

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3991029号

(P3991029)

(45) 発行日 平成19年10月17日(2007.10.17)

(24) 登録日 平成19年7月27日(2007.7.27)

(51) Int. Cl.		F I		
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78		C
GO 1 N 21/64	(2006.01)	GO 1 N 21/64		F

請求項の数 10 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-423410 (P2003-423410)	(73) 特許権者	501387839
(22) 出願日	平成15年12月19日(2003.12.19)		株式会社日立ハイテクノロジーズ
(65) 公開番号	特開2005-181145 (P2005-181145A)		東京都港区西新橋一丁目24番14号
(43) 公開日	平成17年7月7日(2005.7.7)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成17年12月20日(2005.12.20)		弁理士 平木 祐輔
		(72) 発明者	山本 周平
			茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
			株式会社 日立ハイテクノロジーズ 那珂
			事業所内
		(72) 発明者	前嶋 宗郎
			茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
			株式会社 日立ハイテクノロジーズ 那珂
			事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の測定サイトを備えるDNAチップを保持するDNAチップインターフェイスと、
波長の異なる複数種類の発光ダイオードを有して構成され、前記DNAチップインター
フェイスに保持された一のDNAチップの複数の測定サイトに対し、同時に複数種類の波
長の異なる励起光を照射する照射系部と、

前記DNAチップインターフェイスに保持されたDNAチップへの該照射系部による複
数種類の波長の異なる励起光の同時照射に対応して、当該一のDNAチップの複数の測定
サイトから放射される蛍光を検出するCCDカメラを含み、該CCDカメラによって得ら
れた当該一のDNAチップの複数の測定サイトの蛍光測定結果を、あらかじめ波長それぞ
れの発光ダイオードに対応して記憶されているDNAチップ上での励起光強度分布に従い
、補正して出力する検出系部と

を備えていることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項2】

前記照射系部には、

前記DNAチップインターフェイスに保持される一のDNAチップに対し、当該一のD
NAチップの平面と励起光の光軸との成す角、及び当該一のDNAチップまでの距離が互
いに等しくなるようにして、前記波長の異なる複数種類の発光ダイオードが、当該一のD
NAチップを中心にして、同じ種類の発光ダイオードが対向位置するように配置されてい
る

10

20

ことを特徴とする請求項 1 記載の核酸分析装置。

【請求項 3】

前記検出系部は、

一の DNA チップの複数の測定サイトから放射される蛍光を前記 CCD カメラの撮像面上に結像するレンズ群が収容され、その側面に開口部が設けられている鏡筒と、

波長選別用の複数の光学フィルタを備え、前記開口部を介して、前記鏡筒内に当該複数の光学フィルタのうちの任意の一のフィルタを位置させるように、前記鏡筒に対して相対移動可能に支持されたフィルタ部材と

をさらに含み、

該フィルタ部材の前記鏡筒に対する相対位置に応じて、前記レンズ群に挿入される一の光学フィルタが切り替えられる

10

ことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の核酸分析装置。

【請求項 4】

前記 CCD カメラ、前記鏡筒、及び前記フィルタ部材は、複数の測定サイトを備える DNA チップが保持される前記 DNA チップインターフェイスに対して、光軸方向に相対移動可能に設けられた移動ステージ上に一体として設けられ、

該移動ステージの前記 DNA チップインターフェイスに対する近接・離間位置に応じて、前記 CCD カメラのフォーカシングが行える

ことを特徴とする請求項 3 記載の核酸分析装置。

【請求項 5】

20

前記移動ステージの前記 DNA チップインターフェイスに対する光軸方向の相対移動と、前記 CCD カメラによる一の DNA チップの複数の測定サイトから放射される蛍光測定とを連動制御するフォーカシング制御手段が設けられ、

該フォーカシング制御手段は、前記移動ステージを一定間隔で移動させながら、当該一定間隔毎に前記 CCD カメラに一の DNA チップの複数の測定サイトから放射される蛍光測定を行わせる

ことを特徴とする請求項 4 記載の核酸分析装置。

【請求項 6】

蛍光色素がマトリックス状に配置された、複数の測定サイトを備える基板が保持される基板インターフェイスと、

30

波長の異なる複数種類の発光ダイオードを有して構成され、前記基板インターフェイスに保持された一の基板の複数の測定サイトに対し、同時に複数種類の波長の異なる励起光を照射する照射系部と、

前記基板インターフェイスに保持された基板への該照射系部による複数種類の波長の異なる励起光の同時照射に対応して、当該一の基板の複数の測定サイトから放射される蛍光を検出する CCD カメラを含み、該 CCD カメラによって得られた当該一の基板の複数の測定サイトの蛍光測定結果を、あらかじめ波長それぞれの発光ダイオードに対応して記憶されている基板上での励起光強度分布に従い、補正して出力する検出系部とが備えられていることを特徴とする蛍光検出システム。

【請求項 7】

40

前記照射系部には、

前記基板インターフェイスに保持される一の基板に対し、当該一の基板面と励起光の光軸との成す角、及び当該一の基板までの距離が互いに等しくなるようにして、前記波長の異なる複数種類の発光ダイオードが、当該一の基板を中心にして、同じ種類の発光ダイオードが対向位置するように配置されている

ことを特徴とする請求項 6 記載の蛍光検出システム。

【請求項 8】

前記検出系部は、

一の基板の複数の測定サイトから放射される蛍光を前記 CCD カメラの撮像面上に結像するレンズ群が収容され、その側面に開口部が設けられている鏡筒と、

50

波長選別用の複数の光学フィルタを備え、前記開口部を介して、前記鏡筒内に当該複数の光学フィルタのうちの任意の一のフィルタを位置させるように、前記鏡筒に対して相対移動可能に支持されたフィルタ部材と
をさらに含み、

該フィルタ部材の前記鏡筒に対する相対位置に応じて、前記レンズ群に挿入される一の光学フィルタが切り替えられる

ことを特徴とする請求項 6 又は 7 記載の蛍光検出システム。

【請求項 9】

前記 C C D カメラ、前記鏡筒、及び前記フィルタ部材は、複数の測定サイトを備える基板が保持される前記基板インターフェイスに対して、光軸方向に相対移動可能に設けられた移動ステージ上に一体として設けられ、

該移動ステージの前記基板インターフェイスに対する近接・離間位置に応じて、前記 C C D カメラのフォーカシングが行える

ことを特徴とする請求項 8 記載の蛍光検出システム。

【請求項 10】

前記移動ステージの前記基板インターフェイスに対する光軸方向の相対移動と、前記 C C D カメラによる一の基板の複数の測定サイトから放射される蛍光測定とを連動制御するフォーカシング制御手段が設けられ、

該フォーカシング制御手段は、前記移動ステージを一定間隔で移動させながら、当該一定間隔毎に前記 C C D カメラに一の基板の複数の測定サイトから放射される蛍光測定を行

