることなく80%という高効率で1細胞レベルで確実に分離・捕捉できること；特に基板材として顔料を含有したプラスチックを用いていることで、目的細胞の超高感度検出が可能であること；一細胞ずつ分離した試料を分析することで、細胞とその内部に発現している核酸の関連性を比較的容易にダイレクトに調べることができること；マイクロメッシュ上に捕捉された細胞を、その状態のままで、プラスチック製上部平板を簡易に剥離し（粘着性の材質なので脱着可能）、表面に露出させてキャピラリーで回収することができるので、細胞がダメージを受けることなく、発現解析試料に供することができること；が明らかとなった。例えば、試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉し、捕捉された各細胞に蛍光プローブを導入した後、蛍光励起により単一細胞の遺伝子発現の定量的解析、すなわちFISH（Fluorescence in situ hybridization）法により単一細胞内mRNAの可視化及び定量的解析が可能となり、また、腫瘍免疫学的観点から見ると従来不可能とされてきた1個のT細胞レベルでの機能的なT細胞レセプター（TCR）を解析・同定することができ、免疫応答のモニタリングが可能となる。

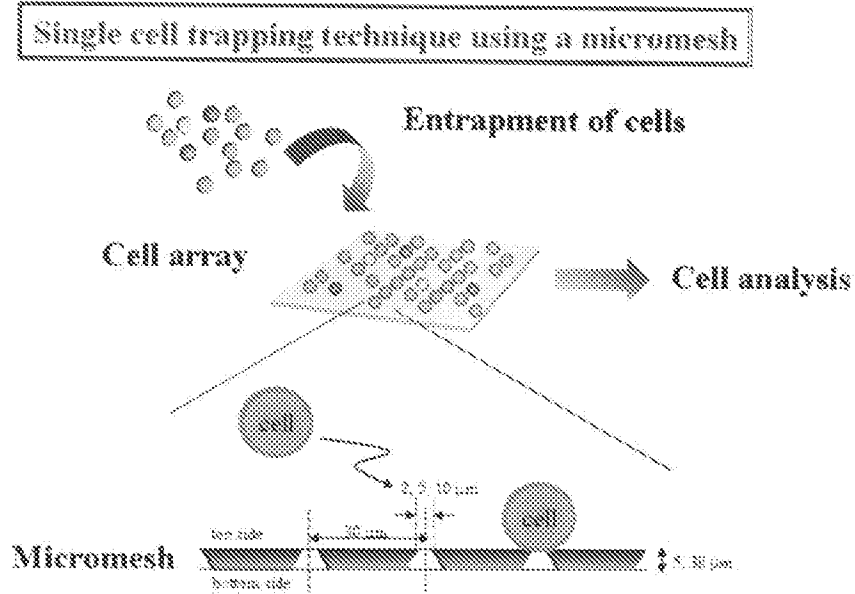
また、本発明のマイクロ流路デバイスは、送液による各種試薬の導入が容易であることから、リアルタイム観察による細胞の解析にも最適なツールであり、現在注目されているiPS細胞をはじめとする幹細胞等において、目的細胞の誘導メカニズムの解析や目的細胞の培養にも利用可能な研究支援ツールとして有望である。

