

明 細 書

発明の名称：

流路デバイス、核酸精製方法、および試料前処理システム

技術分野

[0001] 本開示は、流路デバイス、核酸精製方法、および試料前処理システムに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子分析技術は、分析精度の向上や技術の汎用化といった急速な技術進歩に伴い、体外診断、法医学、環境計測など様々な分野で活用が進められている。遺伝子検査の手法や分析対象は様々な形態があるが、典型的な分析処理は、検体を採取するステップ、検体から遺伝子を抽出した溶液(サンプル)を準備する抽出ステップ、サンプルに含まれる反応阻害物質を除去する精製ステップ、遺伝子増幅反応で目的遺伝子を増幅するステップ、増幅産物を検出するステップ、および検出信号を解析するステップから構成される。一般に、採取された検体は、ベンチトップ型の遺伝子分析装置および専門器具を備えた専門の施設に輸送され、以降の処理は熟達した専門の技師の手作業に実施される(ラボ方式)。

[0003] 近年、操作の簡易化や迅速化、低コスト化等を目的に、遺伝子前処理・検出装置と使い捨ての専用カートリッジを用いて、試料導入から計測・データ解析までを全自動で実施可能とする、Sample-to-answer型遺伝子分析システムの需要が高まっている。例えば、特許文献1は、カートリッジ内にサンプル導入口、核酸抽出部、精製部、PCR部および検出部を備えた全自動DNA型鑑定システムを提案する。

[0004] 核酸を精製する方法には、有機相固化法、または多孔質膜や磁性ビーズを用いた固相抽出法が利用される。特に、固相抽出法は、多くのキットが市販されており精製効率も良好であることから、広く用いられている。固相抽出法は、核酸を固体の担体に結合させて回収する方法である。当該担体にはシ

リカやガラスファイバー製の多孔質膜や、シリカコーティングを施した磁性ビーズ等が用いられる。一般に、手作業で精製処理をおこなう場合には、特許文献2に示すようなスピncラムに設置された多孔質膜に溶液を載せ、遠心操作により溶液搬送するスピncラム法が採用されることが多い。これは、一般的な研究室設備で実施可能で、比較的操作が簡便であるためである。

[0005] 一方、自動化システムに適用する場合には、磁性ビーズをマグネットに集積する処理により遠心操作なしで溶液交換を達成できる磁性ビーズ法が採用されることが多い。例えば、非特許文献1は、磁性ビーズ法により遺伝子抽出・精製ステップを自動化する方法を開示する。また、非特許文献2は、磁性ビーズ法に限らず流路チップを用いた核酸精製法について開示する。特に、簡易な処理で高効率・高サンプルロバストな核酸精製を実施可能な方法として、B o o m法は広く使用されている。このB o o m法は、カオトロピック塩の存在下でシリカがDNAに強固に結合する作用を応用したDNA精製技術である。B o o m法は、スピncラム法、磁性ビーズ法の多数の溶解精製キット、および流路チップ上での核酸精製に応用されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特許5815572号公報
特許文献2：特開2014-030397号公報
特許文献3：特表2002-512688号公報
特許文献4：特開2005-257647号公報
特許文献5：特開2016-63475号公報
特許文献6：特開2007-111653号公報
特許文献7：特開2019-144164号公報
特許文献8：特開2010-257691号公報
特許文献9：特開2002-39984号公報
特許文献10：国際公開第2022/030605号

非特許文献

[0007] 非特許文献1: " Microfluidic Devices for Nucleic Acid (NA) Isolation, Isothermal NA Amplification, and Real-Time Detection, " Methods Mol. Biol. 1256, 15-40(2015).

非特許文献2: " Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting, " Trends Analyt. Chem. 127:115912(2020).

非特許文献3: " Purification of Nucleic Acids in Microfluidic Devices, " Anal. Chem. 80, 6472-6479(2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 磁性ビーズ法は、ビーズ回収のためのマグネット、マグネットの駆動回路に加え、多段の分析フロー実施にはビーズを高精度で搬送する機構が必要となる。このため、装置および流路チップの構成が複雑でコストが高くなるという課題がある。例えば、非特許文献1に示されるような、流路上に結合担体となるマイクロピラーやモノリス構造を設ける場合、流路チップに特殊な加工が必要になるため、流路チップの製造コストが高くなってしまう。

[0009] 上述の特許文献1、特許文献3、および非特許文献3は、膜状の担体を格納した流路チップ内での核酸精製の実施例について開示する。しかし、これらいずれの文献も、少量のサンプルでも感度良く検査できる水準（例えば、法医学サンプル（事件現場に残された遺留品など）の検査に使うことができる水準）の高感度分析への応用については検討すらしていない。このことは、試料から回収される核酸の量および純度が分析の精度および感度に大きな影響を与えることが一般的に知られているにも拘らず、これらの技術の精製効率について言及した公知例がないことから裏付けられる。

[0010] 流路チップ上で膜状の担体を用いて高効率な核酸精製を実施する課題の一つは、ラボ方式および膜以外の担体を用いた流路チップ精製方式と比較して、精製効率が低いことである。これは、今回、本願発明者等の検討により初めて明らかになった新しい課題である。また、当該課題の主たる原因が溶液

の膜外へ漏れによることも、本願発明者等の検討により初めて明らかになった。なお、本課題の発見に至った経緯および詳細は、後述のように、実施形態に記述および添付図面により明らかにされる。

[0011] 上記課題の解決策の一つとして、例えば、溶液漏れないように精製膜をシール固定することが考えられる。核酸精製用途に限らず、薄膜状の物体を液体または気体が漏れなく接触するように所定の格納部に保持する方法としては、特許文献4から特許文献8に例示されるような、OリングまたはCリングのようなガスケットを用いる膜固定法が考えられる。

[0012] 特許文献4は、外容器に補強板、ガス透過膜、Oリング（ゴムパッキン）を順に格納し、Oリング上部から内容物を嵌合することでOリングを膜方向に押し付ける構造について開示する。特許文献4の構成を上述のような高感度分析の用途（例えば、法医学サンプルの検査）に適用すると、溶液が内容物と外容器の間隙、あるいは補強板と外容器の間隙に吸引されて液漏れが生じ、間隙に吸収された溶液は回収不可能となってしまう。これは、特許文献4が気体成分の通過を意図しており、液体を膜方向に通過させることを考慮していないためである。同時に、特許文献4の構成を流路チップの基板に設けようとすると、膜およびリングを格納した外容器、リングを押しつける内容物、流路を設ける下部蓋体、および下部蓋体を押し付ける上部蓋体の少なくとも4層の基板を組み立てねばならないため、チップが大型で高コストとなってしまう。

[0013] 特許文献5は、内嵌部材の溝にCリングをはめ込んだ上で外容器に嵌合することで、溶液を容器外に漏らすことなく分離膜に連続的に送液する構成を示している。これは、一般的なガスケットリングの使用法でもある。特許文献5の構成を上述のような高感度分析の用途（例えば、法医学サンプルの検査）に適用すると、容器外への液漏れは防止できる一方で、外容器とリングの間隙には液が侵入し、間隙に吸収された溶液は回収不可能となってしまう。これは、特許文献5は連続的な送液を意図しており、微量溶液を流して後段で回収することは考慮されていないためである。また、特許文献4と同様

、特許文献5の構成を基板状のチップデバイスに適用しようとすると、チップの構成要素が複雑となり、やはり大型で高コストとなってしまう。

[0014] 特許文献6は、流路およびフィルタ格納部を形成した2枚のチップ基板の間にフィルタを格納し、チップ基板を接合することによりフィルタを固定する構成を示している。特許文献6の構成は、2枚のチップ基板内に流路を設ける構造であることが必須である。従って、それを、1枚のチップ基板上にフィルムのような薄く軟らかい材質の貼り合わせや接合によって形成する流路チップには適用できない。そのため、特許文献7に例示されるようなオンチップダイアフラムバルブ等を構成することが考えられる。しかし、この場合、バルブを設けるためにさらに別の接合層を設ける必要があり、チップの層構造が煩雑になる。同時に、精密に接合状態を制御するためには、接合条件や位置決め精度を厳密に制御する必要がある。このため、形成できる流路形状やチップ材質の制約が大きい上、製造コストが高くなってしまう。

[0015] 特許文献8および特許文献9は、ガス透過膜、シールリング、および固定部材を順に格納してリングを加圧変形させることにより、デバイス内部に収めた電解液を外部に漏れないようにする構成を開示する。これらは、微量溶液を漏れなくデバイス内に満たすことができる。しかし、当該構成においては送液動作を意図していないため、流路を設けることができない。また、当該技術を上述のような高感度分析の用途（例えば、法医学サンプルの検査）に応用するために流路を設けたとしても、やはり回収不可能な液残りが生じてしまうことは明らかである。

[0016] 特許文献10は、流路チップ上に構成された膜格納容器に核酸抽出膜を設置し、流路を塞がないように切欠を設けたゴム製Oリングを押しつけることで膜を固定し、一定量の液体を膜に通過させる構成を示している。特許文献10の構成を上述のような高感度分析の用途（例えば、法医学サンプルの検査）に適用すると、精製効率が低く、かつ回収液量が顕著に減少することが、本発明者等の検討により明らかになった。また、特許文献10の構成における膜のシール固定力が高感度分析の用途には不十分であること、および、

回収液量の現象は切欠により液残りが生じること由来する現象であることが本発明者等の検討により明らかとなった。特許文献8のOリングは弾性変形するため、切欠部は周囲より変形しやすく、不均一に変形する。このとき、切欠が小さいと流路が細くなることで流路抵抗が大きくなり、送液制御性が損なわれてしまう。一方、切欠が大きいと、切欠部がより大きく潰れるように変形するため、余計に流路が細くなってしまう。同時に、切欠部に液残りが生じやすいほか、リングの断面形状がO型であるためにリングと膜格納部の間隙に液体が侵入しやすく、回収不可能な溶液が増えてしまう。特許文献10に例示される構成例は、少なくとも数百 μL の液体搬送が想定されているのに対し、上述の高感度分析の用途では、数十 μL の微量液体を膜に通過させた上で回収する必要がある。そのため、特許文献10に例示される構成においても、上述の高感度分析の用途は想定されておらず、期待する効果を得られないと言える。

[0017] 以上の通り、従来、多数の膜のシール固定法は存在している一方で、それらはいずれもガスの通流や連続送液、あるいは収液を想定するものに限られ、微量の液体を採取することを想定していない。すなわち、公知の膜固定法はいずれも、流路や容器から気体や液体が漏れ出して本来その気体または液体が侵入してはならない部分に侵入することを回避することが技術的意義であった。これに対し、高感度分析の用途では、流入した微量液体がロスなく膜を通過し後段で高収率に回収可能とする必要がある。

[0018] さらに、薄膜状の物体を液体または気体が漏れなく接触するように所定の格納部に保持する別の方法としては、特許文献2に例示されるような、硬質リングを用いた圧入による膜固定法がある。特許文献2は、樹脂製のスピncラムに円形の多孔質部材、膜、樹脂製の中空部材を順に圧入することで膜を固定する構成を示している。これは、一般的なスピncラムの構成であり、微量液体をロスなく膜を通過させ、高収率で回収可能とする。しかし、特許文献2の構成を高感度分析の用途に適用しようとする、圧入リングまたは流路チップが破損または変形してしまい適用できないことが、本発明者等

の検討により明らかとなった。これは、スピンカラムとは異なり、流路チップの剛性が大きいため、リング圧入時の歪がリングおよび流路チップの双方によって吸収できないためであることも判った。

[0019] 特許文献2の構成を高感度分析の用途に適用する際の別の課題は、膜の保持台となる円形の多孔質保持部材の内部に溶液が残り、収率が低下することである。これは、特許文献2の実施の前提条件となる遠心操作による溶液搬送と比較して、遠心操作を実施しない場合の用途では、溶液搬送圧力が小さいために発生する事象であることが判った。また、特許文献2の構成を高感度分析の用途に適用する際のさらに別の課題は、上記課題に対する対策をした上で、高効率核酸精製法として標準的な技術であるB o o m法を採用してもなお、精製効率が低いか、後段のP C Rの反応阻害を引き起こすことがあることである。これは、送液圧力不足による試料の目詰まりおよび阻害剤残留によることが判った。試料溶液がロスなく精製膜を通過するように精製膜を強固に固定したチップで一連の精製フローを実施する場合には、高い送液圧力（概ね $>200\text{ kPa}$ ）を要する。一方で、一般的なS a m p l e - t o - A n s w e r型の流路チップの場合、流路圧損や流路内バルブの耐圧の観点から、十分な送液圧力を得ることがしばし困難である。公知の技術の組合せによって遠心操作による溶液搬送と同程度の送液圧力を得るためには、チップ耐圧の改善と送液圧力源の高出力化が必須である。このため、チップおよびシステムの高コスト化およびシステムの大型化を免れることができず、簡易な構成で低コストの装置および流路チップによる全自動・高感度遺伝子分析システムを実現することはできない。

[0020] 本開示は、このような状況に鑑み、核酸を含む試料から不純物の除去および核酸の精製回収の処理を、簡易な構成で低コストの装置および流路チップにより、高効率に実施することを可能にする技術を提案する。

課題を解決するための手段

[0021] 本開示は、上記課題を解決するために、基板に流路が形成された流路デバイスであって、核酸を回収可能な精製膜と、基板に形成された空間であって

、流路と接続され、精製膜を格納する、膜格納部と、膜格納部に圧入された円環状の樹脂リングと、を備え、膜格納部は、基板の上面と下面との間に精製膜が設置可能に形成された台座面を有し、台座面を境として円筒状の膜格納部上部と膜格納部下部より小径の膜格納部下部に分かれており、流路は、少なくとも1つのバルブ機構と接続し、基板の上面上に形成され、膜格納部上部の側壁に接続される第一流路と、少なくとも1つのバルブ機構と接続し、基板の下面上に形成され、膜格納部下部に接続される第二流路と、を含み、樹脂リングは、膜格納部上部の内径以上の外径を有し、精製膜は、台座面と樹脂リングとの間に固定され、圧入された樹脂リングの外径は、膜格納部に格納されていない状態の樹脂リングの外径よりも小さく、かつ、膜格納部上部の内径は、樹脂リングが膜格納部に格納されていない状態の膜格納部上部の内径とほぼ同一であり、少なくとも膜格納部上部の側壁と圧入された樹脂リングが最も接近する位置において、膜格納部上部の内径と圧入された樹脂リングの外径が同一である、流路デバイスについて提案する。

[0022] 本開示に関連する更なる特徴は、本明細書の記述、添付図面から明らかになるものである。また、本開示の態様は、要素及び多様な要素の組み合わせ及び以降の詳細な記述と添付される請求の範囲の様態により達成され実現される。

本明細書の記述は典型的な例示に過ぎず、本開示の請求の範囲又は適用例を如何なる意味においても限定するものではない。

発明の効果

[0023] 本開示の技術によれば、核酸を含む試料から不純物の除去および核酸の精製回収の処理を、簡易な構成で低コストの装置および流路チップにより、高効率に実施することができるようになる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]標準的なB o o m法による核酸精製法の処理工程を示す図である。

