

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年12月24日 (24.12.2008)

PCT

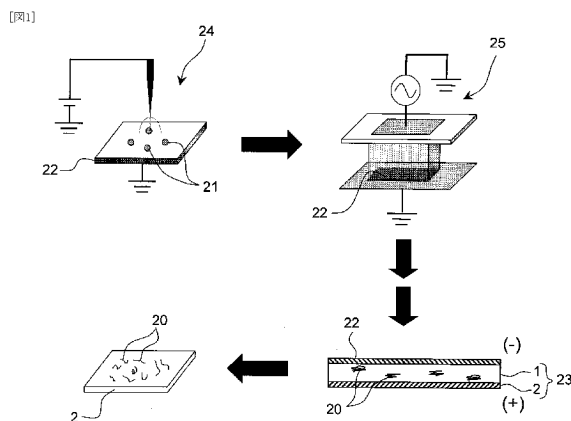
(10) 国際公開番号
WO 2008/156135 A1

- (51) 国際特許分類: *G01N 33/50* (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01) *C12M 1/40* (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/061210
- (22) 国際出願日: 2008年6月19日 (19.06.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2007-162261 2007年6月20日 (20.06.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人豊橋技術科学大学 (TOYOHASHI UNIVERSITY of TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒4418580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水野 彰 (MIZUNO, Akira) [JP/JP]; 〒4418580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1 国立大学法人豊橋技術科学大学内 Aichi (JP). 高島 和則 (TAKASHIMA, Kazunori) [JP/JP]; 〒4418580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1 国立大学法人豊橋技術科学大学内 Aichi (JP). 安田 八郎 (YASUDA, Hachiro) [JP/JP]; 〒4418580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1 国立大学法人豊橋技術科学大学内 Aichi (JP). ラーマン モハメド マスデウル (Rahman Md. Masudur) [BD/JP]; 〒4418580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1 国立大学法人豊橋技術科学大学内 Aochi (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF MEASURING MICROPARTICLES HAVING NUCLEIC ACID AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: 核酸を有する微粒子の計測方法および装置



(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a system whereby the state of contamination with microparticles having nucleic acid can be quickly and appropriately evaluated. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] The above problem can be overcome by a system for measuring microparticles which comprises the following steps: (1) the microparticle-adhesion step wherein microparticles having nucleic acid are adhered to a member for microparticle-adhesion; (2) the membrane-breakage step wherein the membranes of the adhered microparticles are broken by electrical discharge; (3) the electrophoresis step wherein the above-described microparticles are electrophoresed in the thickness direction of a gel so that the nucleic acid in the microparticles is migrated from the negative electrode side toward the positive electrode side, thereby adhering the nucleic acid to the surface of a member for nucleic acid-detection; and (4) the nucleic acid-measurement step wherein the surface of the member for nucleic acid-detection as described above is fluorescently stained and thus the nucleic acid concentration is measured.

(57) 要約: 【課題】 核酸を有する微粒子による汚染状況の評価を迅速かつ的確に行えるシステムを提供すること。【解決手段】 下記工程、すなわち (1) 核酸を有する微粒子を微粒子付着用部材に付着させる微粒子付着工程、(2) 付着された微粒子の膜を放電により破壊する膜破壊工程、(3) 前記微粒子をゲルの厚さ方向に電気泳動し、微粒子中の核酸を負極側から正極側に移動させ、核酸検出用部材の表面に核酸を付着させる電気泳動工程、(4) 前記核酸検出用部材の表面を蛍光染色し、核酸の濃度を

[続葉有]

WO 2008/156135 A1



(74) 代理人: 小林 洋平 (KOBAYASHI, Youhei); 〒5110068
三重県桑名市中央町4-4-4 ウインズビル2階ケー
ワイ国際特許事務所 Mic (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,

SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

核酸を有する微粒子の計測方法および装置

技術分野

- [0001] 本発明は、病院・食品工場の空気・壁面・床、あるいは手術・食品製造に用いる器具・衣服の微生物による汚染状況などを把握するための核酸を有する微粒子の計測に関する方法および装置に関するものである。

背景技術

- [0002] 従来より、病院や食品工場などのように、特に衛生面に気を配る必要がある場所における空气中、壁面、及び床面の微生物による汚染状況、並びに手術や食品製造に用いる器具及び衣服の微生物による汚染状況を調べる必要があった(非特許文献1)。従来の方法では、培地や細胞を多数固定した膜に試料を溶液として塗布し、微生物に対してはコロニーを形成し、またウイルスに対しては膜状に張った細胞の欠損を生じさせて、コロニー数あるいは欠損数を計数することで評価していた(非特許文献2)。

- [0003] 一方、近年の技術開発の進歩により、一分子DNAの操作や計測技術が進んだことで、一分子のDNAを蛍光染色することで鮮明に観察できるようになって来た(非特許文献3)。これを用いて、細胞からのDNA分子の取り出し、DNA分子の基板への伸張固定、また伸張固定したDNAに蛍光染色した制限酵素を付着させて蛍光顕微鏡による制限地図の作成などが可能となってきた(特許文献1、非特許文献4)。

特許文献1:特開2003-200400号公報

非特許文献1:柳 宇:事務所ビルにおけるバイオエアロゾルの挙動とその制御方法, クリーンテクノロジー, vol 17, No.5, 44-47, 2007

非特許文献2:石松維世:浮遊微生物粒子の捕集と検出, クリーンテクノロジー, vol 17, No.5, 48-51, 2007

非特許文献3:Morikawa K., and Yanagida M., J. Biochem., 89, pp.693-696, 1981

非特許文献4:A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, D. Bensimon, "Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface", Scienc

e, Vol.265(5181), pp2096-2098, 1994

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は一分子を可視化する方法を核酸を持つ粒子の検出に応用することで、環境中の微生物を迅速かつ的確に計数するものである。

従来、環境中の微生物による汚染状況の評価は、培養によるコロニー形成あるいは細胞欠損により行われている。しかしながら、細胞の培養や細胞にウイルスを感染させ細胞欠損を起こすには数日の時間が必要である。蛍光色素を用いて細胞内のDNAを染色して観察する方法も、細胞膜の色素透過性が低く、10時間程度以上の染色処理時間が必要である(非特許文献2)。このとき細胞内小器官が同時に蛍光染色されることが多く、誤差の原因となっていた。また、処理時間短縮のために細胞膜を壊して蛍光染色を行うと、核酸以外の生体高分子も染色されてしまい、誤差の原因となってしまう。

課題を解決するための手段

[0005] 上記事情に鑑み、本発明者は鋭意検討を重ねた結果、次の発明を完成させるに至った。

第1の発明に係る核酸を有する微粒子の計測方法は、下記工程、すなわち、(1)核酸を有する微粒子を微粒子付着用部材に付着させる微粒子付着工程、(2)付着された微粒子の膜を放電により破壊する膜破壊工程、(3)前記微粒子をゲルの厚さ方向に電気泳動し、微粒子中の核酸を負極側から正極側に移動させ、核酸検出用部材の表面に核酸を付着させる電気泳動工程、(4)前記核酸検出用部材の表面を蛍光染色し、核酸の濃度を計測する核酸計測工程を備えたことを特徴とする。

本発明において、前記微粒子付着工程においては、前記微粒子付着用部材をコロナ放電電極の滑らかな電極側の表面に置き、前記微粒子付着用部材の表面に空中に浮遊する核酸を持つ微粒子を付着させることが好ましい。

また、前記膜破壊工程においては、相対する電極間に絶縁板を挿入した電極系を用い、前記電極の間に前記微粒子付着用部材を挿入し、前記電極間に交番電圧を印加することで微粒子の膜を破壊することが好ましい。

また、前記核酸検出用部材において核酸が電気泳動される面は、正の表面電荷を有することが好ましい。

[0006] 第2の発明に係る核酸を有する微粒子の計測システムは、核酸を有する微粒子を付着させる微粒子付着用部材と、この微粒子付着用部材の表面に核酸を有する微粒子を付着させる微粒子付着装置と、前記微粒子付着用部材に付着した前記微粒子の膜を放電により破壊する膜破壊装置と、電荷中和剤を備えたテープとこのテープの一面側に設けたゲルとを備えた核酸検出用部材と、前記微粒子付着用部材の表面に付着している核酸を前記核酸検出用部材のゲルを通して電気泳動させて前記テープ側に移動させる電気泳動装置と、前記核酸検出用部材のゲルを取り除いた状態で前記テープ表面の核酸を検出する核酸検出装置とを備えたことを特徴とする。

