

(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2004-12290

(P2004-12290A)

(43) 公開日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

C 1 2 M 1/00

G 0 1 N 33/566

F I

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

C 1 2 M 1/00

G 0 1 N 33/566

テーマコード (参考)

4 B O 2 9

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2002-165888 (P2002-165888)

(22) 出願日 平成14年6月6日(2002.6.6)

(71) 出願人 501387839

株式会社日立ハイテクノロジーズ
東京都港区西新橋一丁目24番14号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(72) 発明者 竹中 啓

茨城県土浦市神立町502番地 株式会社
日立製作所機械研究所内

(72) 発明者 長岡 嘉浩

茨城県土浦市神立町502番地 株式会社
日立製作所機械研究所内

(72) 発明者 渡部 成夫

茨城県土浦市神立町502番地 株式会社
日立製作所機械研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子診断装置

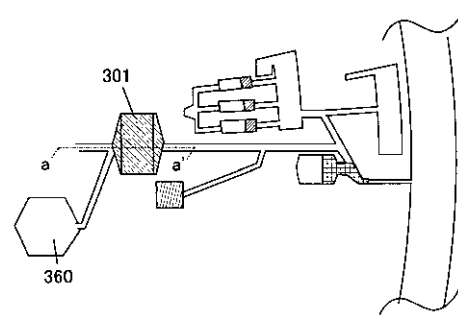
(57) 【要約】

【課題】 核酸の精製から増幅に必要な定量操作を必要としない遺伝子診断装置を提供する。

【解決手段】 核酸吸着部材301と増幅液を保持した増幅液保持容器360を持つ回転可能なデバイスを用い、遠心力を利用して、増幅液を核酸結合部材301に送液し、核酸を溶離する。もしくは核酸結合部材上で溶離とともに増幅する。

【効果】 核酸の精製物と増幅液を定量する工程が省略できるので、作業時間の短縮し、遺伝子診断装置の構造を単純にする。

【選択図】 図22



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、及び複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、
前記核酸吸着部材が核酸増幅部を兼ねることを特徴とする遺伝子診断装置。

【請求項 2】

回転可能に支持した構造体を備え、検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、及び複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、
前記核酸吸着部材が核酸増幅を兼ねることを特徴とする遺伝子診断装置。

10

【請求項 3】

回転可能に支持した構造体を備え、検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、及び複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、
前記核酸吸着部材の温度を制御する温度制御機構を設け、前記核酸吸着部材に増幅液が供給されることを特徴とする遺伝子診断装置。

【請求項 4】

回転可能に支持した構造体を備え、検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部、及び増幅部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、
前記増幅部の温度を制御する温度制御機構を設け、前記核酸吸着部材に増幅液が供給されることを特徴とする遺伝子診断装置。

20

【請求項 5】

前記核酸結合部材より下流に、増幅液を前記核酸吸着部材に供給させる以前の試薬が流動するための第一流路、及び前記核酸吸着部材を通過したあとの増幅液が流動するための第二流路を備え、前記第一流路の一部の断面積を縮小させたことを特徴とする請求項 3 又は 4 に記載の遺伝子診断装置。

【請求項 6】

前記核酸結合部材と前記第一流路の幅狭流路の一部が回転中心方向をむいていることを特徴とする請求項 5 に記載の遺伝子診断装置。

30

【請求項 7】

核酸結合部位より下流に検出部または増幅部を備え、核酸結合部位と、検出部または増幅部を連結する流路の一部が回転中心方向をむいていることを特徴とする請求項 3 または 4 に記載の遺伝子診断装置。

【請求項 8】

前記第一流路の一部、または前記回転中心方向をむいている流路の一部に封止材を注入する手段を有することを特徴とする請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載の遺伝子診断装置。

【請求項 9】

検出部と増幅部を連結する流路上に液だめ容器を備え、液だめ容器と検出部を連結する流路幅は液だめ容器の最小幅よりも小さく、かつ液だめ容器は通気孔を備えていることを特徴とする請求項 7 に記載の遺伝子診断装置。

40

【請求項 10】

検出部は複数あり、検出部より内径側の流路の幅は検出部の最小幅より小さく、かつ検出部より内径側の流路は連結していることを特徴とする請求項 7 に記載の遺伝子診断装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、検体中の核酸を抽出し、抽出した核酸を分析するための遺伝子診断装置に関する。

50

【0002】

【従来の技術】

複数の化学物質を含む試料から核酸等の特定の化学物質を抽出する抽出装置としては、特表平8-501321号公報に、クロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法が記載されている。この方法では、核酸混合液を高濃度の塩を含む吸着水溶液からシリカゲル等の無機基体上に吸着させた後、洗浄液で洗浄し、低濃度の塩を含む溶液で核酸を溶出している。シリカゲルは円筒状の中空カラム内に固定されており、分離すべき核酸混合物の溶液を注ぎ、吸引または遠心分離で溶液を無機基体に通している。

【0003】

また、WO00/78455号公報に、増幅を用いた検査のための微小構造体及び方法が記載されている。この装置では、前記特表平8-501321号公報記載の核酸混合物の精製分離法を用いて、DNA混合液を無機基体としてのガラスフィルタに通過させた後、洗浄液及び溶離液を通過させてDNAのみを回収している。ガラスフィルタは回転可能な構造体に設けてあり、洗浄液や溶離液等の試薬は同じ構造体内の各試薬リザーバに保持してある。各試薬は構造体が回転することにより発生する遠心力で流動し、各試薬リザーバとガラスフィルタを結ぶ微細流路に設けたバルブを開くことにより試薬がガラスフィルタを通過する。

【0004】

複数の化学物質を含む試料から核酸等の特定の化学物質を抽出し分析する化学分析装置としては、特表2001-527220号公報に、一体型流体操作カートリッジが記載されている。この装置では、一体型カートリッジ内部に溶解液や洗浄液や溶離液等の試薬、及び核酸を捕獲する捕獲構成部品を備え、核酸を含む試料をカートリッジ内部に注入した後、前記試料と溶離液を混合させて前記捕獲構成部品に通過させ、さらに捕獲構成部品に洗浄液を通過させ、さらに捕獲構成部品に溶離液を通過させ、捕獲構成部品を通過した後の溶離液をPCR試薬に接触させ反応チャンバへと流している。

【0005】

特表2001-502793号公報に化学分析用の装置及び方法が記載されている。この装置では、ディスク形状部材内部にチャンバ、流路、リザーバ、分析用セルを設け、遠心チャンバ内に血液サンプルを注入後血球と血清を遠心分離し、血清を試薬が表面にコーティングされたビーズを有する反応チャンバに血清のみを流し、その後洗浄のための溶液を反応チャンバに流し、さらに溶出溶液を反応チャンバに流して、前記溶出溶液を反応チャンバから複数の分析用セルに移動させている。分析セルは複数あり、ある時系列にそって、分注していく。分析セルの流入口は回転中心側にある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

核酸を溶離した後、増幅するには一定量の核酸を含む溶離液に一定量の増幅液を追加し増幅する必要がある。検出の際、従来の方法では、精製した核酸を含む溶液と増幅液を一定の比率で混合する必要がある、そのため、検査者の技量に検査結果が反映されうることもある。また、核酸の精製から増幅に移る過程において、精製した核酸を含む溶液や増幅液を定量する必要がある、自動化する上で、そのための作業時間や複雑な過程が必要となる。さらに、定量することで精製した核酸の一部を失う事になるため、核酸の精製から増幅、検出まで一貫して行い、精製した核酸を定量せずに増幅過程に移行できる遺伝子診断装置の必要性があった。

【0007】

従来技術である特表平8-501321号公報記載の精製分離法では、シリカゲルを固定した円筒状の中空カラムに核酸混合液を注ぎ、遠心力を利用してシリカゲルに核酸混合液を通過させた後複数の試薬を通過させることで核酸のみを回収しているが、中空カラムへの各試薬の注入方法及びシリカゲルを通過した洗浄液と溶離液の回収方法については開示されていない。

【0008】

特表2001-527220号公報記載の核酸を溶離する方法では、PCR試薬で核酸を溶離することが書いてあるが、その他の増幅試薬での溶離操作や核酸捕獲構成部品上での核酸の増幅については開示されていない。

特表2001-527220号公報記載の構造体では、各試薬リザーバと核酸捕獲構成部品を結ぶ微細流路に設けた流れ制御装置（バルブ、分流加速器、流体ダイオード）を開き、各試薬は強制的に流体動力源で流動し核酸捕獲構成部品を通過する。試薬の流路方向の制御を上記流れ制御装置で行っている。またW000/78455号公報記載の構造体では、各試薬リザーバとガラスフィルタを結ぶ微細流路に設けたバルブを開くことで各試薬は遠心力の作用で流動しガラスフィルタを通過する。試薬の流路方向の制御をバルブを開く事によって行っている。第一の従来技術において使用している流れ制御装置は、コスト10
がかかり、使い捨てのデバイスには不向きである。第二の従来技術では、流路を切り替えた際、切り替えられた流路は開いたままの状態であるため、振動などにより、切り替えられた流路の先に溜まっている液が振動などにより逆流し、切り替えた流路を汚染する恐れがある。

