

(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7月16日(16.07.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/145124 A1

(51) 国際特許分類:

C12M 1/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

C12Q 1/6874 (2018.01) *G01N 37/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/050512

(22) 国際出願日: 2019年12月24日(24.12.2019)

(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 2019-001562 2019年1月9日(09.01.2019) JP

(71) 出願人: 株式会社日立ハイテク
(**HITACHI HIGH-TECH CORPORATION**) [JP/
JP]; 〒1056409 東京都港区虎ノ門一丁目
17番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 馬場 紀子(**BABA Noriko**); 〒1058717 東
京都港区西新橋一丁目24番14号 株式会社

日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 奈良
原 正俊(**NARAHARA Masatoshi**); 〒1058717 東
京都港区西新橋一丁目24番14号 株式会社
日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 板橋 直
志(**ITABASHI Naoshi**); 〒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). 横山 徹(**YOKOYAMA Toru**);
〒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).

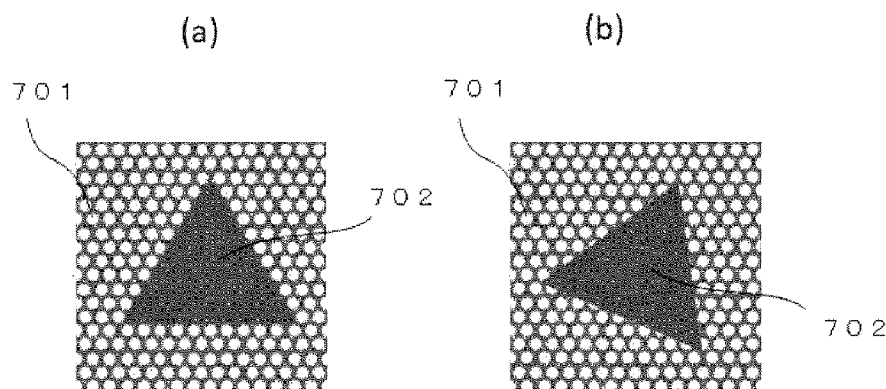
(74) 代理人: 岩崎 重美 (**IWASAKI Shigemi**);
〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2
4番14号 株式会社日立ハイテクノ
ロジーズ内 Tokyo (JP).

(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,

(54) **Title:** SUBSTRATE FOR NUCLEIC ACID ANALYSIS, FLOW CELL FOR NUCLEIC ACID ANALYSIS, AND
IMAGE ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 核酸分析用基板、核酸分析用フローセル、及び画像解析方法

図7



(57) **Abstract:** At the positions of spots which are arranged on a substrate, image aligning is made difficult by the occurrence of a recognition error of the positions of spots, said spots being adjacent to each other in a patterned form, or a displacement caused by the expansion or deformation of the substrate due to device operation, temperature control, etc. The present invention provides: a substrate for nucleic acid analysis, on the surface of which a patterned spot area provided with spots to which a biopolymer is adhered and a randomly distributed spot area are formed; and an analysis method.



WO 2020/145124 A1

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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 基板上に配置するスポット位置で、パターン状に隣接するスポット同士の位置の誤認識や、装置駆動、温調等による基板の膨張や変形による位置ずれが発生した場合、画像の位置合わせが困難になる。基板表面上に、生体高分子が付着するスポットを形成するパターン状のスポット部と、ランダム状のスポット部を備えた核酸分析用基板と解析方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：

核酸分析用基板、核酸分析用フローセル、及び画像解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、核酸分析用基板、核酸分析用フローセル、および画像位置合わせ方法に係り、生体関連物質を計測するための分析用のパターン状のスポット部およびランダム状のスポット部の配置に関する。

背景技術

[0002] 近年、核酸分析装置では、大量の塩基配列情報を同時並列でシーケンス可能としている。分析対象となる核酸は基板上に固定され、シーケンス反応を繰り返す。核酸の塩基配列に対して塩基を特定する蛍光ヌクレオチドを取り込ませ、そこから発する蛍光輝点から塩基を特定する技術が用いられている。核酸の複数の塩基に対応した画像がそれぞれ装置から提供されている。1 サイクルと呼ばれるシーケンス単位では、固定された核酸のうち、それぞれ1塩基分をシーケンスする。このサイクルを繰り返すことにより各核酸の塩基を順番にシーケンスすることが出来る。大量の塩基配列情報を取得するためには、基板上に固定される核酸の密度を高める必要がある。核酸を固定する基板の種類は、基板上にランダムに核酸を固定するランダムスポットによる基板と、パターン状に核酸を整列固定するパターンスポットによる基板がある。ランダムスポットは固定された核酸同士が近すぎる場合、別々に検出できない可能性があり、高密度に核酸を配置する場合はパターンスポットが効果的である。例えば特許文献1に開示されている分析用基板では、核酸が結合する付着スポットが基板上に格子状に配置されたパターンスポットを形成し、高密度化を図っている。

[0003] この様な基板上の核酸を分析する手法では、輝点である蛍光画像内の個々のスポットの位置を正確に同定する必要がある。一般的に、同一の検出視野を撮像した蛍光撮像同士であっても、視野を変えるためにステージ駆動等の

移動を行った場合、駆動制御の精度によって、撮像した位置はずれて異なる位置を示す場合がある。このため、あるスポットの座標位置は、個々の画像内で異なる座標位置として撮像される場合がある。個々のスポットの位置を正確に同定するためには、個々のスポットの基板上の座標位置を正確に求める必要がある。

[0004] 前述特許文献1のようなパターンスポットを形成し、高密度化を図っても、周期的に整列した付着スポットであることから、誤認識による位置ずれが発生する場合、核酸の付着スポットの位置を同定することは困難となる。そのため、特許文献2では基板上に施したパターン状の付着スポットのうち、任意に付着スポットを欠損させ、その欠損個所を検出し、位置ずれを補正する分析手法を開示している。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許出願公開第2009/0270273号明細書

特許文献2：米国特許第8774494号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 大量の塩基配列情報を取得するために、サンプルの高密度化を目的として、基板上にパターン状のサンプルの付着スポットを配置した場合、サンプルの高密度化は図れるが、周期的に整列した付着スポットのため、隣接する付着スポット同士の位置の判別が困難になる課題がある。また、基板に固定された核酸は、シーケンス反応を繰り返しても基板上での固定位置は変わらないが、基板を載せたステージの駆動精度や、温調システムによる基板の膨張や変形などによって、サイクルごとに全く同じ位置の画像が取得されない場合がある。さらに、1画像においても、画像中央付近と四隅付近では収差が異なるため画像の位置合わせを困難にしている。

[0007] これらの課題を解決する手段として、例えばマーカーなどの基準点を基板

上に配置する方法がある。この場合、輝点と基準点の複数点の組み合わせで、一つの位置を決定することが必要となる。様々な要因による位置ずれに対応するために、通常は多くのマーカーとなる基準点を必要とし、これらの基準点を検出し位置を決定するためには画像処理の負荷が大きくなる傾向がある。

[0008] また、特許文献2では、この課題を解決するために、任意にスポット部を欠損させて、それを位置情報として位置ずれの補正を行なっている。しかし、全ての付着スポットに必ずしもサンプルが付着するわけではないため、任意なスポットの欠損部と、サンプルが付着しなかった付着スポットとの区別が難しくなっている。さらに、欠損部が存在することでサンプル密度の低下に繋がっている。

[0009] 核酸分析では、一つの画像内に100万個以上の核酸が付着可能であり、一回の分析で50万枚近くの画像数を取得する場合がある。そのため、配列解析を行うためのサンプル位置の誤検出は、多数のミスリードが発生することになるため、高精度で迅速な画像位置合わせを可能とする核酸分析用基板と画像位置合わせの技術が必要となっている。

[0010] 本発明では、高密度にサンプルを配置させ、取得した画像の高精度な画像位置合わせを可能とする核酸分析用基板、核酸分析用フローセルおよび画像位置合わせ方法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

[0011] 上記の目的を達成するために、基板と、前記基板表面上に生体高分子が付着するパターン状のスポット部とランダム状のスポット部を備えることを特徴とする核酸分析用基板、並びに核酸分析用フローセルを提供する。

[0012] また、上記の目的を達成するために、

基板表面上に生体高分子が付着するパターン状のスポット部とランダム状のスポット部を備える基板の解析方法であって、

前記基板表面のパターン状のスポット部の発光する輝点とランダム状のスポット部の発光する輝点を用いて、前記基板上の輝点位置を同定することを

特徴とする解析方法を提供する。

発明の効果

[0013] 本発明によって、パターン状のスポット部とランダム状のスポット部が存在することにより、ランダム状のスポット部だけで構成される基板よりも、高密度にサンプルを配置することが可能である。

[0014] また、パターン状のスポット部だけでは困難な、位置合わせの精度と速度を向上させる。これは、パターン状のスポット部だけで構成されている基板は、付着スポットが周期的に整列しているために、隣接するスポット列が誤認識され、大きな位置ずれが起こる可能性がある。しかし、パターン状のスポット部とランダム状のスポット部が存在する基板では、検出されるランダム状の輝点がマーカ等役割をすることによって、特別な位置検出用のマーカを設置することなく、パターン状のスポット部とランダム状スポット部の位置関係、パターン状のスポット部とランダム状の輝点の位置関係、パターン状のスポット部の輝点とランダム状のスポット部の輝点の位置関係、あるいは個々のランダム状の輝点の位置関係などの様々な位置関係を使用することが可能である。使用状況により、これらの位置関係を単独あるいは組み合わせて使用することによって、サンプルの位置情報を精度良く特定することが可能となる。その結果、位置合わせの精度と処理速度の向上などの効果がある。

[0015] また、特別な位置検出用のマーカを設置する工程が無いことから基板製造の効率化も期待される。

[0016] さらに、特許文献2のような画像位置合わせを目的とした基準点の役割を果たす付着スポット欠損部が存在しないため、スポット欠損部がある場合よりも付着スポット密度は高く配置可能である。

[0017] このように、本発明により、画像の位置合わせ精度が向上し、近傍の異なる核酸同士の配列解析のミスリードを防ぎ、シーケンス精度と分析のスループットを向上させることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]核酸分析装置の概略構成例を示す図

[図2]核酸分析装置の概略構成例を示す図

[図3]基板作製方法例の基板断面図

[図4]核酸分析用フローセルの構成例を示す図。

[図5]核酸分析装置を用いた核酸分析方法の例を示す図。

[図6]塩基配列決定方法の概念を示す図。

[図7]パターン状のスポット部とランダム状のスポット部の配置例を示す図。

[図8]ランダム状のスポット部の図形形状の例を示す図。

[図9]4種類の蛍光画像の例を示す図

[図10]サイクル間の位置ずれの概念を示す図。

[図11]画像の位置合わせ方法の例を示す図。

[図12]1画像を64ブロックに分割した場合のランダム状のスポット部の配置例を示す図。

[図13]1画像を64ブロックに分割した図12の4ブロックを拡大した図。

[図14]1画像を64ブロックに分割し、さらに各ブロックを16ブロックに小分割し、64ブロックに分割した1画像の4ブロックを拡大した図。

[図15]画像の位置合わせ方法の例を示す図。

[図16]パターン状のスポット部とランダム状のスポット部とランダム状スポット部の付着スポットの配置例を示す図。

[図17]画像の位置合わせ方法の例を示す図。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、添付図面を参照して本発明の実施例について説明する。なお、本発明の理解のために具体的な実施例を示すが、本発明を限定的に解釈するためものではない。また、実施例の説明上、核酸分析とは核酸つまりDNA断片のシーケンス（塩基配列解析）を示しているが、本来この分析対象はDNA、RNA、タンパク質などの生体高分子でもよく、生体関連物質の全般に適用可能である。

