

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年11月26日(26.11.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/235607 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 37/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/019992

(22) 国際出願日: 2020年5月20日(20.05.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-095187 2019年5月21日(21.05.2019) JP

(71) 出願人: 凸版印刷株式会社(TOPPAN PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 平瀬 匠(HIRASE Takumi); 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 牧野 洋一(MAKINO Yoichi); 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 松沼 泰史, 外(MATSUNUMA Yasushi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 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))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING TARGET MOLECULE

(54) 発明の名称: 標的分子の検出方法

(57) Abstract: This method for detecting a surface target molecule and an internal target molecule of a structure comprises steps for: bringing a liquid having a structure dispersed therein into contact with a well array having a plurality of wells so as to introduce the structure into the wells; bringing an encapsulation liquid into contact with the well array so as to cause the structure to be encapsulated within each of the wells; extracting content of the structure within each of the wells; detecting at least one type of surface target molecule present on the surface of the structure within each of the wells; and detecting at least one type of internal target molecule present inside the structure within each of the wells.

(57) 要約: この構造体の表面標的分子及び内部標的分子を検出する方法は、複数のウェルを有するウェルアレイに、構造体が分散した液体を接触させ、前記ウェルに前記構造体を導入することと、前記ウェルアレイに封止液を接触させ、前記構造体を前記ウェル内に封入することと、前記ウェル内で前記構造体の内容物を抽出することと、前記ウェル内で前記構造体の表面に存在していた少なくとも1種の表面標的分子を検出することと、前記ウェル内で前記構造体の内部に存在していた少なくとも1種の内部標的分子を検出することと、を含む。

WO 2020/235607 A1

明 細 書

発明の名称： 標的分子の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的分子の検出方法に関する。より具体的には、構造体の表面に存在する表面標的分子及び構造体の内部に存在する内部標的分子を検出する方法、構造体の評価方法及びキットに関する。

本願は、2019年5月21日に日本に出願された特願2019-095187号について優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 生体試料中の標的分子を定量的に検出することにより、疾患の早期発見や投薬の効果予測が行われている。従来から、タンパク質の定量は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）等により行われ、核酸の定量はリアルタイムPCR法等により行われている。

[0003] 近年、疾患をより早期に発見する等の目的で、標的分子をより精度よく検出するニーズが高まっている。標的分子を精度よく検出する手法として、例えば、特許文献1、特許文献2及び非特許文献1等には、多数の微小区画内で酵素反応を行う技術が記載されている。これらの手法はデジタル計測と呼ばれている。

[0004] デジタル計測では、試料溶液を極めて多数の微小溶液に分割する。そして、各微小溶液からの信号を2値化し、標的分子が存在するか否かのみを判別して、標的分子数を計測する。デジタル計測によれば、従来のELISAやリアルタイムPCR法等と比較して、検出感度及び定量性を格段に向上させることができる。

[0005] デジタルPCRでは、1つの微小液滴に存在する鋳型となる核酸が0個ないし1個になるように、PCR反応試薬と核酸との混合物は希釈されている。デジタルPCRでは、核酸増幅の感度を高めるために、また多数の微小液滴に対して同時に核酸増幅を行うために、各微小液滴の体積は小さい方が好

ましい。例えば、特許文献3には、各ウェルの容積が6 nL（ナノリットル）となるように形成されたアレイ状の反応容器が開示されている。また、特許文献1には、深さ3 μm 、直径5 μm のウェルが多数形成された流路に試料を流して各ウェルに試料を導入した後、流路内の余剰試薬をオイルで押し出すことによって、各ウェル内に試料を導入する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第6 1 8 3 4 7 1号公報

特許文献2：特表2 0 1 4－5 0 3 8 3 1号公報

特許文献3：国際公開第2 0 1 3／1 5 1 1 3 5号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Kim S. H., et al., Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules., Lab on a Chip, 12 (23), 4986-4991, 2012.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、構造体の外部及び内部に存在する標的分子を検出する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 複数のウェルを有するウェルアレイに、構造体が分散した液体を接触させ、前記ウェルに前記構造体を導入することと、前記ウェルアレイに封止液を接触させ、前記構造体を前記ウェル内に封入することと、前記ウェル内で前記構造体の内容物を抽出することと、前記ウェル内で前記構造体の表面に存在している少なくとも1種の表面標的分子を検出することと、前記ウェル内で前記構造体の内部に存在している少なくとも1種の内部標的分子を検出することと、を含む、前記構造体の表面標的分子及び内部標的分子を検出

する方法。

〔2〕前記構造体の内容物を抽出すること、前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが、前記構造体を前記ウェル内に封入することの後に行われる、〔1〕に記載の方法。

〔3〕前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが、前記構造体の内容物を抽出することの後に行われる、〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔4〕前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが同時に行われる、〔1〕～〔3〕のいずれか一項に記載の方法。

〔5〕前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが、同一条件下で行われる、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

〔6〕前記表面標的分子及び前記内部標的分子のそれぞれが、核酸、タンパク質、糖、脂質又はこれらの複合体からなる群より選択される少なくとも1種の分子である、〔1〕～〔5〕のいずれか一項に記載の方法。

〔7〕前記表面標的分子がタンパク質を含み、前記内部標的分子が核酸を含む、〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の方法。

〔8〕前記内部標的分子を検出することが核酸検出手法により行われる、〔1〕～〔7〕のいずれか一項に記載の方法。

〔9〕前記核酸検出手法が、Invasive Cleavage Assayである、〔8〕に記載の方法。

〔10〕前記表面標的分子を検出することにおいて検出するシグナルと前記内部標的分子を検出することにおいて検出するシグナルが互いに識別可能である、〔1〕～〔9〕のいずれか一項に記載の方法。

〔11〕前記構造体が、ウイルス、エクソソーム、細胞、小胞体からなる群より選択されるいずれか1つである、〔1〕～〔10〕のいずれか一項に記載の方法。

〔12〕前記構造体が捕捉物との複合体を形成しており、前記捕捉物は固相

と前記構造体に対する特異的結合物質との結合体である、〔１〕～〔１１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１３〕前記特異的結合物質が抗体である、〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕前記構造体の内容物を抽出することは、界面活性剤を含む液体中で構造体を加熱するである、〔１〕～〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１５〕前記ウェルに前記構造体を導入することにおいて、前記ウェル１つあたりに１つ以下の前記構造体が導入される、〔１〕～〔１４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１６〕〔１５〕に記載の方法により、前記ウェル毎に前記表面標的分子及び前記内部標的分子の有無を検出することと、前記表面標的分子の検出結果及び前記内部標的分子の検出結果に基づいて前記構造体を評価することと、を含む、構造体の評価方法。

〔１７〕複数のウェルを有するウェルアレイ、構造体から内容物を抽出する試薬、前記構造体の表面に存在する少なくとも１種の表面標的分子を検出する試薬、及び、前記構造体の内部に存在する少なくとも１種の内部標的分子を検出する試薬、を含む、前記構造体の前記表面標的分子及び前記内部標的分子を検出するためのキット。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、構造体の外部及び内部に存在する標的分子を検出する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]流体デバイスの一例を示す模式断面図である。

[図2]流体デバイスの一例を示す模式断面図である。

[図3]流体デバイスの一例を示す模式断面図である。

[図4]流体デバイスの一例を示す模式断面図である。

[図5]流体デバイスの一例を示す模式断面図である。

[図6]流体デバイスの一例を示す模式断面図である。

[図7A]構造体が、ウェルと封止液Ｌ１２０により形成された微小区画に収容

されている様子を示す模式図である。

[図7B]抽出工程後において、構造体から内部標的分子が抽出されている様子
を示す模式図である。

[図8A]構造体が、捕捉物を利用してウェルに導入及び封入され、ウェルと封
止液により形成された微小区画に収容されている様子を示す模式図である。

[図8B]抽出工程後において、構造体から内部標的分子が抽出されている様子
を示す模式図である。

[図9]実施例2における蛍光観察の結果を示す写真である。

[図10]実施例3において、蛍光シグナルの経時変化を測定した結果を示すグ
ラフである。

[図11]実施例4において、蛍光シグナルの経時変化を測定した結果を示すグ
ラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、場合により図面を参照しつつ、本発明の実施形態について詳細に説
明する。なお、図面中、同一又は相当部分には同一又は対応する符号を付し
、重複する説明は省略する。なお、各図における寸法比は、説明のため誇張
している部分があり、必ずしも実際の寸法比とは一致しない。

[0013] [構造体の表面標的分子及び内部標的分子を検出する方法]

本発明の一実施形態において、複数のウェルを有するウェルアレイに、構
造体が分散した液体を接触させ、前記ウェルに前記構造体を導入することと
、前記ウェルアレイに封止液を接触させ、前記構造体を前記ウェル内に封入
することと、前記ウェル内で前記構造体の内容物を抽出することと、前記ウ
ェル内で前記構造体の表面に存在していた少なくとも1種の表面標的分子を
検出することと、前記ウェル内で前記構造体の内部に存在していた少なくと
も1種の内部標的分子を検出することと、を含む、前記構造体の表面標的分子
及び内部標的分子を検出する方法を提供する。

なお、前記構造体を導入することを導入工程と表現してもよい。同様に、
前記構造体の内容物を抽出することを抽出工程と表現してもよい。前記表面

標的分子を検出することを表面標的分子検出工程と表現してもよい。前記内部標的分子を検出することを内部標的分子検出工程と表現してもよい。

[0014] 実施例において後述するように、本実施形態の方法により、構造体の表面に存在する少なくとも1種の表面標的分子、及び、構造体の内部に存在する少なくとも1種の内部標的分子を検出することができる。

[0015] 本明細書において、表面標的分子とは、構造体の表面に露出して存在している分子であって、検出対象である分子をいう。また、内部標的分子とは、構造体の内部に内包されており、表面に露出していない分子であって、検出対象である分子をいう。内部標的分子を検出するためには、構造体から内容物を抽出し、内部標的分子を露出させる必要がある。

[0016] 本実施形態の方法によれば、1構造体レベルで表面標的分子及び内部標的分子を検出することも容易である。

[0017] (構造体)

構造体としては、表面標的分子が露出した表面、及び、内部標的分子を含む内部構造を有するものであれば特に制限されず、任意の構造体を用いることができる。具体的な構造体としては、例えば、ウイルス、エクソソーム、細胞及び小胞体等が挙げられる。細胞としては、真核細胞、原核細胞等が挙げられる。真核細胞としては、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞及び真菌細胞等が挙げられる。原核細胞としては、細菌等が挙げられる。小胞体としては、細胞内小器官である小胞体及び脂質膜で構成された天然の又は人工の膜小胞等が挙げられる。構造体は、生体試料中に存在するものであってもよい。生体試料としては特に制限されず、血清、血漿及び尿等が挙げられる。

[0018] (ウェル)

ウェルアレイは複数のウェルを有する。各ウェルは、上述した構造体、及び、後述する、前記構造体の内容物の抽出、表面標的分子の検出、内部標的分子の検出で使用する試薬を収容可能な寸法を有していれば、その形状及び配置は特に限定されない。

[0019] また、ウェルは、無処理で使用してもよいし、目的に応じて、予めウェル内壁に構造体の内容物を抽出する抽出試薬、抗体及び構造体に対する特異的結合物質等を固定化していてもよい。

[0020] (流体デバイス)

図1は、流体デバイスの一例を示す模式断面図である。図1に示すように、ウェルアレイ140は、流路130を備える流体デバイス100の流路130と隣接して配置されていてもよい。図1に示すように、流体デバイス100は、基板110と、基板110に対向して配置される蓋部材120（単に蓋120と記載してもよい）とを備えている。蓋部材120は、凸部121を有している。凸部121の先端は、基板110に接している。流体デバイス100において、ウェルアレイ140は、基板110の一面上に基板110と一体成型されており、蓋部材120と対向している。ウェルアレイ140は、複数のウェル141を有する。複数のウェルは、流路130と接続している。蓋部材120は、基板110に溶着又は接着されていてもよい。

[0021] ウェル141は、基板110の表面に開口を有している。ウェル141の形状、寸法、及び配置は特に限定されないが、1つのウェル141に1個の構造体が導入されることが好ましい。ウェル141は、容積が小さい微小ウェルであることが好ましい。例えば、1つのウェル141の容積は、10 fL～100 pL程度であってもよい。流体デバイス100では、同形同大の複数のウェル141がウェルアレイ140を構成している。同形同大とは、デジタル計測を行うために要求される程度に同一の形状で同一の容量であればよく、製造上の誤差程度のばらつきであれば許容される。

