

(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2017-138112

(P2017-138112A)

(43) 公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)		
GO 1 N	35/08	(2006.01)	GO 1 N	35/08 A	2 G O 5 8
GO 1 N	37/00	(2006.01)	GO 1 N	37/00 I O 1	
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53 S	
GO 1 N	33/553	(2006.01)	GO 1 N	33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2016-17156 (P2016-17156)
 (22) 出願日 平成28年2月1日(2016.2.1)

(71) 出願人 308036402
 株式会社 J V C ケンウッド
 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (74) 代理人 100101247
 弁理士 高橋 俊一
 (72) 発明者 小野 雅之
 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
 (72) 発明者 糸長 誠
 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地

最終頁に続く

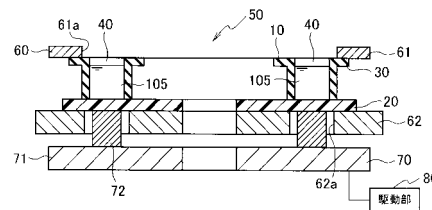
(54) 【発明の名称】 検体検出用装置及び検体検出方法

(57) 【要約】

【課題】エクソソームの検出と内包物質の検出とを同一の検体で行うことを可能にする検体検出用装置を提供する。

【解決手段】検体検出用装置50は、ユニット保持部60と磁界発生部70と駆動部80を備える。ユニット保持部60は検出対象物質と結合する磁気微粒子を捕捉し、検出対象物質から内包物質を抽出するための溶液105を溜める試料分析用容器10を保持する。磁界発生部70は磁気微粒子を試料分析用容器10内に捕捉するための磁石72を有する。駆動部80は試料分析用容器10に溜められている溶液によって検出対象物質との結合が解除された磁気微粒子を磁石72の磁力によって試料分析用容器10内に捕捉させるよう磁石72を試料分析用容器10に接近させるように磁界発生部70を駆動する。

【選択図】 図18



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検出対象物質と結合する磁気微粒子を捕捉し、前記検出対象物質から内包物質を抽出するための溶液を溜める試料分析用容器を保持するユニット保持部と、
前記磁気微粒子を前記試料分析用容器内に捕捉するための磁石を有する磁界発生部と、
前記試料分析用容器に溜められている前記溶液によって前記検出対象物質との結合が解除された磁気微粒子を前記磁石の磁力によって前記試料分析用容器内に捕捉させるよう前記磁石を前記試料分析用容器に接近させるよう前記磁界発生部を駆動する駆動部と、
を備えることを特徴とする検体検出用装置。

【請求項 2】

前記検出対象物質は、前記内包物質が膜で包まれた構造を有する膜小胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の検体検出用装置。

【請求項 3】

前記膜小胞はエクソソームであることを特徴とする請求項 2 に記載の検体検出用装置。

【請求項 4】

前記試料分析用容器は、
貫通孔を有するカートリッジと、
凸部と凹部とが交互に配置されたトラック領域を有する試料分析用ディスクと、
を備え、
前記溶液は、前記貫通孔の内周面と前記トラック領域とによって構成されるウェルに溜められ、
前記磁石は、前記ウェルに対応して配置され、
前記磁気微粒子は、前記磁石の磁力によって前記ウェル内の前記トラック領域の凹部に捕捉される
ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の検体検出用装置。

【請求項 5】

検出対象物質と結合する磁気微粒子を試料分析用容器内に捕捉させ、
前記磁気微粒子が前記試料分析用容器内に捕捉された状態を維持するように磁界を発生させ、
前記磁界により前記磁気微粒子が前記試料分析用容器内に捕捉されている状態で、前記検出対象物質から内包物質を抽出する
ことを特徴とする検体検出方法。

【請求項 6】

前記検出対象物質は、前記内包物質が膜で包まれた構造を有する膜小胞であることを特徴とする請求項 5 に記載の検体検出方法。

【請求項 7】

前記膜小胞はエクソソームであることを特徴とする請求項 6 に記載の検体検出方法。

【請求項 8】

前記試料分析用容器は、
貫通孔を有するカートリッジと、
凸部と凹部とが交互に配置されたトラック領域を有する試料分析用ディスクと、
を備え、
前記試料分析用ディスクは、凸部と凹部とが交互に配置されたトラック領域を有し、
前記磁気微粒子が前記磁界により前記試料分析用容器内の前記トラック領域の凹部に捕捉されている状態で、前記検出対象物質から前記内包物質を抽出する
ことを特徴とする請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の検体検出方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、検体から膜小胞とその内包物質とを検出するための検体検出用装置及び検体検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

検体から疾病と関連付けられている特定の抗原（または抗体）をバイオマーカとして検出して分析することで、疾病の発見や治療の効果等を定量的に分析することが広く行われている。近年、エクソソーム（exosome）と称されている微小な膜小胞が注目されている。エクソソーム等の膜小胞は、内包物質が膜で包まれた構造を有する。なお、エクソソームは、マイクロベシクル、細胞外小胞と称されることもあり、複数の呼称が存在する。

10

【0003】

エクソソームは、血液、リンパ液、唾液、尿、母乳、精液等の体液に含まれている。エクソソームは、液体中では概略球形であり、脂質二重膜で覆われている。一般的に、エクソソームは、種類の異なる複数のたんぱく質を含んでいる。その中で、認識対象となるたんぱく質は、脂質二重膜の表面に発現しているたんぱく質であり、例えば、膜貫通型たんぱく質、接着分子、膜輸送たんぱく質、膜融合たんぱく質、糖たんぱく質等である。

