

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3581297号  
(P3581297)

(45) 発行日 平成16年10月27日(2004.10.27)

(24) 登録日 平成16年7月30日(2004.7.30)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数 21 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2000-112632(P2000-112632)  
 (22) 出願日 平成12年4月13日(2000.4.13)  
 (65) 公開番号 特開2000-316560(P2000-316560A)  
 (43) 公開日 平成12年11月21日(2000.11.21)  
 審査請求日 平成12年4月13日(2000.4.13)  
 (31) 優先権主張番号 09/291566  
 (32) 優先日 平成11年4月13日(1999.4.13)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500172416  
 ビオメリュー インコーポレイテッド  
 BIOMERIEUX, INC.  
 アメリカ合衆国 63042-2905  
 ミズーリ州 ヘイゼルウッド アングラム  
 ドライブ 595  
 (74) 代理人 100083806  
 弁理士 三好 秀和  
 (72) 発明者 チャールズ ロジャーズ  
 アメリカ合衆国 02338 マサチュー  
 セッツ州 ハリファックス モンボンセッ  
 ト ストリート 509

審査官 鈴木 恵理子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸試料分析法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

自動核酸分析用統合機器システムであり、以下からなる：

- a) 試験試料由来の1種以上の標的核酸配列を提供する試料調製ステーション。  
 b) 1種以上の前記標的核酸配列またはその相補配列上で第1ハイブリダイゼーション反応を行う場であり、前記第1反応は少なくとも1個から50個の別個の核酸配列を有する低次検出フォーマット機器からなる第1試験反応ステーション。  
 c) 1種以上の前記標的核酸配列またはその相補配列上での第2ハイブリダイゼーション反応を行う場であり、前記第2反応は100個以上の別個の核酸配列を有する高次検出フォーマット機器からなる第2試験反応ステーション。  
 d) 前記第1および第2ハイブリダイゼーション反応における標的核酸配列またはその相補配列用の陽性ハイブリダイゼーション信号を検出するための、少なくとも1個の検出器。  
 e) 前記検出器からの結果に基づいて、第2ハイブリダイゼーション反応の処理の必要性和、前記第1・第2ハイブリダイゼーション反応由来の検出シグナル解析の必要性を決定する、前記機器の統合操作のための制御モジュール。

【請求項2】

内部の前述の機器に加えて、さらに高次検出フォーマットで前述標的核酸配列またはその相補的配列の陽性ハイブリダイゼーション反応シグナルを検出するための第二検出器も含み、また内部の前述高次検出フォーマットでは前述標的核酸配列についてのさらなるデー

タを供給する、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 3】

内部の前記試料調製ステーションに加えて、選抜された標的核酸配列の調製手段を含む、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 4】

内部の前記試料調製ステーションに加えて、さらに工程 a から提供される前記標的核酸配列上の核酸増幅処理を行う手段を含む、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 5】

内部の前記試料調製ステーションに加えて、さらに内部標準核酸配列を供給する手段を含む、請求項 4 に記載の機器。

10

【請求項 6】

内部の前記機器に加えて、さらに試料調製ステーションから前述の第 1 試験反応ステーションへの液体移送手段を含む、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 7】

内部の前記機器に加えて、前述制御モジュールで決定される、前述の第 1 試験反応ステーションから前述第 2 試験反応ステーションへの液体移送の手段を含む、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 8】

内部の前記機器に加えて、自動的かつ人手を介さず、移送される液体と外部環境の間で接触の起こることなく、前述の第 1 試験反応ステーションから前述第 2 試験反応ステーションへの液体移送の手段を含む、請求項 1 に記載の機器。

20

【請求項 9】

内部に、均一溶液ハイブリダイゼーション反応実行手段を提供する前記低次検出フォーマット機器を含む、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 10】

内部に、マトリックスハイブリダイゼーション反応実行手段を提供する前記高次検出フォーマット機器を含む、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 11】

内部で、前記標的核酸配列上と内部標準核酸配列上での増幅工程を実行する、請求項 5 に記載の機器。

30

【請求項 12】

内部で、前述第 1 ハイブリダイゼーション反応からの検出信号データの結果に基づき、前記制御モジュールによって一つまたは複数の高次検出フォーマットの使用が選択される、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 13】

内部で、前記標的核酸配列上と前記内部標準核酸配列上の前記増幅が同時に実行される、請求項 11 に記載の機器。

【請求項 14】

内部で、TMA、PCR、NASBA、SDAおよびLCRからなる群から前記増幅工程が選択される、請求項 4 に記載の機器。

40

【請求項 15】

内部で、前記低次検出フォーマット機器がマトリックスハイブリダイゼーション反応実行の手段を提供する、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 16】

内部に、複数の核酸配列を含み  $400$  ヌクレオチド /  $\text{cm}^2$  以上の空間密度を有する前記高次検出フォーマットのある、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 17】

内部に、少なくとも  $1000$  個の別個の核酸配列を含む前記高次検出フォーマット機器がある、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 18】

50

内部の、前記低次・高次検出フォーマット機器が使い捨て可能である、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 19】

核酸配列分析実施のための方法であり、自動核酸試験機器内で実施される該方法は第 1 検出フォーマットを提供し、および前記第 1 検出フォーマットの結果が示すところで、前述の機器と提携した制御モジュールによる制御下で第 2 検出フォーマットを提供する、以下の工程からなる核酸分析法：

(a) 試験試料由来の少なくとも 1 つの標的核酸配列またはその相補配列と第 1 ハイブリダイゼーション反応を行い、前記第 1 ハイブリダイゼーション反応は前記第 1 の低次検出フォーマットで行われる工程であり、前記第 1 検出フォーマットは 1 個から 50 個の既知の核酸配列を包含する、

(b) 前記第 1 ハイブリダイゼーション工程から信号を発生する工程、

(c) 前記信号を前記制御モジュールに供給する工程、

(d) 前記信号を前記制御モジュールで処理し、前記信号が閾値レベルより大きいかどうかを決定する工程、

(e) 前記信号が前記閾値レベルより大きい場合、自動的にさらなるデータ解析が必須であるところで、前記標的核酸配列またはその相補配列を前記機器内の前記第 2 の高次検出フォーマット機器に移送する工程であり、前記第 2 検出フォーマットは 100 個以上の既知の核酸配列を包含する、

(f) 第 2 ハイブリダイゼーション反応を行う工程、

(g) 前記第 2 反応から信号を発生する工程、

(h) 前記信号を制御モジュールで処理して前記標的核酸を解析する工程。

【請求項 20】

1000 個以上の核酸配列からなる高次検出フォーマットからなる前記第 2 反応を含む、請求項 19 に記載の分析法。

【請求項 21】

前述に加え、選択された標的核酸配列と内部標準核酸配列を同時に増幅する工程、前記内部標準からの信号を測定する工程、前記内部標準からの信号とそれに対する閾値を比較し、内部標準信号が閾値より小さかった場合には試験を排除する工程を網羅した、請求項 19 に記載の分析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試験試料中の微生物またはウイルスの同定および微生物またはウイルスの薬剤感受性または抵抗性試験を目的とする、分析的または生物学的試料試験の方法および機器に関する。本発明は特に、生物試験試料中に存在する核酸の検出および分析のための方法および機器に関する。

【0002】

【従来の技術】

核酸試験は、遺伝子配列および発現の研究を含む試験試料分析において常に生じる分野である。まず最初にヒトの患者または他の起源の試験試料が分離され、試料中の標的核酸を増幅してコピーの数を増やし、試験試料を分析可能にする。次に標的配列のコピーは、1 種またはそれ以上の相補オリゴヌクレオチドプローブに対し、溶液中または相補プローブを担持する固体担体との間でハイブリダイゼーションされ、ハイブリダイゼーション複合体を生成する。検出用プローブもある条件で標的配列にハイブリダイゼーションされる。生成したハイブリダイゼーション複合体が信号を発生すると、ハイブリダイゼーション生成物の検出と同定が行われる。核酸配列を増幅することにより、微生物培養に頼らずに微生物の有無に関する情報が得られる。

【0003】

増幅法は米国特許第 4,683,195 号 (Mullis) および 4,683,202 号

10

20

30

40

50

(Mullis)に記載され、この中ではポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により標的核酸分子を指数的に複製するため、DNAポリメラーゼ、相補プライマー分子および熱反応反復サイクルが利用される。米国特許第5,792,607号(Backman)にはリガーゼ連鎖反応(LCR)と呼ばれる増幅法が記載され、米国特許第5,744,311号(Fraiser)、5,648,211号(Fraiser)および5,631,147号(Lohman)には分子鎖置換増幅(SDA)に基づく等温増幅系が記載される。等温増幅の記載についてはWalkerら、Nuc. Acids Res. 20、1691-1696(1992)、米国特許第5,437,900号(Burg)および欧州特許第373960号(Gingeras)も参照のこと。さらに別の核酸増幅法が米国特許第5,399,491号(Kacian)および5,409,818号(Davey)に記載されている。前記それぞれ、および全ての参考資料は、本明細書に引用するその他全ての特許および文献と共に本明細書に参考資料として含まれる。

10

**【0004】**

ハイブリダイゼーション技術については多くの他の文献に、例えば米国特許第4,563,419号(Ranki)および4,851,330号(Kohne)、およびDunnら、Cell 12、pp23-66(1978)に記載がある。溶液中ハイブリダイゼーション、一段階または多段階反応における固体支持体上へのプローブ補足を含め、ハイブリダイゼーション反応に対する様々な変法が公知である。