[0022] ウェル141の直径は、例えば1～10 μm 程度であってもよい。ウェル141の深さは、例えば1～10 μm 程度であってもよい。また、ウェル141の配置は、特に制限されず、例えば三角格子状に整列していてもよいし、正方格子状に整列していてもよいし、ランダムに配置されていてもよい。

[0023] 流体デバイス100では、凸部121の存在により、ウェルアレイ140

と蓋部材 120 との間に空間が形成されている。当該空間は、流路 130 を構成している。流路 130 は、構造体が分散した液体及び封止液を送液するための経路として機能する。流路 130 の形状、構造及び容量等は特に限定されないが、流路 130 の高さ、つまり基板 110 の表面と、蓋部材 120 の基板 110 と対向する面との間の距離は、例えば $500\ \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、例えば $300\ \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、例えば $200\ \mu\text{m}$ 以下であってもよいし、例えば $100\ \mu\text{m}$ 以下であってもよい。

[0024] 凸部 121 は、蓋部材 120 と一体に成形されていてもよい。蓋部材 120 は、例えば、熱可塑性樹脂の流動体を、成形型を用いて成形することで、凸部 121 を有する板状に成形することができる。また、蓋部材 120 には試薬の導入ポート 122 及び排出ポート 123 が形成されていてもよい。

[0025] 蓋部材 120 が凸部 121 を有する場合、基板 110 のウェル 141 が開口する面に凸部 121 が接するように、蓋部材 120 と基板 110 とが重ねられる。この結果、蓋部材 120 と基板 110 との間の空間が流路となる。蓋部材 120 と基板 110 とは、レーザー溶着等により溶着されてもよい。

[0026] (流体デバイスの変形例 1)

本実施形態の方法に用いられる流体デバイスは、上述した流体デバイス 100 に限られない。図 4 は、流体デバイスの一例を示す模式断面図である。図 4 に示すように、流体デバイス 200 は、基板 110 と、壁部材 210 (単に壁部 210 と記載してもよい) とを備えている。流体デバイス 200 においては、ウェルアレイ 140 は基板 110 の一方面上に基板 110 と一体成形されている。ウェルアレイ 140 は複数のウェル 141 を有する。

[0027] 流体デバイス 200 は、蓋部材 120 を有していない点で上述した流体デバイス 100 と主に異なっている。このため、流体デバイス 200 は、流路を有していない。

[0028] (流体デバイスの変形例 2)

上述した流体デバイス 100 においては、蓋部材 120 と凸部 121 は一体成形されている。しかしながら、蓋部材 120 と凸部 121 は、別体とし

て成形されていてもよい。

[0029] また、上述した流体デバイス１００及び流体デバイス２００においては、ウェルアレイ１４０は、基板１１０の一方面上に基板１１０と一体成形されている。しかしながら、ウェルアレイは、基板１１０と一体成形されていなくてもよい。例えば、流体デバイス１００とは別体として成形されたウェルアレイ１４０を、流体デバイスの基板１１０上に配置してもよい。あるいは、基板１１０の表面に樹脂層を積層し、エッチング等により、樹脂層にウェルアレイを形成してもよい。

[0030] （流体デバイスの変形例３）

また、上述した流体デバイス１００においては、ウェルアレイは基板１１０に形成されている。しかしながら、ウェルアレイは蓋部材１２０に設けられていてもよい。別の側面として、流体デバイス１００とは別体として成型されたウェルアレイを流体デバイス１００の蓋部材１２０上に配置してもよい。あるいは、蓋部材１２０の表面に樹脂層を積層し、エッチング等により樹脂層にウェルアレイを形成してもよい。あるいは、蓋部材１２０の表面に直接ウェルアレイを形成してもよい。

[0031] （流体デバイスの材質）

基板１１０は、例えば樹脂を用いて形成される。樹脂の種類は、特に限定されないが、試薬及び封止液に対して耐性のある樹脂であることが好ましい。また、検出するシグナルが蛍光

である場合には、自家蛍光が少ない樹脂であることが好ましい。例えば、シクロオレフィンポリマー、シクロオレフィンコポリマー、シリコン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル、フッ素樹脂、及びアモルファスフッ素樹脂等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0032] 基板１１０の板厚方向の一方面に複数のウェル１４１が形成されていてもよい。言い換えれば、基板１１０の一方の面に、板厚方向に深さを有する複数のウェル１４１が形成されていてもよい。樹脂を用いたウェルの形成方法

としては、射出成形、熱インプリント、光インプリント等が挙げられる。

[0033] あるいは、例えば、基板 110 の上にフッ素樹脂を積層し、当該フッ素樹脂をエッチング等により加工してウェルアレイを形成してもよい。フッ素樹脂としては、例えば CYTOP（登録商標）（旭硝子）等を用いることができる。

[0034] また、流体デバイスが蓋部材 120 を有する場合、蓋部材 120 の材質は、自家蛍光の少ない樹脂であることが好ましく、例えば、シクロオレフィンポリマー及びシクロオレフィンコポリマー等の熱可塑性樹脂であってもよい。

[0035] また、蓋部材 120 は、シグナルを蛍光観察する際に検出される波長の近傍の波長の光を透過しない材料から形成されていてもよく、完全に光を透過しない材料から形成されていてもよい。例えば、蓋部材 120 は、カーボン又は金属粒子等を添加した熱可塑性樹脂から形成されていてもよい。

[0036] （従来の標的分子の検出方法）

図 1～図 3 を参照しながら、流体デバイス 100 を用いた場合を例に、デジタル計測により標的分子を検出する従来の方法について説明する。

[0037] まず、図 1 に示すように、流体デバイス 100 の導入ポート 122 から試薬液 L110 を導入し、流路 130 に送液する。試薬液 L110 は標的分子を含んでいる。試薬液 L110 に含まれる標的分子の濃度は、ウェル 141 に 1 ウェルあたり 1 分子以下の標的分子が入る濃度に調整されている。流路 130 に送液された試薬液 L110 は、複数のウェル 141 の内部に収容される。

[0038] 続いて、図 2 に示すように、蓋部材 120 の導入ポート 122 から、基板 110 と蓋部材 120 との間の流路 130 に、封止液 L120 を送液して複数のウェル 141 を個別に封止する。封止液としては、例えば油性のオイルを用いることができる。封止液 L120 は、流路 130 に送液された試薬液 L110 のうち、ウェル 141 に収容されていない試薬液 L110 を押し流して置換する。これにより、封止液 L120 が、標的分子を含む試薬液 L1

10を収容した複数のウェル141をそれぞれ個別に封止し、ウェル141は独立した反応空間、つまり微小区画142となる。

[0039] 続いて、図3に示すように、ウェル141内で所定の反応を行い、発生したシグナルを観察する。ウェル142Rはシグナルが検出されたウェルであり、ウェル142はシグナルが検出されなかったウェルである。

[0040] 従来の検出方法では、細胞やウイルス等の構造体に含まれる核酸やタンパク質等の標的分子を検出する場合、予め構造体から標的分子を抽出し、試薬液L110に混合して送液する。このため、構造体から標的分子を抽出する段階及び送液工程で標的分子が失われ、減少する場合がある。また、標的分子がウェル141内に収容されず、流路130の内部に留まり、封止液L120に押し流され、反応工程においてシグナル増幅反応が観測されず、存在が検出されない場合がある。この結果、構造体に含まれる標的分子を正確に検出することができない場合がある。また、標的分子を検出することができた場合においても、構造体と検出された標的分子とを関連付けることができない。

[0041] 続いて、図4～図6を参照しながら、流体デバイス200を用いた場合を例に、デジタル計測により標的分子を検出する従来の方法について説明する。この場合には、国際公開第2016/006208号に開示される方法を用いて、検出することができる。

[0042] まず、図4に示すように、流体デバイス200の内部に試薬液L110を導入する。試薬液L110は、標的分子を含んでいる。試薬液L110に含まれる標的分子の濃度は、ウェル141に1ウェルあたり1分子以下の標的分子が入る濃度に調整されている。試薬液L110は、複数のウェル141の内部に収容される。

[0043] 続いて、図5に示すように、流体デバイス200の内部に封止液L120を導入する。封止液L120の比重は、試薬液L110よりも大きい。このため、封止液L120は、試薬液L110のうち、ウェル141に収容されていない試薬液L110よりも下に沈み、ウェルアレイ140に接する。そ

して、封止液L 1 2 0は、標的分子を含む試薬液L 1 1 0を収容した複数のウェル1 4 1をそれぞれ個別に封止し、ウェル1 4 1は独立した反応空間、つまり微小区画1 4 2となる。

[0044] 続いて、図6に示すように、ウェル1 4 1内で所定の反応を行い、発生したシグナルを観察する。ウェル1 4 2 Rはシグナルが検出されたウェルであり、ウェル1 4 2はシグナルが検出されなかったウェルである。

[0045] (本実施形態の検出方法)

続いて、場合により図1～3を参照しながら、流体デバイス1 0 0を用いた場合を例に、本実施形態の方法について説明する。本実施形態の方法は、構造体の表面標的分子及び内部標的分子を検出する方法であり、複数のウェルを有するウェルアレイに、構造体が分散した液体を接触させ、前記ウェルに前記構造体を導入することと、前記ウェルアレイに封止液を接触させ、前記構造体を前記ウェル内に封入することと、前記ウェル内で前記構造体の内容物を抽出することと、前記ウェル内で前記構造体の表面に存在していた少なくとも1種の表面標的分子を検出することと、前記ウェル内で前記構造体の内部に存在していた少なくとも1種の内部標的分子を検出することを含む。

[0046] 本実施形態の方法によれば、構造体、表面標的分子及び内部標的分子を互いに関連付けて検出することができる。すなわち、1構造体レベルで表面標的分子及び内部標的分子を検出することができる。本実施形態の方法により、表面標的分子及び内部標的分子が検出された場合、当該表面標的分子及び内部標的分子は、1つの構造体の表面及び内部に存在していたといえることができる。

[0047] 本実施形態の方法によれば、表面標的分子及び内部標的分子を含む2種類以上の標的分子を検出することができる。また、複数種類の表面標的分子を検出することもできる。さらに、複数種類の内部標的分子を検出することもできる。

[0048] 《構造体のウェルへの導入》

本工程では、図1に示すように、流体デバイス100の導入ポート122から試薬液L110を導入し、流路130に送液する。試薬液L110は、構造体が分散した液体である。試薬液L110は、表面標的分子及び内部標的分子を検出するための試薬も含む。試薬液L110を流路130に送液する時点において、表面標的分子を検出するための試薬は、表面標的分子に結合していてもよく、していなくてもよい。

[0049] 従来方法においては、試薬液L110は、予め構造体から抽出された標的分子を含んでいる。一方で、本実施形態の方法においては、試薬液L110は、構造体そのものを含む点において従来技術と異なっている。つまり、試薬液L110は、構造体を含む。

[0050] 流路130に送液された試薬液L110は、ウェルアレイ140に接触する。そして、ウェル141の内部に試薬液L110が収容される。この結果、ウェル141に構造体が導入されることになる。

[0051] 導入工程において1つのウェルに導入される構造体の数は、特に制限されないが、好ましくは、1つのウェルに1つ以下、すなわち、0個又は1個の構造体が導入される。これにより、構造体の検出を1個単位で行うことができ、すなわちデジタル計測が可能となる。また、ウェルアレイの全てのウェルに構造体が導入される必要はない。

[0052] 構造体をウェルに導入する手段は、特に制限されず、選択した構造体に応じた適切な手段を選択することができる。例えば、構造体を自重により流体デバイス内（流路内）で沈降させ、ウェルに分配する方法が挙げられる。あるいは、後述する方法で構造体を捕捉する物質（捕捉物）を利用し、自重で沈降しにくい構造体に捕捉物を結合させて複合体を形成して送液してもよい。また、予めウェルに捕捉物を固定化させておき、送液された構造体を捕捉させて複合体を形成させることで、構造体のウェルへの導入効率を向上させることもできる。

[0053] 試薬液L110よりも比重が小さい捕捉物を構造体に結合させて試薬液L110を送液することで構造体をウェルに導入してもよい。この場合、基板

110が上側、蓋部材120が下側となるよう流体デバイス100を上下反転させた状態で試薬液L110を送液することで構造体をウェルに導入することができる。また、流体デバイスの変形例3で説明した流体デバイスを用いる場合、蓋部材120に形成されたウェルに構造体を導入することができる。なお、構造体が試薬液L110よりも比重が小さい場合には、同様の方法で構造体をウェルに導入することができる。