[0007] 本発明において、前記微粒子付着装置は、針電極と平板電極とを設けたコロナ放電電極を備えており、前記平板電極に前記微粒子付着用部材を載置した状態で表面に前記微粒子を付着させることが好ましい。

また、前記膜破壊装置は、相対する電極と、この電極間に挿入された絶縁板と、前記微粒子付着用部材を挿入する部材装着空間とを備えており、前記電極間に交番電圧を印加することで前記膜を破壊することが好ましい。

また、前記核酸検出用部材のテープは、正の表面電荷を有することが好ましい。

また、前記核酸検出用部材は、前記微粒子付着用部材を兼用しており、前記ゲルの表面に核酸を有する微粒子を付着させた状態で、微粒子の膜破壊操作を行うことが好ましい。

[0008] 核酸とは、RNAまたはDNAのいずれも含まれる。また、一本鎖または二本鎖のいずれでもよく、環状または直鎖状のいずれも含まれる。

核酸を有する微粒子とは、核酸を有するものを意味しており、例えば微生物(細菌、菌類、酵母、カビなどを含む)、ウイルス、ウイロイドなどが含まれる。

発明の効果

[0009] 核酸を持つ細菌やウイルス粒子などの微粒子の濃度を調べるためには、細胞膜やタンパクのエンベロープを効率良く破壊して内部に含まれている核酸(DNA、RNA)

を取り出し、この核酸のみを蛍光染色して計数する必要がある。核酸を細菌やウイルスから迅速に取り出すために本発明では放電を用いる。特に、相対する電極間に絶縁板を挿入した電極系を用いた放電破壊を行うことで、数分以内に細胞を破壊して核酸を取り出すことができる。これは細胞膜を破壊する酵素反応などに比べ極めて短時間である。

また、本発明の目的は、核酸を有する微粒子の濃度計測を短時間で行うことである。上記放電破壊を用いれば、微粒子付着用部材に付着させた微粒子をその場で破壊することができる。従来のように、核酸を有する微粒子を一旦溶液に移して核酸抽出操作を行うためには、かなりの量の試料が必要となる。このため、多くの試料を集めるためには長時間の微粒子捕集操作が必要となり、迅速な濃度計数ができなかった。

[0010] 一方、本願発明によれば、微粒子付着用部材の表面で破壊された細胞やウイルスから表面に拡散する核酸は、微粒子付着用部材の表面に塗布した界面活性剤などの電荷中和剤により、ヒストンなどのタンパクと分離される。つまり、核酸を放電破壊により微粒子から取り出した後、他の構成分子と区別するため、ゲル電気泳動により核酸を分別する。電気泳動の時間を短縮するためにはできるだけ泳動距離を短くする必要がある。本発明の核酸検出用部材では、テープの表面に薄いゲル層を有する膜を用いて、ゲル層の厚さ方向に核酸を電気泳動することで、他の生体高分子から分別する。ゲル層を通過してテープまで電気泳動された核酸はテープ表面に付着する。このとき、核酸は負電荷を帯びているので、正極性表面電荷を持たせたテープを用いれば、分離した核酸をテープに確実に付着させ保持できる。

[0011] 電気泳動を行った後にゲルをテープから剥離する。次に、テープに付着した核酸を蛍光染色する。蛍光染色には、YOYOや臭化エチジウム、DAPIなど、DNAやRNAを蛍光染色するための一般的な色素を用いることができる。電気泳動後の核酸を確実に表面に保持するために、テープには正の表面電荷を有する素材を用いることが望ましい。核酸を持つ微粒子一個から抽出された核酸の数は複数になる場合も多いが、その分布範囲は概ね微粒子の直径の数倍以内になるため、その群を画像処理により同定することで、一つの微粒子の核酸群として計数することができる。

[0012] 微粒子付着用部材の表面に微粒子を付着させるため、空气中浮遊微粒子に対してはコロナ放電を用いる。これにより高効率で微粒子を膜表面に電気集塵できる。また必要に応じてコロナ放電電圧あるいはコロナ放電場に導入する微粒子を含む空気流量を調節して、核酸を持つ微粒子の付着密度を制御することで、微粒子の計数精度を向上できる。

また、微粒子付着用部材と核酸検出用部材とを兼用させる構成とし、核酸検出用部材をテープとこのテープの一面側に設けたゲルとから構成すれば、核酸検出用部材を連続的に供給しながら、微粒子付着工程、膜破壊工程、電気泳動工程、及び核酸計測工程を行えるので、非常に迅速な測定システムとすることができる。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 図1は、本実施形態の概要を説明するための工程を示す図である。この工程図では、微粒子付着用部材22と、核酸検出用部材23とが異なる構成としている。核酸20を有する微粒子21は、図示左上側から矢印に向かって工程を進み、右上側から右下側、更に左下側の工程に至ることにより、核酸20が計測される。

まず、左上の微粒子付着工程では、微粒子付着用部材22の表面に核酸を有する微粒子21を付着させる。こうして、微粒子21を付着した微粒子付着用部材22は、次の膜破壊工程に進む(図示右上)。

次に、膜を破壊された微粒子について、ゲル1を用いて、その厚さ方向に電気泳動工程を行い、核酸20を負極側から正極側に移動させる。こうして、核酸20は、核酸検出用部材23のテープ2の表面に移動する(図示右下)。

最後に、核酸検出用部材23のゲル1を取り除き、テープ2の表面に付着したを蛍光染色し、核酸20の濃度を計測する(核酸計測工程)。

[0014] 次に、各工程の詳細について説明する。図2には、微粒子21を電気泳動するための核酸検出用部材23の側断面図を示した。核酸検出用部材23には、正極性の表面電荷を持つようにアミノ基(NH_2^+)で表面処理をした不織布でできたプラスチックテープ2を基板として、その表面にアガロースゲル1を1mm程度以下の厚みで塗布した膜を備えている。このゲル1を用いて核酸を持つ微粒子21を電気泳動する。このテープ状の膜とした核酸検出用部材23は、カートリッジに入れて保管しておき、連続的

に供給できる。例えばテープの幅は1mmから5mm程度でよい。この核酸検出用部材23は、微粒子付着用部材22として兼用することができる。すなわち、アガロースゲル1の表面上に微粒子21を付着させた後に、微粒子21の膜を破壊させ、次いで電気泳動を行うことで、核酸20をテープ2の方向に移動させ、その表面に付着させる。

[0015] 空気中に浮遊する核酸を持った微粒子をテープ状の膜に付着させるには、図3に示すコロナ放電装置(微粒子付着装置)24を用いることができる。コロナ放電装置24には、針状の高電圧電極3と平板状接地電極9とが設けられている。両電極3, 9の距離を約5mmから10mm程度の間隔で設置し、平板状接地電極9の表面に微粒子付着用部材22を供給する。

壁や衣服などに付着した核酸を持つ微粒子を付着させるために、テープ状の核酸検出用部材23を用いるには、核酸検出用部材23をカートリッジから引き出し、直接に壁や衣服などにゲル1の表面を接触させる。あるいは直径数mm程度の膜状の微粒子付着用部材22(または微粒子付着用部材22を兼用する核酸検出用部材23)を別途用意しておき、それを壁や衣服などに接触させ、その後に核酸抽出と蛍光染色などの後処理を行ってもよい。

[0016] 図4には、膜破壊工程に使用できる膜破壊装置25を示した。膜破壊装置25には、相対する無声放電電極5, 19と、両電極間に挿入された絶縁板6と、微粒子付着用部材22を挿入する部材装着空間26が備えられている。両放電電極5, 19は、平行平板電極とされており、電極の一方側に絶縁板6を設けることにより、部材装着空間26の空隙を2mm程度以下とされている。上側の電極5は、ステンレスメッシュにより構成されており、下側の電極19は、接地電極である。電極5には、高電圧交番電源4が接続されている。また、絶縁板6と電極9との間には、所定厚さのスペーサー7が挟み付けられている。これに例えば30kHz、10kV程度の交番電圧を印加して無声放電を発生させる。

核酸20を持つ微粒子21を微粒子付着用部材22に付着させた後、部材装着空間26に微粒子付着用部材22を挿入し、無声放電により微粒子21の膜を破壊する。

[0017] 続いて、微粒子付着用部材22の表面に付着した核酸20を持つ微粒子21を破壊した膜の表面にSDSなどの界面活性剤を加えて核酸20を抽出する。その後に図5