## 請求の範囲

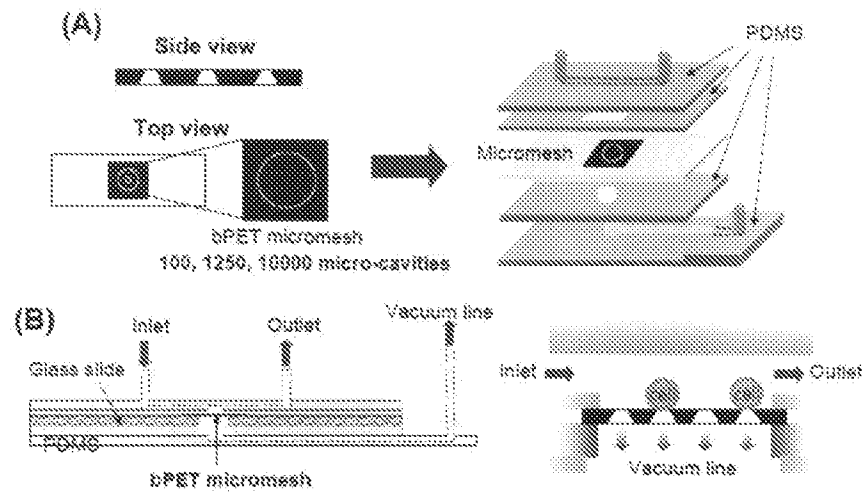
- [1] マイクロメッシュにより試料中に含まれる細胞を1細胞レベルで捕捉することができるマイクロ流路デバイスであって、  
表面に試料供給口及び試料排出口が形成され、下面に試料供給口と試料排出口を連通するマイクロ流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる上部基板と、  
前記上部基板と協働してマイクロ流路を形成するとともに、マイクロ流路の一部に相当する位置にマイクロメッシュ用開口窓が設けられたプラスチック製上部平板と、  
前記上部平板の開口窓の下方に相当する位置に、細胞捕捉用の複数の微細貫通孔を有するプラスチック製のマイクロメッシュと、該マイクロメッシュを保持する保持板からなるマイクロメッシュ保持平板と、  
前記保持平板のマイクロメッシュの下方に相当する位置に吸引用開口窓が設けられたプラスチック製下部平板と、  
表面に吸引口が形成され、上面に前記下部平板と協働して前記吸引用開口窓と吸引口を連通する吸引流路形成用の溝が設けられたプラスチック製平板からなる下部基板と、  
を順次備え、  
前記マイクロメッシュの細胞捕捉用の微細貫通孔の形状が反すり鉢状又は円筒状であり、前記上部平板が前記上部基板に比較して軟質のプラスチックで構成されており、  
前記上部基板と上部平板、又は上部平板とマイクロメッシュ保持平板とが装脱着可能に構成されている  
ことを特徴とするマイクロ流路デバイス。
- [2] マイクロメッシュが、PET製又は着色PET製であることを特徴とする請求項1記載のマイクロ流路デバイス。
- [3] マイクロメッシュが、1000～10000の微細貫通孔を有することを特徴とする請求項1又は2記載のマイクロ流路デバイス。

- [4] 上部基板と上部平板が、PDMS (poly-dimethylsiloxane) を主剤とするプラスチック製であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか記載のマイクロ流路デバイス。
- [5] マイクロ流路内面が非イオン性界面活性剤で処理されていることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載のマイクロ流路デバイス。
- [6] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンブロックコポリマー型非イオン性界面活性剤であることを特徴とする請求項 5 記載のマイクロ流路デバイス。
- [7] マイクロメッシュを保持する保持板が、ガラス製であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載のマイクロ流路デバイス。
- [8] 少なくとも、細胞捕捉率が 50%以上であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載のマイクロ流路デバイス。
- [9] 請求項 1～8 のいずれか記載のマイクロ流路デバイスの試料供給口から細胞を含む試料を注入し、 $-10\text{ kPa}$ ～ $-0.1\text{ kPa}$  の吸引圧で吸引することを特徴とする試料中に含まれる細胞を 1 細胞レベルで捕捉する方法。
- [10] 請求項 1～8 のいずれか記載のマイクロ流路デバイスを用いて、試料中に含まれる細胞を 1 細胞レベルで捕捉し、捕捉された各細胞に蛍光プローブを導入した後、蛍光励起により単一細胞の遺伝子発現を定量的に解析する方法。

