

(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  
2020年10月29日(29.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/218551 A1

(51) 国際特許分類:  
C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/6844 (2018.01)  
C12Q 1/6806 (2018.01) C12N 11/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/017790

(22) 国際出願日: 2020年4月24日(24.04.2020)

(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 2019-085829 2019年4月26日(26.04.2019) JP

(71) 出願人: bit Biome株式会社(BITBIOME, INC.) [JP/JP]; 〒1690051 東京都新宿区西早稲田一丁目2番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 細川 正人 (HOSOKAWA Masahito); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 竹山 春子 (TAKEYAMA Haruko); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 西川 洋平(NISHIKAWA Yohei); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO Shusaku et al.); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町3-1 グランフロント大阪 タワーC Osaka (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, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: SEQUENCE-SCREENING METHOD FROM SINGLE-CELL GENOME LIBRARY USING GEL ENCAPSULATION TECHNIQUE

(54) 発明の名称: ゲルカプセル方式による1細胞ゲノムライブラリーからの配列スクリーニング法

(57) Abstract: The present disclosure provides an analysis of single cells with high precision. More particularly, the present disclosure provides: a method that is for analyzing cells or cell-like structures and that comprises a step for encapsulating two or more cells or cell-like structures or substances derived therefrom, or capsules containing these elements, together with a desired chemical agent separately for respective cells or cell-like structures or substances derived therefrom, and a step for analyzing the cells or cell-like structures using the desired chemical agent; and a technique related to the method.

(57) 要約: 本開示は、シングルセルの精度良い解析を提供する。より詳細には、本開示は、2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに所望の薬剤とともにカプセル化する工程と、該所望の薬剤を用いて該細胞または細胞様構造物の分析を行う工程とを包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法及びそれらに関連する技術を提供する。

WO 2020/218551 A1

## 明 細 書

発明の名称：

ゲルカプセル方式による1細胞ゲノムライブラリーからの配列スクリーニング法

### 技術分野

[0001] 本開示は、カプセル化法を用いた単一細胞または細胞様構造物の個別の分析の応用に関する。

### 背景技術

[0002] 多様な細胞を含有する様々な生物学的サンプルにおいて、シングルセル毎の解析を行うことが近年少しずつ可能になっている。しかしながら、このような解析には、依然として、細胞の効果的な分離、単一細胞の溶解、全ゲノムの均一増幅、単一細胞増幅ゲノム（SAG）の品質評価、配列決定ライブラリー調製、および配列決定分析を含めたサンプル調製プロセスにおけるいくつかの技術的課題が存在している。そのため、品質とスループットを最大化するために、大規模並列解析を可能にする新規な技術に対する大きな需要がある。

[0003] 環境微生物のうち培養が可能なものはわずか1%に限られており、地球上の微生物の多様性の大部分は未知である。ゲノム配列情報は、生物を理解するための基本情報であり、ゲノム解読により系統、進化、疾患、生物地球化学的循環に関連する微生物の多様性と機能の理解が可能となる。このため、難培養性の機能理解には全ゲノム解析が必要不可欠とされている。この難培養微生物ゲノム解析の方法としては、試料から種々の微生物ゲノムを一括抽出し配列解読するメタゲノム解析が主流であった。

[0004] しかし、メタゲノム解析法では、様々な微生物ゲノム配列の情報が混在するデータが得られることになる。このため、その中から興味のある微生物のゲノム情報を取り出して個別に再構築することは容易ではなく、大規模なデータ取得と計算処理が必要とされている。

[0005] 一方、1細胞解析では細胞一つ一つを始めに分けた後、処理を開始する。単一の細胞に由来する遺伝情報のみを直接的に取得するため、例えばゲノム情報を再構成するための計算難易度はメタゲノム解析に比べて圧倒的に易しい。しかし、細胞内の極少量のゲノム配列を漏れなく解読するためには、高精度な細胞操作と核酸反応が求められる。

[0006] 1細胞ゲノム解析のステップは、(1)微生物1細胞の分取、(2)微生物の溶解、(3)全ゲノム増幅、(4)増幅ゲノムのシーケンス解析、に大きく分けることができる。しかし、従来の分子生物学実験で用いられてきた数十マイクロリットルの反応系は、1細胞という極小の試料を上記の流れにしたがい精密に扱う上で不適切であった。具体的には、小さく不定形の多様な微生物をフローサイトメトリーなどで分取する際には、生物以外の粒子と微生物を分けて認識し回収することが困難であった。分取した微生物試料の扱いにおいても、実験環境や試料、実験者からの核酸のコンタミネーションが大容量の反応系においては高頻度に生じ、正常な増幅産物が得られる歩留まりは低く、解読した配列の大部分が無関係のコンタミネーション由来になるケースが非常に大きかった。

[0007] さらに、正しい配列のみを情報処理により抽出しても、30%程度のゲノム解読率に留まっていた。オープンな実験環境ではエアロゾルなどからのコンタミネーションを完全に防ぐことは難しいため、1細胞ゲノム解析実験専用の清浄実験環境が必要とされている。また細胞一つ一つからシーケンスを実行する必要性に対して、反応系のスループット性が極めて低いことも課題であり、高価な分注ロボットなどが実験操作に使用されてきた。

## 発明の概要

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意研究した結果、一旦シングルセル（単位生物単位）にした後に、再度ゲルカプセル化の手法を適用することで、個別の単一生物単位（例えば、細胞）を集合として保持したままでさらに核酸増幅や検出などを行うことができることを見出し、本開示を完成するに至った。

本開示の実施形態の例として、以下のものが挙げられる。

(項目 1)

(A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、第一の薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、

(B) 第一の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(C) 該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第二の薬剤とともにカプセル化する工程と、

(D) 該第二の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(E) 必要に応じて、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、

(F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、

(H) 該カプセルに対して少なくとも1つの分析を行う工程とを包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。

(項目 1 A)

(A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、第一の薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、

(B) 第一の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(C) 該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第二の薬剤とともにカプセル化する工程と、

(D) 該第二の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(E) 必要に応じて、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、

(F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、

(H) 該カプセルに対して第1～第2および必要に応じて第3～第Xの薬剤に基づく少なくとも1つの分析を行う工程と

を包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。

(項目2)

(C') 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに所望の薬剤とともにカプセル化する工程と、

(D') 該所望の薬剤を用いて該細胞または細胞様構造物の分析を行う工程と

を包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。

(項目3)

(E)～(G)は存在せず、前記第一の薬剤および第二の薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目4)

前記所望の薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、単一の細胞または構造物単位ごとに選別し、該細胞または細胞様構造物に含まれる核酸を増幅する工程と、

B) 該増幅された核酸を含む細胞または細胞様構造物を、分析に必要な薬剤とともに、個別にカプセル化する工程と、

C) 該個別にカプセル化された該細胞または細胞様構造物について分析する工程と

を包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。

(項目 6)

前記 C) の分析は、核酸増幅によるものであり、前記 B) の分析に必要な薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記 A) が、

a) 2 つ以上の細胞または細胞様構造物を含む試料を用い、液滴中に 1 つの細胞または成分を封入することと、

b) 該液滴をゲル化してゲルカプセルを生成することと、

c) 該ゲルカプセルを 1 種以上の溶解用試薬に浸漬して該細胞または成分を溶解することであって、該細胞または成分中のポリヌクレオチドが該ゲルカプセル内に溶出し該ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態で前記ゲルカプセル内に保持される、ことと、

d) 該ポリヌクレオチドを第 1 の増幅用試薬に接触させて該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅すること

を包含する、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記単一細胞または単一細胞様構造物の懸濁液をマイクロ流路中に流動させ、オイルで前記懸濁液をせん断することにより該単一細胞または単一細胞様構造物を封入した前記液滴が作製されることを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記ゲルカプセルがアガロース、アクリルアミド、PEG、ゼラチン、ア

ルギン酸ナトリウム、マトリゲル、コラーゲン又は光硬化性樹脂から形成されることを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記溶解用試薬がリゾチーム、ラビアーゼ、ヤタラーゼ、アクロモペプチダーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ザイモリアーゼ、キチナーゼ、リソスタフィン、ムタノライシン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、フェノール、クロロホルム、グアニジン塩酸塩、尿素、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、TCEP-HCl、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween 20、Tween 80、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、CHAPS、CHAPSO、ドデシル-β-D-マルトシド、Nonidet P-40、および Zwittergent 3-12 からなる群から少なくとも1種選択されることを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記ゲルカプセルがヒドロゲルカプセルであることを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記分析に必要な薬剤が第2の増幅用試薬である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記第1の増幅試薬と前記第2の増幅用試薬とが同一である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。(項目14)

前記第1の増幅試薬と前記第2の増幅用試薬とが異なる、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記第1の増幅試薬がゲノムDNAまたはその部分の増幅用試薬または特

定配列増幅用試薬である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 16)

前記第2の増幅試薬がゲノムDNAまたはその部分の増幅用試薬または特定配列増幅用試薬である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 17)

前記a)において、前記液滴中に前記1つの細胞または細胞様構造物、および第1の標識を封入することを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記B)において、前記1つの細胞または細胞様構造物および第2の標識をカプセル化することを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 19)

前記第1の標識と前記第2の標識とが同一である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 20)

前記第1の標識と前記第2の標識とが異なる、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 21)

前記第1の標識と前記第2の標識とが核酸の量を示すことを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

前記C)が、前記第1の標識および／または前記第2の標識を評価することを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 23)

前記A)における前記細胞または細胞様構造物に含まれる核酸が、ゲノムDNAである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 24)

前記C)の分析において、種特異的な配列または特定種に保存されている配列の増幅を行うことを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

細胞または細胞様構造物を分析するためのシステムであって、

[X] 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、カプセル化するための薬剤および／またはそれらを格納するカプセル化薬剤格納部と、

[Y] 分析に使用する所望の薬剤および／またはそれらを格納する分析薬剤格納部と、

[Z] カプセル化のための手段と

[W] 必要に応じて、該所望の薬剤を用いて分析を行うための手段とを備える、システム。

(項目25A)

上記項目のいずれか一項または複数に記載の特徴をさらに含む、項目25に記載のシステム。

(項目26)

細胞または細胞様構造物を分析するためカプセルを提供するためのキットであって、

[X] 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、カプセル化するための薬剤と、

[Y] 分析に使用する所望の薬剤と、を備える、キット。

(項目26A)

上記項目のいずれか一項または複数に記載の特徴をさらに含む、項目26に記載のキット。

(項目27)

細胞または細胞様構造物を分析する方法であって、

- (A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、核酸増幅のための薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、
- (B) 第一の核酸増幅反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、
- (C) 該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに核酸増幅のための薬剤とともにカプセル化する工程と、
- (D) 第二の核酸増幅反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、
- (E) 必要に応じて、D) で得られた、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、
- (F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、
- (G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、
- (H) 該カプセルに含まれる核酸の配列決定を行う工程と
- を包含する、方法。

[0009] 本開示において、上記1又は複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供されることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態及び利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

### 発明の効果

[0010] 本開示により、個別の単一生物単位（例えば、「シングルセル」）を集合として保持したままで核酸増幅や検出、選別などを行うことができ、レアな細菌のデータを獲得したい場合、ホストDNAなどが多量に混在する場合、特定の細菌だけのデータが求められ、多様性の評価が不要な場合などに応用

可能である。

[0011] 本開示を用いると、希少な微生物種をもれなく捉えられる確度が高くなる。本開示はまた、事前に微生物種を特定し、全ゲノムシーケンスなどの分析に移行するサンプルを選抜することができる。本開示はまた、特異的な特定遺伝子の有無を事前に調べることで、ある種の微生物を選択的に選抜あるいは排除して、効果的なゲノム解析またはその他の分析を実施することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、単一の細胞または細胞様構造物を液滴に封入し、1次増幅するまでの段階を示す図である。1次増幅後にD A P Iなどの蛍光性DNAインターカレーターを用いて、ゲルカプセル内の核酸を染色する。

[図2]図2は、ゲルカプセルを液滴に再封入する段階を示す図である。ゲルカプセルを液滴に再封入する際に、PCR用プライマーおよび蛍光標識したプローブを添加したPCR反応液などとともに再封入を行う。PCR反応液は、例示であり、これ以外にLAMP反応、Smart Amp法、RPA（リコンビナーゼポリメラーゼ）増幅法も可能である。

