

(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
2016年8月11日(11.08.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/125251 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/052965
- (22) 国際出願日: 2015年2月3日(03.02.2015)
- (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: 株式会社日立製作所(HITACHI, LTD.)
[JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目
6番6号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 白井 正敬(SHIRAI Masataka); 〒1008280
東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会
社日立製作所内 Tokyo (JP). 坂井 友幸(SAKAI
Tomoyuki); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁
目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

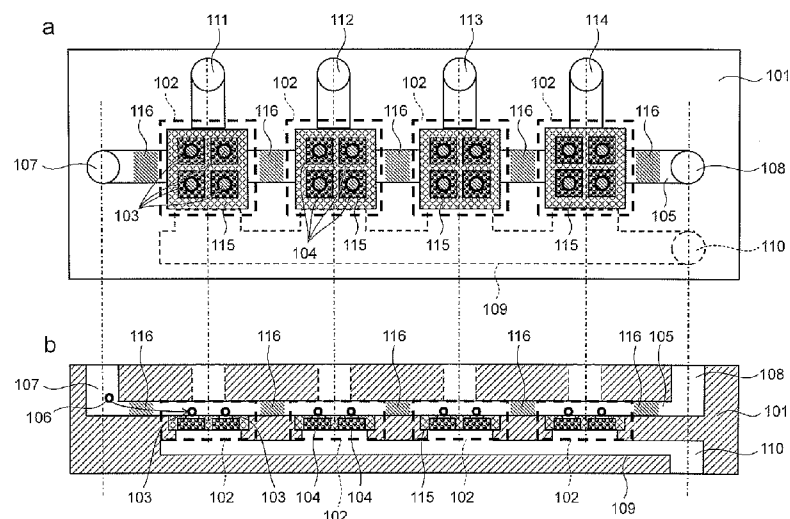
添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: FLOW CELL DEVICE FOR SINGLE CELL ANALYSIS, AND SINGLE CELL ANALYSIS DEVICE

(54) 発明の名称: 単一細胞解析用フローセルデバイス及び単一細胞解析装置

図 1



(57) Abstract: A flow cell device for single cell analysis is provided with: (1) multiple reaction chambers each of which has at least one cell capture section and at least one nucleic acid capture section which are connected to each other through a flow path; (2) a first liquid flow path which is connected to all of the multiple reaction chambers on the side of a first surface; (3) multiple second li-
quid flow paths which are connected to the multiple reaction chambers in a one-to-one relationship on the side of the first surface;
and (4) a third liquid flow path which is connected to all of the multiple reaction chambers on the side of a second surface which is
opposed to the first surface.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/125251 A1

(1) それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する、複数の反応室と、(2) 第1の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第1の液体流路と、(3) 前記第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第2の液体流路と、(4) 前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第3の液体流路と、を単一細胞解析用フローセルデバイスに設ける。

明 細 書

発明の名称：

単一細胞解析用フローセルデバイス及び単一細胞解析装置

技術分野

[0001] 本発明は、単一細胞解析用フローセルデバイス及びそれを用いた単一細胞解析装置に関する。

背景技術

[0002] 単一細胞解析とは、単一細胞毎に細胞中の生体分子を高精度に検出し、定量する技術である。単一細胞解析は、大きく分けて、2つの技術から構成される。1つは、解析のために細胞を単離する技術であり、1つは、1細胞中の微量な生体分子から高効率に計測用のサンプルを調整して解析する技術である。

[0003] 前者の技術には、一般に、フローサイトメータが用いられる。フローサイトメータでは、複雑な処理が自動化されており、ユーザは、細胞を簡単に単離することができる。一方、フローサイトメータは依然として高価である。最近、より簡便かつ安価に細胞を単離する方法として、フローセルデバイスを用いる方法が知られている（特許文献1、2）。

[0004] 特許文献1には、計測対象種である細胞の単離を目的として、フローセルデバイス中の反応室内に細胞を個別に捕捉する細胞捕捉部をアレイ状に複数配置した構成が記載されている。細胞捕捉部は、フローセルデバイス中の反応室内に導入された細胞を1つずつ単離することができるメンブレンフィルタを有するデバイスである。目的とする細胞は、上記フィルタに形成された孔を通過することができずフィルタ上に捕捉され、単離される一方、目的外の細胞は、前記フィルタの孔を通過し、フィルタの反対側から排出される。捕捉された細胞は、細胞膜上に発現した膜蛋白を染色する免疫染色法等で導入された蛍光ラベルを用いて計測される。

[0005] 特許文献2には、複数の細胞から一つの細胞を捕捉し（複数の細胞から細

胞を単離し)、捕捉した細胞を回収するデバイス及び装置が記載されている。特許文献2の場合、細胞は、小さな穴に吸引して捕捉した後、目的とする細胞だけをバルブ制御によって反応室内に吸引する一方、目的外の細胞を細胞捕捉部から排出する。

[0006] 次に、単一細胞レベルの遺伝子発現解析で用いられる技術を説明する。

[0007] 単一細胞解析が実現する以前の遺伝子発現解析では、細胞群の中からmRNAを取り出し、次に相補鎖であるcDNAを作製してこれをPCR増幅し、更にDNAプローブアレー (DNAチップ) を用いてターゲットを対応するプローブ位置に捕獲して蛍光検出する方法が用いられている。

[0008] しかし、PCR増幅やDNAチップを用いる方法は定量分析精度が低く、より精度の高い遺伝子発現プロファイルの分析方法が望まれている。また、ヒトゲノム解析の終了に伴い、遺伝子発現を定量的に調べる要求が強まると共に、組織中の細胞毎のHeterogeneityに注目が集まっており、多数の単一細胞の中からmRNAを抽出して定量分析する方法が望まれている。

[0009] 最近では、単一細胞中の微量なmRNAを逆転写し、これをcDNAに代えてPCR増幅し、大規模DNAシーケンサを用いて増幅産物を配列決定し、シーケンシング結果を集計することによって、増幅後の核酸配列数をカウントし、これによって、mRNA分子数を推定する方法が用いられ始めている (非特許文献1)。この方法の場合、計測できる遺伝子数の上限は、大規模DNAシーケンサの並列数で決まるため、2万数千ある全ての遺伝子を計測できるだけでなく、原理的には、スプラッシングバリエーションを含む10万種類の配列も計測できる。

[0010] 特許文献3には、多数の細胞について、一度に個々の細胞の遺伝子発現解析を実現するために、多孔質メンブレンや多数のビーズをパッキングしたメンブレンデバイスを利用して1st cDNAライブラリを構成し、更に当該ライブラリから遺伝子発現の2次元分布を得て多数の細胞中の遺伝子発現解析を実現できるデバイスが記載されている。このデバイスを用いた単一細胞中の遺伝子発現の解析では、デバイス上に構築された1st cDNAから相補鎖 (2nd cDNA) を合成してPCR増幅し、大規模配列解析装置のためのサンプル (シーケンシン

グライブラリ)を調製する。

- [0011] このシーケンシングライブラリは細胞毎でなく、デバイス毎に調製されるため、複数の細胞からの核酸が混在した状態となる。特許文献3では、得られた配列解析データから上記デバイス上の細胞を識別するためにデバイス上の位置固有の配列が1st cDNAライブラリに導入され、この位置固有の配列ごとに大規模配列解析装置で得られた配列解析結果を分類することによって、単一細胞レベルの遺伝子発現解析を実現している。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：特開2013-58138号公報
特許文献2：特開2010-51291号公報
特許文献3：国際公開第2014/020657号

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：ゲノムリサーチ 21巻 7号 2002 p. 1088 (Genome Research, Vol. 21, No. 7, (2011) p. 1088)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 再生医療の実用化研究、遺伝子解析によるがんや免疫関連の診断法の研究、あるいは多細胞生物の生命現象の基礎研究において、組織の平均としての遺伝子の発現量ばかりでなく、組織を構成する一つ一つの細胞の中味を定量的に分析することが重要視され始めている。すなわち、細胞を一つずつ取り出して種々の遺伝子の発現量を定量的にモニターすることが望まれている。生体組織の中で活動する遺伝子mRNAを1細胞レベルで計測することができれば、生体内で起こっている種々の現象を細胞間の相互作用も含めて詳細に知ることができ、生命科学分野、特に医療あるいは創薬分野の研究と診断に大きな効果があると期待される。
- [0015] ところで、フローサイトメータを用いて単離された一つ一つの細胞を反応

チューブに入れ、遺伝子発現解析のためのシーケンシングライブラリを構築するために必須のプロセス（mRNA抽出、1st cDNA合成、2nd cDNA合成、核酸増幅）を全てマニュアル操作で実行しようとする、数 μ L以上の試薬が必要となるだけでなく、前記試薬のコストは細胞数に比例して増大するため、試薬のコストが高額になってしまう。また、前述のマニュアル操作は、熟練した技術者が行う必要がある。

[0016] 実際、特許文献1又は特許文献2に記載された方法でも、細胞の単離と、蛍光ラベルによる細胞の識別や計測は可能であるが、個々の細胞についての詳細な遺伝子発現解析のためのシーケンシングライブラリの調整については、単離された細胞を、市販のプラスチック製のチューブ（又は、96穴プレートや、384穴プレート）にマニュアル操作で個別に移した後、mRNAの抽出からPCR増幅までの反応を別途実行させる必要がある。この場合、必要となる試薬量の下限は、マニュアル操作で制御可能なボリューム（通常1 μ L程度）で定まってしまう。このため、必要となる試薬量は、細胞数に比例して増大し、解析のための試薬コストが上昇してしまうという問題が生じている。

[0017] このように、いずれの特許文献にも、単一のフローセルデバイス内で単一細胞解析の全工程を実行することは想定されていない。ところで、この解析の実行には、フローセルデバイス中の細胞捕捉部に捕捉された均一な細胞集団に対して同一条件で均一なサンプル調製を実行して単一細胞毎の詳細な遺伝子発現を可能にすることと、複数の異なる細胞について個別の処理を同時に実現することと、が求められる。ここで、均一なサンプル調製を行うには、反応溶液が同一の反応容器から供給される必要があり、前記個別の処理の同時実行には、細胞群毎に個別の試薬条件を適用する必要がある。ところが、これら2つの要求を、フローセルデバイスの構成を複雑にすることなく実現できる技術は、現在のところ知られていない。

課題を解決するための手段

[0018] 上記課題を解決する本発明の単一細胞解析用フローセルデバイスの一つは、(1) それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と

少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する、複数の反応室と、(2) 第1の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第1の液体流路と、(3) 前記第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第2の液体流路と、(4) 前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第3の液体流路と、を有する単一細胞解析用フローセルデバイスである。

[0019] また、上記課題を解決する本発明の単一細胞解析用フローセルデバイスの他の一つは、(1) それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する、複数の反応室と、(2) 第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第1の液体流路と、(3) 前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第2の液体流路と、を有する単一細胞解析用フローセルデバイスである。

[0020] また、上記課題を解決する本発明の単一細胞解析装置の一つは、(1)(1-1) それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する複数の反応室と、(1-2) 第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第1の液体流路と、(1-3) 前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第2の液体流路とを有する単一細胞解析用フローセルデバイスが載置されるステージと、(2) 前記ステージの位置を制御するステージ制御系と、(3) 前記複数の第1の流体流路に対する第1の液体の導入を個別に制御する導入制御装置と、(4) 前記第2の流体流路からの第2の液体の排出を制御する排出制御装置と、を有する単一細胞解析装置である。

発明の効果

[0021] 本発明により、多数の一つ一つの細胞の同時解析を安価かつ簡便に実現することができる。前述した以外の課題、構成及び効果は、以下の実施の形態の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]形態例に係るフローセルデバイスの基本構成を示す図。

[図2]シーケンシングライブラリの第1の調整方法を説明する反応過程図。

[図3]シーケンシングライブラリの第2の調整方法を説明する反応過程図。

[図4]実施例1に係るフローセルデバイスの構成を示す図。

[図5]実施例1で使用する2次元アレイチップの構成を示す図。

[図6]実施例1で使用する2次元アレイチップの単位構造を拡大して示す図。

[図7]実施例1で実行する反応過程を示す図。

[図8]単一細胞解析装置の構成例を示す図。

[図9]実施例2に係るフローセルデバイスの構成を示す図。

[図10]実施例2で使用する2次元アレイチップの構成を示す図。

[図11]実施例2で使用する2次元アレイチップの単位構造を拡大して示す図。
。

[図12]実施例2で実行する反応過程を示す図。

[図13]実施例3に係るフローセルデバイスの構成を示す図。

[図14]実施例3に係るフローセルデバイスの他の構成を示す図。

[図15]実施例3で使用する単一細胞解析装置の構成例を示す図。

[図16]実施例4で使用する単一細胞解析装置の構成例を示す図。

発明を実施するために形態

[0023] 以下、図面に基づいて、本発明の実施の形態を説明する。なお、本発明の実施の態様は、後述する形態例に限定されるものではなく、その技術思想の範囲において、種々の変形が可能である。

[0024] [実施の形態の概要]

具体的な形態例について説明する前に、各形態例で採用する基本構成や基本概念について説明する。各形態例では、単一細胞解析に必須の2つのプロセス（細胞の単離と、単離された個別の細胞からのサンプルの調製）を実行可能な構造を有するフローセルデバイスと当該フローセルデバイスを用いる単一細胞解析装置の処理動作について説明する。

[0025] 単一細胞解析に必須の2つのプロセスが一つのフローセルデバイス内で実

行できることで、手作業による試薬の分注操作が回避され、必要になる試薬のボリュームが低減し、単一細胞解析に要するランニングコストが低減される。また、単一細胞解析の全プロセスを自動化（細胞毎に必須な反応処理を自動化）できることで、大規模シーケンサに必要なサンプル調製プロセスの簡素化が実現され、熟練技術者でなくても容易に単一細胞解析ができるようになる。

[0026] さらに、我々は、細胞から抽出されたmRNAからのサンプル調製について、特許文献3に開示されている細胞識別配列を固定したメンブレンデバイスを適用し、形態例に係るフローセルデバイスを構築することとした。これにより、多数の細胞について、同時に多数の細胞から高い効率で1st cDNAライブラリを構築することができ、同時に、一細胞あたり少ない試薬量で均一なサンプル調製を実現することができる。すなわち、個々の細胞毎の遺伝子発現解析が可能な大規模配列解析装置（次世代シーケンサ）用サンプルを調製することができる。かくして、シーケンシングライブラリを安価に構築することができる。

[0027] また、以下の実施の形態では、フローセルデバイスのサンプル調製反応において、フローセルデバイス中の細胞の数に比べて大幅に少ない種類の細胞識別タグを用いて処理できる方法についても説明する。この方法とは、同じ組み合わせの細胞識別タグを持つメンブレンデバイスをフローセルデバイス中に複数配置し（例えば100種類の識別タグを持つメンブレンデバイスを20枚のフローセルデバイス中に配置し）、2nd cDNA合成以降の反応時に異なるメンブレンデバイスを識別できるタグ配列をシーケンシング用の核酸サンプルに挿入する方法である。

[0028] この方法により、一つのフローセルデバイスで処理可能な細胞数を、1つのメンブレンデバイス上の細胞識別タグの種類の数とメンブレンデバイスを識別するためのタグ配列の種類の数との積で与えられる数まで増大させることができる。すなわち、細胞識別タグの種類の数とメンブレンデバイスを識別するためのタグ配列の種類の数との和の数で与えられる種類の配列を準備

することにより、これらタグの数の積で与えられる細胞数までの識別が可能となる。この方法を形態例に係るフローセルデバイス上で実現することにより、一細胞あたりの試薬量を低減して試薬コストを低減させることができる。

[0029] 以下に示す形態例の1つでは、(1) それぞれが、細胞捕捉部と核酸捕捉部の対を少なくとも1つ有する複数の反応室と、(2) 前記複数の反応室に対して共通に接続され、前記複数の反応室に第1の液体を導入する第1の液体流路と、(3) 前記複数の反応室に対して一対一に接続され、前記反応室毎に第2の液体を個別に導入する複数の第2の液体流路と、(4) 前記複数の反応室に対して共通に接続され、前記細胞捕捉部及び前記核酸捕捉部を通過した前記第1の液体及び／又は前記第2の液体を回収する第3の液体流路と、を有する単一細胞解析用フローセルデバイスについて説明する。

[0030] また、以下に示す形態例の1つでは、(1) それぞれが、細胞捕捉部と核酸捕捉部の対を少なくとも1つ有する複数の反応室と、(2) 前記複数の反応室に対して一対一に接続され、前記反応室毎に液体を個別に導入する複数の第1の液体流路と、(3) 前記複数の反応室に対して共通に接続され、前記細胞捕捉部及び前記核酸捕捉部を通過した液体を回収する第2の液体流路と、を有する単一細胞解析用フローセルデバイスについて説明する。

