

(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
2021年8月19日(19.08.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/161893 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/6874 (2018.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/004130

(22) 国際出願日: 2021年2月4日(04.02.2021)

(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 2020-023365 2020年2月14日(14.02.2020) JP

(71) 出願人: ソニーグループ株式会社(SONY GROUP CORPORATION) [JP/JP]; 〒1080075 東京都港区港南1丁目7番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松本 真寛 (MATSUMOTO Masahiro); 〒1080075 東京都港区港南1丁目7番

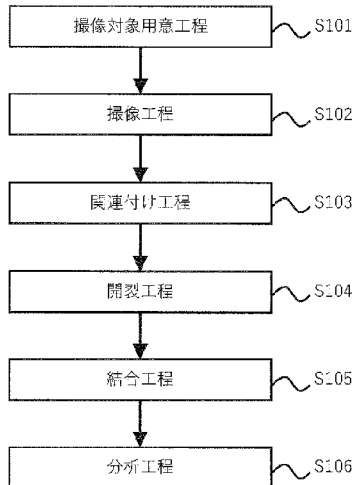
1号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP). 中川 和博 (NAKAGAWA Kazuhiro); 〒1080075 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 渡 邊 薫 (WATANABE Kaoru); 〒1080014 東京都港区芝四丁目10番5号 ヒューリック田町ビル6階 薫風国際特許事務所 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, IT, 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,

(54) Title: ANALYSIS METHOD, ANALYSIS SYSTEM, AND SURFACE FOR ANALYSIS

(54) 発明の名称: 分析方法、分析システム、及び分析用表面



S101 To-be-imaged object preparation step
S102 Imaging step
S103 Association step
S104 Cleavage step
S105 Binding step
S106 Analysis step

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a technique that makes it possible to associate position information of a cell with a cell component by single cell dissociation. This technology provides an analysis method comprising: an imaging step of imaging a sample in a state in which the sample is overlaid on a surface to which molecules each including a linker cleavable by stimulation, a barcode sequence, and a target capturing part are immobilized via the linker; an association step of associating the position of a cell with the barcode sequence of a molecule at the position using a sample image obtained by the imaging; a cleavage step of cleaving the linker of the molecule at the position by selectively applying stimulation to the position of the cell; and a binding step of binding the molecule released from the surface by the cleavage to a constituent component of the cell via the target capturing part of the molecule.

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))

(57) 要約: シングルセル分解能で細胞の位置情報と細胞成分とを関連付けることを可能とする手法を提供することを目的とする。本技術は、刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面と重ねた状態で標本を撮像する撮像工程と、前記撮像により得られた標本画像を用いて、細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け工程と、前記細胞の位置に選択的に刺激を与えて、当該位置にある前記分子のリンカーを開裂させる開裂工程と、前記開裂によって前記表面から遊離した前記分子を、当該分子の標的捕捉部を介して前記細胞の構成成分に結合させる結合工程と、を含む分析方法を提供する。

明 細 書

発明の名称： 分析方法、分析システム、及び分析用表面

技術分野

[0001] 本技術は、分析方法、分析システム、及び分析用表面に関する。より詳細には、本技術は、細胞に含まれる成分の種類及び量を細胞の位置情報と関連付けて取得するための分析方法、分析システム、及び分析用表面に関する。

背景技術

[0002] 生体組織を分析するために、生体組織を構成する細胞に含まれる m R N A の種類及び量を測定することが行われている。生体組織の分析においては、細胞に含まれる m R N A の種類及び量に加えて、当該細胞の位置情報も重要である。そこで、生体組織に含まれる細胞の位置情報と当該細胞に含まれる m R N A の情報とを関連付けて取得するための手法がこれまでにいくつか提案されている。

[0003] 例えば、下記非特許文献 1 には、Spatial transcriptomicsと呼ばれる手法が開示されている。当該手法において用いられるプローブは、開裂部位、T 7 増幅及びシーケンシングハンドル、Spatial barcode、U M I、及び m R N A 捕捉領域を含む（同文献の図 2）。当該手法では、当該プローブが固定されたスライドガラス上に組織切片が配置され、当該組織切片中の m R N A が当該分子により捕捉され、そして、逆転写されて c D N A が合成される。合成された cDNA は、開裂部位で開裂され、チューブに回収され、シーケンスなどの分析工程に供される。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献 1 : Patrik L. Stahl et al., Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics, Science, 1 July 2016, Vol. 353, Issue 6294, pp. 78-82

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 細胞の位置情報と当該細胞に含まれる成分の情報との関連付けを、生体組織を構成する細胞毎に行うことができれば、生体組織のより詳細な分析が可能となると考えられる。そこで、本技術は、シングルセル分解能で細胞の位置情報と細胞成分とを関連付けることを可能とする手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

[0006] 本発明者らは、特定の分析方法によって上記課題を解決できることを見出した。

すなわち、本技術は、刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面と重ねた状態で標本を撮像する撮像工程と、

前記撮像により得られた標本画像を用いて、細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け工程と、

前記細胞の位置に選択的に刺激を与えて、当該位置にある前記分子のリンカーを開裂させる開裂工程と、

前記開裂によって前記表面から遊離した前記分子を、当該分子の標的捕捉部を介して前記細胞の構成成分に結合させる結合工程と、

を含む分析方法を提供する。

前記標本は組織サンプルを含みうる。

前記開裂工程において、前記細胞の位置以外の位置にある分子のリンカーが開裂しないように、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられてよい。

前記刺激は、光刺激であってよい。

前記結合工程は、電場又は磁場又は遠心力の印可によって前記分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含みうる。

前記結合工程は、自然拡散によって前記分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含みうる。

前記結合工程は、前記分子と前記細胞の構成成分とを結合させるためのイ

ンキュベート工程を含みうる。

本技術の分析方法は、前記結合工程後に、前記分子と前記細胞の構成成分との結合体に対する分析を行う分析工程をさらに含みうる。

前記分析工程において、前記結合体に対するシーケンシング処理が行われてよい。

前記分析工程は、前記分析結果と前記標本画像とを用いて、前記関連付け工程における関連付け結果に基づき2次元マッピングを行う2次元マッピング工程を含みうる。

[0007] また、本技術は、刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面を有する分析用基板と、

前記分析用基板に重ねられた標本を撮像する撮像装置と、

前記撮像により得られた標本画像中の選択された細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け部と、

前記細胞の位置に選択的に刺激を与える刺激付与装置と、

を含み、

前記刺激によって前記表面から遊離した分子と前記細胞の構成成分とが前記分子の標的捕捉部を介して結合した結合体を分析対象として用いる、

分析システムも提供する。

前記標本は組織サンプルを含みうる。

前記刺激付与装置は、前記細胞の位置以外の位置にある分子に含まれるリンカーを開裂させることなく、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられるように構成されていてよい。

前記刺激付与装置は光照射装置であってよい。

前記分析システムは、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子を前記細胞に向かって移動させるための電場又は磁場又は遠心力を印可する電場印可装置又は磁場印可装置又は遠心力印可装置を含みうる。

前記分析システムは、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子が前記細胞の構成成分と結合することを促すためのインキュベーション装置をさらに含む。

前記分析システムは、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子と前記細胞の構成成分との結合体を分析する分析装置をさらに含む。

前記分析装置はシーケンサーであってよい。

前記分析システムは、前記分析装置による分析結果と前記撮像により得られた標本画像とを用いて、前記関連付け部による関連付け結果に基づき2次元マッピングを行う2次元マッピング部をさらに含む。

[0008] また、本技術は、開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されており、且つ、

前記バーコード配列が、当該バーコード配列を含む分子が固定されている位置に関する情報を与えるために用いられる、

分析用表面も提供する。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本技術に従う分析方法のフロー図の一例である。

[図2]本技術に従う分析方法に含まれる各工程における操作を説明するための模式図である。

[図3]本技術に従う分析方法において用いられる分析用表面及び当該表面に固定される分子を示す模式図である。

[図4]本技術に従う方法に含まれる関連付け工程を説明するための模式図である。

[図5]本技術に従う分析システムの一例のブロック図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本技術を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本技術の代表的な実施形態を示したものであり、本技術の範囲がこれらの実施形態のみに限定されることはない。なお、本技術

の説明は以下の順序で行う。

1. 第1の実施形態（分析方法）

（1）第1の実施形態の説明

（2）第1の実施形態の例

（2－1）撮像対象用意工程

（2－2）撮像工程

（2－3）関連付け工程

（2－4）開裂工程

（2－5）結合工程

（2－6）分析工程

2. 第2の実施形態（分析システム）

3. 第3の実施形態（分析用表面）

[0011] 1. 第1の実施形態（分析方法）

[0012] （1）第1の実施形態の説明

[0013] 本技術の分析方法において、標本が、刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面と重ねられた状態で撮像される。そして、当該撮像により得られた標本画像を用いて、標本に含まれる細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とが関連付けられる。当該関連付けが行われた後に、分析対象とする細胞の位置に刺激が与えられて、当該位置に存在する分子のリンカーが開裂される。当該開裂により、前記表面から前記分子が遊離し、そして、当該分子が、分析対象とする細胞の構成成分と標的捕捉部を介して結合する。

[0014] このように細胞の構成成分と結合した分子は、バーコード配列を有し、且つ、当該バーコード配列は当該細胞の位置と関連付けられている。そのため、細胞の構成成分と結合した分子に対する分析（例えば細胞の構成成分の特定及びバーコード配列の特定など）を行うことによって、細胞の構成成分に関する情報を、細胞の位置情報と関連付けて取得することができる。さらに

、当該分析方法では、上記のとおり標本画像も取得される。そのため、例えば標本画像に、細胞の構成成分に関するデータをマッピングすることができる。

[0015] 本技術において、標本は、固定化された標本であってよく、例えば凍結切片又はF F P E切片であってもよい。従来技術の分析方法は、凍結切片又はF F P E切片のいずれかのみについて適用可能であるものが多いが、本技術の分析方法は、これら切片の両方に対して適用することができる。前記標本は、例えば組織サンプルであってよく、特に生体組織サンプルであってよい。