[0054] 捕捉物を構造体に結合させる工程は、本実施形態の方法の任意の時点で行うことができる。例えば、この工程は、ウェルに構造体を導入する前に、サンプルチューブ内で構造体と捕捉物を接触させることにより行ってもよい。構造体と捕捉物との接触は、構造体を含む試薬液L110に捕捉物を添加して行ってもよい。また、構造体と捕捉物とを接触させ、その後表面標的分子及び内部標的分子を検出するための試薬を含む溶液と混合してもよい。あるいは、捕捉物をウェルに導入した後に、構造体をウェルに導入し、ウェル内で捕捉物と構造体とを接触させることにより複合体を形成させてもよい。

[0055] 捕捉物は、構造体を捕捉することができる物質である。捕捉物は、例えば、固相と構造体に対する特異的結合物質との結合体であってもよい。また、特異的結合物質は抗体であってもよい。

[0056] 固相としては、粒子、膜及び基板等が挙げられる。また、構造体に対する特異的結合物質は、少なくとも1種類であってもよい。例えば3種類であってもよいし、4種類であってもよいし、5種類以上であってもよい。

[0057] 粒子としては、特に制限されず、ポリマー粒子、磁気粒子及びガラス粒子等が挙げられる。粒子は、非特異的な吸着を避けるための表面処理が施された粒子が好ましい。また、特異的結合物質を固定化するために、表面にカルボキシル基等の官能基を有する粒子が好ましい。より具体的には、JSR社製の商品名「Magnosphere LC300」等を用いることができる。

[0058] あるいは、例えば構造体としてウイルスを用いる場合、ウイルスが付着することができる細胞（すなわち、ウイルス受容体を有する細胞）を、捕捉物

として用いてもよい。

[0059] 特異的結合物質としては、抗体、抗体断片、アプタマー及びレクチン等が挙げられる。抗体断片としては、F a b、F (a b')₂、F a b'、一本鎖抗体 (s c F v)、ジスルフィド安定化抗体 (d s F v)、2 量体 V 領域断片 (D i a b o d y) 及び C D R を含むペプチド等が挙げられる。抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよい。また、市販の抗体であってもよい。

[0060] 特異的結合物質を粒子表面に固定化する方法としては、特に制限されず、物理吸着による方法、化学結合による方法、アビジン-ビオチンの結合を利用する方法及びプロテイン G 又はプロテイン A と抗体との結合を利用する方法等が挙げられる。物理吸着による方法としては、疎水的相互作用又は静電的相互作用により、特異的結合物質を粒子表面に固定化する方法が挙げられる。化学結合による方法としては、架橋剤を使用する方法が挙げられる。例えば、粒子の表面が水酸基を有する場合、特異的結合物質が有するカルボキシル基に架橋剤を反応させて活性エステル化した後、水酸基とこのエステル基とを反応させることにより、特異的結合物質を粒子表面に固定化させることができる。また、特異的結合物質による標的分子の認識能を阻害しないよう、特異的結合物質と粒子表面との間にスペーサーを設けることが好ましい。

[0061] 上述したように、構造体のウェルへの導入を、捕捉物を用いて行ってもよい。例えば、捕捉物と構造体との複合体を流路に送液し、ウェルに導入してもよい。

[0062] ここで、捕捉物 1 個に構造体が 0 個又は 1 個捕捉される条件で捕捉物と構造体との複合体を形成することが好ましい。さらに、1 つのウェルには、捕捉物が 0 個又は 1 個導入されるように構成されることが好ましい。これによりデジタル計測が可能となる。すなわち、本実施形態において、構造体の検出は 1 個単位で行われてもよい。その場合は、1 構造体レベルで、表面標的分子及び内部標的分子が検出される。

[0063] 《構造体のウェルへの封入》

本工程では、図2に示すように、蓋部材120の導入ポート122から、基板110と蓋部材120との間の流路130に、封止液L120を送液する。流路130に送液された封止液L120は、ウェルアレイ140に接触する。そして、封止液L120は、流路130に送液された試薬液L110のうち、ウェル141に収容されていない試薬液L110を押し流して置換する。これにより、封止液L120が、構造体を含む試薬液L110を収容した複数のウェル141をそれぞれ個別に封止し、ウェル141は独立した反応空間、つまり微小区画142となる。

[0064] 封止液は、複数のウェルに導入された液体同士を互いに混合しないように個別に封止して液滴、つまり微小液滴を形成することができる液であり、好ましくは油性溶液であり、より好ましくはオイルである。オイルとしては、フッ素系オイル、シリコン系オイル、炭化水素系オイル又はこれらの混合物等を使用することができる。より具体的には、シグマ社製の商品名「FC-40」等を用いることができる。FC-40（CAS番号：86508-42-1）はフッ素化脂肪族化合物であり、25℃における比重が1.85 g/mLである。

[0065] 《構造物の内容物の抽出》

本工程では、ウェル141内で構造物の内容物を抽出する。本工程では、構造物から内部標的分子を含む内容物を抽出する。内容物の抽出においては、構造物から全ての標的分子が抽出されてもよいし、構造物に含まれる標的分子の一部のみが抽出されてもよい。

[0066] 構造物から標的分子を抽出する方法としては、特に制限されず、公知の手法を用いることができる。例えば、熱、超音波、光、磁力、又は電磁波等を用いた物理的手法界面活性剤、抗生物質、浸透圧誘導剤又はネクロシス・アポトーシス誘導剤等の抽出剤を用いた化学的手法及びこれら手法の組み合わせ等が挙げられる。

[0067] 界面活性剤としては、構造物を不安定化させるものが望ましい。具体的な

界面活性剤として、例えば、T r i t o n - X 1 0 0（ポリエチレングリコールモノー４－オクチルフェニルエーテル（ n ＝約１０）ともいう）、ドデシル硫酸ナトリウム、N o n i d e t P - 4 0（オクチルフェノキシポリ（エチレンオキシ）エタノールともいう）及びT w e e n 2 0（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラートともいう）等が挙げられる。また、抽出剤として、界面活性剤を含む試薬を用いてもよい。界面活性剤を含む試薬としては、例えば、B u g B u s t e r（メルクミリポア社製）等が挙げられる。

[0068] より具体的には、抽出方法として熱を用いる場合、構造体を不安定化させるのに十分な温度となるよう構造体を加熱すればよい。流体デバイスを好ましくは 70°C 以上 90°C 以下、より好ましくは 75°C 以上 85°C 以下、例えば約 80°C で、少なくとも５分間、好ましくは少なくとも１０分間、例えば約１５分間又は約３０分間加熱することにより、構造体から標的分子を抽出することができる。

[0069] 抽出方法として熱を用いる場合、界面活性剤を含む液体中で構造体を加熱することにより、構造体の内容物を抽出してもよい。

[0070] 抽出剤を使用する場合、構造体及び抽出剤は、本実施形態の方法の任意の時点で接触させることができる。例えば、構造体及び抽出剤を、導入工程の前に混合し、続いて混合した液体を送液してウェルに導入してもよい。その後、封入工程を行う。

[0071] この場合、例えば構造体と抽出剤との混合比を調整する方法により、ウェルが封止された後にウェル内で構造体から標的分子が抽出されるように、抽出条件を設計してもよい。あるいは、抽出剤をウェルに導入してから、構造体が分散した液体を送液し、ウェル内で接触させてもよい。その後、封入工程を行う。

[0072] ウェルを封止した後に、ウェル内にて抽出剤が作用し、構造体が崩壊し、内部標的分子が抽出される。

[0073] 抽出工程は、ウェルが封止された後、ウェル内で行われる。これにより、標的分子の損失を抑制することができる。その結果、標的分子を構造体から

抽出した後に流路を用いてマイクロアレイの各ウェルに分配する従来の方法と比較して、標的分子を精度よく検出することができる。

[0074] 図7Aは、表面標的分子710及び内部標的分子720を含む構造体700が、ウェル141と封止液L120により形成された微小区画142に収容されている様子を示す模式図である。

[0075] 図7Bは、図7Aの状態の構造体に抽出工程を実施した後の様子を示す模式図である。図7Bに示すように、抽出工程後において、構造体700'から内部標的分子720が抽出されている。

[0076] 図8Aは、表面標的分子710及び内部標的分子720を含む構造体700が、捕捉物800を利用してウェルに導入及び封入され、ウェル141と封止液L120により形成された微小区画142に収容されている様子を示す模式図である。捕捉物800には、構造体700に対する特異的結合物質810が結合している。

[0077] 図8Bは、図8Aの状態の構造体に抽出工程を実施した後の様子を示す模式図である。図8Bに示すように、抽出工程後において、構造体700'から内部標的分子720が抽出されている。

[0078] 《表面標的分子検出工程》

本工程では、ウェル141内で構造体の表面に存在していた少なくとも1種の表面標的分子を検出する。

[0079] 表面標的分子としては、核酸、タンパク質、糖、糖タンパク質、脂質又はこれらの複合体からなる群より選択される少なくとも1種の分子が挙げられる。核酸としては、DNA、RNA、miRNA及びmRNA等が挙げられる。タンパク質としては、構造タンパク質、膜タンパク質及び酵素等が挙げられる。

[0080] 構造体は、標的分子を含む。本願明細書において、構造体が標的分子を「含む」とは、構造体が標的分子を内包することか、又は、標的分子の一部若しくは全部が構造体の表面に存在することを指し得る。

[0081] 表面標的分子を検出する方法は、検出したい標的分子の特性に合わせて、

公知の任意の検出方法を使用することができる。例えば、まず必要に応じて標的分子由来のシグナルを検出可能なレベルまで増幅させる反応（シグナル増幅反応）を行い、次いで増幅されたシグナルを適切な手段を用いて検出する。本実施形態において、表面標的分子を検出する工程は、核酸検出手法により行われてもよい。

[0082] 本実施形態に係る検出方法において使用することができるシグナルの例としては、蛍光、化学発光、発色、電位変化及びpH変化等が挙げられる。

[0083] シグナル増幅反応は、例えば生化学反応、より具体的には酵素反応であってもよい。一例として、シグナル増幅反応は、シグナル増幅のための酵素を含んだ試薬液がウェル内に収容された状態で、流体デバイスを、所望の酵素活性が得られる一定温度条件下、例えば60℃以上75℃以下の一定温度、好ましくは約66℃で、所定時間、例えば少なくとも10分間、好ましくは約15分間、維持する等温反応である。

[0084] シグナル増幅反応の例としては、具体的には、核酸検出手法を使用する場合には、Invasive Cleavage Assay (ICA) 法、ループ介在等温増幅 (LAMP) 法 (商標登録)、5' → 3' ヌクレアーゼ法 (TaqMan (登録商標) 法)、蛍光プローブ法等が挙げられる。ICA反応を用いることが特に好ましい。

[0085] ICA反応は、(1) 核酸同士の相補的結合と、(2) 酵素による三重鎖構造の認識及び切断との2つの反応のサイクルによってシグナル増幅が進行するという原理に関連する。

[0086] ICA反応においては、標的分子以外の夾雑物による反応サイクル阻害の影響が小さい。したがって、構造体からの内容物の抽出において構造体内に存在する標的分子以外の様々な成分が微小区画内に放出される場合でも、ICA反応を用いることにより、標的分子を精度よく検出することができる。例えば、シグナル増幅反応にICA反応を用いる場合、試薬液L110（構造体を分散させる液体）は、ICA反応に必要な反応試薬及び鋳型核酸を含む。

- [0087] I C A 反応を用いる場合、具体的には、試薬液 L 1 1 0 中に、アレルプローブ、I C A オリゴ、フラップエンドヌクレアーゼー 1 (F E N - 1)、蛍光基質等の I C A 反応試薬が含まれていてもよい。
- [0088] 試薬液 L 1 1 0 としては、流体デバイスを用いて行われる生化学分析において使用される一般的な液体を用いることができ、好ましくは水性溶液である。また、試薬液 L 1 1 0 に界面活性剤等を含ませることにより、ウェル内に液体を封入しやすくしてもよい。また、試薬液 L 1 1 0 は、構造体の内容物の抽出で使用する抽出剤を含んでいてもよい。しかしながら、抽出剤は、生化学反応を行う酵素を失活させる場合があるため、試薬液 L 1 1 0 に抽出剤を含有させることは容易ではない。
- [0089] 表面標的分子の検出における生化学反応が I C A 反応である場合、ウェルに標的分子が存在すると、等温反応による酵素反応によって、蛍光物質が消光物質から遊離し、励起光に対応して所定の蛍光シグナルを発する。
- [0090] あるいは、表面標的分子の検出は、表面標的分子に対する特異的結合物質を標的分子に結合させ、結合した特異的結合物質を検出することによっても行うことができる。
- [0091] 例えば、表面標的分子がタンパク質である場合、E L I S A 法を用いて検出することができる。より具体的には、例えば、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) の原理を用いたサンドイッチ E L I S A により行ってもよい。
- [0092] F R E T の原理を用いたサンドイッチ法を行う場合、まず、第 1 の蛍光物質 (ドナー) で標識した第 1 の特異的結合物質 (例えば抗体) と、第 1 の蛍光物質の蛍光波長と重複する吸光波長を有する第 2 の蛍光物質 (アクセプター) で標識した第 2 の特異的結合物質を準備する。続いて、表面標的分子 (例えば抗原) を、第 1 の特異的結合物質と第 2 の特異的結合物質の両方と接触させ、複合体を形成させる。複合体が形成されると、ドナーとアクセプターの距離が近づき、ドナーの励起波長の照射によりアクセプターの蛍光波長を検出することができるようになる。
- [0093] あるいは、特異的結合物質を核酸断片で標識しておき、核酸断片を I C A