[0031] [フローセルデバイスの構成]

図1に、フローセルデバイスの上面図(図1(a))と断面図(図1(b))を示す。フローセルデバイス101には複数の反応室102が設けられている。個々の反応室102には、1つ又は複数の細胞捕捉部103と1つ又は複数の核酸捕捉部104とが配置されている。核酸捕捉部104は、望ましくは、細胞捕捉部103に一対一に対応付けて配置されている。一対一であることで、細胞捕捉部103に捕捉された1つの細胞と、核酸捕捉部104に捕捉される核酸との対応関係が明確になる。図1の場合、核酸捕捉部104は、細胞捕捉部103の下面側に積層されている。積層関係にあることで、細胞捕捉部103に捕捉された1つの細胞から抽出された核酸を、対応する核酸捕捉部104に確実に導入することができる。

。

[0032] 図1に示すフローセルデバイス101は、基板内に複数の反応室102とその上面側で接続される共通供給流路105と、前記複数の反応室102とその下面側で接続される共通吸引流路109とを有している。共通供給流路105には、検査対象とする細胞106を含む溶液が流れる。前記溶液は、共通供給流路105に設けられた上部共通インレット107から導入され、共通供給流路105に沿って流れ、上部共通アウトレット108から回収される。この際、前記溶液は、共通供給流路105上に位置する各反応室102を満たす。

[0033] 前記溶液の導入と同時に、共通吸引流路109に設けられた下部共通アウトレット110に負圧が印加される。共通吸引流路109が負圧となることで、反応室102内を満たす溶液の一部は、細胞捕捉部103及び核酸捕捉部104を通して共通吸引流路109に流れる。細胞捕捉部103は、細胞106の直径よりも小さい開口部で構成されている。このため、細胞106は、細胞捕捉部103の開口部に捕捉される。細胞捕捉部103の直下には、多孔質材料で構成された核酸捕捉部104が配置されている。細図10図細胞捕捉部103と核酸捕捉部104は、反応室102に対して一対一に配置される2次元アレイチップ115上に作製される。図1の場合、細胞捕捉部103と核酸捕捉部104を一組とする構造体は、1つの反応室102内の4つずつ所定の位置に配置される。

[0034] この結果、細胞106は、複数の反応室102内に配置された複数の2次元アレイチップ115上の複数の細胞捕捉部103に均一に捕捉される。捕捉された細胞106に対して反応室102毎に異なる処理を行えるように、各反応室102には、共通供給流路105とは別に個別の流体流路が接続されている。この流体流路は、反応室102に対して一対一に接続される。図1では、4つの流体流路とそれらに対応する4つの個別インレット111、112、113、114を表している。個別インレット111、112、113、114には、接続先の反応室102で実行する処理内容に応じた個別の試薬が導入される。図1の場合、個別の流体流路は、各反応室102の上面側において、その側方側から接続される。

[0035] 各反応室102に試薬を個別に導入する場合には、共通供給流路105内におけ

る溶液の流れを止めると共に、各反応室102の下面側に接続された共通吸引流路109に負圧を印加して個別の試薬の逆流を防止する。これにより、個別に導入された試薬が、導入先とは異なる反応室102に導入される可能性を十分に低減することができる。

[0036] 個別に導入された試薬の導入先とは異なる反応室102への誤導入を確実に防ぐ観点からは、各反応室102の間又は各反応室102の前後の領域116の内壁面を撥水（疎水）処理した共通供給流路105を使用し、個別の試薬の導入に先立って、上部共通インレット107から上部共通アウトレット108に向かってミネラルオイルなどの非極性溶媒を流しても良い。この場合、非極性溶媒が共通供給流路105内の領域116に留まり、各反応室102が互いに分離された状態になる。すなわち、極性溶媒である水溶液は領域116を通過できなくなり、個別に導入された試薬が他の反応室102に導入されることがない。

[0037] このように、図1に示すフローセルデバイス101を用いれば、共通供給流路105を通じて、複数の反応室102に対して一度に共通の溶液を導入できると共に、個別の流体流路を通じて、個別の反応室102に個別の試薬を導入できる。このため、図1に示すフローセルデバイス101の使用により、多数の細胞についての高精度な遺伝子発現解析を同時に実行することが可能となる。また、個別の試薬（反応液）の導入が不要な反応プロセスでは、複数の反応室102で同じ反応プロセスを実行でき、各反応室102における反応の均一化が図られ、高精度な解析が実現される。

[0038] [シーケンシングライブラリの第1の調整方法]

以下では、1回の配列解析において、多数の細胞からのシーケンシングライブラリを調整するための第1の方法について説明する。

[0039] 前述したように、フローセルデバイス101（図1）には、複数の反応室102が設けられており、各反応室102には、複数の細胞から個々の細胞を単離して捕捉する細胞捕捉部103と多孔質材料から構成される核酸捕捉部104とを一組とする複数の構造体が平面的に配置された2次元アレイチップ115が設けられている。

[0040] 図2に、核酸捕捉部104の内壁表面（多孔質材料の表面）の拡大構造を示す。図2に示すように、核酸捕捉部104の内壁表面には、第1のDNAプローブ201が固定されている。この第1のDNAプローブ201は、細胞捕捉部103に捕捉された細胞から抽出された核酸（mRNA）206を捕捉するための捕捉配列（ポリT）202と、細胞106を識別するための既知の配列（細胞識別配列）203と、PCR増幅のための共通配列204とを含む。

[0041] （ステップ1）

このステップは、第1のDNAプローブ201の捕捉配列202に、mRNA 206が捕捉された様子を示している。なお、同じ反応室102内にある核酸捕捉部104であっても、反応室102内の位置が異なれば、異なる細胞識別配列203が付されている。例えば図1の構造の場合、2次元アレイチップ115を構成する4つの核酸捕捉部104には、各配置位置に応じた固有の細胞識別配列203が付されている。核酸206は、電気泳動又は溶液の流れによって、細胞捕捉部103に捕捉された細胞106を破碎することで細胞106から取り出される。

[0042] （ステップ2）

このステップは、第1のDNAプローブ201に捕捉したmRNA 206を鋳型として、1st cDNA鎖207を合成した様子を示している。この合成反応に必要な逆転写酵素及び基質は、以下に示す手順で供給される。まず、酵素及び基質を含む緩衝溶液を、上部共通インレット107から上部共通アウトレット108に向かって流し、各反応室102内にある2次元アレイチップ115の上部空間をこの緩衝溶液で満たす。次に、下部共通アウトレット110に負圧を印加して、核酸捕捉部104を通過するように反応室102内の溶液を共通吸引流路109に流し、多孔質材料の表面近傍に必要な試薬で満たす。

[0043] （ステップ3）

このステップでは、細胞識別配列203から所定位置/範囲（例えば200塩基付近/150～250塩基の範囲）にハイブリダイズする第2のDNAプローブ208を反応室102毎に独立に導入する。図2のステップ3には、第2のDNAプローブ208が、1st cDNA鎖207にハイブリダイズしている様子を示している。第2のDNAプロ

ープ208は、5'末端からPCR用の共通プライマー（Forward）209と、チップ識別配列210と、1st cDNA鎖207に相補的な配列である遺伝子特異的プローブ211とから構成されている。ここで、チップ識別配列210は、反応室102毎（すなわち、2次元アレイチップ115毎）に異なる配列をもつ。また、遺伝子特異的プローブ211は、遺伝子発現データを取得する数だけ必要であり、20種類の遺伝子発現解析を行う場合は20種類の遺伝子特異的プローブ211の混合溶液を反応室102に導入する。

[0044] 反応室102に対する第2のDNAプローブ208の導入は、以下の手順による。まず、上部共通インレット107からミネラルオイルを導入し、共通供給流路105を通じて反対側の上部共通アウトレット108から排出する。この段階では、共通供給流路105に接続された4つの反応室102は未だ分離されていない。次に、塩の含まれる緩衝溶液を共通吸引流路109から個別インレット111、112、113、114に向かって流し、個々の反応室102内にある余分なミネラルオイルを、個別インレット111、112、113、114を通じて排出する。この排出後、ミネラルオイルは、領域116にのみ留まる。この結果、共通供給流路105に接続された4つの反応室102は互いに分離される。すなわち、反応室102内に設けられた2次元アレイチップ115の上部空間は、他の反応室102内に設けられた2次元アレイチップ115の上部空間から分離される。

[0045] このような分離が起きるのは、2次元アレイチップ115の上部空間を規定する反応室102の内壁が親水的であるように表面処理されているのに対し、反応室102の間に位置する領域116が疎水的になるように表面処理されているからである。1st cDNAプローブ201が核酸捕捉部104の内壁表面（多孔質材料の表面）に強固に（たとえばビオチン-アビジン結合によって）固定されていることも高い反応効率を維持するために重要である。

[0046] 反応室102の分離が完了した後、チップ識別配列210が異なる第2のDNAプローブ208を含む緩衝溶液を、個別インレット111、112、113、114を通じて反応室102に導入し、導入された緩衝溶液を、細胞捕捉部103、核酸捕捉部104、共通吸引流路109を経て下部共通アウトレット110から排出する。これにより、

核酸捕捉部104の内壁近傍は、反応室102毎に異なる第2のDNAプローブ208で満たされた状態となり、この第2のDNAプローブ208が1st cDNA鎖207にハイブリダイズする。

[0047] (ステップ4)

このステップでは、2nd cDNA 212を合成する。この反応に必要な基質と酵素を導入するために、まず、上部共通インレット107から上部共通アウトレット108に向かって大量の緩衝溶液を流す。大量の緩衝溶液によって、領域116に留まっていたエマルジョンオイルが洗い流される。大量の緩衝溶液を共通供給流路105に流す目的は、共通供給流路105を再び繋げることであるため、多少のエマルジョンオイルが領域116に残っても良い。次に、1st cDNA合成の場合と同様のプロセスにより、2nd cDNA合成に必要な酵素と基質を反応室102に導入する。

[0048] (ステップ5 及び 6)

これらのステップでは、共通プライマー214によるPCR増幅を行う。PCR増幅に必要な共通プライマー (Forward) 214と、共通プライマー (Reverse) 213と、PCR酵素と、基質とは、1st cDNA鎖207の場合と同様の手順で反応室102に導入される。反応完了後に得られたPCR産物215は、配列解析が可能な配列であり (正確には、配列解析の前処理 (エマルジョンPCRなど) が可能な配列であり)、シーケンシングライブラリと呼ばれる。

[0049] このシーケンシングライブラリを配列解析することにより、細胞識別配列 (細胞識別配列203) とチップ識別配列 (チップ識別配列210) 毎に遺伝子発現量が得られる。すなわち、フローセルデバイス101中に同時に導入された細胞識別配列203の種類とチップ識別配列210の種類の積の数以下の細胞数についての同時解析が可能となる。これによって、事前に2次元アレイチップ115中に導入した細胞識別配列の数よりも大幅に多い細胞数の解析が可能となる。

[0050] [シーケンシングライブラリの第2の調整方法]

ただし、前述の方法では、解析遺伝子数が多い場合、第2のDNAプローブ20

8の種類は、チップ識別配列210の種類数×解析遺伝子数で与えられる数だけ準備する必要がある。このため、多数の第2のDNAプローブ208を準備しなければならない。そこで、以下では、この問題を解決する第2の方法について説明する。

[0051] 第2の方法は、2nd cDNA 212を合成するときにチップ識別配列210を導入するのではなく、2nd cDNA合成後のPCR増幅の最初のプロセスでチップ識別配列を導入する。このようにすることで、上記課題（すなわち、解析遺伝子数が多い場合に、準備する第2のDNAプローブ208の種類がチップ数と遺伝子数の積で増えるという問題）を回避することができる。

[0052] 以下では、図3を用い、核酸処理のプロセスのうち、第1の方法と相違する点についてのみを説明する。図3は、図2と同様、シーケンシングライブラリを得るまでのプロセス全体を示している。

[0053] （ステップ1及び2）

核酸捕捉部104の内壁表面に固定する第1のDNAプローブ301の配列は、共通配列204（共通PCRプライマー（Reverse））の代わりに共通接続配列302を設けている。

（ステップ3）

2nd cDNA合成時の第2のDNAプローブ303は、第2のDNAプローブ208（図2）からチップ識別配列210を除いた配列である。すなわち、第2のDNAプローブ303は、共通プライマー（Forward）209と遺伝子特異的プローブ211のみから構成されている。

[0054] （ステップ4）

前記第2のDNAプローブ303を1st cDNA鎖207にハイブリダイズして2nd cDNA鎖304を合成する。

（ステップ5）

合成された2nd cDNA鎖304に対して、第2のチップ識別配列307を持った第3のDNAプローブ305をハイブリダイズさせる。この第3のDNAプローブ305は、PCR共通プライマー（Reverse）306と、第2のチップ識別配列307と、共通接続

配列の相補配列308とから構成されている。

[0055] (ステップ6)

PCRプロセス完了後に得られるPCR増幅産物309として、シーケンシングライブラリが構築される。第3のDNAプローブ305の種類数は、チップの数と同じでよい。DNAプローブのための初期コストを低減して、同時解析細胞数を増やすことができる。

[0056] [実施例1]

(フローセルデバイスの構造)

以下では、前述の形態例の具体的な構成である実施例の1つを説明する。本実施例では、核酸捕捉のためのDNA（DNAプローブ）を表面に固定したビーズを多数パッキングして核酸捕捉部104を構成する。また、本実施例の場合、前述した第一の方法に基づいてシーケンシングライブラリを調整する。

[0057] 図4に、本実施例で使用するフローセルデバイス101の上面図（図4(a)）と断面図（図4(b)）を示す。本実施例におけるフローセルデバイス101の基本構造は、図1の基本構造と同じである。すなわち、フローセルデバイス101は、4つの反応室102を有し、各反応室102に1つ又は複数の細胞捕捉部103と核酸捕捉部104を有する。核酸捕捉部104は、望ましくは、細胞捕捉部103に対して一対一の関係で配置される。図4では、2次元アレイチップ115に形成された7×7個の細胞捕捉部103に対して核酸捕捉部104が一対一に配置されている。

[0058] 本実施例の場合も、核酸捕捉部104は細胞捕捉部103の直下に配置される。ただし、本実施例の場合、核酸捕捉部104は、多数の磁性ビーズを充填した空間により形成されている。本実施例の場合も、細胞106を含む溶液が共通インレット107から導入される。導入された溶液は、共通供給流路105に沿って4つの反応室102に順番に流れ、最終的に上部共通アウトレット108から排出される。溶液を共通供給流路105に流す際に、反応室102の下部に形成した共通吸引流路109を負圧に制御することで、共通供給流路105中の溶液の一部は反応室102を通じて共通吸引流路109に流れる。

[0059] この流れにより、溶液中の細胞106は、細胞捕捉部103を構成する開口部に引き寄せられ、捕捉される。この際、1つの細胞捕捉部103に対して1つの細胞106が捕捉される。また、この流れにより、捕捉された細胞106が破壊され、細胞106内からmRNAが抽出され、核酸捕捉部104の磁気ビーズの表面に捕捉される。このように、本実施例では、細胞捕捉部103と同じ位置に形成された核酸捕捉部104にcDNAライブラリが構築される。このライブラリを鋳型として、2次元アレイチップ115毎に異なる配列を持つDNAプローブを用いて2nd cDNAを合成し、シーケンシングライブラリを構築する。

[0060] 図5に、本実施例で使用する2次元アレイチップ115の詳細な構成を示す。図5(a)は、2次元アレイチップ115の面に対して垂直に切断した断面図である。図5(b)は、図5(a)のA-A'断面を上面側から見た断面図であり、図5(c)は、図5(a)のB-B'断面を上面側から見た断面図である。細胞捕捉部103は、チップ503の上面側に形成された個々の開口部（流路504）に相当し、核酸捕捉部104は、チップ503と細孔アレーシート502で囲まれた空間に収容された多数の磁気ビーズ601に相当する。

[0061] 図6に、2次元アレイチップ115（図5）の単位構造を拡大して示す。図6に示すように、単位構造は、一对の細胞捕捉部103と、多数の磁性ビーズ601をパッキングした核酸捕捉部104と、下部流路501が形成された細孔アレーシート502とで構成される。細孔アレーシート502は、チップ503の下面側に形成された多数の凹部を塞ぎ、当該凹部に磁気ビーズ601に閉じ込める部材として機能する。下部流路501は、細孔アレーシート502に形成された多数の貫通孔であり、核酸捕捉部104と共通吸引流路109とを接続する。下部流路501の寸法は、磁気ビーズ601を核酸捕捉部104に保持できる寸法に形成されている。

