

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5530081号  
(P5530081)

(45) 発行日 平成26年6月25日(2014.6.25)

(24) 登録日 平成26年4月25日(2014.4.25)

(51) Int.Cl.		F 1
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/42</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>C 1 2 M</b>	<b>3/08</b>	<b>(2006.01)</b>
		C 1 2 M 1/42
		C 1 2 M 3/08

請求項の数 9 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2008-184738 (P2008-184738)	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成20年7月16日 (2008.7.16)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開2010-22226 (P2010-22226A)		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
(43) 公開日	平成22年2月4日 (2010.2.4)	(74) 代理人	100108855
審査請求日	平成23年5月27日 (2011.5.27)		弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100109830
			弁理士 福原 淑弘
		(74) 代理人	100075672
			弁理士 峰 隆司
		(74) 代理人	100095441
			弁理士 白根 俊郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超音波ダイセクション装置および超音波ダイセクション方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

平坦な担体上に広がった複数の生物学的対象を含む溶液に対して、収束超音波により音響流を発生させ、これにより目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離すための超音波ダイセクション装置であって、

超音波発生手段と、

超音波発生手段により発生させた超音波を目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界線を含む領域に収束させるための超音波収束手段と、

超音波収束手段により収束された超音波が目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流を発生するように超音波発生手段を制御するためのコントローラとを備え、

前記超音波は、10 μs よりも長く、数百ms 以下の時間照射され、

前記境界線を含む領域は、20 μm 以下の収束スポット径を有する

ことを特徴とする超音波ダイセクション装置。

【請求項 2】

生物学的対象を照明するための照明手段を更に備えた、請求項 1 に記載の超音波ダイセクション装置。

【請求項 3】

前記照明手段が、生物学的対象を直接照明するように配置されていることを特徴とする、請求項 2 に記載の超音波ダイセクション装置。

10

20

## 【請求項 4】

前記照明手段が、超音波収束手段を照明し、その散乱光により生物学的対象を照明するように配置されていることを特徴とする、請求項 2 に記載の超音波ダイセクション装置。

## 【請求項 5】

生物学的対象を観察するための観察手段を更に備えた、請求項 1 または 2 に記載の超音波ダイセクション装置。

## 【請求項 6】

前記観察手段が、生物学的試料を間に挟んで、超音波収束手段と向かい合うように配置されていることを特徴とする、請求項 5 に記載の超音波ダイセクション装置。

## 【請求項 7】

生物学的対象を観察するための観察手段を所定の位置に配置するための手段を更に備えた、請求項 1 または 2 に記載の超音波ダイセクション装置。

## 【請求項 8】

平坦な担体上に広がった複数の生物学的対象を含む溶液に対して、収束超音波により音響流を発生させ、これにより目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離すための超音波ダイセクション方法であって、

目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界線を含む領域に超音波を収束させる工程と、

収束超音波により、生物学的対象を含む溶液中に目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流を発生させ、目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離す工程を含み、

前記超音波は、 $10\ \mu\text{s}$  よりも長く、数百 ms 以下の時間照射され、  
前記境界線を含む領域は、 $20\ \mu\text{m}$  以下の収束スポット径を有する  
ことを特徴とする超音波ダイセクション方法。

## 【請求項 9】

複数の生物学的対象から目的の生物学的対象を切り離した後、それ以外の生物学的対象を担体上から排除し、目的の生物学的対象のみを担体上に残す工程を更に含む、請求項 8 に記載の超音波ダイセクション方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、平坦な担体上に配置された複数の生物学的対象を含む溶液に対して、収束超音波により音響流を発生させ、これにより複数の生物学的対象から目的の生物学的対象を切り離すための超音波ダイセクション装置および超音波ダイセクション方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

単一又は少数の細胞、あるいは微小な生体組織を採取して、その中の遺伝子を解析する研究が近年盛んになっている。例えば、癌組織中の細胞をマイクロダイセクションにより採取し、癌細胞のみの遺伝子発現を解析したり、隣り合う神経細胞の個々における遺伝子発現レベルを解析したりする研究がなされている。とりわけ、癌細胞、神経細胞、胚細胞、幹細胞などにおいて、単一細胞レベルで解析を行うことが重要となっており、単一細胞や微小な生体組織等の生体試料を採取する技術は、その後の解析の精度を左右する重要な技術である。

