

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/074265

発行日 平成24年6月21日 (2012.6.21)

(43) 国際公開日 平成22年7月1日 (2010.7.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 J	2 G O 5 2
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 H	4 B O 2 9
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 1/28 J	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

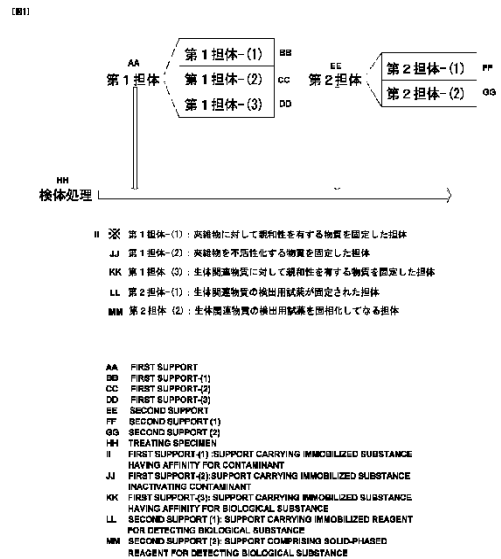
出願番号 特願2010-544181 (P2010-544181)	(71) 出願人 502338292 ユニバーサル・バイオ・リサーチ株式会社 千葉県松戸市上本郷88番地
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/071678	
(22) 国際出願日 平成21年12月25日 (2009.12.25)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-331219 (P2008-331219)	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(32) 優先日 平成20年12月25日 (2008.12.25)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100095360 弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号 特願2009-175584 (P2009-175584)	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
(32) 優先日 平成21年7月28日 (2009.7.28)	(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 田島 秀二 千葉県松戸市上本郷88番地 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体の前処理方法、および生体関連物質の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 第1担体である磁性粒子には非特異的の反応因子に対する抗体が固定されており、この磁性粒子が検体に混合され懸濁される。懸濁後、ピペットチップに懸濁液が吸い上げられ磁石がピペットチップに近接する。非特異的の反応因子が結合した磁性粒子を磁石によって遠隔的に拘束し残液をウェルに排出して検体に含まれる夾雑物の除去処理が終了する。ウェルに排出された処理済みの検体は免疫学的測定に供される。処理済みの検体に抗体が固定された磁性粒子が混合され懸濁される。懸濁液がピペットチップに吸い上げられ磁石を用いて抗原が結合した磁性粒子が分離される。抗原が結合した磁性粒子は洗浄され、第2担体を含有する酵素標識化液に混合懸濁される。懸濁後、標識化され抗原が結合した磁性粒子は基質液に混合され、発光強度等が測定される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検体中の生体関連物質の測定システムであって、
 検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第 1 担体と、
 生体関連物質の検出用試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体から選ばれる第 2 担体と、
 を備えたことを特徴とする前記測定システム。

【請求項 2】

生体関連物質が抗原または抗体である、請求項 1 に記載のシステム。

10

【請求項 3】

生体関連物質が核酸である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

夾雑物が非特異的反応因子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 5】

非特異的反応因子が、免疫グロブリン、M タンパク質、異好抗体およびリウマチ因子からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 4 に記載のシステム。

【請求項 6】

第 1 担体が、磁性粒子、ゲル、樹脂およびメンブレンからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のシステム。

20

【請求項 7】

前記磁性粒子を分注ノズルに装着した分注チップを用いて、分離、洗浄、または懸濁を行う請求項 6 に記載のシステム。

【請求項 8】

生体関連物質の検出用試薬が、前記生体関連物質に対する標識抗原若しくは標識抗体、または前記生体関連物質の増幅用プライマーおよびプローブを含むものである請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 9】

固相化が凍結乾燥により行われたものである請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のシステム。

30

【請求項 10】

検体、第 1 担体および第 2 担体を、それぞれ別個の収容部に収容したことを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 11】

検体を収容する検体収容部と、
 第 1 担体が収容された第 1 収容部と、
 第 2 担体が収容された第 2 収容部と、
 を略直線状に配列したことを特徴とする請求項 10 に記載のシステム。

【請求項 12】

検体を収容する検体収容部と、
 第 1 担体が収容された第 1 収容部と、
 第 2 担体が収容された第 2 収容部と、
 を一体的にカートリッジ化したことを特徴とする請求項 10 または 11 に記載のシステム。

40

【請求項 13】

前記収容部が密閉可能なものである請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 14】

検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第 1 担体を予め収容

50

した第 1 収容部と、

生体関連物質の検出用試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体から選ばれる第 2 担体を収容した第 2 収容部と、

検体を収容する検体収容部と、
を備えた試薬カートリッジ。

【請求項 15】

第 1 担体が磁性粒子である請求項 14 に記載の試薬カートリッジ。

【請求項 16】

分注ノズルに装着した分注チップ内にて分離される磁性粒子を、予め複数の試薬を備えた試薬カートリッジウェルに移送する請求項 15 に記載の試薬カートリッジ

10

【請求項 17】

固相化が凍結乾燥により行われたものである請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の試薬カートリッジ。

【請求項 18】

前記収容部が密閉可能なものである請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の試薬カートリッジ。

【請求項 19】

検体を収容する検体収容部と、

第 1 担体が収容された第 1 収容部と、

第 2 担体が収容された第 2 収容部と、

を略直線状に配列したことを特徴とする請求項 14 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の試薬カートリッジ。

20

【請求項 20】

検体中の生体関連物質を測定する前の検体の前処理方法であって、

検体中に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第 1 担体を用いて前記検体を処理する工程を含む前記方法。

【請求項 21】

生体関連物質の検出用試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体から選ばれる第 2 担体を調製する工程をさらに含む請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

生体関連物質が抗原または抗体である、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

生体関連物質が核酸である、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 24】

夾雑物が非特異的反応因子である、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 25】

非特異的反応因子が、免疫グロブリン、M タンパク質、異好抗体、およびリウマチ因子からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 26】

第 1 担体が、磁性粒子、ゲル、樹脂およびメンブレンからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 20 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

磁性粒子を、分注ノズルに装着した分注チップ内で、分離、洗浄、または懸濁処理を行う、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

生体関連物質の検出用試薬が、前記生体関連物質に対する標識抗原若しくは標識抗体、または前記生体関連物質の増幅用プライマーおよびプローブを含むものである請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 29】

固相化が凍結乾燥により行われたものである請求項 21 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 18 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法によって前処理された検体を測定デバイスに供して、検体中の生体関連物質を測定することを特徴とする生体関連物質の測定方法。

【請求項 31】

測定が免疫学的測定または核酸増幅法による測定である請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

核酸増幅法が PCR 法である請求項 31 に記載の方法。

10

【請求項 33】

検体の前処理と、この処理された検体の測定とを請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のシステムを用いて行う請求項 20 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

検体の前処理と、この処理された検体の測定とを連続して行う請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

(a) 検体を収容する検体収容部と、

(b) 検体から標的核酸を補足する捕捉粒子を収容する第 1 収容部と、

(c) 標的核酸の検出用試薬を収容する第 2 収容部と、

20

(d) 前記検体を検体収容部に分注する分注機構、前記検体と補足粒子とを混合して検体から標的核酸を抽出する機構、および前記抽出された標的核酸と検出用試薬とを混合する機構と、

(e) 前記第 2 収容部に標的核酸と検出用試薬との混合流体よりも比重の小さい疎水性流体を注入する機構、前記各収容部を覆う蓋を脱着させる機構、標的核酸を蛍光させるための照射光を投射する機構および該照射光を受けた標的核酸からの光を受けて標的核酸を検出する機構、並びにこれらの機構を組み合わせた機構からなる群から選ばれるいずれかの機構とを備えた核酸測定装置。

【請求項 36】

前記捕捉粒子が磁性粒子であり、

30

前記磁性粒子を分注ノズルに装着した分注チップ内で、分離、洗浄、または懸濁を行う工程を制御する請求項 35 に記載の核酸測定装置。

【請求項 37】

前記磁性粒子を分注チップ内に収容する請求項 35 または 36 に記載の核酸測定装置。

【請求項 38】

疎水性流体が、炭素数 16 ~ 20 の鉱油である請求項 35 に記載の装置。

【請求項 39】

前記(d)および(d)の機構は収容部の上部をスライドする機構を備えたものである請求項 35 に記載の装置。

【請求項 40】

40

前記(d)の機構、前記(e)の機構、または前記(d)と(e)との組み合わせの機構は同一ノズル内に内蔵されたものである請求項 35 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 41】

前記検体収容部、第 1 収容部、および第 2 収容部を略直線状に配列したことを特徴とする請求項 35 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 42】

前記検出用試薬は、PCR 法または等温増幅法による核酸増幅用試薬および増幅産物の検出用試薬を含むものである請求項 35 ~ 41 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 43】

前記検出用試薬が予め凍結乾燥されたものである請求項 35 ~ 42 のいずれか 1 項に記載

50

載の装置。

【請求項 4 4】

前記第 1 および第 2 収容部をカートリッジ化したことを特徴とする請求項 3 5 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 4 5】

請求項 3 5 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の装置に供して核酸の抽出および検出を行うことを特徴とする核酸の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、生体関連物質を含有する検体を測定に供する前に前処理する方法、および検体中の生体関連物質の測定システムに関するものである。

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体作製法が確立されて以来、検体中から目的の生体関連物質を測定する方法として、エンザイムイムノアッセイなどの免疫学的測定法が主要な測定法となっている。このような免疫学的測定法は、高い特異性を有するために直接測定が可能となり、また、高感度に測定することができる。そして近年、これらの測定法は、採取した検体のセット後から測定結果を得るまで測定システムによって自動化されている。また、測定をより迅速化するため、従来よりも固相化抗体やコンジュゲートの濃度を高めた試薬が開発されている。しかしながら、より高濃度の試薬を使用することで、従来測定時に関係しなかった非特異的反応が生じることが多くなった。

20

【0003】

非特異的反応の原因として、対象物質の多様性、免疫類似物質の存在、抗原の多様性、さらに抗体の多様性が考えられる。免疫学的測定系には種々の非特異的反応を起こす物質として、I g A、I g M、I g G 型の異好抗体（異種動物間で反応する抗体：H A M A、抗 B S A 抗体など）、生体成分（例えば、リウマチ因子、クリオグロブリン、M タンパク質など）が存在し、免疫学的測定において非特異的反応の結果として偽陽性を示す場合がある（非特許文献 1、2、3 参照）。さらに、細菌の表面には糖鎖などの癌関連抗原が存在することから、細菌に感染した症例では、癌に罹患していないにも関わらず、癌の検査において偽陽性を示すことが少なくない。さらに、癌患者において臓器を摘出する際の術中の細菌感染などによる非特異的反応により偽陽性を示すこともある。

30

【0004】

また、妊娠時や肝臓、腎臓等の疾病罹患時に非特異的反応が生じることが多い。さらに、近年開発されている多くの試薬にリコンビナント抗原が使用されているが、これらリコンビナント抗原の作製の際に使用されている細菌成分の存在により、これら細菌に対する抗体が測定系に影響を与えることも知られている。一般に、免疫学的測定を行う際にこれら非特異的反応物質に対する阻害物質が加えられるが、試薬中に加えられる量には限度があるため必ずしも十分満足な阻害効果を得られるわけではない。このため、現在使用されている測定システムでは、非特異的反応因子を除去することが困難であり、非特異的反応を十分に阻害して測定することは困難である。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Marlen Bouillon, et al. Reduced frequency of blood donors with false-positive HIV-1 and -2 antibody EIA reactivity after elusion of low-affinity nonspecific natural antibodies. TRANSFUSION. volume 42 August

50

2002 1046 - 1052 .

【0006】

【非特許文献2】Johan Bjerner , et al . Incidence and Prevention . Clinical Chemistry . 48 : 4 613 - 621 (2002) .

【0007】

【非特許文献3】Michael Covinsky , et al . An IgM Antibody to Escherichia coli Produces False - Positive Results in Multiple Immunometric Assays Michael Covinsky . Clinical Chemistry . 46 : 8 1157 - 1161 (2000) .

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、測定に供される検体の中から夾雑物を予め除去することができる前処理方法、および当該前処理された検体を用いる測定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、検体を前処理した後に測定を行うことにより高感度に生体関連物質を測定できることを見出し、本発明を完成するに到った。即ち本発明は、

20

検体中の生体関連物質の測定システムであって、

検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第1担体と、

生体関連物質の検出用試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体から選ばれる第2担体とを備えたことを特徴とするものである。

【0010】

本発明においては、生体関連物質は、抗原もしくは抗体であるか、または核酸であってよい。

30

【0011】

また、検体中の夾雑物は、非特異的反応因子であってもよく、非特異的反応因子は、免疫グロブリン、Mタンパク質、異好抗体およびリウマチ因子からなる群から選択される少なくとも1つであってもよい。

【0012】

第1担体としては、例えば、磁性粒子、ゲル、樹脂およびメンブレンからなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。また、この磁性粒子は分注ノズルに装着される分注チップ内に収容可能であることが好ましく、この場合、この磁性粒子を用いて分注チップ内で分離、洗浄、懸濁などの処理を行うことが好ましい。

【0013】

また、生体関連物質の検出用試薬は、前記生体関連物質に対する標識抗原若しくは標識抗体、または前記生体関連物質の増幅用プライマーおよびプローブを含むものであることが好ましい。

40

【0014】

本発明の1つの態様では、検出用試薬の固相化は凍結乾燥により実行することが好ましい。

【0015】

また、検体、第1担体、および第2担体は、それぞれ別個のウェルまたはチップなどの収容部に収容することが好ましい。

【0016】

50

さらに、本発明のシステムは、検体を収容する収容部（ウェルまたはチップ）と、第1担体が収容された収容部と、第2担体が収容された収容部と、を略直線状に配列したことを特徴とする。

【0017】

また、本発明のシステムは、検体を収容する検体収容部と、第1担体が収容された収容部と、第2担体が収容された収容部と、を一体的にカートリッジ化したことを特徴とする。

【0018】

上記システムにおいて、収容部は密閉可能とすることが好ましい。

【0019】

さらに、本発明のカートリッジは、検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第1担体を予め収容した収容部と、生体関連物質の検出用試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体から選ばれる第2担体を収容した収容部と、検体を収容する検体収容部と、を備えたことを特徴とする。

【0020】

上記カートリッジにおいて、第1担体は磁性粒子であることが好ましい。

【0021】

また、このカートリッジにおいて、固相化は凍結乾燥により実行することが好ましい。

【0022】

このカートリッジにおいて、収容部は密閉可能なものであってもよい。

【0023】

さらに、このカートリッジは、検体を収容する検体収容部と、第1担体が収容された収容部と、第2担体が収容された収容部と、を略直線状に配列したことを特徴とする。

【0024】

本発明の前処理方法は、検体中の生体関連物質を測定する前の検体の前処理方法であって、検体中に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第1担体を用いて前記検体を処理する工程を含むことを特徴とするものである。

【0025】

さらに、本発明の前処理方法は、生体関連物質の検出用試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体から選ばれる第2担体を調製する工程をさらに含むことを特徴とする。

【0026】

なお、上記前処理方法において、生体関連物質は、抗原もしくは抗体、または核酸であってもよい。

【0027】

夾雑物としては、例えば、非特異的反応因子が挙げられる。

【0028】

また、非特異的反応因子は、免疫グロブリン、Mタンパク質、異好抗体、およびリウマチ因子からなる群から選択される少なくとも1つであってもよい。

【0029】

第1担体としては、例えば、磁性粒子、ゲル、樹脂およびメンブレンからなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。

【0030】

また、生体関連物質の検出用試薬は、前記生体関連物質に対する標識抗原若しくは標識抗体、または前記生体関連物質の増幅用プライマーおよびプローブを含むものであることが好ましい。

【0031】

また、この前処理方法においては、固相化は凍結乾燥により実行することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0032】

さらに、本発明においては、前処理された検体を測定デバイスに供して、検体中の生体関連物質を測定してもよい。

また、測定は免疫学的測定または核酸増幅法による測定であることが好ましい。

【0033】

核酸増幅法としては、例えば、PCR法、または等温増幅法が挙げられる。核酸の増幅時には、ミネラルオイル等の疎水性流体によって、標的核酸含有溶液と増幅試薬との混合物をウェルやチップなどの収容部内にシール（封止）することが好ましい。

【0034】

本発明において、検体の前処理と、この処理された検体の測定とは連続して実行することができる。

10

【0035】

さらに本発明の核酸増幅装置では、

(a) 検体を収容する検体収容部と、

(b) 検体から標的核酸を補足する捕捉粒子を収容する第1収容部と、

(c) 標的核酸の検出用試薬を収容する第2収容部と、

(d) 前記検体を検体収容部に分注する分注機構、前記検体と補足粒子とを混合して検体から標的核酸を抽出する機構、および前記抽出された標的核酸と検出用試薬とを混合する機構と、

(e) 前記第2収容部に標的核酸と検出用試薬との混合流体よりも比重の小さい疎水性流体を注入する機構、前記各収容部を覆う蓋を脱着させる機構、標的核酸を蛍光させるための照射光を投射する機構および該照射光を受けた標的核酸からの光を受けて標的核酸を検出する機構、並びにこれらの機構を組み合わせた機構からなる群から選ばれるいずれかの機構とを備えたことを特徴とする。

20

【発明の効果】

【0036】

本発明によれば、極めて高感度に生体関連物質を測定することができる。

【0037】

従来の検体の測定システムでは、夾雑物が検体から十分に除去されずに生体関連物質の測定が行われたが、本発明により、夾雑物を除去することができ、生体関連物質の測定感度を高めることが可能となる。また、本発明により、検体の前処理、および前処理された検体の生体関連物質の測定を自動的かつ連続的に行うことができる。さらに、従来は夾雑物の介入を避けるために測定用の検体に夾雑物を失活させる試薬を手動で添加する必要があったが、本発明によりこのような試薬を手動で添加する必要はなく極めて簡便に測定結果を取得することが可能となる。

30

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】第1担体と第2担体との組み合わせを例示した説明図である。

【図2】夾雑物に対して親和性を有する物質が固定された第1担体を用いて夾雑物を除去する態様を概略的に説明する説明図である。

40

【図3】夾雑物を分解する物質によって夾雑物を分解する態様を概略的に示した説明図である。

【図4】生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第1担体を用いて生体関連物質を抽出する態様を概略的に説明する説明図である。

【図5】生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第2担体を用いて生体関連物質を抽出し標識化する態様を概略的に説明する説明図である。

【図6】非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いた前処理から検体に含まれる抗原の検出までの全工程を概略的に示した説明図である。

【図7】非特異的反応因子に対する抗体が固定された担体を用いた前処理から検体に含まれる抗原の検出までの全工程を概略的に示した説明図である。

50

【図 8】非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて行われる夾雑物の除去処理を説明する説明図である。

【図 9】非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートである。

【図 10】非特異的反応因子に対する抗体が固定されたカラムを用いて行われる夾雑物の除去処理を説明する説明図である。

【図 11】非特異的反応因子に対する抗体が固定されたカラムを用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートである。

【図 12】非特異的反応因子に対する抗体が固定されたメンブレンを用いて行われる夾雑物の除去処理を説明する説明図である。

【図 13】非特異的反応因子に対する抗体が固定されたメンブレンを用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートである。

【図 14】還元剤が固定されたゲルを用いて行われる夾雑物の除去処理を説明する説明図である。

【図 15】還元剤が固定されたゲルを用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートである。

【図 16】核酸と親和性を有するプローブが固定された磁性粒子を用いて行われる抽出処理を説明する説明図である。

【図 17】核酸と親和性を有するプローブが固定された磁性粒子を用いて行われる核酸抽出処理のフローチャートである。

【図 18】抗原に対する抗体が固定された磁性粒子、抗原に対する抗体が固定されたプレート、抗原に対する抗体が固定されたビーズを模式的に説明する説明図である。

【図 19】第 2 担体を用いて抗原を捕捉し標識化して検出する態様について概略的に説明する説明図である。

【図 20】磁性粒子を用いて行われる免疫学的測定を説明する説明図である。

【図 21】抗原分別固定チューブを用いて行われる免疫学的測定を説明する説明図である。

【図 22】測定システムを機能的にまとめたブロック図である。

【図 23】非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて前処理が実行された後に続けて免疫学的測定を実行する際のフローチャートである。

【図 24】非特異的反応因子に対する抗体が固定されたカラムを用いて前処理が実行された後に続けて免疫学的測定を実行する際のフローチャートである。

【図 25】前処理用の磁性粒子や基質役を予め収容したカートリッジを利用する測定システムの概略図である。

【図 26】カートリッジを利用する測定システムの作動形態について概略的に説明する説明図である。

【図 27】カートリッジを利用する測定システムの前処理工程について示した説明図である。

【図 28】カートリッジを利用した測定工程について示した説明図である。

【図 29】別形態のカートリッジについて概略的に説明する説明図である。

【図 30】検体からの核酸の抽出から第 2 担体の調製までの前処理工程を概略的に示した説明図である。

【図 31】ライン状に並べられた複数のウェルが 1 2 列並べられた処理部について概略的に説明する説明図である。

【図 32】測定システムを機能ごとに図示した機能ブロック図である。

【図 33】測定システムで実行される処理工程を示したフローチャートである。

【図 34】カートリッジを利用して核酸を前処理することができる測定システムの概略図である。

【図 35】マスターミクスチャを収容したウェルをカートリッジの長手方向に沿って一部切断したカートリッジの斜視断面図である。

10

20

30

40

50

【図36】測定サンプルが収容されたウェルとマスターミックスが収容されたウェルとをカートリッジ本体から分離する態様について説明する説明図である。

【図37】ライン状に並べられた複数のウェルを用いて核酸の検出を実行する態様について説明する説明図である。

【図38】ウェルが配列された複数の処理ラインを有するカートリッジと、このカートリッジ上を処理ラインに沿って移動するノズルユニットとを示した斜視図である。

【図39】ポンピング開口と、トリガー光照射用光ファイバと、検出用のレンズとを備えたノズルユニット先端部の斜視図である。

【図40】ノズルユニット先端部を、光ファイバの延伸方向と平行な平面で切断した断面図である。

【図41】核酸検出装置を機能ブロックごとにまとめた機能ブロック図である。

【図42】ポンピング開口と、トリガー光照射用光ファイバと、検出用のレンズとを備えたノズルユニットを1本だけ備えた核酸検出装置を概略的に示した斜視図である。

【図43】処理ラインごとに備えられた分注用のノズルと単一の核酸検出器とを別個に備えた核酸検出装置の要部を示した斜視図である。

【図44】処理ラインごとに核酸の検出器を備えた核酸検出装置の斜視図である。

【図45】分注用のノズルの外部に、光ファイバを備えた態様について示した断面図である。

【図46】単一の検出器と、この検出器に各検出用ウェルを選択的に対応させる切り替え装置と、を備えた核酸検出装置の概略を示した説明図である。

【図47】血清へのAFPの添加に基づく、AFP値を求めるための標準曲線を示したグラフである。

【図48】PBS緩衝液へのAFPの添加に基づく、AFP値を求めるための標準曲線を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0039】

1. 概要

本発明は、検体中の標的物質を測定するため、機能の異なる複数種類の担体を利用した検体の測定システムおよび検体の前処理方法に関するものである。本発明の測定システムは、生体関連物質を含有した検体に対して用いることができ、機能の異なる複数の担体を用いて検体を処理して標的である生体関連物質の測定を高い精度で実行するものである。機能の異なる複数の担体としては、例えば、検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第1担体と、生体関連物質の検出用の試薬が固定された担体、および生体関連物質の検出用の試薬を固相化してなる担体から選ばれる第2担体とを用いることができる。「親和性を有する」とは物質(物質A、B)同士の相互間で化学的または物理的に相互作用して結びつきが強まることを意味する。また、「不活性化する」とは、保有する機能を呈さないようにすることを意味する。物質Aと、物質Aに対して親和性を有する物質Bとの組み合わせとして、例えば、抗原と抗体、リガンドと受容体、核酸とその相補鎖などが挙げられる。夾雑物を除去するための第1担体としては、例えば、非特異的反応因子に対する抗体が固定された物質(磁性粒子、カラム、濾材、高分子材料など)を備えたものが挙げられる。また、夾雑物を分解するための第1担体としては、例えば、非特異的反応因子を分解する還元剤を備えたものが挙げられる。また、生体関連物質を抽出するための第1担体としては、例えば、生体関連物質である核酸と親和性を有するプローブが固定された磁性粒子などが挙げられる。これら例示した第1担体を用いることで、検体からの夾雑物の除去や検体からの生体関連物質の抽出を実行することができる。

【0040】

図1に示すように、第1の担体として、検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質が固定された担体、夾雑物を不活性化する物質が固定された担体、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された担体の3種が挙げられ、第2担体と

10

20

30

40

50

して、生体関連物質の検出用の試薬が固定された担体、生体関連物質の検出用の試薬を固相化してなる担体の2種が挙げられ、このため第1担体と第2担体との組み合わせは少なくとも6通り考えられ、これらの組み合わせを用いて検体を処理することで様々な処理態様を形成することができる。

図2～5に本発明のシステムにおける原理の概略的な説明図を示す。例えば、図2に示すように、第1担体として、検体に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質が固定された担体を用いて検体を処理することにより担体が夾雑物を捕捉し、この担体を回収（除去）することにより検体から夾雑物を除去できる。また、図3に示すように、第1担体として、検体に含まれる夾雑物を不活性化する物質（不活性化物質）が固定された担体を用いることにより検体中の夾雑物を分解することができる。これにより結果的に検体から夾雑物を除去することができる。生体関連物質の取得後、第2担体として、生体関連物質検出用の試薬が固定された担体を用いることにより、検体中の生体関連物質を検出することができる。また、図4に示すように、第1担体として、検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された担体を用いることで検体から生体関連物質のみを抽出することができ、生体関連物質の測定時などにおける夾雑物による障害を防止することができる。

本発明においては、図1に示したように、上記に例示した担体以外の第1、第2担体の組み合わせも可能であり、それぞれの組み合わせに応じて異なる処理を検体に対して実施することができる。また、夾雑物と親和性を有する物質が固定された第1担体を用いた後、さらに生体関連物質と親和性を有する物質が固定された第1担体を用いて検体を処理してもよい。

【0041】

第1担体を用いて生体関連物質が取得された後、第2担体を用いて生体関連物質を測定することができる。第1担体は、検体中の生体関連物質の高純度化または抽出などを行うための担体であり、本発明の前処理に使用される担体である。第2担体は、生体関連物質を検出するための測定試薬が固定された、または固定化されてなる担体である。本発明においては、第2担体を調製せずに別途試薬と反応させて測定工程を実施することも可能であるが、装置による全自動化を行うことを考慮すると、第2担体を予め調製しておくことが好ましい。また、第2担体だけでなく第1担体も予め調製しておくことでさらに高い効率で利便性の高い作業を実現できる。

【0042】

図5に示すように、生体関連物質と親和性を有する物質（親和性物質）が固定された第2担体を生体関連物質に結合させ、さらに、標識化物質が固定された第2担体を生体関連物質に結合させて生体関連物質を検出する。なお、生体関連物質と親和性を有する第1担体を用いた場合は、生体関連物質と親和性を有する第2担体の使用を省略可能な場合があり、この場合は第1担体を用いた処理が実施された検体に対して標識化物質が固定された第2担体を直ちに使用することができる。

【0043】

また、本発明の前処理方法は、検体中の生体関連物質を測定する前の検体の前処理方法であって、検体中に含まれる夾雑物に対して親和性を有する物質、該夾雑物を不活性化する物質、または検体中の生体関連物質に対して親和性を有する物質が固定された第1担体を用いて前記検体を処理する工程を含むことを特徴とする。この前処理は、検体中に含まれる夾雑物を除去すること、および検体中に含まれる生体関連物質を抽出または精製することのいずれをも意味するものである。

【0044】

さらに、本発明の前処理には、生体関連物質と親和性を有する物質、および/または生体関連物質を標識化する物質が固定された第2担体を調製する工程を含めることができる。第2担体の調製は、第1担体による処理と同時にまたは時期を前後して行うことができる。生体関連物質が抗原または抗体の場合には、後の測定工程で抗体または抗原を標識化して検出するための準備が整い、また生体関連物質が核酸の場合には、後の工程で核酸を標識化して検出するための準備が整うこととなる。