【0004】

エクソソームは直径が100nm程度と非常に小さいため、エクソソームを光学的に直接検出することは難しい。

【0005】

特許文献1には、検体から、エクソソームの表面に発現しているたんぱく質（抗原）と特異的に反応する抗体を用いて試料分析用ディスクと微粒子等の標識とでエクソソームをサンドイッチ捕獲し、標識を光学的に検出することで、エクソソームを間接的に検出する検体検出方法が記載されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2013-134083号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0007】

一方、細胞情報を伝達する物質とされるDNA（デオキシボ核酸）、RNA（リボ核酸）、miRNA（マイクロRNA）等の高分子生体物質は、エクソソームに内包された状態となって体内で転移しているとされる研究が報告されている。そこで、体液中のエクソソームの個数とその内包物質の個数の関係性とガンやアルツハイマー等の重大疾病との相関に注目が集まっている。一般的に、生体物質の反応は安定性が低い場合もあるため、エクソソームの検出（計測）と内包物質の検出（計測）とを同一の検体で行うことが望ましい。

【0008】

特許文献1に記載されているような方法で、エクソソームを高精度に計数することが可能である。エクソソームを計数するには検体を乾燥させた後に行う必要がある。従って、エクソソームの内包物質を抽出するためには、エクソソームの計数後に基板表面に捕捉したエクソソームと試薬とを再度反応させる必要がある。

40

【0009】

また、エクソソームや内包物質などは乾燥により変性する可能性がある。そのため、エクソソームの計数と内包物質の抽出は別々に行い、それぞれの結果で関係性を評価するという方法をとらなければならない。従って、従来では、エクソソームの検出と内包物質の検出とを別々の検体を用いて行っている。さらに、検査や測定等をできる限り少ない量の検体で行う低侵襲診断が望まれている。

【0010】

50

本発明は、エクソソーム等の膜小胞の検出とその内包物質の検出とを同一の検体で行うことを可能にする検体検出用装置及び検体検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、検出対象物質と結合する磁気微粒子を捕捉し、前記検出対象物質から内包物質を抽出するための溶液を溜める試料分析用容器を保持するユニット保持部と、前記磁気微粒子を前記試料分析用容器内に捕捉するための磁石を有する磁界発生部と、前記試料分析用容器に溜められている前記溶液によって前記検出対象物質との結合が解除された磁気微粒子を前記磁石の磁力によって前記試料分析用容器内に捕捉させるよう前記磁石を前記試料分析用容器に接近させるように前記磁界発生部を駆動する駆動部とを備えることを特徴とする検体検出用装置を提供する。

10

【0012】

また、本発明は、検出対象物質と結合する磁気微粒子を試料分析用容器内に捕捉させ、前記磁気微粒子が前記試料分析用容器内に捕捉された状態を維持するように磁界を発生させ、前記磁界により前記磁気微粒子が前記試料分析用容器内に捕捉されている状態で、前記検出対象物質から内包物質を抽出することを特徴とする検体検出方法を提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明の検体検出用装置及び検体検出方法によれば、エクソソーム等の膜小胞の検出とその内包物質の検出とを同一の検体で行うことが可能になる。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】一実施形態の試料分析用容器を示す上面図である。

【図2】図1の試料分析用容器のA-A断面を示す断面図である。

【図3】図1のウェルをB-Bで切断した状態を示す拡大斜視図である。

【図4】一実施形態の検体検出用装置を示す上面図である。

【図5】図4の検体検出用装置のC-C断面及びD-D断面を示す断面図である。

【図6】ユニット保持部の押さえ板を示す上面図である。

【図7】ユニット保持部のベース基板を示す上面図である。

【図8】磁界発生部を示す上面図及びA-A断面図である。

30

【図9】一実施形態の検体検出方法を説明するためのフローチャートである。

【図10】試料分析用容器のウェルに抗体を含む緩衝液が注入された状態を示す断面図である。

【図11】抗体が試料分析用ディスクのトラック領域に固定されている状態を示す模式的な断面図である。

【図12】ブロック層がトラック領域に形成されている状態を示す模式的な断面図である。

【図13】試料分析用容器のウェルに検出対象の検体の試料液が注入された状態を示す断面図である。

【図14】エクソソームを示す模式的な断面図である。

40

【図15】エクソソームがトラック領域の凹部に捕捉されている状態を示す模式的な断面図である。

【図16】試料分析用容器のウェルに磁気微粒子を含む緩衝液が注入された状態を示す断面図である。

【図17】トラック領域の凹部に捕捉されているエクソソームと磁気微粒子とが結合した状態を示す模式的な断面図である。

【図18】磁石をウェルの底面に接近させた状態で、エクソソームから内包物質を遊離させるための抽出液がウェルに注入された状態を示す断面図である。

【図19】磁気微粒子が磁石の磁力によってトラック領域の凹部に捕捉されている状態を示す模式的な断面図である。

50

【図 2 0】複数の反応領域が形成された試料分析用ディスクを示す上面図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

[試料分析用容器]

図 1 ~ 図 3 を用いて、一実施形態の試料分析用容器を説明する。

【0016】

図 1 は試料分析用容器をカートリッジ側から見た状態を示している。図 2 (a) は図 1 の試料分析用容器の A - A 断面を示している。図 2 (b) はカートリッジが試料分析用ディスクに対して取り外しできることを示している。図 3 は図 1 のウェルを B - B で切断した状態を部分的に拡大して示している。

