

(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
2017 年 6 月 8 日(08.06.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/094101 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/083719
- (22) 国際出願日: 2015 年 12 月 1 日(01.12.2015)
- (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: 株式会社日立ハイテクノロジーズ(HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 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). 内田 憲孝(UCHIDA Kenko); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 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3 2 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), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

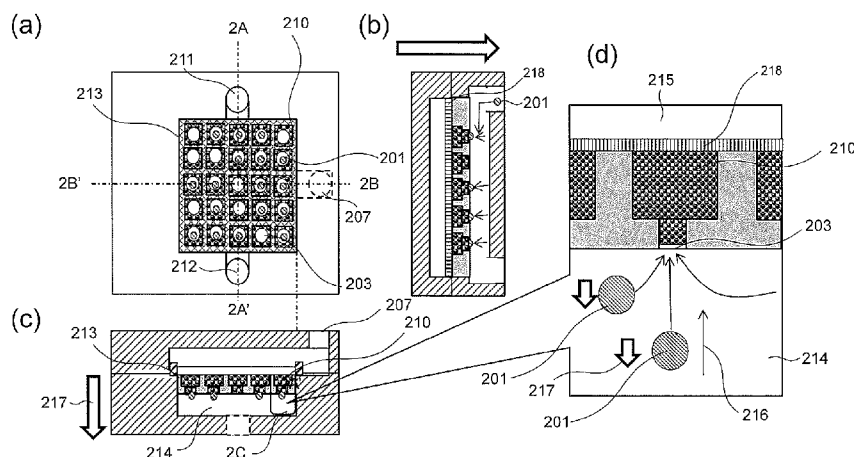
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CELL ANALYSIS DEVICE, APPARATUS, AND CELL ANALYSIS METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 細胞解析デバイス、装置およびそれを用いた細胞解析方法

図 2



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a single-cell analysis device wherein enhanced nucleic acid capture efficiency and enhanced cell capture efficiency are both achieved, and high-precision single-cell analysis data are thereby obtained. The present invention relates to an improvement of a cell analysis device provided with a two-dimensional array chip, provided with: a plurality of cell capture parts capable of capturing one cell in each thereof; and nucleic acid capture parts corresponding to the cell capture parts, the nucleic acid capture parts for capturing a nucleic acid extracted from the cell captured in the corresponding cell capture part.

(57) 要約: 本発明は、単一細胞解析デバイスにおいて、核酸捕捉効率の向上と細胞捕捉効率の向上の両立を図ることで高精度な単一細胞解析データを得ることを目的とする。本発明は、細胞を 1 個ずつ捕捉可能な複数の細胞捕捉部と、各細胞捕捉部に対応して存在し、細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部とを備えた 2 次元アレイチップを備えた細胞解析デバイスの改良に関する。

WO 2017/094101 A1

明 細 書

発明の名称：

細胞解析デバイス、装置およびそれを用いた細胞解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子発現解析、細胞機能解析、生体組織の解析方法、病気の診断、創薬などの技術分野に関し、より具体的には単一細胞についての遺伝子解析を可能とする細胞解析デバイス、装置およびそれを用いた細胞解析方法に関する。

背景技術

[0002] 単一細胞解析は、単一細胞毎の細胞中の生体分子を高精度に検出および／または定量する技術である。単一細胞解析を行うためには、細胞を個別処理するために単離し、細胞中の計測対象となる核酸を効率よく抽出し、相補鎖（例えばcDNA）を合成し、必要に応じて、増幅して得られた産物を配列解析する必要がある。

[0003] 特許文献1には、細孔アレーシートの細孔に個々の細胞を捕捉し、次いで細孔に固定され細孔ごとに異なるタグ配列を有するDNAプローブでその細胞由来の核酸を捕捉してcDNAを合成することにより、どの細胞に由来するかを識別可能な配列解析用の産物を得ることができるデバイスが開示されている。図1にそのようなデバイスの基本構成（特許文献1の図8に相当）を示す。

[0004] 図1のデバイスにおいて、細胞101を含む細胞溶液はインレット106から導入する。平面基板形状をした多孔質膜102の上部領域104を細胞溶液で満たすため、上部アウトレット107から細胞溶液を吸引する。下部アウトレット108から溶液を吸引して負圧をかけると、細胞溶液は多孔質膜102を介して吸引され、細胞101は細胞捕捉部103に誘導される。細胞101は多孔質膜102の上に構築された格子状の細胞捕捉部103で捕捉され、細胞を破碎すると、その細胞中の核酸（例えばmRNA）は細胞の直下の多孔質膜中に固定されたDNAプローブ（例えばポリTプローブ）によって捕捉される。

[0005] 図1のようなデバイスを用いると、捕捉された細胞から抽出された核酸を、反応領域である多孔質膜内壁以外の領域にほとんど接触させることなく捕捉し、捕捉された核酸に対応する核酸（例えばcDNA）を合成することができる。そのため、反応に関連のないデバイスの内壁に核酸が吸着する確率を低く抑えて、高効率に配列解析のための産物を調製することができる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2014/020657号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 図1のようなデバイスにおいて、核酸を効率よく捕捉するためには、多孔質膜102を構成する平均的な孔の直径は数 μm 以下である必要があり、特に1 μm 以下であることが望ましい。また、多孔質膜102の膜厚は10 μm 以上、特に数十 μm 以上であることが望ましい。しかし、そのような多孔質膜を用いると、細胞溶液を通過させる際の圧力損失が大きくなってしまう。圧力損失が大きいと、下部アウトレット108から溶液を吸引した際に吸引速度が低下することにより、細胞101が細胞捕捉部103に吸引される速度が低下する。そのため、比較的多くの細胞が重力により沈降し、細胞捕捉部103にたどり着く前に、その他のデバイス上の領域に留まってしまう現象がみられていた。図1中、109で示した細胞は、そのような細胞捕捉部103まで到達しなかった細胞の一例である。

[0008] 細胞捕捉部103以外の領域に細胞が留まってしまうことは、解析できる細胞の割合が低下するのみならず、付随した問題を引き起こす。すなわち、細胞から核酸を抽出する際には細胞を破碎する工程が必要となるが、その際に細胞捕捉部103以外の領域に存在する細胞も同時に破碎され、その細胞から抽出された核酸が複数の細胞捕捉部103に流入してしまい、正確な単一細胞解析が困難になるという問題が生じる。

[0009] 上記のような問題は、核酸捕捉効率の向上を図って、多孔質膜102の孔の直径を小さくし、膜厚を大きくしたことによる圧力損失の増大が原因である。それゆえ、核酸捕捉効率の向上と細胞捕捉効率の向上がトレードオフの関係になっていることが本質的な課題である。

[0010] さらに、核酸を捕捉後、配列解析を行うためには、核酸増幅工程が必要である。この工程では、（特許文献1に記載されているように）核酸捕捉部から核酸増幅産物が遊離し、溶液サンプルとしてデバイスの外部に抽出し、配列解析を実行する必要がある。この溶液中の増幅産物がデバイスの内壁に吸着する問題が生じる場合がある。吸着によって配列解析に必要な核酸増幅産物の収量が低下し、また、核酸の塩基長の違いによって吸着率が異なるため細胞中の本来の核酸の組成とは異なる組成についての配列解析を行ってしまう可能性がある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは上述したような問題を検討した結果、以下のような結論に達した。細胞溶液を核酸捕捉部が配置された基板（例えば多孔質膜）の裏面から吸引する際に、細胞捕捉部以外の基板上の領域に近づかないような斥力が細胞に印加されるようにデバイス構成をとることが有効である。すなわち、一例として、図2に示すように細胞への吸引方向と細胞への重力が反対方向に印加されるように構成されたデバイスが有効である。このような斥力は、図2に例示したような重力の場合のみならず、表面処理による静電気力や誘電泳動力も有効である。

[0012] また、本発明者らは、図3に示すように第2の3次元多孔質膜（3次元多孔質体）を用いて吸引力を強めることによって、細胞捕捉部以外の領域に他の力による吸着を防止する方法が有効であることを見出したが、この第2の3次元多孔質膜の内壁は親水性である必要があるため、負の電荷を有するDNA鎖は高確率に内壁へ吸着することがあった。そのため、得られる増幅産物の収量が低下し、DNA増幅産物の長さによる収量の変化が生じることがあるため、一細胞中の核酸組成の解析が難しいこともある。この点をさらに改良するために

、増幅反応過程で前記親水性の3次元多孔質膜と増幅反応部である前記核酸捕捉部の溶液を分離する手段を設けることが有効であることを見出した。このような分離を行う手段としては、核酸捕捉部である第1の多孔質膜（または基板、すなわち2次元アレイチップ）と吸引補助用の第2の親水性3次元多孔質膜との間に、適切なタイミングで空気またはオイルなどの非極性溶媒を注入する手段を設けること、あるいは、第1と第2の多孔質膜の設置距離が膜に対して垂直方向に離れるようなアクチュエータをデバイス内部に設けることが有効であることを見出した。さらに、第1と第2の多孔質膜の間に限外ろ過膜またはゲル膜等の分離膜を用いて増幅産物が第2の多孔質膜に到達しないようにすることが有効であることも見出した。

[0013] したがって、本発明の要旨は以下のとおりである：

(1) 細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、

前記溶液導入流路に接し、細胞を1個捕捉可能な凹部を有する細胞捕捉部と、前記細胞捕捉部のそれぞれの凹部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部との組を複数備えた基板と、

前記基板の前記核酸捕捉部に隣接して設けられ、前記核酸捕捉部の溶液を排出する排出流路と、

前記排出流路に設けられた圧力制御手段と
を備え、

前記基板は、細胞を前記基板から引き離す方向の斥力を備え、

前記圧力制御手段は、前記細胞捕捉部に細胞を捕捉する際は、前記細胞捕捉部から前記核酸捕捉部へ方向の力が、前記斥力よりも大きな第1の圧力となるように制御する

ことを特徴とする細胞解析デバイス。

(2) 前記圧力制御手段は、前記核酸捕捉部での核酸反応の際は、前記細胞捕捉部から前記核酸捕捉部へ方向の力が、重力よりも大きく前記第1の圧力よりも小さくなるように制御する、(1)に記載の細胞解析デバイス。

(3) 前記基板上の、前記細胞を含む溶液と接する前記凹部以外の領域は、細胞に対して斥力を働かせる領域である、(1)に記載の細胞解析デバイス。

(4) 前記斥力は、前記細胞捕捉部が細胞を重力に逆らう方向に捕捉するように前記基板が設置されることによる斥力である、(1)に記載の細胞解析デバイス。

(5) 前記斥力は、前記基板の表面が細胞の吸着を抑制する処理をされることによる斥力である、(1)に記載の細胞解析デバイス。

(5-1) 細胞の吸着を抑制する処理が、コーティング剤、例えばMPCポリマによる表面処理である、(5)に記載の細胞解析デバイス。

(6) 前記基板を挟むように設けられた電極対をさらに備え、前記核酸捕捉部は金属微粒子を備え、前記斥力は前記電極対に印加される電圧と前記金属微粒子による誘電結合による斥力である、(1)に記載の細胞解析デバイス。

(6-1) 金属微粒子が金微粒子である、および／または基板が白金基板である、(6)に記載の細胞解析デバイス。

(7) 細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、

前記溶液導入流路に隣接して設けられ、細胞を1個ずつ捕捉可能な複数の細胞捕捉部と、前記複数の細胞捕捉部の各細胞捕捉部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部とを備えた2次元アレイチップと、

前記核酸捕捉部に滞留した溶液を吸収する3次元多孔質体を備え、前記溶液を排出する排出流路と、

前記核酸捕捉部と前記排出流路との間を分離制御する分離制御部とを備え、

前記分離制御部は、前記核酸捕捉部に前記核酸が捕捉された後、捕捉された核酸から増幅された産物が前記排出流路に導入されないように分離制御を行う

ことを特徴とする細胞解析デバイス。

(8) 前記分離制御部は、前記排出流路に設けられた吸引圧力印加手段である

、(7)に記載の細胞解析デバイス。

(9) 前記2次元アレイチップと前記3次元多孔質体の間に、前記増幅産物の分子サイズの分子の通過を防止する限外ろ過膜またはゲル膜を配置する、(7)に記載の細胞解析デバイス。

(10) 前記分離制御部は、前記核酸捕捉部と前記排出流路との間に分離溶媒または空気を導入する手段である、(7)に記載の細胞解析デバイス。

(10-1) 分離溶媒がミネラルオイルである、(10)に記載の細胞解析デバイス。

(11) 前記核酸捕捉部が核酸を捕捉するための核酸プローブを有し、前記核酸プローブは細胞から抽出された核酸とハイブリダイズする核酸捕捉配列と、各細胞捕捉部に対応して異なる細胞認識配列とを有する、(1)または(7)に記載の細胞解析デバイス。

(12) (1)に記載の細胞解析デバイスを用いた細胞解析方法であって、
前記基板の上を細胞を含む溶液で満たす工程、および
前記細胞捕捉部に負圧を印加し、前記細胞を含む溶液を前記基板に向かって吸引し、前記細胞捕捉部に単一の細胞を捕捉する工程を含む、前記方法。

(13) 前記細胞捕捉部に捕捉した単一の細胞を、前記細胞捕捉部に負圧を印加した状態で破碎し、前記細胞から抽出された核酸を前記核酸捕捉部に捕捉させる工程をさらに含む、(12)に記載の細胞解析方法。

(14) 前記核酸捕捉部に捕捉された核酸とハイブリダイズする配列を有する第2の核酸プローブ、ならびに捕捉された核酸を鋳型とする相補鎖合成のための酵素および基質を前記核酸捕捉部に供給して相補鎖合成を行う工程をさらに含む、(13)に記載の解析方法。