【0009】

特表2001-502793に記載されている検体を複数の検査容器に分注する方法では、検体にかかる負荷方向と検体を検出部に流入させる方向が同じため、検出部にある空気が抜けず検出の際に邪魔をする恐れがある。また、検査試薬を同時に分注する目的には適していない。

本発明の目的は、上記課題を解決することにより、検体中の核酸を抽出し、抽出した核酸20
を分析するための遺伝子診断装置を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記課題は、核酸吸着部材上で核酸を増幅することができる遺伝子診断装置を提供することで解決できる。即ち、第一に本発明の遺伝子診断装置は、検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、及び複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、前記核酸吸着部材が核酸増幅部を兼ねることを特徴とする。

【0011】

第二に、本発明の遺伝子診断装置は、回転可能に支持した構造体を備え、検体中の核酸を30
捕捉する核酸吸着部材、及び複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、前記核酸吸着部材が核酸増幅を兼ねることを特徴とする。

【0012】

或いは、核酸吸着部材の温度を制御する温度制御機構を設け、核酸吸着部材に増幅液を供給することができる遺伝子診断装置を提供することで解決できる。即ち、第三に本発明の遺伝子診断装置は、回転可能に支持した構造体を備え、検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、及び複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、前記核酸吸着部材の温度を制御する温度制御機構を設け、前記核酸吸着部材に増幅液が40
供給されることを特徴とする。

【0013】

或いは、増幅部の温度を制御する温度制御機構を設け、前記核酸吸着部材に増幅液を供給することができる遺伝子診断装置を提供することで解決できる。即ち、第四に、本発明の遺伝子診断装置は、回転可能に支持した構造体を備え、検体中の核酸を捕捉する核酸吸着部材、複数の試薬を別々に保持するための複数の試薬保持部、及び増幅部を備え、前記核酸吸着部材と試薬保持部を連結するための流路を上記構造体内部に備えた遺伝子診断装置において、前記増幅部の温度を制御する温度制御機構を設け、前記核酸吸着部材に増幅液が供給されることを特徴とする。

【0014】

特に、第三または第四の遺伝子診断装置において、前記核酸結合部材より下流に、増幅液を前記核酸吸着部材に供給させる以前の試薬が流動するための第一流路、及び前記核酸吸着部材を通過したあとの増幅液が流動するための第二流路を備え、前記第一流路の一部の断面積を縮小させたことが望ましい。ここで、前記核酸結合部材と前記第一流路の幅狭流路の一部が回転中心方向をむいていることが好ましい。

【0015】

また、第三または第四の遺伝子診断装置において、核酸結合部位より下流に検出部または増幅部を備え、核酸結合部位と、検出部または増幅部を連結する流路の一部が回転中心方向をむいていることが好ましい。

上記のいずれかにおいて、前記第一流路の一部、または前記回転中心方向をむいている流路の一部に封止材を注入する手段を有することが望ましい。 10

【0016】

更に、上記において、検出部と増幅部を連結する流路上に液だめ容器を備え、液だめ容器と検出部を連結する流路幅は液だめ容器の最小幅よりも小さく、かつ液だめ容器は通気孔を備えていることが好ましい。

更に、上記において、検出部は複数あり、検出部より内径側の流路の幅は検出部の最小幅より小さく、かつ検出部より内径側の流路は連結していることが好ましい。

【0017】

【発明の実施の形態】

図1～図51を参照して、本発明による抽出装置を用いた遺伝子分析装置の実施例を説明する。 20

図1は本発明による遺伝子分析装置の全体構成図である。遺伝子分析装置1は、モータ11により回転可能に支持された保持ディスク12と、保持ディスク12上の突起121により位置決めされた複数の扇形の分析ディスク2と、液体の流動を制御するための穿孔機13と、加温及び検出のための2台の光学装置即ち上部光学装置14及び下部光学装置15と、位置検出器16を備えている。保持ディスク12は、下部光学装置15用の保持ディスク光学窓122を備えている。

【0018】

図2は分析ディスク2の組図の断面図である。分析ディスク2は上カバー20（図3）と流路部30（図4）と下カバー40（図5）を接合して構成している。図6は分析ディスクの上カバーと流路部の対応を示す。上カバー20は、試料注入口210、複数の試薬注入口220、230、240、250、260、290、1210、1220、1230及び複数の通気孔202、221、231、241、251、261、271、281、291、1211、1212を備えている。下カバー40は、位置決め孔460と流路部光学窓490を備えている。分析ディスク2は、保持ディスク12の突起121に対して位置決め孔460が嵌め合うことで位置決めされる。 30

【0019】

流路部30の構成図を図4に示す。図4に示す流路部の実施例は、全血から血清を分離後、血清中のウイルスに含まれる核酸を抽出し分析する流路を構成している。

以下全血を試料として用いた場合のウイルス核酸の抽出及び分析動作を説明する。抽出及び分析動作の流れを図31から33に示す。 40

【0020】

操作者は分析ディスク2の上カバー20より各試薬注入口220、230、240、250、260、290、1210、1220、1230を通して試薬を本発明で言う試薬保持部である各試薬容器320、330、340、350、360、390、1311、1321、1331に分注し、蓋をする。分析数に応じて必要な数の分析ディスクに試薬を注入後、保持ディスク12に分析ディスクを装着する。

【0021】

次に真空採血管等で採血した全血を試料注入口210より試料容器310に注入する。全血を注入後、モータ11で保持ディスク12を回転する。試料容器310に注入された全 50

血は、保持ディスク１２の回転により発生する遠心力の作用で外周側に流動する。

【００２２】

この全血の流動状態を図７～１０に示す。後述の血清貯蔵容器３１３は血清保持部３１２の真下に位置し、血清流出口３１５で血清貯蔵容器３１３と血清保持部３１２が連通しているが、図７～１０では血清の流動状態を示すため、血清貯蔵容器３１３を血清保持部３１２から離して示してある。全血流動部の上下方向の位置関係を分析ディスクの縦断面図（図１１～１４）で示す。なお図１１～１４には、後述の試薬容器、混合部及び廃液容器も示してある。図１５は分析ディスクの上面図を示す。

【００２３】

図７及び図１１に示すように、注入された全血３１６は試料容器３１０に保持される。保持ディスク１２が回転すると（図８及び図１２）、遠心力により全血３１６は血球分離部３１１へ流れ込む。血球分離部３１１には分離剤３１４があらかじめ注入してある。分離剤３１４の比重は血清より大きく血球より小さく調整してある。保持ディスク１２の回転数が増加するにつれて血球成分と血清とが比重の違いで徐々に分離すると、分離剤３１４は血球３１７と血清３１８の間に位置し、血球３１７と血清３１８とを分離する（図９及び図１３）。モータ１１の回転を止めると、血清のみが血清流出口３１５を通過して血清保持部３１２から真下の血清貯蔵容器３１３へと流出する（図１０及び図１４）。 10

【００２４】

上記一連の血清分離動作時に、上カバー（図３）にある各試薬容器の通気孔２２１、２３１、２４１、２５１、２６１、２７１、２８１、２９１、１２１１、１２１２は蓋をしていて空気が入らない状態になっている。遠心力により各試薬は試薬容器外周側より流出しようとするが、容器内に空気が入らないため試薬容器内の圧力が低下し、遠心力と釣り合って試薬は流出することができない。しかし回転数が増加し遠心力が大きくなると、試薬容器内の圧力は徐々に低下し、試薬の飽和蒸気圧以下になると気泡が発生する。そこで、図１５に示すように、各試薬容器外周側から流出する試薬を一旦内周側に戻すような流路構造（戻り流路３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２）とすることで、試薬容器内の圧力低下を抑制し、気泡の発生を防ぐ。このように図４及び図５に示す血清分離動作時には、各試薬（図１１～１４の場合試薬３２１）は試薬容器３２０に保持されたまま流動しない。 20

【００２５】

血清分離動作が終了し血清３１８が血清貯蔵容器３１３に蓄えられると、以下穿孔機１３が各試薬容器上部の通気孔の蓋にひとつずつ穴をあけてはモータ１１を回転し、各試薬を遠心力で流動させる。 30

【００２６】

以下に血清分離終了後の動作を示す。

図１８に核酸結合部材３０１下流側の部分詳細図を示す。また、図１５に流路部３０に対する上カバー２０の各孔の位置関係を示す。

溶解液容器３２０には血清中のウイルスの膜蛋白を溶解するための溶解液が分注してある（図１３）。穿孔機１３が溶解液通気孔２２１の蓋に穴をあけた後、モータ１１を回転させると、遠心力の作用により溶解液は溶解液容器３２０より溶解液戻り流路３２２を経て、混合容器３８０に流れ込む。このとき血清貯蔵容器３１３内の血清も遠心力の作用で流動し混合容器３８０に流れ込む。 40