[0016] 本技術の分析方法では、細胞の位置に選択的に刺激が与えられて、その位置に存在する分子が表面から遊離し、そして、細胞の構成成分と結合する。より好ましくは、前記開裂工程において、前記細胞の位置以外の位置にある分子のリンカーが開裂しないように、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられる、これにより、シングルセル分解能での細胞構成成分（例えばm R N A又はタンパク質）の分析が可能となる。すなわち、本技術の分析方法は、標本に含まれる細胞の構成成分を、シングルセル分解能で分析する分析方法であってよい。

さらに、細胞の位置情報と関連付けられたバーコード配列によって、各細胞の構成成分の分析を、標本に含まれる種々の細胞に対して網羅的に行うことができる。例えば、従来技術による組織サンプル中のm R N Aの分析においては、組織サンプル中の細胞の形態情報や免疫染色情報に基づいて特定の領域を指定し、レーザーなどで切り出してからm R N A分析に付されうる。本技術では、組織サンプルの切り出しなどを行うことなく、組織サンプル中のm R N Aの発現情報を、当該組織サンプルに含まれる細胞毎に網羅的に行うことができる。すなわち、本技術の分析方法は、標本に含まれる複数の細胞の構成成分をシングルセル分解能で分析する分析方法であってよい。

[0017] (2) 第1の実施形態の例

[0018] 本技術の分析方法のフロー図の一例を図1に示す。図1に示されるとおり

、本技術の分析方法は、撮像対象用意工程 S 1 0 1、撮像工程 S 1 0 2、関連付け工程 S 1 0 3、開裂工程 S 1 0 4、結合工程 S 1 0 5、及び分析工程 S 1 0 6 を含みうる。以下でこれらの工程について説明する。

[0019] (2-1) 撮像対象用意工程

[0020] 撮像対象用意工程 S 1 0 1 において、後述の撮像工程 S 1 0 2 における撮像対象が用意される。撮像対象は、刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面に標本が重ねられて得られた積層物であってよい。

[0021] 撮像対象用意工程 S 1 0 1 において、例えば図 2 の (A) に示されるとおり、複数の分子 1 0 0 が固定された表面 1 0 1 を有する分析用基板（例えばスライドガラスなど） 1 0 2 が、標本 1 0 3 が乗せられた基板（例えばスライドガラスなど） 1 0 4 に重ね合わせられる。当該重ね合わせは、表面 1 0 1 と標本 1 0 3 とが向かい合うように行われてよく、例えば表面 1 0 1 と標本 1 0 3 はバッファーなどを介して接触されてよい。また、表面 1 0 1 と標本 1 0 3 とが重ねられた後に、例えば P B S などのバッファー中に、分析用基板 1 0 2 と基板 1 0 4 との積層物が浸漬されてよい。

当該重ね合わされた表面 1 0 1 及び標本 1 0 3 の位置関係が後述の工程（特に撮像工程 S 1 0 2 ～結合工程 S 1 0 5）において変更されないように、基板 1 0 2 及び 1 0 4 の位置関係が固定されうる。

[0022] 分子 1 0 0 は、刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む。

本明細書内において、分子（すなわち前記リンカーと前記バーコード配列と前記標的捕捉とを含む分子）は、標的を捕捉するために用いられる分子であり、標的捕捉用分子とも呼ばれうる。標的捕捉用分子は、本技術において用いられる分子を意味するための名称であり、本明細書内において、例えば標的を捕捉した後の前記分子を言及するために用いられ、また、後述の開裂工程において前記リンカーが開裂した後の前記分子を言及するためにも用いられうる。標的捕捉用分子は、例えば単一分子（single molecule）及び複合

分子 (complex molecule) のいずれであってもよい。単一分子は、例えば複数の機能を有する 1 種類の分子を意味してよく、例えば前記リンカーとして構成されている核酸部分、前記バーコード配列として構成されている核酸部分、及び前記標的捕捉部として構成されている核酸部分を含む 1 つの核酸 (例えば DNA 又は RNA) であってもよい。複合分子は、例えば 2 種以上の分子からなる分子集合体 (例えば 2 種以上の分子の結合物) であってもよく、例えば前記リンカーとして構成されている核酸部分及び前記バーコード配列として構成されている核酸部分を含む核酸と、前記標的捕捉部として構成されているポリペプチド (例えばタンパク質若しくはその一部、又はオリゴペプチドなど) と、の結合物であってもよい。

分子 100 の構造の例を、図 3 を参照しながら説明する。図 3 に示される分子 100 は、リンカー 1、回収用配列部 2、増幅用配列部 3、バーコード配列部 4、UMI (Unique molecular identifier) 部 5、及び標的捕捉部 6 を含む。また、分子 100 は、リンカー 1 を介して、表面 101 に固定されている。

回収用配列部 2、増幅用配列部 3、バーコード配列部 4、及び UMI 部 5 は、一続きの核酸 (特には DNA) として構成されてよい。標的捕捉部 6 が核酸である場合は、回収用配列部 2、増幅用配列部 3、バーコード配列部 4、及び UMI 部 5 に加えて、標的捕捉部 6 も、一続きの核酸 (特には DNA) として構成されてよい。これらの場合、例えば表面 101 と分子 100 との固定部分に近い端が 5' 末端であり、他方の端が 3' 末端でありうる。

分子 100 の構成要素について以下で説明する。

[0023] リンカー 1 は、刺激によって開裂可能なリンカーであってもよく、例えば光刺激又は温度刺激によって開裂可能なリンカーであり、好ましくは光刺激によって開裂可能なリンカーである。光刺激は、後述の開裂工程において特定の位置に選択的に刺激を与えるために特に適している。

[0024] リンカー 1 は、例えば光刺激によって開裂可能なリンカーとして、アリールカルボニルメチル基、ニトロアリール基、クマリン-4-イルメチル基、

アリールメチル基、金属含有基、及びその他の基うちから選ばれるいずれか一つを含みうる。これらの基として、例えばPhotoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy, Chem. Rev. 2013, 113, 119-191に記載されているものが用いられてよい。

例えば、前記アリールカルボニルメチル基は、フェナシル基、*o*-アルキルフェナシル基、又は*p*-ヒドロキシフェナシル基であってよい。前記ニトロアリール基は、例えば、*o*-ニトロベンジル基、*o*-ニトロ-2-フェネチルオキシカルボニル基、又は*o*-ニトロアニリドであってよい。前記アリールメチル基は、例えば、ヒドロキシ基を導入されたものであってよく、又は、導入されていないものであってもよい。

[0025] リンカー1が光刺激によって開裂可能なリンカーである場合に、当該リンカーは、好ましくは360nm以上の波長の光によって開裂されるものであってよい。当該リンカーは、好ましくは $0.5 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ 以下のエネルギーで切断されるリンカーであってよい。(Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology, Nat Methods. 2015 Jan;12(1):23-6. doi: 10.1038/nmeth.3219.)。上記波長の光又は上記エネルギーで切断されるリンカーを採用することによって、光刺激を与えるときに生じうる細胞ダメージ(特にはDNA又はRNAの切断など)を低減することができる。

[0026] リンカー1が温度刺激によって開裂可能なリンカーである場合、リンカー1は例えば温度応答性高分子を含みうる。温度応答性高分子は、例えば温度変化に応じて親水性から疎水性へと変化し又は疎水性から親水性へと変化しうる。このような変化によって、標的捕捉用分子は表面1から遊離されうる。

[0027] 特に好ましくは、当該リンカーは、短波長領域の光、具体的には360nm~410nmの波長領域の光によって開裂されるリンカーであってよく、又は、近赤外領域若しくは赤外領域の光、具体的には800nm以上の波長領域の光によって開裂されるリンカーであってよい。当該リンカーが、可視光領域の波長の光で効率よく切断されるリンカーである場合は、分析用表面

の取扱いが難しくなりうる。そのため、当該リンカーは、上記短波長領域の光又は上記近赤外領域若しくは赤外領域の光によって開裂されるリンカーであることが好ましい。

[0028] 回収用配列部2は、後述の分析工程において、表面101から遊離した分子100を回収するために用いられる核酸を含む。当該核酸は、DNA又はRNAであってよく、特にDNAである。例えば、図3の(D)に示されるように、回収用配列部2に含まれる核酸の配列は、ビーズ9に固定された核酸8の配列と相補的である。核酸8を複数固定されたビーズ9によって、回収用配列部2を有する分子100を効率的に回収することができる。回収用配列部2に含まれる核酸の塩基配列は、当業者により適宜設定されてよい。

[0029] 増幅用配列部3は、例えば、後述の分析工程において核酸の増幅のために用いられるプライマー配列若しくは核酸の転写のために用いられるプロモーター配列を有する核酸を含みうる。当該核酸は、DNA又はRNAであってよく、特にDNAである。増幅用配列部3は、プライマー配列及びプロモーター配列の両方を有していてもよい。前記プライマー配列は、例えばPCRハンドルであってよい。前記プロモーター配列は、例えばT7プロモーター配列であってよい。

[0030] バーコード配列部4は、バーコード配列を有する核酸を含む。当該核酸は、特にDNA又はRNAであってよく、より特にDNAである。バーコード配列は、例えば、表面101上における標的捕捉用分子の存在位置を特定するために用いられる。バーコード配列は、或るバーコード配列を含む標的捕捉用分子を、他のバーコード配列を含む標的捕捉用分子と区別可能とするための識別子として用いられうる。バーコード配列は、当該バーコード配列を含む標的捕捉用分子が固定されている位置に関する情報（以下「位置情報」ともいう）と関連付けられていてよい。位置情報は、表面101上の位置を特定するためのものであってよく、例えばXY座標に関する情報であるが、これに限定されない。位置情報と関連付けられたバーコード配列には、

I Dナンバーが割り当てられてよい。当該I Dナンバーは、撮像工程以降の工程において用いられうる。当該I Dナンバーは、バーコード配列と1対1で対応するものであってよく、撮像工程以降の工程において、バーコード配列に対応するデータとして用いられてもよい。