[0020] まず、実施例に共通する核酸分析装置の概略構成、核酸分析用基板の作製

方法とフローセル構成、DNAの塩基配列のシーケンス処理について、例を示し説明する。

[0021] (1) 核酸分析装置

本発明で使用する核酸分析装置の概要を、図1に一例を示し説明する。

核酸分析装置100は、フローセル109と、光学系ユニット、温調系ユニット、送液ユニット、コンピュータ119を装備している。

[0022] 光学系ユニットは、フローセル109へ励起光を照射し、核酸の伸長反応によって取り込まれた塩基配列から発せられる蛍光を検出する。光学系ユニットは、光源107、コンデンサレンズ110、励起フィルタ104、ダイクロイックミラー105、バンドパスフィルタ103、対物レンズ108、結像レンズ102、2次元センサ101の構成を持っている。励起フィルタ104、ダイクロイックミラー105、バンドパスフィルタ103が、フィルタキューブ106内に含まれている。温調系ユニットは、ステージ117に設置され、例えば、ペルチェ素子などを備える加熱冷却可能な温調基板118を備え、フローセル109の温度を調整することが可能である。送液ユニットは、複数の試薬容器113を収容する試薬保管ユニット114、試薬容器113へアクセスするノズル111、複数の試薬容器113に入っている各試薬をフローセル109へ導入する配管112、フローセル109で反応後、反応した試薬等の廃液を廃棄する廃液容器116、廃液を廃液容器116へ導入する配管115の構成を持っている。

[0023] 核酸分析装置では、あらかじめ核酸サンプルを固定したフローセル109をXY方向に駆動するステージ117上に搭載する。フローセルには流路穴があり、真空チャックによってステージに固定される。これにより、ステージに接続された送液ユニットの流路と結合し、反応試薬などの送液が可能になる。試薬ラック114は、冷温保管されており、ラックへのノズル111の突き刺しにより試薬へアクセスが可能である。ノズルは流路とつながっており、シリンジポンプの動作によって、試薬はフローセルを経由し、最終的に廃液タンク116まで送液される。使用される試薬は複数の試薬が用いら

れているが、流路切り替えバルブによって選択されている。XYステージは温調基板118が搭載され、シーケンス反応が行われる。光学系ユニットにおいては、光源107は、例えばLED光源が使用されており、光源107から発せられた励起光は、コンデンサレンズ110で集光され、フィルタキューブ106に入射する。フィルタキューブの内部には、励起フィルタ104、バンドパスフィルタ103、ダイクロイックミラー105があり、励起フィルタ104とバンドパスフィルタ103によって特定の蛍光波長が選択される。励起フィルタから透過した光は、ダイクロイックミラー105で反射し対物レンズ108によってフローセル109に照射される。励起光によって、フローセル109上に固定された試料に取り込まれた蛍光体のうち、照射された励起光の波長帯域に励起する蛍光体が励起される。励起された蛍光体から発せられる蛍光は、ダイクロイックミラー105を透過し、バンドパスフィルタ103にて特定の波長帯域のみが透過され、結像レンズ102によって、2次元センサ101上に蛍光スポットとして結像する。励起光によって励起する蛍光体は、1種類または複数種類でも検出が可能である。例えば、励起光によって励起する蛍光体が1種類のみ場合、塩基配列に対応する4種類の蛍光を識別するために、検出する波長帯域に応じてフィルタキューブ106を4種類用意し、切り替え可能とすることで検出が可能となる。また、複数種類の蛍光体を同時に励起させる場合、例えば2種類の蛍光体を同時に励起させる場合の核酸分析装置概要例を図2に示す。核酸分析装置200は、対象とする2種類の蛍光の波長帯域を透過するバンドパスフィルタ103を透過後、2種類の蛍光を分けるダイクロイックミラー120を備え、2つの二次元センサでデュアルビューによるイメージングを行うことが可能である。そして、検出する波長帯域に応じてフィルタキューブ106を2種類用意し、切り替え可能とすることで4種類の蛍光検出が可能となる。この場合、1種類ごとの検出よりも短時間の検出が可能であり、対象とする試料の塩基配列解析にかかる時間の短縮につながる。コンピュータ119では、装置制御およびリアルタイムの画像処理を行っている。

[0024] (2) 核酸分析用基板の作製方法、構成およびフローセルの構成

次に、本発明で使用する核酸分析用基板の作製方法の一例を図3に示し説明する。

[0025] まず、シリコンウエハ302を熱処理し、表面に酸化膜301を生成する(図3-A)。酸化膜上に疎水性でDNAなどの吸着を防ぐHMDS(Hexamethyldisilazane)層303をコーティングする(図3-B)。次に保護膜をコーティングし、さらにパターン状やランダム状のスポット部が切り抜かれたフォトマスク304を載せる(図3-C)。そして、フォトリソグラフィ処理で保護膜305を溶解しやすくし、現像処理を行う(図3-D)。さらに、酸素プラズマでスポット部のHMDS層を除去し、除去部に、サンプルを固定する材料としてアミノシラン306などを蒸着する(図3-E)。最後に保護膜を洗浄除去し、基板を作製する(図3-F)。

[0026] 基板に用いられる材料としては、特に制限は無いが、DNAを蛍光で分析する場合や、分析中に温度の上げ下げが行われる場合などは、自家蛍光が低く、熱膨張係数が小さく、且つ分析溶液の耐性が高いシリコン、ガラス、石英、SUS、チタンなどが特に望ましい。

[0027] 付着スポットなどのサンプル付着部に用いられる材料としては、基板上に共有結合を介して形成できるようなものがよい。このような材料としては、基板表面に酸化膜を持つシリコン、ガラス、石英、サファイア、セラミック、フェライト、アルミナなどの無機材料やアルミニウム、SUS、チタン、鉄などの金属材料を用いる場合は、特にシランカップリング材が望ましい。また、シランカップリング材のなかでも、共有結合を介してアミノ基を含むコーティング膜を形成できるような反応性が高い官能基を持つものがよく、このような官能基としては、ビニル基、エポキシ基、スチリル基、メタクリル基、アクリル基、アミノ基、ウレイド基、イソシアネート基、イソシアヌレート基、メルカプト基を分子内に持つエトキシシランやメトキシシランが挙げられる。

[0028] 次に、フローセルの構成を図4で説明する。

[0029] フローセルは下面に核酸分析用の基板403と上面のガラス部401と流路を形成する中間材402を挟み込み接合する。下面の基板の穴が送液試薬の注入口、および排出口となる。

[0030] (3) DNAの塩基配列のシーケンス処理

次に、核酸分析装置を用いたDNAシーケンス方法の一例を図5に示し説明する。まず、分析対象のDNAを固定したフローセルを核酸分析装置に搭載する501。次に、4種類の塩基の種類毎に異なる種類の蛍光体が標識された蛍光標識ヌクレオチドやDNAポリメラーゼを含む反応試薬をフローセルに送液し、フローセルの温度を調整し、試薬を反応させる502。その結果、あらかじめ試料に結合したプライマと呼ばれる塩基配列の存在によって、試料DNAの配列に相補的な蛍光体が付いたヌクレオチドが取り込まれ、伸長反応が行われる。本核酸分析装置では、取り込まれた塩基の種類を4種類の蛍光によって検出することが可能である。分析対象となる試料DNAの配列に対応するA（アデニン）、T（チミン）、G（グアニン）、C（シトシン）の4塩基の判別が可能である。塩基配列に対応する蛍光検出は、1塩基伸長する毎に、洗浄後、撮像により4種類の蛍光画像を取得する503。次に、撮像された1塩基の蛍光体は、酵素等を含む試薬によって蛍光体を除去する504。洗浄後、次の1塩基を検出するために、蛍光体が標識された蛍光標識ヌクレオチドを含む先の反応試薬をフローセルに送液し、フローセルの温度を調整し、蛍光体が付いた塩基試薬を反応させ505、洗浄後、撮像する506。この蛍光色素除去、1塩基伸長、撮像506を1サイクルとして、(N-1)回繰り返すことにより、N塩基分のシーケンスが可能となる。図6に、このシーケンス方法の例を示す。蛍光体が標識された蛍光標識ヌクレオチドをCy3-dATP、Cy5-dTTP、TxR-dGTP、FAM-dCTPを用いた場合、個々の付着スポット（例えば塩基配列-TATACG-を持つDNA断片(601)）において、あるサイクル(#M)のケミストリ処理によって一塩基分伸長させると、例えば蛍光体のCy3-d

A T P が取り込まれる。この蛍光標識ヌクレオチドは、輝点として観察され、撮像処理において、C y 3 の蛍光画像上のスポットとして検出される。この C y 3 - d A T P が取り込まれる場合、対応する D N A 断片の塩基は T (チミン) であると判断される。同様に、サイクル (# M + 1) では、輝点として観察され、蛍光体 C y 5 の蛍光画像上のスポットとして検出される。この C y 5 - d T T P が取り込まれたる場合、対応する D N A 断片の塩基は A (アデニン) であると判断される。同様に、サイクル (# M + 2) では、輝点として観察され、蛍光体 T x R の蛍光画像上のスポットとして検出される。この T x R - d G T P が取り込まれる場合、対応する D N A 断片の塩基は C (シトシン) であると判断される。同様に、サイクル (# M + 3) では、輝点として観察され、蛍光体 F A M の蛍光画像上のスポットとして検出される。この F A M - d C T P が取り込まれる場合、対応する D N A 断片の塩基は G (グアニン) であると判断される。以上のサイクル # M から、サイクル # M + 3 までのサイクル処理によって、このスポットにおける塩基配列は T A C G と決定される。この様にして、サンプルとなる D N A 断片の塩基配列はシーケンスされる。

実施例 1

[0031] 基板表面上に核酸が付着するパターン状のスポット部と、ランダム状のスポット部を備える核酸分析用基板について、図 7 を用いて一例を説明する。

[0032] 図 7 は基板上の一部を拡大した図である。基板上に一定の規則性を持って核酸の付着スポットが整列する領域であるパターン状のスポット部 7 0 1 と非規則的に核酸が付着する領域であるランダム状のスポット部 7 0 2 が存在する。図 6 - A では、円形箇所が整列している部分がパターン状スポット部 7 0 1 を示し、円形箇所はサンプルが付着する付着スポットを示している。そして、三角形の箇所がランダム状のスポット部 7 0 2 である。各スポット部は、アミノ基を含むコーティング膜で形成される核酸が付着するエリアをもち、核酸が付着しない領域は、表面が疎水性の H M D S でコーティングされている。パターン状のスポット部では、整列した円形箇所に核酸が付着し

、円形箇所の周辺は核酸が付着せず、表面が疎水性のHMD Sでコーティングされている。三角形のランダム状のスポット部は、核酸が付着するアミノ基を含むコーティング膜で形成されている。

[0033] ここで、パターン状に並んだスポット部のパターン状とは、斜方格子状、長方格子状、面心長方格子状、六方格子状、正方格子状などの配列パターンであり、特に、付着スポットの高密度化を図ることが可能である六方格子状で付着スポットを配列することが望ましい。また、ランダム状のスポット部の図形が辺を持つ図形の場合、ランダム状のスポット部の図形の各辺は、図形の外側のパターン状のスポット列に平行であることが望ましい。例えば、図7のようにランダム状のスポット部の図形が三角形の場合、図7-Bのように、三角形のランダム状のスポット部の辺の一部が、周辺に位置するパターン状の付着スポットと重なる場合に比べ、図7-Aのように、ランダム状のスポット部の三角形の各辺は、その周辺に位置するパターン状の付着スポット列と重ならないことが望ましい。あるいは、ランダム状のスポット部の三角形の各辺は、その周辺に位置するパターン状の付着スポット列と平行であることが望ましい。これは、パターン状の付着スポットが、ランダム状のスポット部と重なることによる検出可能な蛍光画像上のスポット数の減少を回避することが可能である。また、画像の位置合わせにおいて、図形の外側に整列した平行したスポット列、あるいは図形の外周のスポットを指標として、位置合わせを行なうことも可能である。例えば、パターン状のスポット部とランダム状のスポット部の領域位置関係から、位置合わせを行う領域が選択可能となり、少数のスポット位置の確認によって、位置合わせが可能となる。その結果、位置合わせの精度と処理速度の向上などの効果がある。

