

(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
2018年7月26日(26.07.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/134907 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/001512

(22) 国際出願日: 2017年1月18日(18.01.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 株式会社日立ハイテクノロジーズ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 Tokyo (JP).

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

Kiyomi); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).

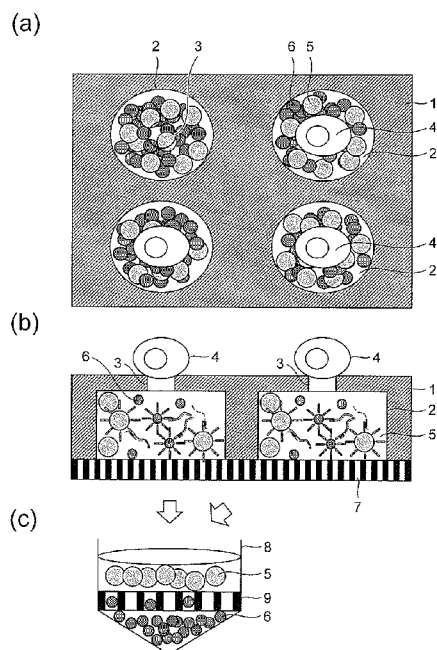
(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR EXTRACTING MULTIPLE BIOMOLECULES FROM SINGLE CELL

(54) 発明の名称: 同一細胞複数生体分子抽出装置および方法

図 1



(57) Abstract: In order to measure trace amounts of multiple kinds of biomolecules in a single cell, the present invention provides a device and method capable of differentiating biomolecules derived from a single cell and separating and extracting samples with high efficiency. Specifically, the present invention provides a single cell analysis device, which has a cell separating means and a reaction field disposed near or inside said separation means, the single cell analysis device being characterized in that: said reaction field has an area in which there are first carriers for trapping a first biomolecule extracted from a trapped cell and second carriers for trapping a second biomolecule different from the first biomolecule; the first carriers and/or the second carriers are provided with an identification tag sequence of the trapped cell; and the first carriers and the second carriers have different, mutually separable physical characteristics.

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 単一細胞中の微量な複数種の生体分子の計測のため、単一細胞由来の生体分子を区別可能かつ高効率にサンプル分離・抽出するためのデバイスおよび方法を提供する。具体的には、細胞を分離する手段と、前記分離手段の近傍または前記分離手段内に配置された反応場とを備えた単一細胞解析デバイスであって、前記反応場は、捕捉された細胞から抽出される第1の生体分子を捕捉する第1の担体と、第1の生体分子とは異なる第2の生体分子を捕捉する第2の担体とが存在する領域を有し、第1の担体および第2の担体の一方又は両方は、捕捉された細胞の識別用タグ配列を備え、第1の担体および第2の担体は、互いに分離し得る異なる物理的特性を有していることを特徴とする単一細胞解析デバイスを提供する。

明 細 書

発明の名称： 同一細胞複数生体分子抽出装置および方法

技術分野

[0001] 本発明は、単一細胞中のゲノム解析、遺伝子発現解析、遺伝子配列解析、タンパク質解析などの解析を同時に単一細胞ごとに実施するための装置および方法に関する。

背景技術

[0002] 単一細胞解析では、単一細胞中の生体分子を個別に抽出し、解析を可能にするための適切なサンプル調製を行った後に、このサンプルの計測を行う。この計測には、ゲノム配列解析、遺伝子配列解析、遺伝子発現解析、タンパク質解析などが含まれる。すなわち、単一細胞解析は、サンプルが非常に微量であるため、直接計測することはできず、サンプル調製と計測を組み合わせることで解析を実行する必要がある。

[0003] 単一細胞解析において、計測に必要な量のサンプルを、単一細胞という微量な生体分子（サンプル）から調製する際には、サンプルのロスを極限まで低減するとともに、適切なサンプル増幅方法を適用することが重要である。ここでロスとは、計測したい生体分子の抽出・濃縮過程や増幅過程において、容器の壁面等に吸着して、計測用サンプルとして利用されずに失われてしまうことを指す。このような課題を解決するための従来技術として、例えば特許文献1には、細胞を平面チップ上の孔に捕捉することで単離し、その直下の多孔質材料表面に固定されたDNAプローブで細胞中の核酸を捕捉することで、計測対象の生体分子であるmRNAを抽出する。このように、細胞捕捉位置と生体分子を捕捉する位置を近接させ、計測のためのサンプル調製をその平面チップ上で実行することで、サンプルのロスを低減させている。他の方法として、特許文献2には、単一の細胞とその細胞中の核酸を抽出（捕捉）するためのDNAプローブ付ビーズをエマルジョン液滴（油中の液滴）に閉じ込めて、細胞中の核酸を高効率に捕捉・抽出し、シーケンシングの

ためのサンプル調製を行う方法が開示されている。この技術でも、解析対象の細胞を単離し、その近傍で核酸を捕捉・抽出し、高スループットDNAシーケンサのためのサンプル調製の一部を実施する方法をとることで、解析対象となる細胞中の核酸のうち、このシーケンサで解析される核酸の効率を高め、サンプルロスを低減している。それゆえ、単一細胞中の0.1～10 pgのmRNA（核酸）を抽出し、配列解析や定量を行うことができる。

[0004] 一方、まず容器中で細胞サンプルから核酸サンプルを抽出した後に、計測対象となる核酸を再抽出する方法も当該技術分野では一般的に行われている。この場合、単一細胞解析は行われなかったことが一般的である。というのは、このよう方法を適用する場合に必要な核酸サンプルの量は3 μg（ゲノムDNAが断片化されたあと、上記方法で抽出される。それゆえゲノムDNA量はmRNA量と比較可能となる。）であり、上記の単一細胞解析での核酸量である0.1～10 pg程度の核酸量の場合に比べると約6桁の相違がある。このような相違は、細胞からの核酸の捕捉・抽出が細胞の近傍で捕捉した固体表面上でのサンプル調製が行われず、固体表面から溶液中の核酸を溶出する過程を含むことで、固体表面上でのサンプルロスの割合が高くなるだけでなく、溶液状態で別の容器などに移動されることでも容器表面への吸着によるロスが大きくなってしまいうことに起因する。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許出願公開US 2015/0167063号

特許文献2：米国特許出願公開US 2015/0376609号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 単一細胞解析において、同一細胞中の複数の種類の生体分子の計測や、同じ種類の生体分子であっても、異なるサンプル処理が必要な生体分子の計測は非常に有用である。例えば、ゲノム変異解析やエピゲノム解析と遺伝子発

現解析の同時解析では、ゲノムと遺伝子発現の状態の関係が明らかになり、細胞や組織の状態をゲノム情報から高精度に予測するための情報が得られる。これと同様に、遺伝子発現解析とタンパク質解析を同時に行うことによって、ゲノムと遺伝子発現よりも時間的に安定なゲノム情報と細胞の状態の関連についての情報を得ることが期待できる。さらには免疫細胞中の抗体はT細胞レセプタの可変領域の配列解析（レパトア（Repertoire）解析）と遺伝子発現解析によって、有効な細胞グループレパトア解析が可能となり、がんなどの治療選択に有用な情報を与えると期待される。

[0007] 以上のように、これまでの単一細胞解析のためのサンプル調製デバイスでは、計測対象が微量なため、細胞捕捉および細胞破碎と同時に、その場またはその近傍でサンプル処理しているが、その場合、細胞が1つであるため、反応槽は1箇所となる。そのため、1種類の反応処理しかできなかった。すなわち、同一の細胞に対する複数種類の生体分子の解析ができなかった。一方、サンプルを分離して反応容器を複数に分けようとするとは分離・抽出時にサンプルがロスするため、分離前に大量のサンプルが必要となり、単一細胞という微量サンプルを扱うことができなかった。

[0008] 本発明では、単一細胞という微量サンプルであっても、複数の計測に必要な複数のサンプル調製が実行できるようにするために、高効率のサンプル分離・抽出が可能な手段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] 前記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、本発明者は、以下の構成を有する単一細胞解析デバイスおよび以下の工程を含む単一細胞解析方法により前記課題を解決できるという知見を得るに至った。すなわち、本発明は、

細胞を分離する手段と、

前記分離手段の近傍または前記分離手段内に配置された反応場とを備えた単一細胞解析デバイスであって、

前記反応場は、捕捉された細胞から抽出される第1の生体分子を捕捉する

第1の担体と、第1の生体分子とは異なる第2の生体分子を捕捉する第2の担体とが存在する領域を有し、

第1の担体および第2の担体の一方または両方は、捕捉された細胞の識別用タグ配列を備え、

第1の担体および第2の担体は、互いに分離し得る異なる物理的特性を有している

ことを特徴とする単一細胞解析デバイスに関する。

[0010] また本発明は、上記単一細胞解析デバイスにおいて、分離手段により細胞を捕捉し、捕捉された細胞から抽出された第1の生体分子および第2の生体分子を反応場においてそれぞれ第1の担体および第2の担体に捕捉し、第1の担体および第2の担体を物理的特性の違いに基づいて分離することにより第1の生体分子および第2の生体分子を個別にサンプル処理することを含む、単一細胞解析方法に関する。

発明の効果

[0011] 本発明に係るデバイスおよび方法により、単一細胞中に存在する、最適なサンプル調製工程または計測方法が異なる生体分子を個別にロスなく抽出し、どの単一細胞に由来するかの情報を保持したまま個別にサンプル調製を実施して、個別に計測を行うことで、多数の細胞から構成される複雑な生体組織の状態を計測することができるようになる。特に、DNAのゲノム変異解析とmRNAの遺伝子発現解析の同時解析によって、ゲノム変異がどのように遺伝子発現に影響を与えているかを単一細胞ごとに解析できるため、より精度の高いゲノム情報の発現についての解析が可能となる。

[0012] また、エピゲノム解析と遺伝子発現解析の同時解析や遺伝子発現解析とタンパク質解析も同様な効果が期待できる。さらに医学的な応用として、上記複数の生体分子の計測がT細胞レセプタや抗体に対応するmRNAの配列解析と細胞の状態に関連するmRNA発現解析という2種類の分子に対する2種類の解析が単一細胞ごとにできることで、がんに関連する抗原の情報を配列解析から得て、細胞の活動状態を遺伝子発現解析から得ることができるた

め、高精度ながんの診断につながると期待される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明に係るデバイスの基本構成例として実施例1のチップ構成を示す図である。

[図2]実施例1に対応するサンプル処理フローを示す図である。

[図3]実施例1の第2のビーズ（固体担体）のサンプル処理フローの前半を示す図である。

[図4]実施例1の第2のビーズ（固体担体）のサンプル処理フローの後半を示す図である。

[図5]実施例1の第1のビーズ（固体担体）のサンプル処理フローの前半を示す図である。

[図6]実施例1の第1のビーズ（固体担体）のサンプル処理フローの後半を示す図である。

[図7]本発明に係るデバイスを備えた構成例として実施例2のフローセルデバイス構成を示す図である。

[図8]本発明に係るデバイスの別の構成例として実施例3のデバイス構成を示す図である。

[図9]実施例3のサンプル処理フローを示す図である。

[図10]本発明に係るデバイスの構成の一実施形態を示す図である。

[図11]本発明に係るデバイスの基本構成例として実施例6のチップ構成を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、複数の細胞について、各単一細胞から複数種の生体分子のサンプルを並行的かつ迅速に調製し、それぞれのサンプルを解析するためのデバイス、装置および方法を提供する。ここでサンプルは、単一細胞および生体分子の種類を区別可能に調製される。

[0015] 本発明において、「生体分子のサンプルの調製」とは、細胞内に含まれる生体分子を抽出して、他の細胞成分と分離することを意味し、特に複数種の

生体分子を区別可能なように分離してサンプルを調製することを意味する。また、「サンプルの解析」とは、サンプルに関連する生体分子を解析することであって、具体的には、サンプル（細胞、組織切片など）における生体分子の発現を定量的に分析すること、サンプルにおける生体分子の発現分布を分析すること、サンプルにおける生体分子（例えば特定の変異を有するゲノムDNA）の存在の有無を分析すること、サンプルにおける特定の位置と生体分子発現量との相関データを得ることを意味する。

[0016] 本発明において解析する対象となる生体分子は、細胞内に含まれる生体分子であれば特に限定されるものではなく、核酸（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）、非コードRNA（ncRNA）、microRNA、ゲノムDNA、およびそれらの断片など）、タンパク質（例えば、酵素、抗体など）、低分子化合物などが含まれる。本発明では、複数種、例えば2種の生体分子を解析対象とする。例えば、第1の生体分子および第2の生体分子はいずれもmRNAとすることができる。あるいは、第1の生体分子および第2の生体分子の一方をmRNAとし、他方をタンパク質とすることもできる。また、第1の生体分子の一方をゲノムDNAとし、他方をmRNAとすることも可能である。解析する生体分子の種類は、2種以上、例えば2種、3種、4種、5種など、解析目的に応じて設定することができる。

[0017] 本発明では、個々の細胞に対して生体分子捕捉のための個別の反応場を設定するが、その反応場の近傍の位置（例えば隣接した位置）または反応場の中に、細胞を分離／捕捉する手段を設け、反応場の中には、第1の計測対象生体分子を捕捉するための担体を充填し、これに加えて、この担体とは分離可能で第2の計測対象生体分子を捕捉するための別の担体を充填する。このような構成により、細胞の分離／捕捉と、捕捉された細胞からの生体分子の抽出と、複数種の生体分子の別個のサンプル調製とを迅速かつ効率的に行うことが可能となる。

[0018] 第1の態様では、本発明は、
細胞を分離する手段と、

前記分離手段の近傍または前記分離手段内に配置された反応場とを備えた単一細胞解析デバイスであって、

前記反応場は、捕捉された細胞から抽出される第1の生体分子を捕捉する第1の担体と、第1の生体分子とは異なる第2の生体分子を捕捉する第2の担体とが存在する領域を有し、

