

(11) 特許出願公開番号

特開2009-201444

(P2009-20144A)

(43) 公開日 平成21年9月10日(2009.9.10)

(51) Int.Cl.
C12M 1/00

F 1
C 1 2 M 1/00

テーマコード (参考)
4B029

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2008-48991 (P2008-48991)
(22) 出願日 平成20年2月29日 (2008.2.29)

(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 100100310
弁理士 井上 学

(74) 代理人 100098660
弁理士 戸田 裕二

(72) 発明者 山本 周平
茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
株式会社日立ハイテ
クノロジーズ那珂事業所内

(72) 発明者 桜井 智也
茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
株式会社日立ハイテ
クノロジーズ那珂事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分析装置

(57) 【要約】

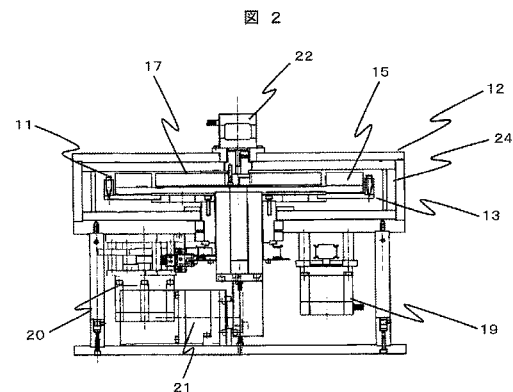
【課題】

本発明の目的は、個々の反応容器が核酸増幅部へ一定の周期で順次投入される連続処理の核酸分析装置において、密閉容器内の反応溶液の加熱に伴って発生する結露を防止することに関する。

【解決手段】

本発明は、当該複数の反応容器を保持可能な容器設置台を備え、当該容器設置台に設置された反応容器は、近接する非接触の熱源と、熱源から反応容器上部へ向かう空気循環によって加熱され、反応容器上部の温度が反応容器下部の温度より高く保持される核酸分析装置に関する。本発明によれば、核酸増幅時の加熱によって密閉容器上部の内壁に発生し得る結露を防止でき、より精度の高い核酸分析を可能となる。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸を保持できる複数の密閉反応容器が核酸増幅部へ順次投入される連続処理の核酸分析装置であって、

当該複数の反応容器を保持可能な容器設置台を備え、

当該容器設置台に設置された反応容器は、近接する非接触の熱源と、熱源から反応容器上部へ向かう空気循環によって加熱され、反応容器上部の温度が反応容器下部の温度より高く保持されることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 2】

請求項 1 記載の核酸分析装置であって、

前記密閉反応容器が蓋付き密閉反応容器であることを特徴とする核酸分析装置。

10

【請求項 3】

請求項 1 記載の核酸分析装置であって、

前記密閉反応容器を介して前記核酸を蛍光測定することを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 4】

請求項 1 記載の核酸分析装置であって、

前記容器設置台が、所定周期で、周回軌道上を移動及び停止することを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 5】

請求項 1 記載の核酸分析装置であって、

前記設置台がターンテーブルであることを特徴とする核酸分析装置。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、密閉容器内の核酸を増幅する核酸分析装置に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝情報を担う物質である核酸の分析は、学術研究や医療等の多岐の分野で実施されている。核酸の分析方法としては、主に P C R (Polymerase Chain Reaction) 等の核酸増幅技術が利用されることが多い。ここで、P C R とは、核酸を塩基配列特異的に増幅する方法であり、微量の核酸を高感度で検出できる方法である。この P C R に代表される核酸増幅過程のプロダクトを経時的に検出する増幅・検出工程に加え、核酸の抽出や反応液の調製等の前工程を含む複数の工程を自動で実施する装置が、感染症の診断等の臨床検査分野で利用されている。

30

【0003】

P C R に代表される核酸増幅過程では、試料を含む微量な反応液を一定時間加熱するため、蒸発による反応液量の低下、またはそれに伴う含有成分の濃度変化が課題となる。これに対する既知の対策として、水溶性の反応液にミネラルオイルを添加する方法や、容器に蓋を設け、反応液を容器内に密閉する方法等がある。