[0031] 表面101のうちの或る領域内に固定された複数の標的捕捉用分子が同じバーコード配列を有しうる。これにより、当該或る領域と当該バーコード配列とが関連付けられる。当該或る領域のサイズを、細胞のサイズよりも小さく設定することによって、当該バーコード配列を含む標的捕捉用分子を、1つの細胞が存在する位置に関連付けることができる。このように、本技術の分析方法において用いられる表面は、同じバーコード配列を有する複数の標的捕捉用分子が固定された領域を複数有しうる。領域毎にバーコード配列は異なってよい。各領域のサイズは、好ましくは細胞のサイズより小さく、例えば50 μ m以下、好ましくは10 μ m以下、より好ましくは5 μ m以下でありうる。

[0032] 本技術の一つの実施態様において、配列が既知のバーコード配列を含む標的捕捉用分子が、所定の領域に固定されうる。例えば、表面101は、複数の領域を有し、当該複数の領域のそれぞれに固定された複数の標的捕捉用分子は、同じバーコード配列を含みうる。当該複数の領域は、分析対象である細胞のサイズよりも小さく設定されうる。このように構成された表面101に関して、前記複数の領域のそれぞれと、各領域に固定されている複数の標的捕捉用分子に含まれるバーコード配列とを、関連づけることができる。

このように同じバーコード配列を含む標的捕捉用分子が固定されている領域を、本明細書内においてスポットともいう。スポットのサイズは、例えば50 μ m以下、好ましくは10 μ m以下、より好ましくは5 μ m以下でありうる。

以上のように構成された表面101は、標的捕捉用分子が表面101に固定化された時点で、或る標的捕捉用分子に含まれるバーコード配列と当該或る標的捕捉用分子が存在する位置とを関連付けることができる。当該固定の

ために、例えば標的捕捉用分子のリンカー 1 にビオチンが結合され且つ標的捕捉用分子が固定される表面 101 にストレプトアビジンが結合され、そして、前記ビオチン及び前記ストレプトアビジンが結合することによって、前記標的捕捉用分子が表面 101 に固定化される。

[0033] 本技術の他の実施態様において、表面 101 に、バーコード配列を含む標的捕捉用分子が、ランダムに配置されてもよい。この場合、バーコード配列を含む標的捕捉用分子が表面 101 に固定された後に、固定された標的捕捉用分子に含まれるバーコード配列を読み取ることで、或る標的捕捉用分子に含まれるバーコード配列と、当該或る標的捕捉用分子が存在する位置とが、関連付けられる。当該読み取りは、例えば Sequencing By Synthesis、sequencing by ligation、又は sequencing by hybridization などの手法により行うことができる。

この実施態様において、例えば同じバーコード配列を含む複数の標的捕捉用分子が結合したビーズ（例えばゲルビーズ）が用いられてよく、当該ビーズ（例えばゲルビーズ）が表面 101 に固定されうる。ビーズ（例えばゲルビーズ）のサイズは、例えば $50\ \mu\text{m}$ 以下、好ましくは $10\ \mu\text{m}$ 以下、より好ましくは $5\ \mu\text{m}$ 以下でありうる。標的捕捉用分子をビーズ（例えばゲルビーズ）に結合させるために、例えばビオチンとストレプトアビジンとの組合せが用いられてよい。例えば、標的捕捉用分子のリンカー 1 にビオチンが結合され且つビーズにストレプトアビジンが結合され、そして、前記ビオチン及び前記ストレプトアビジンが結合することによって、前記標的捕捉用分子がビーズに固定化される。

[0034] 表面 101 には、複数の凹部が設けられていてもよい。当該複数の凹部のそれぞれに、前記実施態様における 1 つのスポット又は 1 つのビーズが配置されてよい。当該複数の凹部において、当該スポット又は当該ビーズを、より容易に表面 101 に配置することができる。凹部のサイズは、例えばビーズが一つ入るサイズであることが好ましい。凹部の形状は、円形、楕円形、六角形、又は四角形であってよいがこれらに限定されない。

[0035] また、表面 101 のうち、前記スポット又は前記ビーズが配置される表面部分の表面状態が、他の表面部分と異なってもよい。例えば、前記スポット又は前記ビーズが配置される表面部分が親水性であり、その他の表面部分が疎水性であってよく、又は、その他の表面部分が疎水性を有し且つ凸部を有していてもよい。表面に親水性を付与するため手法として、例えば、酸素存在下での反応性イオンエッチング及びオゾン存在下で深紫外光の照射などが挙げられる。これらの手法において、親水性を付与する部分が貫通されたマスクが用いられうる。また、表面に疎水性を付与するための手法として、シリコンスプレー（spray-on-silicone）を挙げることができ、例えばTechspray 2101-12Sなどが用いられてよい。疎水性を付与する場合においても、例えば疎水性を付与する部分が貫通されたマスクを用いられうる。

[0036] 例えばDNAマイクロアレイ作製技術などを用いて、基板上で前記標的捕捉用分子を合成することもできる。例えば、フォトリソグラフィーに用いられるDMD（Digital Micromirror Device）、液晶シャッター、又は空間光位相変調器などの技術を用いて、特定の位置に標的捕捉用分子を合成することができる。当該合成のための手法は、例えばBasic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Oct. 2009, p. 611-633に記載されている。なお、当該合成により前記標的捕捉用分子を基板上で合成する場合、標的捕捉用分子が合成される際に当該標的捕捉用分子が合成される位置の情報を取得し、バーコード配列と位置情報とが関連付けられる。その際に、IDナンバーが付与されてもよい。

[0037] 本技術の一つの実施態様において、表面に固定されている標的捕捉用分子のいずれもが、共通のオリゴ配列を含みうる。当該オリゴ配列に相補的な配列を有し且つ蛍光標識された核酸を用いることで、標的捕捉用分子が固定されている位置（特に前記スポットの位置又は前記ビーズの位置）を確認することができ、特に暗視野において確認することができる。また、表面上記で述べた凹部又は凸部が無い場合、標的捕捉用分子が固定されている位

置が把握しにくくなりうる。前記蛍光標識は、この場合において、標的捕捉用分子が固定されている位置を把握しやすくする。

[0038] UMI部5は、核酸を含んでよく、特にDNA又はRNAを含んでよく、より特にDNAを含む。UMI部5は、例えば5塩基～30塩基、特に6塩基～20塩基、より特に7塩基～15塩基の配列を有しうる。

UMI部5は、表面101に固定された標的捕捉用分子間で互いに異なる配列を有するように構成されうる。例えばUMI部が10塩基の核酸配列を有する場合、UMI配列の種類は、4の10乗、すなわち100万以上である。

UMI部5は、標的分子を定量するために用いられうる。例えば、mRNAを逆転写して得られるcDNAにUMI配列が付加される。1つのmRNA分子から転写されたcDNAを増幅して得られる多数のcDNAは同じUMI配列を有するが、当該mRNAと同じ配列を有する他のmRNA分子から転写されたcDNAを増幅して得られる多数のcDNAは異なるUMI配列を有する。そのため、同じcDNA配列を有するUMI配列の種類の数数を数えることで、mRNAのコピー数を決定することができる。

[0039] 例えば、UMI部5は、前記スポット又は前記ビーズに固定された同じバーコード配列を含む複数の標的捕捉用分子間で互いに異なる配列を有するように構成されうる。すなわち、前記スポット又は前記ビーズに固定された複数の標的捕捉用分子は、同じバーコード配列を有する一方で、互いに異なるUMIを有しうる。

[0040] 標的捕捉部6は、細胞に含まれる分子を捕捉するための構成要素を含む。当該構成要素は、例えば核酸又はタンパク質でありうる。当該構成要素が核酸である場合、当該核酸は、細胞に含まれるmRNAを網羅的に捕捉するために、例えばポリT配列であってよい。代替的には、当該核酸は、標的配列に相補的な配列を有しうる。当該構成要素がタンパク質である場合、当該タンパク質は例えば抗体であってよい。当該構成要素は、アプタマー又は分子鋳型ポリマー (Molecular Imprinted Polymer) であってもよい。

標的捕捉部 6 は、細胞に含まれる分子を捕捉するための 2 種類以上の構成要素を含んでいてもよい。標的捕捉部 6 は、タンパク質及び核酸の両方を含んでよく、例えば抗体とポリ T 配列の両方を含みうる。これにより、タンパク質と mRNA の両方を同時に検出することができる。

[0041] 表面 101 は、好ましくは透明な基板の表面でありうる。当該基板は、その全体が透明であってよく、又は、標的捕捉用分子が固定される部分だけが透明であってよい。基板の表面は、標本との接触を良好に行うために、好ましくは平面である。当該透明の基板は、例えばガラス製の基板又は樹脂製の基板でありうる。当該基板は例えばスライドガラスであってよい。透明であることによって、後述の撮像工程において標本を撮像することができる。また、透明であることによって、後述の関連付け工程において関連付けが行いやすい。

[0042] 標本 4 は、例えば細胞を含む標本であってよく、より特には細胞を含む固定化された標本でありうる。標本は、生体組織標本であってよく、特には凍結組織標本又は F F P E (formalin-fixed paraffin-embedded) 標本であってよく、より特には凍結組織切片又は F F P E 切片でありうる。標本 4 は、例えば基板に載せられていてよく、特には透明な基板の表面でありうる。当該基板は、その全体が透明であってよく、又は、標本が載せられる部分だけが透明であってよい。当該透明の基板は、例えばガラス製の基板又は樹脂製の基板でありうる。当該基板は例えばスライドガラスであってよい。当該基板の表面は、標的捕捉用分子が固定されている表面との接触を良好に行うために、好ましくは平面である。

[0043] 標本 4 は、後述の細胞のセグメンテーションをより容易に行うために染色されてよい。当該染色は、例えば細胞膜染色、H E (Hematoxylin Eosin) 染色、若しくは D A P I 染色、又はこれらのうちの 2 以上の組合せであってよい。前記細胞膜染色のために、脂質二重膜に取り込まれて蛍光を発する細胞膜染色試薬が用いられてよく、試薬は当業者により適宜選択されてよい。前記 H E 染色は、明視野観察のために用いられ、例えば細胞形態を特定するた

めに用いられうる。前記D A P I 染色は、核染色のために用いられうる。

[0044] (2-2) 撮像工程

[0045] 撮像工程S 1 0 2において、例えば図2の(B)に示されるように、表面1 0 1と標本1 0 3とが重ねられた状態で、標本1 0 3が撮像される。当該撮像は、標本1 0 3に含まれる個々の細胞が認識できるような分解能で行われうる。撮像素子1 1 0は、例えばC C D又はC M O Sであってよい。