## 【0003】

細胞群のなかから必要な細胞を切り出すダイセクション技術として、これまでに、UVレーザーによるカッティング(特許文献 1 および 2)、IRレーザーによる熱で、細胞に接触させた接着剤の面に接着する方法(特許文献 3)、振動を与えた細い棒で細胞を切る方法(特許文献 4)等が知られている。しかし、UVレーザーによる方法は生細胞に対する光毒性の問題があり、IRレーザーによる方法は発熱の問題があり、生細胞に適用するのは難しい。また、振動を与えた細い棒を用いる方法は生細胞に適用可能であるが必要な細胞を正

10

20

30

40

50

確に取り出す精度に欠けている。また、この方法は、マニピュレータでの操作のため、高度な手技が必要である。

【 0 0 0 4 】

また、収束超音波により水中に音響流を発生させることができることは知られているが（非特許文献 1）、これが細胞ダイセクションに利用可能であることは知られていない。

【特許文献 1】特開 2 0 0 2 - 1 5 6 3 1 6 号公報

【特許文献 2】米国特許第 5 9 9 8 1 2 9 号明細書

【特許文献 3】特許第 3 7 8 6 7 1 1 号公報

【特許文献 4】特開 2 0 0 4 - 3 0 5 4 4 1 号公報

【非特許文献 1】社団法人電子情報通信学会 信学技報 UE93-93, EA93-93 (1994-01)

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

細胞等の生物学的試料に対して侵襲性の低いダイセクション装置およびダイセクション方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者は、収束超音波により液体中に発生させた音響流が、細胞のダイセクションを引き起こすことができることを発見し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 0 7 】

20

すなわち、本発明は、一つの側面によれば、

平坦な担体上に広がった複数の生物学的対象を含む溶液に対して、収束超音波により音響流を発生させ、これにより目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離すための超音波ダイセクション装置であって、

超音波発生手段と、

超音波発生手段により発生させた超音波を目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部に収束させるための超音波収束手段と、

超音波収束手段により収束された超音波が目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流を発生するように超音波発生手段を制御するためのコントローラと

30

を備えた超音波ダイセクション装置である。

【 0 0 0 8 】

別の側面によれば、本発明は、

平坦な担体上に広がった複数の生物学的対象を含む溶液に対して、収束超音波により音響流を発生させ、これにより目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離すための超音波ダイセクション方法であって、

目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部に超音波を収束させる工程と

、  
収束超音波により細胞培養液中に目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流を発生させ、目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離す工程

40

を含む方法である。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明により、細胞に対して侵襲性の低い新規ダイセクション装置および方法が提供される。本発明の装置は、高度な手技を必要とすることなく、正確に細胞の切り出しが可能であり、一細胞レベルで目的の細胞のダイセクションを行うことが可能であるという点で優れている。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 0 】

50

本発明において、「ダイセクション」とは、平坦な担体上に広がった複数の生物学的対象から目的の生物学的対象を切り離すことを意味し、ここで切り離される生物学的対象は、一つであってもよいし、複数であってもよい。本発明において「生物学的対象」は、平坦な担体上に広がった任意の生物学的試料であり、たとえば、平坦な担体上に単層に広がった任意の細胞であり、これは、細胞を平坦な担体上で平面上に増殖させることにより得ることができる。あるいは、「生物学的対象」は、生体組織より切除され、平坦な担体上に置かれた組織切片であってもよい。「担体」は、生物学的対象を含む溶液を保持する平坦な担体であり、たとえば、生物学的対象を含む溶液を保持する平板状の基板（たとえばAmpliGrid（Advalytix社製））であってもよいし、底面が平坦であって、かつ可視光を透過させる透明な面からなる任意の容器、たとえばシャーレ等であってもよい。

10

## 【0011】

## 1. 超音波ダイセクション装置

## [第1の実施の形態]

以下、本発明の第1の実施の形態に係る超音波ダイセクション装置について、図1を参照して説明する。なお、以下の説明は、本発明を説明するためのものであって、本発明を限定するためのものではない。