【 0 0 4 5 】

以上に述べたような前処理を実行した後に、測定工程が実行される。測定対象である生体関連物質が抗原または抗体である場合、第1担体として、検体中の夾雑物と親和性を有する物質が固定された磁性粒子、ゲル、メンブレンなどの保持体が挙げられ、第2担体として、当該抗原に対する抗体が固定された物質（磁性粒子、ビーズなど）が挙げられる。

また、生体関連物質がDNA、RNAなどの核酸の場合では、第1担体として検体中のDNA/RNAと親和性を有する物質が固定されたものが挙げられ、第2担体として、抽出、分離または精製されたDNA/RNAの特定の塩基配列部分を増幅測定するために必要な反応試薬（プローブ、プライマー、マスターミクスチャ等）が固相化されたものが挙げられる。

10

【 0 0 4 6 】

さらに具体的には、例えば、生体関連物質が腫瘍マーカー（例えばCA19-9）の場合、測定時における偽陽性反応を防止するために、第1担体として、反応阻害物質となるIgMなどを除去するための夾雑物と結合する物質（例えば、IgM抗体）を固定した担体（磁性粒子または非磁性固体）が使用される。そして、第2担体として、腫瘍マーカー抗体（例えば抗CA19-9抗体）を固定した磁性または非磁性固体が使用される。測定は、第2担体が含まれる容器に、第1担体を用いて処理された生体関連物質（上記例ではCA19-9）および基質溶液を加えて測定する。

【 0 0 4 7 】

また、測定対象の生体関連物質が核酸（例えばインフルエンザウイルスRNA）の場合、第1担体として、ウイルスRNAの抽出、分離または精製を行うための磁性粒子が使用され、第2担体として、上記抽出、分離または精製されたRNAの特定の塩基配列部分をPCRその他増幅測定するために必要な反応試薬を備えた担体を使用される。測定は、第2担体が含まれる容器に、第1担体を用いて処理された生体関連物質（上記例ではインフルエンザウイルスRNA）および増幅用反応試薬を加えて行う。

20

【 0 0 4 8 】

本発明は1つの態様において、このような検体中の非特異的反応因子を除去する処理、生体関連物質と親和性を有する、および/または生体関連物質を標識化する物質が固定された第2担体を調製する処理を1つの装置で連続して行うものである。これを実現した装置を、本発明では測定システムという。

30

【 0 0 4 9 】

図6に示すように、測定システムでは、前処理工程として、生体関連物質を含有する検体の処理工程、例えば夾雑物を除去する工程と、第2担体を調製する工程とが実行され、検体中の生体関連物質を検出する工程は、検体中の生体関連物質を標識化する標識化反応工程と標識化された生体関連物質を測定する測定工程とを有する。従って、測定システムでは、大別して(i)第1担体を用いた検体の処理工程、(ii)第2担体の調製工程、(iii)前処理後に行われる測定工程、の3つの工程が実行され、基本的には(i)の工程を前処理という。ただし、(ii)の工程を(i)の工程と合わせて前処理工程とすることができる。(i)の工程は、測定対象の生体関連物質の高純度化または抽出を行う試験管内環境を整える処理であり、(ii)の工程は生体関連物質を検出するための試薬が含まれる試験管内環境を整えるものと理解することができ、検体中の生体関連物質を測定可能にするための、いわばサンプルおよびサンプル測定試薬の準備工程を意味する。図6は第2担体の調製を前処理工程に含めて表示したものである。

40

【 0 0 5 0 】

第1担体を用いて検体を処理する工程は、夾雑物の除去工程、生体関連物質の高純度化または抽出工程を意味する。この工程は第2担体の調製に合わせて適宜選択することができる。例えば、(a)磁性粒子を利用して所望の生体関連物質を選択的に収集する手法、(b)所望する複数種類の生体関連物質を同時に収集する手法などが可能である。検出の対象である生体関連物質が抗原または抗体などのタンパク質の場合は、主として、(1)非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を利用して非特異的反応因子を捕捉

50

除去する手法、(2)非特異的反応因子に対する抗体が固定されたアフィニティゲルを利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手法、(3)非特異的反応因子に対する抗体が固定されたフィルタを利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手法、(4)非特異的反応因子に対する抗体が固定されたプラスチック担体を利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手法、および(5)還元剤が固定されたゲルを用いて非特異的反応因子を分解する手法、などの態様がある。また、生体関連物質がDNAやRNAなどの核酸の場合は、標的核酸と結合可能なプローブが固定された磁性粒子を用いて標的核酸を抽出する手法などがある。

【0051】

本発明の測定システムは、前処理工程に引き続き連続的に免疫学的測定または核酸測定などの測定を実行することができる。測定システムは、ノズル、分注チップであるピペットチップ、複数のウェルが配列されたウェルプレート等の収容部、ポンプ機構等を備える。収容部は、磁性粒子液、洗浄液、酵素標識液、基質液等を収容できる。ピペットチップ移動時の動きはモータやモータコントローラ等によって自動制御することができる。ウェルの材質は検出方法に鑑みて適宜選択するとよい。例えば、CLIA検査やCLEIA検査の場合は、相互の発光影響を受けない不透明な材質で形成し、EIA(ELISA)検査の場合は、透過光を扱う関係上、透明な材質で形成するとよい。なお、後述するが、非特異的反応因子を捕捉する磁性粒子とは、例えば、非特異的反応因子に対する抗体を表面に固定でき、B/F分離(結合体と非結合体との分離)等を行うための磁性物質をいう。

【0052】

図6は、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたアフィニティゲルを利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手法を用いて検体を処理し、次いで磁性粒子を利用して所望の生体関連物質を選択的に収集する手法を用いて生体関連物質の標識化を行うプロセスの全体を示すものである。但し、第2担体の調製は、図6に示す順序でなくてもよく、夾雑物の除去工程中または除去工程前でもよい。図6に示した態様とは別の処理を行った場合については、図7に示した。図7は、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手法を用いて検体の前処理を実行し、次いで磁性粒子を利用して所望の生体関連物質を選択的に収集する手法を用いて生体関連物質の検出を行うプロセスの全体を示すものである。測定対象である生体関連物質が核酸の場合は、検体中の標的核酸を測定する工程の前に、第1担体を用いて核酸を抽出する工程が実行される。以下に、前処理工程、および測定工程等の各工程等についてさらに詳しく説明する。

【0053】

2. 生体関連物質および検体

本発明において「生体関連物質」とは、測定工程における検出の対象となりうる物質であって、微生物、ウイルス、細胞、核酸、多糖、単純タンパク質、複合タンパク質、低分子などのあらゆる生体物質を意味する。

【0054】

微生物には真菌および真正細菌および古細菌が含まれる。真菌としては、例えば、サッカロマイセス属、アスペルギルス属、カンジダ属に属する微生物などが挙げられる。真正細菌としては、例えば、マイコバクテリウム属、エッシェリヒア属、バチルス属、リステリア属、ピブリオ属、サルモネラ属、シュードモナス属、スタフィロコッカス属、マイコプラズマ属、リケッチア属、クラミジア属などに属する微生物が挙げられる。古細菌としては、例えば、サーモプラズマ属、ハロバクテリウム属、メタノバクテリウム属に属する微生物などが挙げられる。具体的には、サッカロマイセス・セレビスシエ種、アスペルギルス・ニデュランス種、カンジダ・アルピカンス種、マイコバクテリウム・ツベルクローシス種、マイコバクテリウム・アビウム種、マイコバクテリウム・イントラセルラー種、マイコバクテリウム・カンサシー種、エッシェリヒア・コリ種、バチルス・セレウス種、バチルス・アンスラシス種、リステリア・モノサイトゲネス種、ピブリオ・パラヘモリティカス種、ピブリオ・コレラ種、サルモネラ・チフス種、シュードモナス・エレギノーサ

10

20

30

40

50

種、スタフィロコッカス・アウレウス属、マイコプラズマ・ニューモニア種、リケッチア・プロワツェキ種、クラミジア・トラコマチス種などを例示し得る。

【0055】

ウイルスとしては、例えば、アデノウイルス科、バクテリオファージ科、レトロウイルス科に属するウイルスなどが挙げられる。具体的には、アデノウイルス、T7様ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ノロウイルス、ヒトロタウイルス、インフルエンザウイルスなどを例示し得る。細胞は動物細胞、植物細胞、昆虫細胞のいずれも含まれる。核酸としては、DNA、RNA、人工核酸などが挙げられる。多糖としては、デンプン、グリコーゲン、キチン、カラギーナンなどが挙げられる。タンパク質としては、抗原、抗体、酵素、色素タンパク質その他ポリペプチドなどが挙げられる。低分子としては、ヌクレオチド三リン酸またはデオキシヌクレオチド三リン酸などのヌクレオチド、グルコースまたはガラクトースなどの糖、グルタミン酸またはリジンなどのアミノ酸、フルオロセインまたはエチジウムプロマイドなどの色素、エピネフリンまたはペプチドホルモンまたはステロイドなどのホルモンが挙げられる。但し、上記生体関連物質は例示であり、これらの物質に限定されるものではない。検体はこれらの生体関連物質を含む限り特に限定されるものではなく、例えば、(i)痰、喀痰、唾液、口腔洗浄液、胃液、胸腔洗浄液、血液、血清、血漿、糞便、尿、髄液、精液等の臨床材料、(ii)細胞溶解液、組織溶解液、細胞培養物、組織培養物等の生物材料、(iii)家庭排水、工業排水などの排水、(iv)海洋水、河川水、池水、湖水、地下水などの環境水、(v)飲用水、食物等洗浄液、および生体関連物質が存在し得る道具の洗浄用液、が検体に含まれる。「生体関連物質が存在し得る道具の洗浄用液」とは、生体関連物質の存在を確認したい箇所を拭き取った道具の洗浄用液、または生体関連物質の存在を確認したい箇所を洗い流した洗浄用液を意味し、例えば、調理用包丁の洗浄液、拭き取りクロス(台布巾)で物を拭き取った後の洗浄用液などが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0056】

本発明において、夾雑物の除去処理によって除去される非特異的反応因子は、処理対象となる検体に応じて種々考えられるが、検体として血清を使用するときは、免疫グロブリン、異好抗体、リウマチ因子(RF)、Mタンパク質などが非特異的反応因子となる。Mタンパク質は、単クローン性(モノクローナル)免疫グロブリンと同義であって1種類の免疫グロブリンが増加した場合に見られるそのタンパク質を指し、例えば、骨髄腫が産生する免疫グロブリンタンパク質は、多発性骨髄腫を代表する形質細胞異常増殖症患者の血清中に出現するMタンパク質である。なおMタンパクには、Mタンパクを産生する骨髄腫によりIgA、IgM、IgG、IgE、およびBence-Jonesタンパクの5種がある。また、異好抗体(heterophilic antibody:HA)はヒト抗体-動物抗体であり、健康なヒトにも通常、数パーセントの割合で存在する。異好抗体にはヒト抗体-マウス抗体(HAMA)、ヒト抗体-ヒツジ抗体(HASA)、ヒト抗体-ヤギ抗体(HAGA)などがある。これらの異好抗体が検体中に存在する場合、マウス、ヤギ、ヒツジ、あるいはヤギ抗体を用いた免疫学的測定において偽陽性や偽陰性の非特異的反応を受けることとなる。検体から核酸を検出する場合は、抗体に代えて核酸の相補領域または相補領域を含む核酸を用いて目的の核酸を検出することができる。検出時に用いられる核酸の増幅には、例えばPCR法を適用できるが、これに限らず目的に合わせて適宜他の増幅方法(LAMP法等の等温増幅法)を用いるとよい。

【0057】

3. 第1担体を用いた検体処理

この処理によって、免疫学的測定分野で従来、回避できなかった偽陽性反応または偽陰性反応の原因となる非特異的反応因子を予め除去することができるため、極めて特異的かつ高感度に生体関連物質を検出することができる。第1担体として、磁性粒子、ゲル状部材、メンブレン、樹脂部材、線維体などを利用することができ、それぞれ適宜使い分けるとよい。後述するとおり、夾雑物の除去処理後、処理済の検体は免疫学的測定工程に供される。また、この処理によって核酸の測定分野では標的核酸を選択的に抽出することがで

き、測定時の検出感度を向上させることができる。第1担体としては、核酸捕捉用のプローブが固定された磁性粒子などを用いることができる。

【0058】

3-1 非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子による夾雑物の除去処理
図8は、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて行われる夾雑物の除去処理を示す図である。図8に示すように、ピペットチップ(分注チップ)10は、例えば、先細りした細長い略円筒形状に形成され、測定システムに着脱自在に取り付けられる。磁性粒子は、例えば、分注用のノズルに装着されたピペットチップにて、分離、洗浄、懸濁等を行うときに用いられる。図8(a)に示すように、ピペットチップ10は、ウェル12に挿入される先端部10a、測定システムのノズル(図示省略)に固定されるマウント部10b、先端部10aとマウント部10bとの間に形成され外部磁場によって磁性粒子を収容する収容部10cとを有する。先端部10aの内径は最も小さく、収容部10cは、例えば、小径部と大径部とからなり、小径部の内径は先端部の内径よりも大きく、大径部の内径はマウント部の内径よりも小さく、そしてマウント部10bの内径が最も大きい。ピペットチップの容量サイズはウェルのサイズに合わせて適宜決めることが望ましいが、例えば数マイクロリットルから数百マイクロリットルの容量とすると利便性の向上が期待できる。

10

【0059】

夾雑物の除去処理を実行する測定システムは、収容部10cの外周に接離可能に設けられ磁性粒子を磁力によって拘束する磁石M、ピペットチップ10のマウント部10bが取り付けられるノズル、ノズルに装着されたピペットチップ10に液体の吸込や排出を実行させるためのポンプ機構等を備える。ここで、磁石Mは収容部10cのうち小径部で磁性粒子を拘束することができる(図6、図7参照)。

20

【0060】

図8(b)に示すように、ピペットチップ10がウェル12に挿入されたとき、ピペットチップ10とウェル12の間には、例えば0.2mm~0.5mm程度のクリアランスが設けられている。これによりピペットチップ挿入時における検体の外部との接触エリアを極力小さくでき、雑菌混入の危険性を低減している。なお、ピペットチップ10の形状は適宜変更してよいが、ピペットチップ10がウェル12に挿入された際のウェル12とピペットチップ10との間のクリアランスは狭い方が好ましい。

30

【0061】

磁性粒子14は磁性を有し、その大きさは、例えば0.1 μ m~100 μ m、好ましくは0.1 μ m~10 μ m程度のサイズに形成されている。磁性粒子14の、サイズ、質量、材料、構造、その性質(常磁性、超常磁性、強磁性等、フェリ磁性、磁力の大きさ)等は、その処理目的に応じて任意に定めてよい。この磁性粒子は、水酸化鉄、酸化鉄水和物、酸化鉄、混合酸化鉄、あるいは鉄、 $-Fe_2O_3$ 、 Fe_3O_4 等によって形成することができる。

【0062】

図9は、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートを示す図である。図9に示すように、測定システムが上記のウェルとピペットチップとを用いて検体の前処理を行なう場合、まず、ウェルに収容された検体をピペットチップ10で所定量吸引する。次に、この検体が吸引されたピペットチップ10を前処理用磁性粒子液が収容されたウェル12に移動させ、前処理用磁性粒子液を収容したウェル12にピペットチップ10内の検体を排出する。ピペットチップ10を用いて検体と前処理用磁性粒子液との混合操作を繰り返し、吸込および排出させて流動攪拌しながら均一な懸濁液を形成する。攪拌終了から所要時間静置して、前処理用磁性体に固定された非特異的反応因子に対する抗体に、検体中の非特異的反応因子を結合させる。所定時間経過後、静置された懸濁液をピペットチップ10内に吸い込む工程を実行する。

40

【0063】

図8(c)に示すように、ピペットチップ10に吸い込まれた懸濁液はピペットチップ

50

10の収容部10cに収容される。懸濁液に懸濁した前処理用磁性粒子14は、ピペットチップ10外部の磁石Mの磁場によって収容部10cの内壁面上の一定部位に遠隔的に固定される。

【0064】

懸濁液がピペットチップ10内に収容された後、前処理用磁性粒子14は磁石Mからの磁場によって一ヶ所に固定された状態で、残りの液体がウェル12内に排出される。これにより、非特異的反応因子15が結合した前処理用磁性粒子14を検体から除去し、検体から夾雑物が除去処理された測定サンプルを取得することができる。このように非特異的反応因子15に対する抗体が固定された磁性粒子14を非特異的反応因子の除去に利用することにより、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子が非特異的反応因子に遭遇する頻度を高めることができ、効率よく非特異的反応因子を捕捉して除去することができる。

10

【0065】

3-2 非特異的反応因子に対する抗体が固定されたアフィニティカラムによる夾雑物の除去処理

図10は、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたカラムを用いて行われる夾雑物の除去処理を示す図である。図11は、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたカラムを用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートを示す図である。図10および図11に示すように、カラム含有ピペットチップ20は非特異的反応因子を除去するためのカラム24を有する。図10(a)に示すように、カラム含有ピペットチップ20の外形、寸法、材料は上記のピペットチップ10と同様に形成されている。カラム24にはペレット状に形成された多数のアフィニティ樹脂26が含まれ、各アフィニティ樹脂26には非特異的反応因子を捕捉するための抗体が結合されている。図10(b)に示すように、カラム24に、ウェル12に収容された検体を通すことで検体中の非特異的反応因子が上記の抗体と結合してカラム24に捕捉される。カラム含有ピペットチップ20内に検体を吸い込んだ後にカラム含有ピペットチップ20から検体を排出する工程を所定回数繰り返すことで、より多くの非特異的反応因子をカラム24で捕捉することができる。図10(c)に示すように、検体の吸込および排出を所定回数実行した後にウェル12に排出することで、検体から非特異的反応因子を除去した測定サンプルを提供することができる。

20

【0066】

3-3 非特異的反応因子に対する抗体が固定されたメンブレン等の濾材による夾雑物の除去処理

図12は、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたメンブレンを用いて行われる夾雑物の除去処理を示す図である。図13は、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたメンブレンを用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャートを示す図である。図12および図13に示すように、メンブレン含有ピペットチップ30は非特異的反応因子を除去するためのメンブレン34を有する。図12(a)に示すように、メンブレン含有ピペットチップ30の外形、寸法、材料は上記のピペットチップ10と同様に形成されている。このメンブレン34はシート状に形成され、メンブレン34には非特異的反応因子に対する抗体が固定されている。図12(b)に示すように、メンブレン34に検体を通すことで、検体中の非特異的反応因子は上記の抗体と結合してメンブレン34に捕捉される。メンブレン含有ピペットチップ30内にウェル12内の検体を吸い込んだ後にメンブレン含有ピペットチップ30から検体を排出する工程を所定回数繰り返すことで、より多くの非特異的反応因子をメンブレン34で捕捉することができる。図12(c)に示すように、検体の吸込および排出を所定回数実行した後にウェル12に排出することで、検体から非特異的反応因子を除去した測定サンプルを提供することができる。

30

40

【0067】

3-4 還元剤が固定されたゲルによる夾雑物の除去処理

図14は、還元剤が固定されたゲルを用いて行われる夾雑物の除去処理を示す図である。図15は、還元剤が固定されたゲルを用いて行われる夾雑物の除去処理のフローチャー

50

トを示す図である。図14および図15に示すように、ゲル含有ピペットチップ40は非特異的反応因子を分解するためのゲル43を有する。図14(a)に示すように、ゲル含有ピペットチップ40の外形、寸法、材料は上記ピペットチップ10と同様に形成されている。このゲル43には、非特異的反応因子を分解するための還元剤(夾雑物を不活性化する物質)が固定されている。還元剤としては、例えば、トリス(2-カルボキシルエチル)ホスフィン(TCEP)、グルタチオン等を用いることができる。図14(b)に示すように、還元剤が固定されたゲルに検体を通すことで検体中の非特異的反応因子が還元剤によって分解される。ゲル含有ピペットチップ40内にウェル12内の検体を吸い込んだ後にゲル含有ピペットチップ40から検体を排出する工程を所定回数繰り返すことで、より多くの非特異的反応因子を還元剤で分解することができる。図14(c)に示すように、検体の吸込および排出を所定回数実行した後、ウェル12に排出することで非特異的反応因子を除去した検体を提供することができる。なお、上記ではゲルに還元剤を保持させ非特異的反応因子を分解した例を示したが、ゲルに非特異的反応因子に対する抗体を保持させてもよい。この場合、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたゲルによって非特異的反応因子を捕捉して除去することができる。

10

20

30

40

50

【0068】

3-5 その他(プラスチック部材による処理)

上記態様のほかにも、例えば、非特異的反応因子に対する抗体がプラスチック製の支持体に固定されているものでも検体を前処理することができる。例えば、支持体には、例えば複数の凹穴がマトリクス状に配列され、この凹穴内に非特異的反応因子に対する抗体が予め固定されている。検体中の非特異的反応因子がこの凹穴内に收容されると検体中の非特異的反応因子がこれに対する抗体と結合して固定される。この凹部内にピペットチップ先端部を浸漬させて液体を吸い上げることで、検体から非特異的反応因子が除去された測定サンプルを作製することができる。

【0069】

3-6 核酸捕捉用のプローブが固定された磁性粒子を用いた標的核酸の抽出処理

図16は核酸捕捉用のプローブが固定された磁性粒子(第1担体)を用いて行われる標的核酸の抽出処理について概略的に説明する説明図である。また、図17は核酸補足用のプローブが固定された磁性粒子を用いて行われる標的核酸の抽出処理におけるフローチャートを示す図である。図16に示すように、測定システムがウェルとピペットチップとを用いて検体の前処理を行なう場合、まず、ウェルに收容された検体をピペットチップ220で所定量吸引する。次に、この検体が吸引されたピペットチップ220を前処理用磁性粒子液が收容されたウェル222に移動させ、前処理用磁性粒子液を收容したウェル222にピペットチップ220内の検体を排出する。ピペットチップ220を用いて検体と前処理用磁性粒子液とを吸込排出させて均一に混合した懸濁液を形成する。攪拌終了から所定時間静置して、前処理用磁性粒子224に固定されたプローブに、検体中の標的核酸225を結合させる。

【0070】

図16(c)に示すように、所定時間の静置後、懸濁液はピペットチップ220に吸い込まれ收容部220cに收容される。懸濁液に含まれる前処理用磁性粒子224は、ピペットチップ220外部の磁石Mの磁場によって收容部220cの内壁面上の一定部位に遠隔的に固定される。懸濁液がピペットチップ220内に收容された後、前処理用磁性粒子224は磁石Mの磁場によって一ヶ所に固定された状態で、残りの液体がウェル222内に排出される。これにより、標的核酸225が結合した磁性粒子224を検体から取り出し、検体から標的核酸を抽出することができる。このように標的核酸と結合可能なプローブが固定された磁性粒子を標的核酸の抽出に用いることにより、効率よく標的核酸を捕捉して抽出することができる。

【0071】

ウェルプレート上には複数のウェル12が、例えば、一列、またはマトリクス状に配列されている。特定のウェル12には検体が予め收容され、これと別のウェルには非特異的

反応因子に対する抗体（以降、前処理用抗体という）が固定された所要量の磁性粒子（以降、前処理用磁性粒子という）を含む液体（以降、前処理用磁性粒子液という）が予め収容されている。

【0072】

本発明において、測定サンプルの検出工程に移行する前に、生体関連物質と親和性を有する物質が固定された第2担体を調製する工程が実行される。図18は、抗原に対する抗体が固定された磁性粒子、抗原に対する抗体が固定されたプレート、抗原に対する抗体が固定されたビーズを模式的に説明する説明図である。検出工程に移行する前に作製される第2担体としては、例えば図18に示すように、(a)抗原45に対する抗体46が固定された磁性粒子G、(b)抗原45に対する抗体46が固定されたプレートP、(c)抗原45に対する抗体46が固定されたビーズBなどが挙げられる。図18(a)に示すように、抗原45に対する抗体46を磁性粒子Gに固定することで、第2担体を作製することができる。また、図18(b)に示すように、抗原45に対する抗体46をプレートPに固定することにより、別の態様の第2担体を作製することができる。さらに、図18(c)に示すように、抗原45に対する抗体46をビーズBに固定することにより、さらに別の態様の第2担体を作製することができる。このように第2抗体を予め作製することにより、次の測定工程をスムーズに実行することができ、検出精度の向上などが期待できる。作製された第2の抗体には、抗原45が特異的に結合可能であり、抗原45にはさらに蛍光反応または発光反応を起こす標識物質47が抗原に対する別の抗体（二次抗体）を介して特異的に結合可能となっている。

10

20

【0073】

4. 生体関連物質の測定

生体関連物質の測定工程は、生体関連物質の標識化工程と、この標識化された生体関連物質の検出工程とを含む。以下に各工程について説明する。

4-1 標識化反応工程

標識化反応工程は標的の生体関連物質の測定工程に含まれ、第2担体を用いて行われる。図19は、第2担体を用いて抗原を捕捉し標識化して検出する態様について概略的に説明する説明図である。図19に示すように、標識化反応工程では、検体から夾雑物の除去等の処理がなされた測定サンプルから生体関連物質を捕捉して標識が付与される。生体関連物質として例えば抗原を捕捉する場合、その標識として、抗原45に結合する抗体46が用いられる。抗原45に標識47を結合させた後、後述する検出工程が行われる。図19(a)(b)に示すように、第2担体として抗原45に対する抗体46が固定された磁性粒子Gを用いた場合、および第2担体として抗原45に対する抗体46が固定されたプレートPを用いた場合は、例えば、標識化された抗原の検出は光電子増倍管(PMT)48を用いることで抗原の検出を実行することができる。また、図19(c)に示すように、第2担体として抗原45に対する抗体46が固定されたビーズBを用いた場合は、例えば、光ファイバを利用したフォトンカウンタを用いることで抗原の検出を実行することができる。以下に、検体から抗原を捕捉して標識となる抗体を付与する2つの典型的な態様についてさらに具体的に説明する。

30

40

【0074】

4-1-1 抗原に対する抗体が固定された磁性粒子を用いた抗原の標識化

ここでは第2担体として、抗原に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて単一の抗原を捕捉して標識化する態様について説明する。検体の高純度化処理後、測定システムは標識化反応工程を含む測定工程を有する免疫学的測定を実行する。ウェルプレート上の第1のウェル（第1収容部）には検出目的である抗原に対する抗体（以降、特異的反応抗体という）が固定された所要量の磁性粒子（以降、特異的反応用磁性粒子という）を含む液体（以降、特異的反応用磁性粒子液という）が予め収容され、さらに別の第2のウェル（第2収容部）には抗原に対する標識化抗体（以降、標識抗体という）を含む液体（以降、標識化液という）が予め収容され、さらに別の第3のウェルには基質液が収容されている。

50

【0075】

図20は、磁性粒子を用いて行われる免疫学的測定を示す図である。図20に示すように、夾雑物の除去等の前処理に使用されたピペットチップと同様の新たな別のピペットチップ50がノズルに付け替えられて別のウェル内に収容された特異的応用磁性粒子液をピペットチップ50内に吸い込む。図20(a)に示すように、特異的応用磁性粒子液を内側に保持したピペットチップ50は、測定サンプルを収容したウェル12へ移動制御され先端部をこのウェル12に浸漬する。磁石Mがピペットチップ50から徐々に離間して特異的応用磁性粒子を磁場による拘束から解き、特異的応用磁性粒子液を測定サンプルに混合させる。特異的応用磁性粒子液と測定サンプルとの混合液を吸込および排出して特異的応用磁性粒子が均一に懸濁した懸濁液が形成される。図20(a)~図20(b)に示すように、懸濁液の形成後、懸濁液は、例えば37℃で一定時間静置(インキュベーション)され、懸濁液内の抗原と特異的応用磁性粒子に固定された特異的応用抗体とが特異的応用して結合する。なお、上記では特異的応用磁性粒子液をピペットチップ50に吸い込んで測定サンプルが収容された検体収容部(ウェル)12に加えたが、測定サンプルをピペットチップ50に吸い込んで特異的応用磁性粒子液が収容されたウェルに加えてもよい。

