

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-200446

(P2017-200446A)

(43) 公開日 平成29年11月9日(2017.11.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z	2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/52 (2006.01)	G O 1 N 33/52 B	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-92534 (P2016-92534)
 (22) 出願日 平成28年5月2日 (2016.5.2)

(71) 出願人 000003768
 東洋製罐グループホールディングス株式会社
 東京都品川区東五反田2丁目18番1号
 (71) 出願人 596132019
 株式会社荒川樹脂
 東京都荒川区荒川5丁目39番2号
 (74) 代理人 110002354
 特許業務法人平和国際特許事務所
 (72) 発明者 西塚 秀彦
 東京都品川区東五反田2-18-1 東洋製罐グループホールディングス株式会社内
 (72) 発明者 吉田 充裕
 東京都品川区東五反田2-18-1 東洋製罐グループホールディングス株式会社内
 最終頁に続く

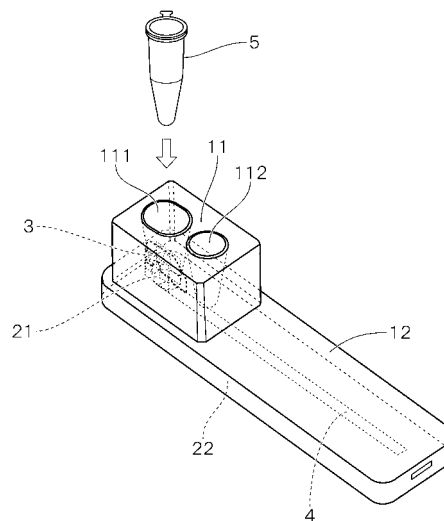
(54) 【発明の名称】 核酸クロマトグラフィー検査器具、核酸クロマトグラフィー検査キット、及び核酸クロマトグラフィー検査器具の使用方法

(57) 【要約】

【課題】 核酸クロマト法を行うにあたって、コンタミネーションを抑制すると共に、検出に用いる標的核酸を含むPCR反応液量を低減させ、検出精度を向上させることを可能とする。

【解決手段】 遺伝子検査用のストリップ4を保持し、該ストリップにより標的核酸を検出する核酸クロマトグラフィー検査器具であって、PCR用のチューブ5を挿入可能な第一の注入口111とクロマトグラフィー展開液を注入するための第二の注入口112とを備えた注入口11、ストリップの検出領域を覆う展開部12、チューブを切開する切開手段3を支持する切開手段支持部21、及び、ストリップを保持するためのストリップ保持部22を有する核酸クロマトグラフィー検査器具により核酸クロマト法を行う。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

遺伝子検査用のストリップを保持し、該ストリップにより標的核酸を検出する核酸クロマトグラフィー検査器具であって、

PCR用のチューブを挿入可能な第一の注入口とクロマトグラフィー展開液を注入するための第二の注入口とを備えた注入部、前記ストリップの検出領域を覆う展開部、前記チューブを切開する切開手段を支持する切開手段支持部、及び、前記ストリップを保持するためのストリップ保持部を有する

ことを特徴とする核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 2】

前記注入部、及び、前記展開部を有する本体部と、
前記切開手段支持部、及び、前記ストリップ保持部を有し、かつ、前記本体部と嵌合する底蓋と、を備えた

ことを特徴とする請求項 1 記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 3】

前記第一の注入口と前記第二の注入口が、前記ストリップの展開開始領域の上方に、前記ストリップの長手方向に並んで備えられたことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 4】

前記切開手段の少なくとも一部が、前記第一の注入口の中に配置されるように前記切開手段支持部が備えられたことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 5】

少なくとも前記展開部及び/又は前記ストリップ保持部が透明部材からなることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 6】

前記切開手段が、前記第一の注入口に挿入された前記チューブを切開する切開刃と、前記ストリップに接触するストリップ接触部を有することを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 7】

前記第一の注入口の水平断面の開口が、トラック形状となるように形成されたことを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 8】

前記ストリップ保持部が、前記ストリップを固定するための複数の突起部からなる位置決め柱を有することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具が、前記ストリップの短手方向に複数個配置され、前記核酸クロマトグラフィー検査器具と同数個連結される連結式チューブの各チューブを、それぞれ前記核酸クロマトグラフィー検査器具における前記第一の注入口に同時に挿入可能に連結されてなる

ことを特徴とする核酸クロマトグラフィー検査器具。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具と、
少なくとも、一又は二以上のプライマーセットからなるプライマーミックスを含む PCR 用反応試薬と、

少なくとも標識用色素及び緩衝液を含むクロマトグラフィー展開液と、を含む

ことを特徴とする核酸クロマトグラフィー検査用キット。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の核酸クロマトグラフィー検査器具の前記第一の注入口

