

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7366247号
(P7366247)

(45)発行日 令和5年10月20日(2023.10.20)

(24)登録日 令和5年10月12日(2023.10.12)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z	
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z	

請求項の数 7 (全13頁)

(21)出願番号	特願2022-515244(P2022-515244)	(73)特許権者	314005768
(86)(22)出願日	令和3年3月8日(2021.3.8)		P H C ホールディングス株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/009033		東京都港区西新橋 2-3 8-5
(87)国際公開番号	WO2021/210298	(74)代理人	100105924
(87)国際公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)		弁理士 森下 賢樹
審査請求日	令和4年5月18日(2022.5.18)	(74)代理人	100109047
(31)優先権主張番号	特願2020-72540(P2020-72540)		弁理士 村田 雄祐
(32)優先日	令和2年4月14日(2020.4.14)	(74)代理人	100109081
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 三木 友由
		(74)代理人	100123102
			弁理士 宗田 悟志
		(72)発明者	米原 亮
			愛媛県東温市南方 2 1 3 1 番地 1 P H
			C 株式会社内
		(72)発明者	満田 綾子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸検査装置および核酸検査方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸の標識物質および標的核酸の増幅試薬を含有する溶液が添加された組織切片が載置されるステージと、

前記ステージ上の前記組織切片の温度を調節する温度調節部と、

前記組織切片における核酸増幅反応を進行させるよう前記温度調節部を制御する温度制御部と、

前記組織切片の標識強度を経時的に検出する強度検出部と、

前記強度検出部が生成する検出情報を記憶する記憶部と、を備え、

さらに、前記組織切片の形状および標識強度の少なくとも一方に基づいて、前記検出情報上で前記組織切片中に検査領域を定める領域設定部、および使用者による前記検出情報上での前記組織切片中の検査領域の指定を受け付ける受付部の少なくとも一方と、

前記検査領域における前記標的核酸に関する情報を生成する情報処理部と、を備え、

前記情報処理部は、前記検査領域の標識強度の経時変化を導出し、前記経時変化から前記検査領域における標的核酸の量を算出する核酸検査装置。

【請求項 2】

前記情報処理部は、前記検査領域における、標識強度が所定のしきい値以上である陽性領域と、標識強度が前記しきい値未満である陰性領域との比率を算出する請求項 1 に記載の核酸検査装置。

【請求項 3】

前記標的核酸は、所定の異常状態にある細胞に含まれ、

前記標識物質は、異常細胞を標識する第 1 標識物質と、正常細胞を標識する第 2 標識物質と、を含み、

前記情報処理部は、前記第 1 標識物質に起因する標識強度に基づいて前記陽性領域を特定し、前記第 2 標識物質に起因する標識強度に基づいて前記陰性領域を特定する請求項 2 に記載の核酸検査装置。

【請求項 4】

前記標的核酸は、所定の疾病に関連する核酸であり、

前記比率に基づいて前記疾病の重篤度を判定する判定部を備える請求項 2 または 3 に記載の核酸検査装置。

【請求項 5】

前記核酸増幅反応の進行中に前記標識強度が所定のしきい値を超える所定面積の領域が発生したことを検知する陽性検知部を備える請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の核酸検査装置。

【請求項 6】

前記情報処理部が生成する情報を表示する表示部を備える請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の核酸検査装置。

【請求項 7】

標的核酸の標識物質および標的核酸の増幅試薬を含有する溶液が添加された組織切片の温度を調節して前記組織切片における核酸増幅反応を進行させ、

前記組織切片の標識強度を経時的に検出し、

検出した情報を記憶することを含み、

さらに、前記組織切片の形状および標識強度の少なくとも一方に基づいて、前記検出した情報上で前記組織切片中に検査領域を定めること、および使用者による前記検出した情報上での前記組織切片中の検査領域の指定を受け付けることの少なくとも一方と、

前記検査領域における前記標的核酸に関する情報を生成することと、
を含み、

前記情報の生成は、前記検査領域の標識強度の経時変化を導出し、前記経時変化から前記検査領域における標的核酸の量を算出することを含む核酸検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、核酸検査装置および核酸検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年の研究から、がん等の疾病は、種々の遺伝子の変異が積み重なることで発症することや、遺伝子の変異態様が患者毎に異なることが明らかになってきた。さらに、変異した遺伝子の中には、疾病により変異した細胞の生存に関わるものが含まれることも明らかになってきた。したがって、疾病の種類の特定や治療において、遺伝子検査の重要性が高まっている。遺伝子検査の精度を高めるためには、疾病に関わる遺伝子をコードする標的核酸を核酸増幅装置を用いて増幅させることが有効である。従来、核酸増幅装置としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR：Polymerase Chain Reaction）で核酸を増幅させるとともに、核酸の増幅をリアルタイムに検出するリアルタイム PCR 装置が知られている（例えば特許文献 1 参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特開 2008-278810 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】**【0004】**

従来のリアルタイムPCR装置では、組織から核酸を抽出する際に組織を破碎、混合する必要があった。このため、核酸の位置情報を保持したまま核酸を増幅させることができなかった。これに対し、核酸の位置情報を取得可能な装置としてin situ PCR装置が知られている。この装置では、標的核酸を組織切片上で増幅させることができるため、標的核酸の位置情報を取得可能である。しかしながら、従来のin situ PCR装置では、核酸を増幅をリアルタイムに検出することができず、核酸の定量解析ができなかった。

【0005】

遺伝子検査の重要性の高まりから、標的核酸の発現量や発現位置といった標的核酸に関する様々な情報の取得が求められるようになってきているが、従来の核酸検査装置ではこの要求に応じることが困難であった。

【0006】

本開示はこうした状況に鑑みてなされたものであり、その目的の1つは、より多くの情報を取得可能な核酸検査技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

上記課題を解決するために、本開示のある態様は、核酸検査装置である。この装置は、標的核酸の標識物質および標的核酸の増幅試薬を含有する溶液が添加された組織切片が載置されるステージと、ステージ上の組織切片の温度を調節する温度調節部と、組織切片における核酸増幅反応を進行させるよう温度調節部を制御する温度制御部と、組織切片の標識強度を経時的に検出する強度検出部と、強度検出部が生成する検出情報を記憶する記憶部と、を備える。

【0008】

また、本開示の他の態様は、核酸検査方法である。この方法は、標的核酸の標識物質および標的核酸の増幅試薬を含有する溶液が添加された組織切片の温度を調節して組織切片における核酸増幅反応を進行させ、組織切片の標識強度を経時的に検出し、検出した情報を記憶することを含む。

【0009】

以上説明した構成要素の任意の組合せ、本開示の表現を方法、装置、システム等の間で変換したものもまた、本開示の態様として有効である。

【発明の効果】**【0010】**

本開示によれば、より多くの情報を取得可能な核酸検査技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】**【0011】**