[0062] （単一細胞解析処理：第1の調整方法）

図7を用いて、磁気ビーズ601の表面で実行される一連の処理を説明する。以下の処理は、前述の第1の調整方法に対応する。この図7には、細胞捕捉部103に捕捉された細胞106から抽出された核酸(mRNA)の捕捉（ステップ1）、cDNAの合成（ステップ2）、核酸増幅(PCR)およびシーケンスに必要な既知

の末端配列を導入した2ndストランドの合成（ステップ3、4）、PCR増幅（ステップ5）のステップの概念図が示されている。図7のステップ1～6は、図3のステップ1～6に対応する。

[0063] （ステップ1）

まず、500 μ Lの1 $\times$ PBSバッファ（Phosphate buffered saline）で細胞106を傷つけないように洗浄した後、4 $^{\circ}$ Cに冷却された10 μ Lの1 $\times$ PBSバッファに懸濁された1000個の細胞106を、フローセルデバイス101（図4）の上面に形成された共通インレット107から導入する。同時に、4つの反応室102がこの溶液で満たされるように、共通供給流路105の反対側の端部である上部共通アウトレット108から当該溶液を吸引する。これにより、各反応室102に配置される2次元アレイチップ115の上部は、細胞106を含むPBSバッファで満たされる。

[0064] 次に、下部共通アウトレット110に負圧（1.0気圧）を印加し、細胞捕捉部103から共通吸引流路109（図4）に溶液を吸引する。細胞106は、溶液の流れに乗って移動し、細胞捕捉部103まで到達する。図5(b)に示すように、細胞捕捉部103の開口直径は、細胞106の直径よりも小さいため、到達した細胞106は細胞捕捉部103の開口に捕捉される。捕捉された細胞106は、溶液流に対して栓の役割を果たすので、溶液の流れは未だ細胞106を捕捉していない細胞捕捉部103に移動する。そのため、溶液中の残りの細胞106は、未だ細胞106を捕捉していない開口に移動し、捕捉される。

[0065] 細胞106が細胞捕捉部103に十分な数だけが捕捉されると、反応室102中に残留する細胞106（捕捉されていない過剰な細胞106）とPBSバッファとを、上部共通アウトレット108から排出する。続いて、上部共通インレット107から上部共通アウトレット108に向かって細胞溶解液（Lysis buffer）（例えば、Tween 20などの表面活性剤）を流し、反応室102を当該細胞溶解液で満たす。反応室102が細胞溶解液で満たされると、直ちに、下部共通アウトレット110に負圧を印加し、細胞溶解液を吸引する。以下、全ての溶液は、同様の方法によって2次元アレイチップ115中の核酸捕捉部104を通過させる。このとき、

細孔アレーシート502に形成されている下部流路501は、直径が $0.2\mu\text{m}$ の多孔質材料から構成された流路であり、圧力損失が大きい。このため、細胞溶解液は、反応室102から細胞捕捉部103及び核酸捕捉部104を通して共通吸引流路109に、5分程度時間を掛けてゆっくり流れ続ける。

[0066] 細胞溶解液は、流れている間に、細胞106を破砕する。破砕された細胞106からは核酸（mRNA）206が抽出される。核酸206は、周辺に拡散することなく、細胞溶解液と共に細胞捕捉部103を通り、核酸捕捉部104に到達する。この他、矢印603で示す方向（フローセルデバイス101の下面側から上面側の方向）に電界を印加し、細胞106中の核酸206を核酸捕捉部104まで電気泳動によって移動させてもよい。この細胞溶解液の導入により、細胞106の破砕と核酸捕捉部104の磁気ビーズ601上に固定された第1のDNAプローブ201による核酸206の捕捉とが同時に実行される。

[0067] 細胞106を捕捉した細胞捕捉部103の2次元アレイチップ115上における位置情報（図5(a)の場合、 7×7 の格子状に配列された細胞捕捉部103のうちどの位置の細胞捕捉部103かの情報）は、対応する核酸捕捉部104の磁気ビーズ601に固定された第1のDNAプローブ201の配列情報として保存されている。すなわち、核酸捕捉部104の第1のDNAプローブ201には、2次元アレイチップ115上における核酸捕捉部104の位置毎に異なる捕捉配列202が導入されている。第1のDNAプローブ201は、捕捉配列202に加え、3'末端にポリT配列を持っている。第1のDNAプローブ201側の3'末端のポリT配列を、核酸206の3'末端のポリA配列とハイブリダイズすることにより核酸206を捕捉する。第1のDNAプローブ201の5'末端側には、更に、PCR増幅のための共通プライマー204（Reverse）が設けられている。

[0068] なお、本実施例の第1のDNAプローブ201は、もう少し複雑な配列構成を有し、5'末端から30塩基のPCR増幅用共通プライマー204（Reverse）、7塩基の細胞認識用配列と7塩基のランダム配列からなる細胞識別配列203、18塩基のオリゴ(dT)配列+2塩基のVN配列からなる捕捉配列202の順に配列されている。ここで、細胞識別配列を7塩基のランダム配列に設定しているので、最大で

、 $4^7=1.6 \times 10^4$ 個の単一細胞を認識することが可能となる。

[0069] また、分子認識用配列（例えば7塩基）を第1のDNAプローブ201へ導入すれば、 $4^7=1.6 \times 10^4$ 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。すなわち、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。このため、始めに試料中に存在していた核酸量を高い精度で定量することができる。ただし、単一細胞中の同一遺伝子の発現量が分子認識用配列のバリエーションよりも多い場合には増幅バイアス補正の正確性が低下する。最も3'側に位置するオリゴ(dT)配列は、核酸206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、核酸206を捕捉するために利用される。

[0070] 本実施例では、mRNAを解析するために第1のDNAプローブ201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ポリT配列の代わりにランダム配列は解析したい配列と相補的な配列の一部を用いてもよいことは言うまでもない。

[0071] (ステップ2)

第1のDNAプローブ201に捕捉された核酸206を鋳型として、1st cDNA鎖を合成する。1st cDNA鎖合成試薬として0.1%Tween20を含む10mM Tris Buffer (pH=8.0) 58.5 μ Lと、10mM dNTP 4 μ Lと、5xRT Buffer (SuperScript III, Invitrogen社) 225 μ Lと、0.1M DTT 4 μ Lと、RNaseOUT (Invitrogen社) 4 μ Lと、Superscript III(逆転写酵素, Invitrogen社) 4 μ Lを混和し、上部共通インレット107から前工程と同様に導入する。上記溶液を逆転写酵素および合成基質を含む溶液でパックされた磁気ビーズ601の空隙部分を満たした状態で反応室102から共通吸引流路109に非常にゆっくり流しながら、溶液を50℃にゆっくり昇温して50分ほど相補鎖合成反応(1st cDNA鎖の合成反応)を行った。

[0072] この結果、細胞106毎に、磁気ビーズ601の表面に固定された多くのcDNAをライブラリとして得た。これはいわば1細胞cDNAライブラリアレイというべきものであり、これまでの多くの細胞から得られる平均化されたcDNAライブ

ラリとは根本的に違うものである。

[0073] 反応終了後（1st cDNA鎖を合成した後）、フローセルデバイス101の全体を、1.5分間、85℃の温度で保ち、逆転写酵素を失活させた。さらに、フローセルデバイス101の全体を、4℃に冷却した後、RNaseおよび0.1%Tween20を含む10mM Tris Buffer (pH = 8.0) 0.2mLを上部共通インレット107から注入すると共に反対側の上部共通アウトレット108から吸引して反応室102を上記溶液で満し、その後、下部共通アウトレット110から上記溶液を排出すると共に、反応室102中の溶液を上部共通アウトレット108から取り除くという工程を5回繰り返す。これにより、RNAを分解し、核酸捕捉部104中の残存物および分解物を除去及び洗浄する。さらに、アルカリ変性剤を含む液および洗浄液で同様に5回洗浄する。ここまでのプロセスにより、捕捉された細胞毎のcDNAライブラリアレイが構築される。

[0074] (ステップ3及び4)

次に、滅菌水69 μ Lと、10 x Ex Taq Buffer (TaKaRa Bio社) 10 μ Lと、2.5 mM dNTP Mix 100 μ Lと、各10 μ MのPCR増幅用共通配列(Reverse)が付加されたEx Taq Hot start version (TaKaRa Bio社)1 μ Lとを混和し、この混合試薬を前工程と同様に上部共通インレット107から共通供給流路105を通じて核酸捕捉部104に導入した。チップ識別タグ付きの20種の第2のDNAプローブ208の混合溶液10 μ Lの個別の導入方法については後述する。その後、95℃で3分間、核酸の2次構造を解き、その後、44℃で2分間、1st cDNA鎖207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。図7は、第2のDNAプローブ208が1st cDNA鎖207にハイブリダイズしている様子を示している。さらに、6分間、72℃に温度を上げて相補鎖伸長反応を行い、2nd cDNA鎖304を合成させる。

[0075] 遺伝子特異的プローブ211の領域の配列が異なる20種類の第2のDNAプローブ208の混合溶液（チップ識別配列は反応室102毎（すなわち、2次元アレイチップ115毎）に異なる配列をもつ溶液）を2次元アレイチップ115（反応室102）毎に導入する。この導入には、後述するように個別インレット111、112、

113、114を用いる。遺伝子特異的プローブ211は、遺伝子発現データを取得する数だけ必要であり、200種類の遺伝子発現解析を行う場合、200種類の遺伝子特異的プローブ211の混合溶液を反応室102に導入する。

[0076] 以下、反応室102に対する第2のDNAプローブ208の導入方法について説明する。まず、上部共通インレット107からミネラルオイルを導入し、上部共通アウトレット108から排出する。次に、塩の含まれる緩衝溶液を共通吸引流路109から個別インレット111、112、113、114に向かって流し、反応室102内の余分なミネラルオイルを排出する。これにより、2次元アレイチップ115の上部の反応室102は、共通供給流路105に残留するミネラルオイルによって他の反応室102から分離される。このような分離が可能であるのは、2次元アレイチップ115の上部の反応室102の内壁が親水的になる一方、反応室102に接続される共通供給流路105の領域116が疎水的になるように表面処理が施されているからである。

[0077] 高い反応効率を維持には、多孔質内壁に、1st cDNA鎖207が強固に（例えばビオチン-アビジン結合によって）固定されていることも重要である。反応室102同士の分離が完了すると、チップ識別配列の異なる第2のDNAプローブ208を含む緩衝溶液を個別インレット111、112、113、114から導入し、共通吸引流路109を通して下部共通アウトレット110から排出する。これにより、核酸捕捉部103の内壁近傍は、反応室102毎に異なる第2のDNAプローブ208で満たされ、このプローブが1st cDNA鎖207にハイブリダイズすることができる。

[0078] 第2のDNAプローブ208中のチップ識別タグは、細胞識別タグと同様、4塩基のランダム配列であり、これによって最大256チップの識別が可能となる。また、20種類の遺伝子特異的配列（例えば、ATP5B、GAPDH、GUSB、HMBS、HPR T1、RPL4、RPLP1、RPS18、RPL13A、RPS20、ALDOA、B2M、EEF1G、SDHA、TBP、VIM、RPLP0、RPLP2、RPLP27およびOAZ1の遺伝子特異的配列）に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塩基を用いた。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事で、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、1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。

[0079] 2nd cDNA鎖304を合成完了後、上部共通インレット107から上部共通アウトレット108に向かって大量の緩衝溶液を流し、共通供給流路105の領域116に留まっているミネラルオイルを洗い流す。緩衝溶液を流す目的は、4つの反応室102の間の流路を再び接続することであるので、多少のミネラルオイルが領域116に残ってもよい。

[0080] (ステップ5及び6)

最後に、共通プライマーによるPCR増幅を実行する。まず、滅菌水49. μ Lと、10 x High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen) 10 μ Lと、2.5 mM dNTP mix 10 μ Lと、50mM MgSO₄ 4 μ Lと、10 μ MのPCR増幅用共通配列プライマー (Forward) 10 μ Lと、10 μ MのPCR増幅用共通配列プライマー (Reverse) 10 μ Lと、Platinum Taq Polymerase High Fidelity (Invitrogen社) 1.5 μ Lとを混和して試薬を作製する。また、フローセルデバイス101の共通吸引流路109を満たしている溶液を下部共通アウトレット110から排出する。

[0081] その後、作製した前記試薬を前工程と同様、上部共通インレット107を通じて共通供給流路105に導入する。続いて、フローセルデバイス101の全体を30秒間94℃に保ち、その後、94℃で30秒間→55℃で30秒間→68℃で30秒間の3段階の工程を40サイクル繰り返す。最後に、フローセルデバイス101の全体を3分間68℃に保った後、4℃に冷却することにより、PCR増幅工程を行う。この反応は共通反応である。従って、全てのチップについて共通の試薬条件によるPCR増幅が行われることになり、チップ間における増幅効率が均一化される。

[0082] この増幅過程において、20種のターゲット遺伝子の目的部分が増幅される。ただし、いずれのPCR産物も、そのサイズは200±8塩基とほぼ均一である。最後に、溶液中に蓄積されたPCR増幅産物の溶液を回収する。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/Reverse) や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

製する。

[0083] 得られたPCR産物215は、配列解析の可能配列であり（正確には配列解析の前処理（エマルジョンPCRなど）が可能な配列であり）、シーケンシングライブラリと呼ばれる。また、この工程において遺伝子間又は分子間で増幅バイアスが生じたとしても、次世代シーケンシングデータの取得後に、分子認識タグ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出来る。

[0084] このシーケンシングライブラリを配列解析することによって、細胞識別配列、チップ識別配列ごとに遺伝子発現量が得られる。すなわち、フローセルデバイス中に同時に導入された細胞識別配列の種類とチップ識別配列の種類の積の数以下の細胞数についての同時解析が可能となる。これにより、事前に2次元アレイチップ中に導入した細胞識別配列数よりも大幅に多い数の細胞数の解析が可能となる。

[0085] ここまで、ビーズ表面で生成したcDNA(1st cDNA)にPCR増幅用の共通配列が付加されている数十種類の遺伝子特異的配列プライマーを用いて2nd cDNA鎖304を合成し、PCR増幅する例について説明した。勿論、増幅手法はPCR増幅に限らず、ローリングサークル増幅(RCA)、NASBA、LAMP法など他の増幅法を用いても良い。

[0086] （2次元アレイチップの構造と作製方法）

ここでは、図5を用い、磁性ビーズ601を用いて構成される2次元アレイチップ115の構造と作製方法について説明する。2次元アレイチップ115は、PDM S（ポリジメチルシロキサン）製のチップ503として作製される。チップ503には、細胞捕捉部103、磁性ビーズ601を充填した核酸捕捉部104、これらを結ぶ流路504が形成される。なお、チップ503は、細胞捕捉部103に対応する多数の凹構造と、その底面（図中は上面）に形成された小口径の流路504とで構成される。この構造は、射出成型により作製される。流路504は、直径10 μ mの貫通孔であり、125 μ m間隔にアレイ状に配置される。流路504を挟んで上面側の領域が細胞捕捉部103であり、流路504を挟んで下面側（凹部）が核酸捕捉部1

04に対応する。

[0087] チップ503の大きさは一辺が1.125mmの正方形であり、図5の場合、その内部に細胞捕捉部103が 7^2 個配置されている。この個数は一例であり、例えば 10^2 個でも良い。細胞捕捉部103の直下の凹部を形成する筒状の貫通孔の直径は $75\mu\text{m}$ であり、この部分に磁性ビーズ601を充填して核酸捕捉部104とする。この貫通孔をアレイ状に配置したチップ503の下面には、前記貫通孔（凹部）の位置に対応付けて多数の細孔を配置した細孔アレーシート502が配置される。細孔アレーシート502の細孔の直径は磁性ビーズ601の直径である $1\mu\text{m}$ よりも小さく、 200nm とする。細孔アレーシート502で前記貫通孔（凹部）の下面側の開口を塞ぐことにより、磁性ビーズ601は前記貫通孔（凹部）に保持されたままとなる。また、細孔アレーシート502に形成された細孔により、反応室102の上面側と下面側（共通吸引流路109）の間での溶液の流れが確保される。

[0088] 上記磁性ビーズ601の充填には、インクジェットプリンタヘッドを用いて実行する。すなわち、チップ503の上下面を逆転させた状態で、個々の領域毎に異なる配列を付した第1のDNAプローブ201を固定した磁性ビーズ601の溶液を、核酸捕捉部104としての空間に 2nL ずつ充填する。このとき充填に用いる磁性ビーズ601の溶液は、直径 $1\mu\text{m}$ の磁性ビーズ601が 5×10^9 個/mLの数密度で懸濁されている。また、磁性ビーズ601上には、ストレプトアビジンが固定されており、このストレプトアビジンを介して5' ビオチン基修飾された第1のDNAプローブ201が固定される。インクジェットプリンタヘッドを用いて磁性ビーズ601の溶液を核酸捕捉部104に吐出するとき、溶媒は細孔アレーシート502中の細孔の内壁が親水表面であるため毛細管現象によってビーズ溶液中の水分のみを吸収して、磁性ビーズ601が核酸捕捉部104に残る。