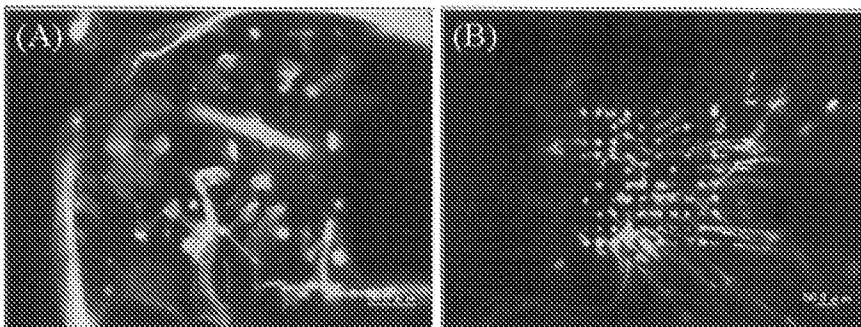
[圖1]



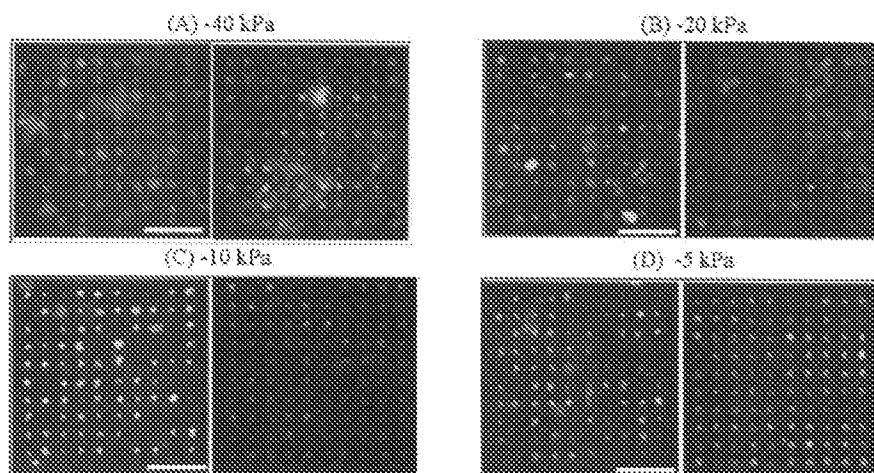
[圖2]



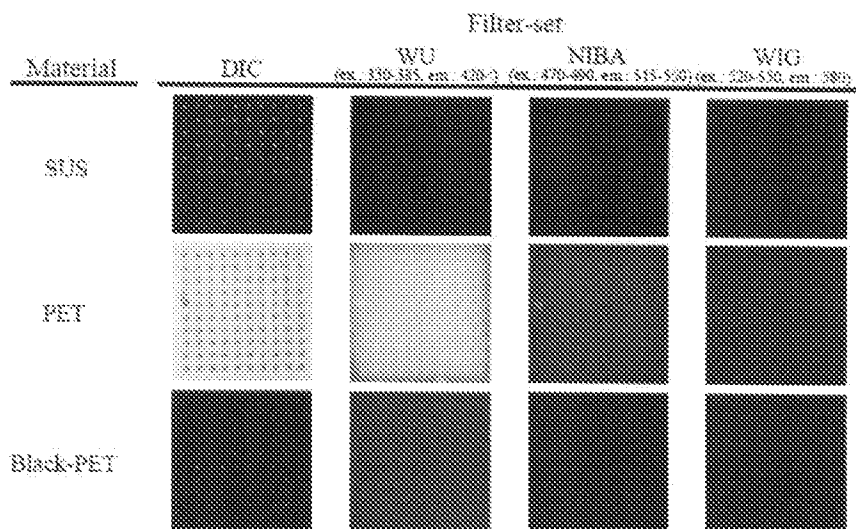
[圖3]