**【0005】**

米国特許第4,486,539号(Kourlisky)、4,411,955号(Ward)、4,882,269号(Schneider)および4,213,893号(Carrion)に記載される検出法は、特定の核酸並列を検出するための標識検出プローブの製法を示している。検出可能な標識は、塩基、糖または1以上の特定のリン酸基上のリンカーアームにより、直接または間接的に結合している。公知の標識には蛍光発色体、放射性同位元素、染料、アルカリホスファターゼ等の酵素、発光または化学発光分子が含まれる。検出プローブは増幅核酸反応生成物またはアンプリコンに結合し得る。アンプリコンへのハイブリダイゼーション後に標識検出プローブから検出される信号量は、アンプリコン、従って元の試験試料中の一個以上の選択された標的核酸の有無を反映する。

20

**【0006】**

一般的に、試料中の内部標準は既知の初期量を増幅し、次いで逆の配列またはセンスを有する検出プローブとハイブリダイゼーションして、内部標準アンプリコンとの複合体を生成し、最後に発生する信号を検出することにより、試験試料中の標的核酸の定性および定量が可能な一つの方法が得られる。

30

**【0007】**

試験試料中に存在する標的の定量法は、米国特許第5,213,961号(Bunn)、5,476,774号(Wang)、5,476,774号(Ryder)および5,457,027号(Nadeau)に記載されている。

**【0008】**

核酸検出キットが市販され、上に参照した増幅、ハイブリダイゼーション、標識検出および定量の技術が用いられている。例えば、増幅された核酸を検出するHIV分析が米国特許第5,559,662号(Respess)およびGratzira、J. Virol. Method 66、pp269-292(1997)に記載されている。この様なHIV核酸の増幅を行うキットには、Chiron QUANTIPLEX Branche DNAおよびOrganon Teknika NASBA-QTが含まれる。

40

**【0009】**

M. tuberculosis用試験キットが米国特許第5,643,723号(Persing)に記載され、マイコバクテリア試験用核酸が5,589,595号(Mabilat)、5,702,312号(Mabilat)および5,839,901号(Mabilat)に記載されている。

50

## 【0010】

核酸配列解析は制限検出または低次検出フォーマットと、多重または高次検出フォーマットの二つの異なった分類に分けられる。その区別は、フォーマットから得られる特定のデータ信号数、または応答数である。

## 【0011】

欧州特許第0875584号には低次検出フォーマットを用いる機器が記載されている。検出プローブに結合した単一タイプの蛍光標識を測定し、試験試料中の相補核酸の存在を検出する。この技術を順番に用いることにより、その機器が試験試料中の少なくとも2種の特異的標的を測定し得ることが示された。また、スクリーニング検定で多重標識（例えば、異なった放射特性を有する蛍光または発光標識）も同時に測定することができる。しかしながら実用上の理由で、スクリーニング検定で測定し得る標的被分析物の数は10以下である。これらの技術は低次検出フォーマットのカテゴリーに入ると考えられる。

10

## 【0012】

高次検出フォーマットにおいて、試験パネルの設計または選択は、一部には顧客の要請、特定部位での疾病発生率、微生物およびウイルス同時感染の頻度、および（数は少ないが例を挙げれば）環境条件によって決められると思われる。

## 【0013】

この二番目のカテゴリーである多重検出または高次検出フォーマットは、試験アンプリコンに関するより詳細な情報を提供する。この例の一つは、逆ドット-プロット技術であり、マトリックス上に固定化された多重相補標識に核酸がハイブリダイゼーションされる。染色処理後、染色された多重セクションが相補標的の存在を示す。他の技術では多量のオリゴヌクレオチドが沈降した、光学的手法で空間的に位置決めできるマトリックスまたは配列を提供する。

20

## 【0014】

大規模遺伝子解析における最近の進歩では、微細作成技術による多重検出アレイとして組み込まれたオリゴヌクレオチドが利用される。これらのアレイの合成と方法は米国特許第5,700,637(Southern)、米国特許第5,445,934(Fodor)、米国特許第5,807,522(Brown)、米国特許第5,202,231(Drmanac)および米国特許第5,837,832(Chee)に記載されている。これらのアレイによりハイブリダイゼーションが行われ、単一または多重塩基置換等の変異体または突然変異の同定のための固定化オリゴヌクレオチドが標識プローブまたは標識アンプリコンにより探査される。応用例として、ヒト免疫不全ウイルス検出用の多重検出アレイがFodor、Stephenら、「光学的手法で空間的に位置決めし得る平行化学合成」、Science、Vol.251、pp767-773(1991)に記載されている。

30

## 【0015】

低次および高次フォーマットが分析および診断試験の双方に用いられているが、それぞれ別な能力を持っている。低次検出フォーマットは簡便であり、比較的成本が低く、例えばこの試料が典型的なHIVウイルス領域由来の核酸を含んでいるかという、試料に関する特定の質問に答えることができるという利点がある。高次検出フォーマットはより高価であるが、例えばこのHIV核酸試料が野性型配列由来の突然変異を有するか、もしそうならそれは何かという、分析のためのより多くのデータまたは情報を提供できるが、高価であるため、日常のスクリーニング試験では多重検出または高次検出フォーマットは費用効率の良い手段とは見なされていない。従って、典型的な有償の試験では制限された、または低次検出フォーマットが図1に示す様な医学的仮説を確認するために行われる。

40

## 【0016】

図1において、試験手順は患者が結核に罹っているという仮定から始まる。工程10で呼吸試料を患者の唾液から得る。工程12で試料を処理し、培養用組織を得る。次いで試料を分割し、一部を組織培養に用いる。工程14で試料の第2の部分の抗酸性スミア試験を提供する。抗酸性スミア試験の結果が陰性である場合、工程16で示されるように医師は

50

培養の結果を待たなければならない。可能であれば臨床技師は試料を再度処理し、工程 18 で行われる増幅種特異性 T B 試験に提供する。工程 22 では、増幅 A v i u m 細胞内試験が試料を同定するために行われる第 3 の試験となり得る。工程 22 での試験結果が陰性である場合、試験試料または新しい第 2 の試料で次の試験反応または培養を行い、試料中に病原体が存在するかどうか決定する。

#### 【 0 0 1 7 】

##### 【 発明が解決しようとする課題 】

従来の技術においては、前記の核酸検出キット等の低分解能または低感度検出フォーマットは簡便で、比較的成本が低く、保存された、または限定された数の標的配列の存在を検出するのに有用であるが、これらの試験は特定の突然変異体、その薬剤感受性または突然変異の有無の解析に必要な、高いレベルのデータまたは標的核酸に関する詳細を得るためにはあまり有効でなかった。高次検出フォーマットは分析のためのより多くのデータまたは情報を提供できるが、それが高価であるため、日常のスクリーニング試験では多重検出または高次検出フォーマットは費用効率の良い手段とは見なされていない。

10

#### 【 0 0 1 8 】

図 1 は公知の低コスト試験の典型例であり、抗酸性スミア（工程 14）が *M y c o b a c t e r i a* を含むと疑われる試験試料のうち、陰性である 90% の試料をを排除するために用いられる。以後の試験を陽性である 10% の試料に用いることは正当であるが、試験試料の全てに適用しなければならない場合、仮に試験費用が低くても人件費と試料処理費は正当とは言えない。

20

#### 【 0 0 1 9 】

核酸分析のための限定検出スクリーニングを含むだけでなく、更に先へ進む機器および自動化法の必要がある。このような機器の能力は、例えば他の遺伝的欠陥と類似、または重複する生理学的影響を生じ得る遺伝的欠陥の同定等、価値のある情報およびデータを提供すると思われる。また、集中試験ステーションおよび使用し得る薬剤に対する微生物の耐性を決定し、適当な治療法を決めるためのデータを提供できる機器システムも必要である。さらに、このようなシステムは研究者または医療関係者の操作、特に試料調製、増幅および検出を含む工程を最小にすることを目的としなければならない。その機器はモニタリング、データ収集、配列および核酸の遺伝子型決定と共に、各試験または工程間の汚染の危険性を制限するための道具として応用し得ることが好ましい。その機器はまた、正確、高感度であり、妥当な価格で利用者が購入できることが可能でなければならない。

30

#### 【 0 0 2 0 】

本発明は、核酸分析のために多重または高次検出フォーマットを何時選択するかを自動的に制御する方法および機器を提供し、定性および定量分析のための 1 回以上の第 1 試験反応から 1 個以上の信号データを提供し、また低コスト技術、即ち自動化システムにおいて限定検出フォーマットを使用してさらなる解析の必要性を決定するに当たり、試料中の標的核酸配列のスクリーニングを行うことを目的としている。本発明は他の方法の試みに固有の様々な制約を克服し、生物または試験試料中の核酸を正確かつより完全に同定する、費用効率のよい手段を提供する。

#### 【 0 0 2 1 】

##### 【 課題を解決するための手段 】

本発明の提供する、多重または高次検出フォーマットの選択を自動的に制御する方法および機器には、制限検出または低次検出フォーマット中の少なくとも 1 回の増幅反応で生成した標的アンプリコンを検出し、次いで低次検出フォーマット由来のデータまたは信号を取り込む統合システム中の制御アルゴリズムを使用し、標的アンプリコンを高次検出フォーマットを使用しその費用で分析するかどうかを決定する工程が含まれる。本システムは第 1 試験反応からの出力データを、制御アルゴリズムおよび高次検出フォーマット選択のための入力データとして利用する。