【００２７】

図１６、１７に血清と溶解液が混合容器３８０に流れ込む様子を示す。混合容器３８０は、血清流出流路３１９で血清貯蔵容器３１３と連通し、溶解液流出流路３２９で溶解液貯蔵容器３２０と連通し、混合容器通気流路３８３を経て混合容器通気孔２８２（図３）から外部に連通している。血清３１８及び溶解液３２１が混合容器３８０に流れ込むと、血清と溶解液との混合液３８１を一旦内周側に戻すような流路構造（混合液戻り流路３８２）のために、混合液は一旦混合容器３８０に保持され（図１６）、混合容器３８０内で血清と溶解液とが十分混合される。図１７に示すように、混合容器３８０内の混合液量が増 50

え混合液戻り流路 382 の最内周側を越えると、混合液 381 は混合液戻り流路 382 から混合液流出流路 389 を経て核酸結合部材 301 (図 4) へと流出する。

【0028】

溶解液は、血清中のウイルスや細菌等からその膜を溶解して核酸を溶出させる働きをするが、さらに核酸結合部材 301 への核酸の吸着を促進させる。このような試薬としては、DNA の溶出及び吸着には塩酸グアニジンを、RNA にはグアニジンチオシアネートを用いればよく、核酸結合部材としては石英やガラスの多孔質材や繊維フィルタ等を用いればよい。

【0029】

このようにして溶解液と血清の混合液が核酸結合部材を通過すると、核酸が核酸結合部材に吸着し、液は溶離液回収容器 390 へと流れ込む。 10

次にモータ 11 を停止し、穿孔機 13 で第一洗浄液容器 330 に空気を供給するための第一洗浄液通気孔 231 の蓋に穴をあけた後、再びモータ 11 を回転させると、遠心力の作用により第一洗浄液は第一洗浄液容器 330 より第一洗浄液戻り流路 332 を経て、核酸結合部材 301 に流れ込み、核酸結合部材 301 に付着した蛋白等の不要成分を洗浄する。第一洗浄液としては、たとえば上述の溶解液或いは溶解液の塩濃度を低減した液を使用すればよい。

【0030】

洗浄後の廃液は、上述の混合液同様、溶離液回収容器 390 を経て、廃液貯蔵容器 302 へと流出する。 20

同様の洗浄動作を複数回繰り返す。たとえば図 4 の実施例では、第一洗浄液に引き続き、モータ停止の状態、穿孔機 13 で第二洗浄液容器 340 に空気を供給するための第二洗浄液通気孔 241 の蓋に穴をあけ再びモータ 11 を回転させ、核酸結合部材 301 に付着した塩等の不要成分を洗浄する。第二洗浄液としては、たとえばエタノール或いはエタノール水溶液を用いればよい。

【0031】

同様に第三洗浄液容器 350 に空気を供給するための第三洗浄液通気孔 251 の蓋に穴をあけ、核酸結合部材 301 に付着した塩等の不要成分を再度洗浄する。第三洗浄液としては、たとえばエタノール或いはエタノール水溶液を用いればよい。

このように核酸結合部材 301 を洗浄し核酸のみが吸着している状態にした後、核酸の増幅工程に移行する。 30

【0032】

(実施例 1)

以下、核酸吸着部材上で核酸を増幅する場合を示す。

図 19 に核酸結合部材 301 周辺の流動状態を示す。

モータ 11 停止後、封止剤保持容器 370 に空気を供給するための封止剤保持容器通気孔 271 の蓋に穴を空ける。再びモータ 11 を回転させる。封止剤は流路 1371 に流れ込み流路 1371 を塞ぐ (図 20)。先細り流路 1381 のため (図 21)、封止剤流路 1371 の途中でとまる。封止剤はシリコングリースや接着剤を用いるのが望ましい。

【0033】

モータ 11 停止後、穿孔機 13 で増幅液保持容器 360 に空気を供給するための増幅液保持容器通気孔 261 の蓋に穴を開け、低速でモータ 11 を回転させ、増幅液を核酸結合部材 301 に遠心力と浸透で行き渡らせる (図 22)。モータ 11 停止のときに、増幅液が核酸結合部材 301 の下部に偏らないために、核酸結合部位 301 は図 7c' の構造にすることが好ましい。尚、図 23 は図 22 の a-a' 断面図である。 40

【0034】

増幅液は核酸を増幅し検出するための試薬で、増幅に必要なプライマー、核酸合成酵素、デオキシリボ三リン酸、緩衝液、金属イオンなどを含んでいる。増幅や検出の方式によって、蛍光色素、蛍光色素やビオチン修飾したプライマー、蛍光色素を修飾したデオキシリボ三リン酸を含んでもよい。 50

【0035】

モータ11を停止させ、核酸結合部材301を増幅方法に適した温度に加温する。たとえば恒温増幅法、LAMP法ならば、55-65℃が望ましい。核酸結合部の熱容量が大きいので、増幅法は増幅時の温度変化の回数が少ないもしくは無い恒温増幅法が好ましい。

【0036】

増幅終了後、穿孔機13で増幅液保持容器304から空気を抜くための検出容器通気孔281の蓋に穴を開け、モータ11を再び回転させると、核酸結合部材301にある増幅液は遠心力により、流路1361、流路1372、流路1374を通り、検出容器304に流れ込む(図24)。検出容器1310は外周側に突き出た検出液保持容器1311を持っているため、検出容器1311にあらかじめ入れている検出液1314は回転中も流れ出ることはない(図25)。増幅液廃棄容器1315から空気を抜くための検出液廃棄容器通気孔1212が閉じているため、増幅液は検出液廃棄容器1315に流れ込まない。

【0037】

モータ11を止め、追加液保持容器390に空気を供給するための追加液保持容器通気孔291の蓋に穴を開け、再びモータ11を回転させると、追加液は流路1361、1372、1374を通り、増幅液保持容器304内にある増幅液を検出容器1310、1320、1330まで押し上げる(図26)。追加液には水などを用いる。特に増幅液と追加液の混合が問題になる場合は疎水性の溶媒、例えばPCR用のミネラルオイルを用いることが好ましい。押し上げられた増幅液は検出容器1311、1321、1331に保持されていた検出液と混合する。追加液は微小流路1312、1322、1332に流れ込まない量にする。

【0038】

ある検出容器内の検出液がその他の検出容器に混入するのを防ぐために、各検出容器1310、1320、1330を連結している増幅液保持容器304を満たしている増幅液と追加液の混合物を取り除く。モータ11を止め、増幅液保持容器304に空気を供給するための増幅液保持容器通気孔1211の蓋に穿孔し、検出液廃棄容器1315から空気を逃がすための検出液廃液容器通気孔1212の蓋を穿孔する。モータ11を再び回転させると、増幅液保持容器304に溜まっている増幅液と追加液の混合物は流路1312、流路1313を通り、検出液廃棄容器1315に流れる(図27)。検出容器1310、1320、1330に溜まっている増幅液と検出液の混合液はその表面張力のため、微小流路1312、1313、1322、1323、1332、1333から流れ出す事はない(図28)。

【0039】

検出容器1310、1320、1330の上に上部光学装置14を下に下部光学装置15を動かす。図28に測定の様子を示す。上部光学装置14で光を照射し、発光量もしくは吸光量を下部光学装置15で測定する。発光量を測るばあいは受光装置の前に励起光を遮断するフィルタを取り付ける(図示せず)。

【0040】

上記穿孔、加温、検出時には保持ディスク12を所定の位置に停止させる必要がある。図29に示すように、保持ディスク12には位置決め用突起17を設けてあり、位置検出器16で保持ディスクの回転位置を検出し、コントローラ18でモータ11の回転及び穿孔機13の回転及び上下動、上部光学装置14及び下部光学装置15の回転、照射、検出を制御する。

【0041】

例えば図30に穿孔機13の動作タイミングを示す。保持ディスク12は、全血或いは各試薬の流動終了後回転数を低下させ、位置決め用の低速回転を維持する。位置検出器16が位置決め用突起17を検出すると保持ディスク12を停止し、穿孔機13を下降させ各試薬貯蔵容器の通気孔の蓋に穴をあけた後、再び上昇する。穿孔後保持ディスク12は、穿孔終了後の試薬貯蔵容器から試薬が流出しない程度の低速で回転し、次の分析ディスクの位置、すなわち分析ディスクが6枚装着されている場合は60度回転して停止し、同様

の穿孔動作を繰り返す。分析ディスクがどこに装着されているかは、例えば下部光学装置で流路部光学窓 490 から光を照射しその反射光を調べればよい。すべての分析ディスクの穿孔が終了した後、保持ディスクは高速で回転し試薬を流動させる。

【0042】

本実施例によれば、核酸の精製工程から増幅工程へ移行する過程で、核酸精製物を定量する必要がないため、定量により精製した核酸を失うことや定量に必要な動作を省略できるために、より高精度で短時間での測定が可能である。また核酸結合部位で核酸の増幅を行うために、溶離液を核酸結合部位に通過させ、溶離した核酸を増幅するよりも、より多くの核酸を増幅させることが可能である。