[図2A]図1に示す処理工程および当該考察で使用したサンプル溶液の組成を示す図である。

[図2B]図1に示す精製の処理工程で使用した試薬および溶液搬送方法を示す図である。

[図3A]流路デバイスで図1の処理工程を実施する試料前処理システム301の構成例を示す概念図である。

[図3B]流路デバイスを設置した状態の図3A中のA-A断面の構成を示す図である。

[図4A]公知の膜設置法を応用した流路デバイス(例1)101の上面図である。

[図4B]図4AにおけるA-A断面構成を示す図である。

[図5A]公知の膜設置法を応用した流路デバイス(例2)101の上面図である。

[図5B]図5AにおけるA-A断面構成を示す図である。

[図6A]公知の膜設置法を応用した流路デバイス(例3)101の上面図である。

[図6B]図6AにおけるA-A断面構成を示す図である。

[図7A]スピнкаラムおよび、公知の構成の流路デバイスを用いた場合の、核酸精製効率と回収液量の定量評価結果を示す図である。

[図7B]リアルタイムPCRにより図7Aで回収した溶出液に含まれるDNA量を定量し、算出した精製効率(DNA回収効率:各方式の濃色(左側)の棒グラフ)と、精製膜を通過したサンプル溶液(以降、廃液と呼ぶ)に含まれるDNA量を定量し、算出したDNA漏出率(各方式の淡色(右側)の棒グラフ)と、を示す図である。

[図8]溶出液回収後のOリングによる膜固定構造を備えた流路デバイス101(一例)において、切欠部付近に溶出液403の液だまりができる(切欠上に液が捕捉されているとみられる)現象を示す図(写真)である。

[図9A]本実施形態による流路デバイス101の上面図である。

[図9B]図9AのA-Aの断面構成例を示す図である。

[図10A]膜格納部上部110から台座面109の上に精製膜201を設置する

様子を示す図である。

[図10B]膜格納部上部 1 1 0 に樹脂リング 2 0 4 を圧入する様子を示す図である。

[図10C]台座面 1 0 9 と樹脂リングとの間に固定された精製膜 2 0 1 を示す図である。

[図11A]図 3 A に示す試料前処理システムおよび図 9 の流路デバイス 1 0 1 を用いて核酸精製実験を実施し、回収溶出液量を定量評価した結果を示す図である。

[図11B]図 3 A に示す試料前処理システムおよび図 9 の流路デバイス 1 0 1 を用いて核酸精製実験を実施し、DNA 精製効率を定量評価した結果を示す図である。

[図12A]スピнкаラム構成を適用した流路デバイス 1 0 1 の上面構成を示す図である。

[図12B]図 1 2 A における A - A 断面構成を示す図である。

[図13A]圧入固定に失敗し、膜格納部 1 0 4 上で変形した樹脂リング 2 0 4 の例を示す図（拡大写真）である。

[図13B]圧入固定に失敗し、膜格納部 1 0 4 上で変形した樹脂リング 2 0 4 の例を示す図（写真）である。

[図13C]樹脂リング 2 0 4 の外径寸法と圧入固定の成否の実例をまとめた表である。

[図14A]送液機構 3 0 2 の内部構成例を示す図である。

[図14B]送液機構 3 0 2 において大気開放可能な多方バルブ機構（V 0）を備える内部構成例を示す図である。

[図15]開閉バルブ機構 3 0 0 5 を複数個組み合わせて多方バルブ機構 3 0 0 6 と同等機能を達成するための構成例を示す図である。

[図16]試薬保持部 3 0 3 の内部構成例を示す図である。

[図17]図 1 6 に示す核酸精製システムにおける核酸精製処理を説明するためのフローチャートである。

[図18]核酸精製システムにおける試薬保持部303の別の内部構成例（変形例）を示す図である。

[図19]図18に示す核酸精製システムにおける核酸精製処理を説明するためのフローチャートである。

[図20]試薬タンク一体型の流路デバイス（核酸精製デバイス）101を設置した試料前処理システム301のシステム構成例を示す図である。

[図21A]試薬タンク3105周辺の上面構成例を示す図である。

[図21B]図21AのA-Aにおける断面構成例を示す図である。

[図22]図20に示す核酸精製システムによって実行される核酸精製処理を説明するためのフローチャート（例）である。

[図23]生体試料から核酸抽出、核酸精製、核酸増幅・検出を自動で実施可能な流路デバイス101および試料前処理システム301で構成されるSample-to-Answer型DNA分析システムの全体構成例を示す図である。

[図24]Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸抽出部1201の構成例を示す図である。

[図25]Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸抽出処理を説明するためのフローチャートである。

[図26]Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸精製部1101周辺の構成例を示す図である。

[図27A]核酸増幅部1301周辺の構成例を示す図である。

[図27B]図27AのA-Aの断面構成例を示す図である。

[図28]Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸増幅処理を説明するためのフローチャートである。

[図29A]各変形例における膜格納部104の周辺を上から見た構成例を示す図である。

[図29B]変形例1における、図29AのA-Aの断面構成例を示す図である。

[図29C]変形例2における、図29AのA-Aの断面構成例を示す図である。

[図29D]変形例3における、図29AのA-Aの断面構成例を示す図である。

[図29E]変形例4における、図29AのA-Aの断面構成例を示す図である。

[図30A]連続搬送法においてサンプル溶液401を搬送する様子を示す図である。

[図30B]連続搬送法において洗浄液402を搬送する様子を示す図である。

発明を実施するための形態

[0025] 本開示の実施形態は、流路デバイス（流路チップ）において微量の反応溶液を漏れなく精製膜を通過させて高効率で回収可能とすることにより、高効率な核酸精製を実施可能とする技術を提案する。本明細書では、まず、本開示に係る検討で初めて明らかとなった課題について説明した後、実施形態による試料前処理システム（試料前処理装置）の特徴について説明する。続いて、本実施形態の変形例の説明に移行する。本明細書の図面においては、機能的に同じ要素は同じ番号で表示される場合がある。なお、添付図面は本開示の原理に則った具体的な実施形態と実装例を示しているが、これは本開示の理解のためのものであり、本開示を限定的に解釈するために用いられるものではない。また、本実施形態では、当業者が本開示を実施するのに十分詳細にその説明がなされているが、他の実装・形態も可能で、本開示の技術的思想の範囲と精神を逸脱することなく構成・構造の変更や多様な要素の置き換えが可能であることを理解する必要がある。従って、以降の記述をこれに限定して解釈してはならない。

[0026] （１）核酸精製における課題の更なる考察（詳細検討）

＜核酸精製の処理工程＞

図1は、標準的な核酸精製法の処理工程を示す図である。まず、精製膜に試料DNAを含むサンプル溶液を通過させ、精製膜にDNAを結合させる（工程I）。Boom法による核酸精製法を採用する場合には、生体試料を細胞溶解処理したサンプル溶液にグアジウム塩などカオトロピック剤が添加される。次に、精製膜に洗浄液を通過させ、精製膜に付着した不純物を洗い流す（工程II）。一般に、洗浄液にはエタノールを含む溶液が用いられ、洗

浄は複数回実施されることもある。さらに、精製膜を乾燥させ、洗浄液成分を除去する（工程ⅠⅠⅠ）。最後に、以上のフローによりDNAが結合し、かつ不純物および洗浄液成分が除去された精製膜に、DNA溶出液を通過させて回収することで、標的DNAを回収する（工程ⅠⅤ）。

[0027] 図2Aは、図1に示す処理工程および当該考察で使用したサンプル溶液の組成を示す図である。また、図2Bは、図1に示す精製の処理工程で使用した試薬および溶液搬送方法を示す図である。ここでは、サンプルをヒトゲノム試料（2800M）とし、溶解精製試薬にはラボ方式として標準的なキットであるQIAamp DNA Investigator Kit（Qiagen）を用いた。ラボで実施されるスピンカラム法の場合は、各溶液の搬送は遠心操作により達成する。

[0028] <核酸精製のための試料前処理システム>

図3Aは、流路デバイスで図1の処理工程を実施する試料前処理システム301の構成例を示す概念図である。試料前処理システム301は、送液機構302と、試薬保持部303と、PEEK（ポリエーテルエーテルケトン）製のチップ保持部304と、フィッティング306を有するPEEK製のカバー305と、配管チューブ307と、を備える。送液機構302は、溶液搬送圧力を任意のタイミングで印加可能な送液動力源と圧力制御機構から構成され、配管チューブ307を介して試薬保持部303と接続する。試薬保持部303は、内部に溶液保持する領域と、搬送後の溶液を回収する領域を備え、それぞれ配管チューブ307を介して、流路デバイス101と接続し、送液機構302により制御された加圧または減圧動作に応じて任意の溶液を搬送し、回収することができる。送液機構302および試薬保持部303の具体的な内部システム構成例については後述する。

[0029] 図3Bは、流路デバイスを設置した状態の図3A中のA-A断面の構成を示す図である。流路デバイス101は、チップ保持部304とカバー305との間の所定位置に保持可能なように設置される。流路デバイス101設置の際、流路デバイス101に設けられた第一通気口107および第二通気口

108は、カバー305に設けられたフィッティング306と接続する。

[0030] 送液機構302の送液動力源は、溶液搬送に十分な圧力を印加可能で、かつチップ耐圧を超えないものとすることができる。例えば、0.1kPa～250kPaの範囲で印加圧力を制御可能なダイヤフラムポンプやシリンジポンプを用いることができる。また、ここでは、送液圧力源には空気圧を用いた例が示されるが、機械的な圧縮、遠心力などを用いてもよい。

[0031] チップ保持部304およびカバー305の材質は、PEEK製でなくともよく、流路デバイス101の保持に十分な剛性を備える材料であれば、特に限定されるものではない。当該材質として、PEEKの他、ポリカーボネート（PC）、アクリル（PMMA）といった樹脂材料、アルミニウム、ステンレスといった金属材料、などが選択可能である。サンプル溶液に含まれる界面活性剤や塩、洗浄液に含まれるエタノールといった溶液が漏出した場合を考慮し、これらの溶液に対する耐薬品性を有することが好ましい。

＜核酸精製のための流路デバイス＞

[0032] 次に、ここで（本考察の際に）用いた流路デバイス101について説明する。図4A、図5A、および図6Aは、公知の膜設置法を応用した流路デバイス（例1から例3）101の上面図である。また、図4B、図5B、および図6Bは、図4A、図5A、および図6AのそれぞれにおけるA-A断面構成を示す図である。

[0033] いずれの流路デバイス101も、流路構造を形成した基板102、基板102の上下面に貼付したポリオレフィン（PO）製のシーリングテープ103、膜格納部104に設置された精製膜201を共通して備える。まず、縦20×横50×厚さ4mmのPC製の基板102に、上部が直径6×深さ1mm、下部が直径4×深さ2mmの同軸異径円筒状の膜格納部104、幅1×深さ1mmの第一流路105および第二流路106、直径1mmの第一通気口107および第二通気口108を切削加工にて形成した。第一通気口107は第一流路105の端点、第二通気口108は第二流路106の端点に位置し、基板102上では貫通孔として加工され、上面は開口している。第一

流路１０５は、基板１０２の上面に形成され、膜格納部上部１１０の側壁と接続する。第二流路１０６は、基板１０２の下面に形成され、膜格納部下部１１１の側壁と接続する。

[0034] 図４ＡおよびＢは、膜固定構造がない流路デバイス１０１の構成、すなわち、台座面１０９に精製膜２０１を静置する構成を示す。基板１０２上面にシーリングテープ１０３を貼付する前に、膜格納部上部１１０側から台座面１０９方向に、直径６ｍｍの精製膜２０１（シリカメンブレンフィルター、ＧＦ／Ｆ、Whatman）を押し付けるように設置した。精製膜２０１の外周部が浮き上がりず設置できたことを確認後、基板１０２上面にシーリングテープ１０３を貼付して、膜固定構造がない流路デバイス１０１を形成した。

[0035] 図５ＡおよびＢは、切欠を設けたＯリングによる膜固定構造を備えた流路デバイス１０１の構成を示す。基板１０２上面にシーリングテープ１０３を貼付する前に、膜格納部上部１１０側から台座面１０９方向に、直径６ｍｍの精製膜２０１（シリカメンブレンフィルター、ＧＦ／Ｆ、Whatman）を押し付けるように設置した。さらに、切欠を設けたゴム製のＯリング２０２（外径６×内径４ｍｍ）を、第一流路１０５を塞がないように切欠部分が第一流路１０５と一致するように挿入した。精製膜２０１およびＯリング２０２が浮き上がりず設置できたことを確認後、基板１０２上面にシーリングテープ１０３を貼付し、膜格納部１０４上部のシーリングテープ１０３の上に１０ｍｍ角のＰＭＭＡブロックを貼り付けることで、Ｏリングを押し潰した。以上により、Ｏリングによる膜固定構造を備えた流路デバイス１０１を形成した。

[0036] 図６ＡおよびＢは、接着剤による膜固定構造を備えた流路デバイス１０１の構成を示す。基板１０２上面にシーリングテープ１０３を貼付する前に、台座面１０９に両面テープ（＃９９６９、３Ｍ）を貼付した。さらに、膜格納部上部１１０側から台座面１０９方向に、直径６ｍｍの精製膜２０１（シリカメンブレンフィルター、ＧＦ／Ｆ、Whatman）を押し付けるよう

に設置し、台座面 109 と接着した。精製膜 201 の外周部が浮き上がらず設置できたことを確認後、基板 102 上面にシーリングテープ 103 を貼付して、接着剤による膜固定構造を備えた流路デバイス 101 を形成した。

[0037] <実験結果>

図 3 A および B に示す試料前処理システム、および図 3 A および B から図 5 A および B の流路デバイス 101 を用いて核酸精製実験を実施した。図 7 A および B は、核酸精製実験による、回収溶出液量と DNA 精製効率を定量評価した結果を示す図である。図 7 A に示す通り、スピнкаラム法で最終的に回収された溶出液量が平均 17 μ L だったのに対し、チップデバイスの回収溶出液量はいずれも平均 10 μ L 以下であった。特に、切欠を設けたリングによる膜固定構造を備えた流路デバイス 101 の場合、回収液量は投入液量の 1/10 以下まで減少した。また、図 8 は、溶出液回収後のリングによる膜固定構造を備えた流路デバイス 101（一例）において、切欠部付近に溶出液 403 の液だまりができる（切欠上に液が捕捉されているとみられる）現象を示す図（写真）である。

[0038] 図 7 B は、各方式の濃色（左側）の棒グラフによって、リアルタイム PCR により図 7 A で回収した溶出液に含まれる DNA 量を定量し、算出した精製効率（DNA 回収効率）を表している。また、図 7 B は、各方式の淡色（右側）の棒グラフによって、精製膜を通過したサンプル溶液（以降、廃液と呼ぶ）に含まれる DNA 量を定量し、算出した DNA 漏出率を表している。DNA 漏出率の評価は、廃液を新しいスピнкаラムに投入し、本実施形態の精製処理を実施し、リアルタイム PCR により DNA 含有量を定量することにより実施した。図 7 B に示される通り、スピнкаラム法の精製効率は平均 50 % 程度、DNA 漏出は試行した全 6 例全てで 0 % であったのに対し、チップデバイスの精製効率はいずれもスピнкаラム法の半分以下であり、DNA 漏出率が大きいことが判った。また、接着剤による膜固定構造を備えた流路デバイス 101 では、回収された溶出液に PCR 阻害剤の混入が疑われる例がみられた。

