

(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 2017/169192 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005127
- (22) 国際出願日: 2017年2月13日(13.02.2017)
- (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 2016-064095 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26番30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798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1250番地 F F T P M O棟6F 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.

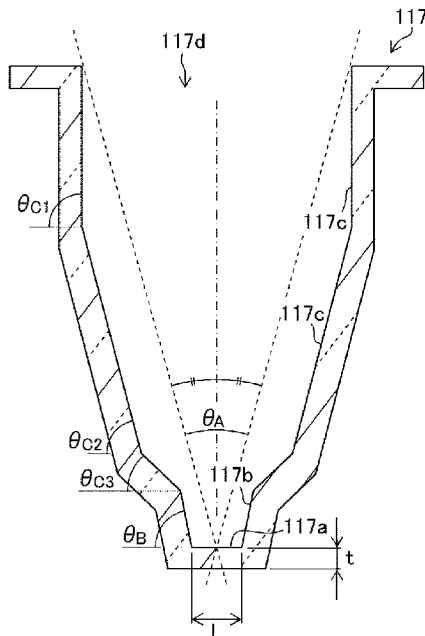
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, 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: PCR CONTAINER

(54) 発明の名称: PCR用容器



(57) Abstract: Provided is a PCR container that makes it possible to carry out cell observation and PCR processing in a single container. In this PCR container, the bottom surface 17a of the interior is flat, the shape of the bottom surface is circular or a polygonal shape having four or more sides, and the size of the bottom surface 17a is such that the diameter L when approximated to a circle circumscribing the bottom surface 17a is 0.05-1 mmφ, inclusive, and the side surface-side angle θ_B formed between the bottom surface 17a and a side surface 17b that is adjacent to the bottom surface 17a is 50-80°, inclusive.

(57) 要約: 1つの容器で、細胞観察とPCR処理を行うことができるPCR用容器を提供する。内部の底面17aが、平坦であり、かつ、底面の形状が円形または四角形以上の多角形であり、底面17aの大きさは、底面17aを外接する円に近似した時の直径Lが0.05mmφ以上1mmφ以下であり、底面17aと隣接する側面17bと、17a底面とのなす側面側の角 θ_B の角度が50°以上80°以下であるPCR用容器である。

WO 2017/169192 A1

明 細 書

発明の名称 : P C R用容器

技術分野

[0001] 本発明は、P C R用容器に係り、特に、細胞撮影とP C R処理を兼用することができるP C R用容器に関する。

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、細胞を流体中に分散させ、その流体を細かく流して、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、分取を行い、その後の細胞の解析を行うものである。

[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、顕微鏡検査によって細胞画像を撮影し、得られた画像を解析して目的細胞を特定した後に、その特定した目的細胞をキャピラリーにより吸引し、P C R (polymerase chain reaction) 処理に用いられるウエルプレートに移す操作が行われている。

[0004] このような顕微鏡検査や、P C R処理に用いられるウエルプレートとしては、例えば、下記の特許文献1から5に記載のウエルプレートが挙げられる。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特表2010-531644号公報
特許文献2：特表2007-526767号公報
特許文献3：特開2009-204451号公報
特許文献4：特表2014-518758号公報
特許文献5：特表2001-509272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 から 5 に記載されているウエルプレートは、画像撮影用、または、PCR用のいずれかで使用されるものであって、細胞の画像撮影、および、PCR処理の両方を行えるウエルプレートではなかった。また、この方法においては、操作が難しい、時間がかかる、キャピラリーが高額などの問題があった。

[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、目的の細胞である割合は、7割から8割程度であり、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。更に、PCRプレートの底面が平坦な構造ではないため、細胞に焦点を合わせることが難しく、PCRプレート上での細胞の観察は行われていなかった。

[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、1つの容器により、細胞観察とPCR処理のどちらも行うことが可能なPCR用容器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、PCR用容器であって、内部の底面が、平坦であり、かつ、底面の形状が円形または四角形以上の多角形であり、底面の大きさは、底面を外接する円に近似した時の直径が0.05mmφ以上1mmφ以下であり、底面と隣接する側面と、底面とのなす側面側の角度が50°以上80°以下であるPCR用容器を提供する。

[0010] 本発明のPCR用容器によれば、容器内部の底面を平坦とすることにより、顕微鏡などを用いて細胞を撮像する際に、細胞全体に焦点を合わせることが容易となり、細胞の撮像を確実に行うことが可能となる。また、底面の形状を円形または四角形以上の多角形とし、底面の大きさを上記範囲とすることにより、通常用いられる倍率（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、好ましい細胞の大きさで、かつ底面全体を1枚の画像により撮像することが可能となる。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。

[0011] また、底面と隣接する側面と、底面とのなす側面側の角度を 50° 以上とすることにより、底面と側面により形成される空間を狭くすることができる。そのため、少ない培養液の使用量で、細胞を液中に浸すことができ、また、容器中の培養液の深さを保つことができるので、細胞の乾燥を防止することができる。なお、「側面と底面とのなす側面側の角度」とは、側面と底面とのなす角の、容器の内部側と側面側の角のうち、側面側の角度のことをいう。

