

(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
2017 年 10 月 5 日(05.10.2017)



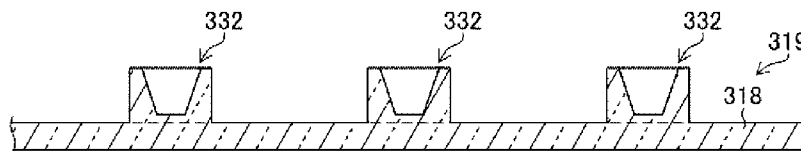
(10) 国際公開番号

WO 2017/169198 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 1/24 (2006.01) G01N 21/01 (2006.01)
C12M 1/28 (2006.01) G01N 21/17 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005200
- (22) 国際出願日: 2017 年 2 月 14 日(14.02.2017)
- (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 2016-064093 2016 年 3 月 28 日(28.03.2016) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社(FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布 2 丁目 2 6 番 3 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 金子 泰久(KANEKO Yasuhisa); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台 7 9 8 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 中島 順子, 外(NAKASHIMA Junko et al.); 〒2500111 神奈川県南足柄市竹松 1 2 5 0 番地 F F T P M O 棟 6 F Kanagawa (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: LID FOR TUBE FOR LIFE SCIENCES, TUBE SET FOR LIFE SCIENCES, AND CELL SEPARATION METHOD

(54) 発明の名称: ライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットおよび細胞の選別方法



(57) Abstract: The present invention provides a lid for a tube for the life sciences that can be handled efficiently, a tube set, and a cell separation method. Provided is a lid 32 that has a recess 34 on the surface that is on the tube side when attached, wherein the bottom surface 34a of the recess 34 is flat and has a circular shape or a polygonal shape having four or more sides, and a side surface 34b comprises a surface that is inclined in a direction that widens from the bottom surface 34a toward an opening. Further provided are a tube set consisting of the lid 32 and a tube 50 that is used in combination therewith, and a cell separation method using said lid 32.

(57) 要約: 効率良く操作を行うことができるライフサイエンス用チューブの蓋、チューブセットおよび細胞の選別方法を提供する。取り付けの際に、ライフサイエンス用チューブ側になる面に凹部 34 を有し、凹部 34 の底面 34 a が平坦で、かつ、円形または四角形以上の多角形であり、側面 34 b が底面 34 a から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなる蓋 32 である。また、蓋 32 と合わせて使用されるチューブ 50 とのチューブセット、および、蓋 32 を用いた細胞の選別方法である。

WO 2017/169198 A1

明 細 書

発明の名称：

ライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットおよび細胞の選別方法

技術分野

[0001] 本発明は、ライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットおよび細胞の選別方法に係り、特に、細胞の画像解析に適したライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットおよびライフサイエンス用チューブの蓋を用いた細胞の選別方法に関する。

背景技術

[0002] 複数の細胞から目的細胞を取得する方法として、フローサイトメトリーにより、目的細胞を分取することが行われている。フローサイトメトリーは、微細な細胞を流体中に分散させ、その流体を細かく流して、個々の細胞を光学的に分析し、この分析結果に基づいて取得する細胞の判定、および、分取を行うものである。

[0003] また、複数の細胞をまとめてウエルスライド上に滴下し、微小なウエルに細胞を落とし、撮影、画像の解析を行い、目的細胞を特定する。その後、特定した目的細胞をキャピラリーにより吸引し、PCR (polymerase chain reaction) プレートもしくはチューブに移す操作が行われている。

[0004] 遺伝子解析装置に用いられる容器として、例えば、下記の特許文献1には、PCR用途に使用されるチューブに、取り外し可能な蓋を有する反応容器が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2011-072263号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献1で用いられる反応容器の蓋は、内部に收容する反応液が蒸発して消失することを防止するために密閉するために用いられることが記載されているのみである。したがって、特許文献1に記載されている反応容器についても、他の装置、方法を用いて目的細胞を判定した後、反応容器に分取する必要があり、操作フローが煩雑、時間がかかる、また、操作に使用される装置、器具が高額であるという問題があった。

[0007] また、フローサイトメトリーにおいては、分取した細胞の中において、目的以外の細胞が混入するケースがあり、目的の細胞である割合は、数割程度である。そのため、フローサイトメトリーにより分取した細胞の全てに対して、解析、または解析のための前処理を行うことは非効率であった。また、PCRプレートもしくはPCRチューブの底面は、平坦ではないため、フォーカスが合わせられず、PCRプレート上もしくはPCRチューブ内での細胞の観察はできていなかった。

[0008] 本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであり、蓋を用いて画像解析を行うことにより、その後の解析、または、解析の前処理を、効率良く行うことができるライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットおよび細胞の選別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

[0009] 本発明は、上記目的を達成するために、ライフサイエンス用チューブの蓋であって、ライフサイエンス用チューブ側に凹部を有し、凹部の底面が平坦で、かつ、円形または四角形以上の多角形であり、側面が底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなるライフサイエンス用チューブの蓋を提供する。

[0010] 本発明のライフサイエンス用チューブの蓋によれば、ライフサイエンス用チューブの蓋のライフサイエンス用チューブが装着される面側に凹部を有し、この凹部の底面を平坦とすることにより、凹部内の検体の画像を撮像することができる。蓋の凹部の底面を平坦とすることにより、凹部内の検体に焦

点を合わせることができ、良好な画像を撮像することができる。

[0011] また、凹部の側面を底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面とすることにより、開口部を広くすることができ、検体を凹部内に入り易くすることができる。また、底面に向かって狭くすることにより、底面のサイズを小さくすることができ、検体に対する底面のサイズを所定の範囲とすることができる。したがって、検体の画像解析において、1視野による撮影により、底面全体を撮像することができ、効率良く撮像、検体の画像解析を行うことができる。

[0012] また、側面を開口部に向かって広がる方向の傾斜面とすることにより、培養液中の気泡を抜き易くすることができ、気泡により光が屈折することを防止することができ、良好な画像を撮像することができる。

[0013] なお、本明細書において、「ライフサイエンス用」とは、細胞や生体分子を取り扱うことをいい、より具体的には、細胞の培養、検出、分離、精製、分析および評価や、生体分子を含む化合物の合成、検出、分離、精製、分析および評価などに用いられるものをいい、「ライフサイエンス用チューブ」とは、ライフサイエンスの用途に用いられる容器のことをいう。

[0014] また、「ライフサイエンス用チューブ側」とは、ライフサイエンス用チューブが装着される面側であり、ライフサイエンス用チューブとともに使用した場合、ライフサイエンス用チューブの蓋とチューブとの間において空間を形成する面側のことをいう。

[0015] 本発明の別の態様においては、側面は、底面に対して異なる角度を有する二段以上の傾斜面を有することが好ましい。

[0016] この態様によれば、蓋の凹部の側面を、底面に対して異なる角度を有する二段以上の傾斜面とすることにより、凹部の側面の設計の自由度を増すことができる。例えば、凹部の開口部側の角度を大きくすることにより、検体を凹部内により入り易くすることができる。また、側面の底面側の角度を小さくすることにより、底面を狭くすることができ、撮像する際の倍率を高くしても、1枚の画像により底面を撮像することができる。側面の底面側の角度

を大きくすることにより、凹部内に導入された検体が側面にとどまることを防止し、底面まで落とすことができる。

[0017] 本発明の別の態様においては、底面の大きさは、外接する円に近似した時の直径が0.05mmφ以上1mmφ以下であることが好ましい。

[0018] 底面の大きさを、上記範囲とすることにより、通常の画像の撮像に用いられる倍率（5倍以上63倍以下）の対物レンズを用いて撮像することにより、底面全体を1枚の画像により撮像することができる。したがって、効率良く、撮像、検体の画像解析を行うことができる。

[0019] 本発明の別の態様においては、350nm以上800nm以下の波長の光に対する透過率が60%以上であることが好ましい。

[0020] この態様によれば、ライフサイエンス用チューブの蓋に用いられる材料の上記波長の光に対する透過率を60%以上とすることにより、良好な画像を撮像することができる。

[0021] 本発明の別の態様においては、アクリル樹脂、ポリプロピレン、または、ポリスチレンにより形成されていることが好ましい。

[0022] この態様は、ライフサイエンス用チューブの蓋に用いられる材料を限定したものであり、アクリル樹脂、ポリプロピレン、または、ポリスチレンを用いることにより、蓋の透明性を得ることができ、良好な画像を撮像することができる。また、ポリプロピレン、または、ポリスチレンを用いることにより、耐熱性を確保することができるので、次の工程が温度をかける処理、例えば、PCR処理などの場合であっても、蓋をそのまま用いて処理を行うことができる。

[0023] 本発明の別の態様においては、凹部の表面に細胞低付着処理が施されていることが好ましい。

[0024] この態様によれば、凹部の表面に細胞付着処理を施すことにより、蓋からライフサイエンス用チューブに細胞を移す際に、細胞が蓋の凹部に付着することを防止することができる。したがって、蓋からライフサイエンス用チューブへ検体の移動を確実に行うことができる。