[0039] スピнкаラム法よりチップデバイスで回収液量が少なくなった理由は、Ｏリングによる膜固定構造（後述の本開示の技術による圧入とは異なり、単に弾性体の挿入に過ぎない）を備えた流路デバイス１０１で観察されたリング上の液残りの他に、送液方式の違いによる影響が考えられる。精製膜は多孔質材であり一定の保水力を有するため、膜内に残留する溶出液量は、膜の材質や密度、送液圧力に依存する。本検討で用いた精製膜２０１は、スピнкаラム法、チップデバイスいずれも同程度の密度を有するシリカ膜である。このため、本検討でみられた回収液量の違いには寄与していないと考えられる。一方、送液圧力に関しては、溶液搬送方法が異なるため、スピнкаラム法とチップデバイスで異なる。スピнкаラム法では、カラムに投入した溶液を遠心力により精製膜を通過させ、コレクションチューブへ搬送した。このとき、溶液には常に２００００ｇ（本検討の条件では最大約１００～１５０ｋＰａの搬送圧力に相当）がかかる。一方、本検討のチップデバイスでは空気圧送液を採用しており、溶出液の送液圧力は最大５０ｋＰａ程度と低い。そのため、流路デバイス方式では膜内に保水されたサンプル溶液が流路に排出されにくくなり、回収液量が減少したと考えられる。

[0040] 精製効率については、スピнкаラム法の場合、廃液にはＤＮＡがほとんど含まれない。このことは、サンプル溶液は漏れなく精製膜を通過していること、また、精製膜とＤＮＡの結合効率は極めて高いことを示唆している。一方、膜固定構造がない流路デバイス１０１の場合、精製膜を固定する機構がない。このため、膜の浮き上がりや周縁部からの染み出しが生じていたと考えられる。Ｏリングによる膜固定構造を備えた流路デバイス１０１では、膜固定構造がない流路デバイス１０１と比較して膜の浮き上がりを抑えられたため、ＤＮＡ漏出率が小さくなり、精製効率に改善傾向がみられたと考えられる。しかし、スピнкаラム法と比較すると精製効率は低く、ＤＮＡ漏出抑制力、すなわち、膜固定力が不十分であることが示唆された。

[0041] 接着剤による膜固定構造を備えた流路デバイス１０１でも、高いＤＮＡ漏出率と、顕著に低い精製効率が観測された。これは、接着が不十分で意図せ

ぬ間隙が生じたり、接着剤により精製膜に目詰まりが生じたりしたためと考えられる。PCR阻害は接着剤203を用いた流路デバイス以外で発生しなかった。このことから、PCR阻害が生じた原因は接着剤203による汚染が疑われる。本検討で使用した接着剤203は、精製試薬に対する耐薬品性を有していることが確認されている。しかし、当該接着剤203は生体適合性が保証された製品ではない。このため、他用途では問題視されないわずかな成分溶出が、PCR分析の阻害因子となった可能性がある。また、本検討の流路デバイス101の組立は手作業で実施したため、再現性よく接着状態を制御することができず、接着成分が台座からはみ出したり、不均一に貼り付けられていたりした可能性が高く、溶液と接触することでPCR阻害物質が溶液に混入しやすかったものとも考えられる。これを解決するには、より精密にデバイス製造工程を管理すること、かつPCR阻害物質を含まない接着成分を用いる必要がある。しかし、本検討に係る流路デバイス101の膜格納部104や台座面109(貼りしろとなる部分)の大きさを考慮すると、実験室での安定試作は困難であることが予想される。同時に、本研究の精製試薬には有機溶剤であるエタノールの高濃度溶液が含まれるため、選択できる接着剤および両面テープの種類が大きく制限されることも、重大な懸念事項である。

[0042] (2) 本開示の実施形態

上記考察(検討)で発見した課題の解決策となる、本実施形態による試料前処理システム301および流路デバイス101について説明する。

[0043] <システムおよび流路デバイス>

試料前処理システム301は、図3Aに示すシステムと同一である。図9Aは、本実施形態による流路デバイス101の上面図である。また、図9Bは、図9AのA-Aの断面構成を示す図である。流路デバイス101は、基板102に形成された膜格納部104と、第一流路105と、第二流路106と、第一通気口107と、第二通気口108と、基板102の上下面に貼付したシーリングテープ(フィルムシート)103と、膜格納部104に設

置された精製膜 201 と、を備える。膜格納部 104 は、基板 102 の上面と下面の中間に精製膜 201 を設置可能な台座面 109 が形成されるように、台座面 109 を境として内径が異なる膜格納部上部 110 と膜格納部下部 111 から構成される。膜格納部上部 110 の内径は精製膜 201 と略同径、膜格納部下部 111 の内径は精製膜 201 および膜格納部上部 110 よりも小さくなるように形成される。第一通気口 107 は、第一流路 105 の端点に位置する。第二通気口 108 は、第二流路 106 の端点に位置する。第一通気口 107 および第二通気口 108 は共に、例えば、基板 102 上では貫通孔として加工され、上面は開口している。第一流路 105 は、基板 102 の上面に形成され、膜格納部上部 110 の側壁と接続する。第二流路 106 は、基板 102 の下面に形成され、膜格納部下部 111 の側壁と接続する。

[0044] 本実施形態による流路デバイス 101 は、具体的には縦 20×横 50×厚さ 4 mm の PC 製の基板 102 に、上部が直径 6×深さ 1 mm、下部が直径 4×深さ 2 mm の同軸異径円筒状の膜格納部 104、幅 1×深さ 1 mm の第一流路 105 および第二流路 106、直径 1 mm の第一通気口 107 および第二通気口 108 を切削加工することにより、形成される。

[0045] 基板 102 およびシーリングテープ 103 の材質は、当該技術分野で一般的に用いられている材料であれば特に限定されるものではない。例えば、DNA の吸着量が少ない材料として、PC、ポリプロピレン (PP)、環状オレフィンポリマー (COP)、環状オレフィンコポリマー (COC)、ポリエチレンテレフタレート、ポリウレタン、を用いることができる。また、表面に負に帯電するような修飾を施すことで、吸着量を抑えることもできる。そのほかの材料としては、例えば、ガラス、石英ガラス、熔融石英、合成石英、アルミナ、サファイア、セラミクス、フォスファイト及び感光性ガラス等のガラス材料や、ポリエステル樹脂、ポリスチレン、ポリエチレン樹脂、ジメチルポリシロキサン (PDMS)、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フ

エノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂及び塩化ビニル樹脂等のプラスチック、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。以上述べたような材料で構成されたシーリングテープ（フィルムシート）103を、第一流路105、第二流路106、および膜格納部104が形成された基板102の上下に貼付（PCR阻害しない接着剤によって接着する）し、流路等による開口の少なくとも一部をシールする（少なくとも第一通気口107および第二通気口108の部分を除いてシールすることになる）により、流路デバイス101を構成することができる。

[0046] <精製膜の固定方法>

図10AからCは、精製膜201の設置方法を説明するための図である。基板102上面にシーリングテープ103を貼付する前に、直径R、深さDの膜格納部上部110から台座面109の上に、直径P、厚さQの精製膜201を設置した（図10A）。さらに、外径a、内径b、高さc（ただし、 $a > R$ ）の樹脂リング204を圧入し、台座面109との間に精製膜201を固定した（図10Bおよび図10C）。膜格納部上部110の内径と樹脂リング204の外径が同一となっていること（ $R' = a'$ ：R'は樹脂リング204圧入後の膜格納部上部110の直径を示す；a'は膜格納部上部110に圧入後の樹脂リング204の外径を示す）、および精製膜201および樹脂リング204が浮き上がらず設置できたことを確認後、基板102上面にシーリングテープ103を貼付し、流路デバイス101を形成した。なお、樹脂リング204の高さは組立状態（図10C）のとき第一流路105を塞がない高さであることが好ましい。さらに好ましくは、樹脂リング204の上面（精製膜201と接していない側の端面）が、少なくとも膜格納部上部110と第一流路105の接続部の周辺では、第一流路105の底面よりも下部に位置することが望ましい（チップの厚みT－（第一流路105の深さ） $\geq Q + c$ ）。つまり、第一流路105の底面部よりも樹脂リング204の上面が下にあることが望ましい。ただし、樹脂リング204の側面はできるだけ大きな面積で膜格納部104の側面に接していることが望ましい。

このため、樹脂リング204の上面は第一流路105の底面の高さになるように樹脂リング204の高さを決めるとよい。これにより、搬送される溶液が樹脂リング204や膜格納部104との間隙に液残りしてしまうことを防ぐことができることに加え、流路抵抗を小さくすることができ、微量の溶液をロスなく回収することができる。

[0047] 本開示の技術において「圧入」とは、機械的な嵌め合い精度の基準において、押込から圧入に相当する嵌め合い状態を意味する。すなわち、圧入完了後には膜格納部104と樹脂リング204は相互に動かすことができず、強い力を加えたと取り外すことができるか、部品を破壊しないと分解できない状態となっている。特許文献10、あるいは上記検討（課題の考察）に示したリングによる膜固定構造の場合には、リング202が弾性変形（外力を取り除くと形状が元に戻る）する。このため、膜格納部上部110に装着した後、リングは装着した外力に反発するように膜から離れる方向に戻る。同時に、リング202の外周と膜格納部上部110の側壁との間に摩擦力が働く。従って、一度格納したリング202が飛び出すことはないが、精製膜を押し下げる力は弱い。従って、これは、本開示の技術における「圧入」状態には該当しない。

[0048] 一方、樹脂リング204を膜格納部上部110に挿入（圧入）する場合、樹脂リング204は塑性変形（外力を取り除いても変形が残り、形状が元に戻らない）して膜格納部上部110の側壁との間の摩擦力によってその場に保持される。このため、膜格納部104において、精製膜201を押し下げる方向の力が維持される。このとき、膜格納部上部110との寸法範囲を適切に設定することで、樹脂リング204を押込から圧入状態の嵌め合い状態で保持できる。これにより、高い膜固定力を実現できる。流路デバイス101において、樹脂リング204の圧入による膜固定構造が実現しているかは、組立状態で少なくとも膜格納部上部110の側壁と樹脂リング204が最も接近する位置において $R' = a'$ であること、より厳密には組立状態の流路デバイス101を精密に観察し、少なくとも膜格納部上部110の側壁と

樹脂リング204が最も接近する位置において $|R' - a'| < 1 \mu m$ （光学顕微鏡の分解能以下）であることにより確認できる。非組立状態（図10B）と組立状態（図10C）における膜格納部上部110の内径および樹脂リング204の外径を計測し、 $R/R' (\cong 1) > a'/a$ が成立することを確認することによっても、本開示の技術の実施を確認できる。すなわち、非組立状態と組立状態において、膜格納部上部110は剛性が大きいためほとんど変形せず、膜格納部上部110の内径Rより大きい外径aを有する樹脂リング204が収縮するように設置されることが、本開示の技術の重要な特徴である。なお、樹脂製のリングを用いた圧入による膜固定法の公知例は、特許文献2にも例示されるスピнкаラムの構成があるが、非組立状態および組立状態のスピнкаラムの内径をそれぞれS、S'、リング外径をそれぞれA、A' とすると、 $S/S' < A'/A (\cong 1)$ が成立し、本開示の技術の場合とは逆の関係にある。これは、スピнкаラムの構成の場合、スピнкаラムが剛性の小さい肉薄の容器であり、リング圧入により変形可能であることに由来する。例えば、QIAamp DNA Investigator Kit（Qiagen）に含まれるスピнкаラムの場合、 $P = 7 mm$ 、 $S = 6.4 \sim 6.7 mm$ 程度、 $A = 7 \sim 7.2 mm$ 程度であり、 $S' = A' \cong A$ が成立する。

[0049] 本実施形態では、具体的には、流路デバイス101において、直径6×厚さ0.4mmの精製膜201（シリカメンブレンフィルター、GF/F、Whatman）、および外径6.2×内径4×高さ0.5mmのPE製の樹脂リング204を、膜格納部104に設置した。

[0050] 精製膜201は、100 μm 以上の粒子を保持できる膜であればよい。また、膜厚は1 μm 以上であることが好ましい。さらに、目が細かいほどよりDNAを高効率に回収することができるため、精製膜201は、10 μm 以上、より好ましくは1 μm 以上、さらに好ましくは0.1 μm 以上の粒子を保持できることが望ましい。膜の種類としては、シリカ膜でなくてもよく、DNAを吸着できるセルロースを主成分とする固体基材、カルボキシル化粒

子、イオン交換樹脂製の精製膜を用いてもよい。精製膜の体積は、小さすぎると吸着できる生体分子の量が少なくなる。一方、体積が大きすぎると、精製またはその後のステップで意図しない分子吸着が起きる確率や、溶液の搬送効率が悪くなることが懸念されるため、適切に設定する必要があるが、大きさについては限定されない。

[0051] 樹脂リング204の材質はPEでなくてもよく、ポリエステル樹脂、ポリスチレン、ポリエチレン樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂及び塩化ビニル樹脂などの、弾性変形しない材料であることが望ましく、樹脂製でなくてもよい。具体的な物性としては、材料のヤング率が5MPa以上1GPa以下であること、弾性率が100kPa以上であること、または弾性ひずみ限界値が100%未満であることなどが挙げられる。

[0052] 樹脂リング204の外径aは、膜格納部上部110にはめ込むことができ、圧入固定可能な寸法であればよい。具体的には、樹脂リング204の外径aは膜格納部上部110の内径Rより大きく、 $0 \leq a - R < 400 \mu\text{m}$ 、または $(a - R) / R \leq 0.2$ を満たす範囲で設計することが好ましいことが、本発明者等の検討により明らかとなっている。樹脂リング204の外径aの詳細については後述する。

[0053] 樹脂リング204の内径bは、溶液が通過できる径であればよいが、膜格納部下部の内径rと略同一であることが望ましい。これにより、精製膜201に接液した溶液が効率よく膜格納部下部111に通過することができ、回収できる溶液を最大にすることができる。また、樹脂リング204の外径aと内径bの差はできるだけ小さいことが望ましい。具体的には、概ね2.5mm以下であることが望ましい。これにより、樹脂リング204の上面に溶液が捕捉されて残留することを防ぎ、より効率よく溶液を回収することができる。

[0054] <実験結果>

図 1 1 A および B は、図 3 A に示す試料前処理システムおよび図 9 の流路デバイス 1 0 1 を用いて核酸精製実験を実施し、回収溶出液量と DNA 精製効率を定量評価した結果を示す図である。なお、本実施形態においても、上記「核酸精製における課題の更なる考察」と同様、図 1 に示すサンプル溶液および処理工程により、操作を実施した。