40

#### 【 0 0 2 2 】

本発明のさらなる目的は、定性および定量分析のための 1 回以上の第 1 試験反応から 1 個

50

以上の信号データを提供することである。第1反応では、試験試料由来の増幅標的核酸と共に、好ましくは既知の濃度を有する増幅された内部標準配列がハイブリダイゼーションおよび検出反応に提供され、信号データを発生する。得られた信号は制御モジュールに供給され、処理され、標的/試験試料または内部標準アンプリコンいづれかに特有の閾値レベル信号と比較される。信号の組み合わせは、標的アンプリコンをさらなる試験のため、自動的に機器内部の別のステーションへ移送するかどうかを決定するアルゴリズムに使用される。必要ありと判断された場合、1個以上の選ばれた高次検出フォーマットを用いる第2試験反応により、変異体の同定、核酸配列の突然変異、微生物またはウイルスの薬剤感受性または耐性等の標的アンプリコンに対するさらなるデータが得られる。第2試験反応の解析には、少なくとも1個の高次検出フォーマット中でのアンプリコンのハイブリダイゼーションが含まれる。

10

**【0023】**

本発明の好ましい実施形態では、可能ならば核酸増幅能を有する試料調製ステーション、第1および第2ステーションまたはモジュールおよび適当な検出ステーションを包含し、各ステーションは制御モジュールによって指令される核酸分析用機器を提供する。流体流路または流体転送手段も備えられ、随意に第1試験反応ステーションからのアンプリコンを第2反応ステーションまたはモジュールに接続する。各ステーションは他のステーションとモジュールの制御下に連通する。制御モジュールは第1反応ステーションおよびフィードバックループ中の対応する検出ステーションから得られたデータを統合し、プロセスを終了するか、または第2試験反応ステーション中の第2反応を開始し、その後検出と信号解析を行う。

20

**【0024】**

本発明の他の実施形態は、試料処理、増幅、ハイブリダイゼーションおよび検出法を統合したモジュール状の自動化機器システムであり、システムはさらに試験試料に関して追加データ収集を行うべきかどうかを解析し、その後この様な追加データ収集分析を行うことができる。

**【0025】**

本発明一つの目的は、低コスト技術、即ち自動化システムにおいて限定検出フォーマットを使用し、さらなる解析の必要性を決定するに当たり試料中の標的核酸配列をスクリーニングすることである。少なくともシステムの高次検出フォーマットによりさらに解析し得る全ての試料を「陽性」とするために、スクリーニング工程は高感度であるが広範な特異性を有する必要がある。

30

**【0026】**

別の態様では、異なった反応技術、即ちハイブリダイゼーションおよび検出を利用して標的核酸配列を完全に決定するために、総合的な機器システムが提供される。好ましい実施形態では、均一溶液ハイブリダイゼーション反応を利用するスクリーニング試験が行われ、多重検出解析のために、単一アレイ/マトリックスハイブリダイゼーションが利用される。別な目的では、1回以上のマトリックス系ハイブリダイゼーション分析を行う必要性を決める目的で信号データを制御モジュールへ提供するため、増幅プロトコールを行わずにスクリーニング解析を提供することが可能である。

40

**【0027】**

本発明のシステムは例えば微生物学、ウイルス学、食品研究、水試験、ヒトおよび動物の疾病の診断、および分析研究用に使用できる。適当な生物または試験試料材料には動物、ヒトまたは植物細胞または組織、血液、尿、糞および尿道粘膜が含まれる。さらに、本発明は食品加工、汚染制御または医薬品研究等の産業用途にも使用可能である。

**【0028】**

特に、本発明の一つの態様では疾病の検出、薬剤耐性の同定および治療の目的で重要なデータと情報が提供される。

**【0029】****【発明の実施の形態】**

50

本発明の代表的な、好ましい選択的な実施形態が、添付図面と共に以下に示される。参照番号はそれぞれの図面での対応する要素を表す。

#### 【0030】

制限または低次検出フォーマットは前記のハイブリダイゼーションおよび検出法を含む。これらは溶液中、またはマトリックスに結合した捕捉プローブを用いて行われる。プローブが固定化されたマトリックスにはポリスチレン系ポリマー、ニトロセルロース、様々な組成のシート、ビーズ、マイクロタイターウエル、チューブ、ガラス粒子、磁気粒子、天然および合成繊維が含まれる。本明細書で言う低次検出フォーマットには、別個の配列を有する50以下、好ましくは少なくとも1個から10個のオリゴヌクレオチドプローブが含まれる。各プローブは試験試料由来のアンプリコンに対し、また随意に内部標準に対し、完全なまたは部分的な相補配列を含んでいる。本明細書で言う高次検出フォーマットとは、100個以上、好ましくは400個以上、最も好ましくは1000個以上のオリゴヌクレオチドプローブを含み、そのそれぞれが適当なマトリックスに結合または固定化された別個の配列を有する。プローブはマトリックスに対し高い空間密度、例えば400プローブ/cm<sup>2</sup>から1000プローブ/cm<sup>2</sup>で結合している。各プローブはその一部に潜在的標的アンプリコン配列に対し完全に、または部分的に相補性のある配列を含んでいる。

10

#### 【0031】

好ましい実施形態では、低次検出フォーマットは高次検出フォーマットと異なっている。例えば、低次検出フォーマットには均一溶液ハイブリダイゼーション反応を行う機器が含まれるが、高次検出フォーマットにはマトリックスハイブリダイゼーション反応を行う機器が含まれる。また、少数の標的アンプリコンおよび内部標準アンプリコンをスクリーニングするために、マトリックスハイブリダイゼーション反応は低次検出フォーマットに用いられる。

20

#### 【0032】

図2を参照すると、分析の継続を自動的に指令し、高次検出フォーマットの選択を制御する方法と機器を提供するある好ましい実施形態がフローチャートに示されている。その方法には、低次検出フォーマット（一般的に工程30で示される）と制御アルゴリズム40を用いて、試験試料中の標的核酸の増幅反応により生成したアンプリコンを検出し、1個以上の高次検出フォーマットを使用を決定する工程が含まれる。その好ましい実施形態には試験試料中の核酸の完全な分析のための単一増幅工程が含まれていてもよい。従って、試料は広範な特異性を有するスクリーニング検定を行う目的の初期数の第1ハイブリダイゼーション反応に提供され、検定に用いられる技術の費用効率の良い選択は、適当なデータ入力を伴う自動制御アルゴリズム40を用いて決定される。低次検出フォーマットからの出力データは、選ばれた高次検出フォーマット（工程50）のための入力データとなる。

30

#### 【0033】

図2の方法により、試料をスクリーニングするために低コスト技術、即ち工程30の低次検出フォーマットを使用することが可能になる。この様なアプローチを用いることにより、標的アンプリコンを試料分析中に用いることができる。制御アルゴリズム40が高次検出フォーマット50の必要性が正当であることを決定する場合、第2分析50を開始する。本発明の機器に試料を導入する以前、または導入時に、システムユーザーによりそれ以前の試験または分析からのデータも入力される。

40

#### 【0034】

前記手法の第1工程30（即ち、低次検出フォーマットで標的アンプリコンを測定する工程）では、核酸が処理または放出され、好ましくは100%に可能な限り近い「スクリーニング」感度が得られるように選ばれた分析で増幅される。言い換えれば、選ばれたスクリーニングフォーマット中の任意のパラメータで試料が実際に陽性である場合、第1分析試験反応は陽性の結果を与える。

#### 【0035】

代表的な実施形態において、第1工程30は2個の独立した工程からなる。第1サブ工程

50

3 2 は内部標準配列、および代表的試験パネル中の全ての疑わしい標的核酸、即ち呼吸、血液中の核酸等を増幅し、内部標準アンプリコンおよび標的アンプリコン ( T 1、T 2、... T n ) を生成する工程からなる。内部標準アンプリコンは、技術的欠陥による陰性の結果が生じていないことを補償する手段として測定される。本明細書で用いる内部標準配列とは、標的核酸配列により影響されないように加工され、試料中のいかなる核酸配列と実質的に類似でなく、かつ陽性増幅プロセスを決定するオリゴヌクレオチド配列である。一般的に、内部標準は標的と共に増幅され、増幅の陽性対照となる。内部標準信号はまた、定量的試験試料分析にも利用可能である。

【 0 0 3 6 】

第 2 工程 3 4 は、内部標準および標的それぞれからの信号を測定する工程からなる。信号を測定するために用いられる機器は、システム中に組み込まれている。 10

【 0 0 3 7 】

プロセス 4 0 の第 2 工程、即ち制御アルゴリズムを実行する工程において、点線ボックス 4 0 で示すように信号が制御アルゴリズムに与えられる。内部標準信号は、増幅プロセスが満足できるものかどうかを示すために用いられる。制御アルゴリズム 4 0 は、試料の分析を次工程 5 0 に進めるべきかどうかを制御する 2 個の信号を実行する。

【 0 0 3 8 】

図 2 に示される 1 つの実施形態では、内部標準信号が設定された閾値 ( 4 2 ) 以下であった場合、増幅反応が生じなかった、または他の理由で適切な閾値に達しなかったということで、その試験は排除される。内部標準信号が閾値以上である場合、アルゴリズムにより 1 個以上の標的に対するスクリーニングパラメータが閾値以上であるかどうか決定される ( 4 4 )。そうでない場合、試験結果は陰性とみなされ、仮説が排除される。したがって分析の第 2 工程 5 0 の費用または必要性の負担はない。逆に、スクリーニングパラメータが閾値以上である場合 ( 4 4 )、第 2 工程 5 0 の分析へ進むことができる。 20

【 0 0 3 9 】

好ましい実施形態において、工程 3 0 の出力または結果が選択された高次検出フォーマット上で第 2 工程 5 0 を実施すべきかどうかを判断するための入力として使用されるような方法で、図 2 の方法が行われる。対照的に、先行技術に記載されるさらに進んだ、または継続した試験では、試料を独立に、または繰り返し扱うことが必要であり、多くの場合、さらにサンプリングを行う必要がある。先行技術の試験は試料の保管、追加操作、および処理工程一回の反復が必要であるが、それらは本発明では避けることができる。さらに、先行技術においては第 1 試験の結果を調べ、次の行動を決めるために人手を介する必要がある。好ましくは、図 2 のプロセスの最初に試料にただ 1 回だけ接触する方がよい。 30