## 【0012】

図1に示すように、本実施の形態の超音波ダイセクション装置は、下記の構成を具備する：

超音波発生手段1；

20

超音波発生手段1により発生させた超音波を収束させるための超音波収束手段2；

超音波収束手段2により収束された超音波が音響流を発生するように超音波発生手段を制御するためのコントローラ3；

超音波収束手段2を駆動するための駆動部4；

生物学的対象を含む溶液を保持する担体を載せる試料台5；

生物学的対象を照明するための照明手段6；

生物学的対象を観察するための観察手段7。

## 【0013】

以下、第一の実施の形態に係る装置の各構成および動作について、先に挙げた構成の順に説明する。

30

## 【0014】

超音波発生手段1は、超音波を発生させる。図1において超音波発生手段1は、所定周波数の高周波信号（電気信号）を発生、送信する信号発生・送信機1aと、この電気信号を音波に変換するトランスデューサ（電気-音響変換素子）1bとから構成される。信号発生・送信機1aは、図5に示されるとおり、電気信号の発生を行う信号発生機11a-1と、任意波形発生器13からの出力波形に基づいて電気信号の長短を制御するRFスイッチ11a-2と、出力（パワー）の増幅を行うパワーアンプ11a-3と、パワーアンプ11a-3とその後段のトランスデューサ1bをつなぐコネクタ11a-4とから構成される。トランスデューサ1bは、高周波信号（電気信号）に対応した音波を、超音波伝搬媒体（サファイア等）を介して、超音波収束手段2に伝播する。トランスデューサ1b

40

## 【0015】

超音波収束手段2は、超音波発生手段1により発生させた超音波を収束させる。超音波収束手段2は、音響レンズであり、その超音波出射端面が四球面を形成している。超音波収束手段2は、トランスデューサ1bからの超音波（UW）を、所定の焦点位置（目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部）で収束するように偏向し、出射させる。なお、ここでいう境界部は、目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象の境界線上だけでなく、境界線近傍（主に目的の生物学的対象の外側）も含んでいる。

## 【0016】

超音波発生手段と超音波収束手段の一例を図2に示す。図2において超音波発生手段は

50

、電気信号を発生、送信する信号発生・送信機 11a と、発生させた電気信号を音波に変換する ZnO 薄膜トランスデューサ 11b と、音波を音響レンズへと伝播する超音波伝搬媒体（サファイアロッド）11c から構成される。信号発生・送信機 11a は、信号発生機 11a-1 と、RF スイッチ 11a-2 と、パワーアンプ 11a-3 と、コネクタ 11a-4 とから構成される。トランスデューサ 11b は、好ましくは、音響レンズの反対面に音響レンズと同程度のサイズに形成される。図 2 において超音波収束手段は、その超音波出射端面が凹球面で、SiO<sub>2</sub> AR コートされている音響レンズ 12 である。ダイセクションされる細胞 19 は、ディッシュ 18 内の細胞培養液 20 中で増殖させることにより調製し、試料台 15 上に置かれる。図 2 は、音響レンズ 12 により収束された超音波を、目的の細胞とそれ以外の細胞との境界部上に照射した様子を示す。

10

## 【0017】

コントローラ 3 は、超音波収束手段 2 により収束された超音波が目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流を発生するように超音波発生手段 1 を制御するための手段である。本発明のダイセクションにおいてかかる音響流の発生は必須であるため、コントローラ 3 は重要である。

## 【0018】

「音響流」とは、収束超音波により液体中に発生する細い液体の流れを意味する。「目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流」は、「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」である。かかる音響流は、超音波の非線形効果により発生する液体の流れであり、その収束スポット径（生物学的対象に作用する部分でとった断面における外径）は個々の生物学的対象のサイズより小さいサイズ（20 μm 以下、好ましくは 5 μm 程度）を有し、生物学的対象を互いに切り離す圧力を有する流れである。

20

## 【0019】

コントローラ 3 は、「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」を発生する超音波を射出するように電気信号を制御する。音響流を発生する超音波を射出するための電気信号は、所定の時間持続される単一周波数の電気信号（バースト波）である。具体的には、コントローラ 3 は、電気信号を制御し、これにより超音波の周波数、射出時間、および出力（パワー）等の制御を行う。たとえば、コントローラは、超音波発生手段 1 により発生させる超音波の周波数  $f$ 、超音波収束手段 2 の NA、及び水中超音波音速  $c_w$  の関係、並びに超音波の出力に基づき、超音波の継続時間を制御する。図 5 において、コントローラである任意波形発生器 13 は、図 6 に示す信号を RF スイッチ 11a-2 に印加することにより、任意の継続時間のバースト波を発生させることができる。すなわち、任意波形発生器 13 は、射出時間のコントローラとして機能する。なお、任意波形発生器 13 のかわりに電気信号の制御プログラムと制御信号発生手段を備えたコンピュータと、このコンピュータによる制御が可能な電気信号発生・送信機により、超音波の周波数、射出時間、および出力（パワー）等を制御してもよい。

30

## 【0020】

駆動部 4 は、超音波収束手段 2 を XYZ 軸方向に駆動する。駆動部 4 は、超音波を生物学的対象の所望の位置（目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部）に照射するために超音波収束手段 2 を XY 軸方向（水平方向）に駆動するとともに、超音波が生物学的対象上の適切な高さで収束されるように超音波収束手段 2 を Z 軸方向（音波軸方向）に駆動する。なお、超音波を生物学的対象の所望の位置で収束させるために、本実施の形態では超音波収束手段を XYZ 軸方向に駆動するが、後述の試料台 5 を駆動させてもよい。

