

(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2005-295942

(P2005-295942A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	Z

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2004-119763 (P2004-119763)	(71) 出願人	000006633 京セラ株式会社 京都府京都市伏見区竹田鳥羽殿町6番地
(22) 出願日	平成16年4月15日(2004.4.15)	(72) 発明者	小林 善宏 北海道北見市豊地30番地 京セラ株式会社北海道北見工場内
		(72) 発明者	宮原 将章 鹿児島県国分市山下町1番1号 京セラ株式会社鹿児島国分工場内
		Fターム(参考)	4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 FA02 FA12 GA02 GB06 GB09 GB10

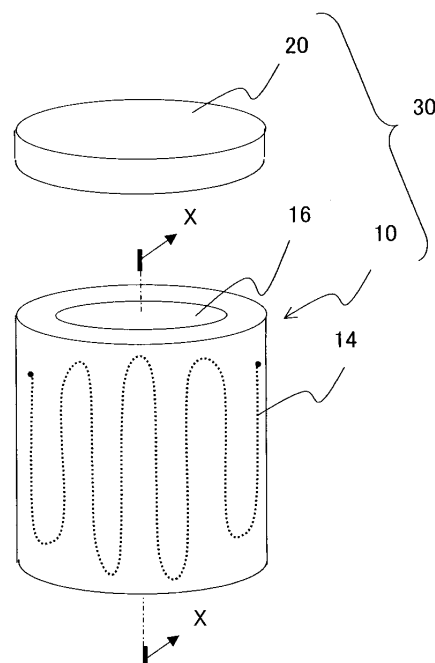
(54) 【発明の名称】 遺伝子反応管およびこれを用いた遺伝子検査装置

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子検査における検査時間を短縮して検査効率を大幅に向上させることができる遺伝子反応管および遺伝子検査装置を提供する。

【解決手段】 遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部16を有する有底筒状のセラミック製の基体10と、該基体10の内部に埋設された発熱体14と、上記凹部16を塞ぐように取着された蓋体20とを具備する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部を有する有底筒状のセラミック製の基体と、該基体の内部に埋設された発熱体と、上記凹部を塞ぐように取着され、少なくとも一部が紫外線透過性を有する蓋体とを具備したことを特徴とする遺伝子反応管。

【請求項 2】

遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部を有する有底筒状のセラミック製の基体と、該基体の内部に埋設された発熱体と、上記凹部を塞ぐように取着された蓋体とを具備し、上記基体の外側面から凹部の内側面にかけて貫通孔が形成されるとともに、貫通孔を塞ぐように少なくとも一部が紫外線透過性を有する窓部材を取着したことを特徴とする遺伝子反応管。

10

【請求項 3】

上記基体为非イオン伝導性の絶縁層とジルコニア層とを順次積層してなるとともに、上記絶縁層中、ジルコニア層中、または絶縁層とジルコニア層との間のいずれかに白金からなる発熱体を埋設したことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の遺伝子反応管。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の何れかに記載の遺伝子反応管と、上記蓋体または窓部材に紫外線を入射させるための紫外線照射手段と、上記蓋体または窓部材から出射した光を検知するための光検知手段と、上記発熱体の温度を制御するための温度制御手段とを具備し、上記温度制御手段により遺伝子反応管内に収容された遺伝子検査液中の遺伝子を反応させるとともに、上記紫外線照射手段によって上記蓋体または窓部材から紫外線を透過させて遺伝子検査液に照射することで遺伝子と紫外線との反応によって生じ、蓋体または窓部材から透過して出射された蛍光を光検知手段により検知することを特徴とする遺伝子検査装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子の増幅に用いられる遺伝子反応管および増幅した遺伝子から遺伝子情報を検出するための遺伝子検査装置に関する。

【背景技術】

【0002】

検査目的の遺伝子の本体である DNA (デオキシリボ核酸) を有する血液等の検体と試薬とを混合させた遺伝子検査液を収納し、遺伝子の増幅反応を行なうための容器であるマイクロプレートと呼ばれる従来の遺伝子反応管 130 を図 7 (a)、(b) に示す。ここで図 7 (a) は、遺伝子反応管 130 の断面図、図 7 (b) は蓋体 120 を外した状態での斜面図である。

30

【0003】

従来の遺伝子反応管 130 を使用した遺伝子増幅方法は、代表的なものとして PCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) 法、ICAN 法、LAMP 法等が存在する。近年、非放射性標識を用いた遺伝子の変異を同定する PCR 法が注目されている。

【0004】

PCR 法とは DNA を複製する酵素 (耐熱性の DNA ポリメラーゼ) を利用して特定の DNA 領域を短時間で増幅する方法である。先ず、目的の遺伝子の本体である DNA (ゲノム DNA 等) の領域に対して相補的な塩基配列を持つ遺伝子の断片 (プライマー) を合成する。次に、2 本鎖の DNA を加熱処理 (約 90) して一本鎖の鋳型 DNA に分離し、その後冷却 (約 50) してプライマーを結合させる。そこに熱に安定な DNA ポリメラーゼを加え、再度加熱 (約 70) して 1 本の鋳型 DNA を 2 本に増幅する。この一連の工程を複数繰り返すことにより目的の遺伝子の本体である DNA を指数関数的に短時間で増幅することができる。

40

【0005】

つまり、1 回の工程で 2 本の DNA が複製されるので、これを 20 回繰り返せば 2^{20}

50

= で約 100 万倍に、30 回で 2^{30} = 約 1 億倍に複製できる。しかもこの増幅は短時間でできるといふ長所がある。

【0006】

そして、このような PCR 法により増幅された遺伝子を蛍光検出法によって遺伝子情報を検出することができる。即ち、増幅された遺伝子に特定の物質にのみ結合する化学的なマーキングを施した後、特定波長の紫外線を当てるとマーキング部が反応して蛍光を発するため、施したマーキングの種類により遺伝子の特徴を知ることが可能となる。