[0089] 細孔アレーシート502は、多孔質のガラスから構成されるモノリスシート、毛細管を束ねてスライスしたキャピラリープレート、ナイロンメンブレン、ゲル薄膜など種々のものを用い得るが、本実施例では、アルミナを陽極酸化して得た細孔アレーシートを用いた。このような細孔アレーシート502は、陽極酸化により自作することもできるが、孔径 $20\text{nm} \sim 200\text{nm}$ 、直径 25mm のものが

市販品として入手可能である。本実施例では、上記の通り、孔径が200nmの細孔アレーシート502を使用する。この細孔アレーシート502中の細孔が核酸捕捉部104と下部共通流路109とを接続する下部流路501となる。

[0090] 前述の説明では、チップ503をPDMSで作製しているが、ナノインプリント技術や射出成型によって作製した樹脂（ポリカーボネート、サイクリックポリオレフィン、ポリプロピレン）製の基板、市販のナイロンメッシュやトラックエッチメンブレンを用いてチップ503としても良い。チップ503と細孔アレーシート502との接着には熱接着を用いることもできる。チップ503と細孔アレーシート502を一体化することで2次元アレイチップ115が構成される。

[0091] なお、磁性ビーズ601上に、固有のタグ配列を有する第1のDNAプローブ201を固定するには、固有のタグ配列毎に別々の反応チューブを用意し、その中で、磁性ビーズ601とDNAプローブ溶液とを1.5M NaClを含むTris バッファ(pH 7.4)中で混和し、10分回転させながら結合反応させれば良い。

[0092] 前述の手法で作製した細孔アレーシート502は繰り返し利用可能であり、発現量を知る必要がある遺伝子群については、PCR増幅用共通配列プライマー(Reverse)が付加された遺伝子特異的配列プライマーMix溶液を作製し、上記と同様に2nd cDNA鎖の合成、PCR増幅、およびemPCRを施し、次世代シーケンサにて解析を行えば良い。すなわち、cDNAライブラリを繰り返し利用することによって、高精度な発現分布測定を必要な種類の遺伝子について行うことが可能である。

[0093] （単一細胞解析処理：第2の調整方法）

続いて、前述の第2の調整方法に対応する処理を説明する。第2の調整方法も、前述のフローセルデバイス101（図5、図6）を用いて実行でき、次世代シーケンサ用のシーケンシングライブラリを容易に調製することができる。

[0094] 以下、前述の第2の調整方法との相違点についてのみ説明する。ステップ1の相違点は、核酸捕捉部104の内壁に固定する第1のDNAプローブ301（図3）の配列として、共通PCRプライマー（Reverse）の代わりに、塩基長が10塩基

と短い共通接続配列302を用いる点のみである。ステップ2は、前述の第1の調整方法と全く同じである。

[0095] ステップ3の相違点は、2nd cDNA鎖の合成時に使用する第2のDNAプローブ303が、チップ識別配列を含んでいない点である。すなわち、20種の第2のDNAプローブ303の混合溶液は、2次元アレイチップ115毎に個別インレット111、112、113、114を通じて導入するのではなく、第1の調整方法のステップ1及び2と同様に、全ての2次元アレイチップ115に対して同じ配列を有する第2のDNAプローブ303の混合溶液が上部共通インレット107から共通供給流路105を介して導入される。

[0096] さらに、ステップ4では、第1の調整方法と同じように、フローセルデバイス101の全体の温度を72℃に6分間を上げることによって相補鎖伸長反応を行い、2nd cDNA鎖を合成させる。ステップ5では、合成された2nd cDNA鎖304に対して、第3のDNAプローブ305（PCR共通306と、第2のチップ識別配列307と、相補配列308とから構成される）をハイブリダイズさせる。

[0097] この処理を実行するために、滅菌水69μLと、10 x Ex Taq Buffer (TaKaRa Bio社) 10μLと、2.5mM dNTP Mix 100μLと、各10μMのPCR増幅用共通配列(Reverse)が付加されたチップ識別タグ付きの10種類のチップ識別タグを含む第3のDNAプローブ308の混合溶液10μLと、Ex Taq Hot start version (TaKaRa Bio社)1μLを混和し、この混合試薬を前工程と同様に上部インレット107から共通供給流路105を通じて、各反応室102の核酸捕捉部104に導入する。10種類の第3のDNAプローブは2次元アレイチップごとに個別に導入する。導入方法は、前述した第1の調整方法と全く同じである。次に、フローセルデバイス101の全体の温度を72℃に6分間上げて相補鎖伸長反応を行い、タグ配列の導入を完了する。最後のステップ6では、第1の調整方法と同じ方法でPCR増幅を実行し、PCR増幅産物309としてシーケンシングライブラリを構築する。

[0098] [単一細胞解析装置]

図8に、前述のフローセルデバイス101を用いて第1の調整方法又は第2の

調整方法を自動的に実行することができる単一細胞解析装置の構成例を示す。この単一細胞解析装置は、第1の調整方法又は第2の調整方法を自動制御で実行し、フローセルデバイス101中に試薬を導入して反応させることができる。

[0099] 図8は、特に送液制御系に着目した、単一細胞解析装置の構成を示している。単一細胞解析装置の制御コンピュータ1309は、細胞導入制御装置1311、試薬導入制御装置1312、ステージ制御系1313、上部試薬排出装置1314、下部試薬排出装置1315、温度制御系1316を適切に制御する。

[0100] 細胞導入制御装置1311は、細胞のフローセルデバイス101への細胞106の導入を制御する。試薬導入制御装置1312は、細胞106を破砕するための細胞溶解液の導入、cDNA合成又はPCR増幅のための酵素試薬の導入、第2および第3のDNAプローブの導入、反応室102を分離するためのミネラルオイル等の導入を制御する。細胞導入制御装置1311と試薬導入制御装置1312は、共通の配管を通じて上部共通インレット107と接続されている。ステージ制御系1313は、顕微鏡観察のため、フローセルデバイス101の観察視野（フローセルデバイス101を載置するステージのXYZ位置）の変更を制御する。上部試薬排出装置1314は、不要な試薬、細胞、反応室102を分離するためのミネラルオイル等の排出を制御する。上部試薬排出装置1314と上部共通アウトレットは専用の配管で接続されている。下部試薬排出装置1315は、(1) 2次元アレイチップ115への細胞106の導入、(2) 各種酵素試薬、第2及び第3のDNAプローブ、基質等を導入するための吸引、(3) 調製された核酸増幅産物の排出等を制御する。下部試薬排出装置1315と下部共通アウトレット110は専用の配管で接続されている。温度制御系1316は、フローセルデバイス101中の温度（反応温度）を制御する。

[0101] 細胞導入制御装置1311と試薬導入制御装置1312は、適切な温度で保存された細胞106、各種試薬（酵素試薬、基質、第2及び第3のDNAプローブ、プライマー）を、適切なタイミングでフローセルデバイス101の共通供給流路105、又は、個別インレット111、112、113、114に導入する。このため、細胞導

入制御装置1311と試薬導入制御装置1312は、切り替えバルブを適切に開閉し、装置内部の配管を切り替える。

[0102] 上部試薬排出装置1314及び下部試薬排出装置1315は、その内部にシリンジポンプなどを有し、試薬や細胞溶液を吸引して排出する。勿論、前記シリンジに蓄積された廃液は、廃液ボトル等に排出できるように構成されている。温度制御系1316は、反応室102の温度を4℃～98℃の間で温度を制御する能力を有し、ペルチェ素子とその制御装置から構成されている。ステージ制御系1313については実施例3で説明する。

[0103] 前記第1の調整方法の自動実行時、図8に示す単一細胞解析装置は、制御コンピュータ1309を用いて以下に示す一連の制御を実行する。

[0104] (ステップ1)

このステップにおいて、制御コンピュータ1309は、細胞106の捕捉処理と核酸206の捕捉処理を実行する。まず、制御コンピュータ1309は、細胞導入制御装置1311を制御し、細胞106を含む溶液を溶液チューブから上部共通インレット107に導入する。次に、制御コンピュータ1309は、上部試薬排出装置1314を制御し、反応室102を細胞溶液で一旦満たす。続いて、制御コンピュータ1309は、下部試薬排出装置1315を制御し、2次元アレイチップ115上に細胞106を捕捉する。

[0105] 次に、制御コンピュータ1309は、過剰な細胞溶液中の細胞106を、上部試薬排出装置1314を制御して吸引すると共に、細胞溶解液を上部共通インレット107から導入する。細胞106を導入する場合と同様、制御コンピュータ1309は、下部試薬排出装置1315を制御し、共通吸引流路109を通じて細胞溶解液を吸引し、核酸(mRNA) 206を核酸捕捉部104に捕捉する。このとき、制御コンピュータ1309は、温度制御系1316を用いて、反応室102内の温度を25℃程度(mRNAの捕捉が高効率で起こる温度)に制御する。

[0106] (ステップ2)

1st cDNA鎖を合成するために、制御コンピュータ1309は、試薬導入制御装置1312を用いて、cDNA合成試薬を上部共通インレット107から導入する。次に、

制御コンピュータ1309は、上部試薬排出装置1314を用いて反応室102を試薬で満たし、その後、下部試薬排出装置1315を用いて、下部共通アウトレット110に負圧を印加する。これにより、cDNA合成試薬が、反応室102から2次元アレイチップ115の内部に導入される。

[0107] 制御コンピュータ1309は、温度制御系1316を用いて、一定の反応時間の間、フローセルデバイス101の温度を適切に制御し、cDNA合成反応が終了する。この後、制御コンピュータ1309は、温度制御系1316を用いて、反応室102を85℃に加温することで、cDNA合成酵素を失活させ、上記と同様、RNase試薬を2次元アレイチップ115に導入する。

[0108] (ステップ3及び4)

制御コンピュータ1309は、試薬導入制御装置1312を制御して、酵素試薬溶液を上部共通インレット107に導入する。試薬導入制御装置1312と上部共通インレット107とは配管で接続されている。これにより、前記と同様、共通供給流路105に接続された各反応室102の各2次元アレイチップ115に上記試薬が導入される。次に、制御コンピュータ1309は、ミネラルオイル及び塩を含むバッファを上部共通インレット107から導入すると共に、上部試薬排出装置1314から吸引する。これにより、共通供給流路105に直列に接続された4つの反応室102がミネラルオイルによって互いに分離される。この後、制御コンピュータ1309は、試薬導入制御装置1312の制御を通じて、チップ識別配列の異なる第2のDNAプローブ208を含む緩衝溶液をそれぞれに対応する個別インレット111、112、113、114に接続し、更に下部試薬排出装置1315を制御して、2次元アレイチップ115内にDNAプローブ溶液を導入する。

[0109] (ステップ5及び6)

2nd cDNA鎖304の合成が完了すると、制御コンピュータ1309は、試薬導入制御装置1312を制御して上部共通インレット107に洗浄バッファを導入すると共に、上部試薬排出装置1314を制御して反応室102の分離に用いたミネラルオイルを共通供給流路105の領域116から排出する。この後、制御コンピュータ1309は、共通プライマーとPCR増幅試薬を上部共通インレット107に導入し、前記

工程と同様、試薬を２次元アレイチップ115内に導入する。その後、制御コンピュータ1309は、PCR反応のために、温度制御系1316を用いて所定の温度サイクルを印加してPCR増幅する。

[0110] なお、前述の第２の調整方法を実行する場合、制御コンピュータ1309は、第２のDNAプローブ208を上部共通インレット107から導入し、第３のDNAプローブ308を個別インレット111、112、113、114から導入する。それ以外の動作は、基本的に第１の調整方法と同じである。

[0111] [実施例２]

本実施例では、個々の細胞106の中に含まれる核酸（mRNA）206が、アレイ状に配置された細胞群のどの細胞に由来するかの情報を保持した状態でcDNAライブラリを構築するための別の手法を説明する。本実施例では、核酸捕捉部104として、磁気ビーズ601の代わりに、DNAプローブを固定した細孔アレーシートを使用する。細孔アレーシートを用いることで、フローセルデバイス101に２次元アレイチップ115をセットするときに磁気ビーズ601が核酸捕捉部104の間に混じってしまうリスクを回避できる。

[0112] 図９に、本実施例に係るフローセルデバイス101の構造を示し、図１０に、本実施例で使用する２次元アレイチップ115の構造を示す。図１１に、２次元アレイチップ115の拡大断面図を示し、図１２に第２の調整方法についての反応過程を示す。

[0113] 以下、実施例１との相違点についてのみ説明する。フローセルデバイス101の構造は、２次元アレイチップ115が半導体プロセスで作製されている点のみ異なっている。２次元アレイチップ115の具体的な構造は、図１０に示す通りである。図１０(a)は、２次元アレイチップ115の面に対して垂直に切断した断面図である。図１０(b)は、図１０(a)のA-A'断面を上面側から見た断面図であり、図１０(c)は、図１０(a)のB-B'断面を上面側から見た断面図である。

[0114] 本実施例の場合、核酸捕捉部104を構成する細孔アレーシートは、厚さ $5\mu\text{m}$ の SiO_2 膜1002中に直径 $0.3\mu\text{m}$ の貫通孔1001を $0.5\mu\text{m}$ ピッチで形成した。また、

本実施例では、核酸捕捉部104となる貫通孔1001の内壁面にシランカップリング剤を用いて第1のDNAプローブ301を固定している。なお、細胞捕捉部103を構成するテーパ状の凹部の直径（最上部）は10 μ mである。細胞捕捉部103は、厚さ10 μ mのポリイミド樹脂膜1003にリソグラフィを用いて開口部を形成することによって作製した。

[0115] 次に、第1のDNAプローブ301の核酸捕捉部104への固定方法について説明する。核酸捕捉部104となる貫通孔1001の内壁面をシラン処理するために、0.3mg/mlのシラン化プリング剤GTMSi（GTMSi：3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane信越化学）、及び、酸触媒である0.02%酢酸を含む水溶液を反応デバイス中に導入し、2時間反応させる。反応デバイス内容積の100倍量のエタノールを反応デバイス内に導入することによってデバイス内部を洗浄した後、溶液を全て排出し、更に、110℃で2時間熱反応させる。

[0116] 次に、1 μ Mストレプトアビジン溶液を反応デバイスに導入し、6時間室温にて反応させ、ストレプトアビジンを反応デバイスの領域に固定する。続いて、未反応グリシド基をブロックし、過剰なDNAプローブを除去するために、デバイス内容積の10倍量の10mMのグリシンと、0.01%SDSと、0.15MのNaClを含むホウ酸バッファ（pH 8.5）とを5分かけて導入しながら排出し、更に、内容積の10倍量の60℃に加熱された0.01%のSDSと、0.3M NaClを含む30mMクエン酸ナトリウムバッファ（2xSSC, pH 7.0）を導入しながら排出する。最後に、内容積の100倍量の0.1%Tween 20を含む10mTrisを導入しながら排出して洗浄を完了する。

[0117] さらに、内容積と等量の10 μ Mの5'末端をビオチン修飾した第1のDNAプローブ301と1MのNaCl及び0.1%のTween20を含む10mMのTrisHCl溶液を反応デバイスに導入し、30分反応させた後、再度、前記10倍量の60℃に過熱された2 $\times$ SSCバッファを導入又は排出した後、100倍量の0.1%Tween 20を含むTris HClバッファを反応デバイスに導入しながら排出することで洗浄し、固定化反応を完了した。

[0118] なお、反応プロセスは実施例1の第の調整方法2と同じである。

[0119] [実施例3]

前述の実施例1及び2では、上面側に共通供給流路105（上部共通インレット107及び上部共通アウトレット108が対応）と個別の流体流路（個別インレット111、112、113、114が対応）が形成され、下面側に共通吸引流路109（下部共通アウトレット110が対応）が形成されているフローセルデバイス101を使用した。

[0120] 本実施例では、図13及び図14に示すように、フローセルデバイス101（図1）の上面側から、上部共通インレット107、共通供給流路105、上部共通アウトレット108を除去した構造のフローセルデバイス101を使用する。特に、図14に示すフローセルデバイス101は、2次元アレイチップ115の上部が開口となっており、直接、2次元アレイチップ115の上面に細胞溶液を滴下したり、顕微鏡観察したりできる構成となっている。その他の構成は、図1の場合と同じである。本実施例に係るフローセルデバイス101は、実施例1及び2のフローセルデバイス101に比して構造が単純で済む。