わせる
ことを特徴とする請求項 9 記載の蛍光検出システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光検出システムを備えた核酸分析装置に関し、例えば、精製された D N A 試料の一塩基多型 (S N P) 解析をする S N P 解析装置に関する。

【背景技術】

【0002】

下記特許文献 1 には、従来の D N A アレイチップの読取方法及び装置が開示されている。ここでは、D N A チップと励起光源を相対的に移動して、D N A チップをレーザー光により走査し、蛍光を光電子増倍管 (P M T) により検出し、D N A チップを読み取る技術が開示されている。

【特許文献 1】特開 2 0 0 0 - 1 3 1 2 3 7 号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

励起光源にレーザー発振器、検出器に光電子増倍管を使用した従来の読取方式では、D N A チップ上の各点の情報のみ得られる為、D N A チップの 2 次元情報を得るためには D N A チップ内を走査する仕組みが必要となる。また、測定対象となる蛍光色素が 2 種類となると、レーザー発振器及び光電子増倍管を 2 組用いる必要がある。したがって、D N A チップを読み取る為には、D N A チップ上の測定サイト数だけ D N A チップを走査し、さらに、測定サイト毎に、検出すべき蛍光色素の数だけ、光源及び検出器を切り替えて測定することとなり、測定時間が長くなる。D N A チップ自身の高集積化も、測定時間の長期化に拍車をかけている。

本発明の目的は、D N A チップの各測定サイトを短時間で測定することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、D N A チップ上を発光ダイオード (L E D) により照射し、各測定サイトの蛍光色素を励起し、各測定サイトから放射された蛍光を C C D カメラにより一括検出する

10

20

30

40

50

ことに関する。

【発明の効果】

【0005】

本発明により、DNAチップ上の各測定サイトを一度に測定することが可能となる。さらに、各測定サイトの測定条件がほぼ同一となり、測定精度も向上する。また、読取機構が省スペース、安価となり、故障率も低下し、メンテナンスもほとんど不要となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

以下、本発明の核酸分析装置について、特にSNP解析装置を例にとり、図面を参酌して説明する。ただし、図面はもっぱら解説のためのものであって、この発明の範囲を限定するものではない。

10

【0007】

本発明の核酸分析装置では、例えば、アフィメトリックス社製DNAチップに代表される一般的なDNAチップが分析対象とされる他、ナノチップと呼ばれる半導体チップも好適に分析対象とされる。ナノチップとは、マトリクス状に電極が配置され、その表面が透過層構造にてコーティングされた半導体チップであり、ユーザが所望のオリゴヌクレオチド-アレイを構築し、そのオリゴヌクレオチド-アレイに試薬をスパイクして、PCR生成物であるサンプルを分析する。一般的なDNAチップの場合、DNAチップメーカーが、既知の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド-アレイを備えるDNAチップを供給する。このDNAチップは、ガラス基板等を用い、ガラス基板の所定位置に、オリゴヌクレオチドの前駆体である4種類の塩基(A、G、C、T)を配置し、オリゴヌクレオチド-アレイを形成する。つまり、ガラス基板上でオリゴヌクレオチドを伸長させ、オリゴヌクレオチド-アレイを作成する。一方、ナノチップでは、寒天質の透過層構造に表面が覆われた半導体チップを用い、この透過層構造に、予め作成した核酸を固定することで、核酸アレイを構成する。

20

【実施例】

【0008】

図1は、本実施例にかかるDNAチップを用いるSNP解析装置の分解斜視図である。以下、図1を参照して、SNP解析装置の概要を説明する。

【0009】

SNP解析装置は、主にDNAのSNPを検出することを目的としている。SNPはSingle Nucleotide Polymorphismの略で一塩基多型と呼ばれ、一塩基だけ異なる遺伝子のことを指す。このSNPが病気と関連していると考えられ、さまざまな病気と関連するSNPの探索が精力的に行われている。

30

【0010】

本SNP解析装置の最終的な出力は、次の3状態である。サンプルDNAにおいて着目するSNPが両対立遺伝子で存在する、又は存在しない状態(ホモ)と、片方の対立遺伝子のみが存在する状態(ヘテロ)である。これらを判定する方法として、例えば、着目するSNPを持つサンプルと反応し結合する(ハイブリダイズする)試薬を第1番目の蛍光色素により標識しておき、それを持たないサンプルとハイブリダイズする試薬を第1番目とは励起波長、蛍光波長の異なる第2番目の蛍光色素により標識しておく。サンプルDNAに対し前記両試薬を反応させる。第1番目と第2番目の蛍光色素からの蛍光を検出し、それぞれの検出強度の比を求める。この比をもとに、着目するSNPに対する前記3つの状態を判定する。

40

【0011】

ここで、上記ナノチップを用いたPCR生成物であるサンプルを分析する手順を説明する。分析手順は、"Amplificaon Down Format"と"Capture Down Format"の2種類がある。

【0012】

Amplificaon Down Formatでは、まず、半導体チップ上に、一部の塩基配列が不明であり

50

、一端がビオチン化された分析対象PCR生成物(Sample Oligos)を供給し、半導体チップ上の所定の電極に電圧を印可する。すると、そのSample Oligosは、当該電極に引き寄せられ、半導体チップ表面の透過層構造と接触する。そして、Sample Oligosのビオチン標識と透過層構造が反応し(avidin-biotin反応)、Sample Oligosは透過層構造に固定される。半導体チップ表面を洗浄し、別のSample Oligosを用いて上述の工程を繰り返すことにより、半導体チップ上に、Sample Oligosから成る所望のオリゴヌクレオチド-アレイを形成する。Sample Oligosがマトリックス状に配置されたオリゴヌクレオチド-アレイを形成した後、その上に、一端が蛍光標識されたオリゴヌクレオチド(Reporter Oligos)を供給する。Reporter Oligosは、相補的配列を有するSample Oligosとハイブリダイズする。半導体チップ表面を洗浄後、半導体チップ上に励起光を照射する。これにより、Sample OligosとハイブリダイズしたReporter Oligosから蛍光が発生する。この蛍光パターンを検出し、解析することで、Sample Oligosの塩基配列を分析することができる。

10

【0013】

一方、Capture Down Formatでは、まず、半導体チップ上に、既知の塩基配列を有し、一端がビオチン化されたオリゴヌクレオチド(Capture Oligo)を供給し、半導体チップ上の所定の電極に電圧を印可する。すると、そのCapture Oligoは、当該電極に引き寄せられ、半導体チップ表面の透過層構造と接触する。そして、Capture Oligoのビオチン標識と透過層構造が反応し(avidin-biotin反応)、Capture Oligoは透過層構造に固定される。半導体チップ表面を洗浄し、別のCapture Oligoを用いて上述の工程を繰り返すことにより、半導体チップ上に、Capture Oligoから成る所望のオリゴヌクレオチド-アレイを形成する。Capture Oligoがマトリックス状に配置されたオリゴヌクレオチド-アレイを形成した後、その上に、一部の塩基配列が不明である分析対象PCR生成物(Sample Oligos)を供給する。Sample Oligosは、相補的配列を有するCapture Oligoとハイブリダイズする。これにより、Sample Oligosは、Capture Oligoを介して、半導体チップ上に固定される。半導体チップ表面を洗浄し、一端が蛍光標識されたオリゴヌクレオチド(Reporter Oligos)を供給する。Reporter Oligosは、相補的配列を有するSample Oligosとハイブリダイズする。半導体チップ表面を洗浄後、半導体チップ上に励起光を照射する。これにより、Sample OligosとハイブリダイズしたReporter Oligosから蛍光が発生する。この蛍光パターンを検出し、解析することで、Sample Oligosの塩基配列を分析することができる。