に示す電気泳動装置27を用いて、核酸20の電気泳動を行う。電気泳動装置27には、導電性を有する水溶液(電解質液10)を入れる容器30と、この容器30の底面と上面に設けられた正負一対の電極28, 29が設けられている。両電極28, 29の間に核酸検出用部材23を挿入し、核酸20の電気泳動を行う。電気泳動は、核酸検出用部材23のゲル1側が負となり、テープ2側が正となるように、ゲル1の厚さ方向に行い、核酸20をゲル1表面からテープ2まで電気泳動させる。電気泳動に要する時間は通常数分程度である。

[0018] 電気泳動を行った後に核酸検出用部材23を電気泳動装置27から取り出し、ゲル1をスクレーパーで剥ぎ取って、核酸20が付着したテープ2のみとする。その後に蛍光染色液を入れた容器中にテープ2を通して、付着した核酸20を蛍光染色する。

その後に蛍光を発するよう励起光をテープ2に照射して蛍光を発する核酸20の計数を行う。

実施例

[0019] (コロナ放電による核酸を有する微粒子の捕集)

図6に示すコロナ放電極を備えた微粒子付着装置を用いて空気中に浮遊する細菌の捕集を行った。この装置には、コロナ放電用の針状の高電圧電極3'と平板状接地電極(集じん電極)として培地13と、高電圧直流電源15とが設けられている。なお、符号13Aは、培地13を接地するための電極である。装置の上面側には、ファン12が設けられている。このファン12の駆動により、室内の空気は、上面側から導入され(符号11)、下面側から排出される(符号14)。空気が両電極3', 13間を通過する際に、核酸を有する微粒子が培地13に捕集される。

図7には、この装置を用いて微粒子を捕集したときのコロニー数の計数結果を示した。毎秒18リットルの室内空気をファン12で下方に送り、銀製の針電極3'と培地13との間にコロナ放電を発生させた。培地13側を正極(positive)または負極(negative)とし、電圧を0kVから30kVまで変化させて、10分間のコロナ放電を行った後に、培地13を2日間培養したときに確認されたコロニー数を計数した。

その結果、(1)10分間のコロナ放電により、正極または負極のいずれを用いた場合でも、捕集される菌数が10倍以上(負極では22倍、正極では47倍)に増加すること、

及び(2)正極性コロナ放電を用いることで、負極性コロナ放電を用いた場合に比べると、生菌の捕集効率が上がることが確認できた。正極からのコロナ放電の方が菌コロニー数が多かったのは、銀製の正極における大気圧コロナ放電は、細菌に有害なオゾンの発生が低く抑えられるためと思われた。

[0020] (無声放電による菌の破壊)

図8には、膜を破壊した後の大腸菌の写真を示した。蛍光を発するよう、クラゲ由来の蛍光タンパク質GFPを作る遺伝子を導入した大腸菌を用いた。図4に示す無声放電電極5, 19を備えた膜破壊装置25に、この大腸菌を塗布した微粒子付着用部材22を置き、30kHz, 25kVppの交流電圧を印加した。大腸菌の細胞膜が破壊されると、細胞内に含まれていたGFPが拡散するため、蛍光強度が大きく減衰することが確認できる。比較のため無声放電処理をしていない大腸菌を、無声放電で破壊した大腸菌と混合したサンプルでの蛍光写真からも、無声放電処理により、蛍光強度が大きく減衰することが確認できた。通常、大腸菌の細胞膜の破壊には酵素反応を用いるがその処理には数時間を要するので、無声放電による菌の破壊は極めて短時間でできる特長を有している。

[0021] (DNAの電気泳動)

図9は、微粒子付着用部材22の表面にDNA分子群を塗布したときの蛍光写真である。図10に模式的に示すように、この微粒子付着用部材22のうちDNA分子を塗布した面側(図示下面側)に、核酸検出用部材23を密着させて、電気泳動装置27により、DNAの電気泳動を行った。

図11には、電気泳動後に核酸検出用部材23のテープ2を蛍光染色した結果である。染色によるDNA量の測定から、微粒子付着用部材22からテープ2に、約30から50%のDNA分子が電気泳動により移動して付着することが確認できた。図12は、テープ2に付着したDNAの蛍光顕微鏡写真像である。個々のDNA分子を識別できることが示された。また電気泳動時間は数分程度であり、薄いゲルを通してDNAをサンプリングすることが可能であることが示された。

[0022] (核酸を有する微粒子の計数システム)

図13には、本実施形態の計数システムの概要を示した。このシステムでは、微粒子

付着用部材と核酸検出用部材23とは、兼用する構成となっている。核酸検出用部材23は、帯状に連続して製造されており、図示左側から右側に向かって、所定の速度で移動することにより、微粒子付着工程(A)、膜破壊工程(B)、電気泳動工程(C)、及び核酸計測工程(D)を経るようになっている。

すなわち、核酸検出用部材23は、ゲル1を上方に向けた状態で、コロナ放電装置24を通過する。このとき、ゲル1の表面には、核酸を有する微粒子21が付着する。次に、核酸検出用部材23が、膜破壊装置25の部材装着空間26内を通過すると、無声放電により、微粒子21の膜が破壊される。

次いで、核酸検出用部材23が電気泳動装置27を通過するときに、核酸20が負極側から正極側に電気泳動されつつゲル1の内部を移動し、テープ2の表面に付着する。

電気泳動装置27を通過した後には、核酸検出用部材23のゲル1が剥ぎとられてテープ2のみとされた後に、励起光を発生する核酸検出装置28からの照射によって、核酸20が計測される。

[0023] このように、本発明によれば、核酸20を持った微粒子21の捕集から、微粒子21の破壊と核酸20の抽出、電気泳動によるテープ2表面への固定、蛍光染色と計数が10分以内で行うことが可能となった。

産業上の利用可能性

[0024] この発明により、病院や食品工場の空気および壁面や床、あるいは手術や食品製造に用いる器具や衣服の微生物やウイルスによる汚染状況の評価が10分以内で行うことができるため、感染の危険性の把握、あるいは感染防止に必要な処置をほぼリアルタイムで行うことができ、衛生管理への応用が期待できる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]本実施形態の概要を説明するための工程を示す図である。

[図2]核酸を含む微粒子を捕捉する核酸検出用部材の側断面図である。

[図3]コロナ放電装置の概略図である。

[図4]微粒子の膜を破壊するための膜破壊装置の概略図である。

[図5]核酸をゲル表面からテープまで移動させるための電気泳動装置の概略図であ

る。

[図6]コロナ放電により核酸を持つ微粒子を捕集する微粒子付着装置の概略図である。

[図7]コロナ放電により捕集した微粒子中に含まれる生菌数の測定結果を示すグラフである。図中の白抜きグラフは、培地を正極側(positive)としたときの結果を、黒塗りグラフは、培地を負極側(negative)としたときの結果をそれぞれ示す。

[図8]蛍光タンパク質GFPを体内に含む大腸菌に無声放電処理を行ったときの結果を示す写真である。放電処理を施すことにより、大腸菌の膜が破壊されて細胞内に含まれていたGFPが拡散し、蛍光強度が大きく減衰したことが分かる。

[図9]各種フィルタ表面に塗布したDNAの蛍光写真である。

[図10]微粒子付着用部材と核酸検出用部材とを密着させて、DNAを電気泳動しているときの様子を模式的に示す側断面図である。

[図11]電気泳動処理後に核酸検出用部材のテープ上に転送されたDNAの写真である。点線四角Tは、標準量のDNAを滴下した領域を示し、点線円Sは、電気泳動されたDNAの領域を示す。また、T及びS内部の数値は、DNA量を示す。

[図12]フィルタに付着したDNAの蛍光顕微鏡写真像である。

[図13]核酸を有する微粒子の計数システムの概要を示す図である。

符号の説明

- [0026] 1…アガロースゲル、2…正電荷を持つプラスチック膜、3, 3'…針電極、5…放電電極、6…絶縁板、9, 19…接地電極、13…培地(平板状接地電極)、20…核酸、21…微粒子、22…微粒子付着用部材、23…核酸検出用部材、24…微粒子付着装置、25…膜破壊装置、26…部材装着空間、27…電気泳動装置、28…核酸検出装置

