

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第4965651号  
(P4965651)

(45) 発行日 平成24年7月4日 (2012.7.4)

(24) 登録日 平成24年4月6日 (2012.4.6)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 12 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2009-518760 (P2009-518760)	(73) 特許権者	501205108
(86) (22) 出願日	平成19年7月5日 (2007.7.5)		エフ ホフマンーラ ロッシュ アクチェ
(65) 公表番号	特表2009-543547 (P2009-543547A)		ン ゲゼルシャフト
(43) 公表日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		スイス連邦、ツェーハー ー 4 0 7 0 パー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/005953		ゼル、グレンツアッハーシュトラーセ 1
(87) 国際公開番号	W02008/006502		2 4
(87) 国際公開日	平成20年1月17日 (2008.1.17)	(74) 代理人	100098464
審査請求日	平成22年4月9日 (2010.4.9)		弁理士 河村 洸
(31) 優先権主張番号	06014680.0	(74) 代理人	100149630
(32) 優先日	平成18年7月14日 (2006.7.14)		弁理士 藤森 洋介
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100154449
			弁理士 谷 征史
		(72) 発明者	ザロフィム、エマード
			スイス連邦、ツェーハー ー 6 3 3 2 ハー
			ゲンドルン、ホフマッ 7 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸増幅装置を用いた核酸含有液体サンプル分析用使い捨て装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸増幅技術による核酸含有液体サンプル分析用核酸増幅装置中で作動される使い捨てサンプル保持および処理装置（1）であって、

該装置（1）が、装置（1）内の核酸増幅を用いることにより、核酸の捕捉、増幅および検出を行う室（15、16）および、少なくとも第1および第2の経路を有する複数の経路（44）からなる流体装置であり、

前記装置（1）が、分析されるサンプルの成分の固相抽出用の固相（14）を含む結合室（15）を含み、また

前記装置（1）が、流体経路（2）によって前記結合室（15）に接続される増幅室（16）を含み、

前記装置（1）が、剛直胴体（42）を含み、また

少なくとも1つの経路（44）、前記結合室（15）および前記増幅室（16）が、前記胴体（42）の側面（50）上に置かれ、

該側面（50）上に経路（44）、前記結合室（15）または前記増幅室（16）が置かれ、少なくとも1つの壁（41）によって覆われており、

前記結合室（15）から入力ポートに通じる前記第1の経路が、該第1の経路を閉止して該第1の経路を経由する液体またはガスの流れを遮断する該第1の経路の1つの部分であって、該第1の経路の1つの部分を該第1の経路の相対する壁でシールするように、該第1の経路を幅方向に変形され得る第1のシールポイントを含んでおり、

10

20

前記増幅室（１６）から前記結合室（１５）に通じる前記第２の経路が、該第２の経路を閉止して該第２の経路を経由する液体またはガスの流れを遮断する該第２の経路の１つの部分であって、該第２の経路の１つの部分を該第２の経路の相対する壁でシールするように、該第２の経路を幅方向に変形され得る第２のシールポイントを含んでおり、

前記装置（１）が、前記核酸増幅装置中で作動しているときには、前記側面（５０）は、垂直であり、

前記装置（１）が、垂直な面で方向づけられた前記側面（５０）を有する前記核酸増幅装置中で操作されるように設計されていることを特徴とし、また

前記装置（１）が、流体経路（４４）により、前記装置（１）の少なくとも１つの室に、接続される少なくとも１つの流体接触面を含み、そこでは、前記装置（１）が、前記核酸増幅装置中で操作されるときに、前記胴体（４２）の上面および／または底面（５２、５３）に置かれることを特徴とする装置。

10

【請求項２】

前記経路（４４）、前記結合室（１５）および前記増幅室（１６）が、前記胴体（４２）中に置かれる空隙によって前記胴体（４２）の前記側面（５０）上に形成され、前記空隙が、前記少なくとも１つの壁（４１）により覆われることを特徴とする請求項１記載の装置（１）。

【請求項３】

前記流体接触面が、前記核酸増幅装置の流体供給手段および／または流体除去手段と接触するようにされ、前記流体供給手段および／または流体除去手段が、流れの垂直方向にある流体を、前記装置（１）に供給するために、および／または前記装置（１）から除去するために、適合されることを特徴とする請求項１または２記載の装置（１）。

20

【請求項４】

前記装置（１）の少なくとも１つの流体供給接触面（８、１０）が、組み立てられ、その結果、該装置（１）の上から下向き方向に、流体を、該装置（１）に供給できることを特徴とする請求項３記載の装置（１）。

【請求項５】

空隙を形成するための構造化された表面を有する装置胴体（４２）と、構造化された表面を覆いそれにより前記装置（１）の側面（５０）を覆う壁（４１）を形成するシールカバーとを備える装置であって、

30

前記シールカバー（４１）の第１層は、サンプル液体に対して不活性な材料で作られており、

前記シールカバー（４１）の第２層は、金属で作られていることを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の装置（１）。

【請求項６】

前記増幅室（１６）が、前記核酸増幅装置中で操作されるときに、前記核酸分析装置の温度制御手段と、前記装置（１）の前記増幅室（１６）中でサンプル加熱および／または冷却用増幅室（１６）との間の、直接または間接の熱接触を提供するために、良好な熱伝導度を有する熱伝導壁（４１）によって、一方の側で覆われていることを特徴とする請求項１～５のいずれかに記載の装置（１）。

40

【請求項７】

前記温度制御手段と前記増幅室（１６）の間の熱流の有効な方向が、水平でありかつ前記熱伝導壁（４１）の平面に対して垂直であることを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の装置（１）。

【請求項８】

前記増幅室（１６）の透明な光学測定窓および前記熱伝導壁（４１）が、前記増幅室（１６）の反対側に配置されていることを特徴とする請求項５～７のいずれかに記載の装置（１）。

【請求項９】

液体を前記装置（１）中に移送するためのサンプル移送チップ（１２）を受け取るため

50

に適合した開口部を有するサンプル調製室（３）を含んでいることを特徴とする請求項１～８のいずれかに記載の装置（１）。

【請求項１０】

前記装置（１）が、さらに、前記装置（１）の室から前記装置（１）の出口ポート（２４）もしくは排出口（４５）まで通じる、または第１室（３）から第２室（１６）に通じる第３の経路（４４）を備えており、前記胴体（４２）が、前記第３の経路を閉止して該第３の経路を経由する液体またはガスの流れを遮断する該第３の経路の１つの部分であって、該第３の経路の１つの部分を該第３の経路の相対する壁でシールするように、該第３の経路を幅方向に変形され得る第３のシールポイント（６、７）を含んでいることを特徴とする請求項１～９のいずれかに記載の装置（１）。

10

【請求項１１】

前記装置（１）を用いて行われる工程中で生じる廃棄物を回収するために前記装置（１）と一体化された少なくとも１つの廃棄室（４６）を含み、そこでは、前記廃棄室（４６）は、前記胴体（４２）の側面（５０）上に置かれ、また前記胴体（４２）の凹所である空隙によって形成されており、しかも前記側面（５０）は、壁（４１）によって覆われ、壁（４１）は、前記装置（１）が前記核酸増幅装置で作動されるときには垂直であることを特徴とする請求項１～１０のいずれかに記載の装置（１）。

【請求項１２】

請求項１～１１のいずれかに記載の装置（１）および該装置（１）を分析するための核酸増幅装置を備えるシステム。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、核酸増幅技術、特にポリメラーゼ連鎖反応技術（ＰＣＲ）分析、詳細には、定量的リアルタイムＰＣＲ（TaqMan-PCRまたはハイブリッド形成プローブＰＣＲ）分析による核酸含有液体サンプル分析用核酸増幅装置中で作動される使い捨てサンプル保持および処理装置に関する。

【背景技術】

【０００２】

そのような装置が、米国特許第６５５１８４１号明細書に開示されている。公知の装置は、シリコンまたはポリマー材料の基材からなり、その中では複数の経路と室が、形成されている。基材は、基材とカバーの間で複数の経路と室をシールするガラス製またはプラスチック製のカバーによって覆われている。装置は、水平方向で使用されるように設計されている。

30

【０００３】

米国特許第５５８７１２８号明細書は、チップと、一体化された装置の間に接触面を含むＰＣＲ分析用の使い捨て装置を開示している。チップは、流体ポートを含む空隙中に液体を排出する働きをしている。

【０００４】

米国特許第６６６４１０４号明細書では、サンプルの調製、増幅と検出との一体化されたプロセス用に使用される一体化された使い捨て装置が開示されている。該使い捨て装置は、サンプルをピペットで取ることが可能な開口部を有する。反応室は、カバーによって閉じなければならない。

40

【０００５】

欧州特許第０８８４１０４号明細書は、容器とチップのセットを記載しているが、この容器は、汚染を避ける事に関しては、あまり有利ではない。

【０００６】

製造業者のIquum社からは、全ての必要な検査工程を自動的に行う携帯型分析器における試薬調製、ターゲット濃縮、阻害剤除去、核酸抽出、増幅およびリアルタイムの検出を包含する核酸テストプロセスのために必要な全検査試薬を含むサンプル容器として、可携

50

性チューブを含む商標名Liatと命名された分子テスト診断システムが、公知となっている。検査試薬は、垂直ラインに配置された剥離可能シールにより分離されたチューブ部分に予め詰められている。多重サンプル処理アクチュエータは、チューブを押し付け、チューブ部分から試薬を選択的に放出しかつ1つの部分から他の部分にサンプルを移動させるために必要である。チューブシステムは、一度サンプルが、導入されかつチューブが被せられると、該チューブが、全てのテスト目的に対して閉じられたままであるという意味において、閉じられた閉鎖システムアプローチである。二次汚染を避けることに関し、また生物学的有害な廃棄物が封じられたままである使用後チューブの安全な使い捨てにより生物学的有害なリスクを削減することに関して、この事は、有利であるが、プロセス中、サンプル試薬も、反応混合物も、添加できず、また除去できないということが柔軟性を欠き、不利である。

10

#### 【0007】

本発明の技術分野は、核酸増幅技術を用いてサンプルを分析するために使用される使い捨て装置に関するものである。分析の目的は、サンプル中の検体濃度の検出（検体の有無）および/または定量化である。本発明においては、検体は、核酸：RNAまたはDNAまたはそれらの誘導体である。記述された誘導体（核酸）は、NA増幅法（たとえば、DNA-ポリメラーゼ、トランスクリプターゼ、リバーストランスクリプターゼなど）に対して直接にまたは間接に（たとえば、化学的改質後に）アクセス可能な分子を含む。標的検体は、たとえば、遺伝子検査用のたとえば、生物学的起源を有する遺伝子材料であっても良く、感染性病気の場合には、検体は、ウイルスまたはバクテリアからの核酸材料であ

20

#### 【0008】

欧州特許出願公開第1179585号明細書は、斜め方向にテスト機器中に手動で置かれる核酸テスト用に一体化された流体操作カートリッジを開示している。該カートリッジは、カートリッジの側面に対して垂直な方向で、流体サンプルをカートリッジ中に導入するための流体接触面（サンプルポート）を含んでいる。該サンプルポートは、カートリッジ中に手動でサンプルを導入するように設計されている。該カートリッジは、自動化された取り扱いおよび操作をするように設計されているわけでもなく、サンプルをカートリッジ中に、自動的にサンプル導入するように設計されているわけでもない。さらに、テスト機器中でのカートリッジの処理は、使用位置において、カートリッジの傾斜方向による大きな空間を必要とする。製造中に前もって搭載された検体特異性試薬、装置中での流体処理用圧力アクチュエータおよび処理液体を有する供給室を含むカートリッジは、高度に集積され、また複雑であり、そのために、カートリッジをむしろ高コストにしている。

30

#### 【0009】

PCRのような核酸増幅技術でたくさんの流体サンプルを分析するためには、分析の速度とコストが、サンプル保持および処理装置の重要な態様である。したがって、本発明の目的は、低コストで都合良く短時間で、流体サンプル分析に適した使い捨てサンプル保持および処理装置を提供することである。本発明の先行技術に対する優れた点は、特に使い捨て装置中への挿入および分析装置中での使い捨て装置の移送および保持、使い捨て装置により必要とされる分析装置中での空間、生物学的有害リスクの排除および二次汚染と使い捨て装置中での機能の一体化を含む流体処理の態様に関して、自動処理装置中での容易な製造および容易な使用の態様である。