第1の担体および第2の担体の一方または両方は、捕捉された細胞の識別用タグ配列を備え、

第1の担体および第2の担体は、互いに分離し得る異なる物理的特性を有している

ことを特徴とする単一細胞解析デバイスを提供する。

[0019] 複数種、例えば2種類の生体分子を計測する（＝2種類の解析を行う）ための具体的な構成の一例は、前記分離手段および前記反応場が、平面状に配置した複数の細胞捕捉用の孔を設けた基板と、前記孔の直下に配置された反応槽である構成である。具体的には、平面状に配置した複数の細胞捕捉（単離）用の孔を設けた基板中の孔の直下に細胞抽出溶液を通過させる反応槽を設け、ここに第1の計測対象生体分子を捕捉するための分子と細胞識別用タグ配列を有する第1の捕捉プローブが固定された第1の固体担体を充填し、これに加えて、第1の固体担体とは物理的特性が異なる別の固体担体に、第2の生体分子を捕捉するための第2の捕捉プローブを固定して、前記反応槽に充填する。

[0020] 平面上に配置された複数の細胞捕捉孔が設けられた基板と孔の直下に配置された反応槽を備えるデバイスは、二次元アレイまたはチップとも呼ばれ、特許文献1、国際特許出願公開WO2014/141386号などに記載の通り、当該技術分野において公知である。

[0021] 例えば基板は、当該技術分野で一般的に使用されている材料で作製されたものであれば特に限定されるものではない。その材料としては、例えば、金、クロム、白金、チタン、ニッケル等の金属；ステンレス、ジュラルミン等の合金；シリコン；ガラス、石英ガラス、熔融石英、合成石英、アルミナ、

サファイア、セラミクス、フォスフェイトおよび感光性ガラス等のガラス材料；ポリエステル樹脂、ポリスチレン、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS樹脂（Acrylonitrile Butadiene Styrene樹脂）、ジメチルポリシロキサン（PDMS）、サイクリックポリオレフィン、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂等のプラスチック；アガロース、デキストラン、セルロース、ポリビニルアルコール、ニトロセルロース、キチン、キトサンが挙げられる。基板に用いる材料は、疎水性材料であることが好ましく、それにより細胞や試薬などの吸着を低減することができる。あるいは、基板には、他の物質（核酸やタンパク質、試薬など）が吸着しないように、表面コーティングを行ってもよい。

[0022] 基板の一面に一細胞捕捉孔を設け、孔の直下に反応槽を設け、反応槽に生体分子を捕捉するための担体を充填する方法も公知である。細胞捕捉孔の大きさは、捕捉しようとする細胞のサイズよりも小さく、かつ反応槽に向かって流れを発生させることができる程度の大きさを備えている必要がある。例えば5～10 μm 、好ましくは8～10 μm とすることができるが、捕捉対象の細胞の種類に応じて適宜変更する。基板上の細胞捕捉孔の配置および間隔もまた捕捉対象の細胞の種類に応じて適宜変更することができる。また、反応槽は、細胞捕捉孔と一体的に形成されていてもよいし、別に形成されて流路で接続されていてもよい。

[0023] 別の具体的な構成例としては、前記分離手段および前記反応場が、非極性溶媒が流れる流路と、非極性溶媒中に形成された、単一細胞を含む液滴である構成である。具体的には、非極性溶媒中に形成された単一細胞を含む液滴を反応場として、その液滴の中に、細胞を破砕する試薬と第1の計測対象生体分子を捕捉するための分子と細胞識別用タグ配列を有する第1の捕捉プローブが固定された固体担体と、これに加えて、前記固体担体とは物理的特性が異なる別の固体担体とを導入する。

[0024] 非極性溶媒中の液滴において細胞中の生体物質（特に核酸）を抽出・捕捉する技術は、いわゆるエマルジョン液滴として知られており、例えば特許文

献2などに記載されている。

[0025] 非極性溶媒として、例えばミネラルオイル、シリコンオイルなどを使用し、そこへ単一細胞、試薬および担体を封入したエマルジョン液滴を形成する。エマルジョンの形成は当技術分野で周知であり、任意の方法により行うことができる。生体分子の抽出やサンプル処理のため、非極性溶媒およびエマルジョン液滴が熱安定性であることが好ましい。エマルジョン液滴の大きさは、解析対象の細胞の種類および大きさ、使用する担体の種類および大きさなどに応じて異なり、約100 μ L以下、50 μ L以下、10 μ L以下、5 μ L以下、1 μ L以下、さらには500pL以下など、適宜設定することができる。

[0026] 本発明では、複数種の生体分子を捕捉するため、互いに分離し得る異なる物理的特性を有する複数種の担体を使用する。例えば、2種類の生体分子を捕捉する場合には、それぞれの生体分子を捕捉するための第1の担体および第2の担体を反応場に充填または導入する。3種以上の生体分子を捕捉する場合には、それらの生体分子をそれぞれ捕捉するための担体を反応場に充填または導入する。

[0027] それぞれの担体は、大きさ、重量、比重、磁性および形状からなる群より選択される少なくとも1つの物理的特性が異なるものを使用する。形状の異なる担体としては、例えばビーズ、多孔質構造、反応槽の壁面などが挙げられる。また、大きさおよび／または重量もしくは比重の異なる担体としては、異なるサイズおよび／または重量もしくは比重を有するビーズなどが挙げられる。磁性の異なる担体としては、磁性ビーズ、磁性多孔質構造などが挙げられる。これらの物理的特性が少なくとも1つ異なる複数種の担体を組み合わせて使用することで、担体に捕捉される生体分子を容易に分離することが可能となる。

[0028] 生体分子の捕捉効率を上げる点を考慮すると、担体として、表面積の大きい材料を用いることが好ましく、例えば、多数のビーズが充填された構造、多孔質構造、メッシュ構造などを採用することが好ましい。また、操作の簡

便性の点から、担体の少なくとも1つとしてビーズを使用することが好ましい。担体としてビーズを用いる場合には、樹脂材料（ポリスチレンなど）、酸化物（ガラスなど）、金属（鉄など）、セファロース、およびこれらの組み合わせなどからビーズを作製することができる。さらに、担体の少なくとも1つとして磁性ビーズを使用すると、担体の分離を迅速かつ簡便に行うことができる。

[0029] 担体には、解析対象の生体分子を捕捉するためのプローブを固定する。そのようなプローブは、解析対象の生体分子の種類に応じて、生体分子と特異的に結合するように設計することができる。例えば、生体分子がmRNAである場合には、ポリT配列を含むDNAプローブを用いることができる。ポリT配列を含むDNAプローブ、すなわちオリゴ(dT)は、常法により合成することができ、オリゴ(dT)の重合度は、mRNAのポリA配列とハイブリダイズして、mRNAをオリゴ(dT)が固定された担体に捕捉する重合度であればよい。例えば、10～30塩基、10～20塩基、10～15塩基程度とすることができる。生体分子がmRNA、非コードRNA(ncRNA)、microRNAまたはゲノムDNAである場合には、ランダム配列からなるDNAプローブ、特定の標的配列に対して相補的な配列を有するDNAプローブを用いることができる。また、生体分子がタンパク質や低分子化合物である場合には、該生体分子と特異的に結合する分子、例えば抗体、受容体、アプタマーなどをプローブとして用いることができる。さらに生体分子がタンパク質や低分子化合物であり、細胞認識用タグ配列を利用する場合には、該生体分子と特異的に結合する第1の結合性分子（抗体、アプタマー等）と、第1の結合性分子に結合した第1のDNAプローブを利用することができる。上記結合性分子とサンドイッチ状態で上記生体分子と結合する第2の結合性分子（上記結合性分子と同じ種類の分子であることが好ましく、例えば抗体、アプタマー等である）と、第2の結合性分子に結合した第2のDNAプローブを添加し、ターゲットとなる生体分子が存在する場合には、上記DNAプローブと第2のDNAプローブとがライゲーション

し、その生体分子に特異的なリングプローブが形成される。この方法は近接ライゲーシオン法 (Proximity Ligation Method) と呼ばれ (例えば、Malin Jarvius et al. Molecular & Cellular Proteomics 6 (9) p.1500, 2007)、タンパク質に対応したDNAライブラリの構築に有用である。

[0030] プローブは、当技術分野で公知の任意の方法により担体に固定する。例えばビーズ表面、多孔質膜の表面または内部、反応槽の壁面などに、共有結合、イオン結合、物理吸着、生物学的結合 (例えば、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジンとの結合、抗原と抗体との結合など) を利用してプローブを固定することができる。また、スペーサー配列を介してプローブを担体に固定することも可能である。前記近接ライゲーシオンを用いた生体分子としてタンパク質や低分子化合物を処理する場合、前記第1の結合性分子を別の担体に固定することも可能である。

[0031] ここで、上記担体のいずれか1つ、例えば第1の担体および第2の担体の一方または両方は、捕捉された細胞の識別用タグ配列を備える。例えば、担体に固定されたプローブに細胞識別用タグ配列を導入することができる。特に、デバイスから分離される担体 (例えばビーズ等) に固定されるプローブの場合には、細胞識別用タグ配列を使用して、デバイスから分離した後であっても、どの細胞または位置に由来するかの情報を保持することができ、好ましい。また、計測対象の生体分子が3種類以上の場合には、少なくとも2種類以上の担体に細胞識別用タグ配列を導入することが好ましい。細胞識別用タグ配列は、当業者であれば、捕捉する細胞の数や反応場の数に応じて、それらを区別可能なように設計することができる。

[0032] 上述したような構成によって本発明の課題が解決される理由は以下の通りである。すなわち、細胞の破碎が反応場の近傍または反応場中で行われるとともに、この反応場の中に計測対象とするすべての計測対象とする生体分子を捕捉する担体を設けることで、細胞抽出液に含まれる計測対象生体分子が反応容器に触れる前に担体上の生体分子を捕捉するためのプローブに捕捉される。これにより、生体分子が容器などの壁面に吸着してサンプルがロス

することがほとんどない。次に、捕捉された生体分子を担体の物理的特性、すなわち、大きさや形や比重や磁性などによって分離することで、分離時も容器壁面などに吸着する確率を低減することができる。これによって、単一細胞中の極めて微量な計測対象生体分子を分離して、分離したサンプルに対して個別に最適なサンプル調製を行うことができる。

[0033] また別の態様において、本発明は、本発明に係る単一細胞解析デバイスにおいて、分離手段により細胞を捕捉し、捕捉された細胞から抽出された第1の生体分子および第2の生体分子を反応場においてそれぞれ第1の担体および第2の担体に捕捉し、第1の担体および第2の担体を物理的特性の違いに基づいて分離することにより第1の生体分子および第2の生体分子を個別にサンプル処理することを含む、単一細胞解析方法を提供する。

[0034] 解析対象となる細胞は、細胞を含む生体由来サンプルであれば特に限定されるものではない。サンプルの由来となる生体も特に限定されるものではない。サンプルは、本発明に係るデバイスまたは方法において使用する際に、細胞がそれぞれ分離した形態である必要がある。そのため、サンプルが固形サンプル（例えば組織切片など）である場合には、固形サンプルを溶媒に溶解または懸濁させることにより液体サンプルとすることが好ましい。また、サンプルが気体サンプル（例えば空気、呼気など）である場合には、気体サンプルに含まれる細胞を溶媒に懸濁させることにより液体サンプルとすることが好ましい。サンプルの調製方法は、当該技術分野において慣用的に行われており、当業者であれば容易に理解することができる。

[0035] 本発明に係る単一細胞解析デバイスに、サンプルである細胞を導入する。分離手段（例えば細胞捕捉孔または非極性溶媒）により細胞を捕捉し、捕捉された細胞から生体分子を抽出する。例えば、当技術分野で公知の細胞溶解試薬を用いて細胞を溶解し、細胞に含まれる核酸を抽出することができる。例えば、プロテイナーゼKのようなタンパク質分解酵素、チオシアン酸グアニジン・グアニジン塩酸といったカオトロピック塩、TweenおよびSDSといった界面活性剤、あるいはリシス溶液などの市販の細胞溶解用試薬を

用いて、細胞を溶解し、それに含まれる核酸、すなわちDNAおよびRNAを溶出することができる。生体分子としてmRNAを捕捉する場合には、DNAをDNA分解酵素（DNase）により分解してからRNAのみを捕捉するようにしてもよい。

[0036] 抽出された複数種の生体分子を反応場においてそれぞれ物理的特性の異なる担体に捕捉する。その後、その担体を物理的特性の違いに基づいて分離する。例えば、大きさが異なる担体を使用する場合には、フィルターなどを使用して分離することができる。重量または比重が異なる担体の場合には、遠心分離、沈降などを利用して分離することができる。形状が異なる担体の場合には、洗浄、フィルター、遠心分離などを利用して分離することができる。磁性が異なる担体の場合には、磁石を使用して分離することができる。担体の分離は、使用する担体の物理的特性の違いに応じて、上記手段を適宜組み合わせる行うことができる。

[0037] 担体を分離した後、それぞれの担体に捕捉された生体分子を個別にサンプル処理する。サンプル処理では、細胞識別用タグ配列を利用して、処理されたサンプルがどの細胞または位置に由来するかを解析することも可能である。

[0038] 本発明に係る単一細胞解析方法では、細胞の破碎が反応場の近傍または反応場の中で行われるとともに、この反応場の中に計測対象とするすべての計測対象とする生体分子を捕捉する担体を設けることで、細胞抽出液に含まれる計測対象生体分子が反応容器に触れる前に担体上の生体分子を捕捉するためのプローブに捕捉される。これにより、生体分子が容器などの壁面に吸着してサンプルがロスすることがほとんどない。次に、捕捉された生体分子を担体の物理的特性、すなわち、大きさや形や比重や磁性などによって分離することで、分離時も容器壁面などに吸着する確率を低減することができる。これによって、単一細胞中の極めて微量な計測対象生体分子を分離して、分離したサンプルを個別に最適なサンプル調製を行うことができる。

[0039] このような解析によって生体組織中の分子生物学的視点からの多様な細胞

の分布に関する情報を得ることができ、がんの進行やそれに伴う免疫応答の個人レベルでの多様性も従来の遺伝子解析よりも詳細かつ正確に調べることができる。それゆえ、このような研究が、新しい病気の診断方法の開発や創薬に資するものと期待され、特に、個人別の適切な治療方法の選択の研究に資するものと期待される。