40

## 【0021】

試料台 5 は、生物学的対象を含む溶液を保持する担体を載せるための平らなステージである。試料台 5 は、その下方から細胞を観察可能なように倒立顕微鏡のステージと同じ構成を有していることが好ましい。

## 【0022】

50

照明手段 6 は、生物学的対象を明瞭に観察するために生物学的対象を照明する。照明手段は、具体的には光源である。後述の観察手段（顕微鏡）のコンデンサレンズのNAは、超音波収束手段（音響レンズ）のNAより小さく、試料を照明することは難しいため、観察手段（顕微鏡）を備えている場合であっても、本発明のダイセクション装置は照明手段を別途備えていることが好ましい。照明手段は、生物学的対象を一方向から照明する一つの光源から構成されていてもよいし、生物学的対象を種々の方向から照明するように環状に配置された複数の光源から構成されていてもよい。また、照明手段は、図 3 に示すとおり、生物学的対象を直接照明するように配置されていてもよいし、図 4 に示すとおり、超音波収束手段である音響レンズの超音波出射端面を照明し、その散乱光により生物学的対象を照明するように配置されていてもよい。

10

#### 【 0 0 2 3 】

観察手段 7 は、生物学的対象を観察するための手段であり、具体的には光学顕微鏡対物レンズであり、好ましくは倒立顕微鏡対物レンズである。観察手段 7 は、対物レンズ以外の光学顕微鏡の構成（たとえば撮像装置）を備えていてもよい。本発明のダイセクション装置は、観察手段を備えていてもよいし、観察手段を備えていない場合、既存の観察手段を所定の位置に配置し組み合わせるための手段を設けてもよい。本発明の装置が観察手段を備えていない場合、既存の観察手段と組合せて使用することができるよう、音響レンズの音軸上の超音波放射方向に観察手段の少なくとも一部（対物レンズなど）を配置するためのスペース、治具等を有していることが望ましい。

20

#### 【 0 0 2 4 】

##### 2. 超音波ダイセクション方法

本発明の超音波ダイセクション方法は、平坦な担体上に広がった複数の生物学的対象を含む溶液に対して、収束超音波により音響流を発生させ、これにより複数の生物学的対象から目的の生物学的対象を切り離すための方法であって、

- ( 1 ) 目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部（境界線上だけでなく、境界線近傍（主に目的の生物学的対象の外側）も含む）に超音波を収束させる工程と、
- ( 2 ) 収束超音波により、生物学的対象を含む溶液中に目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流を発生させ、目的の生物学的対象とその他の生物学的対象とを相対的に切り離す工程を含む。

30

#### 【 0 0 2 5 】

上記方法は、本発明の超音波ダイセクション装置を用いて行うことができる。以下、工程順に説明する。

#### 【 0 0 2 6 】

##### ( 1 ) 超音波を収束させる工程

超音波ダイセクション装置の超音波発生手段により発生させた超音波（UW）を、超音波収束手段である音響レンズにより、所定の焦点位置（目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部）で収束させる。所定の焦点位置で超音波を収束させるためには、音響レンズを所定の位置に配置する。この位置決めは、観察手段で生物学的対象を観察しながら、音響レンズ自体を X Y Z 軸方向に駆動するか、もしくは試料台を X Y Z 軸方向に駆動することにより行うことができる。

40

#### 【 0 0 2 7 】

音響レンズの Z 軸方向（音波軸方向）における位置調整は、収束超音波を試料溶液に照射し、「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」を試料溶液中で発生させるために重要である。すなわち、音響レンズとダイセクションされる生物学的対象との間の距離は、音響レンズの焦点距離に制御される必要がある。たとえばその距離は、5 mm より短い距離、数ミリメートル、たとえば 0.5 mm に制御される。このとき音響レンズの一部（少なくとも超音波出射端面を含む部分）は、生物学的対象を含む溶液中に浸漬されている。

#### 【 0 0 2 8 】

50

収束させた超音波の収束スポット径（生物学的対象に作用する部分でとった断面における外径）は、目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な大きさ、すなわち個々の生物学的対象のサイズより小さいサイズ（ $20\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $5\mu\text{m}$ 程度）である。

【0029】

（2）音響流を発生させる工程

収束させた超音波から「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」、すなわち「目的の生物学的対象の相対的な切り離しに有効な収束スポット径をもつ音響流」を発生させるためには、上述のとおり、超音波の周波数、射出時間、および出力（パワー）等に関して適切に設定する必要がある。