[0034] また、ランダム状のスポット部の図形が円系状の部分を持つ図形の場合、パターン状の付着スポット列と重ならないことが、同様に望ましい。重ならないことで、ランダム状のスポット部の図形部分の判別を行いやすくする。

[0035] また、図8-A、B、C、D、E、Fで例を示すように、ランダム状のスポット部の形状は、三角形や四角形などの多角形、円形、楕円形、またこれ

らの組み合わせた図形であることが考えられる。その中でも、複数の三角形を組み合わせて出来る図形は、パターン状のエリアとランダム状のエリアを区別しやすく、図形の位置合わせに使用しやすい利点がある。

[0036] また、ランダム状のスポット部に付着するサンプルのランダムな位置関係から、マーカーとしての活用することが可能になるため、複数のサンプルが重ならず付着することが望ましい。そのため、ランダム状のスポット部のサイズは、サンプルのサイズによって異なるため規定はできないが、少なくとも各ランダム状のスポット部の領域の形状やスポット位置によって位置の判別が可能である複数のサンプル数が付着可能な大きさであれば良い。

[0037] パターン状のスポット部は、一つの付着スポットに複数種類の核酸サンプルが付着すると、その複数種類の核酸サンプルから蛍光色素が検出され誤検出となる。そのため、付着スポットのサイズが大きすぎると誤検出の原因となりえる。一方、付着スポットのサイズが小さすぎると核酸サンプルとの接触確率が低下し、核酸サンプルが付着しない付着スポットが増え、分析のスループットが低下する。そのため、パターン状の付着スポットの直径や付着スポットの配置は、核酸サンプルが1つの付着スポットに1個だけが付着する様なサイズや位置が望ましく、付着スポットの大きさがサンプルの大きさの $1/2$ 以上、2倍未満程度の大きさが好ましく、良好な結果が得られている。例えば、核酸サンプルが、50 nmのサイズの場合、付着スポットのサイズは25 nm以上100 nm未満が望ましい。

実施例 2

[0038] パターン状のスポット部と、ランダム状のスポット部を備える核酸分析用基板を用いた画像取得と位置合わせ方法の例を説明する。

[0039] 分析対象である核酸サンプルは、フローセル上の基板に配置されたパターン状スポット部とランダム状スポット部に固定される。そして、伸長反応により、蛍光体が付いたヌクレオチドが取り込まれ、4種のDNA塩基に対応する4種類の蛍光画像を撮像し取得する。1塩基伸長の各サイクルで、1視野あたり4種類の蛍光画像を輝点として観測される。図9では、4種類の蛍

光画像の例を示す。白丸が輝点を示す。輝点は蛍光画像上のスポットとして検出できる。この4種類のA、T、G、Cに対応する画像（901、902、903、904）を合わせた画像905の輝点位置が、画像当たりの核酸試料が固定された位置を示している。

[0040] また、基板の蛍光画像を検出する検出視野数は、基板の大きさや装置の解像度によって異なり、数百以上の視野におよぶ場合もある。例えば、検出視野が800ある場合、各サイクルで、ステージを800視野分移動させ撮像することになる。図10に示すように、サイクルN（1001）とサイクルN+1（1002）ではステージの移動に伴う位置ずれが生じる場合がある。この位置ずれはステージ駆動の制御精度や熱による基板の歪み等、様々な要因に起因する。

[0041] 核酸サンプルを分析するには、核酸試料を固定した基板を用いて、伸長反応により、蛍光体が付いたヌクレオチドを取り込ませ、輝点画像を撮像し輝点の位置情報を取得する工程を繰り返す必要がある。そして、複数画像を用いて核酸を解析するために、複数画像の正確な位置合わせが必要となる。

[0042] 画像の位置合わせ方法の一例を、図11を用いて説明する。まず輝点である蛍光画像上の全スポットを検出する1101。次に、位置合わせの基準となる基準画像を作成する1102。ここで基準画像とは、輝点である蛍光画像上のスポットの位置座標を合わせるために用いる基準とするスポットの位置の画像のことを示す。そして、基準画像の輝点であるスポットの位置に対して、解析対象画像と基準画像の輝点のスポット同士的位置を合わせる1103。

[0043] 基準画像の作成は、撮像された実画像をもとに基準画像（K1）を作成する。例えば核酸分析の場合、1サイクルで1視野あたり、4種類の核酸塩基A T C Gのそれぞれの塩基種類に基づく4枚の輝点画像を取得する。最初に1サイクル目の4枚の画像を合わせ、基準画像（K1）を作成する。この1サイクル目の1視野で撮像する4枚の画像は、ステージ移動が無い場合、ステージ移動で発生する可能性がある位置ずれは無い。そのため、画像を重ね

合わせはステージ移動がある場合に比べ容易である。

そして、1つの蛍光画像上のスポットに複数サンプルが付着していなければ、輝点である各蛍光画像上のスポットは4枚の画像で重複しない。そのため、各蛍光画像上のスポットが重ならないようにして、画像の重ね合わせを行うことになる。例えば、図9の画像が、1サイクル目で撮像した4種類のA、T、G、Cに対応する蛍光画像（901、902、903、904）の場合、合わせた画像905が基準画像（K1）となる。

[0044] また、撮像で全ての輝点が検出されるような特殊なプライマを用いた場合、1枚で全ての輝点が検出された蛍光画像を基準画像とすることも可能である。

[0045] また、基準画像（K1）は、複数サイクルで撮像した蛍光画像を合わせて作成してもよい。この場合、サンプルが付着している箇所が、各サンプルの塩基配列に応じて輝点となり、輝点は蛍光画像上のスポットとして検出される。そのため、輝点位置を合わせるために、画像を回転、拡大縮小、平行移動することを繰り返しながら、各蛍光画像上のスポットについて、各蛍光画像上のスポット同士の距離の二乗が最小となるような方法を適用し、位置合わせを行ってよい。同一点の同定には、複数のサイクルで取得する複数の画像を合わせることで、精度が向上し誤検出を防ぐことができる。一つのスポットに複数のサンプルが付いた場合の判別も可能である。しかし、使用する画像が多すぎる場合、位置合わせの計算に時間を要することになりスループットが低下することがある。

[0046] また、最初のサイクルの4枚の画像を基に作製した基準画像は、次のサイクルの4枚の取得画像による基準画像の補正を行って良く、また、複数のサイクルの取得画像を用いて補正しても良い。例えば、2サイクル目から10サイクル目までの画像と最初の基準画像（K1）の位置合わせを行い、基準画像（K1）を補正し、基準画像（K2）を作成する。この基準画像（K2）を用いて、11サイクル目の画像の位置合わせを行って良い。

[0047] また、基準画像の補正は、画像位置合わせの誤差増加に応じた補正や、一

定時間間隔ごとに補正しても良い。このような基準画像の補正は、複数のサイクルや複数視野の撮像によるステージ駆動のずれや、熱などによる基板ゆがみ等の経時変化に対応することが可能となる。

[0048] さらに、基準画像作成や基準画像と解析対象画像の位置合わせにおいて、パターン状のスポット部の輝点は、規則的に付着スポットが整列しているために、輝点の位置合わせが容易となる反面、隣の列と誤認識される場合は位置ずれが起こる可能性がある。一方、ランダム状のスポット部の輝点は、輝点の位置座標がランダムであるため、複数の輝点との位置関係から位置マーカーとして使用可能であり、輝点の位置合わせに有用である。そのため、パターン状スポット部の輝点による位置合わせを行った後にランダム状のスポット部の輝点で補正をすることで、位置ずれを回避することが可能である。また、ランダム状のスポット部の輝点による位置合わせから、輝点の位置合わせを行う場合、ランダムなスポットだけの基板に比べ、本発明のランダム状のスポット部の領域は少ないため、短時間での位置合わせが可能となる。このように、パターン状のスポット部とランダム状スポット部の両方を備える基板は、位置合わせの検出において、パターン状のスポット部の優位な特徴とランダム状のスポット部の優位な特徴を組み合わせることで、位置合わせを容易にし、分析のスループットを向上させることが可能である。また、パターン状のスポット部とランダム状のスポット部の両方の領域を備えることで、各領域の配置から、領域位置の推定が可能な場合もある。また、ランダム状のスポット部の輝点位置合わせだけで、輝点位置の特定をすることも可能である。

[0049] また、画像間の位置合わせを行う場合に、位置合わせ精度や速度を向上させるために、一枚の画像を複数のブロックに分割し、ブロック単位で位置合わせすることが可能である。位置合わせのエリアを小さく区切り、ブロック単位で位置合わせを行うことで、位置合わせを行うための輝点数が減少し、位置合わせの速度は上昇する。この場合、輝点数が減少することで、位置合わせのマーカーとなる輝点数が減少することを意味し、ブロック単位の特

が困難になる可能性が考えられるが、周辺ブロックの輝点位置情報によって、ブロック単位の位置を特定することが可能である。この場合、各ブロックには、少なくとも一つのパターン状のスポット部とランダム状のスポット部が存在することが望ましいが、周辺ブロックの位置関係によって各ブロック位置が判別できる場合、ランダムスポット部が無いブロックがあっても良い。

[0050] 1つの画像を分割するブロック数に制限は無いが、例えば、基板上でランダム状スポット部が周期的に同一の位置関係をとる場合、単位ブロックのサイズが、観察時に発生する画像ずれのサイズより大きいことが望ましい。

これは、画像ずれサイズより単位ブロックのサイズが大きい場合、位置合わせを行う対象ブロック周辺で一致するブロックを探索することで、対象ブロックの位置を特定することが可能である。一方、画像ずれサイズより単位ブロックのサイズが小さい場合、位置ずれサイズに応じて探索するブロック数を増加させる必要がある。

[0051] また、撮像によって取得される画像は、画面中央部と四隅で収差が異なるため、画像の位置合わせを行なう際のずれ量も異なる。そのため、ランダム状のスポット部の数は多いほど、位置合わせの精度が高くなる。ランダム状のスポット部は、基板上にランダムに配置することによって、ランダム状のスポットの輝点位置だけではなく、ランダム状のスポット部の配置パターンにも一意性を持たせ、既知の配置として位置合わせに寄与させてもよい。

[0052] 単位ブロックのサイズが、観察時に発生する画像ずれのサイズより大きい場合のランダム状のスポット部の配置パターンと分割するブロックの例を次に示す。例えば一画像が 1 mm^2 程度の大きさであり、画像ずれが 0.1 mm 程度以内のずれを想定した場合、分割するブロックは、一画像あたり64ブロックに分割した場合の例を図12に示す。図12を1画像とし、1画像を64ブロックに分割している。各単位ブロックには便宜上、1～64の番号を記載しているが、この番号は無くても良い。そして、各ブロックは少なくとも隣接するブロック同士で、ランダム状のスポット部の配置が異なるように

配置する。また、基板の設計や製造を簡易化するために、例えば、64ブロック全てのランダム状のスポット部の配置を異なるものにはせず、4つの単位ブロック毎に同じ配置を使用しても良い。4つの単位ブロックの例として、図12上のブロック1、2、9、10について拡大した図13を示す。4つの単位ブロックはそれぞれ異なるランダム状のスポット部の配置を持つ。この4ブロック単位を16個配置し、64ブロックとして良い。このような配置方法は、基板製造の容易さやコストを軽減する効果がある。