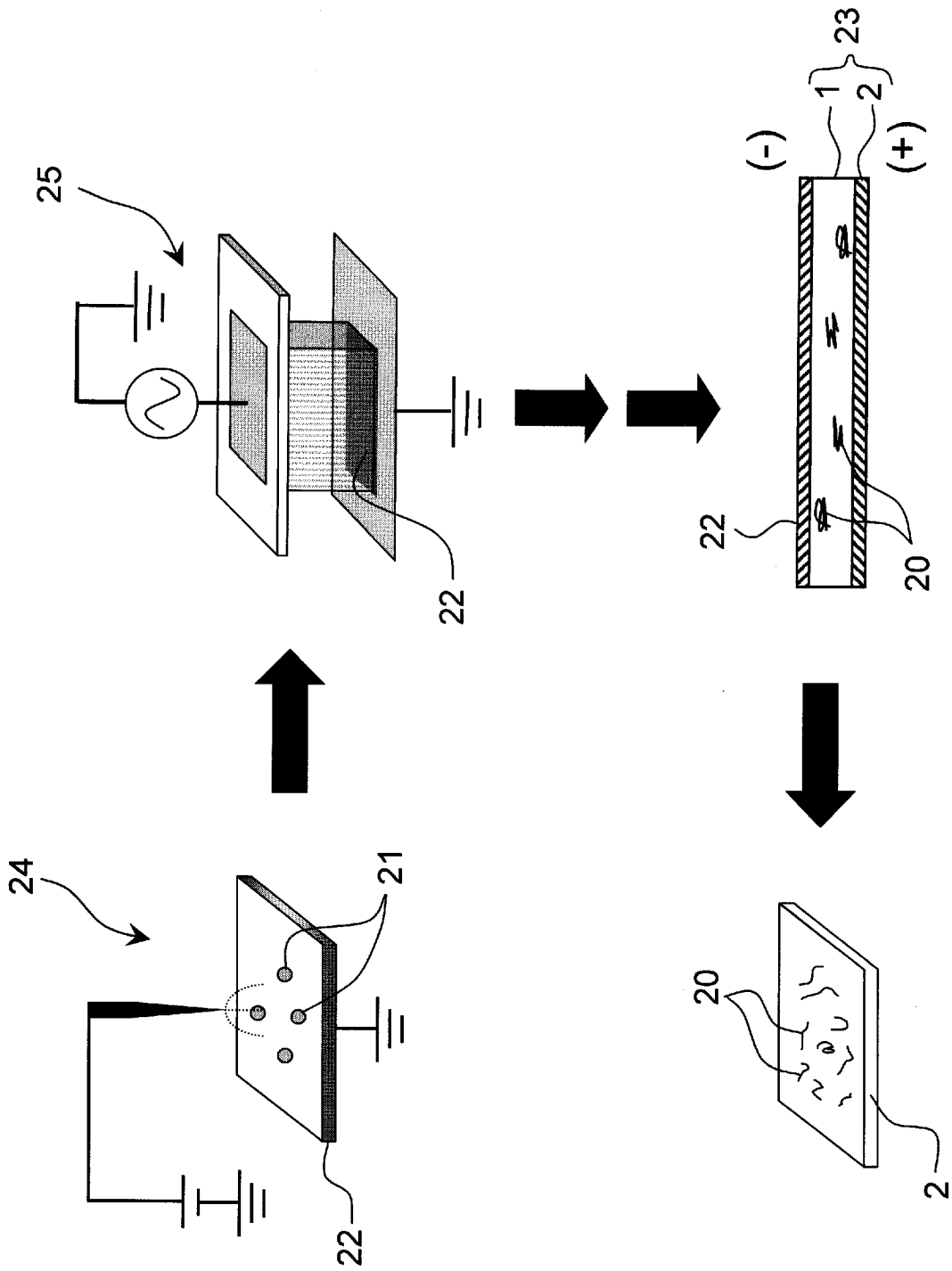
請求の範囲

- [1] 下記工程を備えたことを特徴とする核酸を有する微粒子の計測方法；
- (1)核酸を有する微粒子を微粒子付着用部材に付着させる微粒子付着工程、
 - (2)付着された微粒子の膜を放電により破壊する膜破壊工程、
 - (3)前記微粒子をゲルの厚さ方向に電気泳動し、微粒子中の核酸を負極側から正極側に移動させ、核酸検出用部材の表面に核酸を付着させる電気泳動工程、
 - (4)前記核酸検出用部材の表面を蛍光染色し、核酸の濃度を計測する核酸計測工程。
- [2] 前記微粒子付着工程においては、前記微粒子付着用部材をコロナ放電電極の滑らかな電極側の表面に置き、前記微粒子付着用部材の表面に空中に浮遊する核酸を持つ微粒子を付着させることを特徴とする請求項1に記載の核酸を有する微粒子の計測方法。
- [3] 前記膜破壊工程においては、相対する電極間に絶縁板を挿入した電極系を用い、前記電極の間隙に前記微粒子付着用部材を挿入し、前記電極間に交番電圧を印加することで微粒子の膜を破壊することを特徴とする請求項1または2に記載の核酸を有する微粒子の計測方法。
- [4] 前記核酸検出用部材において核酸が電気泳動される面は、正の表面電荷を有することを特徴とする請求項1～3のいずれか一つに記載の核酸を有する微粒子の計測方法。
- [5] 核酸を有する微粒子を付着させる微粒子付着用部材と、この微粒子付着用部材の表面に核酸を有する微粒子を付着させる微粒子付着装置と、前記微粒子付着用部材に付着した前記微粒子の膜を放電により破壊する膜破壊装置と、電荷中和剤を備えたテープとこのテープの一面側に設けたゲルとを備えた核酸検出用部材と、前記微粒子付着用部材の表面に付着している核酸を前記核酸検出用部材のゲルを通して電気泳動させて前記テープ側に移動させる電気泳動装置と、前記核酸検出用部材のゲルを取り除いた状態で前記テープ表面の核酸を検出する核酸検出装置とを備えたことを特徴とする核酸を有する微粒子の計測システム。
- [6] 前記微粒子付着装置は、針電極と平板電極とを設けたコロナ放電電極を備えており

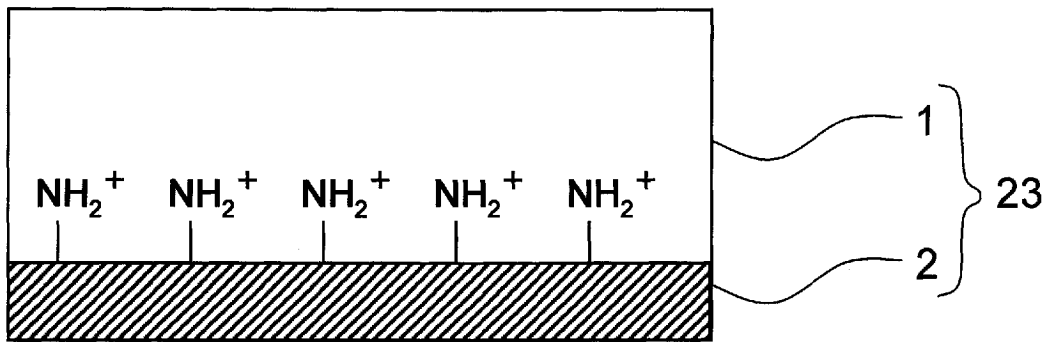
、前記平板電極に前記微粒子付着用部材を載置した状態で表面に前記微粒子を付着させることを特徴とする請求項5に記載の核酸を有する微粒子の計測システム。

- [7] 前記膜破壊装置は、相対する電極と、この電極間に挿入された絶縁板と、前記微粒子付着用部材を挿入する部材装着空間とを備えており、前記電極間に交番電圧を印加することで前記膜を破壊することを特徴とする請求項5または6に記載の核酸を有する微粒子の計測システム。
- [8] 前記核酸検出用部材のテープは、正の表面電荷を有することを特徴とする請求項5～7のいずれか一つに記載の核酸を有する微粒子の計測システム。
- [9] 前記核酸検出用部材は、前記微粒子付着用部材を兼用しており、前記ゲルの表面に核酸を有する微粒子を付着させた状態で、微粒子の膜破壊操作を行うことを特徴とする請求項5～8のいずれか一つに記載の核酸を有する微粒子の計測システム。

