

(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
2012 年 8 月 2 日(02.08.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/101943 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/080007
- (22) 国際出願日: 2011 年 12 月 26 日(26.12.2011)
- (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 2011-016690 2011 年 1 月 28 日(28.01.2011) JP
特願 2011-205865 2011 年 9 月 21 日(21.09.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾崎 久美江 (OZAKI, Kumie). 佐々本 裕方 (SASAMOTO, Hiromichi). 雑野 邦久 (NAGINO, Kunihisa).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

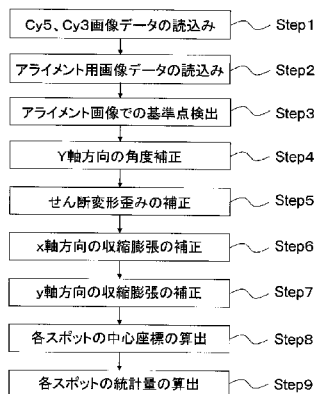
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: ANALYSIS METHOD AND READING DEVICE FOR MICROARRAY

(54) 発明の名称: マイクロアレイの解析方法および読取り装置

【図8】



Step 1 Read Cy5, Cy3 image data
Step 2 Read image data for alignment
Step 3 Detect reference point in alignment image
Step 4 Correct angle of direction of Y-axis
Step 5 Correct for shear deformation strain
Step 6 Correct for expansion/contraction in the X-axis direction
Step 7 Correct for expansion/contraction in the Y-axis direction
Step 8 Calculate center coordinate of each of the spots
Step 9 Calculate statistical amount of each of the spots

(57) Abstract: In order to provide an analysis method enabling the appropriate performance of alignment processing even in the analysis of a DNA chip where no positive control has been arranged or even in the analysis of a chip where a sample contains little DNA, this microarray analysis method for irradiating, with excitation light, a microarray where probes have been arranged on a substrate surface having an uneven shape, and obtaining as numerical data the amount of fluorescence from each of the probes excited by the excitation light comprises: a step (a) for measuring the amount of fluorescence of the probes and acquiring fluorescence image data; a step (b) for receiving reflected light and/or scattered light from the substrate surface and acquiring, as image data for alignment, the uneven shape of the substrate surface of the microarray, from the intensity of the received light; and a step (c) for determining the positions of each of the probes in the fluorescence image data on the basis of the image data for alignment.

(57) 要約: ポジティブコントロールを配置していない DNA チップの解析においても、もしくは、サンプルに含まれる DNA 量が少ないチップの解析においても、アライメント処理を適切に行うことが可能な解析方法を提供するために、凹凸形状を有する基板表面にプローブが配置されたマイクロアレイに励起光を照射し、励起光で励起された各プローブからの蛍光量を数値データとして得るマイクロアレイの解析方法であって、プローブの蛍光量を測定して蛍光画像データを取得するステップ (a) と、基板表面からの反射光及び又は散乱光を受光して、該光の受光強度からマイクロアレイの基板表面の凹凸形状をアライメント用画像データとして取得するステップ (b) と、前記アライメント用画像データに基づいて前記蛍光画像データにおける各プローブの位置を決定するステップ (c) と、を含む、マイクロアレイの解析方法とす

る。

WO 2012/101943 A1

明 細 書

発明の名称：マイクロアレイの解析方法および読取り装置

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロアレイの解析方法およびマイクロアレイの読取り装置に関する。

背景技術

[0002] 1990年以降、生物学、医学、薬学方面でマイクロアレイと呼ばれる技術の開発が進み利用されるようになってきた。マイクロアレイは、ガラスやプラスチックなどの基板上に、数十から数万のプローブを固定したもので、蛍光分子などで標識されたサンプル（ターゲット）をこの基板にアプライし、プローブとサンプルとの結合反応を蛍光などで検出するものである。マイクロアレイの特徴としては一度に網羅的な測定が可能であり、今後テーラーメイド医療に必須のものになると期待されている。

[0003] 基板に固定するプローブの種類には、後述するようなものがあり、その種類により名称がつけられている。すなわち、プローブとしてDNAを基板に固定したDNAマイクロアレイ（DNAチップ）、タンパク質を基板に固定したタンパク質マイクロアレイ、多数の微小標本を基板に固定化した組織マイクロアレイ、多数の低分子化合物を基板に固定化した化合物マイクロアレイなどが知られている。

[0004] このうち、DNAマイクロアレイ（以下DNAチップ）は、最も実用化が進んでおり、疾患に関連する遺伝子の探索や、その遺伝子を用いて検査、診断を行おうとする研究が活発に行われており、一部は実用化されている。

[0005] 以下にマイクロアレイの一形態であるDNAチップについて、詳細に説明する。

[0006] DNAチップとは、ガラスや樹脂等からなる基板の上にDNAをグリッド状にスポット（固定化）したものをいう。DNAチップ上には、標識されるDNAサンプルと特異的に反応可能なプローブとして、DNA（プローブD

NA) がスポットされている。一方、解析すべき未知のDNAサンプルには光学的に検出可能な発光又は蛍光マークを付けておく。こうすると、解析すべき未知のDNAサンプルを前記DNAチップ上に流し込むことで、該DNAサンプルが、スポットされたDNAと相補的な関係にあれば、結びついて二重鎖になる。したがって、プローブDNAと結びつかなかったDNAサンプルをすべて洗い流し、DNAチップ上に残存する判定したいDNAサンプルを発光させ、これを読み取り装置（スキャナー）により読み取ると、二重鎖となったDNAの状況を画像として観察することができる。すなわち、DNAチップ上で発光するマークの分布を解析することで、求める遺伝子の存在や、ある遺伝子が発現しているか否か、またはどの程度発現しているかを解析することができる。このように、DNAチップ上に既知のプローブDNAセットを構成し、このプローブDNAを多種類DNAチップ上に搭載することで、遺伝子の変異や遺伝子の発現量などを検出することができる。

[0007] 以下、図1に、DNAチップ解析の一連の処理工程の詳細を示す。

[0008] 図1に示す前処理工程においては、検体から抽出したDNAサンプル中に含まれる未知のDNAを増幅し、これらのDNAに蛍光マークを付与する。

[0009] 次にハイブリダイゼーション工程において、多種類のプローブDNAが搭載されたDNAチップの基板上に、蛍光マーク（例えば、Cy3, Cy5など）を付与したDNAサンプルを滴下する。ここで、DNAサンプルがスポットされたDNAと相補的な関係にあれば、結びついて二重鎖になる。

[0010] 次に、洗浄工程において、所定の洗浄液により、ハイブリダイズされたDNAチップを洗浄する。これにより、グリッド状に配置されたプローブDNAと結びつかなかったDNAサンプルがすべて洗い流される。

[0011] 続いて、洗浄されたDNAチップをスキャンする。スキャン工程においては、読み取り装置内にて、蛍光マーク（例えば、Cy3, Cy5など）を励起するのに適した所定の波長のレーザー光をDNAチップに照射し走査する。これにより、スポットされた各DNA（遺伝子）の発光量が測定され、それに基づいて解析処理を行う蛍光画像データを取得する。

- [0012] 解析工程においては、得られた蛍光画像データに対してテンプレートを利用して各スポットの蛍光強度を算出し、各種の解析を実行する。
- [0013] ここで、図2に、DNAチップ解析に用いられるDNAチップ1の一例を示す。図2に示すDNAチップ1は、基板2の上に、個々の遺伝子に対応するプローブDNAが行方向および列方向に所定数、マトリクス状に配列されたブロックを有している（以下、当該ブロックに配置されているプローブDNAを「スポット」3と称する）。なお、基板2上に配置されるスポット3は、既にその塩基配列が解読されている互いに異なる遺伝子にそれぞれ対応するものであり、基板2上におけるその配置位置は予め定められている。
- [0014] また、図3に、DNAチップの蛍光画像データに対して適用されるテンプレートの一例を示す。図3に示すように、テンプレートは、例えば1～32などの複数のブロックに分割されており、各ブロック内においてはm行n列（図3では22×22）のマトリクス状に配置された検出エリア（DNAチップの個々のスポットに対応する）が設けられている。
- [0015] 上記の解析工程においては、読みとったDNAチップの蛍光画像データ中の個々のスポットに、解析ツールが提供するテンプレートの検出エリアを当てはめ（アラインメント）、当該検出エリアにおいて各スポットの蛍光強度を算出する。このとき、正確な解析を実行するためには画像上の個々のスポットに対してテンプレートの個々の検出エリアが正しく設定されるよう、アラインメント処理が正確に実行される必要がある。
- [0016] このアラインメントの方法としては、ブロック単位でアラインメントを行うパターンマッチング法や投影法などがある。そして、特許文献1に示す通り、ポジティブコントロールと呼ばれる蛍光物質やどのような検体にでも含まれているハウスキーピング遺伝子をスポットしたチップを使用して、アラインメントを正確に行なおうとする試みもなされている。

先行技術文献

特許文献

- [0017] 特許文献1：特開2005-172840号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0018] しかしながら、ブロック単位でアライメントを行う典型的なパターンマッチング法や投影法は、いずれも、ハイブリダイズしたサンプルDNAの量が多く、十分な強さの蛍光を発するスポットが1/4から半数程度存在しないと、正しくアライメント出来ない。そのため、検体から抽出したサンプル中に含まれるDNA量が少ない場合、アライメントが正常に行えない場合がある。一方、ポジティブコントロールと呼ばれる蛍光物質を配置する方法は、十分な強さの蛍光を発するスポットが少なくともアライメントが行えるという利点があるものの、配置可能なDNA数が減少し、チップ製造時におけるコストアップ等の問題がある。また、蛍光物質をポジティブコントロールとして利用した場合、ハイブリダイゼーション中に、それが遊離し、ポジティブコントロールの周辺を汚染してしまい、データを得られない恐れもある。また、ハウスキーピング遺伝子に対応するDNAプローブを配置した場合においては、サンプルに含まれるDNA量が少ない時、ポジティブコントロールからの蛍光も小さく、結果的にアライメントが困難になってしまうという問題もある。