(15) (7)に記載の細胞解析デバイスを用いた細胞解析方法であって、
前記2次元アレイチップの上を細胞を含む溶液で満たす工程、および
前記細胞捕捉部に負圧を印加し、前記細胞を含む溶液を前記3次元多孔質体を備えた前記排出流路から吸引するとともに、核酸増幅のための試薬を前記

核酸捕捉部に前記細胞を含む溶液と同様に吸引によって導入後、増幅反応の開始前または増幅反応の開始後終了前まで前記核酸捕捉部または前記2次元アレイチップと前記3次元多孔質体を分離する工程を含む、前記方法。

(15-1) 前記細胞捕捉部に捕捉した単一の細胞を、前記細胞捕捉部に負圧を印加した状態で破碎し、前記細胞から抽出された核酸を前記核酸捕捉部に捕捉させる工程をさらに含む、(15)に記載の細胞解析方法。

(15-2) 前記核酸捕捉部に捕捉された核酸とハイブリダイズする配列を有する第2の核酸プローブ、ならびに捕捉された核酸を鋳型とする相補鎖合成のための酵素および基質を前記核酸捕捉部に供給して相補鎖合成を行う工程をさらに含む、(15-1)に記載の解析方法。

(16) (1) ～ (11) のいずれかに記載の細胞解析デバイスと、細胞観察手段(例えば蛍光顕微鏡)とを備えることを特徴とする細胞解析装置。

発明の効果

[0014] 本発明の細胞解析デバイス、装置および細胞解析方法により、細胞からの核酸捕捉の際に、核酸捕捉部における核酸捕捉効率を維持しつつ、細胞捕捉部が細胞を捕捉する効率を従来よりも向上させることに成功した。その結果、従来のデバイス等よりも高精度に個々の細胞の分離度を高めた単一細胞解析用のサンプルを調製することが可能となった。また本発明の細胞解析デバイス、装置および細胞解析方法により、デバイス内部で増幅反応を行う際に、高効率に増幅産物を回収することが可能となった。

[0015] したがって、本発明の細胞解析デバイス、装置および細胞解析方法により、組織の平均としての遺伝子の発現量だけではなく、組織を構成する個々の細胞の中味を高効率かつ高精度に定量分析することが可能である。生体組織の中で活動する遺伝子(例えばmRNA)を単一細胞レベルで計測する単一細胞解析を行うことにより、生体内で起こっている種々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るようになり、生命科学分野、特に医療、創薬、診断、生命現象の基礎研究などに大きな効果があると期待される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の関連技術である、特許文献1に記載のデバイスの基本構成を示す図である。

[図2]本発明の一態様に係る細胞解析デバイスの構成の実施形態を示す図である。

[図3]本発明の別の態様に係る細胞解析デバイスの構成の実施形態を示す図である。

[図4]本発明に係る細胞解析デバイスを用いた細胞解析方法のフロー図と分離タイミングを示す図である。

[図5]実施例1-1で製造したデバイスの構成の概要を示す図である。

[図6]本発明に係る細胞解析デバイスを用いた解析方法における核酸処理過程を示す図である。

[図7]実施例1-4で製造したデバイスの構成の概要を示す図である。

[図8-1]実施例2に係るデバイスの構成の概要を示す図である。

[図8-2]図8-1の続きである。

[図9]実施例2-2で製造したデバイスの構成の概要を示す図である。

[図10]実施例3に係る装置の構成の概要を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] 一態様において、本発明の細胞解析デバイスでは、2次元アレイチップの細胞捕捉部に細胞を吸引する際に、2次元アレイチップの基板から細胞を引き離す方向の斥力（例えば重力）と拮抗させて吸引することで、細胞の2次元アレイチップへの吸着を防止する。具体的には、本発明の細胞解析デバイスは、細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、前記溶液導入流路に接し、細胞を1個捕捉可能な凹部を有する細胞捕捉部と、前記細胞捕捉部のそれぞれの凹部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部との組を複数備えた基板と、前記基板の前記核酸捕捉部に隣接して設けられ、前記核酸捕捉部の溶液を排出する排出流路と、前記排出流路に設けられた圧力制御手段とを備え、前記基板は、細胞を前記基

板から引き離す方向の斥力を備え、前記圧力制御手段は、前記細胞捕捉部に細胞を捕捉する際は、前記細胞捕捉部から前記核酸捕捉部へ方向の力が、前記斥力よりも大きな第1の圧力となるように制御するものである。

[0018] 図2は、本発明の上記態様に係る細胞解析デバイスの構成の一実施形態を示す図であり、(a)は下面図（下から見た平面図）、(b)は2A-2A'断面における断面図、(c)は2B-2B'断面における断面図をそれぞれ示す。また、(d)は断面図(c)中の領域2Cの拡大図である。

[0019] 本発明に係る細胞解析デバイスは、細胞を1個ずつ捕捉可能な複数の細胞捕捉部203と、各細胞捕捉部に対応して存在し、細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部210の組を備えた基板（以下、2次元アレイチップ(213)という）を有し、細胞導入口211から導入された細胞溶液を吸引前に保持する下部領域214が2次元アレイチップに隣接して配置され、反対側の上部領域215は上部にある上部アウトレット207に接続されている。この上部アウトレット207にはポンプまたはシリンジが接続されており、この上部アウトレット207に負圧を印加することで、2次元アレイチップ上の、核酸捕捉部210および細胞捕捉部203に負圧を印加可能となり、領域214中の細胞溶液は細胞捕捉部203に吸引される。(d)の拡大断面図に示すように細胞溶液の吸引時に溶液の粘度によって細胞には上向き（矢印216の方向）に力が働く。一方、重力は217方向に働き、吸引方向と反対向きとなる。これによって、重力による細胞の沈降は、2次元アレイチップから引き離す方向に働くから、細胞の吸引力は細胞捕捉部203のみで働き、2次元アレイチップ上の細胞捕捉部以外の領域への細胞吸着を防止する。この実施形態では、重力を2次元アレイチップから引き離す方向の斥力として利用しているが、他の斥力を利用できることについては後述する。

[0020] 核酸捕捉部210は、多孔質材料またはビーズ（好ましくは磁性ビーズ）などから構成され、細胞から抽出された核酸を捕捉するための核酸プローブが固定されている。核酸プローブには、細胞から抽出された核酸とハイブリダイズする核酸捕捉配列と、各細胞捕捉部に対応して異なる細胞認識配列とを有

し、そのような核酸プローブに捕捉された核酸を増幅させた産物を用いることにより単一細胞解析が可能となる。核酸プローブは、解析の目的、解析対象（mRNA、ゲノムDNA、ncRNA等）、使用するデバイスの構成、増幅反応の種類などに応じて、当業者であれば適宜設計することができる。

[0021] 細胞溶液は、細胞導入口211から導入する。図1に示した従来例とは上下反転した形で領域214を細胞溶液で満たすため、サンプル回収口212から細胞溶液を吸引する。次いで、上部アウトレット207から溶液を吸引して負圧を印加することにより、細胞捕捉部203に単一の細胞を吸着させる点も、従来例のデバイスと同じである。しかし、本発明に係るデバイスは、重力方向を適切な向きに制御することが従来例のデバイスとは相違する。

[0022] 細胞吸引時の2次元アレイチップに近づく吸引力は、反対方向に加わる重力よりも強い必要がある。この強い吸引は上部アウトレットに印加する負圧が1気圧に近く、領域215の内部の圧力が細胞溶液の飽和蒸気圧よりも低く設定するときに特に有効である。この飽和蒸気圧よりも内部圧力を低くするためには、持続的な吸引が必要であることから、吸引体積が有限なシリンジを用いたポンプよりも、ダイヤフラムポンプなどの連続吸引ポンプが有効である。重力に打ち勝つほどの強い吸引力を実現するためのもう1つの方法は、3次元多孔質体を配置する方法である。3次元多孔質体は、領域215に配置した場合には、毛細管現象により接触した水溶液を素早く吸収し、かつ、その吸収した水溶液を外部へ、とりわけ核酸捕捉部210に接していない方向へと排出させることができる性質を有する。吸収した水溶液を排出させることにより、3次元多孔質体の毛細管現象による溶液吸収性能を維持させることができる。3次元多孔質体の毛細管現象を利用することにより、図1に示した従来例のように単に負圧を印加するのみの場合と比べて、より速やかに核酸捕捉部210に滞留した溶液を吸引することができ、さらに細胞捕捉部203が細胞を吸着する能力も向上させることができる。3次元多孔質体を用いる実施の形態については、核酸増幅までをデバイス内で行うとき高効率に核酸増幅産物を回収するための構成の記載において詳述する。

[0023] 細胞を2次元アレイチップから引き離す方向に細胞に印加する力は重力に限られるものではない。例えば、2次元アレイチップに対して負電荷を持った表面処理を2次元アレイチップ（基板）に行うことで、2次元アレイチップ近傍で細胞に斥力を印加して、細胞の2次元アレイチップへの吸着を抑制することが可能である。また、MPCポリマやポリエチレングリコールなどのコーティング剤で表面をコートすることによっても実現可能である。

[0024] さらに、誘電泳動によって細胞を2次元アレイチップから引き離す方向に力を印加することも可能である。詳細については実施例1-4に記載する。

[0025] また別の態様において、本発明の細胞解析デバイスでは、2次元アレイチップに隣接して3次元多孔質体を配置することで毛細管現象により細胞の吸引を高速化し、細胞の重力による沈降の影響を低減するものである。本発明の細胞解析デバイスは、3次元多孔質体を備える場合、同時に、2次元アレイチップ上での増幅された増幅産物が3次元多孔質体に吸着されないように増幅反応中に2次元アレイチップと3次元多孔質体を分離する手段を備えるものである。具体的には、本発明の細胞解析デバイスは、細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と；前記溶液導入流路に隣接して設けられ、細胞を1個ずつ捕捉可能な複数の細胞捕捉部と、前記複数の細胞捕捉部の各細胞捕捉部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部とを備えた2次元アレイチップと；前記核酸捕捉部に滞留した溶液を吸収する3次元多孔質体を備え、前記溶液を排出する排出流路と；前記核酸捕捉部と前記排出流路との間を分離制御する分離制御部とを備え、前記分離制御部は、前記核酸捕捉部に前記核酸が捕捉された後、捕捉された核酸から増幅された産物が前記排出流路に導入されないように分離制御を行うものである。

[0026] 図3は、本発明の上記態様の細胞解析デバイスの構成の一実施形態を示す図であり、(a)は下面図（下から見た平面図）、(b)は3A-3A'断面における断面図、(c)および(d)は3B-3B'断面における断面図をそれぞれ示す。

[0027] 本発明の別の態様に係る細胞解析デバイスは、細胞から抽出した核酸から

の増幅産物を効率よく外部に回収できる手段を設けたことを特徴とする構成に関するものである。細胞を1個ずつ捕捉可能な複数の細胞捕捉部303と、各細胞捕捉部に対応して、細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部310とを備えた2次元アレイチップ(313)は、前記態様と同様であり、細胞導入口311から導入された細胞溶液を保持する下部領域314が2次元アレイチップに隣接して配置され、反対側の上部領域315は上部アウトレット307に接続されていることも同様である。さらに、この上部アウトレット307にはポンプまたはシリンジが接続されており、この上部アウトレット307に負圧を印加することで、2次元アレイチップ上の、核酸捕捉部310および細胞捕捉部303に負圧を印加可能となり、領域314中の細胞溶液は細胞捕捉部303に吸引されることも同様である。しかし、本態様では、上部領域に3次元多孔質体を配置することによって吸引力を増して、細胞を捕捉する構成において、3次元多孔質体と2次元アレイチップを分離する手段を設ける点で異なる。この分離手段としては、図3の323の“ため”（空気または非極性溶媒（例えばミネラルオイル）などの分離溶媒を入れる空間）と、3次元多孔質体と2次元アレイチップの間の領域に空気または分離溶媒を注入する手段としてのシリンジ333を設けている。本実施の形態では、2次元アレイチップは弾力性のある材料（ここではPDMS樹脂）で作製しているため、吸引のための負圧を上部アウトレット307に印加することによって図3の(C)の313で示す2次元アレイチップのように、2次元アレイチップは負圧印加によってたわんで3次元多孔質体319に密着する。このような密着によって、3次元多孔質体のキャピラリー効果による吸引が可能となる。負圧印加をとめて、空気または分離溶媒をそれぞれの媒体の“ため”323から3次元多孔質体319と2次元アレイチップ313の間に注入することによって、溶液を介した物質の移動を遮断する。この遮断によって、増幅産物であるDNAの3次元多孔質体内壁への吸着を防止することができる。

[0028] 具体的には、2次元アレイチップ中の核酸捕捉部310を構成する多数のビーズがパックされた状態を維持するために、ビーズ流出防止膜（親水性多孔質

膜) 318を2次元アレイチップ313の裏面に密着させている。3次元多孔質体と2次元アレイチップの密着は正確にはビーズ保持膜318と3次元多孔質体の密着によって実現される。ここでビーズ流出防止膜318は2次元アレイチップ313と一体となって機能するため、前記キャピラリ効果による吸引は有効である。

[0029] 分離手段としては、3次元多孔質体にアクチュエータを接続して3次元多孔質体と2次元アレイチップの間の距離を変えて分離することもできる。

[0030] さらに、密着したままで3次元多孔質体表面に増幅産物が到達しないような隔離膜を設けることによって分離することも可能である。これは、例えば3次元多孔質体と2次元アレイチップの間に増幅産物の分子サイズの分子（例えばDNA分子）の通過を防止するポアサイズの限外ろ過膜またはゲル膜を配置することによって実現される。