【図1】実施の形態に係る核酸検査装置を模式的に示す正面図である。

【図2】組織切片が載置されたステージを模式的に示す平面図である。

【図3】検査領域の決定手順を説明するための模式図である。

【図4】図4（A）および図4（B）は、標的核酸の定量処理を説明するための図である。

【図5】検体の状態判定処理を説明するための図である。

【図6】図6（A）および図6（B）は、報知処理を説明するための模式図である。

【図7】実施の形態に係る核酸検査装置が実行する制御の流れを説明するための模式図である。

【発明を実施するための形態】**【0012】**

以下、本開示を好適な実施の形態をもとに図面を参照しながら説明する。実施の形態は、本開示を限定するものではなく例示であって、実施の形態に記述されるすべての特徴やその組み合わせは、必ずしも本開示の本質的なものであるとは限らない。各図面に示される同一または同等の構成要素、部材、処理には、同一の符号を付するものとし、適宜重複

10

20

30

40

50

した説明は省略する。また、各図に示す各部の縮尺や形状は、説明を容易にするために便宜的に設定されており、特に言及がない限り限定的に解釈されるものではない。また、本明細書または請求項中に「第1」、「第2」等の用語が用いられる場合には、特に言及がない限りこの用語はいかなる順序や重要度を表すものでもなく、ある構成と他の構成とを区別するためのものである。また、各図面において実施の形態を説明する上で重要ではない部材の一部は省略して表示する。

【0013】

図1は、実施の形態に係る核酸検査装置を模式的に示す正面図である。図2は、組織切片が載置されたステージを模式的に示す平面図である。本実施の形態に係る核酸検査装置1は、ステージ2と、温度調節部4と、制御ユニット6と、強度検出部8と、入力部10と、表示部12と、を備える。ステージ2、温度調節部4、制御ユニット6および強度検出部8は、筐体13に収容される。入力部10および表示部12は、筐体13の外部に配置される。なお、制御ユニット6は筐体13の外部に配置されてもよい。この場合、制御ユニット6の構成要素の全てが筐体13の外部に配置されてもよいし、一部が筐体13の外部に配置されてもよい。また、入力部10および表示部12は筐体13に設けられてもよい。

10

【0014】

ステージ2は平板状であり、組織切片14が載置される。組織切片14は、例えばスライドガラス16に支持された状態で、ステージ2に載置される。一例として、筐体13はスライド部13aを有し、スライド部13aにステージ2が設けられる。スライド部13aは、筐体13の内外に進退可能であり、スライド部13aを引き出すことでステージ2上に組織切片14を載置することができる。

20

【0015】

組織切片14には、標的核酸を標識する標識物質および標的核酸を増幅させる増幅試薬を含有する溶液が添加される。標識物質は、例えば蛍光標識プローブやDNAインターカレータ等の蛍光物質である。増幅試薬は、標識核酸に特異的なプライマー、DNAポリメラーゼおよびdNTPs等を含む。

【0016】

温度調節部4は、ステージ2上の組織切片14の温度を調節する。温度調節部4は、熱電素子プレートおよび放熱部等を有する。熱電素子プレートは、ステージ2を加熱および冷却することで組織切片14の温度を調節する。熱電素子プレートは、熱電素子および温度センサを有する。熱電素子は、例えばペルチェ素子である。温度センサは、例えばサーミスタである。熱電素子プレートは、基板に搭載される。基板は、外部接続端子を有し、外部接続端子に制御ユニット6および電源が接続される。

30

【0017】

温度調節部4は、制御ユニット6により制御される。具体的には、基板を介して制御ユニット6からの制御信号が熱電素子に送信される。熱電素子は、制御ユニット6からの指示に基づいてステージ2を加熱および冷却する。温度センサは、ステージ2の温度を検知し、基板を介して制御ユニット6に検知結果を出力する。制御ユニット6は、温度センサの出力値に基づいて、熱電素子を制御する。放熱部は、例えば複数の放熱フィンを有するヒートシンクで構成され、熱電素子プレートを放熱する。

40

【0018】

制御ユニット6は、組織切片14における核酸増幅反応を進行させるよう温度調節部4を制御する。また、制御ユニット6は、温度調節部4以外の各部の動作も制御する。制御ユニット6は、ハードウェア構成としてはコンピュータのCPUやメモリをはじめとする素子や回路で実現され、ソフトウェア構成としてはコンピュータプログラム等によって実現されるが、図1では、それらの連携によって実現される機能ブロックとして描いている。この機能ブロックがハードウェアおよびソフトウェアの組合せによっていろいろなかたちで実現できることは、当業者には当然に理解されるところである。制御ユニット6の各部の動作については、後に詳細に説明する。

50

【0019】

強度検出部8は、標識物質の種類に応じた測定方法により、組織切片14の標識強度を経時的に検出する機構である。本実施の形態では、標識物質の一例として蛍光物質が用いられる。このため、強度検出部8は、光源18と、第1光学フィルタ20と、ダイクロイックミラー22と、第2光学フィルタ24と、カメラ26と、を有する。

【0020】

光源18は、例えばハロゲンランプや半導体レーザ光源であり、励起光を含む光を照射する。光源18の点消灯は、制御ユニット6によって制御される。本実施の形態の光源18は、光軸がステージ2に対して平行に延びるように配置される。第1光学フィルタ20は、光源18からの光のうち標識物質を励起させる励起光を透過させるバンドパスフィルタである。第1光学フィルタ20は、光源18の光軸上に配置される。

10

【0021】

ダイクロイックミラー22は、光源18の光軸上に配置され、第1光学フィルタ20を透過した励起光を組織切片14に向けて反射する。ダイクロイックミラー22で反射された励起光は組織切片14に照射される。組織切片14に励起光が照射されると、標識物質が励起されて蛍光が発せられる。この蛍光は、ダイクロイックミラー22を透過して第2光学フィルタ24に向けて進む。第2光学フィルタ24は、ダイクロイックミラー22を透過した蛍光を選択的に透過させるバンドパスフィルタである。第2光学フィルタ24を透過した蛍光は、カメラ26に入射される。カメラ26は、蛍光を受光して蛍光画像を繰り返し生成し、生成した画像を制御ユニット6に送る。蛍光画像は、組織切片14の標識強度の検出情報に相当する。