[0019] 本発明は、上記の課題を解決するためになされたものであって、ポジティブコントロールを配置していないDNAチップの解析においても、もしくは、サンプルに含まれるDNA量が少ないチップの解析においても、アライメント処理を適切に行うことが可能な解析方法および装置を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0020] 上記目的を達成する本発明は、以下のいずれかの構成を特徴とするものである。

(1) 凹凸形状を有する基板表面にプローブが配置されたマイクロアレイに励起光を照射し、励起光で励起された各プローブからの蛍光量を数値データとして得るマイクロアレイの解析方法であって、プローブの蛍光量を測定

して蛍光画像データを取得するステップ（a）と、基板表面からの反射光及び／又は散乱光を受光して、該光の受光強度からマイクロアレイの基板表面の凹凸形状をアライメント用画像データとして取得するステップ（b）と、前記アライメント用画像データに基づいて前記蛍光画像データにおける各プローブの位置を決定するステップ（c）と、を含む、マイクロアレイの解析方法。

（2） 前記基板表面からの反射光及び／又は散乱光は、前記励起光を照射する光源からの光が前記マイクロアレイで反射及び／又は散乱した光である、前記（1）に記載のマイクロアレイの解析方法。

（3） 前記ステップ（c）は、前記アライメント用画像データにおいて、受光強度の差に基づいて前記マイクロアレイの3つ以上の基準点Aを検出するステップ（c1）と、検出した基準点Aを基に前記蛍光画像データの歪みを補正するステップ（c2）とを含んでいる、前記（1）または（2）に記載のマイクロアレイの解析方法。

（4） 前記ステップ（c1）は、少なくとも8つの所定の観察領域それぞれにおいて前記基板の輪郭線上の点である輪郭基準点aを算出するステップ（c11）と、重複しない所定の少なくとも2つの観察領域を組とし、各組において複数の輪郭基準点aに対する近似直線を求めるステップ（c12）と、各組で求めた近似直線の交点を算出して該交点を前記基準点Aとするステップ（c13）とを含んでいる、前記（4）に記載のマイクロアレイの解析方法。

（5） 前記ステップ（c2）が、前記基準点Aからプローブを配置しているスポットの配列角度 θ_x 、 θ_y を得て、該スポットの配列角度 θ_x 、 θ_y および下記式から、前記蛍光画像データの剪断変形歪みを補正するものである、前記（3）または（4）に記載のマイクロアレイの解析方法。

[0021] [数1]

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\tan \theta_{xy} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$$

[0022] [数2]

$$\theta_{x y} = \theta_x - \theta_y$$

[0023] (6) 前記ステップ(c1)は、4つの基準点Aを検出し、その4つの基準点Aを直線で結んで形成される四角形が平行四辺形でない場合には、さらに該四角形を平行四辺形に近似し、該平行四辺形の頂点を基準点Aとして設定しなおす、前記(3)～(5)のいずれかに記載のマイクロアレイの解析方法。

(7) 前記マイクロアレイがDNAマイクロアレイである、前記(1)～(6)のいずれかに記載のマイクロアレイの解析方法。

(8) 凹凸形状を有する基板表面にプローブが配置されたマイクロアレイに励起光を照射するレーザー光源と、前記基板表面で反射した励起光と前記プローブからの蛍光の光束を平行光にする対物レンズと、前記基板表面で反射した励起光をカットするとともに前記プローブからの蛍光を透過する光学フィルタと、前記光学フィルタを透過した蛍光を受光して蛍光画像データを取得する結像レンズおよび検出器と、を備えたマイクロアレイの読取り装置であって、前記結像レンズおよび検出器は、前記基板表面で反射及び／または散乱した光を受光して、マイクロアレイの基板表面の凹凸形状が表れたアライメント用画像データを取得可能であり、更に、前記アライメント用画像に基づいて前記蛍光画像データにおける各プローブの位置を検出する演算処理装置を備えているマイクロアレイの読取り装置。

(9) 前記結像レンズと前記検出器の間に、被写体深度を制限するピンホールを有する、前記(8)に記載のマイクロアレイの読取り装置。

発明の効果

[0024] 本発明によれば、ポジティブコントロールを配置していないDNAチップの解析や、サンプルに含まれるDNA量が少ないチップの解析の場合にも、アライメント処理を適切に行うことができ、解析が可能となる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]DNAチップ解析の一連の工程を示す概略図である。

[図2]DNAチップ解析に用いられるDNAチップの一例を示す概略図である。

[図3]DNAチップ解析において、DNAチップの蛍光画像データに対して適用されるテンプレートの一例を示す模式図である。

[図4]本発明の一実施形態を示す、DNAチップの解析装置の概略模式図である。

[図5]DNAチップの読取り装置における光学系の一実施形態を示す概略模式図である。

[図6]スポット配列の行方向と列方向とが垂直に直交するDNAチップをスキヤニングしたにも関わらず歪みが生じて該スポット配列が垂直にならない蛍光画像データの一例を示す模式図である。

[図7]DNAチップの読取り装置で得られたアライメント用画像の一例である。

[図8]DNAチップの解析方法の一実施形態を示すブロック図である。

[図9]DNAチップの読取り装置で得られたアライメント用画像における四隅の座標を示す図である。

[図10]図6におけるStep4、Step5の処理を示す図である。

[図11]本発明で解析に供したアライメント用画像データ(a)ならびに蛍光画像データ(b)、(c)の一例である。

[図12]基準点の検出方法の一例を示す図である。

[図13]アライメント用画像データにおいてDNAチップに回転がかかっているときの一例である。

[図14]台形を平行四辺形に近似する方法を示す図である。

発明を実施するための形態

[0026] 本発明のマイクロアレイの解析装置は、プローブとしてのDNAを基板に固定したDNAマイクロアレイ(DNAチップ)や、プローブとしてのタンパク質を基板に固定したタンパク質マイクロアレイ、多数の微小標本を基板

に固定化した組織マイクロアレイ、多数の低分子化合物を基板に固定化した化合物マイクロアレイなどを解析する装置であって、マイクロアレイの基板表面の凹凸形状を利用して、得られる蛍光画像データのアライメントを行うものである。該解析装置においては、凹凸形状を有する基板表面にプローブが配置されたマイクロアレイに励起光を照射し、励起光で励起された各プローブからの蛍光量を数値データとして得るが、その際、プローブの蛍光量を測定して蛍光画像データを取得するとともに（ステップ（a））、該ステップ（a）とは別に、基板表面からの反射光及び／又は散乱光を受光して、該光の受光強度からマイクロアレイの基板表面の凹凸形状をアライメント用画像データとして取得する（ステップ（b））。そして、ステップ（b）で得られたアライメント用画像データに基づいて、ステップ（a）で得られた蛍光画像データにおける各プローブの位置を決定する（ステップ（c））。

[0027] 本発明でいうマイクロアレイとは、ガラスやプラスチックなどの基板上に、例えば数十から数万のプローブを固定したものである。蛍光分子などで標識されたサンプル（ターゲット）をこのマイクロアレイの基板にアプライし、プローブとサンプルとの結合反応を蛍光で検出する。前述のように、基板に固定するプローブの種類により、名称がつけられおり、プローブとしてDNAを基板に固定したDNAマイクロアレイ（DNAチップ）、タンパク質を基板に固定したタンパク質マイクロアレイ、多数の微小標本を基板に固定化した組織マイクロアレイ、多数の低分子化合物を基板に固定化した化合物マイクロアレイなどが挙げられる。

[0028] 以下、本発明を、マイクロアレイの代表例であるDNAチップの解析方法および解析装置を例に、説明する。

[0029] DNAチップなどのマイクロアレイの解析は、例えば図4に示すように、スキャナー4と、スキャナー制御用PC5と、画像サーバー6と、解析用PC7などを用いて行われる。

[0030] スキャナー4は、レーザー光源、光学フィルタ、対物光学系、蛍光画像データおよびアライメント用画像データを取得する検出器、等から構成される

。さらに詳しくは、スキャナー４は、例えば図５に示すように、DNAチップ１などの基板を二方向に走査するための走査機構（図示しない、また本明細書においてはチップの長手方向をy軸、それに直交する方向をx軸とする）と、DNAチップなどの基板を複数載置するオートローダー機構（図示しない）と、それぞれ特定波長の励起光を基板表面に出射するレーザー光源５０１、５０２と、該励起光を受光したプローブからの光（蛍光）および該励起光の基板表面からの反射光・散乱光の光束を平行光にする対物レンズ５０４と、レーザー光源５０１からの励起光をカットしつつプローブからの蛍光を透過させる励起光カットフィルタ５０８と、レーザー光源５０２からの励起光をカットしつつプローブからの蛍光を透過させる励起光カットフィルタ５０７と、プローブからの蛍光を受光・結像することによって蛍光画像データを取得するとともに、基板表面からの反射光及び／又は散乱光を受光・結像し、その受光強度からマイクロアレイの基板表面の凹凸形状をアライメント用画像データとして取得する、結像レンズ５０９および検出器５１１とを備えている。

[0031] なお、図５に示す態様においては、装置を小さくするために、励起光をミラー５１２、５１３により屈折させてDNAチップ１に到達させる。

[0032] また、走査機構の基準軸は、歪みの無い画像を得るために、直交していることが好ましい。走査機構としては、一般的に２軸共、スライダーを用いることが好ましい。

[0033] 上記実施態様は、DNAサンプルに２種の蛍光マークを付け、それらの読み取りを行う装置としたため、当該２種の蛍光マークに対応した波長の光を出射するレーザー光源５０１、５０２と、出射される励起光の波長にそれぞれ対応した励起光カットフィルタ５０８、５０７とを備えている。しかしながら、DNAサンプルに１種のみの蛍光マークをつけ、その読み取りを行う装置としてもよいし、３種以上の蛍光マークをつけ、それらの読み取りを行う装置としてもよい。いずれの場合も、用いる蛍光色素に対応したレーザー光源と励起光カットフィルタを設ければよい。

