(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6027321号
(P6027321)
(45)発行日　平成28年11月16日(2016.11.16)　(24)登録日　平成28年10月21日(2016.10.21)

(51)Int.Cl.			F I		
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A

請求項の数 14　(全 34 頁)

(21)出願番号　特願2012-49185(P2012-49185)
(22)出願日　平成24年3月6日(2012.3.6)
(65)公開番号　特開2013-183648(P2013-183648A)
(43)公開日　平成25年9月19日(2013.9.19)
審査請求日　平成27年3月4日(2015.3.4)

(73)特許権者　591243103
公益財団法人神奈川科学技術アカデミー
神奈川県川崎市高津区坂戸３丁目２番１号
(73)特許権者　504179255
国立大学法人　東京医科歯科大学
東京都文京区湯島１－５－４５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100126354
弁理士　藤田　尚
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　安田　賢二
東京都文京区湯島一丁目５番４５号　国立大学法人東京医科歯科大学内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】高速遺伝子増幅検出装置

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
核酸を含むサンプル液を容れるための１または複数のウェルを備えた反応槽と、
ヒートシンクまたは熱交換槽と、
前記ヒートシンクまたは前記熱交換槽を第１の温度に保つように構成された、該ヒートシンクまたは該熱交換槽の温度制御装置と、
前記ヒートシンクまたは前記熱交換槽と前記反応槽との間に配置された、前記ヒートシンクまたは熱交換槽と前記反応槽との間の熱の移動を媒介する熱電素子と、
前記熱電素子の動作を制御することにより、前記反応槽の温度を前記第１の温度と第２の温度との間で変化させる熱電素子制御装置と
を備え、
前記第１の温度が核酸の伸長反応温度であり、前記第２の温度が（ｉ）核酸の変性温度、または（ii）核酸の変性温度もしくは核酸のアニーリング温度であり、
前記ヒートシンクもしくは熱交換槽の素材が、アルミニウム、ジュラルミン、金、銀、タングステン、ネパール黄銅、マグネシウム、モリブデン、ベリリウム、およびこれらの元素を用いた合金からなる群から選択される金属であり、
前記ヒートシンクまたは熱交換槽が、反応槽表面の温度とヒートシンクまたは熱交換槽の温度をほぼ瞬時に平衡化することができる大きな熱容量を有し、
前記熱電素子の動作がオフのときに、前記反応槽の温度が前記第１の温度となるように構成されている、遺伝子解析または遺伝子増幅のための装置。

【請求項２】
前記温度制御装置が、
（ｉ）温度センサー、
（ｉｉ）前記ヒートシンクを加温するための熱電線、および
（ｉｉｉ）前記温度センサーからの前記ヒートシンクの温度情報に基づいて前記熱電線への電力供給を制御するフィードバック制御機構
を備える、請求項１に記載の装置。
【請求項３】
前記温度制御装置が、管状流路により前記熱交換槽に流体接続された所定の温度の液体を保持した液体リザーバと前記熱交換槽との間で前記所定の温度の液体を還流させることによって前記熱交換槽の温度を制御する液体還流型温度制御装置である、請求項１に記載の装置。
【請求項４】
前記熱電素子制御装置が、
温度センサー、および
前記温度センサーからの前記反応槽の温度情報に基づいて前記熱電素子の動作を制御するコンピュータ
を備える、請求項１～３のいずれか一項に記載の装置。
【請求項５】
前記熱電素子が、ペルチエ素子である、請求項１～４のいずれか一項に記載の装置。
【請求項６】
前記熱電素子と前記反応槽との間の熱の移動効率を高めるために前記熱電素子と前記反応槽との間に配置された熱伝導用薄板をさらに備える、請求項１～５のいずれか一項に記載の装置。
【請求項７】
前記反応槽の底面および壁面が、厚さ１ミクロンから１００ミクロンのアルミ、ニッケル、マグネシウム、チタン、プラチナ、金、銀、および銅からなる群から選択される金属またはシリコンから形成されている、請求項１～６のいずれか一項に記載の装置。
【請求項８】
前記サンプル液の量が１ウェル当たり数十μＬ以下である、請求項１～７のいずれか一項に記載の装置。
【請求項９】
前記サンプル液中に蛍光色素を含有させた場合に、前記反応槽の温度の切り替えに連動して前記ウェル内の前記蛍光色素が発する蛍光を検出し、蛍光強度の時間変化を測定するための蛍光検出装置をさらに備える、請求項１～８のいずれか一項に記載の装置。
【請求項１０】
前記ウェルに配置したサンプルの液滴の蒸発を防ぐために前記反応槽を密閉して覆い、かつ結露を防ぐために保温部材を備える反応槽枠をさらに備える、請求項１～９のいずれか一項に記載の装置。
【請求項１１】
前記反応槽枠が、該反応槽枠内の前記サンプルからの光学信号の測定を容易にする孔もしくは光学窓をさらに備え、該光学窓が光学的に透明な発熱体を備える、請求項１０に記載の装置。
【請求項１２】
前記反応槽の前記各ウェルのサンプル配置場所に支柱(ピラー)が配置されており、該ピラーに支えられるようにサンプル液蒸発防止用のシール剤が該ウェルに被せられており、該ピラーによって測定中の前記サンプル液が前記蒸発防止用のシール剤に付着することを防がれている、請求項１～８のいずれか一項に記載の装置。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の装置を用いて、ＰＣＲを行う方法であって、

（a）核酸を含むサンプル液をウェルに配置する工程、
（b）第１の温度としての核酸の伸長反応温度から、第２の温度としての（i）核酸の変性温度または（ii）核酸の変性温度もしくは核酸のアニーリング温度への反応槽の温度の切り替えを行う工程、
（c）引き続き前記第２の温度から前記第１の温度への前記反応槽の温度の切り替えを行う工程、ならびに
（d）工程（b）および工程（c）を所定の時間間隔で所定回繰り返す工程、
を含み、
前記第２の温度から前記第１の温度への前記反応槽の温度の切り替えが、前記熱電素子の動作をオフにすることによって行われる、方法。

【請求項１４】
前記工程（d）において、工程（b）（ii）および工程（c）を所定回繰り返す際に、
前記第１の温度としての核酸の伸長反応温度から、前記（b）（ii）の第２の温度としての核酸の変性温度への前記反応槽の温度の切り替えおよび引き続き該核酸の変性温度から前記第１の温度への前記反応槽の温度の切り替えを行うことと、
前記第１の温度としての核酸の伸長反応温度から、前記（b）（ii）の第２の温度としての核酸のアニーリング温度への前記反応槽の温度の切り替えおよび引き続き該核酸のアニーリング温度から前記第１の温度への前記反応槽の温度の切り替えを行うことと
を交互に行うことを所定の時間間隔で繰り返すことを含む、請求項１３に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、基礎生命科学、医学基礎研究ならびに医療現場において、迅速に微量の遺伝子解析の研究や臨床を行うに適する反応容器を用いた遺伝子解析装置に関するものであり、例えば人間をはじめとする動物や植物のゲノムＤＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ等の核酸塩基配列から特定の塩基配列を高速で検出するための反応装置を扱う遺伝子解析に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase chain reaction以下、PCRと略記する。）は、様々な種類の核酸の混合物から特定の塩基配列を増幅する方法である。混合物中にゲノムDNAあるいはメッセンジャーRNAから逆転写した相補的DNA等のDNAテンプレート、２種類以上のプライマーと熱安定性酵素、マグネシウムなどの塩、および４種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）を入れ、核酸を分離させる工程と、前記プライマーを結合させる工程と、熱安定性酵素によってプライマーが結合した核酸を鋳型としてハイブリダイゼーションさせる工程を少なくとも一回繰り返すことによって、特定の核酸配列を増幅させることができる。DNA増幅反応に用いられる反応容器を昇温、降温させることによって、熱サイクルを行っている。温度変化用の機構は色々と挙げられるが、サンプルを含む反応容器の温度をヒーターないしペルチエ素子、温風を用いた熱交換で変化させる機構、反応容器を異なる温度のヒータブロックもしくは液体バスに交互に接触させることにより温度を変化させる機構、異なる温度の領域を有する流路中にサンプルを流して温度を変える方法がある。現状の市販装置として最速なものとして、例えばロッシュ社のライトサイクラー（Ｌｉｇｈｔ　Ｃｙｃｌｅｒ）では、複数のガラスキャピラリー管の各々に試料とＤＮＡポリメラーゼとプライマーとなるＤＮＡ小片および計測用の蛍光標識色素を導入し、このキャピラリー管内の微量液滴の温度を、例えば５５℃と９５℃の２つの温度など、変化させたい液滴の温度と同じ温度の温風を吹き付けることで変化させ、同時に、このガラスキャピラリー管に蛍光色素の励起光を照射し、得られた蛍光強度を計測する機構を有するものである。これらの方法によりサンプルの温度を繰り返し変化させ

ることが可能である。
【０００３】
また、試料含有領域の外壁へ流体ジェットを衝突させることにより、試料温度を制御する流体衝突熱サイクラー装置が報告されている（特表２００１－５１９２２４（特許文献１））。そこで本発明者らは、現在までにより高速なPCRを行うために、水に特異的に吸収を持つ波長の赤外線を照射して微小水滴の温度を高速で変換する技術、ならびに循環水を利用して循環水との熱交換によって温度サイクリングが超高速に行える超高速PCR装置を開発してきた（特開２００８－２７８７９１、特開２００９－１１８７９８、ＷＯ２０１０／１１３９９０、ＷＯ２０１１／１０５５０７（特許文献２～５））。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００４】
【特許文献１】特表２００１－５１９２２４
【特許文献２】特開２００８－２７８７９１
【特許文献３】特開２００９－１１８７９８
【特許文献４】ＷＯ２０１０／１１３９９０
【特許文献５】ＷＯ２０１１／１０５５０７
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
上述のように、従来の技術では、急激な温度変化を伴って複数の温度の間でのサイクルを繰り返す場合には、１）厳密な温度制御、２）安定した温度維持、３）目標温度への移動時にオーバーシュートが無いことを達成する事は困難である。例えば、ヒーターまたはペルチエ素子での温度の変化速度は、毎秒数℃程度と遅く、また発熱と熱伝導との関係からターゲット温度に達するプロセスでは、高速でターゲット温度にするためにはオーバーシュートなしに温度を変化させることは困難である。また、基本的に固体中の熱伝導を利用すると熱源と表面の間には熱勾配が形成されてしまい、厳密な制御は不可能であった。また、サンプルがヒーターないしペルチエ素子に触れた瞬間に熱が奪われ、表面温度が所定温度に復帰するまでの遅延が発生していた。また異なるヒーターないし液体バスに反応槽を接触させる場合には、移動用の機構が複雑であり、ヒーターないし液体バスの温度制御が困難であった。さらに、異なる温度領域を有する流路中にサンプルを流す方法においては、サンプルの移動に伴って流路自体の表面温度が変化してしまい、温度制御が困難であるといった問題があった。また、温風を吹き付けて温度変化を行う場合には、空気の熱容量が少ないため、多量の空気を吹き付ける必要があり、また、同様に空気の熱容量が少ないため、電熱線等で吹き付ける空気の最終的な吹き出し温度を１℃単位で厳密に制御することは困難であった。
【０００６】
本発明者らはこれまでに、連続して一定の熱量を供給するために定常的な赤外光照射あるいは高速還流する温水を利用し、ターゲットに対して常にエネルギーを供給することができ、正確な温度制御、温度測定と迅速な昇温、降温を行うことができる反応制御装置を独自に開発した。さらにこれに蛍光検出系を組み合わせる事で、PCR反応によるDNA増幅に伴い蛍光強度が増加する蛍光色素を用い、その増幅反応をリアルタイムに検出する蛍光検出方法を組み込んだ高速PCR検出装置を開発してきた（特許文献２～５）。
【０００７】
本発明では、これら本発明者らの従前の発明をさらに改善させ、より正確な温度制御、温度測定と迅速な昇温、降温を行うことができる核酸反応制御装置を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
上記課題に鑑みて、本発明は、より安定した温度制御を可能にする付加機構を備える高

速反応制御装置（例：高速PCR装置）およびそれを用いる遺伝子解析または遺伝子増幅方法を提供する。

【０００９】

すなわち、本発明は、以下の装置および方法を提供する。

［１］核酸を含むサンプル液を容れるための１または複数のウェルを備えた反応槽（reaction vessel）と、

ヒートシンク（heat sink）または熱交換槽（heat exchange chamber）と、

上記ヒートシンクまたは上記熱交換槽を第１の温度に保つように構成された、該ヒートシンクまたは該熱交換槽の温度制御装置（temperature controller）と、

上記ヒートシンクまたは上記熱交換槽と上記反応槽との間に配置された、上記ヒートシンクまたは熱交換槽と上記反応槽との間の熱の移動を媒介する熱電素子（thermoelectric element）と、

上記熱電素子の動作（operation）を制御することにより、上記反応槽の温度を上記第１の温度と第２の温度との間で変化させる熱電素子制御装置（thermoelectric element controller）と

を備え、

上記熱電素子の動作がオフのときに、上記反応槽の温度が上記第１の温度となるように構成されている、遺伝子解析または遺伝子増幅のための装置。

［２］上記第１の温度が、核酸の伸長反応温度であり、

上記第２の温度が、（i）核酸の変性温度、または（ii）核酸の変性温度もしくは核酸のアニーリング温度である、上記［１］に記載の装置。

［３］上記温度制御装置が、

（i）温度センサー、

（ii）上記ヒートシンクを加温するための熱電線、および

（iii）上記温度センサーからの上記ヒートシンクの温度情報に基づいて上記熱電線への電力供給を制御するフィードバック制御機構

を備える、上記［１］または［２］に記載の装置。

［４］上記温度制御装置が、管状流路により上記熱交換槽に流体接続された所定の温度の液体を保持した液体リザーバと上記熱交換槽との間で上記所定の温度の液体を還流させることによって上記熱交換槽の温度を制御する液体還流型温度制御装置である、上記［１］または［２］に記載の装置。

［５］上記熱電素子制御装置が、

温度センサー、および

上記温度センサーからの上記反応槽の温度情報に基づいて上記熱電素子の動作を制御するコンピュータ

を備える、上記［１］～［４］のいずれかに記載の装置。

［６］上記熱電素子が、ペルチエ素子である、上記［１］～［５］のいずれかに記載の装置。

［７］上記熱電素子と上記反応槽との間の熱の移動効率を高めるために上記熱電素子と上記反応槽との間に配置された熱伝導用薄板をさらに備える、上記［１］～［６］のいずれかに記載の装置。

［８］上記反応槽の底面および壁面が、厚さ１ミクロンから１００ミクロンのアルミ、ニッケル、マグネシウム、チタン、プラチナ、金、銀、および銅からなる群から選択される金属またはシリコンから形成されている、上記［１］～［７］のいずれかに記載の装置。

［９］上記サンプル液の量が１ウェル当たり数十μＬ以下である、上記［１］～［８］のいずれかに記載の装置。

［１０］上記サンプル液中に蛍光色素を含有させた場合に、上記反応槽の温度の切り替えに連動して上記ウェル内の上記蛍光色素が発する蛍光を検出し、蛍光強度の時間変化を測定するための蛍光検出装置をさらに備える、上記［１］～［９］のいずれかに記載の装置。