【特許文献 1】特開 2003 - 194817 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

近年、遺伝子検査における検査時間の短縮に対する要求が急激に増加している。しかしながら、PCR 法による遺伝子増幅反応を行なうプロセスは、目的の遺伝子の本体である DNA を有する検体と PCR 法用試薬とを混合した遺伝子検査液をヒータにより加熱して 50 ~ 90 の範囲で温度を変化させて反応させ、この工程を 30 ~ 40 回繰り返すことにより行なわれるため、遺伝子検査液が蒸発して液量が減少しやすいものであり、遺伝子検査液の蒸発を防止するために蓋体 120 を取付させるものの、従来の遺伝子反応管 130 は基体 110 および蓋体 120 がポリプロピレン等のプラスチックから成るために気密性が悪く、遺伝子検査液の蒸発を見越して液量を 50 μ L 程度も用いる必要があった。そのため、遺伝子検査液を所望の温度とするのに時間がかかり、検査時間を短縮するのが困難であるという問題点を有していた。

20

【0008】

また、従来のポリプロピレン等のプラスチックから成る遺伝子反応管 30 を恒温槽に投入して、所定の温度にまで遺伝子検査液を上昇させていたが、プラスチックでは熱伝導率が低いため、内部に収容する遺伝子検査液を所望の温度とするのに時間がかかるとともに、遺伝子検査液を温度制御するのが困難であるという問題点も有していた。

【0009】

さらに、従来においては、増幅を行なった後の遺伝子検査液に対して紫外線を照射して遺伝子検査液の蛍光反応から遺伝子情報を確認する際、増幅反応後の遺伝子検査液を別の容器に移して紫外線を照射し蛍光反応を確認する必要があった。そのため、微量しか検査しない検査液が遺伝子反応管 130 の凹部にこびりつき、遺伝子反応管 130 から完全に遺伝子検査液を取り出すことは非常に困難であり、遺伝子検査液を多量に用いる必要があるとともに、非常に作業効率が悪いという問題点があった。

30

【0010】

本発明は、上記問題点を鑑み完成されたものであり、その目的は、遺伝子検査における検査時間を短縮して検査効率を大幅に向上させることのできる遺伝子反応管および遺伝子検査装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部を有する有底筒状のセラミック製の基体と、該基体の内部に埋設された発熱体と、上記凹部を塞ぐように取付され、少なくとも一部が紫外線透過性を有する蓋体とを具備したことを特徴とする。

40

【0012】

また、遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部を有する有底筒状のセラミック製の基体と、該基体の内部に埋設された発熱体と、上記凹部を塞ぐように取付された蓋体とを具備し、上記基体の外側面から凹部の内側面にかけて貫通孔が形成されるとともに、貫通孔を塞ぐように少なくとも一部が紫外線透過性を有する窓部材を取付したことを特徴とする。

【0013】

さらに、上記基体が非イオン伝導性の絶縁層とジルコニア層とを順次積層してなるとと

50

もに、上記絶縁層中、ジルコニア層中、または絶縁層とジルコニア層との間のいずれかに白金からなる発熱体を埋設したことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の遺伝子反応管。

【0014】

また、上記遺伝子反応管を用いた本発明の遺伝子検査装置は、遺伝子反応管と、上記蓋体または窓部材に紫外線を入射させるための紫外線照射手段と、上記蓋体または窓部材から出射した光を検知するための光検知手段と、上記発熱体の温度を制御するための温度制御手段とを具備し、上記温度制御手段により遺伝子反応管内に収容された遺伝子検査液中の遺伝子を反応させるとともに、上記紫外線照射手段によって上記蓋体または窓部材から紫外線を透過させて遺伝子検査液に照射することで遺伝子と紫外線との反応によって生じ

10

【発明の効果】

【0015】

遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部を有する有底筒状の基体と、該基体の内部に埋設された発熱体と、上記凹部を塞ぐように装着された蓋体とを具備することにより、遺伝子検査における検査時間を短縮して検査効率を大幅に向上させることのできる遺伝子反応管および遺伝子検査装置を提供することが可能となる。

【0016】

また、遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部を有する有底筒状のセラミック製の基体と、該基体の内部に埋設された発熱体と、上記凹部を塞ぐように装着された蓋体とを具備し、上記基体の外側面から凹部の内側面にかけて貫通孔が形成されるときに、貫通孔を塞ぐように少なくとも一部が紫外線透過性を有する窓部材を装着したことにより、遺伝子検査液に窓部材を通して紫外線を照射することができ、窓部材から遺伝子検査液の発光状態を確認することが可能となる。

20

【0017】

また、上記基体が非イオン伝導性の絶縁層とジルコニア層とを順次積層してなるとともに、上記絶縁層中、ジルコニア層中、または絶縁層とジルコニア層との間のいずれかに白金からなる発熱体を埋設したことにより、遺伝子検査液および外気から発熱体が隔離されることにより、発熱体の劣化を防止することが可能となる。

30

【0018】

また、上記の何れかに記載の遺伝子反応管と、上記蓋体または窓部材に紫外線を入射させるための紫外線照射手段と、上記蓋体または窓部材から出射した光を検知するための光検知手段と、上記発熱体の温度を制御するための温度制御手段とを具備し、上記温度制御手段により遺伝子反応管内に収容された遺伝子検査液中の遺伝子を反応させるとともに、上記紫外線照射手段によって上記蓋体または窓部材から紫外線を透過させて遺伝子検査液に照射することで遺伝子と紫外線との反応によって生じ、蓋体または窓部材から透過して出射された蛍光を光検知手段により検知することにより、遺伝子検査における検査時間を短縮して検査効率を大幅に向上させることのできる遺伝子反応管および遺伝子検査装置を提供することが可能となる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の遺伝子反応管の実施形態を以下に詳細に説明する。

【0020】

図 1 は本発明の遺伝子反応管の一実施形態を示す斜視図であり、遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための凹部 16 を有する有底筒状のセラミック製の基体 10 と、該基体 10 の内部に埋設された発熱体 14 と、上記凹部 16 を塞ぐように装着され、少なくとも一部が紫外線透過性を有する蓋体 20 とを具備してなる。