40

#### 【発明の開示】

#### 【0010】

本発明によれば、これらの目的は、核酸増幅技術による核酸含有液体サンプル分析用核酸増幅装置中で作動されるよう寸法合わせされた使い捨てサンプル保持および処理装置であって、

該装置が、装置内の核酸増幅を用いることにより、核酸増幅分析の捕捉、増幅および検出を行う室および、少なくとも第1および第2の経路を有する複数の経路からなる流体装

50

置であり、

前記装置が、分析されるサンプルの成分の固相抽出用の固相を含む結合室を含み、また

前記装置が、流体経路によって前記結合室に接続される増幅室を含み、

前記装置が、剛直胴体を含み、また

少なくとも1つの経路、前記結合室および前記増幅室が、前記胴体の側面上に置かれ、

該側面上に経路、前記結合室または前記増幅室が置かれ、少なくとも1つの壁によって覆われており、

前記結合室から入力ポートに通じる前記第1の経路が、該第1の経路を閉止して該第1の経路を経由する液体またはガスの流れを遮断する該第1の経路の1つの部分であって、該第1の経路の1つの部分を該第1の経路の相対する壁でシールするように、該第1の経路を幅方向に変形され得る第1のシールポイントを含んでおり、

10

前記増幅室から前記結合室に通じる前記第2の経路が、該第2の経路を閉止して該第2の経路を経由する液体またはガスの流れを遮断する該第2の経路の1つの部分であって、該第2の経路の1つの部分を該第2の経路の相対する壁でシールするように、該第2の経路を幅方向に変形され得る第2のシールポイントを含んでおり、

前記装置が、前記核酸増幅装置中で作動しているときには、前記側面は、垂直であり、

前記装置が、垂直な面で方向づけられた前記側面を有する前記核酸増幅装置中で操作されるように設計されていることを特徴とし、また

前記装置が、流体経路により、前記装置の少なくとも1つの室に、接続される少なくとも1つの流体接触面を含み、そこでは、該流体接触面が、前記装置が、前記核酸増幅装置中で操作されるときに、前記胴体の上面および/または底面に置かれることを特徴とする装置により、解決される。

20

#### 【0011】

一般に、核酸増幅技術は、対応する核酸増幅装置の異なった室または異なった位置における次のサンプル処理を必要とする。US 6 551 841 B1中に提示されているように、サンプルが処理装置中で操作されるときには、水平面である主面を持つ装置中で、該サンプルが処理される。処理装置中での装置のサポートまたは液体の供給および除去は、このような方法で達成可能であるが、そのような装置の総合的な取り扱いは、困難であり、また特にサンプルの核酸増幅検出用工程の多くの工程を実現する自動装置中では、場所と時間を浪費する。装置が作動されている分析装置の相互作用手段は、複数の他の装置と同時に分け合うことが出来ない。というのは、それらの装置は、分析中に該装置に取り付けなければならないからである。

30

#### 【0012】

対照的に、特に本発明による使い捨て装置に、本発明の好ましい実施形態による一体化された生物化学的診断機能が設けられているときには、本発明による使い捨て装置の取り扱いは、分析装置において、より簡単でかつ場所と時間の浪費がより少ない。装置を容器またはシート中に挿入しかつサンプル流体などの流体を垂直方向にある装置中に搭載する取り扱いおよび操作手段を有する核酸増幅装置により、簡易な自動化手段で、本発明による使い捨て装置を取り扱いかつ操作できる。これにより、信頼性のある自動化された操作、コストを抑えた高自動化された処理能力および空間を抑えたデザインを達成できる。前記装置は、好ましくは、高度に一体化されたものではなく、かつ複雑ではなく、好ましくは、処理液を有する装置または供給室中に流体を処理するための製造または圧力アクチュエータ中にあらかじめ搭載された検体特異性試薬を含んでいないが、使用に際して装置に選択された試薬および流体を供給し、かつ生産にあたり、装置を安価にする処理用のインターフェースを供給するための流体ポートおよび多くの異なる分析に使用可能な遺伝子装置を含んでいる。高精度のインターフェースと分析装置の作動手段の情報資源を、遺伝子タイプの装置に分けることができる。

40

#### 【0013】

本願に記述した使い捨て装置と組み合わせて使用するのに適した核酸分析装置の有利な特性および実施形態に関しては、タイトル「核酸分析実行装置」、欧州特許出願公開第0

50

6014681. 8号明細書に対応する代理人事件番号RDG167/00/WOである、同一出願人の同時に出願された国際特許出願を参照し、その出願の開示は、参照によってここに組み込まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の更なる詳細および利点を、添付した図面を参照して、例示の実施形態に基づいて以下に例示する。以下のことは、図面中に図示されている。

【0015】

図1中に示された手法は、本発明による使い捨て装置の好ましい実施形態により行われる核酸(NA)を含むサンプルの核酸テスト(NAT)用の典型的な手法である。生物学的サンプル中のNAを分析する大抵のNA分析(たとえば、PCRを用いた)は、NAの検出反応と干渉しがちな他の成分からNAを分離する必要がある。NAを分離するこの第1の工程は、一般的には、「サンプル調製」と呼ばれている。サンプル調製のための典型的な方法は、技術の状態である。一般的な方法は、NAの固相抽出である。この場合において、NAは、高濃度のカオトロピック塩のもとに、ガラス面に結びつき、一方サンプルからのかく乱材料は、溶液中に残る。

【0016】

NAを固相に結合させた後、固相を洗浄し、固相から残存材料を除去するが、NAは、吸着して残る。固相の洗浄工程後、洗浄緩衝液の阻害特性によっては、洗浄緩衝液を除去しなければならない。そうでなければ、中和するかまたは、非阻害量まで減少させなければならない。この工程後、低濃度塩緩衝液または純粋中に、NAを溶出する(すなわち、固相から溶解する)。この溶出液(純粋のNAを含む)は、一般的には、多くのNA検出化学品/検定、たとえば、PCRまたは他の線形もしくは指数関数的NA増幅および検出法と一致する。

【0017】

サンプル回収工程においては、求めているNAが、存在すると思われる場所で、サンプルを取る。そのようなサンプル材料は、組織、血液、尿、唾液であっても良い。サンプルは、求めている検体の種類に依存している。NAテスト用サンプル取得法は、技術の状態であり、また検体およびサンプルがある場所に依存している。たとえば、血液中のHBV、HCVまたはHIVとしてのウイルスに対するテストの場合には、おおよそ3mlの血液が、テスト対象の人から、血液採取チューブ(たとえば、EDTA抗凝血剤を用いたベクトン・ディッキンソン)中に引き取られる。

【0018】

サンプル、検体および二次的な条件によっては、予備分析工程を行う。自動化されたNA分析を行うことが可能な自動化装置に、サンプルを搭載する前に、サンプルを「予備分析」工程に持っていかなければならない。この予備分析工程は、NA分析器装置上での自動化された工程に、サンプルを準備する全工程を、主としてカバーしている。そのような予備分析工程は、たとえば

組織を、次のNA手法にアクセス可能にするたとえば組織の均質化、  
分離、たとえば、血液からの赤血球の分離、  
懸濁、たとえば、バクテリアおよびウイルスの液体媒体中での懸濁、  
たとえば、遺伝子テスト用のたとえば、植物種子の粉碎、  
を包含することができる。

【0019】

そのような予備処理の手法は、技術水準である。一例としては、ウイルステストのために、サンプル回収のチューブ(たとえば、ベクトン・ディッキンソン)により、引かれた血液サンプルから赤血球室の分離を行うことである。

【0020】

図1のさらなる分析工程は、本発明による使い捨て装置の好ましい実施形態用いた自動核酸増幅および分析装置を用いて行われることが好ましい。この目的のために、自動分析

10

20

30

40

50

装置には、分析に使用される必要な全ての材料が、手動で、または自動で搭載される。機器に搭載されることになっている材料は、分析されるサンプル、単一検定または部分検定に使用され、また使用後廃棄物に放出されるところの分析するための一体化された使い捨て装置、および機器を動かすために使用される、たとえばシステム流体、システム洗浄緩衝液などの試薬およびサンプル調製試薬および検出試薬などの検定に使用される試薬であってもよい。

#### 【 0 0 2 1 】

サンプル回収チューブ中または特定チューブ / 容器中に、サンプルを搭載できる。使い捨て装置は、好ましくは、装置上の棚またはホルダーに搭載される。1つの検定は、1つの使い捨て装置またはいくつかの異なるまたは等しい使い捨て装置を使用してもよい。そのような使い捨て装置は、一体化された使い捨て装置であっても良く、そこでは、1つの検定用に使用される多数の機能が、任意にいくつかのサブユニットを有する1つの使い捨てユニット中に設けられても良く、またはたとえば、必要であれば使い捨てチップを含むいくつかの使い捨て装置（同一でなくてもよい）のセットが設けられる。

#### 【 0 0 2 2 】

たとえばシステム洗浄緩衝液、システム流体などの装置を動かす試薬が、少なくとも1日だけ装置を動かせる量で設けられる。そのような試薬は、希釈剤、消化剤（たとえば、プロテイナーゼ、溶解緩衝液）、コンディショナー（たとえば、結合条件を調節するために）、固相を洗浄するための洗浄緩衝液、標準液（内部制御として、または定量用に）、検出試薬などであっても良い。使い捨て装置それ自体に使用される試薬は、1つの単一使い捨て装置を動かすための全ての試薬を含むことができる試薬キットの形状で、または多くの使い捨て装置を使用できるキット中に搭載可能である。

#### 【 0 0 2 3 】

自動化理由のために、バーコードまたは他の同定手段により、材料を同定できる。人の血漿中のHBVウイルス分析用の自動化NA装置に搭載される材料の例は、次のものを含む：

サンプル：チューブ中に設けられ、バーコードで同定される少なくとも1mlのサンプル（EDTA血漿）。制御理由または特性研究のために、たとえばアクロメトリックス社から提供されるHBVウイルスを用いて、サンプルを固定することができる（たとえば、HBVウイルスの10000コピーで固定された1mlのサンプル）。

試薬：

#### ・システム / 洗浄流体

0.4 ml	オクタノール - 1
0.3 g	トリオン × 100
0.01 g	アジ化ナトリウム
0.1 m モル	ホスファート緩衝液 pH 7.4
1 m モル	塩化ナトリウム
1.000 L	システム / 洗浄流体（水で完了する）

#### ・溶解緩衝液

5.5 モル	グアニジン - ロダニド
0.04 モル	TRIS pH 7.4
9.0 g	トリトン × 100
0.02 モル	1,4 - ジメルカプト - 2,3 - ブタンジオール（DTT）

トレオ

14 mg	ポリA（アメリシャム・サイエンス社）
1.000 L	溶解緩衝液（水で完了する）

#### ・洗浄緩衝液

200 g	水
10 mg	ポリA（アメリシャム・サイエンス社）
0.16 g	トリトン × 100

10

20

30

40

50

- 0.66 mモル TRIS pH 7.5  
 570 g エタノール  
 30 g イソプロパノール  
 約1.0 L 洗浄緩衝液
- ・プロテイナーゼ：ロッシュ・ダイアグノスチック社からの使用された試薬 Taqman (登録商標) HBVキット  
 キット番号 : 03370194 190  
 カセット番号 : 00058005073  
 試薬番号 : 03 359 026 - 102  
 同定剤 : パセ
- ・QS (定量標準液) : ロッシュ・ダイアグノスチック社からの使用された試薬 Taqman (登録商標) HBVキット  
 キット番号 : 03370194 190  
 カセット番号 : 00058005076  
 試薬番号 : 0058004657  
 同定剤 : QS
- ・溶出緩衝液  
 50 mg ドデシル - マルトシド (Fluka、PN44205)  
 3.3 mモル TRIS pH 7.5  
 5 mg ポリA (アメリシャム・サイエンス社)  
 1.000 L 溶出緩衝液 (水で完了する)
- ・マスターミックスA (Mn) : ロッシュ・ダイアグノスチック社からの使用された試薬 Taqman (登録商標) HBVキット  
 キット番号 : 03370194 190  
 カセット番号 : 00058005076  
 試薬番号 : 0058004402  
 同定剤 : Mn
- ・マスターミックスB : ロッシュ・ダイアグノスチック社からの使用された試薬 Taqman (登録商標) HBVキット  
 キット番号 : 03370194 190  
 カセット番号 : 00058005076  
 試薬番号 : 0058004403  
 同定剤 : マスターミックス
- ・組み合わされた溶出マスターミックス (「EMMx」) - 使用前に混合  
 0.5 ml 溶出緩衝液  
 0.15 ml マスターミックスA (Mn)  
 0.35 ml マスターミックスB  
 1 ml EMMx