[0012] さらに、底面に隣接する側面と底面とのなす側面側の角度を 80° 以下とすることにより、PCR用容器内の培養液中の気泡が抜け易くなり、気泡に影響されない良好な画像を撮像することができる。

[0013] 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複数の傾斜面を有することが好ましい。

[0014] この態様において、複数の傾斜面のうち、底面と隣接している傾斜面以外の傾斜面と、底面の平行線とのなす角度が、底面に隣接する側面と底面となす側面側の角度よりも浅い角度を有する傾斜面を、少なくとも1つ有する態様のPCR容器である場合には、容器の開口部を広くすることが可能となり、細胞を容器内に導入することが容易となる。

[0015] 本発明の別の態様においては、底面と隣接していない傾斜面と、底面の平行線とのなす角で、側面側の角度が 40° 以上 90° 以下であることが好ましい。

[0016] この態様によれば、側面を二段以上の複数の傾斜面を有し、底面と隣接していない側面と、底面の平行線とのなす角度を 40° 以上とすることにより、細胞を容器内に導入した場合に、細胞が底面まで到達せずに側面である傾斜面にとどまってしまうことを防止することができる。

[0017] 本発明の別の態様においては、複数の傾斜面のうち、底面と接している傾斜面以外の傾斜面と、底面の平行線とのなす角で、側面側の角度が、PCR用容器の開口部から底面に向かって小さくなることが好ましい。

- [0018] この態様によれば、側面を形成する傾斜面で、底面と接していない傾斜面の角度を、底面に向かって徐々に小さくすることにより、側面である傾斜面にとどまることなく、細胞を底面まで導入しやすくすることができる。
- [0019] 本発明の別の態様においては、底面に外接する円に近似した時の円の中心と開口部の端部とを結ぶ線が底面に対して垂直な直線となす角度の2倍の角が、 45° 以下であることが好ましい。
- [0020] この態様によれば、底面に外接する円に近似した時の円の中心と、開口部の端部とを結ぶ線が底面に対して垂直な直線となす角度の2倍の角を 45° 以下とすることにより、開口部が広くなることを防止し、プレート上に配置した際のスペースを狭くすることができる。また、開口部を狭くすることにより、側面の傾斜の角度が大きくなるので、細胞を底面まで導きやすくすることができる。
- [0021] 本発明の別の態様においては、底面の厚みが、 0.2 mm 以上 1 mm 以下であることが好ましい。
- [0022] この態様によれば、底面の厚みを上記範囲とすることにより、PCR用容器の底面側から細胞を撮像した際に、細胞にレンズの焦点を当てることができる。底面の厚みが 0.2 mm 以上であると、焦点深度により、容器の外側のキズや付着したゴミなどが、撮像される画像に影響を及ぼすことがなくなり、細胞の画像のみを撮像することが可能となる。また、底面の厚みが 1 mm 以下であると、レンズを細胞に接近させることが可能となるので、細胞の拡大画像を容易に取得することが可能となる。
- [0023] 本発明の別の態様においては、 350 nm 以上 800 nm 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。
- [0024] この態様によれば、PCR用容器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。
- [0025] 本発明の別の態様においては、材質が、ポリプロピレンまたはポリスチレ

ンであることが好ましい。

[0026] この態様は、PCR用容器に用いられる材料を限定したものであり、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、容器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、PCR処理においては、温度をかけて処理するため、上記の材料を用いることにより、耐熱性を確保することができる。

[0027] 本発明の別の態様においては、PCR容器の内側に、細胞低付着処理が施されていることが好ましい。

[0028] 細胞低付着処理は、細胞すなわちタンパク質を、容器に付着させないようにする処理であり、PCR容器の内部表面にタンパク質を吸着させない材料をコートする処理である。この態様によれば、容器の内壁への細胞付着を防止して、底面に確実に細胞を到達させることができ、細胞観察が可能となる。

発明の効果

[0029] 本発明のPCR用容器によれば、細胞の撮像（観察）とPCR処理を、同じ容器内において行うことができる。したがって、画像を撮像した後に、容器内の細胞を移動させる操作が不要であり、効率良く、解析を行うことができる。また、キャピラリーなどの高価な器具が不要であり、解析に要するコストを下げる事が可能となる。

図面の簡単な説明

[0030] [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]PCR用容器の形状を示す断面図である。

[図3]撮像される画像とPCR用容器の底面のサイズとの関係を示した図である。

[図4]他の実施形態のPCR用容器の形状を示す断面図である。

[図5]さらに他の実施形態のPCR用容器の形状を示す断面図である。

発明を実施するための形態

[0031] 以下、添付図面に従って本発明に係るPCR用容器について説明する。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値および上限値として含む意味で使用される。

[0032] 《解析装置》

まず、本実施形態のPCR用容器を適用し、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。

[0033] 図1は、PCR用容器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、可視光による細胞の光透過画像の取得が可能な解析装置である。