- [0025] 本発明は、上記目的を達成するために、上記記載のライフサイエンス用チューブの蓋と、ライフサイエンス用チューブと、を備えるライフサイエンス用チューブセットを提供する。
- [0026] 本発明のライフサイエンス用チューブセットによれば、上記記載のライフサイエンス用チューブの蓋を用いて画像解析を行った検体を、セットで用いられるライフサイエンス用チューブに移動し、その後の処理を行うことができる。したがって、蓋を有する1つのライフサイエンス用チューブセットで、検体の画像解析とその後の処理を行うことができ、効率よく操作を行うことができる。
- [0027] 本発明の別の態様においては、ライフサイエンス用チューブが、PCR用チューブ、または、タンパク質低吸着チューブであることが好ましい。
- [0028] この態様は、ライフサイエンス用チューブの具体例を記載したものであり、ライフサイエンス用チューブとしてPCR用チューブ、タンパク質低吸着チューブを用いることができる。
- [0029] 本発明は、上記目的を達成するために、細胞をライフサイエンス用チューブの蓋に分取する工程と、分取された細胞を撮像し、細胞画像を取得する工程と、細胞画像に基づいて、目的細胞を選別する工程と、を有する細胞の選別方法を提供する。
- [0030] 本発明の細胞の選別方法によれば、ライフサイエンス用チューブの蓋を用いて、細胞画像により目的細胞の選別を行うことにより、高い精度で目的細胞を選別することができ、かつ、ライフサイエンス用チューブへの目的細胞の移動を容易に行うことができる。
- [0031] 本発明の別の態様においては、目的細胞を選別する工程後のライフサイエンス用チューブの蓋に、ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程と、目的細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程と、ライフサイエンス用チューブ内の目的細胞を処理する工程と、を有することが好ましい。
- [0032] この態様によれば、ライフサイエンス用チューブの蓋を用いて細胞の画像解析を行い、目的細胞をライフサイエンス用チューブに移動させ、目的細胞

の処理をライフサイエンス用チューブ内において行うことにより、蓋を備える1つのライフサイエンス用チューブにより、画像解析、および、その後の処理を行うことができる。

[0033] 本発明の別の態様においては、目的細胞を処理する工程が、PCR処理であることが好ましい。

[0034] この態様は、目的細胞を処理する工程を限定したものであり、PCR処理を行うことができる。

[0035] 本発明の別の態様においては、ライフサイエンス用チューブの蓋は、ライフサイエンス用チューブ側に凹部を有し、凹部の底面が円形または四角形以上の多角形であり、側面が底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなることが好ましい。

[0036] この態様よれば、ライフサイエンス用チューブの蓋のライフサイエンス用チューブが装着される面側に凹部を有し、この凹部の底面を平坦とすることにより、凹部内の細胞の画像を撮像することができる。蓋の凹部の底面を平坦とすることにより、凹部内の細胞に焦点を合わせることができ、良好な画像を撮像することができる。

[0037] また、凹部の側面を底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面とすることにより、開口部を広くすることができ、細胞を凹部内に入り易くすることができる。また、底面に向かって狭くすることにより、底面のサイズを小さくすることができ、細胞に対する底面のサイズを所定の範囲とすることができる。したがって、検体の画像解析において、底面全体を1枚の画像により撮像することができ、効率良く撮像、検体の画像解析を行うことができる。

[0038] また、側面を開口部に向かって広がる方向の傾斜面とすることにより、培養液中の気泡を抜き易くすることができ、気泡により光が屈折することを防止することができ、良好な画像を撮像することができる。

[0039] 本発明の別の態様においては、底面の大きさが、外接する円に近似した時の直径が0.05mmφ以上1mmφ以下であることが好ましい。

[0040] 底面の大きさを、上記範囲とすることにより、1視野による撮影で、底面全体を撮像することができる。したがって、効率良く、撮像、画像の解析を行うことができる。

[0041] 本発明の別の態様においては、細胞画像を取得する工程における、撮影の対物レンズの倍率が5倍以上63倍以下であり、底面の大きさは、画像撮影領域において、外接する円に近似した時の直径が、画像撮影領域の直交する二辺のうちの短辺の長さより短く、短辺の長さの $1/2$ 以上であることが好ましい。

[0042] この態様によれば、撮影の対物レンズの倍率が5倍以上63倍以下における画像撮影領域において、底面の大きさ（外接する円に近似した時の直径）を、画像撮影領域の直交する二辺のうち短辺の長さより短く、短辺の長さの $1/2$ 以上とすることにより、画像撮像領域内で、底面全体、および、細胞の観察に最適なサイズとすることができる。

発明の効果

[0043] 本発明のライフサイエンス用チューブの蓋によれば、観察対象となる検体（細胞）を、凹部に導入し、画像解析を行うことができる。そして、ライフサイエンス用チューブとセットで用いることにより、蓋を有する1つのライフサイエンス用チューブセットで、検体の画像解析とその後の処理を行うことができ、効率よく操作を行うことができる。また、細胞の選別方法によれば、ライフサイエンス用チューブの蓋により画像解析により目的細胞の選別を行うことにより、高い精度で目的細胞を選別することができ、かつ、ライフサイエンス用チューブへの目的細胞の移動を容易に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0044] [図1]細胞を撮像する装置の構成を示す概略構成図である。

[図2]トレーの別の態様を示す図である。

[図3]ライフサイエンス用チューブの蓋の形状を示す断面図である。

[図4]撮像される画像と凹部の底面のサイズとの関係を示した図である。

[図5]他の実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋の形状を示す断面図で

ある。

[図6]さらに他の実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋の形状を示す断面図である。

[図7]細胞の選別方向の工程を示す工程図である

[図8]細胞の選別方向の工程を示す工程図である。

[図9]細胞の選別方向の工程を示す工程図である。

[図10]ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程を説明する図である。

[図11]目的細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程を説明する図である。

発明を実施するための形態

[0045] 以下、添付図面に従って本発明に係るライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットおよび細胞の選別方法について説明する。なお、本明細書において「～」とは、その前後に記載される数値を下限值および上限値として含む意味で使用される。また、以下では、細胞を例として説明するが、本発明のライフサイエンス用チューブの蓋、ライフサイエンス用チューブセットの用途は細胞に限定されず、生体分子を含む化合物などに用いることもできる。

[0046] まず、本実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋（以下、単に「蓋」ともいう）を適用し、画像を撮像する撮像装置を備える解析装置について説明する。

[0047] 図1は、分取する工程において、ライフサイエンス用チューブの蓋に分取された目的細胞の撮像や、細胞からの光学情報を取得する装置の構成を示す概略構成図である。好ましい態様として、抗原抗体反応などによって分取した細胞に標識した蛍光色素からの蛍光発光の情報の取得や、可視光により細胞の光透過画像取得が可能な解析装置である。

[0048] 図1に示す解析装置10は、対象となる細胞の発する蛍光を測定するための光を照射する蛍光用励起光源装置12、細胞の透過光を測定するための光（可視光）を照射する明視野用光源装置14、撮像の対象となる細胞16を

収納するライフサイエンス用チューブの蓋 3 2 およびプレート 1 8 からなるトレイ 1 9、および、レンズ 2 0、励起フィルタ 2 2、ダイクロイックミラー 2 4 および蛍光フィルタ 2 6 を保持したフィルタ群（フィルタキューブ） 2 8、ならびに、細胞 1 6 からの蛍光および透過光を撮像する撮像装置 3 0 を備える。

[0049] 蛍光用励起光源装置 1 2 は、高圧水銀ランプ、高圧キセノンランプ、LED (light emitting diode)、または、LASER (light amplification by stimulated emission of radiation) などを用いることができる。これらの光源を用いることにより、細胞 1 6 に照射する照射光の波長領域を狭くすることにより、精度の高い分析を確実に行うことが可能となる。また、蛍光用励起光源装置 1 2 としては、タングステンランプ、ハロゲンランプ、白色 LED などを用いることができる。これらの光源を用いる場合でも、励起フィルタ 2 2 により、目的の波長のみ透過させることにより、細胞 1 6 に目的の波長の光を照射させることができる。なお、明視野用光源装置 1 4 としても、蛍光用励起光源装置 1 2 と同様の光源を用いることができる。

[0050] トレイ 1 9 は、プレート 1 8 と、分取された細胞 1 6 を収納する蓋 3 2 とからなる。蓋 3 2 は、ライフサイエンス用チューブ（以下、単に「チューブ」ともいう）が装着される側に凹部を有し、この凹部内に分取された細胞を収納する。なお、本明細書においては、ライフサイエンス用チューブの蓋 3 2 のライフサイエンス用チューブが装着される側をライフサイエンス用チューブの蓋の表面といい、反対側を裏面とする。プレート 1 8 は、蓋 3 2 を保持するサンプル台であり、細胞 1 6 は蓋 3 2 の裏面側から撮像されるため、蓋 3 2 の凹部の底面に対応するプレート 1 8 の位置に貫通孔を有する。または、光を透過させることができる透明な材料により形成されている。

[0051] 図 2 は、トレイの別の態様を示す図である。図 2 に示すトレイ 3 1 9 は、プレート 3 1 8 と蓋 3 3 2 が一体となって構成されている点が、図 1 に記載されているトレイ 1 9 と異なっている。解析装置 1 0 に使用されるトレイとしては、図 2 に示すように、プレート 3 1 8 と蓋 3 3 2 が一体となったトレ

ーを用いることができる。プレート 318 と蓋 332 を一体に形成することにより、射出成型で一度に作製することができ、精度良く蓋 332 を配列させることができる。また、トレーを低コストで作製することができる。