- [0034] 解析用PC7（演算処理装置）には、前記検出器511で取得するアライメント用画像に基づいて蛍光画像データにおける各プローブの位置を検出するための演算処理を行うプログラムが導入されている。
- [0035] 以上のような装置においては、基本的に、発光性のマーカーによりマーキングされたDNAサンプルを滴下したDNAチップを、レーザー光により励起し、蛍光画像データを取得する。蛍光画像データを取得する際には、スキャナー制御用PC5により、スキャナー4におけるDNAチップ1の走査や画像取得の制御を行う。当該スキャナー制御用PC5としては、汎用パーソナルコンピュータなどを用いる。
- [0036] 得られた蛍光画像データは、DNAチップ画像ファイル8として画像サーバー6に保存される。DNAチップ1は、後述するように、例えば蛍光色素Cy3、Cy5に対応する励起波長でスキャンされ、1つのDNAチップ1に対応してそれぞれの励起波長に対応した蛍光画像データが得られるが、この蛍光画像データは、例えば、16ビットグレイスケールTiffフォーマット、BMPフォーマット、JPEGフォーマットなどのファイル形式で保存される。
- [0037] 解析用PC7は、画像サーバー6に保存されたDNAチップ画像ファイル8を読み込む。さらに解析実行用のパラメータ等を定義する解析定義ファイル9を読み込んで、DNAチップ画像の解析を実行し、数値化された解析結果データを数値化データファイル10として出力する。この解析用PC7には、後述のアライメント処理を含んだ解析処理を実行するためのプログラムが導入される。
- [0038] 基本的には以上のような方法でDNAチップなどマイクロアレイの解析が行われるが、本発明においては、蛍光画像データを取得する工程（（上記ステップ（a））とは別に、マイクロアレイの基板表面からの反射光および／または散乱光を受光して、該基板の凹凸形状をアライメント用画像データとして取得し（上記ステップ（b））、得られたアライメント用画像データに基づいてアライメント処理を行って蛍光画像データにおける各プローブの位

置を決定する（上記ステップ（c））。

[0039] 次に、スキャナー4での蛍光画像データおよびアライメント用画像データの取得方法とアライメント処理方法について詳しく説明する。

[0040] まず、図5を用いて上記ステップ（a）に対応する画像取得方法について説明する。なお、以下では蛍光色素としてCy5、Cy3を用いた態様を説明するが、サンプルを標識するための蛍光色素はいずれか一方でもよいし、またこれらに限定されるものではない。蛍光色素としては例えば、Fluorescein、FITC、Alexa Fluor 555、Rodamine、Cy3.5、Texas Red、TAMURA、Oyster 650、Cy5.5などを用いることができる。

[0041] 例えば、最初に蛍光色素Cy5を読み取るために、Cy5用のレーザー光源501（例えば波長635nmのレーザー光源）からレーザー光（すなわち蛍光色素Cy5の励起光）を照射する。レーザー光は、穴あきミラー503および対物レンズ504を介してDNAチップ1に照射される。照射されたレーザー光により励起発光した蛍光分子からの蛍光505ならびにチップ表面で反射および／または散乱したレーザー光506は、対物レンズ504で互いに略平行となるよう集光される。その後、該蛍光505ならびにレーザー光506は、穴あきミラー503で反射され、Cy5用の励起光カットフィルタ508に入射する。なお、チップ表面で正反射したレーザー光は、穴あきミラー503の穴を通過する。励起発光した蛍光分子からの蛍光505は、この励起光カットフィルタ508を透過し、結像レンズ509で集光される。一方、励起光カットフィルタ508に到達した励起光（チップ表面で反射および／または散乱した光）はカットされる。結像レンズ509で集光された蛍光505は、ピンホール510により、結像レンズ509の焦点位置付近以外の光がカットされ、検出器511に入射する。検出器511は、光の強弱に応じた電気信号を出力する。このような工程を、スキャナー制御用PC5により、DNAチップ1を二方向に走査させて繰り返しつつ、検出器511から出力された電気信号をA/D変換して蛍光画像データを作成

する。

[0042] 続いて、蛍光色素C y 3の読み込みを行う。蛍光色素C y 3の読み込みは、C y 5用のレーザー光源5 0 1をC y 3用のレーザー光源5 0 2（例えばレーザー波長5 3 2 n mのレーザー光源）に置き換えるとともに、C y 5用の励起光カットフィルタ5 0 8をC y 3用の励起光カットフィルタ5 0 7に置き換える以外は、蛍光色素C y 5の読み込みと同様に行えばよい。すなわち、C y 3用のレーザー光源5 0 2からレーザー光（すなわち蛍光色素C y 3の励起光）を照射するとともに、C y 3用の励起光カットフィルタ5 0 7にて該励起光カットフィルタ5 0 7に到達した励起光（すなわちチップ表面で反射および／または散乱した光）を除去することで、C y 5と同様に蛍光画像データを作成する。

[0043] ここで、スキャナーの走査機構が2つのスライダーを備えたものである場合、これらスライダーが必ずしも直交しているとは限らない。装置組み立て時、もしくは時間の経過等に伴って、ずれてしまうことある。そのため、スキャナーで読み取ったDNAチップの画像も、例えば図6（a）に示すように傾いている可能性がある。このように、走査機構のx軸とy軸が直交しない場合は得られた蛍光画像データが歪んでしまい、テンプレートの検出エリアを得られた画像に正しく位置合わせすることが出来ない。

[0044] このため、画像から直交度のズレを検出して、スライダーが直交する走査機構で得られる画像と同等になるように補正することが好ましい。より具体的には、蛍光画像データをx軸に対してy軸方向に投影し、座標X毎の積算強度（各画素値の積算値）を算出する。この処理を、座標原点周りに蛍光画像データを予め設定した角度ずつ回転させて繰り返す。投影方向とスポットのy軸方向の配列方向がずれている場合の積算強度グラフは、図6（b）に示すように振幅のないグラフになる。一方、投影方向とスポットのy軸方向の配列方向が一致した場合の積算強度グラフは、図6（c）に示すとおり、信号の振幅が最大となる。投影データのこのような特徴を利用し、積算強度の標準偏差が最大値をとる角度を求めることで、スポットのy軸に対する配

列の角度を検出することができる。同様にx軸に対する配列の角度を求め、せん断変形等の画像処理を施すことでスポットの配列方向を直交させることが可能である。

[0045] 以上のようにして蛍光画像データを取得する場合、検体から抽出したサンプル中に含まれるDNAが非常に少ないと、Cy 5、Cy 3ともに、発光するスポット数が少なくなるためブロックの境界がわからず、また画像の直交度補正も出来ないため、アライメント処理が不可能となる。

[0046] そこで本発明においては、上記のような蛍光画像データの他に、チップを再セットすることなく以下のようなアライメント用画像データも取得する（上記ステップ（b））。すなわち、DNAチップ1に光を照射し、該チップの基板表面からの反射光及び／又は散乱光を受光することで、アライメント用画像データを取得する。これは、凹凸形状を有する基板表面からの反射光及び／又は散乱光を積極的に受光し、該光の受光強度に基づいて基板表面の凹凸形状を画像化し、該凹凸形状をアライメントに用いるためである。

[0047] DNAチップにおけるスポット位置は、該DNAチップを再セットするまで変化しない。そのため、アライメント用画像データにおけるスポット位置とCy 5およびCy 3の蛍光画像データにおけるスポット配置とは一致する。したがって、本発明においては、アライメント用画像データで得られるアライメント結果をCy 5およびCy 3の蛍光画像データへ適用することで、該蛍光画像データのアライメント処理が可能になる。

[0048] ここで、具体的に上記した構成の装置においてアライメント用画像データを取得するには、Cy 5用のレーザー光源501からレーザー光を照射するとともに、Cy 3用の励起光カットフィルタ507を使用することが好ましい。Cy 3用の励起光カットフィルタ507には一般的に550～600 nmのバンドパスフィルターを用いることが多いが、該励起光カットフィルタ507は、一般的に、Cy 5の励起光の波長の光（635 nm）をわずかに透過するので（例えば、635 nmの光のOD値が約5）、例えば図7（a）に示すとおり、DNAチップの凹凸形状を画像化することが可能である。すな

わち、特定波長の光によって励起発光した蛍光分子からの蛍光ではなく、基板表面からの反射光や散乱光を受光して、該基板そのものの凹凸形状を画像化することができる。なお、図7（a）のP-P'線分における画素値のプロファイルを図7（b）に、対応する場所のDNAチップの高さプロファイルを図7（c）に示す。このようにレーザー光を積極的に受光することで、結像レンズ509の焦点付近でかつレーザーの光軸に垂直なDNAチップの表面からの光の受光強度が強くなるため、図7（a）のような、基板表面の凹凸形状が表れたアライメント用画像データが得られる。

[0049] アライメント画像データ取得用の光源については、スキャナーの部品点数を少なくできることから、蛍光分子を励起するための励起光を出射する光源を用いることが好ましいが、別途、アライメント画像データ取得用光源を設けてもかまわない。

[0050] また、アライメント用画像データの取得時にフィルタを使わない方法も採用しうる。しかしながら、フィルタを用いない場合は、検出器に入る光量が大きくなりすぎるために検出器を傷める可能性がある。よって、上記したように、Cy5用のレーザー光源501からレーザー光を照射する場合には励起光カットフィルタ507を使用するなど、照射する光源の波長をわずかに透過するフィルタを用いることが好ましい。反対に、Cy3用のレーザー光源502からレーザー光を照射して励起光カットフィルタ508を用いてもよい。また、励起光カットフィルタ507、508の代わりにNDフィルタを用いたり、励起光カットフィルタ507、508やNDフィルタを使用せずに前記レーザー光の出力自体を弱くしてアライメント用画像データを得ても構わない。もちろん、これらの組み合わせも適用できる。

[0051] なお、アライメント用画像データには、DNAチップをスキャナーにセットする際に回転ずれや位置ずれが生じる虞がある。しかし、これらの回転ずれや位置ずれの量も、DNAチップを再セットするまで一定である。このため、アライメント用画像データにおけるスポット位置とCy5およびCy3の蛍光画像データにおけるスポット配置とは一致する。

[0052] 次に、このアライメント用画像データに基づいて蛍光画像データにおける各プローブの位置を決定し（上記ステップ（c））、マイクロアレイの解析を行う。以下に、この方法の詳細について、図8に示すブロック図を用いて説明する。ただし、図8におけるStep 1, 2は前記した工程に相当する工程である。