20

【0022】

強度検出部8は、波長の異なる複数の励起光を組織切片14に照射して波長の異なる複数の蛍光を組織切片14から生じさせることで、各波長の蛍光に対応する蛍光画像を生成することができる。例えば、第1光学フィルタ20、ダイクロイックミラー22および第2光学フィルタ24で構成されるフィルターユニットが各蛍光に対して用意され、励起光を通過させるフィルターユニットが順次切り替えられることで、各波長の蛍光に対応する蛍光画像がカメラ26で生成される。なお、強度検出部8は、波長の異なる複数の励起光を照射可能な1つの光源18を備えてもよいし、各波長の励起光を個々に照射する光源18を複数備えてもよい。

30

【0023】

また、可視光を組織切片14に照射し、反射した光をカメラ26で撮像することで、当該光に対応する明視野画像を生成することができる。カメラ26は、生成した明視野画像も制御ユニット6に送る。

【0024】

なお、強度検出部8を構成する各部の配置は特に限定されない。例えば、光源18は、光軸がステージ2と交わるように配置され、カメラ26は、光軸がステージ2に対して平行に延びるように配置されてもよい。この場合、光源18の光は、第1光学フィルタ20を透過した後にダイクロイックミラー22を透過して組織切片14に照射される。組織切片14で生じた蛍光は、ダイクロイックミラー22により第2光学フィルタ24に向けて反射され、第2光学フィルタ24を透過してカメラ26に入射する。

40

【0025】

入力部10は、マウス、キーボード等で構成することができる。表示部12は、ディスプレイ等で構成することができる。また、本実施の形態の核酸検査装置1は、タッチパネル式のディスプレイによって一体的に構成される入力部10および表示部12を備える。使用者は、スタイラスペン11等を用いて入力部10としてのディスプレイに指示を入力することができる。入力部10および表示部12は、図1では筐体13と別体で図示されているが、上述のようにこれらは筐体13に組み込まれていてもよい。核酸検査装置1の使用者は、入力部10を介して制御ユニット6に各種の動作を指示することができる。また、表示部12は、制御ユニット6の指示に基づいて各種の情報を表示することができる。

50

【0026】

制御ユニット6は、温度制御部28と、記憶部30と、領域設定部32と、受付部34と、情報処理部36と、判定部38と、陽性検知部40と、を有する。温度制御部28は、組織切片14における核酸増幅反応を進行させるよう温度調節部4を制御する。温度制御部28が実施する核酸増幅方法は特に限定されず、例えばPCR (Polymerase Chain Reaction) 法等の変温核酸増幅方法や、RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法等の等温核酸増幅方法が例示される。

【0027】

記憶部30は、RAM、ROM、ハードディスク等で構成される。記憶部30は、強度検出部8が生成する検出情報を記憶する。本実施の形態の記憶部30は、強度検出部8の検出情報として、カメラ26が生成する蛍光画像および明視野画像を記憶する。これらの画像は、核酸増幅反応の進行中に経時的に生成されて記憶部30に記憶される。これにより、標的核酸の存在位置を検出できるとともに、標的核酸の増幅をリアルタイムに検出することができる。

10

【0028】

領域設定部32は、組織切片14の形状および標識強度の少なくとも一方に基づいて、組織切片14中に検査領域Rを定める。また、検査領域Rは、使用者が任意に定めることもできる。使用者が入力部10を介して検査領域を指定すると、受付部34が当該指定を受け付ける。図3は、検査領域の決定手順を説明するための模式図である。

20

【0029】

核酸増幅反応が終了すると、表示部12には各種の画像が表示される(S101)。一例として、表示部12には明視野画像IMG1と、第1蛍光画像IMG2と、第2蛍光画像IMG3とが表示される。第1蛍光画像IMG2は、ある標識物質が発する蛍光に対応する蛍光画像である。第2蛍光画像IMG3は、第1蛍光画像IMG2の標識物質とは異なる2種類の標識物質が発する蛍光に対応する蛍光画像である。

【0030】

領域設定部32が検査領域Rを定める場合、例えば領域設定部32は、第1蛍光画像IMG2に公知の画像処理を施して、所定の蛍光強度以上の蛍光領域を抽出する(S102)。図3に示す例では、公知のフィルタ処理等によって第1蛍光画像IMG2の背景ノイズを軽減し(ステップS102の左側の画像)、続いて、所定のしきい値を用いた輝度の2値化処理等によって蛍光領域を抽出している(ステップS102の右側の画像)。前記「しきい値」は、設計者による実験やシミュレーションに基づき適宜設定することが可能であり、入力部10を介して使用者が予め設定しておくことができる。その後、領域設定部32は、明視野画像IMG1～第2蛍光画像IMG3のそれぞれにおいて、抽出した蛍光領域を検査領域Rと定める(S103)。

30

【0031】

なお、領域設定部32は、組織切片14の形状に基づいて検査領域Rを定めることもできる。例えば領域設定部32は、画像のコントラスト等に基づいて範囲を選択する公知の範囲選択処理を明視野画像IMG1等に施すことで、検査領域Rを定めることができる。

40

【0032】

使用者が検査領域Rを定める場合、例えば使用者は、入力部10を介して明視野画像IMG1に公知の範囲選択処理を施す(S104)。図3に示す例では、公知の画像処理ソフト等で採用される範囲選択ツールを用いて、明視野画像IMG1に範囲選択処理を施している。この結果、明視野画像IMG1～第2蛍光画像IMG3のそれぞれにおいて検査領域Rが定められる(S103)。なお、使用者は、蛍光画像に公知の範囲選択処理を施すことで、検査領域Rを定めることもできる。

【0033】

また、領域設定部32による検査領域Rの設定と、使用者による検査領域Rの設定とを組み合わせることもできる。例えば、領域設定部32および使用者によって、明視野画像

50

IMG 1上で組織切片14の形状に基づく範囲選択処理が施される(S105)。図3に示す例では、領域設定部32が明視野画像IMG 1に公知の範囲選択処理を施すことで仮領域Raを定め(ステップS105の左側の画像)、続いて使用者が公知の範囲選択処理によって仮領域Raに微調整を施すことで検査領域Rを定めている(ステップS105の右側の画像)。

【0034】

また例えば、領域設定部32および使用者によって、第1蛍光画像IMG 2上で蛍光強度に基づく範囲選択処理が施される(S106)。図3に示す例では、領域設定部32が第1蛍光画像IMG 2に公知の範囲選択処理を施すことで仮領域Raを定め(ステップS106の左側の画像)、続いて使用者が公知の範囲選択処理によって仮領域Raに微調整を施すことで検査領域Rを定めている(ステップS106の右側の画像)。以上説明した検査領域Rの設定に用いられる公知の範囲選択処理には、公知の画像処理ソフトで使用される、いわゆるマグネット選択ツール、なげなわ選択ツール、多角形選択ツール、自動選択ツール等が含まれる。