20

30

【0014】

SNP解析装置は主に、分注ユニット、流路系ユニット、インターフェイスユニット、光学系ユニットおよび電源ユニットから構成され、図示しない外部機器(PC)により制御される。SNP解析装置は、DNAチップを備えたカートリッジを装着し、分析を行う。カートリッジは、その内部に半導体素子からなるDNAチップを配置したフローセルを内蔵している。DNAチップは、最大400の核酸プローブを所定位置に配置し、所望のプローブアレイを構築できる。尚、DNAチップ上への核酸プローブの貼り付けから、測定までを自動で行え、オペレータがサンプル毎に装置を操る必要はない。例えば、96個のサンプルの分析は、およそ3時間で行える。

【0015】

SNP解析装置(101)は、トップカバー(102)、カバー(103)、装置本体(104)、フロントパネル(105)から成る。

40

【0016】

分注ユニットは、サンプルや試薬を配置保管できるサンプルハンドリングステーション(106)と、サンプル及び試薬を所定位置へ搬送するためのロボットアーム(112)を含む。サンプルハンドリングステーション(106)は、サンプルや試薬が入っているサンプルトレイ(111)を2つ、Reagentボトルを4つ搭載できる。また、反応酵素を冷却保管できる反応酵素冷却部を備えている。そして、溶液を吸引吐出できるプローブチップを備えたロボットアーム(112)を用い、所定のサンプルや試薬を分注し、注入ポートに投入できる。

50

【0017】

流路系ユニットは、3台のシリンジポンプを駆動し、注入ポートから投入されたサンプルや試料、水ボトルに蓄えられた水等を、自動的にフローセル内のDNAチップへ搬送できる。また、洗浄ポートによりプローブチップを洗浄したり、フローセル内や流路を洗浄できる。更に、装置内から生じた廃液を、装置外に配置された廃液ボトルへ排出できる。

【0018】

インターフェイスユニットはカートリッジを着脱保持でき、カートリッジにニードルを挿入し、ニードルを介して流路接続できる。これにより、所定のサンプルや試薬をフローセル内に搬送することが可能となる。また、DNAチップと電氣的接続することにより、核酸プローブの配置場所等を制御可能とする。更に、DNAチップと熱的接続することにより、フローセル内の温度を制御可能とする。

10

【0019】

光学系ユニットは、DNAチップ上に存在する蛍光試薬を励起できる光源と、蛍光試薬から生じた蛍光を検出できる検出器を含み、DNAチップ上の画像を出力できる。

電源ユニットは、各ユニットへ駆動電力を供給し、電源電圧として、100、110、120、200、220、230、240VACが使用可能であり、電流値は4A以下で、周波数は50/60Hzに対応している。

【0020】

SNP解析装置(101)の装置側面には外部機器接続部(110)が配され、図示しないパーソナルコンピュータ(PC)及びバーコードリーダーを接続できる。PCは、SNP解析装置(101)の操作、測定結果の表示、解析、保存を担う。SNP解析装置(101)とPCはLAN(Local Area Network)によって接続される。ハブを介することで1台のPCが最高4つのSNP解析装置(101)を操作することも可能である。また、バーコードリーダーは、サンプルの入ったサンプルトレイやカートリッジに貼付されたバーコードを読み取り、PCへ送信することで測定されるサンプル、試薬、カートリッジの管理を容易にする。

20

【0021】

図2は、本実施例のSNP解析装置の概略図である。以下、図2を参照して装置全体の機構部を説明する。尚、図2では、装置本体にカートリッジ(218)が挿入され、装置本体とフローセル(219)がニードル(211)により接続された状態を示している。

30

【0022】

流路系ユニットは、ロボットアーム(204)のプローブチップ(205)、水ボトル(201)、ヒスチジンボトル(202)、廃液ボトル(203)、水ポンプ(206)、ヒスチジンポンプ(207)、カートリッジポンプ(208)、洗浄ポート(209)、注入ポート(210)、及びニードル(211)が複数の流路で結ばれた構造となっている。

【0023】

プローブチップ(205)は、サンプル及び溶液を吸引吐出する配管が接続され、ロボットアーム(204)によりその先端を所定位置に移動させることができる。そして、サンプルハンドリングステーション上に配置されたサンプルトレイ、Reagentボトル及び反応酵素冷却部から、所定のサンプルや試薬を分注し、注入ポートへ投入できる。ここで、注入ポート(210)は、サンプル及び溶液をカートリッジ(218)内フローセル(219)に送り込む前に存在するポートタンクである。注入ポート(210)は、40から60の範囲で温度制御可能である。導入試料温度とカートリッジ内温度が異なる状態で試料を導入するとスパイクノイズが発生するが、注入ポート(210)より試料導入前に温調することで、スパイクノイズを軽減できる。また、プローブチップ(205)は、洗浄ポート(209)において洗浄することができる。

40

【0024】

水ポンプ(206)は、水ボトル(201)からプローブチップ(205)に水を送ること、プローブチップ(205)によりサンプル及び試料の吸引・吐出を行うこと、廃液

50

ボトル(203)に溶液を送ることができる。

【0025】

また、ヒスチジンポンプ(207)は、ヒスチジンボトル(202)からヒスチジンを注入ポート(210)に送ること、水ボトル(201)から注入ポート(210)に水を送ること、注入ポート(210)に空気を送ること、廃液ボトル(203)にシリンジ内溶液を送る事ができる。

【0026】

また、カートリッジポンプ(208)は、注入ポート(210)からカートリッジ(218)内フローセル(219)に溶液及び空気を送ること、カートリッジ(218)内のフローセル(219)からカートリッジポンプ(208)に溶液及び空気を送ることが

10

【0027】

装置内で生成された廃液は、接続部を介して着脱可能に搭載されている装置外部の廃液ボトル(203)へ排出できる。

【0028】

水ポンプ(206)とカートリッジポンプ(208)を駆動することにより、注入ポートに投入された試薬や洗浄液を、カートリッジ流路を介して、フローセル(219)内へ搬送できる。カートリッジ流路は、ヒスチジンポンプ(207)とカートリッジポンプ(208)を駆動することにより、ヒスチジンによって洗浄される。ヒスチジンポンプ(207)から注入ポート(210)及びカートリッジポンプ(208)までの流路は、ヒスチジン溶液から水に置換できる構造と成っている。水により流路を洗浄することでヒスチジン溶液が流路配管内に析出することを回避している。