[0053] まず、Step 1では、スキャナーにDNAチップをセットし、前述の通り、蛍光色素Cy 5およびCy 3の蛍光画像データを読み込む（上記ステップ（a））。続いて、Step 2では、DNAチップをセットしたまま、Cy 5用のレーザー光源501から励起光を照射するとともに、Cy 3用の励起光カットフィルタ507を使用し、アライメント用画像を読み込む（上記ステップ（b））。なお、本工程においては、Cy 3用のレーザー光源502から励起光を照射するとともにCy 5用の励起光カットフィルタ508を使用してもよい。また別の光源を用意して、その光のDNAチップからの反射光及び／又は散乱光を受光して、アライメント用画像を取得してもよい。

[0054] そして、Step 3以降で、アライメント用画像データを使用して蛍光画像データにおける各プローブの位置を決定し（上記ステップ（c））、解析する。

[0055] 具体的には、まずStep 3で、アライメント用画像データにおける少なくとも3つの基準点Aを検出する（ステップ（c1））。ここで、少なくとも3つの基準点Aとしては、例えば図9に示す通り、アライメント用画像での4隅の座標を挙げることができる。かかる四隅の座標の検出方法は、明暗情報を用いたエッジ検出や、同様に明暗情報を用いる、四隅の画像をマスク画像としたパターンマッチング等が望ましい。

[0056] 続いて、Step 4、5において、前記基準点Aに基づいて蛍光画像データの歪みを補正する（ステップ（c2））。

[0057] 具体的には、Step 4において、例えば前述の四隅の座標から、スポットのx軸に対する配列角度（最も近くに隣接するスポットを直線的に結んだ

線の x 軸に対する傾斜角度) θ_x 、スポットの y 軸に対する配列角度 (最も近くに隣接するスポットを直線的に結んだ線の y 軸に対する傾斜角度) θ_y を検出する。 θ_x 、 θ_y は、四隅の座標を結んだ 4 本の線分について、該当方向の 2 本の線分の角度の平均値を取ることが望ましい。なお、基準点が 3 点であっても、 θ_x 、 θ_y を算出可能である。そして、図 10 (a)、(b) に示すとおり、スポットの y 軸に対する配列角度 θ_y を補正角度として用い、蛍光画像データを回転させて、スポットを y 軸に対して平行にする。

[0058] さらに、Step 5 において、回転後の画像に対して、上述のように検出した二方向に規則的に配列されているスポットの配列角度 θ_x 、 θ_y および下記式に基づいて、変換 (せん断変形) を実施する。これにより、画像のせん断変形歪みを補正する。この変換後の画像を図 10 (c) に示す。なお、下記式の (x、y) は変換前の座標、(X、Y) は変換後の座標である。また、スキャナーの走査機構のずれ (走査機構の基準軸の直交度) に相当する θ_{xy} は、数 4 に示すように、スポットの x 軸に対する配列角度 θ_x から y 軸に対する配列角度 θ_y を減じて求める。

[0059] [数 3]

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\tan \theta_{xy} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$$

[0060] [数 4]

$$\theta_{xy} = \theta_x - \theta_y$$

[0061] さらに、DNA チップ 1 が樹脂成型品である場合、ハイブリダイゼーション工程や洗浄工程での吸湿や温度変化により樹脂が膨張する場合がある。各工程での処理時間にもよるが、数十 μm 膨張する場合があり、アライメントの精度に影響を与える。

[0062] このため、Step 6、7 において、例えば前記四隅の座標から x 軸方向および y 軸方向のチップ長さを算出するとともに、設計値と一致するように、蛍光画像データを収縮させる。

[0063] 続いて、上記のようにして、回転補正、せん断変形補正、収縮補正をした蛍光画像データに対して、アライメントを行なう。予め解析定義ファイルに保存しているテンプレートにおける各スポットの位置情報は、例えばチップ左上の隅を原点とした、各スポットの中心座標となっている。このため、Step 7で収縮補正した後の画像について、例えば左上隅の座標を原点とし、各スポット枠を計算することで、図11(b)、(c)に示すとおりアライメントが可能である(Step 8)。なお、図11(b)がCy3の蛍光画像データに対してアライメントを行った結果を示す画像、図11(c)がCy5の蛍光画像データに対してアライメントを行った結果を示す画像である。また、確認のため、Step 2で得られたアライメント用画像データに対してアライメントを行った結果を図11(a)に示す。各図において点線で描画した円の内部が、テンプレートで規定された検出エリアである。

[0064] その後、Step 9においては、Step 8で求めた各スポットの中心座標から、スポット半径内の画素の信号強度について、平均値、メディアン値、標準偏差等の統計量を算出し、スポットの属するブロック番号、スポットの行列番号、配置されているプローブDNA名と合わせて、各種数値データをファイルとして出力する。

[0065] なお、上記のような図8に示す工程において、上記Step 1、2の順序は入れ替わってもよい。

[0066] また、ハイブリダイゼーションの際の検体流動性を良くするためなどの理由から、DNAチップの四隅は角が丸く成形されている場合がある。このため、Step 3での基準点Aの検出に際しては、DNAチップの輪郭線上の点の座標に基づいて基準点Aを検出することが望ましい。

[0067] すなわち、図12に示すように、DNAチップの四隅それぞれの近傍に、実質的にx軸方向に続く輪郭線を含むような輪郭点検出用ウィンドウ(観察領域)Wyと、実質的にy軸方向に続く輪郭線を含むような輪郭点検出用ウィンドウWxを設定する。そして、該輪郭点検出用ウィンドウWx、Wyそれぞれにおいて、DNAチップの輪郭線上の一点に相当する輪郭基準点aを

検出し、ウインドウ W_y における輪郭基準点 a の y 座標と、ウインドウ W_x における輪郭基準点 a の x 座標とから、DNAチップの角に相当する基準点 A の座標を算出する。これをたとえば四隅について行う。

[0068] さらに、四隅のそれぞれに対して輪郭点検出用ウインドウ W_x 、 W_y がそれぞれ1つずつしか設定されていない場合、DNAチップがスキャナーの固定治具に斜めに固定されたりすると、図13(a)、及び図13(a)の二点鎖線で囲まれた部分を拡大した図13(b)に示すように、検出すべき基準点 A の位置と実際に検出された基準点 A との位置に誤差が生じ、スポットをうまくアライメントできない。

[0069] そのため、本発明においては、輪郭点検出用ウインドウ W_x 、 W_y をそれぞれ少なくとも4つずつ、すなわち合計8つ以上設定することが好ましい。具体的には、図13(c)に示すとおり、四隅それぞれに対して、少なくとも2つの輪郭点検出用ウインドウ W_x (1301, 1302)、ならびに少なくとも2つの輪郭点検出用ウインドウ W_y (1303, 1304)を設定することが好ましい(ステップ(c11))。

[0070] そして、四隅それぞれに対して、それら少なくとも2つの輪郭点検出用ウインドウ W_x (1301, 1302)を組とし、該組における複数の輪郭基準点 a に対する近似直線を求めるとともに、少なくとも2つの輪郭点検出用ウインドウ W_y (1303, 1304)を組として、該組における複数の輪郭基準点 a に対する近似直線を求める(ステップ(c12))。このようにして得られた2本の近似直線の交点を求め、該交点を基準点 A とする(ステップ(c13))。

[0071] このようにすることで、チップが斜めに固定された場合でも精度良く基準点 A を検出することが可能となる。

[0072] なお、本発明においては、必ずしも四隅で基準点 A を求める必要がなく、三隅で基準点 A を算出するのでもよい。

[0073] さらに、上記のように基準点 A を検出する場合、検出部にキズやゴミ等があると測定誤差が生じる。そのため、基板の四隅の角に相当する4つの基準

点Aを検出しても、それら4つの基準点Aを結んで形成される形状が平行四辺形（長方形・正方形を含む）でない、台形などの四角形になる場合がある。しかしながら、後の処理Step 5におけるせん断変形歪みの補正は、検出した基準点で形成される形が平行四辺形であることが前提であり、そのため、上記のような場合にはスポットをうまくアライメントできないおそれがある。

[0074] そこで本発明においては、図14に示すように、一旦検出した4つの基準点A600～603で形成される四角形が平行四辺形（長方形および正方向を含む）でない場合には、平行四辺形に近似し、近似した平行四辺形の頂点を改めて基準点A700～703として設定しなおすことが好ましい。

[0075] 最初に検出した4つの基準点A600～603で形成される四角形を平行四辺形に近似するにあたっては、たとえば、対辺となる2つの線分1401と1402の傾きの平均と線分1401と1402それぞれの中点を求め、これら中点を通りかつ前記平均傾きを有する2本の直線を求める。これを別の2つの線分についても同様に行い、得られた4本の直線の交点を平行四辺形近似後の基準点A700～703として改めて設定する。これにより、一旦検出された基準点に測定誤差がある場合でも、精度よくアライメントを行うことができる。

[0076] 本発明においては、このようにして遺伝子の発現に基づいて得られた蛍光画像データを処理して所望の数値データを取得するが、得られる各種の数値データは、検体内で、求める遺伝子の存在や、ある遺伝子が発現しているか否か、またはどの程度発現しているかを解析するため等に用いられる。

[0077] また、以上のようなDNAチップの解析においては、DNAチップの凹凸を利用して画像の補正、アライメントを行う。そのため、検体から抽出したサンプル中に含まれるDNA量が少なく発光するスポットが少ない画像、さらに、走査機構の精度が悪い読取り装置によって得られた画像に対しても、DNAチップの基板上に配置された検出エリアの位置決め処理を高精度に実行可能となる。

[0078] 上記実施形態においては、マイクロアレイにDNAがスポットされたDNAチップの実施形態を説明したが、本発明は、RNA、タンパク質、微小標本、低分子化合物、細胞等をスポットしたチップに対しても適用可能である。