10

20

30

40

50

に、標的核酸を含む反応液が封入された前記チューブを挿入して、前記切開手段により前記チューブを切開し、

前記チューブから反応液を前記ストリップに浸透させ、展開させることによって、反応液中の標的核酸を、前記ストリップに固定化されている相補的な塩基配列を有するプローブとハイブリダイズさせ、

所定時間の経過後、前記第二の注入口からクロマトグラフィー展開液を注入して、該展開液に含まれる標識用色素を、プローブにハイブリダイズした標的核酸に結合させる

ことを特徴とする核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、核酸クロマトグラフィー技術に関し、特に、プローブが固定化された遺伝子検査用のストリップを用いて標的核酸を検出する核酸クロマトグラフィー検査器具、核酸クロマトグラフィー検査キット、及び核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、核酸クロマト法を行うにあたっては、一般的に、プローブが固定化された遺伝子検査用のストリップを用いて、標的核酸をストリップに固定化されたプローブにハイブリダイズ（相補的に結合）させることによって、検出が行われていた。

20

具体的には、例えば、検査対象の試料からゲノムDNAを抽出し、PCR（polymerase chain reaction）法などにより標的核酸を増幅して得られた増幅産物を含む反応液に遺伝子検査用ストリップを浸漬して、増幅産物をストリップに展開させてプローブとハイブリダイズさせ、プローブとハイブリダイズした増幅産物に結合する標識用色素を目視で確認することによって、標的核酸の検出が行われていた。

【0003】

このとき、抽出したゲノムDNAをPCR反応試薬と共にPCRチューブに入れてPCRを行った後、標識用色素を含むクロマトグラフィー展開液をPCRチューブに混合して、増幅産物の着色が行われていた。そして、図5に示すように、このPCRチューブ内の反応液に遺伝子検査ストリップを浸漬して、反応液を毛細管現象によってストリップに展開させ、ストリップに固定化されたプローブにハイブリダイズした増幅産物により示される着色されたラインを確認することが行われていた。

30

【0004】

しかし、このような従来の方法では、増幅産物のストリップへの展開が、開放形で行われることから、コンタミネーションの虞があるという問題があった。

このようなコンタミネーションを抑制するための技術として、特許文献1に記載の分析物検出デバイスを挙げることができる。このデバイスによれば、準密閉系となるように構成されたデバイス内において、増幅産物をストリップに展開させることが可能とされている。

具体的には、液体サンプルが入った容器をデバイスの空洞に挿入することで、容器の下部が穿孔されて容器内のサンプルが放出されてストリップに到達し、展開されるようになっている。このようなデバイスは、上述した従来核酸クロマト法のプロトコルを行う場合には、好適に用いることが可能である。

40

【0005】

【特許文献1】特表2015-512250号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ところで、このようなデバイスを用いる方法では、PCRなどによる増幅産物を着色した後、これをストリップに展開していることから、着色が不安定で検出精度が十分でな

50

い場合があるという問題があった。このため、PCR反応液を比較的多く使用することが必要となり、PCR反応試薬量が多量に必要なという問題があった。

【0007】

このような問題を解消する方法として、増幅産物を含むPCR反応液を先にストリップに展開した後に、標識用色素を含むクロマトグラフィー展開液をストリップに後から展開し、プローブとハイブリダイズした増幅産物に対して着色を行うプロトコルを用いることが考えられる。このようなプロトコルによれば、先にプローブと増幅産物とのハイブリダイゼーションを行い、その後、標識用色素を増幅産物に結合させることができるため、ハイブリダイゼーションの精度をより向上でき、安定的な着色が行われて、検出精度を向上させることが可能となる。

10

しかしながら、上述した従来のデバイスは、PCR反応液とクロマトグラフィー展開液を別々に展開する場合に適したものではなく、このようなプロトコルで使用することは、困難であった。

【0008】

そこで、本発明者らは、鋭意研究して、核酸クロマト法を準密閉系で行うことが可能であり、かつ、PCR反応液をストリップに展開させた後に、クロマトグラフィー展開液を別途ストリップに展開させることの可能な核酸クロマトグラフィー検査器具を開発し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、コンタミネーションを抑制できると共に、検出に使用する標的核酸を含むPCR反応液量を低減でき、検出精度を向上させることの可能な核酸クロマトグラフィー検査器具、核酸クロマトグラフィー検査キット、及び核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法の提供を目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために、本発明の核酸クロマトグラフィー検査器具は、遺伝子検査用のストリップを保持し、該ストリップにより標的核酸を検出する核酸クロマトグラフィー検査器具であって、PCR用のチューブを挿入可能な第一の注入口とクロマトグラフィー展開液を注入するための第二の注入口とを備えた注入部、前記ストリップの検出領域を覆う展開部、前記チューブを切開する切開手段を支持する切開手段支持部、及び、前記ストリップを保持するためのストリップ保持部を有する構成としてある。