10

20

30

40

50

【0076】

図20(b)に示すように、静置後、懸濁液がピペットチップ50内に収容される。懸濁液がピペットチップ50内に収容された後、磁石Mがピペットチップ50の収容部の外周に近づけられ、抗原が結合した特異的応用磁性粒子(以降、抗原結合磁性粒子という)がピペットチップ50の収容部内の一ヶ所に集められる。抗原結合磁性粒子の収集後、残り液体はウェル12に排出され抗原結合磁性粒子のみがピペットチップ50内に保持される。

【0077】

図20(b)に示すように、抗原結合磁性粒子を保持したピペットチップ50は、抗原結合磁性粒子を保持しつつ洗浄液を収容したウェル60へと移動制御される。ピペットチップ50先端部がウェル60内の洗浄液に浸漬した後、磁石Mがピペットチップ50の収容部の外周から徐々に離間しピペットチップ50内の抗原結合磁性粒子が洗浄液と混合される。抗原結合磁性粒子が混合された洗浄液はピペットチップ50によって吸込および排出されて流動攪拌される。攪拌後、抗原結合磁性粒子が混合された洗浄液がピペットチップ50内に吸い込まれ、ピペットチップ50の収容部の外周に磁石Mが接近し抗原結合磁性粒子が一ヶ所に集められる。抗原結合磁性粒子が一ヶ所に配置が拘束された後、残りの液体がウェル60に排出される。

【0078】

図20(c)に示すように、液体排出後、ピペットチップ50は抗原結合磁性粒子を保持した状態で、抗原に対する標識化抗体(酵素標識抗体)を含む標識化液を収容したウェル62に移動制御される。ピペットチップ50の先端部が標識化液に浸漬した後、磁石Mがピペットチップ50の収容部の外周から徐々に離間して抗原結合磁性粒子の拘束が解除される。抗原結合磁性粒子が混合された標識化液を吸込および排出させることで、抗原結合磁性粒子と標識化液とを混ぜ合わせて均一に懸濁することができる。懸濁後、懸濁液は、例えば37℃で一定時間静置することで抗原に酵素標識抗体を結合させることができる。

【0079】

図20(d)に示すように、一定時間静置(インキュベート)後、ピペットチップ50はウェル62内の懸濁液をゆっくりとピペットチップ50内に吸い込む。ピペットチップ50内に懸濁液を収容した後、磁石Mがピペットチップ50に接近し、収容された懸濁液に懸濁した磁性粒子を一ヶ所に拘束する。この酵素標識抗体が結合した磁性粒子(以降、標識化抗体結合磁性粒子という)の拘束後、標識化磁性粒子を除く液体がウェル62に排出され、標識化抗体結合磁性粒子のみがピペットチップ50に残る。

【0080】

この後、図20(e)に示すように、ピペットチップ50は、標識化抗体結合磁性粒子

を保持したまま洗浄液を収容した別のウェル64へと移動制御され、磁石Mが徐々にピペットチップ50から離間してウェル64内の洗浄液と標識化抗体結合磁性粒子とが混合される(図20(f)参照)。既に述べた洗浄工程と同一手順で標識化抗体結合磁性粒子の洗浄が実行された後、標識化抗体結合磁性粒子を保持したピペットチップ50が基質液を収容したウェル67に移動制御され、後述する検出工程(図20(g)参照)が開始される。

【0081】

なお、上記では抗原に対する抗体が固定された磁性粒子を夾雑物の除去等の処理が済んだ検体に混合して抗体に抗原を結合させた後に、標識化液を用いて抗原に酵素標識抗体を結合させたが、標識化の順序はこれに限らない。例えば、予め酵素標識抗体および抗体が固定された磁性粒子を用いてもよい。

10

【0082】

4-1-2 抗体固定ビーズを複数用いた複数種類の抗原の同時的標識化反応工程

上記項目[4-1-1]では単一の抗原を捕捉して標識化したが、この工程では一度に複数種類の抗原を捕捉して標識化する態様について説明する。図21は、抗原分別固定チューブを用いて行われる免疫学的測定を示す図である。図21に示すように、管状に形成された透明な抗原分別固定チューブ70は、抗原に対する抗体が予め固定された第2担体であるビーズ(以降、抗体固定ビーズという)と、一定個数の抗体固定ビーズを隔てて配置されるスペーサビーズ72とを収容し、各ビーズはチューブに沿って一列に配列されている。抗体固定ビーズは、例えば、第1の抗体が固定された第1抗体固定ビーズ74と、第2の抗体が固定された第2抗体固定ビーズ76と、第3の抗体が固定された第3抗体固定ビーズ78とがそれぞれ例えば3個ずつ連続して並び、各種類の抗体固定ビーズ74、76、78間にはスペーサビーズ72が配列されている。なお、ビーズの配列は適宜変更してよく、場合によってスペーサビーズは省略できる。

20

【0083】

抗原分別固定チューブ70は、上端部に測定システムのノズルにマウントされるマウント部(図示省略)が設けられ、下端は液体の吸込および排出が可能ないように開口している。本発明の測定システムにはポンプ機構が備えられ、ノズルにマウントされた抗原分別固定チューブ70に液体を吸い込ませる、または排出させることができるようになっている。

30

【0084】

図21(a)に示すように、抗原分別固定チューブ70の下端がウェル12に浸漬され、ウェル12内の夾雑物の除去等の処理がなされた測定サンプルが抗原分別固定チューブ70に吸い込まれると、第1~第3の抗体にそれぞれ対応する第1~第3の抗原が抗体に結合して第1~第3抗体固定ビーズ74、76、78に捕捉される。検体の吸込および排出を所定回数繰り返すことで各抗体固定ビーズ74、76、78に抗原を確実に結合させる。

【0085】

図21(b)に示すように、検体の吸込および排出を所定回数繰り返した後、別のウェル80の洗浄液を吸い込み第1~第3抗体固定ビーズ74、76、78を洗浄する。図21(c)に示すように、第1~第3抗体固定ビーズ74、76、78の洗浄後、別のウェル84内に収容された酵素標識化液に抗原分別固定チューブ70の下端が浸漬され、酵素標識化液が抗原分別固定チューブ70内に吸い込まれる。酵素標識化液は第1~第3抗体に結合する各抗原に対応して酵素標識抗体が3種類混合されており、抗原分別固定チューブ70内に酵素標識化液が吸い込まれると各酵素標識抗体は各抗原に結合する。図21(d)に示すように、酵素標識化液の吸込および排出が所定回数実行されると、別のウェル84に収容された洗浄液の吸込および排出が行われて抗原および酵素標識抗体が結合した第1~第3抗体固定ビーズ74、76、78の洗浄が行われる。図21(e)に示すように、洗浄後、基質液を収容したウェル86に抗原分別固定チューブが移動制御され後述する検出工程が開始される。上記では3種の酵素標識抗体の混合液が用いられたが、酵素標

40

50

識化は、異なる種類の酵素標識抗体が収容された3つのウェルについて、順に酵素標識抗体の吸込および排出と洗浄とからなる工程を行うことで代替してもよい。

【0086】

このように複数種類の抗体固定ビーズ74、76、78が配列された抗原分別固定チューブ70を用いて検体を処理することで、一度に複数の抗原を捕捉することができ、多項目同時検出を可能にするとともに、検体中の抗原の検出時間を短くすることができる。

【0087】

上記では抗原に対する抗体が固定されたビーズ74、76、78に夾雑物の除去等の処理がなされた検体を接触させて抗体に抗原を結合させた後に、標識化液を用いて抗原に酵素標識抗体を結合させたが、標識化の順序はこれに限らない。例えば、予め酵素標識抗体を固定したビーズを用いて抗原の補足工程を実行してもよい。

10

【0088】

4-2 検出工程

酵素標識抗体が結合した抗原は、基質液に混合され基質を発色させ、吸光度等の検出が行われる。以下に、上記した磁性粒子を用いて抗原の標識化を行った場合と抗原分別固定チューブを用いて抗原の標識化を行った場合とのそれぞれに場合分けして検出工程を説明する。

【0089】

4-2-1 磁性粒子およびピペットチップを利用した検出

本発明の測定システムは、例えばウェルの側面に特定波長の光束を照射する光照射部、光照射部から照射された光束を、ウェルを介して受光する受光部、受光部から出力される信号を処理して、例えば吸光度データ、あるいは発光強度データを形成する信号処理回路等を備える。

20

【0090】

図20(g)に示すように、標識化抗体結合磁性粒子を保持したピペットチップ50は、基質液を収容したウェル67に移動制御される。ウェル67内の基質液にピペットチップ50の先端部が浸漬した後、磁石Mがピペットチップ50の収容部の外周から離間して標識化抗体結合磁性粒子の拘束が解除され、標識化抗体結合磁性粒子が基質液と混合される。標識化抗体結合磁性粒子が基質液と混合された後、ピペットチップ50内への混合液の吸込およびウェル67への混合液の排出が所定回数実行され、標識化抗体結合磁性粒子が均一に分散した懸濁液が形成される。これにより標識化抗体結合磁性粒子と基質液とを均一に反応させることができる。

30

【0091】

標識化抗体結合磁性粒子を基質液と反応させて基質を発色させ、その後、例えば、ウェル67の側面から特定波長の光束を照射してその吸光度が検出される。なお、CLIA検査のように、発光状態が極めて短い検査法の場合には、液収容部を構成し、該液収容部にフィルタと吸水パッドを配設し、ピペットチップから液収容部内に前工程で吸引した洗浄液と共に磁性粒子を吐出して、フィルタに磁性粒子を捕集させた後、ノズルから過酸化水素水(H₂O₂)等の発光誘発液を供給して該磁性粒子を発光させ、分注時の発光をPMT等の光学測定装置で測定してもよい。

40

【0092】

4-2-2 抗原分別固定チューブを利用した検出

図21(e)に示すように、第2担体である抗原分別固定チューブ70を用いて複数の抗原を捕捉した場合には、複数の抗原の検出を一度に実行することができる。本発明の測定システムには特定波長の光束を照射する複数の光照射部、抗原分別固定チューブ70を介して各光照射部からの光束を受光する複数の受光部、受光部からの出力信号を、例えば増幅してデジタル化して発光強度データを形成する信号処理回路等が備えられている。まず、基質液が収容されたウェル86に抗原分別固定チューブ70の下端が浸漬され、基質液が抗原分別固定チューブ70内に吸い込まれる。基質液の吸込および排出を所定回数実行し十分に発光反応させる。光照射部および受光部は、例えば、各抗体固定ビーズ74、

50

76、78に対応して設けられている。光照射部および受光部は各抗体固定ビーズ74、76、78を介して対向するように配列されている。光照射部からの光束が抗原分別固定チューブ70の各ビーズ74、76、78を介して受光部によって受光され、受光部からの出力信号を基にして、各ビーズ74、76、78ごとの、例えば吸光度データあるいは発光強度データが形成される。

【0093】

測定システム

5-1 免疫学的測定システム

本発明は、検体の前処理を行う前処理手段、および前処理手段によって前処理された検体について免疫学的測定を行う免疫学的測定手段を含む測定システムを提供するものであり、免疫学的測定手段は標識化反応手段、および検出手段を備える。本発明の測定システムは、検体の前処理工程から検出工程まで全自動化され、検体中の生体関連物質を自動的に検出することができる。すでに上記で説明したように、前処理工程、並びに測定工程（標識化反応を含むこともある）はそれぞれ複数のバリエーションが考えられ、これら前処理工程および測定工程の組み合わせに従って測定システムが構成される。

10

【0094】

上述したように、本願の特徴である夾雑物の除去手段は主に5態様あり、(i)非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手段、(ii)非特異的反応因子に対する抗体が固定されたアフィニティゲルを利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手段、(iii)非特異的反応因子に対する抗体が固定されたフィルタを利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手段、(iv)非特異的反応因子に対する抗体が固定されたプラスチックを利用して非特異的反応因子を捕捉除去する手段、(v)還元剤が固定されたゲルを用いて非特異的反応因子を分解する手段、などの態様が可能である。標識化反応工程は、主に2態様あり(i)磁性粒子およびピペットチップを利用した標識化反応手段、(ii)抗原分別固定チューブを利用した標識化反応手段、が可能となっている。

20

【0095】

検出工程は、標識化反応手段において選択された手段に応じて選択され、例えば、標識化反応手段において(i)磁性粒子およびピペットチップを利用した標識化反応手段を選択した場合には、磁性粒子およびピペットチップを利用した検出手段を選択することが好ましく、標識化反応手段において(ii)抗原分別固定チューブを利用した標識化反応手段を選択した場合には、抗原分別固定チューブを利用した検出手段を選択することが好ましい。また、(i)磁性粒子およびピペットチップを利用した標識化反応手段と、(ii)抗原分別固定チューブを利用した標識化反応手段との両方を搭載した測定システムの製作も可能である。但し、この場合、ノズルに対するピペットチップと抗原分別固定チューブとの付け替え機構をさらに搭載するか、あるいはピペットチップ用のノズルと抗原分別固定チューブ用のノズルとの両方を搭載する。以上のように夾雑物の除去手段、標識化反応手段、および検出手段の組み合わせ次第で少なくとも10通り以上の測定システムを設計可能であり、使用目的等に応じて適宜改変して製作するとよい。以下に、特に好ましい態様について示す。

30

40

【0096】

図22は、前処理工程を実行した後に、測定工程を実行する測定システムのブロック図である。以下に磁性粒子を利用したシステムについて説明する。測定システム100は、中央制御部102、チップ位置制御部104、チップマウント制御部106、磁場制御部108、温度制御部110、ポンピング制御部112、計時部114、RAM116、ROM118、表示パネル120、操作インターフェース122などを備える。

【0097】

チップ位置制御部104は、互いに直行したXYZ軸を備え、ステッピングモータやサーボモータによってノズルの位置を制御する。X軸およびY軸はウェルプレートと略平行であって互いに直行し、Z軸はウェルプレートと略垂直をなしている。ノズルの移動に際

50

しては、例えば、ウェルプレートと略平行なこれら X 軸上および Y 軸上での移動と、ウェルプレートと略垂直な Z 軸上での移動との 2 段階でノズルが動かされる。

【 0 0 9 8 】

R O M 1 1 8 には各種制御プログラムが格納されている。ユーザが操作インターフェース 1 2 2 を通して選択した動作モードに応じて R O M 1 1 8 から制御プログラムが R A M 1 1 6 に展開され、中央制御部 1 0 2 はこの R A M 1 1 6 に展開された制御プログラムを基にしてシステム 1 0 0 の各部をコントロールしている。

【 0 0 9 9 】

表示パネル 1 2 0 はユーザに対して提示する必要がある項目を表示する。例えば、検体の夾雑物の除去処理時のポンピング回数、磁性粒子懸濁後の静置時間、ポンピング時の流速の緩急、吸込量および排出量、ピペットチップの移動速度の緩急などは表示パネル 1 2 0 に表示でき、ユーザはこの表示で確認することができる。もし各種設定内容を変更したい場合は、操作インターフェース 1 2 2 の操作を通して変更することができる。

【 0 1 0 0 】

計時部 1 1 4 は、R O M 1 1 8 から読み出されたプログラムに応じて時間のカウントを行う。時間のカウントは、例えば、インキュベートを行うときやポンピングを行うときなどに行われ、これにより各工程が正確に実行される。

【 0 1 0 1 】

磁場制御部 1 0 8 は、磁石 1 3 0 の配置を管理してピペットチップに付与する磁場の強さを制御する。磁場制御部 1 0 8 は、互いに直行した X Y Z 軸を備え、ステッピングモータやサーボモータによって磁石 1 3 0 の配置を管理している。X 軸および Y 軸はウェルプレートと略平行であって互いに直行し、Z 軸はウェルプレートと略垂直をなしている。磁石 1 3 0 の移動に際しては、例えば、ウェルプレートと略平行なこれら X 軸上および Y 軸上での移動と、ウェルプレートと略垂直な Z 軸上での移動との 2 段階で磁石 1 3 0 の配置の調節が可能となっている。通常は X 軸上および Y 軸上での移動のみを行うが、オプションで Z 軸上の移動も可能となっている。

【 0 1 0 2 】

温度制御部 1 1 0 はヒータ 1 3 6、サーマルセンサ 1 3 8などを備え、ピペットチップに収容された液体の温度を管理する。ヒータ 1 3 6 は温度制御部 1 1 0 からの供給電力によって発熱し、サーマルセンサ 1 3 8 はピペットチップ内に収容された液体の温度に応じて温度制御部 1 1 0 に温度信号を送出する。温度制御部 1 1 0 はサーマルセンサ 1 3 8 からの温度信号を基にして温度を検知してヒータ 1 3 6 への供給電力を調節する。

【 0 1 0 3 】

チップマウント制御部 1 0 6 は、ノズルへのピペットチップの装着、およびノズルからのピペットチップの脱着を行う。チップマウント制御部 1 0 6 はウェルプレートからある程度離れた場所に配置され、万が一ピペットチップ交換時にピペットチップから液体が飛散した場合にコンタミネーションが発生しないようにされている。チップマウント制御部 1 0 6 はピペットチップを把持する把持部と、別の新たなピペットチップを準備するチップ準備部とを備える。把持部がピペットチップを把持しながらノズルが Z 軸に沿って上昇するとノズルからピペットチップが脱着される。次いで、むき出しになったノズルが X 軸および Y 軸上で移動して新たなピペットチップの上方に移動する。チップ準備部では新たなピペットチップがマウント部を上側に先端部を下側にした状態で姿勢が保持されており、ノズルが Z 軸に沿って下降することでノズルに新たなピペットチップのマウント部が装着される。なお、ノズルとピペットチップとの係合態様としては、例えば、爪とこの爪が嵌入する切り欠きとを利用した係合形態、ボスとリブとを利用した係合形態、雄ネジと雌ネジとを利用した係合形態などがあり、適宜選択するとよい。

【 0 1 0 4 】

ポンピング制御部 1 1 2 は、ポンプ 1 4 0 および圧力センサ 1 4 6 を備え、ノズルおよびこのノズルに装着されたピペットチップを介して行われる液体の吸込と排出とを制御する。ポンプ 1 4 0 は、シリンダ状に形成されたハウジングとこのハウジングに移動自在に

10

20

30

40

50

嵌合されるピストン、このピストンを駆動させるモータとを備え、ハウジング内はノズルの開口と連通している。ピストンの動きは、例えばサーボモータによって制御され、サーボモータの駆動はポンピング制御部 112 からの駆動制御信号によって制御されている。ピストンが作動するとノズルの開口を通して液体の吸込または排出が可能となる。

【0105】

ノズルの開口内には圧力を検知する圧力センサ 146 が設けられ、圧力センサ 146 はポンピング制御部 112 に圧力信号を送出する。ポンピング制御部 112 はこの圧力センサ 146 からの圧力信号を基にして圧力をモニタリングしている。このような構成により、例えば、ピペットチップの先端部がウェル内の検体に浸漬した際、ポンピング制御部 112 によって検知された圧力が予め定められた閾値を上回り、これに応じてサーボモータに駆動制御信号が送出される。検体の吸込時および排出時も圧力センサ 146 からは常時、ポンピング制御部 112 に圧力信号が送出され、これによりポンピング制御部 112 は高い精度でサーボモータの駆動をコントロールすることができ、検体の吸圧や排圧が低すぎたり、高すぎたりすることをモニタリングし、これにより予め定められた範囲内で吸込、および排出が実行されているか管理することができる。なお、夾雑物の除去処理手段は、磁場制御部 108、ポンピング制御部 112、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子などによって構成される。攪拌手段は、ピペットチップ、ポンピング制御部 112、ポンプ 140、圧力センサ 146 等によって構成される。また、分取手段は、磁場制御部 108、磁石 130 等によって構成される。

10

【0106】

上記構成の作用について説明する。夾雑物の除去処理工程が開始されると、ウェル 12 の検体にピペットチップの先端部が浸漬し、圧力センサ 146 からの圧力信号を基にしてポンプ 140 が作動する。ピペットチップ内に検体が吸い込まれた後、ピペットチップが、前処理用磁性粒子液が収容されたウェル 12 に移動制御され、ピペットチップ先端が前処理用磁性粒子液に浸漬される。圧力センサ 146 からの圧力信号を基にしてピペットチップの先端部の浸漬が検知されると、ポンプ 140 のピストンが作動してポンピングが開始される。ポンピングが開始されると、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子が拡散され、懸濁液が形成される。

20

【0107】

懸濁液が形成されてから所定時間経過後、ポンプ 140 を作動させて懸濁液をピペットチップ 10 内に吸い上げる。ピペットチップ 10 に吸い上げられてポンプ 140 が停止した後、磁石 130 がピペットチップの収容部に近づけられ、前処理用磁性粒子が内壁面上の一ヶ所に固定される。前処理用磁性粒子が磁石によって一ヶ所に固定された状態で、ポンプ 140 が作動して液体がウェル内に排出される。これにより、夾雑物が除去されかつ非特異的反応因子が結合した前処理用磁性粒子を検体から分取して測定に供される測定サンプルを作製できる。

30

【0108】

検体に含まれる夾雑物が除去された測定サンプルの取得後、測定サンプルに特異的反応用磁性粒子を添加して検体から抗原を抽出し、さらに抗原結合磁性粒子を酵素標識抗体で標識化し標識化抗体結合磁性粒子を取得する。取得された標識化抗体結合磁性粒子を基質液に添加され吸光度等が検出される。

40

【0109】

このように、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子が混合された検体がポンピングされることで検体が攪拌され、磁性粒子が検体中で移動するため非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子が検体中の非特異的因子と遭遇する頻度が高まり、非特異的反応因子に対する抗体に非特異的反応因子をより確実に結合させることができる。そして、磁石を用いて非特異的反応因子が結合した磁性粒子を検体から分取することで、検体中から非特異的反応因子を効率よく除去できる。また、検体の前処理から免疫学的測定までを一括して連続的に行うことができ、ユーザに利便性の高いシステムを提供することができる。さらに、免疫学的測定工程で使用されるポンピング機構、チップ、ウェ

50

ルに合わせて検体の前処理を実行するようにしたことから、免疫学的測定工程に前処理工程を統合したシステムを構築したときのポンピング機構等を兼用できるためシステムの巨大化を抑えることができる。

【0110】

また、上記したように、ポンピング時に駆動するピストンの動きは圧力センサ146からの圧力信号を基にサーボモータによって制御されているため、ポンピング時に吸い込まれる液体の量、排出される液体の量、吸圧、および排圧は高い精度で制御でき、液体の流動を迅速にコントロールすることができる。これにより、上記した磁性粒子の拡散を短時間で実行でき、前処理時間の短縮化等が可能となる。また、検体のポンピングは、ピペットチップの先端開口が検体に浸漬した状態で行われるため、検体の泡立ち低減や検体が接触する雰囲気中の検体中への取り込みを低減することができる。

10

【0111】

また、ポンピングはピペットチップおよびウェルを用いて実行され、これらピペットチップやウェルのサイズは標識化反応工程や測定工程において使用されるピペットチップおよびウェルのサイズに合わせることができ、ピペットチップおよびウェルのサイズをそれぞれ統一することで測定システムのコンパクト化が期待できる。なお、上記では非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いたが、非特異的反応因子が固定されたマイクロサイズの小球を用いてもよい。この場合、この小球を通さないメッシュサイズを有するフィルタなどを使用することで検体から非特異的反応因子が固定された小球を分離することができる。

20

【0112】

また、抗原に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて標識化反応工程を実行する測定システムは、磁石の移動パターンなどが異なること以外は基本的に図22に示した構成と同様となる。

【0113】

このような装置を用いることで、例えば前処理工程では、ポンピングによって検体は非特異的反応因子に対する抗体が固定された担体または還元剤が固定された担体を流通することから、検体のポンピング回数に応答して非特異的反応因子に対する抗体が固定された担体または還元剤が固定された担体を流通する回数が増加して非特異的反応因子が非特異的反応因子に対する抗体または還元剤に遭遇する可能性が高まる。これにより、非特異的反応因子に対する抗体が固定された担体を用いた場合には、非特異的反応因子に対する抗体に非特異的反応因子をより確実に結合させて担体に非特異的反応因子を捕捉させることができ、還元剤が固定された担体を用いた場合には、非特異的反応因子をより確実に分解することができる。また、上記したように、ポンピング時に駆動するピストンの動きは圧力センサからの圧力検知信号を基にサーボモータによって制御されているため、ポンピング時に吸い込まれる液体の量、排出される液体の量、吸圧、および排圧は高い精度で制御でき、液体の流動を迅速にコントロールすることができる。これにより、上記した非特異的反応因子の捕捉または非特異的反応因子の分解を短時間で実行することができ、前処理に要する時間をより短くすることができる。また、ポンピングはピペットチップおよびウェルを用いて実行され、これらピペットチップやウェルのサイズは標識化反応工程において使用されるピペットチップおよびウェルのサイズに合わせることができ、ピペットチップおよびウェルのサイズをそれぞれ統一することで測定システムをよりコンパクトなものとするすることができる。なお、ここで説明したシステムはあくまで一例であり、適宜変更してよい。

30

40

【0114】

このように測定システムを用いて免疫学的測定を自動で行う場合、前処理における検体の吸込や排出はピペットチップの先端部がウェル内に浸漬した状態で行うことで気泡の発生や検体の飛散を低減できる。また、第1担体を用いた夾雑物の除去処理工程、第2担体の調製工程、並びに標識化反応工程および測定工程の全てが、ウェル内とピペットチップ内、あるいはウェル内とピペットチップ内と抗原分別固定チューブ内といった装置内の限

50

られた場所で一貫して実行されるため、処理工程が簡略化されるとともに、雑菌等の混入を低減できる可能性が高くコンタミネーションの低減が期待できる。

【0115】

上記の実施形態では、検体から、非特異的反応因子を除去する態様を例示したが、本発明はこれに限らず、検体から目的とする抗原を抽出してもよい。目的とする抗原と特異的反応する抗体が固定された磁性粒子を検体に添加し懸濁させ、懸濁後、検体をピペットチップ内に吸い込みピペットチップに磁石を近づけ、磁性粒子を拘束する。磁性粒子拘束後、ピペットチップ内の液体を排出し、磁性粒子と結合した抗原を洗浄することで、夾雑物を取り除くことができる。このような前処理も可能である。

【0116】

5 - 2 核酸の測定システム

また、上記では、免疫学的測定の前に検体から非特異的反応因子を除去する前処理工程を実施する測定システムを例示したが、本発明は、核酸の測定システムに用いることもできる。核酸の測定システムとして例えばスタンフォードタイプのシステムでは、プローブDNAが配列されたマイクロアレイチップ上に、ターゲットDNA溶液をスポッティングしてハイブリダイズさせ、ターゲットDNA溶液がスポッティングされたマイクロアレイチップを受光素子やイメージセンサ等で検出して検出データを取得する。この取得された検出データのシグナルをより明確化するために、プローブDNAとターゲットDNAとのハイブリダイゼーションをより確実にする必要がある。マイクロアレイチップ上のプローブDNAとターゲットDNAとの確実なハイブリダイゼーションのためには、検体中の夾雑物をいかに除去できるが重要な課題の一つとなり、マイクロアレイチップ上にスポッティングされるターゲットDNA溶液中に混入した夾雑物が少なければ少ないほど、クオリティの高い検出データを取得することができる。このターゲットDNA溶液中の夾雑物を除去する前処理として本発明を用いることもできる。

【0117】

例えば、ターゲットDNA溶液に含まれる夾雑物を除去するため、ウェルにターゲットDNAを含有した検体を収容し、検体中の夾雑物と親和性を有する物質が固定された磁性粒子を、ピペットチップを用いてウェル内の検体に添加しポンピングする。

【0118】

ポンピング後、検体をピペットチップ内に吸い込み、磁石をピペットチップに近づけて磁性粒子を拘束する。磁性粒子を拘束しつつ液体をウェルに排出することで、検体から夾雑物を除去することができる。この夾雑物が除去された検体からターゲットDNA溶液を作製することでターゲットDNA溶液に含まれる夾雑物を低減することができる。また、このターゲットDNA溶液の調製工程から検出データを取得する工程までを1つのシステムで一貫して自動化することで処理工程が簡略化されるとともに、コンタミネーションの防止のほか利便性の向上が期待できる。ここではターゲットとしてDNAを例示したが、この技術はcRNAやmRNA等の他の核酸ターゲットの調製の際にも用いることができる。