10

【0017】

図 1 及び図 2 (a) に示すように、試料分析用容器 1 0 は、試料分析用ディスク 2 0 とカートリッジ 3 0 とを備える。試料分析用容器 1 0 は、検出対象物質であるエクソソーム等の膜小胞、及び膜小胞を標識する磁気微粒子を捕捉するための試料分析用容器の一形態である。

【0018】

試料分析用ディスク 2 0 は、例えば、ブルーレイディスク (B D)、D V D、コンパクトディスク (C D) 等の光ディスクと同等の円板形状を有する。試料分析用ディスク 2 0 は、例えば、一般的に光ディスクに用いられるポリカーボネート樹脂やシクロオレフィンポリマー等の樹脂材料で形成されている。

20

【0019】

図 3 に示すように、試料分析用ディスク 2 0 の表面には、凸部 2 1 と凹部 2 2 とが半径方向に交互に配置されたトラック領域 2 3 が形成されている。凸部 2 1 及び凹部 2 2 は、内周部から外周部に向かってスパイラル状に形成されている。凸部 2 1 は光ディスクのランドに相当する。凹部 2 2 は光ディスクのグルーブに相当する。

【0020】

図 1 に示すように、カートリッジ 3 0 はリング形状を有する。カートリッジ 3 0 には、周方向に複数の円筒状の貫通孔 3 1 が形成されている。複数の貫通孔 3 1 は、それぞれの中心が同一円周上に位置するように等間隔に形成されている。

【0021】

図 2 (a) 及び図 3 に示すように、試料分析用容器 1 0 は、カートリッジ 3 0 の貫通孔 3 1 と試料分析用ディスク 2 0 のトラック領域 2 3 とによって形成される複数のウェル 4 0 を有する。複数のウェル 4 0 は、それぞれの中心が同一円周上に位置するように等間隔に形成されている。貫通孔 3 1 の内周面はウェル 4 0 の内周面を構成し、試料分析用ディスク 2 0 のトラック領域 2 3 はウェル 4 0 の底面を構成している。ウェル 4 0 は試料液や緩衝液等の溶液を溜めるための容器である。

30

【0022】

貫通孔 3 1 と試料分析用ディスク 2 0 の間に、シリコンゴム等の弾性変形部材で作製したパッキンを配置することにより、溶液の漏れる可能性を低減することができる。

【0023】

図 2 (b) に示すように、カートリッジ 3 0 と試料分析用ディスク 2 0 とは分離することができる。検出対象物質であるエクソソーム等の膜小胞の検出、具体的には膜小胞を標識する磁気微粒子の検出は、カートリッジ 3 0 が分離された試料分析用ディスク 2 0 単体で行われる。

40

【0024】

[検体検出用装置]

図 4 ~ 図 8 を用いて、一実施形態の検体検出用装置を説明する。

【0025】

図 4 は試料分析用容器、ユニット保持部、及び磁界発生部を示している。図 5 (a) は図 4 の C - C における断面を示している。図 5 (a) は磁界発生部が試料分析用ディスク

50

に接近した状態を示している。図5(b)は磁界発生部が試料分析用ディスク及びユニット保持部から離隔した状態を示している。図5(c)は図4のD-Dにおける断面を示している。図6はユニット保持部の押さえ板を示している。図7はユニット保持部のベース基板を示している。図8(a)は磁界発生部を示している。図8(b)は図8(a)のA-Aにおける断面を示している。図6、図7、及び図8(a)は図4に対応する。図8(b)は図5(a)に対応する。

【0026】

図4及び図5(a)に示すように、検体検出用装置50は、ユニット保持部60と磁界発生部70と駆動部80とを備える。

【0027】

ユニット保持部60は、押さえ板61とベース基板62とを備える。ユニット保持部60は、押さえ板61とベース基板62とで試料分析用容器10を挟持することによって試料分析用容器10を保持する。

【0028】

図4及び図5(c)に示すように、押さえ板61とベース基板62とをスペーサ64を介してねじ65等により固定するようにしてもよい。スペーサ64の高さは試料分析用容器10の高さと同等または若干低くすることが望ましい。

【0029】

図6に示すように、押さえ板61は開口部61aを有する。図4に示すように、試料分析用容器10がユニット保持部60に保持されている状態において、開口部61aは、全てのウェル40が開口部61a内に位置するような開口径を有する。

【0030】

図7に示すように、ベース基板62は複数の貫通孔62aを有する。図5(b)に示すように、貫通孔62aはウェル40に対応して形成されている。具体的には、貫通孔62aは、試料分析用容器10がユニット保持部60に保持されている状態において、ウェル40の底面に位置するように形成されている。即ち、複数の貫通孔62aは、それぞれの中心が同一円周上に位置するように等間隔に形成されている。

【0031】

図8(a)及び図8(b)に示すように、磁界発生部70は、基台71と複数の磁石72とを備える。磁石72は基台71に固定されている。

【0032】

図4及び図5(a)に示すように、磁石72はウェル40に対応して形成されている。具体的には、磁石72は、試料分析用容器10がユニット保持部60に保持されている状態において、ウェル40の底面に位置するように形成されている。即ち、複数の貫通孔62aは、それぞれの中心が同一円周上に位置するように等間隔に形成されている。なお、ベース基板62の貫通孔62aは、磁石72をウェル40の底面に接近させるための挿入孔である。そのため、貫通孔62aは、磁石の外径よりも若干大きい孔径を有する。