[図3]図3は、PCR増幅（あるいは他の手法）および遺伝子検出を示す図である。再封入時にTaqmanプライマーなどの標識を共に封入することにより、特定の遺伝子が増幅された場合に検出することができる。遺伝子検出は、DNA結合性蛍光インターカレーターと特異的遺伝子検出用プライマーの併用でも可能である。

[図4]図4は、二次増幅の段階を示す図である。二次増幅に供する液滴は、1次増幅後の染色、遺伝子検出の結果に基づき選別することができる。選別は、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡での検鏡、マイクロ流体デバイスでも可能である。

[図5]図5は、PCRによる確認およびライブラリー調製の段階を示す図である。

[図6]図6は、ゲルカプセル方式による1細胞ゲノムライブラリーからの配列

スクリーニング法の全体的なフローを示す模式図である。

[図7]図7は、遺伝子検出時のゲルカプセルを示す図である。図7AはDAP Iによるゲルカプセルの染色を示し、図7BはFAMによるゲルカプセルの染色を示す。蛍光を示さない液滴、MDAによって増幅されたDNAに結合したDAP I由来の蛍光（青色）のみを示す液滴、DAP I由来の蛍光およびプローブ由来の蛍光（FAM：緑色）の2種類の蛍光を示す液滴、の3種類が確認できる。

### 発明を実施するための形態

[0013] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語及び科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0014] 本開示は、カプセル化により、その中で個別に分離して生成した集合に対して反応を行った集合に対して、さらにカプセル化技術を用いて別又は同じ反応を当該集合に対して行うことで、効率よいスクリーニングを可能とする技術に関する。具体的には、遺伝子配列解析に応用され、多様な微生物から並列調製された増幅ポリヌクレオチドから、遺伝子配列を参照して微生物特異的に検出し、選抜することができる。

[0015] （定義等）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義及び／又は基本的技術内容を適宜説明する。

[0016] 本明細書において、「細胞」とは、遺伝情報を有する分子を内包する粒子

であって、（単独で可能かどうかにかかわらず）複製されることが可能である任意の粒子を指す。本明細書における「細胞」としては、単細胞生物の細胞、細菌、多細胞生物由来の細胞、真菌などが包含される。

[0017] 本明細書において、「細胞様構造物」とは、遺伝情報を有する分子を内包する任意の粒子を指す。本明細書における「細胞様構造物」としては、細胞内小器官、例えば、ミトコンドリア、細胞核、および葉緑体、ならびにウイルスなどが包含される。

[0018] 本明細書において、「ゲル」とは、コロイド溶液（ゾル）において、高分子物質またはコロイド粒子がその相互作用により全体として網目構造をつくり、溶媒あるいは分散媒である液相を多量に含んだまま流動性を失った状態のことをいう。本明細書において、「ゲル化」とは、溶液を「ゲル」の状態に変化させることをいう。

[0019] 本明細書において、「カプセル」とは、その中に細胞または細胞様構造物を保持することが可能なカプセル状のものをいい、ゲルでできている場合は、ゲルカプセルといいゲル状の微粒子状構造体である。本明細書において「カプセル化」とは、細胞または細胞様構造物などをカプセルの中に封入する処理をいう。本明細書において「ゲルカプセル化」とは、細胞または細胞様構造物などをゲルであるカプセルの中に封入する処理をいう。

[0020] 本明細書において、「ゲルカプセル」とは、その中に細胞または細胞様構造物を保持することが可能なゲル状の微粒子状構造体を指す。

[0021] 本明細書において、「遺伝子分析」とは生体サンプル中の核酸（DNA、RNA等）の状態を調べることをいう。1つの実施形態では、遺伝子分析は、核酸増幅反応を利用するものを挙げることができる。これらを含め、遺伝子分析の例としては、配列決定、遺伝子型判定・多型分析（SNP分析、コピー数多型、制限酵素断片長多型、リピート数多型）、発現解析、蛍光消光プローブ（Quenching Probe: Q-Probe）、SYBR green法、融解曲線分析、リアルタイムPCR、定量RT-PCR、デジタルPCRなどを挙げることができる。

[0022] 本明細書において、「シングルセルレベル」とは、1つの細胞または細胞様構造物に含まれる遺伝情報またはその他の生体分子の情報に対して、他の細胞または細胞様構造物に含まれる遺伝情報またはその他の生体分子の情報と区別した状態で処理を行うことをいう。例えば、「単一生物単位レベル」または「シングルセルレベル」でのポリヌクレオチドを増幅する場合、それぞれある単一生物単位、またはある細胞もしくは細胞様構造物中のポリヌクレオチドと、他の単一生物単位、または他の細胞もしくは細胞様構造物中のポリヌクレオチドが区別可能な状態でそれぞれの増幅が行われる。

[0023] 本明細書において、「シングルセル解析」とは、1つの細胞または細胞様構造物に含まれる遺伝情報またはその他の生体分子の情報を、他の細胞または細胞様構造物に含まれる遺伝情報またはその他の生体分子の情報と区別した状態で解析することを指す。

[0024] 本明細書において、「遺伝情報」とは、1つの細胞または細胞様構造物に含まれる遺伝子その他情報をコードする核酸の情報を指し、特定の遺伝子配列の有無、特定の遺伝子の収量または全核酸収量を含む。

[0025] 本明細書において、「核酸情報」とは、1つの細胞または細胞様構造物に含まれる核酸の情報を指し、特定の遺伝子配列の有無、特定の遺伝子の収量または全核酸収量を含む。

[0026] 本明細書において、「同一性」とは、2つの核酸分子間の配列類似性を指す。同一性は、比較のためにアライメントしうる各配列中の位置を比較することによって決定することができる。

[0027] (好ましい実施形態)

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本開示の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にして、本開示の範囲内にある改変、変更などを容易に行うことができることが理解されるべきである。これらの実施形態について、当業者は適宜、1または複数の任意の実施形態を組み合わせ得る。

## [0028] (カプセル化技術の応用)

本開示の1つの局面において、本開示は、(A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、第一の薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、(B) 第一の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、(C) 該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第二の薬剤とともにカプセル化する工程と、(D) 該第二の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、(E) 必要に応じて、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、(F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、(G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、(H) 該カプセルに対して分析、例えば、第1～第Xの薬剤に基づく少なくとも1つの分析を行う工程とを包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法を提供する。ここで、Xは3以上の整数であり、任意の整数が選択される。(E)～(G)は任意工程であり、存在しない場合は、2回のカプセル化がなされる実施形態となる。2つ以上の細胞または細胞様構造物を、第一の薬剤とともにカプセル化し、第一の薬剤に基づく反応を細胞または細胞様構造物に対して行うだけでは、多量のサンプルを分析するのは非常に困難である場合もあるが、第一の薬剤に基づく反応を行った細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、第二の薬剤とともにカプセル化し、第二の薬剤を用いて細胞または細胞様構造物の分析を行うことにより、カプセルをチューブまたはプレートなどの容器内で分析することが不要となり、多量のサンプルを迅速かつ精確に分析することができ、また、第一の薬剤および第二の薬剤の反応に異なる種類の薬剤を用いて反応させる場合、第一の薬剤を用いて

一次スクリーニングし、これを第二および／または第三～第Xの薬剤を用いてさらに（第二次またはさらに高次の）スクリーニングすることができる。

[0029] 別の局面では、本開示は、一旦単一の細胞または細胞様構造物ごとに調製または処理がなされている場合において適用される局面を提供する。ここにおいて、本開示は、（C'）2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに所望の薬剤とともにカプセル化する工程と、（D'）該所望の薬剤を用いて該細胞または細胞様構造物の分析を行う工程とを包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法を提供する。

[0030] 本開示の方法を用いることで、多量のサンプルの中から、目的の遺伝子を含む、および／または含まない細胞または細胞様構造物を選択して、分析に供することが可能となる。例えば、レアな細菌のデータのみを獲得したい場合、ホストDNAなどが多量に混在し、目的の細胞または細胞様構造物の割合が低い場合、特定の細菌だけのデータが求められ、多様性の評価が不要な場合、本開示は有用である。

[0031] 1つの実施形態において、カプセルをさらにカプセル化する場合、それぞれのカプセルは別の材料で形成されてもよく、同一の材料で形成されてもよい。特定の実施形態において、工程（A）のカプセルはゲルカプセルであってもよい。1つの実施形態において薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤であってもよい。あるいは薬剤は、核酸プローブであってもよいし、抗体等のタンパク質やその他抗原を特定する薬剤でもよい。特定の実施形態において、複数の（第一～第Xの）薬剤は、それぞれ独立して同一であってもよく、異なってもよい。例えば、核酸増幅試薬の他、特定の核酸の分解薬剤、修飾剤、標識、各種酵素等を含んでいてもよい。

[0032] 工程（H）における分析は、カプセルに対して分析を行うものであり、それぞれのカプセル化ごとに都度分析してもよく、あるいはしなくてもよい。途中で行う場合は、スクリーニングのような機能を果たすことができ、最終

的に行う場合は、評価も兼ねた分析を行うこともできるがこれらに限定されない。1つの実施形態において、工程（H）の分析は、核酸増幅をとともってもよく、ともなわなくともよい。一部の実施形態において、工程（H）の分析は、含まれるおよび／または増幅された核酸の配列決定、全核酸の収量、特定配列の有無、特定配列の核酸の収量を分析してもよい。他の実施形態において、工程（D）の分析は、タンパク質、糖鎖、脂質等を対象とした分析でもよい。配列決定には次世代シーケンサ（NGS）等を用いることができ、全ゲノムシーケンスを取得してもよい。

[0033] 1つの実施形態において、所望の薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤であってもよい。他の実施形態において、所望の薬剤は、特定分子を検出するための薬剤であってもよい。特定の実施形態において、特定分子を検出するための薬剤として、プローブ、抗体、インターカラーター、タグ、放射性物質、蛍光色素結合ヌクレオチド、蛍光標識タンパク質などが挙げられる。

[0034] 一つの具体的な実施形態では、本開示は、細胞または細胞様構造物を分析する方法であって、

（A）2つ以上の細胞または細胞様構造物を、核酸増幅のための薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、

（B）第一の核酸増幅反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

（C）該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに核酸増幅のための薬剤とともにカプセル化する工程と、

（D）第二の核酸増幅反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

（E）必要に応じて、D）で得られた、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、

(F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、

(H) 該カプセルに含まれる核酸の配列決定を行う工程と

を包含する、方法を提供する。(E) で用いられる薬剤は上記したものと同様に種々の薬剤が使用され得る。

[0035] 本開示の具体的な実施形態において、本開示は、A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、単一の細胞または構造物単位ごとに選別し、該細胞または細胞様構造物に含まれる核酸を増幅する工程と、B) 該増幅された核酸を含む細胞または細胞様構造物を、分析に必要な薬剤とともに、個別にカプセル化する工程と、C) 該個別にカプセル化された該細胞または細胞様構造物について分析する工程とを包含する方法を提供する。増幅、カプセル化、分析などの詳細は、以下更に説明する。

[0036] (1次増幅)

前記工程A) は1次増幅ともいい、下記に記載の方法にて行うことができる。

[0037] (細胞中のポリヌクレオチド増幅方法)

一つの局面において、本開示は、細胞中のポリヌクレオチドを増幅する方法を提供する。この増幅方法は、2つ以上の細胞または細胞様構造物(例えば、ウイルス、小器官(Mt, Nuc)等を含む)を含む試料を用い、該細胞または細胞様構造物を1細胞または構造物単位ずつ液滴中に封入する工程と、該液滴をゲル化してゲルカプセルを生成する工程と、該ゲルカプセルを1種以上の溶解用試薬に浸漬して前記細胞または細胞様構造物を溶解する工程であって、該細胞中のポリヌクレオチドが該ゲルカプセル内に溶出し該ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態で前記ゲルカプセル内に保持される、工程と、該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程とを含む。本開示の増幅方法は、いわゆるシングルセルレベルでのゲノムまたはそれに類似する遺伝子集合

物を個別に増幅し得るものである。本開示の増幅方法は、個別のゲノム増幅を、非常に簡便な手法で実現するものであり、そのため、100個単位、1000個単位、1万個単位、10万個単位あるいはそれ以上の単位の細胞について一時期にゲノム情報を取得することができ、それゆえライブラリーとすることもできるものである。本開示の一実施形態において、当該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程は、当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅することもできる。