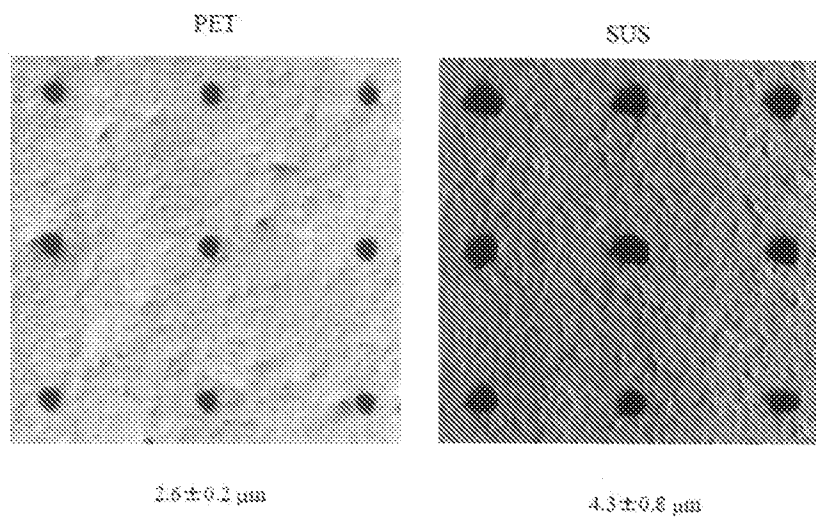
[図4]



[図5]

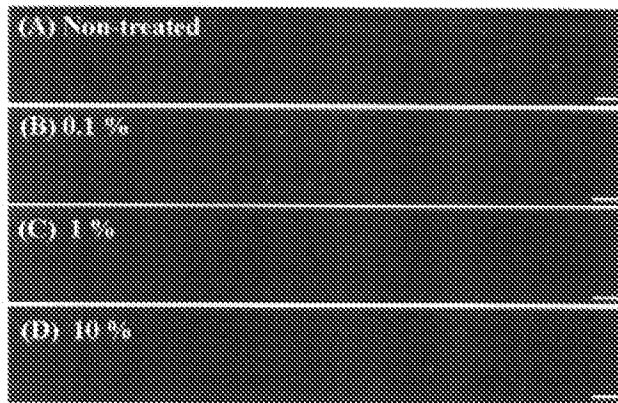


[図6]