【0033】

図5(a)及び図5(b)に示すように、駆動部80は、磁石72が試料分析用容器10のウェル40の底面に接近したり、離隔したりするように磁界発生部70を駆動させる。駆動部80としてモータを用いてもよい。磁石72をウェル40の底面に接近させることにより、試料分析用容器10のウェル40内に磁界を発生させることができる。

【0034】

[検体検出方法]

図9に示すフローチャート、及び図10～図20を用いて、一実施形態の検体検出方法を説明する。なお、本実施形態の検体検出方法では、検出対象物質である膜小胞としてエクソソームを例に挙げて説明する。

【0035】

オペレータは、ステップS1にて、図10に示すように、試料分析用容器10を検体検出用装置50のユニット保持部60に装着する。オペレータは、抗体(第1の結合物質)

10

20

30

40

50

101を含む緩衝液100を、試料分析用容器10のウェル40に注入する。

【0036】

オペレータは、試料分析用容器10を、適切な時間、適切な温度でインキュベートさせる。例えば、一般的な免疫学的測定で用いられる、4で一晚ほど静置してインキュベートさせる。これにより、図11に示すように、抗体101は試料分析用ディスク20のトラック領域23上に固定される。

【0037】

オペレータは、ウェル40から緩衝液100を排出し、ウェル40を緩衝液で洗浄する。トラック領域23に固定されなかった抗体101はこの洗浄によって除去される。

【0038】

なお、図10では磁界発生部70の磁石72がウェル40の底面に接近した状態を示しているが、ステップS1では、磁石72がウェル40の底面から離隔した状態でもよい。

【0039】

ステップS1は、オペレータが抗体101を固定させる場合に必要な工程である。工場等で事前に抗体101が固定されている試料分析用容器10または試料分析用ディスク20を使用する場合は、ステップS1を省略することができる。

【0040】

図11に示すように、抗体101はトラック領域23を構成する凸部21及び凹部22に疎水結合によって固定される。抗体101の固定方法は疎水結合に限定されない。トラック領域23に適切な化学的処理を行い、共有結合等を用いて抗体101をトラック領域23に固定させてもよい。トラック領域23に抗体101を固定させる方法は、免疫学測定法で一般的に使われている方法を用いることができる。

【0041】

オペレータは、ステップS2にて、抗体101の抗原識別部以外に抗原が非特異的に吸着することを防ぐため、ウェル40の内部をブロッキング処理する。具体的には、オペレータは、緩衝液で希釈されたスキムミルクをウェル40に注入し、試料分析用容器10を適切な時間、振盪させる。

【0042】

スキムミルクはエクソソームに付着しないたんぱく質を含むので、ブロッキング処理に好適である。なお、ブロッキング処理に用いる物質は、同様の効果を奏するものであればスキムミルクに限定されない。

【0043】

オペレータは、ウェル40からスキムミルクを含む緩衝液を排出し、ウェル40を緩衝液で洗浄する。洗浄に用いる緩衝液としては、スキムミルクを含んでいてもよいし、含まなくてもよい。また、洗浄を省略することも可能である。

【0044】

これにより、図12に示すように、ブロック層102がトラック領域23上に形成される。

【0045】

オペレータは、ステップS3にて、図13に示すように、検出対象の検体である試料液(第1の溶液)103をウェル40に注入する。なお、試料液103には検出対象のエクソソームが含まれていない場合もある。以下に、試料液103に検出対象のエクソソームが含まれている場合について説明する。

【0046】

試料液103中には、検出対象のエクソソーム90が含まれている。図14に示すように、エクソソーム90は、脂質二重膜91で覆われている。脂質二重膜91には、複数の種類の膜貫通型たんぱく質等のたんぱく質が表面分子92として存在する。たんぱく質の個数や脂質二重膜11における位置は、エクソソームの種類によって異なり、個体によっても異なる。これらの表面分子92を抗原として抗原抗体反応を用いてエクソソーム90を認識する。抗原である表面分子92として、CD63, CD9, Rab-5b等の他様

10

20

30

40

50

々なたんぱく質等の分子の存在が多く論文で報告されている。

【0047】

エクソソーム90は、細胞情報を伝達する物質とされるDNA、RNA、miRNA等の高分子生体物質である内包物質93が脂質二重膜91内に内包されている。エクソソーム90の直径は100nm程度である。

【0048】

オペレータは、試料分析用容器10を、適切な時間、適切な温度でインキュベートさせる。インキュベート時に振盪させてもよい。例えば2時間程度、37℃で試料分析用容器10を振盪させる。

【0049】

これにより、エクソソーム90の表面分子92とトラック領域23上に固定されている抗体101とが抗原抗体反応によって特異的に結合する。その結果、図15に示すように、エクソソーム90はトラック領域23、具体的にはトラック領域23の凹部22に捕捉される。

【0050】

オペレータは、ウェル40から試料液103を排出し、ウェル40を緩衝液で洗浄する。なお、抗体101と結合しないで試料液103中に分散しているエクソソーム、及び、抗原抗体反応ではない非特異吸着によってトラック領域23に付着しているエクソソームは、この洗浄によって除去される。即ち、検出対象のエクソソーム90はトラック領域23の凹部22に捕捉され、検出対象ではないエクソソームは洗浄によって除去される。