[0053] また、上記の単位ブロックよりさらに細かく分割する例として、図14を用いて説明する。図14では、ランダム状のスポット部の種類と数を増やすことにより、ブロック単位での一意性を高めている。図14は、1画像を64ブロックに分割し、さらに各ブロックを16ブロックに小分割した例である。1画像の4／64ブロックについて示している。周辺のランダム状スポット部の配置から、ブロックの位置を特定するために、この小分割した各ブロックに少なくとも一つのランダム状のスポット部を配置するのが良い。また、ランダム状のスポット部の配置は、近傍周辺のランダム状スポット部の配置からブロック位置を特定可能な配置となる場合、小分割したブロック内にランダム状のスポット部が無いブロックがあっても良い。

[0054] 尚、図12、図13、図14では、パターン状のスポット部を省略し、ランダム状のスポット部のみを表示している。

実施例 3

[0055] 画像の位置合わせ方法の例を図15に示す。

[0056] 基板の設計情報から、基準画像を作成する1501。例えば、シミュレーションなどによって、基準画像を作成してよい。ここで基準画像とは、輝点である蛍光画像上のスポットの位置座標を合わせるために用いる基準とするスポットの位置の画像のことを示す。スポットの位置情報だけで合わせる場合は、画像を作成しなくて良い。この基準画像は使用する基板に応じて、あらかじめ基準画像を作成しておいて良い。あらかじめ作成しておいた基準画像を、使用する基板に応じて記憶媒体から基準画像を呼び出しても良い。基

板の設計情報から作成する最初の基準画像は、パターン状のスポット部の付着スポットの位置である。使用する条件によってはパターン状のスポット部の領域、ランダム状のスポット部の領域情報があっても良い。次に基板上の輝点を検出する1502。基板上の輝点は、蛍光画像上ではスポットとして検出される。次に基準画像のパターン状のスポット部のスポットの位置に対して、解析対象画像のパターン状のスポットの位置を合わせる1503。このパターン状のスポット部の位置合わせは、あらかじめ位置情報が分かっている基準画像があるという利点のため、高スループットな位置合わせを実現できる。しかし、パターン状のスポット部のみの位置合わせは、スポットが周期的に整列しているために、隣接するスポット列を誤認識する可能性がある。そのため、ランダム状のスポット部の輝点である蛍光画像上のスポット、つまり、ランダム状のスポットを用いて画像の位置合わせの補正を行なう1504。ランダム状のスポットは隣接するスポット同士の距離が不規則であるため、ランダム状のスポット全体における位置の判別が、パターン状のスポット部よりも特定しやすい。ただし、ランダム状のスポット部の輝点位置情報は、基板の設計情報から作成したパターン状のスポット部の位置情報の基準画像には無いため、各サイクルで取得した輝点情報によって、基準画像の補正を行う。

実施例 4

[0057] 基板表面上に核酸が付着するパターン状のスポット部と、ランダム状のスポット部を備える核酸分析用基板について、実施例1と異なる実施例について図16を用いて一例を説明する。

[0058] 図16は基板上の一部を拡大した図である。基板上に一定の規則性を持って核酸の付着スポットが整列する領域であるパターン状のスポット部1601と、核酸が付着する付着スポットを非規則的に持つランダム状のスポット部1602を備えた基板である。ランダム状のスポット部1602には、ランダム状のスポット部に非規則的に配置した付着スポット1603を持つ。各付着スポットは、アミノ基を含むコーティング膜で形成され核酸が付着す

ることができる。核酸が付着しない領域は、表面が疎水性のHMD Sでコーティングされている。パターン状のスポット部では、整列した円形箇所核酸が付着し、ランダム状のスポット部も円形箇所に核酸が付着する。円形箇所の周辺は核酸が付着せず、表面が疎水性のHMD Sでコーティングされている。ランダム状のスポット部の付着スポットは、前述した核酸分析用基板の作製方法の例で説明したフォトマスク304の作成時に、配置される。このランダム状のスポット部の付着スポットの配置は、スポット同士が接触しない配置であり、周辺のパターン状のスポット部とは異なる付着スポット配置を持つ。付着スポットを非規則的に配置するとは、周辺のパターン状のスポット部の規則的な配置に対して、異なった配置となっていることを意味し、付着スポット単独あるいは複数個で、周辺のパターン状の付着スポットと比較し、異なった配置をしていることを意味している。また、配置する付着スポットの数や密度によるが、ランダム状のスポット部における蛍光画像上のスポット位置とランダム状のスポット部のスポット位置、あるいはランダム状のスポット部におけるスポット位置とパターン状のスポット部のスポット位置によって、それぞれのスポット位置を特定できれば良い。図16ー(A)はランダム状のスポット部に付着スポットの単体をランダムに配置した例である。図16ー(B)はパターン状のスポット部の付着スポットとは異なる位置関係をもつ付着スポットの集合体をランダムに配置した例である。図16ー(B)は4個の付着スポットの集合体を複数個配置した例ある。付着スポットの集合体は、どんな数や配置でも良いが、位置マーカー的に使用するため、少なくともパターン状のスポット部と区別可能であることが望ましい。

実施例 5

- [0059] 実施例4の基板を用いた場合の画像に関連した位置合わせ方法の例を図17に示す。
- [0060] 基板の設計情報から、各スポット部の位置情報の基準画像を作成する1701。例えば、シミュレーションなどによって、基準画像を作成してよい。

ここで基準画像とは、輝点である蛍光画像上のスポットの位置座標を合わせるために用いる基準とするスポットの位置の画像のことを示す。スポットの位置情報だけで合わせる場合は、画像を作成しなくて良い。この基準画像は使用する基板に応じて、あらかじめ基準画像を作成して良い。あらかじめ作成しておいた基準画像を、使用する基板に応じて記憶媒体から基準画像を呼び出しても良い。基板の設計情報から作成する最初の基準画像は、パターン状のスポット部の付着スポットの位置、ランダム状のスポット部の付着スポットの位置から作成する。取得した位置合わせを行うために、パターン状のスポット部の領域、ランダム状のスポット部の領域情報があっても良い。次に基板上の輝点を検出する1702。基板上の輝点は、蛍光画像上ではスポットとして検出される。次に基準画像のランダム状のスポット部のスポットの位置と、解析対象画像のランダム状のスポット部のスポットの位置を合わせる1703。このランダム状のスポット部の位置合わせは、あらかじめ位置情報が分かっている基準画像があるという利点のため、また、位置合わせをする領域が少ないため、高スループットな位置合わせを実現できる。また、ランダム状のスポットは隣接するスポット同士の距離が不規則であるため、ランダム状のスポット全体における位置の判別が、パターン状のスポット部よりも特定しやすい。次に、パターン状のスポット部のスポットと解析対象画像のパターン状のスポットの位置合わせを行なう1704。ランダム状のスポット部の位置合わせを行っているため、パターン状のスポット部のスポットは、位置合わせが容易となる効果がある。

[0061] 尚、本発明は上記した実施例に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。上記した実施例は本発明を理解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ものに限定されるものではない。また、各実施例の構成の一部について、他の構成の追加、削除、置換をすることが可能である。

符号の説明

[0062] 100 核酸分析装置

- 1 0 1 2次元センサ
- 1 0 2 結像レンズ
- 1 0 3 バンドパスフィルタ
- 1 0 4 励起フィルタ
- 1 0 5 ダイクロイックミラー
- 1 0 6 フィルタキューブ
- 1 0 7 光源
- 1 0 8 対物レンズ
- 1 0 9 フローセル
- 1 1 0 コンデンサレンズ
- 1 1 1 ノズル
- 1 1 2 配管
- 1 1 3 試薬容器
- 1 1 4 試薬ラック
- 1 1 5 配管
- 1 1 6 廃液容器
- 1 1 7 ステージ
- 1 1 8 温調基板
- 1 1 9 コンピュータ
- 1 2 0 ダイクロイックミラー
- 2 0 0 核酸分析装置
- 3 0 1 酸化膜
- 3 0 2 シリコンウエハ
- 3 0 3 HMDS
- 3 0 4 フォトマスク
- 3 0 5 保護膜
- 3 0 6 アミノシラン
- 4 0 1 ガラス板

- 4 0 2 中間材
- 4 0 3 基板
- 5 0 1 フローセル搭載
- 5 0 2 試薬反応：1 塩基伸長
- 5 0 3 撮像
- 5 0 4 試薬反応：蛍光除去
- 5 0 5 試薬反応：1 塩基伸長
- 5 0 6 撮像
- 6 0 1 DNA断片の塩基配列
- 7 0 1 パターン状のスポット部
- 7 0 2 ランダム状のスポット部
- 9 0 1 A（アデニン）に相当する蛍光ヌクレオチドが発光した画像
- 9 0 2 T（チミン）に相当する蛍光ヌクレオチドが発光した画像
- 9 0 3 G（グアニン）に相当する蛍光ヌクレオチドが発光した画像
- 9 0 4 C（シトシン）に相当する蛍光ヌクレオチドが発光した画像
- 9 0 5 9 0 1～9 0 4 を重ね合わせた場合の画像
- 1 0 0 1 サイクルNのステージ位置
- 1 0 0 2 サイクルN+1のステージの移動に伴う位置ずれ
- 1 1 0 1 スポットの輝点を検出する
- 1 1 0 2 基準画像を作成する
- 1 1 0 3 解析対象画像と基準画像の輝点同士的位置を合わせる
- 1 5 0 1 基板の設計情報から基準画像を作成する
- 1 5 0 2 基板上の輝点を検出する
- 1 5 0 3 基準画像のパターン状のスポットと解析対象画像のパターン状のスポットの位置を合わせる
- 1 5 0 4 ランダム状のスポットを用いて画像の位置合わせの補正を行なう
- 1 6 0 1 パターン状のスポット部
- 1 6 0 2 ランダム状のスポット部

- 1 6 0 3 付着スポット
- 1 7 0 1 基板の設計情報から基準画像を作成する
- 1 7 0 2 基板上の輝点を検出する
- 1 7 0 3 基準画像のランダム状のスポットと、解析対象画像のランダム状のスポットの位置を合わせる
- 1 7 0 4 基準画像のパターン状のスポットと、解析対象画像のパターン状のスポットの位置を合わせる

請求の範囲

- [請求項1] 基板と、前記基板表面上に生体高分子が付着するパターン状のスポット部とランダム状のスポット部を備えることを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項2] 請求項1の核酸分析用基板において、
前記ランダム状のスポット部は図形形状の領域で構成され、複数のサンプルがランダムに配置されることを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項3] 請求項1の核酸分析用基板において、
前記パターン状のスポット部はサンプルが付着するスポットが規則的に配置されることを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項4] 請求項2の核酸分析用基板において、
前記ランダム状のスポット部の図形形状領域は、サンプルが付着可能なコーティング膜で形成されていることを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項5] 請求項2の核酸分析用基板において、
前記ランダム状のスポット部の図形形状領域に、サンプルが付着するスポットが不規則的に配置されることを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項6] 請求項3の核酸分析用基板において、
前記パターン状のスポット部は、サンプルが付着するスポットの配列が六方格子状のパターン配列を持つことを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項7] 請求項2の核酸分析用基板において、
前記ランダム状のスポット部の図形形状の領域がパターン状のスポットに、重ならないで配置されることを特徴とする核酸分析用基板。
- [請求項8] 基板表面上に生体高分子が付着するパターン状のスポット部とランダム状のスポット部を備える基板と、基板上面をカバーするガラス部材と流路を形成する中間材のシートを備える、