20

【0029】

尚、水ボトル(201)とヒスチジンボトル(202)には、それぞれと1Lの水とヒスチジンを入れることが可能である。この為、96サンプルの貼り付けから測定までの間、水やヒスチジンをユーザーが追加する必要がない。

【0030】

インターフェイスユニットは、カートリッジ(218)内のフローセル(219)と装置本体を結ぶ流路となるニードル(211)、カートリッジ冷却ペルチェ(212)、およびポゴピン(213)を含んでいる。カートリッジ冷却ペルチェは、カートリッジと接触し、フローセル(219)の温度を制御できる。ポゴピン(213)は、カートリッジ(218)に設けられた端子に接続され、装置本体とDNAチップの電氣的接続を行う。ポゴピン(213)の本数は、12本と少数である為、カートリッジへの接続が容易となっている。

30

【0031】

光学系ユニットは、CCDカメラ(214)、EMフィルタ(215)、EXフィルタ(216)、及びLED(217)を含む。LED(217)は、EXフィルタ(216)により波長特性でフィルターされ、フローセル(219)内のDNAチップ上の蛍光体に光を照射できる。蛍光体から生じた蛍光は、EMフィルタ(215)により波長特性でフィルターされ、フローセル(219)の映像はCCDカメラ(214)により取得される。光源としてLED(217)を使用しており、光源の寿命は従来のレーザーの場合より十分長い為、装置寿命中の光源交換作業を回避でき、メンテナンスが容易となる。

40

【0032】

以下、光学系ユニットの構成について詳細に説明する。図3に光学系ユニット概略図を示す。光学系ユニットは主にLED(301)、励起用フィルタ(302)、検出用フィルタ(303)、レンズユニット(304)、CCDカメラ(305)、移動ステージ(306)、オートフォーカス駆動部(307)からなる。

【0033】

DNAチップ上に存在する蛍光色素を励起するための光源として複数の発光ダイオード(LED)を用いており、2種類の蛍光色素に対応して発光波長の異なる2種類のLED

50

を採用している。LED(301)から放射された光は励起用フィルタ(302)を透過し、DNAチップ(308)全面に同時照射される。DNAチップ上に分布した蛍光色素から放出された蛍光は、複数枚のレンズによって構成されるレンズユニット(304)により検出器上に結像される。本実施例の場合、レンズは5枚で構成されており、第1レンズと第2レンズ間に、検出用フィルタ(303)が挿入される。ここに挿入される検出用フィルタには3種類あり、測定の目的に応じて自動で切り替えられる。検出器には電荷結合素子(CCD)を採用する。検出用フィルタ(303)、レンズユニット(304)、CCDカメラ(305)は、ボールネジ及びステッピングモータによって構成されるオートフォーカス駆動部(307)によって光軸方向に移動可能な移動ステージ(306)上にまとめて配置され、焦点合わせのため移動する。

10

【0034】

図4に光学系の外観図を示す。前述のように、本実施例では、励起光源にLED(401)、検出器にCCD(402)を用いている。これにより、一定濃度以上の蛍光体の有無を測定でき、病気との関連が既知のSNPを検出し、病気の診断を行うことができる。

【0035】

一方、従来技術では、励起光源にレーザー発振器、検出器に光電子増倍管(PMT)を使用した共焦点光学系となっている。この方式では、光源と検出器の各点を対応させるために、DNAチップ上の各点の情報のみ得られるので、DNAチップの2次元情報を得るためにはDNAチップ内を走査する仕組みが必要となる。また、本実施例同様、測定対象となる蛍光色素は2種類であるため、レーザー発振器及び光電子増倍管を2組用いている。したがって、実際に蛍光測定を実施する際には、DNAチップ上の測定サイト数だけDNAチップを走査し、測定サイト毎に、検出すべき蛍光色素の数だけ、光源及び検出器を切り替えて測定することになるため、測定時間が長くなる。一般的にDNAチップは、それ自身を高集積化し、より多くのサンプルを一枚のDNAチップ上に載せ、それを短い測定時間で読み取ることが望まれている。上記従来技術で使用するDNAチップの測定サイト数は100箇所であるが、本実施例で説明する装置では、その4倍の400箇所の測定サイト数を持つDNAチップを読み取るため、従来技術の光学系では、測定時間が4倍になってしまう。また、レーザー発振器、光電子増倍管は非常に高価であるため、コストが高くなってしまいう問題がある。さらにレーザー発振器は、その種類によっては、寿命がそれほど長くないこと、また故障率も他の光源と比較して高いことから、信頼性の面でも問題がある。

20

30

【0036】

上記理由から、本実施例では励起光源にLED(401)を、検出器にCCD(402)を用いている。これにより、低コスト、省スペース、高スループットを図ることが可能となる。LEDは、レーザー発振器と比較して非常に安価であり、大きさも非常に小さいことから大幅なコスト削減、省スペース化を図ることが可能となる。また、寿命の面でもLEDはレーザー発振器を含む他の光源と比較して長寿命であり、故障率も極めて低いことから、交換等のメンテナンスの必要性がほとんど発生しない。また、LED(401)により励起光はDNAチップ(403)全面に同時照射され、蛍光検出もCCD(402)によりDNAチップ(403)全面について同時に行われるため、上記従来技術に対して、大幅に測定時間を短縮することが可能となる。

40

【0037】

一般的にLEDからの発光は指向性がないため、それ自身だけでは所望の範囲に限定して光を照射することは困難である。そのため、LEDから放出される励起光はレンズによりDNAチップ上に集光される。このとき、DNAチップ上での励起光強度が測定サイトの位置によって異なるという現象が発生する。前述のように本装置は、2種類の蛍光色素に対する蛍光強度比から、3状態あるSNPの有無を判定する。したがって、2種類のLEDのDNAチップ上での励起光強度分布が測定サイトによって異なっていると、仮にDNAチップ上の異なる測定サイトに全く同じサンプルが存在していたとしても、2波長の蛍光強度比が測定サイトによって異なってしまうという問題が発生する。その対策として

50

、本装置ではあらかじめ2波長それぞれのLEDに対し、DNAチップ上での励起光強度分布を記憶しておき、得られた測定結果をその分布に従って補正するという方法を採用している。これにより、励起光強度の大小の差によって生じる検出強度の差をキャンセルすることが可能となる。