【0051】

なお、図13では磁界発生部70の磁石72がウェル40の底面に接近した状態を示しているが、ステップS2、S3では、磁石72がウェル40の底面から離隔した状態でもよい。

【0052】

オペレータは、ステップS4にて、図16に示すように、標識となる磁気微粒子(磁気ビーズ)110を含む緩衝液(第2の溶液)104をウェル40に注入する。オペレータは、試料分析用容器10を、適切な時間、適切な温度でインキュベートさせる。

【0053】

図17に示すように、磁気微粒子110は、略球形に形成されたポリスチレン等の合成樹脂で形成されている。磁気微粒子110は酸化鉄等の磁性体111を内包している。磁気微粒子110の表面には、エクソソーム90の表面分子92と特異的に結合する抗体(第2の結合物質)112が固定されている。磁気微粒子110の直径は200nm程度である。

【0054】

磁気微粒子110は磁石72の磁界によって磁化され、ウェル40の底面に向かって移動する。エクソソーム90の表面分子92と磁気微粒子110の抗体112とは、抗原抗体反応によって特異的に結合する。これにより、磁気微粒子110は、エクソソーム90と結合した状態で、試料分析用容器10内、具体的にはウェル40内のトラック領域23の凹部22に捕捉される。

【0055】

図16では磁界発生部70の磁石72がウェル40の底面に接近した状態を示しているが、ステップS4では、磁石72がウェル40の底面から離隔した状態でもよい。なお、ステップS4では、磁石72をウェル40の底面に接近させることにより、磁気微粒子110をウェル40の底面に向かって迅速に移動させることができる。これにより、ステップS4を時間短縮することができる。

【0056】

オペレータは、磁石72がウェル40の底面に接近した状態の場合には、磁石72がウェル40の底面から離隔するように検体検出用装置50を操作する。オペレータは、ウェル40から緩衝液104を排出し、ウェル40を緩衝液で洗浄する。なお、エクソソーム

10

20

30

40

50

90と結合しないで緩衝液104中に分散している磁気微粒子110は、この洗浄によって除去される。即ち、検出対象のエクソソーム90と結合している磁気微粒子110はトラック領域23の凹部22に捕捉され、検出対象のエクソソーム90と結合していない余分な磁気微粒子110は洗浄によって除去される。

【0057】

オペレータは、ステップS5にて、図18に示すように、磁石72がウェル40の底面に接近するように検体検出用装置50を操作する。オペレータは、エクソソーム90から内包物質93を遊離させるための抽出液(第3の溶液)105をウェル40に注入する。

【0058】

図19に示すように、抽出液105でエクソソーム90を溶解させることにより、抽出液105中に内包物質93を遊離させることができる。エクソソーム90から内包物質93を遊離させる時間は、例えば抽出液105を注入してから数分間程度である。

【0059】

エクソソーム90が溶解することにより、トラック領域23の凹部22に捕捉されているエクソソーム90と磁気微粒子110との結合は解除されてしまう。結合が解除された磁気微粒子110は磁石72の磁力によって磁石72側に引き寄せられるため、試料分析用容器10内、具体的にはウェル40内のトラック領域23の凹部22に捕捉されている状態を維持する。即ち、駆動部80は、磁石72をウェル40の底面に接近させることにより、磁気微粒子110を磁石72の磁力によってウェル40内の底面の凹部22に捕捉する。

【0060】

オペレータは、ステップS6にて、内包物質93が遊離された抽出液105をピペット等を用いてウェル40から抽出し、例えばリアルタイムPCR(Real-Time Polymerase Chain Reaction)法を用いて内包物質93を解析する。リアルタイムPCR法は、DNAポリメラーゼによる酵素反応を利用してDNAを増幅させ、増幅産物の増加量をリアルタイムでモニタリングして解析する方法である。

【0061】

例えば、段階的に希釈した基準サンプルに対してリアルタイムPCR法を適用することにより増幅産物の増幅曲線を得る。増幅曲線と設定された閾値との交わる点であるCt(Threshold Cycle)値を算出し、検量線を作成する。ウェル40から抽出した抽出液105についても基準サンプルと同様にCt値を算出し、算出したCt値と作成した検量線とからエクソソーム90の内包物質93であるDNAを定性及び定量することができる。

【0062】

従って、ウェル40毎に抽出液105をサンプリングすることにより、各ウェル40における内包物質93を解析することができる。

【0063】

オペレータは、磁石72がウェル40の底面に接近した状態で、ウェル40から残りの抽出液105を排出し、ウェル40を緩衝液で洗浄する。オペレータは、ウェル40を乾燥させる。乾燥時間は10分~15分程度である。乾燥は、ウェル40の底面上の水滴がなくなる程度でもよい。

【0064】

ウェル40を洗浄し、乾燥させている期間は磁石72がウェル40の底面に接近しているため、磁気微粒子110は磁石72の磁力によって凹部22に捕捉されている状態を維持する。

【0065】

オペレータは、ステップS7にて、試料分析用容器10を検体検出用装置50のユニット保持部60から取り外す。オペレータは、図2(b)に示すように、試料分析用容器10のカートリッジ30を試料分析用ディスク20から取り外す。なお、乾燥後の磁気微粒子110はファンデルワールス力によって凹部22に捕捉されている状態を維持する。

【0066】

10

20

30

40

50

図2(b)及び図20に示すように、試料分析用ディスク20には、複数のウェル40に対応して複数の反応領域24が形成される。即ち、複数の反応領域24は、それぞれの中心が同一円周上に位置するように等間隔に形成されている。反応領域24の凹部22上には磁気微粒子110が捕捉されている(図19参照)。