[0052] 図 1 に戻り、レンズ 20 は、蛍光用励起光源装置 12 から出力された光により細胞 16 が発した蛍光、および、明視野用光源装置 14 から出力された光が細胞 16 を透過した透過光を拡大する。レンズ 20 は、一般的に光学用途に用いられるレンズを用いることができる。

[0053] フィルタ群 28 は、励起フィルタ 22、ダイクロイックミラー 24、蛍光フィルタ 26 を備える。このようなフィルタ群 28 の具体例としては、フィルタキューブを用いることが好ましく、例えば、Zeiss Filter Set49 (DAPI) を用いることができる。蛍光用励起光源装置 12 から照射された光は、励起フィルタ 22 により、目的の波長領域の光のみを透過する。励起フィルタ 22 を透過した光は、ダイクロイックミラー 24 で、トレー 19 の方向に反射する。蛍光用励起光源装置 12 から出射した励起光により生じた、細胞 16 からの蛍光発光は、レンズ 20、ダイクロイックミラー 24、蛍光フィルタ 26 を経て撮像装置 30 により撮像される。励起光により発光する蛍光は、蛍光の波長領域が励起光の波長領域より長波長側に存在するので、ダイクロイックミラー 24 を使用することにより、蛍光発光のみを透過させることが可能となる。更に、励起光は透過させずに、蛍光のみを透過させる蛍光フィルタ 26 を用いることにより、撮像装置 30 により細胞 16 からの蛍光発光のみの情報で撮像することが可能となる。したがって、蛍光フィルタ 26 により、蛍光のみを透過させることにより、撮像装置 30 により撮像される画像が励起光に影響されることなく、画像を取得することができ、蛍光発光情報により検査の精度を向上させることができる。

[0054] 蛍光用励起光源装置 12 から照射された光による蛍光撮影は、細胞の検査目的に応じて 1 つの細胞に対する複数の情報を取得するため、通常は複数の種類の色素により免疫染色される。この場合、免疫染色された細胞のそれぞれの色素からの蛍光に対して、それぞれの色素の蛍光波長に適した透過特性

または反射特性を有するフィルタ群を用いて撮影することにより、異なる波長の光学的情報を得ることができる。なお、明視野用光源装置 14 により細胞 16 の透過光を撮像する場合は、フィルタ群 28 を取り外した状態で撮像する。これにより、透過光を撮像装置 30 で撮像することができる。

[0055] 撮像装置 30 としては、トレー 19 上の蓋 32 内の細胞 16 の蛍光または透過光を撮像することができれば特に限定されず、例えば、CCD (charge-coupled device) カメラを用いることができる。

[0056] 《ライフサイエンス用チューブの蓋》

図 3 は、本実施形態で用いられるライフサイエンス用チューブの蓋 32 の形状を示す断面図である。図 1 に示す解析装置 10 においては、蓋 32 の底面側から励起光を照射し、蓋 32 を透過した、励起光により発光した細胞からの蛍光などの細胞からの情報を含む光を受光するため、蓋 32 の材料としては、これらの光に対して透明であること、自家蛍光しないこと、散乱しないことなどの条件を有することが好ましい。また、細胞 16 を撮像するため、蓋 32 の凹部 34 の底面 34 a は、平坦な形状である。凹部 34 の底面 34 a を平坦とすることにより、焦点を細胞 16 に合わせることが可能となり、底面 34 a に存在する細胞 16 の画像解析を精度良く行うことができる。

[0057] また、底面 34 a の形状は、円形または四角形以上の多角形である。また、底面 34 a の大きさは、底面 34 a に外接する円に近似した時、円の直径 L が $0.05\text{ mm } \phi$ 以上 $1\text{ mm } \phi$ 以下とすることが好ましく、より好ましくは $0.1\text{ mm } \phi$ 以上 $0.5\text{ mm } \phi$ 以下であり、さらに好ましくは、 $0.2\text{ mm } \phi$ 以上 $0.4\text{ mm } \phi$ 以下である。なお、図 3 においては、底面 34 a を円形として記載する。底面 34 a の形状、大きさを上記の形状、サイズとすることにより、5 倍以上 63 倍以下の倍率の対物レンズを用いることにより、好ましい細胞画像の大きさで、かつ 1 視野による撮影（ワンショット撮影）で、底面 34 a 全体を撮像することができる。細胞の検査目的に応じて 1 つの細胞に対する複数の情報を取得するために、通常は複数種類の色素を用いて免疫染色を行う。従って、細胞 16 の撮像は、それぞれの色素からの蛍光

情報と、明視野撮影を行って、必要に応じ撮影後に各画像を重ね合わせて、細胞の解析を行うことができる。

[0058] 図4は、顕微鏡により撮像される画像撮像領域40と凹部34の底面34aのサイズとの関係を示した図である。底面34aのサイズは、底面34aの直径 L が、画像撮影領域40の直交する二辺、長辺 e 、短辺 d のうち、短辺 d の長さより短く、かつ、短辺 d の長さの $1/2$ 以上とすることが好ましい。底面の直径 L の長さを $d > L > d/2$ とすることにより、細胞が収納される蓋の平坦な底面34aを、画像撮影領域40内において、好ましい細胞画像の大きさにより、かつ1視野による細胞の撮影が可能となる。画像撮影領域40のサイズは、顕微鏡の対物レンズの倍率と撮影カメラにより決定される。通常用いられるカメラを用いることにより、例えば、20倍の対物レンズであれば、底面の直径 L を $0.4\text{ mm } \phi$ とすることにより、画像撮影領域40内に1枚で底面34aを撮像することができる。また、40倍の対物レンズであれば底面の直径 L を $0.2\text{ mm } \phi$ 、63倍の対物レンズであれば直径 L を $0.1\text{ mm } \phi$ 、10倍の対物レンズであれば直径 L を $1\text{ mm } \phi$ とすることにより、1枚の画像で底面34aを撮像することができる。細胞を観察するためには、倍率は高倍率が好ましいが、倍率が高くなると蓋32の裏面側の凹凸などにより、画像解析の精度に影響が出始めることから、対物レンズの倍率は20倍程度が好ましい。

[0059] 凹部34の側面34bは、底面34aから開口部に向かって広がる方向に斜めに形成されており、テーパ形状を有する。側面34bを斜めに形成することにより、培養液中の気泡を容易に抜くことができ、気泡により光が屈折することを防止することができる。また、広い開口部を確保できるために、細胞16を凹部34内に収納することが容易になり、更に、底面の面積を小さくすることが可能となる。

[0060] また、蓋32の底面34aの厚み t は 0.2 mm 以上 1 mm 以下とすることが好ましい。図1に示すように、細胞16の撮像は、蓋32の裏面側（底面側）から撮像することになるため、底面34aの厚みが 1 mm 以下であれ

ば、レンズ20を細胞16に接近させることができ、高倍率での細胞の撮影が可能となり、好ましい。また、0.2mm以上であると、狭い範囲に焦点深度を設定することが可能となり、蓋32の裏面側にわずかでもキズなどがある場合でも、キズの焦点がずれるために撮像される画像にキズの像が映し出されることがなくなり、細胞の画像のみを撮像することが可能となり、好ましい。底面34aの厚みtは、0.3mm以上0.5mm以下がより好ましく、0.4mmがさらに好ましい。

[0061] 蓋32の材質としては、画像を撮像する際に、光を透過しやすい材質とすることが好ましく、具体的には、アクリル樹脂、ポリプロピレン、または、ポリスチレンから選択される材料を用いることができる。これらの材料により製造された蓋32は、350nm以上800nm以下の波長の光に対する透過率が60%以上であることが好ましく、70%以上であることがより好ましく、80%以上であることがさらに好ましい。光の透過性の観点においては、アクリル樹脂、または、ポリプロピレンを用いることが好ましい。また、目的細胞を選別した後の処理がPCR処理である場合、耐熱性を有することが好ましく、ポリプロピレン、または、ポリスチレンを用いることにより、PCR処理において材料が劣化することを防止することができる。なお、本発明において、「透過率」とは、透過光を入射光で割った値（透過率＝透過光／入射光）であり、例えば100の光束を入射させたときに透過した光束が60であれば透過率は60%と算出される。

[0062] また、凹部34の表面（底面34aおよび側面34b）は、細胞低付着処理が施されていることが好ましい。細胞低付着処理は、細胞、すなわち、タンパク質が凹部34内の底面34aおよび側面34bに付着しないようにする処理であり、タンパク質の吸着を防止する性質を有する材料を表面にコートする処理である。凹部34内へのタンパク質吸着の原因は、蓋32の材料である樹脂表面の疎水性基とタンパク質中の疎水性基が結合する疎水性相互作用が主な原因とされているため、親水性基を有する材料をコーティングすることによって細胞低付着処理を施した表面とすることができる。