[0040] 以下、図面を参照しながら本発明の具体的な実施の形態を説明する。

実施例 1

[0041] 本実施例は、平面状に配置した複数の細胞捕捉孔を設けた平面基板と、その孔の直下に細胞抽出溶液を通過させる反応槽を反応場として設け、ここに2種類のビーズを充填して、2種類の計測対象生体分子を含むサンプルを調製する例である。

[0042] 2種類の生体分子の計測対象として、本実施例では、同じmRNAであるが、配列中に変異や組み換えが起きている領域のmRNA（第1の生体分子）の配列情報を計測する第1の解析と、変異等がほとんどなくタンパク質をコードしているmRNA（第2の生体分子）の細胞中の存在量（＝発現量）を計測する第2の解析とを、単一細胞毎に複数の細胞について同時に実現するデバイスと方法について記す。第1の解析の具体例として、ここでは免疫細胞の可変領域の配列解析対象部分が3'末端から離れており（離れ方の程度としては、配列解析を実施するシーケンシングのリードの長さより離れている）、また、単一細胞中の発現コピー数が少なく遺伝子の増幅率を大きく取らなければならないが、定量する必要はなく、配列情報のみを取得する解析である。一方、第2の解析は、遺伝子毎の分子数をカウントする定量解析（いわゆる遺伝子発現解析）であり、mRNAの3'末端領域（ポリA配列に近い配列領域）の配列解析と遺伝子配列データベースへのマッピングによって遺伝子毎のmRNA分子数をカウントする。

[0043] 本実施例の基本構成となる反应用のデバイスの構成図を図1に示す。図1の（a）および（b）はそれぞれデバイスの上面図および断面図である。平面基板（1）上に細胞捕捉孔（3）を等間隔で正方格子状に配置し、細胞捕

捉孔の直下に反応槽（２）を配置する。本実施例では平面基板はPDMS（ポリジメチルシロキサン）製であるが、ポリカーボネートやポリプロピレン、（サイクリック）シクロオレフィン等の樹脂材料や、シリコンなどの半導体材料、さらにはガラスやアルミナなどの無機材料、ステンレスなどの金属材料を用いてもよい。また、細胞捕捉孔は（一番細い部分で）直径 $0.1\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ 程度で細胞の大きさに適したサイズを選ぶことができるが、通常 $2\sim3\mu\text{m}$ 程度が好適である。さらに、細胞捕捉孔の間隔は $1\mu\text{m}$ ～ 1mm 程度が望ましいが、特に $100\mu\text{m}$ 程度が望ましい。さらに、反応槽の大きさ（例えば直径）は、 $1\mu\text{m}$ 程度から $500\mu\text{m}$ 程度が望ましいが、特に $80\mu\text{m}$ 程度が望ましい。反応槽の高さは $1\mu\text{m}$ 程度から 1mm 程度が望ましいが、特に $100\mu\text{m}$ 程度が望ましい。

[0044] 本実施例では、反応槽（２）の中に２種類の固体担体として直径と物理的特性の異なる２種類のビーズを充填した。まず、第１の生体分子であるmRNAを捕捉するために、第１の固体担体として直径 $30\mu\text{m}$ のセファロースビーズ上に、可変領域近傍の固定領域に相補的な遺伝子特異的配列を有する第１のDNAプローブを固定する。セファロースビーズへのDNAプローブの固定はストレプトアビジン固定のセファロースビーズが市販されており（例えばGE Health Care社製）、5'末端をビオチン修飾したDNAをセファロースビーズのインストラクションに従った条件で混合して固定する。次に、第２の生体分子である遺伝子を、第２の固体担体として直径 $1\mu\text{m}$ の磁性ビーズ上に捕捉するために、ポリT配列を有する第２のDNAプローブを固定する。この固定についても、ストレプトアビジンが表面に固定された磁性ビーズが市販（例えばDynaI社製）されている。第１のDNAプローブの場合と同様に5'末端をビオチン修飾し、インストラクションに従った条件でビーズとDNA分子を混合することでDNAプローブを固定することができる。もちろん、両者とも異なる機構での固定を選択してもよい。

[0045] これら２種類のビーズ（固体担体５および６）は反応槽（２）に混合して

充填する。さらに、基板（１）の裏面にビーズ保持用のメンブレン（７）を貼り付けることで、基板（１）上に分注された溶液は、細胞捕捉孔から基板裏面に向かって貫通して流れるような構成としている。このメンブレンとしてポアサイズが $0.05\mu\text{m}$ から $80\mu\text{m}$ 程度のトラックエッチメンブレンを用いることができるが、親水性の多孔質メンブレンであれば他の材質および構造の他の多孔質膜を用いても良い。本実施例では $0.8\mu\text{m}$ ポアのトラックエッチメンブレンを用いた。

[0046] 次に、細胞の単離からサンプル調製の方法の概要について記す。サンプル処理の全体的な処理フローは図２に示す。計測対象となる細胞懸濁液を前記基板上に滴下し、ビーズ保持用メンブレン（７）の裏面に負圧（ 95kPa ）を印加し、細胞溶液が細胞捕捉孔（３）および反応槽（２）とメンブレン（７）を通して流れるようにする。この過程で、細胞懸濁液中の細胞は細胞捕捉孔を塞ぐ形で止まり、細胞によって細胞捕捉孔がふさがれた孔は溶液の流れが止まるため、まだ細胞が捕捉されていない孔に優先的に細胞が捕捉されるようになる。この過程を繰り返して、ほとんどの細胞捕捉孔で細胞を捕捉することができる。このようにして細胞（４）が基板（１）上で捕捉される。

[0047] 細胞懸濁液をすべて吸引することで溶液中の細胞をすべて捕捉した後、細胞中の計測対象分子を抽出するために細胞を破碎する。そのためにリシス溶液をデバイス上に分注して、デバイスの裏面に細胞懸濁液の場合と同様に負圧（ 96kPa ）を印加することで、細胞抽出液が反応槽を通過するようにする。細胞でふさがれた細胞捕捉孔では溶液の流れは起きないが、細胞が破碎されると、細胞抽出溶液は細胞捕捉孔を通して、反応槽を流れる。続いて、２種類のビーズ（第１の固体担体５および第２の固体担体６）上の捕捉DNAプローブによって、計測対象となるmRNAがそれぞれ別のビーズ上に捕捉される。

[0048] 次に、mRNAの相補鎖であるcDNA合成する。これによって、mRNAと同じ配列を持つDNAを増幅する準備をすることができる。cDNA合

成用の酵素試薬をリシス溶液と同様に基板（１）上に滴下して、圧力の印加を弱めて（０～５ｋＰａ程度）、溶液の流れを遅くする。デバイスの温度をｃＤＮＡ合成に好適な温度（５０℃）に上げて、適切な時間（５０分程度）反応させる。

[0049] ｃＤＮＡ合成を完了後、メンブレン（７）を取り外し、２種類のビーズを分離した後、２種類の適切なサンプル調製を行う。再び、サンプル溶液を混合し、ＤＮＡシーケンシングを実施する。後に説明するタグ配列情報を用いて、遺伝子の種類ごと、反応槽ごとの計測データを分離して、必要なデータを取得する。

[0050] ２種類のビーズの分離の方法はビーズのサイズと磁性特性の両方を利用した。すなわち、メンブレンを取り外した後、得られたビーズ溶液を分離用チューブ（８）に分注し、遠心することで、分離フィルタ（９）の上部にサイズの大きいセファロースビーズ（第１のビーズ）が残り、下部に直径の小さいビーズが沈降する。沈降を補助するために磁石も用いた。

[0051] 次に、２種類のビーズ上のサンプル調製過程と分子の反応による変化を説明する。

反応は、ビーズが分離されていない部分から分子の反応による変化が異なるので再度記載する。

[0052] まず、第２のビーズ上の遺伝子発現解析用サンプルの調製について記す。図３および図４のstep 1～step 5に、このデバイスで可能なｃＤＮＡの合成後の核酸増幅（ＰＣＲ）までのサンプル調製方法の例を示した。

[0053] ビーズの分離はstep 1のｃＤＮＡ合成前のｍＲＮＡを捕捉した後で行ってもよいが、ここではstep 1に示すようにｃＤＮＡ合成後、酵素の熱失活を行った後に実施した。

[0054] 図３（step 1）には、ＤＮＡプローブ（３１）が固定された第２のビーズ（６）表面の拡大図を示している。ビーズ上に固定されたＤＮＡプローブ（３１（配列番号１））は、反応槽の位置を識別するための細胞認識用タグ配列（３０２）を含む。このＤＮＡプローブ（３１）の３′末端はポリＴ

配列（301）を有しており、mRNAの3'末端のポリA配列とハイブリダイズすることによってmRNAを捕捉する。

[0055] このmRNA捕捉用DNAプローブ（31（配列番号1））は、本実施例ではもう少し複雑な配列構成となっており、図3（step1）に示されているように、5'末端からPCR増幅用共通配列（303）（Forward方向（配列番号23））、細胞認識用タグ配列（302）および核酸捕捉配列（301）で構成されている。ここでは核酸捕捉配列としてポリT配列を用いた。ポリT配列の重合度として、mRNAのポリA配列とハイブリダイズして、mRNAをポリT配列を含む核酸プローブが固定されたビーズに捕捉しうる重合度であればよい。例えば、10～30塩基、10～20塩基、10～15塩基程度とすることができる。PCR増幅用共通配列をDNAプローブ（31）へ導入することで、後続のPCR増幅工程においてこの配列を共通プライマーとして利用することができる。また、細胞認識用タグ配列については、例えば5塩基のランダム配列を使用した場合、 $4^5 = 1024$ の位置または領域（例えば $4^5 = 1024$ 個の単一細胞）を認識することが可能となる。すなわち、1度に1024個の単一細胞からcDNAライブラリーを調製することができ、最終的に得られる次世代シーケンサの配列データにおいて、どの細胞由来であるかを認識することが可能となる。さらに、分子認識用タグ配列（例えば7塩基）をDNAプローブ（31）へ（例えば（301）と（302）の間）に導入してもよい。これにより、 $4^7 = 1.6 \times 10^5$ 分子を認識することができるため、次世代シーケンサで得られる増幅産物についてのDNA配列データから同じ細胞由来で同じ遺伝子の配列をもった増幅産物が、どの分子由来であるかを認識することが可能となる。これらのタグ配列については、例えばWO2014/141386に詳細が記載されている。

[0056] 本実施例では、mRNAを解析するために捕捉用DNAプローブ（31）の一部にポリT配列を用いたが、microRNAやゲノム解析を行うために、核酸捕捉配列としてポリT配列の代わりにランダム配列や解析対象の核

酸の一部に相補的な配列を用いてもよい。

[0057] 次にビーズ上のDNAプローブ(31)により捕捉したmRNA(32)を鋳型にして1st cDNA鎖(33)を合成する。本工程では逆転写酵素および合成基質を含む溶液でパックされたビーズの空隙部分を満たし、50℃にゆっくり昇温して50分ほど相補鎖合成反応を行う。反応終了後、85℃で5分間保持して、逆転写酵素を熱失活後に、ビーズを分離する。

[0058] ビーズの分離は、メンブレン(7)を取り外し、図1の(c)に示すように、基板(1)ごとPBS(リン酸緩衝生理食塩水)バッファの入った5μmのポアのフィルタ付チューブの上側に導入し、攪拌することでビーズを基板から遊離させる。不要なチップをチューブから取り除き、遠心することで、溶液と共にサイズの大きなセファロースビーズを回収する。チューブの下側には直径1μmの磁性ビーズが回収される。

[0059] ただし、フィルターを用いずに磁石を用いて磁性ビーズを回収してもよい。なお、この場合、何度か回収操作を行ってもよい。

[0060] 回収後のセファロースビーズをチューブ中に再回収し、RNase酵素を加えmRNA(32)を分解除去する。アルカリ変性剤を含む液および洗浄液を加えて、ビーズを遠心によってチューブの底に沈殿させ、上澄みを除去することで、残存物および分解物を除去する。ここまでのプロセスで核酸抽出部分にパックされたビーズ上には、細胞捕捉孔に捕捉された個々の細胞の位置を反映して図5(step2)に示すようなcDNAライブラリーアレイが構築される。

[0061] 次にPCR増幅用共通配列(Reverse(配列番号2))(309)が付加された複数(最大数百種)のターゲット遺伝子特異的配列(311)を含むプライマー(34)を1st cDNA鎖(33)ヘアニールさせ(図3(step2))、相補鎖伸長反応により2nd cDNA鎖(35)を合成させる(図3(step3))。すなわちマルチプレックス条件で2nd cDNA鎖合成を行う。これにより、複数のターゲット遺伝子について、増幅用共通配列(Forward(配列番号23)/Reverse(

配列番号2))を両端に持ち、細胞認識用タグ配列、分子認識用タグ配列、および遺伝子特異的配列がその中に含まれる2本鎖cDNAが合成される。また本実施例では、一例として、20種類(ATP5B, GAPDH, GUSB, HMBS, HPRT1, RPL4, RPLP1, RPS18, RPL13A, RPS20, ALDOA, B2M, EEF1G, SDHA, TBP, VIM, RPLP0, RPLP2, RPLP27, およびOAZ1)のターゲット遺伝子のポリAテールから 109 ± 8 塩基上流部分の 20 ± 5 塩基を遺伝子特異的配列として用いたが(配列番号3-22)、これは、後続のPCR増幅工程において、PCR産物サイズを約200塩基に統一するためである。PCR産物サイズを統一することで、煩雑なサイズフラクション精製の工程(電気泳動→ゲルの切り出し→PCR産物の抽出・精製)を除去することができ、一分子からの並列増幅(エマルジョンPCRなど)へ直接利用できる効果を持つ。

[0062] 第2のDNAプローブ(ATP5B遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCCTAACCCAAAAAGCTTCATT (配列番号3)

第2のDNAプローブ(GAPDH遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCACTGAATCTCCCTCCTCACA (配列番号4)

第2のDNAプローブ(GUSB遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGTTTCTGGCCTGGGTTTTG (配列番号5)

第2のDNAプローブ(HMBS遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGATGACTGCCTTGCCTCCTC (配列番号6)

第2のDNAプローブ(HPRT1遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTAGTAGTGTTTCAGTAATGTTGACT (配列番号7)