【0043】

上記実施例の目的は核酸の精製工程から増幅過程へ移行する過程での核酸精製物を定量する必要性をなくすことにある。

従来の方法のように核酸の精製工程と増幅工程を切り離している場合二つの工程を繋ぐためには、精製物を定量する工程は不可欠であった。本実施例は二つの工程を繋げることににより、定量操作を不必要なものにした。

【0044】

本実施例によれば、流路の切り替えを、古い流路を塞ぐことにより行うため、古い流路やその先に溜まっている廃液が振動などにより逆流し切り替えた新しい流路を汚染することを防ぐため、測定の信頼性が向上する。安価な封止剤で流路を塞ぐため、より安価な装置を提供できる。

【0045】

本実施例によれば、検出容器に負荷方向と反対の方向から検出する検体を流入させるので、検出容器内の空気を検出容器外に完全に押し出すことが可能であり、時間的に同時に検出容器に分注できるのでより高精度で高感度の測定が可能となる。

【0046】

(実施例 2)

以下、核酸吸着部材で核酸を溶離した後、核酸増幅過程を下流の別の容器で行う場合の実施例を説明する。

分析ディスク 2 は上カバー 20 (図 34) と流路部 30 (図 35) と下カバー 40 (図 36) を接合して構成している。上カバー 20 は、試料注入口 210、複数の試薬注入口 220、230、240、250、260、290、1210、1220、1230 及び複数の通気孔 202、221、231、241、251、261、271、281、291、1211、1212 を備えている。下カバー 40 は、位置決め孔 460 と流路部光学窓 490 を備えている。分析ディスク 2 は、保持ディスク 12 の突起 121 に対して位置決め孔 460 が嵌め合うことで位置決めされる。

【0047】

流路部 30 の構成図を図 35 に示す。図 35 に示す流路部の実施例は、全血から血清を分離後、血清中のウイルスに含まれる核酸を抽出し分析する流路を構成している。

図 38 に核酸結合部材 301 下流側の部分詳細図を示す。また、図 37 に流路部 30 に対する上カバー 20 の各孔の位置関係を示す。

血清分離から核酸結合部位 301 に核酸を結合させ、核酸結合部位 301 を洗浄するまでの過程 (図 31) は同じなので省略する。核酸増幅工程から検出工程までの流れを図 50、51 に示す。

【0048】

図 39 に核酸結合部材 301 周辺の流動状態を示す。モータ停止の状態で、穿孔機 13 で増幅容器 1340 に空気を供給するための増幅容器通気孔 1241 の蓋に穴を開ける。再びモータ 11 を回転させ、廃液貯蔵容器 302 に混入防止液を流す (図 40)。混入防止液は検出容器中に溶解液、洗浄液 1、2、3 が検出容器に流れ込むことを防ぐためのもので、液を流す過程で流路 1472、1471 を洗浄する効果もある。混入防止液には水などを用いる。

10

20

30

40

50

【0049】

次にモータ停止の状態で、封止液保持容器370に空気を供給するための通気孔271の蓋に穴を開ける。再びモータ11を回転させる。封止液は流路1471に流れ込み、流路1471を塞ぐ(図41)。流路1371は先細りの形状をしているため(図42)、封止剤流路1371の途中でとまる。封止剤はシリコングリースや接着剤を用いるのが望ましい。

【0050】

モータ11を停止後、穿孔機13で増幅液保持容器360に空気を供給するための増幅液保持容器通気孔261の蓋に穴を開け、核酸結合部材301に増幅液を流す。増幅容器1340から空気を逃がすための増幅容器通気孔1261は穴があいてあり、流路1471は閉じているので、増幅液は流路1461を通過し、核酸結合部材301を通過し、流路1472、微小流路1476を通過し増幅容器1340に流れ込む(図43)。検出容器1310、1320、1330から空気を逃がすための検出容器通気孔281、増幅液保持容器から空気を逃がすための増幅液保持容器通気孔1211、検出液廃棄容器から空気を逃がすための検出液廃棄容器通気孔1212がそれぞれ閉じているために、増幅液保持容器304、増幅液廃棄容器303に増幅液は流れ込まない。核酸結合部材301に吸着している核酸は増幅液に溶離する。増幅容器1340を満たし、余った増幅液は増幅液廃棄容器1350に流れ込む。

【0051】

増幅液は核酸を増幅し検出するための試薬で、増幅に必要なプライマー、核酸合成酵素、デオキシリボ三リン酸、緩衝液、金属イオンなどを含んでいる。増幅や検出の方式によって、蛍光色素、蛍光色素やビオチン修飾したプライマー、蛍光色素を修飾したデオキシリボ三リン酸を含んでもよい。

【0052】

モータ停止後、増幅液の表面張力により、微小流路1476と微小流路1477から、空気は増幅容器1340に空気は入らない(図44)。増幅液で満たされた増幅容器1340を光学測定装置を兼ねた光学装置14により、増幅方法に応じた温度に加熱し増幅する。例えば恒温増幅法、LAMP法ならば55℃から65℃に加温する。

【0053】

検出容器1310、1320、1330から空気を逃がすための検出容器検出容器通気孔281の蓋に穴をあけ、モータ11を再び回転させると、増幅容器1340にある増幅液は遠心力により、微小流路1476、流路1475を通り、増幅液保持容器304に流れ込む(図45)。検出容器1310は外周側に突き出た検出液保持容器1311を持っているため、検出液保持容器1311にあらかじめ入れている検出液は回転中も流れ出すことはない(図46)。

【0054】

モータ11を止め、追加液保持容器に空気を供給するための追加液保持容器通気孔291の蓋に穴を開け、再びモータ11を回転させると、追加液は流路1475、流路1474を通り、増幅液保持容器304内にある増幅液を検出容器1310、1320、1330まで押し上げる(図47)。押し上げられた増幅液は検出液保持容器1311、1321、1331に保持されていた検出液と混合する。追加液は微小流路1412、1422、1432に流れ込まない量にする。追加液には水などを用いる。増幅液へ混入が問題になるのであれば、疎水性の溶媒を用いる。例えばPCRで用いるミネラルオイルなどが望ましい。

【0055】

ある検出容器内の検出液がその他の検出容器に混入するのを防ぐために、各検出容器1310、1320、1330を連結している増幅液保持容器304を満たしている増幅液と追加液の混合物を取り除く。モータ11を止め、増幅液保持容器304に空気を供給するための増幅液保持容器通気孔1211の蓋に穿孔し、検出液廃棄容器1315から空気を逃がすための検出液廃液容器通気孔1212の蓋を穿孔する。モータ11を再び回転させ

ると、増幅液保持容器 304 に溜まっている増幅液と追加液の混合物は流路 1474、流路 1473 を通り、検出液廃棄容器 1315 に流れる（図 48）。検出容器 1310、1320、1330 に溜まっている増幅液と検出液の混合液はその表面張力のため、微小流路 1312、1313、1322、1323、1332、1333 から流れ出す事はない（図 49）。

【0056】

検出容器 1310、1320、1330 の上に上部光学装置 14 を下に下部光学装置 15 を動かす。図 14k に測定の様子を示す。上部光学装置 14 で光を照射し、発光量もしくは吸光量を下部光学装置 15 で測定する。発光量を測るばあいは受光装置の前に励起光を遮断するフィルタを取り付ける（図示せず）。

10

【0057】

本実施例によれば、核酸の精製工程から増幅工程へ移行する過程で、核酸精製物を定量する必要がないため、定量により精製した核酸を失うことや定量に必要な動作を省略できるために、より高精度で短時間での測定が可能である。また核酸を増幅する箇所を新たに設けることにより、非常に精製度の高い増幅が可能になる。

【0058】

上記実施例の目的は核酸の精製工程から増幅過程へ移行する過程での核酸精製物を定量する必要性をなくすことにある。

従来の方法のように核酸の精製工程と増幅工程を切り離している場合二つの工程を繋ぐためには、精製物を定量する工程は不可欠であった。本実施例は二つの工程を繋げることで、定量操作を不必要なものにした。

20

【0059】

本実施例によれば、流路の切り替えを、古い流路を塞ぐことにより行うため、古い流路やその先に溜まっている廃液が振動などにより逆流し切り替えた新しい流路を汚染することを防ぐため、測定の信頼性が向上する。安価な封止剤で流路を塞ぐため、より安価な装置を提供できる。また、核酸の精製する箇所、増幅する箇所、検出する箇所を独立させることが可能になるので、それぞれの工程がその他の工程の阻害になることを防ぐので、より高感度で高精度の検出が可能になる。

【0060】

本実施例によれば、検出容器に負荷方向と反対の方向から検出する検体を流入させるので、検出容器内の空気を検出容器外に完全に押し出すことが可能であり、より高精度で高感度の測定が可能となる。