[0034] 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PCR用容器17およびプレート18からなるトレー19、および、レンズ20、励起フィルタ22、ダイクロイックミラー24および蛍光フィルタ26を保持したフィルタ群（フィルタキューブ）28、ならびに、細胞16からの蛍光および透過光を撮像する撮像装置30を備える。

[0035] 蛍光用励起光源装置12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16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12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22で、目的の波長のみ透過させることで、細胞16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14としても、蛍光用励起光源装置12と同様の光源を用いることができる。

[0036] トレー19は、プレート18と、本実施形態のPCR用容器17と、から

なり、PCR用容器17は、観察対象となる細胞16を保持する。細胞16は、細胞培養液とともに、PCR用容器17に供される。PCR用容器17については、後述する。

[0037] 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、光学測定に使用されるレンズを用いることができる。

[0038] 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において、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、励起光に比べてより長波長側の波長帯域を有するので、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によって細胞16からの蛍光発光のみの情報により撮像することが可能となる。従って、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、蛍光発光情報による検査の精度を向上させることができる。

[0039] 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に、通常は複数の種類からなる色素を用いて免疫染色がなされる。この場合、この免疫染色された細胞の複数の種類の色素から生じる蛍光に対して、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、異なる波長の光学情報を独立して手得することができる。
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 により撮像することができる。

[0040] 撮像装置 30 としては、トレー 19 上の PCR 用容器 17 中に分取された細胞 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。

[0041] PCR 用容器に細胞を分取する方法としては、例えば、フローサイトメトリにより行うことができる。また、複数の細胞をまとめて、PCR 用容器とプレートが一体となったトレー上に滴下し、遠心 ($100 \text{ rpm} \cdot 1 \text{ 分}$) または静置して PCR 用容器に落とすことにより、PCR 用容器に分取することができる。PCR 用容器とプレートが一体となって形成されている場合には、プレートに、溝、切り取り線、または、印刷線などの切断導入機構を設けることが好ましい。この切断導入機構に従って、プレートを切断することにより、PCR 用容器を個別に処理することが可能となる。

[0042] ≪PCR 用容器≫

図 2 は、本実施形態で用いられる PCR 用容器 17 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、PCR 用容器 17 の裏面側から励起光を照射し、PCR 用容器 17 を透過したその励起光により発光した細胞から蛍光発光が生じる。この細胞の情報を含む蛍光を受光するため、これらの蛍光に対して、PCR 用容器 17 の材質が、透明であること、自家蛍光しないこと、散乱しないこと、PCR において行う温度サイクルに耐えられることなどの条件を満たす材質であることが必要となる。また、細胞 16 を撮像するため、PCR 用容器 17 の内部の底面 17a が、平坦な形状である。PCR 用容器 17 の底面 17a 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 17a 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。

[0043] また、底面 17a 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 17 a の大きさは、底面 17 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 $1\text{ mm } \phi$ 以下であり、 $0.2\text{ mm } \phi$ 以上 $0.5\text{ mm } \phi$ 以下であることがより好ましい。なお、図 2 は、底面 17 a を円形として記載されている。底面 17 a の形状、大きさを上記の形状、サイズとすることにより、そして、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 17 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ことが好ましい。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、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。

[0044] 図 3 は、顕微鏡により撮像される画像撮像領域 40 と PCR 用容器の内部の平坦な底面との関係を示した図である。底面のサイズは、底面の直径 L が、画像撮影領域 40 の直交する 2 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。このように、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 PCR 用容器の内部の平坦な底面 17 a 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で、かつ 1 視野による細胞の撮影が可能となる。この画像撮影領域 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 17 a 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 $0.1\text{ mm } \phi$ 、5 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 17 a を撮像することができる。細胞を観察する倍率は高倍率が好ましいが、倍率が高くなると PCR 用容器の底面の凹凸などにより、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。

[0045] 図2において、底面17aに接している側面17bは、底面17aと側面17bとがなす角で側面側の角 θ_B の角度が 50° 以上 80° 以下である。底面17aと側面17bとがなす角 θ_B の角度を 80° 以下とすることにより、培養液中の気泡を抜きやすくすることができる。また、角 θ_B の角度を 50° 以上、底面のサイズを、外接する円に近似した時、円の直径Lが $0.05\text{ mm}\phi$ 以上 $1\text{ mm}\phi$ 以下とすることにより、底面17aと側面17bとで形成される空間を狭くすることができ、少ない培養液量で、細胞16を培養液に浸すことができる。さらに、培養液、および、細胞16が乾燥することを防止することができるとともに、培養液の深さを確保することにより、培養液の液面のメニスカスにより、光が屈折し、画像解析に影響を及ぼすことを防止することができる。この角 θ_B の角度は、 55° 以上 70° 以下とすることがより好ましい。