[0121] 図15に、本実施例で使用する単一細胞解析装置の構成例を示す。図8に示す実施例1及び2の単一細胞解析装置との違いは、本実施例に係る細胞導入制御装置では、酵素試薬やDNAプローブを導入する試薬導入制御装置1312に代えて、これらの機能を兼ね備える細胞／試薬導入制御装置1317が設けられ、細胞106及び試薬の導入が4つの個別インレット111～114を通じて実現される点である。本実施例の場合、4つの反応室102に同じ溶液を導入する場合、4つの個別インレット111～114に同じ溶液を導入し、各反応室102に個別の溶液を導入する場合、4つの個別インレット111～114にそれぞれ対応する溶液を導入する。

[0122] 実施例1及び2において上部共通インレット107から導入した試薬等は、本実施例の場合、個別インレット111～114を通じて導入する。なお、本実施例において導入する試薬等の組成や分量は、実施例1及び2と同じである。また、実施例1及び2においては、上部試薬排出装置1314で反応室102を溶液で満たしてから、下部試薬排出装置1315を用いて2次元アレイチップ115中に試

薬を導入していたが、本実施例では、2次元アレイチップ115の上部の反応室102を試薬で満たすか、2次元アレイチップ115の上面を液で覆うだけの分量の試薬を個別インレット111~114から導入し、その後、下部試薬排出装置1315を用いて共通吸引流路109を負圧に制御することで、2次元アレイチップ115中に試薬を導入することができる。

[0123] また、本実施例の場合、反応室102を相互に分離する必要がないため、ミネラルオイル等の導入と洗浄の工程の実行するための制御プログラムは不要となる。その他の装置の動作は基本的に実施例1と同じである。

[0124] [実施例4]

2次元アレイチップ115を用いた遺伝子発現解析では、フローセルデバイス101（細孔アレイシートを含む）などの平面型デバイス上における細胞の捕捉位置と、遺伝子発現解析結果とを対応させることができる。例えば遺伝子発現解析のために細胞106を破碎して詳細な遺伝子発現解析を行う前に、細胞106が生きた状態での形状の取得、蛍光染色による遺伝子や蛋白質の定量、又はラマンイメージングの取得を実行し、これらのデータと遺伝子発現解析データとを対応させることができる。本実施例では、この機能を実現するためのシステム構成について説明する。

[0125] 図16に、単一細胞解析装置（図8）と光学顕微鏡を組み合わせた構成を示す。図16は、フローセルデバイス101の2次元アレイチップ115上に細胞106が捕捉された状況を示している。フローシステム1201は、単一細胞解析装置（図8）に相当し、前述の実施例と同様、フローセルデバイス101中で細胞106から核酸（mRNA）206の抽出とその増幅とを実行する。フローシステム1201の上方位置には、光学顕微鏡1203が配置されている。矢印1211は、増幅産物の移動を示している。フローセルデバイス101で調製された増幅サンプルとしてのシーケンシングライブラリに基づいて、次世代（大規模）DNAシーケンサ1205は細胞106の配列を決定する。

[0126] 本実施例の場合、配列の決定に先立って、フローセルデバイス101上での位置が特定された細胞106の観察を光学顕微鏡1203により実行する。図中に細線

で示す矢印は、情報の移動方向を示している。光学顕微鏡1203には、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー走査共焦点蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、非線形ラマン顕微鏡（CARS顕微鏡、SRS顕微鏡、RIKE顕微鏡）、IR顕微鏡等が含まれる。これらの光学顕微鏡1203によって得られる情報は、遺伝子情報に関する限り情報が少ない。

[0127] しかし、光学顕微鏡1203は、基本的に、細胞106が生きた状態で計測することができる。すなわち、細胞106の経時変化、例えば刺激に対する細胞の応答をリアルタイムに計測することができる。フローセルデバイス101上での位置情報を保存したデバイスを利用することによって、遺伝子発現に関する詳細情報と光学顕微鏡による時間変化を含む情報とを対応させることができる。

[0128] この対応付けの実現のため、本実施例では、次世代（大規模）DNAシーケンサ1205からの配列情報1212と、光学顕微鏡像1203から情報1213と、タグ配列を対応付けた位置情報1214とを統合する情報統合システム1206を設けている。細胞106の計測情報を統合する情報統合システム1206の最小構成は、次世代（大規模）DNAシーケンサ1205以外のシステム1207であり、次世代（大規模）DNAシーケンサ1205との間で情報の入力とサンプル（核酸増幅産物）の出力を行う機能を有している。

[0129] 次に、フローシステム1201について説明する。図16では、フローセルデバイス101を構成する細孔アレーシート上に細胞106が捕捉された状態を示している。計測したい蛋白質（例えばp53）にGFPを発現させるか免疫染色により、細胞106中の特定の蛋白質には蛍光体が導入されている。個々の細胞106についての発現蛋白量のデータは、細胞106を破砕した後、細孔アレーシート上でサンプル処理し、DNAシーケンシングして定量することで得られる遺伝子発現量と相関を取ることができる。この際、細胞106を認識するために、DAPIによって核酸を染色し、細胞核を認識することによって、細胞位置を蛍光顕微鏡によって識別している。

[0130] 蛋白質は、GFPの発現で計測しているため経時変化を追うことができるが、同時に計測可能な蛋白質の種類は数種類程度である。一方、シーケンシング

による遺伝子発現解析は一度に100種類程度は可能であり、プローブを用意すれば1000種類程度の解析も可能である。それゆえ、細胞内の詳細な遺伝子発現制御に関する情報が個々の細胞毎に得られる。しかし、遺伝子発現解析では経時変化を捉えることができない。しかし、両者を組み合わせることによって、どのような蛋白質の発現のときに、どのような遺伝子発現があるかというデータが事前に得られていれば、蛋白質の発現データのみから遺伝子制御に関する情報を推定することが可能となる。この蛍光顕微鏡データと遺伝子発現データとの対応付けと遺伝子制御に関する情報の推定を情報統合システム1206で実行する。

[0131] 次に、光学顕微鏡1203が蛍光顕微鏡である場合について説明する。蛍光顕微鏡は、光源1300、励起フィルタ1301、ダイクロイックミラー1302、エミッションフィルタ1303を有する。光源1300には、例えば水銀ランプを使用する。励起フィルタ1301により励起波長が決まる。エミッションフィルタ1303により受光波長が選択される。

[0132] 細胞106に導入された複数種類の蛍光体を同時に計測する場合、制御コンピュータ1308は、制御信号1304によって、励起フィルタ1301、ダイクロイックミラー1302、エミッションフィルタ1303を選択し、特定の蛍光体からの光のみを計測する。細胞106の蛍光イメージは、対物レンズ1305、結像レンズ1306、CCDカメラ1307によって取得する。前記制御コンピュータ1308は、これらを制御し、画像データを取得する。

[0133] また、制御コンピュータ1308は、XYステージ1310を制御し、顕微鏡像を移動させる。このとき、制御コンピュータ1308は、細孔アレイシート上の位置座標と、細胞認識タグの配列データと、XYステージの位置座標から計算される顕微鏡像上の位置座標とを対応付けることができる。

[0134] 最終的に得られた核酸増幅産物は、次世代（大規模）DNAシーケンサ1205において配列解析される。このとき、シーケンシングのためのemPCRやブリッジアンプは、このシステムの中で実行される。制御コンピュータ1308上で照合された画像の位置情報と細胞認識タグ配列情報は情報統合システム1206に送

信され、蛍光イメージから得られる蛋白量と遺伝子発現量との対応付けを行う。さらに、同じシステムにおいて、遺伝子発現解析データの経時変化を推定する。これにより、遺伝子発現ネットワークのダイナミクスを計測することが可能となる。

[0135] また、この蛍光顕微鏡は、細胞内の計測のみならず、捕捉サイトカイン等の細胞から分泌される物質を抗体によって免疫蛍光染色してその量を計測するために用いてもよい。もちろん、同様にして、破碎後の遺伝子発現量の解析に用いても良い。蛍光顕微鏡の代わりに微分干渉顕微鏡やラマン顕微鏡を組み合わせることも同様に行うことができる。

[0136] [他の実施例]

本発明は、上述した実施例に限定されるものでなく、様々な変形例を含んでいる。例えば、上述した実施例は、本発明を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備える必要はない。また、ある実施例の一部を他の実施例の構成に置き換えることができる。また、ある実施例の構成に他の実施例の構成を加えることもできる。また、各実施例の構成の一部について、他の実施例の構成の一部を追加、削除又は置換することもできる。

[0137] また、上述した各構成、機能、処理部、処理手段等は、それらの一部又は全部を、例えば集積回路で設計する等によりハードウェアで実現しても良い。また、上記の各構成、機能等は、プロセッサがそれぞれの機能を実現するプログラムを解釈し、実行することにより（すなわちソフトウェア的に）実現しても良い。各機能を実現するプログラム、テーブル、ファイル等の情報は、メモリ、ハードディスク、SSD (Solid State Drive) 等の記憶装置、又は、ICカード、SDカード、DVD等の記憶媒体に格納することができる。また、制御線や情報線は、説明上必要と考えられるものを示すものであり、製品上必要な全ての制御線や情報線を表すものでない。実際にはほとんど全ての構成が相互に接続されていると考えて良い。

符号の説明

- [0138] 101 フローセルデバイス
102 反応室
103 細胞捕捉部
104 核酸捕捉部
105 共通供給流路
106 細胞
107 上部共通インレット
108 上部共通アウトレット
109 共通吸引流路
110 下部共通アウトレット
111、112、113、114 個別インレット
115 2次元アレイチップ
116 領域
201 第1のDNAプローブ
202 捕捉配列
203 細胞識別配列
204 共通配列
206 核酸(mRNA)
207 1st cDNA鎖
208 第2のDNAプローブ
209 共通プライマー
210 チップ識別配列
211 遺伝子特異的プローブ
212 2nd cDNA
213、214 共通プライマー
215 PCR産物
301 第1のDNAプローブ
302 共通接続配列

- 303 第2のDNAプローブ
- 304 2nd cDNA鎖
- 305 第3のDNAプローブ
- 306 PCR共通プライマー
- 307 第2のチップ識別配列
- 308 相補配列
- 309 PCR増幅産物
- 501 下部流路
- 502 細孔アレーシート
- 503 チップ
- 601 磁気ビーズ
- 1001 貫通孔
- 1002 SiO₂膜
- 1201 フローシステム
- 1203 光学顕微鏡
- 1205 次世代（大規模）DNAシーケンサ
- 1206 情報統合システム
- 1207 DNAシーケンサ1205以外のシステム
- 1212 配列情報
- 1213 情報
- 1214 位置情報
- 1300 光源
- 1301 励起フィルタ
- 1302 ダイクロイックミラー
- 1303 エミッションフィルタ
- 1304 制御信号
- 1305 対物レンズ
- 1306 結像レンズ

- 1307 CCDカメラ
- 1308 制御コンピュータ
- 1309 制御コンピュータ
- 1311 細胞導入制御装置
- 1312 試薬導入制御装置
- 1313 ステージ制御系
- 1314 上部試薬排出装置
- 1315 下部試薬排出装置
- 1316 温度制御系
- 1317 細胞／試薬導入制御装置

請求の範囲

- [請求項1] それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する、複数の反応室と、
- 第1の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第1の液体流路と、
- 前記第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第2の液体流路と、
- 前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第3の液体流路と
- を有する単一細胞解析用フローセルデバイス。
- [請求項2] 請求項1に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、
- 前記細胞捕捉部と前記核酸捕捉部は一対一に対応付けられていることを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。
- [請求項3] 請求項1に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、
- 前記細胞捕捉部は前記第1の面側に配置され、前記核酸捕捉部は前記第2の面側に配置される
- ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。
- [請求項4] 請求項1に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、
- 前記核酸捕捉部は、多孔質構造又は多数のビーズをパックした構造である
- ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。
- [請求項5] 請求項1に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、
- 前記核酸捕捉部のDNAプローブには、前記核酸捕捉部の配置位置を識別するための配列と、核酸を捕捉するための捕捉配列とが含まれる
- ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。
- [請求項6] 請求項1に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、
- 前記複数の反応室の内壁はいずれも親水処理されており、前記複数の反応室を接続する前記第1の液体流路の内壁面は疎水処理されてい

る

ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項7] それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する、複数の反応室と、

第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第1の液体流路と、

前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第2の液体流路と

を有する単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項8] 請求項7に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、前記細胞捕捉部と前記核酸捕捉部は一対一に対応付けられていることを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項9] 請求項7に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、前記細胞捕捉部は前記第1の面側に配置され、前記核酸捕捉部は前記第2の面側に配置される

ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項10] 請求項7に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、前記核酸捕捉部は、多孔質構造又は多数のビーズをパックした構造である

ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項11] 請求項7に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、前記核酸捕捉部のDNAプローブには、前記核酸捕捉部の配置位置を識別するための配列と、核酸を捕捉するための捕捉配列とが含まれることを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項12] 請求項7に記載の単一細胞解析用フローセルデバイスにおいて、前記第1の液体流路は、前記細胞捕捉部を外部に露出させる前記反応室の開口として形成される

ことを特徴とする単一細胞解析用フローセルデバイス。

[請求項13] それぞれが、流路を通じて接続された少なくとも1つの細胞捕捉部と少なくとも1つの核酸捕捉部とを有する複数の反応室と、第1の面側において、前記複数の反応室に対して一対一に接続される複数の第1の液体流路と、前記第1の面と対向する第2の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第2の液体流路とを有する単一細胞解析用フローセルデバイスが載置されるステージと、

 前記ステージの位置を制御するステージ制御系と、

 前記複数の第1の流体流路に対する第1の液体の導入を個別に制御する導入制御装置と、

 前記第2の流体流路からの第2の液体の排出を制御する排出制御装置と

 を有する単一細胞解析装置。

[請求項14] 請求項13に記載の単一細胞解析装置において、

 前記単一細胞解析用フローセルデバイスが有する、前記第1の面側において、前記複数の反応室に対して共通に接続される第3の液体流路に対して第3の液体を導入する第2の導入制御装置と、

 前記第3の液体を前記第3の液体流路から排出する第2の排出制御装置と

 を更に有することを特徴とする単一細胞解析装置。

[請求項15] 請求項13に記載の単一細胞解析装置において、

 前記単一細胞解析用フローセルデバイスを観察し、観察領域から取得された情報を前記ステージ制御系より取得した位置情報に対応付ける光学顕微鏡と、

 前記単一細胞解析用フローセルデバイスの前記核酸捕捉部毎に得られた核酸増幅産物の配列を解析し、解析結果を前記ステージ制御系より取得した位置情報に対応付けるDNAシーケンサと、

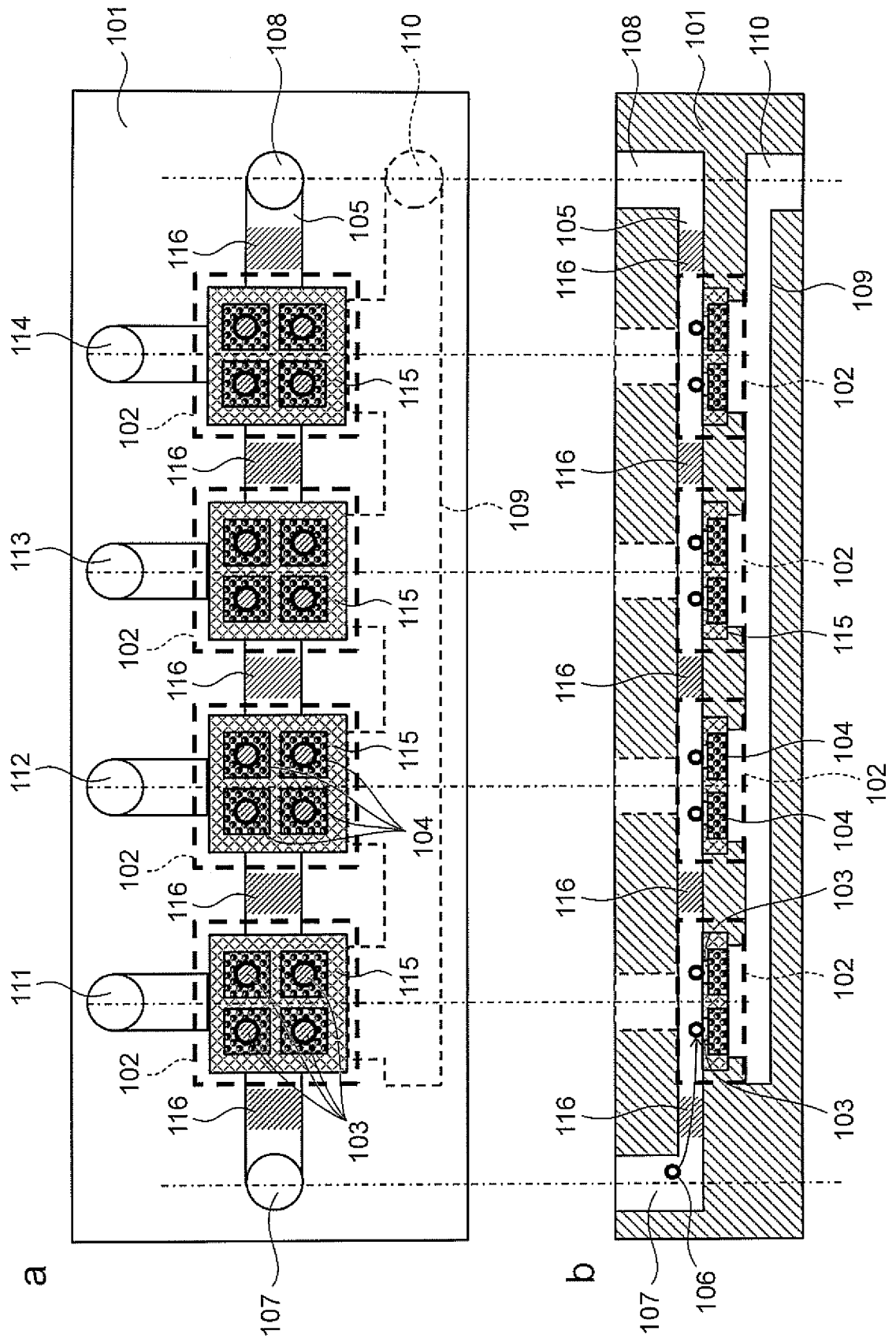
 前記光学顕微鏡が観察領域から取得した前記情報と、前記DNAシーケンサが取得した前記核酸捕捉部毎の解析結果とを統合する情報統合

