(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
2021年9月16日(16.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/181467 A1

(51) 国際特許分類:
*C12M 1/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/010031

(22) 国際出願日： 2020年3月9日(09.03.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(71) 出願人: 株式会社日立ハイテク (**HITACHI HIGH-TECH CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1056409 東京都港区虎ノ門一丁目１７番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 白井 正敬 (**SHIRAI Masataka**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 坂井 友幸 (**SAKAI Tomoyuki**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).

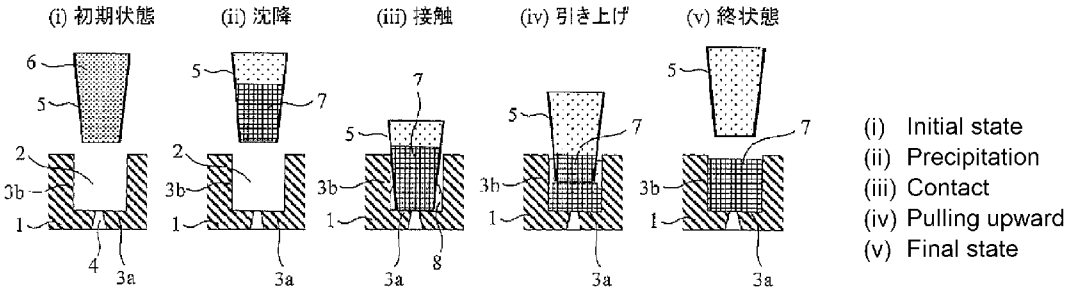
(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) **Title:** MICROPARTICLE FILLING METHOD AND MICROPARTICLE FILLING DEVICE

(54) 発明の名称： 微粒子充填方法及び微粒子充填装置

図１




(57) **Abstract:** This microparticle filling method is a method for filling at least one container with microparticles, the method comprising: suctioning a suspension of the microparticles into a nozzle; concentrating the microparticles in the suspension and forming a highly concentrated suspension having a prescribed microparticle concentration at the tip of the nozzle; causing the highly concentrated suspension to come into contact with an inner wall of the container; and filling the container with the highly concentrated suspension by separating the nozzle from the container after the contact.

(57) 要約：本開示の微粒子充填方法は、少なくとも１つ以上の容器に微粒子を充填する方法であって、ノズルに前記微粒子の懸濁液を吸引することと、前記懸濁液中の前記微粒子を濃縮して、前記ノズルの先端部に、所定の微粒子濃度の高濃度懸濁液を形成することと、前記高濃度懸濁液と前記容器の内壁を接触させることと、前記接触後に前記ノズルを前記容器から離すことで前記高濃度懸濁液を前記容器に充填することと、を含む。

WO 2021/181467 A1

［続葉有］

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

# 明　細　書

## 発明の名称 ： 微粒子充填方法及び微粒子充填装置

## 技術分野

[0001] 本開示は、微粒子充填方法及び微粒子充填装置に関する。

## 背景技術

[0002] 一般に、単一細胞解析とは、生命科学における解析方法の１つであり、単一細胞ごとの生体分子の解析や定量を行う技術である。単一細胞解析は、特に、ＤＮＡシーケンサを利用して、単一細胞ごとのＤＮＡ及びＲＮＡ（特にｍＲＮＡ）の塩基配列を決定したり、分子数を計測したりする方法である。

[0003] 単一細胞解析の具体的な方法としては、チューブ（０．２ｍＬ～２ｍＬ程度の反応用プラスティック容器）やタイタープレート（樹脂製反応容器が９６個や３８４個など規定の数だけプレート状に集積したもの）を用いる方法（非特許文献１）、マイクロ流路を用いる方法（非特許文献２）、エマルジョンを用いる方法（非特許文献３）、マイクロウェルを用いる方法（非特許文献４）、貫通したマイクロウェルを用いる方法（非特許文献５）などが知られている。

[0004] いずれの方法においても、解析対象となる多数の細胞が単一細胞ごとに分離され、それぞれの細胞から抽出された核酸に細胞固有のＤＮＡ塩基配列（以下「バーコード」という）が導入される。その後、これら複数の細胞から得られた核酸サンプルをひとまとめにして、ＤＮＡシーケンシングを実施し、得られる配列データから、バーコード配列情報ごとにＤＮＡ配列情報を分離することで、単一細胞解析データを得ることができる。

[0005] 特に、非特許文献３～５に記載の方法は、細胞単離後、核酸増幅前にバーコードを導入することによって、少ない試薬で多数の細胞からのＤＮＡシーケンサ用のサンプルを調製し、配列データを得ることができる。

[0006] 非特許文献５に記載の単一細胞解析法は、非特許文献３及び４に記載の方法に比べて、１つの細胞の解析のために用いる微粒子の数が多く（非特許文

献３及び４では微粒子は１つ）、１つの細胞の解析に用いる核酸捕捉用ＤＮＡプローブ数を１００倍程度以上に増やすことができる。また、細胞破砕溶液が、多数の微粒子から構成された多孔質構造を通過するため、短時間で高効率に単一細胞からの核酸を微粒子表面上に捕捉することができる。

[0007] このように、１つの細胞の解析に多数の微粒子を用いるためには、微小反応槽に多数の微粒子を充填することが求められる。

[0008] 非特許文献５において、微小反応槽の底面に貫通孔があることを利用して、微粒子懸濁液を微小反応槽に分注し、貫通孔を通して余分な水分を排出することで、微粒子を微小反応槽に充填している。また、微小反応槽の直径が５０～１００μｍと小さいため、インクジェット装置を用いている。

[0009] この方法の他に、ガラスピペットを用いて微小反応槽に微粒子を分注することも可能である。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0010] 特許文献1：特許第６３０７１７９号公報

特許文献2：特許第５４１５５６０号公報

特許文献3：特許第５９９７２７８号公報

### 非特許文献

[0011] 非特許文献1：F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B. B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao , M. A. Surani, “mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell,” Nature Methods, 6, 377-382, 2009.

非特許文献2：A. K. Shalek, R. Satija, X. Adiconis, R. S. Gertner, J. T. Gaublomme, R. Raychowdhury, S. Schwartz, N. Yosef, C. Malboeuf, D. Lu, J. J. Trombetta, D. Gennert, A. Gnirke, A. Goren, N. Hacohen, J. Z. Levin, H. Park , A. Regev, “Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells,” Nature, 498, 7453, p.236-240, 2013.

非特許文献3：A. Klein, L. Mazutis, I. Akartuna, N. Tallapragada, A. Veres, V. Li, L. Peshkin, D. Weitz , M. Kirschner, “Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells,” Cell, 161, 5, p. 1187-1201, 2015.

非特許文献4：H. Fan, G. Fu , S. Fodor, “Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry,” Science, 347, 6222, p.1258367, 2015.

非特許文献5：Masataka Shirai, Koji Arikawa, Kiyomi Taniguchi, Maiko Tanabe, Tomoyuki Sakai, “Vertical Flow Array Chip reliably identify cell types from single-cell mRNA sequencing experiments” Scientific Reports, 6, 36014 DOI: 10.1038/srep36014 (2016)

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0012] しかしながら、インクジェット装置やガラスピペットを用いて微小反応槽（容器）に微粒子を充填するという、上述の方法には、以下のような課題がある。

[0013] 第１に、微粒子を微小反応槽中に充填するためには、微粒子が懸濁した溶液を微小反応槽に分注後、余分な溶液を微小反応槽から排出する必要がある。このとき、微粒子を残して、溶液だけを微小反応槽から排出するためには、微粒子よりも目の細かい網目を有する膜を用いて微粒子が流れ出ないようにしなければならない。しかし、微粒子の直径が数μｍ以下と小さい場合には、網目の開口部のサイズは微粒子直径よりも小さくなくてはならない。開口部が小さくかつ強度のある網目の膜を作製することは非常に困難であり、利用可能なそのようなサイズの網目を持つ膜を用いる場合には、強度を維持するために膜の厚みがｍｍオーダーとなってしまう。これにより、大きな圧力損失のために、素早く溶液を吸引することができない。さらに、高い圧力をかけて迅速に溶液を除去するためには、さらに強度の高い網目を持つ膜を用いる必要があるので、膜の強度の維持と溶液の吸引速度の向上を両立する

ことはできない。

[0014] 第２に、充填後の微粒子数を制御するためには、微粒子懸濁液の微粒子密度を安定させ、溶液量で粒子数を制御する必要がある。しかし、微粒子の比重が溶媒より大きいとき、微粒子が沈降することで微粒子密度が変化するだけでなく、微粒子のミクロな凝集の程度によって沈降速度が変化してしまうので、安定した微粒子密度を維持することが困難である。

[0015] さらに、インクジェット装置を用いて微粒子懸濁液を微小反応槽に分注する場合には、液滴を安定的に吐出するために、吐出ノズル内での微粒子密度が安定して一定でなければ、溶液の物理的特性が一定でなくなるので、吐出量及び吐出方向が安定しないだけでなく、高頻度で吐出自体が停止してしまう。吐出停止が起きた場合は、微粒子懸濁液を再度調製して、インクジェットヘッドに充填し直さなければならない。そのため、微粒子を多数の微小反応槽に充填するための時間が、交換作業の分だけ長くなってしまう。

[0016] 事前に微粒子を最密充填密度に近い濃度にまで濃縮してから、その微粒子を分取して微小反応槽に充填することができれば、上記問題は解決するが、高濃度に濃縮した微粒子沈殿物から微粒子を一定量採取すること自体が、技術的に困難である。

[0017] そこで本開示は、短時間かつ安定的に容器に微粒子を充填する技術を提供する。

## 課題を解決するための手段

[0018] 上記課題を解決するために、本開示の微粒子充填方法は、少なくとも１つ以上の容器に微粒子を充填する方法であって、ノズルに前記微粒子の懸濁液を吸引することと、前記懸濁液中の前記微粒子を濃縮して、前記ノズルの先端部に、所定の微粒子濃度の高濃度懸濁液を形成することと、前記高濃度懸濁液と前記容器の内壁を接触させることと、前記接触後に前記ノズルを前記容器から離すことで前記高濃度懸濁液を前記容器に充填することと、を含むことを特徴とする。

[0019] 本開示に関連する更なる特徴は、本明細書の記述、添付図面から明らかに

なるものである。また、本開示の態様は、要素及び多様な要素の組み合わせ及び以降の詳細な記述と添付される請求の範囲の様態により達成され実現される。

本明細書の記述は典型的な例示に過ぎず、本開示の請求の範囲又は適用例を如何なる意味に於いても限定するものではない。

## 発明の効果

[0020] 本開示の技術によれば、短時間かつ安定的に容器に微粒子を充填することができる。

上記以外の課題、構成及び効果は、以下の実施の形態の説明により明らかにされる。

## 図面の簡単な説明

[0021] [図1]第１の実施形態に係る微粒子充填方法を説明するための概略断面図である。

[図2]微小反応槽への微粒子の充填原理を説明するための概略断面図である。

[図3]第１の実施形態に係る微粒子充填装置を示す模式図である。

[図4]微粒子充填装置の動作を示すフローチャートである。

[図5]ノズル先端の外径に対する微粒子充填の成功率を計測した結果を示すグラフである。

[図6]単一細胞解析用のチップを示す模式図である。

[図7]第２の実施形態に係る微粒子充填装置を示す模式図である。

[図8]センサシステムの構成を示す斜視図である。

[図9]単一細胞解析デバイスに用いられるフローセルデバイスの模式図である。

[図10]第３の実施形態に係る微粒子充填方法を説明するための概略断面図である。

[図11]ノズルの引き上げ速度と高濃度懸濁液中の微粒子数の関係を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