ことを特徴とする核酸分析用フローセル。

[請求項9] 基板表面上に生体高分子が付着するパターン状のスポット部とランダム状のスポット部を備える基板の解析方法であって、

前記基板表面のパターン状のスポット部の発光する輝点とランダム状のスポット部の発光する輝点を用いて、前記基板上の輝点位置を同定することを特徴とする解析方法。

[請求項10] 請求項9の解析方法において、

基準画像を作成し、前記基準画像とパターン状のスポット部の輝点の画像を用いて、画像の位置合わせを行い、

ランダム状のスポット部の輝点を用いて画像位置合わせの補正を行なう工程を含むことを特徴とする解析方法。

[請求項11] 請求項9の解析方法において、

前記基準画像が、核酸塩基種類に基づく4枚の輝点画像を用いて作製される工程を含み、複数の画像を用いて基準画像を補正する工程を含むことを特徴とする解析方法。

[請求項12] 請求項9の解析方法において、

前記基準画像が、前記基板の作製時のサンプル付着用の各スポットの位置情報を用いて作製される工程を含むことを特徴とした解析方法。

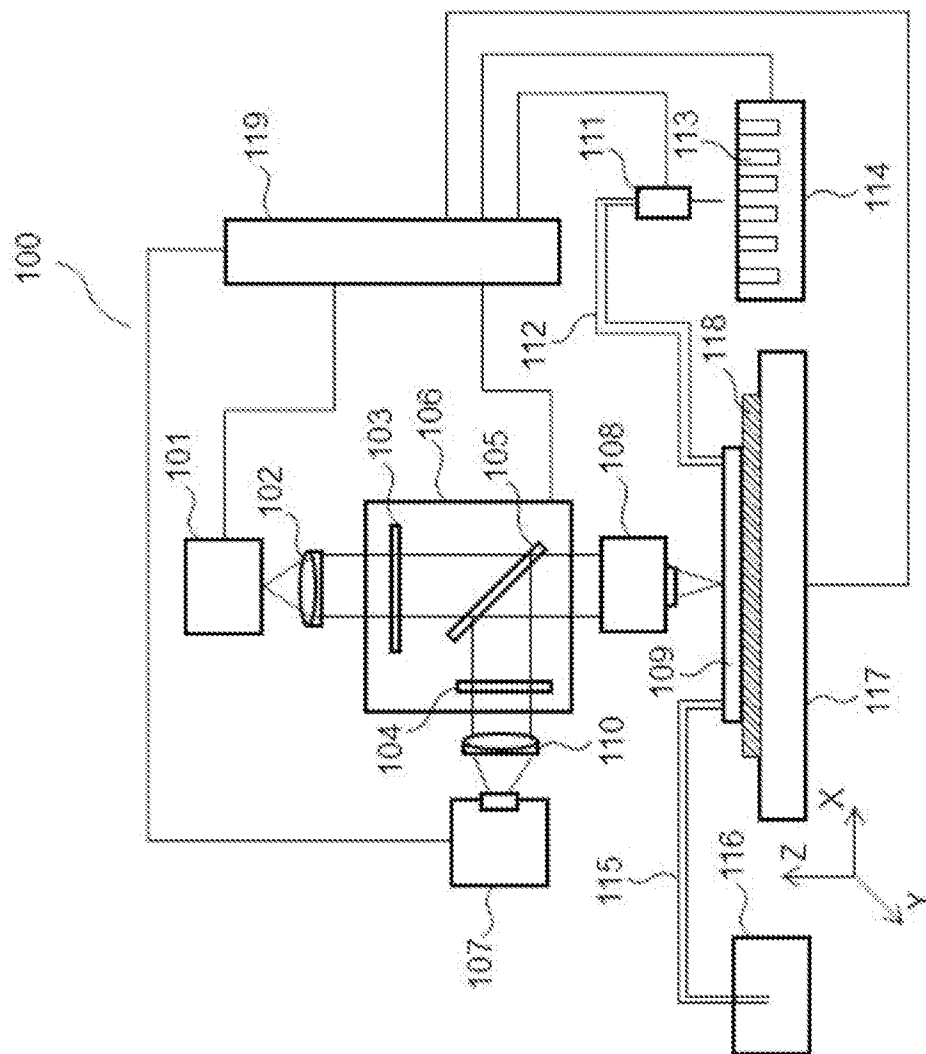
[請求項13] 請求項9の解析方法において、

また、基準画像と解析対象画像の位置合わせの工程において、解析対象画像と基準画像の対応するスポット上の輝点が、各画像上の輝点同士の間隔の二乗が最小となるような数値を用いて位置合わせを行う工程を含むことを特徴とする解析方法。

[請求項14] 請求項9の解析方法において、

少なくとも一つのパターン状のスポット部とランダム状のスポット部が存在するように、一つの画像を複数のブロックに分割する工程を含むことを特徴とする解析方法。

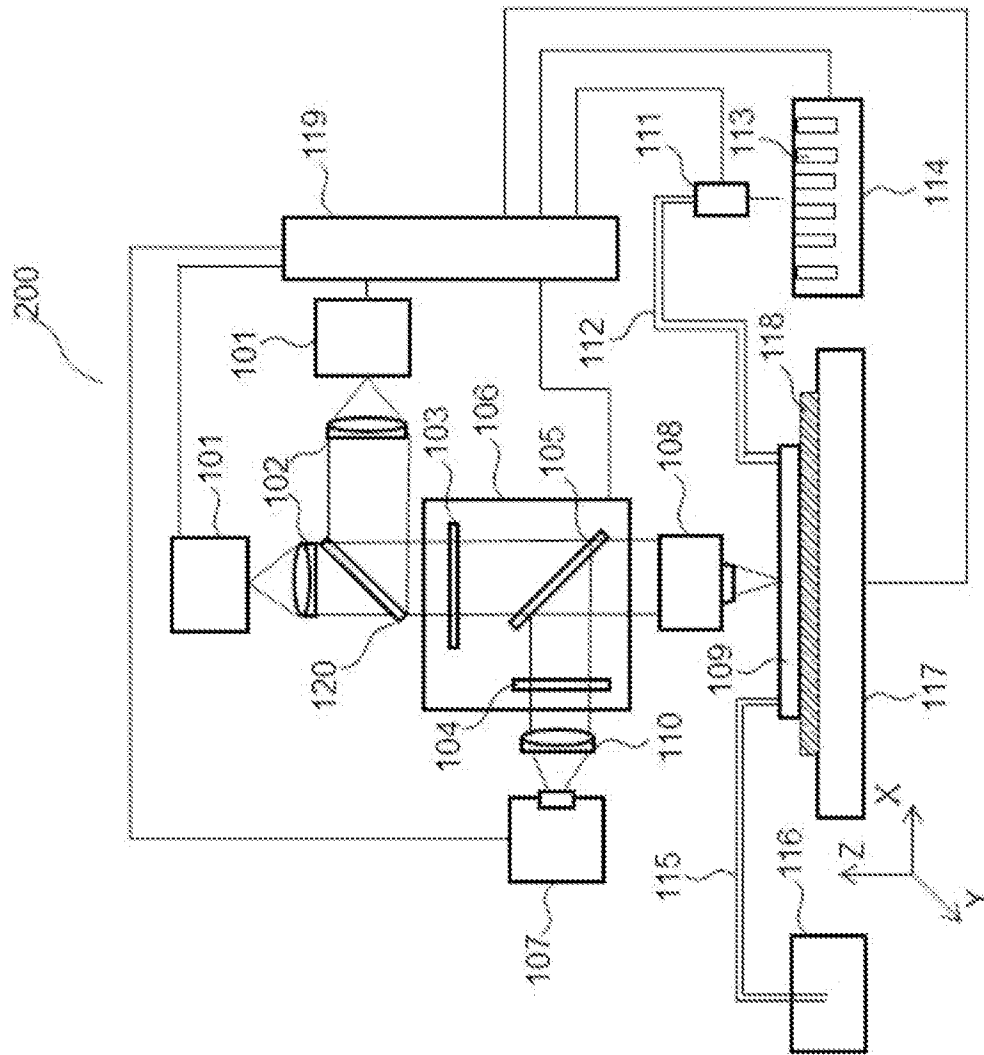
[図1]



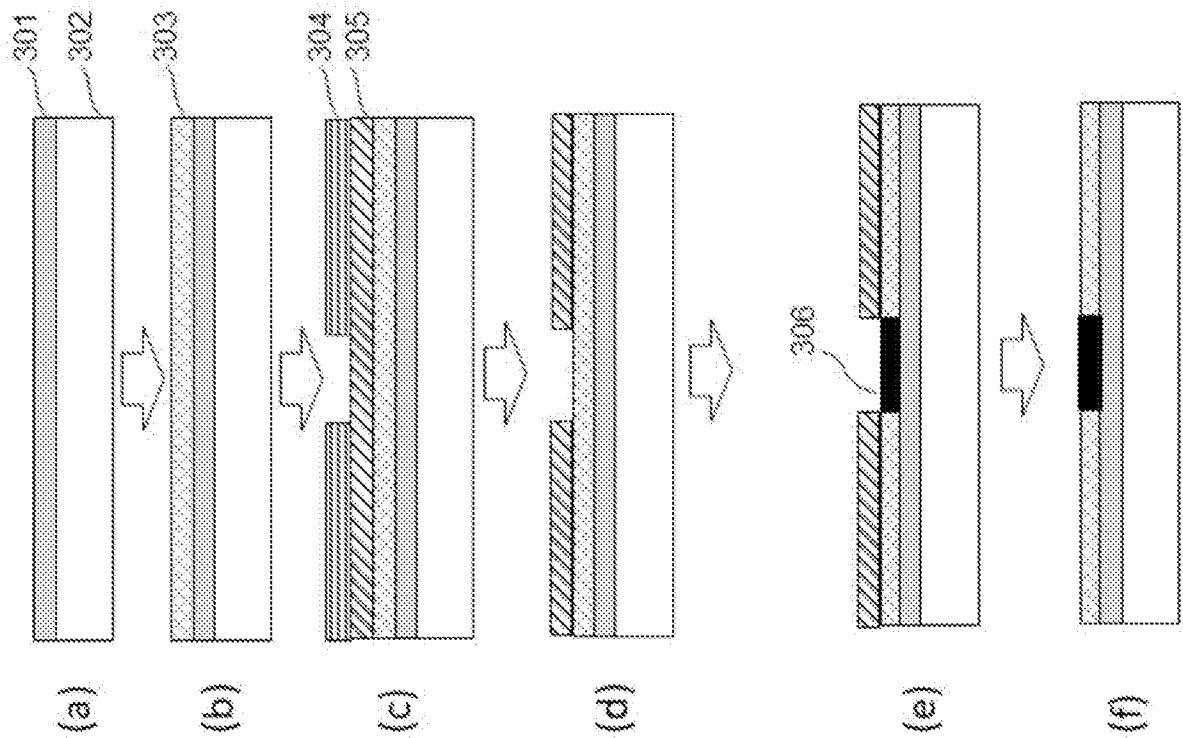
[図1]

[図2]

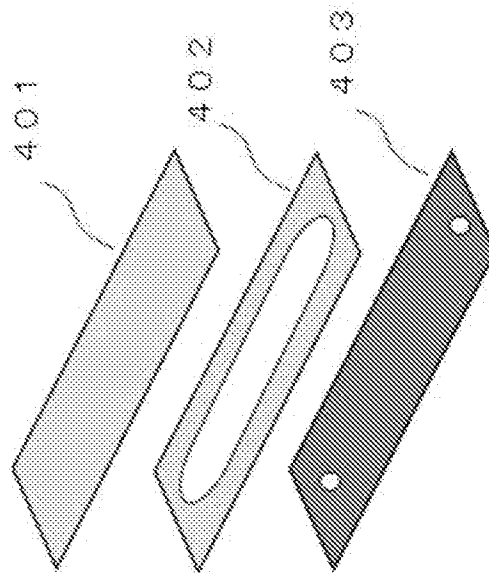
図2



[図3]