［１１］上記ウェルに配置したサンプルの液滴の蒸発を防ぐために上記反応槽を密閉して覆い、かつ結露を防ぐために保温部材を備える反応槽枠をさらに備える、上記［１］～［１０］のいずれかに記載の装置。
［１２］上記反応槽枠が、該反応槽枠内の上記サンプルからの光学信号の測定を容易にする孔もしくは光学窓をさらに備え、該光学窓が光学的に透明な発熱体を備える、上記［１１］に記載の装置。
［１３］上記反応槽の上記各ウェルのサンプル配置場所に支柱(ピラー)が配置されており、該ピラーに支えられるようにサンプル液蒸発防止用のシール剤が該ウェルに被せられており、該ピラーによって測定中の上記サンプル液が上記蒸発防止用のシール剤に付着することを防がれている、上記［１］～［９］のいずれかに記載の装置。
［１４］上記［１］～［１３］のいずれかに記載の装置を用いて、ＰＣＲを行う方法であって、
（ａ）核酸を含むサンプル液をウェルに配置する工程、
（ｂ）第１の温度としての核酸の伸長反応温度から、第２の温度としての（ｉ）核酸の変性温度または（ｉｉ）核酸の変性温度もしくは核酸のアニーリング温度への反応槽の温度の切り替えを行う工程、
（ｃ）引き続き上記第２の温度から上記第１の温度への上記反応槽の温度の切り替えを行う工程、ならびに
（ｄ）工程（ｂ）および工程（ｃ）を所定の時間間隔で所定回繰り返す工程、
を含み、
上記第２の温度から上記第１の温度への上記反応槽の温度の切り替えが、上記熱電素子の動作をオフにすることによって行われる、方法。
［１５］上記工程（ｄ）において、工程（ｂ）（ｉｉ）および工程（ｃ）を所定回繰り返す際に、
上記第１の温度としての核酸の伸長反応温度から、上記（ｂ）（ｉｉ）の第２の温度としての核酸の変性温度への上記反応槽の温度の切り替えおよび引き続き該核酸の変性温度から上記第１の温度への上記反応槽の温度の切り替えを行うことと、
上記第１の温度としての核酸の伸長反応温度から、上記（ｂ）（ｉｉ）の第２の温度としての核酸のアニーリング温度への上記反応槽の温度の切り替えおよび引き続き該核酸のアニーリング温度から上記第１の温度への上記反応槽の温度の切り替えを行うことと
を交互に行うことを所定の時間間隔で繰り返すことを含む、上記［１４］に記載の方法。
【００１０】
上記「より安定した温度制御を可能にする付加機構」に関連して、本発明の反応温度制御装置は、例えば、通常のPCR反応で用いられる３つの温度、すなわち変性温度（以降、高温とする）、アニーリング温度（以降、低温度とする）、そして伸長反応温度（以降、中温度とする）を短時間で実現し、特に反応させたいＤＮＡ鎖の長さに応じて反応時間を長くしたりという調整が必要な伸長反応温度を高速でかつ安定して提供する手段を有する。すなわち、例えば、本発明の一実施形態では、（１）中温度で安定するように制御された熱容量の大きなヒートシンクと、（２）このヒートシンクの温度を一定に維持するように熱を供給する電熱線あるいは一定温度での中温度の液体の高速循環を行う手段と、（３）ＤＮＡ伸長反応を行わせる試料を配置したＤＮＡ反応チップと、（４）ＤＮＡ反応チップを収容し、チップ上面の温度を７５℃以上に維持する蛍光観察領域の波長について光学的に透明な観察窓を持つ容器と、（５）上記、ＤＮＡ反応チップとヒートシンクの間に配置された熱を能動的に移動させることができるペルチエ素子等の熱移動手段と、（６）ＤＮＡ反応チップ上の液体の蛍光強度の変化を検出する手段と、を有する高速遺伝子増幅装置が提供される。ヒートシンクに熱容量の大きな素材と電熱線等の発熱源を用いる場合は、ヒートシンクの素材は熱容量が大きく、かつ、熱伝導性が高い金属（例：アルミニウム、ジュラルミン、金、銀、タングステン、ネパール黄銅、マグネシウム、モリブデン、ベリリウムおよび、これらの元素を用いた合金）を用いる事が望ましい。またヒートシンクと同等に用いられるものとして中温度に設定された高速循環液体を用いた熱交換槽を用い

ても良い。その場合、リザーバを１個のみ備える高速液体還流型の反応制御装置のみならず、それ自体で２温度または３温度のＰＣＲに対応可能な２または３個のリザーバを備える高速液体還流型の反応制御装置において中温度に設定した１個のリザーバのみを用いるようにしてもよい。また、試料を載せるＤＮＡ反応チップについては、発明者らが以前に出願した高速液体還流型PCR装置（ＷＯ２０１０／１１３９９０）の反応容器の構成をそのまま利用することができる。

【発明の効果】

【００１１】

中温度のヒートシンクまたは熱交換槽を用いて反応槽の温度を制御する本発明の利点として、１）中温度についての厳密な温度制御が可能なこと、２）中温度についての安定した温度維持が可能なこと、３）中温度への移動時にオーバーシュートが無いことが挙げられる。温度のオーバーシュート問題を解決することができることについては、大きな熱容量を持つヒートシンクまたは熱交換槽の温度はほぼ一定であることから、反応槽表面の温度とヒートシンクまたは熱交換槽の温度はほぼ瞬時に平衡化することができる。本発明において、反応槽およびサンプルの熱容量は、ヒートシンクまたは熱交換槽と比較して微々たるものであり、また、熱電素子（例：ペルチエ素子）の動作についてもヒートシンクまたは熱交換槽の温度が安定しており、また、その安定点の温度（中温度）が、高温度と低温度の中間に位置する事から、従来の室温から動作させていたペルチエ素子制御型遺伝子増幅装置に対して、高温度あるいは低温度に移動させるときの熱の移動量が最小となり、また、ヒートシンクまたは熱交換槽の温度が安定している限り、高温度あるいは低温度への温度変化の動作に必要な電流量を見積もりやすい。また、ペルチエ素子の動作によって局所的にヒートシンクまたは熱交換槽から熱が奪われたとしてもヒートシンクまたは熱交換槽の熱容量が十分に大きい事から熱勾配は基本的に発生しない。勿論、ペルチエ素子等の熱電素子ＯＦＦ時の反応槽の温度はヒートシンクまたは熱交換槽の温度を超えることはない。本発明によれば0.5秒以内に30℃以上温度を変化させることが可能である。したがって、本発明によれば、温度変更に必要な時間を極めて短くできることから、例えば、ＰＣＲ反応を遂行するためのトータルタイムを従来の装置よりも格段に短縮することが可能である。

【００１２】

本発明によれば、２温度または３温度ＰＣＲを行うために従来の液体還流型反応制御装置において必要であった、異なる２温度または３温度の各液体リザーバからの液体を交互に熱交換槽に循環させるためのバルブ等のスイッチング稼働部が必要でないという利点が提供される。あるいはまた、２温度もしくは３温度に対応可能な複数のリザーバを備える液体還流型反応制御装置を用いて本発明を実施する場合には、バルブ等のスイッチング機構を用いて異なる複数の温度に中温度を設定することが容易に実現可能であるという利点が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】高速液体還流型の反応制御装置（例：PCR装置）の全体構成を示す模式図である。

【図２】高速液体還流型の反応制御装置に使用される熱交換槽の概略図である。

【図３】本発明の装置に使用される反応槽の形態と凍結乾燥試薬の溶解方法を示す模式図である。

【図４】本発明の装置に使用される円柱型反応枠と熱交換槽への取り付け方法を示す模式図である。

【図５】高速液体還流型の反応制御装置に使用されるバルブの切り替えシーケンスを示す模式図である。

【図６】高速液体還流型の反応制御装置を用いて行った（Ａ）温度変化に関するデータと、（Ｂ）ＰＣＲ反応の結果を示す図である。

【図７】本発明の装置に使用されるスライドガラス型反応枠と熱交換槽への取り付け方法

を示す模式図である。
【図８】高速液体還流型の反応制御装置に使用されるスライド型ピストンバルブの駆動機構を示す模式図である。
【図９】高速液体還流型の反応制御装置に使用されるスライド型ピストンバルブの駆動機構を示す模式図である。
【図１０】高速液体還流型の反応制御装置に使用される回転式バルブの駆動機構を示す模式図である。
【図１１】高速液体還流型の反応制御装置に使用されるメンブレンによる温度変化機構を示す模式図である。
【図１２】高速液体還流型の反応制御装置に使用される温度設定型バルブの駆動機構を示す模式図である。
【図１３】高速液体還流型の反応制御装置の構成の一例を用いて、ＤＮＡ反応チップの配置、上面の温度制御、ならびに蛍光検出の方法の一例を示す模式図である。
【図１４】高速液体還流型の反応制御装置の反応槽の構成の一例を用いて、ＤＮＡ反応チップの配置、上面の温度制御、ならびに蛍光検出の方法の一例を示す模式図である。
【図１５】高速液体還流型反応制御装置の反応槽における、反応槽チップの搬送系ならびに逆転写反応を行う装置構成の一例を用いて、ＤＮＡ反応チップの配置、上面の温度制御、ならびに蛍光検出の方法の一例を示す模式図である。
【図１６】本発明の反応槽における試料の蛍光検出方法の構成の一例を示す模式図である。
【図１７】本発明の反応槽における試料の蛍光検出方法の構成の一例を示す模式図である。
【図１８】本発明の反応槽の構造の一例を示す模式図である。
【図１９】本発明の反応槽の構造の一例と検出方法の一例を示す模式図である。
【図２０】本発明の反応槽の構造一例を示す模式図である。
【図２１】高速液体還流型の反応制御装置の構成の一例を示す模式図である。
【図２２】光加熱型の反応制御装置の構成の一例を示す模式図である。
【図２３】光加熱型の反応制御装置の構成の一例でのＮＤフィルターの透過率の角度依存性を示す模式図である。
【図２４】本発明の構成の一例を示す模式図である。
【図２５】本発明のＤＮＡ試料の温度変化とペルチエ素子の動作を模式的に示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
以下、図面を参照しながら本発明の実施形態について説明するが、これらの実施形態は例示であって、本発明の範囲がこれらに限定されるものではない。
【００１５】
図１は、高速液体還流型の反応制御装置の一実施形態の全体構成を示す模式図である。この反応制御装置は、典型的には、反応槽（reaction vessel）１、反応槽枠２、熱交換槽（heat exchange chamber）３、液体リザーバタンク（liquid reservoir tank）４、熱源５、攪拌機構６、ポンプ７、切り替えバルブ８、バイパス流路９、および補助温度制御機構１０を備える。好ましくは、さらに蛍光検出器２０１、および制御信号２０３を送るための制御解析部２０２、および光学窓（または孔）２０４を備える。
【００１６】
好ましい実施形態では、複数の液体リザーバタンク４は、液体の高速循環中に各タンク中の液体の高さに違いが発生してこれが水位高さの違いによる圧力差を発生させないように、微量の液体がタンク間を移動できる細い連結チューブ１５によって接続されている。また、短時間で熱交換を実現するためには、図１に示されているように、各リザーバタンク４から常時、ポンプ７によって液体を循環させ、熱交換槽３に誘導しない場合も、切り替えバルブ８によってバイパス流路９に液体を誘導して常に循環させる。また、循環する

液体は、リザーバタンク４に戻る前に補助温度制御機構１０によって、リザーバタンク４の液体の温度と同じ温度となるように微調整をして還流するように配管されている。ここで補助温度制御機構１０は、加温機構と冷却機構が組み込まれており、ペルチエ素子等によって加温と冷却の両方を実現する事も、あるいは抵抗加熱機構による加温系と空冷フィン型の冷却機構を用いる事も可能である。また、液温度センサー１６が、各リザーバタンク４および各補助温度制御機構１０に配置されており、これらのセンサーからの温度情報から液温度を各々希望する温度に制御できるように熱源５および補助温度制御機構１０を制御することができる。ここで液温度センサーは、液体に直接接触しても腐食しない素材よりなるサーミスタあるいは防蝕被覆された熱電対などを用いる事が望ましい。

【００１７】

また、好ましい実施形態では、各リザーバタンクには、熱源からの熱供給によって発生する水蒸気等の気体によるリザーバタンク内の圧力上昇があった場合に、タンクの破壊を防止し、また、気体の圧力差に原因した連結チューブを通じての液面高さの発生を防ぐために、発生した気体を効果的にタンク外に排出する圧力リーク弁２００３を配置している。

【００１８】

反応槽１は、典型的には、窪み（ウェル）を複数個有するアルミ、ニッケル、ないし金の薄板などから構成されている。窪み領域における薄板の厚さは、熱伝導性を高めるため周囲に比べて薄く構成されていることが好ましく、典型的には10から30ミクロン程度の厚さであるがこれに限定されない。隣り合った窪みの間の領域は全体的に強度を担保するためにより厚くなっていることが好ましく、典型的には、厚さが100ミクロンから500ミクロンの範囲にあるがこれに限定されない。反応槽１は、典型的には、四角、円形などの形状の反応槽枠２の底面に固定されて一体的に形成される。反応槽１および反応槽枠２は、典型的には、熱交換槽３に対して着脱可能に構成される（図４を参照）。

【００１９】

熱交換槽３に導入される液体の温度は、液体リザーバタンク４の内部に配置されている熱源５により制御されている。好ましくは、熱源５の表面から迅速に熱を奪い、液体リザーバタンク４内部の温度を均一にするために、攪拌機構６が備えられている。液体リザーバタンク４中の液体はポンプ７により流路内部に導かれる。切り替えバルブ８によって、液体は熱交換槽３に導かれるか、バイパス流路９に導かれて熱交換槽３を経ずに直接液体リザーバタンク４に戻る。必要に応じて、補助温度制御機構１０によって、循環中に変化した液体の温度をタンク４内の設定温度と同じ温度に修正してから排出されるように緻密に制御され、液体リザーバタンク４内部の温度変動を抑制する。

【００２０】

熱交換槽３に導入される液体としては、水を用いてもよいがこれに限定されず、熱容量が大きく、かつ、粘性が低い液体（例：液体アンモニア）ならば任意のものを用いることができる。ただし、安全性の観点から非毒性、非可燃性の液体を用いる事が望ましい。また、例えば、水より沸点の高い液体を用いることで、確実に、サンプル液を１００℃にしたり、あるいは、水より凝固点の低い液体を用いることで、装置内で循環する液体の凝固を防ぎながら水の凝固点までの温度の変化を確実に行うこともできる。

【００２１】

好適には、図１に示すように、反応槽枠２には、反応槽１内のサンプル液の反応によって変化するサンプル液中の蛍光色素の蛍光強度の変化を、１つあるいは複数の反応槽の各々について計測できるように、蛍光色素の励起光ならびに蛍光を透過する光学窓２０４が配置されている。また、蛍光検出器２０１が配置されることで、計測された各反応槽１の蛍光強度の時間変化を計測することができる。図１の実施例では、複数の蛍光検出器２０１各々の内に、励起光照射機構と、蛍光検出機構が具備されており、例えば、ＰＣＲ反応を行わせる場合には、異なるプライマー、あるいは異なるサンプル液を滴下した複数の反応槽１の各々の異なるＰＣＲ増幅情報を独立して計測することができる構成となっている。また、蛍光検出器２０１で取得された蛍光強度データは、制御解析部２０２で記録され