## 【0024】

図2は、本発明による使い捨て装置1の第1実施形態の斜視図を示す。装置1は、挿入されたガラス繊維フリース14および流体に対する接触面を持った機能的な一体化されたまた小型化されたチップであり、また捕捉、増幅および検出の工程を一体化するために適している。装置1は、流体供給ポート、入り口101、流体除去接触面、出口102、結合室15、増幅および検出室16および経路44を備える。使い捨てサンプル保持および処理装置1は、核酸増幅技術により核酸を含む液体サンプル分析用の核酸増幅装置中に挿入され、かつ作動される (処理される) ように、寸法付けられている。熱伝達壁41および増幅室16上に置かれた光透過壁も、見ることができる。

## 【0025】

装置1は、分析されるサンプルの成分の固定化 / 固相抽出用の固相14を含む結合室15と流体経路2によって結合室15に接続される増幅室16を含む装置内で、核酸増幅分

10

20

30

40

50



析の捕捉、増幅および検出の工程を行うように設計された室および経路 4 4 を含む流体装置である。装置 1 の結合室 1 5、流体経路 2 および増幅室 1 6 は、胴体 4 2 の側面 5 0、すなわち図 1 の裏面に置かれており、しかも経路、結合室 1 5 および増幅室 1 6 が置かれている側面 5 0 は、少なくとも壁 4 1 によって覆われている。装置 1 が、核酸増幅装置中で作動されるときには、図 1 中の重力の方向  $g$  を参照すると、側面 5 0 は、実質的に垂直である。

#### 【0026】

垂直な側面 5 0 は、装置 1 の「主面」と考えても良い。本発明によると、完全な経路 4 4 が、主面に置かれている必要はなく、いくつかの実施形態においては、たとえば、増幅室 1 6 を結合室 1 5 に接続する少なくとも経路 2 が、その面中に配置されていることが、充分であろう。

10

#### 【0027】

図 2 の装置 1 の増幅室 1 6 は、それが、核酸増幅装置中で操作されるときには、片面には、分析信号の光学的検出用の透明な光学測定窓および他面では、核酸分析装置の温度制御手段と装置 1 の増幅室 1 6 中のサンプルの加熱および / または冷却用の増幅室 1 6 との間に、直接または間接の熱接触を提供するための良好な熱伝導度を持った熱伝導壁 4 1 を含んでいる。

#### 【0028】

使い捨て装置 1 は、組み立てられた弾性的入り口 1 0 1 および出口 1 0 2 を有する複合物であっても良く、または熱可塑性弾性隔壁を有する複合物射出成型体であってもよい。その裏面を、ポリプロピレン / アルミニウムフォイルを用いて熱シールしてもよい。使い捨て装置 1 は、低コストで大量生産に用いられるレイアウトを有する。それは、コスト削減とより小さな装置寸法をもたらす核酸増幅装置中における処理の単純な自動化を可能にする。それは、作業フロー、サンプル容積および目標検体に関する種々のプロセスバージョンへの適用に関しては、柔軟であり、高度な分析特性を持ち、処理およびテスト結果の迅速な高信頼性を提供する。それは、装置の信頼性を増加する簡単な自動化に非常に適しており、また顧客による簡単な取り扱いを提供する。それは、内蔵型であるから、二次汚染を抑制し、周囲に対して作動することを抑える。

20

#### 【0029】

図 3 ~ 図 9 は、本発明による使い捨て装置 1 のさらなる実施形態を図示している。使い捨て装置は、挿入されたガラス繊維フリースおよび流体に対する接触面を持った機能が一体化された、または小型化されたチップであり、また溶解、捕捉、増幅および検出の工程を一体化するために適しており、すなわちそれは、「一体型」使い捨て装置である。該使い捨てサンプル保持および処理装置 1 は、核酸増幅技術により核酸を含む液体サンプル分析用の拡散抽出および拡散増幅の両者の工程を行う核酸増幅装置中に挿入されかつ作動されるように、寸法付けられている。

30

#### 【0030】

装置 1 は、分析されるサンプルの成分の固定化用固相を含む結合室 1 5 と流体経路 2 によって結合室 1 5 に接続される増幅室 1 6 を含む装置内で、核酸増幅分析の捕捉、増幅および検出の工程を行うように設計された室および経路を含む流体装置である。装置 1 の結合室 1 5、流体経路 2 および増幅室 1 6 は、胴体 4 2 の側面 5 0 に置かれており、しかも経路、結合室 1 5 および増幅室 1 6 が置かれている側面 5 0 は、壁 4 1 によって覆われている。装置 1 が、核酸増幅装置中で作動されるときには、側面 5 0 は、実質的に垂直面である（図中の重力の方向  $g$  を参照）。垂直側面 5 0 は、装置 1 の「主面」と考えられている。

40

#### 【0031】

本発明の好ましい実施形態によると、装置 1 の経路 4 4、結合室 1 5 および増幅室 1 6 は、胴体 4 2 の側面上の胴体 4 2 中の凹所である空隙によって形成され、また該空隙は、少なくとも 1 つの壁 4 1 によって、覆われている。そのような実施形態は、容易に製造できる。製造プロセスについてより好ましい装置 1 の反対側面上に、空隙を置くことが、好

50

ましい。

【0032】

大抵のまたは全ての空隙が、1つの側面50上に置かれ、すなわち装置1の結合室15、増幅室16を結合室15に接続させる流体経路2および増幅室16は、胴体42の1つの側面50に置かれており、また共通の壁41によりカバーされる最も好ましい実施形態が、図中で示されている。核酸増幅装置中で装置1が作動されるときに、該共通の壁41は、装置1の主面に、および胴体42の垂直表面50である面中に配置されると考えてもよい。

【0033】

本発明の他の好ましい実施形態によると、装置1は、流体経路44により装置1の少なくとも1つの室に、好ましくは、結合室15および増幅室16の1つに接続されている少なくとも1つの流体接触面を含んでおり、そこでは、装置1が、核酸増幅装置中で作動されるとき、流体接触面は、胴体42の上面および/または底面52、53に置かれている。流体接触面は、装置1を用いて行われる分析において、流体の供給または除去のために使用してもよい。流体接触面は、核酸増幅装置の流体供給手段および/または流体除去手段によって接触されることが好ましく、そこでは、流体供給手段および/または流体除去手段が、流れの垂直方向で、装置1に流体を供給し、および/または装置1から流体を除去するために適合される。流体は、ガスまたは液体であってもよく、該液体は、たとえば、サンプルまたは試薬であっても良い。好ましい実施形態によれば、装置1は、該装置1へのサンプル供給用第1接触面および装置1への試薬供給用第2接触面の少なくとも2つの流体供給接触面を含む。

【0034】

装置中での装置1の容易な作動のために界面を作る際には、流体の供給は、流れの下向き方向で装置1の上面52でなされ、流体の除去は、底面でなされることが、好ましい。一般的には、装置1の少なくとも1つの流体供給接触面8、10が作られるとき、装置1の上から下向き方向に、装置1に流体を供給できることが、好ましい。

【0035】

装置1の個々の構成要素を、次に記載する。

【0036】

一体化された使い捨て装置1は、核酸テスト(NAT)を行う装置である。該一体化された使い捨て装置1は、NAT用に必要な多数の手法を行うために必要な多数の一体化された要素を含んでいる。そのような機能は、たとえば、材料の溶解用室、希釈および混合手段、培養工程を行う手段、固相14吸着用手段、流体移送用手段および/または、増幅および/または検出用手段である。一体化された使い捨て装置1は、典型的には、装置1の基材を形成する剛直な胴体42から作られており、それは、室、機械的、流体のおよび光学的接触面、およびこの胴体42に接合される第2熱伝導壁41を定める。胴体42は、代表的には、0.5ml~50mlの外部体積を有する。最も好ましくは、2ml~20mlの範囲である。

【0037】

使い捨て装置1は、低コストで大量生産に適用されるレイアウトを有する。それは、コスト削減とより小さな装置寸法に導く核酸増幅装置中での処理の簡単な自動化を可能にする。それは、作業フロー、サンプル容積および目標検体に関する種々のプロセスバージョンへの適用に関しては、柔軟であり、高度な分析特性を持ち、早い処理および信頼性の高いテスト結果を提供する。それは、装置の信頼性を増加する簡易な自動化に非常に適しており、また顧客による簡単な取り扱いを提供する。それは、内蔵型であるから、二次汚染を抑制し、また周囲に対して作動することを抑える。

【0038】

少なくとも1つの壁が、適当な接合技術によって胴体42に接合される。典型的な技術は、超音波接合、熱シール、レーザー溶接および接着である。一体化された使い捨て装置1の他の素子を、胴体42中の適当な開口部中に挿入してもよく、または押し込んでも良

い。使い捨て装置の部品は、2 - 複合物射出成型プロセスで作られても良い。

【0039】

流体移送用経路44および流体収容用室は、胴体42と熱伝導壁41の間に形成される。

【0040】

溶解室3は、一体化された使い捨て装置1内の室であり、また好ましくは少なくとも1つの熱伝導壁を有する。溶解室の体積は、典型的には $50\mu\text{l} \sim 20\text{ml}$ の範囲であり、最も好ましくは、 $100\mu\text{l} \sim 10\text{ml}$ の範囲である。

【0041】

溶解室3は、図2中に示された実施形態に加えて、装置内での核酸分析の溶解工程を行うために適したサンプル調製室である。該サンプル調製室は、液体を装置1中に移送するためのサンプル移送チップ12を受け取るために適合される開口部を備える。好ましい実施形態によると、サンプル調製室3は、胴体42の側面50上に置かれかつ胴体42中の凹所である空隙およびさらに壁41によって覆われる側面50によって形成され、装置1が、核酸増幅装置中で作動されるとき、壁41は、実質的に垂直面となる。したがって、サンプル調製室3の出口は、装置1の「主面」中に置かれても良いし、または装置1の小さな設置面積を達成するために、装置1の主面に平行な面であっても良い。

【0042】

実施に当たって有利である好ましい実施形態によると、サンプル調製室（溶解室3）の体積は、増幅室16の体積よりかなり大きく、重力により、サンプル調製室の下端に維持されまた置かれ、また装置の使用に当たって、装置1の入り口、特にサンプル調製室と装置の出口の間の圧力差による核酸増幅装置中での装置の使用に際して、結合室15、流体経路44および増幅室16を経由して移送されてもよく、また圧力差は、核酸増幅装置によって装置に印加される。

【0043】

圧力差は、空気圧差または水圧差であっても良い。装置1の室または流体経路の入り口側に気圧または過度の圧力を印加することにより、圧力差を装置1に印加しても良い。また、装置1の室または流体経路の外側に、負圧または真空を印加することにより、圧力差を装置1に印加してもよい。

【0044】

システム4を排気する溶解室3は、ガス交換を可能にする周囲と溶解室3の間の流体接続である。システムを排気する溶解室3は、典型的には、 $0.01\text{mm}^2 \sim 10\text{mm}^2$ の、最も好ましくは $0.04\text{mm}^2 \sim 2\text{mm}^2$ の断面を有する経路44からなっている。

【0045】

汚染抑制操作のためには、フィルタ5を排気する溶解室は、システム4を排気する溶解室の流体経路内に置くことができる。そのようなフィルタは、たとえば、汚染抑制使い捨てピペット取得チップから、一般的に公知である。そのようなフィルタは、典型的には、たとえばセルロースなどの多孔質から、または多孔質ポリマーからなっている。典型的なフィルタ面積は、 $1\text{mm}^2 \sim 500\text{mm}^2$ 、最も好ましくは $10\text{mm}^2 \sim 100\text{mm}^2$ の範囲である。