第2のDNAプローブ(RPL4遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAGAAGCCTGCTGCATAAAC (配列番号8)

第2のDNAプローブ（RPLP1遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAGTGAAGCAAAGAAAGAAGAATCC（配列番号9）

第2のDNAプローブ（RPS18遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTGTCCGAGGCCAGCACA（配列番号10）

第2のDNAプローブ（RPL13A遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTAGAAGCAGAAATAGACTGGGAA（配列番号11）

第2のDNAプローブ（RPS20遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAGATTGTTAAGCAGATTACTTCCA（配列番号12）

第2のDNAプローブ（ALDOA遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTGCCCCGCTCTTTCTTC（配列番号13）

第2のDNAプローブ（B2M遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATTCATATTTACTTCTTATACATTTGA（配列番号14）

第2のDNAプローブ（EEF1G遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAAGCCTTCAATCAGGGCAA（配列番号15）

第2のDNAプローブ（SDHA遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCAGGGAGCGTGGCACTT（配列番号16）

第2のDNAプローブ（TBP遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTCCAGTATTGCAGGACAGA（配列番号17）

第2のDNAプローブ（VIM遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAATCTTGTGCTAGAATACTT（配列番号18）

第2のDNAプローブ（RPLP0遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー）

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCGGACGAGGATATGGGATT (配列番号19)

第2のDNAプローブ (RPLP2遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATATGAGAAGAAGGAGGAGTCTG (配列番号20)

第2のDNAプローブ (RPLP27遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGGAGGCCAAGGTCAAGT (配列番号21)

第2のDNAプローブ (OAZ1遺伝子、特異解析用2nd cDNA鎖合成用プライマー)

CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGAAGTTTCTTATTTGGAGTCT (配列番号22)

[0063] 続いて、増幅用共通配列 (Forward (配列番号23) / Reverse (配列番号2)) に結合する増幅用プライマー (36および37) を用いてPCR増幅を行い、複数種の遺伝子由来のPCR産物 (38) を調製する (図4 (step4および5))。この工程において遺伝子間、ないし分子間で増幅バイアスが生じたとしても、次世代シーケンサデータ取得後に、分子認識用タグ配列を利用して増幅バイアスの補正を行うことができるため、高精度な定量データを得ることができる。

[0064] 次に第1のビーズのRNAase処理後の個別処理について記す。

反応過程を図5および6に示す。担体に固定されたDNAプローブ (50) は、5'末端方向からT7プロモーター配列 (配列番号24)、PCR増幅用共通配列 (Forward方向、配列番号23)、細胞認識用タグ配列、分子認識用タグ配列、およびポリT配列で構成される。T7プロモーター配列 (配列番号24) をDNAプローブへ導入することで、後続のIVT (In Vitro Transcription) によるcRNA (63) 増幅工程によるターゲット配列の増幅が可能となる。すなわち、T7プロモーター配列 (配列番号24) はT7RNAポリメラーゼにより認識され、その下流配列から転写 (cRNA (63) 増幅) 反応が開始される。同様にPCR増幅用共通配列を導入することで、後続のPCR増幅工程において共通プライマーとして利用することができる。また、細胞認識用タグ配列を (例えば5塩基) DNAプローブ

ブへ導入することによって、 $4^5 = 1024$ 個の単一細胞または領域を認識することが可能となることは上記と同様である。さらに、分子認識用タグ配列（例えば15塩基）をDNAプローブへ導入することにより、 $4^{15} = 1.1 \times 10^9$ 分子を認識することができるため、次世代シーケンサで得られる膨大な解読データが、どの分子由来であるかを認識することが可能となることも上記と同様である。すなわち、I V T / P C R などの増幅工程で生じた遺伝子間の増幅バイアスを修正することができるため、始めに試料中に存在していた mRNA 量を高い精度で定量することが可能となる。最も3'側に位置するポリT配列は、mRNAの3'側に付加されているポリAテールとハイブリダイズし、mRNAを捕捉するために利用される。

[0065] 次に、反応の各ステップを順に説明する。図5（step 1）に示すように mRNA（52）は上記と同様に mRNA 3' 末端のポリA配列（53）に相補的な配列である18塩基のポリT配列（51）によって捕捉する。次に1st cDNA鎖（54）を合成し、cDNAライブラリーを構築する（図5（step 1））。次に解析対象の遺伝子に対応する複数（最大数百遺伝子）のターゲット遺伝子特異的配列プライマー（60）を1st cDNA鎖（54）へアニールさせ（図5（step 2））、相補鎖伸長反応により2nd cDNA鎖（61）を合成させる（図5（step 2））。すなわちマルチプレックス条件で2nd cDNA鎖合成を行う。これにより、複数のターゲット遺伝子について、増幅用共通配列（Forward（配列番号23）/Reverse（配列番号2））を両端に持ち、細胞認識用タグ配列、分子認識用タグ配列、および遺伝子特異的配列がその中に含まれる2本鎖cDNAが合成される。また本実施例では、一例として、20種類（ATP5B, GAPDH, GUSB, HMBS, HPRT1, RPL4, RPLP1, RPS18, RPL13A, RPS20, ALDOA, B2M, EEF1G, SDHA, TBP, VIM, RPLP0, RPLP2, RPLP27, およびOAZ1）のターゲット遺伝子のポリAテールから 109 ± 8 塩基上流部分の 20 ± 5 塩基を遺伝子特異的配列として用いたが（配

列番号3-22)、これは、後続のI V Tによる増幅工程において、増幅産物サイズを約200塩基に統一するためである。PCR産物サイズを統一することで、煩雑なサイズフラクション精製の工程(電気泳動→ゲルの切り出し→PCR産物の抽出・精製)を除去することができ、一分子からの並列増幅(エマルジョンPCRなど)へ直接利用できる効果がある。

[0066] 続いて、T7 RNAポリメラーゼを細孔中に導入し、cRNA(63)を合成する(図5(step 4))。この過程によって、約1000コピー程度のcRNAが合成される。さらに、PCRのための2本鎖DNAを合成するために、増幅されたcRNAを鋳型として、PCR増幅用共通配列(Reverse(配列番号2))が付加された複数(最大数百種程度)のターゲット遺伝子特異的配列プライマー(64)をハイブリさせ(図6(step 5))、cDNA(65)を合成する(図6(step 6))。さらに、上記と同様に酵素を用いてcRNAを分解してから、Forward共通プライマ(配列番号23)を用いて2nd strandを合成することによってPCR用2本鎖DNA(66)が合成される(図6(step 7))。この増幅産物は、長さがそろっており、そのまま、PCR、次世代シーケンサにかけることができる。この工程において遺伝子間、ないし分子間で増幅バイアスが生じたとしても、次世代シーケンサデータ取得後に、分子認識用タグ配列を利用して増幅バイアスの補正を行うことができるため、高精度な定量データを得る事ができることは上記と同様である。

[0067] 共通反応部分について詳細に記す。

100個/ μ L程度の数濃度に調整された細胞溶液(リン酸バッファpH 7.5)を各チップに分注し、負圧を印加することで細胞を捕捉し、その後、細胞破碎溶液を流す。次にcDNA合成のために0.1% Tween 20を含む10mM Trisバッファ(pH=8.0) 585 μ Lと10mM dNTP 40 μ Lと5xRTバッファ(SuperScript III, Invitrogen社) 225 μ Lと0.1M DTT 40 μ LとRNaseOUT(Invitrogen社) 40 μ LとSupers

cript III (逆転写酵素, Invitrogen社) 40 μ Lを混和し、シートを満たしている溶液をアウトレットから排出し、直ちに逆転写酵素を含む上記溶液をインレットから注入した。その後、溶液と反応槽を50℃に上げて、50分間保つことによって逆転写反応を完了させ、mRNAと相補的配列を持つ1st cDNAを合成した(図3および5 (step 1))。

[0068] 次に第2のビーズ用のサンプル調製の詳細について記す。

1st cDNA鎖を合成した後、85℃にて1.5分保ち逆転写酵素を失活させ、4℃に冷却後、RNaseおよび0.1% Tween 20を含む10mM Trisバッファー(pH=8.0) 10mLをチューブに分注し反応後、ビーズを沈降させ、上澄みを捨てる。この工程で、RNAを分解する。同様に、同量のアルカリ変性剤を分注し、上澄み除去で洗浄した。続いて、滅菌水690 μ Lと10x Ex Taqバッファー(TaKaRa Bio社) 100 μ Lと2.5mM dNTP Mix 100 μ Lと各10 μ MのPCR増幅用共通配列(Reverse, 配列番号2)が付加された20種の遺伝子特異的配列プライマーMix (配列番号3-22) 100 μ LとEx Taq Hot start version (TaKaRa Bio社) 10 μ Lを混和して試薬混合液を調製したのちに、ビーズが混和したチューブを遠心でビーズを沈降させ、上澄みを除去後、調製した試薬をチューブの分注し、ビーズと混和させる。その後、98℃10秒と43℃60秒、68℃3分のサイクルを10回繰り返した後10℃に冷却して反応を完了した。

[0069] 続いて、滅菌水495 μ Lと10x High Fidelity PCRバッファー(Invitrogen) 100 μ Lと2.5mM dNTP mix 100 μ Lと50mM MgSO₄ 40 μ Lと10 μ MのPCR増幅用共通配列プライマー(Forward, 配列番号23) 100 μ Lと10 μ MのPCR増幅用共通配列プライマー(Reverse, 配列番号2) 100 μ LとPlatinum Taq Polymerase Hig

h Fidelity (Invitrogen社) 15 μ Lを混和し、チューブに分注した。その後、溶液とシートを30秒間94℃に保ち、94℃30秒間→55℃30秒間→68℃30秒間の3段階工程を40サイクル繰り返し、最後に68℃3分間保った後、4℃に冷却してPCR増幅工程を行った(図3 (step 4))。この後、この溶液中に含まれるフリーのPCR増幅用共通配列プライマー(Forward (配列番号23) / Reverse (配列番号2))や酵素などの残留試薬を除去する目的で、PCR Purification Kit (QIAGEN社)などを用いて精製する。この溶液をPCR増幅またはブリッジ増幅適用後、各社(Life Technologies (Solid/Ion Torrent)、Illumina (High Seq)、Roche 454)の次世代シーケンサに適用して解析する。

[0070] 最後に第1のビーズのサンプル調製方法の詳細を示す。

1st cDNA鎖を合成した後、85℃にて1.5分保ち逆転写酵素を失活させ、4℃に冷却後、RNaseおよび0.1% Tween 20を含む10mM Trisバッファー(pH=8.0)10mLをチューブに分注して、RNAを分解した。同様に、同量のアルカリ変性剤を分注して、ビーズを沈降させた後、上澄みを除去して残存物および分解物を洗浄した。続いて、滅菌水690 μ Lと10x Ex Taqバッファー(TaKaRa Bio社)100 μ Lと2.5mM dNTP Mix 100 μ Lと各10 μ MのPCR増幅用共通配列(Reverse, 配列番号2)が付加された20種の遺伝子特異的配列プライマーMix (配列番号3-22) 100 μ LとEx Taq Hot start version (TaKaRa Bio社) 10 μ Lを混和し、チューブに注入した。その後、溶液とシートを95℃3分間→44℃2分間→72℃6分間の反応を行い、1st cDNA鎖を鋳型としてプライマーの遺伝子特異的配列をアニールさせた後(図5 (step 2))、相補鎖伸長反応を行い、2nd cDNA鎖を合成させた。

[0071] 続いて、0.1% Tween 20を含む10mM Trisバッファー（pH=8.0）10mLをチューブに分注して、ビーズを沈降させた後、上澄みを除去して、残存物および分解物を洗浄した。さらに、滅菌水340μLとAmpliscribe 10X Reactionバッファー（EPICENTRE社）100μLと100mM dATP 90μLと100mM dCTP 90μLと100mM dGTP 90μLと100mM dUTP 90μLと100mM DTT、およびAmpliscribe T7 Enzyme Solution（EPICENTRE社）100μLを混和し試薬を調製した。次に、上澄みを除去後、チューブに、調製した試薬を分注して、温度を37℃に上げて、180分間保つことによって転写反応を完了させ、cRNA増幅を行った。これにより、20種のターゲット遺伝子の目的部分が増幅されるが、いずれもcRNA増幅産物サイズは200±8塩基とほぼ均一である。ビーズ溶液の上澄みにcRNA増幅産物が含まれるのでこの溶液を回収する。この溶液中に含まれる酵素などの残留試薬を除去する目的で、PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて精製し、50μLの滅菌水に懸濁する。この溶液に、10mM dNTP mix 10μLと50ng/μLのランダムプライマー30μLを混和させ、94℃10秒加熱後0.2℃/秒で温度を30℃まで低下させ、30℃で5分間加熱し、さらに4℃まで低下させる。その後、5xRTバッファー（Invitrogen社）20μLと、0.1M DTT 5μLと、RNase OUT 5μLと、SuperScript III 15μLを混和させ、30℃で5分間加熱し、0.2℃/秒で温度を40℃まで上昇させる。この溶液中に含まれる酵素などの残留試薬を除去する目的で、PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて精製し、PCR増幅に適用後、各社（Life Technologies、Illumina、Roche）の次世代シーケンサ（NGS）に適用して解析する。

[0072] 配列解析の結果、第1のビーズ上に捕捉したmRNAからと第2のビーズ

上に捕捉した mRNA からの共通配列以外の配列を含むデータが多数得られる。得られたデータを細胞認識用タグ配列ごと（サンプルを識別するためのその他のタグ配列が存在する場合はそれらの配列も含めて配列ごと）にデータを並べなおすことによって、細胞認識用タグが同じ配列データは（前記追加タグが含まれる場合はそのタグの配列でも区別して）、同じ細胞中の遺伝子発現を示すデータとしてデータを解析することができる。すなわち、同じ細胞に対応する mRNA については、同じ細胞認識用タグ配列を有しているため、異なるビーズ種からサンプル調製されても、同じ細胞由来の mRNA であることを識別することができる（図 2）。