、ＰＣＲ反応によって得られたサンプル液内のＤＮＡ量、あるいは、ｍＲＮＡ量を見積もる機能を有する。さらに、制御解析部２０２では、切り替えバルブ８の切り替え情報を取得することで、バルブ切り替え後のサンプル液の温度変化が目的の温度に達したかどうかを、蛍光強度の時間変化から見積もる機能、およびその結果に基づいてバルブ切り替えを制御する機構も有する。これは、蛍光色素が普遍的にもつ水分子の運動に基づいた蛍光消光が液温に依存することを利用して、蛍光強度の単位時間での変化量が小さくなること、あるいは、ゼロとなることから見積もるものであり、特に、ＤＮＡを変性させる高温状態の達成の確認に有効である。

【００２２】

また、図１に示す実施例では、各反応槽１に１つの検出器を配置する構成を示したが、蛍光励起用光源と冷却ＣＣＤカメラなどの蛍光定量検出が可能なカメラを組み合わせて複数の反応槽１の蛍光強度変化を計測してもよい。あるいは、反応槽１の数より少ない検出器を用いる場合には、Ｘ－Ｙ面で高速に移動することができる機械式駆動機構を検出器と組み合わせることで、すべての反応槽１の蛍光強度を計測してもよい。

【００２３】

また、サンプル液の容量は、１ウェル当たり０．１μＬ～１００μＬの範囲を使用することができるが、これに限定されない。好ましいサンプル液の容量は、１ウェル当たり０．１～数十（例えば、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０）μＬであるが、必要に応じて、さらに低容量で、例えば、１ウェル当たり０．５μＬ～１０μＬ、１ウェル当たり１μＬ～５μＬ、１ウェル当たり１μＬ～２μＬ等での使用も好適である。ウェルにはサンプル液の他に、サンプル液の蒸発を防ぐためのミネラルオイルなどを含有させてもよい。ミネラルオイルの容量としては、数μＬ（例：３～４μＬ）程度が好ましいが、これに限定されず、ウェルの大きさやサンプル量により適宜変更しうることは当業者に明らかである。

【００２４】

図２は、高速液体還流型の反応制御装置に使用される熱交換槽３の概略図である。熱交換槽３は、基本構成として、異なる温度の液体を導入するインレットＡ（１１）、インレットＢ（１２）を備える。また、熱交換槽３は、熱交換槽３の液体を液体リザーバタンク４に戻すための複数のアウトレット、アウトレットＡ（１３）およびアウトレットＢ（１４）を備える。図２Ａは、液体リザーバタンク４からのある温度の液体をインレットＡ（１１）から導入し、アウトレットＡ（１３）から排出する様子を、図２Ｂは、液体リザーバタンク４からの別の温度の液体をインレットＢ（１２）から導入し、アウトレットＢ（１４）から排出する様子を、それぞれ模式的に示す。インレットの数は２に限定されず、サンプル液の温度を変化させたい複数の温度に一致する数だけ２温度分以上の複数を用意することができる。例えば、３温度系を達成したい場合にはインレットの数は３つとなる。アウトレットの数もインレットの場合と同様、２に限定されない。なお、図２中の矢印は熱交換槽３に導入または熱交換槽３から排出する液体の流れる方向を大まかに示したものである。

【００２５】

熱交換槽３と液体リザーバタンク４との間を循環させる液体の総容積は、循環に用いる液体の流速、液体の熱容量や温度の安定性などを考慮して、例えば、反応槽３の温度変化の高速性と温度安定性を実現するために流速毎秒１０mL以上とした場合には、通常数十ｍＬ以上の総容量であり、好ましくは、１００ｍＬ以上、より好ましくは、２００ｍＬ以上、さらに最も好ましくは、３００ｍＬ以上である。容積の上限は、装置の可搬性等を考慮して適宜設定できる。

【００２６】

熱交換槽３の容量は、ウェル当たりのサンプル量の約１０倍以上が好ましく、約１００倍以上であることがより好ましく、約１０００倍以上であれば最も好ましい。典型的には、熱交換槽の容量は、１ウェルに対して約０．０１ｍＬ～１０ｍＬであり、より好ましくは、約０．０５ｍＬ～数ｍＬ（例えば、９、８、７、６、５、４、３、２、１ｍＬ）であ

り、最も好ましくは、約０．１ｍＬ～２ｍＬである。

【００２７】

図３は、本発明の装置に使用されうる反応槽の形態と凍結乾燥試薬の溶解方法を示す模式図である。色々な形状の反応槽またはウェルを用いることが可能であり、図３Ａは一つの例として、熱交換槽の液体と接する面が、フラットな反応槽Ａ（２１）、半球状である反応槽Ｂ（２２）、三角錐状である反応槽Ｃ（２３）、球状である反応槽Ｄ（２４）、球状の凹みの中に円錐状の構築物を持った液滴の安定した位置の保持と接触表面積の拡大を可能とした反応槽Ｃ’（２３１）を、それぞれ示している。熱伝導の効率を考えると、熱交換槽の液体と接する面の面積が大きいほど効率がよいことは当業者ならば容易に理解できる。

【００２８】

反応に必要な試薬は凍結乾燥しておくと便利である。図３Ｂに示すように、反応槽２６の底部に凍結乾燥試薬２５を調製しておくことは可能である。また、サンプルを分注する際に用いられる分注チップ２７内部にプラグ状の凍結乾燥試薬２５を形成しておけば、サンプル液２８を上下に移動させることにより試薬をサンプル中に溶解することが可能である。または、ナイロン繊維等が束ねられている繊維玉２９表面に凍結乾燥試薬２５を形成しておき、反応槽２６内部のサンプル２８中に挿入して攪拌することにより凍結乾燥試薬を溶解することも可能である。

【００２９】

図４は、本発明の装置に使用されうる円柱型反応槽枠３２、およびその熱交換槽３７への取り付け方法を示す模式図である。薄膜から構成されている反応槽を直接ハンドリングするのは不便であるので、図４Ａに示すように、反応槽３１を反応槽枠３２に固定すると便利である。反応槽枠３２は断熱性材質であるポリスチレン、ポリカーボネート、ＰＥＥＫ，アクリル等で形成することが望ましい。また、反応槽３１との結合面積をできるだけ小さく（例：５ｍｍ^{2}以下）抑えることが、反応槽３１の迅速かつ高精度な昇温、降温に望ましい。

【００３０】

図４Ｂは、反応槽３１を熱交換槽３７に装着する１つの態様として、反応槽枠３２の表面にネジ山３４を形成しておき、反応槽枠３２を熱交換槽３７の反応槽受け口３３にねじ込む方法を示す。図４Ｂに示すように、水密性の保持のために、開口部にシール３５を装着することが望ましい。図４Ｃはさらに別の装着方法を示す。図４Ｃに示すように、テーパー状反応槽枠３６を採用し、圧力のみで熱交換槽３８に装着することも可能である。

【００３１】

図５は、高速液体還流型の反応制御装置に使用されるバルブの切り替え機構の具体例を示す。反応槽に液体を導入するためのインレットバルブＡ（４１）、インレットバルブＢ（４３）、外部に導くためのアウトレットバルブＡ（４２）とアウトレットバルブＢ（４４）が示されている。インレットバルブＡ（４１）から導かれる液体はアウトレットバルブＡ（４２）から液体リザーバタンク４に戻り、インレットバルブＡ（４３）から導かれる液体はアウトレットバウルＢ（４４）から別の液体リザーバタンク４に戻る。この二つの状態を交互に繰り替えることにより、反応槽中のサンプルを反応することができる。さらに望ましいバルブ切り替え方法としては、上記の二つの状態以外に、インレットバルブＢ（４３）とアウトレットバルブＡ（４２）、もしくはインレットバルブＡ（４１）とアウトレットバルブＢ（４４）が一瞬の間同時に開放することにより、異なる温度の液体が混合することを抑制でき、それぞれの系の液体リザーバタンクの温度制御が容易になる。

【００３２】

液体の循環速度は、特に限定されないが、通常約１ｍＬ／秒～１００ｍＬ／秒であり、より好ましくは、５ｍＬ／秒～５０ｍＬ／秒であり、最も好ましくは、７ｍＬ／秒～１５ｍＬ／秒である。リザーバタンク中の液体の温度を低下させることなく熱交換槽３まで循環させるためには、液体がポンプ７によって常にリザーバタンクから１０mL／s以上の高速で循環することが望ましい。

【００３３】
図６Ａは、上記の機構を用いることによって実現できた温度制御に関するデータから得られたグラフを示す。図６Ａに示すように、1.5秒といった短時間で、温度を60℃から92℃に昇温させ、また60℃に戻すことが可能である。図６Ｂは、リアルタイムPCRによる結果を示すグラフである。PCRを行うときの溶液条件は以下のとおりである。反応バッファー 1.0 μL、2mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 1μL、25 mM 硫酸マグネシウム 1.2 μL、10%牛胎仔血清 0.125μL、SYBR Green Ｉ 0.5 μL、プライマー2種類各0.6μL、 滅菌水 3.725μL、KOD plus polymerase 0.25μL、ゲノムDNA1.0 μLの割合で混ぜ合わせた。温度条件としては、まず95℃ 10 sec行い、次に95℃ 1 sec、60℃ 3 secの温度変化を40サイクル行った。液体の循環速度は、約１０ｍＬ／秒であった。

【００３４】
図７は、本発明の装置に使用されうる反応槽５９および反応槽枠５１の熱交換槽への脱着方法に関するバリエーションを示す。反応槽５９は、スライドガラス型反応槽枠５１に張られて取り付けられている（図７Ａ）。このスライドガラス型反応槽枠５１を熱交換槽に装着するにあたって、ガイドレール５３に沿って反応槽枠５１を横にスライドさせ、シール５４に押し付けて固定することができる（図７Ｂ）。または、スライドガラス型反応枠５１をスライド受け口５５に挿入して、ヒンジ５６を活用して、シール５７に押し付けることも可能である（図７Ｃ）。

【００３５】
図８は、高速液体還流型の反応制御装置に使用されるバルブの切り替え機構のバリエーションを示す模式図であり、図５に示したものとは異なるスライド型ピストンバルブの駆動機構を示す。反応槽６６の温度を変えるバルブ機構として左右にスライドできるピストン６５を用いる。ピストン６５の左側にはインレットＡ（６１）から熱交換槽６７に液体が導入され、アウトレットＡ（６２）から外部に導かれる。ピストン６５の右側にはインレットＢ（６３）から熱交換槽６７に液体が導入され、アウトレットＢ（６４）から外部に導かれる。ピストン６５が反応槽６６に対して右にスライドすると、反応槽６６はインレットＡ（６１）から導入された液体の温度と平衡に達し、逆に左側にスライドするとインレットＢ（６３）から導入される液体の温度と平衡に達する。また、ピストン６５が反応槽６６の真下に位置する場合には、液体が漏れることなく反応槽６６を外すことができる。ピストン６５は断熱性に勝れた素材で製作するか、内部が空洞になっており気体で満たされていたり、または真空状態にあることが望ましい。なお、図８中の矢印は、液体の流れる方向を大まかに示す。

【００３６】
図９は、高速液体還流型の反応制御装置に使用されるピストンバルブのピストンの駆動機構のいくつかのバリエーションを示す。一つの方法としては、ピストン７１がピストンロッド７２と一体になっており、外部から直接動かす方法である（図９Ａ）。別の方法としては、ピストン７３を鉄、ニッケル等の強磁性材料で作製するか、その他の素材で作製されたピストンの内部に磁石７４を組み込む。外部に電磁コイル７５を設置し、電流を制御することにより、ピストン７３を左右にスライドする（図９Ｂ）。さらなる方法としては、インレット側の圧力もしくはアウトレットの流体抵抗を制御することにより、ピストン７６の両側での圧力差を利用してピストン７６を左右にスライドすることも可能である（図９Ｃ）。なお、図９中の白抜き矢印はピストンの動く方向を示し、黒塗り矢印は、流体の流れを示し、矢の向きによって流体の流れる方向を、矢の太さによって流量を大まかに示す。

【００３７】
図１０は、高速液体還流型の反応制御装置に使用されるバルブの切り替え機構の別の形態を示す。回転軸としての棒８２が結合されている傾いた楕円形の板からなる回転弁８１が、断面が円形の熱交換槽８３内部に挿入されている。回転弁８１は熱交換槽８３を左右に分断しており、回転軸８２を回すことにより、熱交換槽の右もしくは左から導入される液体を反応槽８４に導くことができる。図１０における回転弁８１の形状としては、傾斜

した平板であるが、その他の螺旋ネジ等の形状も可能であり、回転軸を回転させることにより同様な効果を生み出す形状であればよい。なお、図１０中の黒塗り矢印は回転軸８２の回転方向を示し、白抜き矢印は、液体の流れる様子を大まかに示す。

【００３８】

図１１は、バルブ以外の構造により液体を置換する構造を示す。熱交換槽９８はメンブランＡ（９５）とメンブランＢ（９６）によって仕切られている。インレットＡ（９１）から導入された液体はアウトレットＡ（９２）により外部に導き出される。メンブランが存在するが故、インレットＢ（９３）やアウトレットＢ（９４）から導き出されることはない（図１１Ａ）。インレットＡ（９１）から導入される液体の圧力が、インレットＢ（９３）から導入される液体の圧力に勝る場合には、メンブランＡ（９５）とメンブランＢ（９６）を左側に押し出すことによって、インレットＡ（９１）から導入される液体の熱が反応槽９７に伝わる（図１１Ｂ）。インレットＡ（９１）とインレットＢ（９３）から導入される液体の圧力の関係が逆の場合には、反応槽９７の温度はインレットＢ（９３）から導入される液体の温度と平衡状態に達する（図１１Ｃ）。メンブランは耐熱ゴム等、耐熱性に優れた薄い膜から作製することが望ましい。なお、図１１中の矢印は、液体の流れる方向を大まかに示す。

【００３９】

図１２は、高速液体還流型の反応制御装置に使用される温度設定型バルブのさらに別の駆動機構を示す模式図である。ここにおいては、設定できる温度は二つに限定されるものではない。図１２には、反応槽の温度を３つ以上設定できる構造を示す。熱交換槽１０３には、側面に溝１０２が形成されたロータリーバルブ１０１が挿入されている。ロータリーバルブ１０１の両側にはインレットとアウトレットが設けられており、例えばインレットＡ（１０４）から導入された液体は流路１０８を経て溝１０２に流れこみ、反応槽１０９に熱を伝えてからアウトレットＡ（１０５）から外に導かれる。それに対して、インレットＢ（１０６）から導入された液体は反応槽１０９に接することなく、アウトレットＢ（１０７）から外に導かれる。しかし、ロータリーバルブ１０１を回転することにより、任意のインレットから導入された液体を反応槽と接することが可能である（図１２Ｃ）。経過時間１１１に伴ってロータリーバルブ１０１を回転することにより、図１２Ｃのグラフに示すように温度１１０を変化させることが可能である。ロータリーバルブ１０１は断熱性材料から作製されていることが望ましい。