【0067】

オペレータは、反応領域24の凹部22上に捕捉されている標識である磁気微粒子110を、例えば光ピックアップ等を用いて光学的に検出し、計数することで、凹部22上に捕捉されていたエクソソーム90を間接的に検出し、計数することができる。

【0068】

例えば、外部に配置された光ピックアップから、磁気微粒子110が捕捉されている反応領域24の凹部22に向けてレーザ光を照射する。反応領域24からの反射光を解析することで、磁気微粒子110を検出し、計数することができる。

【0069】

具体的には、光ピックアップは、トラック領域23にレーザ光を集光させるための対物レンズを備えている。試料分析用ディスク20を一般的な光ディスクと同様に回転させ、光ピックアップを試料分析用ディスク20の半径方向に移動させることにより、対物レンズによって集光されたレーザ光をトラック(具体的には凹部22)に沿って走査する。反応領域24からの反射光により得られた検出信号から、凹部22に捕捉されている磁気微粒子110を検出し、計数する。

【0070】

本実施形態の検体検出用装置及び検体検出方法では、エクソソーム90を磁気微粒子110と結合した状態でトラック領域23の凹部22に捕捉する。磁石72をウェル40の底面に接近させた状態で、抽出液105によりエクソソーム90から内包物質93を遊離させる。磁気微粒子110が磁石72の磁力によって凹部22に捕捉されている状態で、内包物質93が遊離した抽出液105を抽出し、内包物質93を解析する。一方、試料分析用ディスク20を乾燥させ、反応領域24に捕捉されている磁気微粒子110を光学的に検出する。

【0071】

従って、本実施形態の検体検出用装置及び検体検出方法によれば、エクソソーム90の検出と内包物質93の検出とを同一の検体(試料液103)で行うことができる。

【0072】

本発明は、以上説明した実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々変更可能である。

【0073】

本実施形態では、試料液103をウェル40に注入してエクソソーム90を凹部22に捕捉した後、緩衝液104をウェル40に注入して磁気微粒子110をエクソソーム90と結合させたが、これに限定されるものではない。例えば、試料液103と緩衝液104とをウェル40に注入して混合させてもよいし、試料液103と緩衝液104とをマイクロチューブやカラム等の別の容器で混合し、混合液をウェル40に注入するようにしてもよい。

【0074】

また、本実施形態では、試料分析用容器10を試料分析用ディスク20とカートリッジ30とを備える構成としたが、これに限定されるものではない。試料分析用容器10としてマイクロプレートを用いてもよい。マイクロプレートのウェルの底面に磁石72を接近させた状態でエクソソーム90から内包物質93を遊離させることにより、本実施形態と同様の効果を奏する。試料分析用容器10としてマイクロチューブなどの試験管やシャーレなどを用いてもよい。試料分析用容器10としてマイクロプレート、試験管、またはシャーレなどを用いる場合、磁気微粒子110は、磁石72の磁力によって試料分析用容器10内に捕捉された状態を維持できればよい。

【0075】

10

20

30

40

50

また、ユニット保持部 60 は、ウェル 40 と試料検出用ディスク 20 が分離して液漏れしないよう密着保持が可能であれば本実施形態に限定されるものではない。例えば、カートリッジ 30 と試料分析用ディスク 20 を係合させるつめなど各種ロック機構で試料分析用容器 10 を保持してもよい。検体検出用装置 50 に試料分析用容器 10 を載置した際、試料分析用容器 10 側での押さえ構造により試料分析用容器 10 を保持してもよい。

【符号の説明】

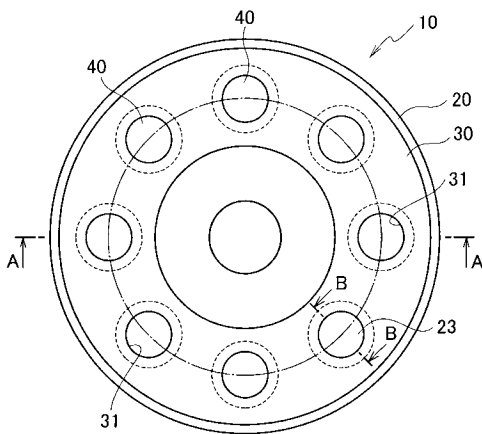
【0076】

- 10 試料分析用容器
- 20 試料分析用ディスク
- 40 ウェル
- 50 検体検出用装置
- 60 ユニット保持部
- 70 磁界発生部
- 72 磁石
- 80 駆動部
- 90 エクソソーム
- 93 内包物質
- 103 試料液（第 1 の溶液）
- 104 緩衝液（第 2 の溶液）
- 105 抽出液（第 3 の溶液）
- 110 磁気微粒子