【0030】

超音波の周波数は、「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」を発生させるように当業者により適宜設定されるが、非特許文献1（社団法人電子情報通信学会 信学技報 US93-93, EA93-93（1994-01））に音響流を発生させる周波数として記載される値「 $5\text{MHz}$ 」または「 $10\text{MHz}$ 」より高く設定することが好ましい。周波数は、たとえば数百 $\text{MHz}$ であり、後述の実施例では $300\text{MHz}$ を使用した、これに限定されない。

【0031】

超音波の射出時間（以下、継続時間ともいう）は、「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」を発生させるように当業者により適宜設定されるが、一般的には、音響流を生成させるための時間が必要であり、これは、超音波顕微鏡で使用される数 $\mu\text{s}$ （たとえば約 $0.5\mu\text{s}$ ）より長く、本発明の場合 $10\mu\text{s}$ 以上の時間が必要である。後述の実施例にある通り、細胞の切り離しに必要な最低の継続時間は、出力（パワー）によって異なるが、出力（パワー）の増大に伴い際限なく継続時間が短くなるのではなく、 $10\mu\text{s}$ 程度に漸近することが本発明者らにより見出されている。ただし、音響流を発生させた後、必要以上に超音波を射出しつづけると、音響流の流れの幅が拡大し、生物学的対象を切り離すことが可能な狭小な幅の音響流ではなくなるため、射出時間を長くしすぎるのは好ましくない。射出時間は、たとえば数百 $\mu\text{s}$ ～数百 $\text{ms}$ であり、後述の実施例では $40\mu\text{s}$ または $300\mu\text{s}$ を使用した、これに限定されない。

【0032】

超音波の出力（パワー）は、「生物学的対象のダイセクションを行うことが可能な音響流」を発生させるように当業者により適宜設定されるが、一般的には、上述の音響流を発生させる高パワー、すなわち超音波の非線形効果を生じさせる高パワーが必要である。上述の音響流を発生させるために、本発明において超音波は好ましくは高パワーで用いられる。後述の実施例では、電気信号のパワーとして、 $0.4\sim 1.0\text{W}$ のパワーを使用した、これに限定されない。ただし、技術的に、 $0.4\sim 1.0\text{W}$ のすべてが音響流の発生に利用されるわけではない。すなわち、超音波発生手段により発生させた電気信号は、そのすべてが音波に変換されず、一部は失われる。また、音響レンズにより収束された超音波は、反射等のため一部は失われ、そのすべてが音響流の発生に利用されるわけではない。

【0033】

本発明において、超音波発生手段の周波数（ $f$ ）、超音波収束手段（音響レンズ）の開口数（ $NA$ ）、水中超音波音速  $c_w = 1500\text{m/s}$  について、 $c_w / 2 (f NA) < 20\mu\text{m}$  \* の関係式を満たすとともに、（\* Sparrowの定義の分解能）、超音波を継続時間 $10\mu\text{s}$ 以上かけることが好ましい。

【0034】

目的の生物学的対象をその他の生物学的対象から相対的に切り離すために、必要であれば、目的の生物学的対象とそれ以外の生物学的対象との境界部に複数回（たとえば、目的の生物学的対象の切り離しが確認できるまで）超音波照射を行う。

【0035】

複数の生物学的対象から目的の生物学的対象を切り離した後、それ以外の生物学的対象を、より射出時間の長い超音波照射により広範囲にわたって音響流を発生させて担体上か

10

20

30

40

50

ら排除し、目的の生物学的対象のみを担体上に残してもよい。目的以外の生物学的対象は、超音波のパワーを上げたり、照射時間を増加させたりすることにより排除効率を高めることができる。

【実施例】

【0036】

実施例 1

図5に示される超音波ダイセクション装置を用いて細胞のダイセクションを行った例を以下に記す。

【0037】

図5のダイセクション装置は、電気信号を発生する信号発生機11a-1と、先に説明したように射出時間を制御可能な任意波形発生器13と、RFスイッチ11a-2と、電気信号を増幅するパワーアンプ11a-3と、発生させた電気信号を音波に変換するZnO薄膜トランスデューサ11bと、音波を音響レンズへと伝播するサファイアロッド11cと、音波を収束する音響レンズ12と、音響レンズ12を駆動するための駆動部14と、細胞19を含む細胞培養液20を収容するディッシュ18を載せる試料台15と、細胞を観察するための倒立型顕微鏡の対物レンズ17とから構成される。