実施例 2

[0073] 本実施例では、同時に処理する細胞数を増やすために、実施例 1 に記載したようなチップを複数組み合わせたフローセルデバイスについて記す。図 7（a）に上面図を示し、図 7（b）に断面図を示した。フローセルデバイス 701 には複数の反応室（702）を備えており、その反応室（702）には 1 つのチップ（715）を配置している。このチップ上には、細胞捕捉孔が複数設けられており、その直下には異なる細胞認識用タグ配列を有する DNA プローブが固定された 2 種類のビーズが充填されている。このビーズ上で、配列解析用の mRNA と遺伝子発現解析用の mRNA を同時に捕捉し、cDNA を合成する。核酸捕捉孔と細胞認識用タグ配列は一対一で対応させて配置している。

[0074] また、フローセルデバイス上の共通流路（705）中を細胞（706）は共通インレット（707）から共通アウトレット（708）に向かって流す。このときチップ 715 上の細胞捕捉孔の直下に充填された 2 種類のビーズ（第 1 のセファロースビーズと第 2 の磁性ビーズ）領域で細胞中の核酸を孔ごとに個別に捕捉する。共通吸引アウトレット（710）を通して印加される負圧によって、共通流路（705）中の溶液は、共通吸引流路（709）に向かって細胞捕捉孔およびビーズが充填された反応領域をとって流れる。この流れによって、細胞中の mRNA はビーズ上に捕捉され、さらに、こ

のビーズ上で cDNA 合成反応が起きる。

[0075] cDNA 合成以降の反応は、チップをフローセルデバイスから取り出し、2種類のビーズをチューブ（容器）中に回収する。チップを取り出すために、フローセルデバイスはデバイス分離境界（720）を境に上下（図7（b）において上下）の部品が組み合わされており、この境界を境に上下の部品のネジ止めをはずして、分離することで、チップを回収する。チップを取り出した後は、実施例1と同様に2種類のビーズをチューブ中で分離し、それぞれ、異なる反応プロセスを実行することで、2種類のサンプルを調製し、次世代シーケンサにて配列解析を実施する。

[0076] データの解析方法も実施例1と同様であるが、チップ毎に異なる配列をPCRプライマーに挿入することによって、配列解析のデータからチップ毎、さらには細胞捕捉孔ごとの遺伝子解析データを取得することが可能となる。

実施例 3

[0077] 本実施例では、単一細胞中の遺伝子発現解析と質量分析によるタンパク質解析の同時解析の例を示す。

[0078] 図8に本実施例でのサンプル調製用チップの構成図を示す。基板（801）はシリコン基板で作製されており（ガラスや窒化シリコン、アルミや銅などの他の無機材料を用いても良い）、この上に細胞捕捉用の貫通孔（803）を2次元格子状に配列している。実施例1と同様にビーズ保持フィルタとしてのメンブレン（807）側に負圧を印加することで、細胞（804）が細胞捕捉孔（803）に捕捉される。捕捉された細胞の直下に反応槽（802）を設け、この領域で解析対象となる複数種類の生体分子を捕捉することは実施例1と同様である。本実施例では、第1の計測対象生体分子であるタンパク質を特異的に捕捉する抗体（805）を基板（801）の反応槽内壁に直接固定する。さらに、第2の計測対象生体分子であるmRNAを捕捉するためのDNAプローブが固定されたビーズ（806）を反応槽に充填する。

[0079] 第2の生体分子であるmRNAを捕捉するための第2のビーズは、実施例

1と同様に第2のビーズを用いている。ビーズ上の固定プローブも実施例1の図3に対応する記載と同じである。ビーズは、磁性ビーズを用いて、細胞認識用タグ配列を付加したポリTプローブを固定している。遺伝子発現解析以外の解析をするために、ゲノム中の特定の領域やマイクロRNAを解析するために、これらの配列に特異的配列をポリT配列の代わりに用いてもよい。また、すべての核酸配列解析を行うために6ベース程度のランダムプローブをポリT配列の代わりに用いても良い。

[0080] 一方、第1の生体分子（タンパク質等）は、反応槽（802）内の基板表面に固定された抗体によって捕捉される。

[0081] 実施例1と同様に、細胞懸濁液を基板（801）上に滴下後に、ビーズ保持用の多孔質メンブレン（807）側に負圧を印加することで、細胞捕捉孔を貫通する溶液流が生じ、細胞（804）が細胞捕捉孔（803）に捕捉される。

[0082] 捕捉後、適切な塩濃度（0.1～1M程度）の洗浄液をチップ表面に滴下して、負圧を印加することで、反応槽（802）に洗浄液を流し、計測対象となる生体分子以外の分子を洗い流す。その後、メンブレン（807）を取り除いて、ビーズと基板を分離する（図8の（b）と（c））。ビーズはチューブ（808）に回収して、実施例1の第2のビーズと同様にサンプル処理を行い、次世代シーケンサ（NGS）にて遺伝子配列解析を実施する。細胞認識用タグ配列が反応槽ごとに異なるため、細胞毎に分離して遺伝子発現解析を実行可能である。

[0083] 一方、基板（801）上の抗体によって捕捉した第1の生体分子は、反応槽ごとに個別にレーザーによってイオン化を行い、質量分析装置にて分析を行う。すなわち、タンパク質が捕捉された基板（801）は位置情報を保持した質量分析（MALDI-TOF-MS解析）を行う。なお、ここでは、反応槽の内壁には抗体を固定してタンパク質を捕捉したが、計測対象となる分子によって固定する分子を変更しても良いことはいうまでもない。計測対象分子の選択性は低下するが、表面を疎水的にしたり、親水的にするなど、計

測対象にあった表面処理を行うだけでも良い。

[0084] この中には、内壁にペプチドを固定することや、糖鎖オリゴマーを固定すること、ポリエチレングリコールやリン脂質分子やその類似分子を固定することなども含む。

[0085] 本実施例のサンプル処理フローは図9にまとめた。

次に単一細胞レベルでのMALDI-TOF-MS解析の具体的な方法について記す。計測対象分子が高分子であるため、マトリックス剤として5 mg/mLのシナピン酸エタノール溶液を用いた。基板(801)をメンブレン(807)が密着していた面を上にして設置し、シナピン酸溶液を滴下する。マトリックス剤滴下済みのチップに反応槽個別的に窒素レーザー(343 nm)照射するとともに、TOF-MS装置のサンプル吸引口をチップに近づけて、質量分析を行う。レーザー励起位置ごとに異なる質量分析を行う(マスイメージング)装置も市販されているのでこのような装置を用いても良い。

[0086] 得られたチップ上の位置ごとの質量分析データと細胞認識用タグを利用して、同じ位置からの遺伝子発現データを対応付けることで、同じ細胞からのタンパク質とmRNAの2種類の生体分子の解析を並行して実行することができる。

実施例 4

[0087] 本実施例では、本発明のデバイスの一実施形態について説明する。単一細胞からの2種類以上の生体分子の解析において、一方の生体分子が他方より大幅に微量である場合、微量な生体分子を捕捉するための固体担体とは異なる固体担体にその微量な生体分子が捕捉されてしまうことが問題となる。この問題を緩和するために、固体担体(本実施例ではビーズ)の充填形態を変更することが有効である。

[0088] 図10に、本実施例に対応するチップ上の反応槽へのビーズ充填形態の図を示す。本実施例では微量のmRNAを捕捉する第1のビーズ(5)が反応槽(2)の中で、貫通孔(3)に近い方に充填されており、それほど微量で

ない mRNA を捕捉する第 2 のビーズ (6) は反応槽 (2) 中の貫通孔から離れた位置に充填するようにした。これによって、第 1 のビーズに、第 1 の生体分子が優先的に捕捉され、微量な mRNA を効率的に捕捉することが可能となる。

[0089] 本実施例では、第 1 のビーズの直径は $1\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ上に (ストレプトアビジンとビオチンを介して) DNA プローブを固定したビーズを用いている (固定した DNA プローブの配列は実施例 1 の場合と同じである)。そのため、ビーズの大きさによる分離ができないため、第 2 のビーズを磁石 1001 によってチューブの底に集め、上澄みと沈殿物に分離する。このとき、沈殿物の方に第 2 のビーズが回収されるため、この溶液を再懸濁することで、第 2 のビーズ溶液を得るとともに、上澄みの方は磁石による第 2 のビーズの沈降を再度実施して、分離することによって、上澄み中の第 1 のビーズの純度を順次上げていく。沈殿した第 2 のビーズ溶液は混合し、ビーズを磁石を使って沈殿することで、溶液のボリュームをコントロールする。この工程を繰り返すことで、第 1 と第 2 のビーズの分離を実施する。この工程以降の工程は実施例 1 と全く同様である。

実施例 5

[0090] 上記実施例では、同時に 2 種類の生体分子を捕捉する実施例のみを記載してきたが、磁性の有無と大きさの異なるビーズを用いて 3 種類の生体分子を単一の細胞から採取し、分離することも可能である。すなわち、第 1 のビーズはセファロースビーズ (直径が $34\ \mu\text{m}$) として、配列解析のための mRNA を捕捉し、第 2 のビーズは磁性ビーズ (直径 $1\ \mu\text{m}$) として、遺伝子発現解析のための mRNA を捕捉し、第 3 のビーズは直径 $1\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ (非磁性で大きさが小さい) として、遺伝子発現解析のためのマイクロ RNA を捕捉する (ビーズにはマイクロ RNA 捕捉用の特異的プローブを固定する)。分離方法は、例えば実施例 1 と同様の方法を使用することができる。

実施例 6

[0091] 本実施例では、基板上の細胞捕捉孔に細胞を捕捉するのではなく、オイル中の液滴に細胞を閉じ込めることによって、同一細胞からの２種類以上の生体分子の解析を行う方法の例を示す。

[0092] チップにおいて液滴に細胞と固体担体としてのビーズを閉じ込め、ビーズ上に細胞由来の２種類以上の生体分子を捕捉するためのデバイスの構造図を図１１に示す。チップ（１１０１）はガラスや樹脂等で成型されており、図１１の（ａ）が上面図、（ｂ）が断面図である。流路（１１０２）の断面のサイズは縦横ともに数 μm ～数百 μm が適当である（この流路サイズが液滴サイズをおおよそ決定する。）が、ここでは縦３０ μm 、横６０ μm とした。この流路（１１０２）にミネラルオイル（オイルでもよい）を適当な流速（数 $\mu\text{m}/\text{秒}$ ～数 $\text{cm}/\text{秒}$ ）で矢印（１１０３）の方向に流す。同時に細胞溶解液（本実施例では１％ＳＤＳと５００ mM の NaCl 、１０ mM の EDTA を含む１００ mM $\text{Tris}:\text{HCl}$ $\text{pH}7.5$ バッファを用いた）に第１のビーズ（実施例と同じセファロースビーズ）を懸濁させて、矢印（１１０４）の方向に、所望の液滴間隔が得られる速度で流路１１０２の方に向かって導入する。さらに、第２のビーズを懸濁した細胞溶解液を第１のビーズと同じ速度で矢印１１０５の方向に流す。同時に、細胞を懸濁したリン酸緩衝生理食塩水を前記ビーズ懸濁液と同じ速度で矢印１１０６の方向に導入する。これによって、細胞溶解液を含む液滴に細胞と第１および第２のビーズがそれぞれ１個含まれる状態の液滴（１１０７）を生成することができる。得られた液滴（１１０７）は解析に必要な数だけ生成し、細胞認識用タグ配列は液滴ごとに異なるとともに、同じ液滴の中では同じ配列になるようにする。あるいは、細胞認識用タグ配列は、液滴ごとに異なるように、同じ液滴の中では同じ順序の配列を使用する。液滴へのこのようなタグ配列の配置は、異なる細胞認識用タグ配列を有するビーズの導入順序を制御することによって実現する。

[0093] 得られた多数の液滴を数分から数十分程度インキュベートして mRNA のビーズ上への捕捉を確実に行ったあと、エマルジョンを壊して水溶液とオイ

ルを分離するために塩または界面活性剤をエマルジョンに添加する。回収されたビーズ溶液は、実施例 1 と同様に 2 種類のビーズごとに分離し、その後の反応工程を実施する。これも実施例 1 と同じである。

[0094] 細胞ごとの 2 種類の mRNA の配列は、遺伝子発現解析において細胞認識用タグ配列の配列またはその順序によって対応付ける。

符号の説明

- [0095] 1 基板
2 反応槽
3 細胞捕捉孔
4 細胞
5 第 1 の固体担体（ビーズ）
6 第 2 の固体担体（ビーズ）
7 メンブレン
8 分離用チューブ
9 分離フィルタ
31 DNA プローブ
32 mRNA
33 1st cDNA 鎖
34 プライマー
35 2nd cDNA 鎖
36 および 37 増幅用プライマー
38 PCR 産物
301 ポリ T 配列
302 細胞認識用タグ配列
303 PCR 増幅用共通配列（Forward）
309 PCR 増幅用共通配列（Reverse）
311 ターゲット遺伝子特異的配列
50 DNA プローブ

- 5 1 ポリ T 配列
- 5 2 m R N A
- 5 3 ポリ A 配列
- 5 4 1 s t c D N A 鎖
- 6 0 ターゲット遺伝子特異的配列プライマー
- 6 1 2 n d c D N A 鎖
- 6 3 c R N A
- 6 4 ターゲット遺伝子特異的配列プライマー
- 6 5 c D N A
- 6 6 P C R 用 2 本鎖 D N A
- 7 0 1 フローセルデバイス
- 7 0 2 反応室
- 7 0 5 共通流路
- 7 0 6 細胞
- 7 0 7 共通インレット
- 7 0 8 共通アウトレット
- 7 0 9 共通吸引流路
- 7 1 0 共通吸引アウトレット
- 7 1 5 チップ
- 7 2 0 デバイス分離境界
- 8 0 1 基板
- 8 0 2 反応槽
- 8 0 3 細胞捕捉孔
- 8 0 4 細胞
- 8 0 5 抗体
- 8 0 6 ビーズ
- 8 0 7 メンブレン
- 8 0 8 チューブ

- 1 0 0 1 磁石
- 1 1 0 1 チップ
- 1 1 0 2 流路
- 1 1 0 3 ミネラルオイルが流れる方向
- 1 1 0 4 第1のビーズの懸濁液を導入する方向
- 1 1 0 5 第2のビーズの懸濁液を導入する方向
- 1 1 0 6 細胞懸濁液を導入する方向
- 1 1 0 7 液滴