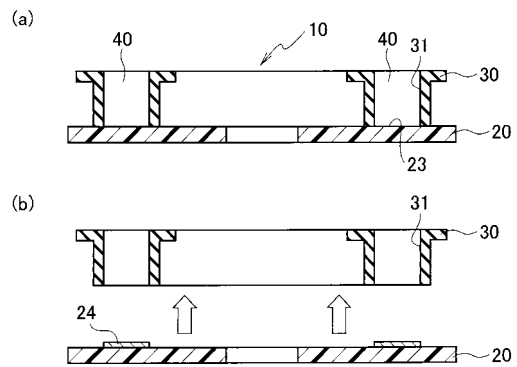
10

20

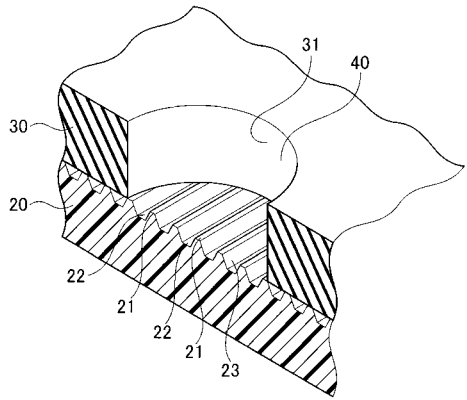
【図 1】



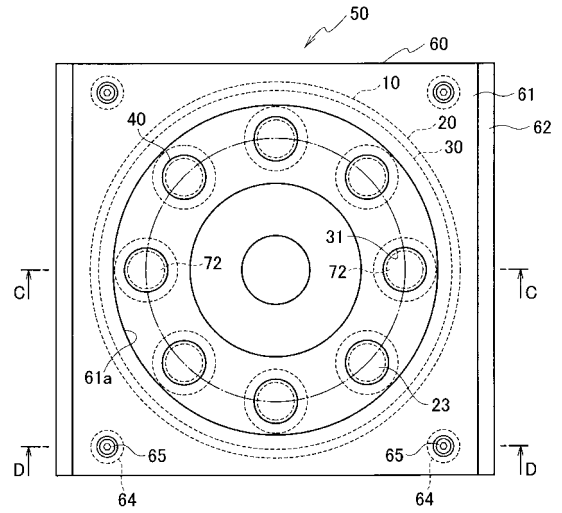
【図 2】



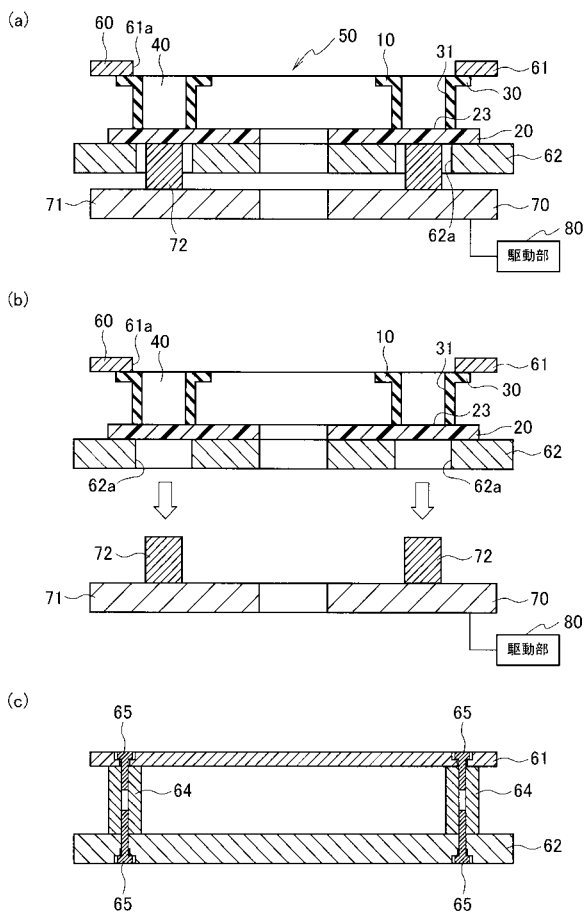
【 図 3 】



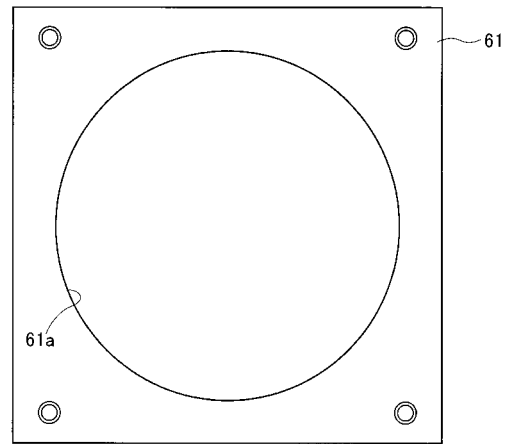
【 図 4 】



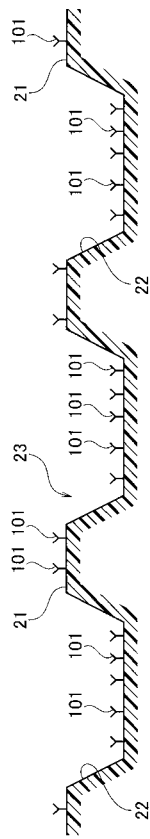
【 図 5 】



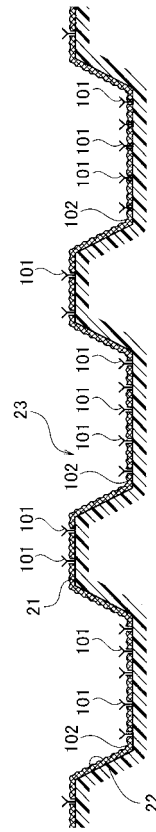
【 図 6 】



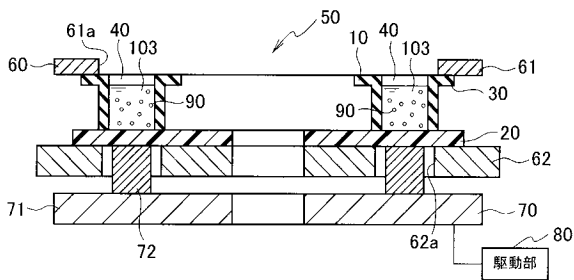
【 図 1 1 】



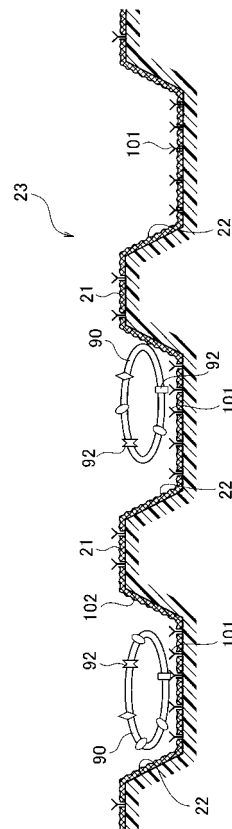
【 図 1 2 】



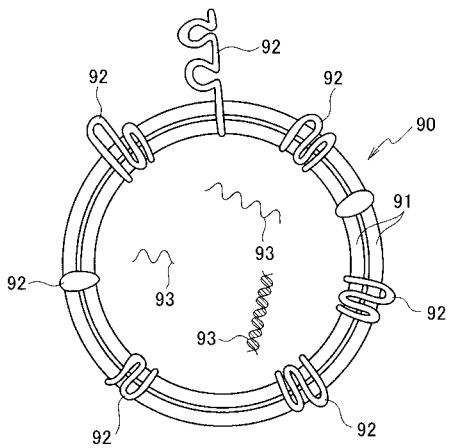
【 図 1 3 】