[0046] また、PCR用容器17の底面17a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、PCR用容器17の底面17a側から撮像する態様が好ましい。底面17aの厚みが 1 mm 以内であれば、レンズ20が細胞16に接近することが可能となり、好ましい。また、 0.2 mm 以上であれば、焦点深度から、PCR用容器17の外側のキズや付着したゴミ、汚れなどの焦点がずれて、撮像される画像に影響を及ぼさず、細胞の画像のみを撮像することが可能となるため好ましい。底面17aの厚みtは、 0.3 mm 以上 0.5 mm 以下が更に好ましく、 0.4 mm が最も好ましい。

[0047] PCR用容器17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、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。また、これらの材料を用いたPCR用容器は、耐熱性も優れており、PCRサーマルサイクラーに適用してもPCR用容器が劣化することなくPCR処理を行うことができる。これらの材料を用いて製造されたPCR用容器は、 350 nm 以上 800 nm 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、7

0%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。なお、本発明において、「透過率」とは、透過光を入射光により割った値（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。

[0048] PCR用容器17の外側の形状は、PCR処理を行う装置、好ましくは、PCRサーマルサイクラーへの搭載が可能な形状であることが好ましい。PCR処理を行う装置に対応させることにより、画像を撮像したPCR用容器のまま、PCR処理を行うことができる。PCRサーマルサイクラーに搭載可能とする場合、PCR処理を行う装置とPCR用容器17の外形の隙間が狭いことが好ましい。PCR用容器17との隙間を小さくすることにより、温度を効率良くPCR用容器17にかけることができる。また、PCR処理を行う際に、温度を効率良くかけるためには、PCR用容器の外側形状と内側形状がほぼ同じ（相似形）であることが好ましく、更には底面から開口部にかけて側面の厚さが均一であることがより好ましい。厚みを均一にすることにより、PCR用容器内の細胞、および、培養液に効率良く、均一に熱が伝わることにより、PCR処理を精度よく制御することが可能となる。

[0049] また、PCR用容器17の内部には、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PCR用容器17の内部に付着しないようにする処理であり、表面にタンパク質を吸着させない材料をコートする処理である。。PCR用容器17の内部へのタンパク質吸着の原因は、PCR用容器17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。したがって、細胞低付着処理は、親水性基を有する材料を用いてコーティングすることにより可能となる。

[0050] 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、リピジュア（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、B

S A (Bovine serum albumin) などの親水性基を有する材料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。

[0051] PCR用容器 1 7 の内部に細胞低付着処理を施すことにより、PCR用容器 1 7 の内壁への細胞の付着を防止して、底面 1 7 a に確実に細胞を到達させて、細胞観察を可能とすることができる。

[0052] 図 4 は、他の実施形態の PCR 用容器 1 1 7 の形状を示す断面図である。図 4 に示すように、側面は、多段で屈曲し、二段以上の傾斜面により形成することもできる。多段で屈曲している場合、底面 1 1 7 a と接している側面 1 1 7 b 以外の側面 1 1 7 c は、それぞれの側面 1 1 7 c と底面 1 1 7 a の平行線とがなす角で側面側の角 $\theta_{c1} \sim \theta_{c3}$ の角度が 40° 以上 90° 以下であることが好ましい。角度が 40° 以上であると、側面 1 1 7 c の傾斜面に細胞がとどまることがなくなり、細胞が底面までに確実に収納することが可能となる。また、角度が 40° 以上であることにより、PCR用容器 1 1 7 の開口部 1 1 7 d を狭くすることが可能となり、トレー 1 9 の狭いスペースにおいて複数の PCR 用容器を収納することが可能となるため、好ましい。

[0053] さらに、多段で屈曲している場合、底面 1 1 7 a に接している側面 1 1 7 b を除き、開口部 1 1 7 d から底面 1 1 7 a に向かって、角 $\theta_{c1} \sim \theta_{c3}$ が、徐々に小さくなる、すなわち、 $\theta_{c1} > \theta_{c2} > \theta_{c3}$ とすることが好ましい。このような構成とすることにより、PCR用容器 1 1 7 内に分取された細胞を底面 1 7 a に導きやすくすることが可能となる。また、PCR用容器 1 1 7 内の底面から二段目の角度（図 4 においては、角 θ_{c3} ）を小さくすることにより、PCR用容器 1 1 7 内の培養液の量の調節を容易に行うことが可能となる。ピペットなどを用いて PCR 用容器 1 1 7 内の培養液を抜く場合、側面 1 1 7 c にピペットをあてて培養液を抜くことにより、底面 1 1 7 a と側面 1 1 7 b とにより形成される PCR 用容器の底面に近い空間にのみ培養液を残すことが可能となる。角 $\theta_{c1} \sim \theta_{c3}$ の角度は、例えば、図 4 において、

$\theta_{C1} = 90^\circ$ 、 $\theta_{C2} = 75^\circ$ 、 $\theta_{C3} = 45^\circ$ とすることができる。