請求の範囲

- [請求項1] 細胞を分離する手段と、
前記分離手段の近傍または前記分離手段内に配置された反応場とを備えた単一細胞解析デバイスであって、
前記反応場は、捕捉された細胞から抽出される第1の生体分子を捕捉する第1の担体と、第1の生体分子とは異なる第2の生体分子を捕捉する第2の担体とが存在する領域を有し、
第1の担体および第2の担体の一方または両方は、捕捉された細胞の識別用タグ配列を備え、
第1の担体および第2の担体は、互いに分離し得る異なる物理的特性を有している
ことを特徴とする単一細胞解析デバイス。
- [請求項2] 前記分離手段および前記反応場が、平面状に配置した複数の細胞捕捉用の孔を設けた基板と、前記孔の直下に配置された反応槽である、請求項1に記載の単一細胞解析デバイス。
- [請求項3] 前記分離手段および前記反応場が、非極性溶媒が流れる流路と、前記非極性溶媒中に形成された、単一細胞を含む液滴である、請求項1に記載の単一細胞解析デバイス。
- [請求項4] 前記反応場が3種以上の生体分子をそれぞれ捕捉するための担体を含む、請求項1に記載の単一細胞解析デバイス。
- [請求項5] 第1の担体および第2の担体は、大きさ、重量、比重、磁性および形状からなる群より選択される少なくとも1つの物理的特性が異なる、請求項1に記載の単一細胞解析デバイス。
- [請求項6] 第1の担体および第2の担体の少なくとも一方が磁性ビーズである、請求項1に記載の単一細胞解析デバイス。
- [請求項7] 第1の生体分子および第2の生体分子がいずれもmRNAである、請求項1に記載の単一細胞解析デバイス。
- [請求項8] 第1の生体分子および第2の生体分子の一方がmRNAであり、他

方がタンパク質である、請求項 1 に記載の単一細胞解析デバイス。

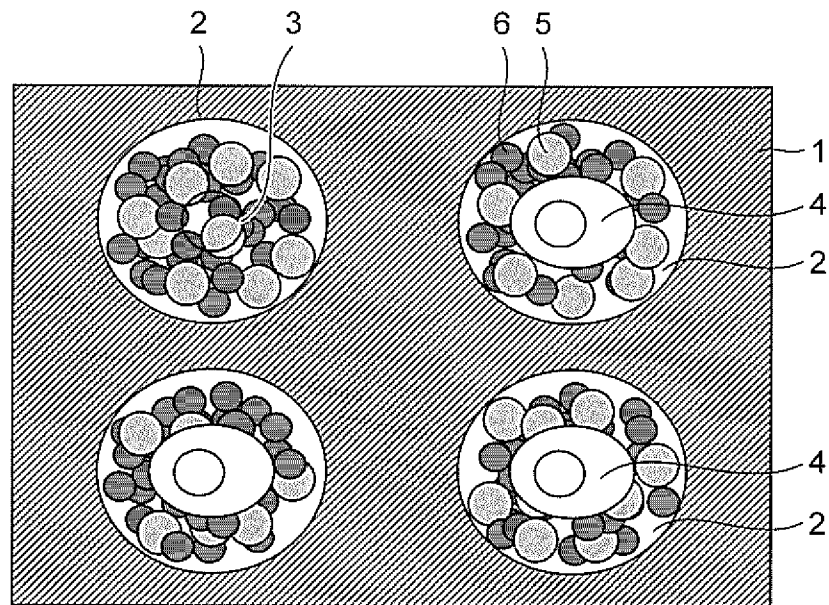
[請求項9] 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の単一細胞解析デバイスにおいて、分離手段により細胞を捕捉し、捕捉された細胞から抽出された第 1 の生体分子および第 2 の生体分子を反応場においてそれぞれ第 1 の担体および第 2 の担体に捕捉し、第 1 の担体および第 2 の担体を物理的特性の違いに基づいて分離することにより第 1 の生体分子および第 2 の生体分子を個別にサンプル処理することを含む、単一細胞解析方法。

[請求項10] 細胞識別用タグ配列を利用して、処理されたサンプルがどの細胞または位置に由来するかを解析することを含む、請求項 9 に記載の単一細胞解析方法。

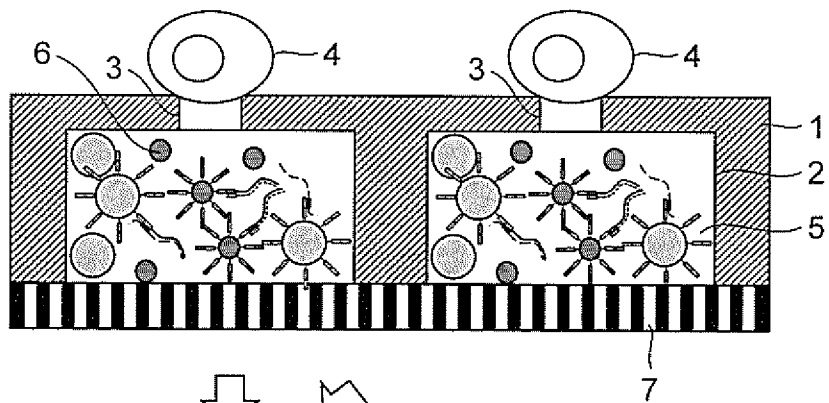
[図1]

図 1

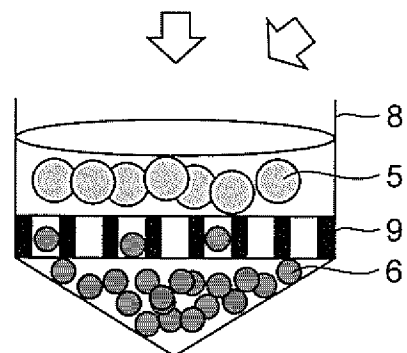
(a)



(b)

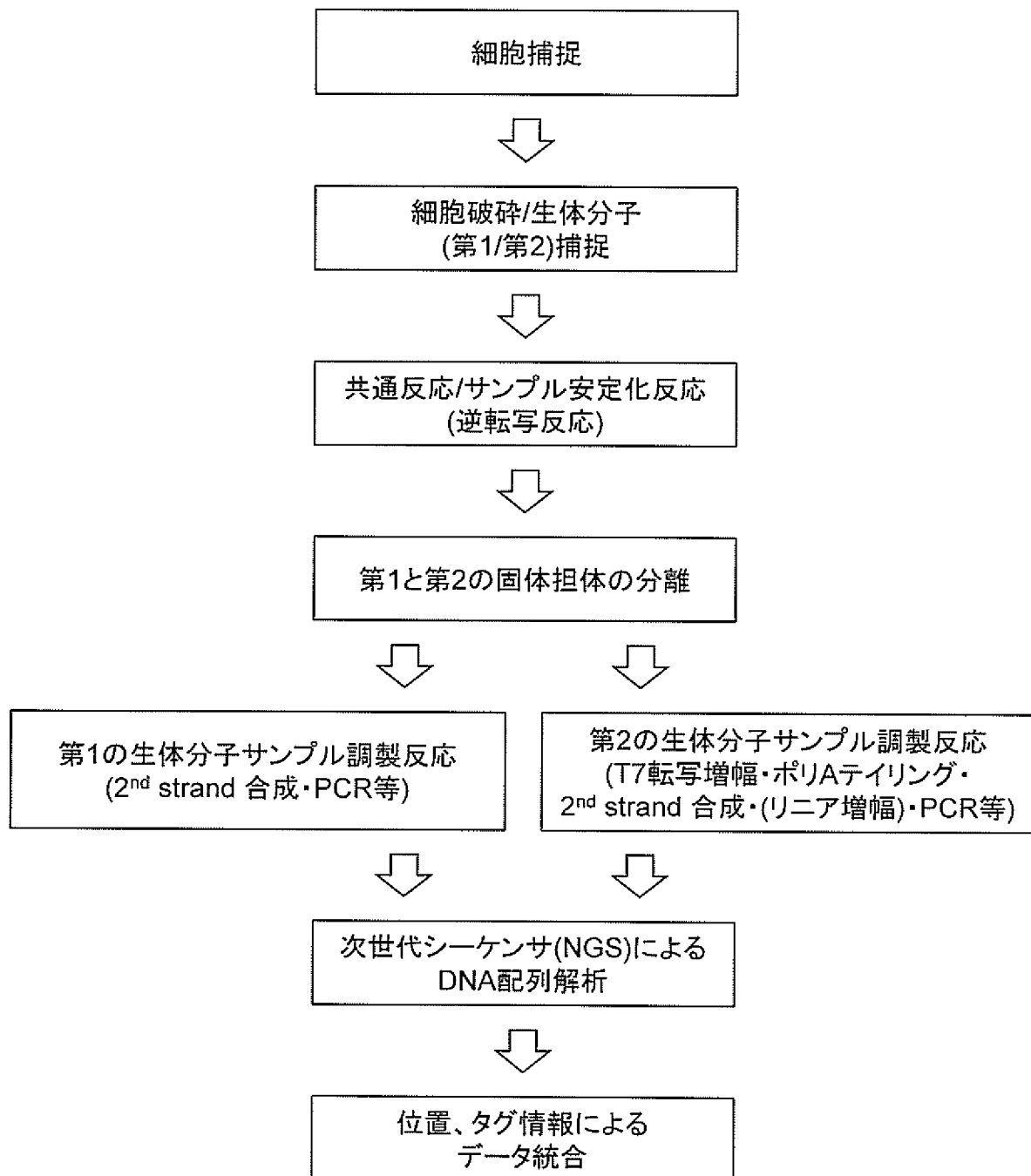


(c)



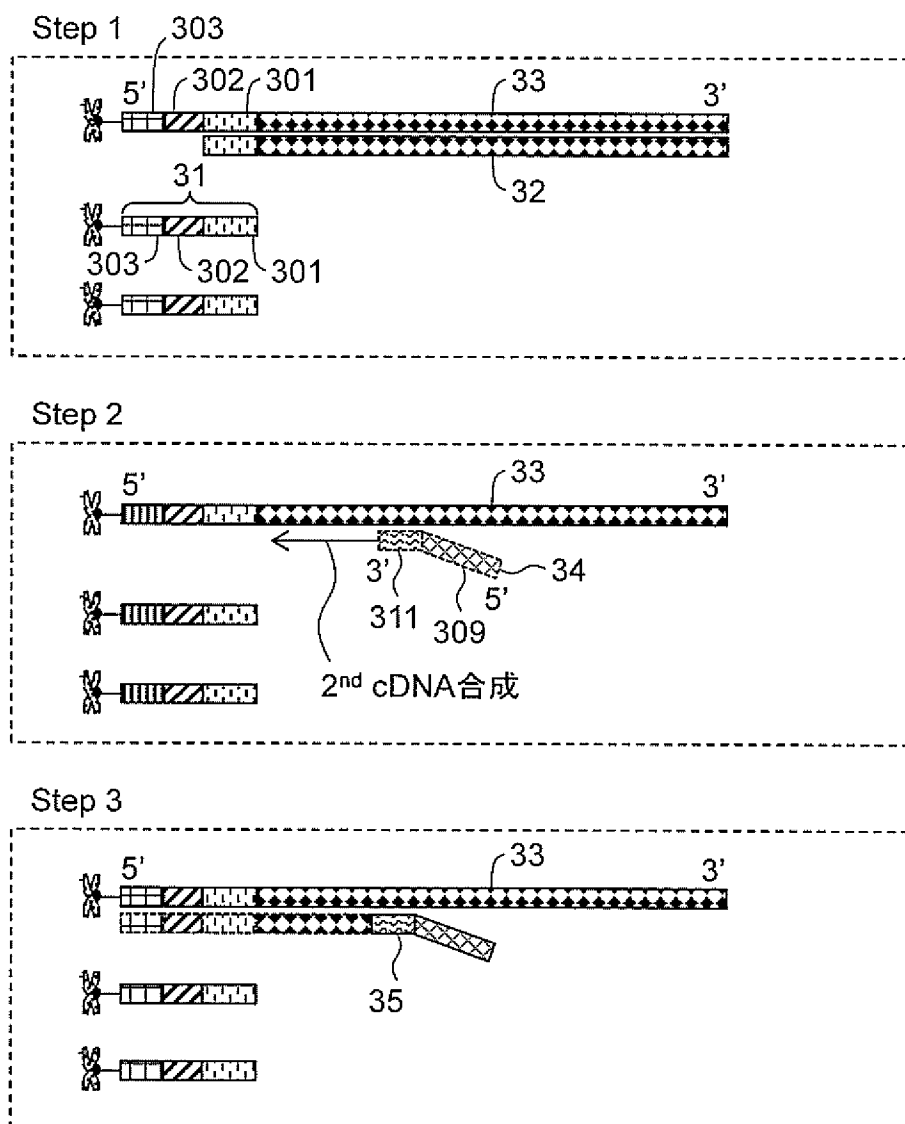
[図2]

図 2



[図3]

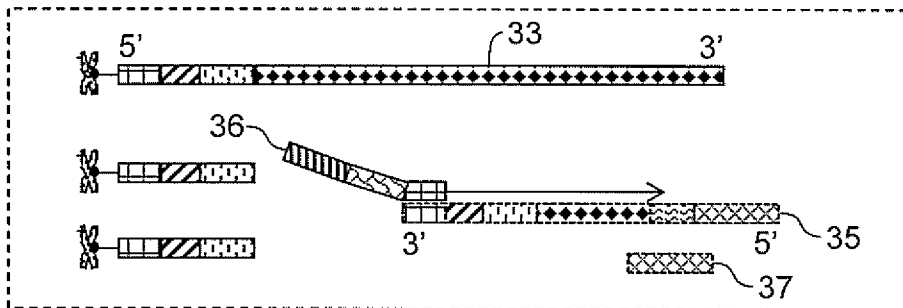
図 3



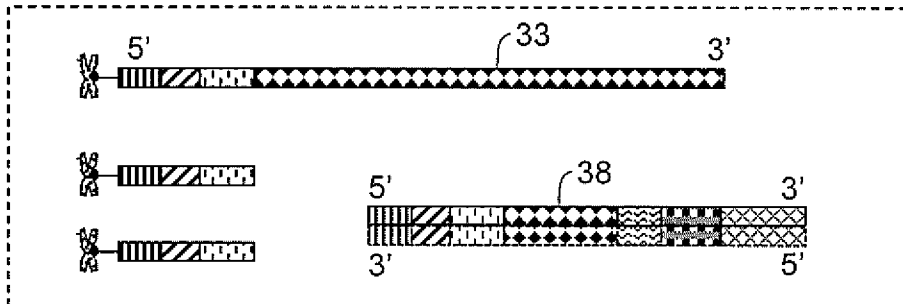
[図4]