[0031] 本発明に用いる3次元多孔質体とは、数十nmから零点数 μm の細孔をランダムに有し、その細孔の存在により生じる毛細管現象により水溶液を吸収することができる程度の表面親水性を有する材料である。その具体例としては、多孔質ガラス材、ガラス繊維集合体（例えば、ガラス繊維を同じ方向に揃えて束ねたもの）、ガラスビーズ集合体（平均粒径が $0.1\sim 30\mu\text{m}$ の範囲であることがより好ましい）などが挙げられる。3次元多孔質体は、容易に変形するものではないほうが、吸収した溶液が意図せず排出されて核酸捕捉部310や細胞捕捉部303に逆流する可能性が低くなるため好ましい。3次元多孔質体の表面の親水性は、純水を用いて測定した水接触角が 90° 以下、好ましくは 80° 以下、より好ましくは 50° 以下、特に好ましくは 40° 以下であること、あるいは $1\mu\text{L}$ の液体を保持するのに十分な体積を有する3次元多孔質体に $1\mu\text{L}$ の純水を滴下した際に、10秒以内、好ましくは5秒以内、より好ましくは3秒以内、特に好ましくは1秒以内に滴下した液滴が吸収されることのいずれかにより特徴付けることができる。なお、液滴が3次元多孔質体に吸収されるとは、3次元多孔質体表面に対して垂直な面から観察した際に、液滴の存在が目視で確認できない状態となることを意味する。

[0032] また、溶液保持部319を構成する3次元多孔質体は、その孔径が多孔質膜や

ビーズなどからなる核酸捕捉部310が有する孔よりも十分大きいことが好ましく、例えば平均孔径が $0.2\mu\text{m}$ 以上、特に $3\mu\text{m}$ 以上であることが好ましい。そのような大きさであれば、空気などの気体が溶液保持部319を通過する際に、過度に大きな圧力損失は生じない。また、3次元多孔質体の孔径が上記のような大きさであれば、上部アウトレット307から負圧をかけた際に、核酸捕捉部310の上部一下部間に十分な圧力差を生じさせることができる。

[0033] 溶液保持部319が設けられており上部アウトレット307と連通する流路は、圧力調整部材320を介して装置外部に開放された吸気ポート321とも連通していることが好ましい。図3の装置では、吸気ポート321は装置上部方向に外部へと解放されている。吸気ポート321が設けられている場合、上部アウトレット307から負圧をかけると、圧力調整部材320を介して吸気ポート321から外気が取り込まれ、空気の流れ322が発生し、それにより溶液保持部319に吸収された溶液が排出される。吸気ポート321を設けた構成とすることで、上部アウトレット307から負圧をかけた時のみ溶液保持部319が毛細管現象により溶液を吸収するように、すなわち溶液保持部319が排出した溶液の容量分だけ毛細管現象により再び溶液を吸収するようにすることができる。また、吸気ポート321を設けない構成の場合は、上部領域314を溶液で満たしただけでは溶液が溶液保持部319まで到達せずに吸収が始まらないこともある一方、吸収が始まれば溶液保持部319の容量が満たされるまで吸収は停止せず、制御性が不十分となるが、吸気ポート321を設けることにより制御性を補うことができる。吸気ポート321にエアバルブをさらに設けると、溶液の吸収の制御性がより向上するため好ましい。

[0034] 圧力調整部材320は、気体が通過する際に、溶液が核酸捕捉部310を通過する際に生じるものよりも大きな圧力損失を生じさせるものであることが好ましい。そのような圧力調整部材320を設けることで、上部アウトレット307から負圧を印加した際に、吸気ポート321のみならず、溶液保持部319、核酸捕捉部310および細胞捕捉部302に十分な負圧が印加されるようになる。圧力調整部材320としては、例えば核酸捕捉部310が有する孔よりも微細な孔を有す

る材料、例えば核酸捕捉部310が有する孔の平均孔径の約1/5～約1/10、より好ましくは約1/7～約1/9、具体的には約1/8の平均孔径を有する材料を用いると、空気と水の粘度差の観点からバランスがよいといえる。

[0035] なお、本発明者らは、3次元多孔質体を備えた細胞解析デバイスについて既に国際特許出願（2015年9月30日出願のPCT/JP2015/077849）を行っている。その出願の明細書、請求の範囲および図面に記載された内容は、そのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

[0036] 図4に本発明に係るデバイスを用いた細胞解析方法のフロー図を示す。これによって、どのタイミングで3次元多孔質体と2次元アレイチップを分離するかを説明する。

[0037] 最初のステップで、上述のようにして細胞を細胞捕捉部303に捕捉した後、（Step 2）で上部アウトレット307から負圧を印加した状態で、リシスバッファなどにより細胞を破碎すると、その細胞から抽出された核酸（例えばmRNA）は核酸捕捉部310に固定された核酸プローブにより捕捉される。（Step 3）で核酸捕捉部310表面上に捕捉された核酸は、酵素を含む試薬を核酸捕捉部に導入することで、捕捉された核酸（例えばmRNA）の相補鎖1st strand（例えばcDNA）が合成される。（Step 4）で計測対象の遺伝子に対応する第2のDNAプローブと酵素試薬を核酸捕捉部に導入することによって、2nd strandを合成する。ここまでの反応はすべて核酸捕捉部表面で起き、必要な反応産物は前記表面上に固定されている。次の増幅反応（例えばPCR）では、増幅産物は表面上から遊離し、最終産物としてデバイスから回収される。このとき、増幅産物が3次元多孔質体内壁に吸着することを防止するために、増幅反応に必要な酵素と基質を含む試薬を核酸捕捉部に吸引によって導入した後、吸引力をオフにして、分離用の空気または分離溶媒を“ため”323からシリンジ333を押し込むことによって、3次元多孔質体と2次元アレイチップの間に注入する。これによって、増幅産物が2次元アレイチップ中から3次元多孔質体へ移動することを遮断し、吸着を防止することができる。増幅時に増幅産物は領域314に拡散によって2次元アレイチップ中から広がっていく。

[0038] 空気または分離溶媒の注入による分離のタイミングは試薬導入後の増幅反応（例えばPCRサイクル反応）前のタイミングでもよいが、拡散によって核酸捕捉部から3次元多孔質体に移動する前の数サイクルの増幅反応が完了した後で分離した方がよい。このようなタイミングで実行することによって、温度変化による溶液の移動の影響を最小限に抑えることができる。

[0039] 増幅工程完了後、増幅産物は、サンプル回収口312から吸引によって回収される。このとき、細胞導入口311は開放されており、溶液は311から312に向かって移動する。得られた増幅産物には解析に不要な長さのDNA鎖（特に短いDNA鎖）が含まれているため、(Step 7)で除去するために精製を実施し、(Step 8)で次世代シーケンサにて配列解析を行う。最後に細胞捕捉位置に対応するタグ配列ごとに得られた配列をまとめなおすこと (Step 9) によって単一細胞解析結果を得ることは従来例と同様である。なお、核酸の増幅は、好ましくはPCR増幅であるが、それに限定されず、ローリングサークル増幅 (RCA) 反応、NASBA法、LAMP法などの他の増幅法を用いることが可能である。そのような他の増幅法は、当技術分野で周知であり、当業者であれば適宜使用する核酸プローブ、試薬を選択することができる。

[0040] また、アクチュエータによって3次元多孔質体と2次元アレイチップを分離する場合も上記と同じタイミングで分離を実行する。

[0041] さらに、限外ろ過膜またはゲル膜を用いる分離方法では多孔質体への増幅産物の移動が常時遮断されるので分離のタイミングを設定する必要はない。ここで、限外ろ過膜またはゲル膜のポアサイズは、1~10 nm、例えば5 nm (30 kDa) と設定することで負圧印加がない状態での増幅産物の核酸の移動量を1/10以下に低減することができる。

実施例

[0042] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0043] (実施例1-1) デバイスの製造

図5は、本実施例で製造したデバイスの構成の概要を示す図であり、(a)

は下面図（下から見た平面図）、（b）は5A-5A'断面における断面図を示す。デバイス500は複数の反応室524を備えており、その反応室524のそれぞれには、複数の細胞捕捉部503と、その個々の細胞捕捉部503に対応する核酸捕捉部510の組を備えた2次元アレイチップ513が配置されている。細胞溶液は、細胞導入口511からサンプル回収口512に向かって共通流路525の中を流すことにより2次元アレイチップ513上に供給し、チップ上を細胞溶液で満たす。個別インレット527は、チップごとに個別に試薬を導入する場合、具体的には、例えばチップを識別するためのタグ配列を有するプライマーを含む試薬を導入する際に用いる。

[0044] 2次元アレイチップ513の製造には、射出成形により得られたジメチルポリシロキサン（PDMS）製樹脂チップ（一辺が1.125mmの正方形）を用い、細胞より小さい直径3～10 μm 程度の貫通孔を形成して細胞捕捉部503とした。なお、2次元アレイチップの製造は、他の樹脂（ポリカーボネート、サイクリックポリオレフィン、ポリプロピレンなど）を用いた射出成形により得られた樹脂チップを用いてもよく、あるいはナノインプリント技術や半導体プロセスを用いて行うこともできる。2次元アレイチップの製造に用いる材料は、疎水性材料であることが好ましく、それにより細胞や試薬などのアレイチップ上への吸着を低減することができる。このような2次元アレイチップの基板の表面に、細胞の吸着を抑制する処理を行うことでも、細胞に斥力を印加することが可能である（実施例1-3参照）。

[0045] 細胞捕捉部503の直下には、直径数十 μm （例えば10～50 μm ）の円筒状の空間を設け、その中に核酸捕捉用プローブを固定した磁性ビーズを充填し、核酸捕捉部510を構成するようにした。磁性ビーズの充填は個別にインクジェットプリンタヘッドを用いて実行する。チップを上下逆転させた状態で、領域ごとに異なる配列が固定されたビーズ溶液を個別に核酸捕捉部510に2nLずつ充填する。充填に用いるビーズ溶液は、直径1 μm の磁性ビーズが 5×10^9 個/mLの数密度で懸濁されている。磁性ビーズ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DNAプロ

ープが固定される。充填する磁性ビーズの数を増やして核酸捕捉効率を向上させるため、ビーズの直径は数 μm 以下（例えば $1\mu\text{m}$ 以下）とした。充填した磁性ビーズが流出しないよう、ビーズ直径よりも孔径が小さいビーズ流出防止膜518（孔径 $0.8\mu\text{m}$ の樹脂製ポラス膜：Isopore膜、ミリポア社製）を2次元アレイチップ513に密着させた。

[0046] 本実施例では、斥力として重力を利用し、重力による細胞の沈降によって2次元アレイチップ上の細胞捕捉部以外の領域に細胞が接触し、吸着することを防止する。しかし、本実施例では、重力は2次元アレイチップから引き離す方向に働くため、重力に打ち勝って細胞を吸引する必要がある。しかし、2次元アレイチップ513の核酸捕捉部510は微細な磁性ビーズが充填されているため、シリンジを用いた2次元アレイチップ513の上部と下部に圧力差を印加するのみでは細胞溶液が十分な流速で流れず、十分な吸引力を得ることができないこともある。そこで本実施例では、より好ましい実施形態として、吸引方法をシリンジではなく、上部アウトレットにダイアフラムポンプを接続することによって、上部流路526の領域を水溶液の飽和蒸気圧以下に保ち、2次元アレイチップの裏面に到達した溶液を蒸発させて速やかに排出することによって実現した。このように溶液を蒸発させることは、核酸捕捉部のキャピラリ効果を促し、これによって、高速の吸引が実現し、重力に逆らって細胞を捕捉することができる。

[0047] （実施例1-2）デバイスを用いた単一細胞解析方法

図4は、図5に示される実施例1-1で製造した本発明のデバイスを用いた単一細胞解析方法の概略を示すフロー図である。本実施例では、(Step 1)細胞捕捉、(Step 2)細胞リシス(破碎)、(Step 3)相補鎖(1st strand)合成（例えばcDNA合成）、(Step 4)捕捉核酸分解（例えばmRNA分解）、(Step 5)2nd strand合成、(Step 6)増幅反応、をデバイス中で実行する。また、(Step 5)までの反応は、核酸捕捉部510上に反応生成物は固定されており、固相反応となっている。(Step 6)で2次元アレイチップから遊離した増幅産物は反応室524の反応試薬中に拡散していく。増幅反応完了後、この増幅産物を含む試薬を

サンプル回収口512から吸引によって回収する。

[0048] また、(Step 4)の相補鎖 (1st strand) 合成 (例えばcDNA合成) が完了したあと、2次元アレイチップをデバイスから取り外して、チップを試薬の入ったチューブに沈めることによって、ビーズを溶液中に回収し(Step 5)以降の反応をチューブ中 (デバイスの外) で実行してもよい。

[0049] (Step 7)は核酸配列解析に不要な増幅時の副産物を除去する精製工程である。さらに(Step 8)は次世代シーケンサによる配列解析工程であり、並列度の高いシーケンサであればどのような配列解析プラットフォームを用いても良い。最後の (Step 9) がデータ解析工程であり、細胞識別タグやチップタグごとに配列解析結果をまとめて、単一細胞毎の遺伝子解析データを構築する工程である。