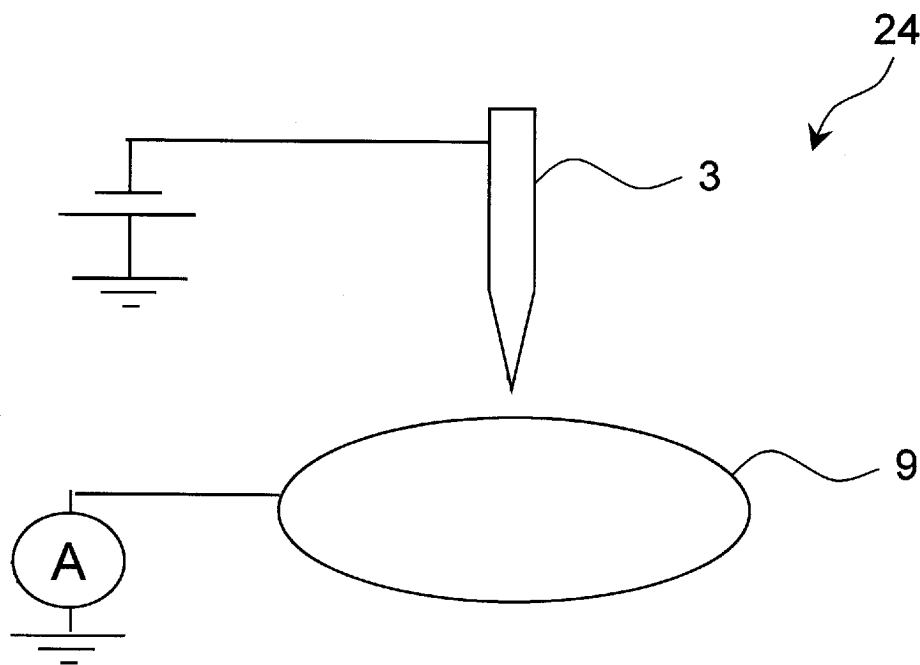
[図1]



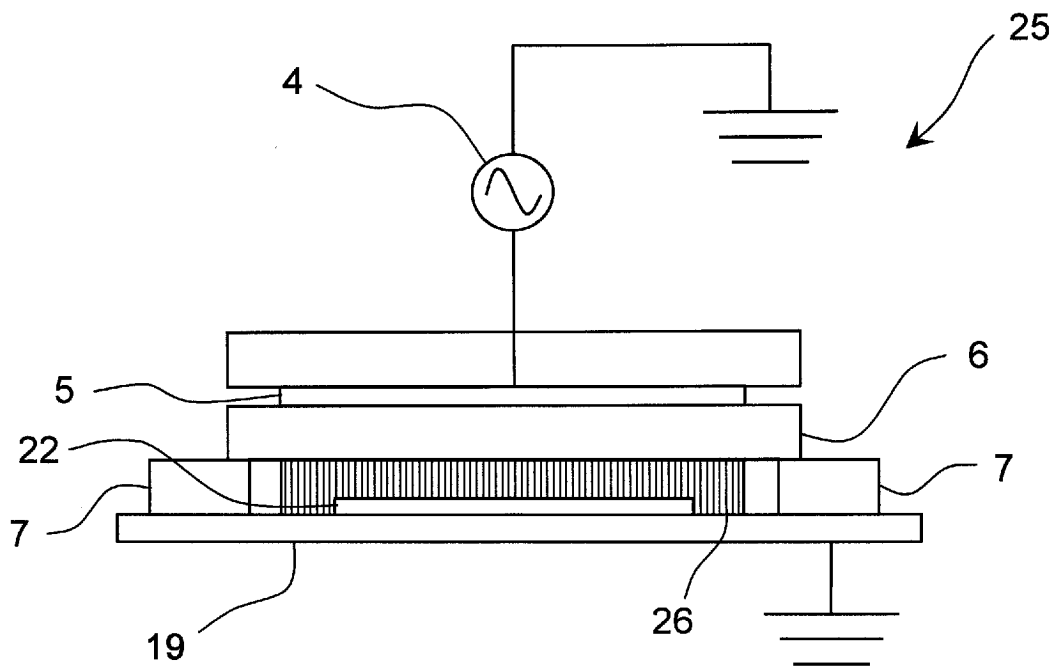
[図2]



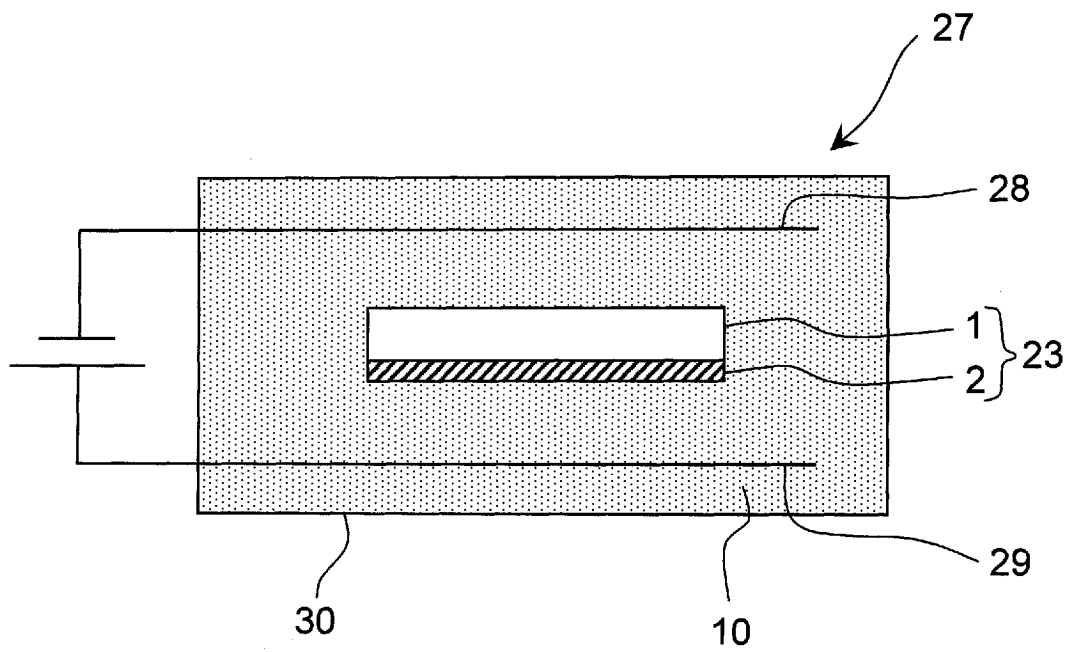
[図3]



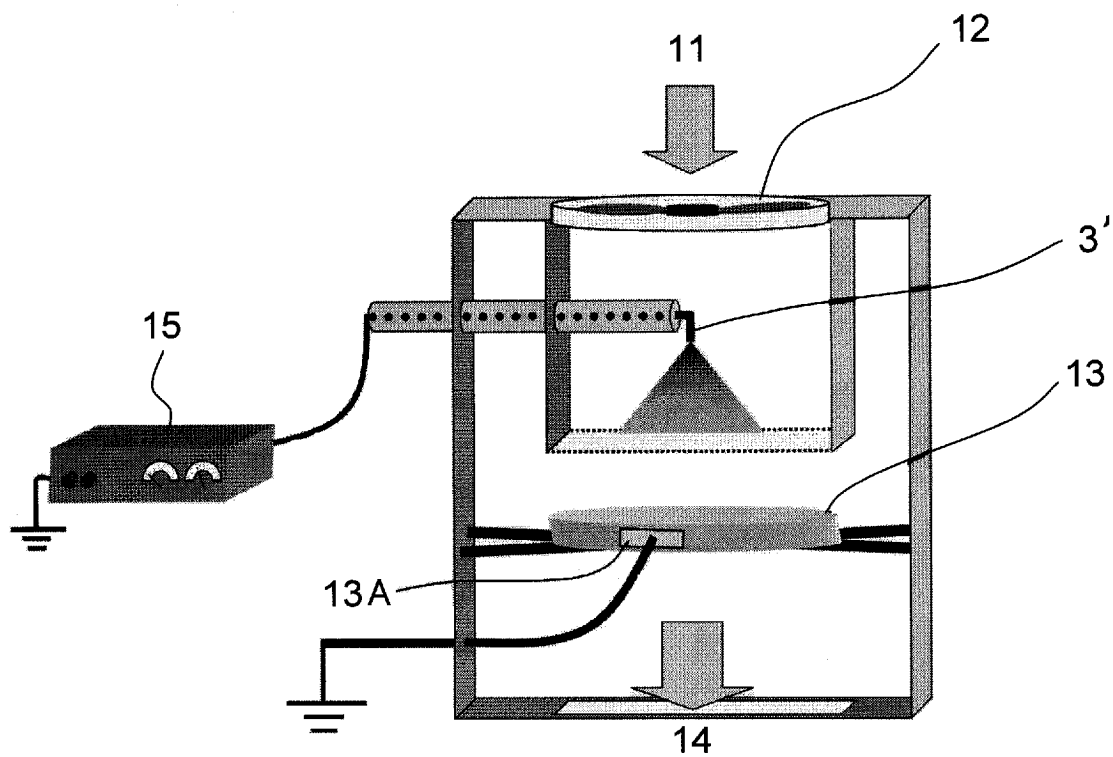
[図4]