システムと

を更に有することを特徴とする単一細胞解析装置。

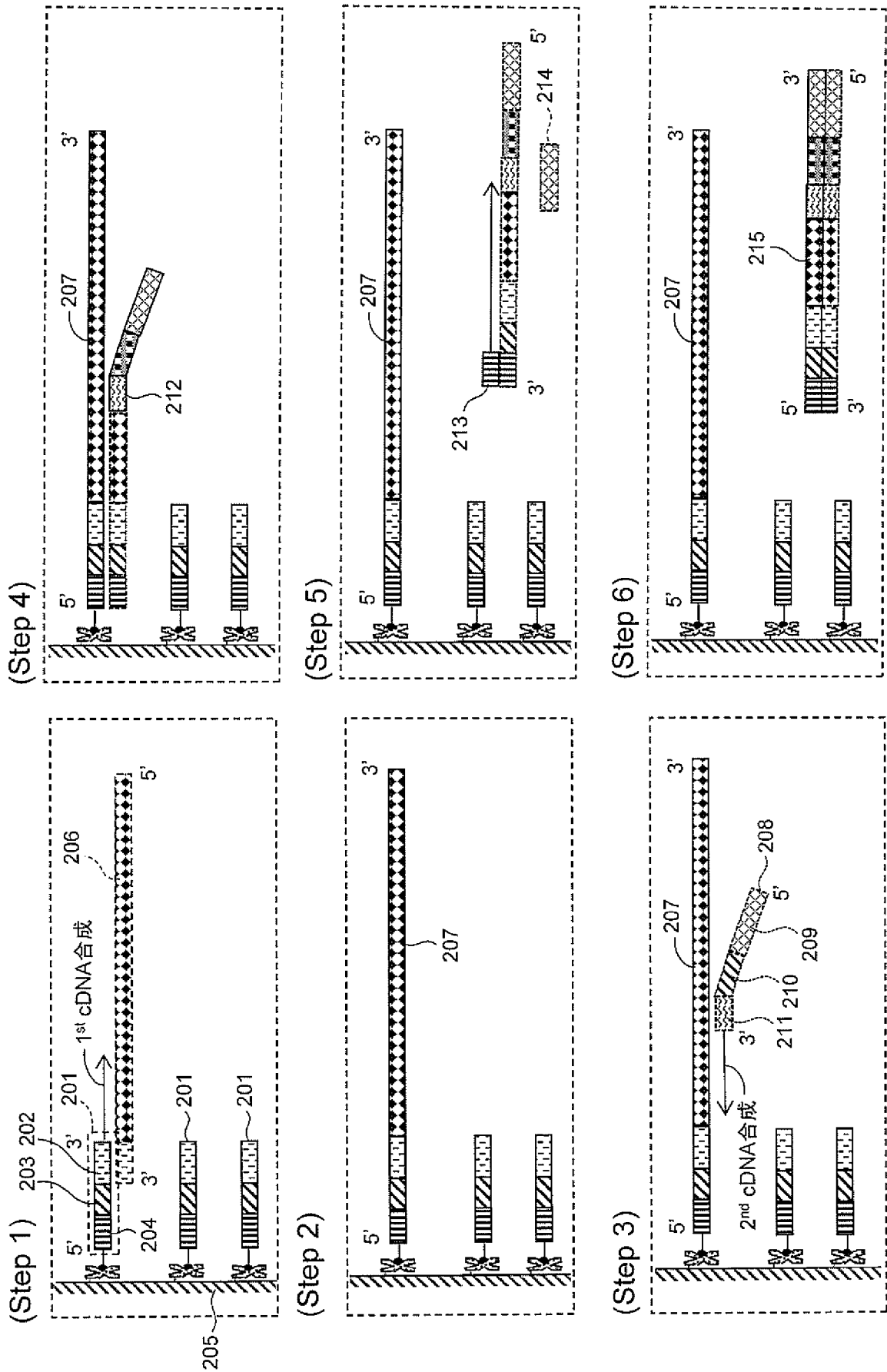
[図1]

図 1



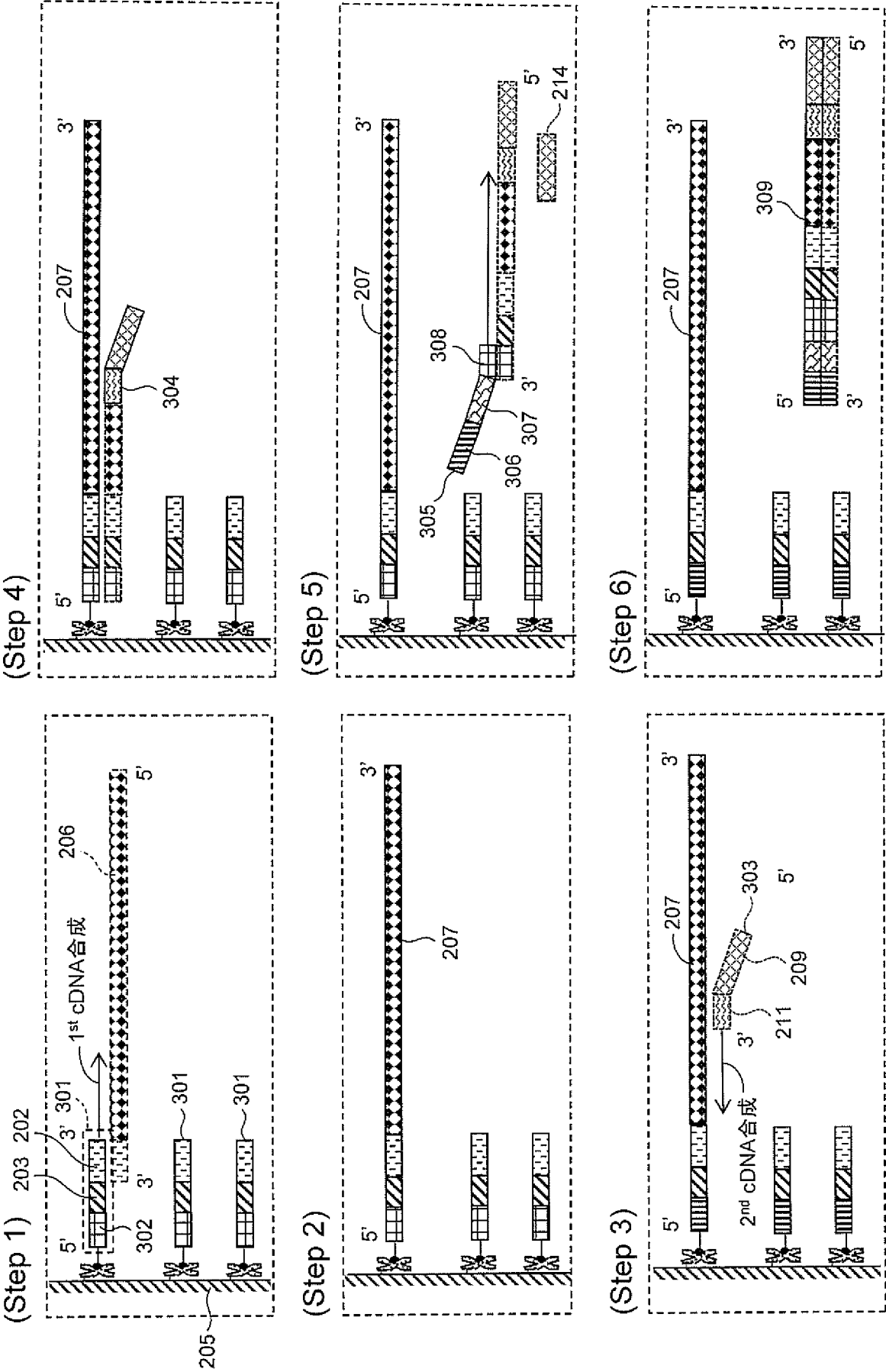
[図2]

[図2]



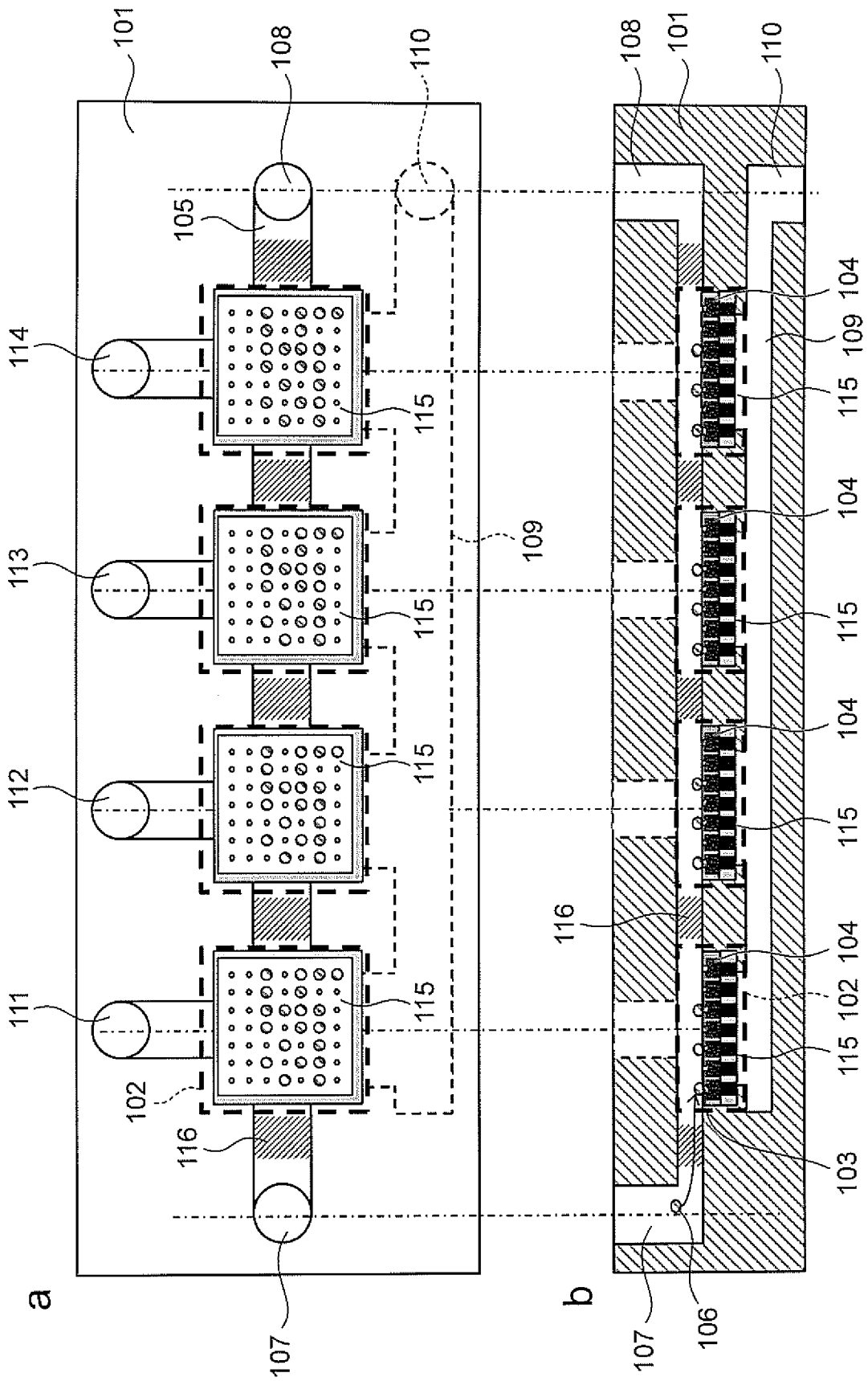
[図3]

図 3

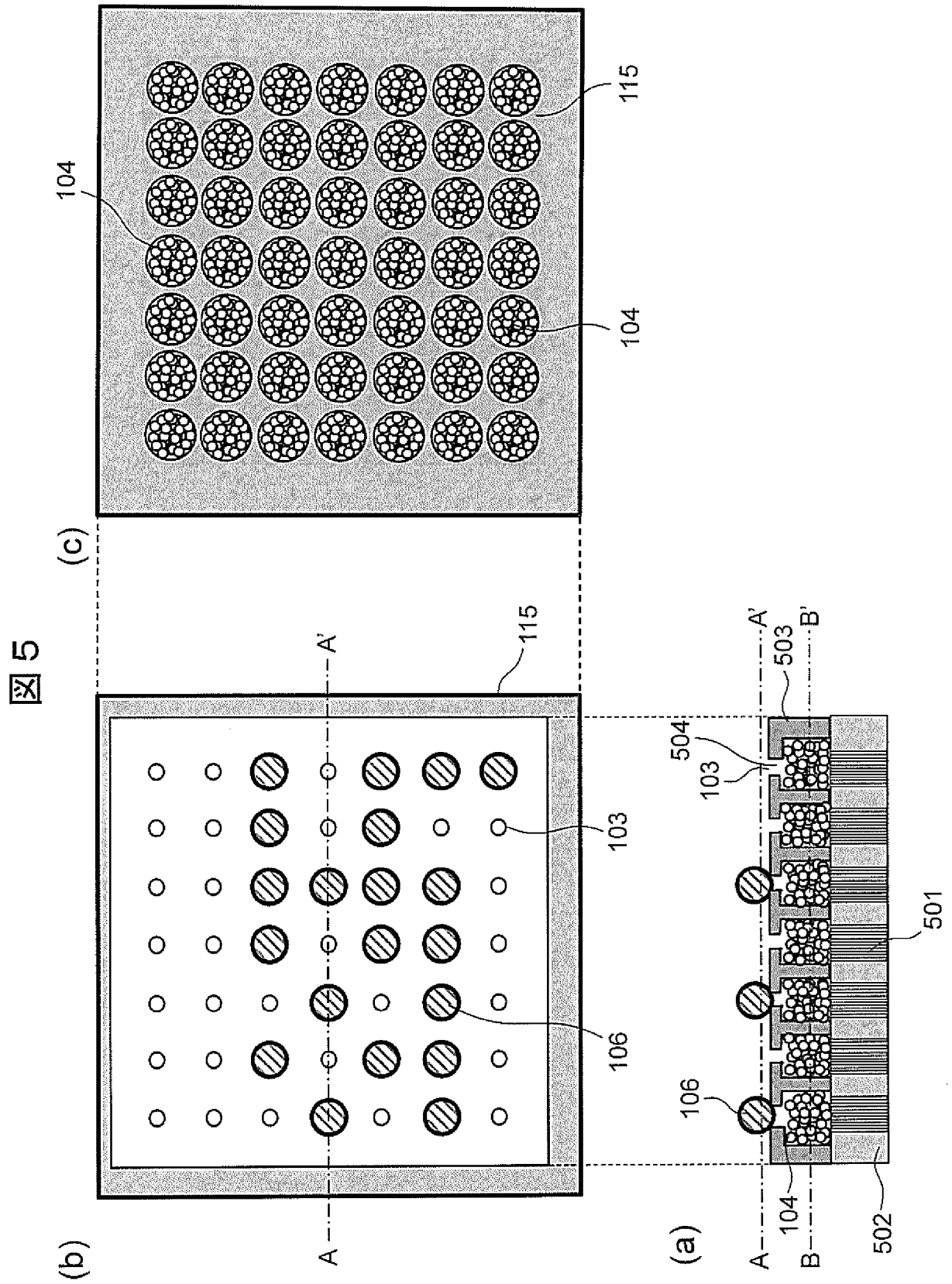


[図4]