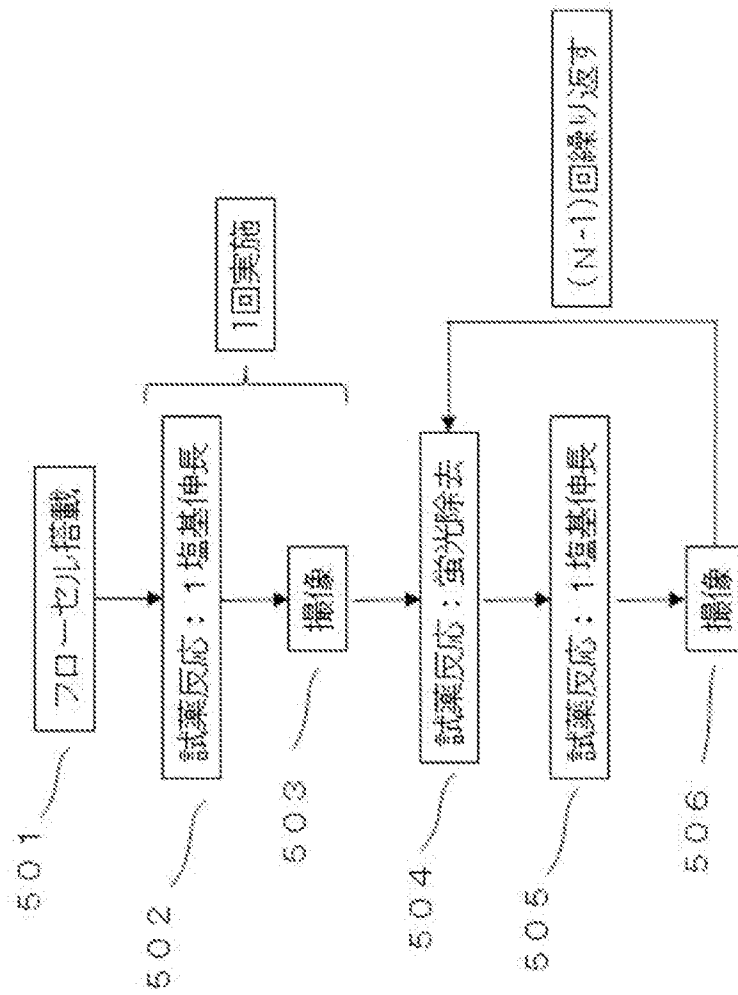


[図4]



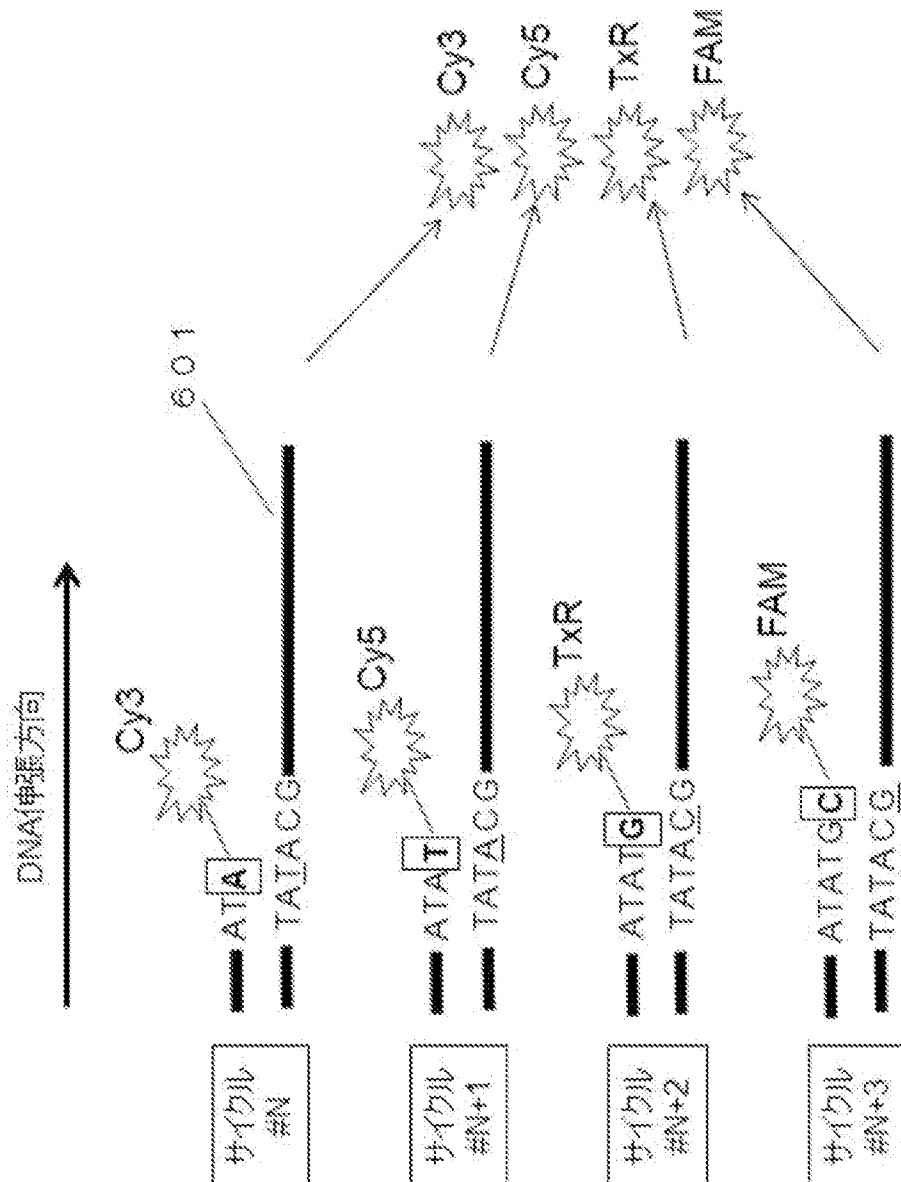
[図4]

[図5]



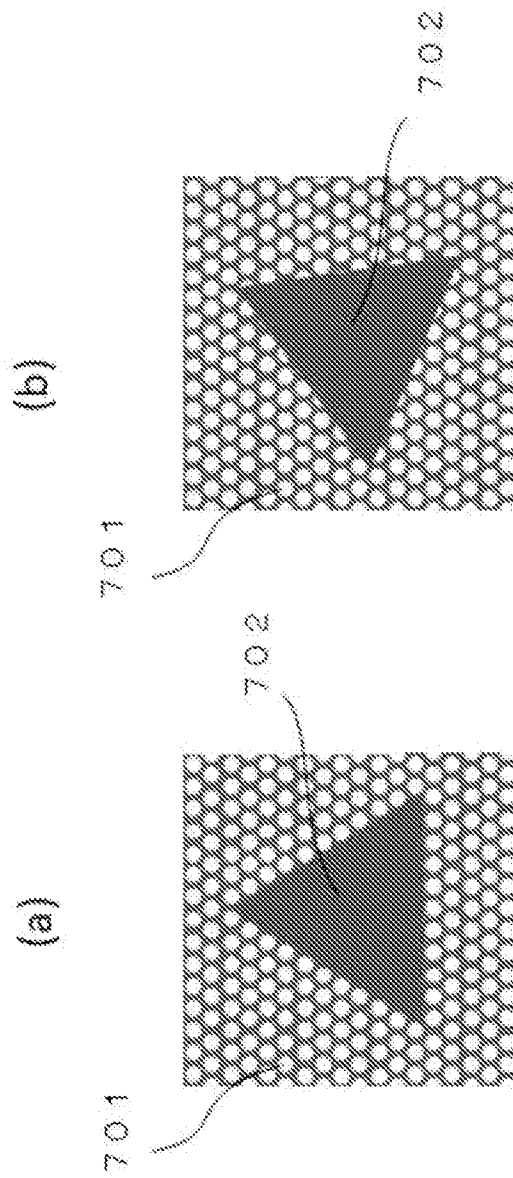
[図5]

[図6]

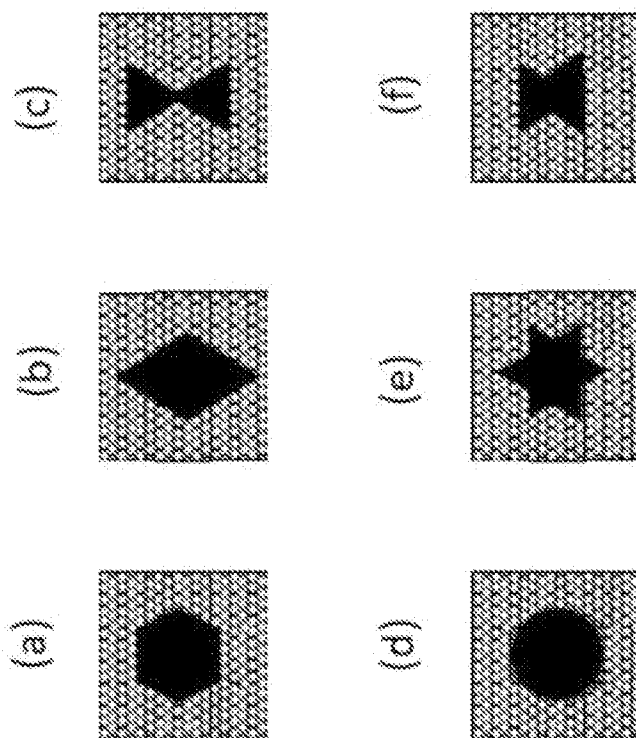


[図7]

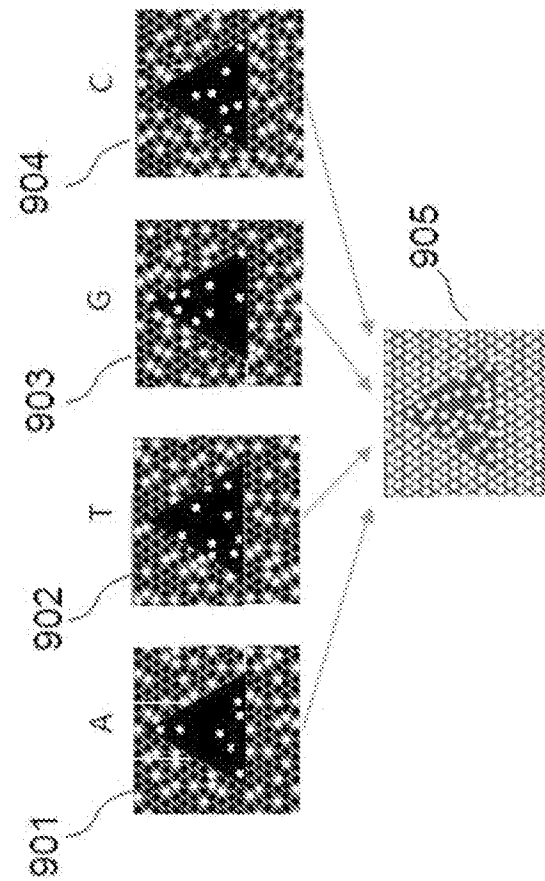
[図7]



[図8]