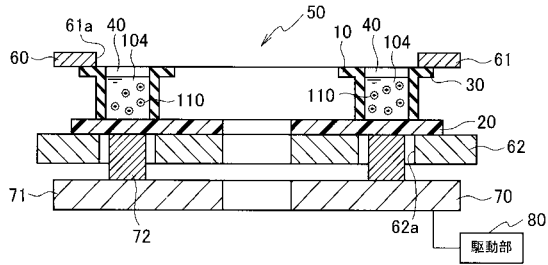
【 図 1 5 】



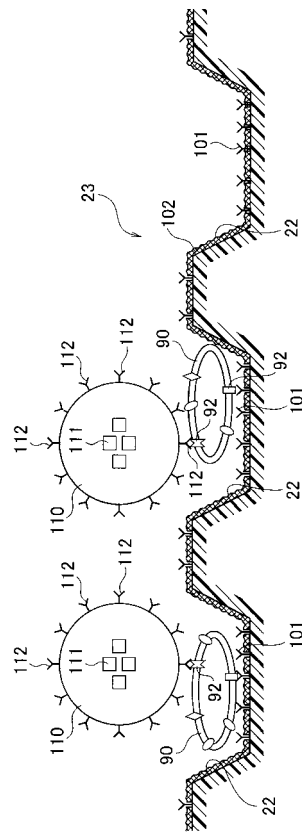
【 図 1 4 】



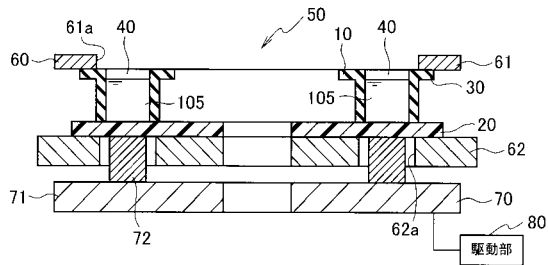
【図 16】



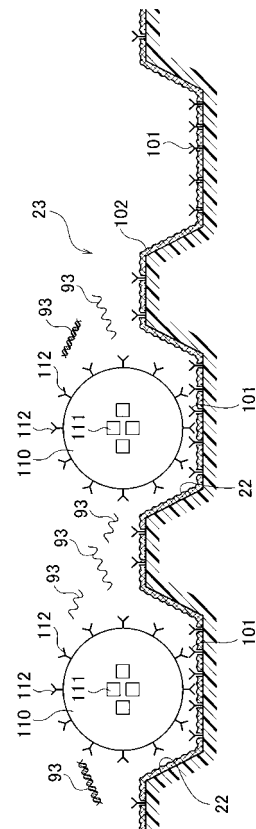
【図 17】



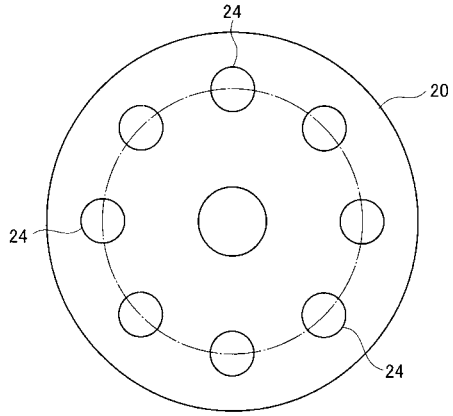
【図 18】



【図 19】



【 図 2 0 】



フロントページの続き

- (72)発明者 長谷川 祐一
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
- (72)発明者 辻田 公二
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
- (72)発明者 岩間 茂彦
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12番地
- Fターム(参考) 2G058 AA09 CC02 CC03 CC17 EA16