[0022] まず、本開示の各実施形態において用いられる用語の定義を説明する。

[0023] 「微小反応槽」：平面基板上に形成された凹形状の容器。典型的には直径は数μｍ～数百μｍであり、特に、直径数十μｍのもの。非特許文献５に記載の、細胞を捕捉するための貫通孔が底面に形成されたものも含む。

[0024] 「ノズル」：溶液及び微粒子が移動できる中空構造を有し、先端部を微小反応槽に挿入可能なもの。

[0025] 「バッファ」：微粒子が懸濁される溶液。微粒子の懸濁状態を維持するために、ｐＨ又は塩濃度が制御されていてもよい。また、ノズル外壁及び微小反応槽内壁との濡れ性（接触角）を制御するために、必要に応じて界面活性剤が混和していてもよい。

[0026] 「微粒子」：比重が溶液よりも大きく、直径が数百ｎｍから数百μｍの粒子、又は、磁性、電荷若しくは誘電性を有し、直径が数ｎｍから数百μｍの粒子。

[0027] 「接触」：ノズル先端部に吸引された微粒子懸濁液の溶液成分（バッファ）が微小反応槽の内壁（底面及び側壁面）に触れること。特に、溶液と内壁との間に接触角が定義できる状態のこと。

[0028] 「濃縮」：微粒子懸濁液の微粒子濃度（単位体積当たりの微粒子の数（数密度））を上昇させ、微粒子の最密充填密度の５０％以上の密度となる微粒子濃度まで到達させること。

[0029] 「充填」：必要な数（必要な微粒子濃度）の微粒子が微小反応槽の内部に供給されること。

[0030] 「沈降」:保存容器に保存されている微粒子懸濁液の微粒子濃度から逸脱して、一部の領域、特にノズル先端部で微粒子濃度が上昇すること。

[0031] 「判定」：ノズル先端部に微粒子濃度が上昇した領域（高濃度懸濁液）が形成され、その微粒子濃度とその領域の体積が、微小反応槽の容積の５０％以上が占有される数の微粒子を含む程度となったかどうかを判定すること。

[0032] 「高濃度」:充填に必要な微粒子の微粒子濃度に達した状態。微粒子の最密充填密度の５０％以上の密度となるような微粒子濃度を指す。

[0033] ［第１の実施形態］

＜微粒子充填方法＞

図１は、第１の実施形態に係る微粒子充填方法を説明するための概略断面図である。図１に示すように、本方法は、以下の工程（ｉ）～（ｖ）を含む。

[0034] （ｉ）初期状態

凹部である微小反応槽２（容器）が形成された平面基板１を準備し、微粒子を溶液に懸濁した懸濁液６を分注用のノズル５に吸引して、ノズル５を微小反応槽２の直上に位置させる。

[0035] 平面基板１は、例えば単一細胞解析用のチップ（タイタープレート）であり、平面基板１に微小反応槽２が複数形成されていてもよい。微小反応槽２には、微小反応槽２の底面３ａから平面基板１の底面まで延設される貫通孔４が形成されている。ノズル５は、先端に向かって先細る形状を有しているが、ノズル５の先端が微小反応槽２の底面３ａに接触するまで微小反応槽２に挿入可能であれば、外径が一定の形状であってもよい。ノズル５の先端の外径は、例えば微小反応槽２の底面３ａの径の８０％～９０％とすることができるが、これに限定されない。

[0036] （ｉｉ）濃縮（沈降）

初期状態のまま所定時間放置して、懸濁液６中の微粒子を重力によりノズル５の先端部に沈降させて濃縮し、所定の体積、所定の濃度の高濃度懸濁液７を得る。あるいは、微粒子が磁性微粒子である場合は、外部から磁力を印加することにより、ノズル５の先端部に微粒子を移動させて濃縮し、高濃度懸濁液７を得る。所定の体積は、例えば、高濃度懸濁液７を微小反応槽２に充填した際に、微小反応槽２の容積の５０％以上が占有される数の微粒子を含むような値に設定される。所定の濃度（高濃度）は、上述のように、微粒子の最密充填密度の５０％以上の密度となるような微粒子濃度である。

[0037] 上記工程（ｉ）の状態を構築した時点から、例えばノズル５を外部のカメラで撮像し、ノズル５内の微粒子の時間的・空間的変化を観察することによ

り、ノズル５内の高濃度懸濁液７の体積を推定する。このとき、ノズル５内の高濃度懸濁液７の液面の高さが所定値となった場合に、所定の体積の高濃度懸濁液７が得られたと判定することができる。

[0038] あるいは、ノズル５の先端部に光を照射し、散乱光、吸光若しくは透過光などの光量又は分布を計測することにより、所定の体積の高濃度懸濁液７が得られたかどうかを判定することもできる。この場合、照射する光のノズル５付近でのスポットサイズと位置を適切に制御する必要がある。また、ノズル５の所定の高さの位置に光を照射して、その位置の散乱光、吸光若しくは透過光などに基づいて、所定の体積の高濃度懸濁液７が得られたと判定するようにしてもよい。

[0039] （ｉｉｉ）接触

工程（ｉｉ）において所定の体積の高濃度懸濁液７が得られたら、ノズル５を下降させ、ノズル５の先端の溶液８の表面張力によって、微小反応槽２の内壁３（底面３ａ又は側壁面３ｂ）に溶液８を接触させる。これにより、溶液８が微小反応槽２内で濡れて拡がり、微小反応槽２の側壁面３ｂの少なくとも一部まで溶液８が浸み出して、微小反応槽２の底面３ａ及び側壁面３ｂに溶液８が接触した状態となる。

[0040] （ｉｖ）引き上げ

工程（ｉｉｉ）において溶液８が微小反応槽２の底面３ａ及び側壁面３ｂに接触したら、所定の速度でノズル５を引き上げて、高濃度懸濁液７を微小反応槽２に充填する。この充填の原理については後述する。

[0041] （ｖ）終状態

微小反応槽２に高濃度懸濁液７が充填された状態を終状態とする。

[0042] ＜原理＞

図２は、本実施形態に係る微粒子充填方法の原理を説明するための概略断面図であり、ノズル５の先端部と微小反応槽２の内部空間が拡大して示されている。図２（ａ）は、ノズル５内の溶液８が微小反応槽２の底面３ａに接触した直後の状態を示している。図２（ａ）に示すように、工程（ｉｉｉ）

においてノズル５を下降させていき、ノズル５の下端の一部が微小反応槽２の底面３ａ（内壁）に接触すると、高濃度懸濁液７中の溶液８が微小反応槽２の底面３ａに濡れて広がる（接触する）。

[0043] 図２（ｂ）は、溶液８が微小反応槽２の側壁面３ｂにも接触した状態を示している。図２（ｂ）に示すように、溶液８は、側壁面３ｂの少なくとも一部に接触するまで浸み出していく。

[0044] ここで、微小反応槽２の底面３ａの半径をＲｗとし、ノズル５の先端の外壁９の半径をＲｃとし、微小反応槽２の内壁に対する溶液８の接触角をθｗとし、ノズル５の外壁９に対する溶液８の接触角をθｃとする。

[0045] 下記式（１）で表される吸引圧力（ΔＰ）が正のとき、微粒子の高濃度懸濁液７をノズル５から引き出すことができる。したがって、工程（ｉｖ）において、ΔＰ＞０の状態を維持したままで、所定の速度でノズル５を引き上げることにより、微粒子の高濃度懸濁液７を微小反応槽２に充填することができる。ノズル５の引き上げ速度は、ΔＰ＞０を維持できる範囲であれば、一定とすることもできるし、加速若しくは減速しながら引き上げてもよい。

[0046] [数1]

$$\Delta P = \frac{2(R_W \cos\theta_W + R_C \cos\theta_C)}{{R_W}^2 - {R_C}^2} \quad \cdots (1)$$

[0047] 微小反応槽２に充填された高濃度懸濁液７から追加で溶液を排出する必要はない。上述のように、高濃度懸濁液７の微粒子濃度は最密充填密度の５０％以上であるので、高濃度懸濁液７の体積を微小反応槽２の容積と同じにすることにより、微小反応槽２の容積の少なくとも５０％以上の微粒子が充填される。高濃度懸濁液７の微粒子濃度及び体積を適切な条件に設定すれば、乾燥状態で微小反応槽２の容積の８０％以上を微粒子で占めることができる。

[0048] ノズル５中に形成する高濃度懸濁液７の体積は、微小反応槽２の容積より大きくすることもできる。微小反応槽２が誤差なく形成され、開口の角度が９０°に形成され、かつ内壁に付着物もないと仮定して（図２の形状）、工

程（ｖ）におけるノズル５の引き上げの際、浸み出した溶液８が微小反応槽２の上端に到達すると、接触角θｗは９０°未満となる。この接触角θｗを式（１）に代入するとΔＰ＜０となるので、理論上はノズル５からの高濃度懸濁液７の排出は停止する。したがって、高濃度懸濁液７の体積が微小反応槽２の容積より大きくても、微小反応槽２の上端で排出が止まるので、高濃度懸濁液７が微小反応槽２から溢れることはないと考えられる。

[0049] 図１に示した微小反応槽２は、単一細胞解析チップに必要な細胞捕捉用の貫通孔４を有しているが、上記微粒子充填の原理に貫通孔４は必須のものではない。実際、上記原理に従って、貫通孔４のない容器への微粒子の充填を実施することができる。すなわち、本実施形態の技術により微粒子が充填される容器としては、単一細胞解析用チップの微小反応槽２に限定されず、ノズル５を挿入可能な容器であればよい。微粒子が充填される容器の断面形状も、図１及び２に示したような長方形に限定されず、底部が開口部より狭くなる台形など、他の形状を採用することができる。

[0050] 以上、単一の微小反応槽２への微粒子の充填方法を説明したが、複数の微小反応槽２へ微粒子を充填する場合には、上記の操作を繰り返せばよい。具体的には、第１の微小反応槽への充填を上記工程（ｉ）～（ｖ）に従って完了したのちに、第２の微小反応槽の直上にノズル５を移動させ、第２の微小反応槽に対して初期状態となるようにして、微粒子充填のための工程を繰り返せばよい。

[0051] 複数種類の微粒子を、それぞれ異なる微小反応槽２に充填する場合も同様の操作となる。例えば、非特許文献５及び特許文献１～３に記載の単一細胞解析用チップを作製するために、異なる配列のＤＮＡプローブが固定された複数種類の微粒子を、予め設定した微小反応槽に個別に充填する例を説明する。

[0052] まず、各種の微粒子がそれぞれ懸濁された懸濁液の保存容器（保存チューブ）を用意し、所望の懸濁液を収容する保存容器内に空のノズル５を浸漬することによって、毛管現象を利用して微粒子懸濁液を吸引する。あるいは、