【0119】

実施態様

上記で説明したように、前処理工程、および測定工程におけるそれぞれの態様の組み合わせを変えることで、様々な態様の測定システムの製作が可能となる。前処理工程、標識化反応工程、および測定工程の可能な組み合わせのうちの一例について以下の実施態様に例示する。

【0120】

[実施態様1]

抗原として、消化器系の癌検査時に利用されるCA19-9を用いたものを例示する。当然ながら本発明はこれら実施態様に限定されるものではない。図23は、非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子を用いて前処理が実行された後に続けて免疫学的測定を実行する際のフローチャートを示す図である。図23に示すように、検体として血

10

20

30

40

50

清を用い、検体に含まれるグロブリン（非特異的反応因子）と結合可能なプロテイン A（非特異的反応因子に対する抗体）またはプロテイン G（非特異的反応因子に対する抗体）のうち少なくともどちらか一方が固定された磁性粒子（以降、前処理用磁性粒子という）を非特異的反応因子に対する抗体が固定された磁性粒子として用いて検体の前処理を行う。

【0121】

まず、ウェル内の血清中に前処理用磁性粒子（第1担体）を混合し吸引と吐出を繰り返して懸濁する。懸濁後、ピペットチップの収容部に懸濁液を吸い上げ、収容部に磁場を付与して磁性粒子を収容部の一ヶ所に拘束し残液をウェルに排液する。これにより、検体に含まれたグロブリンを前処理用磁性粒子のプロテイン A またはプロテイン G に捕捉させて除去することができる。より高精度にグロブリンを除去したい場合にはこの夾雑物の除去処理工程を適宜繰り返せばよい。なお、検体に含まれるグロブリン等をより高い精度で除去する場合には、酵素等のタンパク除去剤の併用等も有効である。

10

【0122】

グロブリンを除去して取得された血清に、抗 C A 1 9 - 9 抗体を表面に固定した特異的の反应用磁性粒子（第2担体）を混合し懸濁する。処理済の血清中の C A 1 9 - 9 抗原は抗 C A 1 9 - 9 抗体に結合し、これにより C A 1 9 - 9 抗原が特異的の反应用磁性粒子に捕捉される。ピペットチップの収容部に懸濁液を吸い上げ、収容部に磁場を付与して抗原結合磁性粒子を収容部の一ヶ所に拘束し残液をウェルに排液する。収容部に保持され C A 1 9 - 9 抗原が結合した抗原結合磁性粒子を、別のウェルに収容された洗浄液に混合し洗浄する。洗浄後、C A 1 9 - 9 抗原が結合した抗原結合磁性粒子に磁場を付与して洗浄液から分離する。洗浄液から分離された抗原結合磁性粒子を、別のウェルに収容された酵素標識抗 C A 1 9 - 9 抗体液に混合し懸濁する。これにより、C A 1 9 - 9 抗原は、抗 C A 1 9 - 9 抗体および酵素標識抗 C A 1 9 - 9 抗体とサンドイッチ結合の形成が可能となる。

20

【0123】

サンドイッチ結合した C A 1 9 - 9 抗原を有する標識化抗体結合磁性粒子に磁場を付与して標識化抗体結合磁性粒子を懸濁液から分離する。分離された標識化抗体結合磁性粒子を洗浄液の入った別のウェルに混合し洗浄する。洗浄後、サンドイッチ結合した C A 1 9 - 9 抗原を有する標識化抗体結合磁性粒子に磁場を付与して洗浄液から分離する。標識化抗体結合磁性粒子を別のウェルに収容された基質液に混合し懸濁する。酵素反応時間の経過後、懸濁液を測光し吸光度、発光強度等を測定する。

30

【0124】

[実施態様2]

図24は、非特異的反応因子に対する抗体が固定されたカラムを用いて前処理が実行された後に続けて免疫学的測定を実行する際のフローチャートを示す図である。図24に示すように、実施態様1と同様、検体として血清を用い、検体に含まれるグロブリンと結合可能なプロテイン A またはプロテイン G のうち少なくともどちらか一方が固定されたアフィニティカラム（第1担体）を用いて血清の処理を行う。ウェル内の血清をカラム含有ピペットチップ内に吸い込み、アフィニティカラムを通してピペットチップに収容された血清をウェルに排出する。このような血清の吸込および排出を所定の回数実行することで血清に含まれたグロブリンをアフィニティゲルのプロテイン A またはプロテイン G に結合させて除去することができる。ウェルに排出された処理済みの血清はこの後、実施態様1と同様に反応工程を実施することができる。

40

【0125】

[実施態様3]

本態様では、前処理は、図8～図15で既に述べた夾雑物の除去処理方法のうちいずれかの方法を用いて実行し、測定は、図21に示した抗原分別固定チューブを用いて複数の抗原について各抗体固定ピースに同時的に抗原を結合させて実行する。一定時間経過後、別のウェルの洗浄液を吸い込み抗体固定ピースを洗浄する。抗体固定ピースの洗浄後、酵素標識化液が抗原分別固定チューブ内に吸い込まれる。酵素標識化液がチューブ内に吸い

50

込まれ各抗原に酵素標識抗体が結合した後、別のウェルの洗浄液を吸い込み抗体固定ビーズを洗浄する。洗浄後、基質液が抗原分別固定チューブ内に吸い込まれる。十分な時間の経過後、サンドイッチ結合した各抗体固定ビーズの吸光度、または発光強度等が測定される。

【0126】

このように複数種類の抗体固定ビーズが配列された抗原分別固定チューブを用いて検体を処理することで、一度に複数の抗原を捕捉することができ、操作を簡略化できるとともに、検体中の抗原の検出時間を劇的に短縮化することができる。

【0127】

本発明においては、前処理は、図8～図15に例示した夾雑物の除去処理方法のうちいずれかの方法を用いて実行し、測定は、前処理後に、従来のELISAによって実行してもよい。例えば、図8～図15に示した夾雑物の除去処理方法のうちいずれかの方法を用いて夾雑物の除去処理を実行する。別のウェルには抗原に対する抗体が予め固定されており、夾雑物の除去処理によって非特異的反応因子が除去された血清をこのウェルに加えると、処理済検体中の抗原がウェルの抗体に結合可能となる。洗浄後、酵素標識抗体を含有した標識化液体をこのウェルに添加し抗体結合した抗原に酵素標識抗体が結合可能となる。洗浄後、基質液を添加して発色させ、適宜発色反応停止液を添加する。発色したウェルが吸光度計測器にセットされ吸光度等が計測される。このような工程を実行する測定システムも可能である。

【0128】

[実施態様4]

検体の前処理から目的とする物質の検出までを行うために、本発明においては、検体を収容するための収容部、夾雑物を検体から取り除くための磁性粒子を予め収容しておくための収容部、検体中の抗原の標識化用の抗体が結合した磁性粒子を予め収容しておくための収容部、基質液を予め収容した収容部などを予め一体化した試薬カートリッジを用いて検体の前処理を含む一連の工程を実施してもよい。また、カートリッジを用いた検体の処理システムは、夾雑物の除去処理工程だけでなく、この夾雑物の除去処理工程に続く標識化反応工程やこの標識化反応工程を含む測定工程を一貫して実行できるようにしてもよい。このようなカートリッジを用いた測定システムについて以下に説明する。図25は、前処理用の磁性粒子や基質液を予め収容したカートリッジを利用する測定システムの概略を示す図である。図26は、カートリッジを利用する測定システムの作動形態について概略的に説明する図である。図25、図26に示すように、測定システム150は、磁石151、分注装置152、ヒートブロック153、検出装置154、配置制御装置、中央制御装置などを備える。

【0129】

分注装置152はポンプ160、ノズル162を備え、ノズル162にはピペットチップ164を着脱自在にマウントすることができる。検出装置154は光電子増倍管(以降、PMTという)172、光源170を備え、光源170からの光をPMT172で受光しこれに应答してPMT172から信号が出力される。図26に示すように、例えば、ノズル162、後述するPMT172、および光源170は中央制御装置によって垂直方向で移動制御され、磁石151や試薬カートリッジであるカートリッジ180は中央制御装置によって水平方向で移動制御される。

【0130】

カートリッジ180は、細長く形成されたベースパネル181と複数の収容部182とを備え、パネル181の長手方向の一端から他端に向かって複数の収容部182が配列されている。カートリッジ180は、ベースパネル上に形成されたベース181と複数の収容部182とが一体に形成されている。各収容部182はベースパネル上に開口し、ピペットチップ164の受け入れが可能となっている。

【0131】

カートリッジ180に備えられる収容部182として、前処理用の磁性粒子液が収容さ

れた収容部、検体を収容するための収容部、標識化用の抗体が結合した磁性粒子液を収容した収容部、標識化用の磁性粒子に結合した抗原を洗浄するための洗浄液が収容された収容部、発色反応を引き起こすための基質液を収容した収容部などを備える。なお、カートリッジ 180 に備えられる収容部として上記を例示したが、収容部の種類はこれに限らない。例えば、前処理だけを実行できるようにカートリッジに収容部を備えてもよい。

【0132】

ベースパネル 181（例えばその中央部）には吸光度を測定するための収容部 182 a が設けられ、この収容部 182 a の上側には P M T 172 を装着するためのマウント 184 が配置されている。ベースパネル 181 や収容部 182 はアルミシール等によって遮光され、P M T 172 はマウント 184 に光密に嵌合される。検出用の収容部 182 a の底部は光源 170 と光密に嵌合可能であり、検出用の収容部 182 a の底部に嵌合した光源 170 から放射される照射光を P M T で受光してフォトンを計数することができる。

10

【0133】

カートリッジ 180 は図示しないカートリッジコントローラによってノズル 162 や P M T 172 に対する位置が決められる。カートリッジコントローラはカートリッジ 180 を水平方向に移動させて分注装置 152 や検出装置 154 に対するカートリッジ 180 の位置を決定する。カートリッジ 180 の配置が制御されることで、例えばピペットチップに対して適切にカートリッジを配置させることができ、夾雑物の除去処理工程、標識化反応工程、検出工程におけるピッピングや吸光度測定をスムーズに行うことができる。

20

【0134】

カートリッジ 180 の収容部 182 は、例えば、夾雑物の除去処理を行うための第 1 部 187 と、標識化反応工程や検出工程を行うための第 2 部 188 とを有する。なお、カートリッジ 180 にインキュベーションを行うためヒータ 153 の装着が可能な収容部を設けたが、このヒータ用の収容部は測定システムの目的に応じて適宜省略してよい。

【0135】

カートリッジ 180 を利用する測定システム 150 の作用について以下に説明する。カートリッジ 180 のマウント後、予めカートリッジ 180 の第 1 の収容部に収容された磁性粒子液がピペットチップ 164 内に吸い上げられて第 2 の収容部内に排出され、ポンピングされる。図 27 は、カートリッジを利用する測定システムの前処理工程について示した図である。図 27 に示すように、ポンピング後、第 2 の収容部内の液体がピペットチップ 164 内に吸い上げられて夾雑物が結合した磁性粒子が磁石 151 によって分離され、夾雑物が除去された測定サンプルが第 3 の収容部に排出される。第 3 の収容部には、標識化用の磁性粒子と測定サンプルとの混合液が収容され、この混合液がポンピングされ、ピペットチップ内に吸い上げられる。混合液の吸引後、磁石によって抗原が一体となった磁性粒子が分離され、第 4 の収容部に投入される。磁性粒子と一体となった抗原は、第 4 の収容部内に予め収容された洗浄液によって洗浄され、洗浄液と抗原との混合液はピペットチップ内に吸い上げられる。ピペットチップ内に吸い上げられたこの混合液から抗原と一体となった磁性粒子が磁石 151 によって分離され、抗原が検出用の第 5 の収容部 182 a に投入される。

30

40

【0136】

図 28 はカートリッジを利用する測定システムの前処理工程について示した図である。図 28 に示すように、第 5 の収容部 182 a 内には基質液が予め収容されており、この基質液と抗原とが反応して発色し吸光度が検出される。なお、検体中の夾雑物を除去処理する際、メンブレン、アフィニティカラム、あるいは還元剤が固定されたゲルを用いて検体に含まれる夾雑物を除去処理したい場合には、ノズル 162 にメンブレンを備えたピペットチップ、アフィニティカラムを含有するピペットチップ、あるいは還元剤が固定されたゲルを含有するピペットチップを取り付けて検体を処理する。例えば図 28 に示すように、メンブレンを備えたピペットチップ 190 を用いて検体に含まれる夾雑物を除去処理する場合は、ノズル 162 にメンブレンを備えたピペットチップ 190 を装着して検体を処理

50

する。これにより、測定システム 150 における夾雑物の除去処理手法のバリエーションを確保でき、システムの利便性を高めることができる。

【0137】

以上のように、検体の前処理工程を含む一連の工程で必要となる収容部を予めカートリッジ 180 に設け、このカートリッジ 180 を測定システム 150 にマウントして使用することにより、ユーザは磁性粒子液や洗浄液等の調製に係る手間を省くことができ、測定システム 150 の運用における利便性を高めることができる。

【0138】

上記の態様では、ピペットチップを垂直方向で移動させカートリッジを水平方向で移動させて前処理を実行したが、前処理の実行手法はこれに限らない。例えば、カートリッジを固定し、ピペットチップを水平方向および垂直方向に移動させて検体の前処理を実行してもよい。カートリッジを固定することで、ウェル内の液体が外部に飛び出ないようにシステムを設計する手間が省け、より簡便な測定システムの提供が可能となる。

【0139】

上記の実施態様 4 では、中央部に基質液が予め収容された収容部 182 a を設け、端部に培養用のヒータ 153 の装着が可能な収容部を設けたカートリッジ 180 を例示したが、カートリッジにおける収容部の配列順序はこれに限らない。図 29 は、別形態のカートリッジについて概略的に示した図である。例えば、図 29 に示すように、カートリッジがマウントされる測定システム本体の構成に合わせて適宜変更してよい。図 29 に図示した形態では、カートリッジ 200 の中央部にヒータ 153 の装着が可能な収容部 202 a を設け、端部に基質液が予め収容された収容部 202 b を設けた。このように収容部の配列順序を処理内容に鑑みて適宜変更することでより効率的な検体の処理を行うことができる。

【0140】

また、上記の実施態様では、磁性粒子液を収容部 182 に予め収容させたが、磁性粒子液を予め保持したピペットチップを用いる、あるいは、検体中の夾雑物を吸着する担体を備えたピペットチップを用いて検体の前処理を実行してもよい。この場合、このようなピペットチップに合わせてカートリッジの収容部の構成を適宜変更する必要がある。

【0141】

また、上記では、第 1 部 187 と第 2 部 180 とが一体形成されたカートリッジ 180 を例示したが、第 1 部 187 と第 2 部 188 とを組み合わせ自在に構成してもよい。第 1 部 187 と第 2 部 188 とを組み合わせ自在な構成とすることで、検体について、夾雑物の除去処理だけを実行したい場合、前処理工程を除く標識化反応工程から検出工程までだけを実行したい場合、あるいは全工程を実行したい場合に、ユーザはそれぞれの場合に応じて第 1 部、第 2 部、第 1 部と第 2 部との組み合わせのいずれかを選択することができ、より利便性の高い測定システムを提供することができる。

【0142】

上記の実施態様では検出対象の抗原として CA19-9 を用いたものを例示したが、検出対象はこれに限らず、例えば、リウマチ因子、遊離サイロキシン (F-T4)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、インスリン、胎児性タンパク (AFP) などの単純タンパクまたは複合タンパク、ステロイドホルモン、ペプチドホルモン等への適用もできる。

【0143】

6 核酸測定システム

本発明の別の例として、本発明を核酸検出分野に用いた態様について以下に説明する。検体から核酸を抽出しこの抽出された核酸を増幅して測定する場合、第 1 担体として標的核酸に対して親和性を有する物質が固定されたものを用いて検体から標的核酸を抽出し、第 2 担体として標的核酸の検出用試薬を固相化してなるものを用いて標的核酸を測定することができる。この測定システムでは、検体中の標的核酸を検出する工程の前に、第 1 担体を用いて核酸を抽出する工程が実行される。さらに、本発明のシステムでは、生体関連物質と親和性を有する、および/または生体関連物質を標識化する物質が固定された第 2

10

20

30

40

50

担体を調製する工程を含む。本発明の1つの態様では、このような第1担体を用いた核酸の抽出工程および第2担体の調製工程を含む前処理を1つのシステムで一貫して行うものである。以下、本発明を用いて核酸を検出する工程について説明する。

【0144】

図30は、検体からの核酸の抽出から第2担体の調製までの前処理工程、並びに検出工程を概略的に示した図である。図30に示すように、標的核酸の測定システムでは、(i)標的核酸に対して親和性を有する物質が固定された担体(第1担体)を用いて検体から標的核酸を抽出する工程、(ii)生体関連物質と親和性を有するかあるいは生体関連物質を標識化する少なくともいずれかの機能を有する担体(第2担体)を調製する工程、(iii)調製された第2担体を用いて標的核酸を標識化して検出する工程、が行われ、好ましくは、前処理(i)~(iii)を一貫して行うものである。検体は、ユーザによって測定システムに備えられたウェル250に収容される。

10

【0145】

6-1 検体から標的核酸を抽出する工程

標的核酸を取得するため、核酸捕捉用のプローブが固定された第1担体である磁性粒子(以降、核酸捕捉用磁性粒子という)が備えられたピペットチップ(分注チップともいう)がノズルに装着される。ウェルに収容された検体がピペットチップに吸い上げられ、核酸捕捉用磁性粒子と混合される。混合後、核酸補足用磁性粒子に固定されたプローブに標的核酸が特異的に結合して核酸捕捉用磁性粒子に捕捉される。

20

【0146】

標的核酸が結合した核酸捕捉用磁性粒子がピペットチップ内に吸い上げられた状態で、ピペットチップに磁石が近づけられ核酸捕捉用磁性粒子がピペットチップ内に拘束される。核酸補足用磁性粒子が磁石によって拘束されたピペットチップがウェルから離れ、洗浄液を収容したウェルに移動して磁石が遠ざかることで、核酸捕捉用磁性粒子が洗浄液内に解放される。洗浄液によって核酸捕捉用磁性粒子を洗浄した後、試薬などを加えて標的核酸を磁性粒子から分離して標的核酸を取得することができる。

【0147】

6-2 取得された標的核酸を検出するための担体を調製する工程

他方、抽出された標的核酸を検出するために、生体関連物質と親和性を有しかつ生体関連物質を標識化する物質が固定された担体が調製される。標的核酸の検出では標的核酸の標識化および増幅が行われ、標識化法および増幅法としては、PCR法、PT-PCR法、リアルタイムPCR法、LAMP法、RT-LAMP法、ICAN法、SDA法、RCA法、NASBA法など公知の方法を用いることができる。リアルタイムPCR法は様々な手法が存在するが、例えばインターカレーション法、ハイブリダイゼーション法、LUX法などが可能である。

30

【0148】

核酸の標識化および増幅には、核酸の標識化および増幅用のプローブやプライマーを含有する固相化されたマスターミクスチャ(MMX)を用いることができる。リアルタイムPCR法を用いる場合、増幅処理する核酸の種類に合わせて核酸増幅用のプライマーやプローブを適宜選択することが好ましい。プローブ、プライマーとしては、例えば、TaqMan(登録商標)プローブ、FRETプローブ、LUXプライマーなど種々のものを用いることができる。プローブは標的核酸を標識化するための標識を備えており、この標識を備えたプローブが標的核酸とハイブリダイズすることで標的核酸が標識化される。プライマーおよびプローブは検出対象の核酸の種類に応じて適宜設計することができる。例えば、リアルタイムPCR法としてハイブリダイゼーション法を用いる場合、標的核酸は、熱変性、アニーリング、および伸長反応が行われ、標的核酸が標識化される。

40

【0149】

本発明においては、標的核酸の検出を実行する前に、核酸の増幅に用いられる試薬を予め調製し、これを固相化してウェル内に収容することで、固相化された試薬(以降、固相化試薬という)を固定したウェル(第2担体)が作製される。核酸の増幅時にはこの固相

50

化試薬に緩衝液、核酸等を注入することで標的核酸の標識化および増幅が開始される。大容量のマスターミクスチャを用いることにより、測定工程時、測定用サンプルを収容するためのウェルに分注することが可能となり、作業効率を向上させることができる。試薬を固相化する方法については特に限定しないが、試薬を凍結乾燥すると利便性が高まり、作業効率の改善が期待できる。

【0150】

マスターミクスチャの試薬を凍結乾燥する場合は、例えば、標的核酸を増幅するためのプライマーおよびプローブ、およびその保護安定させるためのサッカライド類やポリビニルピロリドンなどの保護安定化剤を混合させ、所定温度で冷却して減圧することで作製できる。調整時の圧力、冷却温度、および冷却時間は、目的とするマスターミクスチャの性質に合わせて適宜変更してよい。また、本発明においては、凍結乾燥したときに凍結乾燥品が容器内に固相として（第2担体として）固定化されるように、スクロース、ラクトース、またはトレハロース等を混合することが好ましい。これにより、例えば凍結乾燥された試薬を容器内壁に膜状に層設して固定することができる。

10

【0151】

6-3 標的核酸を検出する工程

標的核酸の検出は、固相化試薬を備えたウェルに標的核酸を注入して行われる。標的核酸の注入後、標的核酸が固相化試薬に含まれるプローブとハイブリダイズして検出が可能となり、例えば、発光、蛍光などを測定することで標的核酸を検出することができる。検出デバイスとして、例えば、イメージセンサを搭載した蛍光レーザー顕微鏡を用いることで標的核酸の画像データを取得でき、この画像データを適宜解析することで蛍光強度などを算出することができる。このように蛍光強度を算出することで標的核酸の検出を行うことができる。

20

【0152】

次に上記の各工程を自動的に実行するシステムについて説明する。上記の手順を自動的に実行する測定システムは、検体を収容し標的核酸を取得する測定サンプルの取得装置、取得された測定サンプルを、PCR法等を用いて増幅して検出する検出装置を備える。

【0153】

測定サンプルの取得装置は、例えば、検体を収容するウェルや試薬を収容するウェルを有し、検体を収容するウェルには、組織、細胞、体液などユーザによって取得された検体が収容される。なお、検体が組織や細胞片の場合は、予め細かくしておくことが好ましい。

30

【0154】

試薬を収容するウェルは、複数のウェル、ピペットチップ、検体を溶解するための試薬、溶解された検体に投入され標的核酸と特異的に結合するプローブが固定された磁性粒子、磁性粒子をピペットチップ内に拘束するための磁石、標的核酸とこの核酸とプローブを介して特異的に結合した磁性粒子とを分離して溶出する溶出試薬などを備え、検体を収容するウェルに収容された検体から、DNAやRNAなどの標的核酸を抽出する。

【0155】

さらに、試薬を収容するウェルは、検体から抽出された標的核酸を標識化および増幅するための固相化された試薬を収容するウェルを備え、ウェル内には、例えば、緩衝液、プライマー、プローブ、核酸ポリメラーゼ、蒸留水、洗浄液などを固相化して収容する。固相化された試薬は、例えば、各試薬を一体に混合しさらに凍結乾燥することで作製できる（凍結乾燥マスターミクスチャ）。

40

【0156】

標的核酸の抽出は、検体を溶解しこの溶液と、標的核酸と特異的に結合するプローブが固定された磁性粒子とを混合し、混合後に磁石を用いて標的核酸が結合した磁性粒子をピペットチップ内に拘束して分離し、この分離した磁性粒子を洗浄した後に標的核酸を溶出することで実行することができる。

【0157】

50

検出装置は検体から抽出された標的核酸を増幅して検出する動作を実行する。核酸の増幅手法としては、例えばリアルタイムPCR法が挙げられる。標的核酸の増幅は、試薬を収容するウェルに収容された凍結乾燥マスターミクスチャを用いてリアルタイムPCR法に従って実行することができる。検出装置は核酸増幅用の反応容器とこの反応容器の温度を調節する温度調節部などを備え、核酸の熱変性、アニーリング、伸長反応の各工程を繰り返し実行することができる。標的核酸の増幅後、標識化された標的核酸に、例えば、励起用の電磁波を照射する、蛍光反応用の基質液を添加してから標的核酸をスキャナなどでスキャンすることで標的核酸を検出することができる。

【0158】

上記システムをより具体化したものについて以下に説明する。図31は標的核酸の抽出から検出まで実行するためのウェルを上部から示した図である。図31に示すように、標的核酸の測定システム480は処理ラインを備え、図31は第1処理ライン500Aから第12処理ライン500Lまでの12列の処理ラインを例示した図である。各処理ライン500A~500Lでは、例えば、検体を収容するウェル502、溶解液を収容するウェル504、緩衝液を収容するウェル506、磁性粒子を収容するウェル508、検体から抽出された核酸を洗浄するための洗浄液やピペットチップを洗浄するための洗浄液が収容されたウェル510、磁性粒子と標的核酸とを分離する溶出液を収容したウェル512、検体から核酸を抽出してなる測定サンプルを一時的に収容するウェル514、測定サンプルを標識化して標的核酸を検出するための固相化されたマスターミクスチャを収容したウェル516が、配列されている。

10

20

【0159】

第1~第12処理ライン500A~500Lの上方には、各処理ライン500A~500Lに対応して12個のノズルがライン方向P(図示省略)に移動自在に設けられ、各ノズルにピペットチップが適宜装着される。測定システム480は、例えば、ウェルを配置するスペースを外部から隔離するための遮蔽扉を備え、これら第1~第12処理ラインに設けられたウェルは、この隔離扉によって外部から遮断することができる。上記では12列の処理ラインを備えた装置を例示したが、処理ラインの本数はこれに限らず、例えば、1本や2本でもよく、また、さらに処理能を高めるために20本、30本としてもよい。

【0160】

図32に示すように、測定システム480は、中央制御部532、チップ位置制御部534、チップマウント制御部536、磁場制御部538、PCRユニット540、ポンピング制御部542、検出部545、RAM548、ROM550、表示パネル552、操作インターフェース554、計時部などを備える。

30

【0161】

チップ位置制御部534は、互いに直行したXYZ軸を備え、ステッピングモータやサーボモータによってノズルの位置を制御する。XYZ軸は、例えば、X軸が処理ラインにおけるウェルの配列方向と略平行をなし、Y軸がX軸と略垂直をなすとともに各列を横断する方向と略平行をなし、Z軸はX軸およびY軸のなす面と略垂直をなしている。検体の処理が開始され各ノズルが移動する場合は、例えば、これらX軸上での移動と、Z軸上での移動との2段階でノズルが駆動することで、各処理ライン500A~500Lに沿った処理が実行される。

40

【0162】

チップマウント制御部536は、ノズルへのピペットチップの装着、およびノズルからのピペットチップの脱着を行う。チップマウント制御部536はピペットチップを把持する把持部と、別の新たなピペットチップを準備するチップ準備部とを備える。把持部がピペットチップを把持しながらノズルがZ軸に沿って上昇するとノズルからピペットチップが脱着される。むき出しになったノズルがX軸およびY軸上で移動して新たなピペットチップの上方に移動する。チップ準備部では新たなピペットチップがマウント部を上側に先端部を下側にした状態で姿勢が保持されており、ノズルがZ軸に沿って下降することでノズルに新たなピペットチップのマウント部が装着される。

50

【0163】

ポンピング制御部542は、ポンプ580および圧力センサ582を備え、ノズルおよびこのノズルに装着されたピペットチップを介して行われる液体の吸込と排出とを制御する。ポンプ580は、シリンダ状に形成されたハウジングとこのハウジングに移動自在に嵌合されるピストン、このピストンを駆動させるモータとを備え、ハウジング内はノズルの開口と連通している。ピストンの動きは、例えばサーボモータによって制御され、サーボモータの駆動はポンピング制御部542からの駆動制御信号によって制御されている。ピストンが作動するとノズルの開口を通して流体の吸込または排出が可能となる。