【0038】

LEDによる励起光は、そのままではDNAチップ上で反射し、検出すべき蛍光とともに検出器へ到達する。この励起光の反射成分は、微弱な蛍光検出の大きなバックグラウンドとなる。そのため、本実施例では、励起光の反射成分を排除するため、各蛍光色素に対して透過波長帯の異なる2種類のバンドパスフィルタを組み合わせ使用とする。第1のバンドパスフィルタを透過することのできる光は、第2のバンドパスフィルタを透過することができない。逆も同様である。第1のバンドパスフィルタである励起用フィルタ(302)、図4中には図示していない)はLED(401)の発光波長域に透過波長帯を持ち、LED発光の一部を透過させる。一方、第2のバンドパスフィルタである検出用フィルタ404は、蛍光色素の蛍光波長帯域に透過波長帯を持ち、蛍光の一部を透過させる。励起用フィルタ(302)は、LED(401)とDNAチップ(403)の間に挿入され、これを透過した波長成分のみが励起光としてDNAチップ(403)上に照射される。検出用フィルタ(404)は、DNAチップ(403)とCCD(402)の間に挿入され、DNAチップ上で反射した励起光は、検出用フィルタ(404)によって透過を禁止され、蛍光のみがレンズユニット(405)を通して検出器であるCCD(402)上に結像される。

10

20

【0039】

図5にLED(501)及び励起用フィルタ(502)で構成されるLED光源部の詳細を示す。本実施例では、1枚の基板の上に発光波長が同一のLEDを4個実装し、それぞれのLEDに対して球状のレンズが実装されている。この球状レンズによって、同一基板の上に実装された各LEDからの発光が、DNAチップ上に集光される。この基板を2波長それぞれについて2枚ずつ使用し、合計4枚の基板がDNAチップの鉛直方向に対して45°の角度に配置される。また、それぞれの基板は、DNAチップを中心に90°間隔で配置され、同一波長の基板が向かい合うように配置される。1枚の基板の上に複数のLEDを実装させる理由は、LED光源を励起用フィルタと組み合わせ使用するためである。使用している励起用フィルタ(502)は干渉フィルタであるため、その透過特性は光の入射角によって変化する。そのため、励起光は励起用フィルタ(502)に対して一定の入射角で入射させる必要があるが、例えば、すべてのLEDをばらばらな位置に設置すると、それぞれのLEDに対して励起用フィルタを設置する必要が生じる。そのため、励起用フィルタの数を最小限に留めるため、4個のLEDを1枚の基板の上に最密実装し、その基板に対して1枚の励起用フィルタを平行に配置させる構造としている。

30

【0040】

この励起用フィルタ(502)は、光の入射角が90°のときに最適な透過特性を示すよう設計されているが、光源にLEDを採用している以上、90°より低角度で入射する成分が少なからず含まれる。干渉フィルタの特性として、入射角が小さくなれば、透過帯が低波長側へシフトするという性質がある。そのため、90°より低角度で入射する光は、より低波長成分のみが励起光としてDNAチップ上に照射されるため、励起光率は若干減少する。しかし、この影響はLEDの個数を調整することで容易に補うことが可能である。本実施例の場合、合計8個のLEDを2枚の基板に分けることで、励起用フィルタの数を2枚に抑えている。また、この透過帯のシフトは必ず低波長側へ現れるため、検出用フィルタの透過帯と重なり、励起光の反射成分が検出用フィルタを透過して、バックグラウンドを上昇させるといった問題は発生しない。

40

【0041】

LED(501)と励起用フィルタ(502)を取り付けたためのLED設置台(503)には位置決め用の基準穴が設けられており、装置側にはこれに対応する位置決めピンが設けられている。これにより、設置台を取り外しても容易に元の位置に戻すことが可能と

50

なり、DNAチップ上での励起光強度分布を変化させることなく、照射系の脱着が可能な構造となっている。

【0042】

また、本実施例では励起光の輝度を調節する機能を有する。LEDは、それを点灯駆動するためのPWM信号のDuty比を調節することで10段階(10~100%, 10% step, 0%はLED Off)に輝度を調節することが可能となっている。これは、反射光及び蛍光の検出強度を調節するために使用される。同様の機能として、CCDの露光時間を調節することで、検出強度を調節することが可能である。

【0043】

図6にレンズ及び検出用フィルタの詳細図を示す。図6(a)に示すように、本実施例で使用するレンズ(601)は5枚構成となっており、これらすべてのレンズが一つの鏡筒(603)内に保持される。これにより、光軸に対する個々のレンズの位置調整やレンズ間の間隔調整が容易になる。さらに鏡筒(603)は、装置への脱着時の位置再現性が無調整で確保される構造となっているため、一度、装置外で個々のレンズ調整を実施しておけば、装置に組み入れた際、装置内で個々のレンズの位置調整を実施する必要がなく便利である。

10

【0044】

図6(b)に示すように、DNAチップから検出器までの光路中に挿入される検出用フィルタ(602)は、前述の励起用フィルタと同様に光の入射角によってその波長特性が変化するため、検出器上で結像されるすべての光が検出用フィルタに対してある許容範囲内の角度で入射されなければならない。このため、DNAチップからレンズに入射する光を第1レンズによって一旦平行にし、その直後に検出用フィルタ(602)を挿入する。検出用フィルタは3種類あるため、これを切り替える必要がある。そのため、図6(c)に示すように、鏡筒(603)の第1レンズと第2レンズの間に貫通穴を設け、その穴を通して3枚の検出用フィルタ(602)を保持している回転板(604)が回転する構造となっている。これにより、レンズ鏡筒を取りはずことなく、フィルタ回転機構を脱着することが可能である。3枚の検出用フィルタ(602)は、蛍光検出のための2種類のバンドパスフィルタと、広い波長域で一定の透過率を示すNDフィルタから構成される。NDフィルタは、励起光の反射像を取得する際に使用される。反射像は、主にオートフォーカスを実施する際に取得する。これら3枚の検出用フィルタの切替は、それらを保持する

20

30

【0045】

図7に検出用フィルタの位置検出方法について示す。各図は、それぞれの検出用フィルタ(701)が実際に挿入されている様子をDNAチップ側から見た図である。回転板(702)の基準位置は図7(a)に示す位置であり、またその位置は、NDフィルタの挿入位置と一致している。基準位置への移動は、機械式ストッパ(703)に衝突させることにより実施される。このとき、ステッピングモータは回転板(702)がどの位置にいても機械式ストッパ(703)まで十分到達するだけのパルス数だけ常に回転する。図7(b)及び(c)に示すように、その基準位置から45°ずつ回転させることにより、他の2種類のバンドパスフィルタの挿入位置へ順に移動する。

40

【0046】

装置を診断目的で使用する場合、このフィルタが正しく挿入されずに蛍光測定が行われると、正しいデータが得られないため、最悪の場合、誤診につながる可能性が考えられる。そこで、これら3種類のフィルタが正しく挿入されていることを確認するために、ホトインタラプタ(704)を使用している。検出用フィルタ(701)が設置されている回転板(702)と同一の回転軸上に、もう一枚の位置検出用回転板(705)が取り付けられており、2枚の回転板は同時に回転する。3種類の検出用フィルタ(701)は回転板(702)の回転軸を中心に45°の間隔で取り付けられ、位置検出用回転板(705)にも45°の間隔でスリット(706)が設けてある。位置検出用回転板(705)は、各検出用フィルタ(701)が正しく挿入されているときに、対応するスリット(706