- [0063] 細胞低付着処理に用いられる材料として、ホスホコリン基を含む高分子（例えば、リピジユア（登録商標）（別名：MPC（2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine）ポリマー）（日油株式会社製））、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、PVA（polyvinyl alcohol）ヒドロゲル、BSA（Bovine serum albumin）などを用いることができる。コーティング方法としては、上記材料を溶媒に分散させた分散液に、ディップ浸漬後、乾燥することにより、コーティングを行うことができる。溶媒としては、例えば、リピジユアの場合、エタノールを用いることができ、エタノールに0.5 wt %の割合でリピジユアを混合することにより、分散し、分散液とする。
- [0064] 凹部34の表面に細胞低付着処理を施すことにより、凹部34内に細胞をフローサイトメトリーなどにより分取する際に、底面34aに到達する前に側面34bへ付着することを防止することができる。また、画像解析後、細胞をチューブへ移動させる際に、底面34aに付着することなく、容易にチューブに移動させることができる。
- [0065] 細胞低付着処理としては、付着したタンパク質を分解させる酵素を安定化させることにより行うこともできる。
- [0066] 図5は、別の一実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋132の形状を示す断面図である。図5に示す蓋132の凹部134の側面は、底面134aに対して角度 θ_B を有する側面134b、および、底面134aに対して角度 θ_C を有する側面134cとからなる。図5に示すように、側面を、多段で屈曲させ、底面134aに対して異なる角度 θ_B 、 θ_C を有する二段の傾斜面である側面134b、134cにより形成することができる。二段の傾斜面で側面を形成することにより、凹部134内の側面の設計の自由度を増すことができる。凹部134の開口部側の角度 θ_C を大きくすることにより、細胞を凹部134内により入り易くすることができる。また、底面134a側の角度 θ_B を小さくすることにより、底面134aを狭くことができ、画像を撮像する際に、高い倍率により撮像しても1枚の画像で底面134aを撮像することができる。角度 θ_B 、 θ_C の関係は、特に限定されない。図5に

においては、角度 θ_c が、角度 θ_B より大きい図で記載されているが、角度 θ_B を角度 θ_c より大きくしてもよい。角度 θ_B を大きくすることにより、側面134bに細胞がとどまり、底面134aに細胞が到達しないことを防止することができる。なお、図5においては、側面を二段の傾斜面としているが、段数は特に限定されず、三段以上の傾斜面とすることもできる。

[0067] 図6は、さらに別の一実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋232の形状を示す断面図である。図6に示す蓋232は、凹部内にスペーサー236を備える点が、他の実施形態と異なっている。スペーサー236の凹部234の形状を、上記の蓋32、132の凹部34、134の形状とし、蓋232の内部に嵌め込むことにより、上記の実施形態と同様の効果を得ることができる。

[0068] <ライフサイエンス用チューブセット>

上述のライフサイエンス用チューブの蓋は、ライフサイエンス用チューブと合わせてライフサイエンス用チューブセットとして使用される。ライフサイエンス用チューブとしては、細胞の培養、検出、分離、精製、分析および評価や、生体分子を含む化合物の合成、検出、分離、精製、分析および評価などの用途に使用されるチューブを用いることができる。具体的には、タンパク質、ペプチド解析などにおいて、容器への試料付着を軽減するタンパク質低吸着チューブを用いることができる。また、PCR処理を行うPCR用チューブを用いることができる。本実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋とセットで用いることにより、1つのライフサイエンス用チューブセットで、画像解析とその後の処理、解析などを行うことができる。

[0069] <細胞の選別方法>

次に、上記のライフサイエンス用チューブの蓋、および、ライフサイエンス用チューブセットを用いた細胞の選別方法について説明する。

[0070] 図7から図9は、細胞の選別方向の工程を示す工程図である。また、図10は、ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程を説明する図であり、図11は、目的細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程を説明

する図である。本実施形態の細胞の選別方法によれば、細胞をライフサイエンス用チューブの蓋に分取する工程と、分取された細胞を撮像し、細胞画像を取得する工程と、細胞画像に基づいて、目的細胞を選別する工程と、を有する。また、目的細胞を選別する工程の後、ライフサイエンス用チューブの蓋に、ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程と、目的細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程と、ライフサイエンス用チューブ内の目的細胞を処理する工程と、を行う。以下、各工程について説明する。

[0071] 《分取する工程》

まず、図7に示すように、蓋32の凹部34内に培養液38を滴下する。次に、図8に示すように、培養液38を有する凹部34内に、細胞16を分取する。複数の細胞から目的細胞を分取する工程としては、例えば、フローサイトメトリーにより行うことができる。フローサイトメトリーは、測定対象の細胞などの測定対象物質を含むサンプル液を、フローセルにおいてシース液の層流の中心側に流し、光学検出部においてレーザ光を測定対象物質に照射して、それによって生じる散乱光と蛍光を測定することにより、測定対象物質の大きさや構造などを測定するものである。光学検出部における測定のパラメータとしては、前方散乱光、側方散乱光および蛍光があるが、前方散乱光では測定対象物の大きさが、また側方散乱光および蛍光により、測定対象物質の構造などを測定することができる。

[0072] そして光学検出部における測定のパラメータを用いて、ソーティング系により、トレー上の蓋に目的細胞を分取する。フローサイトメトリーにおいては、サンプル／シース液は、上から下に流れていくように設計されており、層流のままフローセルの先端にあるノズルから飛び出し落下する。フローセルの外へ出たサンプル／シース液が、途中から液滴（ドロップ）になるように、トランスデューサ（振動子）を用いてフローセル全体またはフローセル内部に上下振動を与える。光学検出部における測定のパラメータを用いた分取条件に基づいて、分取する細胞かどうかを判別し、液滴になる直前に、サンプル／シース液全体に、+または-の荷電をする。その後、液滴は2枚の

偏向板の間を落下し、＋に荷電した液滴は一極板側に、－に荷電した液滴は＋極板側に引かれ、細胞捕集部にあるトレイ上の各蓋に細胞を分取することができる。

[0073] なお、フローサイトメトリーの方法としては、一例として上記の方法を記載したが、上記の方法に限定されず、一般的に行われている方法により行うことができる。また、分取する工程としては、フローサイトメトリーに限定されず、他の方法でも行うことができる。

[0074] ≪細胞画像を取得する工程≫

次に、蓋 3 2 に分取された細胞を撮像し、細胞画像を取得する。図 9 は、細胞画像を取得する工程を示す図である。細胞画像を撮像する装置としては、図 1 に示す装置を用いることができる。

[0075] 本実施形態で用いられるライフサイエンス用チューブの蓋 3 2 は、上述したように、凹部 3 4 の底面 3 4 a が平坦で、かつ、円形または四角形以上の多角形であり、側面 3 4 b が底面 3 4 a から開口部に向かって広がる方向に斜めに形成されている。したがって、底面 3 4 a に存在する細胞 1 6 の画像の撮像に適しており、本実施形態のライフサイエンス用チューブの蓋 3 2 を用いて、効率良く、良好な細胞画像を取得することができる。

[0076] ≪目的細胞を選別する工程≫

次に、細胞画像を取得する工程で得られた細胞画像に基づいて、目的細胞の確認、および、選別を行う。細胞画像による目的細胞の確認は、例えば、核の有無、核の大きさ、核の形状（細胞質の面積に対する核領域の面積の割合、核の円形度合い）、細胞の形状（連続しているかギザギザしているか）、蛍光の輝度のピーク値、平均値、輝度分布（細胞膜均一に蛍光しているか、局所的に強く蛍光しているか）、特定の波長の透過光に対する吸収度合い（ヘモグロビンか、白血球かの判別）、ヘモグロビンの酸素親和性の違いに起因する分光特性（還元ヘモグロビン [Hb] と酸化ヘモグロビン [HbO₂] の波長に対する吸収係数）など、を用いて行うことができる。具体的な選別方法としては、例えば、目的細胞と、選別からはずれる目的細胞とは異なる細

胞とを選別する観点（細胞の形状、透過光の吸収等）を決定する。そして、その観点の度合いを数値化し、これらの測定した数値から、目的細胞である確からしさを表す数値範囲、及びその範囲を表す閾値を決定し、その閾値を、選別の基準値として決定する。このように選別すべき観点を複数、事前に決定しておき、それぞれの観点における閾値を求めて選別の基準値を決定する。こうして決定した複数の全ての基準値を満たす細胞を、目的細胞として選別することができる。例えば、目的細胞が有核赤血球等であれば国際公開WO 2016 021 309号公報や国際公開WO 2016 021 311号公報に記載の選別方法を用いることができる。

[0077] 《ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程》

次に、目的細胞を選別する工程後のライフサイエンス用チューブの蓋32に、ライフサイエンス用チューブ50を取り付ける。図10は、ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程を説明する図である。チューブ50は、目的細胞を選別する工程において、目的細胞と選別された細胞16が分取された蓋32にのみチューブ50を取り付けてもよいし、すべての蓋32にチューブ50を取り付けてもよい。ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程は、専用の装置を用いて行うことが可能である。

[0078] 目的細胞と選別された細胞16が分取された蓋32にのみチューブ50を取り付けた場合、チューブ50を取り付けた目的細胞のみ、次の工程を行う。したがって、チューブ50と、そのチューブ50内の細胞16の情報を紐付けしておくことが好ましい。細胞16の情報を、蓋32あるいはチューブ50と紐付けする方法としては、トレー19上に配列された蓋32の配列情報を、蓋32に文字で刻印しておく方法が挙げられる。配列情報の記載例としては、「C4」であるならば、プレートのC行4列目、「D4」であるならばD行の4列目を意味する。また、トレー19の配列情報ではなく、細胞の情報をQRコード（登録商標）で印字してもよい。また、蓋32にトレーの配列情報を記憶したRFID（radio frequency identifier）タグを設けることにより、細胞の情報を明確にしておくこともできる。