空のノズル５の微粒子懸濁液が分注される先端とは反対側の先端にシリンジポンプ等を設置して、吸引操作により微粒子懸濁液を吸引する。

[0053] 次に、工程（ｉ）の初期状態となるように、所定の微小反応槽２の直上にノズル５を移動させ、工程（ｉｉ）～（ｖ）を実施する。

[0054] 次に、ノズル５を廃液容器（廃液チューブ）まで移動させ、例えばシリンジポンプの操作により、ノズル５内に余った微粒子懸濁液を廃液容器に廃棄する。

[0055] 次に、ノズル５の洗浄のために、複数の保存容器にそれぞれ収容された、複数種類の洗浄液にノズル５を浸漬して、洗浄液の吸引及び廃棄を繰り返し、ノズル５に付着した微粒子を完全に洗浄除去する。洗浄液は、例えば、フィルタろ過したイオン交換水などの純水及びエタノールなどのアルコールを用いることができる。

[0056] 次の種類の微粒子を次の位置の微小反応槽に充填するために、以上の操作を繰り返す。

[0057] ＜微粒子充填装置＞

図３は、第１の実施形態に係る微粒子充填装置１００を示す模式図である。微粒子充填装置１００は、上述の微粒子充填方法を自動で実施する装置である。図３に示すように、微粒子充填装置１００は、ノズル５、ステージ１０１、駆動システム１０２、光学システム１０３、センサシステム１０４、分注システム１０５、複数の保存容器１０６、カメラシステム１０７、バルブ１０８、管１０９並びに制御システム１１０を備える。

[0058] ステージ１０１は、微小反応槽を有する平面基板１を固定して位置決めする。

[0059] 駆動システム１０２は、平面基板１に対してノズル５を相対的に三軸方向に、設定した距離だけ移動させる。駆動システム１０２は、例えば、ノズル５を上下方向に移動させ、ステージ１０１を水平方向に移動させる。駆動システム１０２は、ステージ１０１のみを三軸方向に移動させてもよい。

[0060] 光学システム１０３は、微小反応槽の直上に移動されたノズル５内の微粒

子懸濁液の濃縮状況を観察する。光学システム１０３は、ノズル５の先端部を撮像するカメラであってもよいし、ノズル５の先端部に光を照射して散乱光、吸光若しくは透過光を分析する光学系であってもよい。

[0061] センサシステム１０４は、ノズル５と微小反応槽との接触を検知する。センサシステム１０４は、例えば圧力センサを有しており、ノズル５と微小反応槽との接触による上向きの力を圧力センサで検知することにより、ノズル５と微小反応槽との接触を判断する。あるいは、センサシステム１０４は、カメラなどの光学的手段により接触を検知するように構成されていてもよい。

[0062] 分注システム１０５は、例えばシリンジポンプを有し、ノズル５に対する液体の吸引及び吐出を制御する。分注システム１０５は、特に、ノズル５への微粒子懸濁液の吸引を制御する。ノズル５は、管１０９（例えばＰＥＥＫ製チューブ）により分注システム１０５に接続される。

[0063] 複数の保存容器１０６には、微粒子懸濁液が収容される保存容器、洗浄液が収容される保存容器、廃液が回収される廃液容器が含まれる。

[0064] カメラシステム１０７は、平面基板１及びノズル５の位置を観察し、平面基板１の微小反応槽の直上にノズル５の先端を位置合わせするために用いられる。

[0065] バルブ１０８は、分注システム１０５の部品の１つとして設けることができ、大気圧解放のために用いられる。

[0066] 制御システム１１０は、駆動システム１０２、光学システム１０３、センサシステム１０４、分注システム１０５及びカメラシステム１０７の動作を制御する。また、制御システム１１０は、光学システム１０３、センサシステム１０４及びカメラシステム１０７の検出信号を受信して、必要な演算処理を実行する。

[0067] ＜微粒子充填装置の動作＞

図４は、微粒子充填装置１００の動作を示すフローチャートである。

[0068] ステップＳ１において、制御システム１１０は、微粒子充填装置１００の

全体の初期状態を構築する。具体的には、まず、ユーザは、平面基板１をステージ１０１に載置し、微粒子懸濁液の保存容器１０６と、洗浄液の保存容器１０６とを所定の位置に配置する。その後、ユーザが、例えば制御システム１１０の入力デバイスから動作開始の指示を入力すると、制御システム１１０は、平面基板１、ノズル５、保存容器１０６が全て所定の初期位置に位置しているかを確認する。これらのいずれかが初期位置に位置していない場合は、駆動システム１０２により初期位置に移動させる。

[0069] ステップＳ２において、制御システム１１０は、微小反応槽２ごとの初期状態を構築する。具体的には、制御システム１１０は、駆動システム１０２及び分注システム１０５を駆動して、ノズル５に洗浄液を吸引し、不図示の廃液容器に吐出させて、ノズル５を洗浄する。その後、制御システム１１０は、ノズル５に微粒子懸濁液を吸引させ、所定の微小反応槽２の直上に移動させる。

[0070] ステップＳ３において、制御システム１１０は、ノズル５内の微粒子懸濁液中の微粒子が沈降して、所定の微粒子濃度の高濃度懸濁液が所定の体積だけ形成されたかを判定する。ここで、高濃度懸濁液は、光学的に密な状態となるので、光学システム１０３により、低濃度の領域に比べて黒い領域として観察することができる。制御システム１１０は、光学システム１０３から受信した画像のコントラストなどから、黒い領域の大きさを算出し、それに基づき高濃度懸濁液の濃度及び体積を算出する。ステップＳ２の状態を構築してから、例えば９０～１２０秒保持することにより、高濃度懸濁液の濃度及び体積が所定の値になったと判定できる。

[0071] ステップＳ４において、制御システム１１０は、駆動システム１０２を駆動してノズル５を降下させ、ノズル５の先端を微小反応槽の底面に接触させる。接触によってノズル５の先端部の微粒子懸濁液の溶液が微小反応槽の底面や側壁面に濡れる。本開示では、微粒子懸濁液が微小反応槽の内壁に濡れたことをノズル５が接触したと定義している。これは、溶液が微小反応槽の内壁とノズル５の外壁の両方の壁面を濡らして、適切な接触角を構成し、ノ

ズル５中の高濃度懸濁液が微小反応槽に引き出されることが必要かつ本質的であるからである。しかし、実用上は、ノズル５の降下を必ずどこかで止めなければならないので、センサシステム１０４を設けて接触を検知している。

[0072] ノズル５と微小反応槽との接触後、例えば２秒以内に、微粒子懸濁液の界面はノズル５と微小反応槽の側壁面との間に入り込み、上昇する。制御システム１１０は、この上昇のために、接触状態を２秒間維持する。ここで接触状態を２秒間とした理由は、例えば微小反応槽の径を７５μｍとし、ノズル５の先端の外径を７０μｍ（内径５２．５μｍ）とした場合、ノズル５と微小反応槽の接触から２秒経過すれば、溶液が微小反応槽の底面及び側壁面に確実に濡れた状態となるためである。接触状態を維持する時間は、ノズル５の外径及び微小反応槽２の径に応じて適宜変更され得ることは言うまでもない。

[0073] ステップＳ５において、制御システム１１０は、駆動システム１０２を駆動して、例えば１～１０μｍ／ｓ程度の速度で、ノズル５を引き上げる。これにより、ノズル５内の微粒子を微小反応槽に移動させて、微粒子を微小反応槽内に充填する。

[0074] ステップＳ６において、制御システム１１０は、すべての微小反応槽２に微粒子が充填されたかを判断する。

[0075] ステップＳ６でＮＯの場合、制御システム１１０は、次の微小反応槽２への微粒子の充填のために、駆動システム１０２及び分注システム１０５を駆動して、ノズル５内に余った微粒子懸濁液を廃液容器に破棄する。

[0076] 次に、ステップＳ２に戻り、制御システム１１０は、駆動システム１０２及び分注システム１０５を駆動して２種類の洗浄液を吸引及び吐出させ、ノズル５を洗浄する。次に、制御システム１１０は、駆動システム１０２及び分注システム１０５を駆動して、前回充填された微粒子と異なる微粒子（例えば、前回と異なる細胞認識タグ配列が固定された微粒子）の懸濁液をノズル５に吸引し、前回と異なる微小反応槽２の直上まで移動させる。これによ

り、次の微小反応槽２についての初期状態を構築する。その後、上記と同様にステップＳ３～Ｓ６を実行する。

[0077] ２つ目以降の微小反応槽２について同様にステップＳ２～Ｓ６を繰り返し、ステップＳ６においてＹＥＳとなった場合、制御システム１１０は、微粒子充填装置１００の動作を終了する。

[0078] 微粒子が微小反応槽２に充填されるためには、ステップＳ４（工程（ｉｉ））で微粒子が濃縮されることと、次のステップＳ５（工程（ｉｉｉ））で微粒子懸濁液が濡れて、微小反応槽２の側壁面まで達し、微小反応槽２の内壁と溶液との接触角、ノズル５の外壁と溶液との接触角が式（１）の条件を満たす必要がある。この条件を満たすためには、微小反応槽２の内壁の親水性及びノズル５の外壁の親水性を決めるそれぞれの材料、及び、微小反応槽２の内径とノズル５の先端部の外径の間に一定の条件が成立してなければならない。

[0079] ここで、平面基板（チップ材料）の材質をジメチルポリシロキサン（ＰＤＭＳ）をとし、ノズルの材質をガラスとして、水の接触角を測定したところ、ジメチルポリシロキサンに対する水の接触角は平均９７．９°（最大１０６°）であり、ガラスに対する水の接触角は平均４２．２°（最大５９．０°）であった（いずれもｎ＝１０）。

[0080] 接触角が最大値の場合、式（１）から、懸濁液が上昇するのに必要なノズルの先端の最小外径は４０μｍと導出された。

[0081] 図５は、ノズル先端の外径に対する微粒子充填の成功率を計測した結果を示すグラフである。本計測において、ジメチルポリシロキサンの平面基板をインプリンティング技術を用いて加工して、複数の微小反応槽を形成した。微小反応槽の形状及び寸法は、直径７５μｍ×高さ７０μｍの円筒形とした。図５に示すように、先端の外径が異なる複数のノズルを用いて、本実施形態の方法で微小反応槽に微粒子を充填したところ、ノズル先端の外径が６０μｍ以上の場合に、微粒子充填の成功率が８０％以上となることが分かった。

[0082] 式（１）を用いて計算により算出したノズル先端の最小外径の理論値（４０μｍ）と、図５の計測の結果（６０μｍ以上）との相違は、以下の理由によると考えられる。まず、接触角にはばらつきがあり、ノズルの引き上げの条件は、接触角の平均値をΔＰの式（１）に代入して定められる。ノズルの半径は、このΔＰの条件に対応する値として決定される。ノズルの半径は、ある一定以上の領域（ノズル外周の長さのうちかなりの領域）がΔＰの条件を満たしていないと、引き上げが成功しない。しかし、ノズルは、製造誤差などにより半径がΔＰの条件を満たしていない部分も有するが、この部分も含めてΔＰ＞０が満たされるように引き上げがされる。これにより、図５の計測の結果が、接触角の最大値を用いて算出した理論値よりも大きくなったと考えられる。

[0083] 上述の微粒子充填装置１００の動作においては、ノズル５の先端の外径が７０μｍ（内径５２．５μｍ）のものを使用した場合を想定している。ノズル５と微小反応槽との接触時間を２秒とし、ノズル５の引き上げ速度を１～１０μｍ／ｓとして説明したが、これらの値は、ノズル５の外径や微小反応槽２の径に応じて適宜変更され得ることは言うまでもない。