【００４０】

図１３は、高速液体還流型の反応制御装置の３温度型のシステムの制御系部分の記述を省略した温度制御機構について一実施形態の全体構成を示す模式図である。高速PCR反応を起こすための反応制御装置部は、典型的には、高速で循環する液体とPCR反応液滴との熱交換を行うための反応槽（reaction vessel）１、反応槽上のPCR反応液滴への外部からのコンタミネーションと液滴の蒸発を防ぐための反応槽枠２、熱交換のための高速循環液体が導入される熱交換槽（heat exchange chamber）３、３つの温度の液体をそれぞれの温度で保持する３つの液体リザーバタンク（liquid reservoir tank）４、ならびに各リザーバタンクに対して熱源５、攪拌機構６、ポンプ７、切り替えバルブ８、バイパス流路９、および補助温度制御機構１０を備える。高速PCRを実現するためにそれぞれのリザーバタンクから液体は、液体の流れの方向１８の矢印の方向に循環しており、ジョイント９０にて各リザーバタンクから各切り替えバルブ８を経て流路が接合され、熱交換槽３への流路へと誘導される構成となっており、また、熱交換槽３から流出する液体も下流側のジョイント９０にて各リザーバタンクへの還流流路に分岐しており、熱交換槽３の上流側と下流側の双方の各分岐流路にある各切り替えバルブ８を、同時に連動させて高温、中温、低温の各リザーバタンク４のいずれかの液体の循環のために切り替えることで、瞬時に熱交換槽３へ導入される高速循環液体を高温、中温、低温のいずれかに切り替えることができる。ここで、図１３では装置の構成ならびに配管の配置をわかりやすく示すために模式的に示した事から、各パーツ間の配管の長さが実際の長さと同じように示されていないが、ジョイント９０と各切り替えバルブ８の間を繋ぐ管の長さは、残留する高速液体の量が

ほとんど無いようにジョイント９０に隣接するかたちで切り替えバルブ８は配置されていることが好ましい。また、各リザーバタンク４から熱交換槽３に供給される高速循環液体の温度降下を最小限とするため、各リザーバタンク４から熱交換槽３への流路長さが最小長さとなるように、各リザーバタンク４と熱交換槽３の間に組み込まれるパーツはポンプ７、切り替えバルブ８の２つのパーツ（機構）が組み込まれているだけの最少数のパーツ組み込みの構成となっていることが好ましい。他方、熱交換槽３から各リザーバタンク４に還流する流路の長さについては若干長くなっても下流補助温度制御機構１０によって温度補正をした後にリザーバタンク４に還流するため問題はない。また、ポンプ７の配置位置は、熱交換槽３に確実に流速を維持して高速循環液体を供給し、また、熱交換槽３に供給しないときは切り替えバルブによって瞬時に、かつ、確実に補助温度制御機構１０を経て各リザーバタンクに還流させるために、ポンプ７を各リザーバタンク４と熱交換槽４に供給する上流側の切り替えバルブ８の間に配置し、常に高速還流液体をリザーバタンク４から直接「押し出す」構成となるように配置されていることが好ましい。また、各リザーバタンク４から熱交換槽３へ供給される高速循環液体の温度降下を最小限にするため、これらの流路についての流路内径は２ｍｍ以上であることが望ましい。

【００４１】

図１の例でも説明したが、各リザーバおよび各補助温度制御機構には、液体の温度を計測する液温度センサー１６が配置されており、このセンサー１６の各情報に基づいて、各リザーバタンク４の熱源５による温度制御、および各補助温度制御機構１０を通過する液体の温度をリザーバタンク４の温度と同じ温度に微調整することができる。また、この補助温度制御機構１０を導入する事で、リザーバタンク４の温度緩衝機能は最小とすることができるため、リザーバタンク４の容量、すなわち循環する液体量を最小に保つ事が可能となる。また、本実施例では、図１の実施例の二温度PCR反応に対して、変性、アニーリング、伸長の３つの状態それぞれに対応する３温度PCR反応を実現できる構成となっている。ここで、高温、中温、低温の３温度の制御についてであるが、高温については（図１３では中央のリザーバタンク４）変性のために９５℃以上の高温を保つためリザーバの温度も加温系のみで十分であるが、中温、低温リザーバについては、用いる酵素の種類に応じて、その反応温度すなわちリザーバ温度の微調整を行う必要がある場合がある。ここで、各リザーバタンク４内の液体の温度を上昇させることは熱源からの熱量の供給で容易に実現できるが、温度を下げる場合には、例えば、リザーバタンク４に付加された補助液体放熱機構１７によって液温度を下げることができる。この補助液体放熱機構１７は、リザーバタンク４内の液体の温度を下げたいときにのみ動作させ、機構内に組み込まれたポンプ系によって高速でリザーバ内の液体を吸入し、空冷式あるいはペルチエ素子等の冷却機構が組み込まれた流路を通過するプロセスで液体の熱を放熱し、最終的にリザーバタンク４内に設置された液温度センサー１６によって設定した液温度になることが確認されるまで液体の冷却を行うことができる。

【００４２】

そのため、各リザーバタンク４の液体は、図１から図６の説明でも記述したように、熱源５からリザーバタンク４に熱を供給して温度センサー１６のフィードバック制御によって各リザーバの温度を高温（熱変性温度）、中温（伸長反応温度）、低温（アニーリング反応温度）に保つ。また、熱源の位置は、室温より高温での温度制御を行う事から、熱対流を効果的に行うために、リザーバタンク４の底面に配置する事が望ましく、また、リザーバタンク４内の液体の温度を熱対流のみならず、より高速に一様にするために攪拌機構６などの液体の温度分布を一様にする機構が動作することで一様になるように構成されている。そして、各リザーバタンク４から常時、例えば、流速１０mL／秒でポンプ６によって液体が排出されており、そのポンプの後段に配置された切り替えバルブ８によって、液体を熱交換槽３に誘導しないときは、バイパス流路９を通って補助温度制御機構１０に還流されて、液体の温度をリザーバタンク４の設定温度に微調整した後に、リザーバタンク４に還流される。すなわち、リザーバタンク４→ポンプ７→切り替えバルブ８→補助温度制御機構１０→リザーバタンク４という循環を行って準備態勢を整えておく。他方、反応

槽１の温度を、この液体の温度に変化させたいときには、ポンプ７後段の切り替えバルブ８を熱交換槽３方向に切り替え、かつ、熱交換槽３から排出される液体の流れ方向を制御する切り替えバルブ８も切り替えて、リザーバタンク４→ポンプ７→切り替えバルブ８→熱交換槽３→切り替えバルブ８→補助温度制御機構１０→リザーバタンク４という循環として、反応槽１の温度を、所定のリザーバタンク４の液体の温度と同じ温度に変化させる。

【００４３】

また、３つのリザーバタンク４において、この切り替えプロセスでの液体の還流に多少の量的なずれが発生するため、３つのリザーバタンクを独立して運用する場合には、反応プロセスを繰り返すうちに液面の高さに差が発生し、タンクからの液体の溢れ出しや、３つのタンクからの送液速度の違いが発生する可能性がある。それに対処するために、補助的に、液面高さを揃える機構として連結チューブ１５が配置されていてもよい。この連結チューブ１５は、液面高さを揃えることが目的であり、異なる温度の液体を積極的に移動する事を目的としていないため、十分に細いチューブであることが望ましい。また、その配置する位置は、各リザーバ４の底面付近が望ましい。

【００４４】

３温度のリザーバタンク４を用いてPCR反応を行う場合について、図６Bの二温度の場合のPCR反応と同様に、典型的な例を用いて本装置システムの動作を説明する。ここでは、三温度PCR反応を以下のようなステップでの反応を行う。最初に初期反応として、反応を行う二本鎖ＤＮＡを熱変性させるために９４℃以上の温度となるように９５℃あるいは９６℃に設定された高温リザーバタンク４から高温の液体を１０秒以上還流し、反応槽１の温度を１０秒以上９４℃以上となるようにする。ここで、熱変性を行う場合の温度は、反応槽１全体の温度分布に差が発生する場合であっても最も温度の低い場所の温度が９４℃以上となるように、上記高温リザーバタンク４の温度を設定するようにする。これによって一本鎖ＤＮＡが作られるとともに酵素類によってはこれによってPCR反応に必要な酵素類が活性化されることとなる。次に、プライマーとＤＮＡを特異的に結合させるアニーリングの工程を反応槽の温度がおよそ６０℃となるように液温度を６０℃に設定した低温度のリザーバタンク４からの液体の還流によって反応槽１の温度を６０℃にする循環を１秒行い、最後に、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼによる相補ＤＮＡ鎖の伸長反応をおよそ７２℃に反応槽１がなるように、中温度のリザーバタンク４の温度が７２℃となるように設定された条件で中温度のリザーバタンク４の液体の循環を３秒行い、伸長が終了したところで、再度、熱変性の工程を高温度リザーバタンク４からの９５℃液体の循環１秒で９４℃以上の温度に反応槽１温度を進め、次に、同様に、低温度６０℃を１秒、中温度７２℃を３秒という反応を１サイクルとして、およそ４０サイクルほど反応を繰り返すことで、ターゲットとしたＤＮＡ配列領域の増幅を行うことができる。ここで、実際にリザーバタンク４の温度から温度の下降が発生しないように熱交換槽３に液を送るためには十分な高速で液体を還流する必要がある。本実施例では、液体の循環速度は、約１０ｍＬ／秒で温度降下を防ぐかたちで温度変化を行わせる事が可能であった。また、上記実施例では、アニーリング温度は設計するプライマーによって最適なプライマーとの結合温度が異なるため、後で述べる融解曲線解析を用いて最適なアニーリング温度を算出して、その温度に低温度リザーバタンク４の温度を設定する事が望ましい。また、上記実施例では、伸長反応の時間を３秒と設定したが、これに限定されず、ＤＮＡポリメラーゼ酵素の伸長速度と標的配列サイズの関係から算出することで設定時間を適宜決定することができる。例えば、代表的なＴａｑポリメラーゼによるＤＮＡ伸長速度は、70℃において約60ヌクレオチド/秒であることから、この酵素の場合であれば、３秒の伸長反応でおよそ１５０～１８０塩基長のターゲット領域を増幅することができる。そのためこの装置システムでの高速PCR反応を効果的に実現するためには、ターゲット領域を数百塩基長に絞り込んでプライマー設計を行う事と、目的に応じて最適なＤＮＡポリメラーゼ酵素を選ぶこととなるが、なるべく高速な反応を行うポリメラーゼを用いる事が望ましい。

【００４５】

また、上記３温度でのサイクルを行う場合に、エンドポイント型の計測と、実時間（リアルタイム）での増幅計測という少なくとも２つの計測法を組み合わせることができる。図１でも示したが、本発明の高速遺伝子増幅装置には、光学的にターゲット遺伝子産物の増幅をモニターする光学検出系を組み込むことが可能である。一般にインターカレーター型と呼ばれる二本鎖ＤＮＡの水素結合領域に取り込まれる事で蛍光強度が大きく変化する蛍光色素を用いた計測では、ターゲットＤＮＡ産物が二本鎖となっていることが産物の量を定量的に計測する上では重要である。そのため、エンドポイント型では、反応が終了した後に計測する事から、反応終了後に二本鎖ＤＮＡの状態での計測が可能な温度範囲で安定化させたところで計測するか、あるいは最後の増幅サイクルが終了した直後に、蛍光強度を測定し、増幅反応開始前の蛍光強度と比較解析することで二本鎖ＤＮＡによる蛍光強度の増幅量を見積もる事が望ましい。ここで重要な注意点として、蛍光色素は溶液中での蛍光強度が溶液温度に依存して変化する熱蛍光消光現象があることから、計測するときの温度は、かならず同じ温度で行う事が重要である。

【００４６】

他方、実時間計測では、増幅サイクルごとの増幅量を見積もる事から、各サイクルでの計測が必要である。各サイクルでの計測するタイミングは上記伸長反応が終盤となり、ちょうど熱変性を開始する前に計測することが望ましい。ここでも同様に熱蛍光消光の影響を排除するために、各サイクルでの計測時の溶液温度は同じ温度とすることが望ましい。また、一般にタックマンプローブ法と呼ばれる、５’-３’エキソヌクレアーゼ機能を持ったＤＮＡポリメラーゼと蛍光エネルギー移動に対応するためにドナー蛍光色素とアクセプター蛍光色素を組み込んだプローブＤＮＡ断片とを用いた計測の場合にも、５’-３’エキソヌクレアーゼ反応はＤＮＡポリメラーゼの伸長反応時に進むことから、エンドポイント型では、計測開始前のドナー蛍光色素とアクセプター蛍光色素、それぞれの蛍光波長での蛍光強度を測定した後、遺伝子増幅反応を行い、終了した後に、ドナー蛍光色素とアクセプター蛍光色素、それぞれの蛍光波長での蛍光強度を測定して、プローブＤＮＡが実際にどれだけ酵素によって分解されたかを定量的に検出することで、ターゲット塩基配列の有無を解析することができる。ここでも同様に熱蛍光消光の影響を排除するために計測時の溶液温度は同じ温度とすることが望ましい。他方、実時間計測では、プローブＤＮＡ断片の分解反応は、ポリメラーゼの伸長反応時に進むことから、各増幅サイクルの伸長反応の終了時、あるいは熱変性時、アニーリング時でのドナー蛍光色素の波長とアクセプター警告色素の波長での蛍光強度計測を行えば良い。ただし、ここで注意すべき点として、ここでも同様に熱蛍光消光の影響を排除するために、各サイクルでの計測時の溶液温度は同じ温度とすることが望ましい。

【００４７】

また、本発明の高速PCR反応に使う反応槽１は、使い捨てのチップとすることが可能であるため、交換を行う場合には、熱交換槽３の中を満たしている液体を排出して、液体が無い状態にしてから反応槽枠２を外し、そして反応槽１を外す手順をとる必要がある。そこで、図１３に示した実施例においては、空気の流入管２００１が弁（切り替えバルブ）８を挟んで熱交換槽３と接続するように配置されており、また、熱交換槽３の液体の排出管２００２が同様に弁（切り替えバルブ）８、液体排出ポンプ６を経て、リザーバタンク４のひとつの補助温度制御機構１０への循環経路に接続されるように配置されている。実際に、三温度のリザーバタンク４の液体を用いた遺伝子増幅反応等を行うときには管２００１、２００２に付けられている２つの弁８は閉じられており、３つのリザーバタンク４からの液体の還流に影響を与える事は無い。遺伝子増幅反応が終わった段階で、３つのリザーバタンク４と結合している６つの切り替えバルブ８を切り替えて本熱交換槽３との液体の交換が行われないように切り離し、その後、管２００１，２００２の各々に接続されたバルブ８を接続し、ポンプ７を用いて熱交換槽３内部の液体を、例えば、低温用のリザーバタンク４の補助温度制御機構１０に送液し、熱交換槽３内部は空気で満たすことができる。そうした後に、反応槽１を交換し、新たに別の反応槽１をセットしたところで、管２００１、２００２に接続された切り替えバルブ８を閉鎖して、リザーバタンク４からの