50

)がホットインタラプタ(704)の位置に挿入されるよう調整されている。この状態でのホットインタラプタ(704)の出力信号の状態をONした場合、検出用フィルタ(701)が正しい位置に挿入されなかった場合は、スリット(706)の位置がずれるため、ホットインタラプタ(704)の信号がOFFとなる。さらに、ホットインタラプタ(704)が故障し出力が常にONとなっている場合を想定し、検出用フィルタ(701)を切り替える際は、検出用フィルタ(701)が完全に挿入される直前で一旦停止し、ホットインタラプタ(704)の出力がOFFになっていることを確認した後、正しい挿入位まで回転させ、再度ホットインタラプタ(704)の信号がONに切り替わることを確認する。この動作によりステッピングモータが脱調する等の不具合により、検出用フィルタ(701)が正しい挿入位置へ回転しなかった場合は、装置はその時点でエラー状態となり停止する。また、位置確認のためのホットインタラプタ(704)が故障している場合についてもエラーとなるため、誤ったデータを取得する危険性は回避される。

10

【0047】

検出器にはCCD(402)を用いている。ノイズ低減のためCCD(402)はペルチェ素子によって冷却される。冷却によるCCD(402)の結露を防ぐため、CCD(402)の周囲の空間は密閉され、非常に乾燥したアルゴンガスによって置換されている。また、フルフレーム型CCDを採用しているため、電荷転送のための機械式シャッタをCCD前面に有している。

【0048】

図3に示すように、前述のレンズユニット(304)、検出用フィルタ(303)の切替機構、CCD(305)は全て同一の検出系設置台(309)に取り付けられ、この検出系設置台(309)はリニアガイド、ボールネジ、ステッピングモータで構成される駆動系の移動ステージ(306)上に取り付けられる。この移動ステージ(306)は主にオートフォーカスのために移動する。検出系設置台(309)は前述のLED設置台(503)と同様に位置決めのための2つの基準穴が設けられている。一方、移動ステージ側にはこの基準穴に対応する基準ピンが設けられており、これらのはめ合いにより、検出系設置台の脱着再現性を確保する構造となっている。このように、レンズユニット(304)、検出用フィルタ(303)の切替機構、CCD(305)の検出系光学部品を全て同一の部品上に設置することで、検出系全体を容易に脱着することが可能となる。これにより、個々の検出系光学部品の交換、位置調整等の作業を装置外で実施することが可能となり、大幅にメンテナンス性を向上させることができる。

20

30

【0049】

図8は、装置の処理フローを示す図である。以下、図7を参照して装置の処理フローを説明する。

装置をPower-onし、初期化(801)を行う。水-ボトル内の水容量確認とヒスチジン-ボトル内のヒスチジン容量確認を行う。

【0050】

サンプル等準備(802)として、バーコードリーダーで、Low Salt Buffer、High Salt Buffer、NaOH、サンプルが入ったサンプルトレイ、カートリッジのバーコードを各々読み、そのたびにLEDが点灯するので、その場所に各々を正しく設置する。

40

【0051】

サンプルDNAの貼り付け(803)を以下のように行う。ロボット-プローブチップを洗浄ポートに移動させ、水-ポンプを稼働させプローブチップを洗浄する。ロボット-プローブチップを目的のサンプル位置に移動後、水-ポンプを稼働させ、ロボット-プローブチップからサンプルを吸引する。ロボットをPI検知位置に移動させ、キャリブレーションの確認を行う。ロボット-プローブチップを注入ポートに移動後、水-ポンプを稼働させ、ロボット-プローブチップから吐出する。カートリッジ-ポンプを稼働させ、サンプルをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジActive Chip内の目的の位置に、およそ0.2mAの電流を60秒印加する。ヒスチジン-ポンプを稼働さ

50

せ、ヒスチジンを注入ポートに送る。カートリッジ - ポンプを稼働させ、カートリッジフローセル洗浄のためにヒスチジンをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジ - ポンプを稼働させ、ヒスチジンを廃液ボトルに移動させる。

【 0 0 5 2 】

レポータDNAの導入(804)を以下のように行う。ロボット - プローブチップを洗浄ポートに移動させ、水 - ポンプを稼働させプローブチップを洗浄する。ロボット - プローブチップをHigh Salt Buffer位置に移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップからHigh Salt Bufferを吸引する。ロボットをPI検知位置に移動後、キャリブレーションの確認を行う。ロボット - プローブチップを注入ポートに移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップから吐出する。カートリッジ - ポンプを稼働させ、High Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジ - ポンプを稼働させ、High Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動後、カートリッジ - ポンプを稼働させ、High Salt Bufferを廃液ボトルに移動させる。

10

【 0 0 5 3 】

ロボット - プローブチップを洗浄ポートに移動させ、水 - ポンプを稼働させプローブチップを洗浄する。ロボット - プローブチップを蛍光体がついたDNA(レポータDNA)位置に移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップからレポータDNAを吸引する。ロボットをPI検知位置に移動後、キャリブレーションの確認を行う。ロボット - プローブチップを注入ポートに移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップから吐出する。カートリッジ - ポンプを稼働させ、レポータDNAをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジ - ポンプを稼働させ、レポータDNAをカートリッジフローセルに移動させ、およそ60秒維持する。カートリッジ - ポンプを稼働させ、レポータDNAを廃液ボトルに移動させる。

20

【 0 0 5 4 】

ロボット - プローブチップを洗浄ポートに移動させ、水 - ポンプを稼働させプローブチップを洗浄する。ロボット - プローブチップをHigh Salt Buffer位置に移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップからHigh Salt Bufferを吸引する。ロボットをPI検知位置に移動後、キャリブレーションの確認を行う。ロボット - プローブチップを注入ポートに移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップから吐出する。カートリッジ - ポンプを稼働させ、High Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジ - ポンプを稼働させ、High Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジ - ポンプを稼働させ、High Salt Bufferを廃液ボトルに移動させる。カートリッジフローセルの温度を設定温度に上昇させ、およそ60秒維持する。

30

【 0 0 5 5 】

非特異的吸着レポータDNAの洗浄(805)を以下のように行う。ロボット - プローブチップを洗浄ポートに移動させ、水 - ポンプを稼働させプローブチップを洗浄する。ロボット - プローブチップをLow Salt Buffer位置に移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップからLow Salt Bufferを吸引する。ロボットをPI検知位置に移動後、キャリブレーションの確認を行う。ロボット - プローブチップを注入ポートに移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップから吐出する。注入ポートの温度を設定温度に上昇させ、およそ60秒維持。カートリッジ - ポンプを稼働させ、Low Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジ - ポンプを稼働させ、Low Salt Bufferを廃液ボトルに移動させる。

40

【 0 0 5 6 】

ロボット - プローブチップを洗浄ポートに移動後、水 - ポンプを稼働させプローブチップを洗浄する。ロボット - プローブチップをLow Salt Buffer位置に移動後、水 - ポンプを稼働させ、ロボット - プローブチップからLow Salt Buffer