[0084] ＜技術的効果＞

以上のように、第１の実施形態に係る微粒子充填方法は、ノズルに微粒子の懸濁液を吸引することと、懸濁液中の微粒子を濃縮して、ノズルの先端部に、所定の微粒子濃度の高濃度懸濁液を形成することと、高濃度懸濁液と微小反応槽の内壁を接触させることと、接触後にノズルを容器から離すことで高濃度懸濁液を微小反応槽に充填することと、を含んでいる。このような方法により、従来の微粒子懸濁液を分注して余分な溶液を排除する方式に比べて、微粒子の分注時間を短縮させることができる。また、微小反応槽（容器）への充填前に微粒子を所定の濃度まで濃縮するので、再現性よく、一定量の微粒子を充填することができる。

[0085] 微粒子懸濁液の微小反応槽への充填の原理は、固体表面に対する溶液の表面張力（接触角）を用いた分注であるため、粘度の高い高濃度の微粒子懸濁

液を正確に微小反応槽の上端まで分注することが可能となっている。このような分注方法は、一般的な溶液（微粒子を含まない）の分注方法とは原理が異なっている。

[0086] ［第２の実施形態］

第１の実施形態において、平面基板に形成された微小反応槽に微粒子を充填する技術を説明した。第２の実施形態においては、上述の技術を、単一細胞解析デバイスのチップ（基板）に設けられた微小反応槽への微粒子の充填に適用することを提案する。

[0087] ＜チップの構成例＞

図６（ａ）は、単一細胞解析用のチップ１１（基板）を示す上面図であり、図６（ｂ）は、チップ１１の断面の一部を示す断面図である。チップ１１上には等間隔で１０×１０個の微小反応槽１２が形成されている。微小反応槽１２には、細胞捕捉用の貫通孔１４が設けられ、これにより単一細胞解析用の細胞単離が可能なチップ構造となっている。このような構造のチップ１１は、例えばジメチルポリシロキサン（ＰＤＭＳ）を材料として、インプリンティング技術を用いて成型することができる。貫通孔１４はレーザ加工により穿孔加工できるが、他の粒子ビーム加工や、型による成型加工も可能である。

[0088] チップ１１の材料としては様々な材料を使用することができ、例えば、各種樹脂材料（ポリカーボネート系、ポリシクロオレフィン系、ポリオレフィン系、ポリプロピレン系、ポリエチレン系、アクリル系、アクリロニトリル系樹脂など）、金属材料、シリコンなどの半導体材料、石英やアルミナなどの酸化物材料、ガラスなどの非晶質材料が挙げられる。これらの材料は、加工のため、若しくは表面濡れ性の制御のために、複数の材料を組み合わせて用いることも可能である。

[0089] 図６（ａ）及び（ｂ）には、チップ１１の寸法の一例が示されている。図示の例においては、微小反応槽１２は、直径７５μｍ、高さ７０μｍの円筒形とした。隣接する微小反応槽１２の中心間隔は１０５μｍとした。貫通孔

１４の孔径は一番小さいところで直径３μｍとし、長さは３０μｍとした。なお、上記のサイズは単一細胞解析デバイスに適したサイズの一例であり、微粒子充填対象となる微小反応槽１２のサイズとしては、直径及び高さともに数μｍ～数百μｍまでいずれでもよい。また、微小反応槽１２の形状も円筒形である必要はなく、微粒子の充填が可能な開口部があれば、四角柱などの多角柱や、円錐台、四角推台などのテーパ状の形状でもよい。

[0090] 単一細胞解析デバイスにおいて、チップ１１の微小反応槽１２に充填される微粒子は、単一細胞中のｍＲＮＡの量を遺伝子配列ごとに計測する遺伝子発現解析を行うための微粒子である。解析目的に応じて、微粒子に固定する分子を変更することで、様々な単一細胞解析に応用することが可能となる。

[0091] 本実施形態においては、ストレプトアビジン分子が表面に多数固定された磁性微粒子（直径１μｍ）を用いることとする。単一細胞解析に用いるためには、微粒子表面に計測対象であるｍＲＮＡを捕捉し、細胞識別用のバーコード配列を核酸サンプルに導入するために、ＤＮＡプローブを固定する。ＤＮＡプローブの５’末端には、ストレプトアビジンと強固に結合するためのビオチンが固定されている。

[0092] ＤＮＡプローブの配列は、５’末端から順に、ＰＣＲ用の共通配列、分子認識用タグ配列、細胞識別用タグ配列（７ベース）、３’末端にｍＲＮＡ捕捉用のＴの連続配列を持つ。ＤＮＡプローブの配列を配列番号１～１００に示す。細胞識別用タグ配列は７ベースの既知の１００種類の配列であり、分子認識用タグ配列は７ベースのランダム配列である。

[0093] 細胞識別用タグ配列の長さや位置は、上記と異なっていても構わない。例えば、３種類の７ベースの既知配列が２か所の３ベースの既知配列を挟む形で配置されていてもよいし、既知配列ではなくランダム配列として配置することも可能である。分子認識用タグ配列も同様に、長さや配置を変更することが可能である。

[0094] 微粒子上にＤＮＡプローブを固定する方法は、以下の通りである。まず、細胞識別用タグ配列が異なるＤＮＡプローブ間での混ざりこみがないように

注意しながら、１ｘＢ＆Ｗバッファ（５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１Ｍ　ＮａＣｌ）中で、微粒子とＤＮＡプローブを混和し、３０分程度室温で結合反応させる。その後、１ｘＢ＆Ｗバッファで２回洗浄後、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０バッファで再懸濁することで微粒子懸濁液を得る。微粒子懸濁液として、細胞識別用タグ配列の異なる１００種類を異なる１００本の保存チューブ中に準備した。

[0095] ＜ＤＮＡプローブ固定微粒子のチップへの充填＞

ＤＮＡプローブが固定された微粒子をチップ１１に充填する方法について説明する。

[0096] 図７は、第２の実施形態に係る微粒子充填装置２００を示す模式図である。微粒子充填装置２００の構成は、第１の実施形態の微粒子充填装置１００（図３）とほぼ同様であるので、相違点のみを説明する。微粒子充填装置２００は、各構成要素の制御装置として、制御ボード２０１、画像取得ボード２０２、ＡＤ変換ボード２０３、制御コンピュータ２０４を備える。図７中の二重線は、信号の送信又は受信（伝送）が可能に接続されていることを示している。

[0097] 制御ボード２０１は、駆動システム１０２、分注システム１０５及びバルブ１０８の駆動を制御する。本実施形態においては、駆動システム１０２は、チップ１１が載置されるステージ１０１と、保存容器１０６ａ及び１０６ｂが載置されるステージ１１１とを三軸方向に移動させる。

[0098] 画像取得ボード２０２は、光学システム１０３及びカメラシステム１０７の動作を制御し、光学システム１０３及びカメラシステム１０７が取得した信号若しくは画像を受信する。

[0099] ＡＤ変換ボード２０３は、センサシステム１０４からのアナログ信号をデジタル信号に変換する。

[0100] 制御コンピュータ２０４には、微粒子充填装置２００の制御プログラムが格納され、制御プログラムに従って制御ボード２０１、画像取得ボード２０２、ＡＤ変換ボード２０３を制御する。

[0101] ノズル５は、直径１ｍｍ～３ｍｍのガラス管を引き延ばすことで先端を先鋭化することで作製したものを用いた。ガラス管の加工にはプーラー及びマイクロフォージを用いた。ノズル５を、管１０９を用いて分注システム１０５に接続して、微粒子懸濁液を吸引し、ノズル５を洗浄できるようにした。分注システム１０５を用いる代わりに、ノズル５をシリンジに接続して、このシリンジの駆動を制御ボード２０１により制御するようにしてもよい。

[0102] 上述の１００種類の異なる細胞識別タグが固定された微粒子の懸濁液が収容された保存容器１０６ａは、容器ステージ１１１に設置される。容器ステージ１１１には、保存容器１０６ａを振動若しくは回転させる回転モータを設けてもよく、これにより、ノズル５での吸引直前に微粒子懸濁液が均一な溶液となるように、保存容器１０６ａを攪拌することができる。また、容器ステージ１１１には、例えば、洗浄液を収容する保存容器１０６ｂとして、フィルタろ過したイオン交換水（純水）を収容する容器が３本、１００％ＥｔＯＨを収容する容器が１本、設置される。保存容器１０６ａ及び１０６ｂは、例えばマイクロチューブである。

[0103] 微粒子充填装置２００の制御コンピュータ２０４は、制御プログラムに従い、以下の動作を実行する。なお、微粒子充填装置２００の動作は、基本的には第１の実施形態（図４）と同様である。

[0104] 制御コンピュータ２０４は、画像取得ボード２０２を介して、カメラシステム１０７の撮像画像を受信し、撮像画像に基づいて、充填すべき微小反応槽１２の位置を確認する。

[0105] 制御コンピュータ２０４は、制御ボード２０１により、大気圧解放用のバルブ１０８を閉じ、駆動システム１０２及び分注システム１０５を駆動して、ノズル５での純水の吸引及び吐出を数回繰り返し、次いで、１００％ＥｔＯＨの吸引及び吐出を数回繰り返す。これによりノズル５内を洗浄する。

[0106] 制御コンピュータ２０４は、制御ボード２０１により、バルブ１０８を開放し、駆動システム１０２を駆動してノズル５を微粒子懸濁液の保存容器１０６ａに浸漬させて、毛細管現象により微粒子懸濁液をノズル５内に吸引す

る。

[0107] 制御コンピュータ２０４は、制御ボード２０１により、駆動システム１０２を駆動して、微粒子を充填すべき微小反応槽１２をノズル５の直下に移動させ、ノズル５を所定の位置まで降下させる（あるいは、チップ１１を上昇させる）。

[0108] 制御コンピュータ２０４は、画像取得ボード２０２を介して、光学システム１０３によるノズル５の先端部の光学特性の検出信号若しくは画像を受信して、微粒子の沈降及び高濃度懸濁液の高さ（体積若しくは微粒子量）を確認する。

[0109] 制御コンピュータ２０４は、所定量の高濃度懸濁液が形成されたことを確認した後に、制御ボード２０１に指示を送信し、駆動システム１０２を駆動して、センサシステム１０４の数値に変化が見られるまでノズル５を降下させる（あるいは、チップ１１を上昇させる）。具体的には、高濃度懸濁液の高さが９５μｍになったときに、ノズル５の降下を開始する。

[0110] 制御コンピュータ２０４は、制御ボード２０１により、駆動システム１０２を駆動して、ノズル５の先端が微小反応槽１２の底部に接した後（センサシステム１０４が接触を検知した後）、ノズル５を２秒間静止させ、ノズル５を１μｍ／ｓの速度で上昇させる。

[0111] 図８は、センサシステム１０４の構成の一例を示す斜視図である。図８に示すように、センサシステム１０４は、２つのフェルール９２、ブロック９３、２枚の板バネ９４（弾性体）、固定治具９５及びひずみセンサ９６を有する。

[0112] ２つのフェルール９２は、ノズル５と管１０９を接続する。フェルール９２は、ブロック９３（例えばＰＭＭＡ製）に固定される。

[0113] ２枚の板バネ９４の長手方向の一端部は、ブロック９３にねじ止めされて固定される。板バネ９４の長手方向の他端部は、金属製の固定治具９５に固定される。このような構成により、ノズル５に応力が加わると、応力がブロック９３を経由して板バネ９４に伝わり、板バネ９４が撓む（変形する）。