【 0 0 4 0 】

本発明の好ましい実施形態では、工程 3 0、4 0 および 5 0 は自動化分析機器内に組み込まれ、低次検出フォーマット ( 工程 3 0 ) を含むプロセス中に人手を介さず最終結果に達することができる。本発明の好ましい実施形態によれば、この機器は高次検出フォーマット 5 0 で分析される全ての標的に対し、第 1 工程 3 0 内であらゆる増幅を行う。次いで、この機器は十分な量のアンプリコンを有する試料を、より包括的な分析同定のための高次検出へ向かわせることができる。 40

【 0 0 4 1 】

高次検出フォーマットの好ましい実施形態は、米国特許第 5、8 3 7、8 3 2 号 ( C h e e ) に記載される A f f y m e t r i x G E N E C H I P 技術である。患者試料からの核酸由来の標識されたアンプリコンが標準生化学技術で単離され、高密度カートリッジ ( G E N E C H I P ) の表面で洗浄される。高密度カートリッジ中の一本鎖 DNA 配列またはプローブのコピーは相補標識アンプリコンとハイブリダイズする。レーザーキャナーにより、標識配列がハイブリダイゼーションした既知の位置からの信号が検出される。

【 0 0 4 2 】

図 2 中の工程 3 0 の代表的な好ましい実施形態をさらに説明する。疑わしい核酸標的を分 50

析の最初の部分で処理しなければならない。試験プロトコルの開発中にプローブ配列、プライマー、保存配列等の増幅反応に含まれる条件をパネル中で試験されるパラメータを参照に同定しなければならない。さらに、例えば、唾液試料由来の *Mycobacterium* の試験である図3を参照して、米国特許第5,589,585号(Mabilat)、5,702,317号(Mabilat)および5,849,901号(Mabilat)に記載される制御アルゴリズムの一部となる性質を有する少なくとも1個の部位を選ばなければならない。23S rRNA配列の保存またはコンセンサス領域が、低次検出フォーマットに対するスクリーニングパラメータとして選ばれる。*Mycobacterium* の検出に用いられる23S rRNAの高度保存領域の増幅は、低次検出フォーマット中で行われる。スクリーニング検定結果が適当な閾値に合致する場合、高次検出フォーマット用の工程32Aで示されるように、増幅は *Mycobacterium tuberculosis* 中のリファムピン耐性に関係する *rpoB* 遺伝子のDNA上でも行われる。微生物1個あたりDNAよりrRNAのコピー数が多いので、23S rRNA領域は *Mycobacterium* の存在をより示し易い。最後の要請として、23S rRNAに用いられるプライマーが内部標準配列と組み合わせて用いられ、増幅効率と定量分析が達成されるように内部標準アンプリコンが生成する。

#### 【0043】

ある実施形態では、試験の第1工程30由来のアンプリコンが第2工程50へ転送されるが、スクリーニングおよび検出技術は高次検出フォーマットと互換性がなければならない。このことは、米国特許第5,512,493号(Mathis)またはG.H.KellerおよびM.M.Manak「DNAプローブ」第2版、Stockton Press、1993、第6節に記載される様に、工程32の均一系検出技術を用いて行われることが好ましい。また、エネルギー転移に基づくハイブリダイゼーションまたはビーコン/検出基技術がGionata Leoneら、「RNAの均一、リアルタイム検出を可能にするNASBAによる増幅と組み合わせた分子ビーコンプローブ」、*Nucleic Acid Research*、Vol.26、pp2150-2155(1988)に記載されている。標的配列を均一系で検出可能なビーコン/検出基は、幹ループ構造からなり、ループ部分はアンプリコンに対し相補性である。標的が存在する場合、ビーコン/検出基構造は「開」の状態であり、ループは標的にハイブリダイズする。「開」ビーコン/検出基は通常「閉」状態では消光される蛍光を発する。本発明の1つの実施形態によれば、ビーコン/検出基部分は当業者に公知の技術を用いて固体支持体上に固定化される。固体支持体は好ましくは微粒子または磁気粒子を含む使い捨て器具である。ビーコン/検出基は、反応条件により幹構造配列が開くような方法で構築する必要がある。アンプリコンはビーコン/検出基と接触することによりビーコン/検出基の幹構造を開き、ループ構造へハイブリダイズすることができる。図3の工程32B参照。標的アンプリコンが存在する場合、開構造が消光剤を検出分子から取り去り、標識を検出可能にする。得られた信号は蓄積され、制御アルゴリズム40で使用される。

#### 【0044】

選ばれた閾値と組み合わせて使用した場合、制御アルゴリズム40は3種の異なったプロセスを行う：(1)予想される標的の存在の定性的検出、(2)高次検出フォーマットの結果と組み合わせて用いられる1個以上の標的の定性的検出、および(3)数個の標的のうちの1個の定性的検出、および高次検出フォーマット分析50用の試験の特定のアレイの予備選択。

#### 【0045】

好ましい実施形態における第1のタイプのプロセスである標的の保存領域の存在の定性的検出は、唾液試料中の *Mycobacterium* の試験のために先に記載されている(図3参照)。例えば、図3で第1ハイブリダイゼーション反応、または内部標準アンプリコンの検出子またはビーコン/検出基へのハイブリダイゼーションからの信号が閾値レベル以下である場合(工程42)、その試験は排除される。信号が上記閾値以上である場合、保存23S rRNA配列の標識またはビーコン/検出基の第2グループへのハイブリ

10

20

30

40

50

ダイゼーションに対する信号は工程 4 4 で解析される。この信号が閾値レベル以下である場合、工程 4 6 に示される様に制御アルゴリズムは結果が陰性であることを示す。逆に信号が閾値レベル以上である場合、他の 2 3 S r RNA 増幅領域および r p o B を含むアンプリコンは工程 5 0 に示すように高次検出フォーマットへ転送される。

#### 【 0 0 4 6 】

第 2 タイプの制御プロセス、すなわち多重検出解析結果と組み合わせて用いられる 1 個以上の標的の定量的検出も、制御アルゴリズムで可能である。ある場合は、標的核酸の量が分析または診断で重要である。例として A I D S の治療を受けている H I V 患者を考える。全ウイルス核酸またはウイルス負荷の測定は重要な診断 / 治療上の指針である。例えば、ウイルス負荷レベルが閾値より大きい場合、医者は H I V アンプリコンの遺伝子型分析をさらに行う価値がある。このような解析は高価な高次検出フォーマットが必要であるが、適切な治療によって全ウイルス核酸レベルが低い場合は必要がなくなる。この用途と図 3 の単純な定量例との主な違いは、定量的信号が制御アルゴリズムで使用されるばかりでなく、例えば多点補正において、または内部標準のレベルが増幅前に既知である場合、既知レベルのウイルスからのデータを伴い、それにより解析される報告された場合の結果であることである。

#### 【 0 0 4 7 】

この第 2 タイプの制御アルゴリズムの一例が図 4 に示される。この例では、試料は H I V 患者から得られる。工程 3 0 ( 低次検出フォーマット ) は工程 3 2 A で示されるような内部標準配列、保存 H I V 配列および多形 H I V 配列を増幅する工程からなる。プロセスは工程 3 2 B で示されるように、内部標準アンプリコンのハイブリダイゼーションで始まり、ピーコン / 検出基および保存配列アンプリコンまで続く。また、アンプリコンは最初に固体支持体に捕捉されて複合体を生成し、次いで検出子がアンプリコンを検出するために複合体にハイブリダイズする。次に工程 3 4 に示すようにピーコン / 検出基複合体のハイブリダイゼーションから信号が測定される。発生した得られた信号はデジタル化され、制御アルゴリズム 4 0 を実行する制御モジュールまたは演算ユニットへ送られる。

#### 【 0 0 4 8 】

制御アルゴリズム 4 0 では、工程 4 2 は図 3 と同じである。ピーコン / 検出基 # 1 からの信号が第 2 閾値 ( 工程 4 4 ) より小さい場合、工程 4 6 で示す高次検出フォーマットを実行するために、アルゴリズム 4 0 はそのレベルが閾値以下である核酸の報告を提供する。ピーコン / 検出基 # 2 からの信号が第 2 閾値より大きい場合、アンプリコンは第 2 反応ステーションへ転送される ( 工程 5 0 ) 。

#### 【 0 0 4 9 】

また、定量的検出において、補正データを独立で得るための増幅前に既知料の核酸を有する内部標準 ( 図示せず ) の増幅は、制御アルゴリズムで行われる。工程 4 4 で検出される信号からの結果は、内部標準アンプリコン由来のデータを参照して計算され、工程 4 6 で示すように報告される。

#### 【 0 0 5 0 】

実行し得る第 3 タイプのプロセスは数個の標的のうち 1 個の定量的検出、および第 2 ハイブリダイゼーション反応用の特定試験パネルの予備選択である。図 2 の一実施形態のより一般的な場合として、数個の可能な標的の内の 1 個以上を検出するために多重ピーコン / 検出基を使用し、制御アルゴリズムで使用する多重入力信号を提供することができる。例えば、Mycobacterium、Legionella、Mycoplasma、インフルエンザまたは R S V を呼吸パネルで試験することができる。結核における薬剤耐性を検出する必要があるため、Mycobacterium はこの標的のみに用いられる多重検出分析が必要である複合標的である。同様に、インフルエンザと R S V はウイルスであり、それぞれ異なった多重検出機器を必要とする。従って、3 種の異なった高次検出フォーマットが試験試料のさらなる、または第 2 の解析のために適当である。3 種の低次検出フォーマットそれぞれに対する異なった保存配列を選ぶことにより、制御アルゴリズムが 3 種の高次検出フォーマットの内のいづれかを選ぶことができるピーコン / 検出基を設