[0055] 図 1 1 A に示す通り、本開示の技術のチップデバイスの回収溶出液量は平均 $13\ \mu\text{L}$ である。この回収溶出液量はスピncラム法と比較するとやや少ないものの、従来のチップデバイスと比較すると良好な回収効率（50%以上）が得られた。図 1 1 B は、各方式の濃色（左側）の棒グラフは、リアルタイム PCR により図 1 1 A で回収した溶出液に含まれる DNA 量を定量し、算出した精製効率（DNA 回収効率）を表す図である。図 1 1 B の各方式の淡色（右側）の棒グラフは、精製膜を通過したサンプル溶液（以降、廃液と呼ぶ）に含まれる DNA 量を定量し、算出した DNA 漏出率を表す。図 1 1 B に示す通り、本実施形態によるチップデバイスを用いた場合、従来のチップデバイスの課題であった DNA 漏出率の高さを解決し、スピncラム法同等水準の精製効率を得られた。なお、本実施形態による精製処理工程において、必要な溶液搬送圧力は最大でも $65\ \text{kPa}$ であり、これは従来のチップデバイスの場合と同水準である。以上のように、本実施形態によれば、簡易な構成のチップデバイスと小型の装置を用いて、サンプル漏れのない強固な膜固定および微量溶液の安定送液を達成し、スピncラム法と同等性能の高効率精製を実現できる。以上の技術的効果は、後述の実施形態およびその派生形においても同様である。

[0056] （3）スピncラム構成を適用した流路デバイスの課題についての考察

図 1 1 B で示した通り、スピncラム構成を用いた場合でも高効率精製が実現できる。そこで、ここでは、樹脂リングの圧入による膜固定を達成する唯一の公知例であるスピncラムの構成を適用した流路デバイス 1 0 1 の課題について検討・考察し、図 9 に示す本開示による流路デバイス 1 0 1（多孔質保持部材 2 0 5 を用いない構成）の利点をさらに明らかにする。

[0057] 図12Aは、スピncラム構成を適用した流路デバイス101の上面構成を示す図である。図12Bは、図12AにおけるA-A断面構成を示す図である。当該考察のために用いた流路デバイス101は、膜格納部104に、直径6.7×厚さ2mmの多孔質保持部材205、直径7.0×厚さ0.4mmの精製膜201、外径a（a=6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1の7種）×内径5×高さ0.5mmのPE製の樹脂リング204を備える。スピncラム構成を適用した流路デバイス101は、縦20×横50×厚さ5mmのPC製の基板102に、上部が直径7.1mm、下部が直径5mmと連続的に変化するテーパ形状の膜格納部104、幅1×深さ1mmの第一流路105および第二流路106、直径1mmの第一通気口107および第二通気口108を切削加工することにより、形成される。第一通気口107は、第一流路105の端点に位置する。第二通気口108は、第二流路106の端点に位置する。第一通気口107および第二通気口108はともに、基板102上では貫通孔として加工され、上面は開口している。第一流路105は、基板102の上面に形成され、膜格納部104の側壁と接続する。また、第二流路106は、基板102の下面に形成され、膜格納部104の側壁と接続する。

[0058] 多孔質保持部材205は、膜格納部104の一定位置に精製膜201を保持する機能を持ち、スピncラムおよび流路デバイス101に圧入すると円心方向に潰れるように変形する。まず、多孔質保持部材205を面方向に水平となるように膜格納部104に圧入固定した（手順1）。固定された多孔質保持部材205の上に精製膜201を載せ（手順2）、面方向に水平となるように樹脂リング204を圧入固定した（手順3）。当該精製膜固定手順1～3の工程において、実際には以下の複数の課題があることが判った。

[0059] (i) 多孔質保持部材205を有するスピncラム構成による流路デバイス101を用いた場合の精製膜固定手順における第一の課題は、手順1において、多孔質保持部材205の固定位置の制御が困難であることである。多孔質保持部材205は、圧入により膜格納部104の側壁からの応力を受けて容

易に変形する。このため、所定の固定位置に到達した後も上部からの加圧を続けると、多孔質保持部材 205 が膜格納部 104 と第二流路 106 との接続部にかかることで流路抵抗が大きくなる。そして、最終的には、多孔質保持部材 205 は、膜格納部 104 の底部に到達して完全に第二流路 106 を塞いでしまう。この状態でサンプル溶液 401 を第一流路 105 から導入すると、流路抵抗によりサンプル溶液 401 を効率よく回収できなくなってしまう。逆に、所定の固定位置に到達する前に上部からの加圧を停止すると、精製膜 201 および樹脂リング 204 を固定したときに、樹脂リング 204 が膜格納部 104 と第一流路 105 との接続部にかかることで流路抵抗が大きくなってしまう。この状態でサンプル溶液 401 を第一流路 105 から導入すると、サンプル溶液 401 が精製膜 201 に効率よく接触しなかったり、意図せぬ間隙へのサンプル溶液 401 の回り込みが発生したりしてしまう。

[0060] 本開示による流路デバイス 101（図 9 参照）のように、基板 102 上に流路を設けて精製膜 201 を設置する場合、一般に基板 102 の厚さを薄くするほど流路デバイスの簡易・小型・低コスト化が望めるため、精製膜 201 の面方向に流路を設けることが好ましい。一方、スピнкаラム法の場合、精製膜の面方向に流路を設ける動機がないため、当該第一の課題に示す不都合は発生しない。つまり、スピнкаラム法の場合、多孔質保持部材 205 を用いた場合の不都合は存在しない。

[0061] (ii) 多孔質保持部材 205 を有するスピнкаラム構成による流路デバイス 101 を用いた場合の精製膜固定手順における第二の課題は、上記手順 3 において、スピнкаラム法と同等の寸法制御によっては膜格納部 104 に樹脂リング 204 が圧入固定できないことである。本実施形態の流路デバイス 101 の構成（図 9）で述べたように、樹脂リング 204 は、膜格納部 104 に圧入する際に膜格納部 104 の側壁からの応力を受けて変形する。このとき、樹脂リング 204 はゴムのような弾性素材ではないため、膜格納部 104 に対して樹脂リング 204 が大きすぎると、樹脂リング 204 は、膜格納

部104に入らずに潰れるか、膜格納部104周辺の基板102にクラックが入り破損してしまう。

[0062] 図13AおよびBは、圧入固定に失敗し、膜格納部104上で変形した樹脂リング204の例を示す図(写真)である。図13Cは、樹脂リング204の外径寸法と圧入固定の成否の実例をまとめた表である。精製膜201の固定位置での膜固定部104の内径Rは約6.5mmであったのに対し、樹脂リング204の外径aが6.9mm以上のとき、すなわち $(a - R)$ が少なくとも $400\mu\text{m}$ 以上のとき、図13Aのような圧入不良が確認された。この関係は、樹脂リング204の内径bや厚さ(高さ)cを変えた場合、また、多孔質保持部材205の代わりに台座部を備えた膜格納部104(図9)の場合にも、同一の結果が得られた。同時に、 $a - R \geq 400\mu\text{m}$ を満たす範囲で圧入固定が失敗する事象は、少なくとも $1\text{mm} \leq R \leq 7\text{mm}$ の場合で確認された。圧入固定の失敗は、スピнкаラム法と比較して基板102の剛性が大きく、樹脂リング204を圧入したときの歪が樹脂リング204および基板102の双方によって吸収できないことが主因と考えられる。

[0063] スピнкаラム法の場合、精製膜201を格納する容器は肉薄で剛性が小さいため、本開示による流路デバイス101のような寸法範囲を考慮する必要がない。前述の通り、膜格納部104の内径Rと樹脂リング204を例えば $0 \leq a - R < 400\mu\text{m}$ を満たすように設計することで、実用的な水準で安定して本開示の流路デバイス101を製造することができる。この寸法範囲は、基板102および樹脂リング204の材質、剛性、曲げモーメント等の物性により選択可能で、適切に設定することが好ましい。

[0064] (iii) 多孔質保持部材205を有するスピнкаラム構成による流路デバイス101を用いた場合の別の課題は、多孔質保持部材205に溶出液403が捕捉されてしまい、回収液量が少なくなることである。多孔質保持部材205は、膜格納部104の一定位置に精製膜201を保持しつつ、精製膜201を通過したサンプル溶液401を回収可能とするために多孔質性の素材で構成される。当該多孔質保持部材205は、材質、孔径、体積等に応じた保

水力を有する。スピнкаラム法の場合、カラムに投入した溶出液403を遠心力（例えば20000g）で精製膜201を通過させるため、多孔質保持部材205の内部に保水された溶出液403も概ね回収でき、本課題は発生しない。

[0065] 一方、遠心力を使わず、例えば本開示の技術のように、小型の汎用空気圧ポンプで送液する場合には、多孔質保持部材205に捕捉された溶出液403を回収できず、回収液量が大幅に減少してしまう。さらに、図1および図2AおよびBに一例を示したBoom法の精製フローを実施する場合には、サンプル溶液401や洗浄液402が多孔質保持部材205に残留することにより、回収後の溶出液403にこれらの成分が混入してしまい、汚染される可能性がある。この事象は、例えばPTFEのような疎水性の多孔質保持部材205を使用したり、孔径を大きくしたり、多孔質保持部材205を薄くして体積を減らしたりすることで一定の改善はみられた（Boom法の場合）が、本開示による構成の場合、これらの手段によっても十分な改善を得られないことが判った。そのため、本開示による流路デバイス101を実現するに当たっては、多孔質保持部材205を用いない構成とすることが好ましい。

[0066] (iv) 以上のように、流路デバイス101にスピнкаラム構成を適用することは適切ではなく、上述した本実施形態による流路デバイス101のような構成を採用することが好ましいことが分かる。

[0067] (3) 送液機構と試薬保持部の詳細

ここでは、本実施形態の試料前処理システム301における送液機構302および試薬保持部303の詳細な構成について説明する。

[0068] <送液機構302の構成>

図14Aは、送液機構302の内部構成例を示す図である。図14Bは、送液機構302において大気開放可能な多方バルブ機構（V0）を備える内部構成例を示す図である。

[0069] 図14Aによると、送液機構302は、試薬保持部303と接続する第一

接続口３００１および第二接続口３００２と、第一接続口３００１と接続して送液圧力を提供する送液動力源３００３と、送液動力源３００３から提供される送液圧力を調節する圧力制御機構３００４と、を備える。送液動力源３００３と圧力制御機構３００４は、例えば、一定出力（例えば１００ｋＰａ）のダイヤフラムポンプやＤＣファンと真空レギュレータを組み合わせる構成することもできるし、吐出・吸引量を制御可能なシリンジポンプやＤＣファンを用いて一体化させてもよい。

[0070] 図１４Ｂによると、送液機構３０２は、図１４Ａに示す構成に加えて、圧力制御機構３００４と第一接続口３００１の間に、大気開放可能な多方バルブ機構３００６（Ｖ０）を備える。図１４Ｂの構成の場合、送液動作を停止したい瞬間に多方バルブ機構３００６を操作することで、第一接続口３００１と送液動力源３００３の接続を瞬時に断絶できるため、高速な送応答性を得られる。さらには、大気開放状態で送液動力源３００３を自由に作動可能であるため、送液動力源３００３および圧力制御機構３００４の出力が安定してから送液を開始する動作や、送液動力源３００３にシリンジポンプを用いる場合にはシリンジのプランジャを所定の位置に戻す動作を、試薬保持部３０３との間の配管チューブ３０７を接続したまま実施することができる。送液動力源３００３を常時駆動しておき、多方バルブ機構３００６の動作で第一接続口３００１への圧力印加のタイミングを制御する運用も可能である。電流印加直後の消費電力が大きい送液動力源３００３を用いる場合など、送液動力源３００３および圧力制御機構３００４のスイッチング回数を極力減らしたい場合には、図１４Ｂの構成を用いることができる。なお、多方バルブ機構３００６は、図１５に示すように、開閉バルブ機構３００５を複数個組み合わせる構成を達成することもできる。

[0071] 送液動力源３００３、圧力制御機構３００４、および多方バルブ機構３００６は、第二接続口３００２と接続してもよい。この場合、第一接続口３００１に接続した場合と反対の加圧、減圧動作をおこなうことにより、同等の動作を達成できる。また、一対の送液動力源３００３、圧力制御機構３００

4、多方バルブ機構3006を用い、第一接続口3001と第二接続口3002の両方にそれぞれを接続することもできる。これにより、両方の接続口から試薬保持部303を介して流路デバイス101にアクセスすることができ、配管長が長くなることによる送液圧損の影響を最小限に抑える送液ルートを選択可能となる。同様に、1組の送液動力源3003、圧力制御機構3004を、第一接続口3001、第二接続口3002、または大気開放流路3007を切替え可能とする3方弁の機能を備えた多方バルブ機構3006を用いることもできる。これにより、第一接続口3001と第二接続口3002の両方に圧力印加を可能としつつ、装置を小型化することができる。

[0072] <試薬保持部303の構成>

図16は、試薬保持部303の内部構成例を示す図である。試薬保持部303は、例えば、送液機構302の第一接続口3001と接続する第一送液口3101と、第二接続口3002と接続する第二送液口3102と、流路デバイス101の第一通気口107と接続する第一デバイス接続口3103と、第二通気口108と接続する第二デバイス接続口3104と、開閉バルブ機構3005を介して第一送液口3101と第一デバイス接続口3103の間に着脱可能な少なくとも1つ以上の試薬タンク3105(T1)と、第二送液口3102と第二デバイス接続口3104の間に着脱可能な廃液タンク3106/溶液回収タンク3107(T2)を備える。なお、タンクT2は、最初に廃液タンク3106が取り付けられていて、途中で作業をした後に溶液回収タンク3107に付け替えられるため、図16では3106/3107と表記されている。

[0073] 送液機構302と試薬保持部303、および、試薬保持部303と流路デバイス101とは、それぞれ配管チューブ307を介して接続してもよいし、配管継手により直接接続してもよい。第一送液口3101と第二送液口3102は、送液機構302の制御により加圧または減圧され、試薬タンク3105に格納された試薬を、順次流路デバイス101に搬送し、廃液タンク3106または溶液回収タンク3107に回収することができる。

[0074] 図17は、図16に示す核酸精製システムにおける核酸精製処理を説明するためのフローチャートである。まず、図16中T1の位置にサンプル溶液401を含む試薬タンク3105、T2の位置に廃液タンク3106を接続する(S1701)。当該接続はシステム内においてロボット(ロボットアーム)により自動で行ってもよいし、オペレータが行ってもよい。送液機構302は、試薬タンク3105に保持されたサンプル溶液401(Sample)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出されたサンプル溶液401を廃液タンク3106に回収する(S1702)。次に、オペレータあるいはロボットは、図16のT1から空のタンクを取り外し、第1の洗浄液402を含む試薬タンク3105に付け替える(S1703)。送液機構302は、試薬タンク3105に保持された第1の洗浄液402(洗浄液1)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された第1の洗浄液402を廃液タンク3106に回収する(S1704)。オペレータあるいはロボットは、図16中T1から空のタンクを取り外し、第2の洗浄液402を含む試薬タンク3105に付け替える(S1705)。送液機構302は、試薬タンク3105に保持された第2の洗浄液402(洗浄液2)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された第2の洗浄液402を廃液タンク3106に回収する(S1706)。同様に、オペレータあるいはロボットは、図16のT1から空のタンクを取り外し、第3の洗浄液402を含む試薬タンク3105に付け替える(S1707)。送液機構302は、試薬タンク3105に保持された第3の洗浄液402(洗浄液3)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された第3の洗浄液402を廃液タンク3106に回収する(S