30

【0061】

【発明の効果】

本発明によれば、精製工程における溶離過程を増幅過程に含めるため、時間的省略や操作の単純化につながる。また核酸結合部で増幅過程を行うことで、従来方法よりも核酸の回収量が増大する事が期待される。流路を塞ぐことで流路の切り替えるために、構造が単純になり、切り替えられた流路への廃液の逆流により、流路が汚染されるのを防止する。検出部や増幅部は試薬が流入した際、内部の空気が押し出されるので増幅や検出を阻害とならず、時間的に同時に検出部へ分注できるので、より高感度、高精度で測定する事が可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の実施例による遺伝子分析装置の全体構成図である。

【図 2】 本発明の実施例による分析ディスクの組図の断面図である。

【図 3】 本発明の実施例による分析ディスクの上カバーの構成図である。

【図 4】 本発明の実施例による分析ディスクの流路部の構成図である。

【図 5】 本発明の実施例による分析ディスクの下カバーの構成図である。

【図 6】 本発明の実施例による分析ディスクの上カバーと流路部の対応図である。

【図 7】 本発明の実施例による血球分離部の動作説明図である。

【図 8】 本発明の実施例による血球分離部の動作説明図である。

50

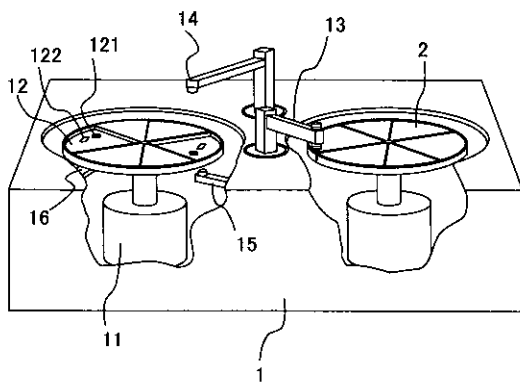
- 【図 9】本発明の実施例による血球分離部の動作説明図である。
- 【図 10】本発明の実施例による血球分離部の動作説明図である。
- 【図 11】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 12】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 13】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 14】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 15】本発明の実施例による分析ディスクの上面図である。
- 【図 16】本発明の実施例による混合部の動作説明図である。
- 【図 17】本発明の実施例による混合部の動作説明図である。
- 【図 18】本発明の実施例による流路部の核酸結合部位より下流側の部分詳細図である。 10
- 【図 19】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 20】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 21】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 22】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 23】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 24】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 25】本発明の実施例による流動部の部分詳細図である。
- 【図 26】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 27】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 28】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。 20
- 【図 29】本発明の実施例による位置決め機構の回路図である。
- 【図 30】本発明の実施例による位置決め動作のタイミングチャートである。
- 【図 31】本発明の実施例による分析動作の手順を示す説明図である。
- 【図 32】図 31 から続く本発明の実施例による分析動作の手順を示す説明図である。
- 【図 33】本発明の実施例による分析動作の手順を示す説明図である。
- 【図 34】本発明の実施例による分析ディスクの上カバーの構成図である。
- 【図 35】本発明の実施例による分析ディスクの流路部の構成図である。
- 【図 36】本発明の実施例による分析ディスクの下カバーの構成図である。
- 【図 37】本発明の実施例による分析ディスクの上カバーと流路部の対応図である。
- 【図 38】本発明の実施例による流路部の核酸結合部位より下流側の部分詳細図である。 30
- 【図 39】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 40】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 41】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 42】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 43】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 44】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 45】本発明の実施例による流路部の流動状態を示した図である。
- 【図 46】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 47】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 48】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。 40
- 【図 49】本発明の実施例による分析ディスクの断面図である。
- 【図 50】本発明の実施例による分析動作の手順を示す説明図である。
- 【図 51】本発明の実施例による分析動作の手順を示す説明図である。

【符号の説明】

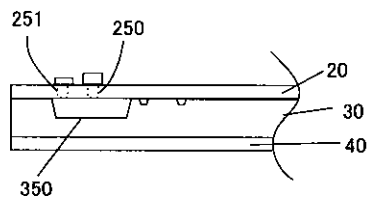
1・・・遺伝子分析装置、2・・・分析ディスク、11・・・モータ、12・・・保持ディスク、13・・・穿孔機、14・・・上部光学装置、15・・・下部光学装置、16・・・位置検出器、20・・・上カバー、30・・・流路部、40・・・下カバー、121・・・突起、122・・・保持ディスク光学窓、202・・・通気孔、210・・・試料注入口、220・・・試薬注入口、221・・・通気孔、301・・・核酸結合部材、310・・・試料容器、380・・・混合容器、390・・・溶離液回収容器、460・・・ 50