[0054] また、底面 117a の中心（外接する円に近似した時の円の中心）と開口部 117d の端部とを結ぶ線が底面に対して垂直な直線となす角度の 2 倍の角である角 θ_A の角度で最も広い角度が 45° 未満であることが好ましい。角 θ_A の角度を 45° 未満とすることにより、PCR 用容器 117 の開口部 117d が広くなることを防止し、トレー 19 のスペースを小さくすることが可能となる。

[0055] 図 5 は、さらに別の実施形態の PCR 用容器 217 の形状を示す断面図である。図 4 に示す実施形態の PCR 用容器 117 とは、側面の屈曲する段数が異なっている。側面の屈曲する段数は限定されず、底面 217a に隣接する側面 217b と、角 θ_B と異なる角度の角 θ_C で屈曲する側面 217c の 2 段の傾斜面で形成することが可能である。

符号の説明

- [0056] 10 解析装置
- 12 蛍光用励起光源装置
- 14 明視野光源装置
- 16 細胞
- 17、117、217 PCR 用容器
- 17a、117a、217a 底面
- 17b、117b、117c、217b、217c 側面
- 117d 開口部
- 18 プレート
- 19 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）

3 0 撮像装置

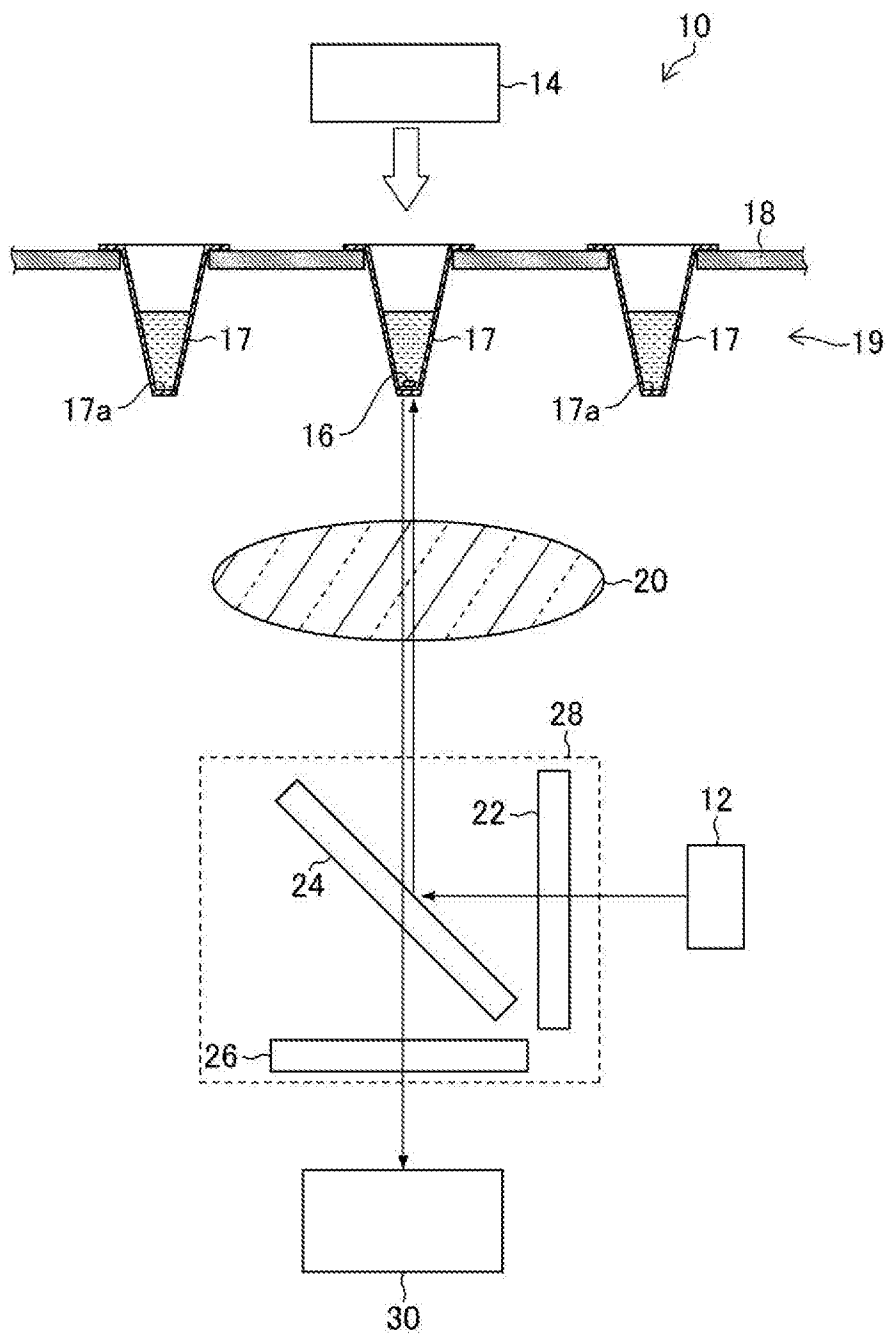
4 0 画像撮影領域

請求の範囲

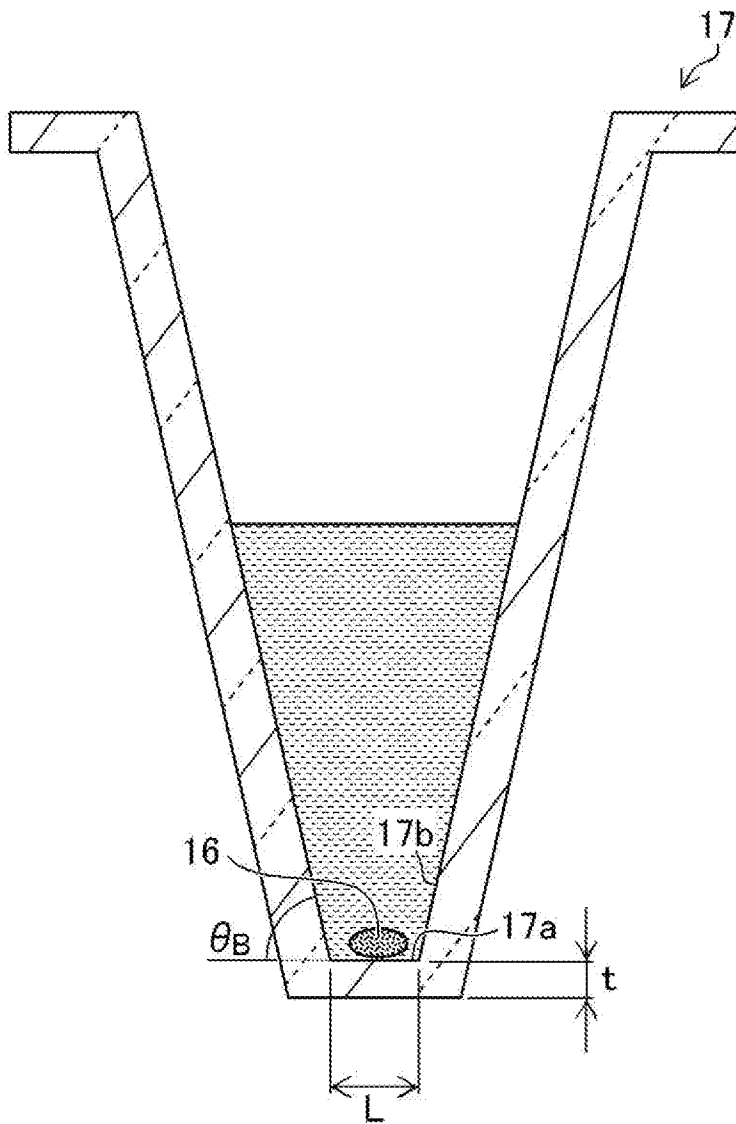
- [請求項1] PCR用容器であって、