[0079] 《細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程》

チューブ50を蓋32に取り付けた後、蓋32内の細胞16を、チューブ50に移動する。図11は、目的細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程を説明する図である。蓋32からチューブ50への細胞16移動は、例えば、蓋32にチューブ50を取り付けた後、反転させ、遠心分離を行うことにより、チューブ50内に、細胞16を培養液38とともに移動させることができる。細胞をライフサイエンス用チューブに移動させる工程は、専用の装置を用いて行うことが可能である。

[0080] 《目的細胞を処理する工程》

目的細胞をチューブ50に移動させた後、目的細胞の処理を行う。目的細胞を処理する工程としては、例えば、PCR処理を挙げることができる。PCR処理は、DNA (deoxyribonucleic acid) 分子の特定の領域を増幅させる方法であり、例えば、次の方法により行うことができる。ただし、PCR処理は以下の方法に限定されない。また、目的細胞を処理する工程もPCR処理に限定されず、他の処理を行うこともできる。

[0081] [PCR処理]

(工程1)

反応液を94℃程度に加熱し、30秒から1分間温度を保ち、2本鎖DNAを1本鎖に分離する。

[0082] (工程2)

反応液を60℃程度にまで急速冷却し、その一本鎖DNAとプライマーを所定の温度に加熱（アニーリング）し、一本鎖DNAとプライマーを加熱させる。

[0083] (工程3)

プライマーにDNAポリメラーゼを反応させ、一本鎖DNAとプライマーの分離が起きず、DNAポリメラーゼ活性に適した温度（60～72℃程度）まで、加熱する。DNAが合成されるのに必要な時間（増幅する長さによるが通常1～2分）、この状態を継続する。

[0084] (工程4)

工程1から工程3を1サイクルとし、工程1から工程3までの手順を繰り返すことにより、特定のDNA断片を増幅することができる。一般的に、PCR処理をn回のサイクル行くと、1つの2本鎖DNAから目的部分を 2^n 倍に増幅することができる。長いDNA鎖が最後まで残ってしまうが、通常20サイクル程度行うことにより、必要とする特定のDNA断片に比べ、DNAの量を見捨てる程、少なくすることができる。

[0085] このように、本実施形態の細胞の選別方法によれば、蓋を用いて、細胞画像の撮像、目的細胞の判定を行った後、チューブに細胞を移動し、目的細胞の処理を行うことができる。したがって、蓋を有する1つのライフサイエンス用チューブセットで、画像解析から、細胞の処理まで行うことができる。また、画像解析を行う蓋から、処理を行うチューブまでの細胞の移動を、キャピラリーを用いるなどの難しい操作を必要とせず、容易に行うことができる。

符号の説明

- [0086] 10 解析装置
- 12 蛍光用励起光源装置
- 14 明視野用光源装置
- 16 細胞
- 18、318 プレート
- 19、319 トレー
- 20 レンズ
- 22 励起フィルタ
- 24 ダイクロイックミラー
- 26 蛍光フィルタ
- 28 フィルタ群（フィルタキューブ）
- 30 撮像装置
- 32、132、232、332 ライフサイエンス用チューブの蓋（蓋）

3 4、1 3 4、2 3 4 凹部

3 4 a、1 3 4 a 底面

3 4 b、1 3 4 b、1 3 4 c 側面

3 8 培養液

4 0 画像撮影領域

5 0 ライフサイエンス用チューブ（チューブ）

2 3 6 スペーサー

請求の範囲

- [請求項1] ライフサイエンス用チューブの蓋であって、
前記ライフサイエンス用チューブ側に凹部を有し、
前記凹部の底面が平坦で、かつ、円形または四角形以上の多角形であり、前記凹部の側面が前記底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなるライフサイエンス用チューブの蓋。
- [請求項2] 前記側面は、前記底面に対して異なる角度を有する二段以上の傾斜面を有する請求項1に記載のライフサイエンス用チューブの蓋。
- [請求項3] 前記底面の大きさは、外接する円に近似した時の直径が0.05mmφ以上1mmφ以下である請求項1または2に記載のライフサイエンス用チューブの蓋。
- [請求項4] 350nm以上800nm以下の波長の光に対する透過率が60%以上である請求項1から3のいずれか1項に記載のライフサイエンス用チューブの蓋。
- [請求項5] アクリル樹脂、ポリプロピレン、または、ポリスチレンにより形成されている請求項1から4のいずれか1項に記載のライフサイエンス用チューブの蓋。
- [請求項6] 前記凹部の表面に細胞低付着処理が施されている請求項1から5のいずれか1項に記載のライフサイエンス用チューブの蓋。
- [請求項7] 請求項1から6のいずれか1項に記載のライフサイエンス用チューブの蓋と、ライフサイエンス用チューブと、を備えるライフサイエンス用チューブセット。
- [請求項8] 前記ライフサイエンス用チューブが、PCR用チューブ、または、タンパク質低吸着チューブである請求項7に記載のライフサイエンス用チューブセット。
- [請求項9] 細胞をライフサイエンス用チューブの蓋に分取する工程と、
分取された前記細胞を撮像し、細胞画像を取得する工程と、
前記細胞画像に基づいて、目的細胞を選別する工程と、を有する細

胞の選別方法。

[請求項10] 前記目的細胞を選別する工程後の前記ライフサイエンス用チューブの蓋に、前記ライフサイエンス用チューブを取り付ける工程と、
前記目的細胞を前記ライフサイエンス用チューブに移動させる工程と、

前記ライフサイエンス用チューブ内の前記目的細胞を処理する工程と、を有する請求項9に記載の細胞の選別方法。

[請求項11] 前記目的細胞を処理する工程が、PCR処理である請求項10に記載の細胞の選別方法。

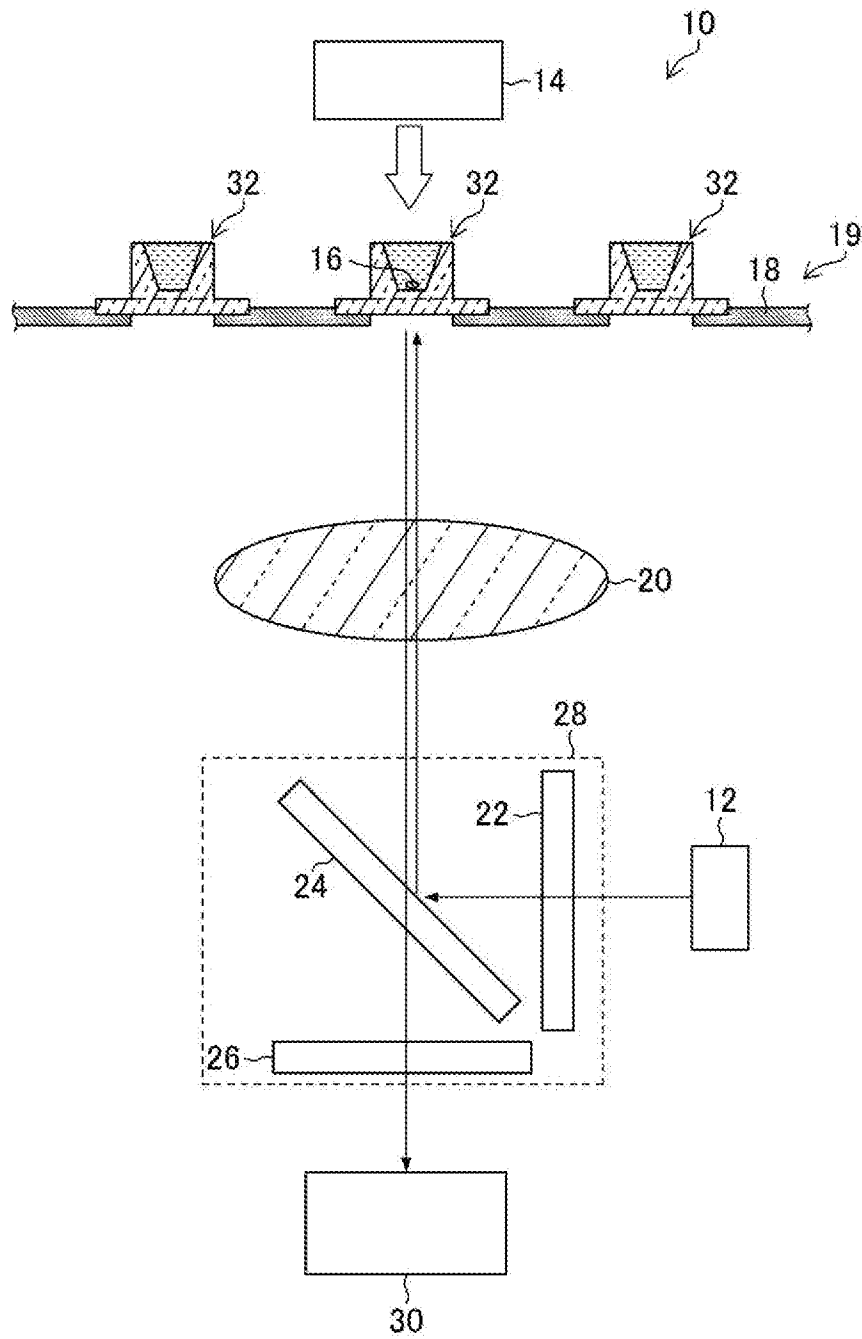
[請求項12] 前記ライフサイエンス用チューブの蓋は、前記ライフサイエンス用チューブ側に凹部を有し、前記凹部の底面が円形または四角形以上の多角形であり、前記凹部の側面が前記底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなる請求項10または11に記載の細胞の選別方法。