[0079] 例えば、上記で説明した凹凸形状を有するDNAチップの基板にDNAの代わりにタンパク質（抗体）を固定化し、検体との反応の有無や定量化を蛍光にて検出する場合でも、同様な方法を用いることができる。試料細胞の溶解液に存在するタンパクをCy5、コントロール細胞溶解液に存在するタンパクをCy3で標識して、両者を混合して抗体アレイと反応する場合や、タンパクを蛍光標識する代わりにビオチン標識し、抗体アレイに結合後、酵素標識アビジンを用いてシグナルを増感する手法などがある。このような場合でも、本発明により、精度よくアライメントが可能となり、蛍光強度の各種数値データをファイルとして出力可能である。RNAアレイの場合でも、凹凸形状を有する基板上に固定化されたRNAと蛍光標識したDNAやRNAとのハイブリダイゼーションを蛍光で検出する場合に本手法を用いることができる。微小標本・細胞アレイにおいても、凹凸形状を有する基板上に固定化された微小標本や細胞と蛍光標識検体（例えば抗体）との結合反応を蛍光により検出する際に、本発明を適応することが可能である。

符号の説明

- [0080]
- 1 DNAチップ
 - 2 基板
 - 3 スポット
 - 4 スキャナー
 - 5 スキャナー制御用PC
 - 6 画像サーバー
 - 7 解析用PC
 - 8 DNAチップ画像ファイル
 - 9 解析定義ファイル

- 1 0 数値化データファイル
- 5 0 1 レーザー光源 (C y 5 用)
- 5 0 2 レーザー光源 (C y 3 用)
- 5 0 3 穴あきミラー
- 5 0 4 対物レンズ
- 5 0 5 蛍光分子からの蛍光
- 5 0 6 基板表面で反射および／または散乱したレーザー光
- 5 0 7 励起光カットフィルタ (C y 3 用)
- 5 0 8 励起光カットフィルタ (C y 5 用)
- 5 0 9 結像レンズ
- 5 1 0 ピンホール
- 5 1 1 検出器
- 5 1 2 ミラー
- 5 1 3 ミラー
- 6 0 0 ~ 6 0 3 一旦検出された基準点 A
- 7 0 0 ~ 7 0 3 平行四辺形に近似後の基準点 A
- 1 1 0 1 アライメント画像の基準点
- 1 1 0 2 計算されたスポット枠
- 1 3 0 1、1 3 0 2 輪郭点検出用ウインドウ W_x
- 1 3 0 3、1 3 0 4 輪郭点検出用ウインドウ W_y
- 1 4 0 1 ~ 1 4 0 2 線分

請求の範囲

- [請求項1] 凹凸形状を有する基板表面にプローブが配置されたマイクロアレイに励起光を照射し、励起光で励起された各プローブからの蛍光量を数値データとして得るマイクロアレイの解析方法であって、プローブの蛍光量を測定して蛍光画像データを取得するステップ（a）と、基板表面からの反射光及び／又は散乱光を受光して、該光の受光強度からマイクロアレイの基板表面の凹凸形状をアライメント用画像データとして取得するステップ（b）と、前記アライメント用画像データに基づいて前記蛍光画像データにおける各プローブの位置を決定するステップ（c）と、を含む、マイクロアレイの解析方法。
- [請求項2] 前記基板表面からの反射光及び／又は散乱光は、前記励起光を照射する光源からの光が前記マイクロアレイで反射及び／又は散乱した光である、請求項1に記載のマイクロアレイの解析方法。
- [請求項3] 前記ステップ（c）は、前記アライメント用画像データにおいて、受光強度の差に基づいて前記マイクロアレイの3つ以上の基準点Aを検出するステップ（c1）と、検出した基準点Aを基に前記蛍光画像データの歪みを補正するステップ（c2）とを含んでいる、請求項1または2に記載のマイクロアレイの解析方法。
- [請求項4] 前記ステップ（c1）は、少なくとも8つの所定の観察領域それぞれにおいて前記基板の輪郭線上の点である輪郭基準点aを算出するステップ（c11）と、重複しない所定の少なくとも2つの観察領域を組とし、各組において複数の輪郭基準点aに対する近似直線を求めるステップ（c12）と、各組で求めた近似直線の交点を算出して該交点を前記基準点Aとするステップ（c13）とを含んでいる、請求項3に記載のマイクロアレイの解析方法。
- [請求項5] 前記ステップ（c2）が、前記基準点Aからプローブを配置しているスポットの配列角度 θ_x 、 θ_y を得て、該スポットの配列角度 θ_x 、 θ_y および下記式から、前記蛍光画像データの剪断変形歪みを補正

するものである、請求項3または4に記載のマイクロアレイの解析方法。

[数1]

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\tan \theta_{xy} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$$

[数2]

$$\theta_{xy} = \theta_x - \theta_y$$

[請求項6] 前記ステップ(c1)は、4つの基準点Aを検出し、その4つの基準点Aを直線で結んで形成される四角形が平行四辺形でない場合には、さらに該四角形を平行四辺形に近似し、該平行四辺形の頂点を基準点Aとして設定しなおす、請求項3～5のいずれかに記載のマイクロアレイの解析方法。

[請求項7] 前記マイクロアレイがDNAマイクロアレイである、請求項1～6のいずれかに記載のマイクロアレイの解析方法。

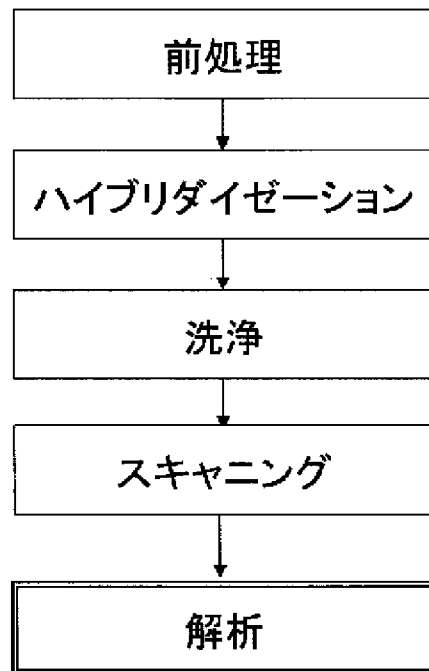
[請求項8] 凹凸形状を有する基板表面にプローブが配置されたマイクロアレイに励起光を照射するレーザー光源と、前記基板表面で反射した励起光と前記プローブからの蛍光の光束を平行光にする対物レンズと、前記基板表面で反射した励起光をカットするとともに前記プローブからの蛍光を透過する光学フィルタと、前記光学フィルタを透過した蛍光を受光して蛍光画像データを取得する結像レンズおよび検出器と、を備えたマイクロアレイの読取り装置であって、前記結像レンズおよび検出器は、前記基板表面で反射及び／または散乱した光を受光して、マイクロアレイの基板表面の凹凸形状が表れたアライメント用画像データを取得可能であり、更に、前記アライメント用画像に基づいて前記蛍光画像データにおける各プローブの位置を検出する演算処理装置を備えているマイクロアレイの読取り装置。

[請求項9] 前記結像レンズと前記検出器の間に、被写体深度を制限するピンボ

ールを有する、請求項 8 に記載のマイクロアレイの読取り装置。

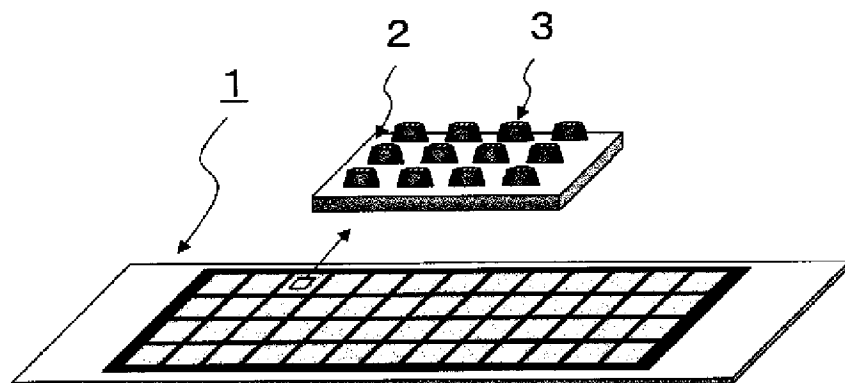
[図1]

【図1】



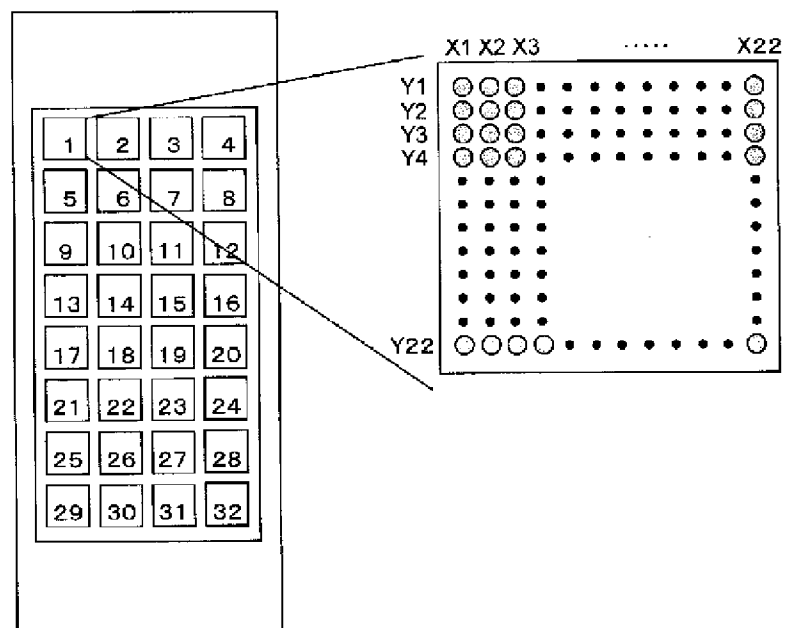
[図2]