【0164】

ノズルの開口内には圧力を検知する圧力センサ582が設けられ、圧力センサ582はポンピング制御部542に圧力信号を送出する。ポンピング制御部542はこの圧力センサ582からの圧力信号を基にして圧力をモニタリングしている。このような構成により、例えば、ピペットチップの先端部がウェル内の流体に浸漬した際、ポンピング制御部542によって検知された圧力が予め定められた閾値を上回り、これに応じてサーボモータに駆動制御信号が送出手される。流体の吸込時および排出時も圧力センサ582からは常時、ポンピング制御部542に圧力信号が送出手され、これによりポンピング制御部542は高い精度でサーボモータの駆動をコントロールすることができる。このような構成によりピペットチップの装着されたノズルは流体の吸い上げおよび吐き出しを実行することができ、流体の攪拌を行うことができる。

【0165】

ROM550には各種制御プログラムが格納されている。ユーザが操作インターフェース554を通して選択したモードに応じてROM550から読み出された制御プログラムがRAM548に展開され、中央制御部532はこのRAM548に展開された制御プログラムを基にして測定システム480の各部をコントロールしている。

ROM550に記憶する処理プログラムとしては、例えば、(1)細胞やウイルスからRNAを抽出しPCR反応後にPCR産物の検出を実行する第1プログラム、(2)血液等の生体サンプルからDNAを抽出しPCR反応後にPCR産物の検出を実行する第2プログラム、(3)大腸菌等の細菌からプラスミドDNAを抽出する第3プログラム、などがある。

【0166】

表示パネル552はユーザに対して提示する必要がある項目を表示する。例えば、核酸抽出時のポンピング回数、磁性粒子懸濁後の静置時間、ポンピング時の流速の緩急、吸込量および排出量、ピペットチップの移動速度の緩急などは表示パネル552に表示でき、ユーザはこの表示で確認することができる。もし各種設定内容を変更したい場合は、操作インターフェース554の操作を通して変更することができる。

【0167】

計時部545は、ROM550から読み出されたプログラムに応じて時間のカウントを行う。時間のカウントは、例えば、ポンピングやPCR反応における熱変性、アニーリング、伸長反応を行うときなどに実行され、これにより各工程の実行期間が正確に管理される。

【0168】

磁場制御部538は、磁石560の配置を管理してピペットチップに付与する磁場の強さを制御する。磁場制御部538は、互いに直行したXYZ軸を備え、ステップモータやサーボモータによって磁石560を位置決めする。X軸およびY軸はウェルが並べられた面と略平行であって互いに直行し、Z軸はこの面と略垂直をなす。磁石560が移動するときは、例えば、X軸上およびY軸上での移動と、Z軸上での移動との2段階で磁石560の位置決めが可能となっている。

【0169】

PCRユニット540は、サーマルセンサ570、温度制御部572、ヒータ574を備える。温度制御部572はサーマルセンサ570からの温度信号に基づき温度を検知す

10

20

30

40

50

る。サーマルセンサ 570 は、例えばマスターミクスチャを収容したウェル 516 の近傍に配置され、ウェル内に流体の温度に応じて温度信号を温度制御部に送出する。ヒータ 574 はウェル 516 の近傍に配置され、ヒータ 574 の通電は温度制御部 572 によって制御されている。温度制御部 572 はサーマルセンサ 570 からの温度信号に基づきヒータ 574 の通電をコントロールすることでウェル 516 内の流体の温度を制御する。これにより、適切な温度コントロールが要求される PCR 反応を迅速に実行することができる。PCR の反応サイクルは基本的に、熱変性ステップ、アニーリングステップ、伸長反応ステップの繰り返しによって構成され、温度制御部 572 は各ステップで流体が最適な温度となるようにヒータ 574 を用いて温度をコントロールする。PCR 反応における最適温度、反応時間、反応サイクル数に関するデータは ROM に予め格納されており、ユーザによって選択された処理モードに対応して読み出され実行される。

10

【0170】

検出部 545 は、トリガー光源 590、トリガー光源からのトリガー光をウェル内の液体に照射する導光部 592、導光部 592 から照射された光によって蛍光した核酸からの光を受光するための受光部 594、検出回路 596 などを備える。導光部 592 は、例えば光ファイバを用いて構成することができ、トリガー光源からのトリガー光を光ファイバ内で導光させることによりウェル内の液体にトリガー光を照射することができる。受光部 594 には例えば CCD や CMOS 等のイメージセンサを用いることができ、蛍光した核酸からの光を受けて受光信号を検出回路 596 に出力する。検出回路 596 は受光部 594 からの受光信号を基にして核酸を検出する。

20

【0171】

本発明の核酸検出システムの作用について図 33 のフローチャートを用いて説明する。ユーザによって選択された処理プログラムが ROM 550 から読み出され、この読み出された処理プログラムを基に測定システム 480 の各部が作動を開始する。ユーザは各処理ライン（図 31 では第 1～第 12 処理ライン 500A～500L）のウェル 502 に取得した検体を手で収容し、遮蔽扉によって第 1～第 12 処理ライン 500A～500L を外部から遮蔽する。第 1～第 12 処理ライン 500A～500L の遮蔽が検出されると検体の処理が開始され、第 1～第 12 処理ライン 500A～500L に対応して設けられた 12 個のノズルおよびピペットチップが駆動して検体と溶解液とを混合する。この混合液の攪拌後、磁性粒子を混合液に加えて攪拌する。

30

【0172】

磁性粒子の加えられた混合液が十分に攪拌された後、磁石を用いて磁性粒子をピペットチップ内に拘束し不要な液をピペットチップ外に排出して標的核酸が接合した磁性粒子を取得する。取得した磁性粒子は洗浄液が収容されたウェルに排出、洗浄され、洗浄後、磁性粒子と標的核酸との結合を切断する分離液に混合され攪拌される。磁性粒子が加えられた分離液が十分に攪拌された後、磁性粒子はピペットチップ内に拘束されて標的核酸が分離される。取得された標的核酸を含有する流体は測定工程に供される測定サンプルとしてウェル 514 に収容される。ウェル 514 に収容された測定サンプルはマスターミクスチャが予め収容されたウェル 516 に分注され、PCR 反応が実行される。PCR 反応工程では、熱変性ステップ、アニーリングステップ、伸長反応ステップが所定の回数だけ繰り返されて標的核酸に基づいた PCR 産物の生成が実行され、所定回数の実行後、検出部 545 によって PCR 産物の検出が実行される。

40

【0173】

以上のように、第 1～第 12 処理ライン 500A～500L に代表される 12 列の処理ラインを備えることで、12 個の検体を同時に処理することができ、検体の処理効率を高めることができる。また、検体の収容ウェル 502、標的核酸抽出用の磁性粒子を収容したウェル、洗浄用のウェル、マスターミクスチャを収容したウェルをライン状に並べたことにより、ノズルおよびピペットチップを無駄なく駆動させることができ、処理時間を更に短期化することができる。また、ノズルおよびピペットチップが直線状に駆動するため、他のラインの検体の混入を防止でき、コンタミネーションを低減することができる。

50

【 0 1 7 4 】

上記では12本の処理ラインを備えた測定システムを例示したが、処理ラインの本数はこれに限らず、これより多くても少なくてもよい。さらに、上記の実施形態では、12列の処理ラインを備えた測定システムを例示したが、ライン状に処理する以外にも、例えば、検体の収容ブロック、磁性粒子と検体との反応ブロック、磁性粒子などを洗浄するための洗浄液の収容ブロック、作製された測定サンプルの収容ブロック、PCR反応ブロック、増幅された標的核酸の測定ブロックなどを、例えば環状あるいは十字状に配置してもよい。

【 0 1 7 5 】

また、システムの態様は上記に限らず適宜変更してよい。図34は、カートリッジを利用して核酸を前処理することができる測定システムの概略を示した図である。例えば、図34に示すように、検体収容部と試薬収容部とを一体化したカートリッジを用いて標的核酸を検出することもできる。以下に、検体収容部および試薬収容部を一体化したカートリッジを用いて検体を処理するシステムについて説明する。

10

【 0 1 7 6 】

測定システム260は、システム本体262と、このシステム本体262に装填されるカートリッジ264とを備える。システム本体262は、カートリッジ264を保持するラック267、ラック267をシステム本体262から引き出された引き出し位置とシステム本体に収納した収納位置との間で移動制御する移動制御機構270、核酸を取得するための磁性粒子を備えたピペットチップ、カートリッジ264に対するピペットチップの配置を制御する配置制御機構273、ピペットチップの着脱などを行うチップ着脱制御部275、増幅された核酸をスキャンして検出するスキャナ277などを備える。ラック267は収納位置に位置するカートリッジ264を外部から遮断する蓋280を備え、これにより収納位置に位置するカートリッジ264などに雑菌が付着する危険性を低減している。

20

【 0 1 7 7 】

カートリッジ264のウェルの配置形態は、DNAを抽出して増幅するかRNAを抽出して増幅するかによって個数、順序、サイズなどが異なる。図35は、上記の測定システムで用いられるカートリッジについて示した図であり、マスターミクスチャを収容したウェルをカートリッジの長手方向に沿って一部切断した斜視断面図である。例えば、DNAを抽出してPCR法を用いて増幅する場合、図35に示すように、カートリッジ264には、検体を収容するウェル300、検体からDNAを抽出するための抽出試薬が予め収容されたウェル302、バッファが収容されたウェル304、抽出されたDNAを洗浄するための洗浄液が収容されたウェル306、308、標的核酸抽出用の磁性粒子をDNAと分離させDNAを取得するための溶出液310、ピペットチップ330を洗浄するための洗浄液が収容されたウェル312、凍結乾燥されたマスターミクスチャが収容されたウェル314、標識化されたDNAを蛍光検出させる場合に用いられる基質液が収容されたウェル316などが一体化されている。各ウェルの開口はアルミシール(図示省略)によって封止され、使用前に雑菌がウェル内に侵入しないようにされている。ウェル314内には凍結乾燥されたマスターミクスチャ318が容器内壁に膜状に設けられている。凍結乾燥されたマスターミクスチャ318をウェル314内に膜状に設ける手法としては、例えば、ウェル314内に凍結乾燥前のマスターミクスチャを収容した後、所定の凍結乾燥条件下で凍結乾燥を実行することでウェル314内に凍結乾燥されたマスターミクスチャ318を膜状に設けることができる。

30

40

【 0 1 7 8 】

カートリッジ264がラック267に装填され核酸の自動検出が開始された後、ラック267がシステム本体262に収納され、カートリッジ264が外部から隔絶される。カートリッジ264がラック267によって収納位置に配置された後、アルミシールが剥離され、検体からのDNAの抽出が実行される。カートリッジ264には凍結乾燥されたマスターミクスチャを備えたウェル314が予め設けられており、これによりDNA抽出後

50

に速やかに前処理を終えることができ、次の測定工程へ移行することができる。

【0179】

このように、カートリッジを264用いて前処理を自動的に一貫して実行できることから、本発明においては手軽で利便性の高いシステムを提供することができる。また、磁性粒子を用いて検体から標的核酸を抽出するから不要物を核酸増幅前に予め低減して、より信頼性の高いDNA検出を実行することができる。

【0180】

また、上記では、検体からの標的核酸の抽出から核酸を抽出して測定サンプルを作製し、作製された測定サンプルを基にして標的核酸を検出する工程までを一貫して行ったが、測定サンプルを作製するまでの工程と、測定サンプルから標的核酸を測定する測定工程とを別の装置で実行してもよい。このようなシステムの一例としては、例えば、検体を収容し標的核酸を抽出し測定サンプルを取得するサンプル作製装置と、取得された測定サンプルを、核酸増幅法を用いて増幅して検出する検出装置とを備える測定システムが挙げられる。このようなシステムを用いる場合、図36に示すように、ウェルカートリッジ600から、測定サンプルを収容するウェル610とマスターミクスチャを収容したウェル612とが一体化された分離ユニット615を、カートリッジ本体608から例えば分割ラインLに沿って分割して分離できるようにし、分離ユニット615を検出装置に装填することで標的核酸の検出を実行することができる。

検体を取得しウェルカートリッジ600に収容してサンプル作製装置に装填すると検体の処理が開始されて、測定サンプルを収容するためのウェル610に測定サンプルが収容される。分離ユニット615がカートリッジ本体608から分離されて検出装置に装填されると、ウェル610内に収容された測定サンプルがマスターミクスチャを収容した4連ウェル612に注入される。測定サンプルがマスターミクスチャと混合された後、PCR法に従って標的核酸を増幅し検出される。

このように、測定サンプルを収容するウェル610とマスターミクスチャを収容したウェル612とが一体化された分離ユニット615をカートリッジ本体608から分離できるようにすることで、測定サンプルを取得するまでの工程と、取得された測定サンプルから標的核酸を検出する工程とを別の装置で実行することができる。

これにより、サンプル作製装置の駆動スケジュールが検出装置の駆動スケジュールから独立し、第1の測定サンプルの作製後に第2の測定サンプルの作製にすぐさま移行することができ、標的核酸の検出を待つことなく測定サンプルをより自在に作製することができる。また、測定サンプルの一時保存なども可能となる。

【0181】

また、上記では1つの検体に対して1列のウェル群を対応させたが、1つの検体に対して複数列のウェル群を対応させてもよい。例えば、図37に示すように、1つの検体に対して2列のウェルを対応させることもできる。測定システム620は、核酸の抽出時に用いられるウェル群を備えた核酸抽出部625、固相化された核酸増幅用試薬が収容されたウェル群を備えた固相化試薬収容部630、サーマルサイクラーに組み合わされる調温部635、トリガー光を照射して核酸の検出を行う検出部640、ノズルユニット645などを備える。ノズルユニット645はワークエリア645内で駆動し検体の吸い込みや吐出を行う。このようにウェルの配置を用いて核酸を測定してもよい。

【0182】

また、本発明の好ましい態様として、上記に説明した測定システムを用いて、各種ウイルス、例えば、インフルエンザウイルス(H1N1、H3N2、H5N1、H7N7等)を検出することができる。インフルエンザウイルスの検出は、採取された検体(鼻腔内体液など)からのインフルエンザウイルスの抽出、およびマスターミクスチャの作製、リアルタイムRT-PCRの実行、並びに検出の順で行われる。

【0183】

[インフルエンザウイルスA(H1N1)の検出におけるプローブおよびプライマー]
使用されるプローブおよびプライマーとしては

10

20

30

40

50

フォワードプライマー (Inf A , SW Inf A , SW H 1 , R nase P)
 リバースプライマー (Inf A , SW Inf A , SW H 1 , R nase P)
 T a q M a n プローブ (Inf A , SW Inf A , SW H 1 , R nase P)
 などを用いる。

従って、プライマーおよびプローブの組み合わせとしては

Inf A : インフルエンザ A 型プライマーセットおよび T a q M a n プローブ

SW Inf A : SW Inf A 型プライマーセットおよび T a q M a n プローブ

SW H 1 : SW H 1 型プライマーセットおよび T a q M a n プローブ

R nase P : ヒューマン RNaseP 遺伝子 (内部ポジティブコントロール) プライマーセッ
 トおよび T a q M a n プローブ
 を用いる。

10

上記の 4 種類のプライマーおよびプローブの組み合わせを含有するマスターミクスチャーをそれぞれ調製して、例えば、図 3 5 に示したカートリッジ 2 6 4 の 4 連のウェル 3 1 4 に予め収容しアルミシールで封止しておくことで簡便な操作でインフルエンザウイルス A (H 1 N 1) を検出できるシステム、およびこのシステムのためのカートリッジを提供することができる。

【 0 1 8 4 】

なお、上記に示したカートリッジ 2 6 4 は、1 つの検体について核酸の抽出から検出する前まで行うものについて示したが、複数のカートリッジ 2 6 4 を並列させて複数の検体を同時処理できるようにしてもよい。複数の検体を同時処理することで処理能力が向上し、さらに利便性の高いシステムを提供することができる。

20

【 0 1 8 5 】

上記の図 3 1 ~ 3 7 では、標的核酸と P C R 反応用の試薬との混合溶液の温度を上昇 / 下降させて核酸増幅を行う P C R 法を用いた態様について例示したが、本発明はこれに限らず、等温で核酸を増幅させる等温増幅法を用いてもよい。

本発明の核酸増幅装置は、

(a) 検体を収容する検体収容部と、

(b) 検体から標的核酸を補足する捕捉粒子を収容する第 1 収容部と、

(c) 標的核酸の検出用試薬を収容する第 2 収容部と、

(d) 前記検体を検体収容部に分注する分注機構、前記検体と補足粒子とを混合して検体から標的核酸を抽出する機構、および前記抽出された標的核酸と検出用試薬とを混合する機構と、

30

(e) 前記第 2 収容部に標的核酸と検出用試薬との混合流体よりも比重の小さい疎水性流体を注入する機構、前記各収容部を覆う蓋を脱着させる機構、標的核酸を蛍光させるための照射光を投射する機構および該照射光を受けた標的核酸からの光を受けて標的核酸を検出する機構、並びにこれらの機構を組み合わせた機構からなる群から選ばれるいずれかの機構とを備えることを特徴としており、上記 (a) ~ (e) の構成の組み合わせを変えることにより様々な装置を実現できる。

以下に、標的核酸を増幅させる機構を備えた装置について説明する。なお、上記に示した P C R 法を用いて標的核酸を増幅させる装置と同様の箇所については概略的な説明を記載しその詳細な説明については省略する。

40

【 0 1 8 6 】

図 3 8 は標的核酸の抽出から検出まで実行するための複数のウェルおよびノズルを示した斜視図である。図 3 8 に示すように、一体的にカートリッジ化された各処理ライン 7 0 0 A ~ 7 0 0 F では、例えば、検体を収容するウェル 7 0 2、溶解液を収容するウェル 7 0 4、緩衝液を収容するウェル 7 0 6、捕捉粒子である磁性粒子を収容するウェル 7 0 8、検体から抽出された核酸を洗浄するための洗浄液やピペットチップを洗浄するための洗浄液が収容されたウェル 7 1 0、磁性粒子と標的核酸とを分離するための試薬を含む溶出液を収容したウェル 7 1 2、検体から核酸を抽出してなる標的核酸含有溶液を一時的に収容するウェル 7 1 4、標的核酸を増幅させるための乾燥 (例えば、凍結乾燥された試薬)

50

された試薬（検出用試薬）を含有するウェル716、標的核酸含有溶液中の標的核酸を増幅することによって取得された増幅産物を検出するための検出用ウェル718が、配列されている。

【0187】

第1～第6処理ライン700A～700Fの上方には、各処理ライン700A～700Fに対応して6個のノズルユニット720がライン方向Pに移動自在に設けられ、各ノズルユニット720にピペットチップ730が装着可能となっている。なお、処理ラインの本数は6本に限らず適宜変更してよい。

【0188】

図39にノズルユニット720の先端部を示した部分斜視図を示す。図39(a)に示すように、ノズルユニット720は、例えば、検体や標的核酸を含有した溶液等の流体を吸引/排出するポンピング開口730、標的核酸の増幅産物に蛍光反応用のトリガー光を照射するプラスチック光ファイバ（以降、POFという）732、標的核酸からの光を受光するレンズ734などを備える。レンズ734はポンピング開口730内に配置され、ポンピング開口730の周囲には相互に等間隔を隔てて例えば8個のPOF732が配置されている。なお、ノズルユニットの形状は上記に限らず、例えば図39(b)や(c)に示すようなものでもよい。図39(b)に示すように、ノズルユニット760の先端の中央部には、流体を吸引/排出するポンピング開口762とレンズ764とが備えられ、その周辺部には4つのトリガー光照射用のPOF767を備えている。また、図39(c)に示すように、ノズルユニット770の先端部の中央部にポンピング開口772とトリ

10

20

【0189】

図40はノズルユニット720をポンピング開口730の延伸方向と平行な平面で切断した断面図である。図40に示すように、ポンピング開口730の周囲には、例えば8個のPOFが配置され、ポンピング開口730内の中央にはレンズ734および光学像伝達のPOF740が配置されている。レンズ740は、検出用ウェル748内に収容された増幅産物含有溶液と対面し、POF740側に増幅産物溶液の光学像を結像する。レンズ740によって結像された光学像はPOF740中を伝わり、後述する再結像光学系（図41参照）に入力される。レンズ734の周囲に、トリガー光を照射するPOF732を配置したことにより、画像の周辺部が暗くなるシェーディングが抑えられ、クオリティの高い増幅産物の画像の取得が可能となる。また、ノズルユニット全端部の構造は上記に限らず、図40(b)に示すような構造としてもよい。図40(b)に示すように、ノズルユニット780はポンピング開口782とトリガー光照射用のPOF784とを備える。このように、ポンピング開口、トリガー光照射用の光ファイバ、および/またはイメージセンサへ検体用ウェル内の光学像を伝達する光ファイバーとを一体化したノズルユニットと、直線状に配列された処理ラインにより、検体などのポンピングと標的核酸の増幅産物の検出とを兼ねるノズルユニットを処理ラインに沿って直線状に動かすだけで検体からの標的核酸の抽出から増幅産物の検出までを実行でき、装置のコンパクト化が期待できる。特に、ノズルユニットはポンピング開口と光ファイバーとにより細径化することができ、これにより隣り合うノズルユニット間の間隔および処理ライン間の間隔を狭めることができ、核酸検出装置を更にコンパクト化できる。

30

40

【0190】

図41は標的核酸検出装置の機能ブロック図である。図41に示すように、測定システム680は、中央制御部832、ノズル位置制御部834、チップマウント制御部836、磁場制御部838、等温制御ユニット840、ポンピング制御部842、計時部843、検出部845、RAM848、ROM850、表示パネル852、操作インターフェース854、再結像光学系856などを備える。

【0191】

ノズル位置制御部834は、互いに直行したXZ軸（2軸）を備え、第1、第2モータ861、862の2つのモータによってノズルユニット720の位置を制御する。XZ軸

50

は、例えば、P方向を向いたX軸は各処理ライン700A~700Fにおけるウェルの配列方向と略平行な方向をなし、Z軸はX軸と略垂直をなすウェルの近位置と遠位置との間を結ぶ方向と略平行な方向に向けられている。検体の処理が開始され各ノズルユニット720が移動するとき、例えば、X軸上での移動と、Z軸上での移動との2段階でノズル720が駆動することで、各処理ライン間を横断することなく各処理ライン700A~700Fに沿って処理を実行することができる。このとき、各ノズルユニット720が同時に作動することにより、より各処理ライン700A~700F間の検出環境を揃えることが可能となり、より正確な増幅産物の検出やその後の分析を実行することが可能となる。

【0192】

ROM850に記憶する処理プログラムとしては、例えば、(1)細胞やウイルスからRNAを抽出し増幅して増幅産物の検出を実行する第1プログラム、(2)血液等の生体サンプルからDNAを抽出し増幅して増幅産物の検出を実行する第2プログラム、(3)細菌等からプラスミドDNAを抽出する第3プログラムなどがあり、目的に応じてROMに記憶させるプログラムは適宜変更するとよい。

【0193】

計時部843は、ROM850から読み出されたプログラムに応じて時間のカウントを行う。時間のカウントは、例えば、タイミングクロックに基づき標的核酸の等温増幅を行うときなどに実行され、これにより各工程の実行期間を正確に管理できる。

【0194】

等温制御ユニット840は、サーマルセンサ870、温度制御部872、ヒータ874を備える。温度制御部872はサーマルセンサ870からの温度信号に基づき温度を検知し、サーマルセンサ870は、例えば凍結乾燥された核酸増幅用試薬を収容したウェル716の近傍に配置され、ウェル716内に収容された標的核酸含有溶液の温度に応じて温度信号を温度制御部872に送出する。温度制御部872はサーマルセンサ870からの温度信号に基づきヒータ874の通電をコントロールすることでウェル716内の流体の温度を所定温度に制御する。これにより、一定温度が要求される等温増幅または温度を変化させるPCRを実行することができる。

【0195】

検出部845は、トリガー光源890、POF740からの光を受光するためのイメージセンサ894、検出回路896などを備える。トリガー光源890からのトリガー光をPOF732内で導光させることにより検出用ウェル718内にトリガー光を照射することができる。イメージセンサ894には例えばCCDやCMOS等のイメージセンサを用いることができ、再結像光学系856からの光を受けて画像信号を検出回路896に出力する。検出回路896はイメージセンサ894からの受光信号を基に画像処理して核酸の検出判定を行う。

【0196】

次に本発明の核酸検出システムの作用について説明する。

ユーザによって選択された処理プログラムがROM850から読み出され、この読み出された処理プログラムを基に核酸検出システム680の各部が作動する。ユーザは各処理ライン700A~700Fのウェル702に取得した検体を手動で収容し、図示しない遮蔽扉などによって第1~第6処理ライン700A~700Fを外側から遮蔽する。第1~第6処理ライン700A~700Fは、例えば、2列を検体から標的核酸を抽出し増幅後に検出するためのラインとして使用し、2列をネガティブ/ポジティブコントロール用として使用し、残り2列を検量線作成用として使用するなど適宜変えるとよい。第1~第6処理ライン700A~700Fの遮蔽が検出されると検体の処理が開始され、ノズルユニット720が駆動して検体と溶解液とを混合する。この混合液の攪拌後、磁性粒子を混合液に加えて攪拌する。

【0197】

磁性粒子の加えられた混合液の攪拌後、磁性粒子を拘束して標的核酸が接合した磁性粒

10

20

30

40

50

子を取得する。取得した磁性粒子は磁性粒子と標的核酸との結合を切断する分離液に混合され、混合後、標的核酸と磁性粒子とが分離され標的核酸が取得される。取得された標的核酸含有溶液は増幅工程に供するため一時的に714に収容される。ウェル714に収容された標的核酸含有溶液は核酸増幅用の試薬が予め収容されたウェル716に分注され、さらにミネラルオイルが分注され等温増幅反応が実行される。

【0198】

ここで、等温増幅反応としては、例えばLAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)法が用いられる。周知のようにLAMP法では鎖置換活性酵素と2対のプライマー（インナープライマーおよびアウトプライマー）とを用いて増幅産物を取得する。LAMP法は鋳型核酸の2本鎖から1本鎖への熱変性の必要がなく、増幅にかかる工程を等温度で実行することができる。さらに、PCR法を用いた場合は約5分の増幅サイクルを少なくとも25～30回程度繰り返し、LAMP法をはじめとする等温核酸増幅法では、30分程度で検出に十分な増幅産物を取得することができる。プライマー設計に関する基本事項はW02000/28082号公報やW02002/24902号公報などに記載されている。

10

なお、等温増幅反応工程としては上記のLAMP法以外にも例えば、

キメラプライマーを用いるICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic Acid)法；

オープンサークルプローブ(Open Circle Probes : OCP)とDNAリガーゼとプライマー対と鎖置換型DNAポリメラーゼとを用いて増幅産物を取得するRCA (Rolling Cycle Amplification)法；

20

2対のプライマーと制限酵素と鎖置換活性酵素とS化アナログ基質とを用いて増幅産物を得るSDA (Strand Displacement Amplification)法；

IVT (In Vitro Transcription)法；

逆転写酵素などを用いてRNAをトリミングしRNAを増幅産物として取得するTRC (Transcription Reverse transcription Concerted amplification)法；

逆転写酵素やRNAポリメラーゼなどの3種類の酵素と鋳型特異的プライマー対を用いてRNAを増幅するNASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法、RNAとDNAのキメラ構造を有するプライマーを用いて増幅産物を取得するSPIA法など、一定の温度で標的核酸を増幅させる手法であればどのような方法でもよい。

30

【0199】

このようにPCR法の代わりに等温増幅反応工程を用いると、標的核酸の増幅のために核酸溶液を、室温から94度、72度、55度といった温度に昇温あるいは降温させる必要がなく、このためサーマルサイクラーといった温度を比較的高温に昇温させる装置も不要となる点で好ましい。また、等温増幅法は、検出するのに十分な量の増幅産物を取得するまでにかかる時間が数十分程度であることから、標的核酸の抽出から検出までにかかる時間の短期化が十分に期待できる。

【0200】

凍結乾燥された核酸増幅用試薬に抽出された標的核酸含有溶液を混合した後、ウェル716にはノズルユニット720によって疎水性流体が注入される。疎水性流体としては、例えば、 $C_n H_{2n+2}$ (nは3～20の整数を示す)で示される鎖式飽和炭化水素、いわゆるミネラルオイルが挙げられ、好ましくは $C_n H_{2n+2}$ (nは16～20の整数を示す)の流動パラフィンが挙げられ、このような疎水性流体がウェル716に注入される。このミネラルオイルにより外部から核酸増幅用のウェル716内に夾雑物が侵入することを防止することができるとともに標的核酸含有溶液と等温増幅用試薬との混合溶液の蒸散を防ぐことができる。なお、ミネラルオイルの代わりまたはミネラルオイルと併用して、ウェル716の開口を塞ぐ固体形成されたシーラントを、ノズルユニット720を用いてウェル716の開口に装着してもよい。