【0046】

排気シールポイント6は、経路のセクションに置かれており、そこでは、経路は、プロセスのある点において、閉じられねばならない。排気シールポイント6は、典型的には、胴体42と熱伝導壁の間で形成される経路のセクションである。排気シールポイント6は、溶解室システム4中に置かれる。

【0047】

閉止シールポイント7は、経路のセクションに置かれており、そこでは、該経路は、プロセスのある点において、閉じられねばならない。該シールポイントは、典型的には、胴体42と熱伝導壁の2層の間で形成される経路のセクションである。閉止シールポイント7は、溶解室3と結合室15の間の流体接続中に置かれる。

## 【 0 0 4 8 】

一般的には、装置 1 の胴体 4 2 が、装置 1 の経路 4 4 近くに置かれているシールポイント 6、7 を含み、経路 4 4 は、装置 1 の室から入り口ポート 8、10、出口ポート 2 4 または装置 1 の排気ポート 4 5 に通じていることが、好ましく、または第 1 室（たとえば溶解室 3）から第 2 室（たとえば、増幅および検出室 1 6）に通じていることが好ましく、そこでは、シールポイント 6、7 近くに置かれている経路 4 4 は、核酸増幅装置のシーラー、たとえば熱的アクチュエータによって（可逆的に、または不可逆的に）シール可能であり、熱的アクチュエータは、たとえば経路を幅で変形しまたそれにより経路の反対壁を共にシールすることにより、該経路 4 4 を経由する液体またはガスの流れを遮断するための該経路 4 4 を閉止するために、線形に作動される加熱ピストンであってもよい。

10

## 【 0 0 4 9 】

開かれた経路 4 4 経由の流れを阻止するために、分析装置の経路シール機、すなわちシーラーにより、経路を熱的にシールすることにより、経路を閉止しても良い。経路を閉止するためには、経路を熱シールしても良い。高温の下では、経路（シールポイント 6 または 7）中のセクションは、圧搾されまたは変形され、また開かれた流路は、共に閉じられかつシールされる。経路シール機は、加熱ピストン（200 と 400 の間、最も好ましくは 250 から 350 の温度に制御される）および該ピストンを、一体化された使い捨て装置 1 上のシールポイント 6、7 に向けて押し付けることが可能なアクチュエータからなっている。作動の距離は、典型的には、0.1 mm ~ 20 mm の範囲であり、より好ましくは、0.2 mm ~ 3 mm の範囲である。使い捨て装置 1 に対して及ぼされる力は、1 N から 100 N の範囲、最も好ましくは 2 N から 20 N の範囲であっても良い。該ピストンは、0.5 mm<sup>2</sup> ~ 10 mm<sup>2</sup> の、最も好ましくは、1 mm<sup>2</sup> ~ 3 mm<sup>2</sup> の活性なシール面積を有してよく、またシールポイントの直径と形状に適合される。

20

## 【 0 0 5 0 】

第 1 流体ポート 8 および第 2 流体ポート 10 は、試薬および選択的プロセスガスが、一体化された使い捨て装置 1 の内側に送られる一体化された使い捨て装置 1 上の接触面である。該流体ポート 8、10 は、好ましくは、弾性体で作られた隔壁である。たとえば、試薬ピペット取得チップ 2 8 などの流体供給装置によって、隔壁を穿刺することができる。弾性体は、10 および 100 ショアの間の、最も好ましくは、30 と 60 ショアの間のショア A 硬度を持っている。隔壁が穿刺される寸法での厚みは、0.4 mm ~ 12 mm の範囲、最も好ましくは 2 mm ~ 8 mm の範囲にすることができる。隔壁の直径は、2 mm ~ 12 mm の範囲、最も好ましくは 3 mm ~ 8 mm の範囲である。

30

## 【 0 0 5 1 】

流体接続 9 は、第 1 流体ポート 8 をスタートして溶解室 3 に通じる経路 4 4 である。流体接続 11 は、第 2 流体ポート 10 をスタートして結合室 15 に通じる経路 4 4 である。逆流、すなわち、流体接続 11 または流体の圧搾を経由して、結合室 15 から流体接続 11 までの液体の流出を避けるためには、経路 4 4 の長さは、短いまたは直接方法を用いるのではなく、たとえば、該経路に、蛇行線を与えることにより、大きくしてもよい。

## 【 0 0 5 2 】

使い捨てサンプルピペット取得チップ 12 は、技術水準である。それは、10 µl ~ 10 ml、より好ましくは、20 µl ~ 5 ml、最も好ましくは、50 µl ~ 3 ml の液体積を保持できる。チップ 12 がサンプルに浸される場所およびサンプルが吸引される場所における開口部の直径は、200 µm ~ 2000 µm、最も好ましくは、400 µm ~ 1000 µm の範囲の開口直径を有する。チップが、チップ把持部に接続される開口直径は、2 mm ~ 20 mm の範囲の直径を持っている。チップ 12 はその外側の上部の領域上では、チップ 12 が胴体 4 2 とのシールゾーン 4 3 を形成するセクションを有してもよい。上端においては、チップ 12 は、チップ把持部に強固に接続可能な接触面を有している。サンプルと試薬の接触により、チップ 12 の材料は、NAT 検定に対して鈍くなり得る。最も好ましい材料は、熱可塑性ポリマーである。最も好ましいポリマーは、ポリエチレンおよびポリプロピレンである。

40

50

## 【 0 0 5 3 】

チップフィルタ 1 3 は、たとえばエアロゾルによるキャリーオーバー (carry-over) を避けるために、チップ 1 2 に一体化しても良い。フィルタ 1 3 は、ろ過または保持によるそのような望まれない質量伝達を阻止するであろう。チップフィルタ 1 3 は、典型的には、チップ 1 2 中に埋め込まれ、また典型的には、円筒のような形状をしている。フィルタの直径は、サンプルピペット取得チップ 1 2 の内壁とフィルタ 1 3 の間に、緊密な取り付けをさせるように選択される。このフィルタ 1 3 用の典型的な材料は、焼結された多孔質の熱可塑性ポリマーであるか、または繊維ベースのフィルタ (たとえばセルロース、ガラスまたはポリマー繊維からの繊維) である。必要な場合には、材料の組み合わせも使用しても良い。

10

## 【 0 0 5 4 】

固相 1 4 は、選択された材料特性を持った材料の部品である。要するに材料特性は、基質から核酸の精製プロセスに使用され得る。材料は、セットされた条件で核酸を、吸着 / 脱着し、それぞれ結合 / 放出できなければならない。周囲の条件を変更することにより、核酸は、選択的に吸着されまたは結合され、それぞれ条件を変更することにより、N A は、脱着されまたは放出される。

## 【 0 0 5 5 】

共通に使用されるシステムは、固相としてシリカを使用し、かつ核酸の吸着のために、核酸は、固相 1 4 に接触し、一方核酸は、高塩濃度の溶液中に溶解される (たとえば、4 モルの塩化グアニジン溶液中)。固相 1 4 上に結合された核酸の脱着のために、低塩含量の溶出緩衝液に、核酸を接触させなければならない。固相の選択、結合および溶出条件は、文献に広く記載されている。

20

## 【 0 0 5 6 】

使い捨て装置 1 中で使用される固相 1 4 の量は、選択された固相 1 4 材料の特定結合能力および適用で使用される必要な結合能力によって定められる。たとえば、 $50 \sim 800 \text{ g/m}^2$  の重さおよび  $100 \mu\text{m} \sim 10 \text{ mm}$  の圧搾されていない厚みを持った、C A S 6 5 9 9 7 - 1 7 - 3 の繊維で作られたガラス繊維フリースを、使用しても良い。最も好ましくは、 $100 \text{ g/m}^2 \sim 400 \text{ g/m}^2$  の重さおよび最も好ましくは、 $200 \mu\text{m} \sim 5 \text{ mm}$  の厚みのものが、使用される。典型的には、 $1 \text{ mm} \sim 20 \text{ mm}$  の直径、最も好ましくは、 $3 \text{ mm} \sim 12 \text{ mm}$  の直径が使用される。しかし、他の材料、たとえば他の形状での焼結された固相を使用しても良い。

30

## 【 0 0 5 7 】

結合室 1 5 は、固相 1 4 の片側に避難し、他の側では、固相 1 4 を経由して、プロセス流体を処理するために、流体接続を提供する。一般的には、結合室 1 5 は、出口と入り口を有しており、また固相 1 4 は、その間に置かれている。入り口および出口の形状は、好ましくは、固相 1 4 中にまたはそこから流体が流れることができるような最適の方法で設計されている。結合室 1 5 は、 $1 \text{ mm} \sim 20 \text{ mm}$ 、より好ましくは、 $2 \text{ mm} \sim 12 \text{ mm}$  の直径および  $0.1 \text{ mm} \sim 10 \text{ mm}$ 、最も好ましくは、 $1 \text{ mm} \sim 5 \text{ mm}$  の範囲の高さを持った種々の形状、たとえば円筒形状を有することができる。したがって、体積は、ほぼ  $5 \mu\text{l} \sim 500 \mu\text{l}$  の範囲であり、また最も好ましくは、 $10 \mu\text{l} \sim 200 \mu\text{l}$  の範囲である。

40

## 【 0 0 5 8 】

増幅および検出室 1 6 は、増幅 / 検出工程を最適に行うように設計されている。P C R の場合には、熱サイクルが必要とされているところでは、少なくとも 1 つの壁が、熱伝導を可能にするべきである。熱伝導壁 4 1 は、好ましくは、装置 1 の「主面」に、すなわち側面 5 0 上に置かれる。一般的には、本発明の好ましい実施形態によると、増幅室 1 6 は、装置が、核酸増幅装置中で作動されるときに、装置の増幅室 1 6 中でのサンプルの加熱および / または冷却を行うために、核酸分析装置の温度制御手段と増幅室 1 6 の間に、直接または間接の熱接触を提供するために、良好な熱伝導性を有する熱伝導壁 4 1 により、一方が覆われている。

50

## 【0059】

他の好ましい実施形態によると、核酸増幅装置の温度制御手段と増幅室16の間の熱流の有効な方向は、熱伝導壁の面に対して水平または垂直であり、すなわち熱流方向は、増幅室16の伝熱およびシールホイルに接触しているヒーター表面に対して垂直である。このことにより、短い距離に亘って大きな表面との良好な熱カップリングが、可能となり、またこれが、装置中での小さな空間のみを必要としている。

## 【0060】

光学的検出が必要とされるところでは、増幅室16の少なくとも1つの壁が、十分な透明性を持ち、すなわち透明な光学測定窓を含んでいる。好ましい実施形態によると、増幅室16の透明な光学測定窓および熱伝導壁41が、増幅室16の反対側に配置されている。図示された実施形態において、増幅室16の光学窓は、表側(図5)にあり、また熱伝導壁41は、裏側(図6)にある。充填/排出それぞれの換気のために、室は、入り口および出口を有している。室は、1つのプロセス工程から他の工程への持ち越しを生じないように設計されている。他の好ましい実施形態によると、透明な光学測定窓は、増幅室16中に設けられ、そこでは、測定窓から核酸増幅装置の光学センサへの測定方向は、水平である。

## 【0061】

強い信号を得るために、光学検出面積(=分析の間に検出器で観察される面積)は、少なくとも $1\text{ mm}^2$ 、より好ましくは、少なくとも $4\text{ mm}^2$ の大きさを有している。最も好ましい範囲は、 $5\text{ mm}^2 \sim 20\text{ mm}^2$ である。特に蛍光測定の場合における大面積観察は、たとえば場合により観察される泡に対して、蛍光測定の感度を低下させる。

## 【0062】

装置1による実施形態の特別な特性は、流路(少なくともいくつかの経路44を含む)は、増幅室16を経由して通過することなく流体が結合室15を去り、装置1の出口に到達可能にする増幅室16のバイパスがまったく無いので、結合室15を経由して通過する全ての流体が、増幅室16を通過するということである。溶出、増幅および検出が、行われる前に、もし増幅室の適当な洗浄が行われれば、この特性は、正確なかつ信頼性のある分析の要求と干渉しないということが、本発明の枠組み中に見出されてきた。