[0050] まず、細胞溶液中の細胞を2次元アレイチップ513上の細胞捕捉部503で捕捉する工程を行う。そのために、細胞溶液を細胞導入口511から導入し、サンプル回収口512から吸引することで、細胞溶液で2次元アレイチップ513上を満たす。次に、下部アウトレット507に負圧を印加することによって、細胞溶液が2次元アレイチップ513上の細胞捕捉部503と核酸捕捉部510を通過して、細胞が細胞捕捉部503に捕捉される。図5 (a) の501は細胞捕捉部に捕捉された細胞を示す。このとき、ダイヤフラムポンプによる連続排気と核酸捕捉部のキャピラリ効果によって高速吸引が実現し、重力による沈降に打ち勝って吸引することができる。吸引時間は1 μ Lあたり1分以内であった。このとき、沈降による2次元アレイチップ上の細胞の吸着は10%以下であった。

[0051] 細胞を破碎するためにリシスバッファを細胞導入口511から導入し、サンプル回収口512から吸引することで、リシスバッファで2次元アレイチップ513上を満たし、必要な吸引速度が得られるように下部アウトレット507に負圧を印加する。印加する負の圧力は細胞吸引時と同じ圧力とした。なお、細胞吸引を完全に完了するために、リシスバッファを導入する前にPBSバッファを1 μ L程度導入することも有効であった。

[0052] 次に相補鎖 (1st strand) 合成 (例えば、逆転写、cDNA合成) のステップ

に進む。相補鎖合成（逆転写）用試薬ミックスの必要な導入速度が得られるように、負圧の値を再設定する。設定後、細胞導入口511から試薬を導入し、2次元アレイチップ513上を試薬で満たす。その後、相補鎖合成反応（逆転写反応）を進めるためにデバイスの温度を上昇させて、反応に必要な時間だけ維持する。さらに、試薬（例えば逆転写酵素）を失活させるために85℃まで昇温する。不要な洗浄液を洗浄・排出するため、洗浄バッファを細胞導入口511から導入し、洗浄バッファを核酸捕捉部に導入・排出するために負圧を再設定する。次の工程である捕捉核酸分解（mRNA分解）と2nd strand合成は、前記相補鎖（1st strand）合成（逆転写）の工程とほぼ同じである。

[0053] 最後の工程が増幅反応である。増幅反応試薬ミックスを細胞導入口511に導入し、核酸捕捉部510に試薬ミックスを必要な溶液速度で導入されるように負圧設定を行う。増幅反応（特にPCR）を行うために温度サイクルを開始し、1～数サイクル目に負圧の印加を停止すると同時にシリンジをするように圧力設定を変更する。その後、必要な増幅産物濃度になるまで温度サイクルを繰り返し、増幅産物を回収するために、下部アウトレット507に負圧を印加して、吸引し、回収された増幅産物溶液をチューブに排出する。

[0054] 次に、2次元アレイチップ513を用いたシーケンシング用サンプルの調製手順を詳細に説明する。本実施例のデバイスの核酸捕捉部510に捕捉された核酸（例えばmRNA）の処理によって、どのようにサンプルが調製されるかを図6に示した。この工程は、細胞捕捉(Step 1)の後の細胞の破碎および核酸（mRNA）の捕捉(Step 2)および相補鎖（1st strand）（例えばcDNA）の合成(Step 3)と捕捉核酸（例えばmRNA）の分解（Step 4）、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する2nd strandの合成(Step 5)、そして核酸増幅(Step 6-1)（Step 6-2）のステップに分けられる。

[0055] 細胞を500 μ Lの1×PBSバッファで細胞を傷つけないように洗浄後、4℃に冷却された1×PBSバッファ10 μ Lに懸濁された1000個の細胞を細胞導入口511から導入し、反応室524がこの溶液で満たされるように、上部アウトレット512から吸引する。このようにすることで、2次元アレイチップ513上は細胞を含

むPBSバッファで満たされることとなる。次に、上部流路526に向かって細胞捕捉部503を溶液が通って流れるように、下部アウトレット507に、例えばダイヤフラムポンプにて負圧0.95気圧を印加して溶液を吸引する。細胞は溶液の流れに乗って移動し、細胞捕捉部503まで到達し、細胞捕捉部503の開口直径が細胞の直径よりも小さいため、ここに細胞が捕捉される。捕捉された細胞は、溶液流に対して栓の役割を果たすので、溶液の流れはまだ細胞を捕捉していない細胞捕捉部503に移動する。そのため、残りの細胞はまだ細胞が捕捉されていない捕捉部へと移動し捕捉される。

[0056] 細胞が十分な数だけが捕捉されたら、捕捉されなかった過剰な細胞とPBSバッファをサンプル回収口512から排出する。次に、細胞導入口511からサンプル回収口512に向かってリシスバッファ（例えばTween 20などの表面活性剤）を流し、2次元アレイチップ513上がバッファで満たされたあと、直ちに下部アウトレット507に負圧を印加して吸引する。以下すべての溶液は、同様の方法によって2次元アレイチップ513の核酸捕捉部510を通過させる。このとき、ビーズ流出防止膜518は直径0.8 μ mの多孔質材料から構成された流路であり、圧力損失が大きいため、このようなビーズ流出防止膜518を使用することで、リシスバッファが細胞捕捉部503を通過して上部流路526に向かって5分程度ゆっくりと流れ続けるようにすることは容易にできる。

[0057] リシスバッファによって、捕捉された細胞501は破碎され、核酸606（例えばmRNA）は細胞の外に出るが、細胞捕捉部503周辺での細胞溶液の流れは、細胞捕捉部503を構成する孔に吸い込まれるように流れ続けているので、核酸606（例えばmRNA）は周辺に拡散することなく細胞捕捉部503を通過して核酸捕捉部510まで到達する。このようにして、リシスバッファの導入によって、細胞の破碎と、核酸606（例えばmRNA）の核酸捕捉部510のビーズ上に固定された第1のDNAプローブ601での捕捉とが同時に実行される。その様子を図6のStep 2に示す。

[0058] ここで、細胞が捕捉された2次元アレイチップ513上における位置の情報、すなわち図5の(a)に示したような格子状に配列した細胞捕捉部503の位置座

標を遺伝子解析のデータの中に盛り込むために、核酸捕捉部510のビーズ表面上には、細胞捕捉部503ごとに異なる配列の細胞認識配列602が導入された第1のDNAプローブ601が固定されている。図6において、各ステップ図の左端の斜線は固定壁面、ここではビーズ表面を示す。この第1のDNAプローブ601は、3'末端領域に捕捉しようとする核酸に相補的な配列（例えばmRNAを捕捉する場合には、ポリT配列）を持っており、捕捉しようとする核酸の配列とハイブリダイズすることによって（例えば、mRNAの3'末端のポリA配列とハイブリダイズすることによって）核酸606（例えばmRNA）を捕捉する。また、5'末端側に増幅反応のための共通プライマー（604、Reverse）を設けてもよい。

[0059] 本実施例において、この第1のDNAプローブ601は、5'末端から約30塩基の増幅用共通プライマー（604、Reverse）、約7塩基の細胞認識配列（602）、および約18塩基のオリゴ（dT）配列+2塩基のVN配列の順に配列する。本実施例では、mRNAを解析するために捕捉用DNAプローブ601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配列の代わりに解析対象の核酸の配列と相補的な配列の一部、またはランダム配列を用いることができ、このような捕捉用プローブの配列設計は、当業者であれば慣用技術に基づいて適宜行うことができる。

[0060] 次に、図6のStep 3で示すように、第1のDNAプローブ601に捕捉された核酸（mRNA）606を鋳型として、1st strand 607を合成する。本実施例ではmRNAから1st cDNAを合成するため、1st strand合成試薬として、0.1% Tween20を含む10mM Tris Buffer (pH = 8.0) 58.5 μ L、10mM dNTP 4 μ L、5xRT Buffer (SuperScript III、Invitrogen社) 225 μ L、0.1M DTT 4 μ L、RNaseOUT (Invitrogen社) 4 μ L、およびSuperscript III(逆転写酵素、Invitrogen社)4 μ Lを混和し、細胞導入口511から前工程と同様に導入する。上記溶液を合成試薬（例えば逆転写酵素）および合成基質を含む溶液で充填されたビーズの空隙部分を満たした状態で、反応室524から上部流路526に非常にゆっくり流しながら、50°Cにゆっくり昇温して50分ほど相補鎖合成反応（1st strand合成反応）を行った。その結果、細胞ごとに複数のビーズ表面に固定された核酸（例

例えばcDNA)をライブラリとして得た。これはいわば一細胞核酸(cDNA)ライブラリアレイというべきものであり、従来多くの細胞から得られる平均化された核酸(cDNA)ライブラリとは根本的に異なるものである。

[0061] 1st strand 607を合成した後、デバイス全体を85℃にて1.5分保ち、合成試薬(例えば逆転写酵素)を失活させた。さらに、4℃に冷却後、例えばRNaseおよび0.1%Tween20を含む10mM Tris Buffer(pH = 8.0)0.2mLを上部インレット511から注入し、上部アウトレット512から吸引して、反応室524を溶液で満たした後、下部アウトレット507から排出し、反応室524中のバッファを上部アウトレット512から取り除くという工程を5回繰り返すことによって、捕捉核酸(mRNA)を分解し、核酸捕捉部中の残存物および分解物を除去・洗浄した。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回洗浄した。ここまでのプロセスで、図6のStep 4に示すような、捕捉した細胞ごとの、すべての細胞に対応する核酸ライブラリアレイ、例えばcDNAライブラリアレイが構築される。

[0062] 次に、滅菌水69 μ L、10 x Ex Taq Buffer(TaKaRa Bio社)10 μ L、2.5mM dNTP Mix 100 μ L、および各10 μ Mの増幅用共通配列(Reverse)609が付加されたEx Taq Hot start version (TaKaRa Bio社)1 μ L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511から核酸捕捉部510に導入した。チップ識別タグ610付きの第2のDNAプローブ608の個別導入方法は後述する。その後、95℃、3分間で核酸の2次構造を解いたあと、44℃2分間で1st strandを鋳型としてプライマーの遺伝子特異的配列611をアニールさせた。図6のStep 5に第2のDNAプローブ608が1st strandにハイブリダイズし、2nd strand 612を合成している様子を示す。6分間72℃に温度を上げることによって相補鎖伸長反応は完了する。

[0063] 反応室524への第2のDNAプローブ608の導入は以下のように行う。まず、細胞導入口511からミネラルオイルを導入し、上部アウトレット512から排出する。次に試薬を含む緩衝溶液を上部流路526から個別インレット527に向かって流し、反応室内の余分ミネラルオイルを個別インレット527から排出する。

このようにすることによって、2次元アレイチップ513下部の反応室524に緩衝液で満たされた領域がミネラルオイルによって分離される。このような分離が起きるのは、反応室524の内壁が親水的である一方、反応室間の領域528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。また、1st strandがビーズに強固に（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好ましい。反応室524の分離の完了後、チップ識別配列がそれぞれ異なる第2のDNAプローブを含む緩衝溶液を個別インレット527から導入し、上部流路526を通して上部アウトレット512から排出する。これによって、核酸捕捉部510近傍は、反応室524ごとに異なる第2のDNAプローブで満たされ、このプローブが1st strandにハイブリダイズする。2nd strandの合成の完了後、細胞導入口511からサンプル回収口512に向かって大量の緩衝溶液を流し、領域528にあるミネラルオイルを洗い流す。流路がつながればよいので、多少ミネラルオイルが領域528に残ってもよい。

[0064] 最後の工程は、図6のStep 6-1とStep 6-2に示すような、共通プライマーによる増幅反応である。本実施例ではPCR反応を行い、滅菌水49 μ L、10 x High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen) 10 μ L、2.5 mM dNTP mix 10 μ L、50mM MgSO₄ 4 μ L、10 μ M PCR増幅用共通プライマー(Forward)10 μ L、10 μ M PCR増幅用共通配列プライマー(Reverse)10 μ L、およびPlatinum Taq Polymerase High Fidelity (Invitrogen社) 1.5 μ Lを混和して試薬を調製後、前工程と同様に細胞導入口511から導入した。続いて、デバイス全体を30秒間94°Cに保ち、94°C 30秒間→55°C 30秒間→68°C 30秒間の3段階工程を40サイクル繰り返し、最後に68°Cで3分間保った後、4°Cに冷却して増幅工程を行った。この反応は共通反応であり、すべてのチップについて共通の条件で増幅反応を行うことで、チップ間での増幅効率の均一化を図ることができる。溶液中に蓄積された増幅産物溶液を回収し、この溶液中に含まれるフリーの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、例えばPCR Purification Kit(QIAGEN社)を用いて精製する。

[0065] 得られた増幅産物615は配列解析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。上述の工程において遺伝子間または分子間で増幅バイアスが生じたとしても、シーケンシングデータ取得後に、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できる。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、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。これによって、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。

[0066] なお、本発明者らは、単一細胞についての遺伝子解析と、その細胞を含む細胞集団についての網羅的遺伝子解析とを同時に実現可能とする細胞解析方法について既に国際特許出願（2014年9月9日出願のPCT/JP2014/073753）を行っている。その出願の明細書、請求の範囲および図面に記載された内容は、そのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

[0067] （実施例1-3）重力以外の斥力の印加方法（表面処理）

2次元アレイチップはPDMS樹脂を用いて作製することができる。核酸捕捉部を構成するビーズを注入する前に、PDMS樹脂製の2次元アレイチップ（基板）の表面をコーティングすることによって、細胞に2次元アレイチップ表面近傍で2次元アレイチップ（基板）から引き離す方向に斥力が働き、チップ表面への細胞の吸着を抑制することができる。本実施例では、MPC（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）ポリマ（日油製Lipidure(登録商標)-CM5206）をコーティングし、細胞の吸着率を1/10以下に低下させることができた。コーティング方法としては0.5w%エタノール溶液を調製し、PDMS樹脂膜に1チップ辺り2 μ Lを滴下して、チップを溶液で覆い5分放置し、チップを回収した。デバイスの構造は図5と同じであり、細胞はほとんど吸着せずすべてのチップにおいて95%以上の細胞が回収された。コーティング剤としてMPCポリマ以外にもPEG（ポリエチレングリコール）をベースとしたもの（JSRライフサイエンス社製Blockmaster）などがあり、いずれのコーティング剤を用いて