【0021】

基体 10 は、遺伝子および試薬を含む遺伝子検査液を収容するための保持体、ならびに

50

遺伝子検査液へ熱を伝達するための熱伝導体として機能している。

【0022】

なお、本発明において、遺伝子とはDNA内の遺伝情報を含んだ部分のことである。また、ある種のウィルスの場合は、DNA内の遺伝情報を含んだ部分のことである。

【0023】

上記基体10は、 ZrO_2 （ジルコニア）質焼結体、 Al_2O_3 （アルミナ）質焼結体、 Si_3N_4 （窒化珪素）質焼結体、 AlN （窒化アルミニウム）質焼結体等のセラミック製であり、セラミックスで形成することにより、耐熱性、耐薬品性が高く、内部に発熱体14を埋設した場合においても、その熱を効率良く遺伝子検査液に伝え、発熱しても割れや欠けが生じることを有効に防止することができる。また、セラミックスの加工精度より内径および外径の公差が1～5 μm 以下と非常に高い加工精度で形成することができ、さらには基体10の摩擦係数が低いとともに、剛性が高く、熱膨張係数も低いことから、外部応力や温度変化に対して基体の形状を安定にすることができ、遺伝子反応管30の気密性を非常に高くして、遺伝子検査液の蒸発を著しく抑制することができる。その結果、収容する遺伝子検査液の量を非常に少なくすることができ、検査時間を著しく短縮することができる。また、基体10が耐食性にも非常に優れ、しかも紫外線に対しても安定なものとなり、基体10が遺伝子検査液に侵されたり紫外線によって劣化したりして遺伝子情報の検出の妨げとなるのを抑制することができる。さらに、遺伝子検査液に照射する紫外線や遺伝子検査液から生じた蛍光を内側面で効率よく反射させることができることから、紫外線強度が低下したり蛍光強度が低下するのを有効に抑制して検査精度を向上させることができる。

【0024】

基体10を押出成形やプレス成形、射出成形等により所定形状に成形する際、また必要があれば切削等により高精度な加工をする際、内径および外径の公差を1 μm 以下と高精度にすることができる。その結果、遺伝子反応管30の形状を安定化することができ、遺伝子検査液に対する紫外線照射効率や蛍光効率を一定に維持して、遺伝子反応管30ごとに遺伝子情報の検出結果が異なることのない高精度の検出が可能となる。また、基体10の外側面と内側面との間の厚みを全周にわたって一定にすることができ、内部に収容する遺伝子検査液の温度制御を容易に行なうことができる。その結果、遺伝子増幅反応の速度を高めることができ検査時間を短縮化することができる。さらに、基体10の内側面において紫外線を等方的に反射することができ、遺伝子検査液に対する紫外線の照射効率を高めて遺伝子情報の検出効率を高めることができる。

【0025】

基体10の凹部16が形成されている一端面は平坦になっているのがよく、これにより蓋体20を安定して装着することができ、蓋体20によって凹部16の気密性を良好にすることができる。

【0026】

また、基体10の内部に埋設された発熱体14は、ニクロム、カンタル合金、白金等の材料を用いることができるが、耐環境性等を考慮すると白金を用いることが好ましい。

【0027】

また、基体10の凹部16を塞ぐように装着された蓋体20は、ガラスやプラスチック等からなり、少なくとも一部が紫外線透過アクリルもしくは紫外線透過ガラス等の紫外線透過性を有することに特定される。なお、プラスチックの場合は遺伝子検査液に化学反応するものは採用できない。

【0028】

これにより、紫外線透過性の蓋体20を介して遺伝子検査液に紫外線を照射することができ、遺伝子検査液から生じた蛍光もこの蓋体20を介して検知することができる。

【0029】

なお、基体10の側面には詳細を後述するような窓部材を形成されていてもよく、紫外線透過性の蓋体20に紫外線を照射することにより、遺伝子検査液から生じた蛍光を窓部

材を介して検知することができる。

【0030】

また、蓋体20が紫外線透過性を有する場合、窓部材は遺伝子検査液から生じた蛍光に対して高い透過率を有しているのが好ましく、蓋体20から紫外線を照射し、遺伝子検査液から生じた蛍光を窓部材から検出することができる。

【0031】

次いで、図2に基づいて本発明の遺伝子反応管の他の実施形態について説明する。

【0032】

図2(a)、(b)に示すように、本発明の遺伝子反応管の他の実施形態は、上述の図1に示す一実施形態と同様に、基体10と、該基体10の内部に埋設された発熱体14と、上記凹部を塞ぐように装着された蓋体20とを具備し、上記基体10の外側面から凹部16の内側面にかけて貫通孔17が形成されるとともに、貫通孔17を塞ぐように少なくとも一部が紫外線透過性を有する窓部材18を取着したことを特徴とするものである。

10

【0033】

これにより、遺伝子検査液に窓部材18を通して紫外線を照射することができ、窓部材18から遺伝子検査液の発光状態を確認することが可能となる。

【0034】

窓部材18は、蓋体20と同様にガラスやプラスチック等からなり、少なくとも一部が紫外線透過アクリルもしくは紫外線透過ガラス等の紫外線透過性を有することに特定される。なお、プラスチックの場合は遺伝子検査液に化学反応するものは採用できない。

20

【0035】

また、窓部材18は、貫通孔17に嵌着することによって基体10に取着されてもよく、基体10の外側面に貫通孔17の開口の周囲に接合することによって基体10に取着されてもよいが、より好ましくは窓部材18が基体10の内側面と面一になるように貫通孔17に嵌着されているのがよい。これにより、貫通孔17と窓部材18とから成る窪みが生じて遺伝子反応液が滞留したり紫外線の照射が妨げられるのを有効に抑制でき、遺伝子の複製反応を良好に進行させることができるとともに、紫外線を遺伝子検査液に均一に照射して遺伝子情報の検出の分解能を向上させることができる。