1708)。第3の洗浄液402の搬送に引き続いて、送液機構302は、流路デバイス101に乾燥空気を3分間送風する(S1709)。最後に、オペレータあるいはロボットは、図16中T1から空のタンクを取り外し、溶出液403を含む試薬タンク3105に付け替える。同時に、オペレータあるいはロボットは、T2から廃液タンク3106を取り外し、溶液回収タンク3107に付け替える(S1710)。送液機構302は、試薬タンク3105に保持された溶出液403を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された溶出液403を溶液回収タンク3107に回収する(S1711)。

[0075] なお、試薬タンク3105、廃液タンク3106、および溶液回収タンク3107は、当該技術分野で一般的に用いられているものであれば特に限定されるものではない。いずれもマイクロチューブやコニカルチューブ、ブリストパック、あるいはパウチパックなど、使用する試薬への耐薬品性を有し、適当なコネクタにより送液機構302および流路デバイス101と接続できるものであればよい。例えば、Microfluidic Reservoirs (Elveflow社)とマイクロチューブを組み合わせる用いることができる。また、試薬タンク3105は、予め各試薬を格納したタンクを図16のT1の位置に順次付け替えて図17の処理を実施してもよい。また、図17の各工程が終了し、空になった試薬タンク3105に、順次試薬を投入して図17の次の工程に移行してもよい。上述のように、タンクの付け替え、または試薬の投入動作は、手動で実施してもよいし、ロボットアームなどを用いて自動で実施することもできる。

[0076] また、第一送液口3101を第二接続口3002に、第二送液口3102を第一接続口3001に接続してもよい。同様に、第一デバイス接続口3103を第二通気口108に、第二デバイス接続口3104を第一通気口107に接続してもよい。

[0077] <試薬保持部303の変形例>

図18と図19を参照して、より自動化に適した核酸精製システム（試薬保持部303）の構成例について説明する。図18は、核酸精製システムにおける試薬保持部303の別の内部構成例（変形例）を示す図である。図19は、図18に示す核酸精製システムにおける核酸精製処理を説明するためのフローチャートである。

[0078] 図18において、試薬保持部303は、送液機構302の第一接続口3001と接続する第一送液口3101と、第二接続口3002と接続する第二送液口3102と、流路デバイス101の第一通気口107と接続する第一デバイス接続口3103と、第二通気口108と接続する第二デバイス接続口3104と、開閉バルブ機構3005を介して第一送液口3101と第一デバイス接続口3103の間に配置され、内部に試薬を保持する少なくとも1つ以上の試薬タンク3105と、多方バルブ機構3006を介して第二送液口3102と第二デバイス接続口3104の間に配置され、流路デバイスから排出された溶液を回収する少なくとも1つ以上の廃液タンク3106および溶液回収タンク3107と、を備える。送液機構302と試薬保持部303、および、試薬保持部303と流路デバイス101は、それぞれ配管チューブ307を介して接続してもよいし、配管継手により直接接続してもよい。第一送液口3101と第二送液口3102は、送液機構302の制御により加圧または減圧され、開閉バルブ機構3005および多方バルブ機構3006による流路切り替えにより、試薬を順次流路デバイス101に搬送することができる。このため、試薬タンク3105、廃液タンク3106、溶液回収タンク3107の付替動作が不要となり、図16の構成と比較して簡易なシステムで核酸精製処理の自動化を達成できる。

[0079] 図19において、まず、制御装置（図示せず：例えば、システムに接続されたコンピュータで構成される）は、開閉バルブ機構3005を操作して、V1とV6を開状態、V2～5、V7～10を閉状態とする。同時に、多方バルブ機構3006（V11、V12）を操作して、第二送液口3102および第二デバイス接続口3104を廃液タンク3106に接続する（S19

01)。制御装置は、送液機構302を動作させ、第1の試薬タンク3105に保持されたサンプル溶液401 (Sample)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出されたサンプル溶液401を廃液タンク3106に回収する(S1902)。次に、制御装置は、開閉バルブ機構3005を操作して、V2とV7を開状態、V1、V3～6、V8～10を閉状態とする(S1903)。制御装置は、送液機構302を動作させ、第2の試薬タンク3105に保持された第1の洗浄液402 (AW1)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された第1の洗浄液402を廃液タンク3106に回収する(S1904)。第1の洗浄液402の搬送終了後、制御装置は、開閉バルブ機構3005を操作して、V3とV8を開状態、V1～2、V4～7、V9～V10を閉状態とする(S1905)。制御装置は、送液機構302を動作させ、第3の試薬タンク3105に保持された第2の洗浄液402 (AW2)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された第2の洗浄液402を廃液タンク3106に回収する(S1906)。制御装置は、開閉バルブ機構3005を操作して、V4とV9を開状態、V1～3、V5～8、V10を閉状態とする(S1907)。制御装置は、送液機構302を動作させ、第4の試薬タンク3105に保持された第3の洗浄液402 (EtOH)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された第3の洗浄液402を廃液タンク3106に回収する(S1908)。第3の洗浄液402の搬送に引き続いて、制御装置は、送液機構302を動作させ、流路デバイス101に乾燥空気を3分間送風する(S1909)。最後に、制御装置は、開閉バルブ機構3005を操作して、V5とV10を開状態、V1～4、V6～9

を閉状態とし、多方バルブ機構3006(V11、V12)を操作して、第二送液口3102および第二デバイス接続口3104を溶液回収タンク3107に接続する(S1910)。制御装置は、送液機構302を動作させ、第5の試薬タンク3105に保持された溶出液403(ATE)を流路デバイス101の第一通気口107に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二通気口108から排出された溶出液403を溶液回収タンク3107に回収する(S1911)。なお、廃液タンク3106または溶液回収タンク3107に回収された溶液は、第二送液口3102から漏出したり、流路デバイス101に戻ったりすることなく、廃液タンク3106および溶液回収タンク3107に保持されることが好ましい。このため、廃液タンク3106および溶液回収タンク3107は、それぞれ搬送される総液量に対して十分大きい容量を有するように設計するとよい。あるいは、第一接続口3001からの加圧動作で図17の核酸精製フローを実施するシステムにおいて、廃液タンク3106および溶液回収タンク3107に、気体の通過を許しかつ液体の通過を許さないフィルタベント機構を設け、第二送液口3102との接続を閉状態にすることによっても、これを達成できる。

[0080] 開閉バルブ機構3005および多方バルブ機構3006は、図15に示したように、互いに置き換えることができる。図16の多方バルブ機構3006(V11、V12)を開閉バルブ機構3005で置き換えれば、同一のバルブ機構を並列することができ、制御性、拡張性などの観点で優位となる。一方、図16の開閉バルブ機構3005(V1～V10)を多方バルブ機構3006に置き換えれば、バルブ機構を集約することができ、システムの小型化、制御機構の共通化が容易となる可能性がある。また、バルブ機構は、必ずしも試薬タンク3105の両端に設けなくてもよく、上流側(V1～V5)、あるいは下流側(V6～V10)にのみ配置してもよい。図16に示すように、試薬タンク3105の両端にバルブ機構を設けると、毛管現象や流路内圧の変化などによって意図せぬ試薬の漏れ出しが生じる可能性を低く

することができ、より安定した送液を実現できる。一方、試薬タンクの片側にのみバルブ機構を設けると、バルブ機構の個数を減らすことができ、より小型で簡易なシステムを構築できる。開閉バルブ機構3005および多方向バルブ機構3006は、例えばダイアフラムバルブ、ニードルバルブ、ベローズバルブ、ゲートバルブなど、核酸精製処理に用いる試薬に対する耐薬品性を有し、流体を通したり止めたり流量を調整したりすることができる機構であればよく、動作は手動で実施しても、電気信号などで制御して実施してもよい。

[0081] (3) 本開示の流路デバイス101の構成を適用した試薬タンク一体型核酸精製システム

図20から図22を参照して、試薬タンク一体型核酸精製デバイスに係る、試料前処理システムおよび核酸精製方法について説明する。

[0082] <試薬タンク一体型核酸精製システムの構成例>

図20は、試薬タンク一体型の流路デバイス（核酸精製デバイス）101を設置した試料前処理システム301のシステム構成例を示す図である。当該流路デバイス（核酸精製デバイス）101は、基板102に形成された膜格納部104と、第一流路105と、第二流路106と、第一通気口107と、第二通気口108と、基板102の上下面に貼付したシーリングテープ103と、樹脂リング204の圧入により膜格納部104に固定された精製膜201と、開閉バルブ機構3005を介して第一通気口107と第一流路105の間に設置された少なくとも1つ以上の試薬タンク3105と、開閉バルブ機構3005を介して第二流路106と接続し、ベントフィルタ3109を備える廃液タンク3106と、開閉バルブ機構3005を介して第二流路106と接続し、第二通気口108と接続する溶液回収流路3108と、を備える。膜格納部104周辺の構成は、図9AおよびBや図14AおよびBと同様である。第二通気口108は、試薬保持部303に設けられた溶液回収タンク3107と接続する。

[0083] 図21Aは、試薬タンク3105周辺の上面構成例を示す図である。図2

1 Bは、図 2 1 Aの A-Aにおける断面構成例を示す図である。試薬タンク 3 1 0 5は、試薬液量（例えば、サンプル溶液 8 0 0 μ L、洗浄液 1 0 0 0 μ L、溶出液 2 0 μ L）よりやや大きい内容積を有する中空容器に試薬溶液が封入され、突起部 1 0 0 4が設けられた接続流路 1 0 0 1の上部の基板 1 0 2に貼付されている。試薬タンクアクチュエータ 3 1 1 0で試薬タンク 3 1 0 5が押し潰されると、突起部 1 0 0 4が試薬タンク 3 1 0 5の底部の封止部材 1 0 0 3と接触し、封止部材 1 0 0 3を破壊する。これにより、試薬が接続流路 1 0 0 1に流入可能となる。当該試薬タンク一体型核酸精製デバイスにおいて、試薬タンク 3 1 0 5は、厚さ 5 0 μ mのアルミシートに試薬封入口 1 0 0 5と通気口 1 0 0 6を設けながら曲げ加工により成型し、封止部材 1 0 0 3として厚さ 1 0 μ mのアルミシートを底部に溶着させて構成される。そして、試薬封入口 1 0 0 5からマイクロピペットを差し込み、試薬タンク 3 1 0 5内を試薬で満たした後、試薬封入口 1 0 0 5と通気口 1 0 0 6がシーリングテープで密封される。最後に、基板 1 0 2に設けた接続流路 1 0 0 1の上部が両面テープで貼付される。試薬タンクアクチュエータ 3 1 1 0は、推進力 1 0 Nの小型リニアアクチュエータにテーパ形状の先端治具を接続したものを用いることができる。

[0084] 開閉バルブ機構 3 0 0 5は、流路デバイス 1 0 1上に設けられたバルブ部 1 0 0 2と、バルブアクチュエータ 3 1 1 1とによって構成される。バルブ部 1 0 0 2は、バルブアクチュエータ 3 1 1 1の先端と合致する形状となっている。バルブアクチュエータ 3 1 1 1でバルブ部 1 0 0 2を押下することで、接続流路 1 0 0 1を封止することができる。当該試薬タンク一体型核酸精製デバイスは、幅 1 m m×深さ 1 m mの接続流路 1 0 0 1に、曲率 ϕ 1 m mのドーム状のバルブ部 1 0 0 2を備えている。バルブアクチュエータ 3 1 1 1として、先端がステンレス製の曲率 ϕ 1 m mの球状となった推進力 5 Nの小型リニアアクチュエータを用いている。

[0085] 試薬タンク 3 1 0 5は、当該技術分野で一般的に用いられているものであれば材質、形状等は特に限定されるものではなく、ブリストアパックやパウ

チパックなどを用いることができる。また、試薬タンク 3105 は、使用する試薬への耐薬品性を有し、流路デバイス 101 の所定位置に試薬を保持可能かつ任意のタイミングで試薬を搬送できるものであればよい。好ましくは、流路デバイス 101 は、試料前処理システム 301 に設置されていない状態でも試薬を所定位置に保持可能であり、試料前処理システム 301 に設置後、試料前処理システム 301 から与えられる外力により、試薬タンク 3105 が開封される構成であるとよい。ただし、流路デバイス 101 は、試料前処理システム 301 に設置されていない状態で試薬を所定位置に保持できない構成でもよい。この場合、例えば、試料前処理システム 301 に設置してすべてのオンチップバルブを閉状態とした後に、試薬封入口 1005 から試薬を導入し、試薬封入口 1005 と通気口 1006 を封止すればよい。なお、試薬タンク 3105 は、試薬封入口 1005 および通気口 1006 を必ずしも備えていなくてもよい。試薬を封入した後に封止部材 1003 を組み立てるようにしてもよい。また、試薬タンク 3105 の形状は六角形でなくてもよく、例えば四角形、三角形、円形などでもよい。ただし、送液方向が対角上に配置される形状であると、試薬タンク 3105 内部での液残りを最小限に抑えることができる。また、試料前処理システム 301 から試薬タンク 3105 に与えられる外力は、試薬タンクアクチュエータ 3110 のように試薬タンク 3105 を変形させる機械的な押下力でなくてもよい。例えば、試薬タンク 3105 に接続する流路を介して試薬タンク 3105 の封止部を決壊させる流路内圧力を用いてもよい。特に、流路内圧力により試薬タンク 3105 を開封する構成の場合、送液機構 302 および核酸精製フロー実施に必要な配管流路と共通化できるため、システムの機構の簡易化、小型化の観点で優位である。

[0086] 開閉バルブ機構 3005 は、当該技術分野で一般的に用いられているものであれば特に限定されるものではなく、使用する試薬への耐薬品性および送液圧力（例えば 100 kPa）以上の耐圧を有し、流路デバイス 101 上に設置可能かつ任意のタイミングで送液方向を制御できるものであればよい。

具体的には、開閉バルブ機構 3005 として、基板 102 表面に貼付した流路蓋材を機械的な押下力により変形させることで閉状態を達成するフィルム変形式バルブ以外には、オンチップダイアフラムバルブ、磁性ビーズを用いたバルブ、熱変形バルブ、piezoバルブなどを挙げることができる。また、回転式のオンチップバルブを用いて、多方バルブ機構 3006 に置き換えてもよい。フィルム変形式バルブは、比較的簡便な構造で動作可能であり、低コストで安定動作可能であることが利点である。従って、煩雑な処理フローを必要とするため必然的にバルブ機構が多数必要で、かつ小型・低コスト化が求められる高性能試料前処理システムにおいて、フィルム変形式バルブは、特に有望な選択肢である。一方、従来の膜固定技術のひとつであるゴム製 Oリングやガスケットリングを用いた手法の場合、固定方向（膜の面方向）への加圧が必須となる。このため、流路蓋材は変形しない剛性の大きい材質とするか、容易に変形可能なフィルムシートを貼付する場合（図 21B 参照）は上部に加圧用のアクチュエータが必要となる。加圧用のアクチュエータを追加すると装置の大型・高コスト化に繋がる一方、流路蓋材を剛性の大きい材質とするとフィルム変形式バルブを採用できないため、やはりシステムの大型・コスト化が懸念される。本開示による精製膜固定法は、樹脂リング 204 の圧入完了後は上面からの外力印加が不要であるため、フィルム変形式バルブと容易に組み合わせ可能であることも、本開示の技術がもたらす効果の一つである。