【0038】

図6は、図5のダイセクション装置において、信号発生機により発生させた電気信号からバースト波が形成される様子を示す。すなわち、図6は、信号発生機により発生させた単一周波数の電気信号が、任意波形発生器により所定の継続時間のみ出力されるように制御され、バースト波が形成されることを示す。

【0039】

以下、実験手順の詳細を記す。

【0040】

倒立型顕微鏡の対物レンズ17を細胞位置から、WD(作動距離)分上昇させた。この操作により音波は細胞位置で焦点距離を結ぶことになる。次いで対物レンズを音響レンズ最深部に合焦して、合焦位置が観察面中心位置になるように水平位置調整した。

【0041】

細胞に合焦し直し、周波数300MHz、継続時間400 $\mu$ sの信号を介して1W弱で試し打ちを行い、さらに位置調整を行った。具体的には、信号発生機11a-1から周波数300MHzの信号を出し、任意波形発生器13によりRFスイッチ11a-2の入力フォーマットに従った信号を与えることで300MHzの信号を所定の継続時間(=射出時間)のバースト波にした。バースト波は、パワーアンプ11a-3で増幅されてトランスデューサ11bで音波平面波に変換された。この平面波は、音響レンズ12を通過して細胞培養液20中で収束音波になり、細胞19付近で収束された。ここで周波数、継続時間、パワーが適切であれば、音響レンズ直下の1個の細胞に作用する細い音響流を形成することができる。本実施例では、300MHzの周波数、400 $\mu$ sの継続時間、0.4~1.0Wの入射パワーを使用した。このパワーは、電気信号のパワーであり、トランスデューサでのロス、音響レンズでのロスは考慮に入れていない。

【0042】

調整終了後、目的の細胞(群)を選択して、目的の細胞と隣接する細胞との境界部を、細胞ごとに数回超音波照射することにより、目的の細胞と隣接する細胞を切り離れた。目的の細胞から離れた領域の細胞については、パワーを上げる、音響レンズを細胞から離す方向にデフォーカスする、継続時間を増加させる等の方法により、広い領域の細胞群を一括で除去し、これにより目的の細胞以外の細胞を除去した。除去された細胞は細胞培養液に浮遊しているため液交換により取り除いた。以上の手順により、目的細胞のみを担体上に残すことに成功した。

【0043】

この実験結果を図7に示す。図7の上の写真は、ダイセクション前の細胞を示し、下の写真はダイセクション直後の細胞を示す。図7は、目的の細胞が隣接する細胞と切り離さ

10

20

30

40

50



れたことを示す。なお、本実施例では、複数の目的の細胞をそれ以外の細胞と切り離しているが、下記実施例 2 に示すとおり、本発明の方法に従って、単一の目的の細胞をそれ以外の細胞と切り離すことも可能である。

【 0 0 4 4 】

実施例 2

本実施例では、本方法で目的の細胞 1 個をその他の細胞と切り離したときに、本方法による細胞に対するダメージが少ないことを確認する実験を行った。

【 0 0 4 5 】

上記実施例 1 と同じ実験配置で、実施例 1 と同様の手順に従って細胞ダイセクションを行った。実験パラメータは 300MHz、2.5W、継続時間 300  $\mu$ s である。ダイセクション後、細胞は、そのまま容器内に翌日まで保存した。

10

【 0 0 4 6 】

結果を図 8 に示す。図 8 は上から順に、超音波ダイセクション前、直後、1 日後の画像である。ダイセクション 1 日後には、細胞は 1 回の分裂を行ったことが観察され、ダイセクションによるダメージが少ないことが実証された。

【 0 0 4 7 】

実施例 3

本実施例では、目的の細胞をその他の細胞と切り離すために必要な超音波の最小継続時間を、電気信号の出力を変化させて調べた。本実施例も、上記実施例 1 と同じ実験配置で、同様の手順に従って行った。

20

【 0 0 4 8 】

継続時間は音響流を十分成長させるのに重要なパラメータである。ある程度以下の継続時間では、音響流を十分に成長させられず、音響流は細胞を切り離し可能な速度に到達しないと考えられる。この最小継続時間を調べるために、入力パワーを変化させたときの、細胞を切り離し可能な最低の継続時間を調べた。

【 0 0 4 9 】

結果を図 9 に示す。グラフは 10  $\mu$ s に漸近しており、10  $\mu$ s が最小継続時間であることが確認できた。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 0 】