・位置決め孔、490・・・流路部光学窓

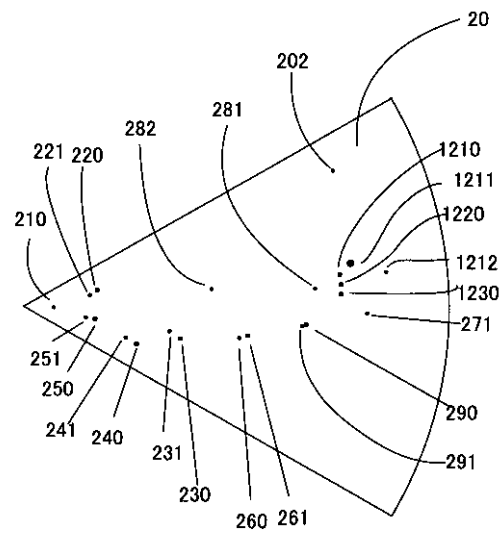
【図 1】



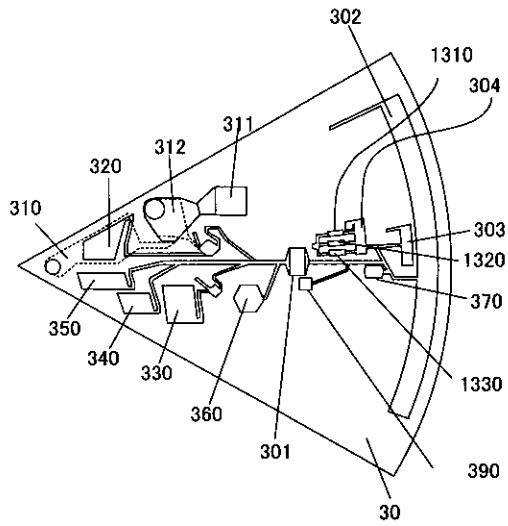
【図 2】



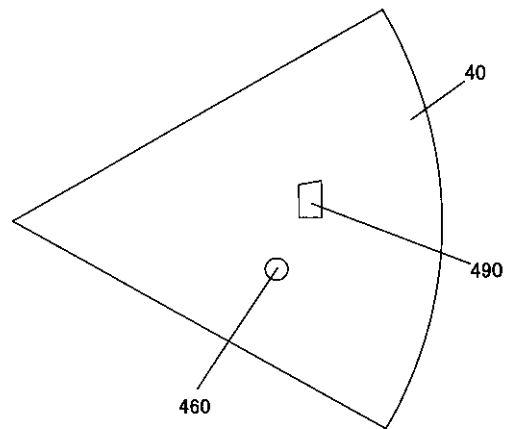
【図 3】



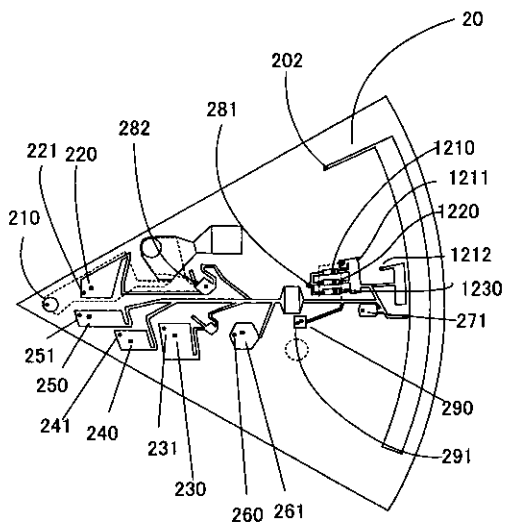
【図 4】



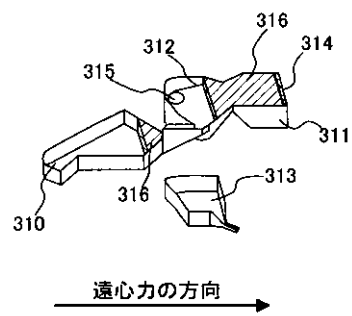
【図 5】



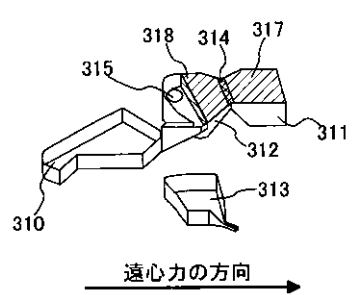
【図 6】



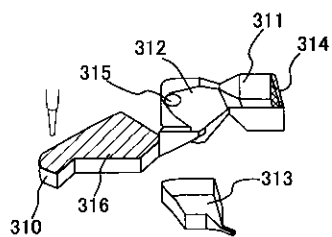
【図 8】



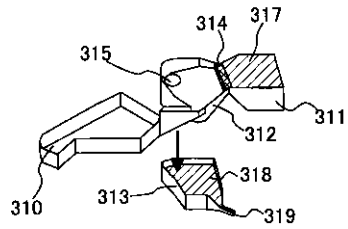
【図 9】



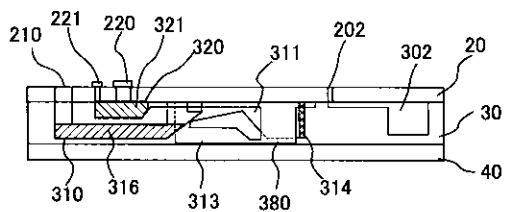
【図 7】



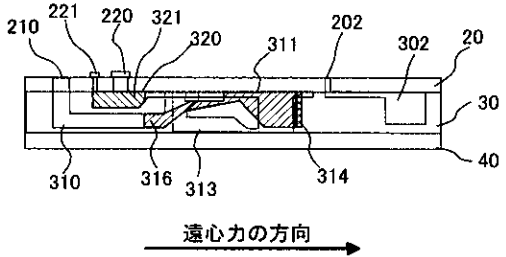
【図 10】



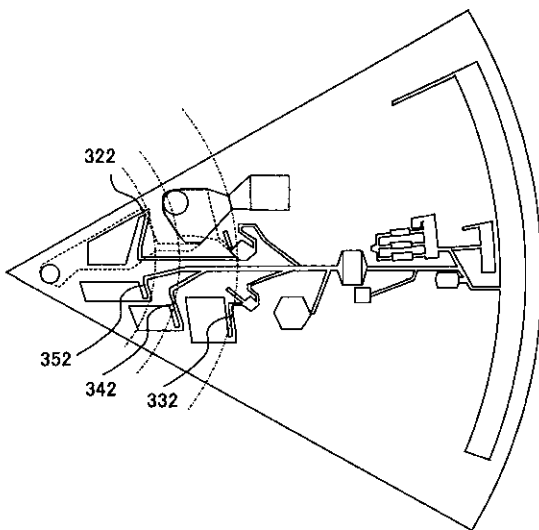
【図 11】



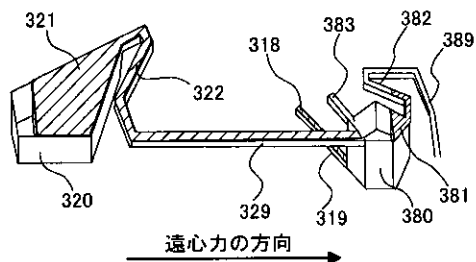
【図 12】



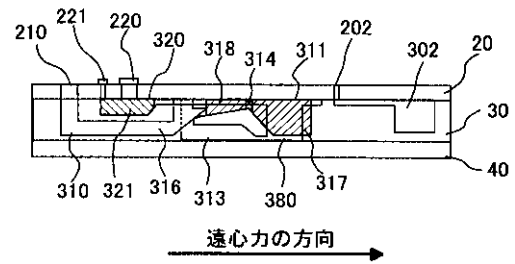
【図 15】



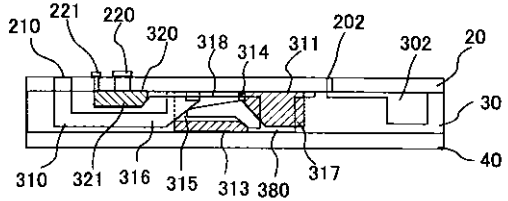
【図 16】



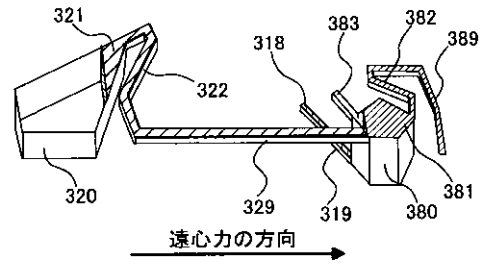
【図 13】



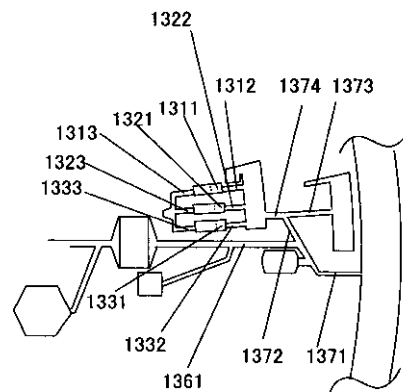
【図 14】



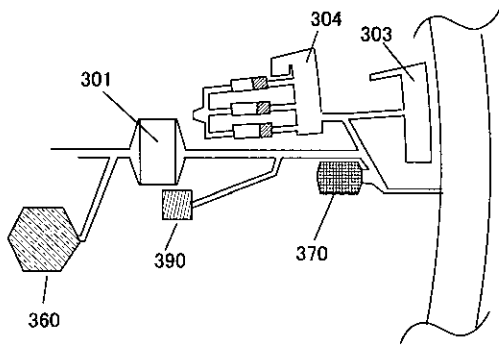
【図 17】



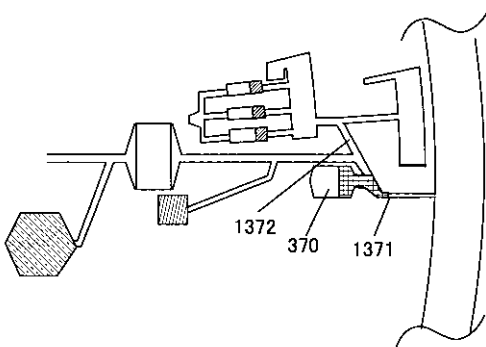
【図 18】