40

【0201】

標的核酸の増幅後、増幅産物溶液がノズルユニット720によって検出用のウェル71

50

8 に移送され、増幅産物の検出が行われる。

以上のように、検体の収容ウェル702、標的核酸抽出用の磁性粒子を収容したウェル、洗浄用のウェル、等温増幅用の凍結乾燥試薬を収容したウェルを順にライン状に並べたことにより、ノズルユニット720を無駄なく駆動させることができ、処理時間の更なる短期化が期待できる。また、ノズルユニット720およびピペットチップ730が直線状に駆動するため他の処理ラインの検体の混入を防止でき、コンタミネーションを低減することができる。また、6列の処理ラインで同時に

【0202】

また、標的核酸の検出装置の態様は上記に限らず様々な変更が可能である。例えば、上記の図38では6列の処理ライン700A~700Fとそれらの処理ライン700A~700Fに対応する6つのノズルユニット720を備えたが、ノズルユニットの本数は1本でもよい。図42は、1本のノズルユニットを備えた標的核酸の検出装置の概略を示した斜視図である。図42に示すように、核酸検出装置900は、1本のノズルユニット902を備える。ノズルユニット902は、第1ガイドレール904によってウェルの配列方向に沿って移動することができ、第2ガイドレール906に沿って第1~第6処理ライン700A~700Fを横断する方向に沿って移動することができる。このような装置構成とすることでノズルユニットの個数を減らし低コストな装置としてもよい。

10

【0203】

また、上記の実施形態では、イメージセンサ894とトリガー光源890とを設けたが、イメージセンサの代わりに光電子増倍管を一体化した核酸検出装置としてもよい。

20

【0204】

また、分注用のノズルと標的核酸の検出器とを別個にしてもよい。図43に示すように、核酸検出装置918は、第1~第6処理ライン920A~920Fに対応した6本の分注ノズル922と、1基の核酸検出器924とを備える。各分注ノズル922はウェル926の配列方向に移動制御され、検出器924は、検出用のウェル927上で、第1~第6処理ライン920A~920Fを横断する方向Sに移動可能に設けられている。このような装置構成とすることで効率的な処理が期待できる。

【0205】

また、核酸検出器は1個だけでなく、図44に示すように各処理ラインに対応して設けることもできる。図44に示すように、第1~第6処理ライン930A~930Fに対応して核酸検出器932を備える。このような装置構成とすることで、検出器932の駆動機構が不要となるとともに、処理効率の更なる向上が期待できる。

30

【0206】

また、複数の処理ラインを備えた核酸増幅装置において標的核酸の増幅工程に等温増幅法を用いる場合、各ラインの核酸の増幅率が異なることがあり、この場合には、温度制御部によって反応温度を補正してもよい。増幅反応の温度を補正することにより各処理ラインの増幅率の調和が期待でき、標的核酸のより正確な定量が期待できる。

【0207】

また、上記ではノズルユニット720にポンピング開口730と増幅産物の光学像をイメージセンサ894に伝達するプラスチック光ファイバ740とを設けたが、このポンピング開口の外部に増幅産物の光学像をイメージセンサに伝達する光ファイバを設けてもよい。図45はポンピング開口の外部に検出用ウェル内の光学像をイメージセンサに伝達する光ファイバを配置したユニットを光ファイバの延伸方向と略平行な平面で切断した断面図である。一体化ユニット1000は、ノズル部1010と光ファイバ部1020とを有し、光ファイバ1020はノズル部1010の外部に配置されている。このようにノズル部1010の外部に光ファイバを配置したユニットとしてもよい。

40

【0208】

また、図46に示すように、複数の検出用ウェルを備えた核酸検出装置において、それぞれの検出用ウェル内の増幅産物を検出できるようにそれぞれの検出用ウェルに光ファイバを配設しこれら複数の光ファイバを選択的に使用して、単一の検出器で標的核酸を検出

50

するようにしてもよい。核酸検出装置 1050 は、単一のイメージセンサ 1052、このイメージセンサ 1052 に検出用ウェル 1054 内の光学像を選択的に伝達する切り替え装置 1060、分注用のノズル 1062、標的核酸の抽出から増幅までを実行するための複数のウェルを配列した処理ライン 1065 などを備える。切り替え装置を切り換えて各検出用ウェル 1054 から増幅産物を検出することができ、このよな装置構成としてもよい。

【0209】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0210】

10

実施例 1

A F P 含有検体の処理

[目的]

H A M A とヒトリウマチ因子(Human Rheumatoid Factor)(IgM)をProtein G 磁性粒子、またはanti-Human IgM磁性粒子を用いて夾雑物を除去処理し、この処理が A F P (-feto protein)の値にどのような影響をおよぼすかを調べた。

[使用した試料および器具]

Anti-AFP HYb-2051 固定済みELISAプレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE(442404, Nunc.))

血清コントロール(Liquichek Immunoassay Plus Control Level 2,Bio-Rad)

20

HAMA(Human Anti Mouse Antibody) 1mg/ml

Dynabeads Protein G (Dyna,Invitrogen) (磁性粒子)

BioMag anti-Human IgM (Bangs Laboratories,Inc.) (磁性粒子)

AFP抗原(Original conc. 4mg/ml)

AFP-HRP標識抗体(Original conc. 0.13mg/ml)

ブロックエース粉末 (1包:4g 100ml分 Cat.No.UK-B80 製造元:雪印乳業株式会社)

10x PBS

8 連ピペット

ディスプレイプレート

SPECTRAMAX190 (Molecular Devices)& SoftMax Pro4.8

30

Nunc-Immuno Wash 8

TMB Peroxidase Substrate & Peroxidase Solution B(H2O2)(KPL:Kirkegaard & Perry Laboratories)

ELISA反応停止液(1.0N H₂SO₄)

Sucker

キムタオル

[実験内容]

下記のサンプル No. 1 ~ No. 6 に示す検体を調製し、A F P 値の測定を行った。

[磁性粒子の結合能の算出]

各検体の A F P 値を取得するにあたり、予め磁性粒子の結合能を計算した。

40

血清中の各イムノグロブリン含有量は、下記の表 1 の通りである。

【表 1】

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgE
分子量(kDa)	970	184	146	146	165	146	160	160	188
血清レベル (mg/ml)	1.5	0.03	9	3	1	0.5	2.0	0.5	5x10 ⁻⁶
(%)	8.6	0.2	51.3	17.1	5.7	2.9	11.4	2.9	

参考:The IMMUNE SYSTEM

血清 5 μ l 中には略 0 . 0 4 ~ 0 . 1 0 m g の I g G が存在し、Dynabeads protein G

50

に吸着させるには100～250 μ l beadsが必要となる。

また、血清5 μ l中には略7.5 μ gのIgMが存在し、BioMag anti-Human IgMに吸着させるには50 μ l beadsが必要となる。

[洗浄液の作製]

ブロックエース粉末を略90mlのミリQ水に溶解させた。溶解確認後、100mlメスシリンダーにて100mlにフィルアップ(fill up)した。10x PBSを100mlはかりとり、1Lメスシリンダーに入れ、ブロックエース粉末も加え、ミリQ水を加えて1000mlにフィルアップ(fill up)した。

[各種検体における吸光度の測定]

本実験では、6種類の検体(サンプルNo. 1～6)について吸光度を測定した。ELISAプレートの反応検体は50 μ lとし、血清にはLiquichek Immunoassay Plus Control Level 2を用い、標識抗体AFP-HRPは1/800、n=3とした。

10

[サンプルNo. 1]

コントロールとしてPBS(Phosphate buffered saline)緩衝液を使用し、この溶液を、Dynabeads protein Gで処理した検体、BioMag anti-Human IgMで処理した検体、および未処理の検体についてそれぞれ吸光度を測定した。

[サンプルNo. 2]

血清コントロールとして血清5 μ lを含む溶液を使用し、この溶液を、Dynabeads protein Gで処理した検体、BioMag anti-Human IgMで処理した検体、および未処理の検体についてそれぞれ吸光度を測定した。

20

[サンプルNo. 3]

血清5 μ lとHAMMA 10%を含む溶液を調製して使用し、この溶液を、Dynabeads protein Gで処理した検体と未処理の検体とについてそれぞれ吸光度を測定した。

[サンプルNo. 4]

血清5 μ lとリウマチ因子10%を含む溶液を調製して使用し、この溶液を、BioMag anti-Human IgMで処理した検体と未処理の検体とについてそれぞれ吸光度を測定した。

[サンプルNo. 5]

血清5 μ lとHAMMA 10%とAFP 80 ng/mlを含む溶液を調製して使用し、この溶液を、Dynabeads Protein Gで処理した検体と未処理の検体とについてそれぞれ吸光度を測定した。

30

[サンプルNo. 6]

血清5 μ lとリウマチ因子10%とAFP 80 ng/mlを含む溶液を調製して使用し、この溶液を、BioMag anti-Human IgMで処理した検体と未処理の検体とについてそれぞれ吸光度を測定した。

[結果]

以下の表2に示される測定結果を取得した。

【表 2】

サンプルNo.	検体	処理	Abs450TMB	平均	標準偏差	変動係数
1	コントロール (PBS緩衝液)	ProteinG	0.0653	0.0642	0.0008179	0.0127
			0.0638			
			0.0634			
		Bio Mag	0.0651	0.0667	0.0017907	0.0268
			0.0658			
			0.0692			
		No beads	0.0685	0.0651	0.0029033	0.0446
			0.0653			
			0.0614			
2	血清 コントロール	ProteinG	0.2777	0.2722	0.0041721	0.0153
			0.2713			
			0.2676			
		Bio Mag	0.2841	0.2872	0.0030232	0.0105
			0.2862			
			0.2913			
		No beads	0.2959	0.3002	0.0076613	0.0255
			0.2938			
			0.3110			
3	血清+HAMA	ProteinG	0.2631	0.2543	0.006287	0.0247
			0.2510			
			0.2488			
		No Beads	1.2472	1.2696	0.0182491	0.0144
			1.2698			
			1.2919			
4	血清 +リウマチ因子	Bio Mag	0.7160	0.6917	0.0211292	0.0305
			0.6947			
			0.6645			
		No Beads	0.7215	0.7231	0.0016083	0.0022
			0.7225			
			0.7253			
5	血清 +HAMA +AFP	ProteinG	0.8900	0.8697	0.0143781	0.0165
			0.8594			
			0.8596			
		No Beads	1.4009	1.4392	0.0273761	0.0190
			1.4537			
			1.4631			
6	血清 +リウマチ因子 +AFP	Bio Mag	1.3443	1.3308	0.0128034	0.0096
			1.3345			
			1.3136			
		No Beads	1.3512	1.3675	0.0117284	0.0086
			1.3732			
			1.3782			

10

20

30

40

【AFP値の算出】

上記表2のAbs450TMB値に基づきAFP値を算出した。AFP値の算出に当たり図47、48から求められる数式

$$y = 0.0065x + 0.2088 \quad \text{式(1)}$$

$$y = 0.0068x + 0.0554 \quad \text{式(2)}$$

のうち、式(1)を用いて算出した。

算出されたAFP値を下記の表3に示す。

【表 3】

サンプルNo.	検体	処理	Beads処理	AFP値 [ng/ml]
1	コントロール (PBS緩衝液)	ProteinG	有	1.29
		Bio Mag	有	1.66
		No beads	無	1.43
2	血清 コントロール	ProteinG	有	9.75
		Bio Mag	有	12.06
		No beads	無	14.06
3	血清+HAMA	ProteinG	有	7.00
		No Beads	無	163.20
4	血清 +リウマチ因子	Bio Mag	有	74.30
		No Beads	無	79.12
5	血清 +HAMA +AFP	ProteinG	有	101.68
		No Beads	無	189.29
6	血清 +リウマチ因子 +AFP	Bio Mag	有	※Substract 66.20
		No Beads	無	※Substract 67.02

※印は、サンプル4との差を示した。

【0211】

[実験結果についての考察]

サンプルNo. 3の無処理(「No beads」処理)の場合のAFP値が示すように、HAMAが存在することによりAFP値が上昇することからHAMAが偽陽性の因子である可

10

20

30

40

50

能性が考えられる。

この考えを裏付けるため、H A M A を Dynabeads protein G で処理した結果、サンプル N o . 3 の Dynabeads Protein G で処理された場合の A F P 値は 7 . 0 0 となり、A F P 値はサンプル N o . 2 に示された A F P 値と同等のレベルにまで下がった。

これにより、H A M A が偽陽性を引き起こす因子であることが裏付けられる。

なお、サンプル N o . 4 の A F P 値については、Bio Mag で処理されたときの A F P 値と、無処理（「No beads」処理）の場合の A F P 値とでほとんど変わらなかった。

【 0 2 1 2 】

[結論]

Protein G Dynabeads を用いて検体に含まれる夾雑物を除去処理することで、偽陽性の原因と考えられる IgM を検体から除去することができる。これにより検体中の A F P の存在量をより正確に測定することが可能となる。

10

【 符号の説明 】

【 0 2 1 3 】

1 0 ピペットチップ

1 2 ウェル

2 0 カラム含有ピペットチップ

3 0 メンブレン含有ピペットチップ

4 0 ゲル含有ピペットチップ

5 0 ピペットチップ（筒状チップ）

20

7 0 抗原分別固定チューブ

7 2 スペーサピース

1 0 0 測定システム

1 0 2 中央制御部

1 0 6 チップマウント制御部

1 0 8 磁場制御部

1 1 2 ポンピング制御部

1 3 0 磁石

1 4 0 ポンプ

1 4 6 圧力センサ

30

1 5 0 測定システム

1 5 1 磁石

1 5 2 分注装置

1 5 3 ヒートブロック

1 5 4 検出装置

1 6 2 ノズル

1 6 4 ピペットチップ

1 7 0 P M T

1 7 1 光源

1 8 0 カートリッジ

40

1 8 1 ベースパネル

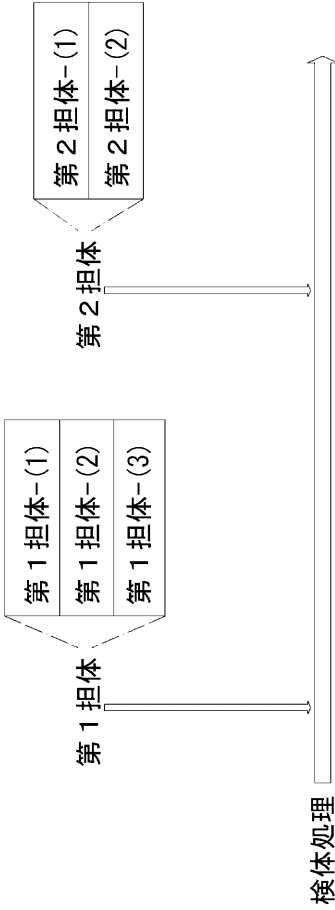
1 8 2 収容部

2 6 0 測定システム

2 6 2 システム本体

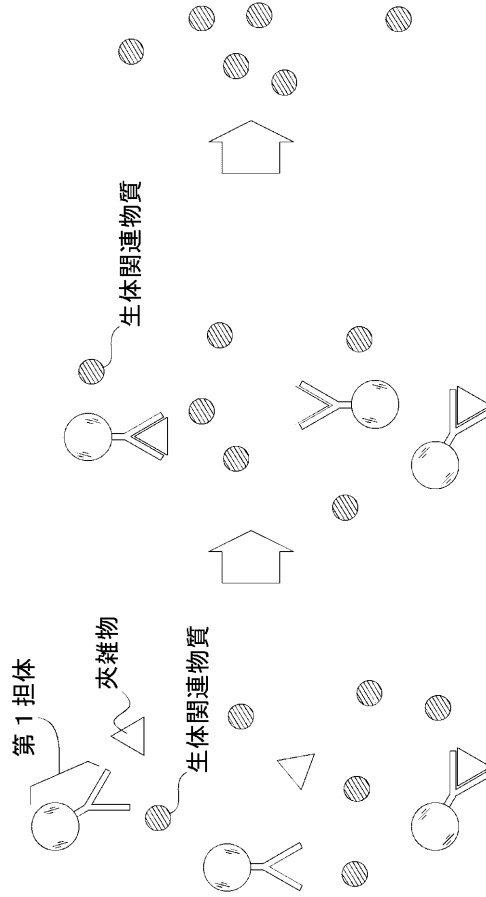
2 6 4 カートリッジ

【 図 1 】

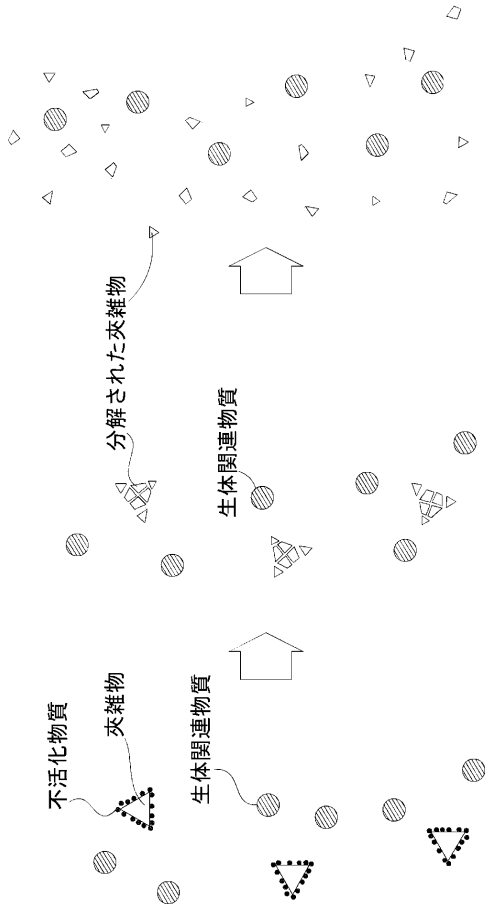


- ※ 第1担体 (1) : 夾雑物に対して親和性を有する物質を固定した担体
- 第1担体 (2) : 夾雑物を不活性化して親和性を有する物質を固定した担体
- 第1担体 (3) : 生体関連物質に対して親和性を有する物質を固定した担体
- 第2担体 (1) : 生体関連物質の検出用試薬が固定された担体
- 第2担体 (2) : 生体関連物質の検出用試薬を固相化してなる担体