【0036】

窓部材18を取着する貫通孔17を基体10に設ける場合には、あらかじめ貫通孔17となる部分に孔を形成しておいて焼成する方法、成形後に切削して貫通孔17となる孔を形成した後に焼成する方法、焼成後に研削にて貫通孔17を形成する方法等、いずれの方法を用いてもよい。ただし、図2(b)に示すように、貫通孔17の部位を予め見込んで発熱体14を形成することが重要であり、貫通孔17から3mm程度距離を持たせた状態で発熱体14を形成することが好ましい。これは3mmより短かすぎると、発熱体14が貫通孔17まで通じる可能性があり、また3mmよりも長すぎると加熱効率が悪くなるからである。

30

【0037】

さらに、窓部材18が紫外線透過性である場合、蓋体20は遺伝子検査液から生じた蛍光に対して高い透過率を有しているのがよい。これにより、窓部材18から紫外線を照射し、遺伝子検査液から生じた蛍光を蓋体20から検出することができる。また、窓部材18を紫外線に対しておおよび遺伝子検査液から生じた蛍光に対して高い透過率を有しているものとすれば、窓部材18から紫外線を照射して遺伝子検査液から生じた蛍光を窓部材18で検出することも可能である。

40

【0038】

この場合、窓部材18に加え、上記蓋体20も紫外線透過性を有することが好ましく、蓋体20に紫外線を照射して窓部材18で遺伝子検査液から生じた蛍光を検知することにより、または、窓部材18に紫外線を照射して蓋体20で遺伝子検査液から生じた蛍光を検知することにより、一つの蓋体20または窓部材18に対して紫外線照射手段および光検知手段の両方を設置する必要がないため、蓋体20または窓部材18を非常に小さくす

50

ることができ、遺伝子検査装置を小型化することができる。

【0039】

また、紫外線の照射方向に対して直角に光検知手段を設置することができるため、紫外線が光検知手段に直接入り込んでノイズとなるのを防止でき、遺伝子情報の検出の分解能をより高くすることができる。

【0040】

さらに、蓋体20が紫外線透過性である場合、窓部材18は遺伝子検査液から生じた蛍光に対して高い透過率を有しているのがよい。これにより、蓋体20から紫外線を照射し、遺伝子検査液から生じた蛍光を窓部材18から検出することができる。

【0041】

また、図1、図2に示す各実施形態の遺伝子反応管における基体10は、図3(a)~(c)に示す要部拡大断面図に示すように、母体となるセラミック体の上面に非イオン伝導性の絶縁層とジルコニア層とを順次積層してなるとともに、上記絶縁層中、ジルコニア層中、または絶縁層とジルコニア層との間のいずれかに白金からなる発熱体を埋設することが好ましい。

10

【0042】

母体11は、アルミナ質焼結体、ジルコニア質焼結体等の各種セラミックスからなり、ジルコニア質焼結体を用いることが好ましい。これは、発熱体14である白金との積層焼成性がよいからである。

【0043】

ジルコニア焼結体を用いる場合、具体的には Y_2O_3 および Yb_2O_3 、 Sc_2O_3 、 Sm_2O_3 、 Nd_2O_3 、 Dy_2O_3 等の希土類酸化物の群から選ばれる少なくとも1種を酸化物換算で1~30モル%、好ましくは3~15モル%含有する部分安定化 ZrO_2 あるいは安定化 ZrO_2 が用いられている。また、 ZrO_2 中のZrを1~20原子%をCeで置換した ZrO_2 を用いることにより、電子伝導性が大きくなり、応答性がさらに改善されるといった効果がある。さらに、焼結性を改善する目的で、上記 ZrO_2 に対して、 Al_2O_3 や SiO_2 を添加含有させることができるが、多量に含有させると、高温におけるクリープ特性が悪くなることから、 Al_2O_3 および SiO_2 の添加量は総量で5重量%以下、特に2重量%以下であることが望ましい。

20

【0044】

母体11の表面に形成される絶縁層12としては、それ自体が非イオン伝導性を有することが必要である。これは、母体11と白金からなる発熱体14とを電氣的に完全に分離し絶縁化するためである。この絶縁層12としては、アルミナ、スピネル、フォルステライト、ガラス等のセラミック材料が好適に用いられる。また、絶縁層12としてガラスを用いる場合には、耐熱性の観点から、BaO、PbO、SrO、CaO、CdOのうちの少なくとも1種を5重量%以上含有するガラス、特に、結晶化ガラスであることが望ましい。

30

【0045】

また、絶縁層12の上面に積層するジルコニア層13としては、主成分であるジルコニアに対して Y_2O_3 および Yb_2O_3 、 Sc_2O_3 、 Sm_2O_3 、 Nd_2O_3 、 Dy_2O_3 等の希土類酸化物の群から選ばれる少なくとも1種の酸化物を酸化物換算で1~30モル%、特に強度を高める上で3~15モル%の割合で含有する部分安定化 ZrO_2 あるいは安定化 ZrO_2 が好適に用いられる。また、 ZrO_2 中のZrを1~20原子%のCeで置換した ZrO_2 も好適に用いることが可能であるが、特に、母体11を構成する材料と同じ熱膨張特性を有することが望ましいことから、母体11のジルコニアと同一の組成のものが最も好ましい。

40

【0046】

さらに、このジルコニア層13はヒータの保温性の観点から100~200 μm の厚みとすることが好ましく、ジルコニア層13を形成することで、発熱体14を外気にさらすことなく保護でき、発熱体14の耐久性を劣化させることがない。

50

【0047】

このように、基体10として、母体11の上面に絶縁層12、ジルコニア層13を順次積層したものをを用いることで、母体11と発熱体14を電氣的に分離させることが可能となり、発熱体14を外気に曝すことなく、使用上安定した特性を継続して得ることができる。

【0048】

このような構造を成す基体10に発熱体14を埋設する場合、発熱体14は、図3(a)に示すように絶縁層12中に埋設する場合、図3(b)に示すようにジルコニア層13中に埋設する場合、または図3(c)に示すように絶縁層12とジルコニア層13との間に埋設する場合の何れかの構造をなし、発熱体14として白金を用いる。