## 【0063】

この増幅室16の代表的な体積は、 $1\text{ }\mu\text{ l} \sim 300\text{ }\mu\text{ l}$ の範囲であり、最も好ましくは、 $5\text{ }\mu\text{ l} \sim 200\text{ }\mu\text{ l}$ の範囲である。流体内の迅速な伝熱のためには、室16は、薄くてかつ平らで、平らな面上の壁は、高い熱伝導度を持っている。熱伝導の方向における増幅室16の厚みは、 $50\text{ }\mu\text{ m} \sim 5\text{ mm}$ の範囲であり、より好ましくは、 $100\text{ }\mu\text{ m} \sim 2\text{ mm}$ の範囲であり、また最も好ましくは、 $200\text{ }\mu\text{ m} \sim 1\text{ mm}$ の範囲である。他の一般的な態様によると、増幅室16の体積が結合室15の体積より大きいことが好ましいが、結合室の体積の2倍以下であることが好ましい。

## 【0064】

さらなる好ましい実施形態によると、流体充填測定手段は、増幅室16が、充填されまたは完全に空になった瞬間に検出するために、増幅室の出口に近い増幅室16の出口経路中に設けられる。増幅室16の出口経路中にこの材料を入れることにより、またはこの材料の多くを入れることにより、それが、充填されるときに、増幅室16を離れることにより、増幅室16中に検出される材料の口スを避けることができ、核酸分析プロセスを監視する一助となろう。この特性は、結合工程(そこでは、結合溶液は、結合室15を経由して処理される)において特に有利であり、また検出される核酸が、結合室15から増幅室16へ移送されるときに溶出工程中で、特に有利である。

## 【0065】

流体充填測定手段は、たとえば、蛍光、透過、反射、屈折または吸収の測定により、必要により、出口経路中または近くに置かれた鏡または電気センサのさらなる使用により、核酸増幅装置の対応する光学センサにより、出口経路中の流体の光学的検出を可能にする使い捨て装置内にある光学的透明窓であってもよい。

## 【 0 0 6 6 】

本発明の好ましい実施形態によると、増幅室の入り口経路、増幅室 1 6 および増幅室の出口経路は、装置 1 中に配置され、その結果、液体が、入り口経路を經由して、上向き方向で増幅室 1 6 中に入り、また装置 1 が、核酸分析装置中で作動されるときに、出口経路を經由して上向き方向で増幅室から排出される。この場合、増幅室 1 6 の完全なかつ泡の無い充填が、改善され、かつ増幅室 1 6 が完全に充填される前に、出口経路へと失われる液体はない。

## 【 0 0 6 7 】

廃棄物コネクタ 2 4 は、使い捨て装置 1 が、作動および使用のために挿入される核酸分析装置の廃棄物容器へ、使い捨て装置 1 の流体接続を提供する。しかし、装置 1 上に廃棄物コネクタ 2 4 を有することは、必須では無い。図 8 および図 9 中に概略的に示された他の実施形態において、装置 1 を用いて行われるプロセス中に生じる廃棄物材料を取り上げるために、装置 1 は、装置 1 中に一体化された 1 つまたはいくつかの廃棄物室 4 6 を備えていても良い。該廃棄物室 4 6 は、好ましくは、胴体 4 2 の側面 5 0 上におかれ、また胴体 4 2 中の凹所である空隙により形成され、さらに、側面 5 0 は、壁 4 1 によってカバーされ、装置 1 が核酸増幅装置中で作動されるときに、壁 4 1 は実質的に垂直面である。廃棄物室 4 6 が、装置 1 上に設けられている場合には、装置 1 の外側の廃棄物容器への廃棄物コネクタ 2 4 は必要ではない。しかし、この場合、排出機構たとえば排出ポートまたは廃棄物室換気 4 7 は、液体が、廃棄物室 4 6 に到達しまたその中に入り、またガスが、廃棄物室 4 6 から排出されることを可能にするために、適している。

## 【 0 0 6 8 】

さらに、廃棄物室 4 6 に通じる経路 4 8 を閉じるために、シールポイント 4 8 が含まれていてもよい。廃棄物室 4 6 は、核酸分析プロセスから生じた全ての液体廃棄物を回収する容積を持っている。そのような廃棄物液体は、たとえば、処理された結合溶液および使用された洗浄緩衝液である。その容積は、代表的には、0.2 ml ~ 1.0 ml の範囲であり、最も好ましくは、0.5 ml ~ 5 ml の間である。一体化された廃棄物室 4 6 は、廃棄物室 4 6 中に到着した廃棄物液体を毛細管で吸着するために、親水性のフリ-ス様の材料、たとえば綿またはガラス繊維を含んでいても良い。一体化された廃棄物室 4 6 の内部間と周囲とのガス交換（ガス伝達）に対しては、廃棄物室 4 6 は、ガス交換、すなわち廃棄物室 4 6 の換気を可能にする開口部を持っている。換気は、流体またはエアロゾルが、換気材料を經由して通過することを許諾しない（通常作動時）。チップ 1 2 中または溶解室排出フィルタ 5 に対して、たとえば、多孔質プラスチックプラグまたは PTFE 膜などと同じまたは同様な材料が、使用されている。

## 【 0 0 6 9 】

流体ポート 8 は、溶解室 3 への試薬入り口として役立っている。流体ポート 1 0 は、流体経路 4 4 により、結合室 1 5 および増幅室 1 6 の少なくとも 1 つへ、好ましくは、結合室 1 5 の入り口側へ、接続される流体供給接触面として役立っている。該供給接触面は、装置 1 の「主面」中に、すなわち側面 5 0 に対応した面中に、または「主面」に平行な面中に置かれていてもよく、また核酸分析装置の流体供給手段によって接触されるように適合され、そこでは、該流体供給手段は、装置 1 に対して、サンプルまたは試薬のような液体を、流れの垂直方向で供給するために適合されている。廃棄物コネクタ 2 4 は、流体経路 4 4 により、結合室 1 5 および増幅室 1 6 の少なくとも 1 つへ、好ましくは、増幅室 1 6 の外側へ接続される流体除去接触面として役立っており、該除去接触面は、装置 1 の「主面」に、すなわち側面 5 0 に対応した面に、または「主面」に平行な面に置かれており、また核酸増幅装置の流体供給手段により接続するために適合され、そこでは、流体供給手段は、装置 1 から、サンプルまたは試薬のような液体を、流れの垂直方向で、すなわち装置 1 の側面 5 0 に平行な方向で、除去するために適合されている。これにより、使い捨て装置 1 は、小さな空間を必要とし、またそれらを、互いに閉ざされた距離に蓄えかつ処理することができる。

## 【 0 0 7 0 】

この目的のために、分析装置は、一般的には試薬容器から試薬を吸引しかつ試薬が必要とされる場所にそれを分配することにより、必要な試薬を投与する試薬ピペット取得システムを含んでいても良い。該試薬ピペット取得システムは、試薬が吸引されそれぞれ分配される試薬投与流体システムおよび試薬ピペット取得チップ、たとえば試薬容器から試薬を取り出しかつ試薬が使用される場所にそれを適用することができる細長い中空針を含んでいても良い。

#### 【0071】

接触面によって使い捨て装置1に、空気（または他のガス、たとえば、精製された窒素）を送るためのガス投与システムも、分析装置に設けても良い。該システムは、一定圧、種々の圧および／またはあらかじめ定められたガス容量で、ガスを送っても良い。空気を10  
使用する場合には、該システムは、空気フィルタを必要としても良い。ガスを適用するために、適用ポイントにつなぎ合わせることができる接続素子が必要とされる。

#### 【0072】

さらに、分析装置、すなわちサンプルまたは空気の一定量を吸引し、それぞれ使い捨て装置1に対して分配可能なシステムによって、サンプル投与システムが設けられる。代表的には、空気置換シリンジポンプも、使用しても良い。

#### 【0073】

図1に示されている実施形態の有利な特性は、それが、少なくとも2つの流体供給接触面、すなわち装置1へのサンプル供給用第1接触面（溶解室3中へのチップ12によって示される例中で行われている）および試薬を装置1に供給するための第2接触面、たとえば20  
流体ポート8または10を含んでいることである。本実施形態は、それが、二次汚染およびキャリーオーバー問題を低減するために、役立っていることに有利である。

#### 【0074】

好ましい実施形態によると、使い捨て装置1の上から下向きの方で、流体を使い捨て装置1に供給できるように、および／または使い捨て装置1から流体を、上向き方向にまたは下向き方向に除去できるように、使い捨て装置1の流体供給接続素子は構築されている。これにより、小さな空間が、使い捨て装置1に求められ、またそれらを、閉ざされた距離に蓄えかつ処理することができる。

#### 【0075】

この目的のためには、装置1の胴体42の投影が、基本的に直角であり、すなわち側面30  
50中に存在する装置1の一部が、好ましくは、基本的に直角形状をしており（側面50に対して直交して見て）また流体供給接触面および／または流体除去接触面は、直角の上部または底部に置かれまた配向されており、その結果、流体供給および／または除去は、その直角の面、すなわち側面50または装置1の主面に平行に配向されるように行われる。

#### 【0076】

熱伝導壁41は、胴体42と共に（および隔壁、フリースおよび排出口として挿入された部品と共に）、使い捨て装置1の組み立て部を形成する。熱伝導壁41は、生じた接続が、液漏れをしないように、胴体42に接続される。胴体42と熱伝導壁41の間に形成されたオープンスペースは、経路と室を形成する。熱伝導壁41を、胴体42に組み立て40  
るために使用される接合技術は、公知である。代表的なかつ好ましい接合技術は、レーザー溶接、超音波接合、熱接着または熱シールおよび接着である。

#### 【0077】

熱伝導壁41は、一般的に平らで、シート状の材料であり、または薄い層にした胴体42である。この素子の厚みは、代表的には、0.01mm～1mmの範囲であり、最も好ましくは、0.04mm～0.35mmの範囲である。熱伝導壁41の全熱伝導速度は、代表的には、200W/m<sup>2</sup>/K以上であり、より好ましくは、2000W/m<sup>2</sup>/K以上である。好ましい実施形態によると、熱伝導壁41は、シールホイル、特に金属シートを含む金属ホイルまたはホイルである。

#### 【0078】



熱伝導壁 4 1 は、検定に使用される試薬および反応流体と接触しているから、反応に対する同様な鈍感さが、胴体 4 2 用として要求され、少なくとも、試薬または反応流体と接触する本素子のこれらのセクション用として要求される。試薬または反応流体と接触する好ましい材料は、ポリプロピレンである。

#### 【 0 0 7 9 】

好ましい熱伝導壁 4 1 は、ポリマーと金属層によって形成された積層体である。そこでは、ポリマー層は、組み立てられた状態では、試薬およびサンプルと接触する材料を形成する胴体 4 2 に近い層であり、またそこでは、該金属層は、胴体 4 2 から遠くかつ試薬およびサンプルとは、直接接してはいない。好ましい積層体ホイルは、 $0.1 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$  の範囲であり、最も好ましくは、 $0.1 \mu\text{m} \sim 80 \mu\text{m}$  の範囲であるポリマー層の形状を持ち、また  $20 \mu\text{m} \sim 400 \mu\text{m}$  の範囲であり、最も好ましくは、 $20 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$  の範囲内の厚みを持った金属層である。熱シールによりポリプロピレン胴体 4 2 に接合される最も好ましい材料は、 $35 \mu\text{m}$  のポリプロピレンと  $100 \mu\text{m}$  のアルミニウムの積層体であり、それは市販で入手可能である。

#### 【 0 0 8 0 】

好ましい実施形態において、装置 1 は、空隙を形成するための構造化された表面を有する装置胴体 4 2 と、構造化された表面を覆うことにより装置 1 の、たとえば、核酸増幅を行うための増幅室 1 6 の、および増幅室 1 6 にサンプル液体を提供するために増幅室 1 6 に接続されている入り口経路 2 の、側面 5 0 を覆う壁 4 1 を形成するシールカバー 4 1 とを含み、該シールカバー 4 1 の第 1 層は、サンプル液体に対して不活性な材料で作られており、またシールカバー 4 1 の第 2 層は、金属、好ましくはアルミニウムで作られている。構造化された表面は、好ましくは胴体 4 2 の側面 5 0 である。