30

【0010】

また、本発明の核酸クロマトグラフィー検査キットは、上記の核酸クロマトグラフィー検査器具と、少なくとも、一又は二以上のプライマーセットからなるプライマーミックスを含むPCR用反応試薬と、少なくとも標識用色素及び緩衝液を含むクロマトグラフィー展開液とを含む構成としてある。

【0011】

また、本発明の核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法は、上記の核酸クロマトグラフィー検査器具の前記第一の注入口に、標的核酸を含む反応液が封入された前記チューブを挿入して、前記切開手段により前記チューブを切開し、前記チューブから反応液を前記ストリップに浸透させ、展開させることによって、反応液中の標的核酸を、前記ストリップに固定化されている相補的な塩基配列を有するプローブとハイブリダイズさせ、所定時間の経過後、前記第二の注入口からクロマトグラフィー展開液を注入して、該展開液に含まれる標識用色素を、プローブにハイブリダイズした標的核酸に結合させる方法としてある。

40

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、核酸クロマト法を行うにあたって、コンタミネーションを抑制できると共に、検出に使用する標的核酸を含むPCR反応液量を低減でき、さらに検出精度を向上させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 3 】

【図 1】本発明の実施形態に係る核酸クロマトグラフィー検査器具の外観を示す斜視図である。

【図 2】本発明の実施形態に係る核酸クロマトグラフィー検査器具の平面図及び側面図である。

【図 3】本発明の実施形態に係る核酸クロマトグラフィー検査器具の底蓋の平面図及び側面図である。

【図 4】本発明の実施形態に係る核酸クロマトグラフィー検査器具の切開手段の側面図である。

【図 5】従来の核酸クロマト法において PCR チューブと遺伝子検査ストリップを使用するようすを示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

以下、本発明の核酸クロマトグラフィー検査器具、核酸クロマトグラフィー検査キット、及び核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法の好ましい実施形態について、図面を参照しつつ説明する。

まず、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具、核酸クロマトグラフィー検査キット、及び核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法において適用する核酸クロマト法のプロトコルについて説明する。

核酸クロマト法は、標的核酸が遺伝子検査用のストリップ内を一定方向に移動（展開）することにより、ストリップにスポットされているプローブに補足されるとともに、プローブが固定化されたスポットにおいて標的核酸が濃縮されることで、その標的核酸に結合した標識用色素により目視できるレベルまでの発色を得て、標的核酸を検出するものである。

20

【 0 0 1 5 】

本実施形態において適用する核酸クロマト法のプロトコル（以下、本適用プロトコルと称する場合がある）では、まず、標的核酸の増幅処理を PCR 法などによって行う。すなわち、この PCR 法などによる増幅産物は、標的核酸からなる。

具体的には、検査対象生物のゲノム DNA における標的核酸を増幅させるためのプライマーセットを含む PCR 反応試薬を PCR チューブへ注入する。プライマーセットとしては、一又は二以上のプライマーセットからなるプライマーミックスを用いることができ、複数の標的核酸を同時に増幅するマルチプレックス PCR を行うこともできる。

30

また、PCR 反応試薬には、プライマーセットの他、核酸合成基質（例えば、dNTP mixture (dCTP、dATP、dTTP、dGTP)）、核酸合成酵素（例えば、EX Taq Hot Start DNA polymerase）、緩衝液等が含まれる。

そして、PCR チューブには、このような PCR 反応試薬と、生体試料から抽出されたゲノム DNA、及び残りの成分として水を含む溶液が注入され、この溶液が PCR に使用する反応液として用いられる。

【 0 0 1 6 】

ゲノム DNA の抽出は、CTAB 法 (Cetyl trimethyl ammonium bromide) による方法や DNA 抽出装置を用いる方法など、一般的な手法により行うことができる。

40

また、PCR 装置としては、一般的なサーマルサイクラーなどを用いることができる。PCR 反応は、例えば以下のような反応条件で行うことができるが、適宜変更して実施可能であり、全体を 15 ~ 30 分程度で行っても良い。

(a) 95 2 分、(b) 95 (DNA 変性工程) 10 秒、(c) 60 (アニーリング工程) 20 秒、(d) 72 (DNA 合成工程) 90 秒 ((b) ~ (d) を 40 サイクル)、(e) 72 2 分

【 0 0 1 7 】

次に、PCR によって得られた増幅産物（標的核酸）を含む PCR 反応液を、遺伝子検査ストリップに展開させる。

50

遺伝子検査ストリップは、増幅産物を捕捉するためのプローブが固定化された細長の部材であり、溶液が毛細管現象によって部材全体に浸透し、展開しやすいように形成される。このため、ストリップの部材としてはセルロースメンブランなどのセルロース等が好適に用いられる。また、ストリップに強度を持たせて取り扱いを容易にするために、その一方の面に樹脂を接着したものを好適に用いることができる。