10

【0049】

発熱体14として白金を用いることで、積層後に焼成を行うが、大気中で安定な白金を用いることが、焼成後の剥離や、変形、クラックが生じにくくなることと、安定した発熱特性を継続して行えるためである。

【0050】

特に、図3(a)に示すように、発熱体14を絶縁層12中に埋設することが好ましく、DNA検査液の入っている凹部へ熱が伝わりやすくなることと、発熱体を外部から守りやすい構造となっているからである。

【0051】

また、かかる構造において、母体11の表面から発熱体14までの絶縁層12の厚さL1が1~100 μm 、特に5~50 μm 、さらには10~40 μm であることが好ましい。これは、上記厚さがL1が1 μm よりも薄いと、母体11と絶縁層12が熱応力で剥離する可能性が高くなるからである。また、厚みL1が100 μm を超えると、発熱体14による加熱効率が低下し、活性化時間が長くなるとともに、母体11と絶縁層12間に生じる熱応力に起因して絶縁層が剥離しやすく、ヒータの抵抗の増加率が大きくなるためである。

20

【0052】

さらに、図3(c)のように発熱体14がジルコニア層13中に埋設される場合、母体11から発熱体14までの絶縁層12およびジルコニア層13との合計厚さL2は100 μm 以下であることが重要である。これは、厚みL2が100 μm を超えると、発熱体14による加熱効率が低下し、活性化時間が長くなるためである。

30

【0053】

以上、ジルコニアを用いて説明してきたが、これに限ることなく、アルミナ等のセラミックスを用いることが可能である。

【0054】

ここで、発熱体14を埋設した基体10を作製する方法を図4に基づいて説明する。ここでは、基体10としてジルコニア質焼結体からなる母体11に絶縁層12、ジルコニア層13を積層したものを例に説明する。

【0055】

まず、図4(a)に示すような母体11を作製する。この母体11は、酸素イオン伝導性を有するジルコニア固体電解質粉末に対して、適宜、成形用有機バインダーを添加して押出成形や、静水圧成形(ラバープレス)あるいはプレス形成などの周知の方法により一端が封止された母体11を作製する。

40

【0056】

この時、ジルコニア粉末に対して安定化剤として Y_2O_3 および Yb_2O_3 、 Sc_2O_3 、 Sm_2O_3 、 Nd_2O_3 、 Dy_2O_3 等の希土類酸化物の群から選ばれる少なくとも1種を酸化物換算で1~30モル%、好ましくは3~15モル%の割合で添加した混合粉末、あるいはジルコニアと上記安定化剤との共沈原料粉末が用いられる。また、 ZrO_2 中のZrを1~20原子%をCeで置換した ZrO_2 粉末、または共沈原料を用いることもできる。

50

【0057】

さらに、焼結性を改善する目的で、上記固体電解質粉末に Al_2O_3 や SiO_2 を5重量%以下、特に2重量%以下の割合で添加することも可能である。

【0058】

次に、図4(b)に示すようなヒータ素体15を形成する。ヒータ素体15は、まず、上記と同様なジルコニア粉末を用いてドクターブレード法、押し出し成形法、プレス法などにより所定厚さのジルコニア層13用グリーンシートを作製する。

【0059】

そして、非イオン伝導性を有する絶縁層12を形成し得るアルミナ、スピネル、フォルステライト、ガラス等のセラミック粉末に、適宜成形用有機バインダーを添加してスラリーを調製し、このスラリーを上記ジルコニア層13用グリーンシートに塗布し、その後、白金粉末を含む導電性ペーストを発熱体パターンにスクリーン印刷法、パット印刷法、ロール転写法等により印刷した後、その上にさらにスラリーを塗布し、乾燥することにより、発熱体14が埋設された絶縁層12とジルコニア層13用グリーンシートとの積層体からなるヒータ素体15を作製できる。

10

【0060】

また、他の方法としては、ジルコニア層13用グリーンシート、絶縁層12用グリーンシートを作製し、そのいずれか一方に白金の発熱体14を印刷塗布した後、積層しても同様な積層体からなるヒータ素体15を作製することができる。

【0061】

上記の各グリーンシートの厚みとしては60~600 μm 、特に100~300 μm が好ましい。シートの厚みが60 μm より薄いとシートの取り扱いが困難であり、600 μm を超えるとシートの母体11の成形体表面への巻き付けが難しくなるためである。

20

【0062】

次に、図4(c)に示すように、上記母体11の表面に、ヒータ素体15を巻き付けて円筒状積層体を作製する。この際、ヒータ素体15を母体に巻き付けるには、ヒータ素体15と母体11との間にアクリル樹脂や有機溶媒などの接着剤を介在させて接着させたり、あるいはローラ等で圧力を加えながら機械的に接着することができる。この時、巻き付けされたヒータ素体15の合わせ目は、焼成時の収縮を考慮し、シート端部同志を重ねるか、あるいは所定の間隔をおいて接着してもよい。

30

【0063】

なお、ヒータ素体15を巻き付ける場合、絶縁層12用グリーンシートとジルコニア層13用グリーンシートとの積層体を巻き付ける方法以外に、絶縁層12用グリーンシートを巻き付けた後に、ジルコニア層13用グリーンシートを巻き付けることも可能である。

【0064】

そして、上記の円筒状積層体を基体10を構成する母体11およびヒータ素体15における絶縁層12用グリーンシートおよびジルコニア層13用グリーンシートが同時に焼成可能な温度で焼成することにより、ヒータ素体15と母体11とが一体化された遺伝子反応管30が作製される。

【0065】

焼成条件としては、アルゴンガス等の不活性雰囲気中あるいは大気中1300~1700で1~10時間程度焼成することが望ましい。

40

【0066】

なお、図3(b)に示すように、発熱体14がジルコニア層13内に埋設した場合には、上記ヒータ素体15を作製する時に、ジルコニア層13用グリーンシートの表面に、白金ペーストを塗布した後、ジルコニア層13用のグリーンシートを積層するかまたはスラリーを塗布した後、さらに絶縁層12用のグリーンシートを積層するか、またはスラリーを塗布することによりヒータ素体15を作製した後、上記と同様な方法で巻き付け、同時焼成することにより作製することができる。