【0035】

領域設定部32は、検査領域Rの情報を情報処理部36に送る。情報処理部36は、検査領域Rの情報を取得すると、検査領域Rにおける標的核酸に関する情報を生成する。情報処理部36が生成する標的核酸情報の種類は、使用者が入力部10を介して指定することができる。なお、予め決められた標的核酸情報を情報処理部36が自動的に生成してもよい。

【0036】

例えば、情報処理部36は、標的核酸情報として標的核酸の量に関する情報を生成する。図4(A)および図4(B)は、標的核酸の定量処理を説明するための図である。図4(A)に示すように、記憶部30には強度検出部8が生成した画像IMGが経時的に蓄積されている。図4(A)には一例として、明視野画像IMG 1と第1蛍光画像IMG 2とを合成した画像を図示している。また、図4(A)には、便宜上3枚の画像IMGのみを図示している。また、左側が核酸増幅反応の開始前の画像IMGであり、右側が核酸増幅反応の終了後の画像IMGであり、中央が核酸増幅反応の進行中に得られる画像IMGの1つである。

【0037】

上述した検査領域Rの設定処理により、核酸増幅反応の終了後に得られる画像IMGにおいて、第1検査領域R1と第2検査領域R2とが設定される。第1検査領域R1は、所定の標識物質に対応する蛍光領域、つまり陽性領域である。第2検査領域R2は、この標識物質に対応する蛍光強度がしきい値未満の非蛍光領域、つまり陰性領域である。経時的に蓄積された画像IMGにおいて、第1検査領域R1における蛍光強度は核酸増幅反応が進行するにつれて徐々に増加している。

【0038】

情報処理部36は、図4(B)に示すように、検査領域Rの標識強度の経時変化を導出し、経時変化から第1検査領域R1における標的核酸の量を算出する。例えば情報処理部36は、各画像IMGにおける第1検査領域R1および第2検査領域R2の平均輝度値を算出、プロットして増幅曲線を得る。例えば、情報処理部36は、核酸増幅反応の終了から開始まで遡りながら平均輝度値をプロットし、増幅曲線を生成する。図4(B)において、増幅曲線L1は第1検査領域R1に対応し、増幅曲線L2は第2検査領域R2に対応し、増幅曲線L3はネガティブコントロールに対応する。そして、情報処理部36は、得られた増幅曲線L1を用いて公知の方法により標的核酸を定量する。情報処理部36は、生成した標的核酸の量情報を表示部12に表示する。

【0039】

また、情報処理部36は標的核酸情報として、検体の状態に関する情報を生成する。図5は、検体の状態判定処理を説明するための図である。図5には一例として、明視野画像IMG 1と第2蛍光画像IMG 3とを合成した画像IMGを図示している。また、図5に

10

20

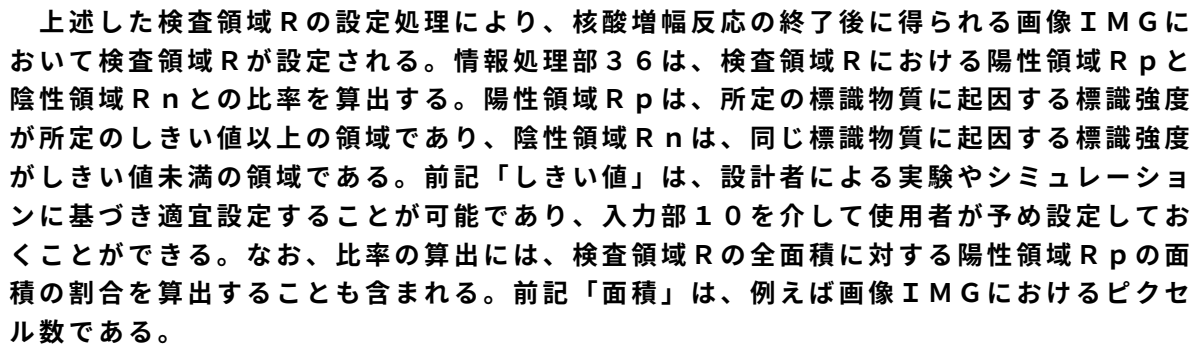
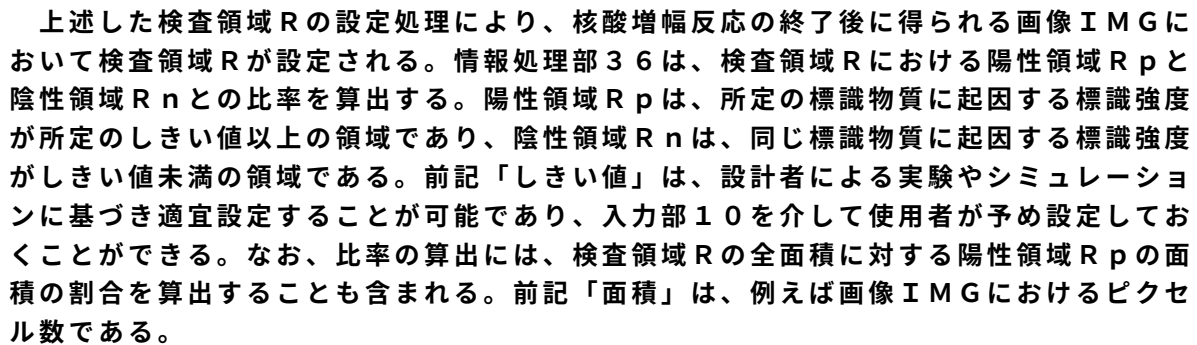
30

40

50

示す画像は、核酸増幅反応の終了後に得られる画像である。

【0040】

上述した検査領域Rの設定処理により、核酸増幅反応の終了後に得られる画像において検査領域Rが設定される。情報処理部36は、検査領域Rにおける陽性領域Rpと陰性領域Rnとの比率を算出する。陽性領域Rpは、所定の標識物質に起因する標識強度が所定のしきい値以上の領域であり、陰性領域Rnは、同じ標識物質に起因する標識強度がしきい値未満の領域である。前記「しきい値」は、設計者による実験やシミュレーションに基づき適宜設定することが可能であり、入力部10を介して使用者が予め設定しておくことができる。なお、比率の算出には、検査領域Rの全面積に対する陽性領域Rpの面積の割合を算出することも含まれる。前記「面積」は、例えば画像におけるピクセル数である。