[0087] 試薬タンクアクチュエータ 3110 およびバルブアクチュエータ 3111 は、リニアアクチュエータでなくてもよく、例えばソレノイドロック、XYZ ステージ、ステッピングモータ、DC モータなどを用いてもよいし、複数のバルブ機構を一体化したアクチュエータで操作してもよい。アームやワイヤーコイルなどを用いて、外部動力源と作用部を離してもよい。これにより、流路デバイス 101 上に配置する機構を小型化することができ、流路デバイス 101 を小型化できる。

[0088] <試薬タンク一体型核酸精製システムにおける核酸精製処理>

図22は、図20に示す核酸精製システムによって実行される核酸精製処理を説明するためのフローチャート（例）である。まず、制御装置（図示せず：例えば、システムに接続されたコンピュータで構成される）は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V1を開状態、V2～10を閉状態とし、試薬タンクアクチュエータ3110を操作して、サンプル溶液401を含む試薬タンク3105（Sample）の封止を破壊する（S2201）。続いて、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V1、V4、V8を開状態、V2～3、V5～7を閉状態とする。また、制御装置は、送液機構302を動作させ、サンプル溶液401を流路デバイス101の第一流路105に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二流路106から排出されたサンプル溶液401を廃液タンク3106に回収する（S2202）。次に、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V2、V8を開状態、V1、V3～7を閉状態とし、さらに、試薬タンクアクチュエータ3110を操作して、洗浄液402を含む試薬タンク3105（Wash buffer）の封止を破壊する（S2203）。その後、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V2、V5、V8を開状態、V1、V2～4、V6、V8を閉状態とし、さらに、送液機構302を動作させ、第2の試薬タンク3105に保持された洗浄液402を流路デバイス101の第一流路105に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過させて第二流路106から排出されたサンプル溶液401を廃液タンク3106に回収する（S2204）。洗浄液402の搬送に引き続いて、制御装置は、送液機構302を動作させて、流路デバイス101に乾燥空気を3分間送風する（S2205）。続いて、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V3を開状態、V1～2、V4～8を閉状態とし、さらに試薬タンクアクチュエータ3110を操作して、溶出液403を含む試薬タンク3105（Elution buffer）の封止を破壊する（S2206）。最後に、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を

操作して、V 3、V 6、V 7を開状態、V 1～2、V 4～5、V 8を閉状態とし、さらに送液機構302を動作させ、溶出液403を流路デバイス101の第一流路105に導入し、流路デバイス101の膜格納部104に設置された精製膜201を通過させて第二流路106から排出されたサンプル溶液401を溶液回収流路3108へ送液し、第二通気口108に接続する溶液回収タンク3107に回収する(S2207)。

[0089] なお、図22では、精製膜201の洗浄液を1種とした核酸精製処理フローを示したが、試薬タンク3105および開閉バルブ機構3005の配置や組み合わせを変更することで、図2に示す核酸精製フローを含む様々な処理フローに対応することができる。

[0090] (4) 本開示の流路デバイス101の構成を適用したSample-to-Answer型DNA分析システム

[0091] 図23から図28を参照して、Sample-to-Answer型DNA分析システムに係る試料前処理システムおよび流路デバイスについて説明する。ここでは、数 μ Lのヒト血液が付着したスワブ試料から、キャピラリー電気泳動装置を用いたSTR(Short tandem repeat)解析により人物鑑定を実施する例を挙げて当該システムの構成および処理内容について説明する。

[0092] <Sample-to-Answer型DNA分析システムの構成例>

図23は、生体試料から核酸抽出、核酸精製、核酸増幅・検出を自動で実施可能な流路デバイス101および試料前処理システム301で構成されるSample-to-Answer型DNA分析システムの全体構成例を示す図である。当該試料前処理システム301の構成は、図3Aに示すシステムの構成と概ね同様であり、送液機構302と、試薬保持部303と、チップ保持部304と、を備える。チップ保持部304に固定された流路デバイス101の第一通気口107と第二通気口108は、配管チューブ307を介して試薬保持部303と接続する。流路デバイス101は、試料導入口1202を有し、試料を溶解して試料中に含まれる核酸を抽出する核酸抽出部

1201と、核酸抽出部1201と接続し、核酸抽出部1201から排出されたサンプル溶液401から夾雑物を除去して標的核酸を回収する核酸精製部1101と、核酸精製部1101と接続し、核酸精製部1101から排出された溶出液403に含まれる標的核酸を増幅して検出する核酸増幅部1301と、を備える。

[0093] <核酸抽出部1201核酸抽出処理>

図24は、Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸抽出部1201の構成例を示す図である。核酸抽出部1201は、基板102上に試料導入口1202と、試料導入口と接続する核酸抽出チャンバ1203と、試料の溶解および核酸精製反応を実施するための試薬を保持する少なくとも1つ以上の試薬タンク3105と、少なくとも1つ以上の開閉バルブ機構3005と、核酸抽出チャンバ1203と核酸精製部1101を接続する精製部接続流路1204と、第一通気口107または第二通気口108と接続し、送液機構302の動作による送液を可能とする送液流路1205と、を備える。

[0094] 試料導入口1202には、分析対象の試料（例えばスワブ試料（試料400）：例えば、綿棒の先に試料（血液）をぬぐったもの）が導入される。その後、試料導入口1202にポリウレタン製の導入口封止部材1206が装着される。これにより、核酸抽出チャンバ1203内の通気性を確保しつつ試料および試薬が流路デバイス101の外部に漏出することを防ぐことができる。

[0095] また、核酸抽出チャンバ1203は、例えば、内容積4mLとなるように設計される。温度制御機構3202は、核酸抽出部熱源3201を制御し、温調された核酸抽出部熱源3201と接触した核酸抽出チャンバ1203を所定の温度に維持することができる。なお、開閉バルブ機構3005および試薬タンク3105として、図21AおよびBで示したものと同様の機構を採用することができる。

[0096] 導入口封止部材1206は、ポリウレタン製でなくてもよく、例えばベン

トフィルタ、多孔質の樹脂焼結フィルタ、孔の空いたシーリングテープなど、空気の通過をある程度許容し、核酸抽出チャンバ1203内部の試料および溶液の漏出を防ぐことができる部材を用いて構成することができる。核酸抽出チャンバ1203を密封しない構造とすることにより、核酸抽出反応中に核酸抽出チャンバ1203の内圧を低減できる。このため、耐圧の小さい流路デバイス101でも破損なく使用することができ、デバイスの低コスト化を実現することができる。また、導入口封止部材1206は、通気性のない材料（例えばゴム製部材）を用いて密封してもよい。その場合、核酸抽出チャンバ1203にフィルタベント機構を設けることで、導入口封止部材1206と同様の効果を得ることができる。

[0097] <核酸抽出処理>

図25は、Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸抽出処理を説明するためのフローチャートである。

[0098] まず、オペレータは、先端に血液（例えば0.5 μ L）が付着したスワブ試料（試料400）を試料導入口1202から核酸抽出チャンバ1203に挿入し、導入口封止部材1206で封止する（S2501）。次に、オペレータによる核酸抽出処理開始の指示に応答して、制御装置（図示せず：例えば、システムに接続されたコンピュータで構成される）は、開閉バルブ機構3005のバルブアクチュエータ3111（図23には図示せず）を操作して、V2を開状態、V1、V3～5を閉状態とし、試薬タンクアクチュエータ3110を操作して、核酸抽出液（Lysis buffer、例えば300 μ L）を含む試薬タンク3105の封止を破壊する。同時に、制御装置は、温度制御機構3202を操作して、核酸抽出部熱源3201の表面温度を56℃とする（S2502）。制御装置は、核酸抽出チャンバ1203が56℃になったことを確認（検知）すると、バルブアクチュエータ3111を操作して、V1、V2を開状態、V3～5を閉状態とし、さらに送液機構302を動作させ、核酸抽出液を核酸抽出チャンバ1203に導入する（S2503）。核酸抽出液搬送に引き続いて、制御装置は、核酸抽出チャンバ

1203に空気を送り込むようにシステムを制御し、気泡および熱対流により核酸抽出液および試料400を30分間攪拌する(S2504)。これにより、試料400に含まれる血球細胞の細胞膜が溶解し、細胞内の核酸が核酸抽出液中に放出される。次に、制御装置は、開閉バルブ機構3005のバルブアクチュエータ3111を操作して、V3を開状態、V1～V2、V4～5を閉状態とし、さらに試薬タンクアクチュエータ3110を操作して、精製試薬(Sample buffer、例えば500 μ L)を含む試薬タンク3105の封止を破壊する。同時に、制御装置は、温度制御機構3202を操作して核酸抽出部熱源3201の表面温度を72 $^{\circ}$ Cとする(S2505)。核酸抽出チャンバ1203が72 $^{\circ}$ Cになったことを確認(検知)すると、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V3、V4を開状態、V1～2、V5を閉状態とし、さらに送液機構302を動作させ、精製試薬を核酸抽出チャンバ1203に導入する(S2506)。S2506の精製試薬搬送に引き続いて、制御装置は、核酸抽出チャンバ1203に空気を送り込むようシステムを制御し、気泡および熱対流により試料400と溶液(核酸抽出液と精製試薬)を10分間攪拌する(S2507)。精製試薬は、カオトロピック塩とエタノールを含む溶液であり、シリカ膜への高効率DNA吸着を可能とする。S2507の操作により、S2504で残留した血球細胞を完全に溶解させると同時に、後段の核酸精製部1101でBoom法を実施可能なサンプル溶液401(試料中のヒトゲノムDNA、核酸抽出液、精製試薬の混合溶液)の調製を完了できる。最後に、制御装置は、V3～5を開状態、V1～2を閉状態とし、サンプル溶液401を精製部接続流路1204から核酸精製部1101へ搬送する(S2508)。

[0099] <核酸精製処理>

図26は、Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸精製部1101周辺の構成例を示す図である。核酸精製部1101は、試薬タンク一体型の流路デバイス(核酸精製デバイス)101(図20参照)と概ね同様の構成を有している。試薬タンク一体型の流路デバイス(

核酸精製デバイス) 101との主な相違点は、サンプル溶液401が核酸抽出部1201と接続する精製部接続流路1204から搬送されること、および、溶液回収流路3108が核酸増幅部1301と接続することである。当該核酸精製部1101でも図22に示す核酸精製処理により、高効率な核酸精製を実現することができる。

[0100] <核酸増幅部1301の構成例>

図27Aは、核酸増幅部1301周辺の構成例を示す図である。図27Bは、図27AのA-Aの断面構成例を示す図である。核酸増幅部1301は、基板102上に核酸精製部1101の溶液回収流路3108と接続する核酸増幅チャンバ1302と、核酸増幅反応を実施するための試薬を保持する少なくとも1つ以上の試薬タンク3105と、少なくとも1つ以上の開閉バルブ機構3005と、核酸増幅チャンバ1302と第一通気口107または第二通気口108と接続し、核酸増幅反応後のサンプル溶液を排出する増幅産物回収流路1303と、少なくとも第一通気口107または第二通気口108の一方と接続し、送液機構302の動作による送液を可能とする送液流路1205と、を備える。

[0101] 核酸増幅チャンバ1302は、例えば、幅5mm×長さ8mm×厚さ0.5mmの直線形状で構成することができる。また、核酸増幅チャンバ1302の下面の基板102は周辺部と比較して薄く加工されている(例えば厚さ0.5mm)。これにより、核酸増幅チャンバ1302の上下面に核酸増幅部熱源3301と接触させることができ、核酸増幅チャンバ内のサンプル溶液に高速で温度変化を与えることができる。なお、温度制御機構3302は、上下の核酸増幅部熱源3301それぞれに1つずつ設置してもよい。これにより、上下面それぞれの温度データから温調のフィードバック制御ができるため、より精密な温度制御が可能となる。一方、温度制御機構3302は核酸抽出部熱源3201(図24参照)のそれ(温度制御機構3202)と共通化してもよい。これにより装置の小型化が可能となる。なお、開閉バルブ機構3005および試薬タンク3105は、図20で示したものと同様の

機構を採用することができる。

[0102] <核酸増幅処理>

図28は、Sample-to-Answer型DNA分析システムにおける核酸増幅処理を説明するためのフローチャートである。上記制御装置（図示せず）は、まず、バルブアクチュエータ3111を操作して、V1～2を開状態、V3～4を閉状態とし、溶出液403の一部（例えば10 μ L）を溶液回収流路3108から核酸増幅チャンバに導入する（S2801）。次に、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、V3を開状態、V1～2、V4を閉状態とし、さらに試薬タンクアクチュエータ3110を操作して、核酸増幅試薬（PCR buffer、例えばGlobalfiler PCR kitの試薬を10 μ L）を含む試薬タンク3105の封止を破壊して核酸増幅チャンバ1302に導入する（S2802）。さらに、制御装置は、バルブアクチュエータ3111を操作して、一度V1～4を全て開状態として核酸増幅チャンバ1302内の気泡を抜いた後、V1～4を全て閉状態とし、核酸増幅チャンバ1302内に反応溶液20 μ L（溶出液2マイクロLと核酸増幅試薬18 μ L）を格納する（S2803）。ここで、制御装置は、温度制御機構3302を操作して核酸増幅部熱源3301の表面温度を95 $^{\circ}$ Cに設定し、核酸抽出チャンバ1203が95 $^{\circ}$ Cに到達（検知）したら1分維持する（S2804）。これにより、核酸増幅試薬に含まれるポリメラーゼが活性化し、核酸増幅反応を開始できる。次に、制御装置は、温度制御機構3302を操作して核酸増幅部熱源3301の表面温度を94 $^{\circ}$ Cに変更し、核酸抽出チャンバ1203が94 $^{\circ}$ Cに到達したら10秒維持してDNAの変性反応を行う（S2805）。続いて、制御装置は、温度制御機構3302を操作して核酸増幅部熱源3301の表面温度を59 $^{\circ}$ Cに変更し、核酸抽出チャンバ1203が59 $^{\circ}$ Cに到達（検知）したら90秒維持してアニーリング・DNA伸長反応を行う（S2806）。制御装置は、S2805およびS2806の処理を30サイクル繰り返し、キャピラリー電気泳動装置で検出可能な産物濃度となるように標的核酸（STR）を

増幅する。制御装置は、S 2 8 0 5 および S 2 8 0 6 の処理を 3 0 サイクル実施した後、引き続き 5 9℃で 1 0 分維持して、アデニリル化を行う（S 2 8 0 7）。最後に、制御装置は、温度制御機構 3 3 0 2 を操作して核酸増幅部熱源 3 3 0 1 の表面温度を 4℃に変更して核酸増幅反応を停止する（S 2 8 0 8）。それと同時に、制御装置は、バルブアクチュエータ 3 1 1 1 を操作して、V 1 ～ 2、V 4 を開状態、V 3 を閉状態とし、さらに、送液機構 3 0 2 を動作させて、反応溶液を核酸増幅チャンバ 1 3 0 2 から増幅産物回収流路 1 3 0 3 に搬送する（S 2 8 0 9）。

[0103] <電気泳動による S T R 解析処理>

増幅産物回収流路 1 3 0 3 に搬送した反応溶液は、第二通気口 1 0 8 を介して外部へ排出し、電気泳動試薬（例えばホルムアミド溶液）と一定割合（例えば反応溶液 2 0 μ L に対して電気泳動試薬 2 0 0 μ L）で混合する。この混合溶液をサンプル溶液とし、電気泳動装置に設置して S T R 解析を行うことができる。