当該撮像は、例えば、撮像素子1 1 0によって対物レンズ1 1 1を介して行われてよい。すなわち、撮像される画像は、顕微鏡画像でありうる。対物レンズ1 1 1の倍率は、細胞のサイズに応じて適宜選択されてよい。

[0046] 前記撮像は、明視野若しくは暗視野での撮像であってよく、又は、明視野の撮像及び暗視野の撮像の両方が行われてもよい。前記撮像は1回又は複数回行われてよく、例えばユーザ若しくは制御部により選択された一部の領域について1回又は複数回行われてよく、又は、標本1 0 3の全域又は一部を網羅するように1回又は複数回行われてもよい。

[0047] 撮像素子1 1 0による前記撮像は、撮像素子1 1 0に接続された制御部(図示されていない)により制御されうる。前記制御部は、例えば、ハードディスク、C P U、及びメモリにより構成されてよく、例えば汎用のコンピュータ又は情報処理装置により制御部の機能が実現されうる。

また、前記制御部は、撮像素子1 1 0内に備えられていてもよい。制御部を備えている撮像素子は、例えば、複数のダイ(例えば2枚又は3枚のダイ)が積層された積層構造を有する1チップの半導体装置として構成されてよい。当該ダイのうちの1つが、2次元に並んで配列された複数の画素を含む。残りのダイに、制御部の機能を実現させるための構成要素(例えばC P U及びメモリなど)が搭載されうる。前記制御部を含む撮像素子の例として、例えば国際公開第2 0 1 8 / 0 5 1 8 0 9号に開示された撮像素子を挙げることができる。前記撮像素子として制御部を備えている撮像素子を用いることによって、標本画像データを撮像素子の外部に出力することなく各種処理を行うことができ、これは情報処理の高速化をもたらす。

[0048] 撮像素子 110 は、撮像により得られた標本画像データを前記制御部に送信しうる。前記制御部は、標本画像データを受信し、以降の工程において当該標本画像データを使用する。

また、前記制御部が受信した標本画像データは、例えば前記制御部に接続された記憶部に格納されてもよい。前記記憶部は、汎用の記憶装置であってよい。前記制御部が、以降の行程を行う場合に、前記記憶部から標本画像データを取得しうる。

[0049] (2-3) 関連付け工程

[0050] 関連付け工程 S103 において、撮像工程 S102 における撮像により得られた標本画像を用いて、細胞の位置と当該位置にある標的捕捉用分子のバーコード配列とが関連付けられる。当該関連付けは、バーコード配列に予め関連付けられた位置情報を介して行われてよい。各バーコード配列に ID ナンバーが付与されている場合は、細胞の位置と ID ナンバーとが関連付けられてもよい。これにより、細胞の位置とバーコード配列とが、ID ナンバーを介して関連付けられうる。

[0051] 前記細胞の位置は、標本画像中において当該細胞が占める領域を意味しうる。当該領域を特定するために、標本画像に対する画像処理が行われてよく、例えば細胞のセグメンテーションが行われうる。細胞のセグメンテーションによって、細胞の位置に存在する標的捕捉用分子を特定しやすくなる。

[0052] 例えば、関連付け工程 S103 において、前記標本画像中の細胞のうちの分析対象である細胞の位置情報が取得される。細胞の位置情報は、上記セグメンテーションにより得られた画像データを用いて取得されてよい。当該標本画像は、表面 101 と標本 103 とが重ねられて撮像されたものであるもので、当該細胞の位置情報は、当該細胞の位置にある標的捕捉用分子の位置情報に対応する。ここで、標的捕捉用分子の位置情報は、上記で述べたとおり、撮像対象用意工程 S101 において、当該標的捕捉用分子に含まれるバーコード配列に関連付けられている。そのため、標本画像中の細胞の位置情報を取得することで、前記細胞の位置と、当該位置にある標的捕捉用分子に含

まれるバーコード配列とを関連付けることができる。

[0053] 好ましくは、前記関連付けは、1つのバーコード配列が、2以上の細胞の位置に関連付けられないように行われうる。例えば、上記で述べた1つのスポットに、2以上の細胞が存在する場合がある。この場合、好ましくは、当該1つのスポットに固定されている標的捕捉用分子のバーコード配列は、当該2以上の細胞のいずれの位置にも関連付けられない。

[0054] 表面上のスポットのうち、関連付けが行われるスポットと関連付けが行われないスポットの区別の仕方の例を、図4を参照しながら説明する。

[0055] 図4の左に示される組織の標本画像のうちの一部を拡大することで又は当該一部の拡大画像をより取得することで、図4の中央に示されるとおり組織サンプル中の細胞が視認可能となる。標本は分析用表面と重ねられて撮像されており、例えば図4の右に示されるように、多数の円形スポットが重なった状態で撮像されている。各円形スポットには、同じバーコード配列を有する複数の標的捕捉用分子が存在する。

図4の右では、より良い理解のために、多数の円形スポットが示されているが、これらスポットは、撮像素子により取得された画像中には確認できなくてよく又は確認できてもよい。

なお、標本画像中にスポットの位置が確認できない場合において、画像処理によって、標本画像中にスポットの位置を表示させてもよい。

[0056] 図4の中央の標本画像中には、2種類の細胞が存在することが確認でき、1種類の細胞が濃いグレーにより示されており、他の種類の細胞が薄いグレーにより示されている。これら2種類の細胞に関して細胞の位置と当該位置に存在する標的捕捉用分子のバーコード配列とを関連付ける場合、例えば図4の右に示されるとおり、実線の円で示されるスポットについて関連付けが行われる。実線の円は、1つの細胞の像の領域内に存在する。このように、1つの細胞の像の領域内に存在するスポットが、関連付けの対象となりうる。

一方で、点線の円は、例えば2つ以上の細胞に重なっていたり、細胞と細

胞の外の領域にまたがっていたり、又は、細胞の像の領域外に存在している。これら点線の円は、関連付けの対象とされなくてよい。

[0057] 関連付け工程 S 1 0 3 は、例えば前記制御部により行われうる。例えば、前記制御部は、標本画像中に存在する細胞のうち、全て又は一部の種類の細胞に関して、細胞の位置と当該細胞の位置にある分子のバーコード配列とを関連付けうる。一部の種類の細胞に関して関連付けが行われる場合、前記制御部は、例えば細胞の特徴（形状、サイズ、色、若しくは模様、又はこれらの組合せ）に基づき、関連付けが行われる細胞を特定しうる。例えば、図 4 の中央に示される画像のうち、濃いグレーにより示される細胞について細胞の位置と当該位置にある標的捕捉用分子のバーコード配列との関連付けを行う一方で、薄いグレーにより示される細胞については当該関連付けを行わないなど、特定の種類の細胞についてだけ関連付けが行われてもよい。

また、前記撮像素子として、制御部を備えている撮像素子を用いる場合、標本画像データを撮像素子の外部に出力することなく、関連付け工程 S 1 0 3 を行うことができる。これにより、関連付け工程 S 1 0 3 をより高速に処理することができる。

[0058] 関連付け工程 S 1 0 3 は、ユーザ操作に基づき行われてもよい。例えばユーザが標本画像中に存在する細胞のうちから、関連付けを行うことを希望する細胞を、例えばマウスのクリックなどにより選択する。そして、ユーザにより選択された細胞について、前記制御部が、細胞の位置と当該位置にある標的捕捉用分子のバーコード配列とを関連付けうる。

[0059] (2-4) 開裂工程

[0060] 開裂工程 S 1 0 4 において、細胞の位置に選択的に刺激を与えて、当該位置にある分子のリンカーを開裂させる。例えば図 2 の (C) に示されるよう刺激付与装置 1 3 0 によって、選択された細胞の位置に光が照射されうる。

[0061] 刺激が与えられる位置は、関連付け工程 S 1 0 3 において関連付けが行われた細胞のうちの一部の細胞の位置であってよく、又は、前記関連付けが行われた細胞の全ての位置であってもよい。好ましくは、当該細胞の位置以外

の位置にある標的捕捉用分子のリンカーが開裂しないように、当該細胞の位置に選択的に刺激が与えられる。刺激付与装置 130 は、好ましくは、このように選択的に刺激を与えるように構成されている。すなわち開裂工程 S104 において、関連付けが行われなかったバーコード配列を含む標的捕捉用分子のリンカーは開裂されなくてよい。

[0062] 例えば、図 4 の右に示される画像のうち、関連付けが行われた実線の円で示されるスポットの全てに、刺激が与えられてよい。このように、関連付けが行われた細胞の全ての位置に刺激が与えられてよい。

代替的には、図 4 の右に示される画像のうち、濃いグレーにより示される細胞中の実線の円スポットで示される位置に、又は、薄いグレーにより示される細胞中の実線の円スポットで示される位置に、刺激が与えられてよい。このように、関連付けが行われた細胞のうちの一部の細胞（特には或る種類の細胞）の位置に刺激が与えられてよい。

代替的には、図 4 の右に示される画像のうち、関連付けが行われた細胞のうちから選択される 1 つ又は複数の細胞中の実線の円スポットで示される位置に、刺激が与えられてよい。このように、関連付けが行われた細胞のうちの一部の細胞（特には選択された細胞）の位置に刺激が与えられてよい。

[0063] ステップ S104 におけるリンカーの開裂によって、標的捕捉用分子が表面 101 から遊離する。例えば図 3 の (B) に示されるように、分子 100 のリンカー 1 が開裂することによって、分子 100 が、表面 101 から遊離する。

[0064] 前記刺激は、例えば光刺激又は温度刺激（熱刺激ともいう）であってよく、好ましくは光刺激でありうる。光刺激は、特定の狭い範囲に選択的に刺激を与えるために特に適している。

[0065] 開裂工程 S104 は、例えば前記制御部により行われてよい。より具体的には、前記制御部が、刺激付与装置を駆動して細胞の位置に選択的に刺激を付与させうる。採用されうる刺激付与装置の例を以下に説明する。