【図2】



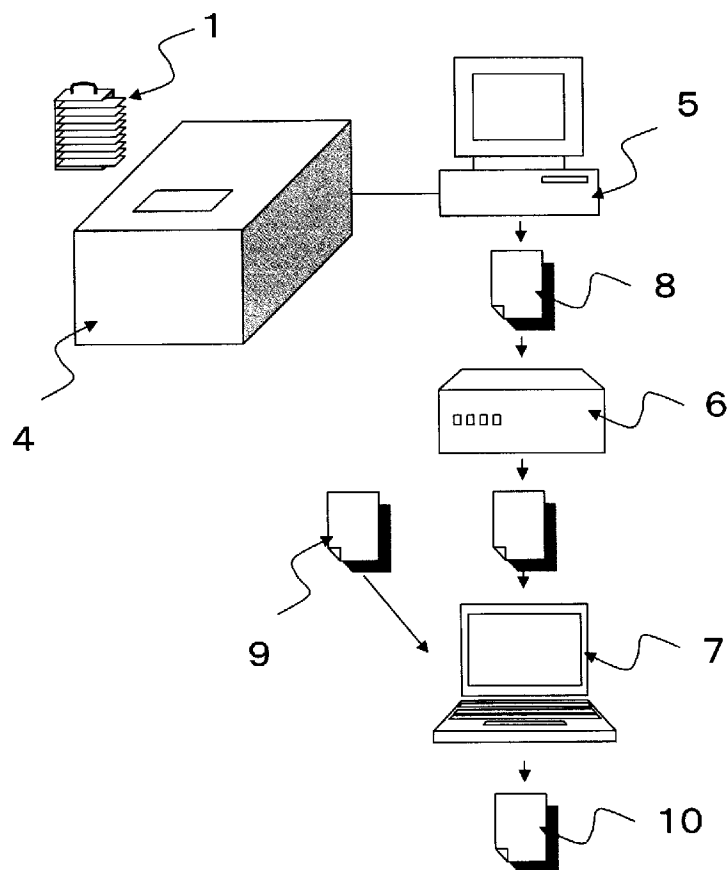
[図3]

【図3】



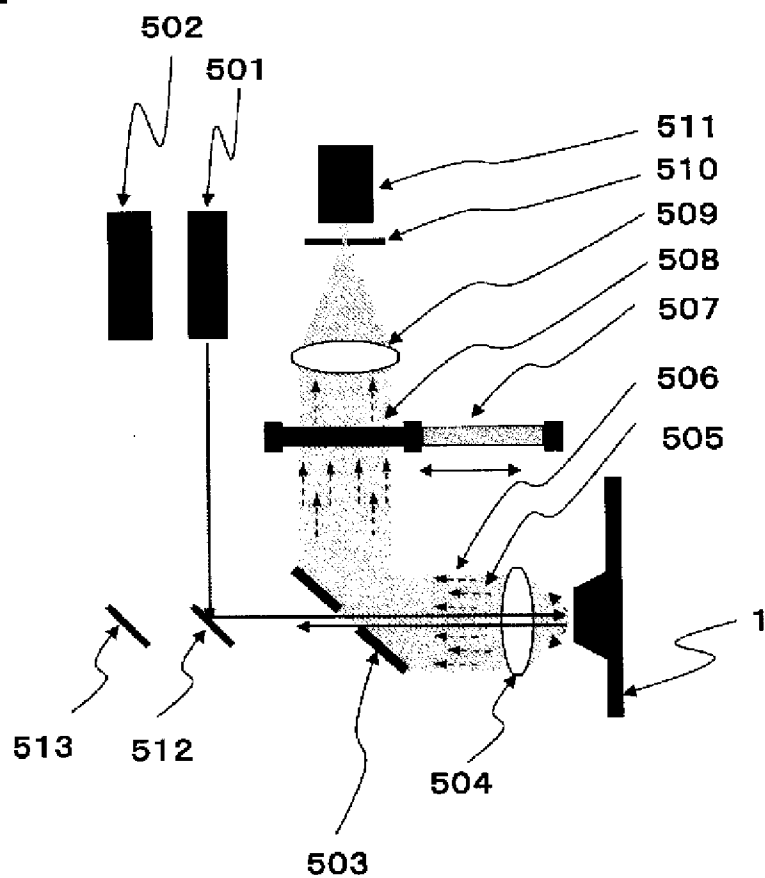
[図4]

【図4】



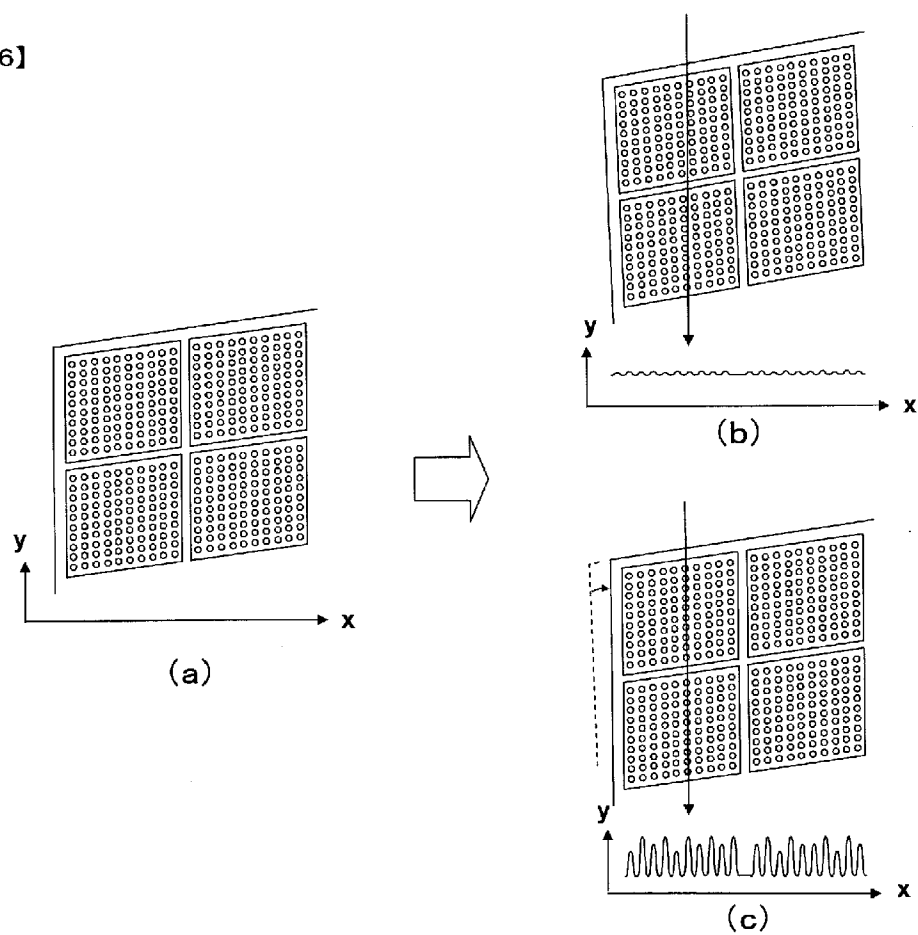
[図5]

【図5】

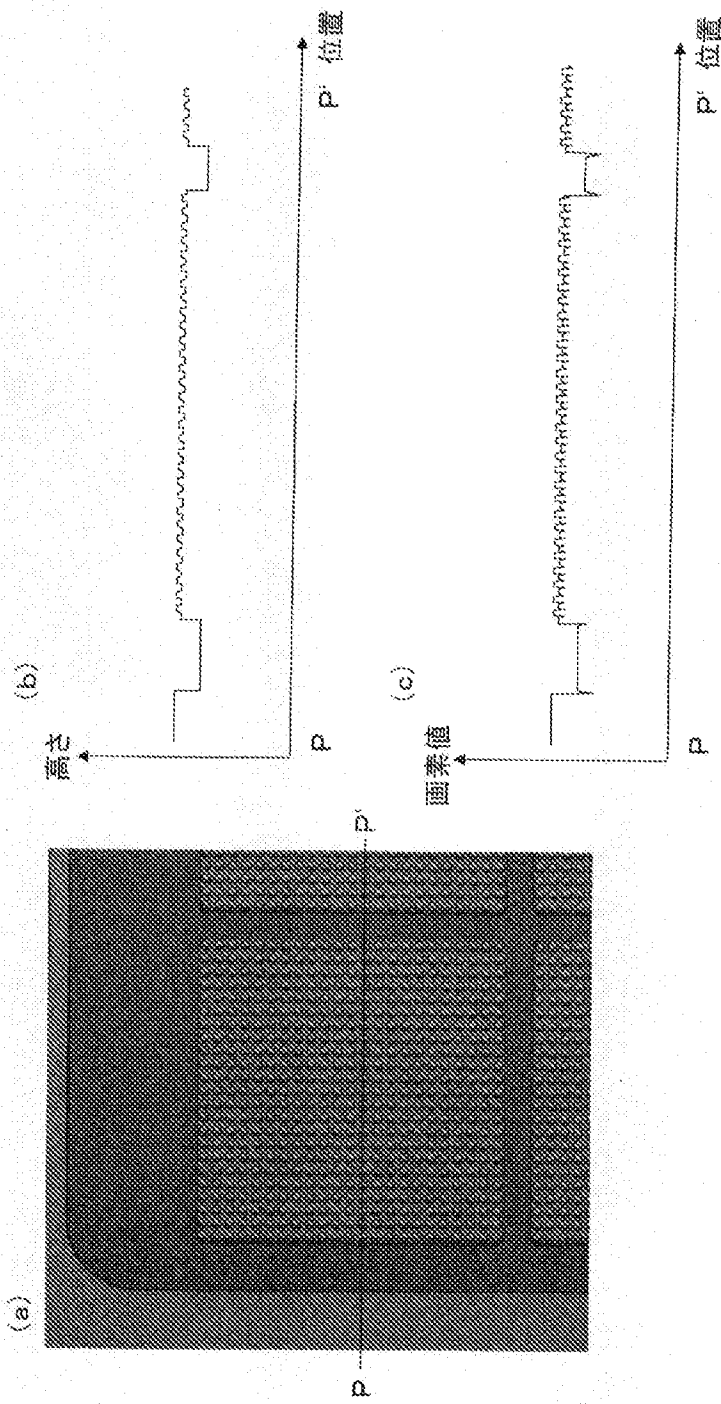


[図6]