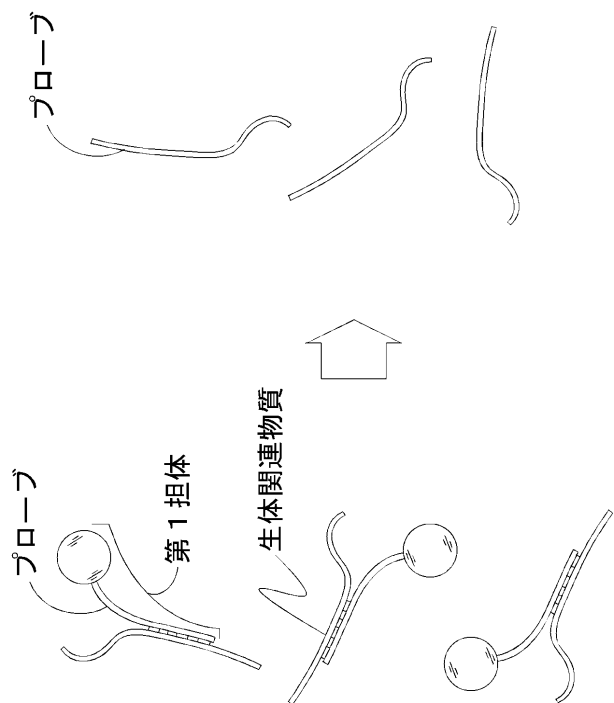
【 図 2 】



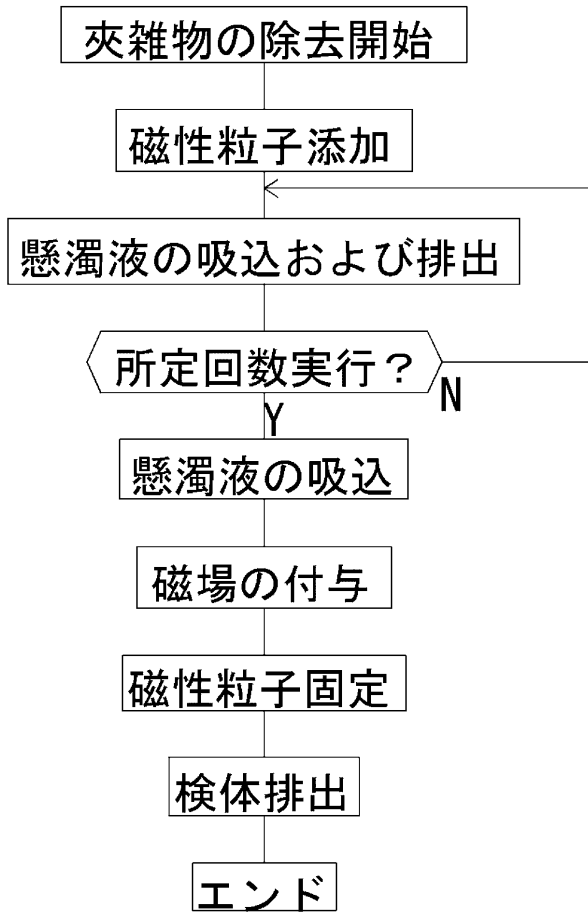
【 図 3 】



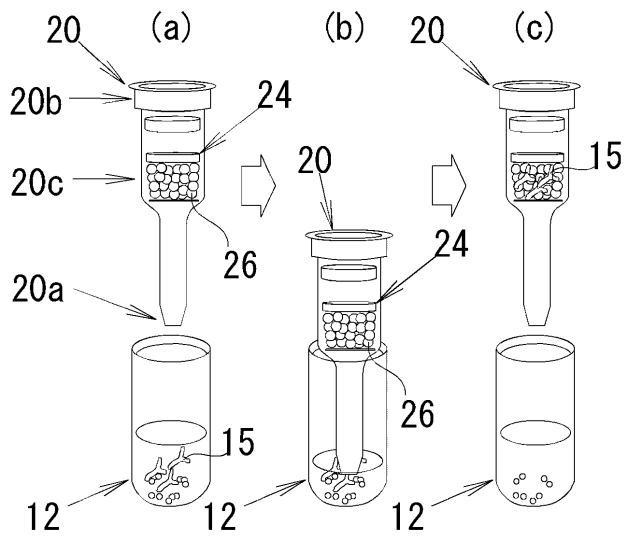
【 図 4 】



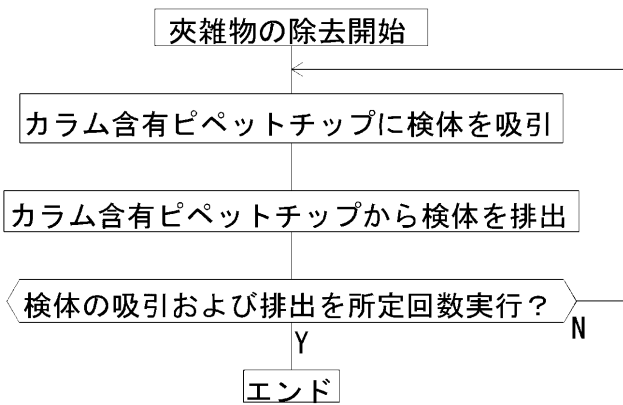
【図9】



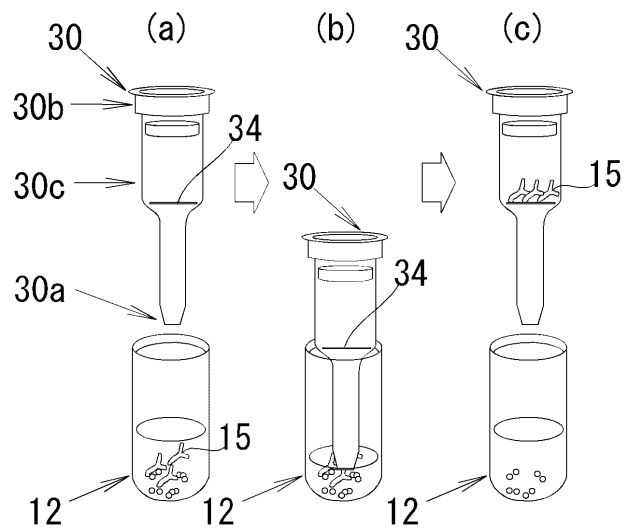
【図10】



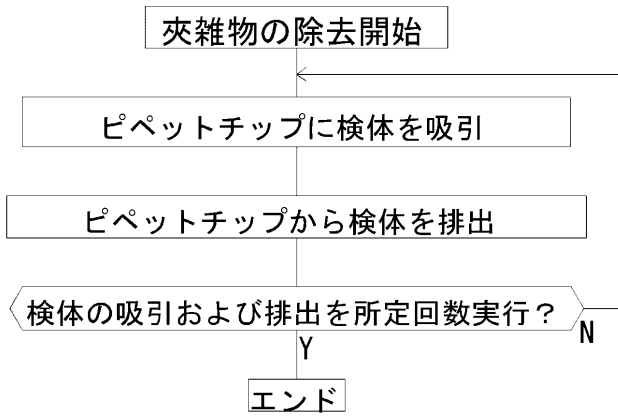
【図11】



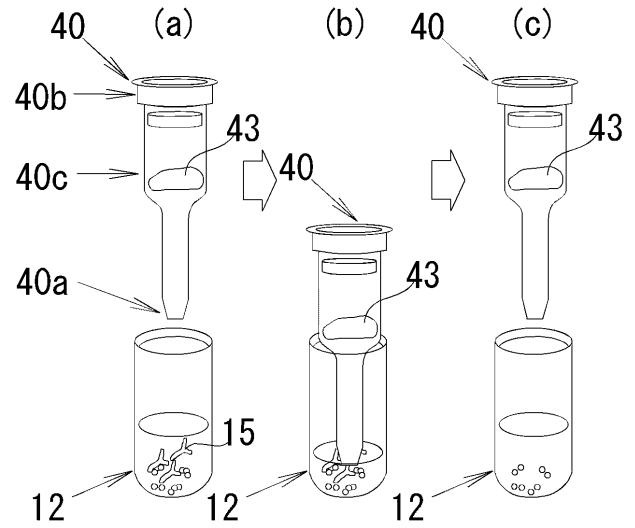
【図12】



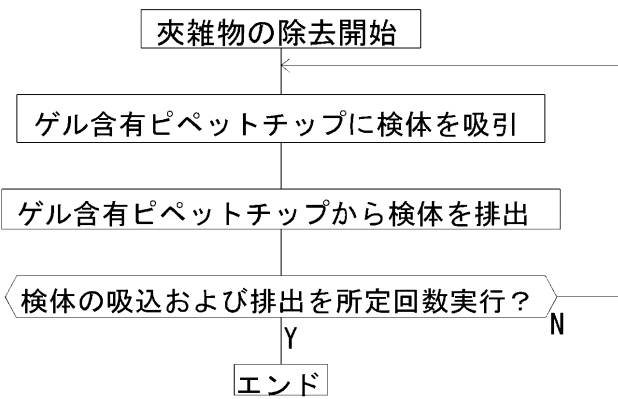
【図13】



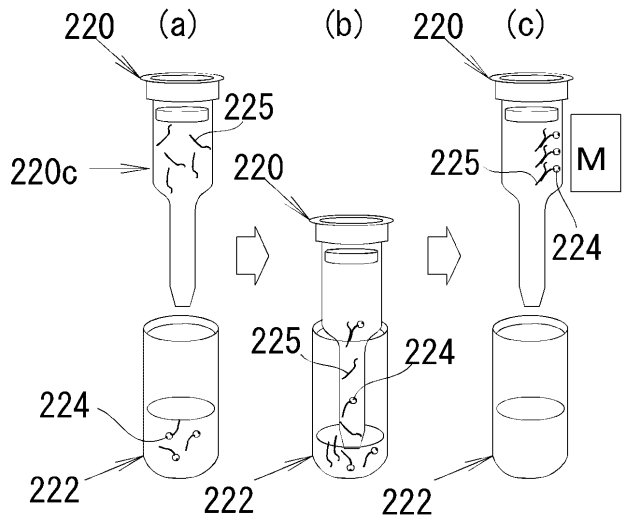
【図14】



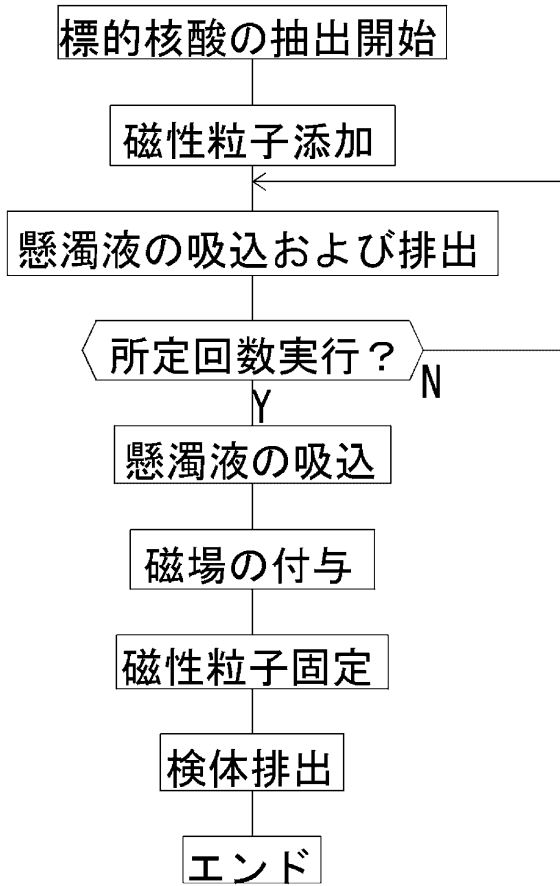
【図15】



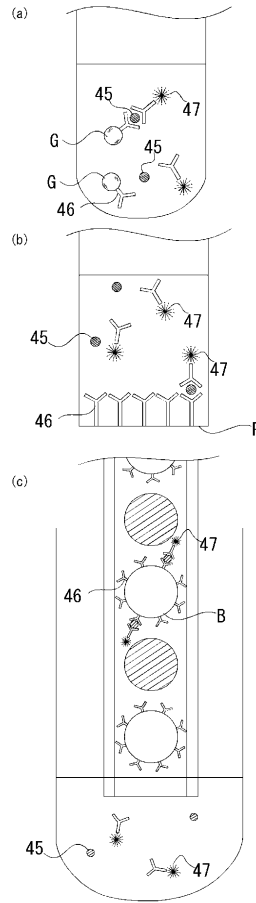
【図16】



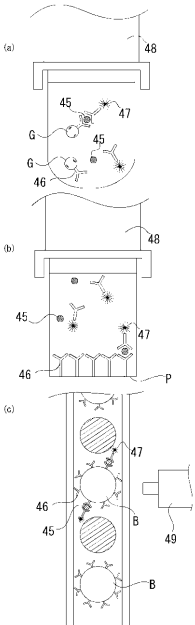
【図17】



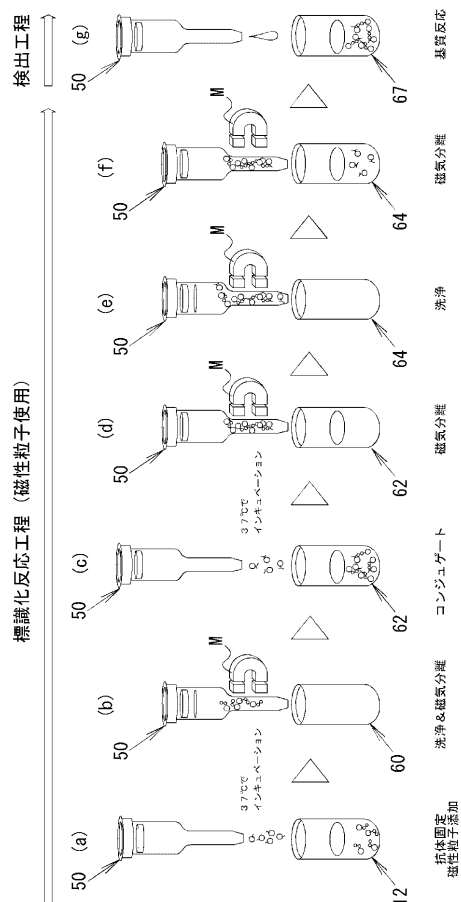
【図18】



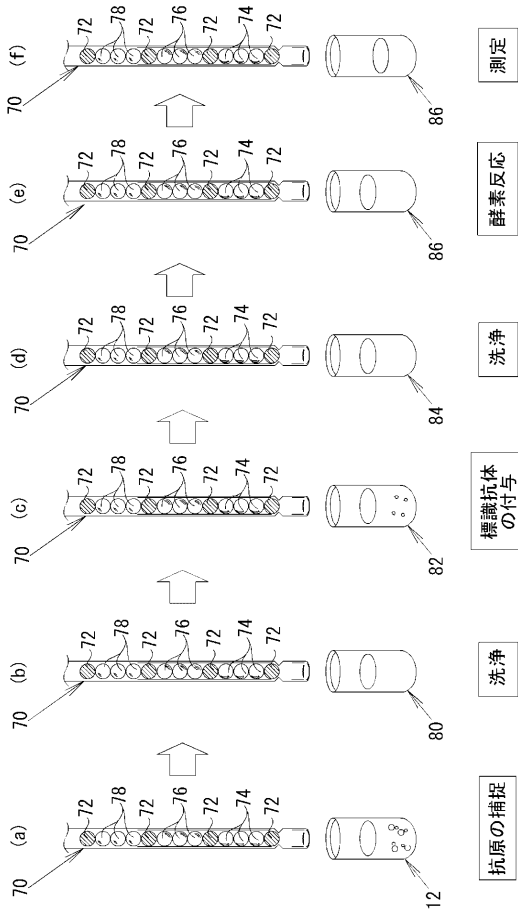
【図19】



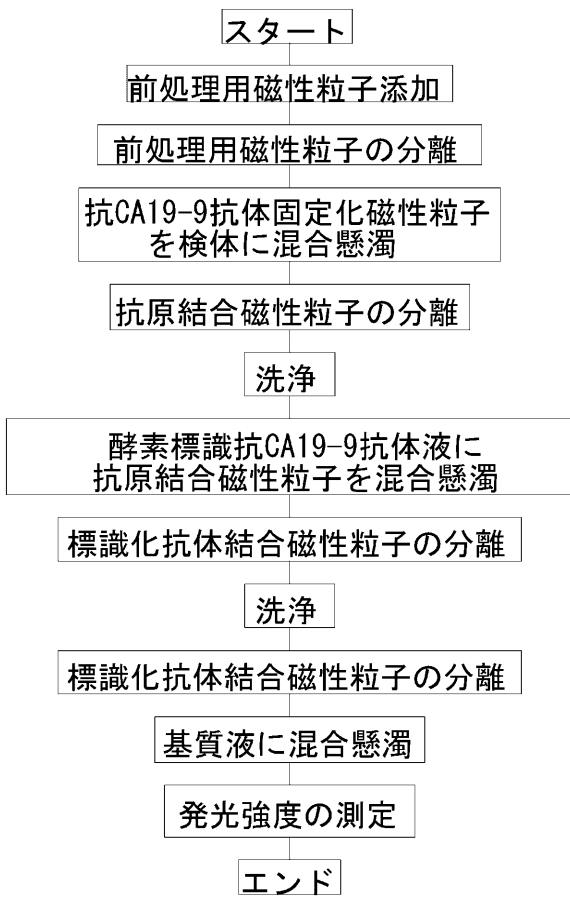
【図20】



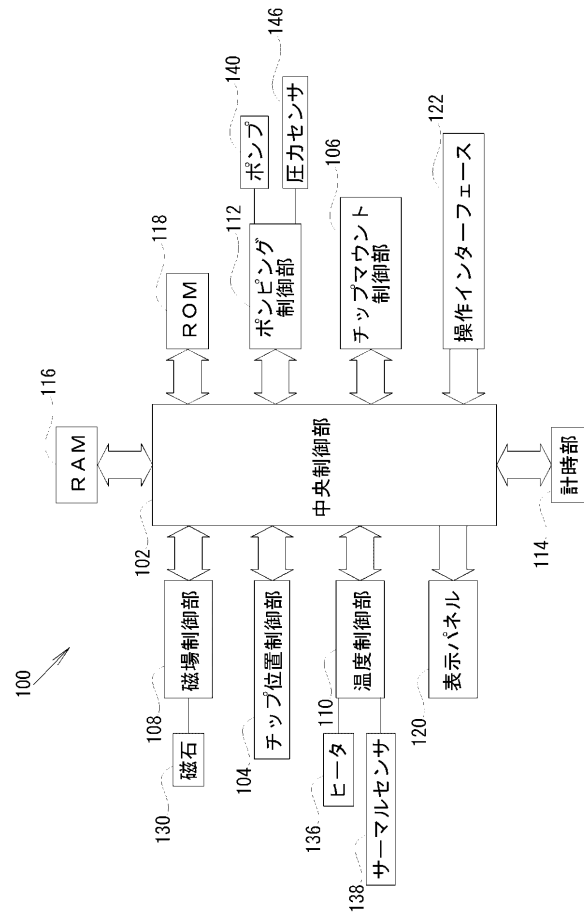
【図 2 1】



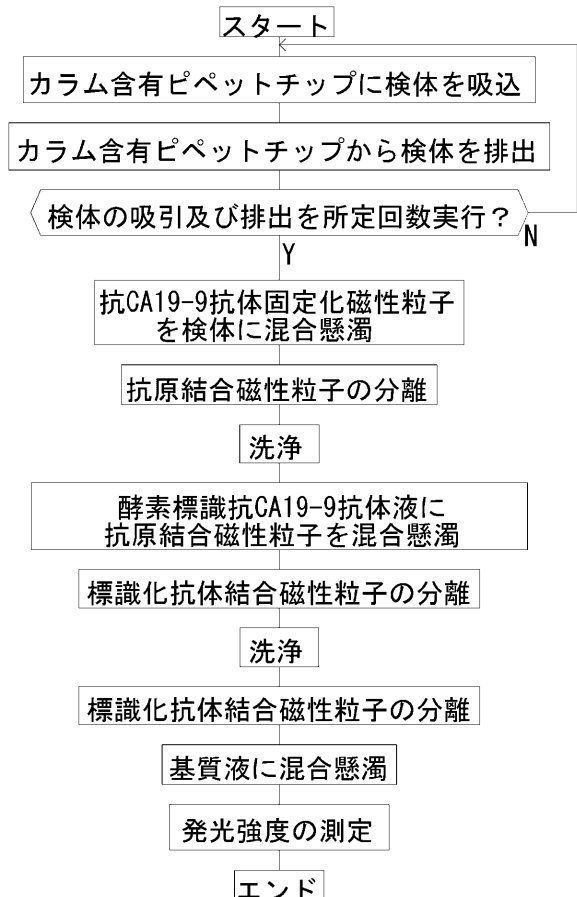
【図 2 3】



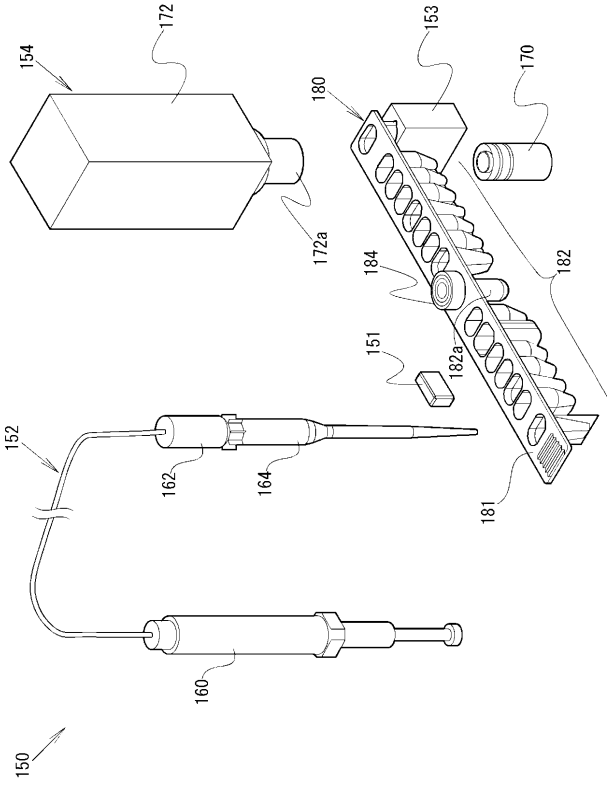
【図 2 2】



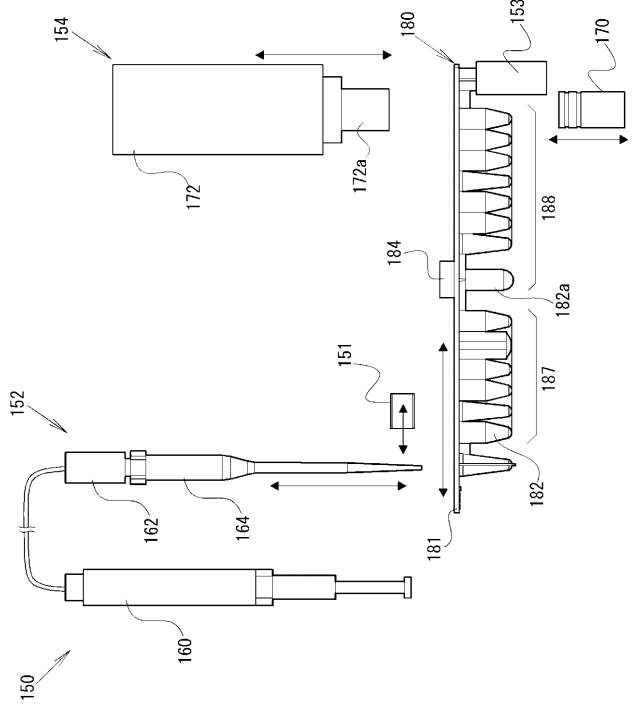
【図 2 4】



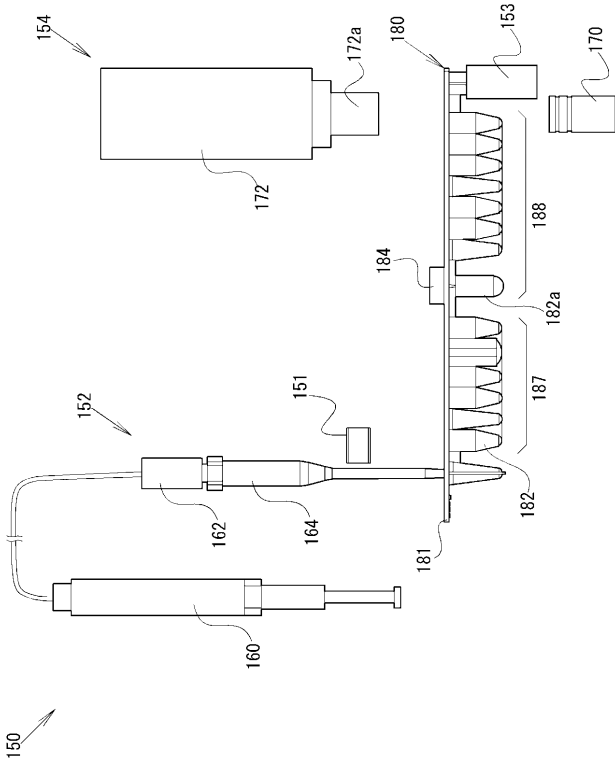
【 図 2 5 】



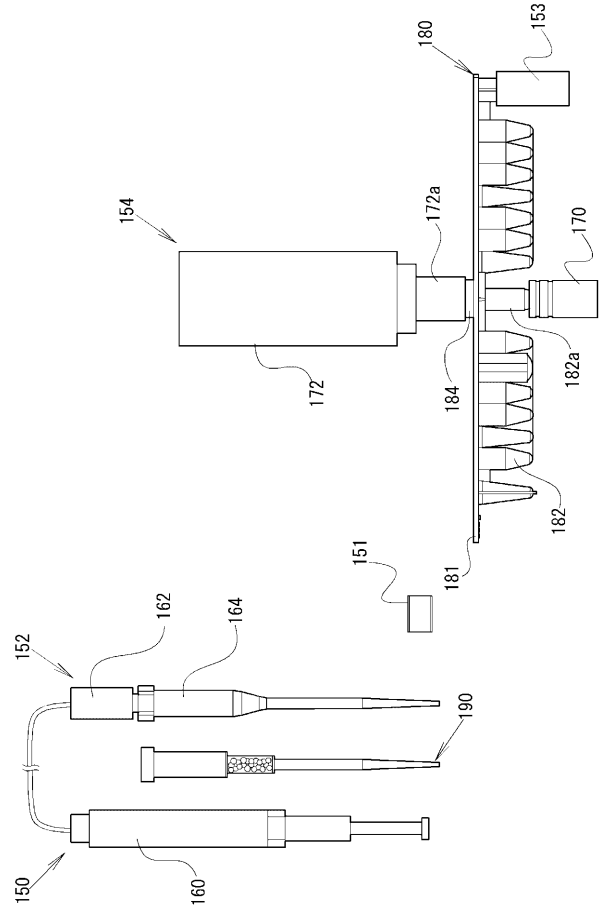
【 図 2 6 】



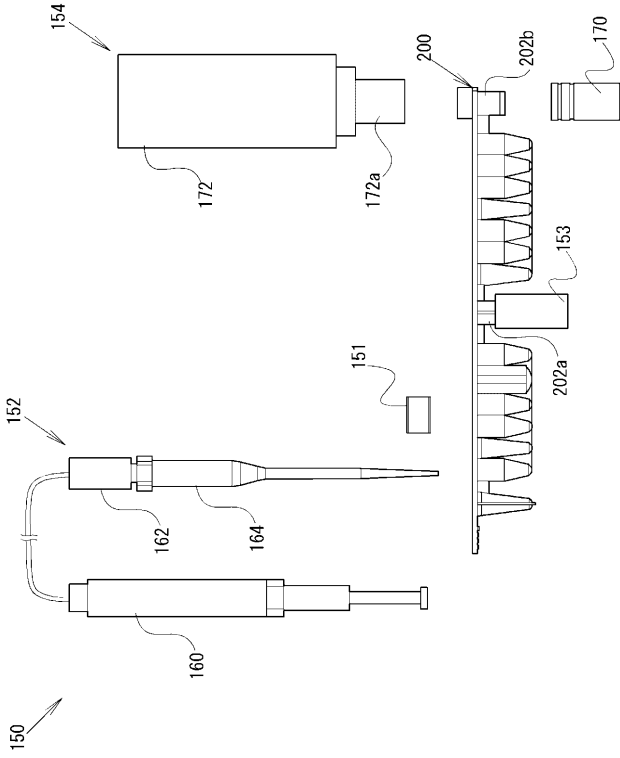
【 図 2 7 】



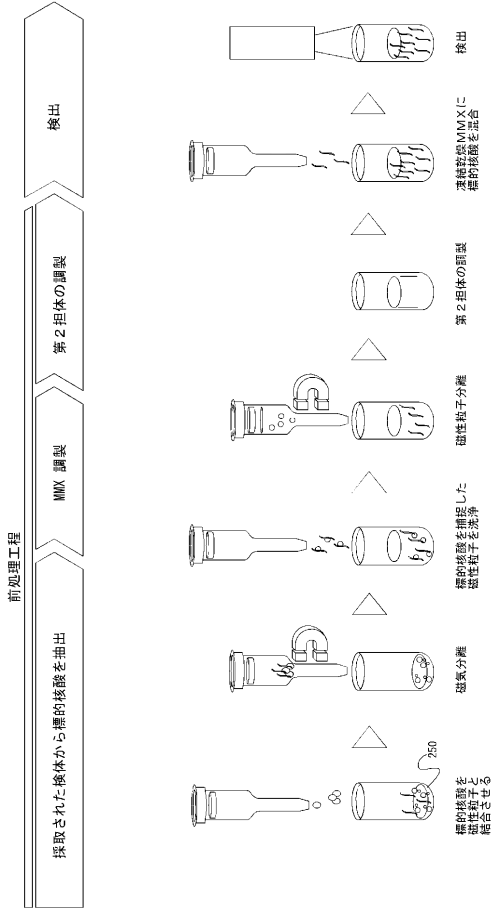
【 図 2 8 】



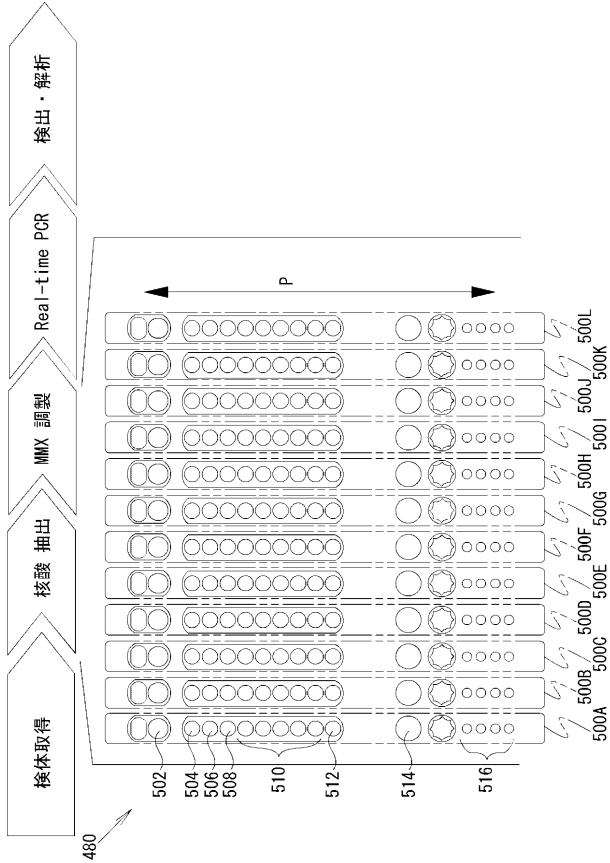
【図 29】



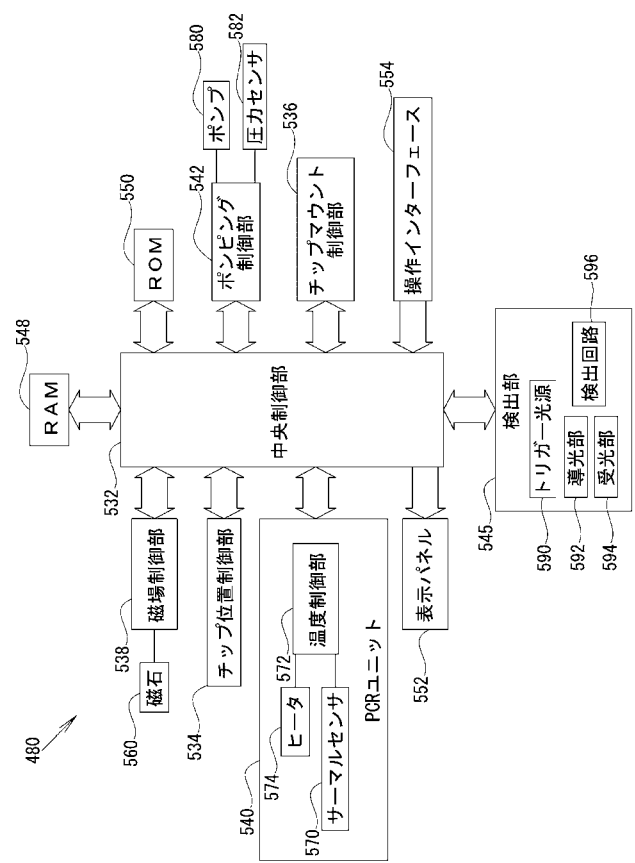
【図 30】



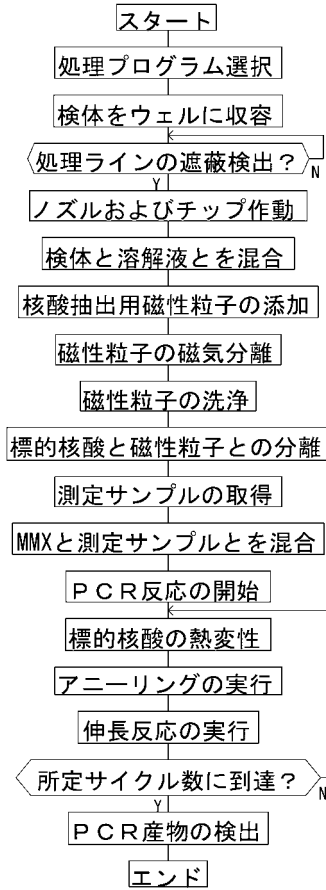
【図 31】



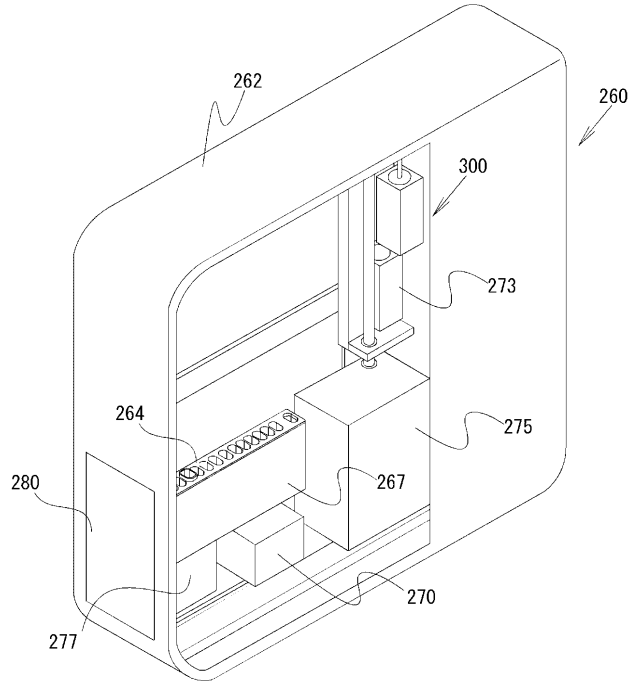
【図 32】



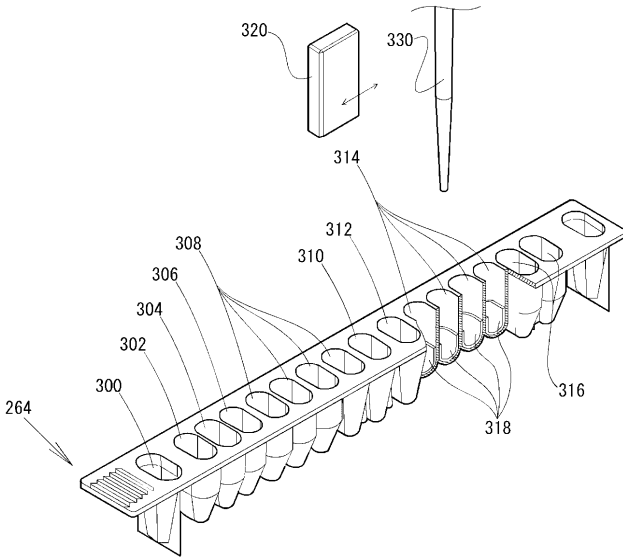
【 図 3 3 】



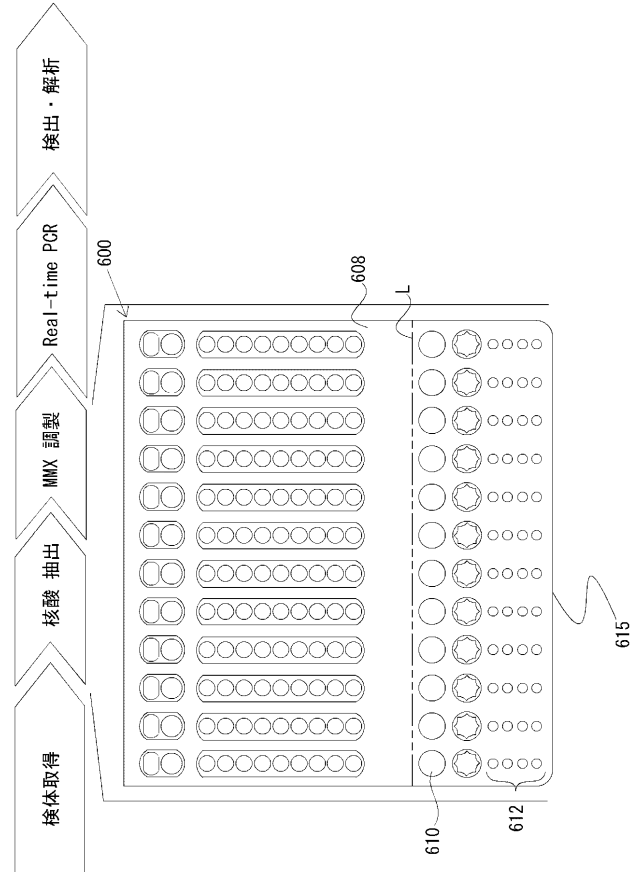
【 図 3 4 】



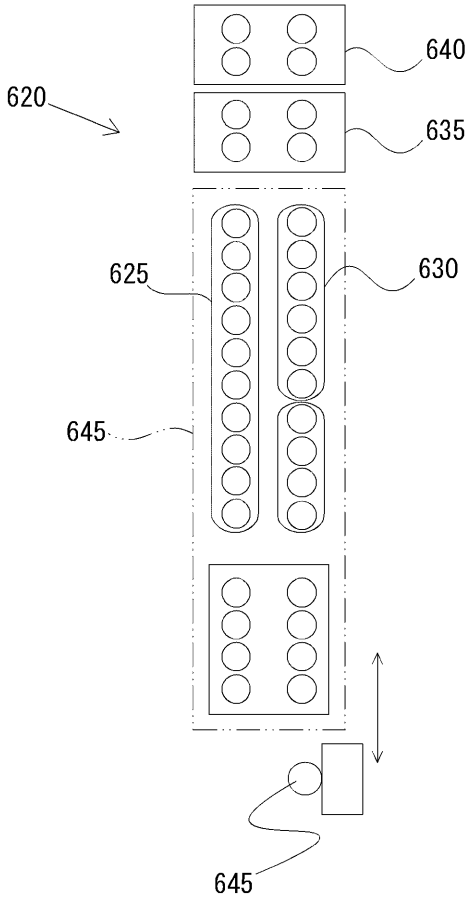
【 図 3 5 】



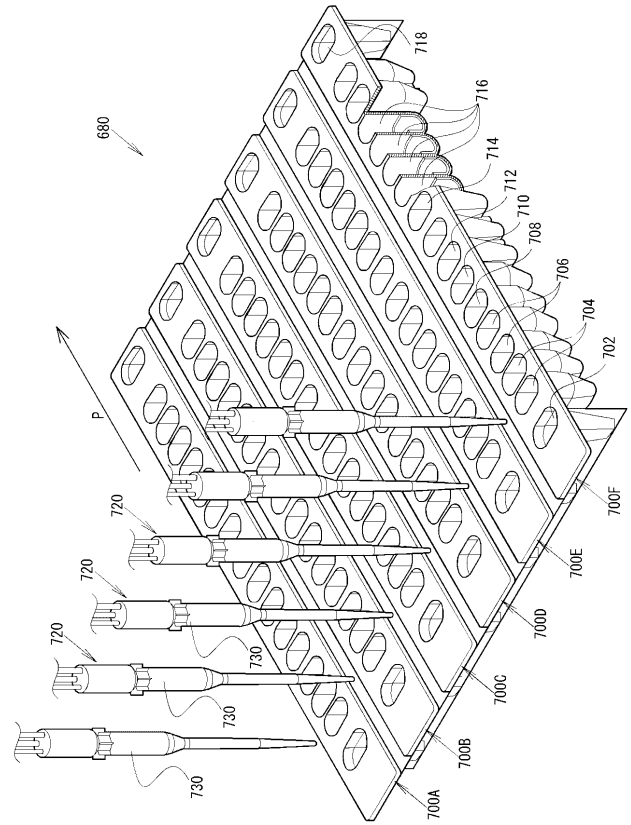
【 図 3 6 】



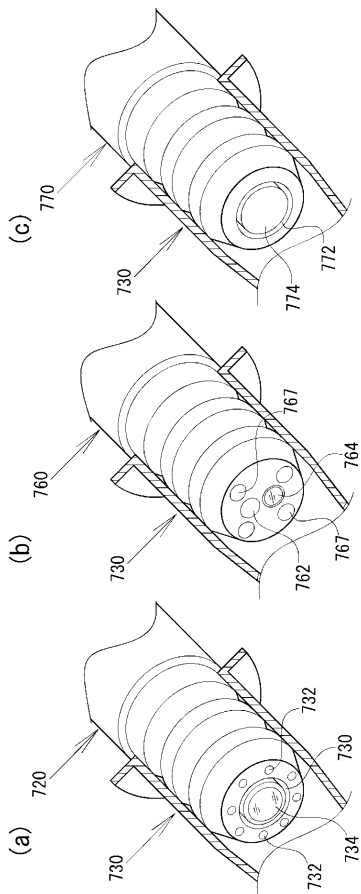
【 図 3 7 】



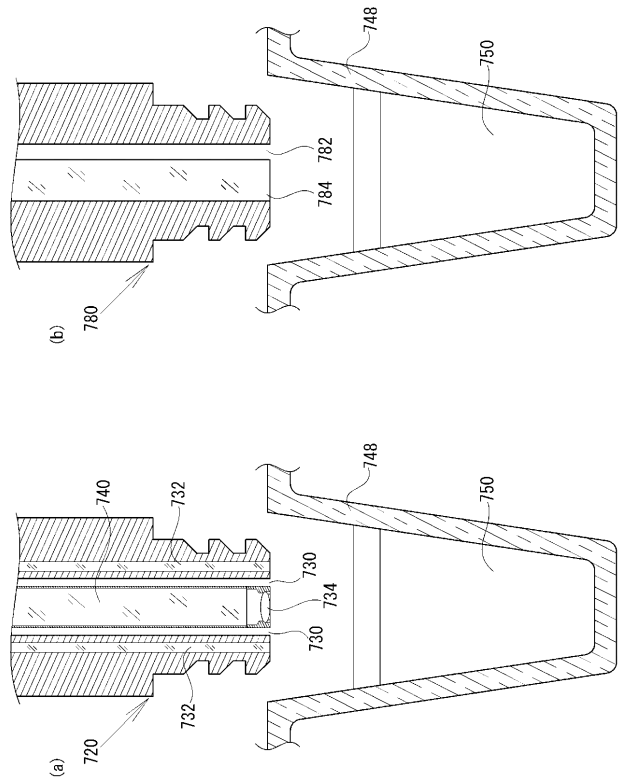
【 図 3 8 】



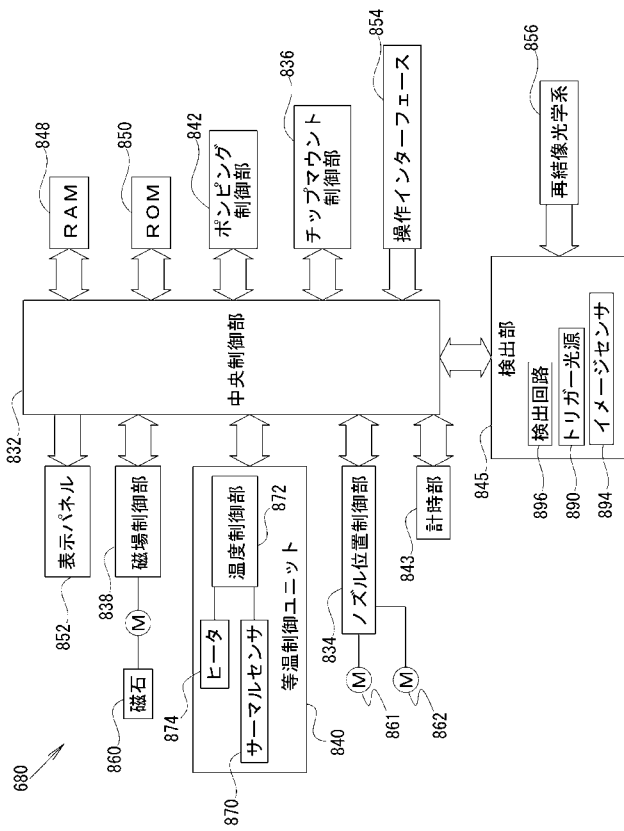
【 図 3 9 】



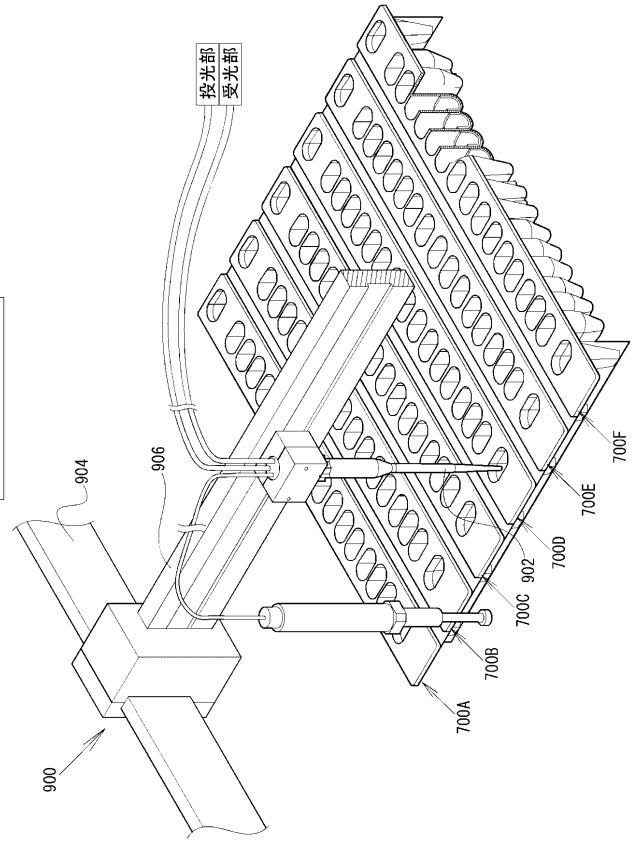
【 図 4 0 】



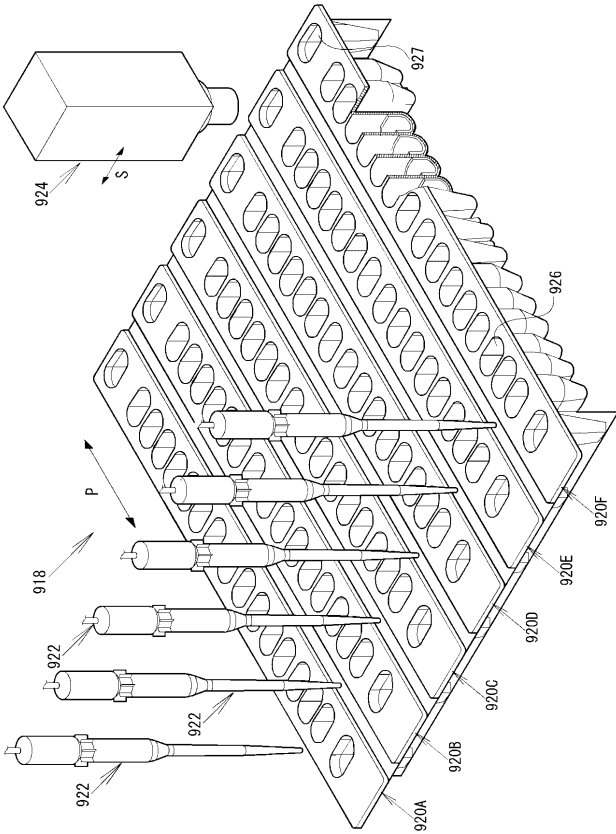
【図 4 1】



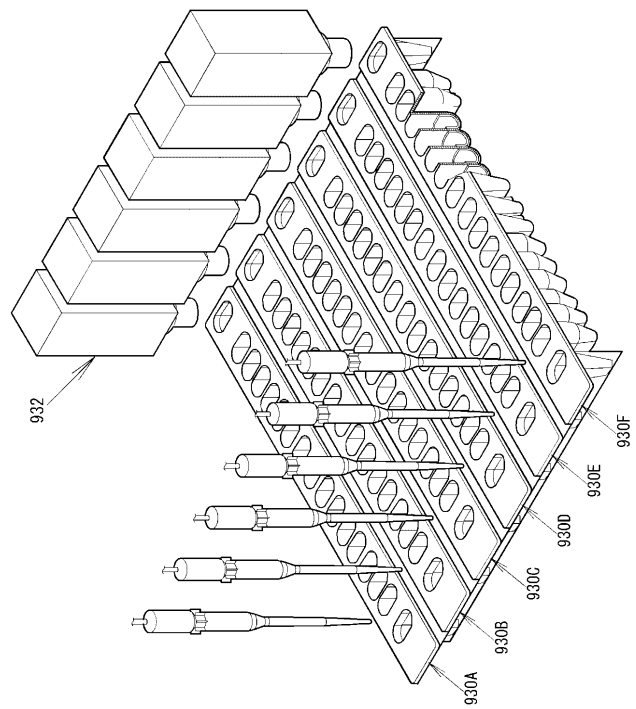
【図 4 2】



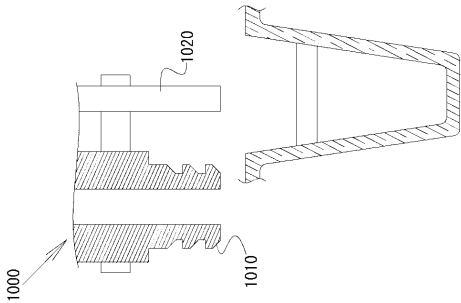
【図 4 3】



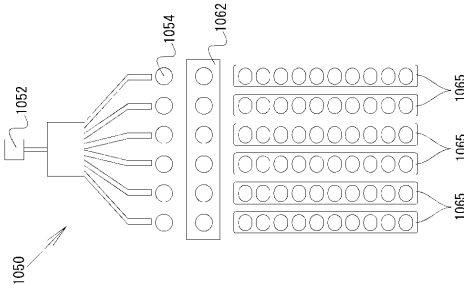
【図 4 4】



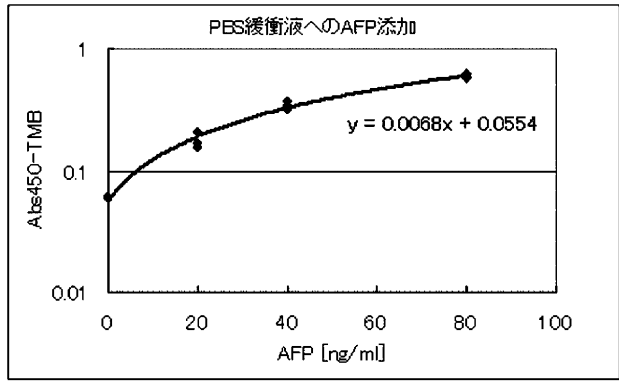
【 図 4 5 】



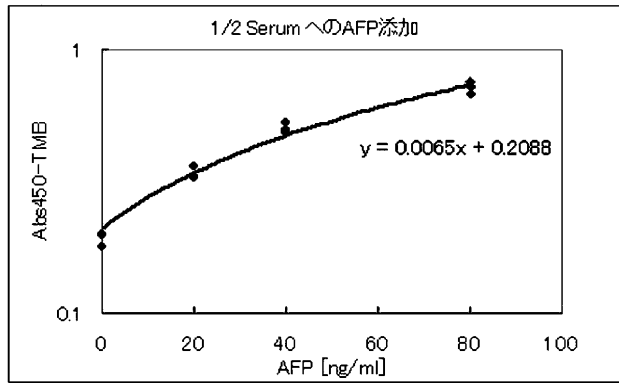
【 図 4 6 】



【 図 4 7 】



【 図 4 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/071678
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, G01N1/28, G01N33/553 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 5-506930 A (Genzyme Corp.), 07 October 1993 (07.10.1993), claims; page 7, upper right column, line 3 to lower left column, line 10; page 11, upper left column, line 2 to lower right column, line 13; fig. 11 to 18	1-34
X	JP 8-262024 A (Nippon Paint Co., Ltd.), 11 October 1996 (11.10.1996), claims 2, 4; paragraphs [0024] to [0031]	1-34
X	JP 60-256057 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 17 December 1985 (17.12.1985), claims; page 2, lower right column, line 19 to page 3, lower right column, line 17	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March, 2010 (19.03.10)		Date of mailing of the international search report 06 April, 2010 (06.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071678

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-249738 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 16 October 2008 (16.10.2008), entire text; all drawings	1-34
A	JP 63-196855 A (International Reagents Corp.), 15 August 1988 (15.08.1988), entire text; all drawings	1-34
A	JP 4-221762 A (Konica Corp.), 12 August 1992 (12.08.1992), entire text	1-34
A	JP 11-344491 A (Roche Diagnostics GmbH), 14 December 1999 (14.12.1999), entire text; all drawings	1-34
X	JP 2004-317363 A (Toyobo Co., Ltd.), 11 November 2004 (11.11.2004), claims 1 to 3; paragraphs [0014] to [0016]	35-45
A	WO 2005/008255 A1 (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.), 27 January 2005 (27.01.2005), entire text; all drawings	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071678

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical feature common to the invention in claim 1 and the invention in independent claim 35 is relevant only to "measurement of biological materials", and it is obvious that said matter is well known.

Therefore, both of the above-said inventions do not have a common special technical feature.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2009/071678

JP 5-506930 A	1993.10.07	AU 659797 B2	1995.06.01
		AU 699639 B2	1998.12.10
		AU 716560 B2	2000.03.02
		AU 1929595 A	1995.09.04
		AU 5881696 A	1996.12.30
		AU 7762491 A	1991.11.27
		CA 2081559 A1	1991.10.28
		CA 2081559 C	2002.07.16
		CA 2183654 A1	1995.08.24
		CA 2223278 A1	1996.12.19
		DE 69126664 T2	1997.10.30
		EP 527212 A1	1993.02.17
		EP 527212 B1	1997.06.25
		EP 748378 A1	1996.12.18
		EP 748378 A4	2000.09.20
		EP 832435 A1	1998.04.01
		JP 3040162 B2	2000.05.08
		JP 9-510345 A	1997.10.21
		JP 11-506827 A	1999.06.15
		NO 975654 A	1998.01.19
		US 5403745 A	1995.04.04
		US 5547873 A	1996.08.20
		US 5783400 A	1998.07.21
		US 6010866 A	2000.01.04
		WO 91/17441 A1	1991.11.14
		WO 95/22605 A1	1995.08.24
		WO 96/41198 A1	1996.12.19
JP 8-262024 A	1996.10.11	AU 4213396 A	1996.08.01
		CA 2168156 A1	1996.07.27
		EP 724156 A1	1996.07.31
JP 60-256057 A	1985.12.17	EP 163312 A2	1985.12.04
		EP 163312 A3	1988.09.14
		US 4680274 A	1987.07.14
JP 2008-249738 A	2008.10.16	(Family: none)	
JP 63-196855 A	1988.08.15	JP 2618629 B2	1997.06.11
JP 4-221762 A	1992.08.12	(Family: none)	
JP 11-344491 A	1999.12.14	AT 221657 T	2002.08.15
		DE 19913117 A1	1999.11.11
		EP 957360 A1	1999.11.17
		EP 957360 B1	2002.07.31
		ES 2180241 T3	2003.02.01
		JP 4253071 B2	2009.04.08
		US 6489131 B1	2002.12.03
		US 2003/113826 A1	2003.06.19
JP 2004-317363 A	2004.11.11	(Family: none)	
WO 2005/008255 A1	2005.01.27	CN 1849515 A	2006.10.18
		EP 1650570 A1	2006.04.26
		JP 2009-150912 A	2009.07.09