[0038] 本開示の方法における液滴中への封入工程は、下記（液滴生成）の項または他の項に詳述されている任意の実施形態を採用することができる。

[0039] 1つの実施形態では、本開示の増幅方法において対象としうる細胞または細胞様構造物は、2つ以上の任意の数字であり、例えば、10個以上、50個以上、100個以上、500個以上、1000個以上、5000個以上、1万個以上、5万個以上、10万個以上、50万個以上、100万個以上、500万個以上、1000万個以上であり得る。本開示の増幅方法は、従来のシングルセル反応系、例えば、0.2 mL、1.5 mL マイクロチューブ反応系を用いるよりも多数の細胞を対象とし得る。

[0040] 本開示の増幅方法において対象とし得る細胞または細胞様構造物は、（細胞および細胞様構造物）の項に説明されている任意のものを採用することができる。1つの好ましい実施形態では、細胞が対象とされ得る。別の実施形態では、細胞様構造物が対象とされ、その中でも、ウイルス、あるいはミトコンドリア、核等の細胞小器官等を対象とすることができる。

[0041] 本開示の増幅方法において、提供される細胞または細胞様構造物を含む試料は、どのような形で提供されてもよい。試料に含まれる媒体は、（細胞および細胞様構造物）の項から選択した任意の細胞または細胞様構造物に対して適切な媒体（バッファー、塩、栄養素や他の成分等を含む）を選択することができる。このような成分としては、液滴生成に適した成分であればどのような成分を使用してもよい。ゲル化する際にも適切な成分であることが好

ましい。そのような成分としては、PBS、Tris-HCl、TE、HEPESなどの緩衝液のほか、滅菌水、海水、人工海水、各種液体培地等を挙げることができるがこれらに限定されない。液滴を生成するためには、界面活性剤を含まない水またはバッファーなどの媒体が好ましい場合がある。

[0042] 本明細書において、細胞または細胞様構造物を1細胞または構造物単位ずつの液滴中への封入は、(液滴作製)の項に記載される任意の実施形態を採用することができる。代表的には、マイクロ流路を用い、細胞または細胞様構造物の懸濁液をマイクロ流路中に流動させ、懸濁液をせん断することにより、1つずつの細胞または細胞様構造物を封入した液滴を作製することができる。 (液滴作製)での説明の他、実施例において例示される代表例を参考に、当業者は、適宜成分やパラメータを調製して実施することができる。

[0043] 本開示の増幅方法において、液滴をゲル化してゲルカプセルを生成する工程は、下記(ゲル化)の項に記載される任意の実施形態を採用することができる。

[0044] 1つの実施形態では、ゲル化は、液滴あるいは液滴の材料(例えば、細胞または細胞様構造物を含む試料)にゲルカプセルの材料が含まれるように構成した作製した液滴を冷却することによって行うことができるし、あるいは、光等の刺激を与えることでゲル化させることもできる。

[0045] ゲルカプセルの材料としては、下記(ゲル化)の項に記載される任意の材料を用いることができる。

[0046] 本開示において、細胞または細胞様構造物を溶解する工程は、ゲルカプセルを1種以上の溶解用試薬に浸漬して実現することができ、下記(溶解)の項目に記載される任意の実施形態を採用することができる。

[0047] ここで、細胞または細胞様構造物を溶解する工程では、細胞中のポリヌクレオチドが該ゲルカプセル内に溶出しそのポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態でこのゲルカプセル内に保持されるように処理されることが重要である。本開示の一実施形態において、当該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程

は、当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅することもできる。

[0048] このように、ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態を維持するためあるいはポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅するためには、多種類の溶解剤を段階的あるいは同時に加えることで、細胞または細胞様構造物の細胞壁・細胞膜構造を確実に破壊し、細胞内に含まれるタンパク質、ポリヌクレオチドに結合する物質までを変性させることが必要である。溶解は細胞外層の破壊から段階的に試薬を加えて達成される。さらに、溶解操作後にゲルカプセル内に残存する溶解物および前記溶解試薬は、後段のポリヌクレオチド増幅を阻害するため、適切な洗浄液を用いてゲルカプセル内を通液させ、前記阻害物質をゲルカプセル外に放出することが望ましい場合がある。これらの操作をゲルカプセル内で完遂するために、ポリヌクレオチドをゲルカプセル内に保持しながら、各種薬液と細胞溶解物の浸透・放出を達成するヒドロゲル構造を取ることが望ましい場合がある。ゲルカプセルを用いることにより、遺伝物質を保持したまま、残留試薬を希薄化することができる。このステップは繰り返すことも可能である。阻害が出ないレベルにまで試薬を希薄化することで、下流の操作、例えば、増幅反応をスムーズに行うことができる。

[0049] 本開示において、ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程は、ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させることにより実現することができる、下記（増幅）に規定される任意の実施形態を採用することができる。

[0050] （液滴生成）

本開示は、2つ以上の細胞または細胞様構造物を含む試料を用い、細胞または細胞様構造物を1細胞または構造物単位ずつ液滴中に封入することを包含し得る。また、本開示において、装置は、細胞または細胞様構造物を1細胞または構造物単位ずつ液滴中に封入する液滴作製部を備え得る。

[0051] 液滴作製は、例えば、マイクロ流路を用いて行うことができる。液滴作製部は、マイクロ流路を備え得る。細胞または細胞様構造物の懸濁液をマイク

口流路中に流動させ、懸濁液をせん断することにより、1つずつの細胞または細胞様構造物を封入した液滴を作製し得る。せん断は、一定間隔で行い得る。懸濁液のせん断は、オイルを用いて行うことができる。オイルとしては、例えば、鉱物油（例えば、ライトミネラルオイル）、植物油、シリコーンオイル、フッ素化オイル、を用い得る。懸濁液の濃度、流路中の流速、せん断の間隔を調整し、当業者は、液滴あたり1つ以上の細胞または細胞様構造物が封入されないように液滴作製を行うことが可能である。

[0052] 液滴の直径は、約1～250 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約10～200 $\mu\text{m}$ であってよく、例えば、液滴の直径は、約1 $\mu\text{m}$ 、約5 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ 、約15 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ 、約25 $\mu\text{m}$ 、約30 $\mu\text{m}$ 、約40 $\mu\text{m}$ 、約50 $\mu\text{m}$ 、約80 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ 、約150 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ 、または約250 $\mu\text{m}$ であってよい。

[0053] (ゲル化)

本開示は、液滴をゲル化してゲルカプセルを生成する工程を包含し得る。また、本開示において、装置は、液滴をゲル化してゲルカプセルを生成するゲルカプセル生成部を備え得る。液滴のゲル化は、液滴にゲルカプセルの材料が含まれるように構成し、作製した液滴を冷却することによって行うことができる。あるいは、液滴に対して光等の刺激を与えることによってゲル化を行うこともできる。液滴にゲルカプセルの材料が含まれるようにするには、例えば、細胞または細胞様構造物の懸濁液にゲルカプセルの材料を含めておくことによって行うことができる。

[0054] ゲルカプセルの直径は、約1～250 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約10～200 $\mu\text{m}$ であってよく、例えば、約1 $\mu\text{m}$ 、約5 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ 、約15 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ 、約25 $\mu\text{m}$ 、約30 $\mu\text{m}$ 、約40 $\mu\text{m}$ 、約50 $\mu\text{m}$ 、約80 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ 、約150 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ 、または約250 $\mu\text{m}$ であってよい。ゲルカプセルの直径は、作製する液滴と同じであってもよいが、ゲル化に際して直径が変化してもよい。

[0055] ゲルカプセルの材料は、アガロース、アクリルアミド、光硬化性樹脂（例

例えば、PEG-DA)、PEG、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、マトリゲル、コラーゲンなどを含み得る。

[0056] ゲルカプセルは、ヒドロゲルカプセルであってよい。本明細書において、「ヒドロゲル」とは、高分子物質またはコロイド粒子の網目構造によって保持されている溶媒あるいは分散媒が水であるものを指す。

[0057] 大量の細胞からまとめてDNAを取り出す際などは、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿によってDNAを精製し得る。しかしながら、単一細胞からの遺伝物質の取得・分析を企図する場合、1細胞毎の遺伝物質の量は非常に微量であり、ロスなく個別に核酸のみの状態に変換する必要がある。単一細胞に対しては、一般的なバルクスケールでの手順で核酸精製を試みても、全く核酸が取り出せないか、あるいは、夾雑物由来の核酸しか抽出できない結果になる。1細胞実験ではコンタミや標的遺伝物質のロスは大きな問題となるが、単一の細胞または細胞様構造物を封入したゲルカプセルを用いることによって、精製した遺伝物質（例えば、DNA）をゲルカプセル中に保持することができ、また、外部からの分子の夾雑の可能性を排除することができる。また、操作面でも非常に簡単な操作で、大量の1細胞を並列処理することができる。ゲル化した液滴を含む試験管を遠心し、上清を除去し、洗浄液に置換するというステップを行うことができる。あるいは、ゲル化した液滴をフィルターでろ過し、上清を除去したのち、洗浄液を通液させ、最後にゲルカプセルを回収するというステップでも行うことができる。ゲルカプセルを用いることにより、遺伝物質を保持したまま、残留試薬を希薄化することができる。このステップは繰り返すことも可能である。阻害が出ないレベルにまで試薬を希薄化することで、下流の操作、例えば、増幅反応をスムーズに行うことができる。

[0058] 本開示の1つの局面において、ゲルカプセルまたはその材料を含む組成物が提供され得る。上述または後述の点から、かかる組成物は、細胞中の核酸をシングルセルレベルで増幅するために有用であり得る。また、かかる組成物は、ゲノムライブラリーを作製するために有用であり得る。さらなる実施

形態において、ゲルカプセルまたはその材料と、シングルセル状態の細胞とを含む組成物が提供され得る。上述または後述の点から、かかる組成物は、細胞中の核酸をシングルセルレベルで増幅するために有用であり得る。また、かかる組成物は、ゲノムライブラリーを作製するために有用であり得る。かかる組成物は、シングルセルレベルで細胞中の核酸を配列決定するために有用であり得る。

[0059] (溶解)

本開示は、ゲルカプセルを1種以上の溶解用試薬に浸漬して前記細胞または細胞様構造物を溶解することを包含し得る。また、本開示において、装置は、ゲルカプセルを溶解用試薬に浸漬する溶解用試薬浸漬部を備え得る。溶解の際、細胞中のポリヌクレオチドがゲルカプセル内に溶出しポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態でゲルカプセル内に保持され得る。溶解用試薬には、例えば、酵素、界面活性剤、その他変性剤、還元剤およびpH調節剤があり、それらの組み合わせもまた用いることができる。本開示の1つの局面では、細胞中の核酸をシングルセルレベルで増幅するための、溶解用試薬を含む組成物が提供され得る。本開示の一実施形態において、当該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程は、当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅することもできる。

[0060] 溶解用試薬は、リゾチーム、ラビアーゼ、ヤタラーゼ、アクロモペプチダーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ザイモリアーゼ、キチナーゼ、リソスタフィン、ムタノライシン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、フェノール、クロロホルム、グアニジン塩酸塩、尿素、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、TCEP-HCl、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween 20、Tween 80、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、CHAPS、CHAPSO、ドデ

シルーβ-D-マルトシド、Nonidet P-40、Zwittergent 3-12からなる群から選択される少なくとも1つを含み得る。溶解用試薬は、リゾチーム、アクロモペプチダーゼ、プロテアーゼ、ドデシル硫酸ナトリウム及び水酸化カリウムからなる群から少なくとも1種選択される場合がある。

[0061] 細胞または細胞様構造物における一部の配列の有無を検出することのみを目的とする場合には、積極的な細胞または細胞様構造物の溶解を行う必要は必ずしもなく、物理的な刺激または熱的な刺激による、細胞または細胞様構造物からの核酸の漏出に基づいて検出を行うことも可能である。しかしながら、ゲノム全域などの大量の情報を単一細胞から得るためには、積極的に細胞または細胞様構造物を破壊し、その中の遺伝物質を完全な状態で細胞から単離することが好ましい。また、ゲルカプセルを用いている場合、熱的・機械的な刺激は、ゲルカプセルの崩壊につながるおそれもあり、溶解試薬を用いることが好ましい場合があり得る。

[0062] 多様な微生物について、細胞ごとに核酸の増幅または分析を行う場合、溶解試薬または溶解試薬の組合せとして、ある程度強力なものを用いることが望ましい。例えば、グラム陽性菌は厚いペプチドグリカン層を有する細胞壁を有するため、緩和なもののみでは細胞が十分に溶解できない可能性がある。