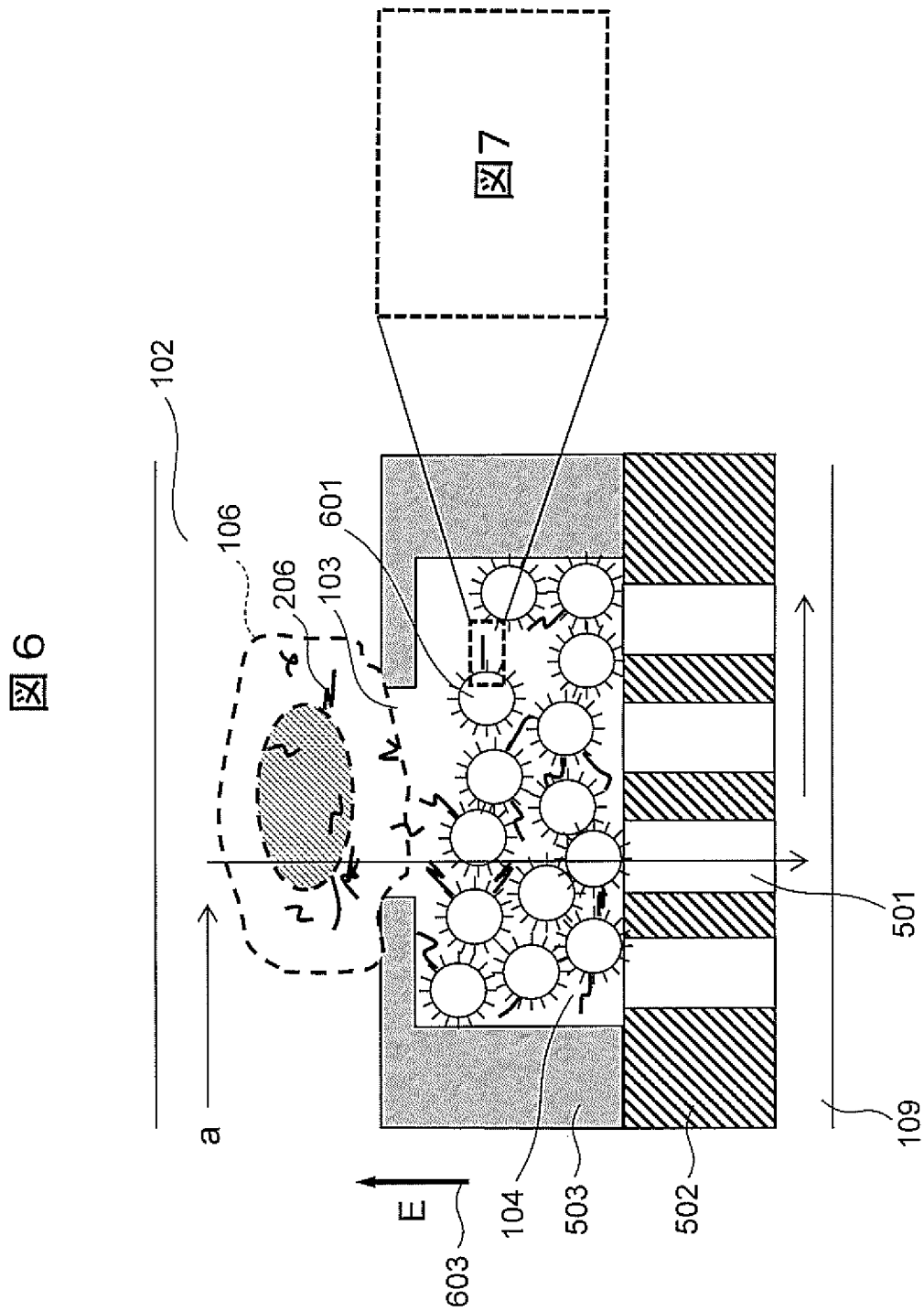
図 4



[図5]

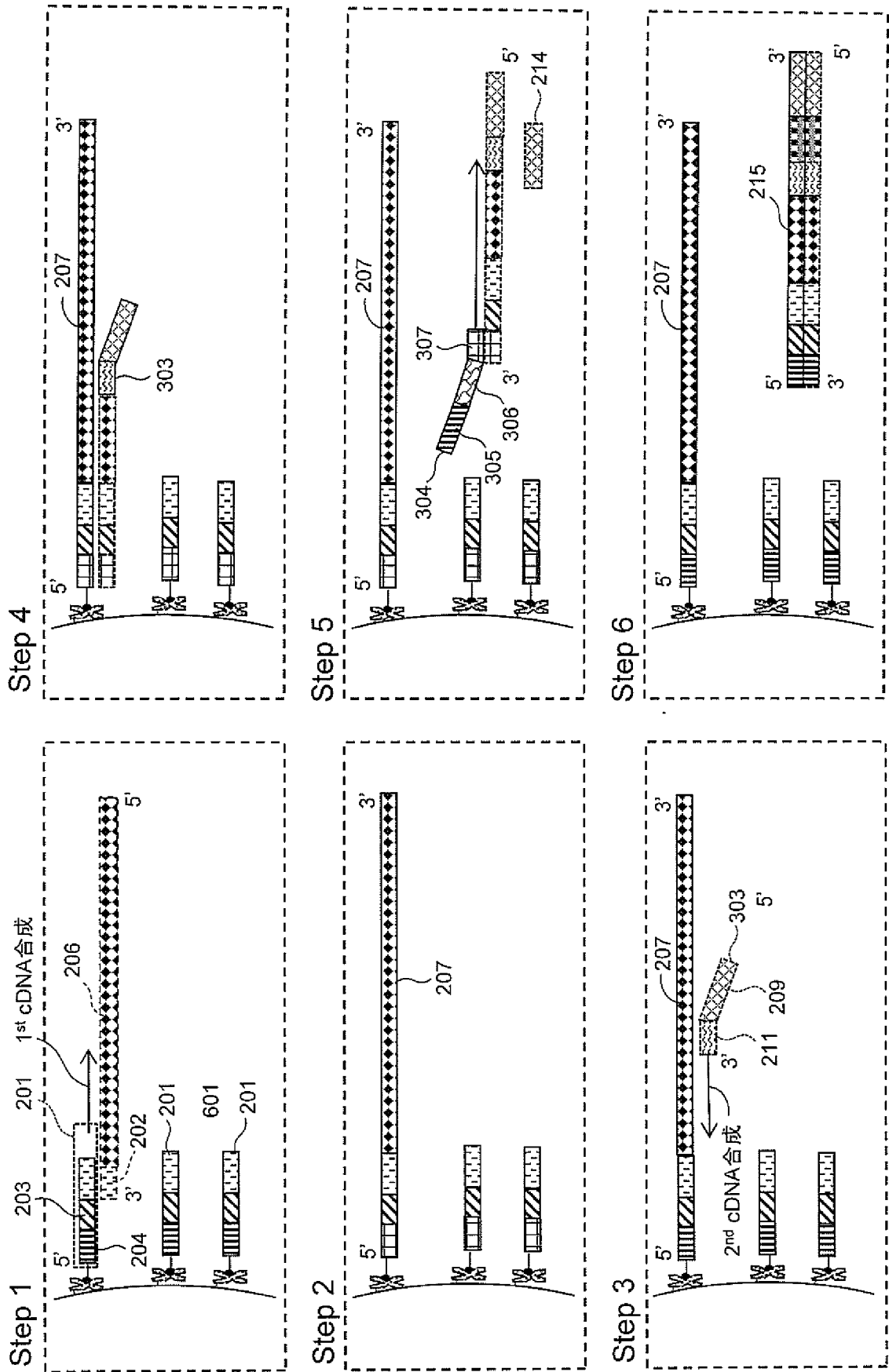


[図6]



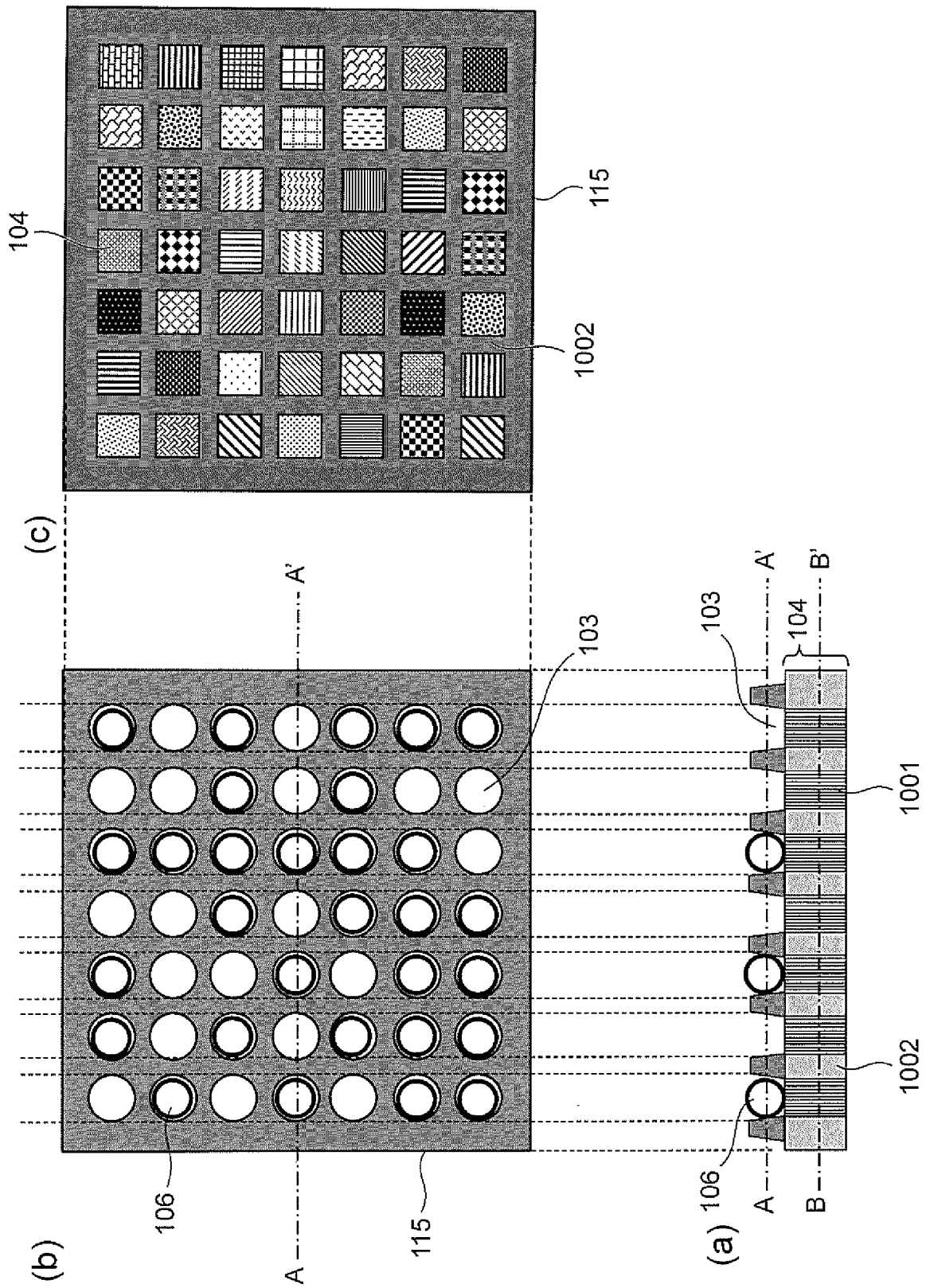
[図7]

図7

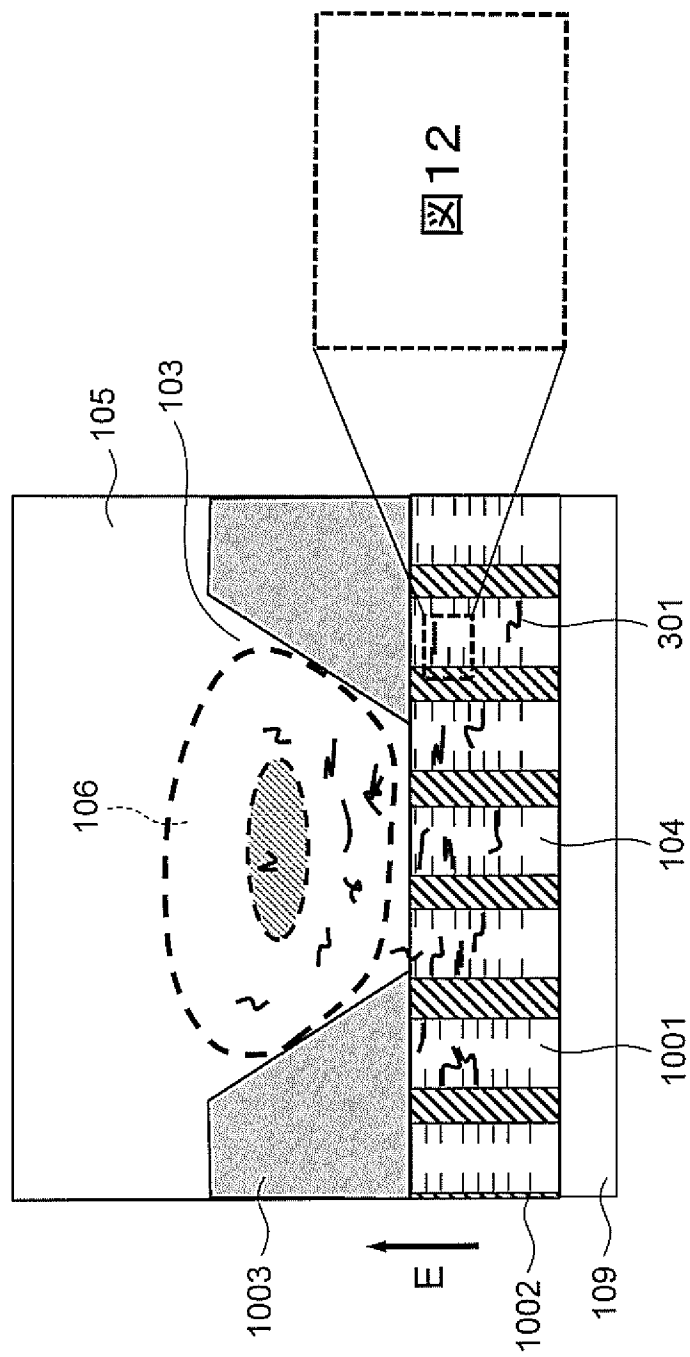


[図10]