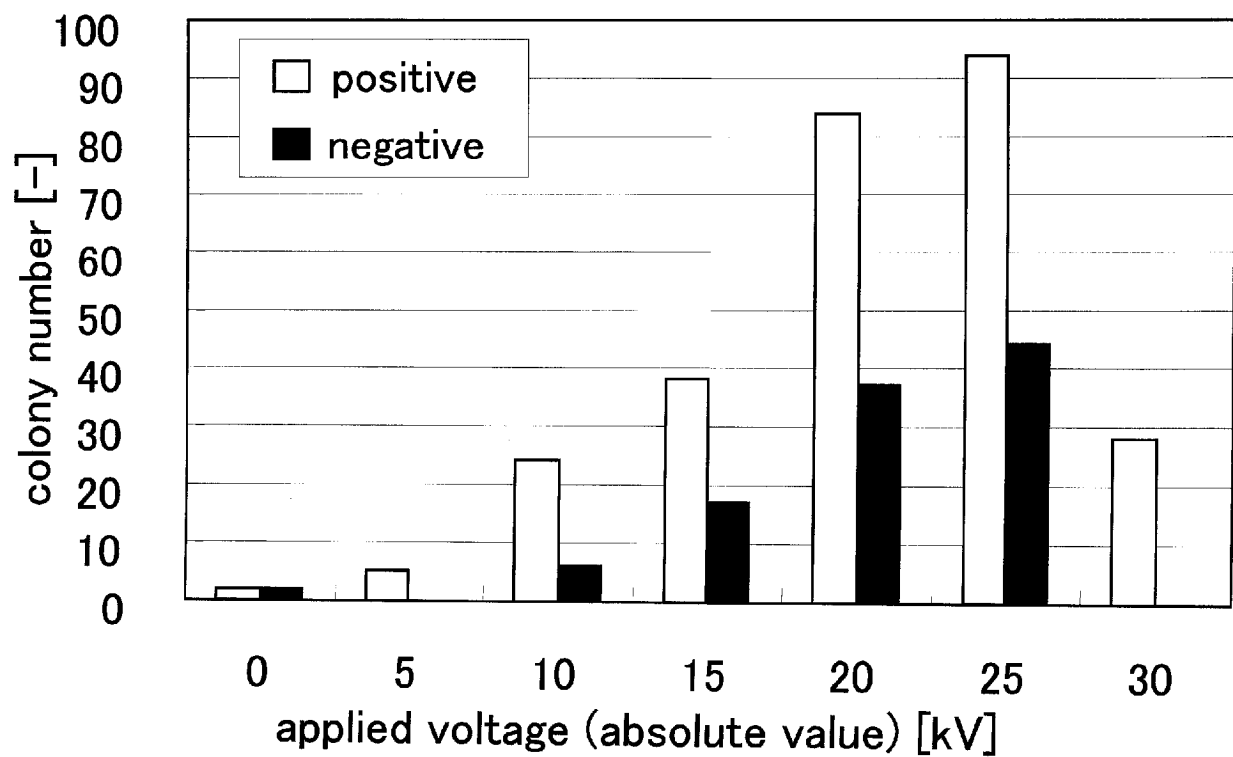
[図5]



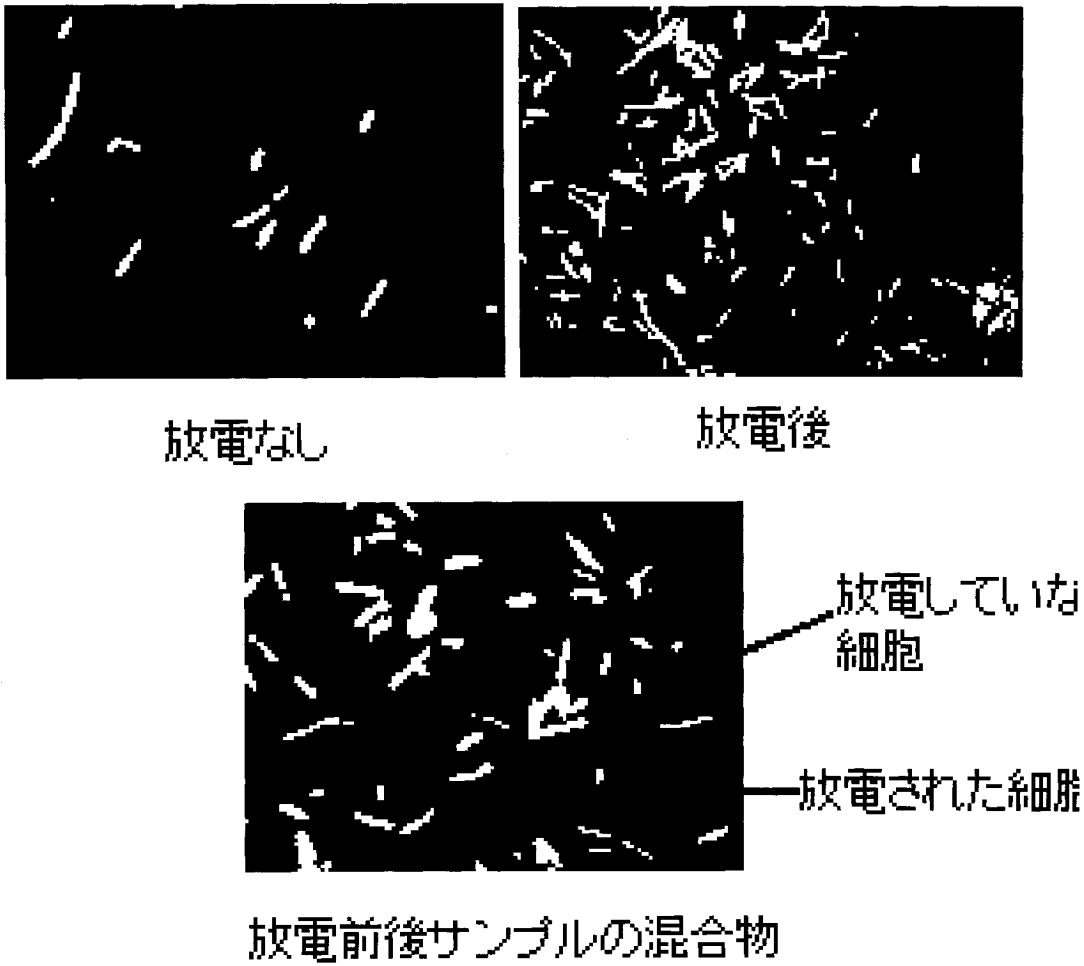
[図6]



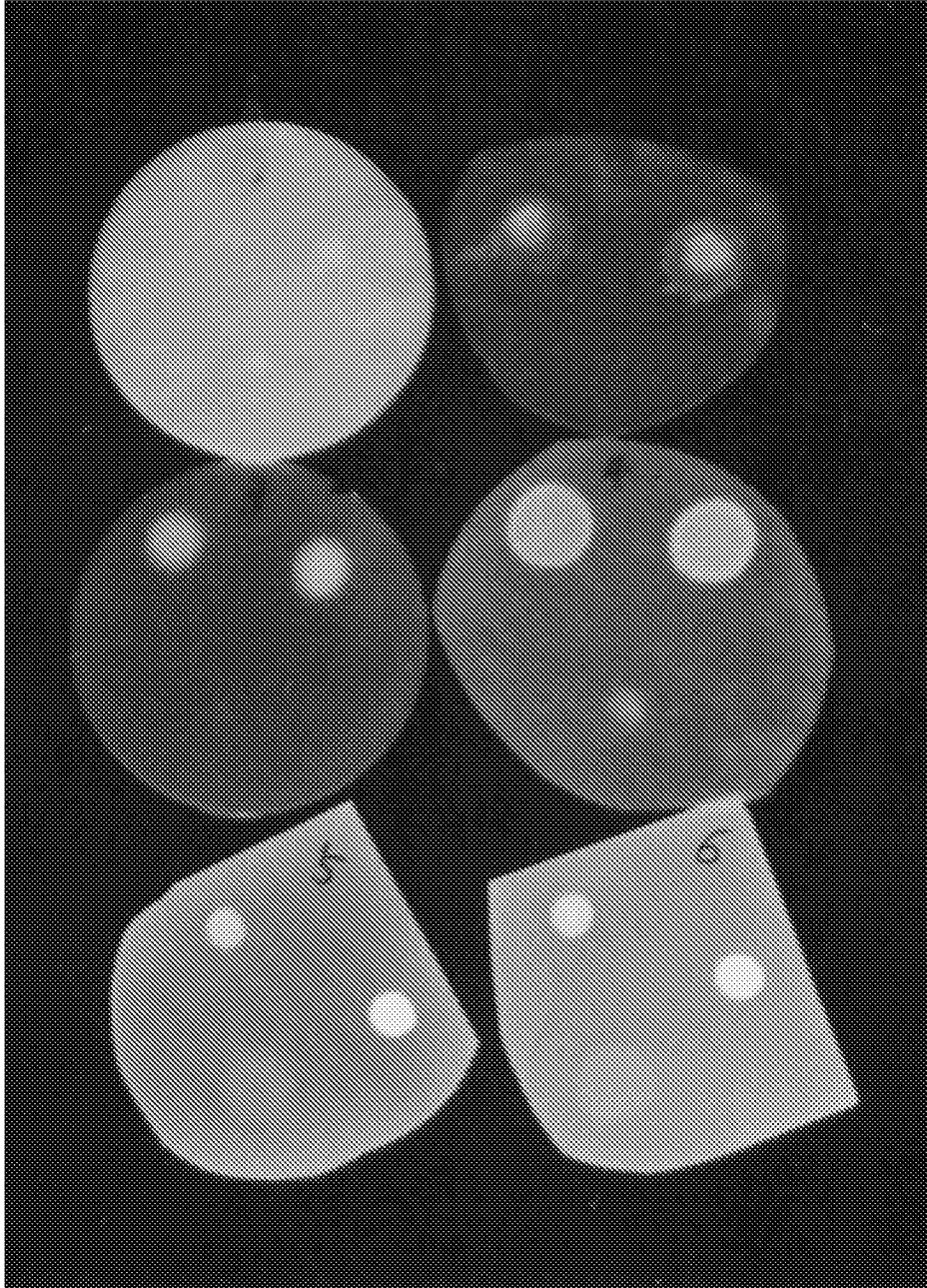
[図7]