[0063] 強力な溶解試薬は、DNA増幅等の反応を阻害する可能性があり、下流の反応の前に十分に除去されることが好ましい。ゲルカプセルを用いている場合には、ゲルカプセルによって解析または増幅の対象となる遺伝物質が保持されるため、遺伝物質が少量である単一細胞解析においても溶解試薬の除去を行うことができ、そのため、強力な溶解試薬または溶解試薬の組合せを用いることが可能である。そして、強力な溶解試薬または溶解試薬の組合せを用いることは、多様な細胞（細胞壁を有するものやその他の種類の微生物を含む）の種類を問わず、網羅的な核酸の増幅またはゲノム解析を可能にし得る。方法は、ゲルカプセルから溶解用試薬および／または夾雑物質を除去す

る工程を含み得る。また、溶解用試薬浸漬部は、ゲルカプセルから溶解用試薬および／または夾雑物質を除去する手段を備える。

[0064] 標的分子が細胞表面マーカーや核酸の一部であり、その存在自体を検知することが目的である場合には、溶解操作が部分的、あるいは溶解操作がなされなくても、目的を達成できる可能性がある。他方で、ゲノムDNAの全長の増幅を企図する場合、ゲノムDNAは、細胞中に1分子しか存在しないことが通常であるため、完全に細胞または細胞様構造物の溶解が進み、またDNAから結合タンパク質類を十分に除去する必要がある。これにより、腸内微生物のような数百種以上の微生物からなる検体を対象とした際にも、そのすべてを均質に溶解し、その全てから全ゲノム増幅を行うことが可能となる。また、それにより、ライブラリー調製を行い、最終的に全ゲノム配列情報を得ることが可能となる。

[0065] (増幅)

本開示は、ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させてポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅することを包含し得る。また、本開示において、装置は、ゲルカプセルを増幅用試薬に浸漬する増幅用試薬浸漬部を備え得る。増幅用試薬浸漬部は、増幅用試薬への浸漬後、必要に応じて、ゲルカプセルの温度を調節するための手段を備え得る。

[0066] 加熱処理（80度以上）を伴う反応はゲル（例えば、アガロースゲル）の再溶解を招く可能性があるため、個別粒子化していた形状を崩壊させ、単一細胞隔離を無効化してしまう場合がある。この場合、約60度以下の酵素反応がゲル液滴形状を保つために望ましい。恒温鎖置換増幅反応（multiple displacement amplification）は、この温度の範囲内で実行可能であり、また、ゲノムDNA全域の増幅が可能である点で好ましい。用いる酵素としては、例えば、phi29ポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Aacポリメラーゼ、リコンビナーゼポリメラーゼが挙げられる。

[0067] 特定の細胞（例えば、特定の微生物）を検出することを目的としたPCR

を実施する場合、その微生物に応じた特定プライマーを使用することが一般的である。しかしながら、ゲノム全体の増幅を行う場合には、ランダムプライマーを用いることが好ましい。

[0068] 本開示に記載のない他種の生物を対象とする際には、当該生物を特異的に検出するためのPCRプライマーおよびTaqmanプローブ等検出用のオリゴヌクレオチドを設計することで対応が可能である。プライマー・プローブの作成法は一般的なPCR・qPCR等でのオリゴヌクレオチド配列設計に準じて行うことができる。

[0069] また、非特許文献(Leng X, Zhang W, Wang C, Cui L, Yang CJ. Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR. Lab Chip. 2010;10(21):2841-2843. doi:10.1039/c0lc00145g)のようにPCR反応液中にアガロースを加えておくことで、反応工程にて、PCR後に冷却を行い、再度ドロップレットをゲルカプセル化することも可能である。この場合、ゲルカプセルとしてフローサイトメトリーなどを使って分取することができる。

[0070] また、プライマーの修飾として、アガロース骨格(非特許文献:Leng X, Zhang W, Wang C, Cui L, Yang CJ. Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR. Lab Chip. 2010;10(21):2841-2843. doi:10.1039/c0lc00145g)やビーズ(Novak R, Zeng Y, Shuga J, et al. Single-cell multiplex gene detection and sequencing with microfluidically generate

d agarose emulsions, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011; 50 (2) : 390-395. doi: 10.1002/anie.201006089) との架橋が適宜なされた形に設計され、増副産物がゲルカプセル内にとどまるようにすることもできる。これにより短鎖の増副産物もゲルカプセルに留めて蛍光DNA結合性色素を使ったゲルカプセルの選抜が可能である。

[0071] mRNAはゲノムDNAを元に細胞内に数千から数万種存在し、個々の分子量も多い。このためRNAを対象とした発現解析では、遺伝子の種類や発現量を絶対（相対）的に求めることが目的となるため、遺伝子の一部（数十塩基）だけを読み取って、どの遺伝子がどれだけ発現しているかを定量することが可能である。ゲノムDNAを対象とする場合、原則的にゲノムDNAは1細胞に1分子しか存在しないため、その1分子しか無い配列情報を漏らさず増やすことが、その数百万塩基の全てを解読するためには必要となり得る。ゲルカプセル中での処理は、そのような増幅にとって有利である。また、配列決定のための核酸を、1細胞から一部ずつの断片的な情報ではなく、全体として得られることはシングルセル解析において有利である。

[0072] （細胞および細胞様構造物）

本開示において対象とする細胞または細胞様構造物は、特段限定されるものではないが、例えば、微生物（例えば、細菌、真菌、単細胞動物）、多細胞生物の細胞（例えば、体細胞、生殖細胞、培養細胞、腫瘍細胞、動物細胞、植物細胞）、細胞内器官（ミトコンドリア、核、葉緑体）、ウイルスが挙げられる。

[0073] ゲノム配列既知の生物の細胞については、その中でどの遺伝子が発現しているかRNA

を計測するという意図が発生し得るが、ゲノム配列および／または遺伝子の情報が未知の生物の解析の場合には、RNA解析の前に、ゲノム自体の情報を得る必要がある。その場合には、ゲルカプセルを用いる本開示の方法によるシングルセルレベルでのゲノム配列の増幅は有利である。

[0074] 本開示においては、2つ以上の細胞または細胞様構造物を含む試料を用いることができる。2つ以上の細胞は、複数の生物に由来するものであってもよい。試料として、例えば、微生物試料、組織試料、共生微生物および宿主生物の混合試料、動物・ヒト検体より取り出した微生物および細胞を含む試料が挙げられる。微生物試料としては、細菌叢試料の他、2種以下の細胞または細胞様構造物を含有する試料、真菌等の細菌以外の細胞または細胞用構造物が含有される試料が挙げられる。ヒト検体より取り出した微生物および細胞を含む試料としては、糞便、唾液、喀痰、手術洗浄液、血液、皮膚・身体粘膜の拭い液やスワブなどが挙げられ、直接的に利用することも可能であるが、細胞や微生物を分離する操作を行ってから使用してもよい。

[0075] 本開示において、対象とし得る微生物は、限定されるものではないが、真正細菌、大腸菌、枯草菌、藍色細菌、球菌、桿菌、ラセン菌、グラム陰性菌、グラム陽性菌、古細菌、真菌などが挙げられる。本開示で対象とし得る細菌は、例えば、*Negibacteria*、*Eobacteria*、*Deinococci*、*Deinococci*、*Deinococcales*、*Thermales*、*Chloroflexi*、*Anaerolineae*、*Anaerolineales*、*Caldilineae*、*Chloroflexales*、*Herpetosiphonales*、*Thermomicrobia*、*Thermomicrobiales*、*Sphaerobacterales*、*Ktedonobacteria*、*Ktedonobacterales*、*Thermogemmatisporales*、*Glycobacteria*、*Cyanobacteria*、*Gloeobacterophyceae*、*Gloeobacterales*、*Nostocophyceae*、*Synechococcophycidae*、*Synechococcales*、*Nostocophycidae*、*Chroococcales*、*Oscillatoriales*、*Nostocales*、*Pseudanabaenales*、*Spirochaetes*、*Spirochaetes*、*Spirochaetales*、*Fibroacte*

res, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes  
, Gemmatimonadetes, Gemmatimonadales  
, Chlorobi, Chlorobea, Chlorobiales, I  
gnavibacteria, Ignavibacteriales, Ba  
cteroidetes, Bacteroidia, Bacteroida  
les, Flavobacteriia, Flavobacteriale  
s, Sphingobacteriia, Sphingobacteria  
les, Cytophagia, Cytophagales, Planct  
omyces, Planctomycea, Planctomycet  
ales, Phycisphaerae, Phycisphaerales  
, Chlamydiae, Chlamydiae, Chlamydiale  
s, Verrucomicrobia, Verrucomicrobiae  
, Verrucomicrobiales, Opitutae, Opitu  
tales, Puniceococcales, Spartobacter  
ia, Chthoniobacteriales, Lentisphaera  
e, Lentisphaeria, Lentisphaerales, Vi  
ctivallales, Proteobacteria, Alphapr  
oteobacteria, Rhodospirillales, Rick  
ettsiales, Rhodobacteriales, Sphingom  
onadales, Caulobacteriales, Rhizobial  
es, Parvularculales, Kordiimonadales  
, Sneathiellales, Kiloniellales, Beta  
proteobacteria, Burkholderiales, Hyd  
rogenophilales, Methylophilales, Nei  
sseriales, Nitrosomonadales, Rhodocy  
clales, Procabacteriales, Gammaprote  
obacteria, Chromatiales, Acidithioba  
cillales, Xanthomonadales, Cardiobac

teriales, Thiotrichales, Legionellales, Methylococcales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, Alteromonadales, Vibrionales, Aeromonadales, Enterobacterales, Pasteurellales, Deltaproteobacteria, Desulfurellales, Desulfovibrionales, Desulfobacterales, Desulfarculales, Desulfuromonadales, Syntrophobacterales, Bdellovibrionales, Myxococcales, Epsilonproteobacteria, Campylobacterales, Nautiliales, Acidobacteria, Acidobacteria, Acidobacterales, Holophagae, Holophagales, Acanthopleuribacterales, Aquificae, Aquificae, Aquificales, Deferribacteres, Deferribacteres, Geovibrionales, Thermodesulfobacteria, Thermodesulfobacterales, Nitrospirae, Nitrospira, Nitrospirales, Fusobacteria, Fusobacteriia, Fusobacterales, Synergistetes, Synergistia, Synergistales, Caldiserica, Caldisericia, Caldisericales, Elusimicrobia, Elusimicrobia, Elusimicrobiales, Armatimonadetes, Armatimonadia, Armatimonadales, Chthonomonadetes, Chthonomonadales, Fimbriimonadia, Fimbriimonadales, Posibacteria, Thermotoga

e、Thermotogae、Thermotogales、Firmicutes、Bacilli、Bacillales、Lactobacillales、Clostridia、Clostridiales、Halanaerobiales、Thermoanaerobacterales、Natranaerobiales、Negativicutes、Selenomonadales、Erysipelotrichia、Erysipelotrichales、Thermolithobacteria、Thermolithobacterales、Tenericutes、Mollicutes、Mycoplasmatales、Entomoplasmatales、Acholeplasmatales、Anaeroplasmatales、Actinobacteria、Actinobacteria、Actinomycetales、Actinopolysporales、Bifidobacteriales、Catenulisporales、Corynebacteriales、Frankiales、Glycomycetales、Jiangellales、Kineosporiales、Micrococcales、Micromonosporales、Propionibacteriales、Pseudonocardiales、Streptomyces、Streptosporangiales、Dictyoglomi、Dictyoglomia、Dictyoglomales、Chrysiogenetes、Chrysiogenetes、Chrysiogenales、Haloplasmatalesなどの細菌が挙げられる。また、それらのうちの複数種が混在する試料において、細胞毎の網羅的な解析を行うことができる。

[0076] (カプセル化)

核酸を含む細胞または細胞様構造物、あるいはそれに由来する物質を、必要な薬剤とともに、個別にカプセル化する工程を単にカプセル化ともいう。カプセル化される対象は、1次増幅により増幅されたものであってもよく、