反応により検出してもよい。特異的結合物質としては、例えば抗体、抗体断片、又はアプタマー等を使用することができる。標的分子に結合した特異的結合物質を検出するために、特異的結合物質を、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P）等の酵素により、直接的又は間接的に標識してもよい。2 以上の特異的結合物質を使用する場合は、各々の特異的結合分子を、互いに識別可能に標識することができる。

[0094] シグナルの観察方法は、観察するシグナルの種類に応じて公知の適切な方法を選択することができる。例えば、明視野観察を行う場合は、ウェルアレイが設けられた基板に対して垂直方向に白色光を照射する。蛍光シグナルを観察する場合は、蛍光物質に対応する励起光をウェル内へ照射し、蛍光物質が発する蛍光を観察する。

[0095] 《内部標的分子の検出》

本工程では、ウェル 1 4 1 内で構造体の内部に存在していた少なくとも 1 種の内部標的分子を検出する。

[0096] 内部標的分子としては、表面標的分子と同様であり、核酸、タンパク質、糖、糖タンパク質、脂質又はこれらの複合体からなる群より選択される少なくとも 1 種の分子が挙げられる。例えば、表面標的分子がタンパク質を含み、内部標的分子が核酸を含んでいてもよい。

[0097] 内部標的分子の検出は、上述した表面標的分子と同様にして行うことができる。なかでも、内部標的分子の検出が核酸検出手法により行われることが好ましい。核酸検出手法としては、I C A 法が好ましい。

[0098] 例えば、表面標的分子を核酸標識抗体を用いて検出し、核酸標識抗体に標識された核酸を I C A 法で検出することができる。また、内部標的分子が核酸である場合、当該核酸を I C A 法で検出することができる。

[0099] このように、表面標的分子と内部標的分子とが異なる分子であったとしても、標識することによって、同じ原理により検出することができる。上記の場合、表面標的分子及び内部標的分子をいずれも I C A 法で検出することが可能となる。このため、表面標的分子及び内部標的分子を同じ条件で同時に

検出することができる。

[0100] 本実施形態の方法において、構造体の内容物の抽出、表面標的分子の検出及び内部標的分子の検出は、構造体のウェルへの封入の後に行われることが好ましい。これにより、1つの構造体に由来する表面標的分子及び内部標的分子を検出することができる。そして、構造体、表面標的分子及び内部標的分子を互いに関連付けて検出することができる。

[0101] 表面標的分子及び内部標的分子は、いずれの順序で検出してもよい。また、表面標的分子が複数種類存在する場合、それぞれの表面標的分子は、いずれの順序で検出してもよい。また、内部標的分子が複数種類存在する場合、それぞれの内部標的分子は、いずれの順序で検出してもよい。また、表面標的分子の検出及び内部標的分子の検出は同時に行われてもよいし、独立して別々に行われてもよい。

[0102] また、表面標的分子の検出及び内部標的分子の検出は同一条件下で行われてもよい。表面標的分子の検出及び内部標的分子の検出を同一条件下で同時に行うことにより、本実施形態の方法を簡便に実施することができる。

[0103] 表面標的分子の検出及び内部標的分子の検出において、2種類以上の標的分子を同時に検出する場合や、同時ではなくても各標的分子が検出可能な状態で共存している状況で順次検出する場合等には、各標的分子それぞれの存在を示すシグナルが混同しないように反応系を設計する必要がある。このような場合、表面標的分子の検出で検出するシグナルと内部標的分子の検出で検出するシグナルが互いに識別可能であることが好ましい。

[0104] さらに、表面標的分子が複数種類存在する場合、それぞれの表面標的分子の存在を示すシグナルも互いに識別可能であることが好ましい。同様に、内部標的分子が複数種類存在する場合、それぞれの内部標的分子の存在を示すシグナルも互いに識別可能であることが好ましい。

[0105] 例えば、蛍光シグナルによって検出を行う場合には、励起光や蛍光の波長を異なる帯域とすることで、シグナルを互いに識別可能にすることができる。あるいは、例えば、蛍光シグナルと磁気シグナル等の、異なるシグナルを

用いることにより、シグナルを互いに識別可能にすることもできる。

[0106] 本実施形態の方法は、構造体のウェルへの封入、表面標的分子の検出、構造体の内容物の抽出、内部標的分子の検出の順に実施してもよい。すなわち、構造体をウェルに封入した後、構造体の表面に存在する表面標的分子を検出する。その後、構造体の内容物を抽出する。これにより、内部標的分子がウェルの内部に露出する。その後、内部標的分子の検出を実施してもよい。この場合、表面標的分子の検出のためのシグナルと内部標的分子の検出のためのシグナルとが同一である場合でも、検出のタイミングによって表面標的分子と内部標的分子とを識別可能である。

[0107] 表面標的分子の検出を構造物の内容物の抽出の前に行う場合、表面標的分子の検出は、内部標的分子の抽出が生じない条件で行われる。例えば、構造物の内容物の抽出時の温度よりも低い温度、より具体的には室温から約 60℃の範囲の温度で表面標的分子の検出を行ってもよい。

[0108] あるいは、表面標的分子の検出及び内部標的分子の検出を、構造物の内容物の抽出の後に行ってもよい。

[0109] あるいは、構造体のウェルへの封入、構造体の内容物の抽出、表面標的分子の検出、内部標的分子の検出の各工程を順序を入れ替えて行ったり、いずれか2つの工程を同時に行ってもよい。例えば、構造体のウェルへの導入の後、構造体のウェルへの封入工程を行う前に抽出工程を行ってもよく、その場合、導入工程と抽出工程とを同時に行ってもよい。また、上述したように、表面標的分子検出工程又は内部標的分子検出工程の一部を、抽出工程を行う前に行ってもよい。

[0110] (構造体の検出)

本実施形態の方法は、構造体を検出する工程を更に備えていてもよい。構造体の検出は、上記実施形態の方法の任意の時点で行うことができ、例えば、構造体のウェルへの導入の後、構造体の内容物の抽出の前に行ってもよい。あるいは、構造体の内容物の抽出の後に、構造体を検出してもよい。

[0111] あるいは、表面標的分子の検出又は内部標的分子の検出と、構造体の検出

とを同時に行ってもよい。表面標的分子の検出、内部標的分子の検出、構造体の検出を同時に行う場合、検出シグナルが相互に干渉しないように反応系を構成する点については、上述した場合と同様である。

[0112] 構造体は、明視野観察する等の方法により直接検出してもよい。あるいは、構造体に含まれる分子を、表面標的分子又は内部標的分子と同様の操作により検出する等の方法により、間接的に構造体を検出してもよい。後者の例としては、細胞膜を染色する蛍光色素や、ウイルスコートタンパク質を認識する抗体等を用いて構造体を検出することが挙げられる。

[0113] [構造体の評価方法]

本発明の一実施形態は、複数のウェルを有するウェルアレイに、構造体が分散した液体を接触させ、前記ウェルに1ウェルあたり1つ以下の前記構造体を導入することと、前記ウェルアレイに封止液を接触させ、前記構造体を前記ウェル内に封入することと、前記ウェル内で前記構造体の内容物を抽出することと、前記ウェル内で前記構造体の表面に存在していた少なくとも1種の表面標的分子を検出することと、前記ウェル内で前記構造体の内部に存在していた少なくとも1種の内部標的分子を検出することと、前記表面標的分子の検出結果及び前記内部標的分子の検出結果に基づいて前記構造体を評価することと、を含む、構造体の評価方法を提供する。

[0114] 本実施形態の方法では、ウェル毎に前記表面標的分子及び前記内部標的分子の有無を検出する。その結果、構造体、表面標的分子及び内部標的分子を互いに関連付けて検出することができる。すなわち、1構造体レベルで表面標的分子及び内部標的分子を検出することができる。「構造体を評価する」とは、このように、構造体、表面標的分子及び内部標的分子を互いに関連付けて検出することを指す。また、構造体を評価することによって、構造体の由来又は状態等を解析してもよい。

[0115] [キット]

本発明の一実施形態は、複数のウェルを有するウェルアレイ、前記構造体

から内容物を抽出する試薬、前記構造体の表面に存在する少なくとも1種の表面標的分子を検出する試薬、及び、前記構造体の内部に存在する少なくとも1種の内部標的分子を検出する試薬、を含む、前記構造体の前記表面標的分子及び前記内部標的分子を検出するためのキットを提供する。

[0116] ウェルアレイは、上述した流体デバイスを構成していてもよい。構造体から内容物を抽出する試薬（つまり、抽出剤）、表面標的分子を検出する試薬及び内部標的分子を検出する試薬については、上述したものと同様である。

[0117] 本実施形態のキットにより、構造体の表面標的分子及び内部標的分子の検出を好適に実施することができる。

実施例

[0118] 以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。本発明は、これらの実施例に何ら限定されない。

[0119] [実施例1]

（ウイルス表面タンパク質及びウイルス内核酸の検出）

構造体の表面標的分子及び内部標的分子を検出した。構造体として、ウイルスの一種であるf1ファージ（試薬名：Escherichia coli phage f1、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：NBRC20010）を用いた。また、表面標的分子として、f1ファージ（内包DNAとして、5'-ACGTTAAACAAAAATCGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAATAATATGGCTGTTTATTTTGTAAGTGGCAAATTAGGCTCTGGAAAGACGCTCGTTAGCGTTGTAAGATTCAGGATAAATTGTAGCTGGGTGCAAAAT-3'（配列番号1）の塩基配列を有する。）の表面タンパク質であるコートタンパク質を検出した。また、内部標的分子として、f1ファージのゲノムDNA上の塩基配列（5'-GTAAGTGGCAAATTAGGCTCTGGAAAGACGCTCGTTAGC-3'、配列番号2）を検出した。また、構造体のウェルへの導入には、特異的結合物質として抗体を有する磁性ビーズを捕捉物として用いた。

[0120] 《核酸検出試薬の調製》

下記表1に組成を示すICA反応液を調製した。この反応液はICA反応

で核酸を検出するためのものである。表1中、Alexa488及びRedmond RED（表1ではREDと表記）は蛍光色素であり、BHQ-1（表1ではBHQと表記）及びEclipseは消光物質である。

[0121] [表1]

終濃度	試薬	塩基配列
0.5 μ M	アレルプローブ1	5'-CGCGCCGAGGGCCTAATTTGCCAGTTAC-3' (配列番号3)
0.5 μ M	アレルプローブ2	5'-ACGGACGCGGAGGATTGCTCACAGAAAGGA-3' (配列番号4)
1 μ M	ICAオリゴ1	5'-GCTAACGAGCGTCTTTCCAGAT-3' (配列番号5)
1 μ M	ICAオリゴ2	5'-GCATGGTTCCAATTTGGGTGAT-3' (配列番号6)
4 μ M	Alexa488-BHQ	5'-T(α)TCT(β)AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCGCG-3' (配列番号7) ここで、 α は第1番目の残基がAlexa488で修飾されていることを示し、 β は第4番目の残基がBHQ-1で修飾されていることを示す。
4 μ M	RED-Eclipse	5'-T(γ)CT(δ)TCGGCCTTTTGGCCGAGAGACTCGCGTCCGT-3' (配列番号8) ここで、 γ は第1番目の残基がRedmond Redで修飾されていることを示し、 δ は第3番目の残基がEclipseで修飾されていることを示す。
0.1 mg/mL	フラップエンドヌクレアーゼ (FEN)-1	—
50mM	Tris-HCl(pH8.5)	—
20mM	MgCl ₂	—
0.05%	Tween20	—