還流系から液体を送液開始すると、熱交換槽３内は液体で満たされて、通常の遺伝子増幅反応を再開することができる。

【００４８】

さらに、本発明の装置では液体の温度制御を行う機構を利用することで融解曲線測定を行うことも可能である。融解曲線解析を行う場合には、例えば、連続して65～95℃までramp rate 0.11℃/secでの温度変化を反応槽１の反応液に与えて、その温度を反応槽１内に設置した液温度センサーにて反応槽１の温度をモニターしながら、その時の反応槽１のPCR反応液のインターカレーター蛍光色素の強度の変化などを図１に示したような光学計測モジュールを用いて計測し、温度と蛍光強度の相関の融解曲線分析の計測をすることが可能である。このとき、例えば、図１３の３つのリザーバタンク４のうちの補助液体放熱機構１７が組み込まれたリザーバタンクを用いて、最初に、所定の低温側のスタート温度となるところまでリザーバタンク内の液温度を下げる。次に、リザーバタンク内の熱源に少しずつ熱量を加え、ちょうど0.11℃/sec程度の温度上昇となるような熱量供給を温度センサー１６で計測を行いながら進め、それと同時に、熱交換槽３にそのリザーバタンクの液体を供給する。熱交換槽３から戻った液体は、補助温度制御機構１０にて、リザーバタンクの温度と同じ温度となるように調整されてリザーバタンクに還流するようにする。そして、最後に、最終温度として例えば、９５℃に達したら、リザーバタンク内の液温度を下げるため、再び補助液体放熱機構１７によって、当初設定していた温度まで液体の温度を下げればよい。

【００４９】

図１でも説明したが、反応槽１は、反応槽枠２で密閉状態に保たれている。好ましい実施形態では、反応槽枠２は、温度センサー１６によって計測された温度データに基づいて、反応槽枠２に組み込まれたヒーターによって常時７５℃以上に保たれるようになっている。このヒーターによって加熱される事で、枠内の水蒸気が枠の内表面で結露することを防ぎ、それによって枠内の水蒸気圧は一定に保たれて、その結果、反応槽の液滴はミネラルオイル等の添加無しのむき出しの状態での液滴状態で配置されていても蒸発をしないで５０～９７℃の範囲での温度変化を行うことができる。

【００５０】

また、同様に、融解曲線解析のための温度制御の手法を、PCR反応とは異なる温度にて一定の温度を保つために用いる事もできる。それによって逆転写反応を反応槽のPCR反応液について行う事も可能である。例えば、５０℃の液体の温度で液体を１０分以上還流させる事でRNAからDNAへの転写を行ってから、このリザーバタンクの温度を通常のPCR反応を行う温度に調整し、連続して逆転写反応からPCR反応に進める事もできる。

【００５１】

具体的な逆転写反応に引き続き行う遺伝子増幅反応の工程としては、ワンステップ操作(逆転写と増幅が1つのチューブ内で連続的に行われる) またはツーステップ操作(逆転写と増幅が別々のチューブ内で行われる)の 2 つがあるが、ここではワンステップ操作を例に、操作の手順の一例を示す。短いターゲットに対するワンステップ RT-PCR 用逆転写酵素として、例えば、Tth DNA Polymerase(Roche)を用いた場合、この反応は５５～７０℃が最適反応温度となっているため、（１）低温リザーバタンクの温度を通常のアニーリング温度より低い５０～６０℃に設定し、この低温リザーバタンク４の液体を熱交換槽３に３０分程度還流させて逆転写反応を行い、次に（２）高温リザーバタンク４より熱交換槽３に９４℃以上の液体を２分間ほど還流させて初期熱変性を行い、その後は、（３）増幅サイクルとして、高温リザーバタンク４からの９４℃以上の液体による１秒以上の熱変性プロセス、引き続きアニーリング用に温度調整を行った低温リザーバタンク４からのプライマー特性に対応した４５～６６℃の液体によるアニーリングプロセス、そして、中温リザーバタンク４からの酵素特性に合わせた６８～７０℃の液体による伸長反応を３秒というサイクルを行う事でターゲットＲＮＡの増幅反応を行うことができる。この実施例では、３つの異なる温度のリザーバタンク４のひとつの温度を逆転写反応に最適な温度に調整して逆転写反応を行った後に、再度、PCR反応に最適な温度に設定をし直して三温度遺伝

子増幅反応を行ったが、逆転写反応に最適な温度となる第４のリザーバタンク４を同様に付加して、上記プロセスを行っても良い。

【００５２】

図１４は、上記融解曲線解析のための計測機能を反応槽１に持たせるための別の手法の実施例のひとつを説明したものである。この実施例ではペルチエ温度制御機構１９が熱交換槽３の底面に配置されており、ここでペルチエ温度制御機構１９には、PCR反応のために循環させる液体の流路管２０が貫通しているため、上記図１３で述べた高速PCR反応のための液体の循環を同様に行うことができるが、さらに融解曲線解析の計測を行うときには液体の流路管２０の液の流れ１８を停止させ、ペルチエ温度制御機構１９と熱交換槽３内の温度センサー１６によって熱交換槽３に満たされた静止液体の温度を制御することで融解曲線解析を行うものである。また、この機構は、同様に逆転写反応でも用いることができる。その場合は、逆転写反応に最適な温度と時間をペルチエ温度制御機構１９によって提供し、逆転写反応が終わったところで図１に示されたような二温度遺伝子増幅装置の構成、あるいは図１３に示されたような三温度遺伝子増幅装置の構成を用いて高速遺伝子増幅を引き続き連続して行うことができる。

【００５３】

図１５は、本発明における連続した使い捨て反応槽１の利用方法の実施形態の一例、ならびに逆転写反応を行うことができる反応槽１を備えた反応槽部の実施形態の一例を示す模式図である。本発明の反応槽１は、上記図１３の説明で述べたように、使い捨てチップとして用いる事ができる。この場合、図１５のＡ－Ａ断面図でも示したように、例えば、高速遺伝子増幅反応を行う反応槽部１０１５は典型的にはPCRを行うための反応槽１、反応槽１を固定するＯリング１０１０などの断熱性と密閉性が保証されたスペーサーで反応槽１の上下を挟み込む反応槽枠２と熱交換槽３、反応槽を搬送するためのガイドレール１０１１を備えることで、ガイドレール１０１１に沿って複数の反応槽１を反応槽部１０１５に搬送することができる。反応槽１を反応で用いるときには、反応槽枠２と熱交換槽３で挟み込む事でＯリング１０１０によって反応槽１を固定化させ、液体リザーバタンク４からの液体の導入を行うことができる。他方、搬送するときには、反応槽枠２と熱交換槽３を反応槽１から離してＯリング１０１０を緩める事で、反応槽１のチップをガイドレール１０１１に沿って移動させ、交換することができる。図１５のＡ－Ａ断面図からもわかるように、反応槽枠２は、光学的に反応槽１上に配置した反応液を観察し計測するために光学的に透明な構成を取ることができる。この場合、二枚の薄いガラス板１０１３の間にＩＴＯなどの抵抗による発熱が効果的に起こる透明電極１０１４が挟み込まれており、光学的観測に支障を与える事無く反応槽枠２の温度を制御することができる。特に温度センサー１６を内側のガラス板１０１３内面に設置し、７５℃以上の温度に調整することで反応槽枠２内面での結露を防ぎ、蒸気圧の変化を防ぐ事が出来、その結果によって反応槽１の上に配置した反応液の蒸発を防ぐ事ができる。

【００５４】

また、ガイドレール１０１１上の、反応槽部１０１５の前段に逆転写反応槽部１０１６を配置する事で、ＲＮＡサンプルをｃＤＮＡに逆転写して、後段の反応槽部１０１５にて高速遺伝子増幅を行うことができる。逆転写反応槽部１０１６では、図１５のＢ－Ｂ断面図からもわかるように、反応槽枠２と同様な構成の枠は、光学的に反応槽１上に配置した反応液を観察し計測するために光学的に透明な構成を取ることができる。この場合、二枚の薄いガラス板１０１３の間にＩＴＯなどの抵抗による発熱が効果的に起こる透明電極１０１４が挟み込まれており、光学的観測に支障を与える事無く枠内部の温度を制御することができる。特に温度センサー１６を内側のガラス板１０１３内面に設置し、約７５℃以上の温度に調整することで反応槽枠２内面での結露を防ぎ、蒸気圧の変化を防ぐ事が出来、その結果によって反応槽１の上に配置した反応液の蒸発を防ぐ事ができる。反応槽１の下面には、逆転写反応用温度プレート１０１２が配置されており、逆転写に最適な温度として例えば、５０℃に設定された状態で、反応槽１に密着させることでPCR溶液が入った反応槽１のプレートの温度を５０℃で３０分程度反応させて逆転写が完了したところで、

その後ガイドレールを反応槽部１０１５にスライドすることでPCRを始めることができる。

【００５５】

図１６は本発明の多サンプルの遺伝子増幅反応におけるリアルタイム検出方法の一実施形態の一例を示す模式図である。本発明の反応検出装置は、典型的には、マルチウェル反応槽（reaction vessel）１１０１、アレイ状に配置された複数の反応ウェル１１０２、検出装置１２０１を備える。検出装置１２０１をPCR反応中に例えば方向１２０２に走査させ反応ウェル１１０２上のPCRサンプルの蛍光強度を検出することで反応ウェルの数より少ない数の検出器で全サンプル中の蛍光強度を測定する機能を備える。ここで図１３の説明でも記述したように、インターカレーター方式での蛍光検出を行う場合には、PCRの伸長反応終了時に、熱変性を開始する前の二本鎖ＤＮＡの状態が維持している時間中に計測する事が望ましい。また、タックマンプローブ法のような蛍光プローブのPCR伸長反応時に量的変化を生じる蛍光プローブ量の蛍光検出の場合には、PCR伸長反応終了後のタイミングから、熱変性、アニーリングの段階のいずれであっても計測することができる。ただし、いずれの場合であっても、蛍光強度を比較計測するためには蛍光色素が含まれる反応液の温度が同じであるようにすることが望ましい。これは、温度依存性のある蛍光消光によって、同じ反応液内の蛍光色素量であっても、温度が違う事で蛍光強度が異なる事を防ぐためである。

【００５６】

図１７は本発明の多サンプルの遺伝子増幅反応におけるリアルタイム検出方法の実施形態の一例を示す模式図である。本発明の反応検出装置は、典型的には、マルチウェル反応槽１１０１、アレイ状に配置された複数の反応ウェル１１０２、検出プローブ１２０３を備える。１１０１上にある反応ウェル１１０２の数と同量の検出プローブ１２０３のアレイを用意しPCRサンプルの蛍光強度を定点観測することで切れ目の無い連続した時間変化を計測する事で、図１６で示したスキャン型と異なり、連続した蛍光強度変化を検出することができる。

【００５７】

図１８は、反応槽１上の反応液がPCR反応中に乾燥しないための手段として、反応ウェル１１０２上にのせたサンプルの蒸発を防止するために封入するシール１３０２を反応槽１１０１上に貼付ける実施形態の一例を模式的に示したものである。ここでは、シール１３０２が反応ウェル１１０２中のサンプル溶液１３０３と接しないため、かつ反応液滴下時、搬送時、PCR測定中にサンプル反応液のウェル内での移動を抑えるために各反応ウェルの中心に柱（ピラー）１３０１を構成した構造の一例を模式的に示したものである。この柱１３０１は、熱伝導性が高いアルミニウム等の金属の打ち出し加工や付加によって作った構造でも良いし、あるいは光学的に透過性を持ったガラスやプラスチックでも良い。

【００５８】

これにより5-10μLのPCR溶液がPCR反応中に移動せずかつシール剤と接することを防止することができる。また、ピラーによってより広い表面積に液滴を展開することができ、その結果として、単純に反応液の液滴を反応槽１１０１の表面に滴下した場合に比べて、より広い表面積で反応液を展開することができ、より効果的に反応液の温度を熱交換槽と交換することができる。また、ピラー１３０１が光学的に透明なプラスチックやＰＤＭＳ等の高分子構造素材であった場合にはリアルタイムPCR測定中に検出する波長とは異なる蛍光を発する物質を練り込むことによりPCRの蛍光強度をキャリブレーションするためのリファレンスとして使用することができる。

【００５９】

図１９は反応ウェル１１０２内に設置した光学的な伝導性を持つ光ファイバーガラスやプラスチック等の素材でできたピラー１３０１の表面に、PCR反応中のDNAが近傍にハイブリダイゼーションできるようにDNAプローブ１３０６またはプライマーを結合させた実施形態の一例を示した模式図である。これにより、PCR反応物の増幅が効果的に行われた場合には、ピラー表面近傍でＤＮＡ増幅物が効果的に結合し、その蛍光をピラーの光ファイ

バー特性を利用して通常より高い検出感度でリアルタイムPCR反応を検出事が可能となる。蛍光を発するための手段としては、図１９Ａで示したように、DNA二重鎖の時にインターカレートすることで蛍光を発するSYBR Greenなどのインターカレーター１３０４を用いる手段や、図１９Bで示したようにPCR反応物１３０２がハイブリダイズしたときDNAの立体構造が崩れることによりDNAプローブ末端に結合していた蛍光物質１３０５が蛍光を発する蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法を利用したプローブ法などを利用することができる。あるいは、柱１３０１表面あるいは柱１３０１中に蛍光アクセプター蛍光色素を導入し、インターカレーターをドナー蛍光色素として用いる事で、効果的にターゲットＤＮＡが増幅された場合には、柱表面に結合しているプローブＤＮＡと増幅産物ＤＮＡが結合し、インターカレーター蛍光がピラー表面で効果的に発生する事で、アクセプター蛍光を柱の蛍光発光から計測する事も可能である。この利点は、従来のインターカレーターの蛍光強度の変化という指標でのターゲットＤＮＡの観察から、蛍光エネルギー移動によってアクセプター蛍光の発光情報という別のインタオーカレーター蛍光色素とは異なる波長の蛍光を観察することで定量的に計測することができることであり、よりノイズの低い定量性の高い計測が可能となる。

【００６０】

図２０は、反応液の容量を効果的に制御し、従来の液滴の滴下だけでは実現できない、より広い表面積で熱交換槽と接する事ができる反応液の空間配置を反応槽１１０１中に実現するために、微細加工技術によって、反応液の導入経路と、反応領域を反応槽中に構成した実施例の一例を模式的に示したものである。本実施例で示したマイクロ流路型反応槽１４０１は、上記、図１から１９で示した実施例で用いてきた熱伝導性に優れたアルミニウム薄板等の反応槽１４０４上に、ポリジメチルシロキサン（PDMS）等の光学的な透過性と弾性を持った素材からなる流路形成用高分子１４０３を接着したものである。このチップにはサンプル注入口１４０５と、毛細管現象によってサンプル注入口から反応液が導入されて通過するマイクロ流路１４０２と、反応液が満たされる反応液リザーバ１４０７、そして、反応液を回収するときにこれを押す事で空気圧によってサンプル注入口１４０５から反応液を回収するために用いる空気リザーバ１４０６が配置されている。この実施例では、反応液を注入口１４０５に導入した後に、上記図１あるいは図１３で示した高速遺伝子増幅装置にて遺伝子増幅を行った後に、サンプル回収用空気リザーバ１４０６を押して、反応液をサンプル注入口１４０５から回収することができる。例えば、流し込む反応溶液は5μL以下が妥当であり、注入口１４０５から反応液リザーバ１４０７までの容積を5μL以内に抑える方が望ましい。また、上記実施例では、空気リザーバを用いたが、図２０Ａ‘－Ａ’断面図のように、空気リザーバの位置をサンプル排出口１４０８にしても良い。この場合には、反応後の反応液の回収の場合には、サンプル注入口１４０５から空気を吹き込むことでサンプル排出口１４０８から回収することができる。また、図２０の実施例では、反応液リザーバ１４０７の高さをマイクロ流路１４０２より高く設定したが、より効果的に熱交換を行うためには、なるべく反応液リザーバ１４０７の高さを低くして面積を広げる事で、より効率的なPCR反応を行うことができる。