【図6】

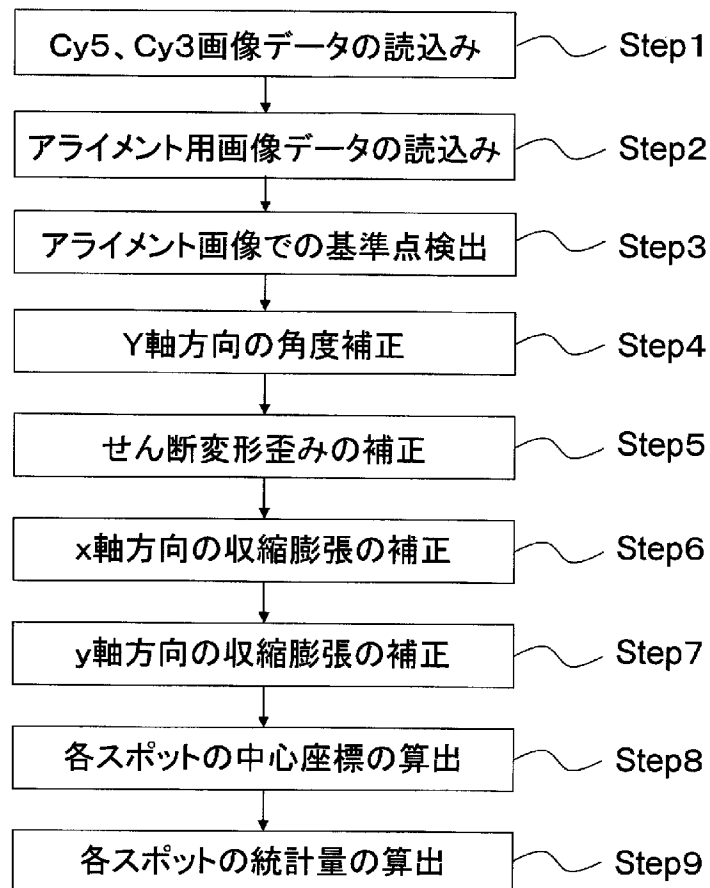


【図7】



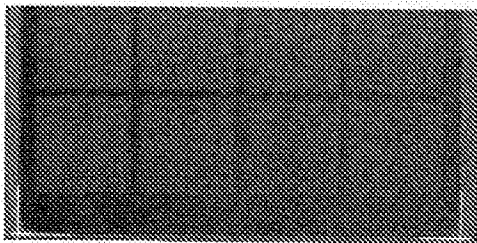
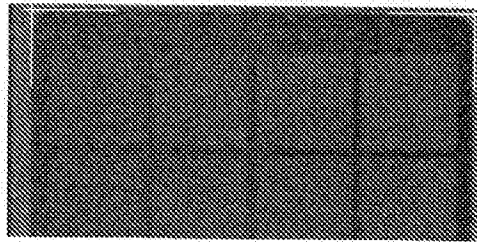
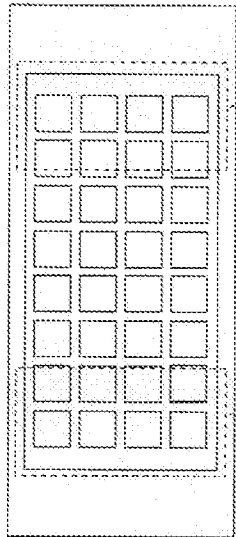
[図8]

【図8】

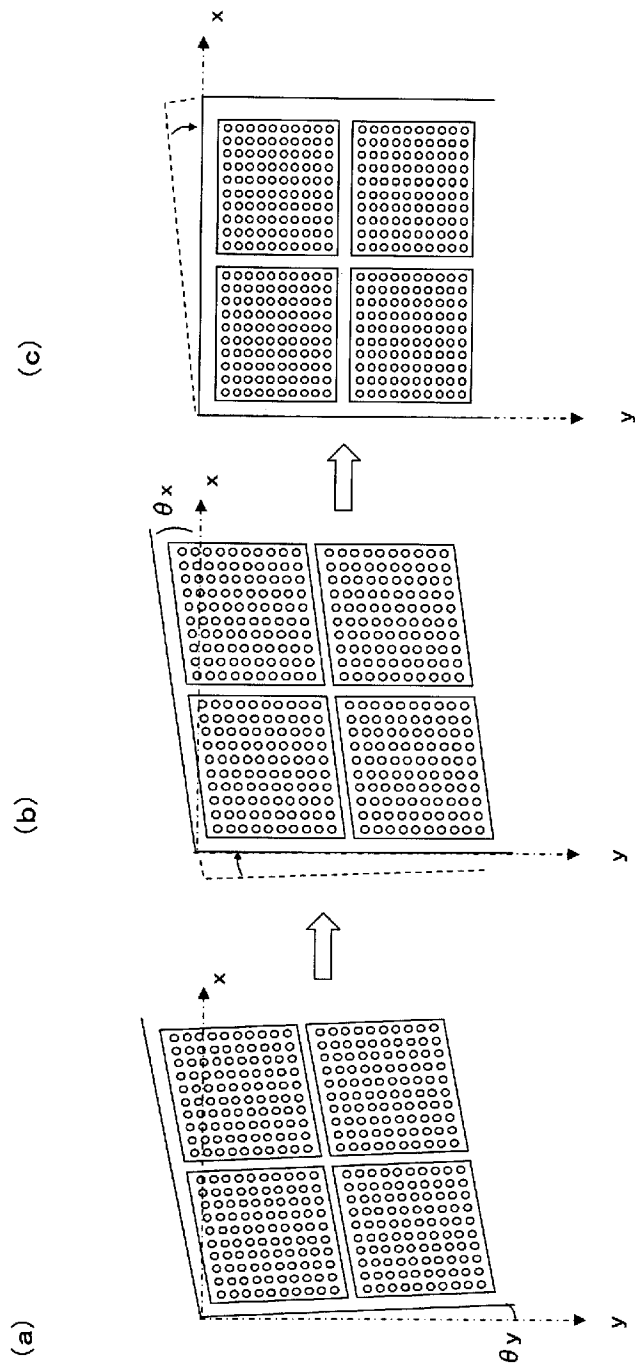


[図9]

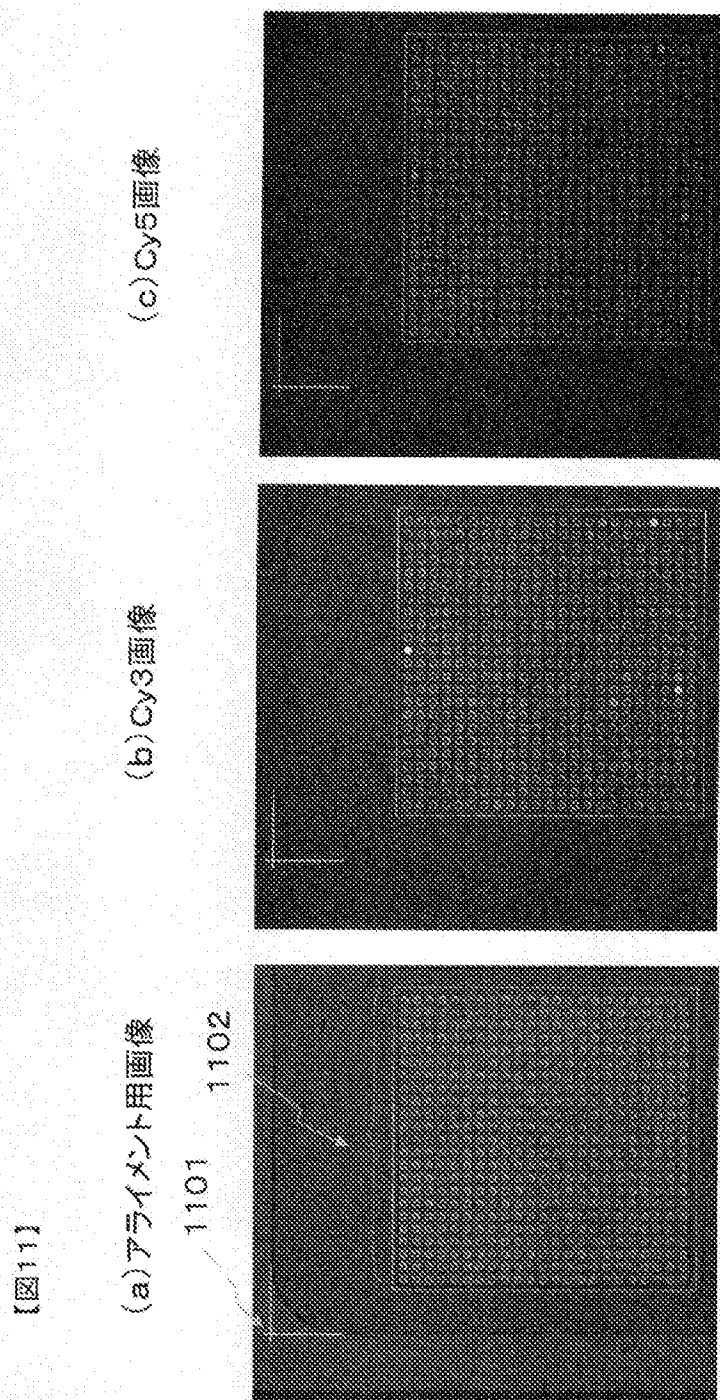
【図9】



[図10]