内部の底面が、平坦であり、かつ、前記底面の形状が円形または四角形以上の多角形であり、
前記底面の大きさは、前記底面を外接する円に近似した時の直径が0.05mmφ以上1mmφ以下であり、
前記底面と隣接する側面と、前記底面とのなす前記側面側の角度が50°以上80°以下であるPCR用容器。
- [請求項2] 側面は、前記底面に対して異なる角度を有する二段以上の複数の傾斜面を有する請求項1に記載のPCR用容器。
- [請求項3] 前記複数の傾斜面のうち、前記底面と接している傾斜面以外の傾斜面と、前記底面の平行線とのなす角で、側面側の角度が40°以上90°以下である請求項2に記載のPCR用容器。
- [請求項4] 前記複数の傾斜面のうち、前記底面と接している傾斜面以外の傾斜面と、前記底面の平行線とのなす角で、側面側の角度が、前記PCR用容器の開口部から前記底面に向かって小さくなる請求項2または3に記載のPCR用容器。
- [請求項5] 前記底面に外接する円に近似した時の円の中心と前記PCR用容器の開口部の端部とを結ぶ線が前記底面に対して垂直な直線となす角度の2倍の角が、45°以下である請求項2から4のいずれか1項に記載のPCR用容器。
- [請求項6] 前記底面の厚みが、0.2mm以上1mm以下である請求項1から5のいずれか1項に記載のPCR用容器。
- [請求項7] 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6のいずれか1項に記載のPCR用容器。
- [請求項8] 材質が、ポリプロピレンまたはポリスチレンである請求項1から7のいずれか1項に記載のPCR用容器。
- [請求項9] 前記PCR用容器の内側に、細胞低付着処理が施されている請求項