[0114] 各板バネ９４には、板バネ９４の面に沿うようにひずみセンサ９６が固定されている。ノズル５の先端が微小反応槽１２の底面に接触して、ノズル５に上方向の力（応力）が印加されると、板バネ９４が撓み、この撓み量をひずみセンサ９６が検出する。撓み量が所定値以上となった場合に、ノズル５が微小反応槽１２に接触したと判断することができる。

[0115] ＜単一細胞解析デバイス＞

図９は、単一細胞解析デバイスに用いられるフローセルデバイス２０の模式図である。図９に示すように、フローセルデバイス２０は、樹脂製（例えばＰＭＭＡ）の上側プレート２１及び下側プレート２２を備え、上側プレート２１及び下側プレート２２の間に、チップ１１（図６参照）が挟み込まれて固定されている。フローセルデバイス２０に組み込まれるチップ１１は、上述の微粒子充填装置２００を用いて、ＤＮＡプローブが固定された微粒子を微小反応槽１２に充填した状態のものである。この状態のチップ１１は、「Ｖｅｒｔｉｃａｌ　Ｆｌｏｗ　Ａｒｒａｙ　Ｃｈｉｐ（ＶＦＡＣ）」と呼ばれることがある。

[0116] 図９の例においては、フローセルデバイス２０は、１２個のチップ１１を搭載することができるが、チップ１１の数は任意に選択できる。

[0117] 上側プレート２１には、チップ１１の数と同じ数だけウェル２３が設けられており、ウェル２３から、チップ１１へ細胞サンプルや洗浄液、酵素試薬などを供給することができる。ウェル２３の底面はチップ１１の上面（貫通孔１４が形成されている側の面）に対応する。すなわち、微粒子が充填されたチップ１１を単一細胞解析デバイスにて使用する場合には、上下方向の向きは図６（ｂ）の向きとなる。貫通孔１４は微小反応槽１２の１つ１つに設けられており、貫通孔１４及び微小反応槽１２からなる流路はチップ１１の上面から下面まで貫通している。下側プレート２２には、微小反応槽１２から外部に通ずる流路２４が設けられており、流路２４には吸引ポンプ（不図示）が接続される。吸引ポンプにより流路２４に負圧を印加することにより、ウェル２３から供給され、貫通孔１４及び微小反応槽１２を通過してきた

試薬を排出することができる。

[0118] 流路２４を形成するための下側プレート２２は、複数層のプレートを貼り合わせて形成することができる。上側プレート２１及び下側プレート２２は切削加工により加工できる。

[0119] ＜単一細胞解析の実施＞

フローセルデバイスを用いて単一細胞解析を行った実験例を説明する。

[0120] （Ｓｔｅｐ１）

１．０μＬ中に７０～１００個程度の細胞を懸濁した細胞溶液と、１．０μＬのＰＢＳバッファを、マニュアルピペットを用いてチップ上に滴下した。その後、直ちに、９０ｋＰａ以上の負圧を印加し、細胞をＶｅｒｔｉｃａｌ Ｆｌｏｗ Ａｒｒａｙ Ｃｈｉｐ（ＶＦＡＣ）上に捕捉した。細胞の捕捉は１～２分で完了する。細胞懸濁液が完全に吸引されたことを確認後、負圧をかけたまま、１％ＳＤＳと１０％ＲＮａｓｅ ＯＵＴを含む細胞リシスバッファ（０．５Ｍ ＮａＣｌと１０ｍＭ ＥＤＴＡ、１％ＳＤＳを含む１００ｍＭ Ｔｒｉｓ：ＨＣｌ ｐＨ８．０）０．５μＬをチップ上に滴下し、１分間リシス溶液を吸引しながら、細胞を破砕する。その後、高塩濃度バッファ（０．５Ｍ ＮａＣｌと１０ｍＭ ＥＤＴＡ １００ｍＭ Ｔｒｉｓ：ＨＣｌ ｐＨ８．０）２．０μＬを滴下後２分吸引し、さらに同じバッファを２．０μＬ滴下後２分吸引することで、微小反応槽中のリシスバッファを洗浄した。その後、急激な圧力変化によってＶＦＡＣチップが変形することを避けるために、２分かけて大気圧に戻した。

[0121] （Ｓｔｅｐ２）

１チップあたり４．５μＬの逆転写酵素溶液を分注し、フローセルと５ｍＬシリンジをシリコンチューブで接続し、１．７ｃｍのスペーサを用いて８秒だけ吸引して、試薬を微小反応槽内に誘導した後、５０℃で５０分間逆転写反応を行った。逆転写酵素量はチューブ中の単一細胞解析に使用する量と同程度であり、使用する試薬量は１個のチップに採取できる細胞数分だけ低減できることになる。また、提案方法では１チップを１チューブで反応処理

しているため、１チューブ１細胞のプレートベースの方法に比べて、１チップで処理できる細胞数に逆比例して処理の手間も低減することが可能である。

[0122] （Ｓｔｅｐ３）

次のステップの２ｎｄ　ｓｔｒａｎｄの合成を阻害しないように、ｃＤＮＡにハイブリダイズしているｍＲＮＡを分解した。

[0123] （Ｓｔｅｐ４）

計測したい遺伝子に対応するプライマ（これを遺伝子特異的プライマと呼ぶ）を１ｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡにハイブリダイズさせて、２ｎｄ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡを合成する。

[0124] （Ｓｔｅｐ５）

共通プライマを用いてＰＣＲ増幅し、増幅時に目的産物以外のＰＣＲ産物（非特異増幅産物）を除去するために、Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ社製のＡＭｐｕｒｅ微粒子を用いた核酸の塩基長による選択・精製を実施した。得られたサンプルをＡｇｉｌｅｎｔ社製の２１００　ＢｉｏａｎａｌｙｚｅｒとＡｇｉｌｅｎｔ　Ｈｉｇｈ　Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　ＤＮＡ　キット電気泳動でフラグメント解析し、目的産物を定量した。

[0125] （Ｓｔｅｐ６）

Ａｍｐｕｒｅ微粒子による精製を行った後に、定量ＰＣＲにて目的産物を定量し、目的産物濃度が２ｎＭになるように、希釈又は蒸発濃縮によって濃度を調整した。Ｄｅｎａｔｕｒｅ後Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）　Ｍｉｓｅｑ（登録商標）に導入し、シーケンシングを行った。

[0126] 得られたシーケンシングデータから、細胞識別タグごとにデータを分割し、分子認識タグを用いて、ＰＣＲ増幅前の分子をカウントすることで、微小反応槽に捕捉された細胞別の単一細胞遺伝子発現解析データを得ることができる。

[0127] ＜技術的効果＞

以上のように、第２の実施形態において、第１の実施形態と同様の微粒子

充填方法を採用して、単一細胞解析用のチップ１１に形成された微小反応槽１２に、ＤＮＡプローブが固定された微粒子を充填できることが示された。複数の微小反応槽１２のそれぞれに対し高密度に再現性良く微粒子を充填することができるので、結果として、同時に多数の細胞についての単一細胞解析の結果を再現性良く取得することができ、高感度の単一細胞解析デバイスを得ることができる。

[0128] ［第３の実施形態］

第１及び第２の実施形態では、重力による微粒子の沈降によって、ノズル内の微粒子懸濁液を濃縮して高濃度懸濁液を取得し、微小反応槽に充填する手法を説明した。これに対し、第３の実施形態においては、磁力を用いて高濃度懸濁液を形成する技術を提案する。

[0129] 図１０は、第３の実施形態に係る微粒子充填方法を説明するための概略断面図である。図１０においては、第１の実施形態で説明した工程（ｉｉ）が工程（ｉｉ－１）～（ｉｉ－３）に細分化して示されている。本方法において、磁力線を集中させるための鉄製コーン３０１が取り付けられた磁石３００を用いる。また、本方法において、微粒子として磁性微粒子が用いられる。

[0130] ノズル５に微粒子懸濁液６を吸引して初期状態を構築後、工程（ｉｉ－１）において、磁石３００がノズル５に吸引された微粒子懸濁液６の上部に位置するように、ノズル５又は磁石３００の位置を制御する。これにより、微粒子が磁石３００の付近に集まり、高濃度懸濁液７が形成される。磁石３００の位置は、不図示の駆動システムにより制御される。

[0131] 工程（ｉｉ－２）において、ノズル５を磁石３００に対して相対的に上方（矢印３０２の方向）に所定の速度（１μｍ／ｓ以下）で移動させ、ノズル５内の高濃度懸濁液７の位置を下降させる。

[0132] 工程（ｉｉ－３）において、ノズル５の先端まで高濃度懸濁液７が到達したら、磁石３００の移動を停止する。これにより、所定の量の高濃度懸濁液７をノズル５の先端に形成することができる。

[0133] 工程（ｉｉ－３）が完了したら、第１及び第２の実施形態と同様にして、微小反応槽内へノズル５を下降させ、微粒子を充填することができる。

[0134] 工程（ｉｉ－１）において、微粒子懸濁液６の上端界面に近いところに磁石３００を配置して、（ｉｉ－３）の位置まで適切な速度で移動させることで、微粒子懸濁液６中のすべての微粒子を高濃度懸濁液７として濃縮することが可能である。

[0135] 図１１は、ノズル５の引き上げ速度と高濃度懸濁液７中の微粒子数の関係を示すグラフである。図１１に示すように、ノズル５を磁石３００に対し１μｍ／ｓよりも早い速度（相対速度）で引き上げると、微粒子濃度が十分に高められず、微粒子をすべて集めることができていないことがわかる。

[0136] また、微粒子懸濁液の界面が、磁石３００がノズル５に最初に接近する位置と（上方に）十分離れている場合でも、磁石３００のノズル５への接近速度を制御することで、高濃度懸濁液７中の微粒子量を制御することが可能である。

[0137] 微粒子として、電荷若しくは誘電性を有するものを用いる場合は、磁石３００の代わりに、ノズル５に電気的な力を印加して（電場を形成するなど）、微粒子を集める機構を用いることができる。

[0138] ＜技術的効果＞

以上のように、第３の実施形態において、磁力を用いて高濃度懸濁液を形成する方法を採用している。これにより、重力によりノズル内の微粒子を沈降させて濃縮する場合と比較して、ノズルの先端部に微粒子の高濃度懸濁液を形成するための時間を短縮することができる。

[0139] ［変形例］

本開示は、上述した実施形態に限定されるものでなく、様々な変形例を含んでいる。例えば、上述した実施形態は、本開示を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備える必要はない。また、ある実施形態の一部を他の実施形態の構成に置き換えることができる。また、ある実施形態の構成に他の実施形態の構成を加えることも