		US 2006/183217 A1	2006.08.17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/071678									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, G01N1/28, G01N33/553											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	JP 5-506930 A (ジェンザイム・コーポレーション) 1993.10.07 請求の範囲、第7頁右上欄第3行-同頁左下欄第10行、第11頁 左上欄第2行-同頁右下欄第13行、図11-18	1-34									
X	JP 8-262024 A (日本ペイント株式会社) 1996.10.11、請求項2、4、 【0024】-【0031】	1-34									
X	JP 60-256057 A (第一化学薬品株式会社) 1985.12.17、特許請求の 範囲、第2頁右下欄第19行-第3頁右下欄第17行	1-34									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 19.03.2010		国際調査報告の発送日 06.04.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆	2J 3807								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 1 6 7 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2008-249738 A (栄研化学株式会社) 2008.10.16、全文、全図	1-34
A	JP 63-196855 A (国際試薬株式会社) 1988.08.15、全文、全図	1-34
A	JP 4-221762 A (コニカ株式会社) 1992.08.12、全文	1-34
A	JP 11-344491 A (ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーパー) 1999.12.14、全文、全図	1-34
X	JP 2004-317363 A (東洋紡績株式会社) 2004.11.11、請求項1-3、 【0014】 - 【0016】	35-45
A	WO 2005/008255 A1 (株式会社三菱化学ヤトロン) 2005.01.27、全文、 全図	1-45

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 1 6 7 8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項1に係る発明と独立請求項35に係る発明との間に共通する技術的事項は、「生体関連物質の測定」のみであり、該事項は明らかに周知である。

したがって、上記両発明は、共通する特別な技術的特徴を有しない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2009/071678

JP 5-506930 A	1993. 10. 07	AU 659797 B2	1995. 06. 01
		AU 699639 B2	1998. 12. 10
		AU 716560 B2	2000. 03. 02
		AU 1929595 A	1995. 09. 04
		AU 5881696 A	1996. 12. 30
		AU 7762491 A	1991. 11. 27
		CA 2081559 A1	1991. 10. 28
		CA 2081559 C	2002. 07. 16
		CA 2183654 A1	1995. 08. 24
		CA 2223278 A1	1996. 12. 19
		DE 69126664 T2	1997. 10. 30
		EP 527212 A1	1993. 02. 17
		EP 527212 B1	1997. 06. 25
		EP 748378 A1	1996. 12. 18
		EP 748378 A4	2000. 09. 20
		EP 832435 A1	1998. 04. 01
		JP 3040162 B2	2000. 05. 08
		JP 9-510345 A	1997. 10. 21
		JP 11-506827 A	1999. 06. 15
		NO 975654 A	1998. 01. 19
		US 5403745 A	1995. 04. 04
		US 5547873 A	1996. 08. 20
		US 5783400 A	1998. 07. 21
US 6010866 A	2000. 01. 04		
WO 91/17441 A1	1991. 11. 14		
WO 95/22605 A1	1995. 08. 24		
WO 96/41198 A1	1996. 12. 19		
-----	-----	-----	-----
JP 8-262024 A	1996. 10. 11	AU 4213396 A	1996. 08. 01
		CA 2168156 A1	1996. 07. 27
		EP 724156 A1	1996. 07. 31
-----	-----	-----	-----
JP 60-256057 A	1985. 12. 17	EP 163312 A2	1985. 12. 04
		EP 163312 A3	1988. 09. 14
		US 4680274 A	1987. 07. 14
-----	-----	-----	-----
JP 2008-249738 A	2008. 10. 16	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 63-196855 A	1988. 08. 15	JP 2618629 B2	1997. 06. 11
-----	-----	-----	-----
JP 4-221762 A	1992. 08. 12	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 11-344491 A	1999. 12. 14	AT 221657 T	2002. 08. 15

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2009/071678

		DE 19913117 A1	1999.11.11
		EP 957360 A1	1999.11.17
		EP 957360 B1	2002.07.31
		ES 2180241 T3	2003.02.01
		JP 4253071 B2	2009.04.08
		US 6489131 B1	2002.12.03
		US 2003/113826 A1	2003.06.19
-----	-----	-----	-----
JP 2004-317363 A	2004.11.11	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
WO 2005/008255 A1	2005.01.27	CN 1849515 A	2006.10.18
		EP 1650570 A1	2006.04.26
		JP 2009-150912 A	2009.07.09
		US 2006/183217 A1	2006.08.17
-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/00	(2006.01)		C 1 2 Q 1/68			A
C 1 2 M 1/34	(2006.01)		C 1 2 M 1/00			A
C 1 2 N 15/09	(2006.01)		C 1 2 M 1/34			B
			C 1 2 N 15/00			A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 2G052 AA29 AA30 AA32 AB18 AB20 AD06 AD26 CA04 CA18 ED05
GA30
4B024 AA11 CA09 CA20
4B029 AA07 BB20 CC01
4B063 QA01 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	样品的预处理方法和生物相关物质的测量方法		
公开(公告)号	JPWO2010074265A1	公开(公告)日	2012-06-21
申请号	JP2010544181	申请日	2009-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	环球生物研究株式会社		
申请(专利权)人(译)	通用生物研究有限公司		
[标]发明人	田島秀二		
发明人	田島 秀二		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N33/53 G01N1/28 C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/54386 B01L3/508 B01L3/52 B01L2200/10 B01L2300/0636 C12Q1/6804 G01N33/54326 G01N33/54393 G01N35/026 G01N35/1009 Y10T436/143333 Y10T436/25125		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/553 G01N33/543.501.H G01N33/53.M G01N1/28.J C12Q1/68.A C12M1/00.A C12M1/34.B C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G052/AA29 2G052/AA30 2G052/AA32 2G052/AB18 2G052/AB20 2G052/AD06 2G052/AD26 2G052/CA04 2G052/CA18 2G052/ED05 2G052/GA30 4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA20 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC01 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
优先权	2008331219 2008-12-25 JP 2009175584 2009-07-28 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在用作第一载体的磁性颗粒上，固定了针对非特异性反应因子的抗体。这些磁性颗粒与样本混合并悬浮在其中。悬浮后，将悬浮液吸到移液器芯片中，磁铁靠近移液器芯片。当带有磁体的带有非特异性反应因子的磁性颗粒远程约束在磁体上时，残留的液体被排入井中。因此，完成了去除样本中包含的污染物。排放到孔中的如此处理的样本进行免疫测定。将携带固定有抗体的磁性颗粒与处理过的样本混合并悬浮在其中。将悬浮液吸到移液器芯片中，并通过使用磁体分离带有结合至其上的抗原的磁性颗粒。洗涤带有与其结合的抗原的磁性颗粒，将其与包含第二支持物的酶标记溶液混合，并悬浮在其中。悬浮后，将标记并带有与其结合的抗原的磁性颗粒与底物溶液混合，并进行发射强度的测量等。



- II ※※ 第1担体-(1)：汚染物に対して親和性を有する物質を固定した担体
- JJ 第1担体-(2)：汚染物を不活性化しする物質を固定した担体
- KK 第1担体-(3)：生体関連物質に対して親和性を有する物質を固定した担体
- LL 第2担体-(1)：生体関連物質の検出用試薬が固定された担体
- MM 第2担体-(2)：生体関連物質の検出用試薬を担体化した担体

- AA FIRST SUPPORT
- BB FIRST SUPPORT-(1)
- CC FIRST SUPPORT-(2)
- DD FIRST SUPPORT-(3)
- EE SECOND SUPPORT
- FF SECOND SUPPORT-(1)
- GG SECOND SUPPORT-(2)
- HH TREATING SPECIMEN
- II FIRST SUPPORT (1) SUPPORT CARRYING IMMOBILIZED SUBSTANCE HAVING AFFINITY FOR CONTAMINANT
- JJ FIRST SUPPORT-(2) SUPPORT CARRYING IMMOBILIZED SUBSTANCE INACTIVATING CONTAMINANT
- KK FIRST SUPPORT-(3) SUPPORT CARRYING IMMOBILIZED SUBSTANCE HAVING AFFINITY FOR BIOLOGICAL SUBSTANCE
- LL SECOND SUPPORT (1) SUPPORT CARRYING IMMOBILIZED REAGENT FOR DETECTING BIOLOGICAL SUBSTANCE
- MM SECOND SUPPORT (2) SUPPORT COMPRISING SOLID-PHASED REAGENT FOR DETECTING BIOLOGICAL SUBSTANCE