1 から 8 のいずれか 1 項に記載の P C R 容器。

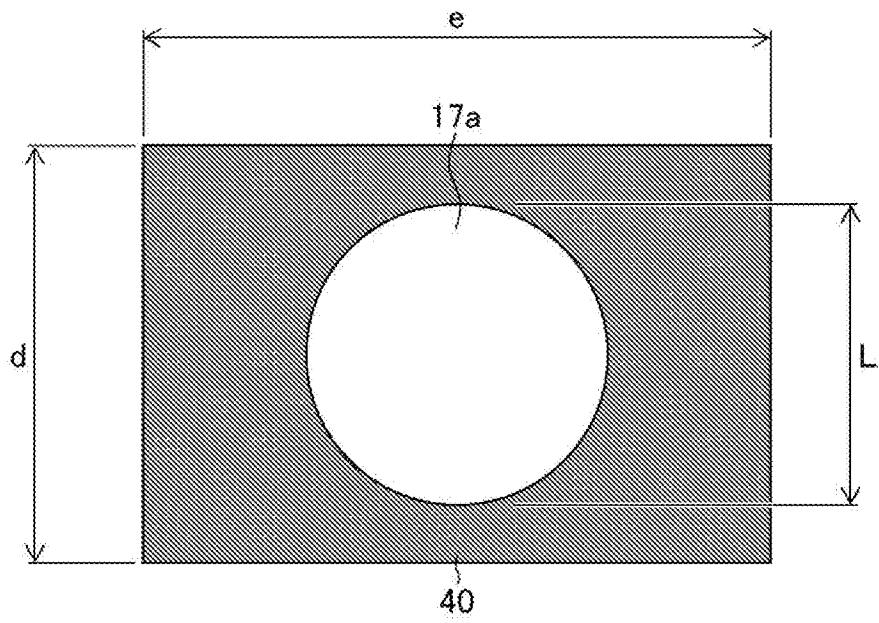
[図1]



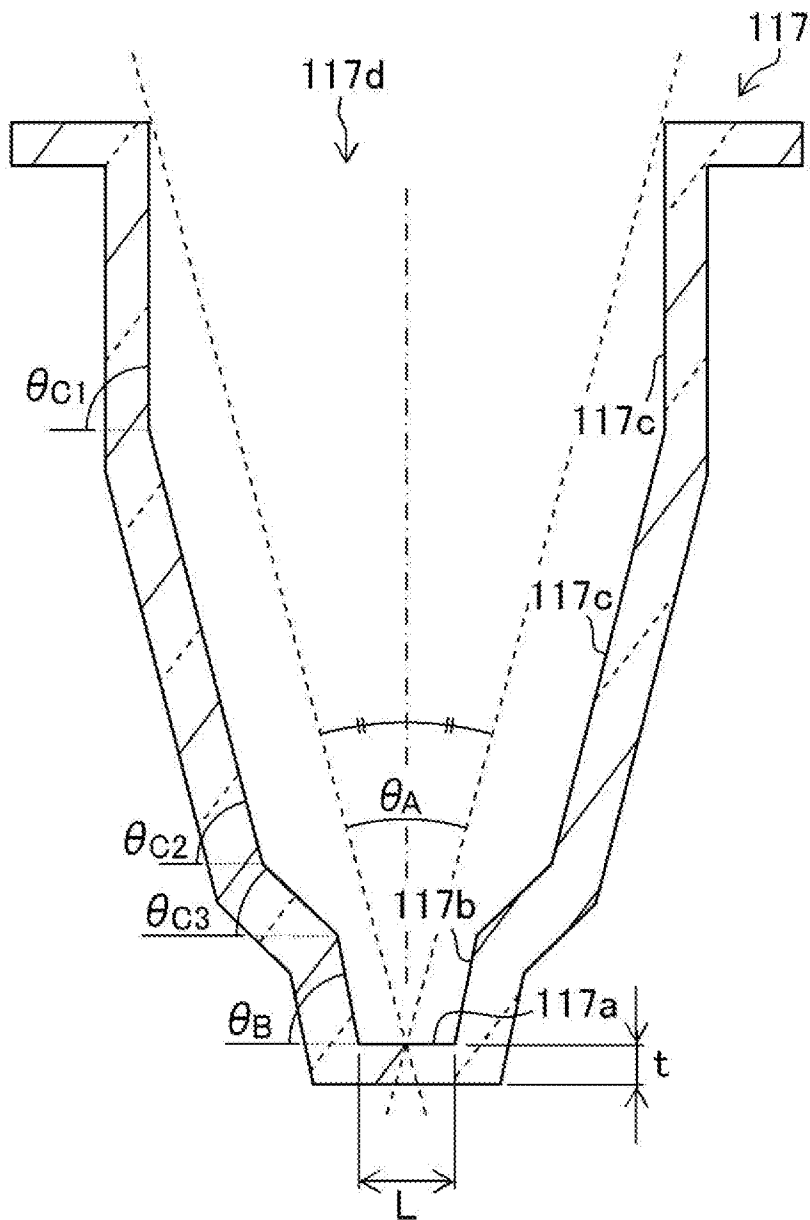
[図2]