#### 【 0 0 8 1 】

剛直な胴体 4 2 は、堅くまた硬いので、それは、所定の形状をしている。それは、代表的には、丈夫で、安定な堅い材料たとえば、単一のかなり硬いプラスチックポリマーなどから作られている。N A T 用の好ましい材料は、対応する核酸テストまたは検定に必要とされる程度に不活性である。補足的な要件は、該材料に対して、たとえば透明性、機械的要件、熱的要件などとして、存在している。多くの N A T 検定用の胴体 4 2 に対する最も好ましい材料は、ポリプロピレンである。胴体 4 2 は、射出成型プロセスで製造されても良い。必要とするときには、射出成型された部品製造プロセスにおいて、熱可塑性弾性体 ( T P E ) 素子を包含するために、2 つの混合物射出成型を使用しても良い。このようにして、たとえば、胴体 4 2 に付着している熱可塑性弾性体から作られている入り口を包含しても良い。胴体 4 2 の材料厚みは、好ましくは、 $0.3 \text{ mm} \sim 4 \text{ mm}$  の範囲であり、最も好ましくは、 $0.5 \text{ mm}$  から  $1.5 \text{ mm}$  の範囲である。材料の好ましい機械的特性は、次の通りである。引張り弾性率 ( 弾性率、ヤング率 ) は、 $0.1$  から  $5 \text{ GPa}$  の範囲であり、引張り強度は、 $10$  から  $200 \text{ MPa}$  の範囲である。

#### 【 0 0 8 2 】

一体化された使い捨て装置 1 の製造プロセスの間は、熱伝導壁 4 1 によって覆われている胴体 4 2 中の溝は、室または経路を形成できる。厚い壁を用いなくても、裂け目をつければ胴体 4 2 の剛性を増加することができる。好ましい実施形態によると、装置は、胴体 4 2 と装置胴体の表面を覆うカバーとを含み、またそこでは、流体経路は、装置胴体の表面に固定されているカバーによって覆われた装置の表面中で溝として提供される。

#### 【 0 0 8 3 】

シールゾーン 4 3 は、胴体 4 2 とサンプルピペット取得チップ 1 2 の間に置かれる。チップが、使い捨て装置中の対応する開口部に差し込まれるときに、シールゾーン 4 3 は、胴体 4 2 とサンプルピペット取得チップ 1 2 の間で生成される。

#### 【 0 0 8 4 】

経路 4 4 は、一体化された使い捨て装置 1 内にある流体移送路であり、一般的には、胴体 4 2 と、たとえば熱伝導壁 4 1 により覆われている胴体 4 2 中の溝を覆っている第 2 素子との間に形成される。経路の断面は、 $0.01 \text{ mm}^2 \sim 2 \text{ mm}^2$  の範囲であり、より好ま

しくは、 $0.04\text{ mm}^2 \sim 0.5\text{ mm}^2$ の範囲の面積である。

【0085】

図10および図11は、先の図中に記述された本発明による使い捨て装置1の基準原理を、概略斜視図で図示している。これらの図は、結合室15、経路44および増幅室16を含む側面50を図示するために、主として役立っている。図中では、すなわち、胴体42の右側に、1つの側面50のみが、示されている。他の構造化された表面は、胴体42の左側42上であり、または含まれても良く、すなわち示された側面50に対して平行および反対である。勿論、室および経路は、側面50から胴体42中に伸びる空隙として構築されているから、それらは、側面50に対して垂直方向で、すなわちy方向で、非ゼロ伸張を持っている。これらの素子の一部、すなわちこれらの素子のセクションは、好ましくは側面50中に置かれている。装置1が、核酸増幅装置中で作動される、すなわち側面50が、垂直方向に配向されるときには、側面50のz方向は、重力gの方向とは反対となる。

【0086】

流路は、側面50に対して平行でまた好ましくは、ゼロに近い距離にある平行面51（図10中にのみ示されている）に置かれている。図10の実施形態は、装置1の上部でのみ流体ポートを含みかつ図11の実施形態は、装置1の上部と底部の両方にある流体ポートを含んでいる。図10および図11中に見られるように、装置1の上側にある流体ポートは、x-y方向において面である水平な流体接触面の上面52にも置かれている。同様に、図11に見ることができるように、装置1の底側にある流体ポートは、水平な流体接触面の底面53に置かれている。一般的に述べると、装置1が、面50に対して直交する少なくとも1つの流体接触面52、53を含む際、すなわち流体接触面52、53が、水平面である際、そこでは、側面50または平行面51において、経路44は、この面から、装置1の種々の室3、15、16に通じる。この面53、53において、流体接触面8、10、24は、置かれても良いし、また隔壁を収容するように設計されているこれらの水平面に置かれている穴に、隔壁を挿入しても良い。

【0087】

図1は、図3～図11による装置1を用いているが、代表的な工程は、次のように記述される。

【0088】

工程1：結合溶液の溶解および調製

サンプル調製プロセス中の第1工程の目的は、NAをいつでも結合する状態にすることである。これは、望まれない脳膜の消化/分解、たとえばプロテイナーゼによるウイルスの蛋白殻の消化、および/または洗剤によるバクテリアの細胞壁の崩壊を包含しても良い。この工程の他の目的は、検体NAが、次の結合工程（結合条件の調整）中に、固相に結合できるように、条件（検体の周囲の溶液）を適合させることである。

【0089】

工程1の手法は、次の工程を含んでも良い：

使い捨て装置把持部および自動化移送システムにより、一体化された使い捨て装置1を、一体化された使い捨て装置配送棚から、サンプル調製台に移送する工程。

【0090】

本発明の好ましい実施形態によると、このプロセス工程を支持するために、装置1の胴体42は、装置1を核酸増幅装置中に誘導する誘導および/または駆動により装置1をグリップするグリップ接触面および核酸増幅装置の取り扱い手段を含む。

自動化移送システム上に搭載されたチップ把持部により、サンプルピペット取得チップ12をグリップすること。チップ把持部は、空気作動されるサンプル投与システムに接続されている。

サンプルは、サンプルチューブまたはサンプルを含む他の容器からサンプル投与システムによって、吸引される。

その後、自動化移送システムは、サンプルピペット取得チップ12中の吸引されたサ

10

20

30

40

50

ンプルを、一体化された使い捨て装置 1 中に動かす。

その後、移送システムは、サンプルピペット取得チップを使い捨て装置 1 の溶解室 3 にロックする。

その後、サンプル投与システムは、サンプルを溶解室 3 に投与する。

結合溶液の調製に使用される試薬は、試薬を含む試薬容器から試薬を吸引しかつ一体化された使い捨て装置 1 中に試薬を投与することにより、一体化された使い捨て装置 1 に巧く添加される。結合溶液調製用試薬は、試薬ピペット取得チップを有する試薬ピペット取得システム、試薬投与流体システムおよび自動化移送システム上に搭載された試薬ピペット取得チップ洗浄台を用いて、プロセスに添加される。結合溶液の溶解および調製用試薬は、溶解室 3 に流体接続 9 を有する使い捨て装置の流体ポート 8 に投与される。

10

溶解室 3 中に存在するサンプルに添加される試薬は、吸い込みおよび吐き出しプロセスによって混合される。吸い込みおよび吐き出しプロセスは、流体を溶解室 3 からサンプルピペット取得チップ 1 2 中に、また逆に、サンプルピペット取得チップ 1 2 から溶解室 3 中に吸引し、それぞれ分配することにより、行われる。溶解室 3 のガス交換のために、溶解室 3 は、溶解室排気システム 4 を持っている。吸い込みおよび吐き出し混合のためには、チップ把持部は、サンプルピペット取得チップ 1 2 に接続し、またサンプル投与システムにより、空気を投与しそれぞれ吸引する。

プロセスの熱制御のために、溶解室 3 は、熱制御システムに接続されている。熱は、熱伝導壁 4 1 によって伝導される。

汚染制御のために、サンプルピペット取得チップ 1 2 は、チップフィルタ 1 3 を含み、また溶解室排気システム 4 は、環境を汚染から守りまたそれぞれ環境からの汚染からプロセスを守る溶解室排気フィルタ 5 を経由して、通じている。

20

#### 【 0 0 9 1 】

工程 1 に対して、次の例が該当する：

流体ポート 8 および流体接続 9 を経由して、 $25\ \mu\text{l}$  の QS を溶解室 3 に投与する。

自動化移送システムにより、 $630\ \mu\text{l}$  の EDTA 血漿（患者からのサンプル）をピペットで取得する。HBV 対照（たとえば、アクロメトリックス社からの HBV ウイルスの、たとえば  $10000$  コピー（ $=10\ \text{kcp}$ ）を用いて）を用いて、対照理由のために、サンプルを固定できる。ピペット取得をするために、サンプルチューブから吸引しかつ自動化移送システムによって、サンプルを一体化された使い捨て装置 1 に移送するために、サンプルピペット取得チップ 1 2 を用いる。サンプルおよび QS は、空気投与システムを用いて、吸い込みおよび吐き出し混合（ $2\times$ ）によって混合される。

30

流体ポート 8 を経由して、試薬ピペット取得システムを用いて、 $65\ \mu\text{l}$  のプロテイナーゼを反応に投与する。

プロテイナーゼは、5 回の吸い込みおよび吐き出し混合工程によって、完全に混合されまた反応混合物は、熱制御システムを用いて  $37^\circ\text{C}$  まで自動温度調節されて、 $300$  秒間培養される。

この培養後、流体ポート 8 を経由して、 $1420\ \mu\text{l}$  の溶解緩衝液を反応混合物に投与し、また吸い込みおよび吐き出し混合工程により、完全に混合する。

#### 【 0 0 9 2 】

40

工程 2：結合

第 2 工程の目的は、先に調製された結合溶液を接触させることであり、または充分に選択的にまた充分に定量的に NA を結合可能な固相 1 4 上でそれ进行处理することである。結合溶液中に存在する抑止化合物は、結合されないかまたはごくわずかな量で結合されるか、または結合した化合物は、1 回または数回の後洗浄工程中で除去される。

#### 【 0 0 9 3 】

工程 2 の手法は、次の工程を含む：

基本的には全ての公知の流体移送機構が、結合室 1 5 を経由して結合溶液进行处理するために使用可能である。そのような流体移送機構の例は：

・たとえば、結合室 1 5 を経由して、結合溶液を押しピストンによる直接ポンプ注入。

50

・たとえば、溶解室 3 の可撓性壁の変形により、室内にかくまわれている溶液を押すことによる直接ポンプ注入。

・重力により生じる静水圧を用いたポンプ注入。

・遠心力により生じる静水圧を用いたポンプ注入。

・システムの片側にガス圧を印加し、および / または他の側に減圧を印加することによる差圧を印加すること。

システムの設計によっては、流体流れの方向付けを可能にし、および / またはそれを制御するために、流路を切り替えなければならない。たとえば、結合溶液に圧力を印加する場合には、溶解室排気システム 4 を閉じなければならない、または結合室 1 5 を経由して、増幅および検出室 1 6 を経由して、廃棄物コネクタ 2 4 を経由して、溶解室 3 から、最後に、廃棄物容器に通じる流路が、たとえば、廃棄物バルブを開放することにより、確保されなければならない。

10

たとえば、流体存在センサとしての追加の手段は、タイミングに関するプロセスとプロセス適合性を制御しても良い。

#### 【 0 0 9 4 】

工程 2 に対して、次の例が該当する：

経路シール機により経路 4 4 を熱的にシールして狭い経路をシールすることにより、溶解室排気システム 4 は、閉じられる。3 0 0 の温度を有するピストンが、シールしなければならない経路セクション（シールポイント 6）に対して、3 0 N の力で 1 5 秒間プレスされる。