もよい。

[0068] (実施例1-4) 重力以外の斥力の印加方法 (誘電泳動による構成)

図7に、誘電泳動を用いて細胞に斥力を印加して、細胞の2次元アレイチップへの吸着を低減する構成を示した。図5に示した基本構成との相違は、上下に誘電泳動のための電極を配置したこと、核酸捕捉部のビーズを、磁性ビーズではなく金属性の金微粒子としたこと、さらに高周波電源を配置したことである。

[0069] 細胞の吸着を抑制するための電極構成は以下の通りである。上部電極729は上部流路726中に配置され、白金製の平板基板である。2次元アレイチップの直上に配置されて2次元アレイチップとほぼ同じサイズの1.1ミリ角の四角い電極がチップの数だけ直列に接続されている。また、電極の厚さは0.1mmとした。本実施例での使用方法では印加電圧が低いため、腐食の可能性が低く、材質は白金以外の金属でもよい。また、下部電極730は直径0.1mmのワイヤを格子状に配置して、超音波溶着によって電極構造を成型した。さらに、図7(a)に示すようにワイヤが細胞捕捉部の間に位置するように配置した。また、核酸捕捉部731は直径400nmの金微粒子をパックして、その表面にチオール基を用いてDNAプローブを固定した。この核酸捕捉部を金微粒子 (金コロイド) にしたことによって、誘電結合によって、細胞捕捉部に向かって吸引力が働く。なお、高周波電源732から両電極に印加される交流電圧は数kHzで10Vppの正弦波であり、誘電引力から誘電斥力に反転する周波数よりも低い周波数を印加した。当然のことながら、周波数を数MHzよりも高くして (細胞のサイズや誘電率によってこの周波数は異なる) 誘電力を斥力にして、吸引力と拮抗させて用いてもよい。

[0070] (実施例2)

図8は、本発明の別の態様に係るデバイスの構成の概要を示す図であり、(a)は上面図、(b)は8A-8A'断面における断面図で細胞溶液吸引時の構成を示している。また、図8の(c)は、増幅反応時の3次元多孔質体と2次元アレイチップが分離されたときの断面図を示している。本実施例のデバイスで

は、実施例1のように重力と吸引力を反対方向に設置せず（反対方向に設置してもよい）、3次元多孔質体を用いることによって吸引力を増し、重力による沈降の影響を最小に抑制する構成である。このとき課題となる溶液保持部819に配置した3次元多孔質体内部への増幅産物の吸着を抑制するために3次元多孔質体と2次元アレイチップを分離する手段を設けたデバイス構成と動作方法について実施例1との相違点を中心に説明する。

[0071] 図8（b）は細胞捕捉の際のデバイスの断面図である。2次元アレイチップ813は弾力性のあるPDMS樹脂で作製されており、核酸捕捉部810を形成するビーズの流出を防止するためのビーズ流出防止膜818として孔径 $0.8\mu\text{m}$ の樹脂製ポラス膜（Isopore膜、ミリポア社製）を用いた。

[0072] デバイス800は複数の反応室824を備えており、その反応室824のそれぞれには、複数の細胞捕捉部803と、その個々の細胞捕捉部803に対応する核酸捕捉部810を備えた2次元アレイチップ813が配置されている。細胞溶液は、細胞導入口811からサンプル回収口812に向かって共通流路825の中を流すことにより2次元アレイチップ813上に供給し、チップ上を細胞溶液で満たす。個別インレット827は、チップごとに個別に試薬を導入する場合、具体的には、例えばチップを識別するためのタグ配列を有するプライマーを含む試薬を導入する際などに用いる。

[0073] 核酸捕捉部810の下部流路837には、3次元多孔質体である多孔質シラス焼結体（シラス多孔質ガラス：SPG膜、SPGテクノ社製）を配置し、溶液保持部819とした。この3次元多孔質体を用いることによって、高速に吸引でき、重力による沈降の影響を排除することができる。下部流路837は、下部アウトレット838および空気を取り入れる吸気ポート835と連通するようにし、吸気ポート835近傍には、圧力調整フィルタ836（本実施例では水と空気の粘度の差を考慮して、孔径 $0.1\mu\text{m}$ の樹脂製ポラス膜（Isopore膜、ミリポア社製）を用いた）およびエアバルブ834を設けた。細胞捕捉部803に細胞を捕捉させる際には、2次元アレイチップ813上を細胞溶液で満たした後、エアバルブ834を開いた状態で下部アウトレット838に接続したシリンジポンプにより負圧を印加する

。もちろん、シリンジポンプに代えて、ダイヤフラムポンプなど他のポンプを用いることもできる。

[0074] 下部アウトレット838に負圧を印加することによって2次元アレイチップはたわみ、ビーズ流出防止膜818と3次元多孔質体(819)が密着する。これによって、3次元多孔質体のキャピラリ効果を活用して高速に細胞溶液を吸引することができる。

[0075] 以下キャピラリ効果を活用した高速吸引の方法について記す。図8に示したデバイスにおいて、図中に示した位置A(2次元アレイチップ813の上部)、位置B(溶液保持部819と圧力調整フィルタ836の間の下部流路837)、位置C(2次元アレイチップ813と溶液保持部819の間)、および位置D(溶液保持部819よりも下部アウトレット838に近い下部流路837)における圧力関係は、 $A > B > C > D$ の大小関係となるように設定すると、核酸捕捉部810が溶液で満たされ、さらに溶液保持部819に溶液が接するようになり、溶液保持部819を構成する3次元多孔質体における毛細管現象が生じて大きな吸引力が発生する。この毛細管現象による吸引力は、例えば3次元多孔質体のポアサイズが $10\mu\text{m}$ であった場合、本実施例の構成では、細胞捕捉部803(直径 $5\mu\text{m}$ の円形と仮定)に約 100kPa の吸引力を生じさせると計算することができる。これによって、重力による沈降にほとんど影響されることなく細胞を吸引することができる。

[0076] 吸気ポート835から取り入れられた空気は、位置B、位置Cおよび位置Dの間の圧力差によって溶液保持部819を通過し、それにより溶液保持部819が吸収した水溶液は位置Dに向かって排出される。この排出によって溶液保持部819の毛細管現象による吸引力は回復するため、下部アウトレット838からの吸引が続く限り、溶液保持部819の吸引力は持続する。一方、下部アウトレット838からの吸引が止まれば、溶液保持部819を構成する3次元多孔質体の孔内壁は速やかに水溶液で覆われ、吸引力は失われる。

[0077] 次に、3次元多孔質体と2次元アレイチップの分離方法について記載する。実施例1と同様に増幅反応(PCR反応)用の試薬で反応室824を満たした後、下部アウトレット838に負圧を印加することで増幅試薬(PCR試薬)を核酸捕捉

部に導入する。この後、シリンジ833を押し込み、“ため”823にたまったミネラルオイルを10秒程度でゆっくりビーズ流出防止膜818と3次元多孔質体の間に注入する。このとき3次元多孔質体は高度に親水性のために多孔質内には非極性溶媒であるミネラルオイルは大きく浸潤しない。このようにして、図8(c)に示すように、3次元多孔質体に残留した増幅試薬（PCR試薬）溶液と2次元アレイチップ中の核酸捕捉部にある増幅試薬（PCR試薬）を隔離することができる。ミネラルオイルの代わりに空気を用いた場合には、空気は3次元多孔質体の中に入っていく、増幅試薬（PCR試薬）溶液を2次元アレイチップ中と隔離できることは同様である。

[0078] （実施例2-2）3次元多孔質体の移動機構による分離

実施例2-1では分離のために非極性溶媒またはオイルを注入したが、本実施例では、3次元多孔質体と2次元アレイチップを適切なタイミングで両者の間隔を離して、溶液を分離することも可能である。具体的には、3次元多孔質体の直下に移動のための機構を挿入すればよい。本実施例では空気圧を用いた例を示すが、サーボ機構などの移動機構を用いてもよい。

[0079] 図9に、空気圧で2次元アレイチップと3次元多孔質体を分離する構成を示す。939はポリエチレン樹脂製のエアバックである。大きさは2次元アレイチップと同様に1×1mm程度で、シリンジ940等のポンプを用いて、エアバックの中に空気を注入することによって、エアバックの厚さが0.1mm～0.3mm程度まで変化するように設計されている。シリンジ940を押して空気を注入したときには2次元アレイチップと3次元多孔質体は密着し、キャピラリ効果による溶液の吸引が可能となる。シリンジ940を引くことでエアバック939の内圧が低下し、厚さが薄くなることを利用して、2次元アレイチップから3次元多孔質体を分離する。

[0080] 増幅試薬（PCR試薬）導入時までは、エアバックの内圧を高めておき、増幅反応（例えばPCRサイクル）の開始後にエアバックの内圧を低下させることによって、増幅産物の3次元多孔質体内壁への吸着を防止することが可能となる。

[0081] また、可動部を伴った分離を行わず、3次元多孔質体への増幅産物への吸着を防止することも可能である。ビーズ流出防止膜918として、 $0.8\mu\text{m}$ ポアのISOPOREの代わりにポアサイズ5nm程度の限外ろ過膜を用いることも可能である。この場合、2次元アレイチップと3次元多孔質体は全工程で密着したままであるが、増幅反応時には負圧の印加をオフとするため、増幅産物が限外ろ過膜を通過する速度を大幅に低下させることができる。これによって3次元多孔質体への増幅産物の吸着を防止することも可能である。

[0082] (実施例3)

本実施例は、実施例1のデバイス構成と捕捉した細胞観察のための蛍光顕微鏡を組み合わせた装置構成について説明する。

[0083] 図10に構成図を示す。デバイス1001の構成は実施例1の構成基本としている。ただし、高速吸引のための3次元多孔質体319, 819, 919も含む構成としている。すなわち、重力方向217は細胞吸引方向216と反対方向に設定している。図中の2次元アレイチップ513は細胞溶液吸引時の状態を示し、3次元多孔質体319, 819, 919に密着している。501は捕捉された細胞である。

[0084] また、負圧印加のためにダイヤフラムポンプ1002を用いている。細胞溶液用チューブ1003中のバッファ中に懸濁された細胞はシリンジ1004による吸引によって細胞導入口511を通過して反応室に導入される。過剰な細胞溶液や試薬はサンプル排出口512および三方活栓1005を介して廃液用チューブ1006に排出される。細胞溶液が反応室に導入された状態でダイヤフラムポンプ1002を作動させて、細胞を捕捉する。このときの様子を蛍光顕微鏡で観察するために、対物レンズ1007および細胞を染色した蛍光体に適した励起波長を持つレーザー光源1008、励起光と細胞からの蛍光を分離するダイクロイックミラー1009および撮像カメラであるCCDカメラ1010を図10のように配置する。1011はフォーカス調整と撮像領域を変更のためのXYZステージである。蛍光顕微鏡によって細胞を観察する場合には細胞を蛍光染色する必要がある。ここでは細胞膜を染色する染色方法を採用した。蛍光イメージの取得はデバイス1001上の顕微鏡観察窓1012を介して行うために、窓を含めデバイスの材質はアクリル

(PMMA)を用いた。当然ながら、他の透明な樹脂材料（ポリカーボネート、シクロオレフィン等）を用いることも可能である。

[0085] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

符号の説明

[0086] 101、201、301…細胞
102…多孔質膜
103、203、303…細胞捕捉部
104、204、304…上部領域
105…下部領域
106…インレット
107、207、307…上部アウトレット
108…下部アウトレット
109…細胞
210、310…核酸捕捉部
211、311…細胞導入口
212、312…サンプル回収口
213、313…2次元アレイチップ
214、314…吸引前細胞溶液保持のための下部領域
215、315…上部領域
216…細胞吸引（力）方向
217…重力方向
318…ビーズ流出防止膜（親水性多孔質膜）
319…溶液保持部（3次元多孔質体）
320…圧力調整部材
321…吸気ポート
322…空気の流れ
323…ため

333…シリンジ
500、700、800、900…デバイス
501、701、801、901…細胞
503、703、803、903…細胞捕捉部
507、707…下部アウトレット
510、810、910…核酸捕捉部
511、711、811、911…細胞導入口（上部インレット）
512、712、812、912…サンプル回収口（上部アウトレット）
513、713、813、913…2次元アレイチップ
518、718、818…ビーズ流出防止膜
524、724、824、924…反応室
525、725、825、925…共通流路
526、726、826、926…上部流路
527、727、827、927…個別インレット
528、728、828、928…反応室間の領域
601…第1のDNAプローブ
602…細胞認識配列
604…共通プライマー
606…核酸（mRNA）
607…1st strand
608…第2のDNAプローブ
609…増幅用共通配列(Reverse)
610…チップ識別タグ
611…遺伝子特異的配列
612…2nd strand
613…共通プライマー
614…増幅用共通配列(Forward)
615…増幅産物

729…上部電極
730…下部電極
731…金微粒子核酸捕捉部
732…高周波電源
819、919…溶液保持部（3次元多孔質体）
823…ため
833…シリンジ
834、934…エアバルブ
835、935…吸気ポート
836、936…圧力調整フィルタ
837、937…下部流路
838、938…下部アウトレット
939…エアバック
940…シリンジ
1001…デバイス（筐体）
1002…ダイヤフラムポンプ
1003…細胞溶液用チューブ
1004…シリンジ
1005…三方活栓
1006…廃液用チューブ
1007…対物レンズ
1008…レーザ光源
1009…ダイクロイックミラー
1010…CCDカメラ
1011…XYZステージ
1012…顕微鏡観察窓