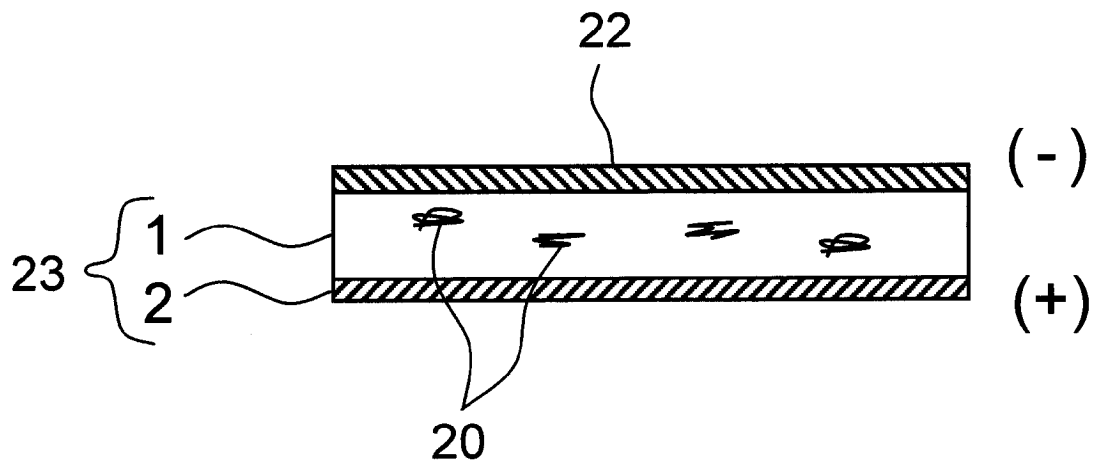
[図8]



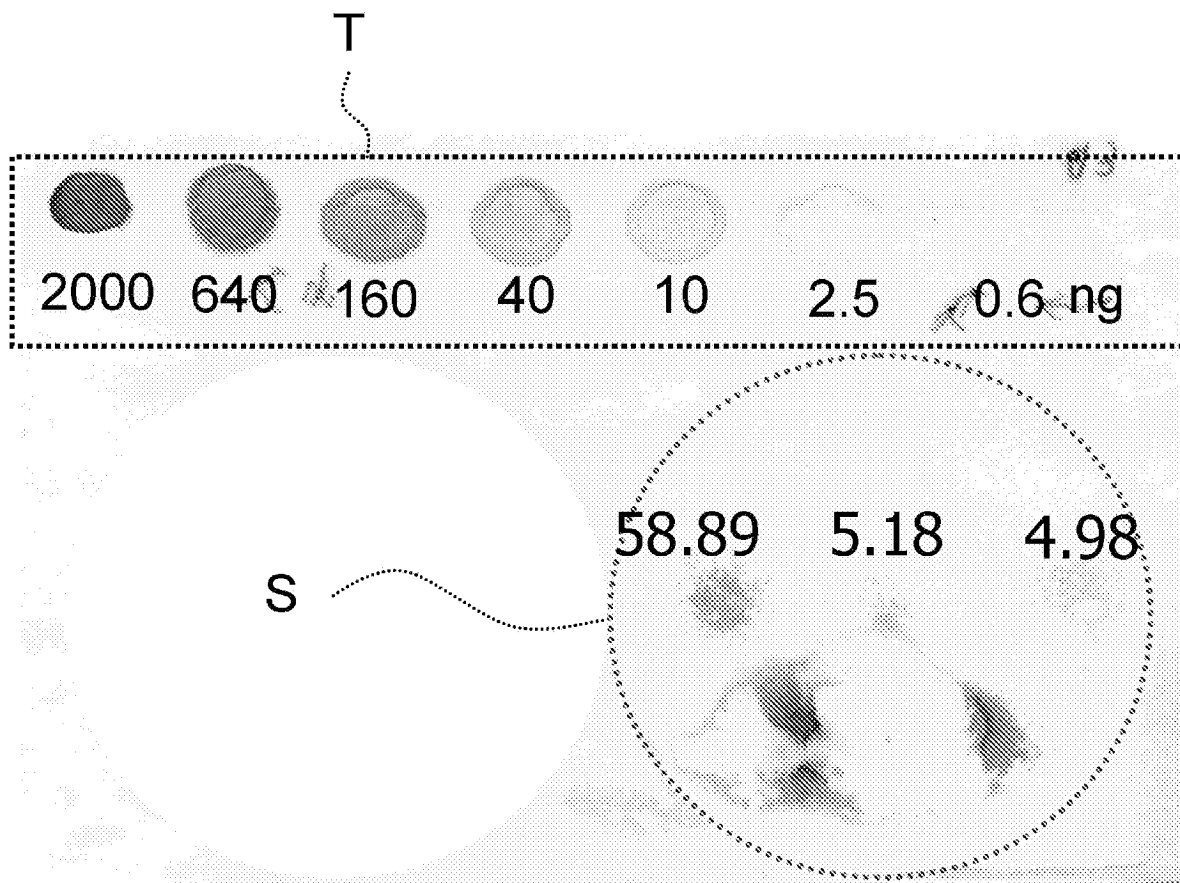
[図9]



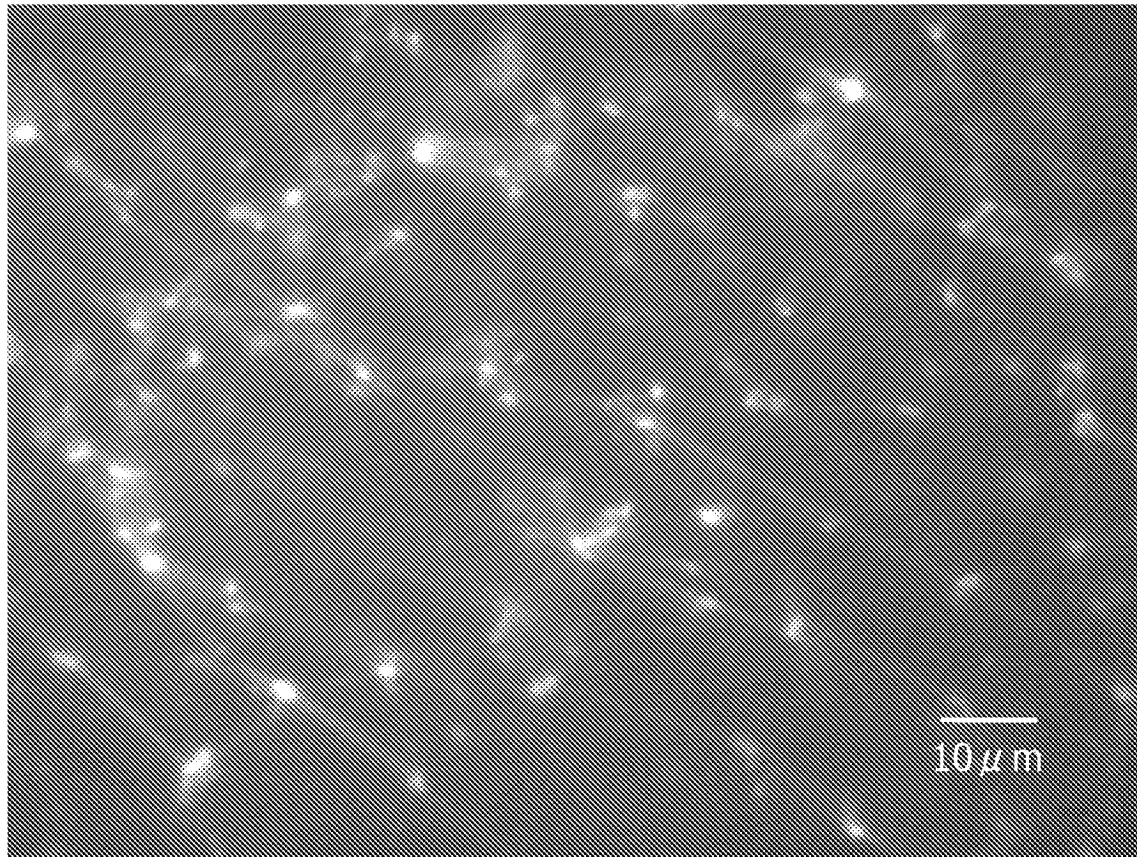
[図10]