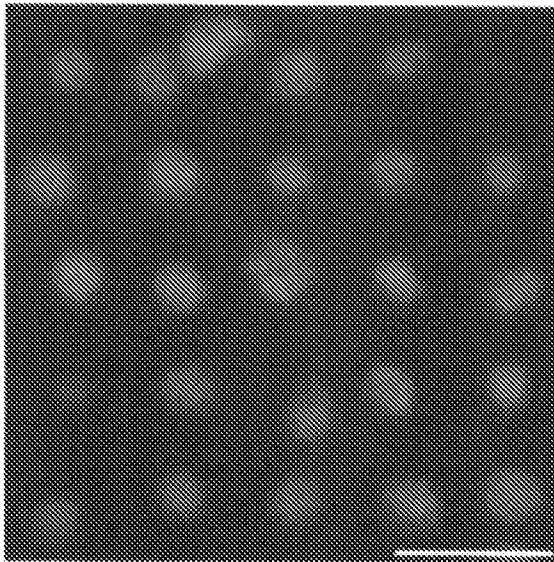




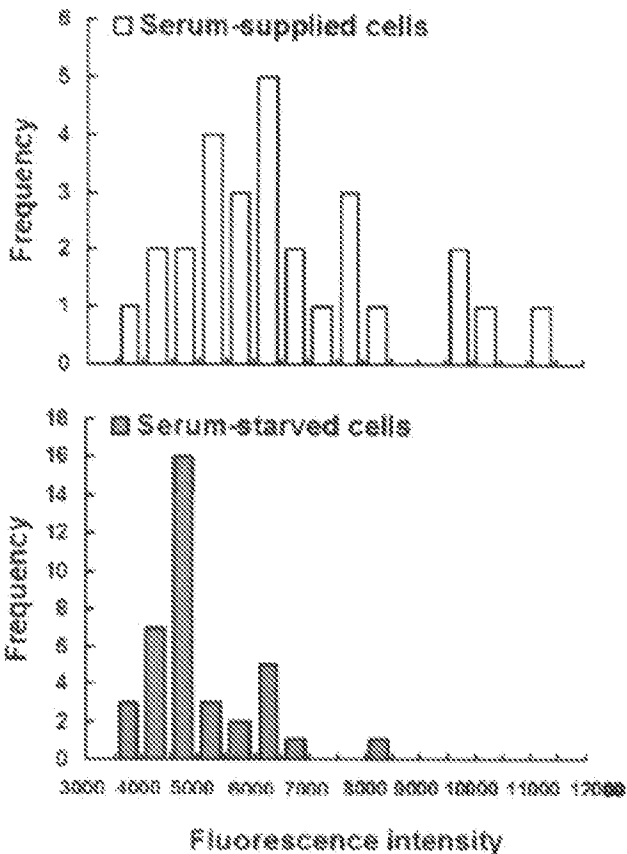
[図10]



[図11]

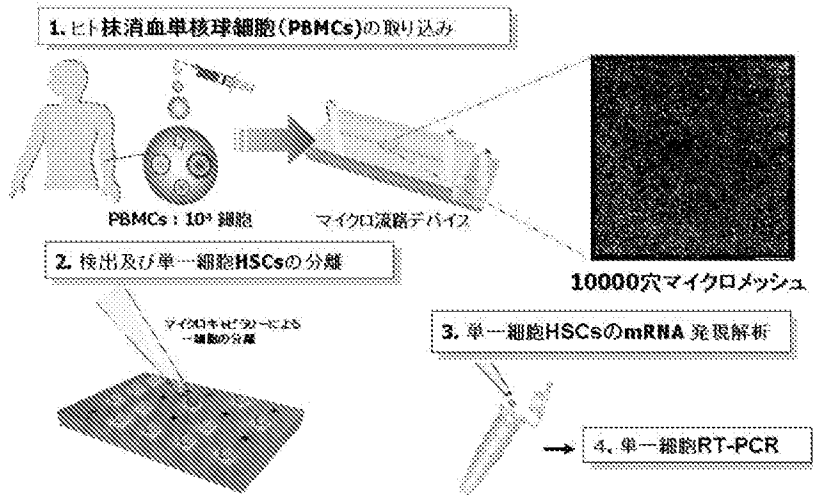


[図12]



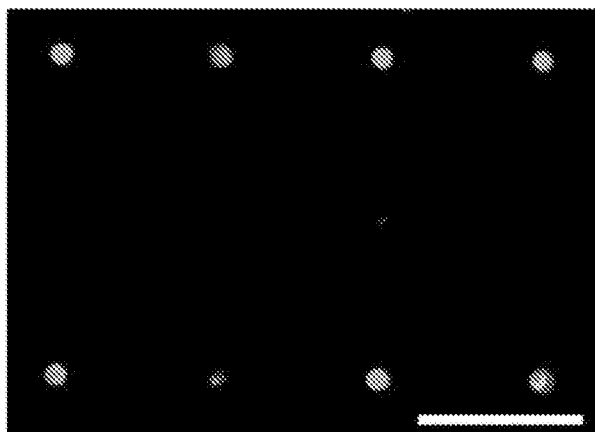
[図13]

ターゲット: 造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells; HSCs)  
 ⇒ 抹消血単核球細胞中に約 0.1% の稀少な細胞である。