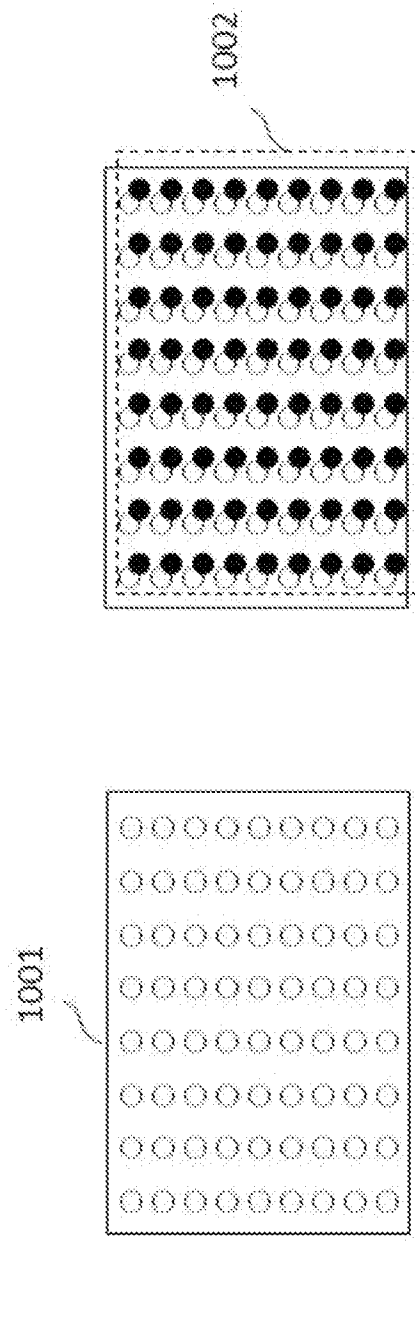


[図9]



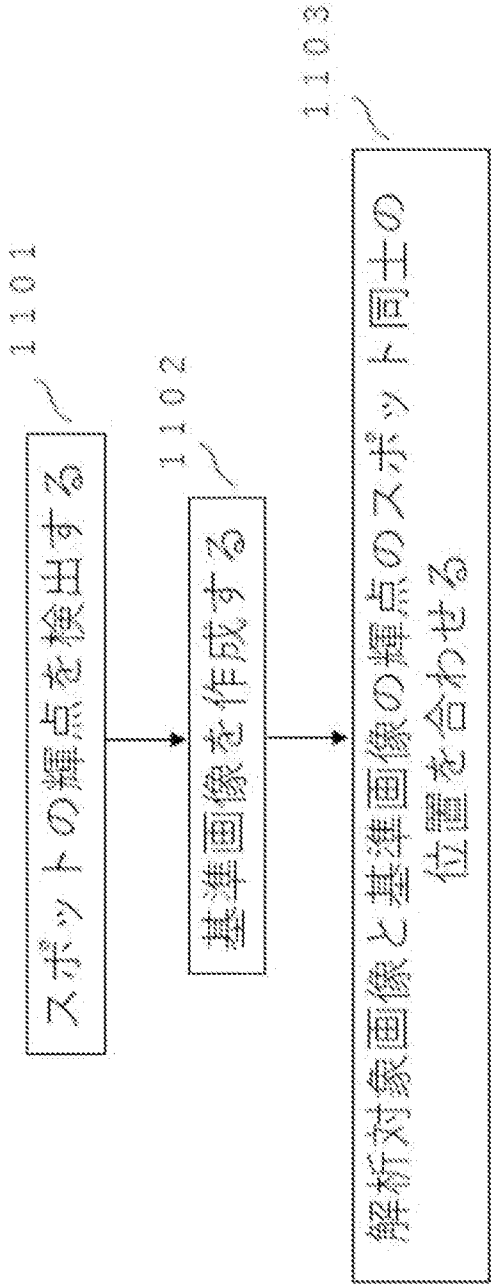
[図9]

[図10]



[図11]

図11

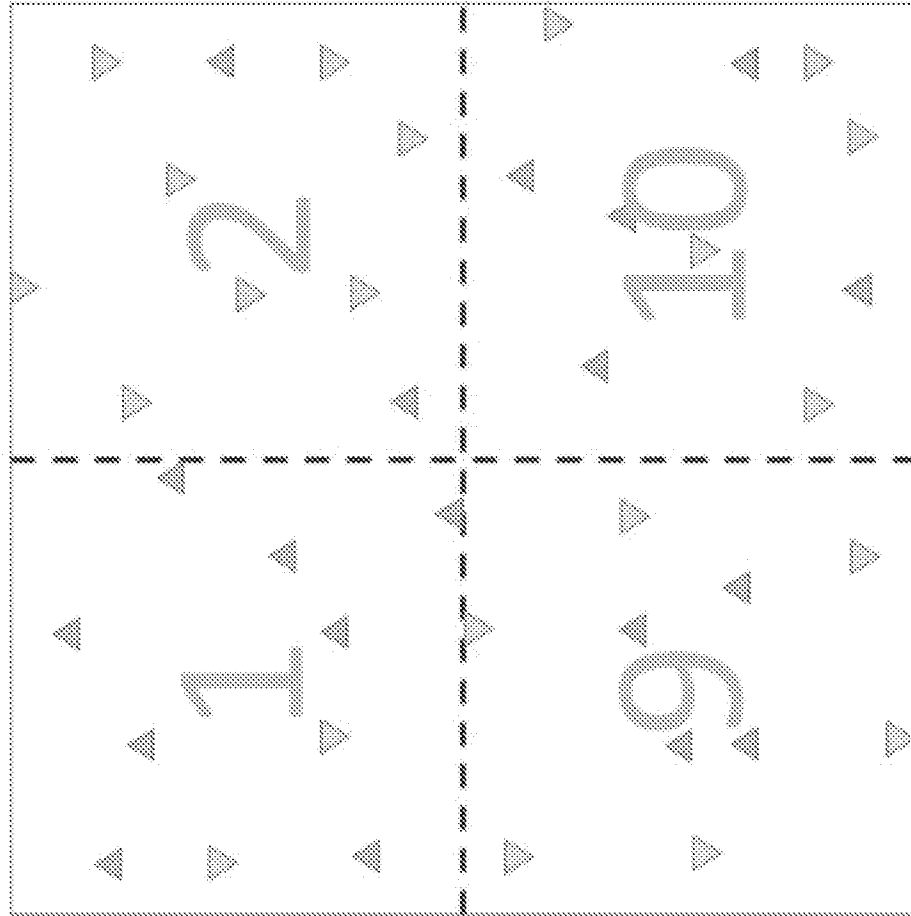


[図12]

1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54	55	56
57	58	59	60	61	62	63	64

図12

[図13]



[図13]

[図14]

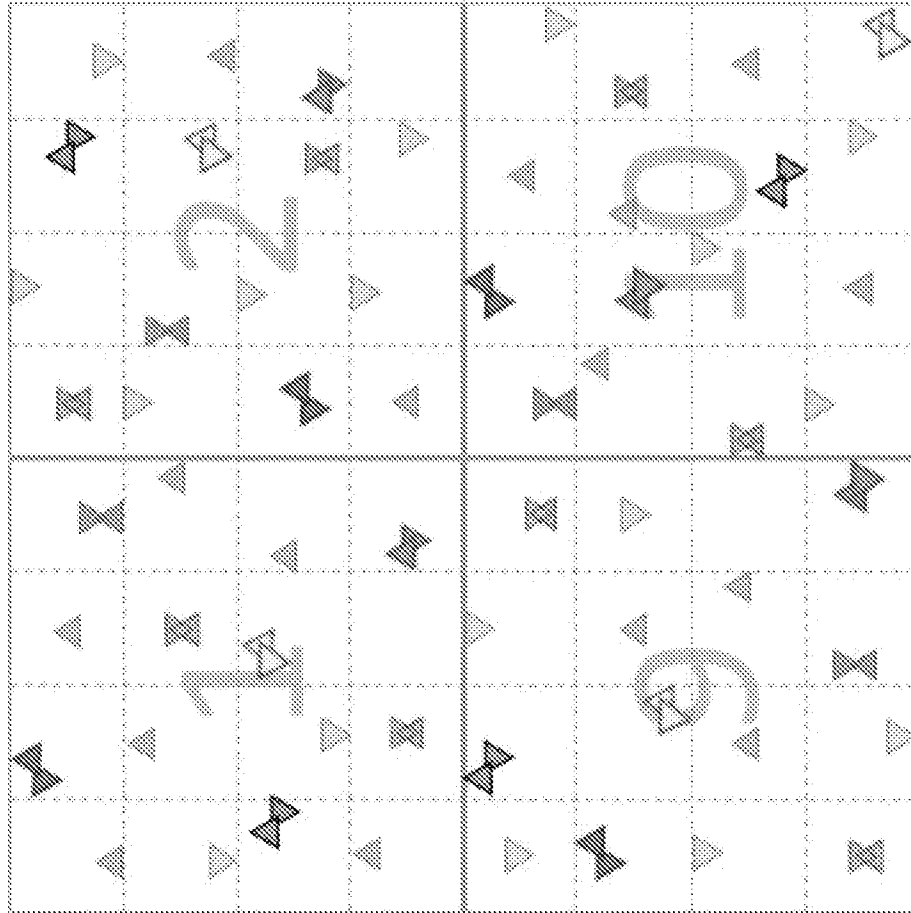
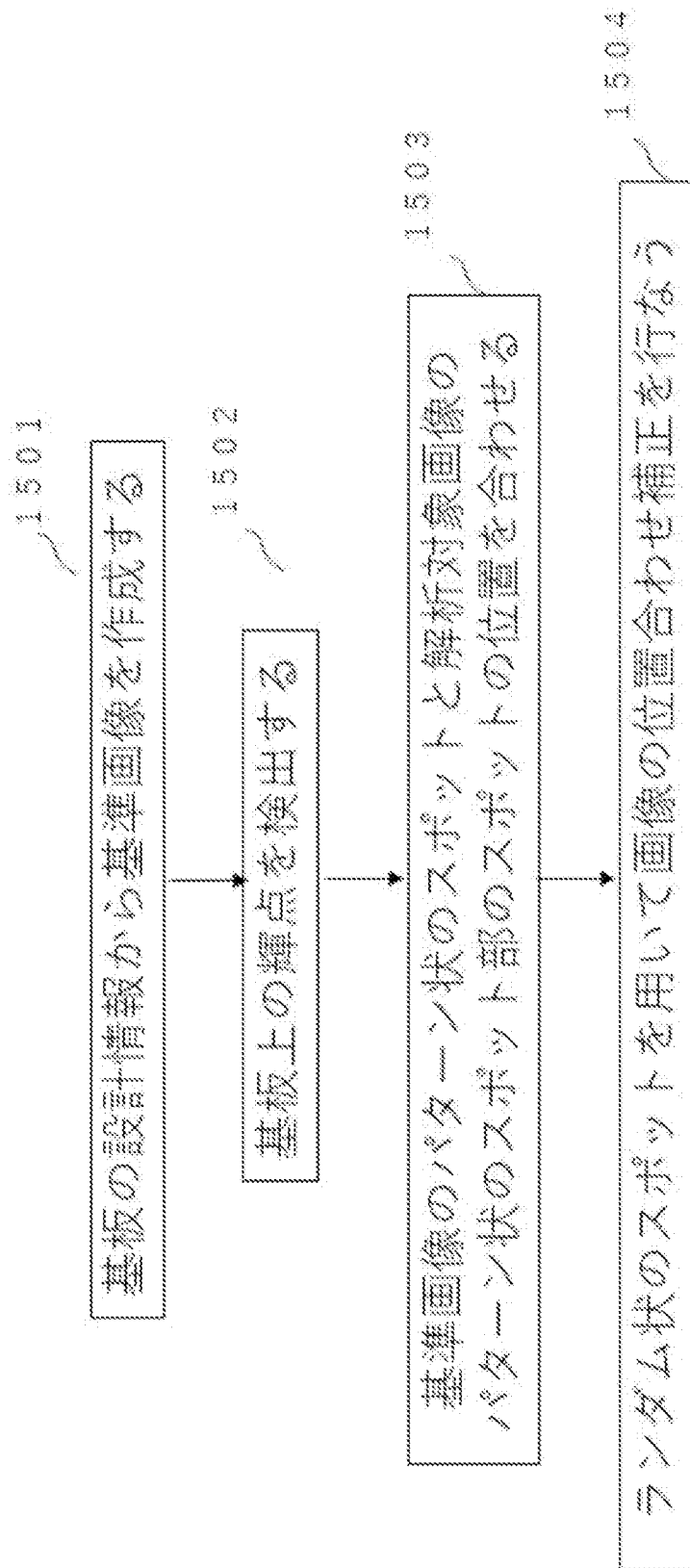