【0018】

遺伝子検査ストリップは、一又は二以上のプローブが、ストリップの特定の位置において、ストリップの短手方向にライン状に固定化された検出領域と、PCR反応液やクロマトグラフィー展開液を浸透させ（染み込ませ）、展開させ始める部分である展開開始領域とからなる。なお、展開開始領域がストリップにおけるごく僅かな部分である場合もあり得る。

10

【0019】

検出領域には、プローブが固定化された一又は二以上の領域（スポット）がストリップの短手方向にライン状に形成（スポットティング）されている。このプローブが固定化されたラインの数は、特に限定されず、例えば8～12個等のラインが形成されたものなどを好適に用いることができる。

このようなライン状に固定化されたプローブにハイブリダイズした増幅産物に対して、例えば青色の標識用色素が結合すると、ストリップの検出領域上において、青色のラインを目視によって検出できる。また、検出領域には、プローブが固定化されたラインの位置を明確に確認できるようにするために、その他の色のライン、例えば赤色のラインが、位置決めマーカーとして好適に配置される。標識用色素は、特に限定されないが、例えばアビジン・ビオチンシステムによるものを好適に用いることができる。

20

【0020】

展開開始領域は、PCR反応液とクロマトグラフィー展開液を最初に染み込ませる部分である。展開開始領域は、検出領域に隣接して連続して形成されており、展開開始領域に染み込んだ液体は、毛細管現象によって検出領域へ展開する。

また、液体をストリップに染み込み易くさせるため、吸水促進領域を展開開始領域と反対側の検出領域に隣接して連続して形成することも好ましい。吸水促進領域は、例えばストリップ上に吸水パッドやセルロース等の部材を積層して構成でき、このような吸水部材によってストリップに展開した水分の吸水を促進させることができる。また、このようにストリップに部材を積層して厚みを増加させた領域を形成することによって、ストリップをより取り扱い易くすることができる。

30

【0021】

このような遺伝子検査ストリップにおける展開開始領域に対して、まずPCR反応液を染み込ませる。PCR反応液は、展開開始領域から検出領域へ展開する。そして、検出領域に固定化されたプローブと相補的な塩基配列を有する増幅産物がPCR反応液に含まれている場合、そのプローブと増幅産物がハイブリダイズする。

また、複数種類のプローブがストリップ上に個別にライン状に固定化され、各プローブにそれぞれハイブリダイズする増幅産物がマルチプレックスPCRにより得られてPCR反応液に含まれている場合も同様に、それぞれ対応するプローブと増幅産物がハイブリダイズする。

40

【0022】

次に、遺伝子検査ストリップの展開開始領域に対して、クロマトグラフィー展開液を染み込ませる。

クロマトグラフィー展開液は、PCR反応液が検出領域又は吸水促進領域まで十分に展開した後に染みこませることが望ましい。これにより、クロマトグラフィー展開液を検出領域へ十分に染みこませることが可能となる。クロマトグラフィー展開液を展開開始領域へ染み込ませるのは、PCR反応液が検出領域へ展開した後、例えば5～10分程度経過した後に、行うことが好ましい。

【0023】

50

クロマトグラフィー展開液には、少なくとも標識用色素（着色ビーズ、例えばアビジン・ビオチンシステムによるものなど）と緩衝液が含まれる。この標識用色素は、増幅産物と結合することができる。展開液は、展開開始領域から検出領域へ展開する。そして、展開液に含まれる標識用色素がプローブとハイブリダイズした増幅産物と結合することによって、プローブが固定化された位置に着色されたラインが現れる。

このように、ストリップ上の着色されたラインを確認することによって、標的核酸を検出することができる。

【0024】

このような核酸クロマト法のプロトコルによれば、増幅産物を含むPCR反応液を先にストリップに展開した後に、標識用色素を含むクロマトグラフィー展開液をストリップに後から展開して、プローブとハイブリダイズした増幅産物に対して着色を行うことができる。このため、着色されたラインを安定的に得ることができ、検出精度を向上させることが可能となる。

その理由は、本適用プロトコルでは、先にプローブと増幅産物とのハイブリダイゼーションを行い、その後、標識用色素を増幅産物に結合させるため、ハイブリダイゼーションよりも先に標識用色素を増幅産物に結合させた場合に想定されるハイブリダイゼーションの立体障害が抑制され、ハイブリダイゼーションの精度をより向上できるためであると考えられる。

【0025】

次に、図1を参照して、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具の概略について説明する。図1は、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具の斜視図を示している。