[0104] なお、電気泳動試薬を、核酸抽出部 1 2 0 1 から核酸増幅部 1 3 0 1 と同様に、試薬タンク 3 1 0 5 に格納して基板 1 0 2 上に設置し、反応溶液と電気泳動試薬との混合までを流路デバイス 1 0 1 で実施することもできる。さらに、電気泳動部を流路デバイス 1 0 1 上に構成してもよく、試料導入から電気泳動解析までを全自動で実施するようにしてもよい。

[0105] （５）膜格納部 1 0 4 および樹脂リング 2 0 4 の変形例

図 2 9 A から E は、本実施形態による膜格納部 1 0 4 および樹脂リング 2 0 4 の変形例を示す図である。図 2 9 A は、各変形例における膜格納部 1 0 4 の周辺を上から見た構成例を示す図である。図 2 9 B から図 2 9 E は、変形例 1 から 4 における、図 2 9 A の A - A の断面構成例を示す図である。

[0106] 図 2 9 A に示すように、各変形例において、樹脂リング 2 0 4 は、上面から見たとき切れ目のない円環状であることが好ましい。これにより、精製膜 2 0 1 の周縁部が全周漏れなく台座面 1 0 9 に固定された状態となり、溶液の漏出を最小限に抑えることができる。同様の理由で、台座面 1 0 9 も切れ

目のない円環状であることが好ましいが、円周の概ね $1/5$ 以下であれば切り欠いたC型の台座面 109 でも、十分に本開示の技術による効果が得られることが実験で明らかとなっている。

[0107] 図 29B から図 29E に示す変形例においては、一般的なOリングのように、リング垂直方向からの断面形状が円形（水平方向からの断面はドーナツ型）の樹脂リング 204 を用いてもよい。ただし、この場合、樹脂リング 204 と精製膜 201、および樹脂リング 204 と膜格納部上部 110 の側壁は、それぞれできるだけ広い面で接触することが好ましい。これは、樹脂リング 204 と精製膜 201 の接触面積が大きくなるほど精製膜 201 の浮き上がりを抑制できるため、また、樹脂リング 204 と膜格納部上部 110 の間に働く摩擦力が接触面積に比例して大きくなるためである。

[0108] 好ましい変形例の一つは、図 29B に示すように、リング垂直方向からの断面が内傾した樹脂リング 204 である。図 29B に示す樹脂リング 204 の形状においては、樹脂リング 204 と精製膜 201 および樹脂リングと膜格納部上部 110 の接触面積が上述の実施形態による樹脂リング 204（図 9）と同一である。よって、高い精製膜固定効果が得られると同時に、樹脂リング 204 の上面への液残りを最小限に抑えることができるため、より高い収率を得ることができる。

[0109] 図 29C は、上下にテーパ形状を設けた樹脂リング 204 を用いた変形例を示している。図 29C に示すように、樹脂リング 204 において、上部テーパ 2001 が精製膜 201 の中心方向に内傾するように設けられている。これにより、図 29B による変形例と同様に、液残り抑制・収率向上効果が期待できる。下部テーパ 2002 は、精製膜 201 の外周側に設けられている。これにより、組立時に樹脂リング 204 を膜格納部上部 110 に挿入しやすくする効果が得られる。本開示による樹脂リング 204（実施形態および各変形例）は、膜格納部上部 110 以上の内径を有することを特徴とする。このため、組立時に樹脂リング 204 の位置決めが難しく、嵌め込みにくい場合がある。従って、下部テーパ 2002 を設けることによって、樹脂リ

ング２０４底面の外径が小さくなるため、嵌め込み開始時に膜格納部上部１１０に納まりやすくなり、正しく圧入固定を実施しやすくなる。

[0110] 図２９Ｄに示す別の変形例は、第一流路１０５と膜格納部上部１１０との接続部に切欠部２００３が設けられた樹脂リング２０４に関する。当該切欠部２００３は、第一流路１０５を塞がないように、好ましくは切欠部２００３の上面が第一流路１０５の底面より低い位置にあり、かつ切欠部２００３の側壁が第一流路１０５の側壁面より外側に位置するように設計、配置するといふ。図２９Ｄのような上面Ｃ型（樹脂リング２０４の上部所定割合；第一流路１０５との接続部分に切欠き部が設けられている）／底面Ｏ型（樹脂リング２０４の下部所定割合）の樹脂リング２０４によれば、膜格納部上部１１０の有効体積を減らすことができる。このため、送液時にダンパーとなる空気量を最小限に抑えることができ、送液圧力をより効果的に高められる。これにより、必要圧力低減による送液機構３０２の小型化が可能となるほか、送液制御性を高め、より安定した核酸精製処理を自動で実現できる。

[0111] 図２９Ｅに示す別の変形例は、膜格納部上部１１０および膜格納部下部１１１がテーパ形状となった膜格納部１０４に関する。この場合、樹脂リング２０４も、膜格納部上部１１０に圧入可能なテーパ形状であることが好ましい。膜格納部上部１１０および樹脂リング２０４がテーパ形状となることにより、図２９Ｃに示す下部テーパ２００２と同様に、組立時に樹脂リング２０４を安定的に嵌め込みやすくする効果がある。同時に、膜格納部上部１１０の側壁が垂直に近い場合と比較して、樹脂リング２０４と膜格納部上部１１０の接触面積が大きくなる。このため、より高い圧入効果を得られる。一方、膜格納部下部１１１をテーパ形状とすると、精製膜２０１の有効面積を確保しつつ、膜格納部下部１１１に残留する溶液を減らし、精製膜を通過した溶液を効率よく第二流路１０６へ搬送でき、より回収効率を高めることができる。

[0112] なお、図２９Ｂから図２９Ｅに示す変形例の特徴的構成はそれぞれ組み合わせることもできる。適切な組み合わせにより、高い精製膜固定力と回収効

率を得ることができる。例えば、基板102および樹脂リング204の材質、加工ひずみ、精製膜201の材質、大きさ、などを考慮して、適切な形状を定めることが好ましい。また、膜固定法は、従来の膜固定法と組み合わせて使用することもできる。例えば、圧入した樹脂リング204と膜格納部上部110の側壁との間のわずかな間隙を、接着剤により埋めてもよい。これにより、材料加工などで生じる加工誤差や表面粗さによる不良を最小限に抑え、用途に合わせて実用的な水準で高性能な核酸精製を達成できる。

[0113] (6) 本開示の流路デバイス101の構成を適用したシステムにおける連続搬送法の適用

(i) ここでは、連続搬送法を適用した核酸精製処理および試料前処理システムについて説明する。当該連続搬送法で用いるサンプル溶液401の組成は図2Aの通りであり、洗浄液402として純エタノールを用いている。また、試料前処理システム301および流路デバイス101は概ね図20で示した構成と同一である。図30Aは、連続搬送法においてサンプル溶液401を搬送する様子を示す図である。図30Bは、連続搬送法において洗浄液402を搬送する様子を示す図である。

[0114] 連続搬送法の運用においては、図30AおよびBに示す通り、サンプル溶液401を第2流路106に搬送しきらずに、サンプル溶液401の後端がサンプル溶液流路1102の中途に位置する送液停止箇所1104で停止する。このような送液制御が、図20におけるそれとは異なる点である。なお、送液停止箇所1104は、サンプル溶液401の後端が所定位置に達したことを検出できればよく、例えば送液停止箇所1104の上面に液面検知センサや、カメラを配置することができる。

[0115] 続いて、図30AおよびBを参照して、連続搬送法による核酸精製処理について簡単に説明する。まず、制御装置(図示せず)は、サンプル溶液401を第1の試薬タンク3105から膜格納部104に設置された精製膜201を通過して第二流路106へ搬送し、サンプル溶液401の後端が送液停止箇所1104に達した瞬間に送液を停止する(図30A)。次に、制御装

置は、洗浄液402を第2の試薬タンク3105から排出し、サンプル溶液401に連続して精製膜201を通過させ第二流路106へ搬送する（図30B）。以降の核酸精製処理は、図22で説明した工程と同一である。

[0116] (ii) 本開示による樹脂リング204を用いた精製膜固定法を適用すると、精製膜201と膜格納部104の間隙が極めて小さくなり液体および気体のすり抜けが抑制される。このため、本開示の技術における溶液搬送に必要な送液圧力は、本開示の技術を実施しなかった場合と比較して大きくなることが、実験的に判っている。例えば、図4AおよびBに示す構成を適用した場合は最大20kPa、図9AおよびBの構成を適用した場合は最大120kPa程度である。このとき、最も高い送液圧力が必要なのはサンプル溶液401を流しきった後で、洗浄液402を流し始める工程である。これは、精製膜201がサンプル溶液401で濡れた状態で精製膜201周辺に空気が到達すると、ラプラス圧を超えるまで空気が精製膜201を通過できないため、洗浄液402を精製膜201に到達させるまでに高い圧力が必要となるためである。

[0117] このような高い送液圧力を抑えるためには、本開示の技術において、一定の条件を満たす2つの溶液において間に空気を挟まず連続的に搬送することで送液圧力を低減する連続搬送法を適用することができる。上記サンプル溶液401の主成分は、水、かつ洗浄液402の主成分はエタノールであるため、連続搬送法の適用により送液圧力低減効果を得やすいことが実験により判っている。また、実験により、「第1液（サンプル溶液401）よりも第2液（洗浄液402）の方が蒸発速度は早く、かつ第1液よりも第2液の方が表面張力は低い」ことが好ましいことも実験により判っている。実際に、図30AおよびBに示す核酸精製処理を実施したところ、本開示の流路デバイス101においても、最大送液圧力は40kPa程度となること、および高い精製効率を達成できることが確認された。このように、本開示による樹脂リング204を用いた精製膜固定法により、高収率・高口バストな核酸精製を達成しつつ、連続搬送法により低压送液を可能とし、小型・低コストの

機構で高性能な核酸精製を実現することができる。

[0118] (7) まとめ

(i) 本実施形態の流路デバイス101は、基板102に形成されており、核酸を回収可能な精製膜201と、基板102に形成された空間であって、基板に形成された第一流路105および第二流路106と接続され、精製膜201を格納する、膜格納部104と、膜格納部104に圧入された円環状の樹脂リング204と、を備えている。また、膜格納部104は、基板102の上面と下面との間に精製膜201が設置可能に形成された台座面109を有し、台座面109を境として円筒状の膜格納部上部110と膜格納部上部110より小径の膜格納部下部111に分かれている。第一流路105および第二流路106は、少なくとも1つのバルブ機構と接続し、基板102の上面上に形成され、膜格納部上部110の側壁に接続される第一流路105と、少なくとも1つのバルブ機構と接続し、基板102の下面上に形成され、膜格納部下部111に接続される第二流路106と、を含む。樹脂リング204は、膜格納部上部110の内径以上の外径を有する。また、精製膜201は、台座面109と樹脂リング204との間に固定される。さらに、圧入された樹脂リング204の外径は、膜格納部104に格納されていない状態の樹脂リング204の外径よりも小さく、かつ、膜格納部上部110の内径は、樹脂リング204が膜格納部に圧入されていない状態の膜格納部上部110の内径とほぼ同一である。また、少なくとも膜格納部上部110の側壁と圧入された樹脂リング204が最も接近する位置において、膜格納部上部110の内径と圧入された樹脂リング204の外径が同一である。ここで、樹脂リング204は、膜格納部104に圧入されると、塑性変形して、膜格納部上部110の側壁との間の摩擦力によって、圧入された場所で保持される。つまり、樹脂リング204は、圧入されると、周知のOリングのように弾性変形するのではない。樹脂リング204は、ヤング率5MPa以上の1GPa以下の材質で構成されている。なお、樹脂リング204を構成する材質のヤング率が、基板102を構成する材質のヤング率未満としてもよい。

。また、樹脂リングの弾性率が100kPa以上である。一方、樹脂リング204の弾性ひずみ限界値は100%未満である。より具体的には、流路デバイス101を組み立てた状態の膜格納部上部110の内径を R' 、流路デバイス101を組み立てた状態の圧入された樹脂リング204の外径を a' としたとき、膜格納部上部110の側壁と圧入された樹脂リング204が最も接近する位置において、 $|R' - a'| < 1 \mu m$ が充足される。一方、流路デバイス101の非組立状態（樹脂リングを圧入する前の状態）での膜格納部上部110の内径を R 、流路デバイス101の非組立状態での樹脂リング（圧入前）204の外径を a としたとき、 $0 \leq a - R < 400 \mu m$ が充足される。このように流路デバイス101を構成することにより、簡易な構成で低コストの流路デバイス（流路チップ）101を実現することができる。そして、当該流路デバイス101を利用することにより、全自動でラボ方式同等の高効率精製し、高感度な遺伝子分析を行うことができるようになる。

[0119] 台座面109の内径は、樹脂リング204の内径と略同一とすることができる。これにより、精製膜201に接液した溶液を効率よく膜格納部下部111に通過させることができ、回収できる溶液量を最大化することができる。

[0120] 膜格納部上部110の内径と膜格納部下部111の内径との差、および／あるいは樹脂リング204の外径と内径との差は、できるだけ小さくすることが好ましく、2.5mm以下であることが望ましい。これにより、樹脂リング204の上面に溶液が捕捉されて残留することを防ぎ、より効率的に溶液を回収することが可能となる。なお、樹脂リング204の外径と内径の差は、1mm以下としてもよい。

[0121] また、圧入された樹脂リング204と膜格納部上部110の側壁、および、圧入された樹脂リング204と精製膜201は、共に面接触している。それぞれできるだけ広い面で接触することが好ましい。これにより、樹脂リング204と精製膜201の接触面積が大きくなるほど精製膜201の浮き上がりを抑制でき、より高い圧入効果を得ることができる。

[0122] さらに、圧入された樹脂リング204は、当該圧入された樹脂リング204と精製膜201が接する面の反対側端面が、第一流路105と膜格納部上部110の側壁との接続部よりも下部に位置するように構成されている。これにより、搬送される溶液が樹脂リング204や膜格納部104との間に液残りしてしまうことを防ぐことができる。また、流路抵抗を小さくすることができる。微量の溶液をロスなく回収することができる。

[0123] (ii) 本実施形態は、流路デバイス101を用いて核酸を生成する、核酸精製方法も提案する。当該方法は、例えば図17に示されるように、試料溶液（サンプル溶液）を収容する試料タンク（試薬タンク3105）と流路デバイス101の第一流路105を接続する工程と、第二流路106を廃液タンク3106と接続する工程と、送液機構302を操作して、試料タンクから、第一流路105、精製膜201、および第二流路106を経由して、試料溶液を廃液タンク3106まで搬送する工程と、精製膜201を洗浄するための洗浄液を収容する洗浄液タンク（試薬タンク3105に洗浄液402を保持させる）と第一流路105を接続する工程と、バルブ機構を操作して、洗浄液タンクから、第一流路105、精製膜201、および第二流路106を経由して、洗浄液402を廃液タンク3106まで搬送する工程と、送液機構302を操作して、第一流路105から、精製膜201を経由し、第二流路106の方向へ乾燥空気を送風する工程と、第一流路105を、バルブ機構を介して、核酸を溶出させるための溶出液を収容する溶出液タンク（試薬タンク3105に溶出液を保持させる）と接続する工程と、第二流路106を溶液回収タンク3107と接続する工程と、送液機構302を操作して、溶出液タンクから、第一流路105、精製膜201、および第二流路106を経由して、溶出液を溶液回収タンク3107まで搬送する工程と、を含む。このようにすることにより、効率よく核酸を精製し、高感度な遺伝子分析を行うことができるようになる。