他の反応の精製物であってもよい。カプセル化の対象は、増幅された核酸、増幅された核酸を含むゲルカプセル、増幅された核酸を含む細胞または細胞様構造物であってもよい。再カプセル化の対象が、ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態でポリヌクレオチドを有する場合、あるいは、ポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅する場合、カプセル化においてゲル化を行わなくともよく、ゲル化材料を含まなくともよい。カプセルの直径は、約1~250 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約10~200 $\mu\text{m}$ であってよく、例えば、カプセルの直径は、約1 $\mu\text{m}$ 、約5 $\mu\text{m}$ 、約10 $\mu\text{m}$ 、約15 $\mu\text{m}$ 、約20 $\mu\text{m}$ 、約25 $\mu\text{m}$ 、約30 $\mu\text{m}$ 、約40 $\mu\text{m}$ 、約50 $\mu\text{m}$ 、約80 $\mu\text{m}$ 、約100 $\mu\text{m}$ 、約150 $\mu\text{m}$ 、約200 $\mu\text{m}$ 、または約250 $\mu\text{m}$ であってよい。カプセルの直径は、カプセル化の回数が増えるごとに大きくなってもよい。

[0077] 1つの実施形態において、カプセルを二回目以降のカプセル化する場合、それぞれのカプセルは別の材料で形成されてもよく、一部材料が重複してもよく、あるいはすべてが同一の材料で形成されてもよい。1つの実施形態において、分析に必要な薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤であってもよい。

[0078] (シングルセル解析)

本開示において、1つずつの細胞または細胞様構造物由来の核酸の増幅は、任意の方法によって行われ得るが、多数の細胞または細胞様構造物から簡便に1つずつの細胞または細胞様構造物由来の核酸増幅を行うためには、細胞または細胞様構造物を1つずつ液滴中に封入する工程と、当該液滴をゲル化してゲルカプセルを生成する工程と、当該ゲルカプセルを1種以上の溶解用試薬に浸漬して細胞を溶解する工程であって、当該細胞のゲノムDNAまたはその部分を含むポリヌクレオチドが当該ゲルカプセル内に溶出し当該ゲノムDNAまたはその部分に結合する物質が除去された状態で当該ゲルカプセル内に保持される、工程と、当該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程とを含む、方法によって1つずつの細胞または細胞様構造物由来の増幅核酸を得ることが好

ましい場合がある。本開示の一実施形態において、当該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程は、当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅することもできる。

[0079] 1つの実施形態において、工程A) (2つ以上の細胞または細胞様構造物を、単一の細胞または構造物単位ごとに選別し、該細胞または細胞様構造物に含まれる核酸を増幅する工程) は、a) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を含む試料を用い、液滴中に1つの細胞または成分を封入することと、b) 該液滴をゲル化してゲルカプセルを生成することと、c) 該ゲルカプセルを1種以上の溶解用試薬に浸漬して該細胞または成分を溶解することとであって、該細胞または成分中のポリヌクレオチドが該ゲルカプセル内に溶出し該ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態で前記ゲルカプセル内に保持される、ことと、d) 該ポリヌクレオチドを第1の増幅用試薬に接触させて該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅することを包含してもよい。本開示の一実施形態において、当該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程は、当該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内でゲル状態を保ちながら増幅することもできる。

[0080] 1つの実施形態において、液滴は、単一細胞または単一細胞様構造物の懸濁液をマイクロ流路中に流動させ、オイルで懸濁液をせん断することにより単一細胞または単一細胞様構造物の懸濁液を封入することで作製され得る。一部の実施形態において、ゲルカプセルはヒドロゲルカプセルであってもよい。

[0081] ゲルカプセルの材料は、アガロース、アクリルアミド、光硬化性樹脂 (例えば、PEG-DA)、PEG、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、マトリゲル、コラーゲンなどを含み得る。液滴のゲル化は、液滴にゲルカプセルの材料が含まれるように構成し、作製した液滴を冷却することによって行うことができる。あるいは、液滴に対して光等の刺激を与えることによってゲル

化を行うこともできる。液滴にゲルカプセルの材料が含まれるようにするには、例えば、細胞または細胞様構造物の懸濁液にゲルカプセルの材料を含めておくことによって行うことができる。

- [0082] ゲルカプセルは、ヒドロゲルカプセルであってよい。本明細書において、「ヒドロゲル」とは、高分子物質またはコロイド粒子の網目構造によって保持されている溶媒あるいは分散媒が水であるものを指す。
- [0083] 溶解用試薬は、リゾチーム、ラビアーゼ、ヤタラーゼ、アクロモペプチダーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ザイモリアーゼ、キチナーゼ、リソスタフィン、ムタノライシン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、フェノール、クロロホルム、グアニジン塩酸塩、尿素、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、TCEP-HCl、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween 20、Tween 80、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、CHAPS、CHAPSO、ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、Nonidet P-40、および Zwittergent 3-12 からなる群から少なくとも1種選択され得る。
- [0084] 多様な微生物について、細胞ごとに核酸の増幅または分析を行う場合、溶解試薬または溶解試薬の組合せとして、ある程度強力なものを用いることが望ましい。例えば、グラム陽性菌は厚いペプチドグリカン層を有する細胞壁を有するため、緩和なもののみでは細胞が十分に溶解できない可能性がある。
- [0085] 1つの実施形態において、分析に必要な薬剤が第2の増幅用試薬であってもよい。特定の実施形態において、分析に必要な薬剤は、1つまたそれよりも多くてもよい。一部の実施形態において、第1の増幅試薬と第2の増幅用試薬とが同一である。他の実施形態において、第1の増幅試薬と第2の増幅用試薬とが異なる。特定の実施形態において、使用する増幅試薬は全て同一でもよく、全て異なってもよい。他の実施形態において、使用する増幅試薬は

、一部のみ同一であってもよい。

[0086] 1つの実施形態において、第1の増幅試薬と第2の増幅用試薬を使用する場合、第1の増幅試薬はゲノムDNAまたはその部分の増幅用試薬または特定配列増幅用試薬である。別の実施形態において、第2の増幅試薬はゲノムDNAまたはその部分の増幅用試薬または特定配列増幅用試薬である。特定の実施形態において、特定配列増幅用試薬は、細胞種特異的な配列もしくは種特異的な配列を増幅する試薬または特定種に保存されている配列を増幅する試薬であってもよい。一部の実施形態において、特定配列増幅用試薬はマーカー遺伝子を増幅する試薬であってもよい。

[0087] 1つの実施形態において、前記a)において、液滴中に1つの細胞または細胞様構造物、および第1の標識を封入してもよい。別の実施形態において、工程B)において、1つの細胞または細胞様構造物および第2の標識を封入してもよい。他の実施形態において、前記a)および/または工程B)において、1つの細胞または細胞様構造物および1つまたはそれより多くの標識を封入してもよい。

[0088] 1つの実施形態において、第1の標識と第2の標識とが同一である。別の実施形態において、第1の標識と第2の標識とが異なる。他の実施形態において、使用する標識が全て同一でもよく、全て異なってもよい。特定の実施形態において、使用する標識は、一部のみ同一であってもよい。一部の実施形態において、標識は全核酸の収量を示してもよい。他の実施形態において、標識は特定配列の有無を示してもよい。特定の実施形態において、標識は、特定配列の核酸の収量を示してもよい。他の実施形態において、標識は、特定分子を検出するための薬剤であってもよい。特定の実施形態において、特定分子を検出するための薬剤として、プローブ、抗体、インターカレーター、タグ、放射性物質、蛍光色素結合ヌクレオチド、蛍光標識タンパク質などが挙げられる。

[0089] 1つの実施形態において、工程A)における細胞または細胞様構造物に含まれる核酸は、ゲノムDNAまたはその部分であり得る。

- [0090] 1つの実施形態において、工程C)は、標識を評価することを含み得る。一部の実施形態において、工程C)は、第1の標識および／または第2の標識を評価することを含み得る。他の実施形態において、標識により示される、全核酸の収量、特定配列の有無または特定配列の核酸の収量を評価してもよい。
- [0091] 1つの実施形態において、工程C)の分析において、カプセル化された該細胞または細胞様構造物の選択を行ってもよい。1つの実施形態において、選択は、特定の遺伝子配列の有無、特定の遺伝子の収量または全核酸収量に基づいて行ってもよい。一部の実施形態において、特定の遺伝子配列がある場合に選択してもよく、特定の遺伝子配列が無い場合に選択してもよい。一部の実施形態において、特定の遺伝子の収量が基準となる収量より多い場合選択してもよく、低い場合に選択してもよい。一部の実施形態において、全核酸収量が、基準となる収量より多い場合に選択してもよく、低い場合に選択してもよい。
- [0092] 特定の実施形態において、特定の遺伝子配列の有無を、特定の遺伝子配列を特異的に検出する試薬、アガロースゲル電気泳動、マイクロチップ電気泳動、PCR、qPCR、遺伝子配列決定（サンガーシーケンシング、NGS）からなる群から選択される手段により検出する。一部の実施形態において、特定の遺伝子配列を特異的に検出する試薬として、抗体、プローブ、DNA結合性蛍光色素、蛍光色素結合ヌクレオチドが挙げられる。
- [0093] 特定の実施形態において、特定の遺伝子の収量または全核酸収量を吸光度測定、蛍光光度測定、アガロースゲル電気泳動、マイクロチップ電気泳動により測定することができる。方法は、1つずつの細胞由来の増幅核酸を含む試料において、特定の配列を有する核酸を検出する工程を含み得る。特定の配列を有する核酸を検出する工程は、特定の配列を有する核酸を増幅および配列解読することを含み得る。
- [0094] 1つの実施形態において、選別は、フローサイトメトリーなどによって行ってもよい。この場合の方法としては、第一の標識で全核酸を標識する蛍光

性DNA結合色素（インターカレーター）を用いる。第二の標識で、特定遺伝子を検出するプライマーセットおよび蛍光性DNA結合色素（インターカレーター）または蛍光標識位プローブを用いる。ここで、第一と第二の標識に用いる蛍光色素は、蛍光波長が重ならず、フローサイトメトリーにおいて別チャンネルで蛍光強度を計測できるものとする。第一・第二の標識を含むゲルカプセルをフローサイトメトリーに導入し、各ゲルカプセルの蛍光シグナルから選抜を行うことで、ゲルカプセル内部で一定量の核酸を含み、且つ特定遺伝子を内包するものを回収することができる。特定配列の収量または全核酸の収量に基づいて選択する場合、選別は、はじめに増幅ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルを蛍光インターカレーターで検知してフローサイトメトリーにてプレートに分取し、さらに分取した各ゲルカプセルのポリヌクレオチドから核酸の再増幅を行い、増幅ポリヌクレオチドライブラリーを調製する。ここで、本増幅核酸の収量を吸光度測定、蛍光光度測定、アガロースゲル電気泳動、マイクロチップ電気泳動により測定し、全核酸量を測定する。あるいは、本増幅核酸の一部を用いて、特定の遺伝子増幅を行い、遺伝子配列決定または分子量決定を行って、増幅した遺伝子の配列情報や収量を評価し、ポリヌクレオチドライブラリー中の各サンプルの特定の遺伝子の有無を評価する。これらのいずれか又は双方の結果を参考に、サンプルを選抜し別のプレート等へ移送する。

[0095] 1つの実施形態において、工程C)の分析において、細胞種特異的な配列もしくは種特異的な配列または特定種に保存されている配列の増幅を行ってもよい。一部の実施形態において、工程C)の分析においてマーカー遺伝子の増幅を行ってもよい。

[0096] (3回以上のカプセル化を行う場合の例)

上記の方法で選抜操作を行った後に、残存したゲルカプセルに対し、別の特定配列を有する核酸を検出する工程として、再度カプセル化から実施することも可能である。

[0097] (システム)

本開示は、例えば、細胞または細胞様構造物を分析するためのシステムであって、[X] 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、カプセル化するための薬剤および／またはそれらを格納するカプセル化薬剤格納部と、[Y] 分析に使用する所望の薬剤および／またはそれらを格納する分析薬剤格納部と、[Z] カプセル化のための手段と[W] 必要に応じて、該所望の薬剤を用いて分析を行うための手段とを備える、システムを提供する。Yとしては、例えば、特定の遺伝子を増幅・解読するための試薬（ポリメラーゼ、プライマーセットほか）が挙げられ、Wとしては、例えば、増幅した遺伝子を検出するための試薬（蛍光標識プローブやインターカレーター）・計測する機器（フローサイトメトリー）などが挙げられ、[Z] としてマイクロ流体デバイスやゲル化剤、カプセル化するための構造物（冷却反応槽や貯留部など）が挙げられ、[W] として、増幅した遺伝子を検出するための試薬（蛍光標識プローブやインターカレーター）・計測する機器（フローサイトメトリー）が挙げられる。

[0098]      (キット)