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、同図に示すように、PCRチューブ5を挿入可能な第一の注入口111、及び、クロマトグラフィー展開液を注入するための第二の注入口112を備えた注入部11と、遺伝子検査ストリップ4における検出領域を覆う展開部12と、PCRチューブ5を切開する切開手段3を支持する切開手段支持部21と、遺伝子検査ストリップ4を保持するためのストリップ保持部22を有している。

また、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、注入部11及び展開部12を有する本体部1と、切開手段支持部21及びストリップ保持部22を有し、かつ、本体部1と嵌合する底蓋2とを備えた構成とすることも好ましい。

【0026】

また、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、本体部1と、底蓋2とを別体に構成するのではなく、一体成形によって形成することも好ましい。

この場合、該検査器具のいずれかの壁面において、遺伝子検査ストリップ4を挿入可能なスリットを設けることが好ましい。スリットは、例えば該検査器具の4つの側壁のいずれかに設けることができる。そして、遺伝子検査ストリップ4は、スリットを介して該検査器具の内部に差し込まれて、ストリップ保持部22に配置される。図1は、このような核酸クロマトグラフィー検査器具を示している。

【0027】

このように、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具では、PCRチューブ5を挿入可能な第一の注入口111と、クロマトグラフィー展開液を注入するための第二の注入口112とが、別個に構成されている。このため、上述したPCR反応液を先にストリップに展開した後に、標識用色素を含むクロマトグラフィー展開液をストリップに後から展開する本適用プロトコルを好適に行うことが可能となっている。

【0028】

また、第一の注入口111と第二の注入口112は、遺伝子検査ストリップ4における展開開始領域の上方に、該ストリップの長手方向に並んで形成されている。このため、第一の注入口111からPCRチューブ5を挿入し、PCRチューブ5を切開手段3により切開することで、PCRチューブ5から反応液をストリップに染み込ませ、展開させることができると共に、その後、第二の注入口112からピペットなどを用いてクロマトグラ

10

20

30

40

50

フィー展開液を注入することで、標識用色素をストリップに染み込ませて展開させ、先に展開されてプローブにハイブリダイズしている増幅産物に標識用色素を結合させることができる。このため、本実施形態に適用する上記プロトコルを好適に行うことが可能になっている。

【0029】

なお、第一の注入口111と第二の注入口112の並び順は、図1に限定されず、これらを入れ替えた配置にしても良い。

また、第一の注入口111と第二の注入口112をこのように遺伝子検査ストリップ4の長手方向に並んで形成することによって、後述する連結式PCRチューブに対応した、連結型核酸クロマトグラフィー検査器具を構成するために適したものにすることも可能となる。

10

【0030】

また、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具において、遺伝子検査ストリップ4の検出領域は、目視によって容易に確認可能にすることが好ましい。このため、遺伝子検査ストリップ4における検出領域を覆う展開部12か、又は、遺伝子検査ストリップ4を保持するためのストリップ保持部22の少なくともいずれかを透明部材からなるものとするのが好ましい。勿論、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具における注入部11、展開部12、切開手段支持部21、及びストリップ保持部22の全てを透明部材からなるものとすることもできる。このような透明部材としては、例えばポリスチレンやポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート（PET）、メチルメタクリレート（MMA）などのアクリル樹脂等を好適に用いることができる。

20

【0031】

このような本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具によれば、一般的な遺伝子検査ストリップ4やPCRチューブ5を用いて、核酸クロマト法を上述した本適用プロトコルで行うことができ、より高い精度で実施することが可能となる。

【0032】

次に、図2～4を参照して、本体部1と、底蓋2とを別体に構成した核酸クロマトグラフィー検査器具について、詳細に説明する。図2は、本実施形態に係る核酸クロマトグラフィー検査器具の平面図及び側面図であり、図3は、同検査器具の底蓋の平面図及び側面図であり、図4は、同検査器具の切開手段の側面図である。

30

【0033】

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、図2に示すように、第一の注入口111及び第二の注入口112を備えた注入部11並びに展開部12を有する本体部1と、PCRチューブ5を切開する切開手段3を支持する切開手段支持部21及び遺伝子検査ストリップ4を保持するためのストリップ保持部22を有し、かつ、本体部1と嵌合する底蓋2とを備えている。

また、切開手段支持部21は、切開手段3の少なくとも一部が、第一の注入口111の中に配置されるように備えられている。

【0034】

PCRチューブ5の内部には、PCRによって得られた増幅産物（標的核酸）が充填されている。PCRチューブ5は、PCRを行った後、蓋を開けることなく、そのまま第一の注入口111に押し込まれる。

40

このとき、PCRチューブ5は、切開手段3により切断あるいは穿孔、切開等されて、PCRチューブ5の底部や側面等において割れ目や開口が生じる。そして、PCRチューブ5内の反応液は、遺伝子検査ストリップ4へと流れ込む。これにより、PCR反応液が遺伝子検査ストリップ4に染み込んで、展開していく。