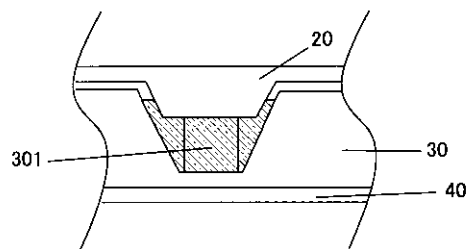
【図 19】



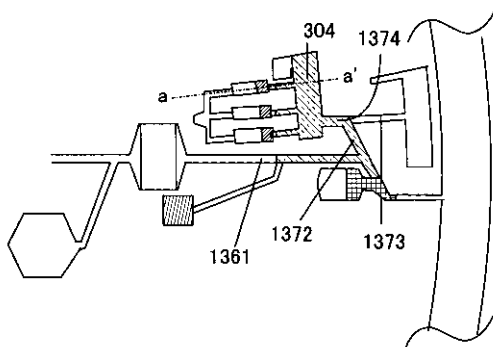
【図 20】



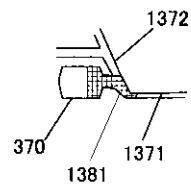
【図 23】



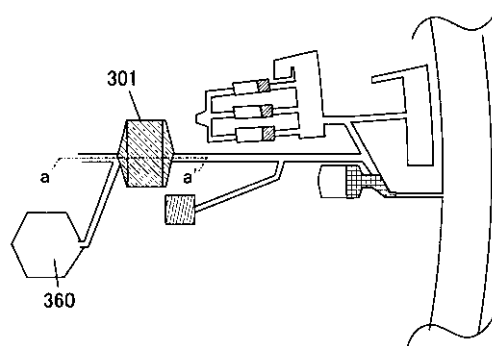
【図 24】



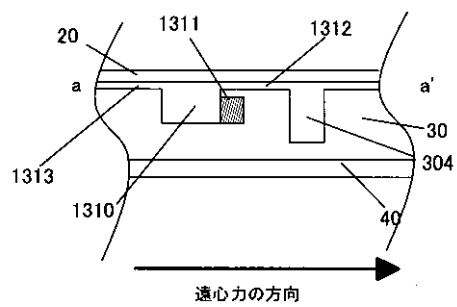
【図 21】



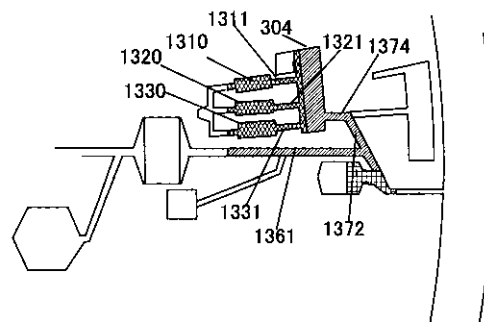
【図 22】



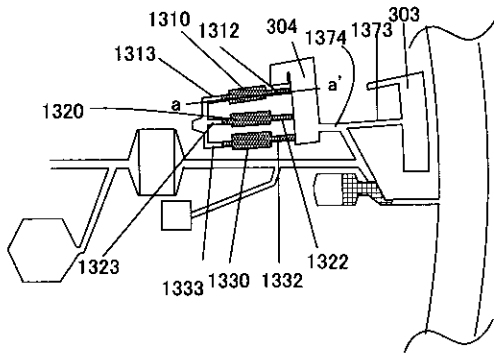
【図 25】



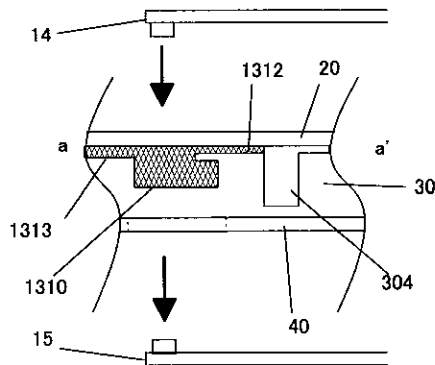
【図 26】



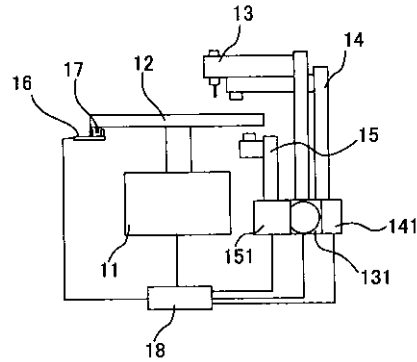
【図 27】



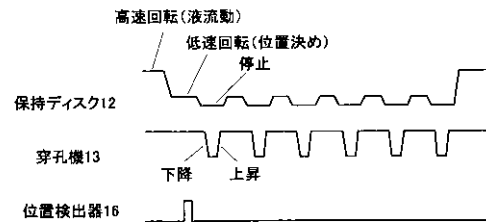
【図 28】



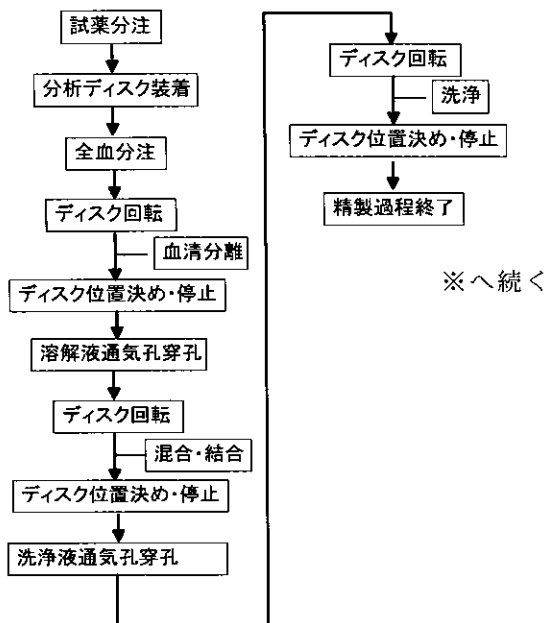
【図 29】



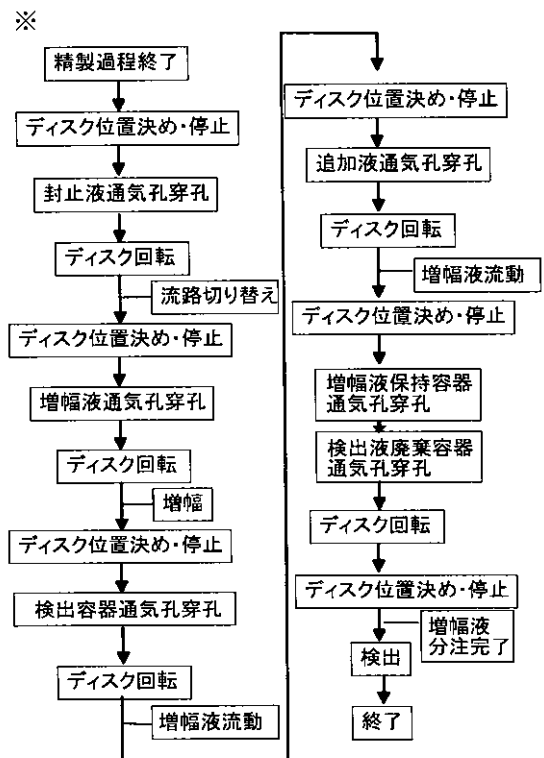
【図 30】



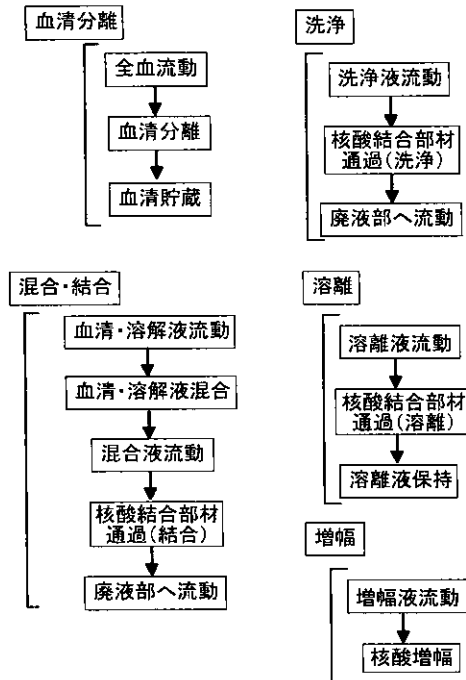
【図 31】



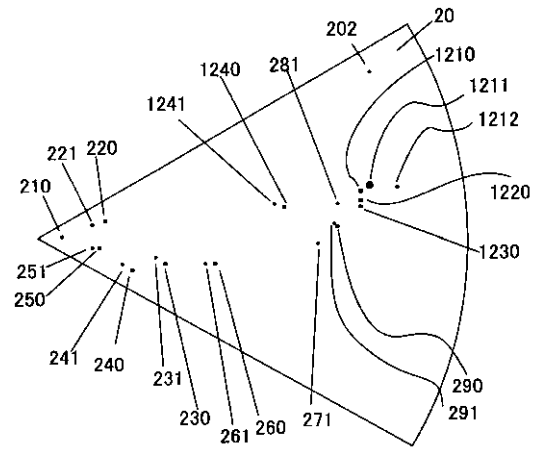
【図 32】



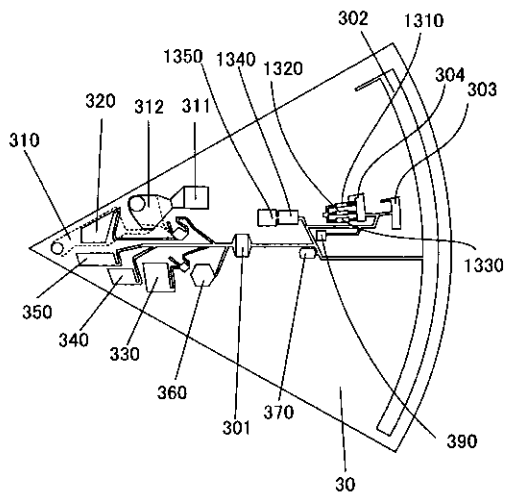
【図 3 3】



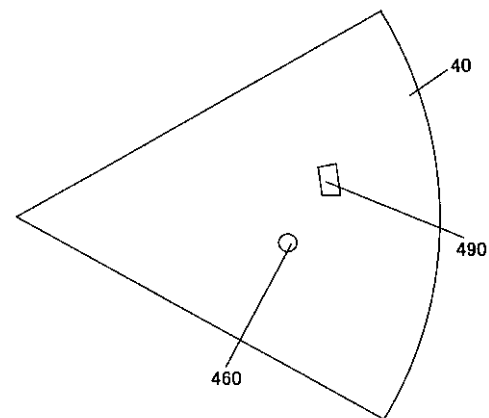
【図 3 4】



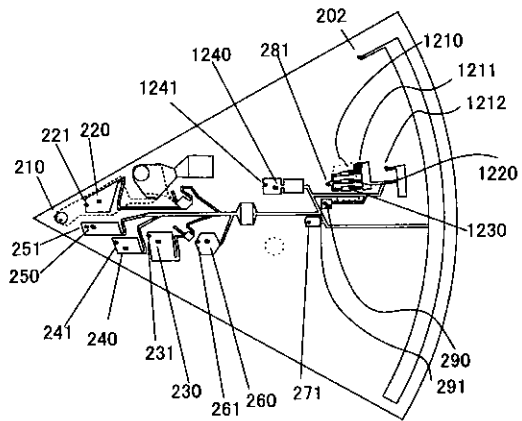
【図 3 5】



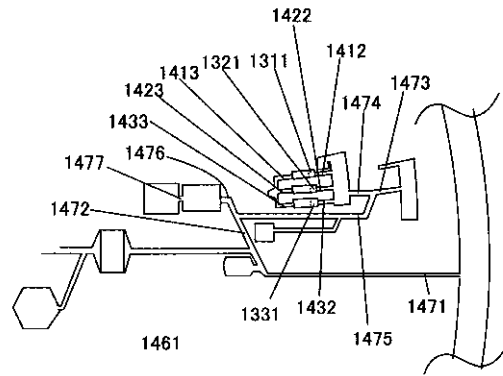
【図 3 6】