50

erを吸引する。ロボットをPI検知位置に移動後、キャリブレーションの確認を行う。ロボット-プローブチップを注入ポートに移動後、水-ポンプを稼働させ、ロボットプローブチップから吐出する。カートリッジ-ポンプを稼働させ、Low Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動させる。カートリッジフローセルの温度を設定温度にする。

【0057】

CCDカメラで画像を取得する(806)。

カートリッジ-ポンプを稼働させ、Low Salt Bufferをカートリッジフローセルに移動する。カートリッジ-ポンプを稼働させ、Low Salt Bufferを廃液ボトルに移動する。装置終了処理(807)後、装置Power-offする。

10

【0058】

以下、上述のCCDカメラで画像を取得する際の動作について、詳細説明する。

DNAチップを保持するカートリッジが装置内に挿入されると、カートリッジのフローセル内に専用のBuffer溶液が注入された後、オートフォーカスが実行される。オートフォーカスでは、2波長ある励起光源のどちらか一方を点灯させ、かつ検出用フィルタをNDフィルタに切替えて、DNAチップの反射像を撮影する。この動作を移動ステージを一定間隔で移動させながら繰り返す。得られた反射像は画像処理により像のエッジが強調された後、CCDの各ピクセルにおける信号量の標準偏差を算出し、その値をオートフォーカスのための評価値とする。評価値が高ければ高いほど、像のコントラストが得られていると解釈することができるため、評価値が最も高い位置を焦点の合った位置とする。実際の動作では、移動ステージを移動させながら、反射像の撮影を繰り返し、同時にそれぞれの画像に対して評価値を算出していく。オートフォーカス中は、撮影毎に移動ステージの位置と評価値を記憶しておき、最終的に評価値が最大値を示した位置へ移動することでオートフォーカスが終了する。オートフォーカス完了後、DNAチップ上へのサンプルの貼り付け等が行われ、蛍光測定のための準備が行われる。オートフォーカス自体はいつでも実行可能であるが、蛍光色素が光照射により劣化するブリーチングを防ぐため、蛍光色素が存在しない状態でオートフォーカスを実施することが望ましい。サンプルがDNAチップ上の各測定サイト上に貼り付けられ、蛍光測定のための準備が整った後、蛍光像の撮影を実施する。蛍光色素は2種類あるため、それぞれの蛍光色素に対して蛍光像の撮影を実施する。蛍光像の撮影では、検出用フィルタをNDフィルタから蛍光検出用のバンドパスフィルタに切り替える。蛍光像を取得後、DNAチップ上の各測定サイトにおける、2波長の蛍光強度比を算出し、SNP判定を行う。

20

30

【0059】

本実施例では、励起光源にLEDを、検出器にCCDを用いることで従来技術に対し、低コスト、省スペース、高スループット、高いメンテナンス性を実現することが可能となる。また、前記構成による光学系を採用するに当たり、DNAチップ像をCCD上へ結像させるためのレンズ群を1つの鏡筒内に収め、かつDNAチップから発する反射光又は蛍光を波長選別するための複数の光学フィルタを鏡筒の一部に設けた貫通穴を当して切り替える構造とすることで、レンズ及びフィルタ切替機構の組立調整の作業性を向上させることが可能となる。また、光学系ユニット内で、照射系と検出系全体をそれぞれ個別に脱着

40

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】DNAチップを用いるSNP解析装置の分解斜視図。

【図2】SNP解析装置の概略図。

【図3】光学系ユニット概略断面図。

【図4】光学系外観図。

【図5】LED詳細図。

【図6】レンズユニット断面図及び側面図。

50

【図7】検出用フィルタの切替および確認方法。

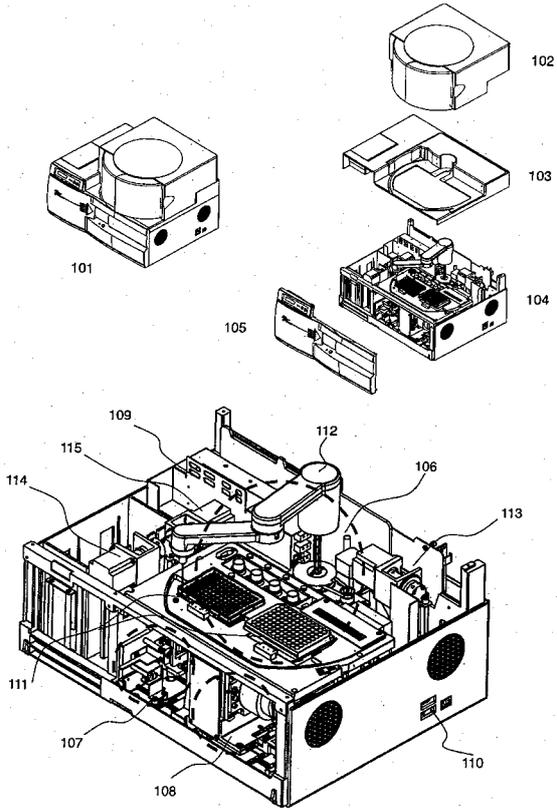
【図8】処理フロー図。

【符号の説明】

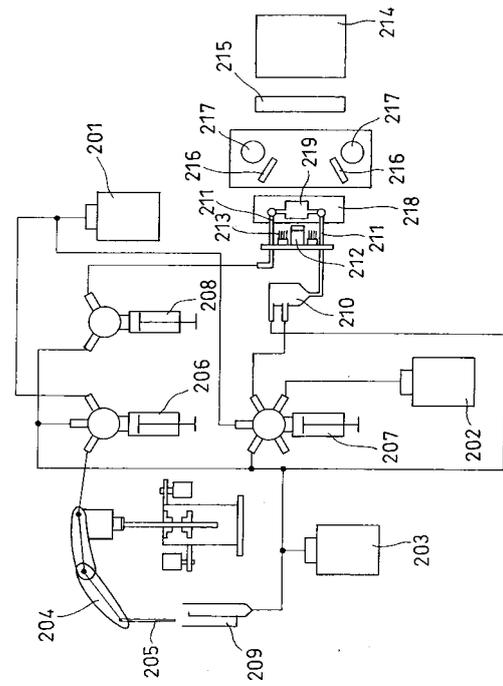
【0061】

301	LED	
302	励起用フィルタ	
303	検出用フィルタ	
304	レンズユニット	
305	CCD	
306	移動ステージ	10
307	オートフォーカス駆動部	
308	DNAチップ	
309	検出系設置台	
401	LED	
402	CCD	
403	DNAチップ	
404	検出用フィルタ	
405	レンズユニット	
501	LED	
502	励起用フィルタ	20
503	LED設置台	
601	レンズ	
602	検出用フィルタ	
603	鏡筒	
604	回転板	
701	検出用フィルタ	
702	回転板	
703	機械式ストッパ	
704	ホトインタラプタ	
705	位置検出用回転板	30
706	スリット	