[請求項13] 前記底面の大きさが、外接する円に近似した時の直径が0.05 mm ϕ 以上1 mm ϕ 以下である請求項12に記載の細胞の選別方法。

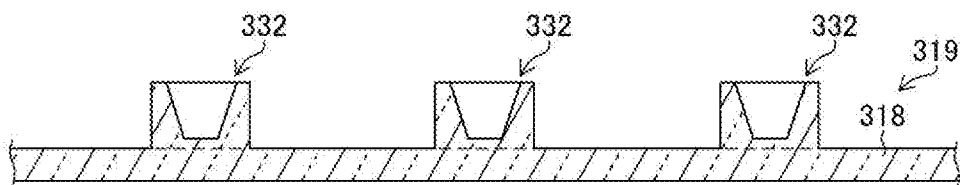
[請求項14] 前記細胞画像を取得する工程における、撮影の対物レンズの倍率が5倍以上63倍以下であり、

前記底面の大きさは、画像撮影領域において、外接する円形に近似した時の直径が、前記画像撮影領域の直交する二辺のうちの短辺の長さより短く、短辺の長さの $1/2$ 以上である請求項13に記載の細胞の選別方法。

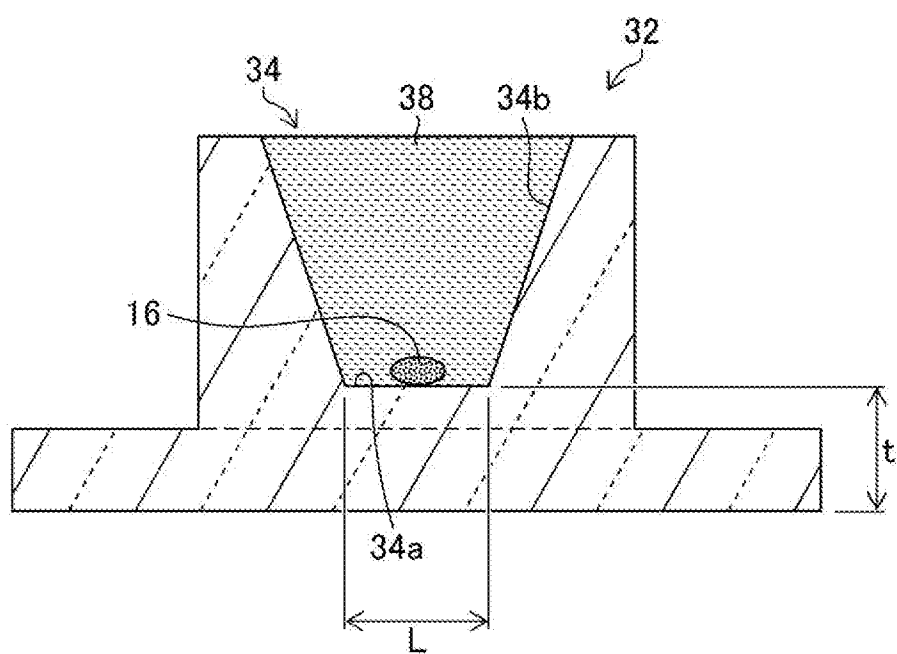
[図1]



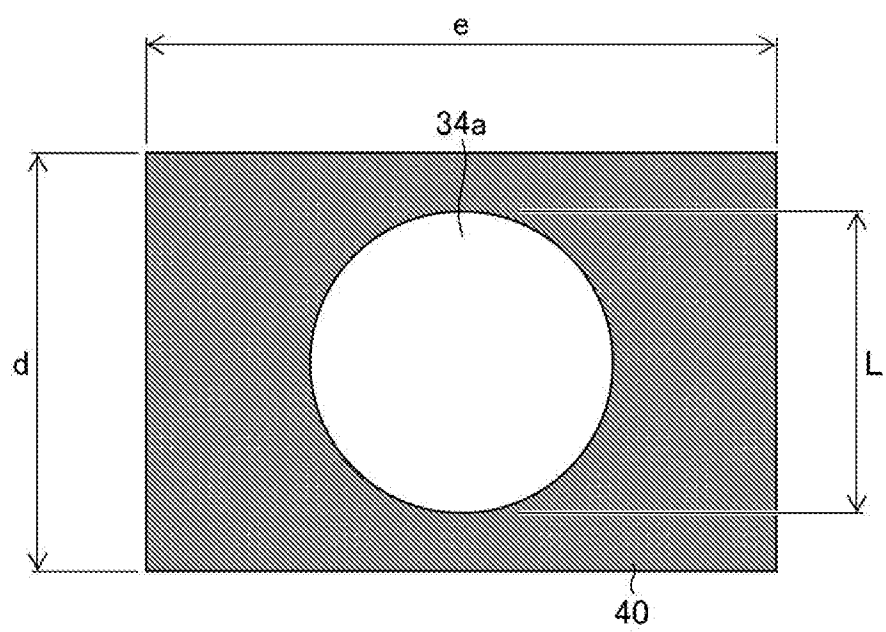
[図2]



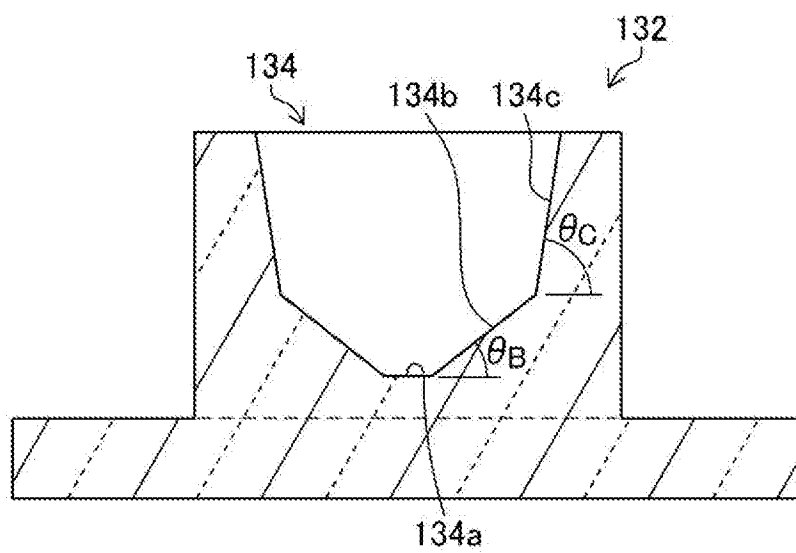
[図3]



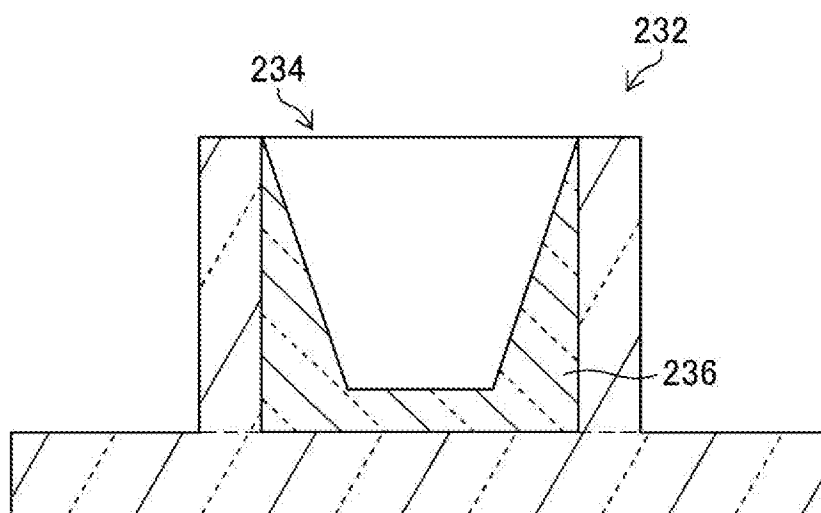
[図4]



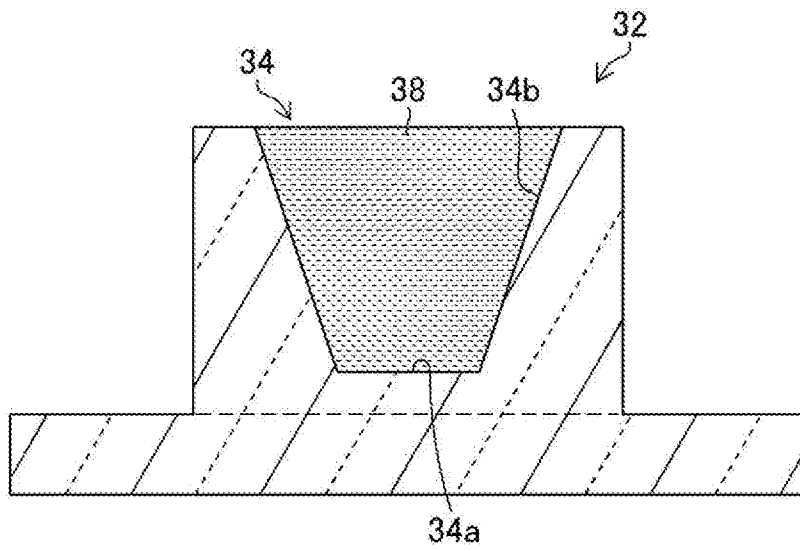
[図5]