[0122] 続いて、ICA反応液とタンパク質抽出試薬であるBugBuster（メルクミリポア社製）を容量比で1：1となるように混合した溶液（溶液A）を調製した。

[0123] 《捕捉物の調製》

f1ファージを捕捉する捕捉物を調製した。具体的には、捕捉物として、抗f1ファージ抗体を固定化した磁性ビーズを調製した。

[0124] まず、カルボキシル基修飾磁性ビーズ（Magnosphere、LC300、JSR社）溶液に、抗f1ファージ抗体（型式「Anti-M-13 Phage Coat Protein」、フナコシ社）を添加し、ローテーターで30分反応させた。続いて、縮合剤であるEDC（1-Ethyl-3-（3-dimethylaminopropyl）carbodiimide）を加えて3時間反応させ、抗f1ファージ抗体をカルボキシル基修飾磁性ビーズに固定化した。

[0125] 続いて、未反応の抗体と試薬を取り除くため、マグネットスタンドを用いて抗体固定化磁性ビーズを磁気捕集した。続いて、PBS-T (0.1% Tween 20 含有 PBS (Phosphate-buffered saline)) による洗浄を3回繰り返し、抗体固定化磁性ビーズを調製した。これにより、f1ファージを捕捉する捕捉物が調製された。

[0126] 《核酸標識抗f1ファージ抗体の作製》

抗f1ファージ抗体 (型式「Anti-M-13 Phage Coat Protein」、フナコシ社) に、DNA断片 (5'-TTTGTCACTGTTCTCC TTTTGTTCCTTTCTGTGAGCAATCTCACCCAAATTGGAACCATGCTGTATACAGTT-3'、配列番号9) を結合させ、核酸標識抗f1ファージ抗体を作製した。DNA断片の結合には、市販のキット (商品名「Protein-Oligo Conjugation Kit」、ソルリンク社) を用いた。

[0127] 《f1ファージ及び抗体固定化ビーズの反応》

f1ファージの濃度は、販売されているf1ファージの懸濁液の濃度を100%とした場合における希釈率として表す。f1ファージ (終濃度0%又は終濃度1%)、100 μ g/mLの上述した抗体固定化磁性ビーズ、10 ng/mLの上述した核酸修飾抗f1ファージ抗体を、全量が100 μ Lとなるように混合し、ローテーター上で室温1時間反応させた。ここで、f1ファージが存在する場合、抗f1ファージ抗体が、f1ファージ表面のコートタンパク質を認識し結合することにより抗体固定化磁性ビーズとの複合体が形成された。

[0128] 続いて、マグネットスタンドを用いて磁性ビーズを磁気捕集し、上清の除去及びPBS-Tを加える操作を3回繰り返して洗浄し、最後に上清を除去した。

[0129] 《導入工程》

続いて、図1に示す構造の流体デバイスに、上述した溶液A (ICA反応液とBug Buster (メルクミリポア社製) の混合液) に懸濁した抗体固定化磁性ビーズ20 μ Lを送液し、ウェルアレイに接触させた。この結果

、抗体固定化磁性ビーズがウェルに導入された。

[0130] 本実施例で用いた流体デバイスのウェルの直径は $5\text{ }\mu\text{m}$ であり、ウェルの深さは $3\text{ }\mu\text{m}$ であった。また、流路の高さは $100\text{ }\mu\text{m}$ であった。

[0131] 《封入工程》

続いて、封止液としてFC-40 (Sigma社) を $150\text{ }\mu\text{L}$ 送液し、ウェルアレイに接触させた。この結果、各ウェルが個別に封止され、抗体固定化磁性ビーズが封入された。以上の操作により、抗体固定化磁性ビーズがf1ファージとの複合体を形成していた場合、1ウェルあたり1個以下のf1ファージがウェル内に封止された。

[0132] 《抽出工程》

続いて、上記流体デバイスをホットプレート上にセットし、 66°C で15分間反応させた。これにより、封止されたウェル内で、f1ファージのカプシド構造が壊れ、f1ファージの内容物であるゲノムDNAが抽出された。

[0133] 《表面標的分子検出工程及び内部標的分子検出工程》

続いて、抽出工程後の上記流体デバイスをホットプレート上にセットし、 66°C で15分間反応させた。これにより、表面標的分子及び内部標的分子が同時に検出された。

[0134] より詳細には、アレルプローブ1及びICAオリゴ1がゲノムDNA上の塩基配列（配列番号2）にそれぞれハイブリダイズし、フラップ構造を形成した。続いて、FEN-1がフラップ構造を認識してアレルプローブ1を切断した。

[0135] 続いて、放出されたアレルプローブ1の断片がRED-Eclipseにハイブリダイズし、フラップ構造を形成した。続いて、FEN-1がフラップ構造を認識してRED-Eclipseを切断し、その結果、蛍光物質と消光物質が離れ、Redmond REDの蛍光シグナルが発生した。

[0136] 同様に、アレルプローブ2及びICAオリゴ2が、核酸標識抗f1ファージ抗体に修飾されたDNA断片にそれぞれハイブリダイズし、フラップ構造を形成した。続いて、FEN-1がフラップ構造を認識してアレルプローブ

2を切断した。

[0137] 続いて、放出されたアレルプローブ2の断片がA l e x a 4 8 8－B H Qにハイブリダイズし、フラップ構造を形成した。続いて、F E N－1がフラップ構造を認識してA l e x a 4 8 8－B H Qを切断し、その結果、蛍光物質と消光物質が離れ、A l e x a 4 8 8の蛍光シグナルが発生した。

[0138] 《ウェルの蛍光観察》

表面標的分子検出工程及び内部標的分子検出工程の後、蛍光顕微鏡B Z－7 1 0（K E Y E N C E社）を用いて流体デバイスの各ウェルの蛍光シグナルを撮影した。1 0倍の対物レンズを用いた。

[0139] 露光時間は、A l e x a 4 8 8の蛍光観察の際にはG F Pの蛍光フィルターを用いて3 0 0 0 m s e cとし、R e d m o n d R E Dの蛍光観察の際にはT e x a s R e dの蛍光フィルターを用いて2 0 0 0 m s e cとした。

[0140] 図9は、蛍光観察の結果を示す写真である。図9中、「ファージなし」はウイルス濃度0%のf 1ファージの結果であることを示し、「ファージあり」はウイルス濃度1%のf 1ファージの結果であることを示す。

[0141] また、「A l e x a 4 8 8」はA l e x a 4 8 8の蛍光を検出した結果であることを示し、「R E D」はR e d m o n d R E Dの蛍光を検出した結果であることを示し、「O v e r l a y」はA l e x a 4 8 8の蛍光の検出結果とR e d m o n d R E Dの蛍光の検出結果を重ね合わせた結果であることを示す。下記表2に蛍光が検出されたウェルの数を示す。

[0142] [表2]

	Alexa488 (配列番号2の核酸断片)	RED (コートタンパク質)	Overlay
ファージなし	0 ウェル	2 ウェル	0 ウェル
ファージあり	62 ウェル	32 ウェル	23 ウェル

[0143] その結果、ファージのコートタンパク質が出された3 2ウェルのうち2 3ウェルで配列番号2の核酸断片が検出されたことが明らかとなった。すなわち、ファージのコートタンパク質が出されたウェルのうちの約7 2%のウェ

ルでファージのゲノムDNAを検出することができた。この結果は、構造体の表面標的分子と内部標的分子を高精度で関連付けて検出することができることを示す。

[0144] [実施例2]

(抽出試薬の濃度の検討)

抽出工程において、構造体から内容物を抽出する試薬（抽出試薬）の濃度を検討した。構造体として、ウイルスの一種である f 1 ファージ（試薬名：Escherichia coli phage f 1、独立行政法人 製品評価技術基盤機構、型番：NBRC20010）を用いた。また、内部標的分子として、f 1 ファージのゲノムDNA上の塩基配列（配列番号2）を検出した。

[0145] 《核酸検出試薬の調製》

下記表3に組成を示すICA反応液を調製した。表3中、Alexa488は蛍光色素であり、BHQ-1（表3中、BHQと表記）は消光物質である。

[0146] [表3]

終濃度	試薬	塩基配列
0.5 μ M	アレルプローブ1	5'-CGCGCCGAGGGCCTAATTTGCCAGTTAC-3' (配列番号3)
1 μ M	ICAオリゴ1	5'-GCTAACGAGCGTCTTTCCAGAT-3' (配列番号5)
4 μ M	Alexa488-BHQ	5'-T(α TCT(β)AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCGCG-3' (配列番号7) ここで、 α は第1番目の残基がAlexa488で修飾されていることを示し、 β は第4番目の残基がBHQ-1で修飾されていることを示す。
0.1mg/mL	フラップエンドヌクレアーゼ(FEN)-1	—
50mM	Tris-HCl(pH8.5)	—
20mM	MgCl ₂	—
0.05%	Tween20	—
1%	f1ファージ	—

[0147] 続いて、ICA反応液とタンパク質抽出試薬であるBugBuster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液：BugBuster=9：1、1：1、1：9となるように混合した溶液をそれぞれ調製した。また、ネガティブコントロールとして、f 1 ファージを含まない試料も用意した。

[0148] 続いて、各試料をリアルタイムPCR装置（型式「LightCycler 480」、ロシュ社）にセットし、65℃で60分間反応させ、Alexa 488の蛍光シグナルを経時的に測定した。

[0149] 図10は、蛍光シグナルの経時変化を測定した結果を示すグラフである。図10中、「9:1 NC」は、f1ファージを含まないICA反応液とBug Buster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液:Bug Buster=9:1で混合した試料の結果であることを示し、「9:1 phage」は、ICA反応液（f1ファージを含む。）とBug Buster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液:Bug Buster=9:1で混合した試料の結果であることを示し、「1:1 NC」は、f1ファージを含まないICA反応液とBug Buster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液:Bug Buster=1:1で混合した試料の結果であることを示し、「1:1 phage」は、ICA反応液（f1ファージを含む。）とBug Buster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液:Bug Buster=1:1で混合した試料の結果であることを示し、「1:9 NC」は、f1ファージを含まないICA反応液とBug Buster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液:Bug Buster=1:9で混合した試料の結果であることを示し、「1:9 phage」は、ICA反応液（f1ファージを含む。）とBug Buster（メルクミリポア社製）を容量比でICA反応液:Bug Buster=1:9で混合した試料の結果であることを示す。

[0150] その結果、Bugbusterの容量比が高すぎると、ICA反応が阻害されることが明らかとなった。

[0151] [実施例3]

（抽出工程の検討）

本実施例では、構造体から内容物を抽出する条件の検討を行った。構造体として、ウイルスの一種であるf1ファージ（試薬名:Escherichia coli phage f1、独立行政法人製品評価技術基盤機構、

型番：NBRC20010)を用いた。また、f1ファージのゲノムDNA上の塩基配列（配列番号2）を内部標的分子として検出した。

[0152] 《核酸検出試薬の調製》

下記表4に組成を示すICA反応液を調製した。この反応液はICA反応で核酸を検出するためのものである。表4中、Alexa488は蛍光色素であり、BHQ-1（表4中、BHQと表記）は消光物質である。表4中、「MOPS」は3-モルホリノプロパンスルホン酸を表す。

[0153] [表4]

終濃度	試薬	塩基配列
0.5 μ M	アレロプローブ1	5'-CGCGCCGAGGGCCTAATTTGCCAGTTAC-3' (配列番号3)
1 μ M	ICAオリゴ1	5'-GCTAACGAGCGTCTTTCCAGAT-3' (配列番号5)
4 μ M	Alexa488-BHQ	5'-T(α TCT(β)AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCGCG-3' (配列番号7) ここで、 α は第1番目の残基がAlexa488で修飾されていることを示し、 β は第4番目の残基がBHQ-1で修飾されていることを示す。
0.1 mg/mL	フラップエンドヌクレアーゼ(FEN)-1	—
50 mM	MOPS(pH7.9)	—
20 mM	MgCl ₂	—