10

20

30

40

50

計することが可能である。この第3プロセスの一例が図5に示される。

【0051】

図5を参照して、図2および図4に共通の基本的な特徴、すなわち、制御アルゴリズム40中のスクリーンの信号出力を用いる、および制御アルゴリズムの結果に基づく工程50におけるより広範囲の高次検出フォーマットを制御、開始する、工程30中の低次検出フォーマットが図5でも共通である。

【0052】

図5の実施形態では、工程72、74および76で示されるように3種の低次検出フォーマットが平行に走る。この例では、ある与えられた診断仮説に対する工程70で呼吸試料が得られる。試験試料が機器に提供され、次いで核酸を放出するために処理される。工程78におけるMycobacteria RNAと同時に、最初のフォーマット72で内部標準も増幅される。内部標準アンプリコンのビーコン/検出基の第1セットへのハイブリダイゼーション、およびMycobacterium RNAアンプリコンの第2セットへのハイブリダイゼーションを伴って、前記方法は工程80へ続く。最後に、工程82でビーコン/検出基の第1および第2セットからの信号が、既知の蛍光または他のタイプの検出機器を用いて測定される。信号はデジタル形に変換され、制御モジュール、独立コンピュータ、または制御アルゴリズム40を実行するその他の演算ステーションへ供給される。

10

【0053】

第2フォーマット74の工程84で、試料中のRSVとインフルエンザ標的が増幅される。工程86でRSVとインフルエンザアンプリコンがビーコン/検出基番号3および4とそれぞれハイブリダイゼーションされる。次いで工程88でビーコン/検出基の第3および第4セットからの信号が既知の蛍光または他の型の検出機器を用いて測定される。信号はデジタル型に変換され、制御アルゴリズム40を実行する制御モジュールに供給される。

20

【0054】

第3フォーマット76の工程90で、試料中のMycoplasmaとLegionella標的が増幅される。米国特許第5,614,388号にはLegionella解析法が記載され、本明細書中に参考文献として用いられる。工程92でアンプリコンは番号5および6にそれぞれ指定されたビーコン/検出基にハイブリダイゼーションされる。次いでビーコン/検出基の第5および第6セットからの信号が既知の蛍光または他の型の検出機器を用いて測定される。信号はデジタル型に変換され、制御アルゴリズム40を実行する制御モジュールに供給される。増幅反応を評価し、必要あれば定量分析のため、内部標準アンプリコンを用いることができる。

30

【0055】

図5の制御アルゴリズムはまず内部標準アンプリコン信号と第一フォーマット72の比較(工程100で示される)を行い、信号が所定の閾値より大きいかどうかを決定する。大きくない場合、工程102に示されるように試験全体が排除される。内部標準信号が閾値より大きい場合、制御アルゴリズムは第2ビーコン/検出基信号の比較へ進み(フォーマット72から)、それが第2閾値より大きいかどうかを決定する。第2閾値より大きい場合、陽性の結果が示される。工程112で示されるように、その後の多重検出分析に対する閾値が設定される。例えば、工程112では呼吸試料中のMycobacteriumに対する陽性の結果は、タイプ「A」の高次フォーマット分析をMycobacteriumをさらに分析するために開始しなければならないことを示す。

40

【0056】

工程104における比較が陰性値となる場合、制御アルゴリズムは更に進んでその試験に対する陰性の結果が正当であるかどうかを決定する。特に、Mycobacteriaの結果が陰性であっても、制御アルゴリズムは工程106で第3ビーコン/検出基の測定が第3閾値(RSVウイルスに対し)より大きいかどうか、または第4ビーコン/検出基の測定が第4閾値(インフルエンザウイルスに対し)より大きいかどうかを決定する。これ

50

らのビーコンノ検出基信号のいずれかが閾値より大きい場合、アルゴリズム40は分析パラメーター(x)を2の、または異なった値、または、例えばRSVまたはインフルエンザのさらなる解析を行なうためにタイプ「B」における高次検出フォーマットを開始しなければならないことを示す特性「B」に設定する。

**【0057】**

工程106における比較が陰性の場合、アルゴリズムは第3フォーマット76の同様な解析のために先へ進む。特に、制御アルゴリズム40は工程108で、ビーコンノ検出基信号の第5セットの測定が第5閾値(Myco plasmaに対する)より大きいかどうか、またはビーコンノ検出基信号の第6セットの測定が第6閾値(Legioneellaに対する)より大きいかどうかを決定する。これらのビーコンノ検出基信号のいずれかが一つが閾値より大きい場合、アルゴリズム40は分析パラメーター(x)を第3または異なった値に設定する、例えば「C」は分析タイプ「C」をMyco plasmaまたはLegioneellaのさらなる解析のために開始しなければならないことを示す。

10

**【0058】**

工程108における比較が陰性である場合、3個のフォーマット72、74、76検出ノビーコンの全て(制御ビーコン以外)は陰性である。従って、制御アルゴリズムが示す陰性の結果は第1試験パネルに対して得られ、機器が高次検出フォーマットに進まないことを示している。

**【0059】**

工程104、106および108における比較の少なくとも一つが陽性の結果になると仮定すると、陽性の結果を有するフォーマットからの適当なアンプリコンが、好ましくは自動的に適当な高次検出フォーマットへ転送される。好ましい実施形態では、第1反応ステーション(30)から第2反応ステーション(50)への転送工程が、アンプリコンを環境に暴露せずに生じる。

20

**【0060】**

図5で3個の低次フォーマット分析が平行に走っている間に、第1工程30中のパネルの任意の数の組み合わせをプロセスに適用することができ、制御アルゴリズム40が適当なデフォルト設定で異なったフォーマットまたはフォーマットの組み合わせを説明するために変更されることを、当業者は理解し得ると思われる。

**【0061】**

図5(同時に他の図面)の制御アルゴリズム40が例えば論理ゲートを用いるハードウェアで実行し得ることも、当業者は理解し得ると思われる。しかしながら、スクリーニング分析30または多重検出分析50のいずれかを行っている機器の反応ステーションが、プログラム可能中央演算ユニットにリンクすると期待されているので、別個にハードウェア制御モジュールを構築するよりも、演算ユニットで実行される制御モジュールを設置する方が好ましい。しかしながら、図2~5の制御アルゴリズムの操作工程が与えられた場合、完全にハードウェアで実行される制御モジュールが他の実施形態となり得ることも確かである。

30

**【0062】**

図6を参照して、ブロック図に示される図2~5の方法を実行する機器120は、モジュールの組み合わせ、即ち本明細書に記載される様なモジュールの操作および連絡方法を提供する。

40

**【0063】**

図6を参照すると、試料は試料調製ステーション122と第1(128)および第2(134)反応ステーション(必要であれば)の間で、流体転送手段、例えば流路124、126、132を通して転送される。また、アンプリコンは第1反応ステーション128から第2反応ステーション134へ、制御モジュール138で制御される流体流路142を通して転送される。転送は人手を介さず、液体と外部環境の間の接触がなく自動的に行われ、試料汚染と空中に飛散したアンプリコンの放出の危険性が増幅反応で最小になる。

**【0064】**

50

試料調製ステーション122から第1(128)、第2(134)反応ステーションを経て検出ステーション136への試料の転送が、流体流路124、126、132中の試料を実際に動かさずに行われる。また、第1反応ステーション128から、高次検出フォーマットが実行される第2反応ステーション134へ転送される。これは、米国特許第5,786,182(Catanzari)に記載されるようなチャンバー内の試料モジュールを通じて行われる。このようなチャンバーは試料調製工程の場所ともなり得る。このような転送を行う手段の他の例は、FR9811383(出願1998年9月8日)に記載されている。

#### 【0065】

前記の如く、図6のステーション128は第1セットのハイブリダイゼーション反応を行う。第1反応ステーション128は、試料中に存在すると考えられる少なくとも1個から10個の別個の核酸配列を分析する手段を有する媒体または機器を含んでいる。内部標準アンプリコンも検出され、従って、内部標準アンプリコンに相補性のある標識も提供されなければならない。

#### 【0066】

機器120は、第1ハイブリダイゼーション反応中の標的またはアンプリコンの陽性ハイブリダイゼーション信号測定に使用される、少なくとも1個の適当な検出システム136と制御モジュール138を含む。特に、検出システム136は制御モジュール138に信号を供給し、次いで制御モジュール138中の中央演算ユニットで使用するために信号がデジタル化され、図2~5の制御アルゴリズム40を実行する。

#### 【0067】

好ましい実施形態における第2反応ステーション134は、目録129から検索した高次検出フォーマット機器上で第2セットのハイブリダイゼーション反応を行うステーションからなる。高次検出フォーマットは、100個以上の別個の核酸配列、好ましくは1000個以上の別個の核酸配列を解析する手段を有する媒体または機器からなる。高次検出フォーマットは前述の多重検出分析の一例である。

#### 【0068】

制御モジュール138は機器120の操作全体にわたる統御と制御を提供する。制御モジュール138は、図2~5に記載される様に、第1低次検出フォーマットにおける標的またはアンプリコンの陽性ハイブリダイゼーションが検出ステーション136により検出されたかどうかに基づき、1個以上の選ばれた高次検出フォーマット上での第2セットのハイブリダイゼーション反応の完結または実行の必要性を決定する。最後に、検出ステーション136と制御モジュール138が、ステーション134中の高次検出フォーマット上の複数の標的またはアンプリコンの陽性ハイブリダイゼーション信号を検出するが、高次検出フォーマットは試験試料中の標的核酸配列に対するさらなる分析データを提供する。