請求の範囲

- [請求項1] 細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、
前記溶液導入流路に接し、細胞を1個捕捉可能な凹部を有する細胞捕捉部と、前記細胞捕捉部のそれぞれの凹部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部との組を複数備えた基板と、
前記基板の前記核酸捕捉部に隣接して設けられ、前記核酸捕捉部の溶液を排出する排出流路と、
前記排出流路に設けられた圧力制御手段と
を備え、
前記基板は、細胞を前記基板から引き離す方向の斥力を備え、
前記圧力制御手段は、前記細胞捕捉部に細胞を捕捉する際は、前記細胞捕捉部から前記核酸捕捉部への方向の力が、前記斥力よりも大きな第1の圧力となるように制御することを特徴とする細胞解析デバイス。
- [請求項2] 前記圧力制御手段は、前記核酸捕捉部での核酸反応の際は、前記細胞捕捉部から前記核酸捕捉部への方向の力が、重力よりも大きく前記第1の圧力よりも小さくなるように制御することを特徴とする請求項1に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項3] 前記基板上の、前記細胞を含む溶液と接する前記凹部以外の領域は、細胞に対して斥力を働かせる領域であることを特徴とする請求項1に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項4] 前記斥力は、前記細胞捕捉部が細胞を重力に逆らう方向に捕捉するように前記基板が設置されることによる斥力であることを特徴とする請求項1に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項5] 前記斥力は、前記基板の表面が細胞の吸着を抑制する処理をされることによる斥力であることを特徴とする請求項1に記載の細胞解析デバイス。

- [請求項6] 前記基板を挟むように設けられた電極対をさらに備え、前記核酸捕捉部は金属微粒子を備え、前記斥力は前記電極対に印加される電圧と前記金属微粒子による誘電結合による斥力であることを特徴とする請求項1に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項7] 細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、
前記溶液導入流路に隣接して設けられ、細胞を1個ずつ捕捉可能な複数の細胞捕捉部と、前記複数の細胞捕捉部の各細胞捕捉部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部とを備えた2次元アレイチップと、
前記核酸捕捉部に滞留した溶液を吸収する3次元多孔質体を備え、前記溶液を排出する排出流路と、
前記核酸捕捉部と前記排出流路との間を分離制御する分離制御部とを備え、
前記分離制御部は、前記核酸捕捉部に前記核酸が捕捉された後、捕捉された核酸から増幅された産物が前記排出流路に導入されないように分離制御を行う
ことを特徴とする細胞解析デバイス。
- [請求項8] 前記分離制御部は、前記排出流路に設けられた吸引圧力印加手段であることを特徴とする請求項7に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項9] 前記2次元アレイチップと前記3次元多孔質体の間に、前記増幅産物の分子サイズの分子の通過を防止する限外ろ過膜またはゲル膜を配置することを特徴とする請求項7に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項10] 前記分離制御部は、前記核酸捕捉部と前記排出流路との間に分離溶媒または空気を導入する手段であることを特徴とする請求項7に記載の細胞解析デバイス。
- [請求項11] 前記核酸捕捉部が核酸を捕捉するための核酸プローブを有し、前記核酸プローブは細胞から抽出された核酸とハイブリダイズする核酸捕捉配列と、各細胞捕捉部に対応して異なる細胞認識配列とを有するこ

とを特徴とする請求項 1 または 7 に記載の細胞解析デバイス。

[請求項12] 請求項 1 に記載の細胞解析デバイスを用いた細胞解析方法であって

、

前記基板の上を細胞を含む溶液で満たす工程、および

前記細胞捕捉部に負圧を印加し、前記細胞を含む溶液を前記基板に向かって吸引し、前記細胞捕捉部に単一の細胞を捕捉する工程を含む、前記方法。

[請求項13] 前記細胞捕捉部に捕捉した単一の細胞を、前記細胞捕捉部に負圧を印加した状態で破碎し、前記細胞から抽出された核酸を前記核酸捕捉部に捕捉させる工程をさらに含む、請求項 1 2 に記載の細胞解析方法。

。

[請求項14] 前記核酸捕捉部に捕捉された核酸とハイブリダイズする配列を有する第2の核酸プローブ、ならびに捕捉された核酸を鋳型とする相補鎖合成のための酵素および基質を前記核酸捕捉部に供給して相補鎖合成を行う工程をさらに含む、請求項 1 3 に記載の解析方法。

[請求項15] 請求項 7 に記載の細胞解析デバイスを用いた細胞解析方法であって

、

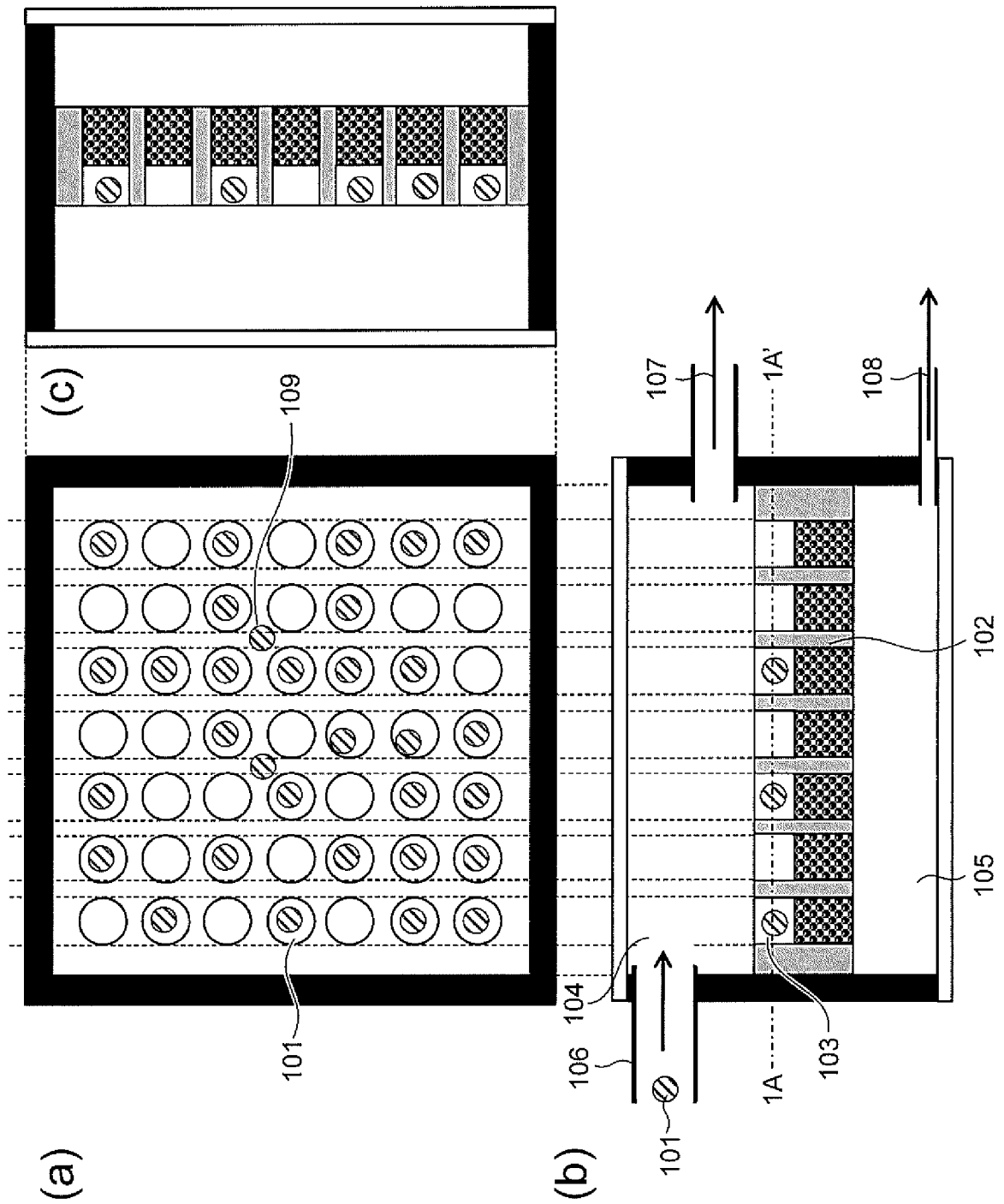
前記2次元アレイチップの上を細胞を含む溶液で満たす工程、および

前記細胞捕捉部に負圧を印加し、前記細胞を含む溶液を前記3次元多孔質体を備えた前記排出流路から吸引するとともに、核酸増幅のための試薬を前記核酸捕捉部に前記細胞を含む溶液と同様に吸引によって導入後、増幅反応の開始前または増幅反応の開始後終了前まで前記核酸捕捉部または前記2次元アレイチップと前記3次元多孔質体を分離する工程

を含む、前記方法。

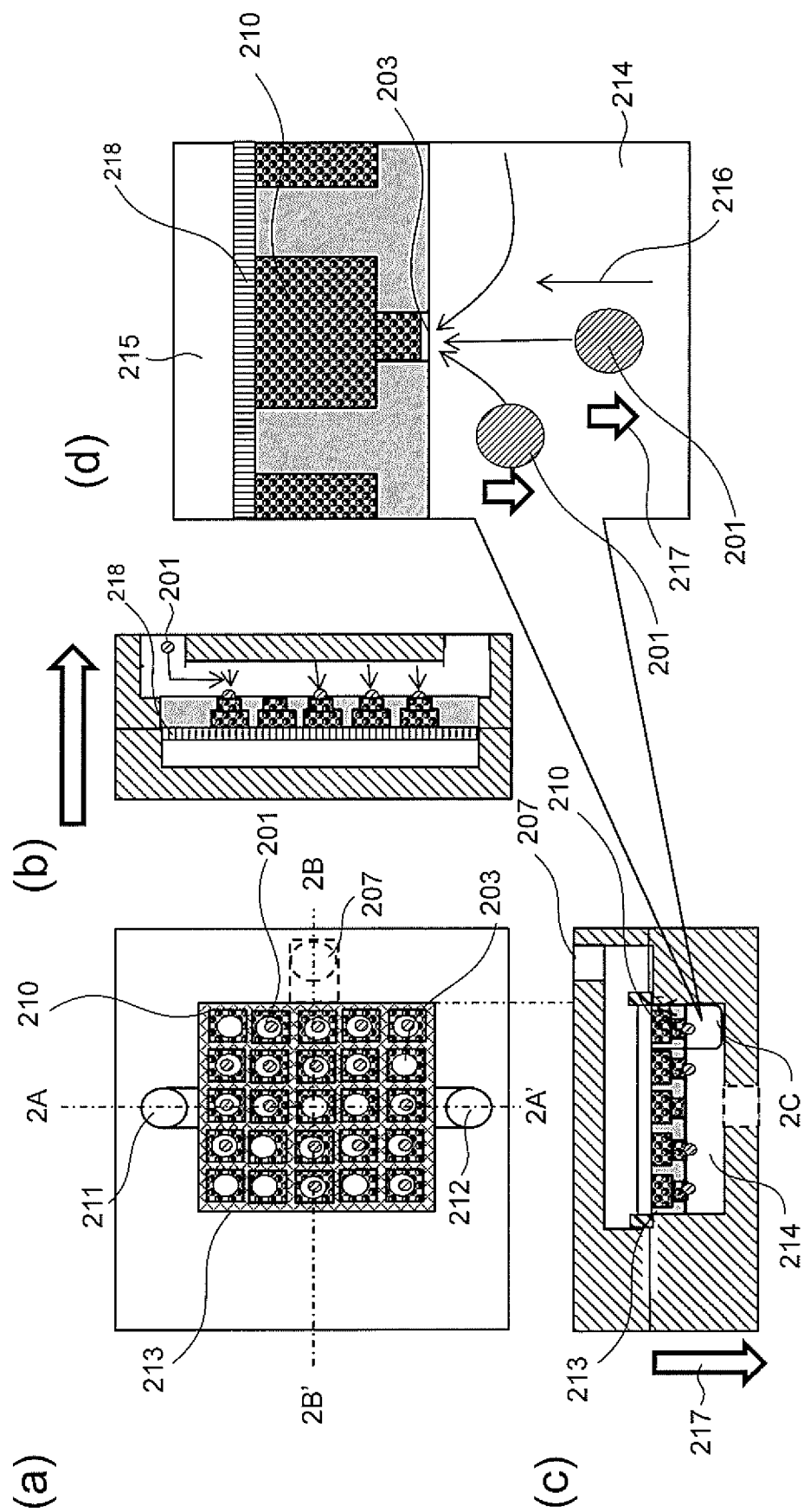
[図1]