[0154] 続いて、種々の条件でファージの内容物の抽出を試み、以下の試料1～4を調製した。

・試料1：ファージ（10％）に、プローブ型超音波発生装置を用いて超音波処理を1分間行った。

・試料2：ファージ（10％）に、BugBuster（メルクミリポア社製）を容量比で50％加え、37℃で30分間攪拌した。

・試料3：ファージ（10％）を70℃で30分間加熱した。

・試料4：ファージ（10％）に、BugBuster（メルクミリポア社製）を容量比で50％加え、70℃で30分間攪拌した。

[0155] 続いて、サンプルチューブに、上述したICA反応液と試料1～4とをそれぞれ混合して、ファージ濃度が終濃度1％、容量10 μ Lとなる溶液を調製した。

[0156] また、ネガティブコントロールとして、ICA反応液のみ（試料5）、及

び、ICA反応液及びファージの混合溶液（試料6）を調製した。また、ポジティブコントロールとして、ICA反応液に、f1ファージのゲノムDNA上に存在する塩基配列（配列番号2）を有する核酸断片を終濃度30pMとなるように加えた溶液（試料7）を調製した。

[0157] 続いて、これらの試料をリアルタイムPCR装置（型式「LightCycler 480」、ロシュ社）にセットし、66℃で60分間反応させ、Alexa 488の蛍光シグナルを経時的に測定した。

[0158] 図11は、蛍光シグナルの経時変化を測定した結果を示すグラフである。図11中、横軸は反応時間（秒）を示し、縦軸は蛍光強度（相対値）を示す。図11中、「ICA」はICA溶液を示し、「phage」はファージを示し、「bug」はBug Buster（メルクミリポア社製）を示す。

[0159] その結果、ファージを超音波処理した試料1、ファージにBug Buster（メルクミリポア社製）を加えた試料2、ファージに70℃の熱処理を加えた試料3、ファージにBug Buster（メルクミリポア社製）を加え、かつ、70℃で30分間熱処理した試料4、及びポジティブコントロールの試料7において、いずれも蛍光強度の増加が検出された。

[0160] また、ファージを超音波処理した試料1、及び、ファージにBug Buster（メルクミリポア社製）を加え、かつ、70℃で30分間熱処理した試料4で、は蛍光強度の増加が顕著であった。一方、ネガティブコントロールのICA反応液のみ（試料5）では、蛍光強度の増加はほとんど観察されなかった。また、ICA反応液及びファージの混合溶液（試料6）においても、時間の経過とともに、蛍光強度の増加が観察されたが、試料1～4と比較すると増加の程度は緩やかであった。

産業上の利用可能性

[0161] 本発明によれば、構造体の外部及び内部に存在する標的分子を検出する技術を提供することができる。

符号の説明

[0162] 100、200…流体デバイス、110…基板、120…蓋部材、121

…凸部、１２２…導入ポート、１２３…排出ポート、１３０…流路、１４０…ウェルアレイ、１４１…ウェル、１４２…微小区画、Ｌ１１０…試薬液、Ｌ１２０…封止液、１４２Ｒ…シグナルが検出されたウェル、２１０…壁部材、７００，７００’…構造体、７１０…表面標的分子、７２０…内部標的分子、８００…捕捉物、８１０…特異的結合物質。

請求の範囲

- [請求項1] 複数のウェルを有するウェルアレイに、構造体が分散した液体を接触させ、前記ウェルに前記構造体を導入することと、
前記ウェルアレイに封止液を接触させ、前記構造体を前記ウェル内に封入することと、
前記ウェル内で前記構造体の内容物を抽出することと、
前記ウェル内で前記構造体の表面に存在していた少なくとも1種の表面標的分子を検出することと、
前記ウェル内で前記構造体の内部に存在していた少なくとも1種の内部標的分子を検出することと、
を含む、前記構造体の表面標的分子及び内部標的分子を検出する方法。
- [請求項2] 前記構造体の内容物を抽出すること、前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが、前記構造体を前記ウェル内に封入することの後に行われる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが、前記構造体の内容物を抽出することの後に行われる、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが同時に行われる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記表面標的分子を検出すること及び前記内部標的分子を検出することが、同一条件下で行われる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記表面標的分子及び前記内部標的分子のそれぞれが、核酸、タンパク質、糖、糖タンパク質、脂質又はこれらの複合体からなる群より選択される少なくとも1種の分子である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記表面標的分子がタンパク質を含み、前記内部標的分子が核酸を

含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 前記内部標的分子を検出することが核酸検出手法により行われる、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 前記核酸検出手法が、*Invasive Cleavage Assay*である、請求項 8 に記載の方法。

[請求項10] 前記表面標的分子を検出することにおいて検出するシグナルと前記内部標的分子を検出することにおいて検出するシグナルが互いに識別可能である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] 前記構造体が、ウイルス、エクソソーム、細胞、小胞体からなる群より選択されるいずれか 1 つである、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項12] 前記構造体が捕捉物との複合体を形成しており、前記捕捉物は固相と前記構造体に対する特異的結合物質との結合体である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] 前記特異的結合物質が抗体である、請求項 12 に記載の方法。

[請求項14] 前記構造体の内容物を抽出することは、界面活性剤を含む液体中で構造体を加熱することである、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項15] 前記導入工程において、前記ウェル 1 つあたりに 1 つ以下の前記構造体が導入される、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 請求項 15 に記載の方法により、前記ウェル毎に前記表面標的分子及び前記内部標的分子の有無を検出する工程と、

前記表面標的分子の検出結果及び前記内部標的分子の検出結果に基づいて前記構造体を評価する工程と、を含む、構造体の評価方法。

[請求項17] 複数のウェルを有するウェルアレイ、

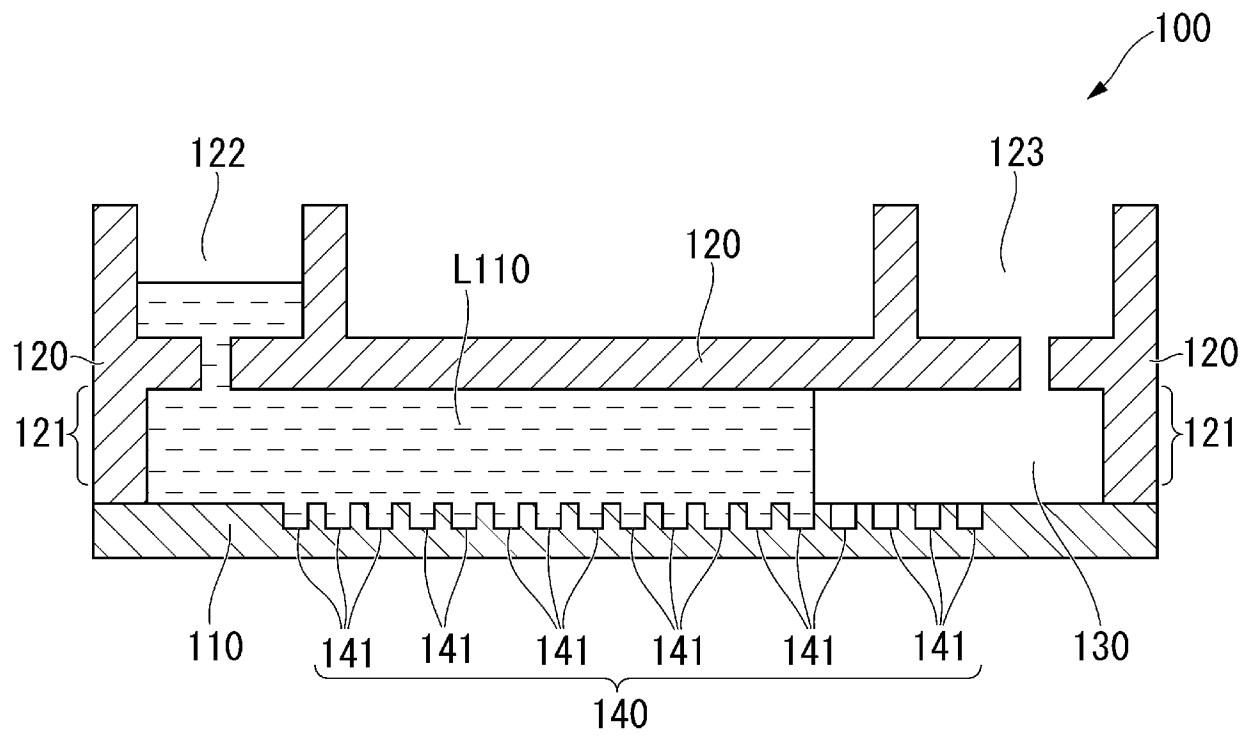
構造体から内容物を抽出する試薬、

前記構造体の表面に存在する少なくとも 1 種の表面標的分子を検出する試薬、及び

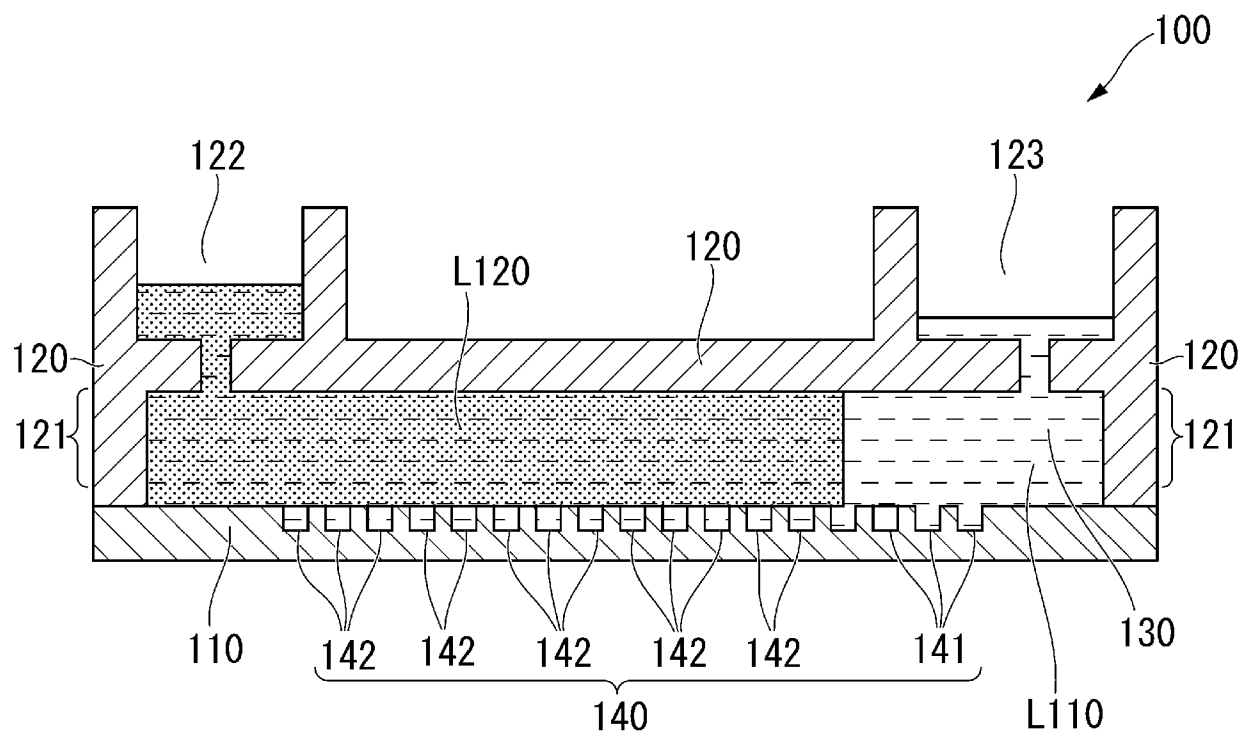
前記構造体の内部に存在する少なくとも 1 種の内部標的分子を検出する試薬、

を含む、前記構造体の前記表面標的分子及び前記内部標的分子を検出するためのキット。

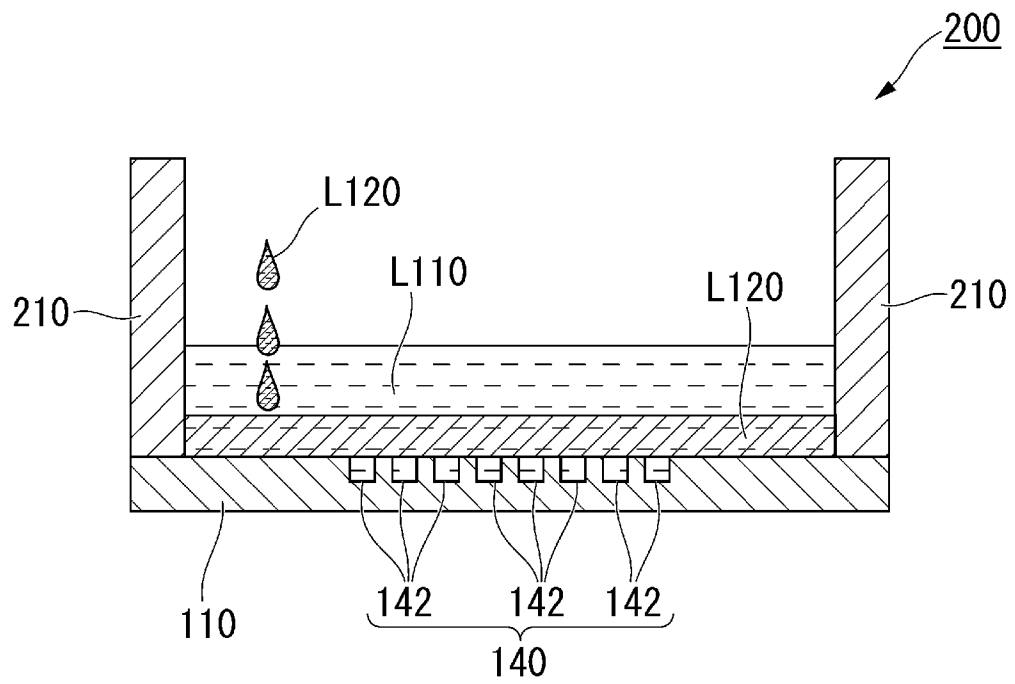
[図1]