図 4

Step 4

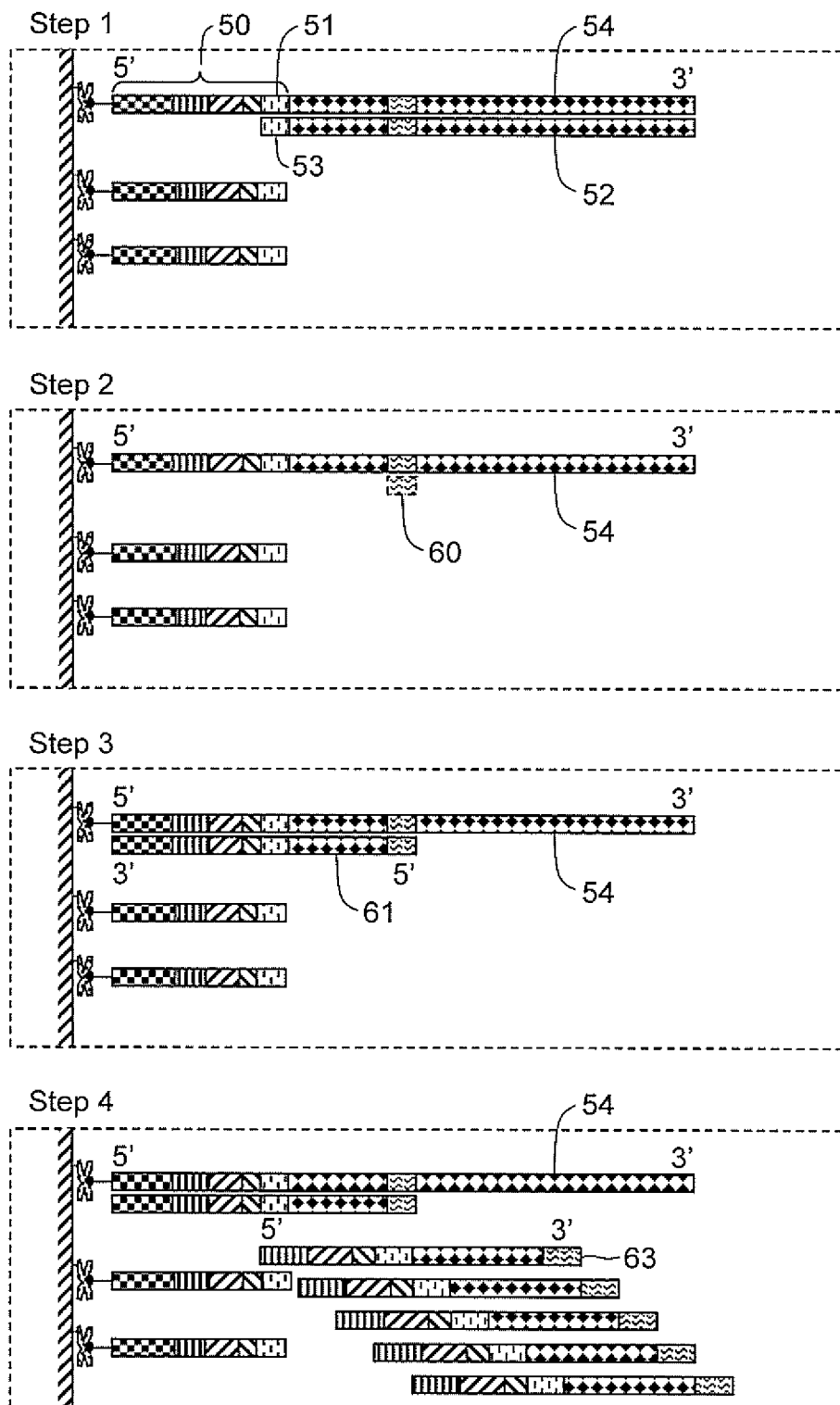


Step 5



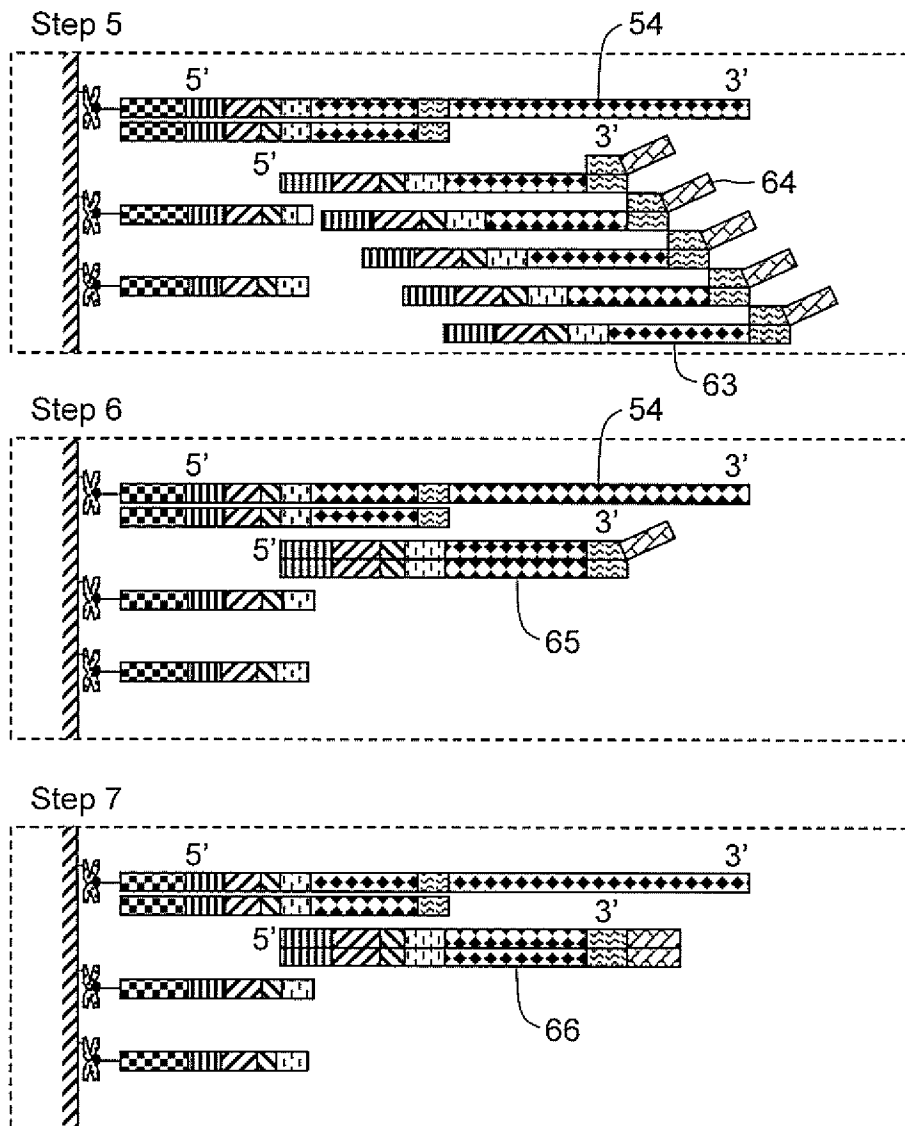
[図5]

図 5



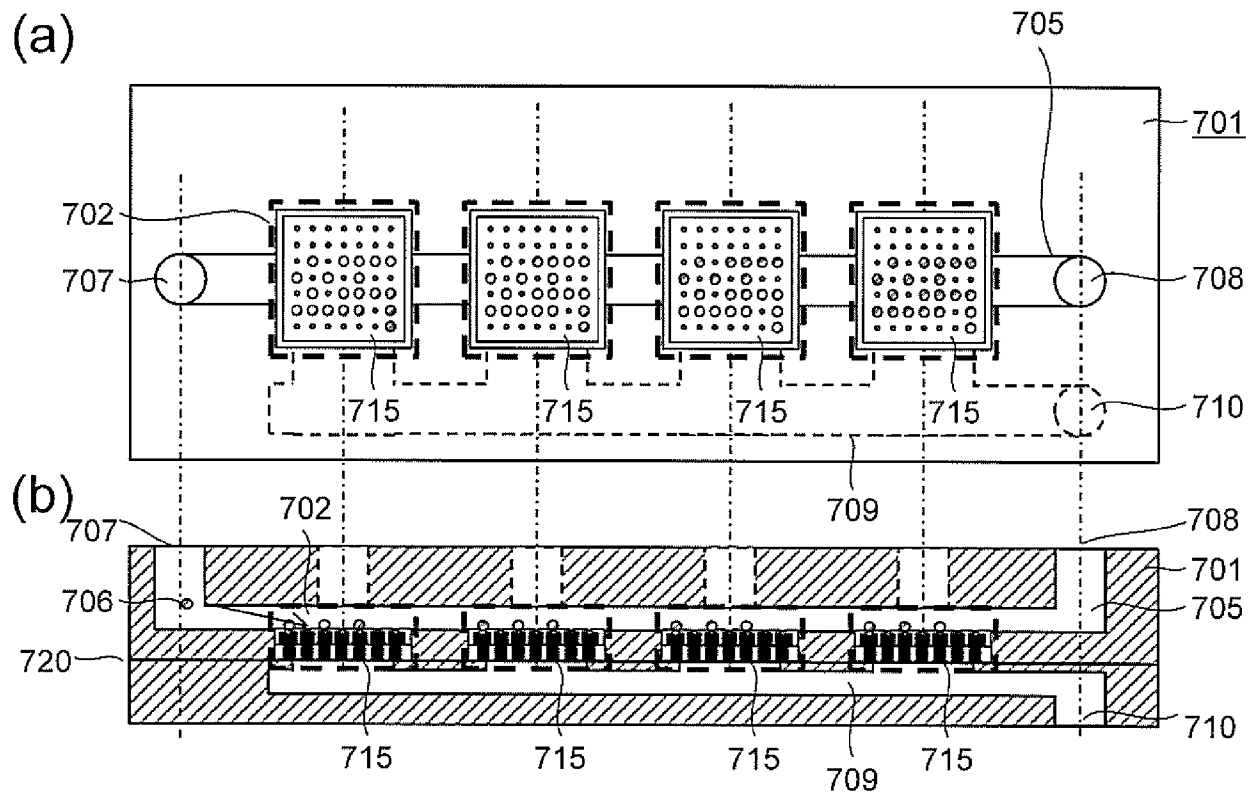
[図6]

図 6



[図7]

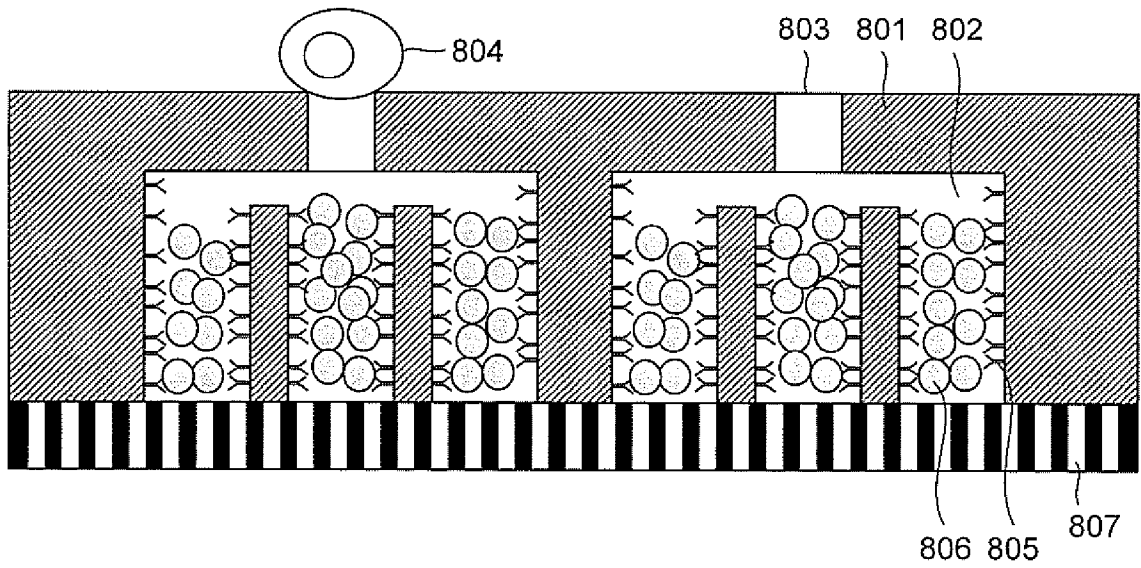
図 7



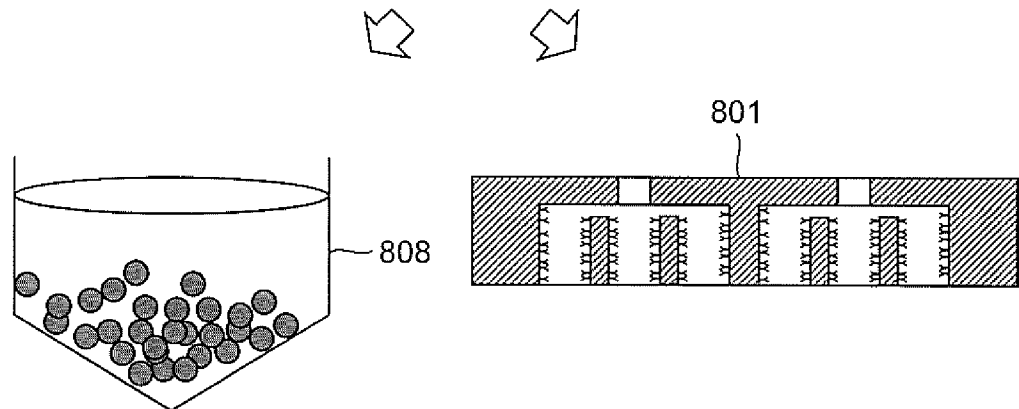
[図8]