20

廃棄物への接続は、廃棄物コネクタ 2 4 によって行われる。

装置の廃棄物バルブを開く。

チップ把持部は、サンプルピペット取得チップ 1 2 に接続し、また結合溶液を、+ 1 バール（周囲の圧力以上）まで加圧する。

この差圧を印加することにより、溶解室 3 中に存在するあらかじめ調製された結合溶液は、結合室 1 5 を経由して溶解室 3 の下端に置かれている経路 4 4 を経由して、溶解室 3 から流出する。結合室 1 5 は、固相 1 4 として、ガラス繊維フリース（ $220\text{ g/m}^2$ 、「ロッシュ・アプライド・サイエンス社の「高純度」製品で使用する純度）の直径 5 mm の円盤をかくまっている。結合室 1 5 は、ほぼ 5 mm の直径と 1 mm の高さを有する。結合室 1 5 まで / から通じる経路 4 4 は、最大 0 . 6 mm の幅と 0 . 6 mm の高さを有する。

30

該結合溶液は、結合室 1 5 後、増幅および検出室 1 6 を経由して、廃棄物まで流れる。

結合（時間は、流体存在センサによって観察される）後、圧力は、切られる。代表的な結合時間は、2 分の範囲である。

#### 【 0 0 9 5 】

工程 3：洗浄

工程 3 においては、結合溶液の残りが、固相 1 4 の内部空間中に、吸収剤および固相に吸収された材料を提示するが、固相 1 4 から洗浄緩衝液中に溶解したものは、除去され、また結合溶液により汚染された一体化された使い捨て装置 1 の壁は、この工程で洗浄される。

40

#### 【 0 0 9 6 】

工程 3 の手法は、次の工程を含んでも良い：

洗浄されねばならない一体化された使い捨て装置 1 上のシステムを経由して、洗浄緩衝液を処理（ポンプ注入）する前に、この流体システムの設計にもよるが、流体流れの方向付けを可能にし、および / またはそれを制御するために、流路を切り替えなければならない。たとえば、溶解室 3 から結合室 1 5 に通じる流路は、溶解室 3 に、洗浄緩衝液の逆流するのを避けるために、断たなければならない、また増幅および検出室 1 6 を経由して結合室 1 5 から通じる経路および最後に、分析装置の廃棄物容器に通じる流路が、たとえば、廃棄物バルブを開けることにより、確保されなければならない。

50

洗浄緩衝液は、洗浄緩衝液を含む試薬容器から吸引され、かつ洗浄されなければならない一体化された使い捨て装置 1 中の流体セクションを経由して、ポンプ注入される。洗浄緩衝液を処理するためには、試薬ピペット取得チップおよび試薬投与流体システムを有する試薬ピペット取得システムならびに試薬ピペット取得チップ洗浄台が、使用される。流体接続 11 を有する流体ポート 10 に対して処理されなければならないシステム洗浄用洗浄緩衝液は、洗浄されなければならない一体化された使い捨て装置 1 上の完全な流体システムに対して、完全な流体接続をそれぞれ有する結合室 15 に通じている。

必要な場合には、同一洗浄緩衝液または種々の洗浄緩衝液を用いて、いくつかの洗浄工程を行うことができる。

該一体化された装置を、装置の熱制御システムに接続することにより、熱制御下に、洗浄工程を行うことができる。

#### 【0097】

工程 3 に対して、次の例が該当する：

溶解室 3 から結合室 15 に通じる経路は、経路シール機により、該経路を熱シールすることによって、閉じられる。300 の温度を持つピストンが、シールしなければならない経路セクション（シールポイント 7）に対して、30 N の力で 15 秒間プレスされる。

装置中の廃棄物バルブが、後に開かれる。

試薬ピペット取得システムを用いて、対応する試薬容器から、600  $\mu$ l の洗浄緩衝液を吸引する。その後流体ポート 10 に対して、1800  $\mu$ l / 分の流速で、500  $\mu$  を投与する。洗浄緩衝液は、結合室 15 および増幅および検出室 16 を経由して、廃棄物コネクタに接続されている廃棄物容器に流れる。

#### 【0098】

工程 4：洗浄、除去 / 乾燥

本プロセス工程 4 は、洗浄緩衝液が、次のプロセス工程（主に、NA 検出工程）に対して抑止効果を持つ一体化された装置および試薬の配置に適用する。これらの場合に、一体化された使い捨て装置 1 中での洗浄緩衝液は、臨界レベル以下まで除去または削減されなければならない。

#### 【0099】

次の原理の単独または組み合わせが、洗浄緩衝液除去に対して使用される。

流体の機械的置換（たとえば、ガス、空気または他の中性流体）。

洗浄緩衝液を除去しなければならない一体化された使い捨て装置 1 のセクションを経由して、ガスを加熱するおよび / または同時にポンプ注入することにより、次のプロセス工程を抑止すると知られている洗浄緩衝液の蒸発しやすい元素の乾燥。

洗浄緩衝液の抑止ポテンシャルを中和することができる一体化された使い捨て装置 1 を経由して、溶液を処理することにより、化学的中和を行うこと。

#### 【0100】

工程 4 の手法は、次の工程を含む：

流体の機械的移動および洗浄緩衝液の蒸発しやすい元素の乾燥のために、空気投与システム（または、他のガス）が、使用される。

洗浄緩衝液の蒸発しやすい元素の乾燥の処理時間を削減するために、一体化された使い捨て装置 1 は、この工程が高められた温度で行うことができる温度制御システムに接続される。

洗浄緩衝液を除去しなければならない装置中の流体システムに接続される一体化された使い捨て装置 1 の流体ポート 8 に、空気投与システムが、自動的に接続される。

結合室 15 を経由して、増幅および検出室 16 を経由して、流体ポート 10 から、また最後に、廃棄物容器に通じる流路が、たとえば、バルブを開けることにより、確保されなければならない。

所定のプロセス時間の間、所定の温度、所定の圧力における流体の機械的移動および洗浄緩衝液の蒸発しやすい部分の乾燥のために、洗浄緩衝液が除去されなければならない

10

20

30

40

50

一体化された使い捨て装置 1 中のシステムを経由して、空気がポンプ注入される。

【 0 1 0 1 】

次の例が、工程 4 に対して与えられる：

空気投与システムが、流体ポート 1 0 に接続する。

廃棄物バルブを開く。

一体化された使い捨て装置 1 を 4 0 に温度調節する。

装置 1 を経由して空気を 1 5 秒間投与する。空気圧は、+ 1 バール（周囲の気圧以上）。

1 5 秒後、温度制御システムの温度を 5 0 に設定し、また 2 0 秒間保持する。

その後、空気投与システムは、洗浄緩衝液を除去しなければならない一体化された使い捨て装置 1 を経由して、圧力 + 1 バールを有する空気を 1 2 0 秒間ポンプ注入し、一方温度を 5 0 に保持する。

【 0 1 0 2 】

工程 5：溶出

工程 5 においては、固相 1 4 に吸着されまた洗浄された N A（選択的にかつ定量的に充分である）は、最終の増幅および / または検出工程の前に溶出される（すなわち、固相から溶解される）。簡潔さの理由から、次の増幅および / または検出工程に使用される検出試薬を用いて、溶出が、直接行われる。次の状況では、このプロセスに対して、[ 溶出緩衝液 ] + [ P C R マスターミックス ] の組み合わせ = 「 E M M x 」を使用する。

【 0 1 0 3 】

本プロセス工程 5 において、N A が、E M M x 中の固相 1 4 から溶出（溶解）され、また増幅および検出室 1 6 に移送される。

【 0 1 0 4 】

工程 5 の手法は、次の工程を含んでも良い：

流体ポート 1 0 を経由して、E M M x は、一体化された使い捨て装置 1 中に投与される。

結合室 1 5 を経由して、増幅および検出室 1 6 を経由して、流体ポート 1 0 から、最後に、廃棄物容器に通じる流路が、たとえば、廃棄物バルブを開けることにより、確保されなければならない。

本プロセスの熱制御のためには、一体化された装置は、熱制御システムに接続される。

溶出工程は、いくつかのサブ工程を含み、そこでは、一体化された装置 1 は、第 1 温度に熱的に制御され、そこでは、E M M x の第 1 体積が、該システムに投与され、そこでは、その後、所定時間の間培養され、またそこでは、最後に、第 2 体積が投与される。

代表的には、E M M x の第 1 体積は、固相 1 4 を含む結合室 1 5 を含む流体接続 1 1 を充填し、また短い培養時間の後、結合室 1 5 中に存在する溶出液を、増幅および検出室 1 6 に移送する流体接続 1 1 に、第 2 体積が投与される。

【 0 1 0 5 】

工程 5 に対して、次の例が該当する：

装置は、熱制御システムによって 5 0 に温度調節され、また全プロセスに対してそこに保持される。

廃棄物コネクタ 2 4 に接続された廃棄物バルブを開く。

試薬ピペット取得システムにより、1 0 0  $\mu$  l の E M M x を吸引する。

流体ポート 1 0 を経由して、4 0  $\mu$  l の第 1 体積の E M M x を、試薬ピペット取得システムによって、1 2 0 0  $\mu$  l / 分の流速で投与する。この第 1 工程において、固相 1 4 のみを、E M M x で濡らす。

一体化された装置 1 を 1 0 秒間培養する。

流体ポート 1 0 を経由して、4 2  $\mu$  l の第 2 体積の E M M x を、試薬ピペット取得システムによって、7 5 0  $\mu$  l / 分の流速で投与する。溶出された N A を含む増幅および検出室 1 6 中に存在する E M M x を、増幅および検出室 1 6 に移送する。

## 【 0 1 0 6 】

## 工程 6 : 増幅および検出

上記した先のプロセス工程の後に、検体を、工程 6 中で分析する分析する用意ができ  
おり、分析する手段とは、検体の有無をチェックするための手段および/または状況に応  
じて、検体の濃度を検出するための手段をいう。

## 【 0 1 0 7 】

本発明は、N A を分析する明確な方法に限定されるものではない。検体 N A の量は、検  
体の存在および状況に応じて、検体の濃度を検出する方法に直接アクセスしてもよい。検  
体の低濃度および最も低い濃度は、いわゆる「検体増幅」を必要としよう。N A の物質ク  
ラスに対しては、標的検体分子または誘導体の増幅を可能にするいくつかの生物学的分析  
方法が、存在する。これらの方法を用いて、検体のコピーまたは検体の誘導体のコピーが  
、発生し、その後それらは、この検体増幅後、それらの濃度が高くなるので、それらは、  
より検出しやすくなる。

## 【 0 1 0 8 】

検体増幅用のそのような分析方法の例は：

ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) : 熱サイクルを使い、D N A ポリメラーゼ (たと  
えば、D N A - ポリメラーゼ形式のサーマスアクアティカス (Thermus Aquaticus) ) を用  
いて、一本鎖 D N A が、発生する。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R ) : 始めは、標的 R N A 検体を形成し、  
そこでは、P C R の前に、逆転写酵素により、逆転写 c - D N A が、発生する。

リガーゼ連鎖反応 ( L C R ) : この場合、検体 D N A の (相補) コピーが、D N A -  
リガーゼ酵素を用いて、検体 D N A の断片の結紮により作られる。

R N A 重合 : この場合、R N A 検体の c - D N A コピーが、逆転写酵素を用いて、多  
重逆転写により作られる。

鎖置換増幅 ( S D A ) : ポリメラーゼ連鎖反応および先に合成されたコピーの鎖置換  
の組み合わせを用いる。反復される複製工程用の新しい出発ポイントを作るために、D N  
A ポリメラーゼ酵素の他に、D N A 切断酵素を用いる。

ローリングサイクル増幅 : 環状 D N A プライマーを用いる。

R i b o - S P I A (登録商標)、L A M P、ヘリカーゼ依存 P C R などの他の多く  
の方法である。

## 【 0 1 0 9 】

本発明の用途は、独特な増幅および検出方法には限定されない。増幅された検体または  
その誘導体は、増幅プロセスの間または増幅後、検出方法にアクセスできる。本発明は、  
増幅された N A を検出する独特の方法に限定されない。

## 【 0 1 1 0 】

増幅された検体 (増幅) 用の検出方法の例は：

増幅の間に増幅された検体 (または誘導体) の発生を検出する「リアルタイム」の方  
法：

・消されない蛍光を形成する検体指定された検体の存在する場合、ポリメラーゼにより  
消化される特定のプローブであるタクマンプローブを用いたアンプリコン (amplicon) の  
検出。