【0067】

50

また、図3(c)に示すように、発熱体14が絶縁層12とジルコニア層13との間に埋設した場合には、上記ヒータ素体15を作製する時に、ジルコニア層13用グリーンシートの表面に、白金ペーストを塗布した後、絶縁層12用のスラリーを塗布するか、またはグリーンシートを積層してヒータ素体15を作製した後、上記と同様な方法で巻き付け、同時焼成して作製することができる。

【0068】

次に、本発明の基体の様々な形状を図5を用いて説明する。

【0069】

図5(a)は基体50が円筒状のパイプ11aと底板11bからなる場合である。これは、円筒状パイプ11aを押し出し成形にて加工して、別に成形した底板11bをとりつけたあと、ヒータ素体15とともに一括で焼成することにより得られる。 10

【0070】

また、円筒状パイプ11aとヒータ素体15を積層し焼成した後、別に焼成した底板11bをハンダ、無機接着剤、低融点ガラス等を用いて固定する方法でもよい。また、固定方法は遺伝子反応管の使用温度が最大100度程度なので、硬化後のガラス転移温度が100以上となる樹脂系の接着剤を用いることも可能である。ただし、この場合は、検査液と反応しないような材質もしくは、接着剤が検査液に直接接触しないような構造とする必要がある。

【0071】

図5(b)は母体11の外側面形状が円断面ではなく多角形断面の場合であり、図5(c)は母体11の外側面形状が多角形断面であり、かつ内側面形状も多角形断面の場合である。 20

【0072】

本発明は外側面形状、内側面形状のいかなを問わず、凹部16を有していれば、同一の効果を奏することができる。

【0073】

より好ましくは、基体10の外側面および内側面(凹部16の内側面)は円筒面とされているのがよい。これにより、基体10を容易に加工することが可能となり、基体10を押し出し成形やプレス成形、射出成形等により所定形状に成形する際、また必要があれば切削等により高精度な加工をする際、内径および外径の公差を1 μ m以下と高精度にすることができる。その結果、遺伝子反応管30の形状を安定化することができ、遺伝子検査液に対する紫外線照射効率や蛍光効率を一定に維持して、遺伝子反応管30ごとに遺伝子情報の検出結果が異なることのない高精度の検出が可能となる。また、基体10の外側面と内側面との間の厚みを全周にわたって一定にすることができ、基体10の外側面から内側面に至る熱伝導時間を全周にわたって均一にして内部に収容する遺伝子検査液の温度制御を容易に行なうことができる。その結果、遺伝子増幅反応の速度を高めることができ検査時間を短縮化することができる。さらに、基体10の内側面において紫外線を等方的に反射することができ、遺伝子検査液に対する紫外線の照射効率を高めて遺伝子情報の検出効率を高めることができる。 30

【0074】

次に、図6を用いて本発明の遺伝子反応管を用いた遺伝子検査装置について説明する。 40

【0075】

上記説明してきた遺伝子反応管30と、紫外線透過性の蓋体20または紫外線透過性の窓部材17に紫外線を入射させるための紫外線照射手段81と、蓋体20または窓部材17から出てきた光を検知するための光検知手段82と、遺伝子反応管30の温度を制御するための温度制御手段83とを具備することにより本発明の遺伝子検査装置80となる。

【0076】

そして、温度制御手段83により遺伝子反応管30内の遺伝子検査液中の遺伝子を反応させるとともに、紫外線照射手段81によって紫外線を紫外線透過性の蓋体20または紫外線透過性の窓部材18を透過させて遺伝子検査液に照射し、遺伝子検査液中の遺伝子の 50

紫外線との反応により生じて蓋体 20 または窓部材 18 を透過して出てきた蛍光を光検知手段 82 により検知することにより、遺伝子反応管内 30 に遺伝子検査液を収納した状態で遺伝子の反応および遺伝子情報の検出を連続して、または同時に行なうことができ、その結果、遺伝子検査における検査時間を大幅に短縮することができるとともに遺伝子情報のより高精度な検出を行なうことができる。

【0077】

ここで、紫外線照射手段 81 とは、紫外線を発光する装置にライトガイドを取り付けて、指定した一部分にのみ紫外線を当てられる、一例として紫外線照射装置を用いることが望ましい。紫外線を広域に発生させると、目に紫外光が入り失明等の危険性があるので、この方法がのぞましことと、市販の安価な装置が販売されており、比較的容易に入手できるからである。

10

【0078】

次に、光検知手段 82 としては、CCDカメラを用いることが望ましい。遺伝子の紫外線との反応により生じた蛍光を確認するには、特に高価なカメラでなくとも市販の CCDカメラで十分である。しかし、更なる検査確認のためには紫外線対応 CCDカメラを用いることがより望ましく、これは CCD自体に紫外光を可視光に変換するコーティングを施す方法で、遺伝子検査液の反応を確認することができる。

【0079】

さらに、上記温度制御手段 83 が遺伝子反応管の温度をモニタして温度調節を一定にしかも細かく調整できるフィードバック機能を備えることが好ましい。遺伝子反応管の温度は遺伝子反応管の内部に温度センサを入れ込む方法がある。温度センサからの温度を温度制御手段 83 にて発熱体に電力を与えてフィードバックする方法である。

20

【実施例】**【0080】**

本発明の遺伝子反応管と従来の遺伝子反応管との検査効率を確認するための評価を以下のように行なった。

【0081】

まず、本発明の遺伝子反応管として、図 1 に示すような中央部に凹部 16 が形成された外形が円柱型で、全長 10 mm、外径 2 mm、内径 1.26 mm、凹部 16 の深さ 3 mm のジルコニア質焼結体から成る基体 10 を準備した。