図 1

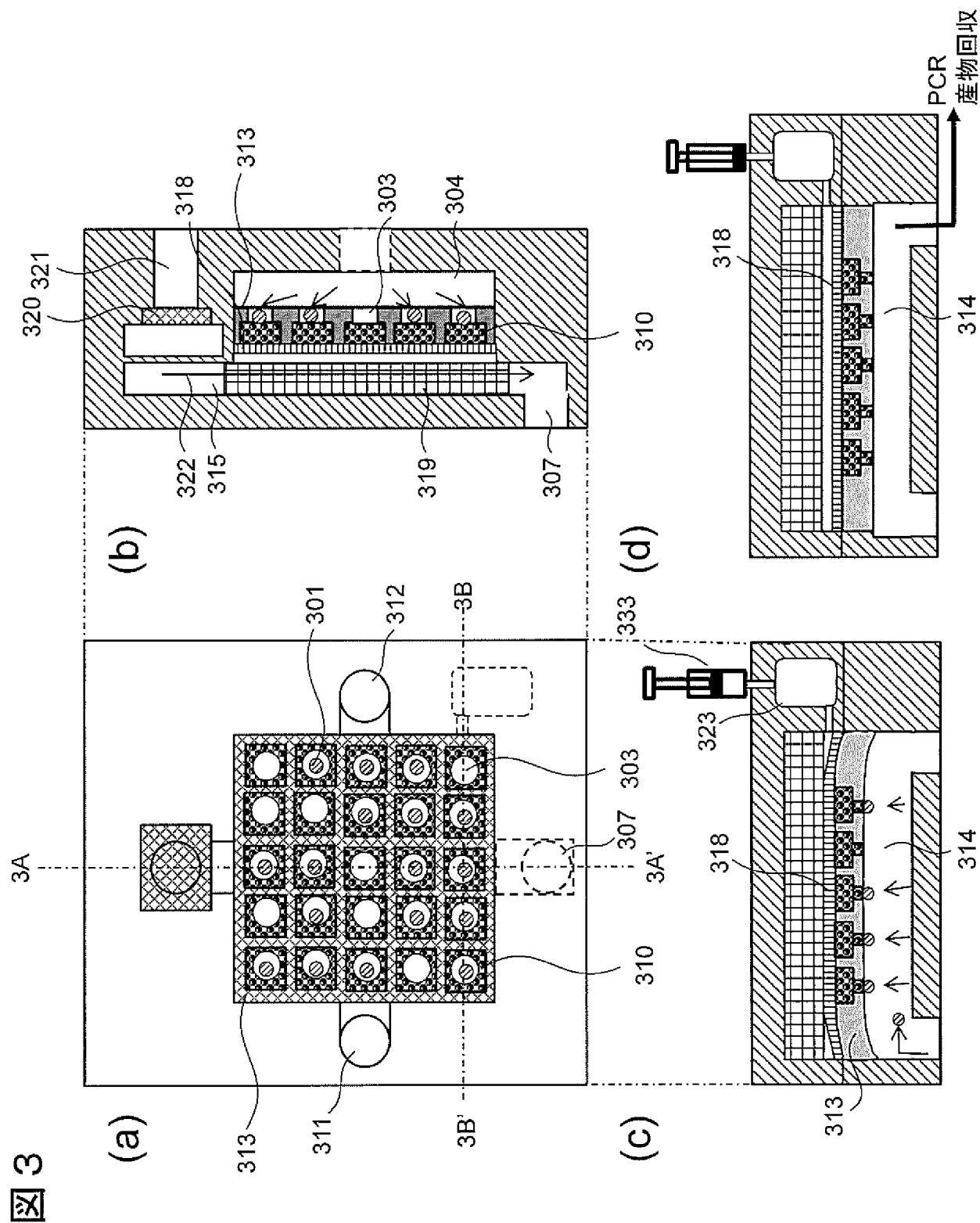


[図2]

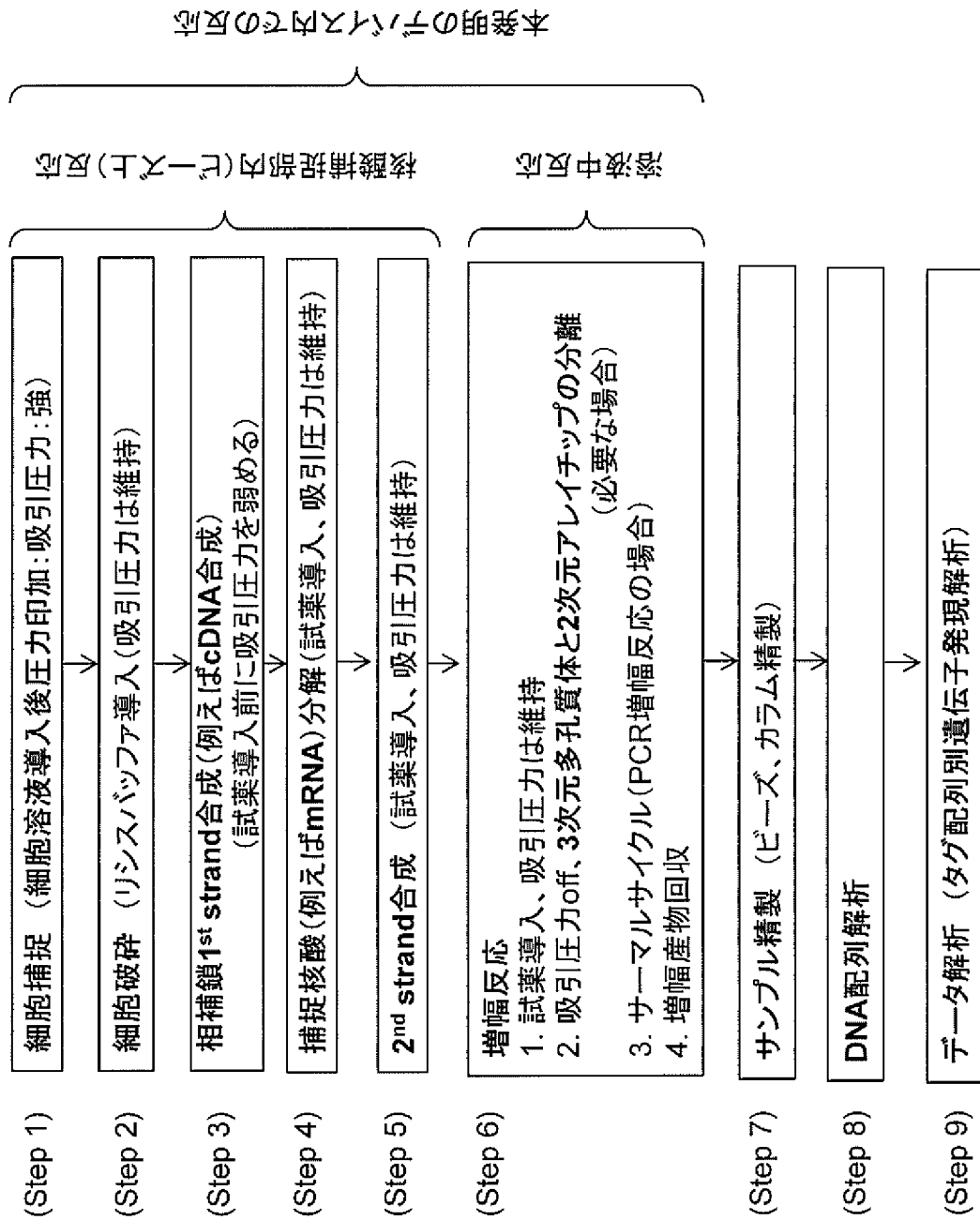
図2



[図3]

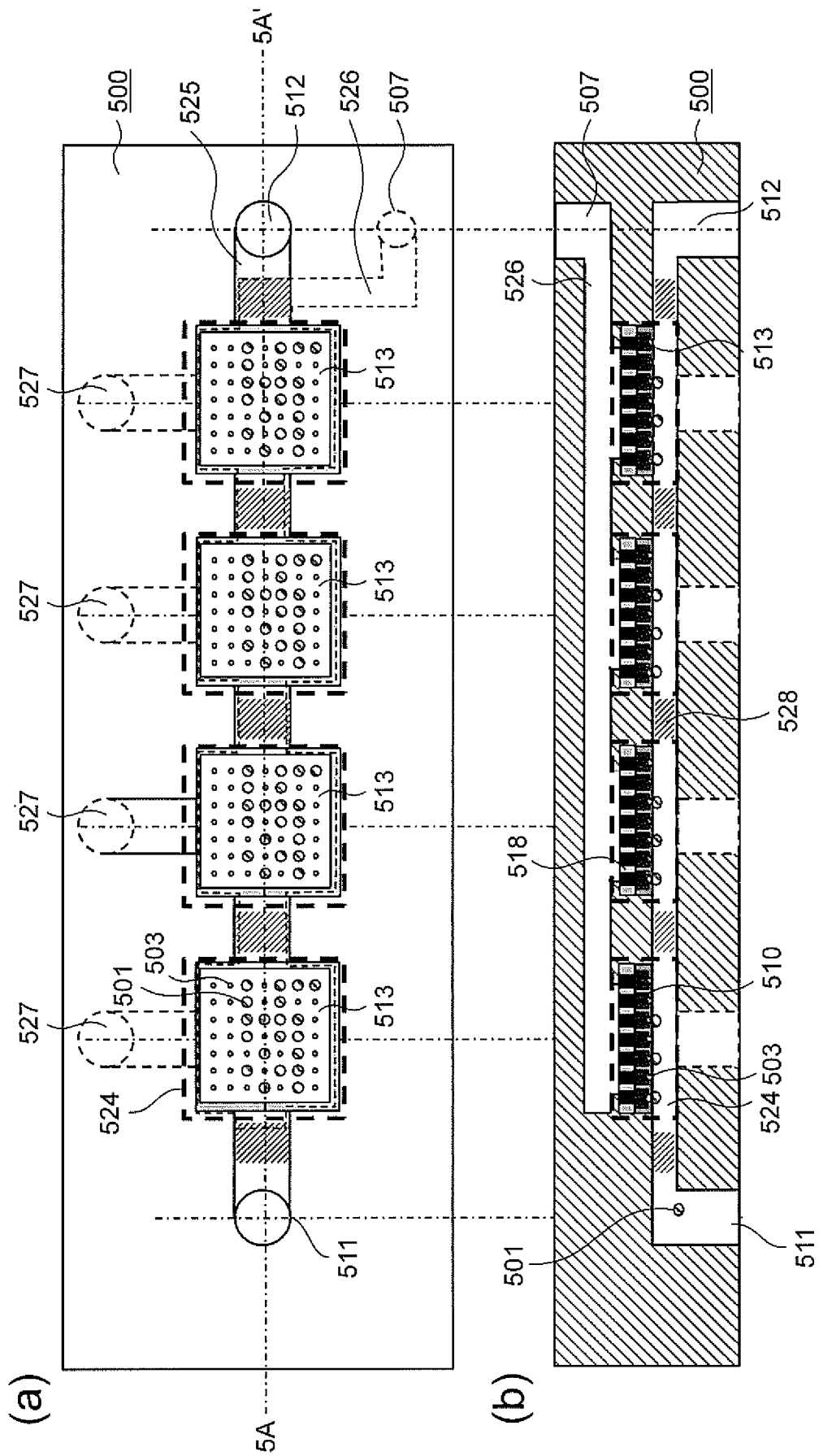


[図4]



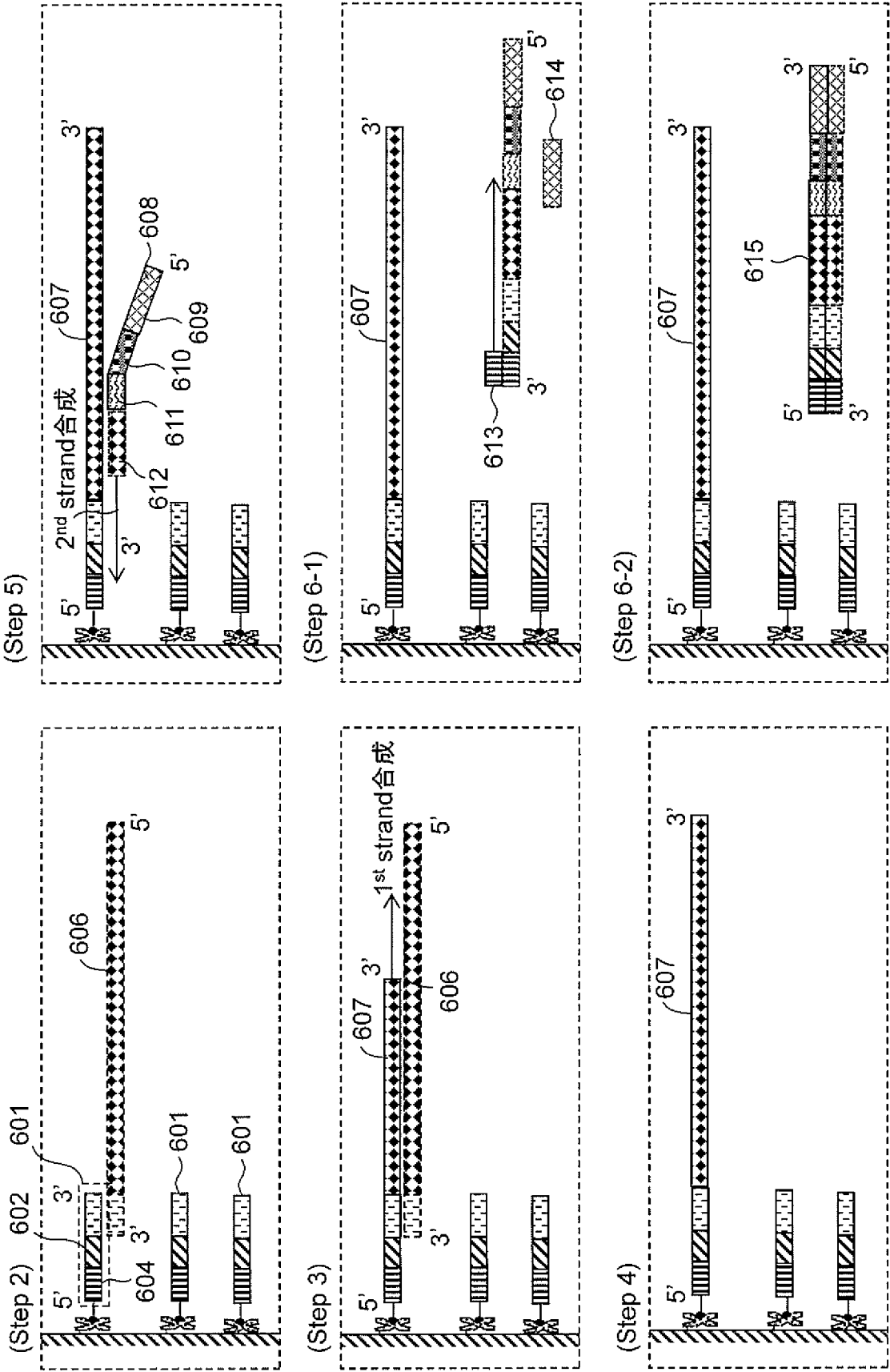
[図5]