[0066] 細胞の位置に選択的に光刺激を与えるために、刺激付与装置 130 として

光照射装置が用いられ得る。光照射装置は、例えばDMD (Digital Micromirror Device) 又は液晶ディスプレイデバイスであってよい。DMDを構成するマイクロミラーによって、表面101のうちの選択された位置に光を照射することができる。液晶ディスプレイデバイスは、例えば反射型液晶ディスプレイであってよく、具体的な例としてはSXRD (ソニー株式会社) を挙げることができる。液晶ディスプレイデバイスの液晶を制御することによって、表面101のうちの選択された位置に光を照射することができる。

また、細胞の位置に選択的に光刺激を与えるために、液晶シャッター又は空間光変調器が用いられてもよい。これらによっても、選択された位置に光刺激を与えることができる。

照射される光の波長は、標的捕捉用分子に含まれるリンカーの種類に応じて当業者により適宜選択されてよい。

[0067] 細胞の位置に選択的に温度刺激を与えるために、例えば赤外光と赤外光吸収材料との組合せが用いられうる。この場合、刺激付与装置としては例えば赤外レーザ光生成装置が採用されうる。例えば表面101を有する基板102を赤外光吸収材料から形成し、そして、赤外レーザ光生成装置により細胞の位置に選択的に赤外光を照射することによって、当該位置に選択的に温度刺激を与えることができる。

[0068] (2-5) 結合工程

[0069] 結合工程S105において、ステップS104における開裂によって表面101から遊離した前記標的捕捉用分子を、当該標的捕捉用分子の標的捕捉部を介して前記細胞の構成成分に結合させる。

[0070] 例えば図2の(C)の1点鎖線により囲まれた模式的な拡大図に示されるように、光を照射された位置にある標的捕捉用分子のリンカーだけが開裂し、その直下にある細胞内へと取り込まれる。そして、例えば図3の(C)に示されるように、当該細胞内で、標的捕捉用分子100の標的捕捉部6に細胞構成成分7が結合しうる。

[0071] 結合工程S105は、電場又は磁場又は遠心力の印可によって前記標的捕

捉用分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含みうる。例えば標的捕捉用分子に含まれる核酸はネガティブチャージを有するので、ポジティブチャージによって当該標的捕捉用分子を細胞に向かって移動させることができる。例えば、基板102及び基板104の積層物を、向かい合う電極の間に配置することによって、電場が印可されうる。また、基板102及び基板104に明視野観察又は暗視野観察（特には蛍光観察）を妨げない厚さの金属薄膜又はITO（Indium Tin Oxide）などの透明電極が配置されていてもよい。電場を印可する電場印可装置、磁場を印可する磁場印可装置、又は、遠心力を印可する遠心力印可装置として、当技術分野で既知の装置が採用されてよい。遠心力印可装置として、例えばスイングローター式の遠心力印可装置が挙げられる。これら装置による電場又は磁場又は遠心力の印可は、例えば制御部によって制御されてもよい。

[0072] 結合工程S105は、自然拡散によって前記標的捕捉用分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含んでもよい。

前記移動工程において、電場又は磁場又は遠心力の印可と自然拡散との組み合わせが用いられてもよい。移動工程は、好ましくは電場の印可を含み、これにより、前記遊離した標的捕捉用分子が細胞に取り込まれる確率を高めることができる。

[0073] 結合工程S105は、前記標的捕捉用分子と前記細胞の構成成分とを結合させるためのインキュベート工程を含みうる。インキュベート工程の時間及び温度は、標的捕捉部及び当該標的捕捉部により捕捉される細胞構成成分に応じて、選択されてよい。インキュベート工程は、例えば表面101と標本との間をバッファーで満たした状態で行われうる。例えば、当該標的捕捉部及び当該細胞構成成分がいずれも核酸である場合、例えば30℃～40℃、特には30℃～37℃の恒温槽で、例えば5時間～30時間、特には16時間～24時間にインキュベートが行われうる。例えば、当該標的捕捉部が抗体であり及び当該細胞構成成分が当該抗体により捕捉される成分である場合、例えば0℃～30℃、特には4℃～室温（例えば25℃）で、例えば5時

間～30時間、特には16時間～24時間インキュベートが行われうる。

[0074] 結合工程S105において、前記標的捕捉用分子は、細胞内に取り込まれてよく又は細胞表面に結合しうる。そして、前記標的捕捉用分子は、前記標的捕捉用分子の標的捕捉部を介して、細胞の構成成分と結合する。その後、表面101と標本103は引き離され、未結合の標的捕捉用分子は、洗浄によって除去される。洗浄法としては、標本103をバッファーに浸漬する等でよい。

[0075] (2-6) 分析工程

[0076] 分析工程S106において、結合工程S105における標的捕捉用分子と細胞構成成分との結合により生成された結合体に対する分析が行われうる。図2の(D)に示されるように、分析装置200を用いて分析が行われうる。例えば、分析工程S106において、前記結合体に対するシーケンシング処理が行われてよく、分析装置200はシーケンサーであってよい。当該シーケンシング処理は、例えば前記細胞構成成分が、核酸、特にはDNA又はRNA、より特にはmRNAである場合に行われうる。シーケンシング処理は、シーケンサーにより行われてよく、次世代型シーケンサー又はサンガー法によるシーケンサーにより行われよい。組織を構成する細胞の網羅的な解析をより高速に行うために、シーケンシング処理は次世代型シーケンサーにより行われうる。

[0077] 分析工程においてシーケンシング処理を行うために、分析工程はさらにシーケンシング処理の対象となる核酸（例えばcDNAなど）の調製工程及び核酸の精製工程を含みうる。これら調製工程及び精製工程によって、例えば次世代型シーケンシング処理を行うためのライブラリーが調製されてよい。

ライブラリーの調製において、例えば図3の(D)に示されるように、回収用配列部2が用いられうる。回収用配列部2に含まれる核酸配列と相補的な配列を有する核酸が固定されたビーズ9を用いて、細胞構成成分7を結合した分子100が回収されうる。

[0078] 前記調製工程において、結合工程S105における結合後の基板102及び104の積層物が、例えばPBSなどのバッファーを用いて洗浄されて、未結合の標的捕捉用分子が除去されうる。そして次に、基板102が基板104から取り外され、標的捕捉用分子を取り込んだ細胞に対して、例えばmRNAからのcDNAを合成するcDNA合成工程及び合成されたcDNAを増幅する増幅工程が行われうる。前記cDNA合成工程及び前記増幅工程の前に、細胞を溶解する溶解工程が行われてよい。当該溶解工程後に標的捕捉用分子と標的との結合体を回収することで、前記cDNA合成工程及び前記増幅工程をより効率的に行うことができる。

[0079] 前記調製工程後に、当該調製工程において得られた核酸を精製する精製工程が行われてよい。当該精製工程は、例えばプロテイナーゼKなどの酵素を用いた核酸以外の成分の分解処理を含みうる。また、当該精製工程において、核酸回収処理が行われてよい。核酸回収処理において、例えば市販入手可能な核酸精製用試薬が用いられてよく、その例として例えばAMPure XPなどの磁気ビーズを挙げることができる。なお、当該精製工程において、細胞内のdsDNAも回収されうるが、シーケンシング処理においてdsDNAはシーケンスされないようにすることができる。例えば、標的捕捉用分子にシーケンシング処理用（特に次世代型シーケンシング処理用）のアダプター配列を含めることで、当該アダプター配列を含む核酸だけをシーケンスすることができる。

[0080] 分析工程S106において、シーケンシング処理結果に基づき、細胞毎に細胞構成成分が分析されうる。例えば、分析工程S106において、細胞毎に、細胞に含まれるmRNAの配列及び／又は各mRNAのコピー数が決定されうる。また、分析工程S106において、細胞毎に、抗原の種類及び／又は数、又は、転写因子の種類及び／又は数が決定されうる。このような細胞毎の細胞構成成分の分析は、シーケンス処理により決定された配列中のバーコード配列に基づき行われうる。例えばシーケンス処理により決定された多数の配列のうちから、同じバーコード配列を含む配列が選択される

。同じバーコード配列を含む配列は、１つの細胞に取り込まれた標的捕捉用分子に基づくものである。そのため、バーコード配列毎に細胞構成成分を分析することは、細胞毎に細胞構成成分を分析することを意味する。

[0081] 分析工程Ｓ１０６は、前記分析の結果と前記標本画像とを用いて、関連付け工程Ｓ１０３における関連付け結果に基づき２次元マッピングを行う２次元マッピング工程を含みうる。例えば、分析工程Ｓ１０６において、細胞毎の細胞構成成分の分析結果は、バーコード配列に関連付けられた位置情報に基づき、前記撮像工程において得られた標本画像にマッピングされうる。当該マッピングによって、例えば図２の（Ｅ）に示されるように、標本画像（図２の（Ｅ）の上）と、標本画像中の各位置における細胞構成成分の種類の分布を示すマッピング画像（図２の（Ｅ）の下）が得られうる。当該マッピングにより得られた画像から、どの位置にあるどの細胞が、どの分子をどの程度の量で含むかを把握することができる。すなわち、イメージングにより得た位置情報とシーケンス解析によって得た定量情報を組み合わせることができ、single cell resolutionで空間情報を保持したまま、組織サンプル内分子の網羅的解析が可能となる。

[0082] ２．第２の実施形態（分析システム）

[0083] 本技術の分析システムのブロック図の一例を図５に示す。図５に示されるとおり、本技術の分析システム１０は、分析用基板１０２、撮像素子１１０、制御部１２０、記憶部１２５、及び刺激付与装置１３０を含む。

[0084] 分析用基板１０２、撮像素子１１０、及び刺激付与装置１３０は、上記１．において説明したとおりのものであってよく、その説明が本実施形態についてもあてはまる。

[0085] 制御部１２０は、上記１．において説明した制御部であってよく、その説明が本実施形態についてもあてはまる。制御部１２０は、例えば画像処理部１２１、関連付け部１２２、及び刺激制御部１２３を含みうる。これらについて以下でより詳細に説明する。