できる。また、各実施形態の構成の一部について、他の実施形態の構成の一部を追加、削除又は置換することもできる。

## 符号の説明

[0140] １００、２００　微粒子充填装置

１　平面基板

２　微小反応槽

３ａ　微小反応槽の底面

３ｂ　微小反応槽の側壁面

４　貫通孔

５　ノズル

６　微粒子懸濁液

７　高濃度懸濁液

８　溶液

９　ノズルの外壁

１１　チップ

１２　微小反応槽

１４　貫通孔

１０１　ステージ

１０２　駆動システム

１０３　光学システム

１０４　センサシステム

１０５　分注システム

１０６　保存容器

１０７　カメラシステム

１０８　バルブ

１０９　管

１１０　制御システム

２０１　制御ボード

２０２　画像取得ボード

２０３　ＡＤ変換ボード

２０４　制御コンピュータ

３００　磁石

３０１　鉄製コーン

# 請求の範囲

[請求項1] 少なくとも１つ以上の容器に微粒子を充填する方法であって、

ノズルに前記微粒子の懸濁液を吸引することと、

前記懸濁液中の前記微粒子を濃縮して、前記ノズルの先端部に、所定の微粒子濃度の高濃度懸濁液を形成することと、

前記高濃度懸濁液と前記容器の内壁を接触させることと、

前記接触後に前記ノズルを前記容器から離すことで前記高濃度懸濁液を前記容器に充填することと、を含む微粒子充填方法。

[請求項2] 前記ノズルに加わる応力に基づいて、前記高濃度懸濁液と前記容器の内壁との前記接触を検知することをさらに含む、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項3] 前記ノズルの外径は、前記ノズルの先端が前記容器の底面まで到達可能な大きさである、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項4] 前記ノズルの撮像画像又は前記ノズルの光学特性により、前記高濃度懸濁液中の前記微粒子が所定の微粒子濃度に達したと判定することをさらに含む、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項5] 前記微粒子の比重が１より大きく、重力により前記微粒子を沈降させることにより前記ノズルの先端部に前記高濃度懸濁液を形成する、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項6] 前記微粒子が磁性微粒子であり、磁石により前記ノズル内の前記微粒子を前記ノズルの先端部に集めることで、前記高濃度懸濁液を形成する、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項7] 前記容器は、単一細胞解析用チップに形成された微小反応槽であり、前記微小反応槽は底部に貫通孔を有する、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項8] 前記所定の微粒子濃度は、単位体積あたりの前記微粒子の数が最密充填密度の５０％以上となる濃度である、請求項１に記載の微粒子充填方法。

[請求項9] 少なくとも１つ以上の容器に微粒子を充填する装置であって、

ノズルと、

前記ノズルへの前記微粒子の懸濁液の吸引を制御する分注システムと、

前記容器と前記ノズルとの相対位置を制御する駆動システムと、

前記分注システム及び前記駆動システムを制御する制御システムと、を備え、

前記制御システムは、

前記分注システムにより、前記ノズルに前記懸濁液を吸引させる処理と、

前記懸濁液中の前記微粒子を濃縮して、前記ノズルの先端部に、所定の微粒子濃度の高濃度懸濁液を形成させる処理と、

前記駆動システムにより、前記高濃度懸濁液と前記容器の内壁を接触させる処理と、

前記駆動システムにより、前記接触後に前記ノズルを前記容器から離すことで前記高濃度懸濁液を前記容器に充填する処理と、

を実行する微粒子充填装置。

[請求項10] 前記ノズルの画像又は光学特性を取得する光学システムをさらに備え、

前記制御システムは、

前記光学システムが取得した前記画像又は前記光学特性に基づいて、前記高濃度懸濁液中の前記微粒子が所定の微粒子濃度に達したと判定する、請求項９に記載の微粒子充填装置。

[請求項11] 前記ノズルに加わる応力に基づいて、前記高濃度懸濁液と前記容器の内壁との前記接触を検知するセンサシステムをさらに備える、請求項９に記載の微粒子充填装置。

[請求項12] 前記センサシステムは、

前記ノズルを固定し、前記ノズルに応力が加わることにより変形す

る弾性体と、

前記弾性体の変形を検知するセンサと、を有し、

前記制御システムは、

前記センサの検知信号に基づいて前記接触を検知する、請求項１１に記載の微粒子充填装置。

[請求項13] 前記微粒子が磁性微粒子であり、

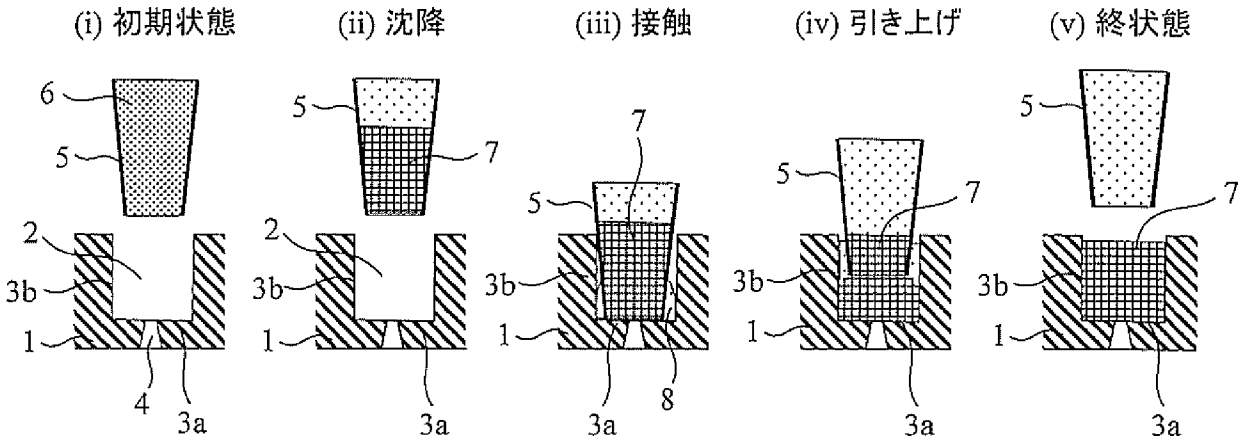
前記微粒子充填装置は、

前記ノズルに対し外部から磁力を印加する磁石をさらに備え、

前記駆動システムにより、前記磁石を前記ノズルに近づけた状態で前記ノズルを前記磁石に対し引き上げることにより、前記高濃度懸濁液を形成する、請求項９に記載の微粒子充填装置。

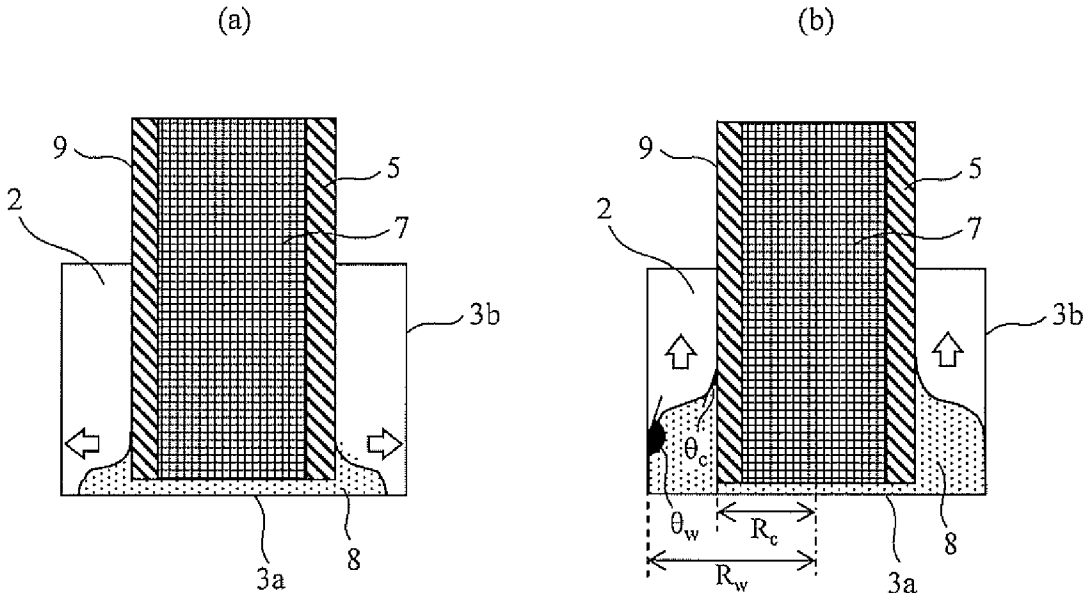
[図1]

図 1


(i) 初期状態
(ii) 沈降
(iii) 接触
(iv) 引き上げ
(v) 終状態
6
5
7
2
3b
1
4
3a
8

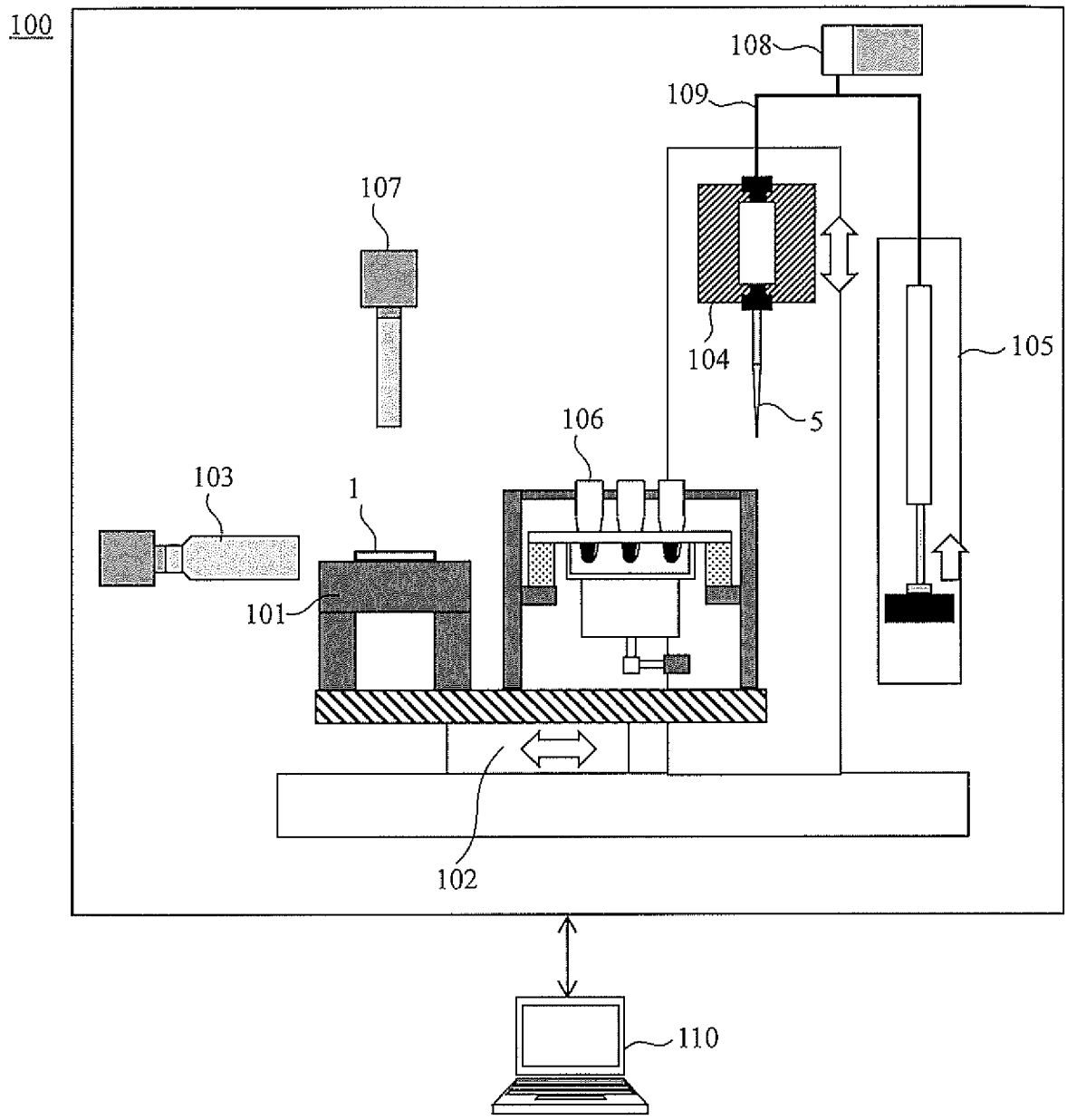
[図2]