30

【 図 1 】 本発明の第 1 の実施の形態に係る超音波ダイセクション装置を示す図。

【 図 2 】 超音波発生手段と超音波収束手段の一例を示す図。

【 図 3 】 生物学的対象を直接照明するように配置された照明手段を備えた超音波ダイセクション装置を示す図。

【 図 4 】 音響レンズの超音波出射端面を照明するように配置された照明手段を備えた超音波ダイセクション装置を示す図。

【 図 5 】 実施例で使用した超音波ダイセクション装置を示す図。

【 図 6 】 信号発生機により発生させた電気信号、任意信号発生器の信号と、それにより R F スイッチから出力される信号のタイムチャート。

【 図 7 】 超音波ダイセクションの結果を示す写真。

40

【 図 8 】 超音波ダイセクションの結果を示す写真。

【 図 9 】 超音波の継続時間に関する実験結果を示すグラフ。

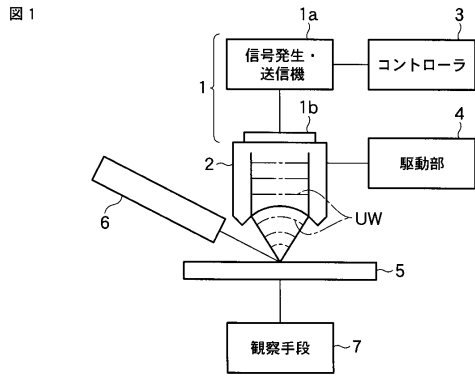
【 符号の説明 】

【 0 0 5 1 】

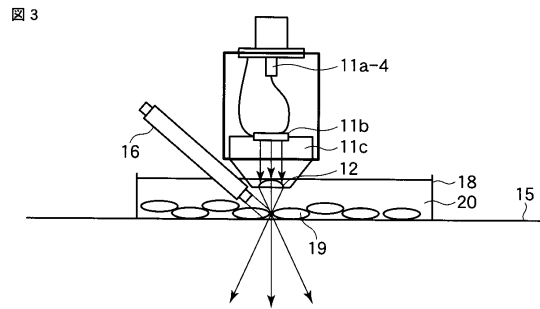
1 ... 超音波発生手段、1 a ... 信号発生・送信機、1 b ... トランスデューサ、2 ... 超音波収束手段、3 ... コントローラ、4 ... 駆動部、5 ... 試料台、6 ... 照明手段、7 ... 観察手段、1 1 a ... 信号発生・送信機、1 1 a - 1 ... 信号発生機、1 1 a - 2 ... R F スイッチ、1 1 a - 3 ... パワーアンプ、1 1 a - 4 ... コネクタ、1 1 b ... Z n O 薄膜トランスデューサ、1 1 c ... サファイアロッド、1 2 ... 音響レンズ、1 3 ... 任意波形発生器、1 4 ... 駆動部、1 5 ... 試料台、1 7 ... 対物レンズ、1 8 ... ディッシュ、1 9 ... 細胞、2 0 ... 細胞培養液