[0086] 画像処理部１２１は、撮像素子１１０により取得された標本画像を処理す

る。画像処理部 1 2 1 は、例えば上記 1. において述べた細胞のセグメンテーションを行いうる。また、画像処理部 1 2 1 は、標本画像中に存在する細胞のうちから、前記関連付け工程において関連付けが行われる細胞を特定しうる。当該特定は、例えば細胞の特徴（形状、サイズ、色、若しくは模様、又はこれらの組合せ）に基づき行われうる。当該特定は、画像中の色データに基づき行われてもよい。例えば、或る蛍光を発する細胞を、関連付け工程において関連付けが行われる細胞として特定しうる。

[0087] 関連付け部 1 2 2 は、細胞の位置と当該細胞の位置にある標的捕捉用分子のバーコード配列とを関連付ける。当該関連付けは、上記セグメンテーションにより得られた画像を用いて行われてもよい。

例えば、関連付け部 1 2 2 は、標本画像に基づき細胞の位置データを取得し、当該位置データに対応する位置データを割り当てられているバーコード配列を特定し、当該バーコード配列を当該細胞の位置と関連付けうる。

[0088] 関連付け部 1 2 2 は、細胞の位置と当該細胞の位置にある標的捕捉用分子のバーコード配列との関連付けを、標本画像中の全ての細胞について行ってもよく、又は、標本画像中の一部の細胞について行ってもよい。例えば、関連付け部 1 2 2 は、標本画像中に存在する全ての細胞のうち、一部の種類の細胞についてだけ前記関連付けを行い、又は、一部の領域に存在する細胞についてだけ前記関連付けを行いうる。

[0089] 刺激制御部 1 2 3 は、刺激付与装置 1 3 0 に、関連付け部 1 2 2 により関連付けされた細胞の位置に選択的に刺激を与えさせる。刺激制御部 1 2 3 は、関連付け部 1 2 2 により関連付けされた細胞のうちの全て又は一部について刺激を与えるよう刺激付与装置 1 3 0 を駆動しうる。刺激付与装置 1 3 0 は、好ましくは、前記細胞の位置以外の位置にある標的捕捉用分子に含まれるリンカーを開裂させることなく、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられるように構成されている。刺激付与装置 1 3 0 は、好ましくは上記 1. において述べた光照射装置である。

[0090] 制御部 1 2 0 は、例えば、ハードディスク、CPU、及びメモリにより構

成されてよく、例えば汎用のコンピュータ又は情報処理装置において制御部の機能が実現されうる。画像処理部 1 2 1、関連付け部 1 2 2、及び刺激制御部 1 2 3 の機能も、汎用のコンピュータ又は情報処理装置により実現されうる。

制御部 1 2 0 は、上記（2-2）において述べたとおり、撮像素子 1 1 0 内に備えられていてもよい。前記撮像素子として制御部を備えている撮像素子を用いることによって、標本画像データを撮像素子の外部に出力することなく各種処理を行うことができ、これは情報処理の高速化をもたらす。例えば、上記で述べた画像処理部 1 2 1、関連付け部 1 2 2、及び刺激制御部 1 2 3 による処理をより高速に行うことができる。

[0091] 分析システム 1 0 は、上記 1. において述べた結合工程 S 1 0 5 を行うために、例えば、刺激付与装置 1 3 0 による刺激の付与によって分析用基板 1 0 2 の表面から遊離した標的捕捉用分子を細胞に向かって移動させるための電場又は磁場を印可する電場又は磁場印可装置又は遠心力を印可する遠心力印可装置を含みうる。当該装置によって、標的捕捉用分子がより効率的に細胞に取り込まれる。

[0092] 分析システム 1 0 は、上記 1. において述べた結合工程 S 1 0 5 を行うために、刺激付与装置 1 3 0 による刺激の付与によって分析用基板 1 0 2 の表面から遊離した標的捕捉用分子が細胞構成成分と結合することを促すためのインキュベーション装置をさらに含みうる。当該インキュベーション装置は例えば恒温槽を含みうる。

[0093] 分析システム 1 0 は、上記 1. において述べた分析工程 S 1 0 6 を行うために、刺激付与装置 1 3 0 による刺激の付与によって分析用基板 1 0 2 の表面から遊離した標的捕捉用分子と細胞構成成分との結合体を分析する分析装置をさらに含みうる。当該分析装置は、例えばシークエンサーでありうる。当該シークエンサーは、例えば次世代型シークエンサーであってよく又はサンガー法によるシークエンシングを行うシークエンサーであってもよい。

[0094] 分析システム 1 0 は、前記分析装置による分析結果と前記標本画像とを用

いて、前記関連付け部による関連付け結果に基づき２次元マッピングを行う２次元マッピング部をさらに含む。当該２次元マッピング部は、制御部１２０の一要素として構成されてよく、例えば上記１．において述べた２次元マッピング工程を行いうる。当該２次元マッピング部によって、例えば細胞の構成成分に関する情報が標本画像にマッピングされうる。当該細胞の構成成分に関する情報は、例えば細胞の構成成分の種類又は量であってよい。当該マッピングにより得られた画像から、どの位置にあるどの細胞が、どの分子をどの程度の量で含むかを把握することができる。すなわち、イメージングにより得た位置情報とシーケンス解析によって得た定量情報を組み合わせることができ、single cell resolutionで空間情報を保持したまま、組織サンプル内分子の網羅的解析が可能となる。

[0095] 分析システム１０はさらに出力部を含んでよい。当該出力部は、例えば表示装置及び／又は印刷装置を含む。制御部１２０は、例えば撮像素子１１０により取得された標本画像及び前記二次元マッピング部により生成されたマッピング画像など、本技術に従う分析方法を行うことによって得られる画像を当該出力部に出力させうる。また、制御部１２０は、前記分析装置による分析結果（例えばシーケンシング処理結果など）を当該出力部に出力させうる。

[0096] ３．第３の実施形態（分析用表面）

[0097] 本技術は、開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む標的捕捉用分子が前記リンカーを介して固定されており、且つ、前記バーコード配列が、当該バーコード配列を含む分子が固定されている位置に関する情報を与えるために用いられる、分析用表面も提供する。前記分析用表面の例は、上記１．において説明した分析用基板１０２の表面１０１であり、当該表面についての説明が本実施形態についてもあてはまる。

[0098] なお、本技術は、以下のような構成をとることもできる。

〔１〕 刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面と重ねた状態で標本を

撮像する撮像工程と、

前記撮像により得られた標本画像を用いて、細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け工程と、

前記細胞の位置に選択的に刺激を与えて、当該位置にある前記分子のリンカーを開裂させる開裂工程と、

前記開裂によって前記表面から遊離した前記分子を、当該分子の標的捕捉部を介して前記細胞の構成成分に結合させる結合工程と、

を含む分析方法。

〔２〕前記標本は組織サンプルを含む、〔１〕に記載の分析方法。

〔３〕前記開裂工程において、前記細胞の位置以外の位置にある分子のリンカーが開裂しないように、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられる、〔１〕又は〔２〕に記載の分析方法。

〔４〕前記刺激が、光刺激である、〔１〕～〔３〕のいずれか一つに記載の分析方法。

〔５〕前記結合工程が、電場又は磁場又は遠心力の印可によって前記分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含む、〔１〕～〔４〕のいずれか一つに記載の分析方法。

〔６〕前記結合工程が、自然拡散によって前記分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含む、〔１〕～〔４〕のいずれか一つに記載の分析方法。

〔７〕前記結合工程が、前記分子と前記細胞の構成成分とを結合させるためのインキュベート工程を含む、〔１〕～〔６〕のいずれか一つに記載の分析方法。

〔８〕前記結合工程後に、前記分子と前記細胞の構成成分との結合体に対する分析を行う分析工程をさらに含む、〔１〕～〔７〕のいずれか一つに記載の分析方法。

〔９〕前記分析工程において、前記結合体に対するシーケンシング処理が行われる、〔８〕に記載の分析方法。

〔１０〕前記分析工程が、前記分析結果と前記標本画像とを用いて、前記関連付け工程における関連付け結果に基づき２次元マッピングを行う２次元マッピング工程を含む、〔８〕又は〔９〕に記載の分析方法。

〔１１〕刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面を有する分析用基板と、

前記分析用基板に重ねられた標本を撮像する撮像装置と、

前記撮像により得られた標本画像中の選択された細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け部と、

前記細胞の位置に選択的に刺激を与える刺激付与装置と、

を含み、

前記刺激によって前記表面から遊離した分子と前記細胞の構成成分とが前記分子の標的捕捉部を介して結合した結合体を分析対象として用いる、

分析システム。

〔１２〕前記標本は組織サンプルを含む、〔１１〕に記載の分析システム。

〔１３〕前記刺激付与装置が、前記細胞の位置以外の位置にある分子に含まれるリンカーを開裂させることなく、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられるように構成されている、〔１１〕又は〔１２〕に記載の分析システム。

〔１４〕前記刺激付与装置が光照射装置である、〔１１〕～〔１３〕のいずれか一つに記載の分析システム。

〔１５〕前記分析システムが、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子を前記細胞に向かって移動させるための電場又は磁場又は遠心力を印可する電場印可装置又は磁場印可装置又は遠心力印可装置を含む、〔１１〕～〔１４〕のいずれか一つに記載の分析システム。

〔１６〕前記分析システムが、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子が前記細胞の構成成分と結合することを促すためのインキュベーション装置をさらに含む、〔１１〕～〔１５〕のいずれ

か一つに記載の分析システム。

〔１７〕前記分析システムが、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子と前記細胞の構成成分との結合体を分析する分析装置をさらに含む、〔１１〕～〔１６〕のいずれか一つに記載の分析システム。

〔１８〕前記分析装置がシーケンサーである、〔１７〕に記載の分析システム。

〔１９〕前記分析システムが、前記分析装置による分析結果と前記撮像により得られた標本画像とを用いて、前記関連付け部による関連付け結果に基づき２次元マッピングを行う２次元マッピング部をさらに含む、〔１７〕又は〔１８〕に記載の分析システム。