図 2


(a)
(b)
9
5
7
2
3b
3a
8
θc
θw
Rc
Rw

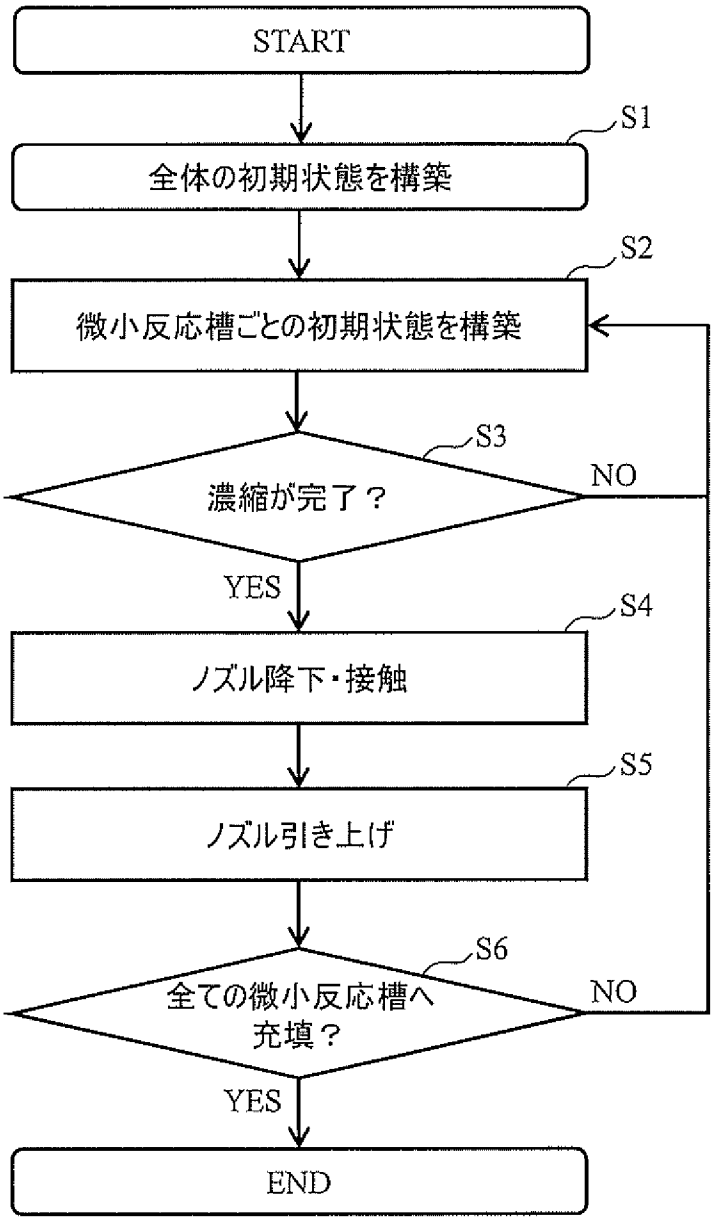
[図3]

図 3



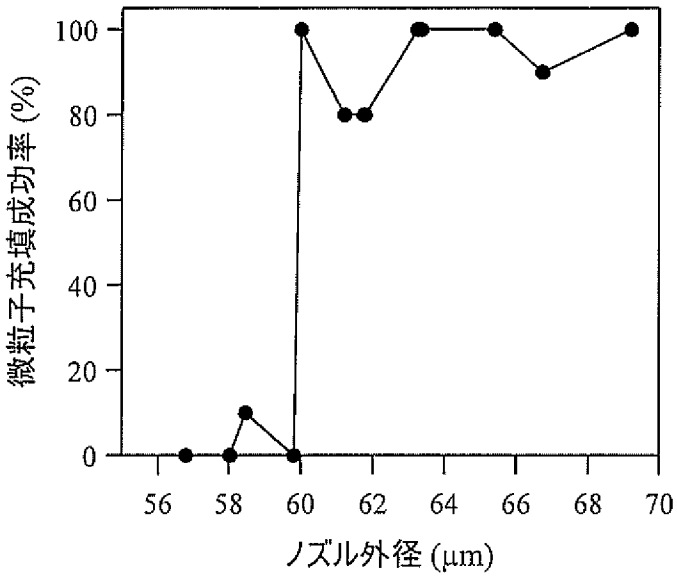
[図4]

図４


START
S1
全体の初期状態を構築
S2
微小反応槽ごとの初期状態を構築
S3
濃縮が完了？
NO
YES
S4
ノズル降下・接触
S5
ノズル引き上げ
S6
全ての微小反応槽へ
充填？
NO
YES
END

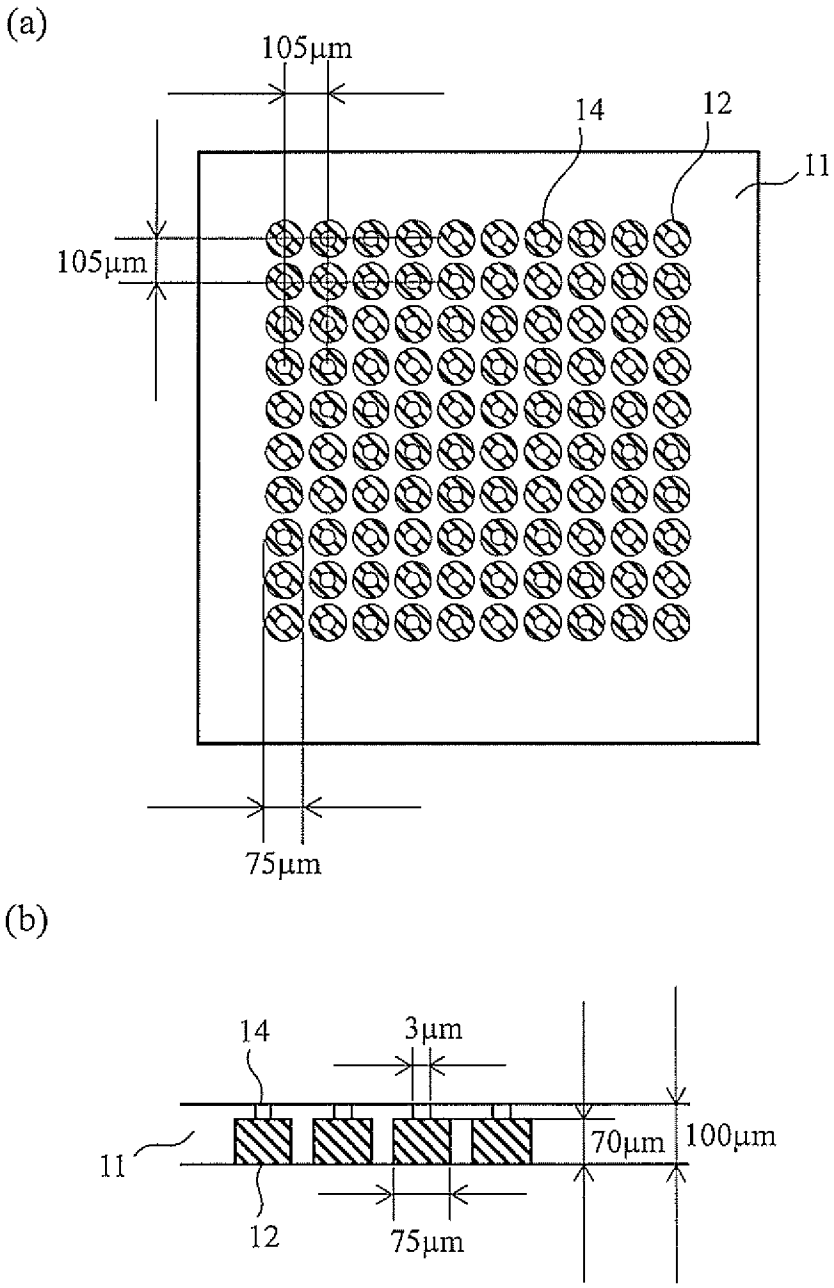
[図5]

図５



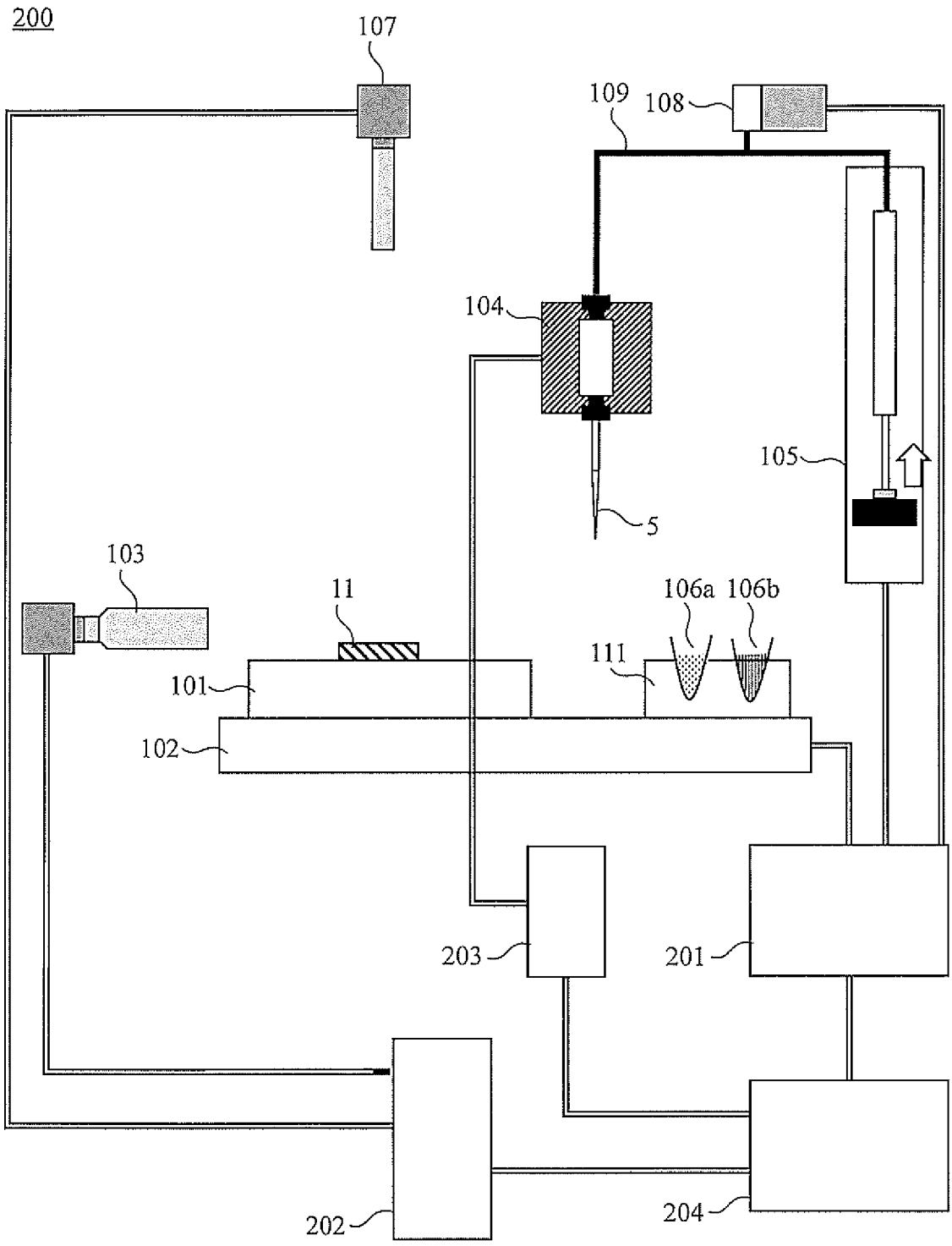
[図6]