図 10

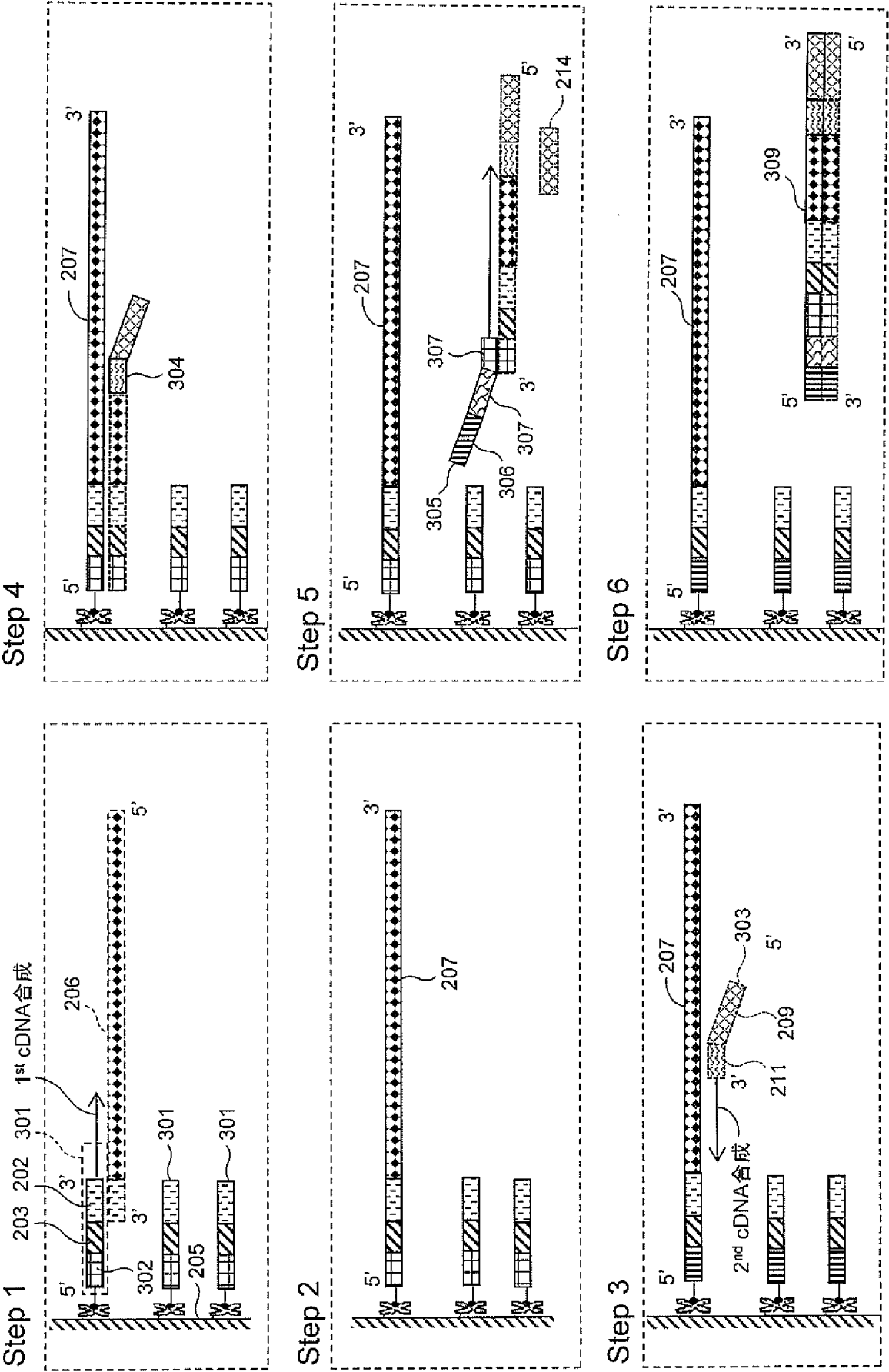


☐ ☐ ☒



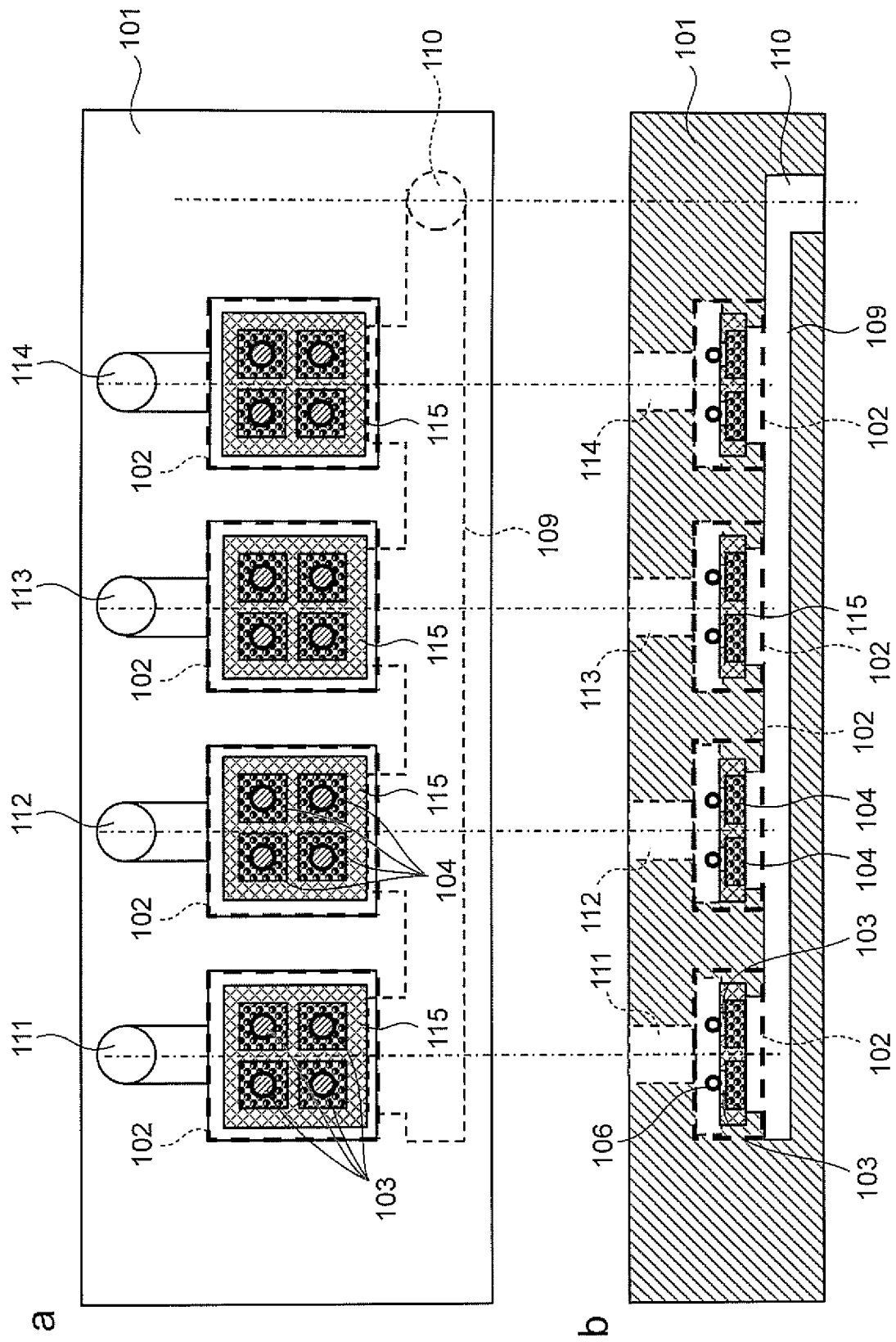
[図12]

図 12



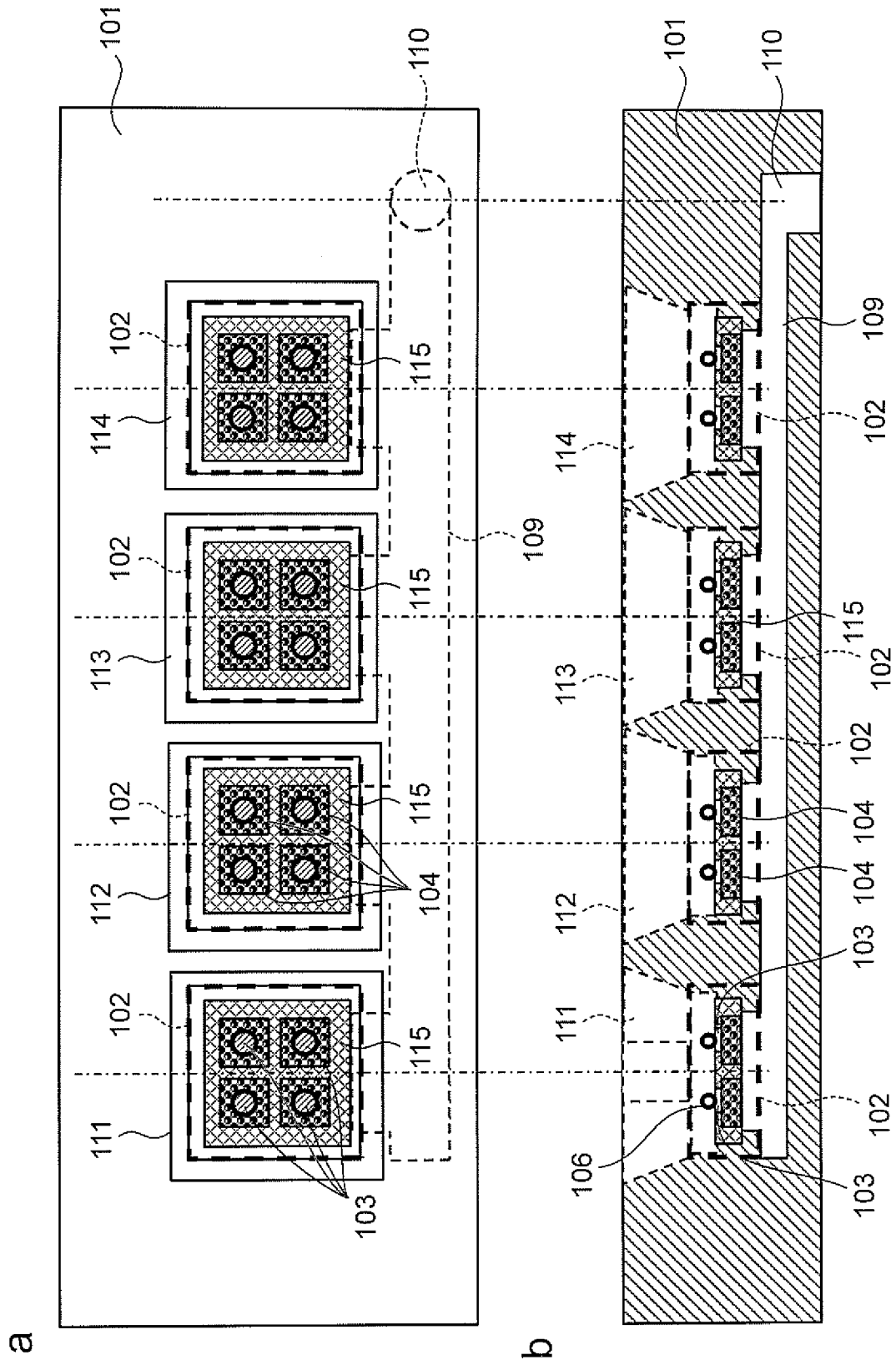
[図13]

図 13



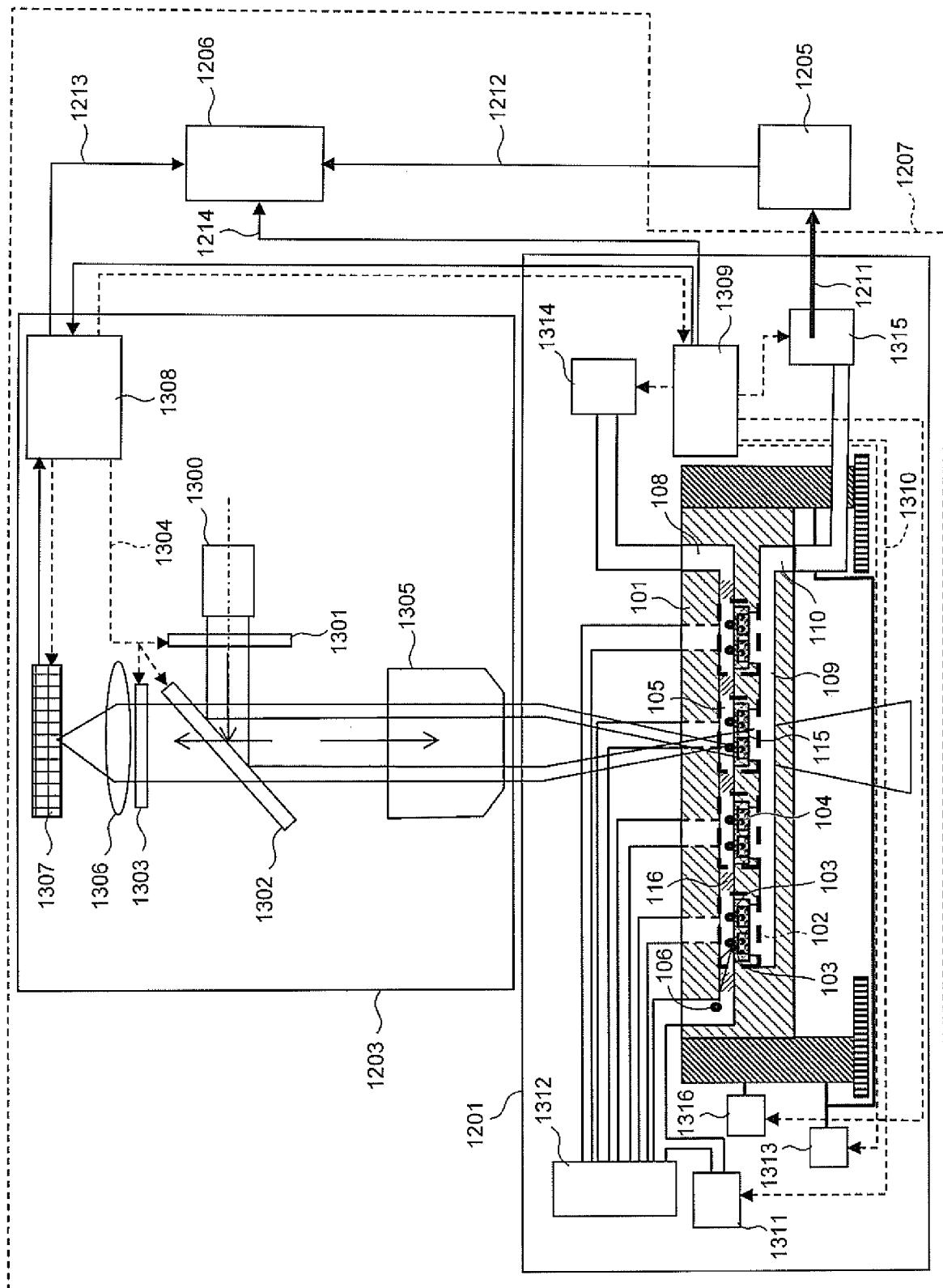
[図14]

図 14



[図16]

図 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/052965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/141386 A1 (Hitachi, Ltd.), 18 September 2014 (18.09.2014), particularly, paragraph [0108]; fig. 1 (Family: none)	1-15
A	JP 2008-261832 A (NSK Ltd.), 30 October 2008 (30.10.2008), paragraphs [0041] to [0053]; fig. 1, 3 (Family: none)	1-15
A	WO 2012/020711 A1 (The University of Tokyo), 16 February 2012 (16.02.2012), figures & JP 2012-34641 A	1-15

☒ 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
07 April 2015 (07.04.15)

Date of mailing of the international search report
21 April 2015 (21.04.15)

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/JP2015/052965

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-539978 A (Genapsys Inc.), 31 October 2013 (31.10.2013), fig. 3, 18B & US 2013/096013 A1 & WO 2012/047889 A2 & EP 2625526 A2 & CN 103328981 A & KR 10-2014-0027906 A	1-15
A	JP 2010-142233 A (454 Corp.), 01 July 2010 (01.07.2010), figures & US 2004/0185484 A1 & WO 2004/069849 A2 & EP 1590477 A2 & CN 102212614 A	1-15
A	JP 2009-534653 A (Advanced Liquid Logic, Inc.), 24 September 2009 (24.09.2009), particularly, fig. 3 & WO 2007/120241 A2 & EP 2016091 A2	1-15
A	JP 2013-533469 A (Arrayx, Inc.), 22 August 2013 (22.08.2013), particularly, fig. 1F, G & US 2013/0260396 A1 & WO 2011/149526 A2 & EP 2576759 A2 & CN 103025859 A	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2014/141386 A1（株式会社日立製作所）2014.09.18, 特に、段落 [0108]、図1（ファミリーなし）	1 - 1 5
A	JP 2008-261832 A（日本精工株式会社）2008.10.30, 段落【004 1】～【0053】、図1、3（ファミリーなし）	1 - 1 5
A	WO 2012/020711 A1（国立大学法人東京大学）2012.02.16, 図 & JP 2012-34641 A	1 - 1 5

☒ 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

0 7 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / 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）

田中 晴絵

4 B

9 7 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
A	JP 2013-539978 A (ジナプシス インコーポレイテッド) 2013.10.31, 図3、18B等 & US 2013/096013 A1 & WO 2012/047889 A2 & EP 2625526 A2 & CN 103328981 A & KR 10-2014-0027906 A	1 - 15
A	JP 2010-142233 A (454 コーポレーション) 2010.07.01, 図 & US 2004/0185484 A1 & WO 2004/069849 A2 & EP 1590477 A2 & CN 102212614 A	1 - 15
A	JP 2009-534653 A (アドバンスド・リキッド・ロジック・インコー ポレイテッド) 2009.09.24, 特に、図3 & WO 2007/120241 A2 & EP 2016091 A2	1 - 15
A	JP 2013-533469 A (アリックス インク) 2013.08.22, 特に、図1 F、G & US 2013/0260396 A1 & WO 2011/149526 A2 & EP 2576759 A2 & CN 103025859 A	1 - 15