〔２０〕開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されており、且つ、

前記バーコード配列が、当該バーコード配列を含む分子が固定されている位置に関する情報を与えるために用いられる、

分析用表面。

符号の説明

- [0099] １００ 分子
１０１ 分析用表面
１０２ 基板
１０３ 標本
１０４ 基板
１１０ 撮像素子
１２０ 制御部
１３０ 刺激付与装置

請求の範囲

- [請求項1] 刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面と重ねた状態で標本を撮像する撮像工程と、
- 前記撮像により得られた標本画像を用いて、細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け工程と、
- 前記細胞の位置に選択的に刺激を与えて、当該位置にある前記分子のリンカーを開裂させる開裂工程と、
- 前記開裂によって前記表面から遊離した前記分子を、当該分子の標的捕捉部を介して前記細胞の構成成分に結合させる結合工程と、
- を含む分析方法。
- [請求項2] 前記標本は組織サンプルを含む、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項3] 前記開裂工程において、前記細胞の位置以外の位置にある分子のリンカーが開裂しないように、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられる、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項4] 前記刺激が、光刺激である、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項5] 前記結合工程が、電場又は磁場又は遠心力の印可によって前記分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含む、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項6] 前記結合工程が、自然拡散によって前記分子を前記細胞に向かって移動させる移動工程を含む、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項7] 前記結合工程が、前記分子と前記細胞の構成成分とを結合させるためのインキュベート工程を含む、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項8] 前記結合工程後に、前記分子と前記細胞の構成成分との結合体に対する分析を行う分析工程をさらに含む、請求項1に記載の分析方法。
- [請求項9] 前記分析工程において、前記結合体に対するシーケンシング処理が行われる、請求項8に記載の分析方法。
- [請求項10] 前記分析工程が、前記分析結果と前記標本画像とを用いて、前記関

連付け工程における関連付け結果に基づき 2 次元マッピングを行う 2 次元マッピング工程を含む、請求項 8 に記載の分析方法。

[請求項11] 刺激によって開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されている表面を有する分析用基板と、

前記分析用基板に重ねられた標本を撮像する撮像装置と、

前記撮像により得られた標本画像中の選択された細胞の位置と当該位置にある分子のバーコード配列とを関連付ける関連付け部と、

前記細胞の位置に選択的に刺激を与える刺激付与装置と、

を含み、

前記刺激によって前記表面から遊離した分子と前記細胞の構成成分とが前記分子の標的捕捉部を介して結合した結合体を分析対象として用いる、

分析システム。

[請求項12] 前記標本は組織サンプルを含む、請求項 1 1 に記載の分析システム。

[請求項13] 前記刺激付与装置が、前記細胞の位置以外の位置にある分子に含まれるリンカーを開裂させることなく、前記細胞の位置に選択的に刺激が与えられるように構成されている、請求項 1 1 に記載の分析システム。

[請求項14] 前記刺激付与装置が光照射装置である、請求項 1 1 に記載の分析システム。

[請求項15] 前記分析システムが、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子を前記細胞に向かって移動させるための電場又は磁場又は遠心力を印可する電場印可装置又は磁場印可装置又は遠心力印可装置を含む、請求項 1 1 に記載の分析システム。

[請求項16] 前記分析システムが、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子が前記細胞の構成成分と結合すること

を促すためのインキュベーション装置をさらに含む、請求項 11 に記載の分析システム。

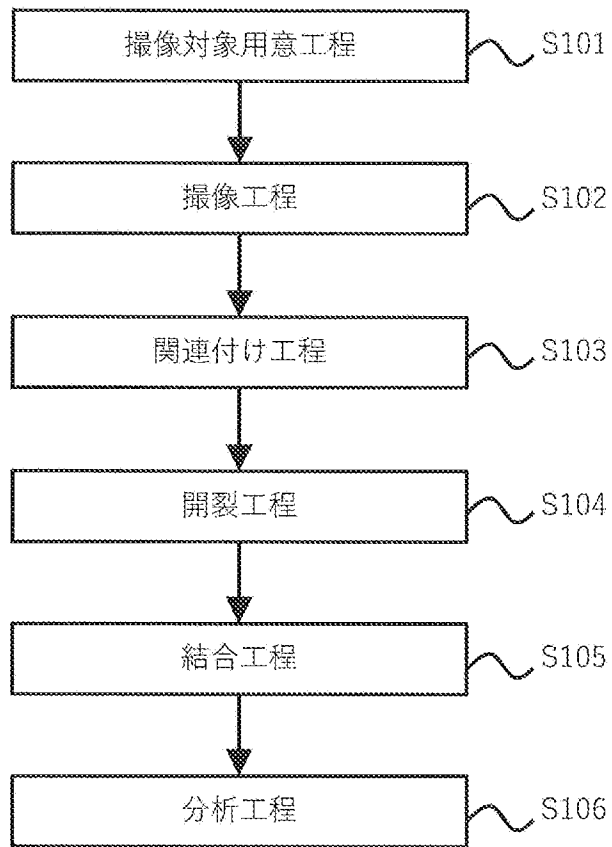
[請求項17] 前記分析システムが、前記刺激付与装置による刺激の付与によって前記表面から遊離した前記分子と前記細胞の構成成分との結合体を分析する分析装置をさらに含む、請求項 11 に記載の分析システム。

[請求項18] 前記分析装置がシーケンサーである、請求項 17 に記載の分析システム。

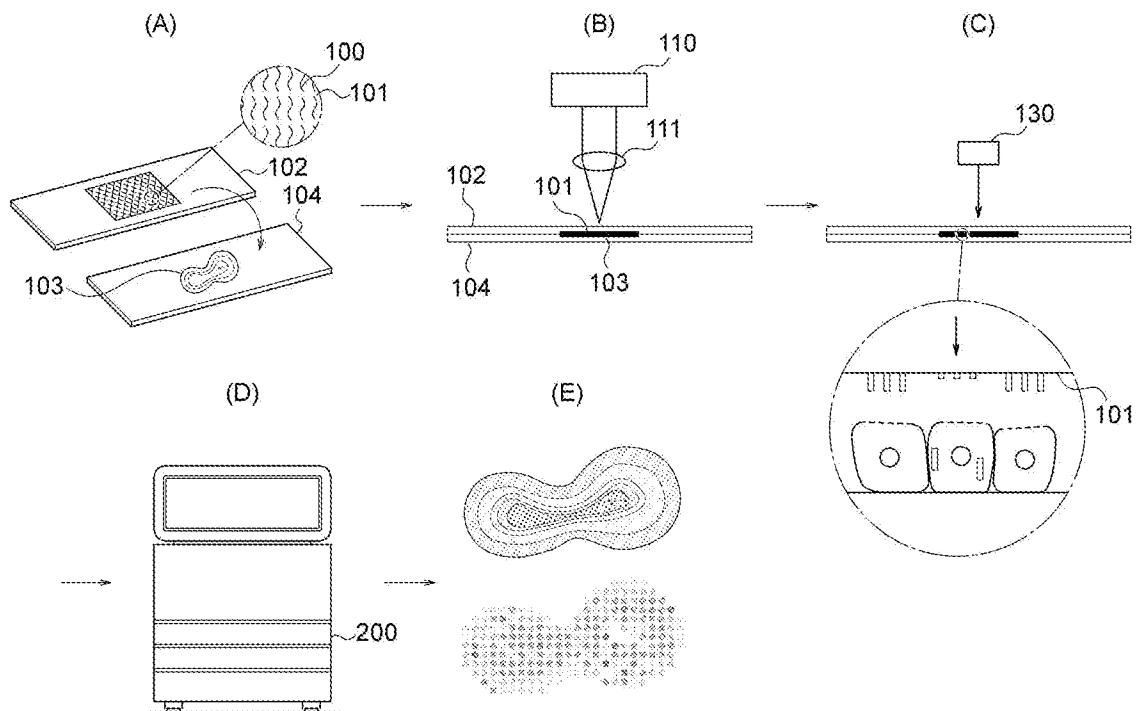
[請求項19] 前記分析システムが、前記分析装置による分析結果と前記撮像により得られた標本画像とを用いて、前記関連付け部による関連付け結果に基づき 2 次元マッピングを行う 2 次元マッピング部をさらに含む、請求項 17 に記載の分析システム。

[請求項20] 開裂可能なリンカーとバーコード配列と標的捕捉部とを含む分子が前記リンカーを介して固定されており、且つ、
前記バーコード配列が、当該バーコード配列を含む分子が固定されている位置に関する情報を与えるために用いられる、
分析用表面。

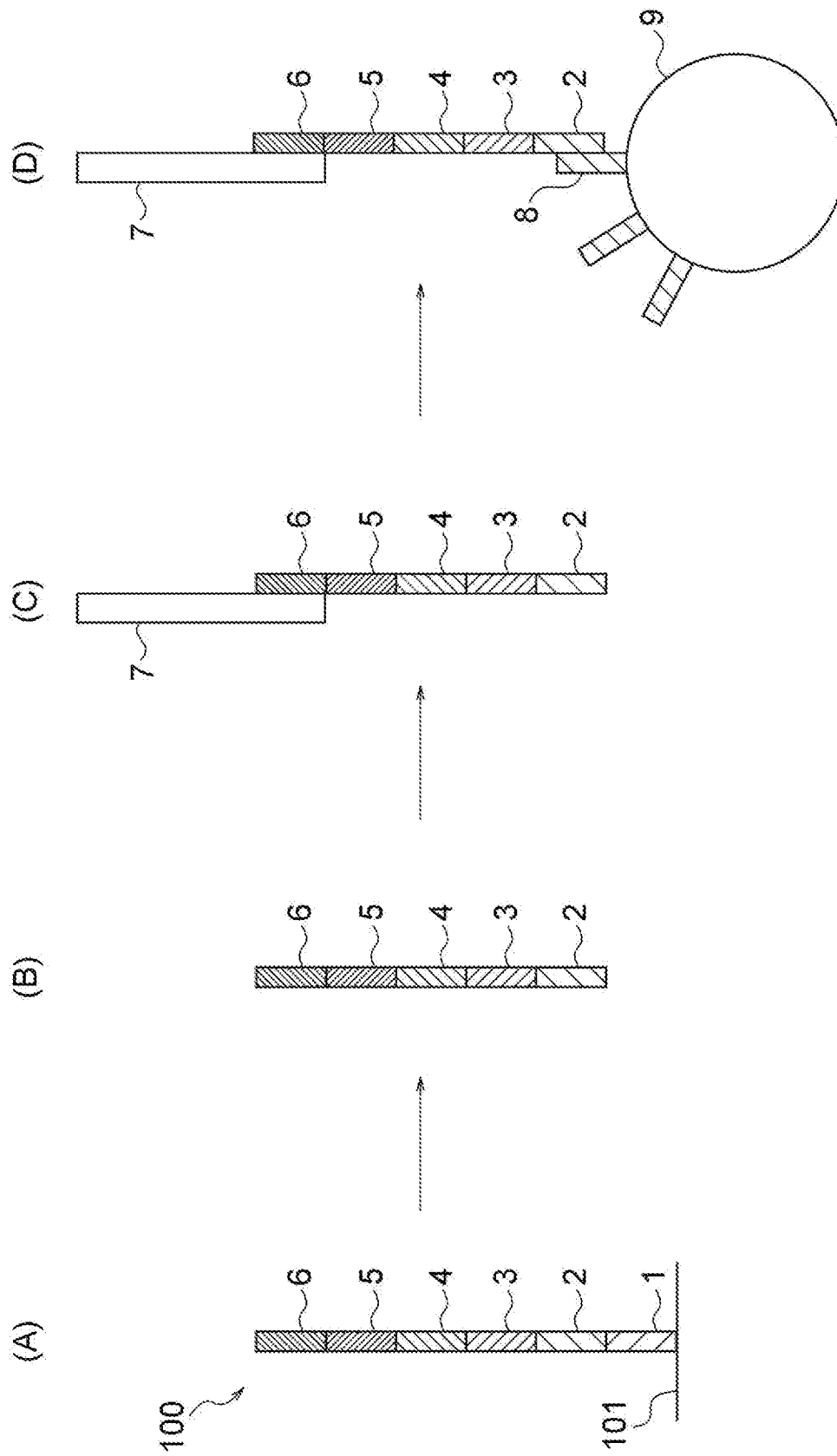
[図1]