【0004】

また、特許文献 1 には、容器の上部に配置された加熱ブロックによって容器を蓋部材を通して上部から加熱することにより、蒸発して上昇してきた溶液が内壁面に付着して結露することを防止することが開示されている。

40

【0005】

【特許文献 1】特開 2 0 0 7 - 9 7 4 7 6 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

臨床検査分野に適した核酸分析装置、特に、反応液の加熱について、本願発明者は鋭意検討した。

50

【0007】

ミネラルオイルを添加する方法は、分注機構の追加によるコスト増、増幅反応に完全に無害かどうか不明、増幅後の分離が必要な場合は面倒、といった問題に加え、試料間のコンタミネーションが大きな問題となる。特に、前工程から核酸増幅工程までを自動化した装置においては、反応容器を装置上で自動搬送するため、搬送中に容器内の反応液が飛散する可能性があり、近接する容器間でコンタミネーションが発生するリスクが高くなる。これは、特に、臨床検査の分野で重大な問題となる。

【0008】

他方、反応容器に蓋を設け密閉容器とする方法は、上記問題を解決する有効な手段であり、容器密閉後に限っては容器間のコンタミネーションのリスクはない。しかし、例えば、ヒータやペルチェ素子等の熱源を内蔵した熱伝導性のよい金属部材で形成された加熱ブロックに、その下部が密着するように蓋付き密閉容器をに設置して加熱すると、容器内で蒸発した成分は、相対的に温度の低い容器上部の内壁に結露してしまう。

【0009】

容器内での結露は、反応液量の低下に伴う液面高さの変動や含有成分の濃度変化といった問題を引き起こす。さらに、増幅過程の産物をリアルタイムに検出する方法として蛍光検出が用いられることが一般的であるが、この蛍光検出のための励起光や蛍光の光路が、容器上部の蓋を通過する場合、蓋内壁に発生した結露が蛍光検出の阻害となる。

【0010】

特許文献1に開示された結露防止技術は、少なくとも核酸増幅工程がバッチ処理の核酸分析装置には適している。ここで、バッチ処理とは、一定数量の試料を同時に処理し、その数量を超える試料は次回処理へ繰越となるような処理を指す。核酸増幅工程がバッチ処理の場合、例えば、96ウェルが16×8の格子状に配列した第1の加熱ブロックに、最大96個の反応容器を設置し、これらを同時に増幅処理する。この場合、最大96個の反応容器の上部に第2の加熱ブロックを接触させ、容器上部を加熱することは容易に実現可能である。また増幅反応終了後に、次に待機する最大96個の反応容器と交換するため、第2の加熱ブロックを手動または自動で開閉することや、最大96個の反応容器を手動または自動で交換搬送することも容易に実現可能である。

【0011】

しかし、このバッチ処理では、すでに開始している増幅工程中に発生した緊急の試料には対応できない。一般に、臨床検査の分野では、常時まとまった検体があるとは限らず、むしろ不定期の飛び込み検体が多いケースが考えられる。このような不定期に発生する個別検体は、現在進行中の増幅工程が終了するまで待たなければならない。また、これから増幅しようとする検体数がバッチ処理数量に対して大幅に少なく、かつバッチ処理前後での容器の交換・搬送を容易にするために反応容器がバッチ数量単位で結合している一体型容器を採用している場合は、使用しない容器の分だけ無駄になり、1テスト当たりの消耗品コストが増加してしまう。

【0012】

一方、個々の反応容器が核酸増幅部へ一定の周期で順次投入される連続処理の場合、緊急の追加検体にも柔軟に対応可能であり、1テスト当たりの消耗品コストは一定である。

【0013】

しかし、特許文献1で開示されている、第2の加熱ブロックによって容器上部を加熱し、結露を防止する技術は、複数の試料が個々に核酸増幅部へ順次投入される連続処理である場合には適していない。例えば、前述の例の場合、96箇所ある容器設置位置に対してそれぞれ独立に開閉可能な第2の加熱ブロックが必要になり、極めて複雑な機構となってしまう。