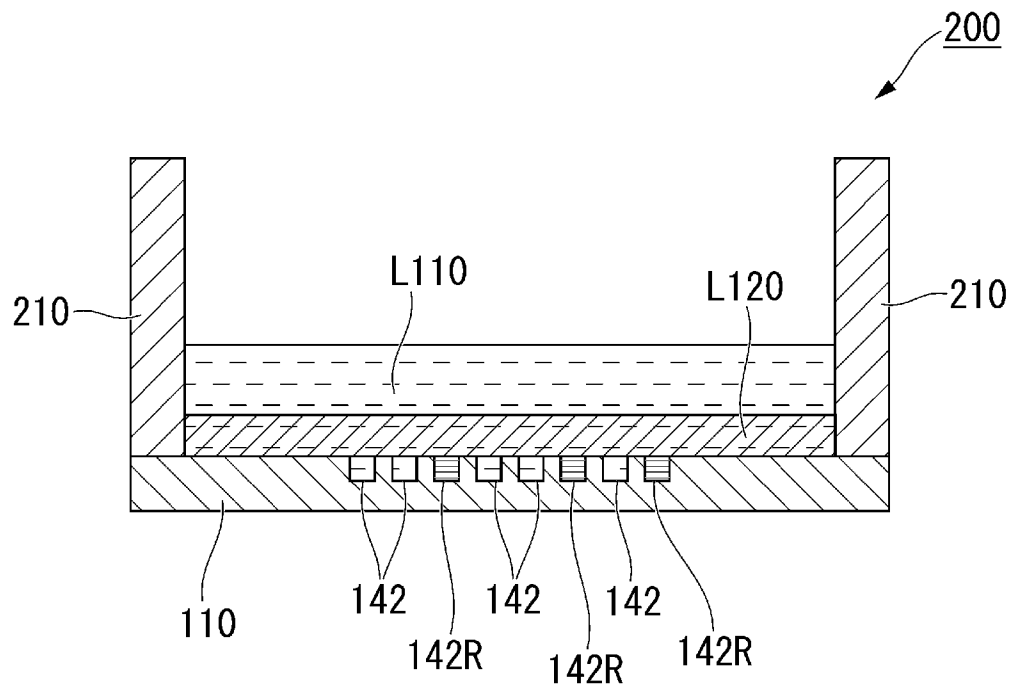
[図2]



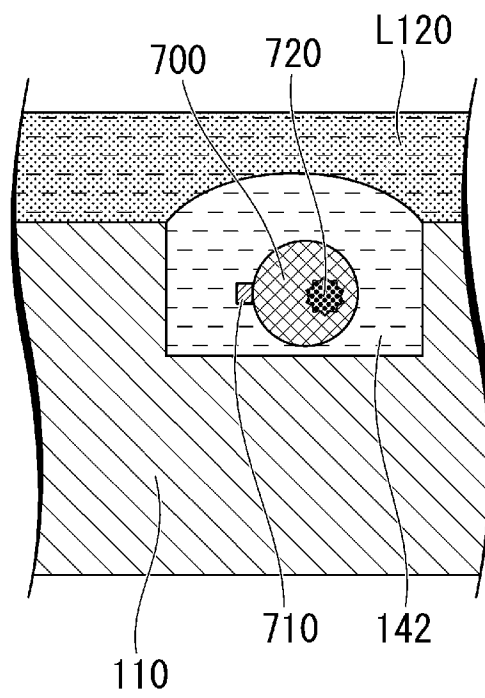
[図5]



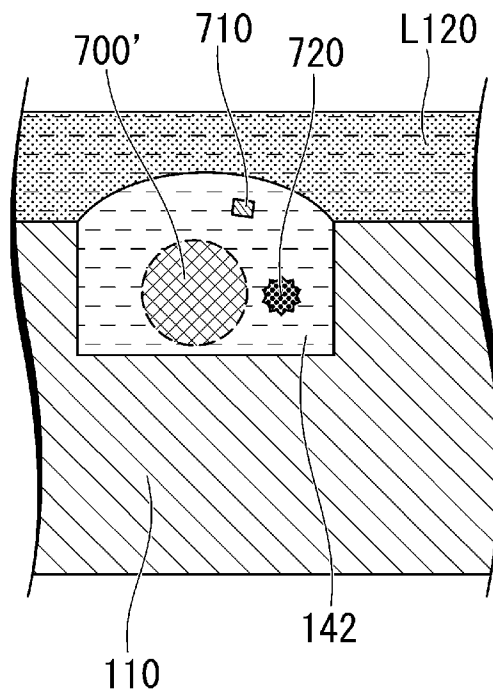
[図6]



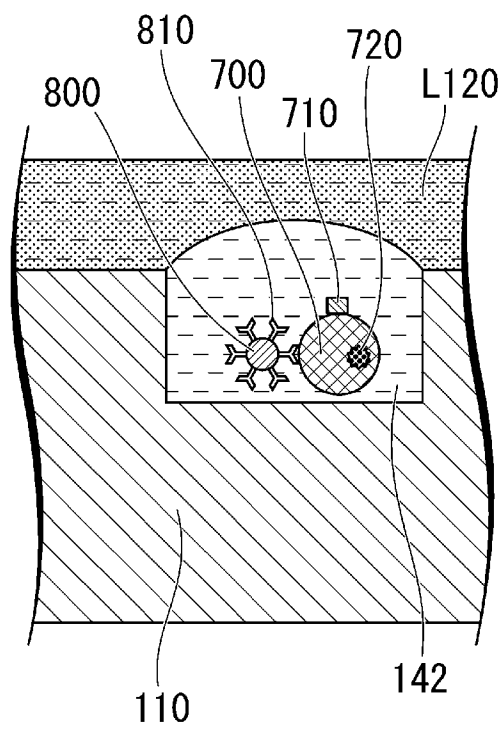
[図7A]



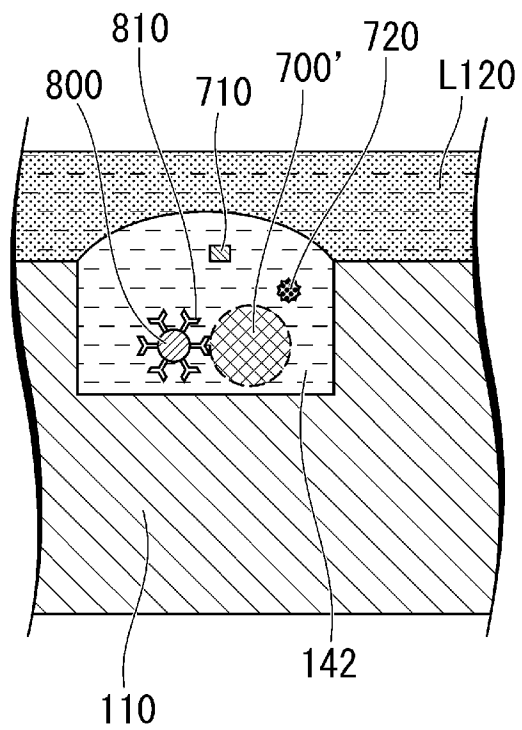
[図7B]



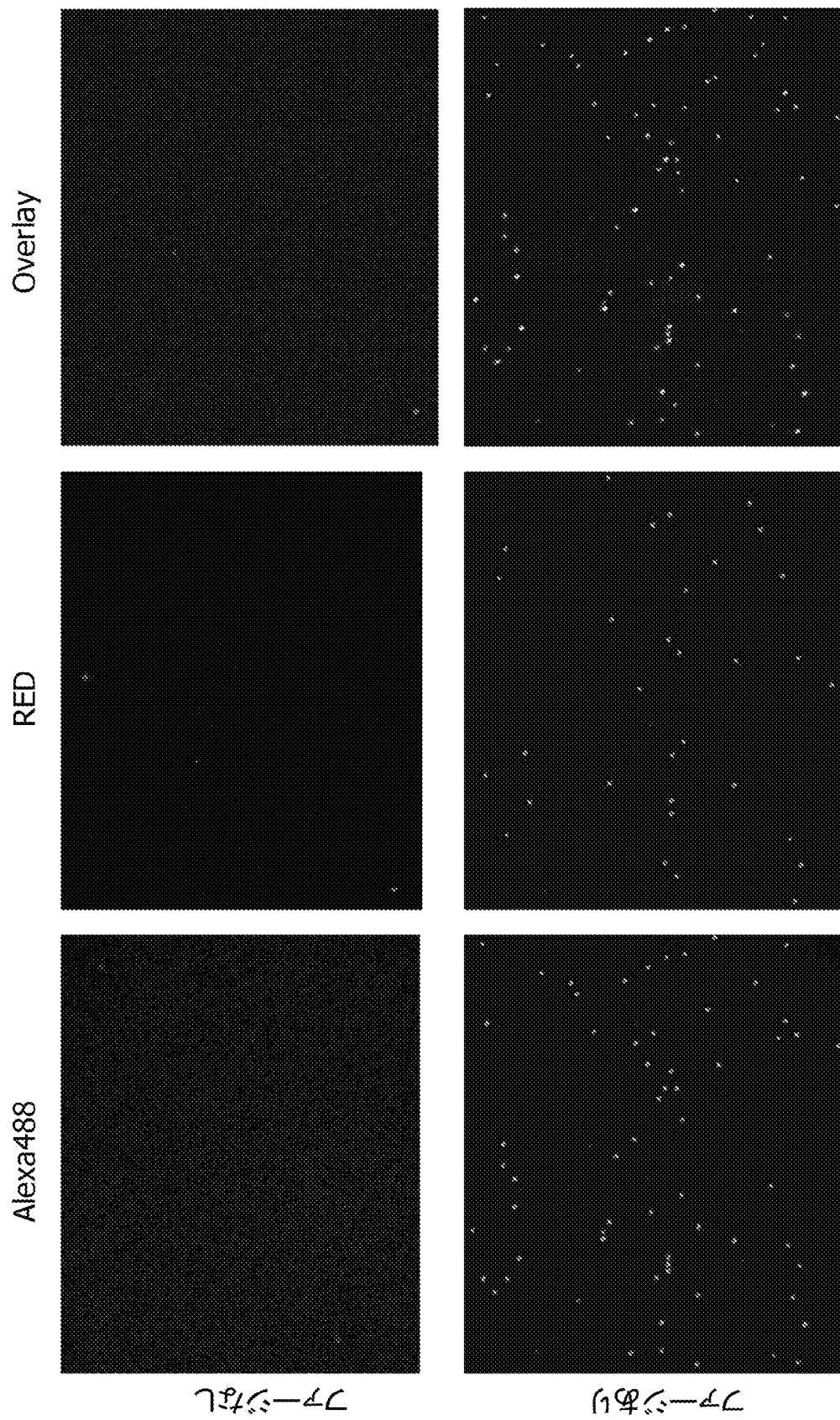
[図8A]