図5



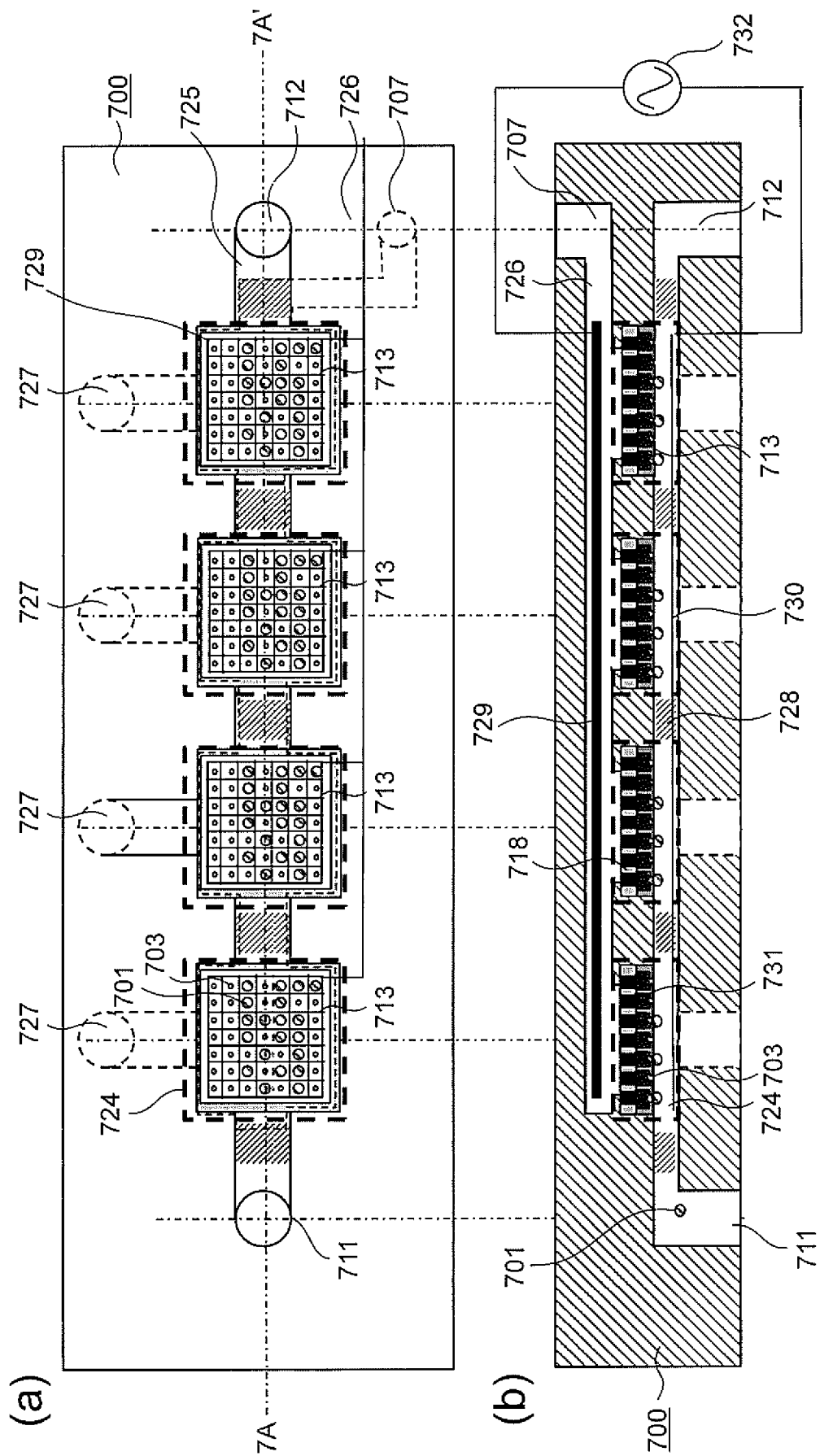
[図6]

図 6



[図7]

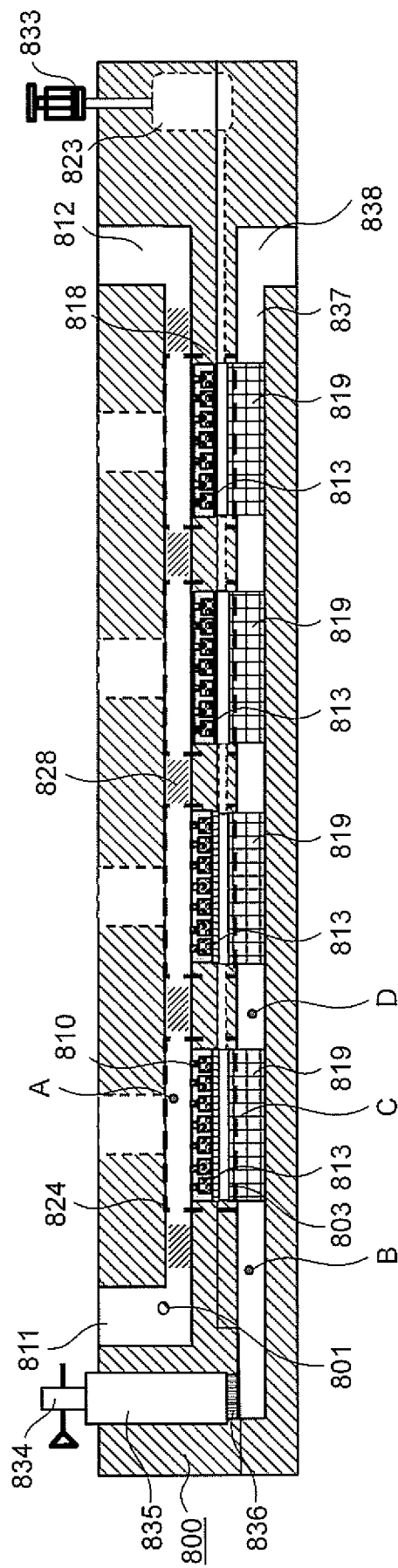
図 7



[図8-2]

図8-2

(c)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(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)

C12M, C12Q, G01N

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/020657 A1 (Hitachi, Ltd.), 06 February 2014 (06.02.2014), examples 1, 3 to 6; drawings & US 2015/0167063 A1 examples 1, 3 to 6; figures & EP 2881465 A1 & CN 104508128 A	1-15
A	WO 2011/068088 A1 (Hitachi, Ltd.), 09 June 2011 (09.06.2011), examples 1 to 7; drawings & US 2012/0245053 A1 examples 1 to 7; figures & CN 102639716 A & JP 2014-27955 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

"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
09 February 2016 (09.02.16)

Date of mailing of the international search report
16 February 2016 (16.02.16)

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/JP2015/083719

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 2015-97499 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 28 May 2015 (28.05.2015), paragraphs [0020] to [0066]; drawings (Family: none)	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083719

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083719

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Document 1: WO 2014/020657 A1 (Hitachi, Ltd.), 06 February 2014 (06.02.2014), examples 1, 3 to 6; drawings & US 2015/0167063 A1 examples 1, 3 to 6; figures & EP 2881465 A1 & CN 104508128 A

Claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) claims 1-6 and claims 11, 12-14 referring to claim 1

Claims 1-6 and claims 11 and 12 to 14 that depend on claim 1, which have a special technical feature "comprising a solution introduction channel for introducing a solution containing cells, a substrate that is in contact with the solution introduction channel and provided with multiple pairs of cell capturing parts, each cell capturing part comprising a concavity capable of capturing a single cell, and nucleic acid capturing parts, each nucleic acid capturing part being formed corresponding to the concavity of a cell capturing part and capturing a nucleic acid extracted from the cell having been captured by the cell capturing part, a discharge channel that is formed adjacent to the nucleic acid capturing parts of the substrate and discharges the solution from the nucleic acid capturing parts, and a pressure control means formed in the discharge channel, wherein the substrate has a repulsive force in such a direction as to separate the cells from the substrate, and the pressure control means controls so that, when cells are captured by the cell capturing parts, the force in the direction from the cell capturing parts toward the nucleic acid capturing parts serves as a first pressure that is larger than the repulsive force", are referred to as "Invention 1".

(Invention 2) claims 7-10 and claims 11, 15 referring to claim 7

Claims 7-10 and claims 11 and 15 that depend on claim 7 have a technical feature "a cell analysis device characterized by comprising a solution introduction channel for introducing a solution containing cells, a substrate (a two-dimensional array chip) that is in contact with the solution introduction channel and provided with multiple pairs of cell capturing parts, each cell capturing part being capable of capturing a single cell, and nucleic acid capturing parts, each nucleic acid capturing part being formed corresponding to a cell capturing part and capturing a nucleic acid extracted from the cell having been captured by the cell capturing part, and a discharge channel for discharging the solution from the nucleic acid capturing parts", said technical feature being common to claim 1 that is referred to as "Invention 1".

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

In addition, claims 7-10 and claims 11, 15 referring to claim 7 are not dependent on claim 1.

Further, claims 7-10 and claims 11, 15 referring to claim 7 have no relationships such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claims 7-10 and claims 11, 15 referring to claim 7 cannot be classified into Invention 1.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/083719

Claims 7-10 and claims 11 and 15 that depend on claim 7, which have a special technical feature "comprising a separation control part for controlling separation between the nucleic acid capturing parts and the discharge channel, said separation control part performing separation control so that, after the nucleic acid is captured by the nucleic acid capturing parts, the amplification product is not introduced from the captured nucleic acid to the discharge channel", are referred to as "Invention 2".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M, C12Q, G01N

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

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 2014/020657 A1 (株式会社日立製作所) 2014.02.06, 実施例1, 3-6、図面 & US 2015/0167063 A1, Examples 1, 3-6, FIGS. & EP 2881465 A1 & CN 104508128 A	1 - 15
A	WO 2011/068088 A1 (株式会社日立製作所) 2011.06.09, 実施例1-7、図面 & US 2012/0245053 A1, Examples 1-7, FIGS. & CN 102639716 A & JP 2014-27955 A	1 - 15

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

09.02.2016

国際調査報告の発送日

16.02.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山本 晋也

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3341

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 2015-97499 A (日立化成株式会社) 2015.05.28, 【0020】－ 【0066】、図面 (ファミリーなし)	1 - 15

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

<第 I I I 欄の続き>

文献 1 : WO 2014/020657 A1 (株式会社日立製作所) 2014.02.06, 実施例 1, 3 - 6、図面 & US 2015/0167063 A1, Examples 1, 3 - 6, FIGS. & EP 2881465 A1 & CN 104508128 A

請求の範囲は、以下の 2 つの発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1 - 6, 1 を引用する 1 1, 1 2 - 1 4

請求項 1 - 6, 1 を引用する 1 1, 1 2 - 1 4 は、「細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、前記溶液導入流路に接し、細胞を 1 個捕捉可能な凹部を有する細胞捕捉部と、前記細胞捕捉部のそれぞれの凹部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部との組を複数備えた基板と、前記基板の前記核酸捕捉部に隣接して設けられ、前記核酸捕捉部の溶液を排出する排出流路と、前記排出流路に設けられた圧力制御手段とを備え、

前記基板は、細胞を前記基板から引き離す方向の斥力を備え、

前記圧力制御手段は、前記細胞捕捉部に細胞を捕捉する際は、前記細胞捕捉部から前記核酸捕捉部への方向の力が、前記斥力よりも大きな第 1 の圧力となるように制御する」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 7 - 1 0, 7 を引用する 1 1, 1 5

請求項 7 - 1 0, 7 を引用する 1 1, 1 5 は、発明 1 に区分された請求項 1 と、「細胞を含む溶液を導入する溶液導入流路と、前記溶液導入流路に接し、細胞を 1 個捕捉可能な細胞捕捉部と、前記細胞捕捉部に対応して設けられ、前記細胞捕捉部に捕捉された細胞から抽出された核酸を捕捉する核酸捕捉部との組を複数備えた基板(2次元アレイチップ)と、前記核酸捕捉部の溶液を排出する排出流路とを備えたことを特徴とする細胞解析デバイス。」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 7 - 1 0, 7 を引用する 1 1, 1 5 は、請求項 1 の従属請求項ではない。また、請求項 7 - 1 0, 7 を引用する 1 1, 1 5 は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 7 - 1 0, 7 を引用する 1 1, 1 5 は発明 1 に区分できない。

そして、請求項 7 - 1 0, 7 を引用する 1 1, 1 5 は、「前記核酸捕捉部と前記排出流路との間を分離制御する分離制御部とを備え、前記分離制御部は、前記核酸捕捉部に前記核酸が捕捉された後、捕捉された核酸から増幅された産物が前記排出流路に導入されないように分離制御を行う」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。