本開示は、例えば、細胞または細胞様構造物を分析するためカプセルを提供するためのキットであって、[X] 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、カプセル化するための薬剤と、[Y] 分析に使用する所望の薬剤と、を備える、キットを提供する。Yとしては、例えば、特定の遺伝子を増幅・解読するための試薬（ポリメラーゼ、プライマーセットほか）、増幅した遺伝子を検出するための試薬（蛍光標識プローブやインターカレーター）が挙げられる。

[0099]      (微生物での例)

本手法は特に希少な対象微生物を特異的に検出回収する目的で利用される。増幅保持された1細胞ゲノム由来ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルを上述の（細胞中のポリヌクレオチド増幅方法）の項に記載の方法で調製する。増幅ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルを標的とする遺伝子領域に対応

したプライマーセット、および蛍光DNAインターカレーターまたはTaqmanプローブ等のPCR増幅検出指示薬を含むPCR溶液に懸濁し、懸濁液をマイクロ流体デバイスに導入する。オイルで前記懸濁液をせん断し、単一のゲルカプセルを含む液滴を作製する。液滴を外部容器に回収後、PCR操作を行う。PCRの熱処理によりゲルカプセルは崩壊し、内部のポリヌクレオチドとPCR溶液中のプライマー・酵素が会合し、標的遺伝子が存在する場合には液滴内でポリヌクレオチドが増幅される。ポリヌクレオチド増幅の有無は、前記PCR増幅検出指示薬由来の蛍光色で確認・検出が可能である。また、増幅ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルについても蛍光DNAインターカレーターで標識をしておき、前記手段では別蛍光色のPCR増幅検出指示薬を用いることで、2色以上の蛍光色のパターンからゲルカプセルの封入有無と標的遺伝子配列の有無を同時検出することも可能である。前記蛍光色を参照し、液滴あるいは再度ゲル化させた液滴を選択的に回収あるいは排除して、標的遺伝子を含む増幅ポリヌクレオチドを含む液滴を収容溶液に選抜収容する。

[0100] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0101] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したものではない。したがって、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

## 実施例

[0102] 以下、本開示の実施例を記載する。

試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ、R&D System

s、USCN Life Science INC等)の同等品でも代用可能である。

[0103] (実施例1：細胞および細胞様構造物の封入)

本実施例では図1に示すように、一次増幅までの段階を行った。

[0104] (材料および方法)

1. 5 cmのサンゴ枝(沖縄県国頭郡本部町瀬底周辺海域の石川原から入手)を採取し、0.22  $\mu\text{m}$ 径のフィルター(DURAPOREメンブレンフィルター, GVWP04700, MERCK)でろ過した海水5 mLを含んだ25 mLチューブ(2362-025, IWAKI)に回収した。メス(替刃メスホルダー(61-3813-28), 替刃No. 10(1-8545-11)を使用, アズワン)を用いてサンゴ枝を十分に破碎した後、氷上で3分間静置して骨片等の大きな粒子を沈殿させた。上清を1.5 mLチューブ(1212-10, SSIBIO)に回収し、8,000 x gで5 min遠心分離(himac CF15RX, 工機ホールディングス)した。ペレットを残して上清を除き、0.22  $\mu\text{m}$ 径のフィルター(DURAPOREメンブレンフィルター, GVWP04700, MERCK)でろ過した海水800  $\mu\text{L}$ を加えてペレットを再度懸濁した。次に、250 x gで5 min遠心分離を行い、上清を新しい1.5 mLチューブに回収した。8,000 x gでの遠心分離、上清の除去および250 x gでの遠心と上清の回収操作を再度繰り返した後、8,000 x gでの遠心分離と上清の除去をさらに3回行った。得られたペレットに対し、0.22  $\mu\text{m}$ 径のフィルター(DURAPOREメンブレンフィルター, GVWP04700, MERCK)でろ過した海水100  $\mu\text{L}$ を加えて懸濁し、サンゴ組織内微生物、サンゴ細胞およびサンゴミトコンドリアの混合懸濁液を取得した。調製した懸濁液中の細菌細胞濃度を測定し(顕微鏡:CKX41, OLYMPUS、バクテリア計算盤A161, 2-5679-01, アズワン)、終濃度1.5%になるように超低融点アガロース(A5030-10G, SIGMA-ALDRIC

H)を加えることで、ゲルカプセル作製に用いる細胞および細胞様構造物の混合懸濁液を調製した（細菌細胞終濃度： $4.5 \times 10^3 \text{ cells} / \mu\text{L}$ ）。

[0105] 調製した細胞および細胞様構造物の混合懸濁液を用いて、直径 $35 \mu\text{m}$ のゲルカプセルを作製した。続いて、溶解用試薬としての溶菌試薬にゲルカプセルを浸漬し、ゲルカプセル内部で細胞の細胞壁等の収集目的物以外の部分を溶解し、ゲルカプセル内にゲノムDNAを溶出させた。

[0106] 具体的には、溶菌試薬の1種である水酸化カリウムを含む水溶液であるBuffer D2（QIAGEN社）にゲルカプセルを浸漬し、残存成分の溶解とゲノムDNAの変性を行った。本実施例で使用する溶菌試薬は、上述のとおり、リゾチーム、アクロモペプチダーゼ、プロテアーゼK、ドデシル硫酸ナトリウム及びBuffer D2である。なお、水酸化カリウムは通常のDNA増幅反応工程でも使用するが、溶菌の効果も兼ねていることから、本実施例では溶菌試薬の一つとしている。ゲルカプセルの溶菌試薬への浸漬は短時間であるため、溶出させたゲノムDNAが溶菌試薬によりゲルカプセル外に流出されることはなく、ゲルカプセル内に保持される。本実施例では、ゲルカプセルに浸透した溶菌試薬も夾雑物質に含まれるものとする。

[0107] 本実施例は、Buffer D2を入れて反応を進行しているが、複数の試薬での溶菌操作を段階的に行い、各工程で遠心洗浄を行うことで十分な洗浄効果を得ることができる。また、各溶菌試薬により細胞を溶解した後に遠心洗浄を行ってもよい。

[0108] このように、複数種類の溶菌試薬により細胞の溶解を行うことで、目的のゲノムDNAを採取することができ、溶菌試薬への浸漬後に遠心洗浄を行うことで、溶菌試薬や溶解した細胞のポリヌクレオチド以外の成分等の夾雑物質を除去し、続くゲノムDNA増幅反応を阻害することのなくゲノムDNAを精製することができる。

[0109] 水酸化カリウム溶液（Buffer D2）中で変性したゲノムDNAを保持するゲルカプセルを含むチューブに増幅用試薬を加え、ゲルカプセルを

増幅用試薬に浸漬した。具体的には、鎖置換型DNA合成酵素であるphi 29 DNAポリメラーゼを用いたMDA (Multiple Displacement Amplification) 法を使用した。ここでは、全ゲノム増幅反応試薬REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN社) に浸漬し、3時間の全ゲノム増幅反応を行った。増幅用試薬 (REPLI-g Single Cell Kit) には水酸化カリウム溶液 (Buffer D2) を中和する成分が含まれている。全ゲノム増幅後のゲルカプセルを、DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, 14190-144, Thermo Fisher Scientific) を用いて3回遠心分離して洗浄し、蛍光性DNAインターカレーターであるDAPI (同仁科学) を用いて染色を行った。染色後のゲルカプセルはDPBSを用いて再度洗浄した (図1)。

[0110] (実施例2-1: 液滴の再封入および遺伝子増幅)

本実施例では実施例1で生産した液滴の再封入を行った。この実施例では、再封入の際に入れる試薬はPCR用の試薬を用いた。

[0111] (材料および方法)

次にPCR反応液の調製を行った。PCR反応液はPrimeTime Gene Expression Master Mix (Integrated DNA Technologies, 1055770) に標的遺伝子検出用にデザインしたプライマーおよびTaqmanプローブ (作製は、Integrated DNA Technologies) を添加した。本実施例で使用したプライマーおよびプローブは、サンゴ組織内共在微生物であるEndozoicomonas属の微生物の16S rRNA遺伝子 (V3-V4領域) の一部を特異的に検出するように設計 (作製は、Integrated DNA Technologies) し、標的の配列が存在する場合、PCR反応後にFAM由来の緑色の蛍光を呈する。また、Taqmanプローブ等検出用のオリゴヌクレオチドを用いず、蛍光性DNAイ

インターカラーをPCR反応液に添加して増幅を検知する設計も可能である。この場合は、前述のゲルカプセルの染色に用いた蛍光色素と波長の異なる蛍光を示すDNA染色試薬（SYBR GreenやEvaGreen（登録商標）等）を用いた。次に、調製したPCR反応液にゲルカプセルを加え、ゲルカプセルを懸濁したPCR反応液を調製した。

[0112] 自作したポリジメチルシロキサン製のマイクロ流路を用いて、ゲルカプセルが懸濁されたPCR反応液から直径50  $\mu\text{m}$ （この直径は、40~60  $\mu\text{m}$ などであり得る）微小液滴の作製を行い、微小液滴内へのゲルカプセルの封入を行った。このときの微小液滴内のゲルカプセル濃度は、0.5 cell/droplet程度であることが好ましい。作製した液滴すべてをPCRチューブに回収した。

[0113] この回収したものについて、サーマルサイクラーを用いてPCR反応を行った。PCRの反応条件は、初期熱変性を95 $^{\circ}\text{C}$ 、3分、熱変性を95 $^{\circ}\text{C}$ 、5秒、アニーリングと伸長反応を60 $^{\circ}\text{C}$ 、30秒で28サイクル行い、反応終了後は4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

[0114] 本反応工程において、内部に封入されたゲルカプセルは熱崩壊し、カプセル内に保持されていたポリヌクレオチドとPCR溶液中のプライマー・酵素が反応した。標的遺伝子が存在する場合には液滴内でポリヌクレオチドが増幅され、プローブ由来の蛍光もしくはDNAインターカラー由来の蛍光の強度が増加する。PCR反応後、蛍光顕微鏡下でドロップレットの観察を行い、液滴内の蛍光を確認した。

[0115] 観察の結果、蛍光を示さない液滴、MDAによって増幅されたDNAに結合したDAPI由来（同仁化学、D523）の蛍光（青色）のみを示す液滴、DAPI由来の蛍光およびプローブ由来の蛍光（FAM：緑色）の2種類の蛍光を示す液滴、の3種類が確認された（図7）。この内、DAPI由来の蛍光を示す液滴中、蛍光プローブ由来の蛍光を示した液滴の割合は0.8%（4/500）であった。

[0116] （実施例2-2：再封入および遺伝子増幅を伴わない検出・選抜）

実施例2のように液滴の再封入および遺伝子増幅を行わずに、実施例1で調製したゲルカプセルの状態を標的とする生物・遺伝子を検出・選抜する方法として次のような方法がある。

[0117] 実施例1で調製したゲルカプセルをリコンビナーゼポリメラーゼ増幅反応（RPA）試薬に浸漬する。本RPA試薬としては、例えばTwisAmp（登録商標）シリーズ（TwistDx社）を用いることができる。検出する標的配列に合わせて設計したプライマー・蛍光プローブを用い、ゲルカプセル内部で37℃から42℃の条件で等温核酸増幅を行う。この際、ゲルカプセルの形状を崩壊させることなく核酸増幅をすることができるため、ゲルカプセル内部に蓄積される蛍光物質を指標に、目的生物あるいは目的遺伝子を含む増幅核酸が存在するゲルカプセルを特異的に検出することができる。このため、実施例2のようにドロップレットへの再封入の手間なく、標的の単一細胞または細胞様構造物の個別の分析へとサンプルを選抜することができる。

（実施例3：二次増幅）

次に、本実施例では、実施例2で調整した、個々のカプセルに含まれる試料について、さらに二次増幅のステップを行った。

以下にその手順を示す。

（材料および方法）

[0118] 実施例2で調製したものの内、2種類の蛍光を示すドロップレットを顕微鏡下でマイクロピペットを用いて分取し、PCRチューブに個別に回収した。回収した個々の液滴に対してサーマルサイクラーを用いて65℃で加熱を行うこと（S1000サーマルサイクラー、Bio-Rad）によりドロップレットを壊した後、各チューブのウェル内でMDA法による二次増幅を行った。これにより、標的遺伝子の配列を含んだ1細胞増幅ゲノムライブラリーを獲得することができる。