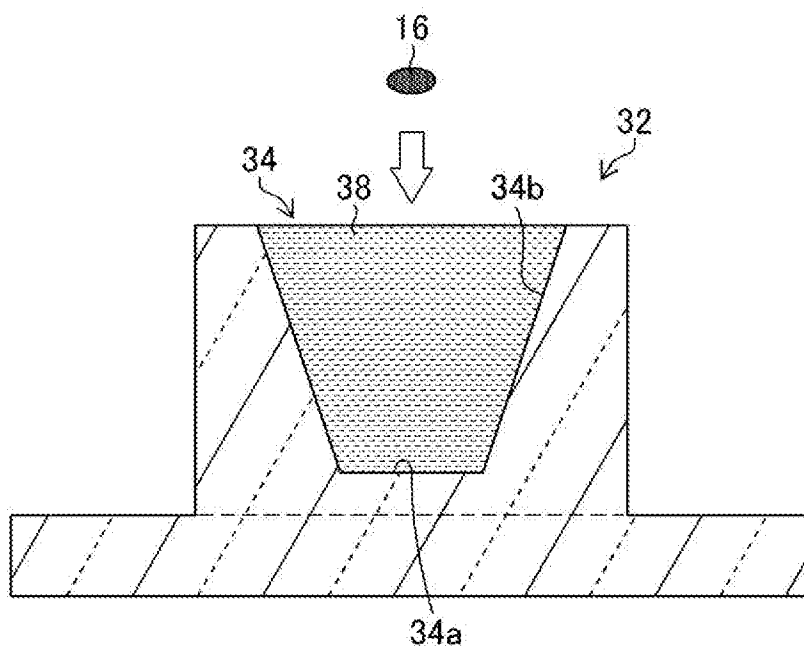
[図6]



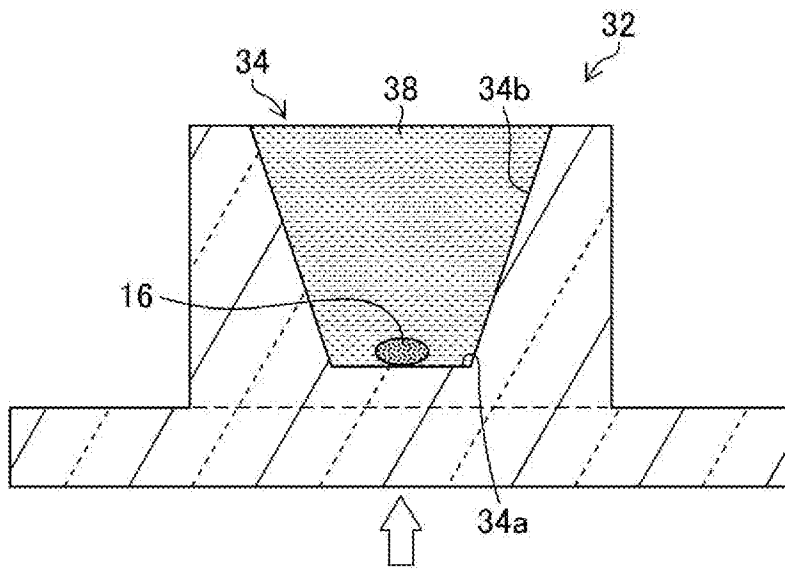
[図7]



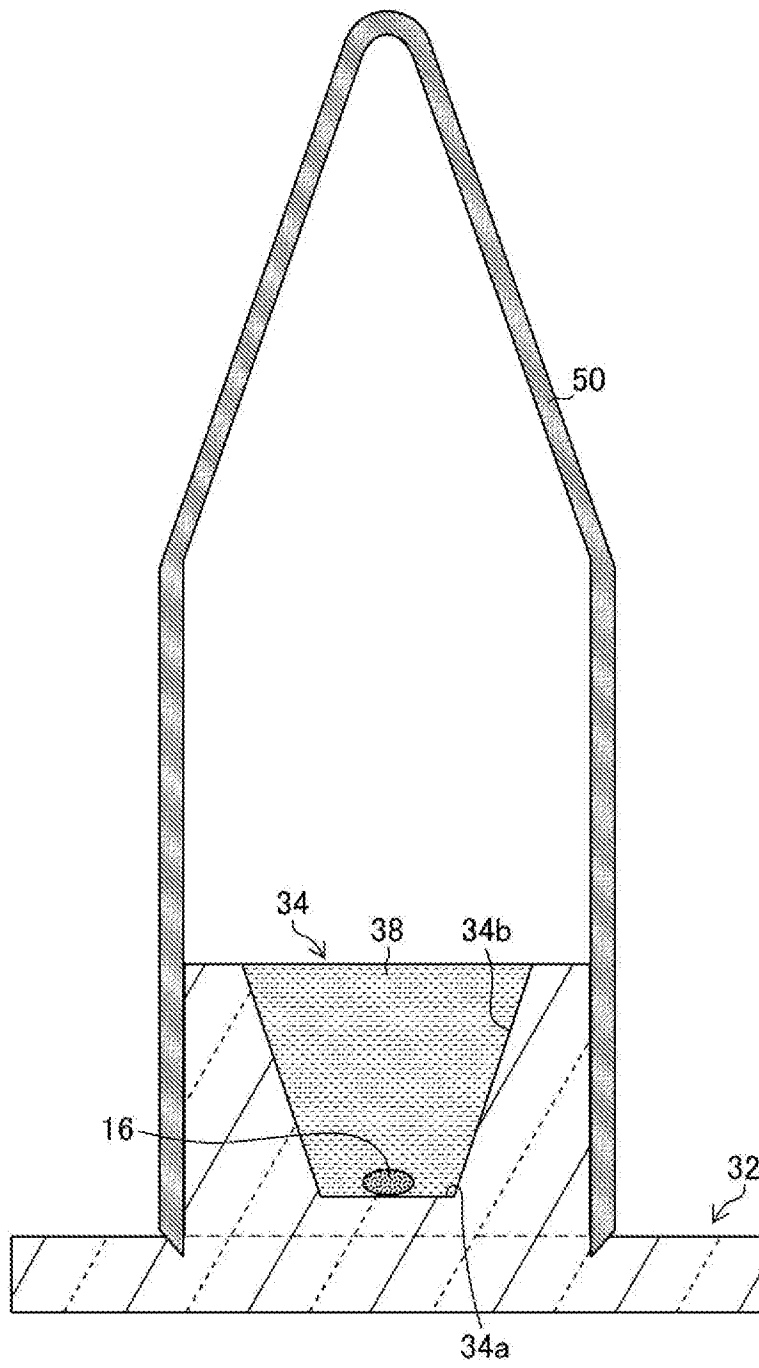
[図8]



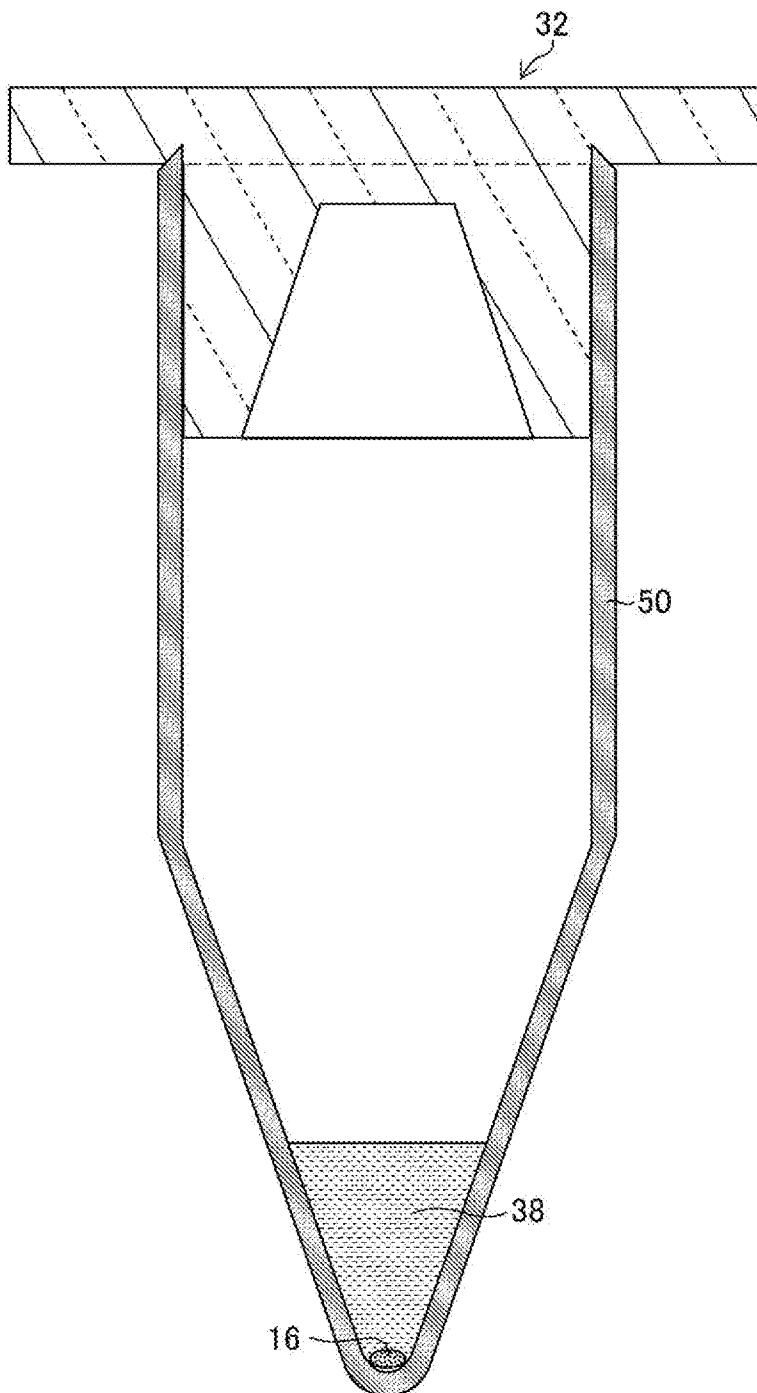
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, C12M1/24(2006.01)i, C12M1/28(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/01(2006.01)i, G01N21/17(2006.01)i, G01N33/48(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, C12M1/24, C12M1/28, C12N1/00, C12Q1/68, G01N21/01, G01N21/17, G01N33/48