10

【0041】

また、本実施の形態では、正常細胞を標識する標識物質に起因する標識強度に基づいて陰性領域Rnを特定する。具体的には、標的核酸は所定の異常状態にある異常細胞に含まれる。また、標識物質は異常細胞を標識する第1標識物質と、正常細胞を標識する第2標識物質と、を含む。つまり、第1標識物質は、異常細胞に特異的な核酸（標的核酸）を標識する。一方、第2標識物質は、正常細胞に特異的な核酸を標識する。情報処理部36は、検査領域Rにおいて、第1標識物質に起因する標識強度に基づいて陽性領域Rpを特定し、第2標識物質に起因する標識強度に基づいて陰性領域Rnを特定する。したがって、陽性領域Rpと陰性領域Rnとの比率は、異常細胞と正常細胞との比率に相当する。なお、比率は、正常細胞および異常細胞の面積比であってもよいし、細胞数の比であってもよい。また、比率の算出には、全細胞に対する異常細胞の割合を算出することも含まれる。

20

【0042】

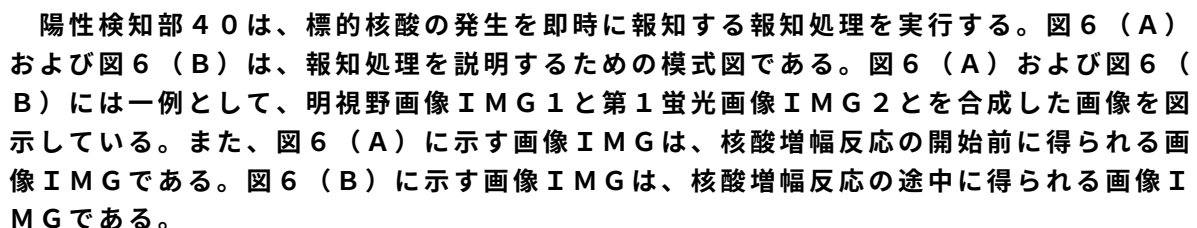
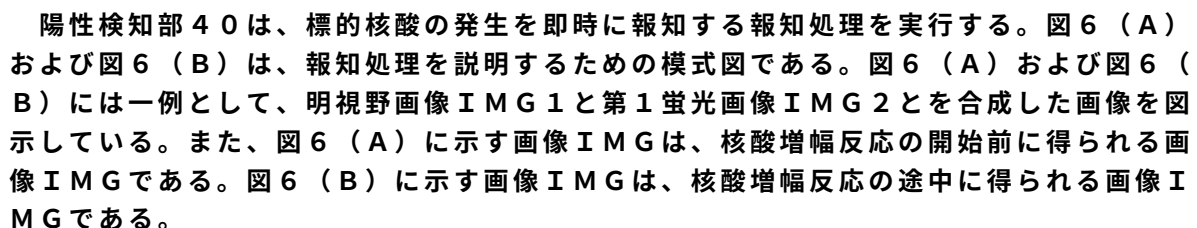
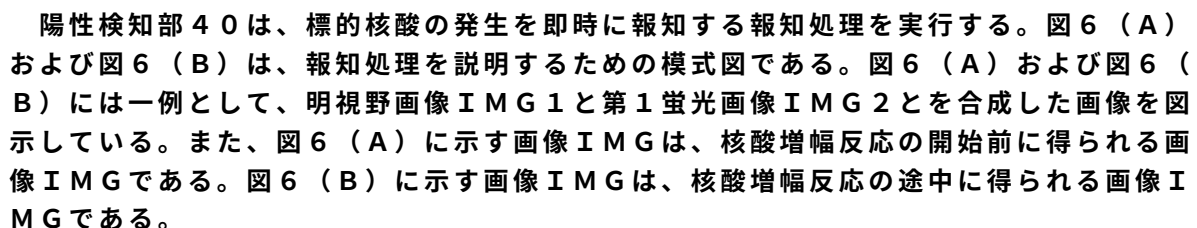
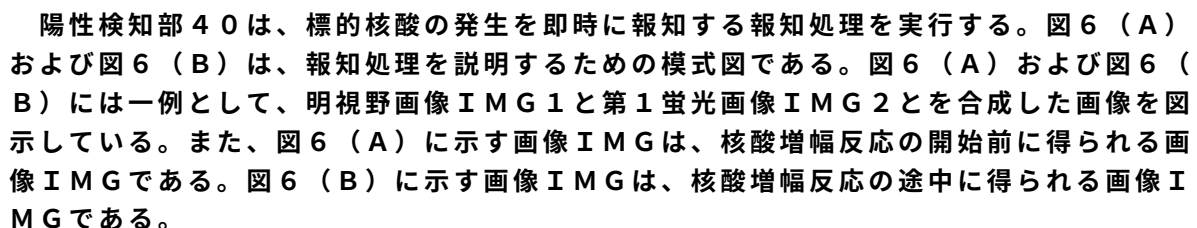
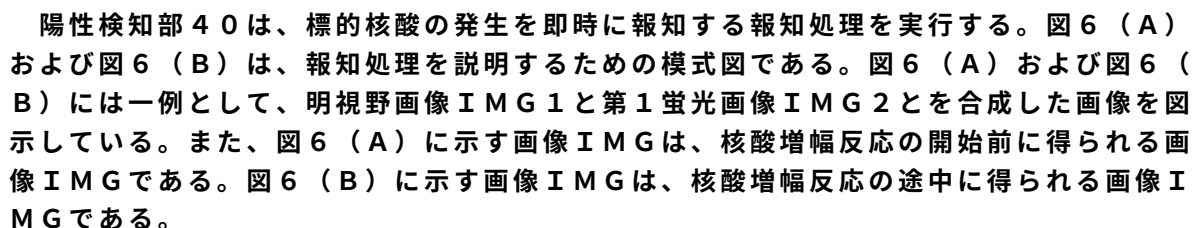
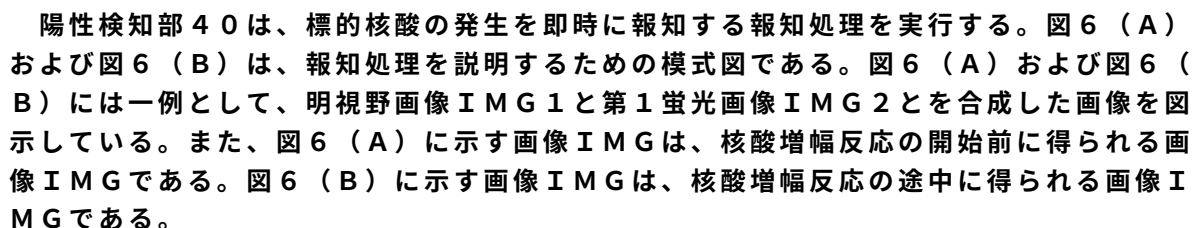
情報処理部36は、検体の状態に関する情報である比率情報を判定部38に送る。標的核酸が所定の疾病に関連する核酸である場合、判定部38は比率に基づいて疾病の重篤度を判定することができる。例えば、判定部38は、比率と疾病の重篤度とを関連付けた変換テーブルを予め保持しており、この変換テーブルを用いて重篤度を決定することができる。変換テーブルは、設計者による実験やシミュレーションに基づき適宜設定することができる。判定部38は、重篤度の判定結果を表示部12に表示する。これにより、核酸検査装置1の使用者は、疾病の重篤度を客観的に把握することができる。