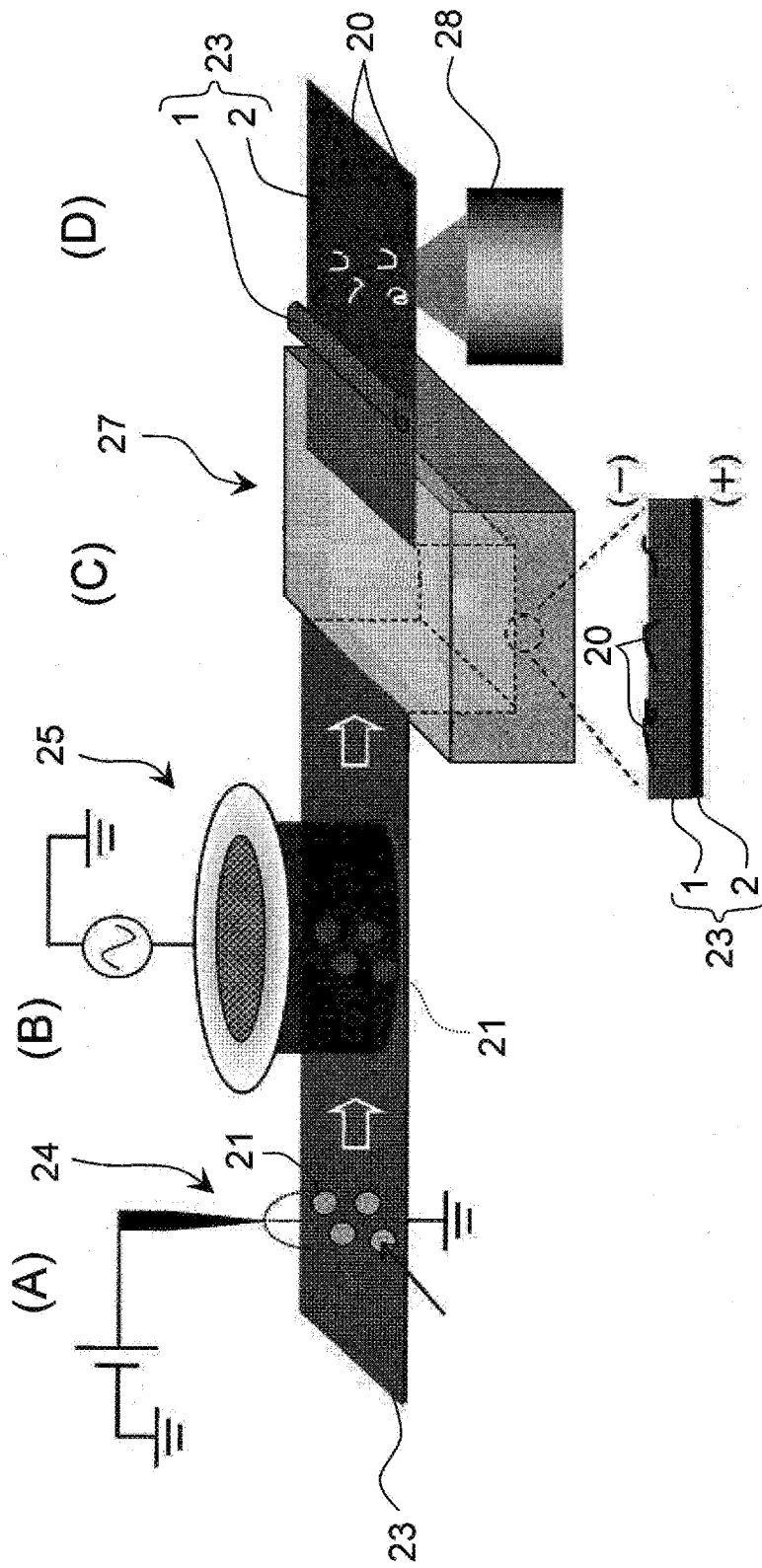
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/061210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/50(2006.01) i, C12M1/34(2006.01) i, C12M1/40(2006.01) i, C12Q1/04(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i, G01N33/483(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)
G01N33/50, C12M1/34, C12M1/40, C12Q1/04, C12Q1/68, G01N21/64, G01N33/483

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	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/083391 A1 (THOMSEN BIOSCIENCE A/S), 09 September, 2005 (09.09.05), Column 3, line 14 to column 4, line 22 & JP 2007-524097 A & EP 001730519 A & WO 2005/083391 A1 & CA 002564612 A & CN 001934443 A	1-9
A	WO 2005/083426 A2 (THOMSEN BIOSCIENCE A/S), 09 September, 2005 (09.09.05), Column 3, line 40 to column 5, line 21 & JP 2007-523652 A & EP 001730518 A & WO 2005/083426 A2 & CA 002557485 A & CN 001947011 A	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 31 July, 2008 (31.07.08)	Date of mailing of the international search report 12 August, 2008 (12.08.08)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061210

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 6-277060 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 04 October, 1994 (04.10.94), Par. Nos. [0014], [0015], [0016], [0017], [0019], [0020], [0025] (Family: none)	1-9
A	JP 3-33656 A (Akzo N.V.), 13 February, 1991 (13.02.91), Page 13, line 6 to page 17, line 6 & EP 402997 A2 & DE 69012440 C & AT 111533 E & AU 5716090 A & ES 2063902 T & FI 902934 A & DK 402997 T & IE 64040 B & ZA 9004600 A & AT 111533 T & AU 641399 B & CA 2018877 A & FI 902934 A0	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12M1/40(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/483(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. G01N33/50, C12M1/34, C12M1/40, C12Q1/04, C12Q1/68, G01N21/64, G01N33/483

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(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 請求の範囲の番号
A	WO 2005/083391 A1 (THOMSEN BIOSCIENCE A/S) 2005.09.09, 第3欄 第14行-第4欄第22行 & JP 2007-524097 A & EP 001730519 A & WO 2005/083391 A1 & CA 002564612 A & CN 001934443 A	1-9
A	WO 2005/083426 A2 (THOMSEN BIOSCIENCE A/S) 2005.09.09, 第3欄 第40-第5欄第21行 & JP 2007-523652 A & EP 001730518 A & WO 2005/083426 A2 & CA 002557485 A & CN 001947011 A	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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

31.07.2008

国際調査報告の発送日

12.08.2008

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)

加々美 一恵

2J

4075

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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 請求の範囲の番号
A	JP 6-277060 A (麒麟麦酒株式会社) 1994. 10. 04, 【0014】、【0015】、【0016】、【0017】、【0019】、 【0020】、【0025】 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 3-33656 A (アクゾ・エヌ・ヴェー) 1991. 02. 13, 第13頁第6 行—第17頁第6行 & EP 402997 A2 & DE 69012440 C & AT 111533 E & AU 5716090 A & ES 2063902 T & FI 902934 A & DK 402997 T & IE 64040 B & ZA 9004600 A & AT 111533 T & AU 641399 B & CA 2018877 A & FI 902934 A0	1-9