[0119] 調製された1細胞増幅ゲノムライブラリー（12個）を対象として、ドロップレット内でのPCRで使用したのとは異なるプライマーセットを用い

て16S rRNA遺伝子を対象としたPCRを行い、PCR産物をサンガー法でシーケンスした。8サンプルにおいてPCR産物が取得され、配列解析の結果サンゴ共生微生物由来のゲノム情報を含むことが確認された。一方で、PCR後にDAPI由来の蛍光のみを示す液滴を分取した場合には、全ての液滴（n=12）が宿主由来のミトコンドリアの配列を含んでいることが明らかとなった。

[表1-1]

Sample	DAPI	FAM	BLAST_Top_HIT	%GC	%Pairwise Identity
1	+	+	<i>Endozoicomonas</i> sp. strain UMTGB108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.1 %	94%
2	+	+	<i>Endozoicomonas</i> sp. 5U3,1 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.6 %	98%
3	+	+	<i>Endozoicomonas</i> sp. 5U3,1 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.6 %	99%
4	+	+	<i>Endozoicomonas</i> sp. 5U3,1 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.6 %	98%
5	+	+	<i>Endozoicomonas montiporae</i> CL-33 genome	54.8 %	94%
6	+	+	<i>Endozoicomonas</i> sp. LC205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	55.3 %	97%
7	+	+	<i>Endozoicomonas</i> sp. strain S-B4-1U 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	53.5 %	96%
8	+	+	<i>Endozoicomonas montiporae</i> CL-33 genome	54.1 %	96%
9	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.4 %	100%
10	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.9 %	100%
11	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.5 %	100%
12	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.5 %	100%
13	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.3 %	100%
14	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.5 %	100%
15	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.5 %	100%
16	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.1 %	100%

[表1-2]

17	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.6 %	100%
18	+	-	<i>Acropora humilis</i> mitochondrion, complete genome	36.7 %	100%
19	+	-	<i>Acropora tenuis</i> mitochondrion, complete genome	37.6 %	100%
20	+	-	<i>Acropora tenuis</i> mitochondrion, complete genome	36.7 %	100%

[0120] サンゴ共生微生物由来のゲノム情報を含む8個のサンプルについて、Nextera XT DNA sample prep kit (Illumina社, FC-131-1096)を用いてライブラリー調製を行い、Miseq (Illumina社, SY-410-1003)を用いた全ゲノムシーケンスによって2×75bpのペアエンドリード(3.99Gb)を取得した。SPAdes (Bankevich A et al., J Comput Biol. 2012 May; 19(5): 455-77. <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>)を用いてシーケンスデータのアセンブリを行い、Contigを作製した。また、ゲノム解読率(コンプリート率)およびコンタミネーション度の評価にはCheckM (Parks et al., Genome Res. 2015. 25: 1043-1055, doi: 10.1101/gr.186072.114)を用いてデフォルト条件で解析を行った。この結果、8個のサンプル中5個でゲノム解読率(コンプリート率)が50%を超えた。またコンタミネーション度は1個のサンプルを除いて5%以下となり、8個中4個のサンプルが国際基準Minimum information about a single amplified genome (MISAG)の基準におけるMedium quality draftに分類されることが明らかとなった。(表2参照)。

[表2]

表2 取得シングルセルゲノムの評価結果

Sample	コンプライト率 (%)	コンタミネーション度 (%)	BLAST 検索でのトップヒット種	相同性 (%)
1	87.0	4.19	<i>Endozoicomonas atrinae</i>	98.362
2	75.2	5.06	<i>Endozoicomonas atrinae</i>	98.362
3	72.4	4.83	<i>Endozoicomonas acroporae</i>	97.392
4	61.0	3.45	<i>Endozoicomonas atrinae</i>	98.362
5	60.7	3.90	<i>Endozoicomonas acroporae</i>	98.041
6	42.6	1.72	<i>Endozoicomonas acroporae</i>	99.284
7	32.0	0.86	<i>Endozoicomonas acroporae</i>	97.392
8	0	0	---	---

## [0121] (実施例3-2: 二次増幅を伴わない解析)

実施例3に記載の二次増幅の工程をスキップして解析に進行する手順として、下記の方法がある。

実施例2で調製したものの内、2種類の蛍光を示すドロップレットを顕微鏡下でマイクロピペットを用いて分取し、PCRチューブに個別に回収した。回収した個々の液滴に対してサーマルサイクラーを用いて65℃で加熱を行うこと(S1000サーマルサイクラー, Bio-Rad)によりドロップレットを壊した後、各チューブのウェル内でNextera XT DNA sample prep kit (Illumina社、FC-131-1096)を用いてライブラリー調製を行い、Miseq (Illumina社、SY-410-1003)を用いた全ゲノムシーケンスを行うことができる。この際には、Nextera XT DNA sample prep kit以外の一般的に入手可能なDNAシーケンスライブラリー調製試薬を使うことも可能である。ドロップレットより回収したDNAに対し、上記キットのようにトランスポゼース反応によりアダプター配列を挿

入する、または断片化・ライゲーションなどの反応を行い、アダプター配列を付加したのち、PCR反応によってシーケンス解析の実行に足るDNA量を獲得する。以降は、実施例3に記載の内容と同様に解析することができる。

[0122] (実施例4：多様な細胞の中から特定の特徴を有する細胞のデータを選択的に獲得したい場合)

腸内細菌などの動物共生微生物や海洋・土壌微生物の中で、当業者が注目する特定の1種以上の微生物のゲノムデータを獲得することが目的であった場合には、ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルに対し、事前に標的とする微生物の遺伝子断片の有無を事前確認しておくことで、不要な遺伝子配列データ取得とそれにかかるコストを削減することができる。測定対象例としては、同一系統微生物の比較解析（例えば、疾患等に関連する微生物系統群における亜種の解析）や特定の遺伝子（例えば、微生物の生産する二次代謝産物や酵素）を有する微生物の探索、あるいは多系統の生物種を含む中から細菌・アーキア・真菌・その他真核細胞等を個別に選択して解析することなどを目的とした場合が想定される。

[0123] (実施例5：ホストDNAなどが多量に混在する場合)

解析試料が、糞便、唾液、喀痰や皮膚、口腔、鼻腔、耳、生殖器などの拭い液、手術洗浄液、あるいは組織抽出物や血液であり、当該試料中に含まれる微生物を解析対象とした場合には、試料中に多くのホスト動物由来の細胞、細胞内小器官、核酸が含まれる。これらの一部も、ゲルカプセル内部に封入されポリヌクレオチド増幅が実行される。このため、増幅ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルに対し、事前に標的とする微生物の遺伝子断片あるいはホスト由来の遺伝子断片の有無を事前確認しておくことで、ホスト由来のポリヌクレオチドを含む不要な遺伝子配列データ取得を避け、それにかかるコストを削減することができる。測定例としては、ヒト由来試料からの微生物検出、例えば、血液や喀痰からの病原性微生物の探索や組織内部に共生する微生物解析などが想定される。

あるいは、ホスト由来のポリヌクレオチドを積極的に解析することで、目的とする微生物や他の細胞の解析と複合的な解析に応用することもできる。

例えば、消化管に存在する腸内細菌叢と宿主動物は、宿主が消化管という細菌叢定着のための嫌気的環境を提供すると同時に、腸内細菌叢は宿主の健康に影響を及ぼすという共生関係を持つことが知られている。例えば、ホストの健康状態への影響として、大きなものは栄養素の産生と感染症に対する防御・免疫系の発達などが挙げられる。また、他の例を挙げると、炎症性腸疾患は、遺伝的素因に加え、腸内細菌を初めとする腸内環境因子の異常が相まって起こる疾患である。

このような病態等については、ホスト自体の遺伝子情報等の解析と、腸内微生物叢、つまり細菌、ウイルス、真菌とを含めた統合的解析と、宿主生理機能への作用機序を明らかにすることが必要であり、本開示の技術はこれらに寄与し得る。また、腸内微生物叢と種々の疾患の病態との関わりや代謝産物を中心とした機能解析も、ホスト自体の遺伝子情報等も含めて解析することでより深化した解析を行うことができる。

また、腸管においては、腸内細菌と生体側は栄養素を競合して取り合う関係である一方、生体のために腸内細菌は栄養素の代謝や分解も併せて行う。腸内細菌に由来する代謝物がどのような働きを示すかについては、ホスト側の遺伝子解析、メタボローム解析や生化学的解析等のデータを取得し、腸内細菌の機能については細菌のゲノム配列情報から機能を類推し、生成する代謝物、メタボローム等種々のデータを取得し、ホスト・腸内細菌双方のデータを複合的に解析することで、両者の関係を知ることができる。

[0124] (実施例6：3回目以上のカプセル化を行う例)

解析試料が、糞便、唾液、喀痰や皮膚、口腔、鼻腔、耳、生殖器などの拭い液、手術洗浄液、あるいは組織抽出物や血液、または共生微生物を含む植物、昆虫、動物の破碎液などであり、当該試料中に含まれる微生物と宿主細胞の双方を解析対象とする場合が想定される。この場合は、各ゲルカプセルにホスト由来の細胞、細胞内小器官、核酸、共生微生物由来の核酸が封入

される。これらのすべてが、ゲルカプセル内部に封入されポリヌクレオチド増幅が実行されうる。このため、増幅ポリヌクレオチドを含むゲルカプセルに対し、標的とする宿主由来の遺伝子断片・微生物由来の遺伝子断片を段階的に検出・選抜することで、解析対象とする遺伝子配列データのみを特異的に取得し、それにかかるコストを削減することができる。例えば、3回以上のカプセル化反応を想定し、1回目のカプセル化ではゲルカプセル内部でのポリヌクレオチド増幅を実行し、2回目のカプセル化にて宿主細胞由来の遺伝子断片をゲルカプセル内で増幅・検出したのち、必要に応じて選抜する。その後、残余ゲルカプセルに対し3回目のカプセル化を実行し、微生物由来の遺伝子断片をゲルカプセル内で増幅・検出したのち、必要に応じて選抜する。2回目以降の順序は、必要に応じて変更しうる。また対象は、2以上の微生物同士あるいは宿主由来物同士などの組み合わせであっても良い。

[0125] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は、日本国特許庁に2019年4月26日に出願された、特願2019-85829に対して優先権主張をするものであり、同出願の内容自体は具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

### 産業上の利用可能性

[0126] 本開示は、シングルセル解析を用いる産業において有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] (A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、第一の薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、
- (B) 第一の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、
- (C) 該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第二の薬剤とともにカプセル化する工程と、
- (D) 該第二の薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、
- (E) 必要に応じて、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、
- (F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、
- (G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、
- (H) 該カプセルに対して少なくとも1つの分析を行う工程と
- を包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。
- [請求項2] (C') 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに所望の薬剤とともにカプセル化する工程と、
- (D') 該所望の薬剤を用いて該細胞または細胞様構造物の分析を行う工程と
- を包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。
- [請求項3] (E) ~ (G) は存在せず、前記第一の薬剤および第二の薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤である、請求項1に記載の方法。

- [請求項4] 前記所望の薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤である、請求項2に記載の方法。
- [請求項5] A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、単一の細胞または構造物単位ごとに選別し、該細胞または細胞様構造物に含まれる核酸を増幅する工程と、  
B) 該増幅された核酸を含む細胞または細胞様構造物を、分析に必要な薬剤とともに、個別にカプセル化する工程と、  
C) 該個別にカプセル化された該細胞または細胞様構造物について分析する工程と  
を包含する、細胞または細胞様構造物を分析する方法。
- [請求項6] 前記C)の分析は、核酸増幅によるものであり、前記B)の分析に必要な薬剤は、核酸増幅に必要な薬剤を含む、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 前記A)が、  
a) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を含む試料を用い、液滴中に1つの細胞または成分を封入することと、  
b) 該液滴をゲル化してゲルカプセルを生成することと、  
c) 該ゲルカプセルを1種以上の溶解用試薬に浸漬して該細胞または成分を溶解することであって、該細胞または成分中のポリヌクレオチドが該ゲルカプセル内に溶出し該ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態で前記ゲルカプセル内に保持される、ことと、  
d) 該ポリヌクレオチドを第1の増幅用試薬に接触させて該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅すること  
を包含する、請求項5または6に記載の方法。
- [請求項8] 前記単一細胞または単一細胞様構造物の懸濁液をマイクロ流路中に流動させ、オイルで前記懸濁液をせん断することにより該単一細胞または単一細胞様構造物を封入した前記液滴が作製されることを特徴とする、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記ゲルカプセルがアガロース、アクリルアミド、PEG、ゼラチ