30

【0082】

基体 10 は、図 3 に示すように母体 11、絶縁層 12、ジルコニア層 13 から形成されており、先ず、共沈法によって作製された平均粒径が 0.8 μm の 5 モル% Y₂O₃ 含有のジルコニア粉末にポリビニルアルコール溶液を添加して坯土を作製し、プレス成形により外径が 5 mm、内径が 3 mm の一端を封じた中空の母体 11 となる成形体を作製した。

【0083】

また、上記ジルコニア粉末にポア形成剤として、市販の 3 μm のポリエチレン粉末を加え、さらにポリビニルアルコール溶液を添加してスラリーを作製し、ドクターブレード法によって種々の厚さのジルコニア層 13 用グリーンシートを作製した。

【0084】

さらに、平均粒径が 0.5 μm のスピネル粉末にポリエチレン粉末を加えて絶縁層 12 形成用のスラリーを調製した。

40

【0085】

上記ジルコニア層 13 用グリーンシートの表面に、スピネルの絶縁層 12 形成用のスラリーを種々の厚さで塗布乾燥後、その表面に白金粉末の導体ペーストをスクリーン印刷により焼成後の厚さが約 10 μm となるように発熱体 14 となるパターンに印刷塗布した。その後、発熱体 14 となるパターンの表面に、スピネルの絶縁層 12 形成用のスラリーを種々の厚さで塗布して、シート状積層体からなるヒータ素体を作製した。そして、上記の母体 11 に対してヒータ素体を巻き付け円筒状積層体を作製した。その後、この円筒状積層体を大気中、1500 °C で 2 時間焼成した。

50

【0086】

次に、蓋体20をほう珪酸ガラスで図1に示すような円板形に作製し、上記基体10と蓋体20とで本発明実施例の遺伝子反応管30を作製した。

【0087】

そして、目的の遺伝子である2本鎖DNAを含むヒトの血液からDNA断片を抽出した検体と、周知のDNA合成方法によって作成した、この目的の遺伝子に対して相補的な塩基配列を持つプライマーと、耐熱性DNAポリメラーゼ（TaKaRa Ex Taq タカラバイオ社製）とを混合した遺伝子検査液となる試薬をDNA基体10の凹部16に注入し、基体10の一端面に直径2mm、高さ1mmの円柱状の石英の蓋体をエポキシ樹脂で凹部16を覆うように接着することにより試料を作製した。

10

【0088】

次にこの試料を、ヒータで温度を調整することによって、95の温度で30秒反応させた後、55の温度で30秒反応させ、次に75の温度で30秒反応させた。この一連の工程を1サイクルとし、合計40サイクル繰り返した。

【0089】

このようにして反応させた遺伝子検査液に対して、蓋体20から紫外線を入射し、遺伝子検査液の蛍光反応によって出射した出射光を蓋体20を通して受光機によって検出することにより、遺伝子増幅反応が正しく行なわれているか検査した。

【0090】

また、比較例として、図7に示すような従来の遺伝子反応管130を準備した。全長30mm、外周の直径10mm、開孔部の内径9.5mm、内径の凹部深さ2.6mmの逆円錐型のポリプロピレン製の基体110と、直径10mm、高さ0.5mmのポリプロピレン製の蓋体120とから成る従来の遺伝子反応管130を用いて、上記と同様に40サイクルの遺伝子増幅反応を行った。

20

【0091】

加熱方法は、遺伝子反応管130を恒温槽に投入して、槽内に設置したヒータにより加熱した。

【0092】

この比較例の遺伝子検査液を蛍光検出法により蛍光検出を行うため、基体から遺伝子検査液を取り出して蛍光セルに移した後、遺伝子検査液へ紫外線を入射し、遺伝子検査液の蛍光反応によって出射した出射光を受光機により検出することにより、遺伝子増幅反応が正しく行われているか検査した。

30

【0093】

そして、このような手順で行なった遺伝子増幅反応の検査について、遺伝子増幅反応が完了してから蛍光検出法により蛍光検出を完了するまでの時間をストップウォッチにて測定することにより、検査時間の評価を行った。

【0094】

表1に評価結果を示す。

【表 1】

試料No.	検査時間	
	実施例	比較例
	[分]	[分]
1	4	20
2	5	25
3	5	23
4	4	25
5	5	28
6	7	24
7	5	24
8	5	25
9	6	26
10	4	28
最大検査時間	7	28
最小検査時間	4	20
平均検査時間	5	25
合計検査時間	50	248

10

20

【0095】

表 1 より、本発明の実施例である遺伝子反応管 30 を用いた場合、10 個の測定に対して 50 分となり、検査時間が非常に短縮できることがわかった。 30

【0096】

これに対し、比較例である遺伝子反応管 130 を用いた場合、10 個の測定に対して合計 248 分もの検査時間が必要であった。

【0097】

なお、本評価において実施例、比較例のいずれも蛍光が十分に検出されており、特に本発明の遺伝子反応管を用いた試料では遺伝子増幅反応が比較例よりも進んでいるのが確認され、遺伝子増幅反応においても本発明の遺伝子反応管 30 を用いることにより反応時間を短縮できることがわかった。