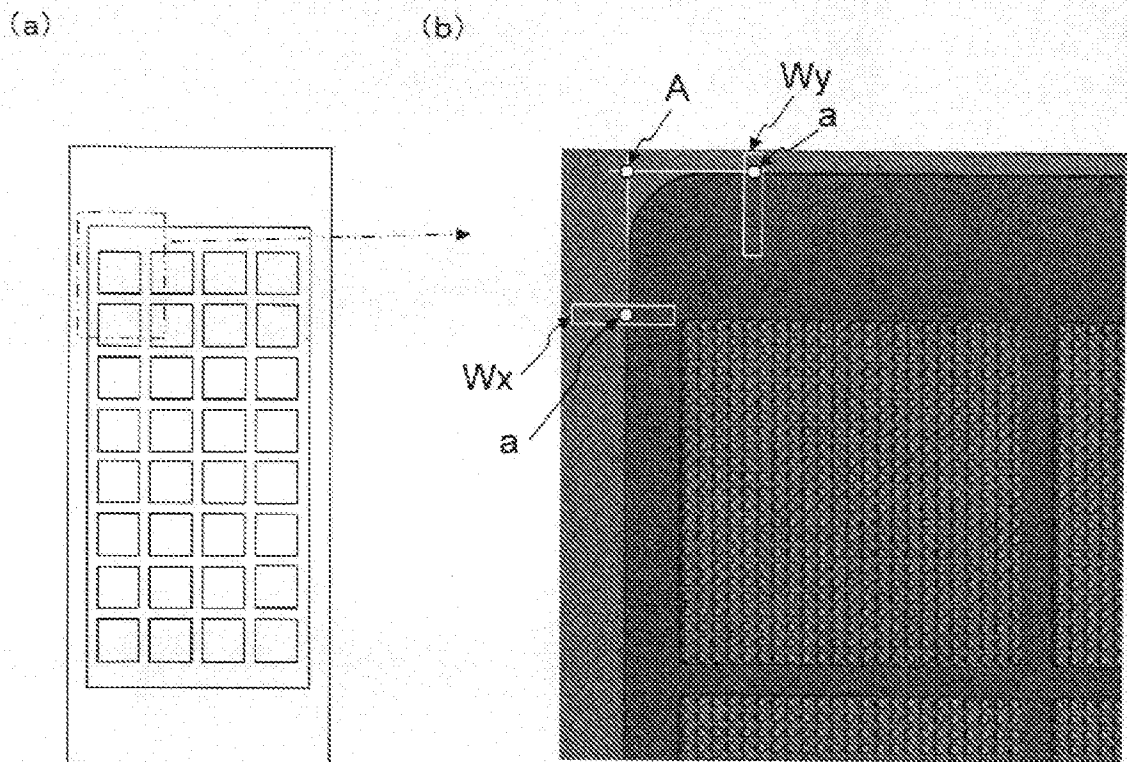


【図11】

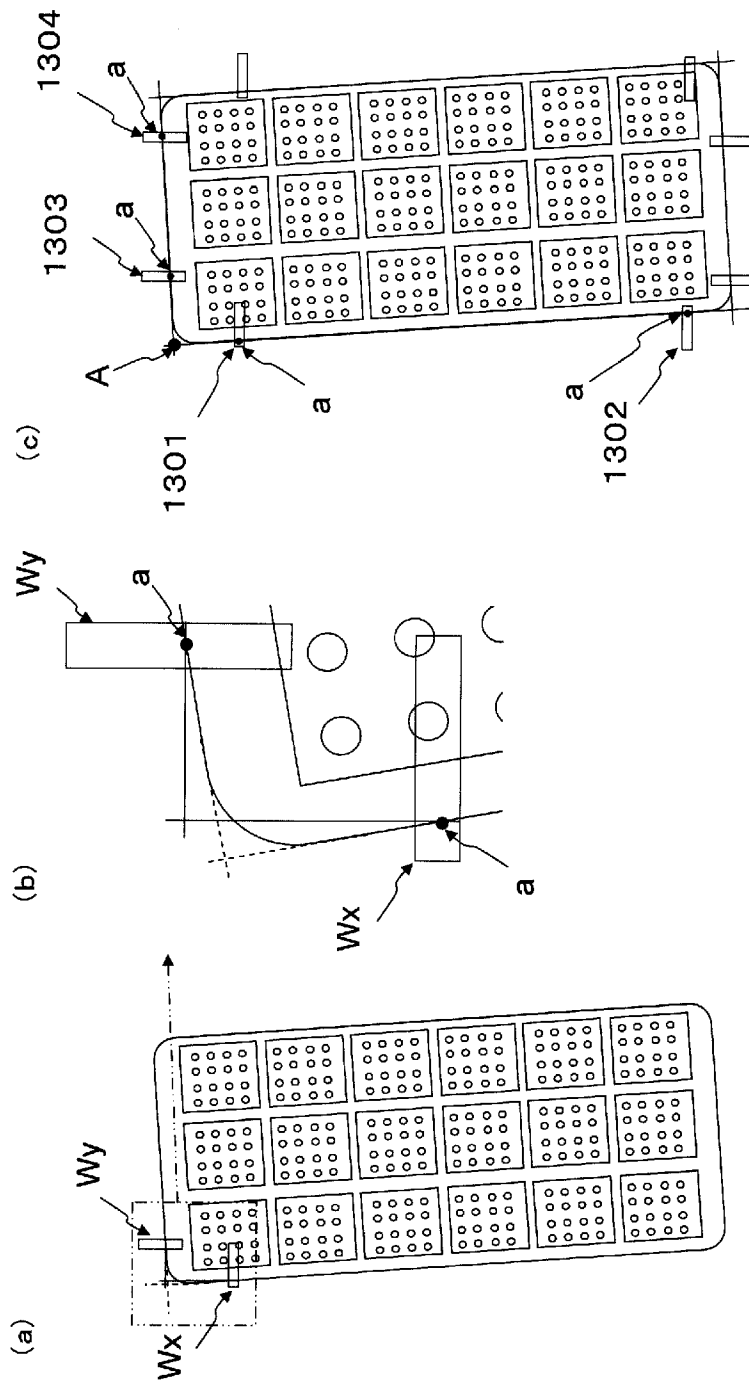


[図12]

【図12】

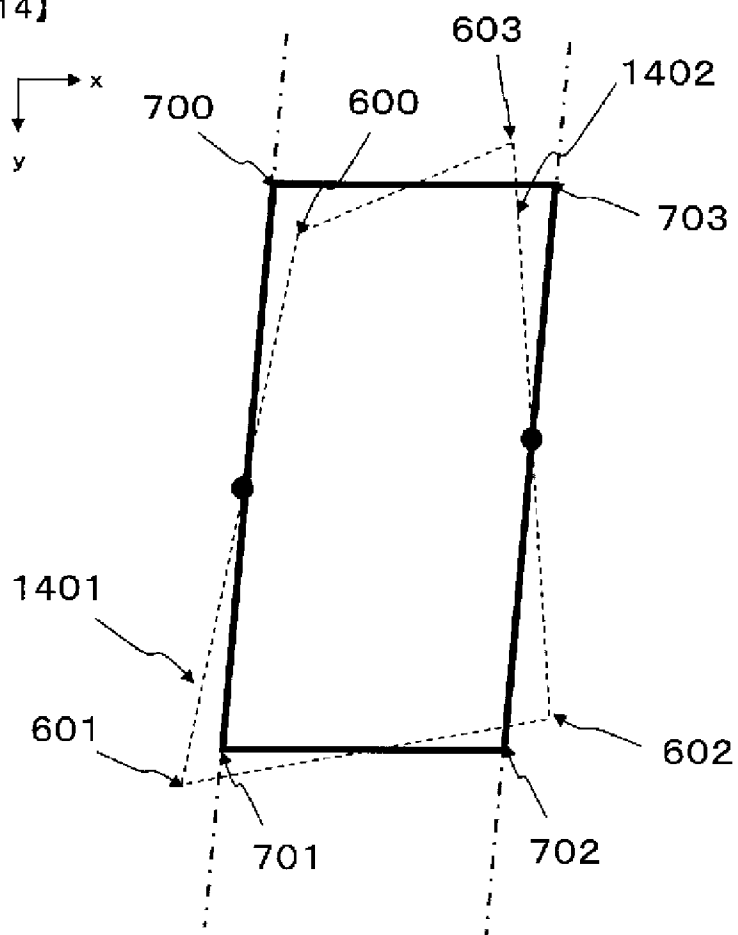


【図13】



[図14]

【図14】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/080007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(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)

G01N21/17-21/74, G01N33/52-33/543, G01N35/00-37/00

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2005-24532 A (Riken, Japan), 27 January 2005 (27.01.2005), paragraphs [0006], [0057], [0071] to [0073]; fig. 1, 7 to 11 & US 2007/0037155 A1 & EP 1643248 A1 & WO 2004/111644 A1	1, 2, 7 8, 9 3-6
Y	JP 2005-49282 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 24 February 2005 (24.02.2005), paragraph [0050]; fig. 1 (Family: none)	8, 9

☒ 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
31 January, 2012 (31.01.12)Date of mailing of the international search report
07 February, 2012 (07.02.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/080007

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-307518 A (NGK Insulators, Ltd.), 31 October 2003 (31.10.2003), entire text; all drawings & JP 2005-172840 A & US 2003/0152255 A1 & US 2003/0152256 A1 & EP 1336662 A2	3-6
A	JP 2010-526314 A (Beamind, Commissariat a l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives), 29 July 2010 (29.07.2010), entire text; all drawings & EP 2153207 A & WO 2008/135821 A1 & FR 2916051 A	3-6
A	WO 2010/147167 A1 (Toyo Kohan Co., Ltd.), 23 December 2010 (23.12.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-9
A	JP 2003-156442 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 30 May 2003 (30.05.2003), entire text; all drawings & US 2006/0035220 A1 & EP 1457782 A1 & WO 2003/044527 A1	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/17-21/74, G01N33/52-33/543, G01N35/00-37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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(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 請求項の番号
X Y A	JP 2005-24532 A (独立行政法人理化学研究所) 2005.01.27, 段落 【0006】, 【0057】, 【0071】 - 【0073】, 第1図, 第7-11図 & US 2007/0037155 A1 & EP 1643248 A1 & WO 2004/111644 A1	1, 2, 7 8, 9 3-6
Y	JP 2005-49282 A (浜松ホトニクス株式会社) 2005.02.24, 段落 【0050】, 第1図 (ファミリーなし)	8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 1 . 0 1 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 2 . 2 0 1 2

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)

上田 泰

2 W

3 6 0 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 9 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2003-307518 A (日本碍子株式会社) 2003. 10. 31, 全文、全図 & JP 2005-172840 A & US 2003/0152255 A1 & US 2003/0152256 A1 & EP 1336662 A2	3-6
A	JP 2010-526314 A (ベアマン, コミッサリア ア レネルジー ア トミック エ オ ゼネルジ ザルタナテイヴ) 2010. 07. 29, 全文, 全図 & EP 2153207 A & WO 2008/135821 A1 & FR 2916051 A	3-6
A	WO 2010/147167 A1 (東洋鋼板株式会社) 2010. 12. 23, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2003-156442 A (理化学研究所) 2003. 05. 30, 全文, 全図 & US 2006/0035220 A1 & EP 1457782 A1 & WO 2003/044527 A1	1-9