【００６１】

図２１は、図１３で示した実施例について、温度制御用の液体を送液する手段としてシリンジポンプ１４１１を用いた場合の形態の実施例の一例を模式的に示したものである。毎秒１０mL以上の流速での自動送液および自動吸引が可能なシリンジポンプ１４１１表面には熱源５が、シリンジポンプ中には温度センサー１６が配置されており、温度制御のための液体を熱交換槽３に導入するときは、送液したい温度のシリンジポンプ１４１１の切り替えバルブ８を切り替えて、各シリンジポンプからジョイント９０を経て液体を熱交換槽３に導入する。そして、熱交換槽３から戻ってくる液体は、ジョイント９０および切り替えバルブ８を経て補助温度制御機構１０に蓄えられて、シリンジポンプ１４１１内で設定した温度と同じ温度に液体を戻した後にシリンジポンプに還流する機能を有する。そして、シリンジポンプからの送液が終わり、別のシリンジポンプ１４１１からの別温度の液体の送液が開始されたところで、切り替えバルブ８をシリンジポンプ１４１１と補助温度

制御機構１０とを接続するように切り替えて、シリンジポンプ１４１１内に液体を回収するように構成されている。

【００６２】

図２２は、反応液の温度制御に反応液の水の吸収が強い赤外線を照射して、その吸収による温度変化を利用した実施例の一例を示したものである。発明者らは、すでにこの集束赤外光の吸収による高速PCR装置技術について特開２００８－２７８７９１に記載しているが、図２２の本実施例では、反応液の温度制御を赤外レーザ１５１０の強度制御ではなく、円状に連続して段階的に透過率が変化するグラデーションＮＤフィルター１５１５と、このＮＤフィルター１５１５の角度をシャフト１５１４を介して緻密に制御するステッピングモーター等のモーター１５１３を用いて、角度を高速で可変に行う事で光の強度を高速で変化させる構成となっている。これによって急激な温度変化だけでなく、様々な一定回転各速度にする事で、反応液の単位時間当たりの温度勾配を正確に、かつ緻密に行うことができるだけでなく、温度変化を自在にプログラムすることもできる。

【００６３】

図２２の本実施例の装置構成は、照明用光源（ハロゲンランプなど）１５０１からの可視光を、コンデンサレンズ１５０２にて集光し、自動XYステージ１５０３上の反応ウェルプレート１５０７の各反応液の状態を光学的に観察できるように、対物レンズ１５０８経由にて焦点を合わせて、画像観察用カメラ（冷却CCDなど）１５２２で観察することができる。自動XYステージ１５０３は、X軸用モーター１５０４とY軸用モーター１５０５によって駆動することで任意の座標のウェルを観察することができる。また、ステージヒーター１５０６によって、例えば、アニーリング温度等のPCR反応での最低温度となる温度に反応ウェルプレート１５０７の温度を制御することができる。他方、赤外レーザ１５１０は、ビームエキスパンダー１５１１、レーザシャッター１５１２、グラデーションNDフィルター１５１５を通過して顕微鏡光学系に赤外レーザ用ダイクロイックミラー１５０９で導入することができる構成となっている。また、グラデーションNDフィルター１５１５は、その中心のシャフト１５１４がステッピングモーター等のモーター１５１３と接続されていることで、グラデーションNDフィルター１５１５による赤外レーザの透過率を自在に調整することができる。ここでグラデーションＮＤフィルターの表面のＮＤのグラデーションのパターンについては、通常は、図２３（ａ）に示したように、その角度θに応じて直線的にＮＤ＝$ＮＤ_{MAX}$・（θ／$θ_{MAX}$）の関係で変化するものを用いれば良い。あるいは、グラデーションのパターンを角度θに依存してあらかじめ書き込むことで、一定の角速度で回転させながら予定した透過光強度の赤外線を水滴に照射することも可能である。図２３（b）は、通常の３温度ＰＣＲの反応を行わせるためのプロセスを一回転分で１サイクルとなるようにグラデーションを構成した１例である。まず透過光０％の状態から一気に１００％の透過まで上昇させ、９５度以上の温度に水滴温度を上げることで核酸の熱変成を行わせ、つぎに透過光を０％に戻すことで、外部の温度を５５度から６０度程度のあらかじめアニーリング温度としておくことで、水滴はアニーリング温度まで下降し、さらにＮＤフィルター円盤の回転で透過光を、たとえば３０％程度透過させることで、水滴の温度を７０度に変化させることができ、ＰＣＲ伸長反応が進む。このとき、一定角速度で円盤を回転させる場合には、各透過光の照射時間の比は、そのグラデーションパターンの空間配置に反映させることで実現できる。反応ウェル中でのPCR反応を定量的に計測するために蛍光観察をするために、この光学系には、蛍光励起用光源（水銀ランプなど）１５１７からの励起光を蛍光励起光源用シャッター１５１８、蛍光励起光用投光レンズ１５１９を経由して、蛍光励起光用ダイクロイックミラー１５１６によって励起光を導入することができるようになっており、加熱用赤外レーザの波長の光ならびに励起光が導入されないように調整されたカメラ用ダイクロイックミラー１５２０、結像レンズ１５２１を経由して、冷却CCDなどの画像観察用カメラ１５２２によって定量的に蛍光強度を計測する事が可能な構成となっている。図２２に述べられた光学的加熱法に付いては、上記図１から２１に述べられた手法と柔軟に組み合わせて用いることができる。

【００６４】

たとえば、上記、図１から２１の実施例に、本図２２の光学的加熱法を付加することで、リザーバタンク４の温度を変更させることなく、簡単に融解曲線解析の機能を組み込むことができる。具体的には、リザーバタンク４からの高速循環液体の流れについて最低温度となる液体を、あらかじめ循環させておくか、あるいは高速循環液体の導入を開始させる前に、ターゲット核酸分子とインターカレーターの機能を持つ蛍光色素を含む水滴に加熱用赤外レーザを連続して照射するが、このとき減光のグラデーションの程度が一次関数の線形（直線）的に減少するように構成されたグラデーションNDフィルター１５１５を水滴の温度が十分に安定して追従する程度の一定の角速度で回転させることで、水滴の温度を直線的に上昇あるいは下降させることができる。ここで、上昇については、ＮＤの大きさが減少する方向で回転させたときに、また、下降については、ＮＤの大きさが上昇する方向で回転させたときに実現させることができる。毎秒0.1ラジアン以下のゆっくりとした回転で、その角度情報と蛍光強度の変化を記録することで、以下に述べる角度θからの液滴温度の見積もり法を用いることで液滴温度と蛍光強度の結果を得ることができ融解曲線解析をすることができる。ここで温度の見積もり法は、透過光０％をθ＝０ラジアン、透過光１００％をθ＝２πラジアンとし、透過光１００％が照射されたところで水滴の温度が９５度以上となるように照射光源の赤外線の強度を調整しておき、この調整された蛍光強度をそのまま維持しながらグラデーションＮＤフィルターを回転させることから、（θ／２π）・（T_{MAX}-T_{MIN}）という関係式で、角度θの測定から水滴の温度を見積もる手段を用いることができる。ただし、ここでT_{MAX}は、透過光１００％での照射時の水滴の温度、T_{MIN}は、照射前の透過光０％での水滴の温度である。

【００６５】

あるいは、図２３（b）示したように、グラデーションＮＤフィルターの円盤上に、あらかじめ一回転すると一回あるいは数回のＰＣＲ反応が終了するように、透過光の割合をθが一定速度で回転することを前提にθ依存的に配置することで、液滴の最低温度を安定化させるための目標とする最低温度の高速液体を還流させる１系統の高速還流系と、本構成を組み合わせれば、簡単に高速PCR反応を光学的な光熱変換によって実現することも可能である。ここでは、高速還流系は１系統のみとなるため、上記図１から２１で記載した複雑な切り替えバルブの組み込みやスイッチングプログラムを組み込む必要がなく、また、リザーバタンクも１個で十分となり、構成が大きく簡素化できることとなる。

【００６６】

本発明はまた、遺伝子解析または遺伝子増幅のための装置を提供し、この装置は、核酸を含むサンプル液を容れるための１または複数のウェルを備えた反応槽（reaction vessel）、ヒートシンク（heat sink）または熱交換槽（heat exchange chamber）、ヒートシンクまたは熱交換槽を第１の温度（例：核酸の伸長反応温度）に保つように構成されたヒートシンクまたは熱交換槽の温度制御装置（temperature controller）（例：温度センサー、熱電線、液体還流型温度制御装置）、ヒートシンクまたは熱交換槽と反応槽との間に配置された、ヒートシンクまたは熱交換槽と反応槽との間の熱の移動を媒介する熱電素子（thermoelectric element）（例：ペルチエ素子）、熱電素子の動作（operation）を制御することにより、反応槽の温度を第１の温度と第２の温度（例：核酸の変性温度またはアニーリング温度）との間で変化させる熱電素子制御装置（thermoelectric element controller）（例：温度センサー、コンピュータ（例：ＰＣ））とを備えており、熱電素子の動作がオフのときに、反応槽の温度が第１の温度となるように構成されている。

【００６７】

図２４は、このような本発明の遺伝子解析または遺伝子増幅のための装置の構成の非限定的な一例を示す模式図である。図２４に示す本発明の実施形態は、ＤＮＡを含むサンプルを保持するためのＤＮＡ反応チップ容器２４０１、ペルチエ素子２４０３、ペルチエ素子２４０３と反応チップ容器２４０１との間の熱伝導効率を上げるための熱伝導薄板２４０２、ヒートシンク２４０４、ヒートシンク２４０４を加熱するための熱電線２４０５、反応チップ容器２４０１の温度をモニターするための温度センサー２４０６、ヒートシンク２４０４の温度をモニターするための温度センサー２４０７、反応チップ容器２４０１

に設けられたサンプル観察するための観察窓２４０８、および観察窓２４０８を介してサンプル液中のサンプルの様子を蛍光観察するための蛍光検出モジュール２４０９を備える。

【００６８】

ＤＮＡ反応チップ容器２４０１としては、前述の液体還流型あるいは光吸収加熱型反応制御装置で用いた反応容器の構成ならびに、光学蛍光強度検出系をそのまま用いることができる。熱源については、ＤＮＡ伸長反応温度（中温度）に制御したヒートシンク２４０４を安定熱源として用い、このヒートシンクからペルチエ素子２４０３と熱を均質に平面上に伝える熱伝導用薄板２４０２（アルミニウム、ジュラルミン、金、銀、タングステン、ネパール黄銅、マグネシウム、モリブデン、ベリリウムおよび、これらの元素を用いた合金、を含む熱伝導性の高い金属、あるいは合金で構成される）を介して、ＤＮＡ反応チップへ熱を供給してＤＮＡ変性温度（高温度）あるいは、熱を奪ってアニーリング温度（低温度）に高速で移動させることができる。温度センサー２４０６は、反応チップのすぐ下に配置された熱伝導用薄板２４０２上面に配置され、熱伝導板上面の反応チップの温度をリアルタイムでモニターでき、この計測された温度と、プログラムに事前に書き込んだ温度経時変化プロファイルとが同じ温度となるようにペルチエ素子２４０３を駆動させることができる。ヒートシンクは安定して中温度にあるのに十分な熱容量と熱伝導性を有する金属等の素材（例：アルミニウム、ジュラルミン、金、銀、タングステン、ネパール黄銅、マグネシウム、モリブデン、ベリリウムおよび、これらの元素を用いた合金）からなっており、電熱線２４０５等の安定して熱を供給できるモジュールからヒートシングに配されている温度センサー２４０７の温度をモニタリングしており、このセンサー２４０７からの情報を元に温度制御モジュール（例：フィードバック制御機構）（これは、電熱線等の電流駆動型の熱源の場合については電流量と極性の制御を、液体還流型温度制御装置については水温加熱冷却モジュールへのON/OFF制御信号を送る機能を有する）によって定常的に必要な熱をヒートシンクに供給して中温度を保っている。本発明の最大の特徴は、ヒートシンクを中温度に設定する（注：厳密には反応槽または反応容器を中温度に設定するためにヒートシンクの温度は熱伝導のロスを考慮すると反応容器の設定温度から高温または低温側に幾分ずれる可能性がある）事で、ペルチエ素子をオフにすれば自律的に高速でオーバーシュートする事無く、ＤＮＡ反応チップの温度を目的とする中温度のＤＮＡ伸長反応温度に平衡温度として達成できることにある。一般にペルチエ素子等のフィードバック制御素子を用いて熱を供給させ続ける事で一定の温度を維持する手法はフィードバック制御由来のオーバーシュートや温度の振動をもたらし易く、かつ、消費電力が非常に大きくなる事、連続したペルチエ素子の動作による素子寿命の短縮などの問題がある。他方、このように中温度をペルチエ素子をオフにすることで実現できる本発明では、PCR反応において最も時間を費やすPCR伸長反応時にペルチエ素子をオフにすることができ、また、特に低温側でアニーリングによって結合した二本鎖ＤＮＡを温度上昇によるオーバーシュートによって乖離するリスクを冒す事無く、伸長反応温度に平衡点に近づく形で達成することができる。また、高温側のＤＮＡ変性温度と低温側のアニーリング温度については１秒程度の短い時間のペルチエ素子動作（変性反応とアニーリング反応）であり、かつ、若干のオーバーシュートは許容されることから、厳密な温度制御を行う必要がなく、また、ＤＮＡ反応チップに熱を出し入れするペルチエ素子が接触する熱源が中温度で安定している事から、目的とする温度に達するために加える電流量についてもだいたいの値を見積もる事が可能である。ＤＮＡ反応チップは、上記、液体還流型装置の例でも示したように、ＤＮＡ反応チップ容器２４０１の上面にＩＴＯ等の発熱性透明電極が配置された観察窓２４０８が配置されており、チップ上面の温度が７５℃以上となるように熱を供給しており、これによってチップ内の試薬の底面からの蒸発と容器上面での結露を防ぐ事ができ、微量の試薬反応液であっても蒸発する事無くＰＣＲ反応を蛍光検出モジュール２４０９で検出することができる。

【００６９】

図２５は、実際にＤＮＡ反応チップ中の試薬の反応温度（ａ）と、ペルチエ素子への電

流印加の例（ｂ）を模式的に示したものである。図からもわかるように、ペルチエ素子の動作時間は、高温と低温にするための短時間の動作に限っており、また、低温にした後の中温への温度変化は、ヒートシンクからＤＮＡ反応チップへの熱伝導による熱平衡によってもたらされている。

【００７０】

本発明によれば、高速で温度変化をするように温度制御することが可能である。したがって、標準的なＰＣＲにおいて、例えば、変性温度（高温）が９４℃、伸長温度（中温）が７２℃、およびアニーリング温度（低温）が５５℃に設定される場合に、中温から高温、高温から中温、中温から低温、および低温から中温のそれぞれの温度変化に要する時間を、例えば、２秒、１秒、0.9秒、0.8秒、0.7秒、0.6秒、0.5秒、0.4秒、もしくは0.3秒またはそれより短い時間とすることが可能である。