【図面の簡単な説明】

40

【0098】

【図 1】本発明の遺伝子反応管の一実施形態を示す斜視図である。

【図 2】(a) は本発明の遺伝子反応管の断面図であり、(b) は同図 (a) の斜視図である。

【図 3】(a) ~ (c) は本発明の遺伝子反応管の基体と発熱体の各実施形態を示す要部拡大断面図である。

【図 4】(a) ~ (c) は本発明の遺伝子反応管の基体の製造方法を説明するための工程図である。

【図 5】(a) ~ (c) は本発明の遺伝子反応管の種々の実施形態を示す斜視図である。

【図 6】本発明の遺伝子反応管を用いた遺伝子検査装置の一実施形態を示すブロック図で 50

ある。

【図7】(a)は従来の遺伝子反応管の断面図、(b)は同図(a)の遺伝子反応管の蓋体を外した状態の斜面図である。

【符号の説明】

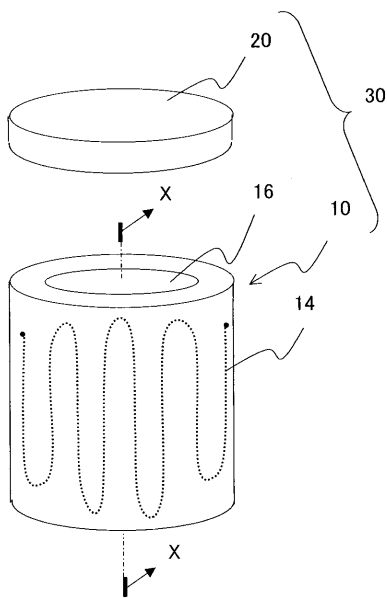
【0099】

- 10 基体
- 11 母体
- 12 絶縁層
- 13 ジルコニア層
- 14 発熱体
- 15 ヒータ素体
- 16 凹部
- 17 貫通孔
- 18 窓部材
- 20 蓋体
- 30 遺伝子反応管
- 40、50、60、70 基体
- 80 遺伝子検査装置
- 81 紫外線照射手段
- 82 光検知装置
- 83 温度制御手段
- 110 基体
- 120 蓋体
- 130 遺伝子反応管

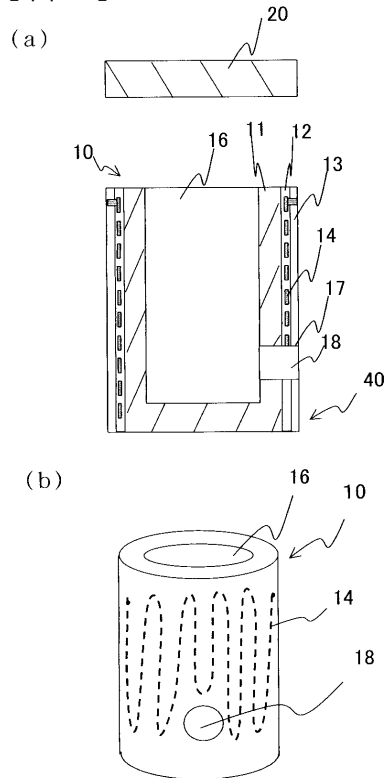
10

20

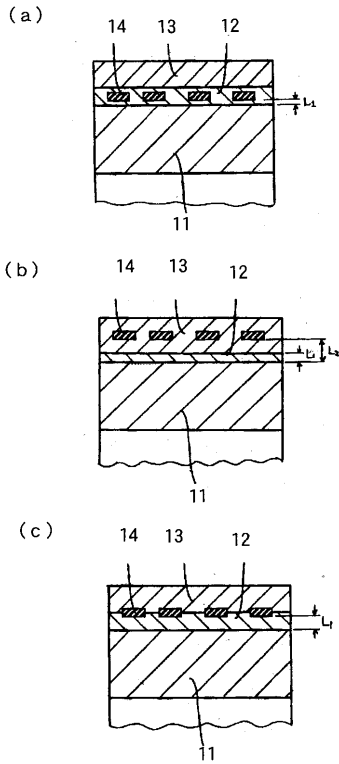
【図1】



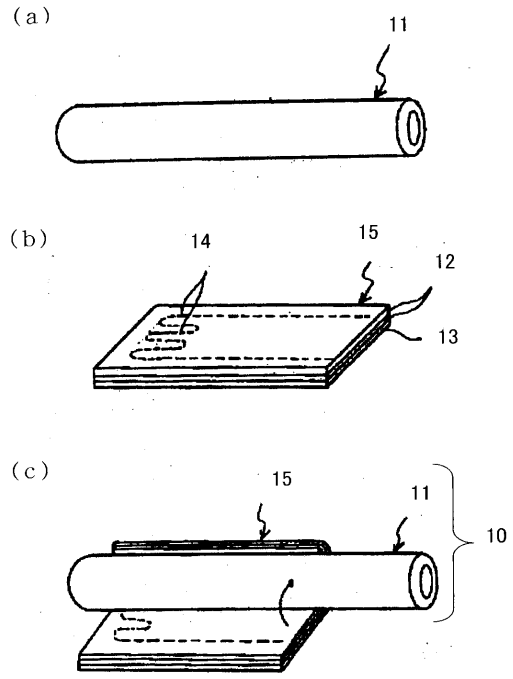
【図2】



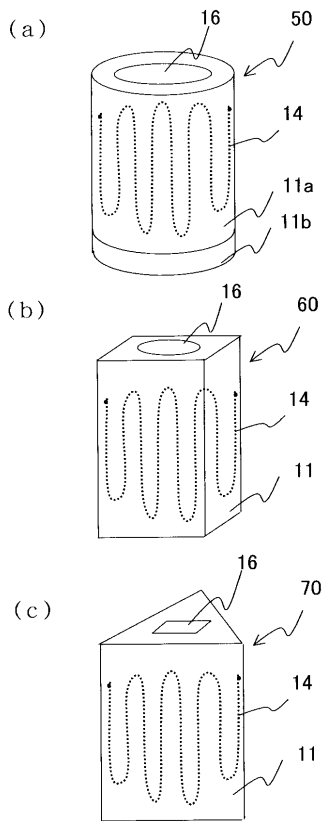
【 図 3 】



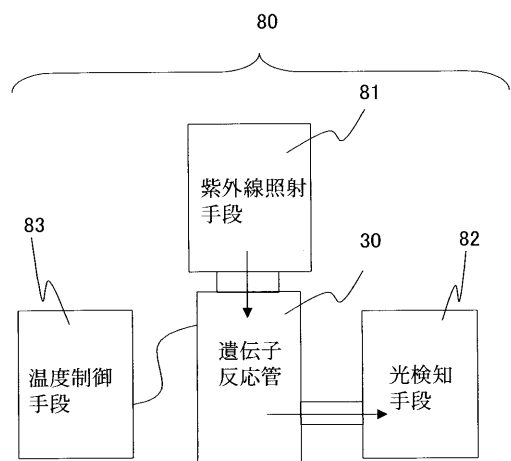
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