【0014】

本発明の目的は、個々の反応容器が核酸増幅部へ一定の周期で順次投入される連続処理の核酸分析装置において、密閉容器内の反応溶液の加熱に伴って発生する結露を防止することに関する。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、当該複数の反応容器を保持可能な容器設置台を備え、当該容器設置台に設置された反応容器は、近接する非接触の熱源と、熱源から反応容器上部へ向かう空気循環によって加熱され、反応容器上部の温度が反応容器下部の温度より高く保持される核酸分析装置に関する。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、核酸増幅時の加熱によって密閉容器上部の内壁に発生し得る結露を防止でき、より精度の高い核酸分析を可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本実施例は、核酸を保持できる複数の密閉反応容器が核酸増幅部へ順次投入される連続処理の核酸分析装置であって、当該複数の反応容器を保持可能な容器設置台を備え、当該容器設置台に設置された反応容器は、近接する非接触の熱源と、熱源から反応容器上部へ向かう空気循環によって加熱され、反応容器上部の温度が反応容器下部の温度より高く保持されることを特徴とする核酸分析装置を開示する。

【0018】

また、密閉反応容器が蓋付き密閉反応容器であることを特徴とする核酸分析装置を開示する。

【0019】

また、密閉反応容器を介して前記核酸を蛍光測定することを特徴とする核酸分析装置を開示する。

【0020】

また、容器設置台が、所定周期で、周回軌道上を移動及び停止することを特徴とする核酸分析装置を開示する。

【0021】

また、容器設置台がターンテーブルであることを特徴とする核酸分析装置を開示する。

【0022】

上記およびその他の本発明の新規な特徴と効果について、図面を参酌して説明する。尚、図面は発明の説明に用いるものであり、権利範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0023】

本実施例は、反応容器が一定の周期で核酸増幅部へ順次投入され、核酸の抽出から増幅・検出までの一連の工程を自動で実施する核酸分析装置において、恒温型増幅法の一つであるLAMP法（Loop-mediated isothermal amplification）を適用した場合について説明する。

【0024】

尚、LAMP法は、変性を含むすべてのステップにおいて、原則として温度変化を必要とせず、各試薬を反応容器に入れてインキュベートすることで、短時間で増幅産物、あるいは増幅の有無を検出できる簡易、迅速な遺伝子増幅法である。また、4種類のプライマーで6つの領域を規定することで、標的遺伝子配列のみを増幅できる精確な遺伝子増幅法でもある。

【0025】

図1および図2に核酸増幅部の上面図および断面図を示す。増幅槽12内に設置される容器設置台13は、ステッピングモータ19によって回転、停止が可能である。容器設置台13上には回転軸を中心とする円周上に5°間隔で合計72箇所のウェル14が形成されており、各ウェル14に1個ずつ反応容器11を設置可能である。LAMP法における標準的な増幅時間は40分であるため、反応容器11が36秒周期で増幅槽12へ搬入されると、容器設置台13上には少なくとも67個の反応容器11が設置される。つまり、

10

20

30

40

50

増幅時間を40分とした場合、合計72箇所のウェル14の内、5箇所が予備となる。

【0026】

本実施形態に使用される増幅反応容器は、開閉可能な蓋部材を備えている。蓋部材が反応容器を密閉することで、反応溶液の蒸発による液量低下やコンタミネーションを防止している。