30

【0043】

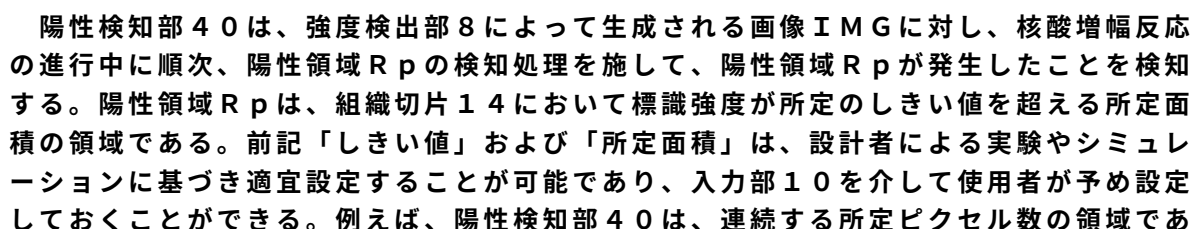
なお、判定部38は、疾病の重篤度以外の状態判定を実施してもよい。また、情報処理部36は、比率情報そのものを表示部12に表示してもよい。この場合、標的核酸が疾病に関連する核酸であれば、使用者は比率から疾病の重篤度を推定することができる。また、標的核酸が疾病以外の状態に関連する核酸であれば、使用者は比率から当該状態の進行度等を推定することができる。

【0044】

陽性検知部40は、標的核酸の発生を即時に報知する報知処理を実行する。図6(A)および図6(B)は、報知処理を説明するための模式図である。図6(A)および図6(B)には一例として、明視野画像1と第1蛍光画像2とを合成した画像を図示している。また、図6(A)に示す画像は、核酸増幅反応の開始前に得られる画像である。図6(B)に示す画像は、核酸増幅反応の途中に得られる画像である。

40

【0045】

陽性検知部40は、強度検出部8によって生成される画像に対し、核酸増幅反応の進行中に順次、陽性領域Rpの検知処理を施して、陽性領域Rpが発生したことを検知する。陽性領域Rpは、組織切片14において標識強度が所定のしきい値を超える所定面積の領域である。前記「しきい値」および「所定面積」は、設計者による実験やシミュレーションに基づき適宜設定することが可能であり、入力部10を介して使用者が予め設定しておくことができる。例えば、陽性検知部40は、連続する所定ピクセル数の領域であ

50

って平均輝度がしきい値を超える領域を画像 I M G 中に検知したとき、陽性領域 R p が発生したと判断する。

【 0 0 4 6 】

陽性検知部 4 0 は、陽性領域 R p の発生を検知すると報知指示信号を表示部 1 2 に送る。図 6 (A) および図 6 (B) に示す画像 I M G では、左から順に第 1 検体の組織切片 1 4、第 2 検体の組織切片 1 4、ポジティブコントロールの組織切片 1 4、ネガティブコントロールの組織切片 1 4 が並べられている。図 6 (B) に示すように、第 1 検体、第 2 検体およびポジティブコントロールには、核酸増幅反応の途中で陽性領域 R p が発生している。このタイミングで、陽性検知部 4 0 は報知指示信号を表示部 1 2 に送る。表示部 1 2 は、報知指示信号を受領すると音や光等を発する。これにより、核酸増幅反応の進行中に、つまり核酸増幅反応の終了前に、核酸検査装置 1 の使用者に陽性領域 R p の発生を報知することができる。したがって、使用者は、より早期に病巣の部位等を把握することができる。

10

【 0 0 4 7 】

また、第 1 検体の組織切片 1 4 にはポジティブコントロールと同じ位置に陽性領域 R p が発生している。一方、第 2 検体の組織切片 1 4 にはポジティブコントロールと異なる位置に陽性領域 R p が発生している。これにより、予期していなかった位置に病巣が存在することを早期に把握することができる。また、スライドガラス 1 6 のフロスト部には、各組織切片 1 4 に対応する二次元コード 4 2 が印字されている。制御ユニット 6 は、二次元コード 4 2 に基づいて、記憶部 3 0 に保存されている各組織切片 1 4 の画像 I M G どうしを紐付けることができる。

20

【 0 0 4 8 】

図 7 は、実施の形態に係る核酸検査装置 1 が実行する制御の流れを説明するための模式図である。まず、使用者によって入力部 1 0 を介して通知条件が設定される (S 2 0 1)。次に、核酸増幅反応が開始される (S 2 0 2)。核酸増幅反応の間、強度検出部 8 によって繰り返し組織切片 1 4 の画像が生成される (S 2 0 3)。核酸増幅反応の間に通知条件が達成されたことを陽性検知部 4 0 が検知すると (S 2 0 4)、表示部 1 2 が音や光等を発して使用者に通知する (S 2 0 5)。

【 0 0 4 9 】

核酸増幅反応が終了すると (S 2 0 6)、領域設定部 3 2 により、または使用者による入力部 1 0 からの入力により、核酸増幅反応の終了後に得られる画像 I M G に検査領域 R が設定される (S 2 0 7)。検査領域 R が設定されると、情報処理部 3 6 によって各画像 I M G における検査領域 R の輝度が計測される (S 2 0 8)。そして、計測した輝度値に基づいて増幅曲線が作成され、標的核酸が定量される (S 2 0 9)。

30

【 0 0 5 0 】

また、検査領域 R が設定されると、情報処理部 3 6 によって検査領域 R における陽性領域 R p と陰性領域 R n との比率が算出される (S 2 1 0)。そして、算出された比率に基づいて、判定部 3 8 により疾病の重篤度が判定される (S 2 1 1)。ステップ S 2 0 9 で得られた標的核酸の量、ステップ S 2 1 1 で得られる重篤度およびステップ S 2 0 5 で実施される通知は、疾病の診断に利用することができる (S 2 1 2)。

40

【 0 0 5 1 】

以上説明したように、本実施の形態に係る核酸検査装置 1 は、標的核酸の標識物質および標的核酸の増幅試薬を含有する溶液が添加された組織切片 1 4 が載置されるステージ 2 と、ステージ 2 上の組織切片 1 4 の温度を調節する温度調節部 4 と、組織切片 1 4 における核酸増幅反応を進行させるよう温度調節部 4 を制御する温度制御部 2 8 と、組織切片 1 4 の標識強度を経時的に検出する強度検出部 8 と、強度検出部 8 が生成する検出情報を記憶する記憶部 3 0 と、を備える。これにより、核酸の位置情報を保持しながら核酸の増幅をリアルタイムに検出することができる。よって、核酸検査においてより多くの情報を取得可能である。