・アンプリコン特異的ハイブリダイゼーション・プローブが、アンプリコンに対して交  
雑し、またそれにより分光特性を変化させる交雑プローブを用いたアンプリコンの検出。

・d s - D N A interchelator (たとえば、ピコグリーン (登録商標) ) を用いたア  
ンプリコン検出、そこでは、これらのinterchelator分子は、形成されたd s - D N A ア  
ンプリコンに親和性を持ちまたd s - D N A の存在下でその分光特性を変化させる。

・反射または濁度測定を用いたアンプリコンの検出 (たとえば、大きなアンプリコンが  
、生成される L A M P 増幅の場合に)。

・およびその他多くの方法である。

後増幅検出法

10

20

30

40

50

- ・ゲル電気泳動法：形成されたアンプリコンの検出。
- ・固定化されたプローブに対するアンプリコンのハイブリダイゼーションおよび適当な手段によるこのハイブリダイゼーションの検出。
- ・およびその他多くの方法である。

## 【0111】

工程6に対して、次の例が該当する：

加水分解されたTaqman（登録商標）プローブを検出するために、PCR反応を行うための熱循環器およびアンプリコン形成を検出するための蛍光測定を含む検出台に、一体化された使い捨て装置1を移送する。

## 【0112】

次の熱サイクルプログラムを行う：

1サイクル：

50 120秒 UNG工程

5サイクル：

+ 2.5 / 秒 95 15秒 変性  
- 2.0 / 秒 59 50秒 アニールおよび30秒後の蛍光測定

45サイクル：

+ 2.5 / 秒 91 15秒 変性  
- 2.0 / 秒 52 50秒 アニールおよび30秒後の蛍光測定

全部で、50回の蛍光読み取りを、分析毎に行う。

標的検体（存在するならば）、485nm（バンド幅20nm）の励起波長を持った蛍光および525nm（バンド幅20nm）の波長での発光を生じる。

540nm（バンド幅20nm）の励起波長を持った第2蛍光および575nm（バンド幅20nm）の波長での発光を用いて、QSを検出する。正当な結果のためには、プロセスおよび試薬類（内部品質標準）を証明するために、QSが、現れなければならない。検体の定量計算のために、QSを使用できることが、優れている。

分析後、一体化された使い捨て装置1は、開放され、または取り外されるか、あるいは、必要により後PCR処理される（たとえば、遺伝子型を特定するために）。

## 【0113】

工程7：結果の生成

工程7においては、検出工程で測定された信号は、ユーザに対して有益な情報、たとえば健康状態情報（たとえば患者のウイルス負荷）に変換される。

## 【0114】

工程7に対して、次の例が該当する：

検出手段から受けられる全ての粗データ（たとえば蛍光データ）は、自動化システム（コンピュータ）によって後処理される。

QS曲線が、適合性に対して試される。これは、QS曲線を、予想されるQS曲線と比較することにより、行われる。もう1つの方法として、該曲線の生成された特性、たとえば分析の終わりに形成される信号の量および「エルボー値（elbow-value）」、すなわち、蛍光が、定められた相対的蛍光信号（たとえば、最終蛍光信号の15%）に到達したサイクルは、使用しても良い。非適性分析の検出に、非適性QS信号を、使用しても良い。

標的「エルボー値」を計算する。該肘値は、一般的には濃度に関係している。

その後、対応する検量曲線または参照データから、検体の濃度が、計算されかつユーザに報告される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0115】

【図1】核酸増幅分析の全体作業フロー概略図を示す。

【図2】本発明による使い捨て装置の第1実施形態の斜視図を示す。

【図3】本発明による使い捨て装置の第2実施形態の概略正面図を示す。



【図 4】図 3 による使い捨て装置のより詳細な実施形態の正面図を示す。

【図 5】図 3 による使い捨て装置のより詳細な斜視正面図を示す。

【図 6】図 3 による使い捨て装置のより詳細な斜視背面図を示す。

【図 7】図 3 による使い捨て装置の部分の使い捨て装置の背面に対する拡大図を示す。

【図 8】一体化された廃棄物室を持ちおよび溶解室を持たない使い捨て装置の第 1 実施形態の概略正面図を示す。

【図 9】一体化された廃棄物室を持ちおよび溶解室を持つ使い捨て装置の第 2 実施形態の概略正面図を示す。

【図 10】本発明による使い捨て装置の第 3 実施形態の概略斜視図を示す。

【図 11】本発明による使い捨て装置の第 4 実施形態の概略斜視図を示す。

10

【符号の説明】

【0116】

- 1 一体化された使い捨てサンプル保持および処理装置
- 2 流体経路
- 3 溶解室
- 4 溶解室排出システム
- 5 溶解室排出フィルタ
- 6 排気シールポイント
- 7 閉止シールポイント
- 8 第 1 流体ポート
- 9 流体接続
- 10 第 2 流体ポート
- 11 流体接続
- 12 サンプルピペット取得チップ
- 13 チップフィルタ
- 14 固相
- 15 結合室
- 16 増幅および検出室
- 24 廃棄物コネクタ
- 41 熱伝導壁
- 42 胴体
- 43 シール領域
- 44 経路
- 45 排出ポート
- 46 一体化された廃棄物室
- 47 廃棄物室換気
- 48 廃棄物室シールポイント
- 50 側面
- 51 平行面
- 52 流体接触面の上面
- 53 流体接触面の底面
- 101 入り口
- 102 出口
- g 重力

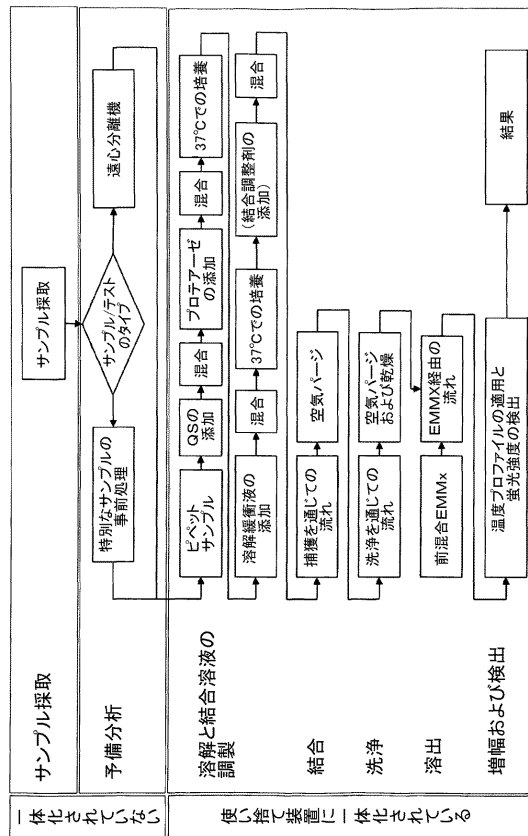
20

30

40

【図 1】

## 作業流れ



【図 2】

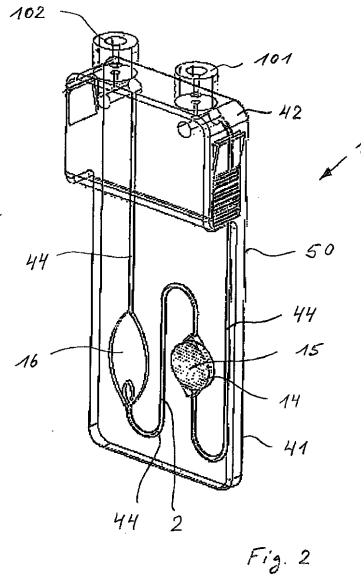


Fig. 2

【図 3】

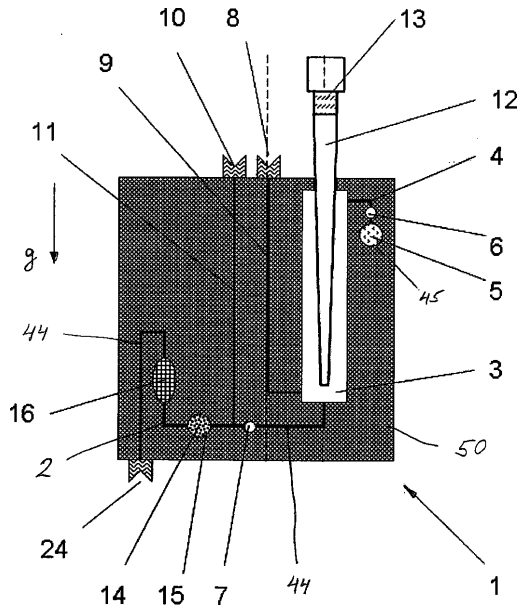


Fig. 3

【図 4】

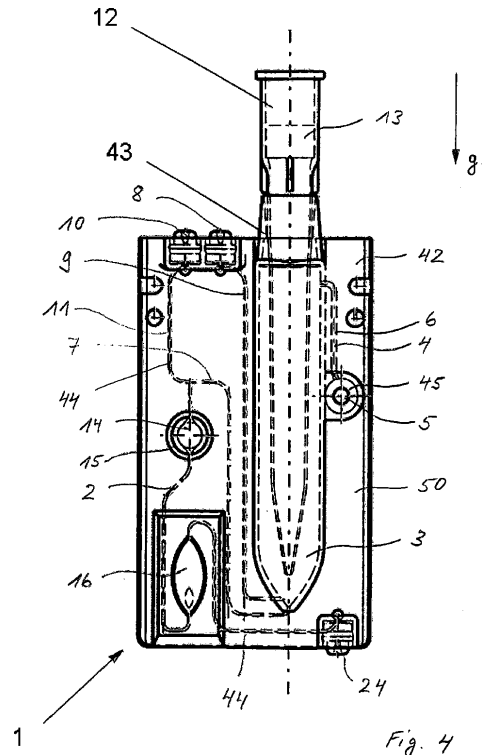


Fig. 4



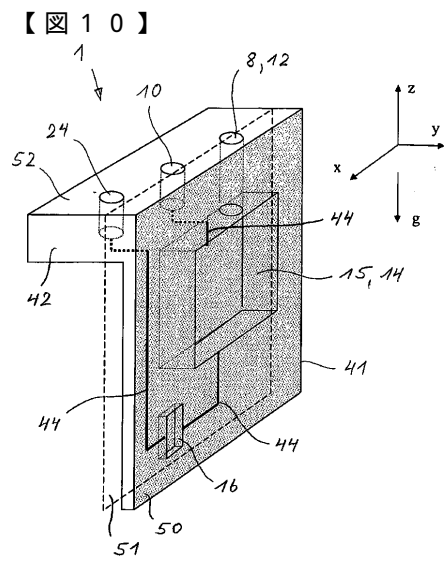


Fig. 10

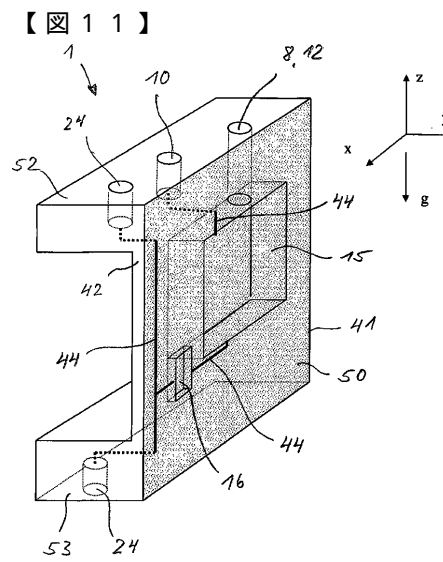


Fig. 11

---

フロントページの続き

- (72)発明者 コップ、マルチン  
スイス連邦、ツェーハー - 6 3 3 0 ハーム、アイヒリュティ 2 1 ツェー
- (72)発明者 エルゼンハンス、オリファー  
スイス連邦、ツェーハー - 5 6 4 3 ジンス、ヘーヘンヴェーク 1
- (72)発明者 ヴァール、ハンス - ペーター  
ドイツ連邦共和国、7 9 6 5 0 ショップハイム、ケーニヒスベルガーシュトラッセ 4 1

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 特表平 0 9 - 5 1 1 4 0 7 ( J P , A )  
特表 2 0 0 6 - 5 1 7 0 2 4 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12M 1/00-3/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)