【0035】

このように、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、PCRチューブ5の蓋を開けることなく、その底部や側面等に割れ目を入れることなどによって、反応液をストリップに展開させることができる。このとき、該検査器具は、PCRチューブ5を第一の

50

注入口 1 1 1 に挿入することで、第一の注入口 1 1 1 の開口が閉塞され、第二の注入口 1 1 2 のみが開口する、準密閉系となっている。このため、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具によれば、コンタミネーションのリスクを低減することが可能になっている。

また、第二の注入口 1 1 2 の開口の大きさを、第一の注入口 1 1 1 の開口の大きさよりも小さくすることが好ましい。これによって、コンタミネーションのリスクをより低減することが可能となる。

【 0 0 3 6 】

第一の注入口 1 1 1 の形状は、特に限定されないが、例えば下細りの略円錐柱や略楕円錐柱等に形成することができ、第一の注入口 1 1 1 の水平面の開口は、例えば真円になるように形成することができる。同様に、第二の注入口 1 1 2 の形状も、特に限定されず、例えば下細りの略円錐柱などに形成することができ、第二の注入口 1 1 2 の水平面の開口は、例えば真円になるように形成することができる。

10

【 0 0 3 7 】

また、第一の注入口 1 1 1 の中心軸が、鉛直方向に対して斜めになるように、第一の注入口 1 1 1 を形成することもできる。例えば、該中心軸を遺伝子検査ストリップ 4 の長手方向で検出領域に対して反対側に傾けて第一の注入口 1 1 1 を形成し、この傾けた第一の注入口 1 1 1 に PCR チューブ 5 を斜めに挿入するようにして、切開手段 3 による PCR チューブ 5 の切開位置を適宜調整しても良い。

なお、第二の注入口 1 1 2 の中心軸についても同様に、鉛直方向に対して斜めになるように、第二の注入口 1 1 2 を形成することも可能である。

20

【 0 0 3 8 】

また、第一の注入口 1 1 1 の水平面の開口は、トラック形状（陸上競技のトラックに類似する形状）となるように形成することが好ましく、例えば、対向する直線状の 2 辺と対向する 2 つの半円とからなる形状（第一の形状）とすることが好ましい。また、このトラック形状には、対向する直線状の 2 辺と対向する内側に凸状の 2 つの半円とからなる形状（第二の形状）が含まれていても良い。

【 0 0 3 9 】

第一の注入口 1 1 1 をこのように形成すると、PCR チューブ 5 を押し込んで切開手段 3 によって切開するとき、PCR チューブ 5 を第一の注入口 1 1 1 内に押し込むにつれて、PCR チューブ 5 が、直線状の 2 辺側の面（上記第一の形状の場合）、あるいは、内側に凸状の 2 つの半円側の面（上記第二の形状の場合）によって圧縮され、切開して生じた割れ目をより大きく開くことができ、反応液を PCR チューブ 5 から外へ流れ出易くすることが可能となる。

30

【 0 0 4 0 】

また、第一の注入口 1 1 1 と第二の注入口 1 1 2 は、その形状や大きさ、高さ等を異なるものとするのも好ましい。第一の注入口 1 1 1 と第二の注入口 1 1 2 をこのように異なる形態にすることにより、例えば第二の注入口 1 1 2 を PCR チューブ 5 が挿入できない大きさにして、PCR チューブ 5 の誤挿入を防止することなどが可能となる。

【 0 0 4 1 】

なお、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具において、第一の注入口 1 1 1 及び / 又は第二の注入口 1 1 2 にアルミシールを貼付して、使用に際してこれを剥がすようにすることもできる。

40

【 0 0 4 2 】

ストリップ保持部 2 2 には、図 3 に示すように、遺伝子検査ストリップ 4 を固定するための複数の突起部からなる位置決め柱 2 2 1 を形成することが好ましい。その個数は特に限定されないが、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具内で遺伝子検査ストリップ 4 が移動しないように、底蓋 2 上に対向して複数設けることが好ましい。同図の例では、6 セット 1 2 個の位置決め柱 2 2 1 が形成されている。

【 0 0 4 3 】

50

切開手段 3 は、第一の注入口 1 1 1 内で PCR チューブ 5 を切開可能なものであれば良く、特に限定されない。切開手段 3 として、例えば、金属刃、金属針、プラスチック刃、プラスチック針等を用いることができる。また、プラスチックによって形成する場合には、切開手段支持部 2 1 と一体成形することも好ましい。

【 0 0 4 4 】

切開手段 3 として、金属刃やプラスチック刃等の刃物を用いる場合には、例えば、図 4 に示すように、第一の注入口 1 1 1 に挿入された PCR チューブ 5 を切開する切開刃 3 1 と、遺伝子検査ストリップ 4 に接触するストリップ接触部 3 2 を有するものとするのが好ましい。