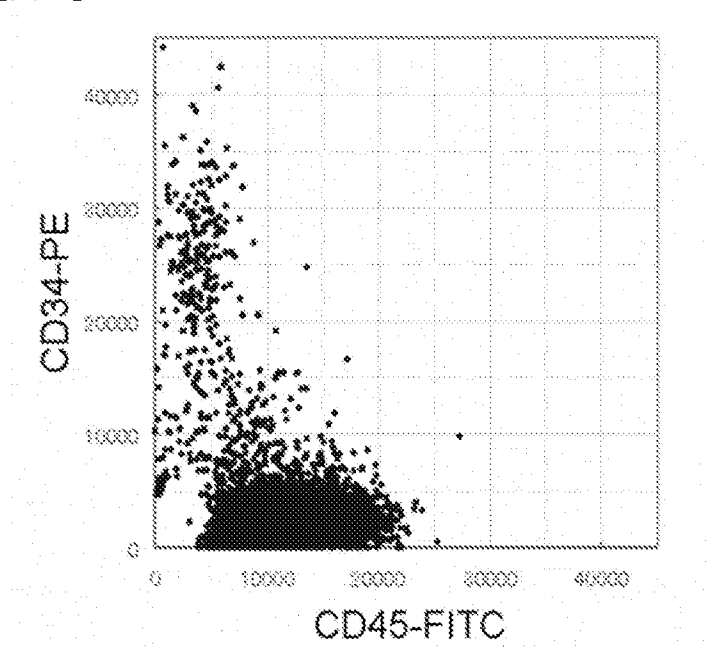


[図14]

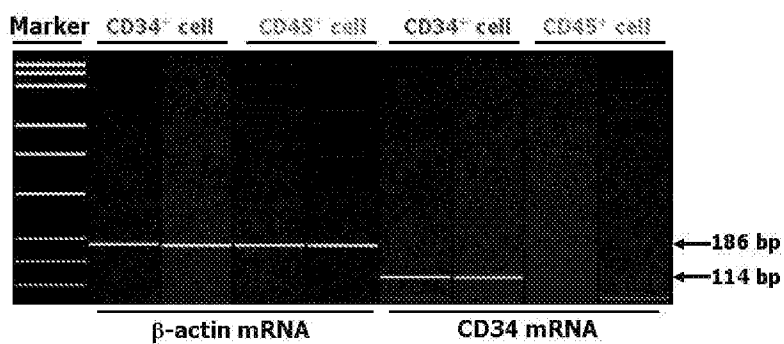
CD34 : Stem cell marker  
 CD45 : Leukocyte common antigen



[図15]



[図16]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002058

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, C12M1/26(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/68  
(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/53(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)

C12M1/00, C12M1/26, C12N5/06, C12Q1/68, G01N21/78, G01N33/53, 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	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

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

PubMed, Science Direct, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-89566 A (Tokyo University of Agriculture and Technology), 12 April, 2007 (12.04.07), Full text (Family: none)	1-10
Y	JP 2006-280231 A (Fujitsu Ltd.), 19 October, 2006 (19.10.06), Full text & US 2006/0223163 A1 & EP 1707620 A1	1-10
Y	JP 2007-43903 A (Fujitsu Ltd.), 22 February, 2007 (22.02.07), Claim 3; Par. Nos. [0015] to [0016], [0074] & US 2007/0048857 A1 & EP 1752221 A1	1-10

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  
18 September, 2008 (18.09.08)

Date of mailing of the international search report  
30 September, 2008 (30.09.08)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2008/002058

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 2006-191877 A (Fujitsu Ltd.), 27 July, 2006 (27.07.06), Par. No. [0026] (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12M1/26(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/53(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 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00, C12M1/26, C12N5/06, C12Q1/68, G01N21/78, G01N33/53, 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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008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)

PubMed, Science Direct, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII)

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 請求の範囲の番号
Y	JP 2007-89566 A (国立大学法人東京農工大学) 2007.04.12, 全文 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2006-280231 A (富士通株式会社) 2006.10.19, 全文 & US 2006/0223163 A1 & EP 1707620 A1	1-10
Y	JP 2007-43903 A (富士通株式会社) 2007.02.22, 請求項3、段落15-16、段落74等 & US 2007/0048857 A1 & EP 1752221 A1	1-10

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、一般的な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

18.09.2008

国際調査報告の発送日

30.09.2008

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)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4155

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 請求の範囲の番号
Y	JP 2006-191877 A (富士通株式会社) 2006.07.27, 段落26等 (ファミリーなし)	1-10