50

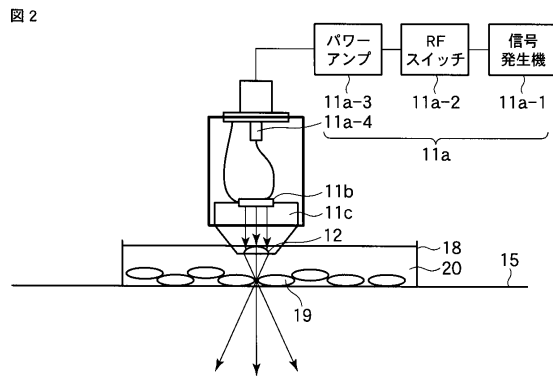
【図1】



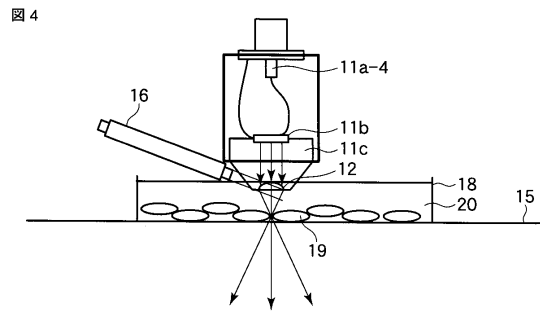
【図3】



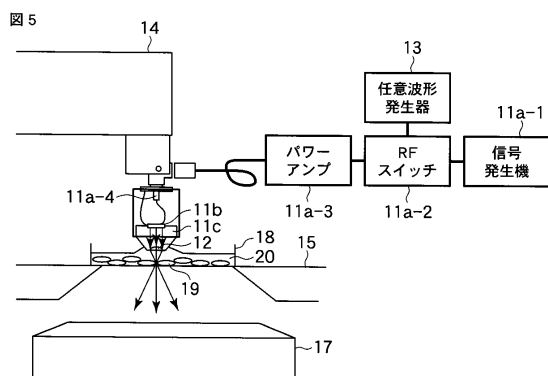
【図2】



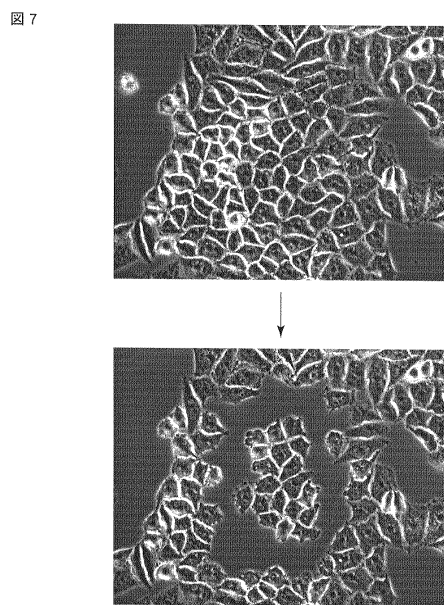
【図4】



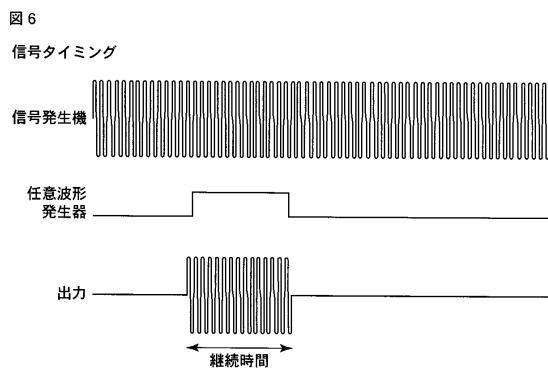
【図5】



【図7】

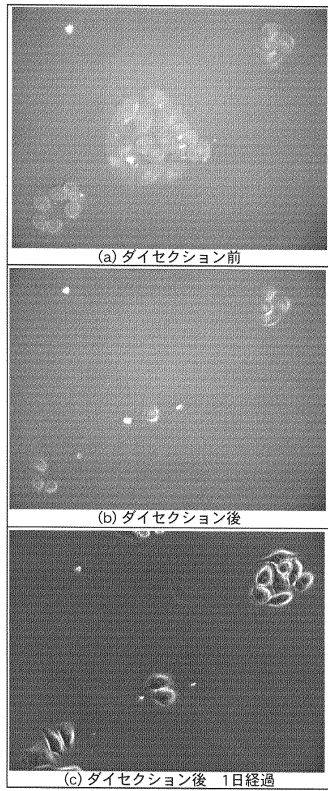


【図6】



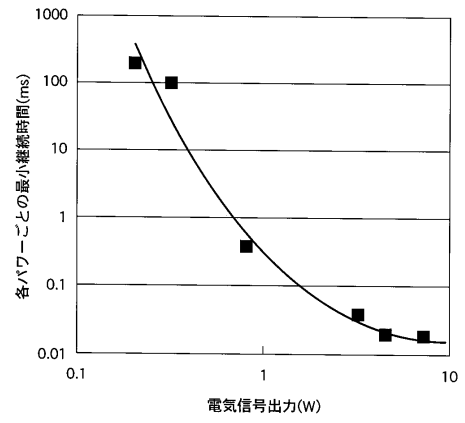
【 図 8 】

図 8



【 図 9 】

図 9



## フロントページの続き

- (74)代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034  
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976  
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051  
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100100952  
弁理士 風間 鉄也
- (74)代理人 100101812  
弁理士 勝村 紘
- (74)代理人 100070437  
弁理士 河井 将次
- (74)代理人 100124394  
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807  
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073  
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290  
弁理士 竹内 将訓
- (74)代理人 100127144  
弁理士 市原 卓三
- (74)代理人 100141933  
弁理士 山下 元
- (72)発明者 佐々木 靖夫  
東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目4番2号 オリジナル株式会社内
- (72)発明者 渡辺 吉彦  
東京都渋谷区幡ヶ谷 2丁目4番2号 オリジナル株式会社内

審査官 佐藤 巖

- (56)参考文献 国際公開第2006/088154(WO, A1)  
特開平06-014977(JP, A)  
国際公開第2000/025125(WO, A1)  
新村出 編, 広辞苑, 1998年, 第五版, 第689頁, 第1048頁  
松田和久ら, 信学技報, 1994年, Vol.93, No.443, pp.59-66

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12M 1/00-3/10  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)