ン、アルギン酸ナトリウム、マトリゲル、コラーゲン又は光硬化性樹脂から形成されることを特徴とする、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。

[請求項10] 前記溶解用試薬がリゾチーム、ラビアーゼ、ヤタラーゼ、アクロモペプチダーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、ザイモリアーゼ、キチナーゼ、リソスタフィン、ムタノライシン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、フェノール、クロロホルム、グアニジン塩酸塩、尿素、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、TCEP-HCl、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100、Triton X-114、NP-40、Brij-35、Brij-58、Tween 20、Tween 80、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、CHAPS、CHAPSO、ドデシル-β-D-マルトシド、Nonidet P-40、およびZwittergent 3-12からなる群から少なくとも1種選択されることを特徴とする、請求項7～9のいずれか1項に記載の方法。

[請求項11] 前記ゲルカプセルがヒドロゲルカプセルであることを特徴とする、請求項7～10のいずれか1項に記載の方法。

[請求項12] 前記分析に必要な薬剤が第2の増幅用試薬である、請求項5～11のいずれか1項に記載の方法。

[請求項13] 前記第1の増幅試薬と前記第2の増幅用試薬とが同一である、請求項12に記載の方法。

[請求項14] 前記第1の増幅試薬と前記第2の増幅用試薬とが異なる、請求項12に記載の方法。

[請求項15] 前記第1の増幅試薬がゲノムDNAまたはその部分の増幅用試薬または特定配列増幅用試薬である、請求項12～14のいずれか1項に記載の方法。

[請求項16] 前記第2の増幅試薬がゲノムDNAまたはその部分の増幅用試薬ま

たは特定配列増幅用試薬である、請求項 12～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項17] 前記 a) において、前記液滴中に前記 1 つの細胞または細胞様構造物、および第 1 の標識を封入することを特徴とする、請求項 7～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項18] 前記 B) において、前記 1 つの細胞または細胞様構造物および第 2 の標識をカプセル化することを特徴とする、請求項 5～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項19] 前記第 1 の標識と前記第 2 の標識とが同一である、請求項 18 に記載の方法。

[請求項20] 前記第 1 の標識と前記第 2 の標識とが異なる、請求項 18 に記載の方法。

[請求項21] 前記第 1 の標識と前記第 2 の標識とが核酸の量を示すことを特徴とする、請求項 17～20 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項22] 前記 C) が、前記第 1 の標識および／または前記第 2 の標識を評価することを含む、請求項 17～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項23] 前記 A) における前記細胞または細胞様構造物に含まれる核酸が、ゲノム DNA である、請求項 5～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項24] 前記 C) の分析において、種特異的な配列または特定種に保存されている配列の増幅を行うことを特徴とする、請求項 6～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項25] 細胞または細胞様構造物を分析するためのシステムであって、

[X] 2 つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、カプセル化するための薬剤および／またはそれらを格納するカプセル化薬剤格納部と、

[Y] 分析に使用する所望の薬剤および／またはそれらを格納する分析薬剤格納部と、

[Z] カプセル化のための手段と

[W] 必要に応じて、該所望の薬剤を用いて分析を行うための手段とを備える、システム。

[請求項26] 細胞または細胞様構造物を分析するためカプセルを提供するためのキットであって、

[X] 2つ以上の細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、カプセル化するための薬剤と、

[Y] 分析に使用する所望の薬剤と、  
を備える、キット。

[請求項27] 細胞または細胞様構造物を分析する方法であって、

(A) 2つ以上の細胞または細胞様構造物を、核酸増幅のための薬剤とともに、細胞または細胞様構造物ごとにカプセル化する工程と、

(B) 第一の核酸増幅反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(C) 該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに核酸増幅のための薬剤とともにカプセル化する工程と、

(D) 第二の核酸増幅反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(E) 必要に応じて、D) で得られた、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質、あるいはそれらを含むカプセルを、該細胞または細胞様構造物あるいはそれに由来する物質ごとに第Xの薬剤とともにカプセル化する工程であって、Xは3以上の整数である、工程と、

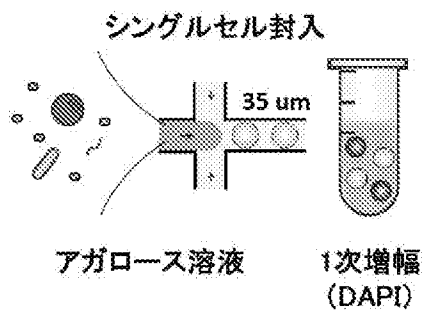
(F) 必要に応じて、該第Xの薬剤に基づく反応をカプセル内で該細胞または細胞様構造物に対して行う工程と、

(G) (E) および (F) の工程を必要に応じて繰り返す工程と、

(H) 該カプセルに含まれる核酸の配列決定を行う工程とを包含する、方法。

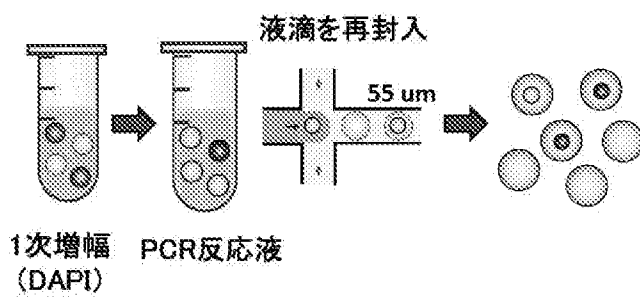
[図1]

図1



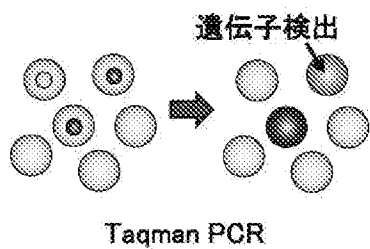
[図2]

図2



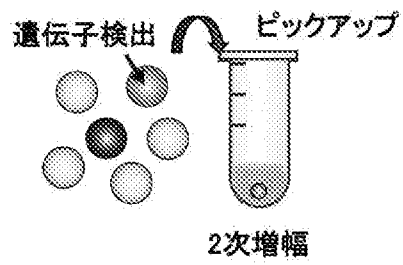
[図3]

図3



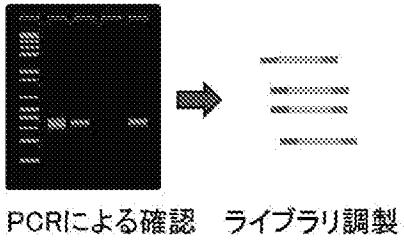
[図4]

図4



[図5]

図5



[図6]

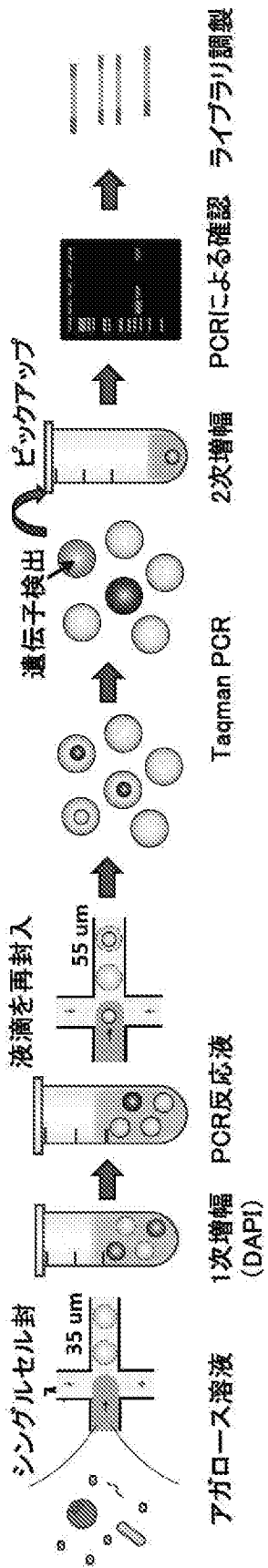
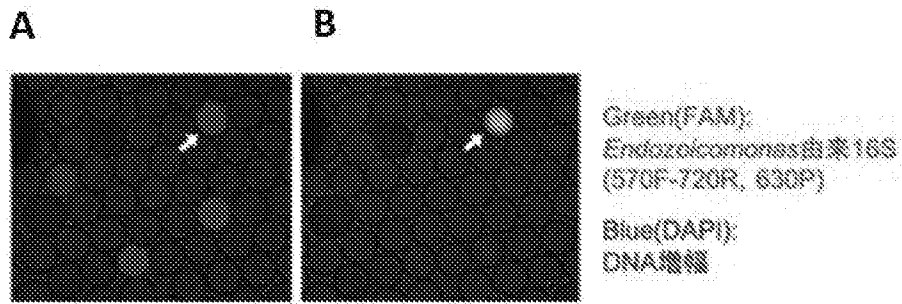


図6

[図7]

図7



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/017790

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12N 11/04(2006.01)i  
 FI: C12Q1/6844 Z; C12Q1/02; C12Q1/6806 Z; C12N11/04  
 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)  
 C12Q1/02; C12Q1/6806; C12Q1/6844; C12N11/04

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)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2019/216271 A1 (BITBIOME, INC.) 14.11.2019 (2019-11-14) claims 23-25	26
X	WO 2017/184707 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 26.10.2017 (2017-10-26) claims 1-158, page 1, lines 11-19, page 9, lines 1-12, page 11, lines 12-20, page 12, line 24, page 39, lines 18-34, example 1, fig. 1-8	1-27
X	JP 2015-528283 A (10X GENOMICS, INC.) 28.09.2015 (2015-09-28) claims 1-64, paragraphs [0032]-[0034], [0050]-[0051], [0057]-[0060], [0129], [0136], [0149]-[0150], [0160]	1-27
X	JP 2002-531056 A (CELLAY, LLC) 24.09.2002 (2002-09-24) claims 1-68, paragraphs [0009], [0057]	1-27

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 07 July 2020 (07.07.2020)	Date of mailing of the international search report 14 July 2020 (14.07.2020)
--	---

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**  
Information on patent family members

International application no.  
PCT/JP2020/017790

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2019/216271 A1	14 Nov. 2019	(Family: none)	
WO 2017/184707 A1	26 Oct. 2017	JP 2019-515674 A claims 1-158, paragraphs [0003], [0044], [0050], [0137], fig. 1-8	
JP 2015-528283 A	28 Sep. 2015	US 2019/0127789 A1 WO 2014/028537 A1 claims 1-64, paragraphs [0065]- [0069], [0099], [0133]	
JP 2002-531056 A	24 Sep. 2002	US 2014/0155295 A1 EP 2885418 A1 WO 2000/008212 A1 claims 1-68, page 3, line 33 to page 4, line 3, page 20, lines 11-28 US 2003/0207260 A1 EP 1102864 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12N 11/04(2006.01)i FI: C12Q1/6844 Z; C12Q1/02; C12Q1/6806 Z; C12N11/04		
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）） C12Q1/02; C12Q1/6806; C12Q1/6844; C12N11/04 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 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	WO 2019/216271 A1 (BITBIOME株式会社) 14.11.2019 (2019-11-14) 請求項23-25	26
X	WO 2017/184707 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 26.10.2017 (2017-10-26) 請求項1-158、1頁11-19行、9頁1-12行、11頁12-20行、12頁24行、39頁18-34行、 実施例1、図1-8	1-27
X	JP 2015-528283 A (テンエックス・ジェノミクス・インコーポレイテッド) 28.09.2015 (2015-09-28) 請求項1-64、段落32-34, 50-51, 57-60, 129, 136, 149-150, 160	1-27
X	JP 2002-531056 A (セレイ, エルエルシー) 24.09.2002 (2002-09-24) 請求項1-68、段落9, 57	1-27
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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 07.07.2020	国際調査報告の発送日 14.07.2020	
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） 野村 英雄 4N 4155 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

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/JP2020/017790

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/216271 A1	14.11.2019	(ファミリーなし)	
WO 2017/184707 A1	26.10.2017	JP 2019-515674 A 請求項1-158、段落 3,44,50,137、図1-8 US 2019/0127789 A1	
JP 2015-528283 A	28.09.2015	WO 2014/028537 A1 請求項1-64、段落 65-69,99,133 US 2014/0155295 A1 EP 2885418 A1	
JP 2002-531056 A	24.09.2002	WO 2000/008212 A1 請求項1-68、3頁33行-4頁3 行、20頁11-28行 US 2003/0207260 A1 EP 1102864 A1	