【 0 0 5 2 】

50

また、本実施の形態の核酸検査装置 1 は、組織切片 1 4 の形状および標識強度の少なくとも一方に基づいて、組織切片 1 4 中に検査領域 R を定める領域設定部 3 2 と、検査領域 R における標的核酸に関する情報を生成する情報処理部 3 6 と、を備える。また、核酸検査装置 1 は、使用者による組織切片 1 4 中の検査領域 R の指定を受け付ける受付部 3 4 と、検査領域 R における標的核酸に関する情報を生成する情報処理部 3 6 と、を備える。

【0053】

また、本実施の形態の情報処理部 3 6 は、検査領域 R の標識強度の経時変化を導出し、経時変化から検査領域 R における標的核酸の量を算出する。また、情報処理部 3 6 は、検査領域 R における、標識強度が所定のしきい値以上である陽性領域 R p と、標識強度がしきい値未満である陰性領域 R n との比率を算出する。また、標的核酸は、所定の異常状態にある細胞に含まれ、標識物質は、所定の異常細胞を標識する第 1 標識物質と、正常細胞を標識する第 2 標識物質と、を含む。そして、情報処理部 3 6 は、第 1 標識物質に起因する標識強度に基づいて陽性領域 R p を特定し、第 2 標識物質に起因する標識強度に基づいて陰性領域 R n を特定する。また、標的核酸は所定の疾病に関連する核酸であり、核酸検査装置 1 は、比率に基づいて疾病の重篤度を判定する判定部 3 8 を備える。

【0054】

また、核酸検査装置 1 は、核酸増幅反応の進行中に標識強度が所定のしきい値を超える所定面積の領域が発生したことを検知する陽性検知部 4 0 を備える。また、核酸検査装置 1 は、情報処理部 3 6 が生成する情報を表示する表示部 1 2 を備える。

【0055】

以上の構成により、標的核酸の発現位置と発現量とを取得することができる。また、疾病の重篤度を把握することができる。また、核酸増幅反応が終了する前に標的核酸の有無を知ることができる。よって、より多くの情報を取得可能な核酸検査技術を提供することができる。

【0056】

以上、本開示の実施の形態について詳細に説明した。前述した実施の形態は、本開示を実施するにあたっての具体例を示したものにすぎない。実施の形態の内容は、本開示の技術的範囲を限定するものではなく、請求の範囲に規定された発明の思想を逸脱しない範囲において、構成要素の変更、追加、削除等の多くの設計変更が可能である。設計変更が加えられた新たな実施の形態は、組み合わせられる実施の形態および変形それぞれの効果をあわせもつ。前述の実施の形態では、このような設計変更が可能な内容に関して、「本実施の形態の」、「本実施の形態では」等の表記を付して強調しているが、そのような表記のない内容でも設計変更が許容される。以上の構成要素の任意の組み合わせも、本開示の態様として有効である。図面の断面に付したハッチングは、ハッチングを付した対象の材質を限定するものではない。

【0057】

なお、実施の形態は、以下に記載する項目によって特定されてもよい。

〔項目 1〕

標的核酸の標識物質および標的核酸の増幅試薬を含有する溶液が添加された組織切片（1 4）の温度を調節して組織切片（1 4）における核酸増幅反応を進行させ、組織切片（1 4）の標識強度を経時的に検出し、検出した情報を記憶することを含む核酸検査方法。

〔産業上の利用可能性〕

【0058】

本開示は、核酸検査装置および核酸検査方法に利用することができる。

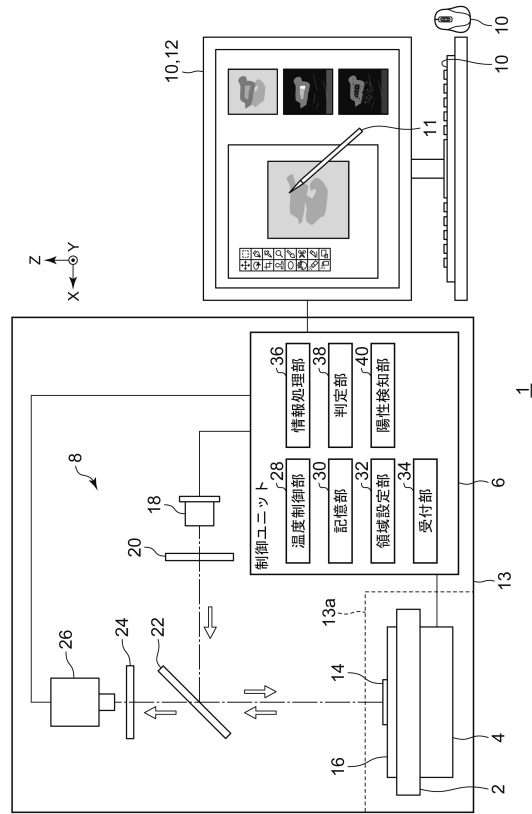
〔符号の説明〕

【0059】

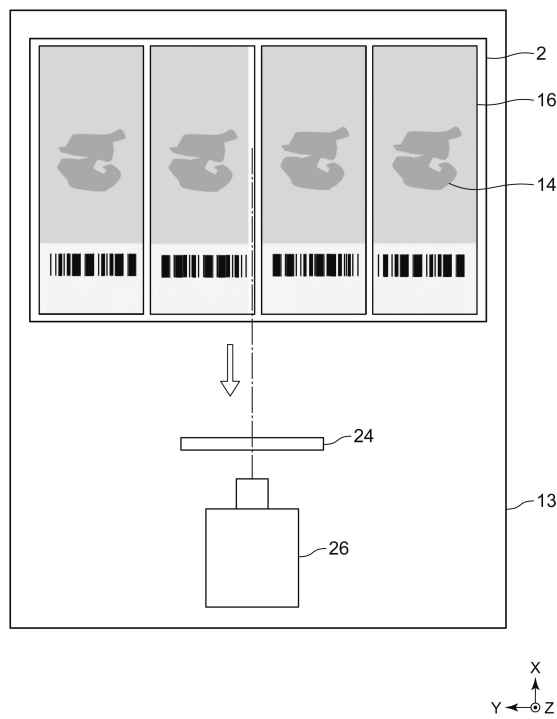
1 核酸検査装置、 2 ステージ、 4 温度調節部、 8 強度検出部、 10 入力部、 12 表示部、 14 組織切片、 28 温度制御部、 30 記憶部、 32 領域設定部、 34 受付部、 36 情報処理部、 38 判定部、 40 陽性検知部。