図 8

(a)

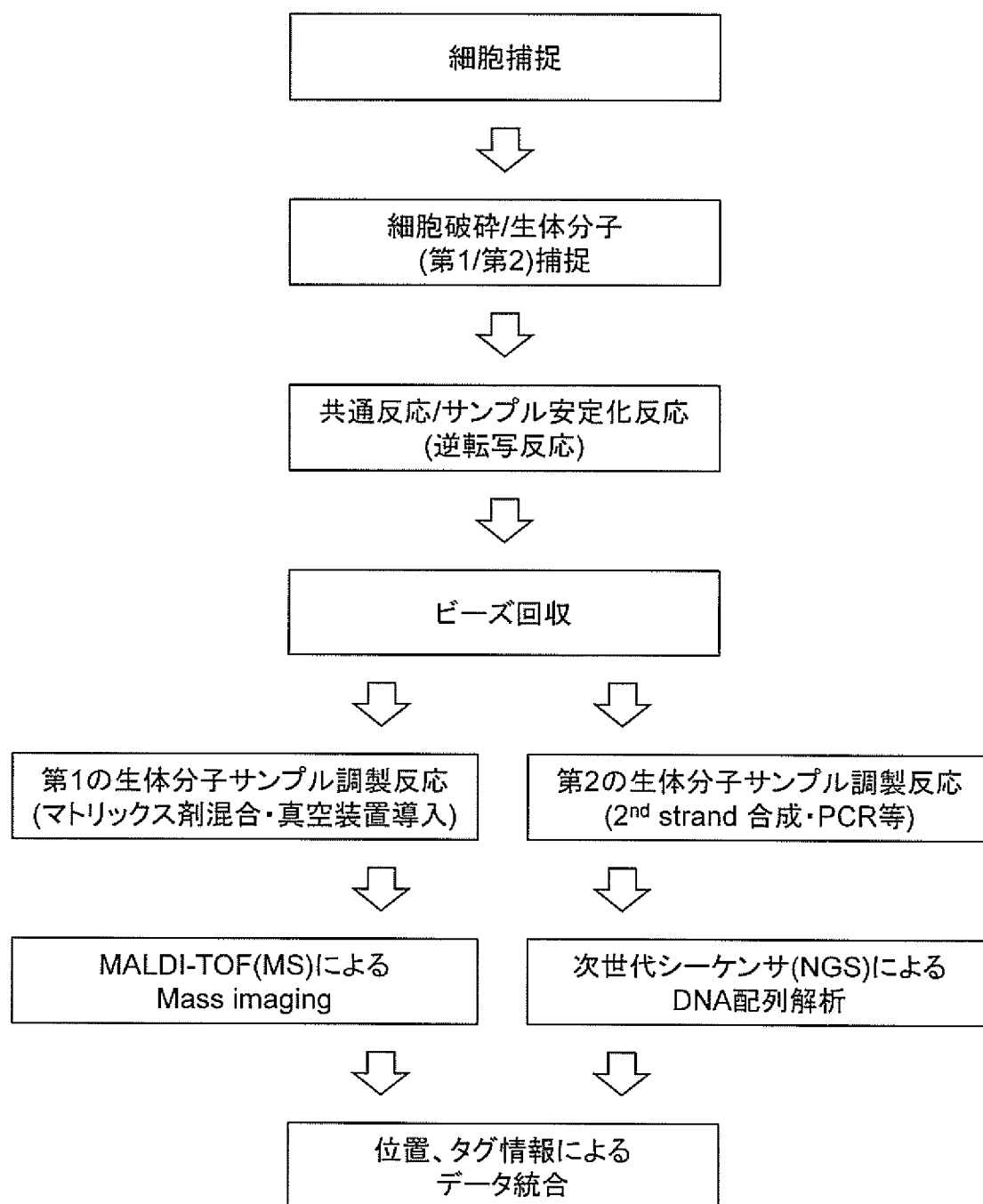


(b)



[図9]

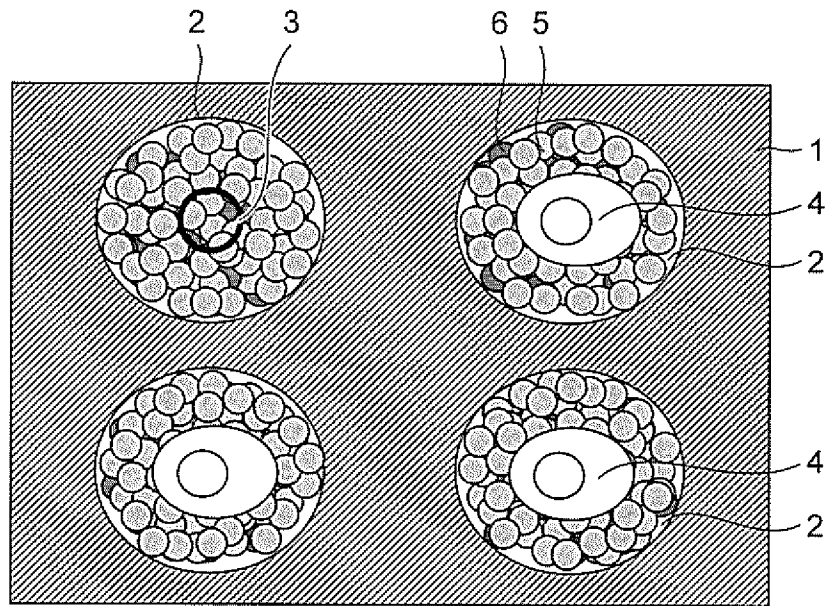
図 9



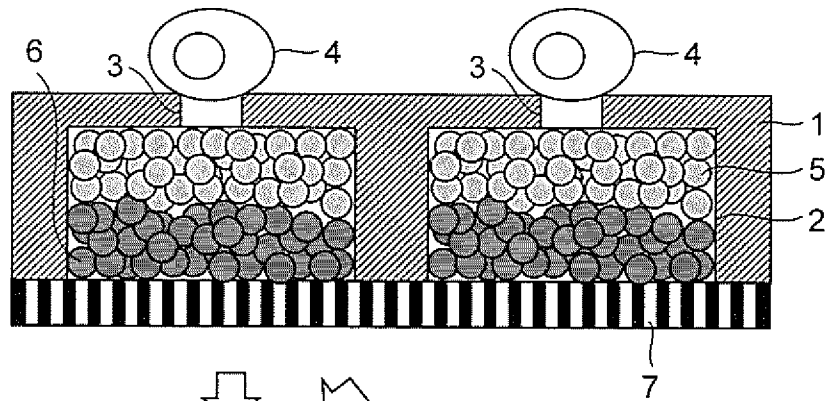
[図10]

図 10

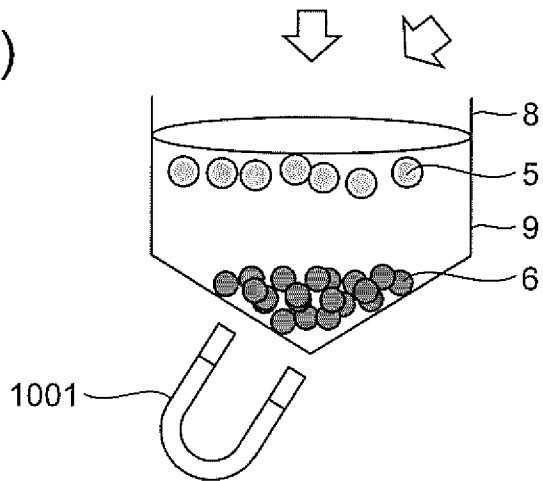
(a)



(b)



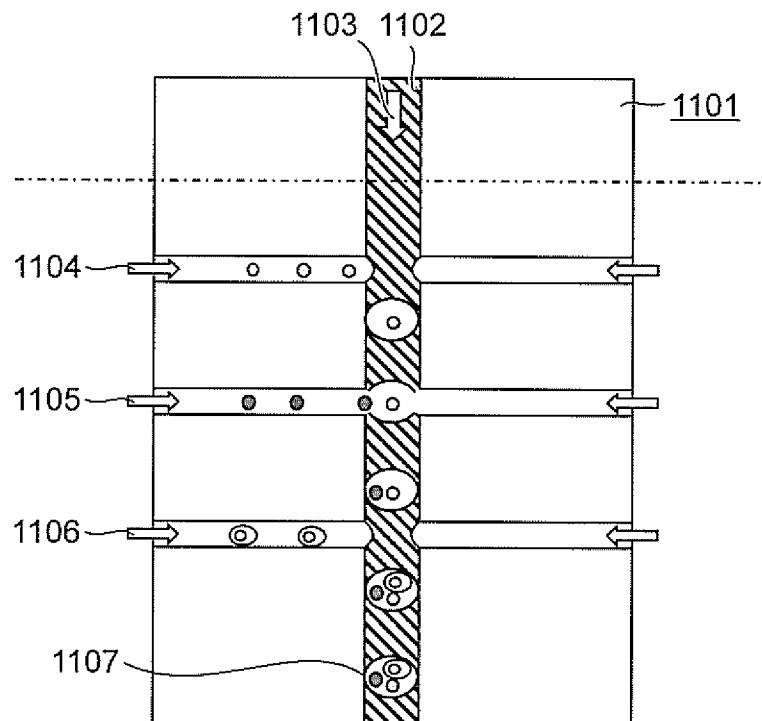
(c)



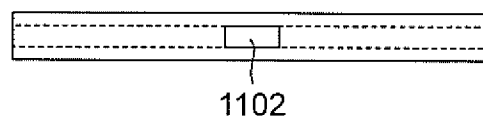
[図11]

図 1 1

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/001512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(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)

C12M3/00, C12Q1/68, G01N33/50

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/WPIDS/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2014/020657 A1 (Hitachi, Ltd.), 06 February 2014 (06.02.2014), examples 3, 4; claims 1 to 7; fig. 2, 6, 8, 10; paragraphs [0011], [0021], [0023], [0032], [0049], [0056] & US 2015/0167063 A1 examples 3, 4; claims 1 to 7; fig. 2, 6, 8, 10; paragraphs [0012], [0038], [0040], [0049], [0066], [0080] & EP 2881465 A1 & CN 104508128 A	1, 2, 4-10 3
Y A	WO 2016/038670 A1 (Hitachi, Ltd.), 17 March 2016 (17.03.2016), paragraphs [0001], [0006] to [0007], [0027] to [0039], [0051]; particularly, paragraphs [0033], [0038] (Family: none)	1, 2, 4-10 3

☒ 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
06 April 2017 (06.04.17)

Date of mailing of the international search report
18 April 2017 (18.04.17)

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/JP2017/001512

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-342258 A (Hitachi, Ltd.), 12 December 2000 (12.12.2000), claims 1, 4, 6, 9; paragraph [0009] & US 2001/0018412 A1 & EP 1061136 A2 claims 1, 4, 6, 9; paragraph [0020]	1-10
Y	JP 2009-284834 A (Hitachi, Ltd.), 10 December 2009 (10.12.2009), claims 1 to 4 (Family: none)	1-10
Y A	US 2015/0376609 A1 (10X Genomics, Inc.), 31 December 2015 (31.12.2015), summary; claims; paragraphs [0058], [0083] to [0084], [0088]; fig. 2, 8 & WO 2015/200893 A2	1, 3, 9, 10 2, 4-8
Y A	WO 2016/162997 A1 (Hitachi, Ltd.), 13 October 2016 (13.10.2016), claim 1; example 4; paragraph [0106]; page 41, lines 13 to 15; fig. 9, 10(c) (Family: none)	1, 2, 4-7, 9, 10 3, 8
A	WO 2014/141386 A1 (Hitachi, Ltd.), 18 September 2014 (18.09.2014), claims 1, 2, 5; fig. 1, 3 & US 2016/0010078 A1 claims 1, 2, 5; fig. 1, 3 & EP 2975123 A1	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(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. C12M3/00, C12Q1/68, G01N33/50

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/WPIDS/BIOSIS (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
Y A	W0 2014/020657 A1 (株式会社日立製作所) 2014.02.06, 実施例3、実施例4、請求項1-7、図2、図6、図8、図10、 [0011]、[0021]、[0023]、[0032]、[0049]、[0056] & US 2015/0167063 A1, 実施例3、実施例4、請求項1-7、図2、 図6、図8、図10、[0012]、[0038]、[0040]、[0049]、[0066]、 [0080] & EP 2881465 A1 & CN 104508128 A	1, 2, 4-10 3

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

06.04.2017

国際調査報告の発送日

18.04.2017

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)

吉田 知美

4 B

3335

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
Y A	WO 2016/038670 A1 (株式会社日立製作所) 2016.03.17, [0001]、[0006]-[0007]、[0027]-[0039]、[0051]、 特に、[0033]、[0038] (ファミリーなし)	1, 2, 4-10 3
Y	JP 2000-342258 A (株式会社日立製作所) 2000.12.12, 請求項 1、4、6、9、[0009] & US 2001/0018412 A1 & EP 1061136 A2, 請求項 1、4、6、9、[0020]	1-10
Y	JP 2009-284834 A (株式会社日立製作所) 2009.12.10, 請求項 1-4 (ファミリーなし)	1-10
Y A	US 2015/0376609 A1 (10X Genomics, Inc.) 2015.12.31, 要旨、請求の範囲、[0058]、[0083]-[0084]、[0088]、図 2、図 8 & WO 2015/200893 A2	1, 3, 9, 10 2, 4-8
Y A	WO 2016/162997 A1 (株式会社日立製作所) 2016.10.13, 請求項 1、実施例 4、[0106]、41 頁 13-15 行、図 9、図 10 (c) (ファミリーなし)	1, 2, 4-7, 9, 10 3, 8
A	WO 2014/141386 A1 (株式会社日立製作所) 2014.09.18, 請求項 1、2、5、図 1、図 3 & US 2016/0010078 A1, 請求項 1、2、5、図 1、図 3 & EP 2975123 A1	1-10