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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.
X/Y	WO 2012/121225 A1 (Kaneka Corp.), 13 September 2012 (13.09.2012), claim 13; paragraphs [0098] to [0103]; fig. 4, 9, 11, 13 & JP 5977228 B2 & US 2014/0058043 A1 claim 13; paragraphs [0115] to [0120]; fig. 4, 9, 11, 13 & US 2016/0209332 A1 & EP 2682480 A1 & CN 103403190 A & SG 193315 A1 & KR 10-2014-0049972 A	1-8/1-14
X/Y	STUMPF, F. et al., Single-cell PCR of genomic DNA enabled by automated single-cell printing for cell isolation, Biosensors and Bioelectronics, 2015, 69, pp. 301-306, Abstract, Fig. 1, 4 to 5, p. 304, left column, 2nd paragraph	9-11/1-14

☒ 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

"I" 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
09 May 2017 (09.05.17)

Date of mailing of the international search report
23 May 2017 (23.05.17)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005200

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 2011-072263 A (Toppan Printing Co., Ltd.), 14 April 2011 (14.04.2011), (Family: none)	1-14
A	JP 2013-517809 A (The Regents of the University of Michigan), 20 May 2013 (20.05.2013), & US 2013/0040855 A1 & US 2014/0179561 A1 & WO 2011/094572 A2 & EP 2529238 A2 & DE 202011110503 U1 & CA 2788575 A1 & CN 102947710 A	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005200

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005200

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Document 1: WO 2012/121225 A1 (Kaneka Corp.), 13 September 2012 (13.09.2012), claim 13; paragraphs [0098] to [0103]; fig. 4, 9, 11, 13 & JP 5977228 B2 & US 2014/0058043 A1, claim 13; paragraphs [0115] to [0120]; fig. 4, 9, 11, 13 & US 2016/0209332 A1 & EP 2682480 A1 & CN 103403190 A & SG 193315 A1 & KR 10-2014-0049972 A

Document 2: STUMPF, F. et al., Single-cell PCR of genomic DNA enabled by automated single-cell printing for cell isolation, Biosensors and Bioelectronics, 2015, 69, pp. 301-306, Abstract, Fig. 1, 4-5, p. 304, left column, 2nd paragraph

(Invention 1) claims 1-8

Document 1 discloses a lid of a PCR tube, "which has a depressed part on the tube-facing side thereof, wherein the bottom surface of the depressed part is flat and circular and the side surface of the depressed part is formed of an inclined surface that extends from the bottom surface toward an opening" (claim 13, [0098]-[0102], figs. 4, 9, 11 and 13, etc.). Therefore, claim 1 is not novel over document 1 and has no special technical feature.

However, claim 2, which depends on claim 1, has the special technical feature "the side surface has two or more steps of inclined surfaces which have different angles against the bottom surface from each other", and parts of claims 3-8 which refer to claim 2 have the same special technical feature as that of claim 2.

Further, claims 3-8 are dependent on claim 1, and have an inventive relationship with claim 1.

Consequently, claims 1-8 are classified into Invention 1.

(Invention 2) claims 9-14

It is not considered that claims 9-14 have a special technical feature same as or corresponding to claim 2 which is classified into Invention 1.

Further, claims 9-14 are not dependent on claim 1 classified into Invention 1.

In addition, claims 9-14 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claims 9-14 cannot be classified into Invention 1.

Document 2 discloses a method in which a droplet containing a single cell is collected in the inside part of a lid of a PCR tube and subsequently a PCR is carried out in the PCR tube, wherein an image of the cell collected in the inside part of the lid is taken to detect the presence of a desired cell (Abstract, Figs. 1 and 4-5, second paragraph in the left column on p. 304, etc.).

Consequently, claims 9-11 have no special technical feature, since these claims lack novelty in the light of the document 2.

However, claim 12, which depends on claim 9, has the special technical feature "the method for selecting a cell ..., wherein the lid of the life science tube has a depressed part on the life science tube-facing side thereof, wherein the bottom surface of the depressed part has a circular shape or the shape of at least quadrangle polygon and the side surface of the depressed part is formed of an inclined surface that extends from the bottom surface toward an opening", and claims 13-14 have the same special technical feature as that of claim 12.

Consequently, claims 9-14 are classified into Invention 2.

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, C12M1/24(2006.01)i, C12M1/28(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/01(2006.01)i, G01N21/17(2006.01)i, G01N33/48(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, C12M1/24, C12M1/28, C12N1/00, C12Q1/68, G01N21/01, G01N21/17, G01N33/48

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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), Cplus/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
X/ Y	WO 2012/121225 A1 (株式会社カネカ) 2012.09.13, 請求項13、[0098] ~ [0103]、図4、9、11、13 & JP 5977228 B2 & US 2014/0058043 A1, 請求項13、[0115] ~ [0120]、 図4、9、11、13 & US 2016/0209332 A1 & EP 2682480 A1 & CN 103403190 A & SG 193315 A1 & KR 10-2014-0049972 A	1-8/ 1-14

☑ 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

09.05.2017

国際調査報告の発送日

23.05.2017

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)

星 浩臣

4 B

5374

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	STUMPF, F. et al., Single-cell PCR of genomic DNA enabled by automated single-cell printing for cell isolation, Biosensors and Bioelectronics, 2015, 69, pp. 301-306, Abstract, Fig. 1, 4-5, p. 304 左欄第2段落	9-11/ 1-14
A	JP 2011-072263 A (凸版印刷株式会社) 2011.04.14, (ファミリーなし)	1-14
A	JP 2013-517809 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン) 2013.05.20, & US 2013/0040855 A1 & US 2014/0179561 A1 & WO 2011/094572 A2 & EP 2529238 A2 & DE 202011110503 U1 & CA 2788575 A1 & CN 102947710 A	1-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページを参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

文献１：WO 2012/121225 A1（株式会社カネカ）2012.09.13,
請求項１３、[0098]～[0103]、図４、９、１１、１３
& JP 5977228 B2
& US 2014/0058043 A1, 請求項１３、[0115]～[0120]、
図４、９、１１、１３
& US 2016/0209332 A1 & EP 2682480 A1 & CN 103403190 A & SG 193315 A1
& KR 10-2014-0049972 A

文献２：STUMPF, F. et al., Single-cell PCR of genomic DNA enabled by automated single-cell printing for cell isolation, Biosensors and Bioelectronics, 2015, 69, pp. 301-306, Abstract, Fig. 1, 4-5, p. 304 左欄第２段落

（発明１）請求項 １－８

文献１には、「チューブ側に凹部を有し、前記凹部の底面が平坦で、かつ、円形であり、前記凹部の側面が前記底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなる」PCRチューブの蓋が記載されており（請求項１３、[0098]～[0102]、図４、９、１１、１３等）、請求項１は文献１により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項１の従属請求項である請求項２は、「前記側面は、前記底面に対して異なる角度を有する二段以上の傾斜面を有する」という特別な技術的特徴を有しており、請求項３－８のうち請求項２を引用する部分も、請求項２と同一の特別な技術的特徴を有している。また、請求項３－８は、請求項１の従属請求項であり、請求項１に対して発明の連関を有している。

したがって、請求項１－８を発明１に区分する。

（発明２）請求項 ９－１４

請求項９－１４は、発明１に区分された請求項２と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項９－１４は、発明１に区分された請求項１の従属請求項ではない。

さらに、請求項９－１４は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項９－１４は発明１に区分できない。

文献２には、単一細胞を含む液滴をPCRチューブの蓋の内側に分取した後、前記PCRチューブ内でPCRを行う方法であって、その際、前記蓋の内側に分取された細胞の画像を撮像して、目的細胞の存在を検出する方法が記載されている（Abstract, Fig. 1, 4-5, p. 304 左欄第２段落等）。よって、請求項９－１１は、文献２により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項９の従属請求項である請求項１２は、「前記ライフサイエンス用チューブの蓋は、前記ライフサイエンス用チューブ側に凹部を有し、前記凹部の底面が円形または四角形以上の多角形であり、前記凹部の側面が前記底面から開口部に向かって広がる方向の傾斜面からなる・・・細胞の選別方法」という特別な技術的特徴を有しており、請求項１３－１４も、請求項１２と同一の特別な技術的特徴を有している。

したがって、請求項９－１４を発明２に区分する。