【図面】

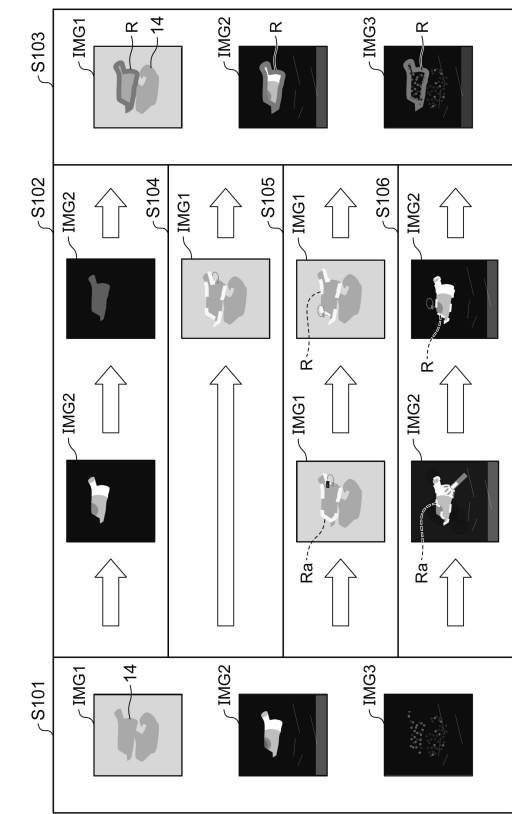
【図 1】



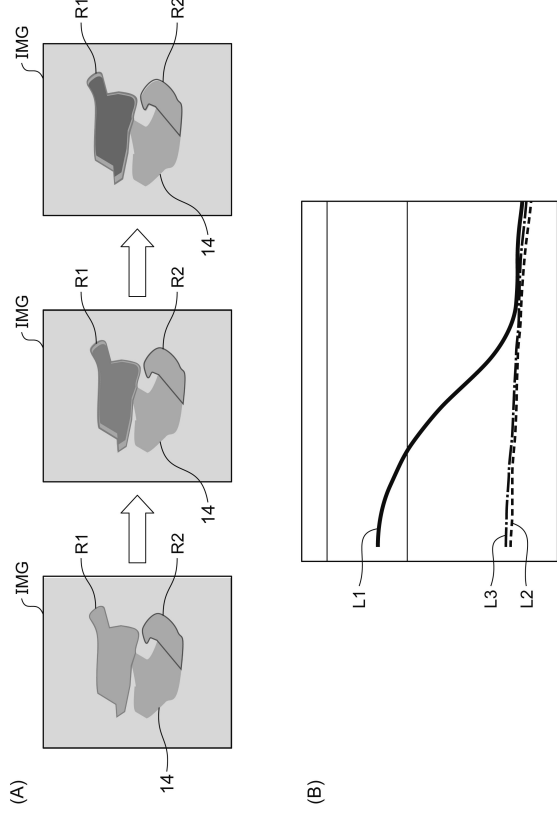
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

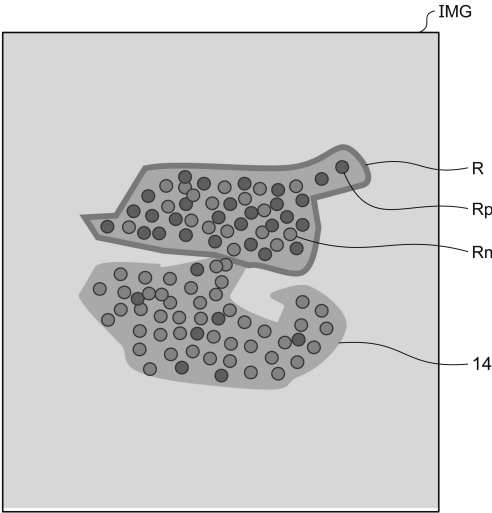
20

30

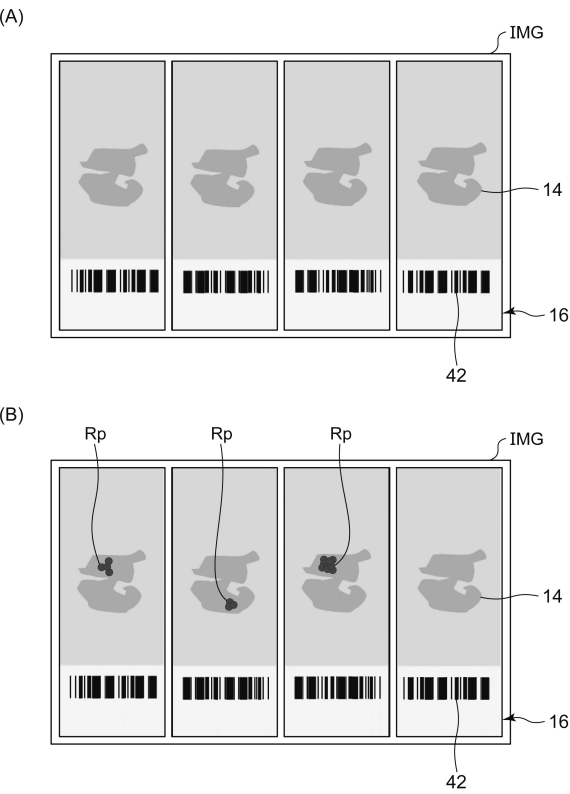
40

50

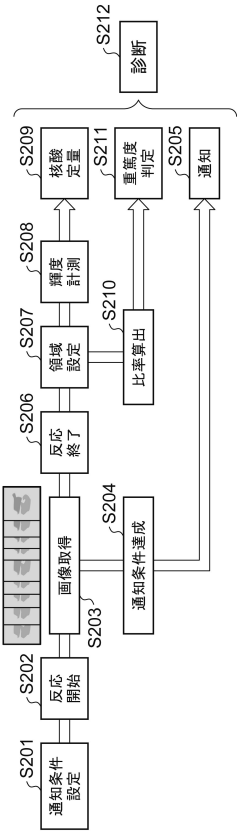
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

愛媛県東温市南方2131番地1 PHC株式会社内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献

特開2009-207392(JP, A)

国際公開第1997/032044(WO, A1)

青柳和子, 「In situ PCR法の遺伝子への応用」, 遺伝子医学, 1998年04月01日, Vol.2, No.2, pp.282-286

COMAR, M., et al., "Direct in situ PCR allows rapid and sensitive detection of high risk human papillomavirus in cytologic specimens and formalin-fixed paraffin tissues by fluorescent labelling.", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, 2001年, Vol.18, No.1, pp.181-185

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12M 1/00-3/10

C12Q 1/00-3/00

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)