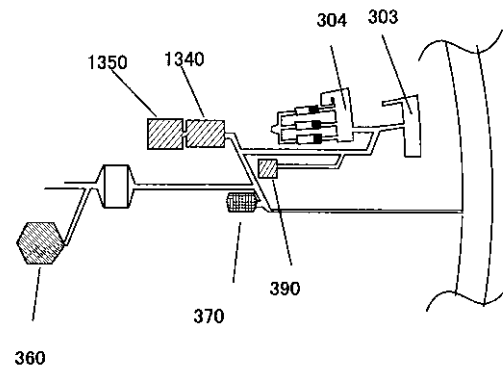
【図 37】



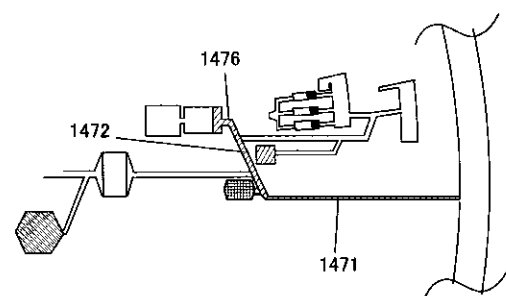
【図 38】



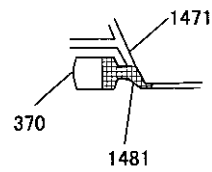
【図 39】



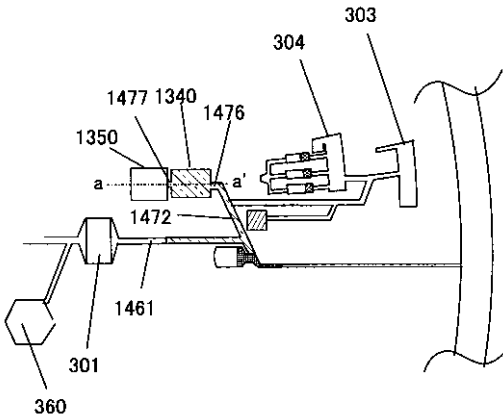
【図 40】



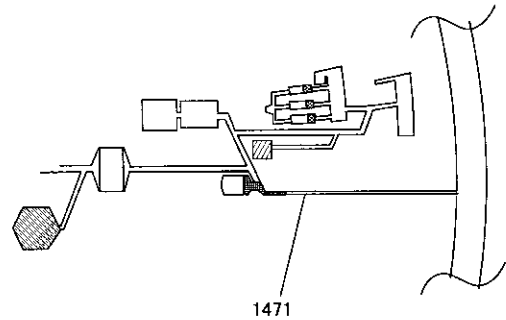
【図 42】



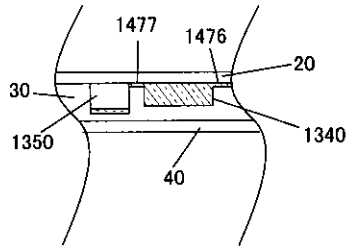
【図 43】



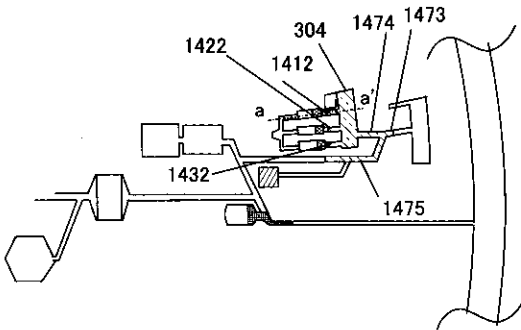
【図 41】



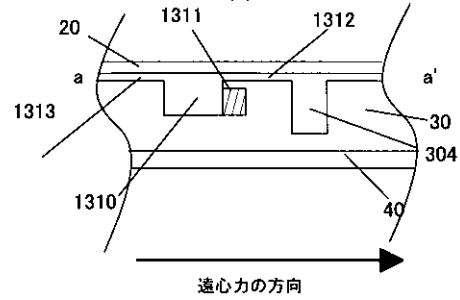
【図 4 4】



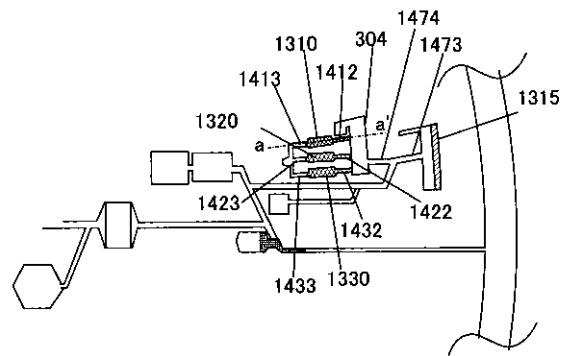
【図 4 5】



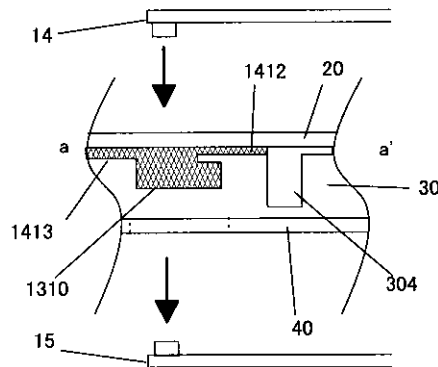
【図 4 6】



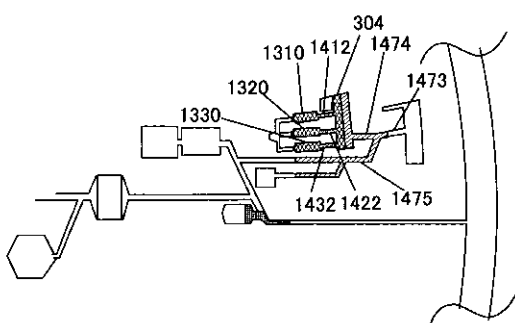
【図 4 7】



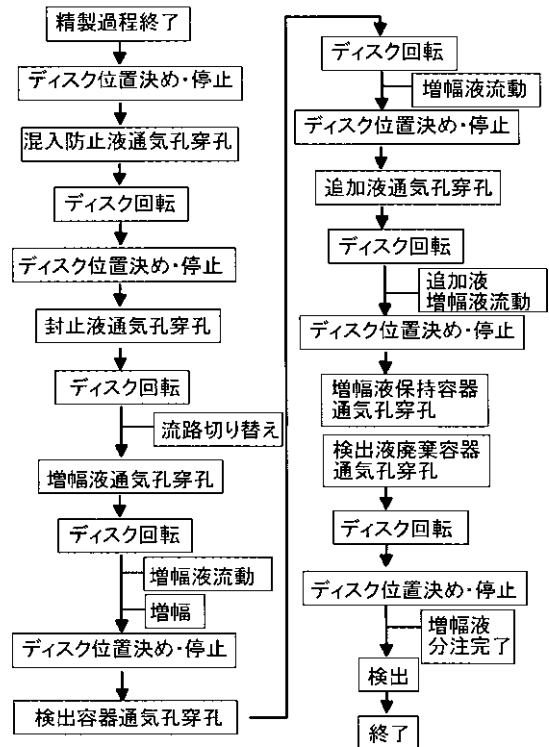
【図 4 8】



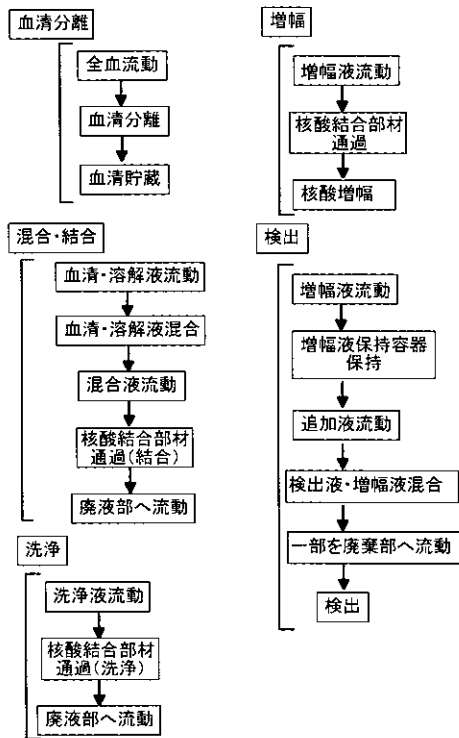
【図 4 9】



【図 5 0】



【図 5 1】



フロントページの続き

(72)発明者 大橋 智樹

茨城県土浦市神立町 5 0 2 番地 株式会社日立製作所機械研究所内

(72)発明者 宮原 裕二

茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部那珂事業所内

(72)発明者 松井 拓也

茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部那珂事業所内

Fターム(参考) 4B029 AA23 BB20 CC04 CC10