[0124] (iii) 本実施形態は、別の核酸精製方法も提案する。当該方法は、図30AおよびB、および図22に示されるように、少なくとも、第一液（試料溶液

：サンプル溶液４０１）を収容する第一液タンク（試薬タンク３１０５）および第二液（洗浄液４０２）を収容する第二液タンク（洗浄液タンク）を準備する工程と、流路デバイス１０１の第一流路１０５を、第一液タンクにつながる第一液送出流路（サンプル溶液流路１１０２）と接続する工程と、流路デバイス１０１の第一流路１０５を、第二液タンクにつながる第二液送出流路（洗浄液流路）と接続する工程と、流路デバイス１０１の第二流路１０６を廃液タンク３１０６と接続する工程と、送液機構３０２を操作して、第一液送出タンクから、第一流路１０５、精製膜２０１、および第二流路１０６を経由して、第一液を廃液タンク３１０６まで搬送する工程と、送液機構３０２を操作して、第一液の最終端が第一液送出流路と第一流路との合流点に到達する前に（送液停止箇所１１０４で）第一液の搬送を停止し、第一液が第一送出流路に留まった状態とする工程と、第一液が第一送出流路に留まった状態で、送液機構３０２を操作して、第二液を第二液タンクから第二液送出流路への送出を開始し、第二液送出流路と第一流路との合流点、第一流路１０５、精製膜２０１、および第二流路１０６を経由して、第二液を廃液タンク３１０６まで搬送する工程と、を含み、膜格納部１０４への流入を、第一液と第二液の間に空気を挟まずに連続的に実行する。

[0125] さらに、当該方法の準備する工程は、さらに、核酸を溶出させるための溶出液を収容する第三液タンク（試薬タンク(Elution buffer)３１０５）を準備する工程を含み、さらに、送液機構３０２を操作して、第一流路１０５から、精製膜２０１を経由し、第二流路１０６の方向へ乾燥空気を送風する工程と、送液機構３０２を操作して、溶出液タンクから、第一流路１０５、精製膜２０１、および第二流路１０６を経由して、溶出液を溶液回収タンク３１０７まで搬送する工程と、を含む。このようにすることにより、送液圧力を低減することができる。このため、溶液の搬送によって流路デバイス１０１を破損させることはなくなる。

[0126] (iv) 本実施形態は、本実施形態による流路デバイス１０１と、流路デバイス１０１の第一流路１０５に接続し、生体試料から核酸を抽出する核酸抽出

部 1 2 0 1 と、流路デバイス 1 0 1 の第二流路 1 0 6 に接続し、核酸を増幅する核酸増幅部 1 3 0 1 と、を備える、試料前処理システム 3 0 1 を提案する（図 2 3 から図 2 7 A および B 参照）。

[0127] (v) 本開示による技術は、本実施形態に開示されている複数の構成要素を適宜組み合わせることにより、種々の機能を形成することもできる。例えば、実施形態に示される全構成要素から幾つかの構成要素を削除してもよいし、異なる具体例にわたる構成要素を適宜組み合わせてもよい。

[0128] 本開示は、上述のように、具体例をもって説明されているが、これは、すべての観点において限定のためではなく説明（本開示の技術の理解）のためである。また、本技術分野の通常の知識を有する者であれば、本開示のその他の実装については本実施形態の考察から明らかにすることができる。なお、明細書と具体例は典型的なものに過ぎず、本開示の技術の範囲と精神は後続する請求範囲で示される。

符号の説明

- [0129] 1 0 1 流路デバイス
1 0 2 基板
1 0 3 シーリングテープ
1 0 4 膜格納部
1 0 5 第一流路
1 0 6 第二流路
1 0 7 第一通気口
1 0 8 第二通気口
1 0 9 台座面
1 1 0 膜格納部上部（直径 R、深さ D）
1 1 1 膜格納部下部（直径 r、深さ d）
2 0 1 精製膜（直径 P、厚さ Q）
2 0 2 Oリング
2 0 3 接着剤

- 204 樹脂リング（外径 a、内径 b、高さ c）
- 205 多孔質保持部材
- 301 試料前処理システム
- 302 送液機構
- 303 試薬保持部
- 304 チップ保持部
- 305 カバー
- 306 フィッティング
- 307 配管チューブ
- 400 試料
- 401 サンプル溶液
- 402 洗浄液
- 403 溶出液
- 1001 接続流路
- 1002 バルブ部
- 1003 封止部材
- 1004 突起部
- 1005 試薬封入口
- 1006 通気口
- 1101 核酸精製部
- 1102 サンプル溶液流路
- 1103 洗浄液流路
- 1104 送液停止箇所
- 1105 核酸精製・増幅部
- 1201 核酸抽出部
- 1202 試料導入口
- 1203 核酸抽出チャンバ
- 1204 精製部接続流路

- 1 2 0 5 送液流路
- 1 2 0 6 導入口封止部材
- 1 3 0 1 核酸増幅部
- 1 3 0 2 核酸増幅チャンバ
- 1 3 0 3 増幅産物回収流路
- 2 0 0 1 上部テーパ
- 2 0 0 2 下部テーパ
- 2 0 0 3 切欠部
- 3 0 0 1 第一接続口
- 3 0 0 2 第二接続口
- 3 0 0 3 送液動力源
- 3 0 0 4 圧力制御機構
- 3 0 0 5 開閉バルブ機構
- 3 0 0 6 多方バルブ機構
- 3 0 0 7 大気開放流路
- 3 1 0 1 第一送液口
- 3 1 0 2 第二送液口
- 3 1 0 3 第一デバイス接続口
- 3 1 0 4 第二デバイス接続口
- 3 1 0 5 試薬タンク
- 3 1 0 6 廃液タンク
- 3 1 0 7 溶液回収タンク
- 3 1 0 8 溶液回収流路
- 3 1 0 9 ベントフィルタ
- 3 1 1 0 試薬タンクアクチュエータ
- 3 1 1 1 バルブアクチュエータ
- 3 2 0 1 核酸抽出部熱源
- 3 2 0 2、3 3 0 2 温度制御機構

3 3 0 1 核酸增幅部熱源

請求の範囲

[請求項1]

基板に流路が形成された流路デバイスであって、
核酸を回収可能な精製膜と、
前記基板に形成された空間であって、前記流路と接続され、前記精製膜を格納する、膜格納部と、
前記膜格納部に圧入された円環状の樹脂リングと、を備え、
前記膜格納部は、前記基板の上面と下面との間に前記精製膜が設置可能に形成された台座面を有し、前記台座面を境として円筒状の膜格納部上部と前記膜格納部上部より小径の膜格納部下部に分かれており、
前記流路は、少なくとも1つのバルブ機構と接続し、前記基板の上面上に形成され、前記膜格納部上部の側壁に接続される第一流路と、
少なくとも1つのバルブ機構と接続し、前記基板の下面上に形成され、前記膜格納部下部に接続される第二流路と、を含み、
前記樹脂リングは、前記膜格納部上部の内径以上の外径を有し、
前記精製膜は、前記台座面と前記樹脂リングとの間に固定され、
前記圧入された樹脂リングの外径は、前記膜格納部に格納されていない状態の前記樹脂リングの外径よりも小さく、かつ、前記膜格納部上部の内径は、前記樹脂リングが前記膜格納部に圧入されていない状態の前記膜格納部上部の内径とほぼ同一であり、
少なくとも前記膜格納部上部の側壁と前記圧入された樹脂リングが最も接近する位置において、前記膜格納部上部の内径と前記圧入された樹脂リングの外径が同一である、流路デバイス。

[請求項2]

請求項1において、
前記樹脂リングは、ヤング率5 MPa以上の材質で構成されている、流路デバイス。

[請求項3]

請求項2において、
前記樹脂リングは、ヤング率1 GPa以下の材質で構成されている

、流路デバイス。

[請求項4] 請求項1において、
前記樹脂リングの弾性率が100kPa以上である、流路デバイス。

[請求項5] 請求項1において、
前記樹脂リングの弾性ひずみ限界値が100%未満である、流路デバイス。

[請求項6] 請求項1において、
前記流路デバイスを組み立てた状態の前記膜格納部上部の内径を R' 、前記流路デバイスを組み立てた状態の前記圧入された樹脂リングの外径を a' としたとき、前記膜格納部上部の側壁と前記圧入された樹脂リングが最も接近する位置において、 $|R' - a'| < 1\mu\text{m}$ を満足する、流路デバイス。

[請求項7] 請求項1において、
前記流路デバイスの非組立状態での前記膜格納部上部の内径を R 、前記流路デバイスの非組立状態での前記樹脂リングの外径を a としたとき、 $0 \leq a - R < 400\mu\text{m}$ を満足する、流路デバイス。

[請求項8] 請求項1において、
前記台座面の内径は、前記樹脂リングの内径と略同一である、流路デバイス。

[請求項9] 請求項1において、
前記膜格納部上部の内径と前記膜格納部下部の内径との差が2.5mm以下である、流路デバイス。

[請求項10] 請求項9において、
前記樹脂リングの外径と内径の差が1mm以下である、流路デバイス。

[請求項11] 請求項1において、
前記圧入された樹脂リングと前記膜格納部上部の側壁、および、前

記樹脂リングと前記精製膜は、共に面接触する、流路デバイス。

[請求項12]

請求項1において、

前記圧入された樹脂リングは、当該圧入された樹脂リングと前記精製膜が接する面の反対側端面が、前記第一流路と前記膜格納部上部の側壁との接続部よりも下部に位置する、流路デバイス。

[請求項13]

請求項1において、

前記樹脂リングを構成する材質のヤング率が、前記基板を構成する材質のヤング率未満である、流路デバイス。

[請求項14]

請求項1において、

フィルムシートが前記基板の上面および下面に貼付され、前記第一流路、前記第二流路、および前記膜格納部が有する、前記基板の上面あるいは下面に開口の少なくとも一部が塞がれて構成されている、流路デバイス。

[請求項15]

請求項1において、

前記圧入された樹脂リングは、前記膜格納部の前記台座面に接着剤によって固定されている、流路デバイス。

[請求項16]

基板に流路が形成された流路デバイスであって、

核酸を回収可能な精製膜と、

前記基板に形成された空間であって、前記流路と接続され、前記精製膜を格納する、膜格納部と、

前記膜格納部に圧入された円環状の樹脂リングと、を備え、

前記膜格納部は、前記基板の上面と下面との間に前記精製膜が設置可能に形成された台座面を有し、前記台座面を境として円筒状の膜格納部上部と前記膜格納部上部より小径の膜格納部下部に分かれており、

前記流路は、前記基板の上面上に形成され、前記膜格納部上部の側壁に接続される第一流路と、前記基板の下面上に形成され、前記膜格納部下部に接続される第二流路と、を含み、

前記樹脂リングは、前記膜格納部上部の内径以上の外径を有し、
前記精製膜は、前記台座面と前記樹脂リングとの間に固定され、
前記圧入された樹脂リングの外径は、前記膜格納部に格納されていない状態の前記樹脂リングの外径よりも小さく、かつ、前記膜格納部上部の内径は、前記樹脂リングが前記膜格納部に圧入されていない状態の前記膜格納部上部の内径とほぼ同一であり、

少なくとも前記膜格納部上部の側壁と前記圧入された樹脂リングが最も接近する位置において、前記膜格納部上部の内径と前記圧入された樹脂リングの外径が同一である、流路デバイス。

[請求項17]

請求項1の流路デバイスを用いて核酸を生成する、核酸精製方法であって、

前記第一流路を、試料溶液を収容する試料タンクと接続する工程と、

前記第二流路を、廃液タンクと接続する工程と、

送液機構を操作して、前記試料タンクから、前記第一流路、前記精製膜、および前記第二流路を経由して、前記試料溶液を前記廃液タンクまで搬送する工程と、

前記第一流路を、前記送液機構を介して、前記精製膜を洗浄するための洗浄液を収容する洗浄液タンクと接続する工程と、

前記送液機構を操作して、前記洗浄液タンクから、前記第一流路、前記精製膜、および前記第二流路を経由して、前記洗浄液を前記廃液タンクまで搬送する工程と、

前記送液機構を操作して、前記第一流路から、前記精製膜を経由し、前記第二流路の方向へ乾燥空気を送風する工程と、

前記核酸を溶出させるための溶出液を収容する溶出液タンクと前記第一流路を接続する工程と、

前記第二流路を回収タンクと接続する工程と、

前記送液機構を操作して、前記溶出液タンクから、前記第一流路、

前記精製膜、および前記第二流路を経由して、前記溶出液を前記回収タンクまで搬送する工程と、
を含む、核酸精製方法。

[請求項18] 請求項1の流路デバイスを用いて核酸を生成する、核酸精製方法であって、

少なくとも、第一液を収容する第一液タンクおよび第二液を収容する第二液タンクを準備する工程と、

前記流路デバイスの前記第一流路を、前記第一液タンクにつながる第一液送出流路と接続する工程と、

前記流路デバイスの前記第一流路を、前記第二液タンクにつながる第二液送出流路と接続する工程と、

前記流路デバイスの前記第二流路を、廃液タンクと接続する工程と、

送液機構を操作して、前記第一液タンクから、前記第一流路、前記精製膜、および前記第二流路を経由して、前記第一液を前記廃液タンクまで搬送する工程と、

前記送液機構を操作して、前記第一液の最終端が前記第一液送出流路と前記第一流路との合流点に到達する前に前記第一液の搬送を停止し、前記第一液が前記第一液送出流路に留まった状態とする工程と、

前記第一液が前記第一液送出流路に留まった状態で、前記送液機構を操作して、前記第二液を前記第二液タンクから前記第二液送出流路への送出を開始し、前記第二液送出流路と前記第一流路との合流点、前記第一流路、前記精製膜、および前記第二流路を経由して、前記第二液を前記廃液タンクまで搬送する工程と、を含み、

前記膜格納部への流入を、前記第一液から前記第二液で空気を挟み、連続的に実行する、核酸精製方法。

[請求項19] 請求項18において、

前記第一液は、試料溶液であり、

前記第二液は、洗浄液であり、

前記準備する工程は、さらに、前記核酸を溶出させるための溶出液を収容する第三液タンクを準備する工程を含み、

さらに、前記送液機構を操作して、前記第一流路から、前記精製膜を経由し、前記第二流路の方向へ乾燥空気を送風する工程と、

前記流路デバイスの前記第二流路を、前記溶出液を回収するための回収タンクと接続する工程と、

前記送液機構を操作して、前記第三液タンクから、前記第一流路、前記精製膜、および前記第二流路を経由して、前記溶出液を前記回収タンクまで搬送する工程と、

を含む、核酸精製方法。

[請求項20]

請求項1の流路デバイスと、

前記流路デバイスの前記第一流路に接続し、生体試料から核酸を抽出する核酸抽出部と、

前記流路デバイスの前記第二流路に接続し、前記核酸を増幅する核酸増幅部と、

を備える、試料前処理システム。