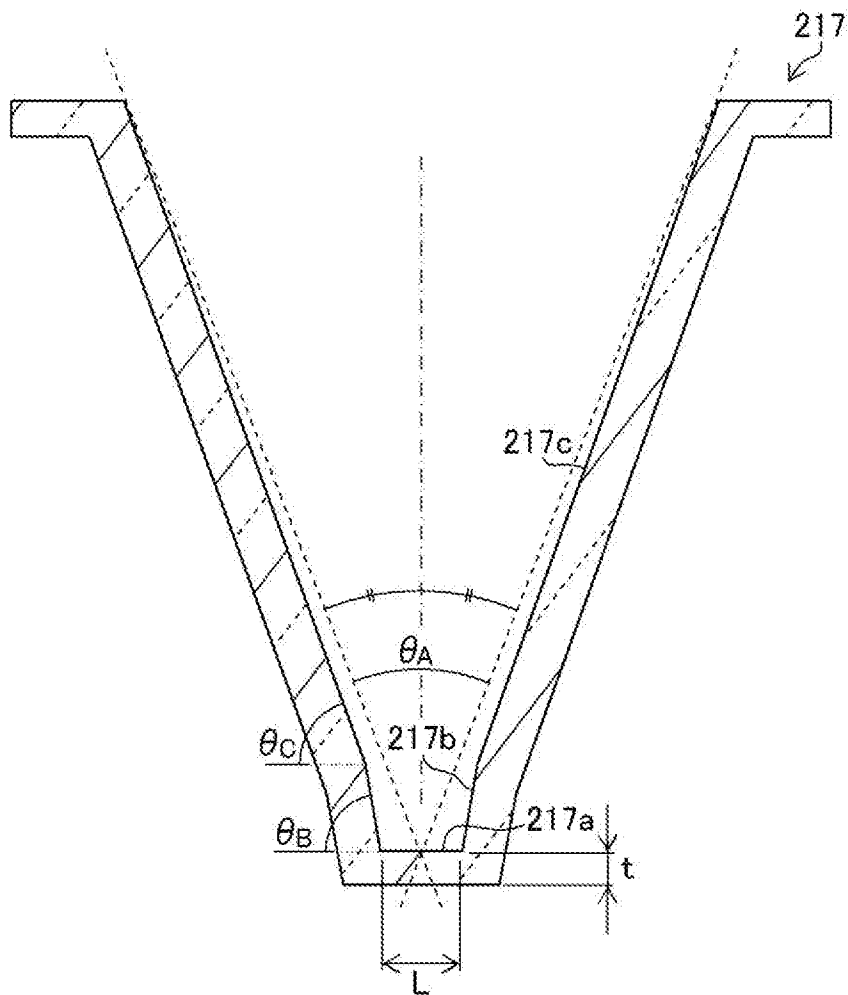
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/00

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-97200 A (Enplas Corp.), 02 April 2004 (02.04.2004), paragraphs [0041], [0042], [0050]; fig. 2 & US 2005/0042143 A1 paragraphs [0042], [0043], [0051]; fig. 2 & WO 2003/057873 A1 & EP 1457553 A1 & CN 1610741 A & KR 10-2004-0069201 A	1-9
X	JP 2010-32487 A (Olympus Corp.), 12 February 2010 (12.02.2010), claims; paragraphs [0008], [0012] to [0018], [0014], [0040] to [0052]; fig. 1, 3 to 5 (Family: none)	1-9

☒ 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
25 April 2017 (25.04.17)

Date of mailing of the international search report
16 May 2017 (16.05.17)

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/JP2017/005127

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-249610 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 15 September 2005 (15.09.2005), paragraphs [0014] to [0028], [0044] to [0048]; fig. 1 (Family: none)	1-9
X	JP 2014-518758 A (Bio-Rad Laboratories Inc.), 07 August 2014 (07.08.2014), claims; paragraph [0013]; fig. 1 to 4 & US 2013/0143272 A1 claims; paragraph [0021]; fig. 1 to 4 & WO 2012/154453 A1 & EP 2704835 A1	1-9

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

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

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)

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	JP 2004-97200 A (株式会社エンプラス) 2004.04.02, [0041]、 [0042]、[0050] 段落、図2 & US 2005/0042143 A1 [0042]、[0043]、[0051]、Fig.2 & WO 2003/057873 A1 & EP 1457553 A1 & CN 1610741 A & KR 10-2004-0069201 A	1-9
X	JP 2010-32487 A (オリンパス株式会社) 2010.02.12, 特許請求の範 囲、[0008]、[0012] ~ [0018]、[0014]、[004 0] ~ [0052] 段落、図1、3-5 (ファミリーなし)	1-9

☒ 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

25.04.2017

国際調査報告の発送日

16.05.2017

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)

上村 直子

4 B

4508

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	JP 2005-249610 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005.09.15, [0014] ~ [0028], [0044] ~ [0048] 段落、図1 (ファミリーなし)	1-9
X	JP 2014-518758 A (バイオーラッド ラボラトリーズ インコーポレーティッド) 2014.08.07, 特許請求の範囲、[0013] 段落、図1-4 & US 2013/0143272 A1 特許請求の範囲, [0021], Fig. 1-4 & WO 2012/154453 A1 & EP 2704835 A1	1-9