このように金属刃などにストリップ接触部 3 2 を設けると、切開された PCR チューブ 5 から流れ出た PCR 反応液が、このストリップ接触部 3 2 を介して遺伝子検査ストリップ 4 に移動でき、該ストリップに染み込み易くすることができるため、該ストリップへの展開をより確実にを行うことが可能となる。

【 0 0 4 5 】

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具において、注入部 1 1 は略直方体状に形成され、展開部 1 2 は内部に遺伝子検査ストリップ 4 を保持できる程度の薄厚かつ長尺に形成されている。注入部 1 1 と展開部 1 2 をこのように形成することで、該検査器具の容積を小さくすることができる。ただし、注入部 1 1 と展開部 1 2 の形状はこれらに限定されるものではなく、注入部 1 1 を例えば略楕円柱状に形成したり、あるいは展開部 1 2 をより厚く形成したりすることも可能である。

【 0 0 4 6 】

次に、上述した核酸クロマトグラフィー検査器具を複数連結した構成の検査器具について説明する。

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、上述した核酸クロマトグラフィー検査器具が、遺伝子検査ストリップ 4 の短手方向に複数個結合した状態で配置され、核酸クロマトグラフィー検査器具と同数個連結されてなる連結式チューブの各チューブを、それぞれ核酸クロマトグラフィー検査器具における第一の注入口 1 1 1 に同時に挿入可能に連結されていることを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具は、上述した核酸クロマトグラフィー検査器具を短手方向に例えば 8 個連結して形成したものとすることが好ましい。このような連結型核酸クロマトグラフィー検査器具を用いれば、一般的に使用されている 8 連式の PCR チューブを用いて 8 つの PCR を同時に実行し、それぞれの PCR 反応液について標的核酸の検出を同時に行うことが可能となる。

【 0 0 4 8 】

このように、連結型核酸クロマトグラフィー検査器具によれば、複数の検査を行う場合の処理の手間を低減でき、検体の取り違いなどが生じるリスクを低減することが可能となる。また、このような複数処理によれば、コスト削減に寄与することも可能となる。

なお、連結する核酸クロマトグラフィー検査器具の個数は 8 個に限定されず、4 個や 1 2 個など、その他の個数にすることができることは言うまでもない。

【 0 0 4 9 】

以上説明したように、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具によれば、従来の開放形の核酸クロマト法に比較して、PCR 反応液の飛散などによるコンタミネーションのリスクを低減でき、また PCR 反応液の揮発などによる検出精度の不安定性を解消することが可能となる。

また、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具によれば、上述した従来の準密閉系のデバイスに比較して、PCR 反応液をストリップに展開させた後に、クロマトグラフィー展開液をストリップに展開させるという本適用プロトコルに適したものにすることができ、検出精度をより向上させることが可能となっている。

さらに、連結型核酸クロマトグラフィー検査器具とすることによって、処理の手間や検

10

20

30

40

50

体の取り違いなどが生じるリスクを低減することができ、さらにコスト削減に寄与することも可能となる。

【0050】

また、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査キットとしては、上述した核酸クロマトグラフィー検査器具と、少なくとも、一又は二以上のプライマーセットからなるプライマーミックスを含むPCR用反応試薬と、少なくとも標識用色素及び緩衝液を含むクロマトグラフィー展開液とを含むものとするのが好ましい。

【0051】

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査キットをこのような構成にすれば、PCRを容易に実行して、PCR反応液をストリップに展開させ、その後にクロマトグラフィー展開液をストリップに展開させることができる。このため、プローブとハイブリダイズした増幅産物に対して着色を行うことができ、検出精度を向上させることが可能となる。

10

【0052】

また、本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法としては、上述した核酸クロマトグラフィー検査器具の第一の注入口111に、標的核酸を含む反応液が封入されたPCRチューブ5を挿入して、切開手段3によりPCRチューブ5を切開し、PCRチューブ5から反応液を遺伝子検査ストリップ4に浸透させ、展開させることによって、反応液中の標的核酸を、遺伝子検査ストリップ4に固定化されている相補的な塩基配列を有するプローブとハイブリダイズさせ、所定時間の経過後、第二の注入口112からクロマトグラフィー展開液を注入して、該展開液に含まれる標識用色素を、プローブにハイブリダイズした標的核酸に結合させる方法とするのが好ましい。

20

【0053】

本実施形態の核酸クロマトグラフィー検査器具の使用法をこのような構成にすれば、準密閉系の核酸クロマトグラフィー検査器具を用いて、最初にPCRチューブからPCR反応液をストリップに容易に展開させることができる。そして、その後に、クロマトグラフィー展開液を注入することで、これをストリップに展開させることができる。