【００７１】

本実施例では、３温度ＰＣＲの場合について例示したが、同様に高温と中温のみからなる２温度ＰＣＲでも、同様に高温へのペルチエ素子のオン／オフのみで実現することができる。また融解曲線解析や、RT-PCRの工程についても、ヒートシンクの温度をゆっくりと変化させることで実現することも、あるいはペルチエ素子によるＤＮＡ反応チップへの熱供給を温度センサーによってフィードバック制御しながらゆっくりと温度変化をさせることで実現することができる。

【００７２】

また、本実施例ではヒートシンクと電熱線を中温度の熱源として用いたが、中温度１つの液体リザーバを備える高速液体還流型の反応制御装置において、または図１、図１３、図２１に記載したような２温度もしくは３温度に対応可能な高速液体還流型の反応制御装置において、中温に設定した１つの液体リザーバおよび熱交換槽３を上記ヒートシンクの替わりに用いても良い。また、２温度もしくは３温度に対応可能な複数のリザーバを備える液体還流型反応制御装置では、中温度自体に異なる温度のバリエーションを持たせることも可能であるという利点がある。

【産業上の利用可能性】

【００７３】

本発明は、サンプルの温度を厳密に制御することが求められる反応を行うための反応装置として有用である。本発明はまた、サンプルの温度変更を迅速に行うことが求められる反応を行うための反応装置として有用である。

【００７４】

本発明は特に、高速、高精度、高増幅率のPCR反応を行うことができるＰＣＲ装置として有用である。本発明の装置はまた、小型化が可能なため、ポータブルＰＣＲ装置として有用である。

【符号の説明】

【００７５】

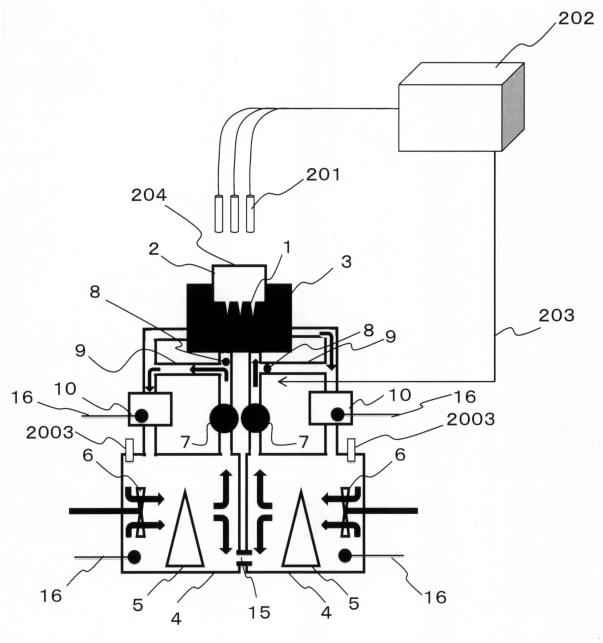
１　反応槽
２　反応槽枠
３　熱交換槽
４　液体リザーバタンク
５　熱源
６　攪拌機構
７　ポンプ
８　切り替えバルブ
９　バイパス流路
９０　ジョイント
１０　補助温度制御機構
１１　インレットＡ
１２　インレットＢ

１３　アウトレットＡ
１４　アウトレットＢ
１５　連結チューブ
１６　温度センサー
１７　補助液体放熱機構
１８　液体の流れの方向
１９　ペルチエ温度制御機構
２０　液体の流路管
２００１　空気の流入管
２００２　熱交換槽の液体の排出管
２００３　圧力リーク弁
２１，２２，２３，２４，２６，２３１　反応槽
２５　凍結乾燥試薬
２７　分注チップ
２８　サンプル
２９　繊維玉
３１　反応槽
３２　反応槽枠
３３　反応槽受け口
３４　ネジ山
３５　シール
３６　テーパー状反応槽枠
３７，３８　熱交換槽
４１　インレットバルブＡ
４２　アウトレットバルブＡ
４３　インレットバルブＢ
４４　アウトレットバルブＢ
５１　スライドガラス型反応槽枠
５２，５８　熱交換槽の反応槽受け口
５３　ガイドレール
５４　シール
５５　スライド受け口
５６　ヒンジ
５９　反応槽
６１　インレットＡ
６２　アウトレットＡ
６３　インレットＢ
６４　アウトレットＢ
６５　ピストン
６６　反応槽
６７　熱交換槽
７１　ピストン
７２　ピストンロッド
７３　ピストン
７４　磁石
７５　電磁コイル
７６　ピストン
８１　回転弁
８２　回転軸
８３　熱交換槽

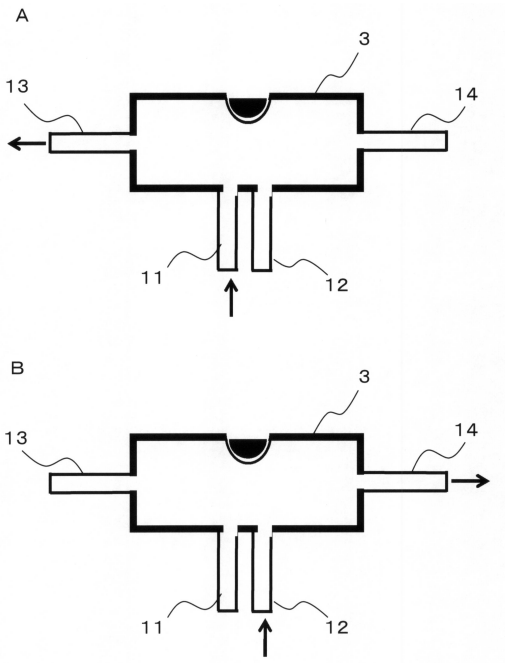
８４　反応槽
９１　インレットＡ
９２　アウトレットＡ
９３　インレットＢ
９４　アウトレットＢ
９５　メンブランＡ
９６　メンブランＢ
９７　反応槽
９８　熱交換槽
１０１　ロータリーバルブ
１０２　溝
１０３　熱交換槽
１０４　インレットＡ
１０５　アウトレットＡ
１０６　インレットＢ
１０７　アウトレットＢ
１０８　流路
１０９　反応槽
１１０　温度
１１１　経過時間
２０１　蛍光検出器
２０２　制御解析部
２０３　制御信号
２０４　光学窓
１０１０　Ｏリング
１０１１　ガイドレール
１０１２　逆転写反応用温度プレート
１０１３　ガラス板
１０１４　透明電極
１０１５　反応槽部
１０１６　逆転写反応槽部
１１０１　反応槽
１１０２　反応ウェル
１２０１　蛍光検出プローブ
１２０２　蛍光検出プローブの走査方向
１２０３　アレイ化した蛍光検出プローブ
１３０１　ピラー
１３０２　蒸発防止用シール
１３０３　PCR溶液
１３０４　インターカレーター
１３０５　蛍光プローブ
１３０６　ＤＮＡプローブ
１４０１　マイクロ流路型反応槽
１４０２　マイクロ流路
１４０３　流路形成用高分子
１４０４　反応槽
１４０５　サンプル注入口
１４０６　サンプル回収用空気だめ
１４０７　反応液リザーバ
１４０８　サンプル排出口

１４１１　シリンジポンプ
１５０１…照明用光源（ハロゲンランプなど）
１５０２…コンデンサレンズ
１５０３…自動XYステージ
１５０４…X軸用モーター
１５０５…Y軸用モーター
１５０６…ステージヒーター
１５０７…反応ウェルプレート
１５０８…対物レンズ
１５０９…赤外レーザ用ダイクロイックミラー
１５１０…赤外レーザ
１５１１…ビームエキスパンダー
１５１２…レーザシャッター
１５１３…モーター（ステッピングモーターなど）
１５１４…シャフト
１５１５…グラデーションNDフィルター
１５１６…蛍光励起光用ダイクロイックミラー
１５１７…蛍光励起用光源（水銀ランプなど）
１５１８…蛍光励起光源用シャッター
１５１９…蛍光励起光用投光レンズ
１５２０…カメラ用ダイクロイックミラー
１５２１…結像レンズ
１５２２…画像観察用カメラ（冷却CCDなど）
２４０１…ＤＮＡ反応チップ容器
２４０２…熱伝導用薄板
２４０３…ペルチエ素子
２４０４…ヒートシンク
２４０５…電熱線
２４０６、２４０７…温度センサー
２４０８…観察窓
２４０９…蛍光検出モジュール

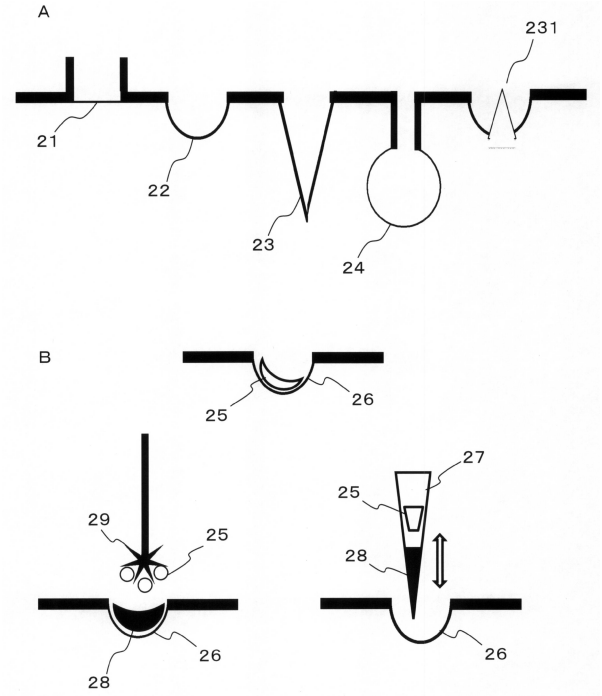
【図１】


202
201
204
2
1
3
8
203
9
8
9
16
10
10
16
2003
2003
7
7
6
6
16
5
4
15
4
5
16

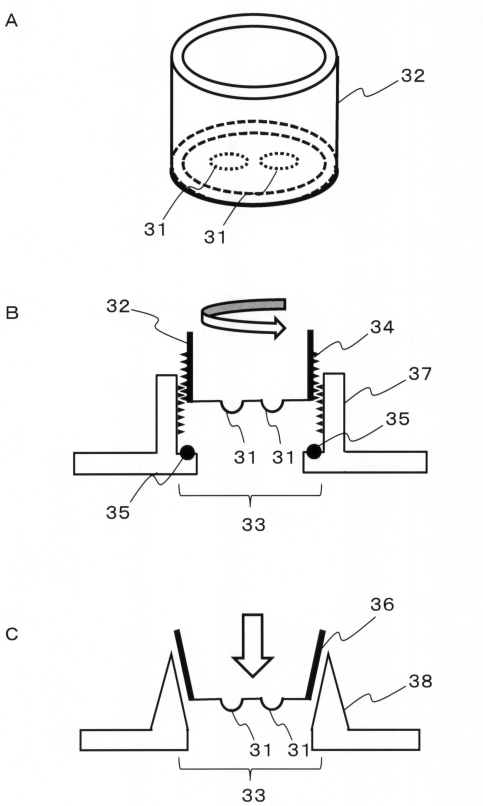
【図２】


A
3
13
14
11
12
B
3
13
14
11
12

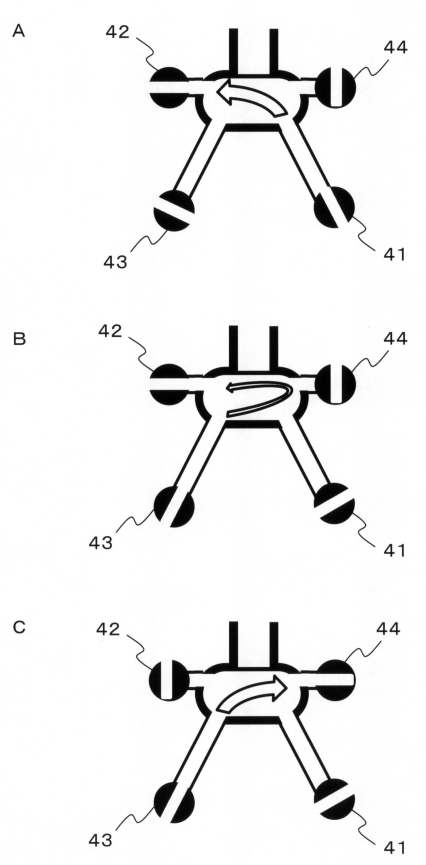
【図３】


A
231
21
22
23
24
B
25
26
29
25
26
28
27
25
28
26

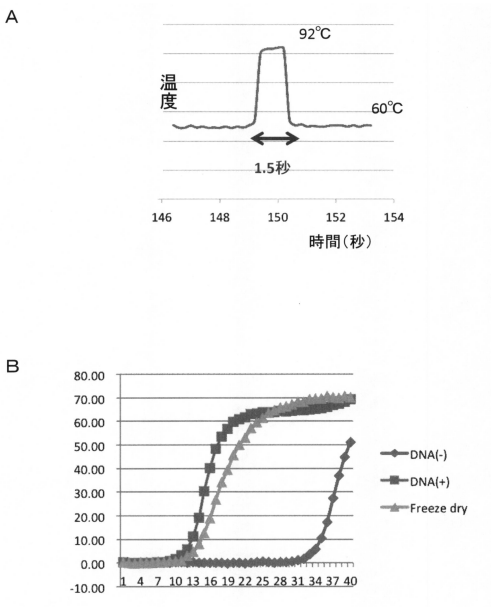
【図４】


A
32
31
31
B
32
34
37
35
31
31
35
33
C
36
38
31
31
33

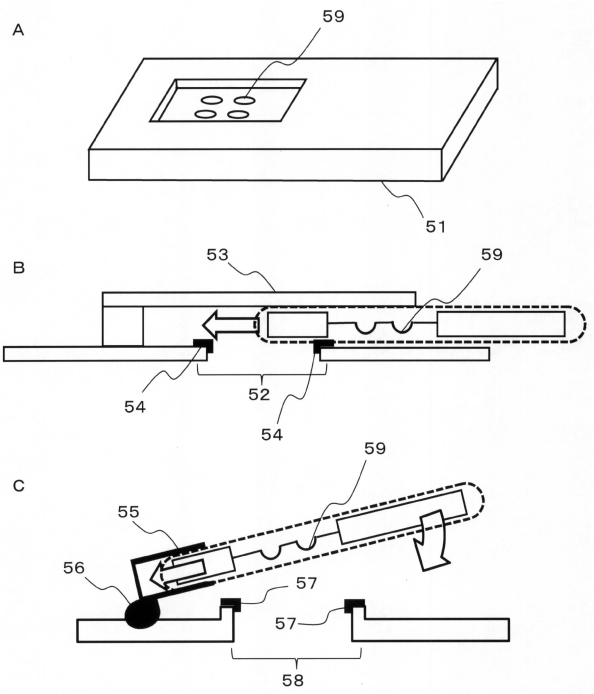
【図５】


A
42
44
43
41
B
42
44
43
41
C
42
44
43
41

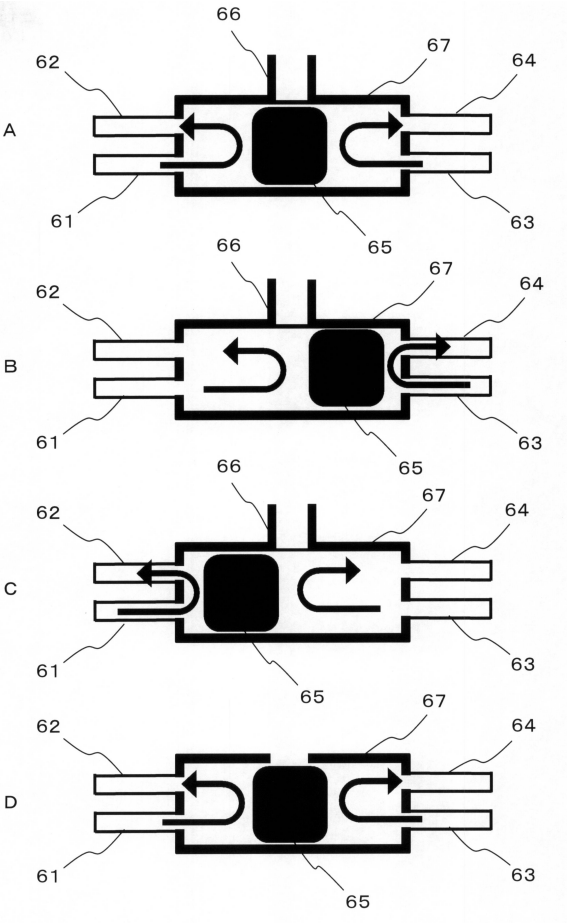
【図６】


A
92℃
温度
60℃
1.5秒
146
148
150
152
154
時間(秒)
B
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
-10.00
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40
DNA(-)
DNA(+)
Freeze dry