【0027】

反応容器11は、核酸および増幅試薬を含む反応溶液を保持する容器と、上部開口を密閉するための蓋によって構成される。容器は、例えば市販の0.2mlPCRチューブと同等の形状および寸法とすれば、目的に応じて、本実施例の核酸分析装置以外の分析装置で使用可能となり、汎用性が確保できる。蓋は、例えば回転式で開閉可能とし、蓋開閉機構によって自動開閉されることが望ましい。また蓋の一部を通じて光検出する場合は、光が通過する部分を薄く平坦な形状とするのが望ましい。容器および蓋は共に樹脂成形品であり、材料には熱による耐性があり、かつ無蛍光で透過率の高い材質を選択する。増幅工程後はコンタミネーション防止の観点から、開栓せずそのまま搬送ロボットによって増幅槽12から取り出し、廃棄ボックス内へ廃棄する。本実施例で容器内に準備される反応溶液量は30 μ lである。反応溶液が容器内に準備され、蓋によって閉栓された反応容器11は、36秒周期で順次、搬送ロボットによって増幅槽12へと搬送される。36秒周期は、ちょうど100テスト/時間の処理速度を実現できる処理周期である。

【0028】

36秒周期で増幅槽12内へ搬入される反応容器11を容器設置台13へ設置するため、容器設置台13は36秒周期で回転を停止する。搬送口23より搬入された反応容器11は、容器設置台13が停止している間に搬送ロボットによって容器設置台13上の所定のウェル14内に設置される。搬送口23の位置は固定のため、反応容器11は常に同じ位置へ搬送される。これに対し、容器設置台13は1サイクル36秒の内、例えば29.2秒かけて1回転+1ウェル分、すなわち73ウェル分回転し、次の6.8秒間停止する動作を繰り返す。第1の反応容器11が容器設置台13の第1のウェル14に設置されると、容器設置台13はその位置を基準に、1回転+1ウェル分回転し、すなわち第1のウェル14の隣の第2のウェル14が容器搬送位置となる位置で停止する。ここで第2の反応容器11が第2のウェル14に設置される。これを繰り返すことにより、一定周期で順次搬送されてくる反応容器11を、第1のウェル14から順に隣り合うウェル14へ設置することが可能となる。

【0029】

これを第72の反応容器11を設置するまで繰り返すと、容器設置台13上の全てのウェル14が反応容器11で満たされることになる。第73の反応容器11を設置すべき位置、すなわち第1のウェル14には第1の反応容器11が既に設置されているが、この時点で第1の反応容器11に対してはすでに必要な増幅時間である40分を経過しているため、第73の反応容器11は、第1のウェル14から第1の反応容器11を搬出した後、空ウェルとなった第1のウェル14に設置する。以下同様に繰り返すことで、容器設置台13に配置されたウェル総数に関係なく、それを超える検体数の増幅処理を連続的に実施可能となる。

【0030】

搬送口23はステッピングモータ20によって開閉可能であり、反応容器11を搬送するときのみ開き、それ以外は閉じている。搬送口23が閉じている間、増幅槽12は外気と遮断されているが、開いている間は増幅槽12内の熱が外気へ漏れてしまう。そのため、なるべく搬送口23が開いている時間を短くすることが望ましい。前述の例では、第73以降の反応容器11の搬入には、事前に既設の反応容器11を排出する必要があるため、既設容器の搬出から新設容器の搬入までの間、搬送口23を開けておかなければならない。反応容器11の搬出、搬入を1台の搬送ロボットで順に実施する場合、搬出した処理済容器を廃棄する動作が必要となるため、この廃棄動作が完了するまで、次の反応容器11の搬入を開始できない。そこで、例えば、反応容器11の搬出開始後、それが完了する

前に一度搬送口 2 3 を閉じ、その後、搬入直前に再度、搬送口 2 3 を開ければ、搬出開始から搬入完了までの間に搬送口 2 3 を開けている時間を短縮することが可能である。