#### 【0069】

機器120には試料調製ステーション122が含まれる。研究者は例えば、患者または他の起源からの生物または分析試料をステーション122に置き、試料を公知の技術または本明細書に記載の技術で処理する。好ましくはステーション122には、試料の起源または他の状況から増幅した方が良いと考えられる場合は核酸を増幅するための、積算増幅ステーション構成が含まれる。増幅ステーションは離れたステーションでもありうる。さらに別な実施形態では、検出ステーション136が増幅しない試料の結果が陰性であることを示す場合は、試料の増幅が開始される。特定の試料処理工程は、一部は既に行った資料分析により決定される。

#### 【0070】

機器120には、標的またはアンプリコンを含む流体を3方バルブ130に供給する試料調製ステーション122に繋がれた流体移送手段、例えば流体流路または導管124が含まれる。バルブ130は制御モジュール138により制御され、流体を第1反応ステーションまたはモジュール138に導く第2導管126に供給し、低次検出フォーマット(図2~5の工程30)が実行される。流体導管124が試料を第1反応ステーション128

10

20

30

40

50

に供給する手段として選ばれる場合は、試料の汚染を防止するため、適当な既存の脱汚染 / 洗浄プロセスを導管 124 のために用いなければならない。その例には酸、漂白、オゾンまたはその他の化学的手法、熱または電気処理技術が含まれる。

【0071】

第1反応ステーション128は標的またはアンプリコンによるハイブリダイゼーション反応を行い、検出子プローブからの信号は検出ステーション136により作られる。検出ステーション136は標的アンプリコンに相補的である検出子プローブからの信号（例えば蛍光または発光信号）を測定し、信号をデジタル化し、デジタルデータバス146に沿って制御モジュール138に供給する。本明細書に記載した制御アルゴリズム40は、制御モジュール138中のハードウェアまたはソフトウェアで実行される。

10

【0072】

好ましい実施形態では、第1反応ステーション128で用いられたスクリーニング分析が使い捨て器具内で行われ、ユーザーインターフェース140でのユーザーからの入力に基づき機器120で選択することができる。例えば、ユーザーが患者由来の血液試料または喉の試料を処理している場合、各タイプの試料に対し機器120はステーション128で異なったタイプの低次検出フォーマットを使用する。ユーザーはユーザーインターフェース140で患者試料のタイプを入力し、制御モジュールが低次検出フォーマットのパネルをパネルの目録129から選ぶか、またはユーザーにこのような使い捨て器具を機器システム中に搭載するように指示する。理想的には、低次検出フォーマットを用いた第1反応ステーションでの試験の試験費用を低減するため、機器は制限された数のウェルまたはチャンパーを有するパネルを包含し、試薬の少量のスペクトルを検出する（例えば試料の起源にもよるが10個以下のウェル、またはそれ以上）。さらに、目録129に記憶された異なったタイプの全てのフォーマットが、パネルの同定が機器120中の安全処理ルーチンにより確認でき、正しいフォーマットを目録129から検索できる様に、バーコードまたは類似の指標で標識されていなければならない。

20

【0073】

第1反応ステーション128は検出ステーション136のごく近くに位置している。検出ステーション136は、第1反応ステーション128で検出される信号のタイプに応じて、例えば光電増幅管、蛍光検出器または他のタイプの検出システムを含んでいる。第1反応ステーション128中における分析を含む機器はまた、適当な転送機構により検出ステーション136へ移動する。好ましい検出標識は化学発光または蛍光標識である。

30

【0074】

制御モジュール138で実行される制御アルゴリズムの結果により、試験は排除されるか、陰性と見なされるか、または多重検出分析へ進む。試験の進行状況はの一例は、第1反応ステーション128を高次検出フォーマットが実行される第2反応ステーション134へ繋ぐ導管内に置かれた導体144に沿って、バルブ142へ制御モジュール138にアナログ信号を出させることである。バルブ142が開いている場合、試験中の標的に対するアンプリコンを含む液1流体が第2反応ステーション134へ転送される。

【0075】

代表的な実施形態では、第2反応ステーション134中のハイブリダイゼーション反応が、前記と同様な高密度アレイ生成物等の使い捨て高次検出機器上に備えられる。第2多重検出分析用高次検出フォーマットが同様に装置目録129から検索される。高次検出フォーマットでハイブリダイゼーションを検出するため、多重検出手段がさらに第2反応ステーション134中、またはその隣りに取り込まれる。

40

【0076】

検出ステーション136が第2反応ステーションからのハイブリダイゼーション信号の検出を終了すると、その結果は制御モジュール138で処理され、ユーザーインターフェース140に表示される。また、機器120は用意し適当な報告を印刷するか、次の検索のためにデータを電子的に記憶するか、または結果を付属機器またはコンピューターの位置へ送る。

50

## 【0077】

図7を参照して、図2～5の方法を実行するための分析機器200の他のデザインがブロック図で示される。機器200は図6の機器と同じ基本構造と操作法を有する。その機器は本明細書で説明した様な核酸配列を処理し、次いで増幅する、試料準備ステーション202と増幅ステーション203を有する。そのステーションはアンプリコンを第1反応ステーション204に提供し、そこで標的および内部標準アンプリコンのハイブリダイゼーションを行って機器をピーコン/検出基に加工する。ステーション204で処理されるパネルまたは装置は検出子209の近傍に位置し、ハイブリダイゼーション生成物の測定を行い、信号を制御モジュール210へ提供する。制御モジュール210は図2～5からのアルゴリズム40を実行する。検出モジュール208は第2反応ステーション206のごく近傍に位置している。高次検出フォーマット、または他の機器が第2反応ステーション206で使用され、検出モジュール208で読み取られ、本明細書で説明した様な方法で信号が制御モジュール210に提供される。制御アルゴリズムの結果が高次検出フォーマット分析が保証されることを示した場合、制御モジュール210はアンプリコンの第1反応ステーション204から第2反応ステーション206への転送を指令するのみである。最終結果はユーザーインターフェース212上に表示されるか、報告に印刷されるか、または必要あれば電子的に転送される。

10

## 【0078】

前述の様に、第1反応ステーション204から選択した高次検出フォーマット分析へのアンプリコンの転送を指示すべきかどうかを決定する手段を、制御アルゴリズムは提供する。第2反応ステーションはその使用が完全に任意である様に、第1反応ステーションから物理的に分離されていなければならない。試験の最初の部分(すなわち図2～5の抗体30)で、増幅処理工程30は含まれるべき大量のアンプリコンを生成することができるか、またはそのアンプリコンが将来の試験の潜在的汚染物になる。これらのアンプリコンの転送中に試験モジュールに対する潜在的汚染を物理的に制限する必要があるため、通常は試験処理ステーションのこの部分を密封しようとするか、何らかの方法で閉じ込めようとする。

20

## 【0079】

他の態様では、好ましくは前記制御モジュールで決定される様に人手を介さず標的、好ましくはアンプリコンを供給源またはその他の起源から第1反応ステーションへ、指示されればアンプリコンを第2反応ステーションへ転送するために、システムが流体流路を含む。

30

## 【0080】

また、転送機器はアンプリコンを受け取り、第1反応ステーションおよび、アンプリコンを1個以上の第2反応ステーション206へ転送するため、必要あれば第2反応ステーションへ転送し得る。

## 【0081】

以下の実施例は本発明の多様な実施形態を説明するためのものである。実施例は本発明をこれらの実施形態に制限するために構成されるものではなく、本明細書とその等価な内容を総括する請求の範囲によってのみ定義されるものである。

40

## 【0082】

## 実施例1

*Mycobacteria*の保存領域の増幅を、第1試験反応ステーション中の試料から行った。核酸配列は米国特許第5,547,842号(Hogan)、5,643,723号(Persing)、5,589,585号(Mabilat)、5,702,317号(Mabilat)および5,849,901号(Mabilat)に記載される。

## 【0083】

単離するため、バクテリアの新しく生育した1または2個のコロニー(直径3～5mm、バクテリア約108個)をへらの端で掻き取り、1.5mlのエッペンドルフ管中の250μlの滅菌水中に再懸濁した。ガラスビーズの存在下にバクテリア懸濁液をボルテック

50

ス処理し、全核酸を培養材料から放出した。5  $\mu$ l 分の溶菌液を PCR 反応に直接加えた。また、20 ng のプラスミド DNA を PCR 反応に加えた。16 S 超可変領域を、*Mycobacterium* 族プライマー (*M. tuberculosis* 参照配列上の 213 - 236 位、M20940、Genbank、TB アンプリコンサイズは 202 bp) を用いて PCR 増幅した。その部位は 5' 末端にバクテリオファージ T3 または T7 プロモーター配列 (T3 - MI 5' a a t t a a c c c t c a c t a a a g g g A C A C G T G G G T G A T C T G C C C T G C A、および T7 M2 5' - g t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g c t T G T G G C C G G A C A C C C T C T C A (下部文字中のプロモーター配列、上部文字中の *Mycobacteria* 配列) のいづれかも含んでいた。*M. tuberculosis* rpoB Rif 部位を、前記の T3 および T7 プロモーター配列末端を有する MTX 2281 TB および MTX 2985 TB プライマーを用いて増幅した。アレイ上で解析した *M. tuberculosis* kat G の増幅は T3 または T7 末端プライマー 33f 5' - T C A C A G C C C G T A A C A C C A A C および 2288r 5' - G G C C G A T C A A C C C G A A T C A G C (X68081 上の 1942 - 1962 位および 4197 - 4217 位、TB アンプリコンサイズは 2275 bp) を用いて行った。