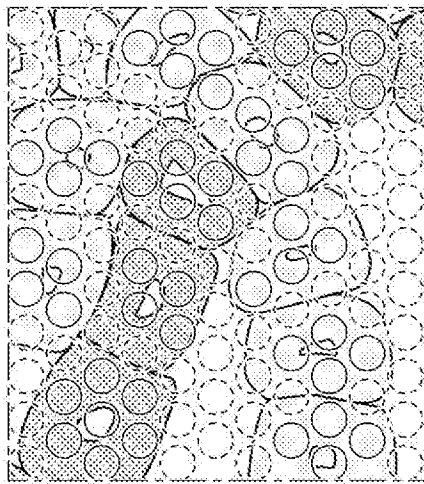
[図2]



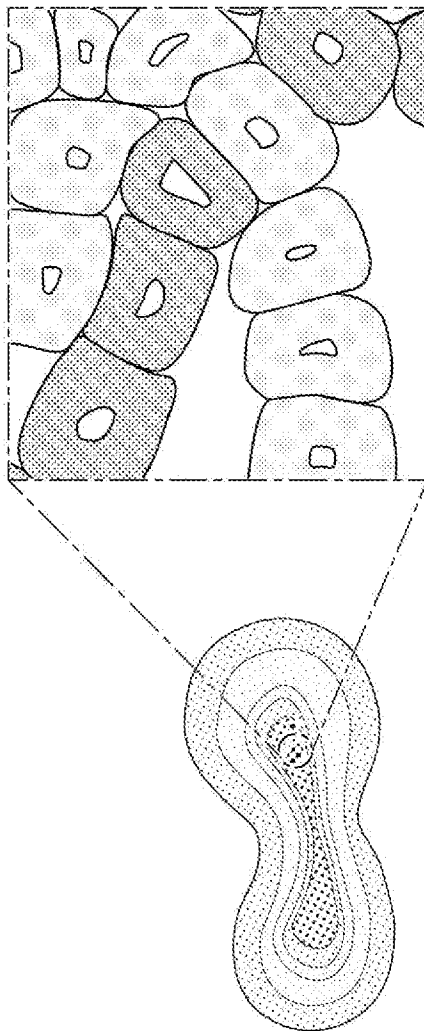
[図3]



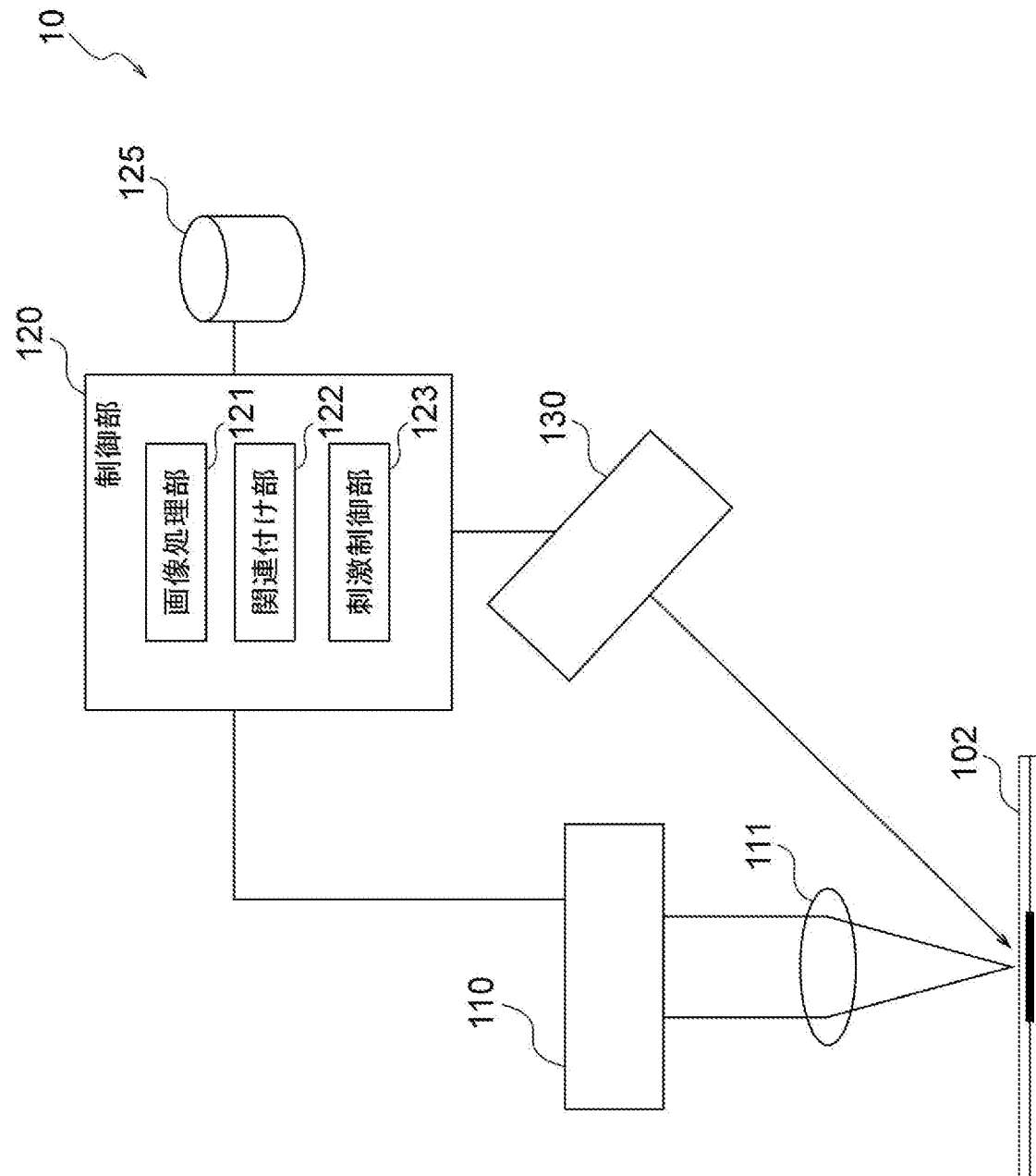
[図4]



○ 関連付けられる
○ 関連付けられない



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/004130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/6874 (2018.01) i, C12M1/34 (2006.01) i, G01N33/53 (2006.01) i
FI: C12Q1/6874Z, G01N33/53D, G01N33/53M, C12M1/34B

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)

Int.Cl. C12Q1/6874, C12M1/34, G01N33/53

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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/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	WO 2019/079399 A1 (DUKE UNIVERSITY) 25 April 2019 (2019-04-25), abstract, paragraphs [8], [10], [35], [121], [169], fig. 23	1-20
X	US 2018/0305681 A1 (SILICON VALLEY SCIENTIFIC, INC.) 25 October 2018 (2018-10-25), abstract, paragraph [0116], fig. 13	20
A	WO 2018/232396 A1 (THE JACKSON LABORATORY) 20 December 2018 (2018-12-20), entire text	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2021

Date of mailing of the international search report

06 April 2021

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/004130

WO 2019/079399 A1 25 April 2019

JP 2021-500012 A
abstract, paragraphs [0009], [0011],
[0014], [0093], [0141]
fig. 23

US 2018/0305681 A1 25 October 2018

(Family: none)

WO 2018/232396 A1 20 December 2018

JP 2020-523993 A
entire text

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6874(2018.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i FI: C12Q1/6874 Z; G01N33/53 D; G01N33/53 M; C12M1/34 B		
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）） C12Q1/6874; C12M1/34; G01N33/53		
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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用了電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/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	WO 2019/079399 A1 (DUKE UNIVERSITY) 25.04.2019 (2019-04-25) 要約、[8]、[10]、[35]、[121]、[169]、図23	1-20
X	US 2018/0305681 A1 (SILICON VALLEY SCIENTIFIC, INC.) 25.10.2018 (2018-10-25) 要約、[0116]、図13	20
A	WO 2018/232396 A1 (THE JACKSON LABORATORY) 20.12.2018 (2018-12-20) 全文	1-20
☐ 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 26.03.2021		国際調査報告の発送日 06.04.2021
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） 長谷川 強 4N 1783 電話番号 03-3581-1101 内線 3446

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/JP2021/004130

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2019/079399	A1	25.04.2019	JP 2021-500012 A 要約、[0009]、[0011]、[0014]、 [0093]、[0141]、図23	
US	2018/0305681	A1	25.10.2018	(ファミリーなし)	
WO	2018/232396	A1	20.12.2018	JP 2020-523993 A 全文	