【0031】

または、搬出、搬入の順序を逆にする事で全体の搬出、搬入の時間を短縮することもできる。前述の例を引用すると、第 7 2 の反応容器 1 1 を空ウェルである第 7 2 のウェル 1 4 に設置した際、容器設置台 1 3 を更に 1 ウェル分回転し、第 1 のウェル 1 4 に設置されている第 1 の反応容器 1 1 を予め排出しておく。これを繰り返すと、回転中、容器設置台 1 3 には常に 1 箇所分の空きウェルがある状態が保持されるため、次に停止した時に既設反応容器の排出および廃棄を待つことなく、先に新設の反応容器 1 1 を設置することが可能となり、次に既設反応容器の排出を開始した時点で、廃棄までの動作完了を待つことなく搬送口を閉じることが可能となる。

10

【0032】

さらに別の手段として、搬出と搬入のための搬送ロボットを個別に用意することで、2 台の搬送ロボットが同時に動作可能な時間分だけ、全体の搬出、搬入の時間を短縮することも可能である。

【0033】

増幅工程中の増幅産物を経時的にモニターする方法として、本実施例では蛍光検出を用いる。増幅量の変化と蛍光強度の変化に相関があるため、蛍光強度の経時変化をモニターすることで増幅前の標的核酸濃度を調べる事が可能である。LAMP法では、増幅反応の副生成物により白濁、沈殿が発生する。蛍光検出への影響を最小化するため、蛍光測定のための励起・検出光学系は反応容器周回軌道上の上方に設置する。これにより、容器設置台 1 3 上の各反応容器は、1 周回転する毎に、つまり、36 秒に 1 回の周期で前記光学系の真下を通過し、この瞬間蛍光測定が実施される。36 秒周期で収集された蛍光強度は、装置本体を制御する制御用 PC に蓄積される。測定が必要な蛍光色素が複数ある場合は、例えば各蛍光色素の検出に最適な構成となる検出光学系を蛍光色素毎に用意し、それらを反応容器周回軌道上に設置すれば良い。または、共通の光学系を利用して、回折格子やプリズム等の分光器で分光し、複数波長の蛍光測定を同時に実施しても良い。

20

【0034】

次に増幅槽内での温調機構について詳述する。

【0035】

LAMP法は 1 温度のみで増幅可能な恒温増幅法の一つであり、本実施例における標準的な温度は 60～65℃である。増幅槽 1 2 の側面に設置された非接触型の温度計 1 8 により容器設置台 1 3 の表面温度をモニターし、この出力と設定温度を比較し熱源の操作を調節する。熱源にはヒータ 1 6 を用い、30W のヒータ 1 6、計 12 個がアルミ製の加熱ブロック 1 5 の外周部にある突起内にそれぞれ埋め込まれている。ヒータの制御は単純な ON-OFF 制御でも良いし、オーバーシュートやハンティングが問題となる場合は、PID 制御等の制御方法を用いても良い。また、ヒータ以外の熱源としてはペルチェ素子を利用しても良い。

30

【0036】

安全面への配慮として、現在温度が許容値を超える場合は、ヒータの制御を停止する。また、ソフトウェアの暴走等が原因で現在温度が許容値を超える場合に備え、サーモスタット等によりヒータへの電力供給を強制的に遮断する。

40

【0037】

加熱ブロック 1 5 には熱伝導性の高い金属を利用する。加熱ブロック 1 5 は容器設置台中心部の上方で、かつ反応容器周回軌道に対して側方内側に設置され、通常、容器設置台 1 3 には直接接触していない。加熱ブロック 1 5 の熱容量が大きいと、室温から設定温度まで加熱するのに時間がかかる他、ヒータ 1 6 の入力に対する応答が遅くなるため制御が難しくなる。このため、加熱ブロック 1 5 の体積はなるべく小さくすることが望ましい。本実施例では、室温からの加熱時間を短縮するため、加熱ブロック 1 5 をステッピングモータ 2 1 によって上下可能な構造とし、装置軌道時は容器設置台 1 3 の回転を止めておき

50

、加熱ブロック 15 を下降させ容器設置台に接触させて加熱する。容器設置台 13 のモニタ温度が設定温度あるいはその近傍に到達したら、加熱ブロック 15 を上昇離脱させ、増幅工程の開始、つまり容器設置台 13 の回転開始に備える。