#### 【0084】

50 mM の KCl、10 mM の Tris (pH 8.3)、1.5 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.001% (w/v) のゼラチン、5% の DMSO、0.5  $\mu$ l の各プライマー、200  $\mu$ M の 4 種それぞれのデオキシヌクレオチド 3 リン酸および 1.5 ユニットの Taq ポリメラーゼ (Ampli Taq、Perkin-Elmer) を含む 100  $\mu$ l の反応容積中で PCR を行った。Perkin-Elmer 2400 熱サイクラー中、初期変性工程が 94 で 5 分間、サイクリング条件 94 で 45 秒、60 で 30 秒、72 で 30 秒 (kat G 標的では 2 分間) で PCR を行い、最後のサイクルは 72 で 10 分間行った。

#### 【0085】

試料中に *Mycobacteria* が存在するかどうかをスクリーニングするため *Mycobacteria* の保存領域 (この様な領域は 2 個のプライマーにより増幅される) 中に設計されたプローブを調製しなければならない。この例では、配列 5' G A T G A G C C C G C G G C C T A T C A G C T T G T T G G T 3' からなる検出プローブによりスクリーニングが可能である。熱またはアルカリ処理で PCR フラグメントを変性、および増幅フラグメントの標識プローブへのハイブリダイゼーション (Nucleic Acids Research、Vol. 26、pp 2150 - 2155 (1988)) 後、蛍光信号の分析は *Mycobacteria* 種が存在することを示している。

#### 【0086】

スクリーニング手順が陽性である場合、プロモーターでラベルされた PCR アンプリコンを標識一本鎖 RNA 標的を生体外転写で生成するために用いた。各 20  $\mu$ l の反応生成物は約 50 ng の PCR 生成物、20 U の T3 または T7 RNA ポリメラーゼ (Promega)、40 mM の Tris 酢酸 (pH 8.1)、100 mM の酢酸 Mg (アセテート) 2、10 mM の DTT、各 1.25 mM の ATP、CTP および GTP、0.5 mM の UTP および 0.25 mM のフルオレスカイン - UTP を含んでいた。反応は 37 で 1 時間おこなわれた。生体外で転写された RNA を MgCl<sub>2</sub> 濃度を 30 mM に調節し 94 で 30 分間加熱するか、30 mM の MnCl<sub>2</sub> および 30 mM のイミダゾールと共に 65 で 30 分間インキュベートすることにより断片化した。断片化の効率を変性 PAGE で分析した。

#### 【0087】

米国特許第 5,837,832 (Chee) に記載されるものと同様なアレイタイル戦略を用い、*Mycobacterium* 株と rpoB 突然変異株を区別する配列を同定した。一定の参照配列内の全ての塩基に対し、同じ長さの 4 個のプローブをアレイ上に合成した。問題の塩基はプローブの中心に位置し、共通の 3' および 5' 末端を有している。1 個のプローブは参照配列に対し正確に相補的であるが、他の 3 個のプローブは問題の塩基

10

20

30

40

50

に対し1個の塩基のミスマッチを有する可能性がある。基本となる細胞を標識標的のハイブリダイゼーション強度を4個のプローブと比較して決定した。16S rRNA配列では、アレイ上で1回だけ参照される2個以上を共有するプローブを合成することにより、過剰のプローブを除去した。rpoBに対する野性型プローブに加えて、リファンピン耐性突然変異体はそれ自体のプローブのセットで表される。アレイはまた、カタラーゼ、ペルオキシダーゼをコードする2.2kbのM. tuberculosis katG遺伝子並列を含む。プローブアレイは16S rRNA、rpoBアンチセンス、およびkatGセンス配列に対応する、4個の別個のゾーンに分けられる。アレイは1.28cm x 1.28cmの面積にわたり、特定の50μm x 50μmユニットまたは細胞に分割され、総数で65,000の異なった合成部位となる。82の固有の16S rRNA配列のデータベースを用いてアレイを設計したが、それにより54の異なったフェノタイプの株を区別することができた。アレイ上に張り合わせた16S rRNAの領域で観察される配列の異質性のために、ある株、または分類学上の複合体が、1個以上の参照配列で表される(例えばM. avium細胞間複合体)。また、61リファンピン耐性単離株由来のrpoB配列のデータベースがアレイ上に表されている。これらの配列は51個の固有のrpoB突然変異体を含んでいる。

10

#### 【0088】

プローブアレイのハイブリダイゼーションをGENE CHIP Fluidicsステーション(Affymetrix)を用いて行った。断片化した標識RNA標的の1から5μlを500μlのハイブリダイゼーション緩衝液で希釈した。ハイブリダイゼーション緩衝液1の組成は4.5X SSPE(0.675M NaCl、45mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4.5mM EDTA、pH7.4)、0.005%(v/v)Triton-X、30であった。アレイに結合した標的により放射される蛍光信号をGene Array Scanner(Hewlett Packard、Palo Alto、CA)により光学濃度6で検出した。プローブアレイ細胞濃度、ヌクレオチド塩基呼び出し、配列決定および報告は、GENE CHIPソフトウェア(Affymetrix)に用意された機能で作成した。候補選択インデックスを、実験的に導き出した配列と、アレイ上に貼り合わせた参照配列のすべてとの間の相同性の比率で決定した。核酸配列は米国特許第5,589,585(Mabilat)、米国特許第5,702,317(Mabilat)および米国特許第5,849,901(Mabilat)に記載されるか、GenBankまたはその他のデータベースから入手できる。

20

30

#### 【0089】

##### 実施例2

##### HIV分析

本発明の第1アレイで、特にウイルス負荷測定のために用いられたHIV核酸配列は、Linら、J. Clin. Microbiol. 36(3)、pp835-839(1998)およびKorberら、Science 280、pp1868-1871(1998)に記載され、Genbankまたは他のデータベースで一般に公開されている。HIV核酸配列を記載する公開文献には欧州特許第0345375号(De Leys)、0173529号(Wong-Stal)、0178978号(Alizon)、0181150号(Luciw)、および0185444号(Chang)が含まれる。核酸配列を記載する米国特許には米国特許第5,079,342号(Alizon)および5,310,541号(Alizon)が含まれる。また、Kozal、Michael J.ら「高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて観測したHOV-1クレードBプロテアーゼ遺伝子中の広範囲多形」、Nature Medicine、Vol. 2、no. 7、pp753-759(1996年7月)も参照のこと。

40

#### 【0090】

##### 【発明の効果】

本発明は以上説明したように構成されることにより、以下のような効果を奏する。

#### 【0091】

50

第1・第2ハイブリダイゼーション反応由来の信号の検出器と、分析機器の統合操作を行う制御モジュールを備えることにより、検出器からの結果に基づいて第2ハイブリダイゼーション反応の処理と、解析の必要性を決定することができる。

【0092】

高次検出フォーマットで前述標的核酸配列またはその相補的配列の陽性ハイブリダイゼーション反応シグナルを検出するための第二検出器を備えることにより、内部の高次検出フォーマットでは標的核酸配列についての追加データを供給することができる。

【0093】

試料調製ステーションで選抜された標的核酸配列の調製する手段を備えることにより、ここから提供される標的核酸配列上の核酸増幅行程を行うことができる。

10

【0094】

試料調製ステーションに内部標準核酸配列を供給する手段を備えることにより、ここから提供される内部標準核酸配列上の核酸増幅行程を行うことができる。

【0095】

試料調製ステーションから第1試験反応ステーションへ、また制御モジュールでの決定により第1試験反応ステーションから第2試験反応ステーションへの液体移送の手段を備えることにより、自動的かつ人手を介さずに、移送される液体と外部環境の間で接触の起こることのない液体の移送を実現する。

【0096】

低次検出フォーマットで均一溶液ハイブリダイゼーション反応実行の手段を備え、第1ハイブリダイゼーション反応からの検出信号データの結果に基づき、制御モジュールによる一つまたは複数の高次検出フォーマット使用の選択を可能にする。

20

【0097】

高次検出フォーマットにマトリックスハイブリダイゼーション反応実行の手段を備えることにより、多重検出解析を可能にする。

【0098】

低次検出フォーマット機器がマトリックスハイブリダイゼーション反応実行の手段を備えることにより、少数の標的アンプリコンおよび内部標準アンプリコンをスクリーニングすることを可能にする。

【0099】

内部標準配列と標的配列を増幅し、増幅された核酸配列の制限検出解析から測定された内部標準信号と第1閾値、標的信号と第2閾値の比較を行い、比較の結果より以降の多重検出分析を行うか否かを決定する工程を備えることで、より多くの分析データの収集を費用効率の良く行う核酸分析法を実現する。

30

【0100】

上記分析法の工程を自動的に、人手を介さず行うことにより、人件費や試料処理費を削減し低コスト化をはかる。

【0101】

1個以上のアンプリコンに対する相補核酸配列からなる低次検出フォーマットにアンプリコンを提供し、ハイブリダイゼーションされたアンプリコンの存在を検出して、制御アルゴリズムにより陽性の決定が得られた場合にのみ、アンプリコンを高じ検出フォーマットでさらに解析するという工程により、1個以上の核酸を含む試験試料から低コストでのデータ収集するための診断法および自動化機器上での手順を実現する。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト試料に関して複数の試験を行うための先行技術の方法の概略図であり、フローチャートでは感染源が試料中にあるという仮定から出発している。

【図2】本発明による方法の概略図であり、低次検出フォーマットからの制御アルゴリズム処理信号が高次検出フォーマットが正当であることを示した場合のみ、高次検出フォーマットが行われる。