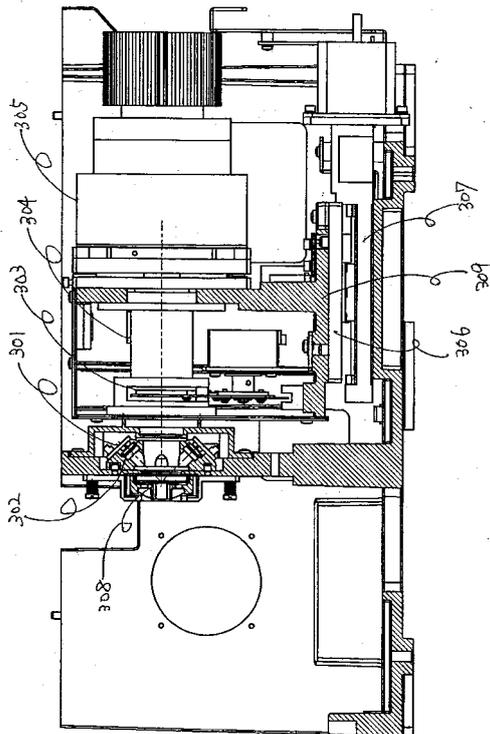
【 図 1 】



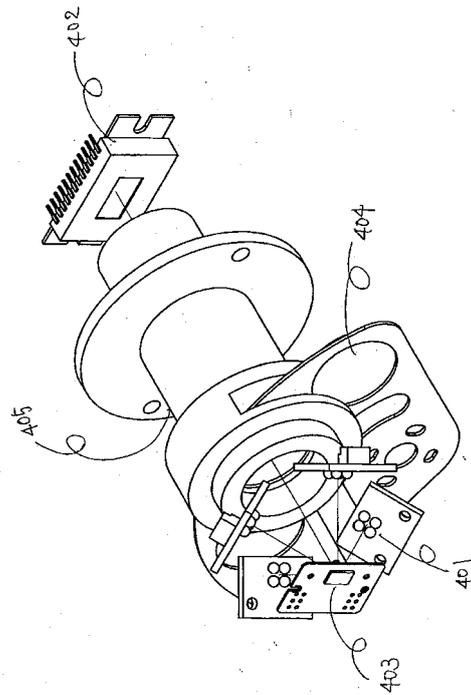
【 図 2 】



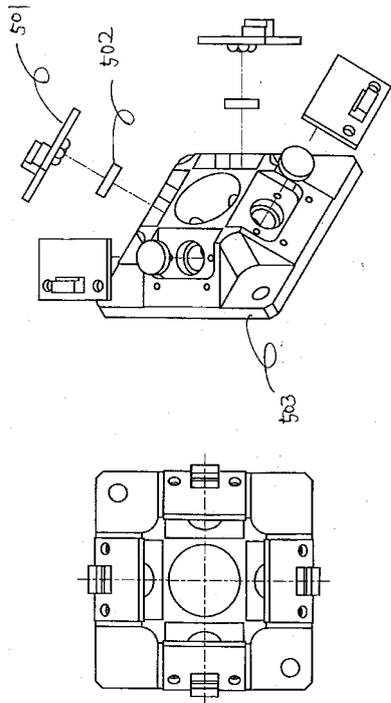
【 図 3 】



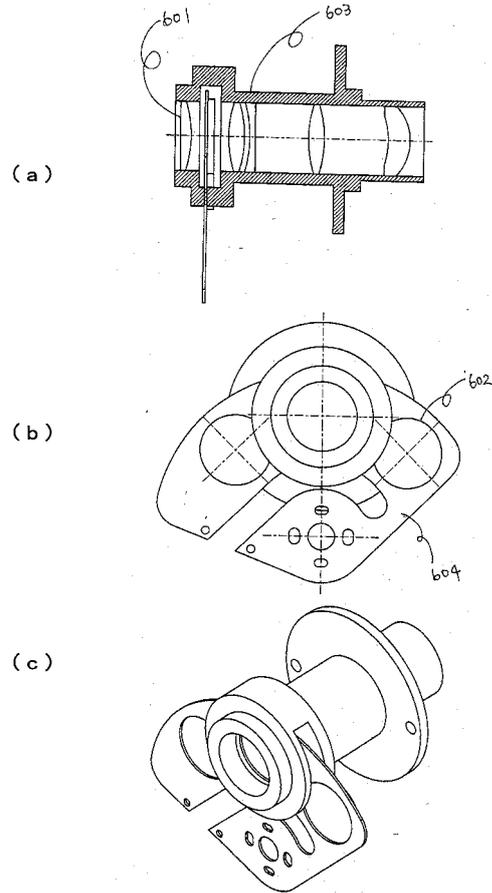
【 図 4 】



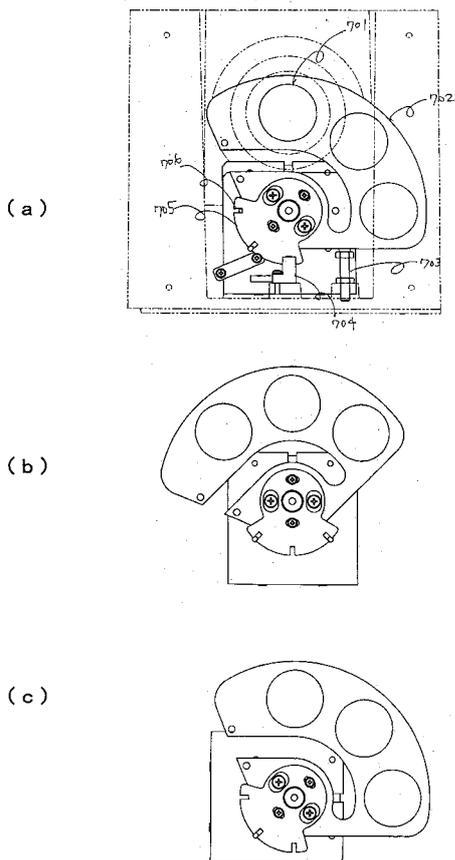
【 図 5 】



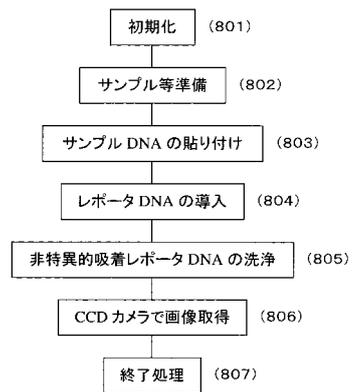
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(72)発明者 濱 勝信

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社 日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内

(72)発明者 高橋 智

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社 日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所内

審査官 横井 亜矢子

(56)参考文献 特開平10-300672(JP,A)

特開2003-262588(JP,A)

特表2003-521670(JP,A)

特開2001-083090(JP,A)

特開2001-083091(JP,A)

特開2000-292353(JP,A)

特表2003-530568(JP,A)

特開2003-28799(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - G01N 21/83

JSTPlus(JDream2)