【0038】

容器設置台 13 の駆動開始後、つまり、増幅工程の開始後は、常に加熱ブロック 15 は上昇位置に保持される。加熱ブロック 15 の中心部上方でかつ、ヒータ 16 の埋め込まれた突起部の側方内側には、空気循環のための回転羽 17 が設置されており、この回転羽 17 はステッピングモータ 22 によって回転させる。ヒータ 16 が埋め込まれた加熱ブロック外周の突起部は、加熱ブロック 15 の熱を周囲へ効率良く放熱させる放熱フィンの役目を果たしており、回転羽 17 は加熱ブロック 15 中心付近の空気を前記放熱フィンを通して加熱し、容器設置台 13 から露出した反応容器上部へと送風することで、反応容器上部を加熱している。反応容器上部へ送風された空気は、容器設置台 13 の外側から下側へと回り、容器設置台中心付近および加熱ブロック中心付近に設けられた穴を通して、再度回転羽周辺まで循環する。この空気循環により反応容器上部が選択的に加熱され、反応溶液が保持される反応容器下部より高い温度に保たれることで、反応容器 11 の上部内壁における結露の発生を防止している。これにより、結露が原因による反応溶液の濃度変化や液面高さの変動を防止するとともに、反応容器の蓋を介して実施される蛍光測定が結露によって阻害されることも無く、より精度の高い蛍光測定を実現することが可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0039】

20

【図 1】増幅部上面図。

【図 2】増幅部断面図。

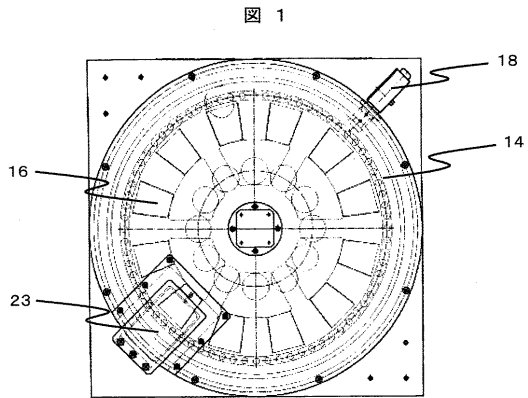
【符号の説明】

【0040】

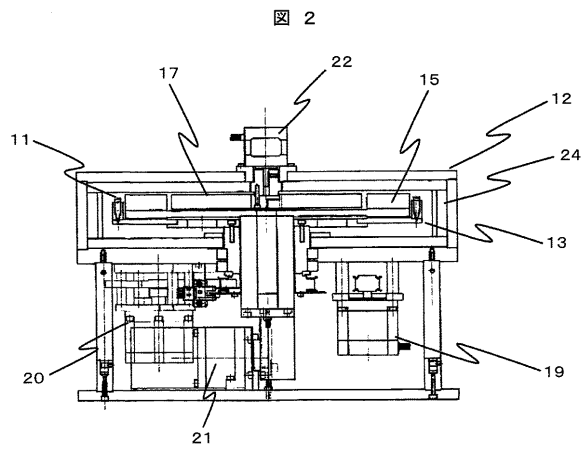
- 11 反応容器
- 12 増幅槽
- 13 容器設置台
- 14 ウェル
- 15 加熱ブロック
- 16 ヒータ
- 17 回転羽
- 18 温度計
- 19, 20, 21, 22 ステッピングモータ
- 23 搬送口
- 24 断熱材
- 25, 26 蛍光検出器

30

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

- (72)発明者 庄司 義之
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
那珂事業所内 株式会社日立ハイテクノロジーズ
- (72)発明者 細入 剛彦
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
那珂事業所内 株式会社日立ハイテクノロジーズ
- (72)発明者 山下 善寛
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
那珂事業所内 株式会社日立ハイテクノロジーズ
- (72)発明者 飛田 朋之
茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
那珂事業所内 株式会社日立ハイテクノロジーズ

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA08 AA23 BB20 FA12 FA15