【図3】図2の方法の変法の概略図である。

50

【図4】図2の方法の2番目の実施形態の概略図であり、第2レベルの試験を行うかどうか、同様に試料中の核酸レベルの定量評価を行うべきかどうか、制御アルゴリズムにより決定される。

【図5】本法の3番目の実施形態の概略図であり、3個の低次検出フォーマットが平行して走り、結果を表す信号が制御アルゴリズムを実行する制御モジュールに供給される。3個の異なる分析パラメータが供給され、1個の高次検出フォーマット選択用の1個の入力となる。

【図6】図2から5の方法を行うために用いられる好ましい分析機器のブロック図である。

【図7】図2から5の方法を行うための分析機器の別な設計のブロック図である。

10

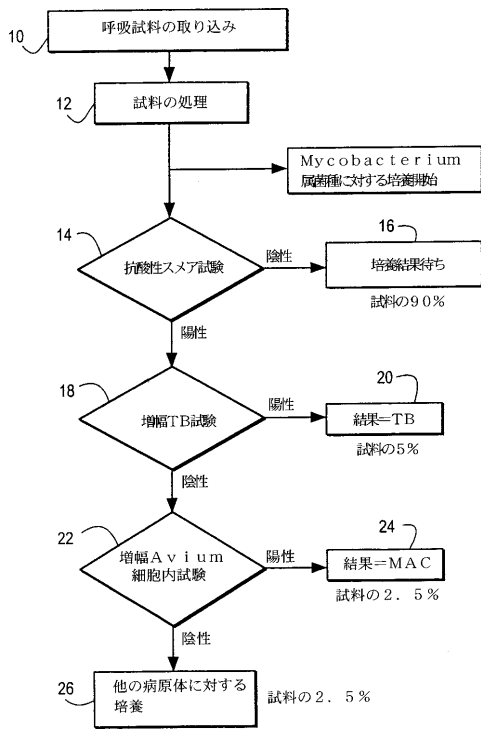
【符号の説明】

- 1 2 0 核酸分析機器
- 1 2 2 試料調製ステーション
- 1 2 4 流路
- 1 2 6 流路
- 1 2 8 第1反応ステーション
- 1 2 9 パネル目録
- 1 3 0 3方バルブ
- 1 3 2 流路
- 1 3 4 第2反応ステーション
- 1 3 6 検出ステーション
- 1 3 8 制御モジュール
- 1 4 0 ユーザーインターフェース
- 1 4 4 導体
- 2 0 2 試料調製ステーション
- 2 0 3 増幅
- 2 0 4 第1反応ステーション
- 2 0 6 多重検出反応ステーション
- 2 0 8 多重検出器
- 2 0 9 第1検出器
- 2 1 0 制御モジュール
- 2 1 2 ユーザーインターフェース

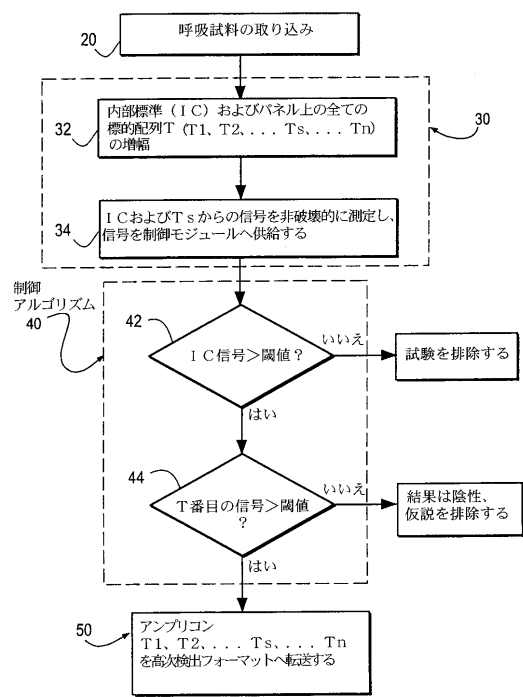
20

30

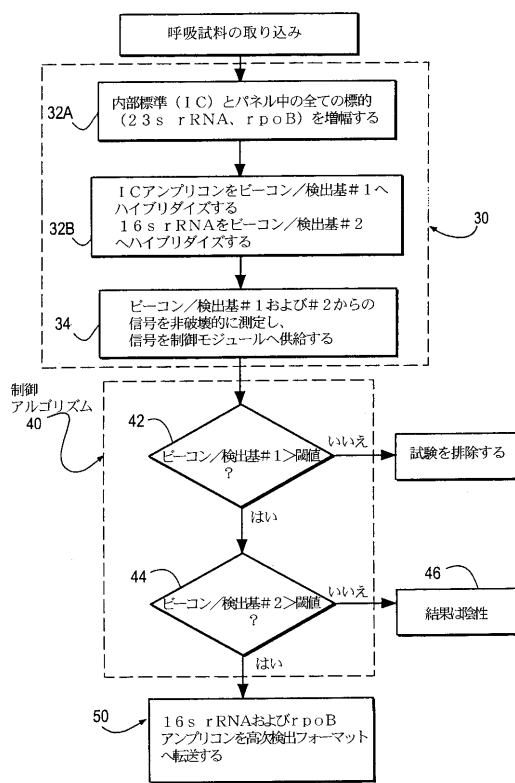
【 図 1 】



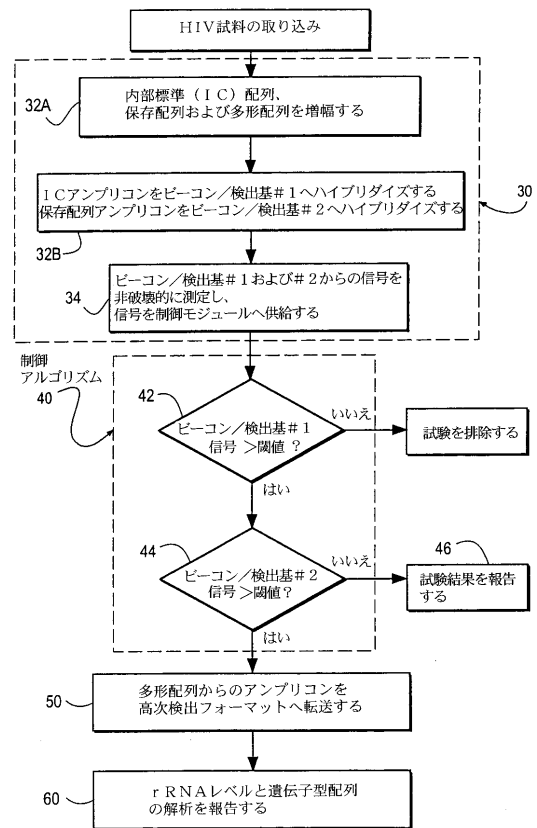
【 図 2 】



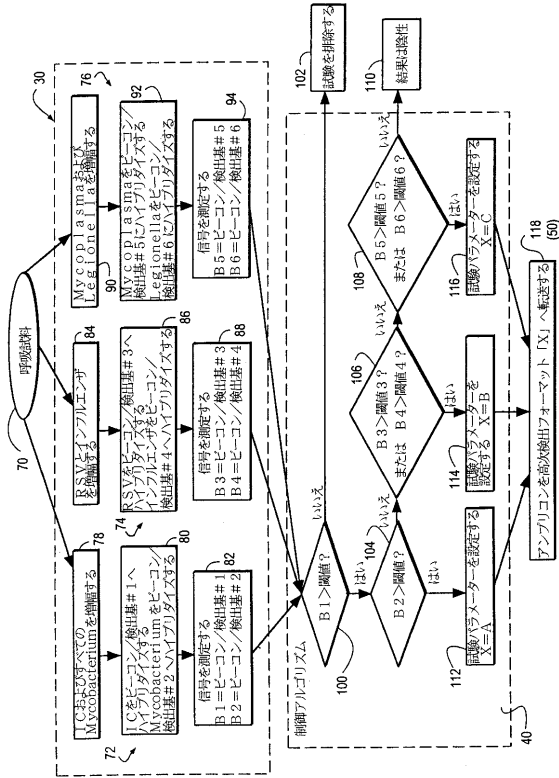
【 図 3 】



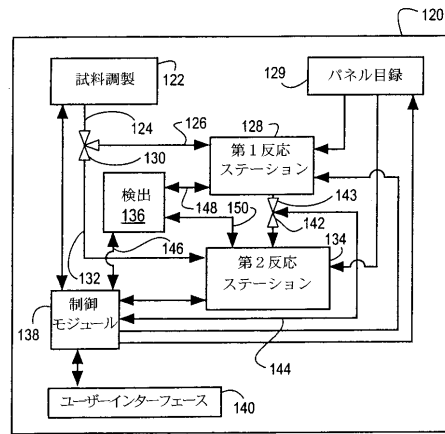
【 図 4 】



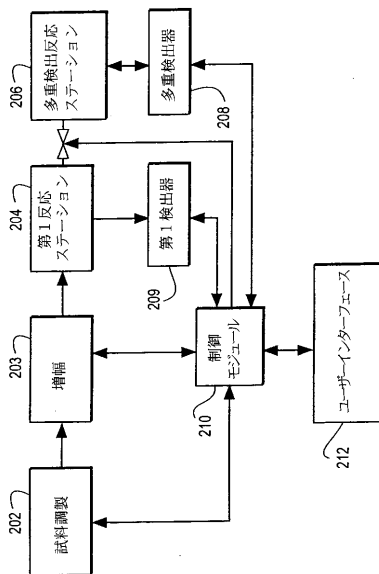
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## フロントページの続き

- (56)参考文献 特表平10 - 513263 (JP, A)  
特表平07 - 509361 (JP, A)  
特表平8 - 503606 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C12M 1/00~34  
C12Q 1/68