このため、先に増幅産物をストリップ上のプローブにハイブリダイズさせた後に、この増幅産物に標識用色素を結合させ、この標識用色素によって示される着色されたラインを視認することで標的核酸を検出することができる。したがって、ハイブリダイゼーションの精度をより向上でき、安定的な着色が行われて、検出精度を向上させることが可能となる。

30

【0054】

以上、本発明について、好ましい実施形態を示して説明したが、本発明は、上記実施形態に限定されるものではなく、本発明の範囲で種々の変更実施が可能であることは言うまでもない。

例えば、一個の核酸クロマトグラフィー検査器具内に複数の遺伝子検査ストリップを保持可能にして、それぞれに対応する第一の注入口と第二の注入口を備えた検査器具にするなど適宜変更することが可能である。

【産業上の利用可能性】

【0055】

本発明は、核酸クロマト法を行うにあたって、コンタミネーションを抑制し、かつ検出精度を向上させるために、好適に利用することが可能である。

40

【符号の説明】

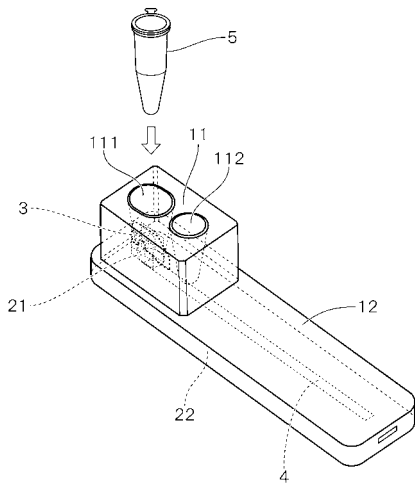
【0056】

- 1 本体部
- 11 注入部
- 111 第一の注入口
- 112 第二の注入口
- 12 展開部
- 2 底蓋

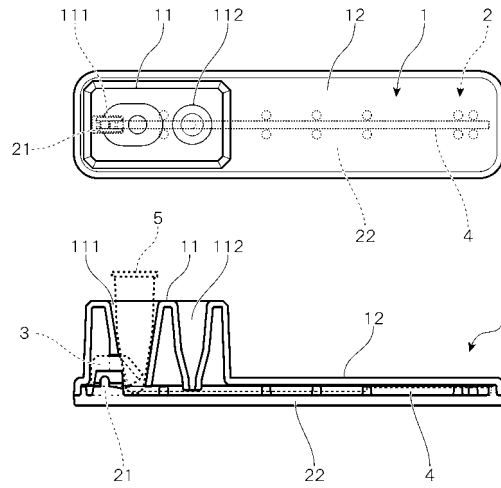
50

- 2 1 切開手段支持部
- 2 2 ストリップ保持部
- 2 2 1 位置決め柱
- 3 切開手段
- 3 1 切開刃
- 3 2 ストリップ接触部
- 4 遺伝子検査ストリップ
- 5 PCRチューブ

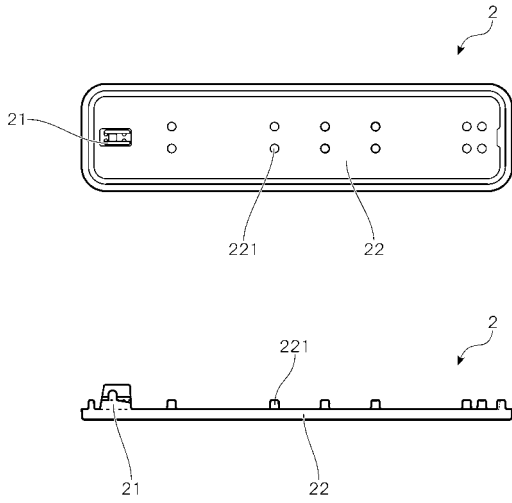
【図 1】



【図 2】



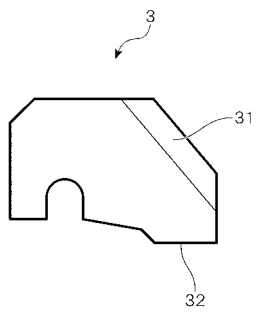
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 1

(72)発明者 小菅 恵美子
茨城県つくばみらい市台9 4 1 3 株式会社荒川樹脂内

(72)発明者 深澤 眞
茨城県つくばみらい市台9 4 1 3 株式会社荒川樹脂内

(72)発明者 伊藤 好久
茨城県つくばみらい市台9 4 1 3 株式会社荒川樹脂内

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA13

4B029 AA07 AA23 BB20 FA12 FA15

4B063 QA01 QA13 QQ28 QQ42 QR08 QR32 QR55 QR66 QR84 QS17

QS25 QS34 QS36 QS39 QX01