図 6



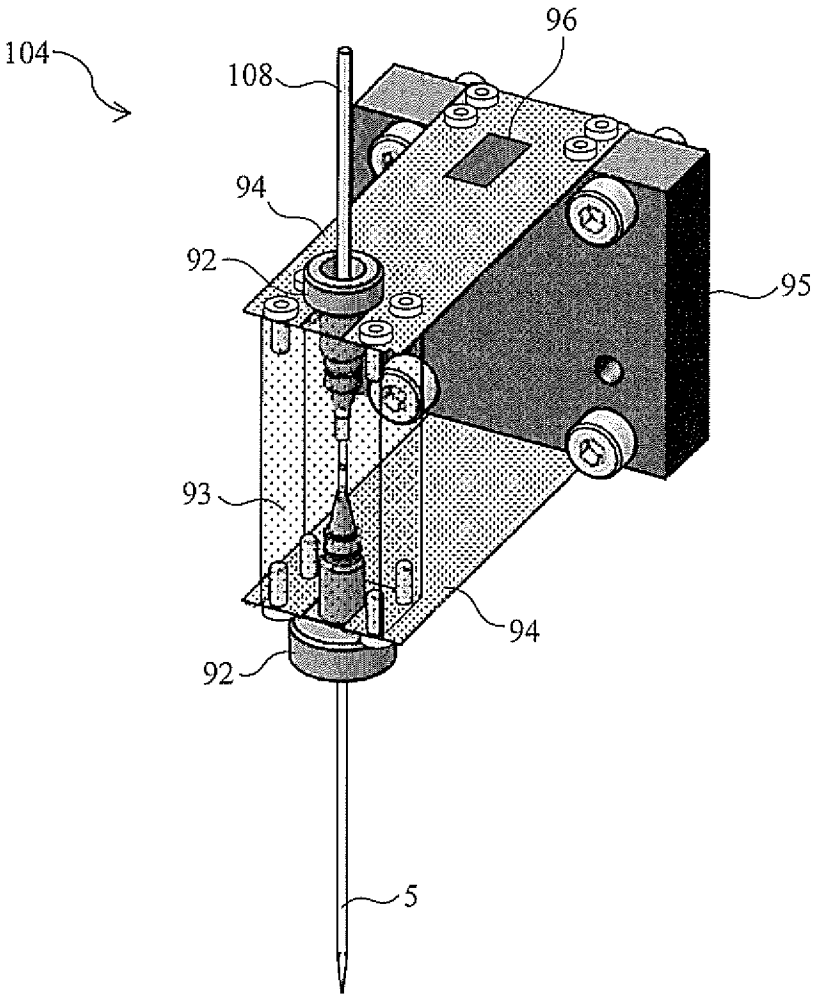
[図7]

図 7


200
107
109
108
104
105
5
103
11
106a
106b
111
101
102
203
201
202
204

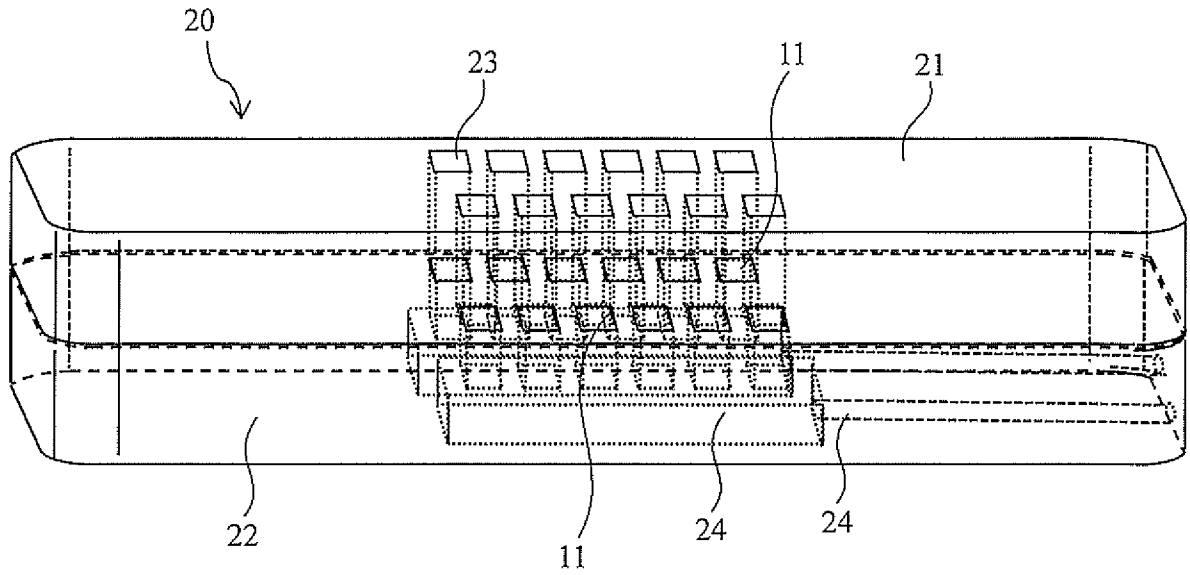
[図8]

図８



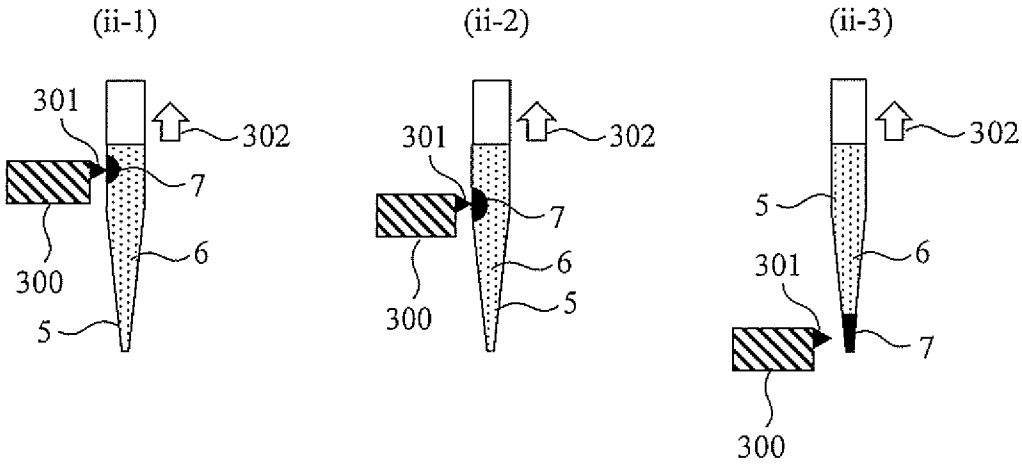
[図9]

図９


20
23
11
21
22
11
24
24

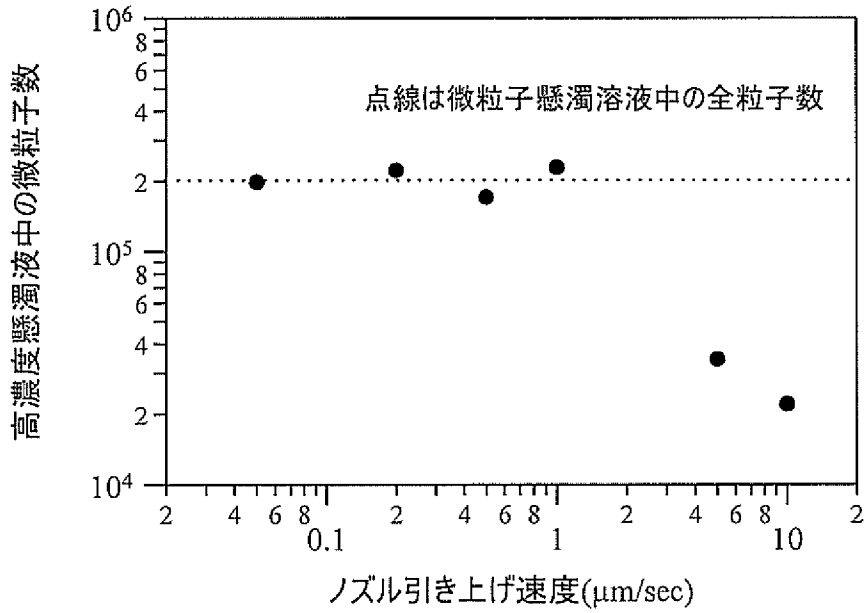
[図10]

図１０


(ii-1)
301
302
7
6
300
5
(ii-2)
301
302
7
6
5
300
(ii-3)
302
5
6
301
7
300

[図11]

図１１


高濃度懸濁液中の微粒子数
点線は微粒子懸濁溶液中の全粒子数
ノズル引き上げ速度(μm/sec)
10^6
10^5
10^4
0.1
1
10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/010031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl. C12M1/00(2006.01)i
FI: C12M1/00 A

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)
Int. Cl. C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | WO 2017/056274 A1 (HITACHI, LTD.) 06 April 2017, examples 1-1, fig. 3 | 1-13 |
| A | WO 2016/125251 A1 (HITACHI, LTD.) 11 August 2016, paragraphs [0086]-[0092], fig. 5 | 1-13 |

☐ 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 26.05.2020 | 09.06.2020 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japan Patent Office<br>3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,<br>Tokyo 100-8915, Japan | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/010031

| Patent Documents referred to in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| WO 2017/056274 A1 | 06.04.2017 | (Family: none) | |
| WO 2016/125251 A1 | 11.08.2016 | US 2018/0304262 A1 paragraphs [0124]-[0131], fig. 5 | |

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/010031

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12M 1/00(2006.01)i
FI: C12M1/00 A

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））

C12M1/00

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 | １９７１－２０２０年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２０２０年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２０２０年 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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 |
|---|---|---|
| A | WO 2017/056274 A1 (株式会社日立製作所) 06.04.2017 (2017-04-06)<br>実施例１－１、図３ | 1-13 |
| A | WO 2016/125251 A1 (株式会社日立製作所) 11.08.2016 (2016-08-11)<br>段落[0086]-[0092]、図５ | 1-13 |

☐ 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抵触するものではなく、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 | 国際調査報告の発送日 |
|---|---|
| 26.05.2020 | 09.06.2020 |

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
金田　康平 4N 5373
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/010031

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/010031

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|---|---|---|---|
| WO 2017/056274 A1 | 06.04.2017 | （ファミリーなし） | |
| WO 2016/125251 A1 | 11.08.2016 | US 2018/0304262 A1<br>段落[0124]-[0131]、図５ | |