図 14

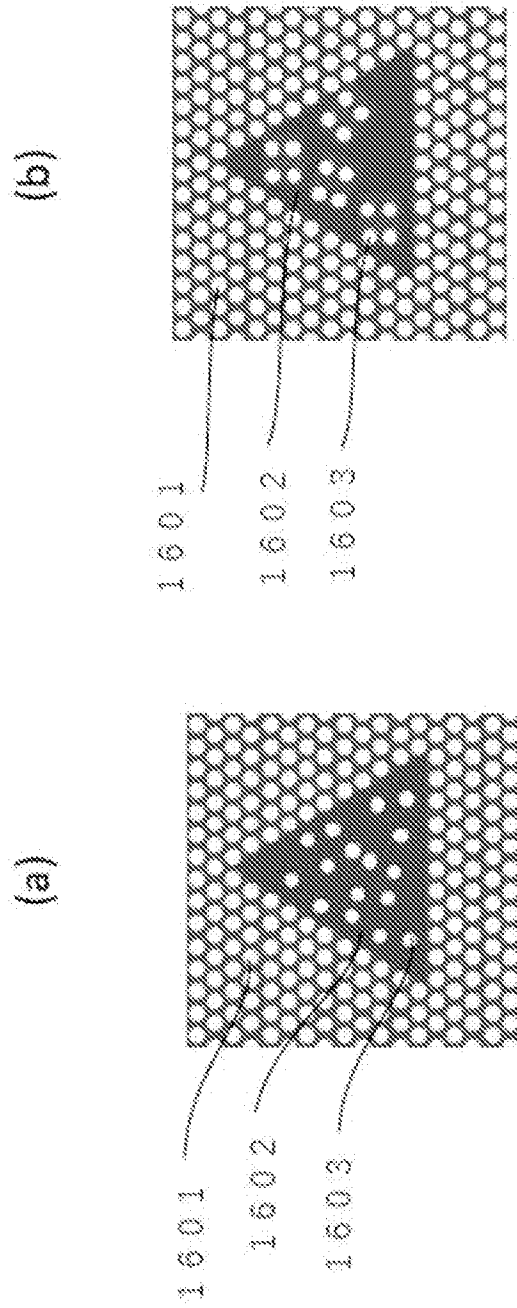
[図15]

図15

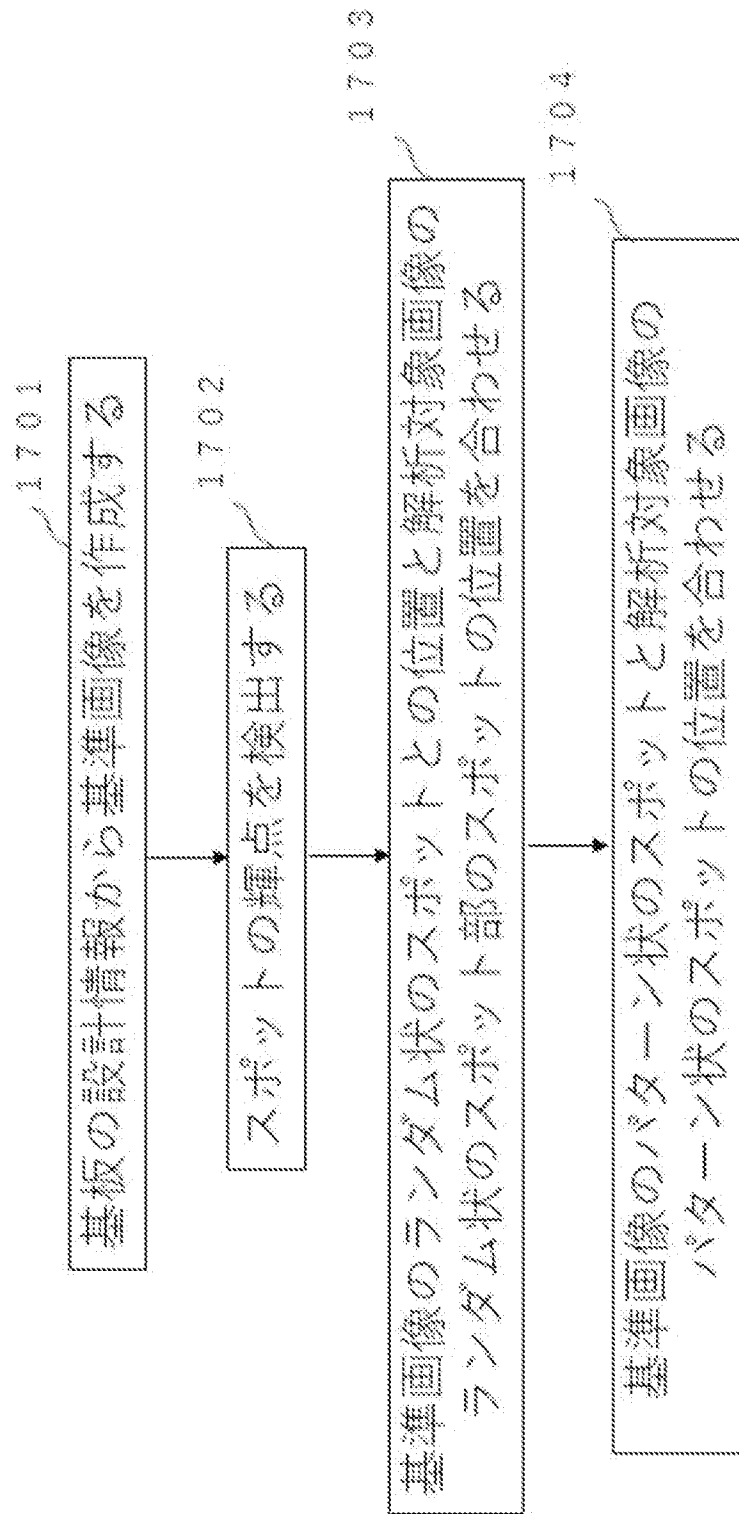


[図16]

図16



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/050512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/00(2006.01)i; C12Q 1/6874(2018.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 37/00(2006.01)i

FI: C12M1/00 A; C12Q1/6874 Z; G01N33/53 M; G01N37/00 102

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)

C12M1/00-3/10; C12Q1/00-3/00; G01N33/53; G01N37/00

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), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-527848 A (COMPLETE GENOMICS, INC.) 04.07.2013 (2013-07-04) claims 1-4, 8-9, paragraphs [0050], [0065], [0089], [0093], fig. 3, 18	1-3, 5-7, 9, 11-14
Y	claims 1-4, 8-9, paragraphs [0050], [0065], [0089], [0093], fig. 3, 18	1-8
A	claims 1-4, 8-9, paragraphs [0050], [0065], [0089], [0093], fig. 3, 18	10
Y	WO 2016/103473 A1 (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.) 30.06.2016 (2016-06-30) claim 7, paragraphs [0017], [0020], [0056]	1-8
A	claim 7, paragraphs [0017], [0020], [0056]	10
A	JP 2003-307518 A (NGK INSULATORS, LTD.) 31.10.2003 (2003-10-31) entire text	1-14

☒ 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 March 2020 (11.03.2020)

Date of mailing of the international search report
24 March 2020 (24.03.2020)

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/JP2019/050512

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 2010-66146 A (PANASONIC CORP.) 25.03.2010 (2010-03-25) entire text	1-14
A	JP 2009-68995 A (PANASONIC CORP.) 02.04.2009 (2009-04-02) entire text	1-14
A	JP 2016-24137 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.) 08.02.2016 (2016-02-08) entire text	1-14
E, A	WO 2020/003823 A1 (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.) 02.01.2020 (2020-01-02) entire text	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/050512

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2013-527848 A	04 Jul. 2013	US 2011/0268347 A1 claims 1-4, 13-14, paragraphs [0074], [0089], [0113], [0117], fig. 3, 18 WO 2011/137183 A1 EP 2563953 A1 SG 184963 A CN 103025927 A	
WO 2016/103473 A1	30 Jun. 2016	US 2017/0362634 A1 paragraphs [0012]- [0018], [0042], [0045], [0083] GB 2548733 A CN 107735496 A	
JP 2003-307518 A	31 Oct. 2003	US 2003/0152255 A1 entire text US 2003/0152256 A1 EP 1336662 A2	
JP 2010-66146 A	25 Mar. 2010	(Family: none)	
JP 2009-68995 A	02 Apr. 2009	(Family: none)	
JP 2016-24137 A	08 Feb. 2016	(Family: none)	
WO 2020/003823 A1	02 Jan. 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/00(2006.01)i; C12Q 1/6874(2018.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 37/00(2006.01)i FI: C12M1/00 A; C12Q1/6874 Z; G01N33/53 M; G01N37/00 102		
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）） C12M1/00-3/10; C12Q1/00-3/00; G01N33/53; G01N37/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2013-527848 A (コンプリート・ゲノミックス・インコーポレーテッド) 04.07.2013 (2013-07-04) 請求項1-4、8-9、[0050]、[0065]、[0089]、[0093]、図3、18	1-3, 5-7, 9, 11-14
Y	請求項1-4、8-9、[0050]、[0065]、[0089]、[0093]、図3、18	1-8
A	請求項1-4、8-9、[0050]、[0065]、[0089]、[0093]、図3、18	10
Y	WO 2016/103473 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 30.06.2016 (2016-06-30) 請求項7、[0017]、[0020]、[0056]	1-8
A	請求項7、[0017]、[0020]、[0056]	10
A	JP 2003-307518 A (日本硝子株式会社) 31.10.2003 (2003-10-31) 全文	1-14
A	JP 2010-66146 A (パナソニック株式会社) 25.03.2010 (2010-03-25) 全文	1-14
☒ 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 11.03.2020		国際調査報告の発送日 24.03.2020
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） 西 賢二 4N 5803 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 2009-68995 A (パナソニック株式会社) 02.04.2009 (2009 - 04 - 02) 全文	1-14
A	JP 2016-24137 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 08.02.2016 (2016 - 02 - 08) 全文	1-14
E, A	WO 2020/003823 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 02.01.2020 (2020 - 01 - 02) 全文	1-14

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/JP2019/050512

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2013-527848	A	04.07.2013	US 2011/0268347 A1 請求項1-4、13-14、[0074]、[0089]、[0113]、[0117]、図3、18 WO 2011/137183 A1 EP 2563953 A1 SG 184963 A CN 103025927 A	
WO	2016/103473	A1	30.06.2016	US 2017/0362634 A1 [0012] - [0018]、[0042]、[0045]、[0083] GB 2548733 A CN 107735496 A	
JP	2003-307518	A	31.10.2003	US 2003/0152255 A1 全文 US 2003/0152256 A1 EP 1336662 A2	
JP	2010-66146	A	25.03.2010	(ファミリーなし)	
JP	2009-68995	A	02.04.2009	(ファミリーなし)	
JP	2016-24137	A	08.02.2016	(ファミリーなし)	
WO	2020/003823	A1	02.01.2020	(ファミリーなし)	