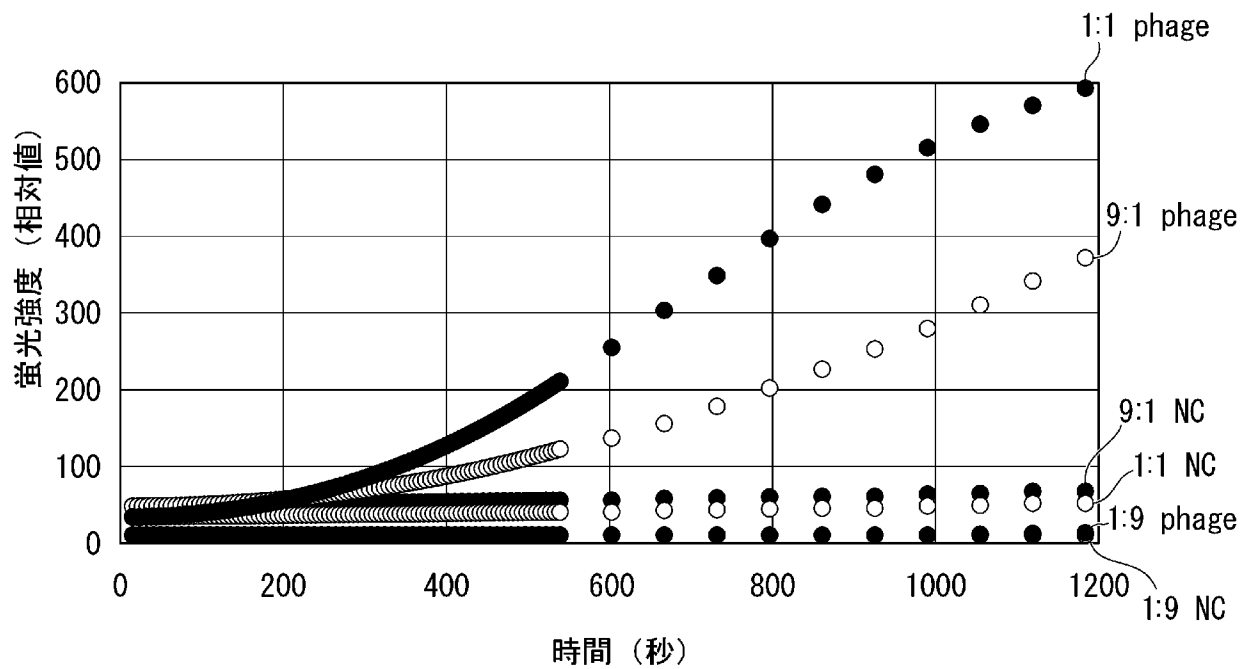
[図8B]



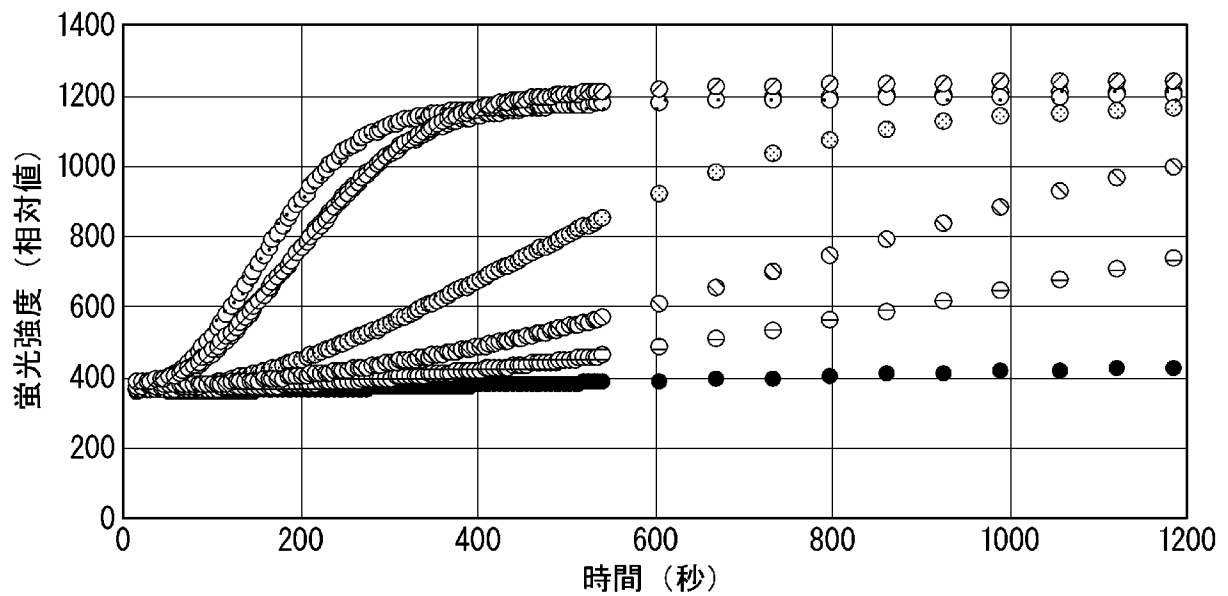
[図9]



[図10]



[図11]



○	ICA+phage+bug+heat (試料4)	○	ICA+phage+sonic (試料1)
●	ICA+phage+bug (試料2)	○	ICA+phage+heat (試料3)
○	ICA+phage oligo 30pM (試料7)	○	ICA+phage (試料6)
●	ICA (試料5)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/019992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 37/00(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i

FI: G01N33/53 D; G01N37/00 101; G01N33/53 M; G01N33/53 S; G01N33/569 G; C12Q1/68; C12M1/34 B; G01N33/53 V ZNA

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)

G01N37/00; C12M1/34; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/569

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/0346969 A1 (CELLULAR RESEARCH, INC.)	1-16
X	06.12.2018 (2018-12-06) entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0004], [0401]-[0436], [0424]-[0494], [0556]-[0620], fig. 5-8, etc.	17
Y	JP 6183471 B2 (TOPPAN PRINTING CO., LTD.)	1-16
	23.08.2017 (2017-08-23) entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	
Y	WO 2016/006208 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 14.01.2016 (2016-01-14) entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	1-16
A	WO 2017/200070 A1 (TOPPAN PRINTING CO., LTD.)	1-17
	23.11.2017 (2017-11-23) see entire text, all drawings, etc.	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 August 2020 (11.08.2020)

Date of mailing of the international search report

25 August 2020 (25.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/019992

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 2018-509895 A (PROKYMA TECHNOLOGIES LIMITED) 12.04.2018 (2018-04-12) see entire text, all drawings, etc.	1-17
A	JP 2017-063716 A (SONY CORP.) 06.04.2017 (2017-04-06) see entire text, all drawings, etc.	1-17
A	JP 2000-502887 A (MANDECKI, Wlodek) 14.03.2000 (2000-03-14) see entire text, all drawings, etc.	1-17
A	JP 2009-505106 A (NANOSPHERE, INC.) 05.02.2009 (2009-02-05) see entire text, all drawings, etc.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/019992

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2018/0346969 A1	06 Dec. 2018	JP 2020-522262 A entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0004], [0346]- [0372], [0422]- [0425], [0485]- [0549], fig. 5-8, etc.	
JP 6183471 B2	23 Aug. 2017	WO 2018/226293 A1 US 2016/0333400 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	
WO 2016/006208 A1	14 Jan. 2016	US 2019/0241948 A1 WO 2015/115635 A1 EP 3101115 A1 EP 3584306 A1 JP 2017-113009 A JP 2018-121634 A JP 2019-141047 A	
WO 2017/200070 A1	23 Nov. 2017	US 2017/0176430 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	
JP 2018-509895 A	12 Apr. 2018	US 2015/0087547 A1 EP 3168624 A1 US 2019/0085385 A1 see entire text, all drawings, etc.	
JP 2017-063716 A	06 Apr. 2017	EP 3460474 A1 US 2018/0030507 A1 see entire text, all drawings, etc.	
		WO 2016/128758 A1 EP 3256603 A1 US 2018/0372741 A1 see entire text, all drawings, etc.	
		WO 2017/056362 A1 EP 3362795 A1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/019992

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2000-502887 A	14 Mar. 2000	US 5641634 A see entire text, all drawings, etc. US 6001571 A US 6051377 A US 6361950 B1 US 2002/0006673 A1 US 6376187 B1 WO 1997/020074 A1 EP 871777 A1	
JP 2009-505106 A	05 Feb. 2009	US 2009/0111094 A1 see entire text, all drawings, etc. WO 2007 /024676 A2 EP 1915466 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 37/00(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i FI: G01N33/53 D; G01N37/00 101; G01N33/53 M; G01N33/53 S; G01N33/569 G; C12Q1/68; C12M1/34 B; G01N33/53 V ZNA																				
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）） G01N37/00; C12M1/34; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/569 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table> 国際調査で利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)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2020年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2020年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2020年																			
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2018/0346969 A1 (CELLULAR RESEARCH, INC.) 06.12.2018 (2018-12-06) 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0004], [0401] - [0436], [0424] - [0494] [0556] - [0620], FIG. 5 - 8等参照</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td></td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 6183471 B2 (凸版印刷株式会社) 23.08.2017 (2017-08-23) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016/006208 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 14.01.2016 (2016-01-14) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017/200070 A1 (凸版印刷株式会社) 23.11.2017 (2017-11-23) 全文・全図等参照</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			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	US 2018/0346969 A1 (CELLULAR RESEARCH, INC.) 06.12.2018 (2018-12-06) 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0004], [0401] - [0436], [0424] - [0494] [0556] - [0620], FIG. 5 - 8等参照	1-16	X		17	Y	JP 6183471 B2 (凸版印刷株式会社) 23.08.2017 (2017-08-23) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-16	Y	WO 2016/006208 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 14.01.2016 (2016-01-14) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-16	A	WO 2017/200070 A1 (凸版印刷株式会社) 23.11.2017 (2017-11-23) 全文・全図等参照	1-17
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	US 2018/0346969 A1 (CELLULAR RESEARCH, INC.) 06.12.2018 (2018-12-06) 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0004], [0401] - [0436], [0424] - [0494] [0556] - [0620], FIG. 5 - 8等参照	1-16																		
X		17																		
Y	JP 6183471 B2 (凸版印刷株式会社) 23.08.2017 (2017-08-23) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-16																		
Y	WO 2016/006208 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 14.01.2016 (2016-01-14) 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]等参照	1-16																		
A	WO 2017/200070 A1 (凸版印刷株式会社) 23.11.2017 (2017-11-23) 全文・全図等参照	1-17																		
☒ 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、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																				
国際調査を完了した日 11.08.2020		国際調査報告の発送日 25.08.2020																		
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 草川 貴史 2J 4075 電話番号 03-3581-1101 内線 3252																		

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	JP 2018-509895 A (プロキーマ テクノロジーズ リミテッド) 12.04.2018 (2018 - 04 - 12) 全文・全図等参照	1-17
A	JP 2017-063716 A (ソニー株式会社) 06.04.2017 (2017 - 04 - 06) 全文・全図等参照	1-17
A	JP 2000-502887 A (マンデッキ ウロデック) 14.03.2000 (2000 - 03 - 14) 全文・全図等参照	1-17
A	JP 2009-505106 A (ナノスフェア インコーポレイテッド) 05.02.2009 (2009 - 02 - 05) 全文・全図等参照	1-17

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/019992

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
US	2018/0346969	A1	06.12.2018	JP 2020-522262 A 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0004]、[0346] - [0372]、[0422] - [0425]、[0485] - [0549]、[図5] - [図8] 等参照	
				WO 2018/226293 A1	
JP	6183471	B2	23.08.2017	US 2016/0333400 A1 全文・全図、特に、特許請求の範囲等参照	
				US 2019/0241948 A1	
				WO 2015/115635 A1	
				EP 3101115 A1	
				EP 3584306 A1	
				JP 2017-113009 A	
				JP 2018-121634 A	
				JP 2019-141047 A	
WO	2016/006208	A1	14.01.2016	US 2017/0176430 A1 全文・全図、特に、特許請求の範囲等参照	
				US 2015/0087547 A1	
				EP 3168624 A1	
WO	2017/200070	A1	23.11.2017	US 2019/0085385 A1 全文・全図等参照	
				EP 3460474 A1	
JP	2018-509895	A	12.04.2018	US 2018/0030507 A1 全文・全図等参照	
				WO 2016/128758 A1	
				EP 3256603 A1	
JP	2017-063716	A	06.04.2017	US 2018/0372741 A1 全文・全図等参照	
				WO 2017/056362 A1	
				EP 3362795 A1	
JP	2000-502887	A	14.03.2000	US 5641634 A 全文・全図等参照	
				US 6001571 A	
				US 6051377 A	
				US 6361950 B1	
				US 2002/0006673 A1	
				US 6376187 B1	
				WO 1997/020074 A1	
				EP 871777 A1	
JP	2009-505106	A	05.02.2009	US 2009/0111094 A1 全文・全図等参照	
				WO 2007/024676 A2	
				EP 1915466 A1	