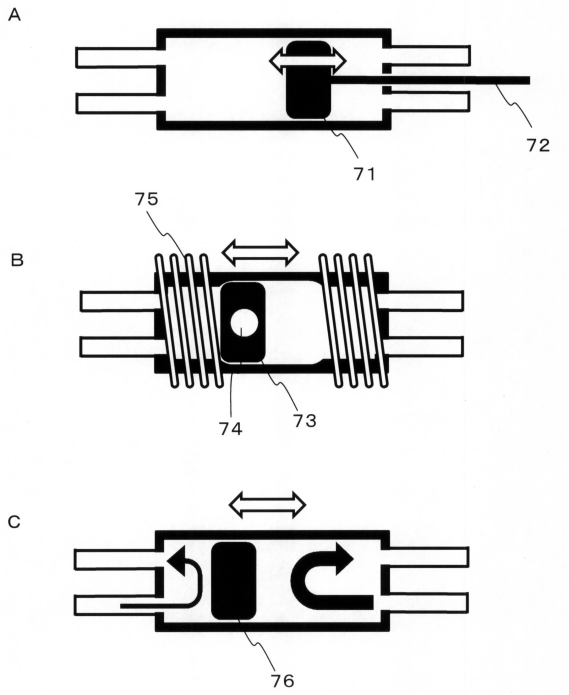
【図７】


A
59
51
B
53
59
54
52
54
C
59
55
56
57
57
58

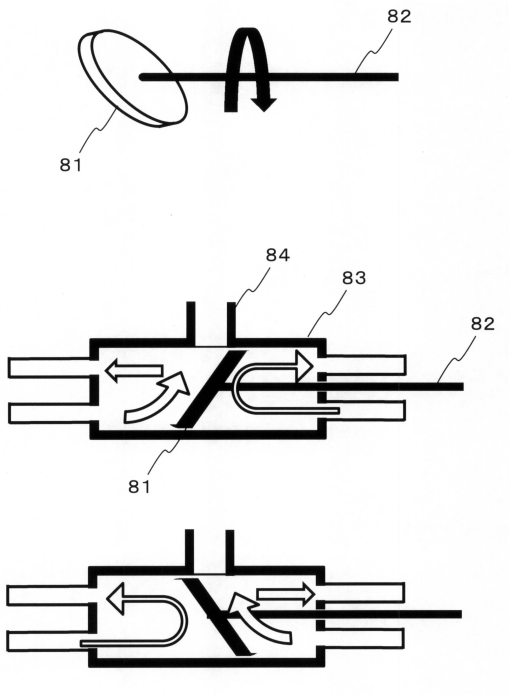
【図８】


A
66
62
67
64
61
65
63
B
66
62
67
64
61
65
63
C
66
62
67
64
61
65
63
D
67
62
64
61
65
63

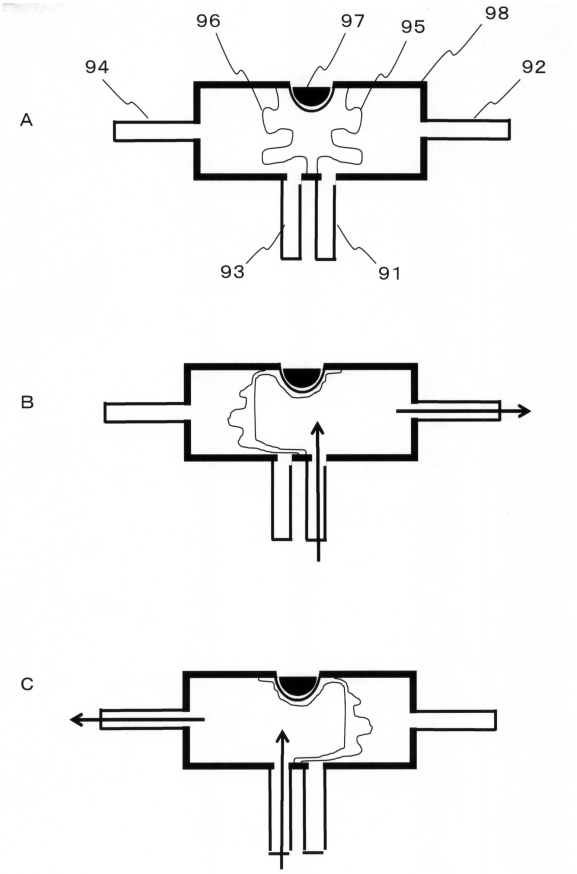
【図９】



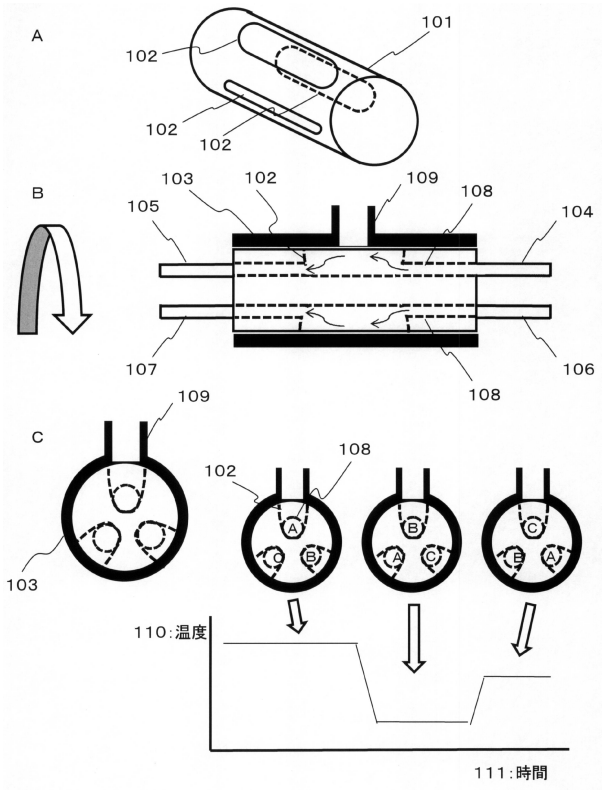
【図１０】



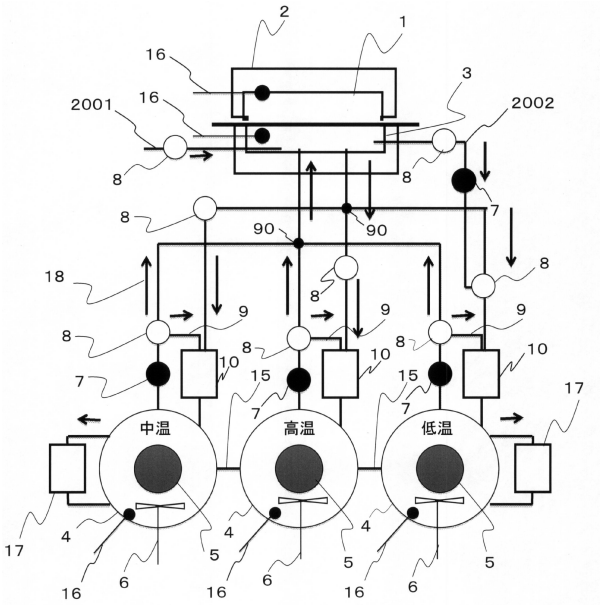
【図１１】



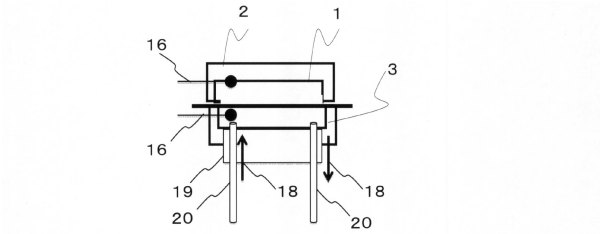
【図１２】



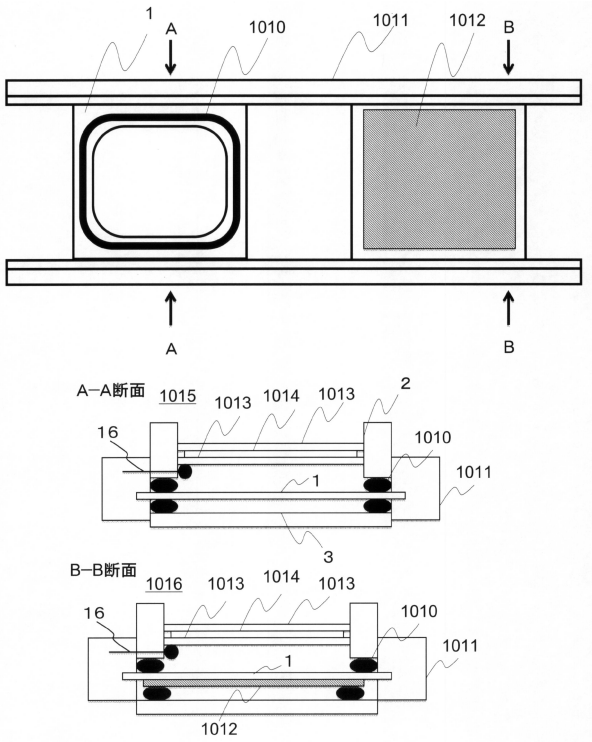
【図１３】



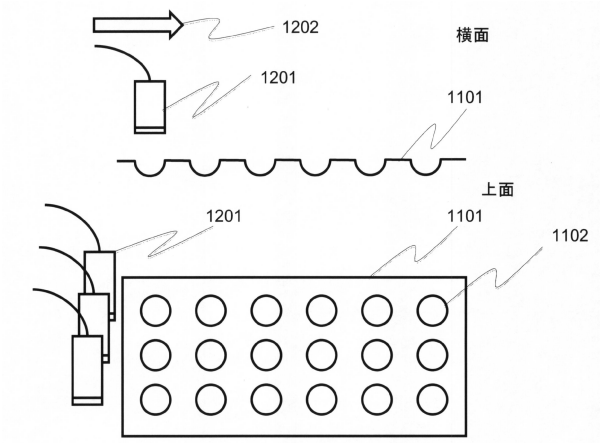
【図１４】



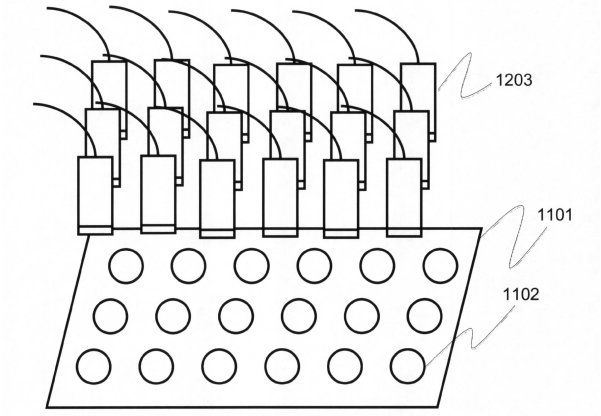
【図１５】



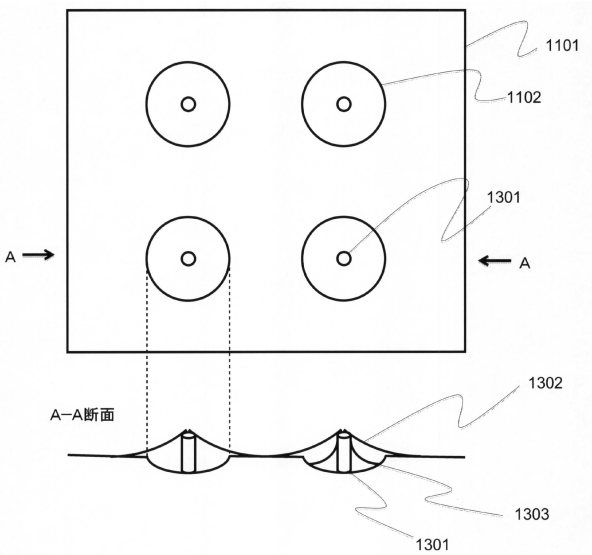
【図１６】



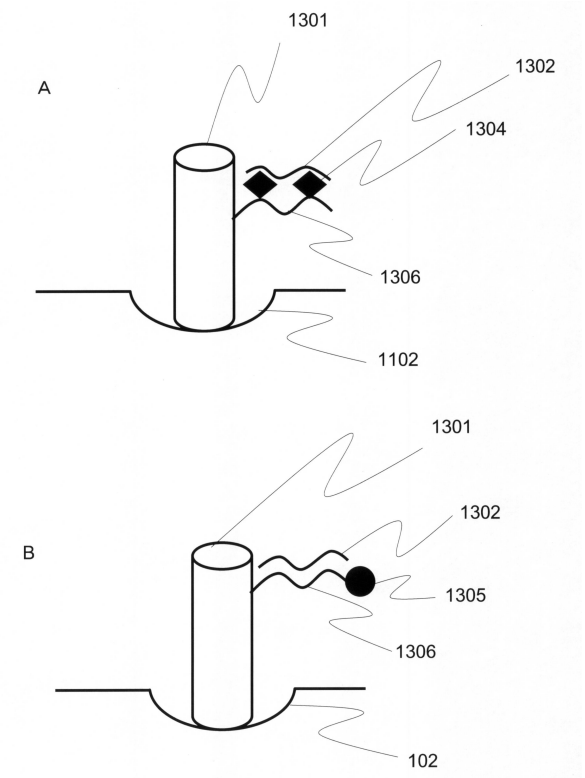
【図１７】



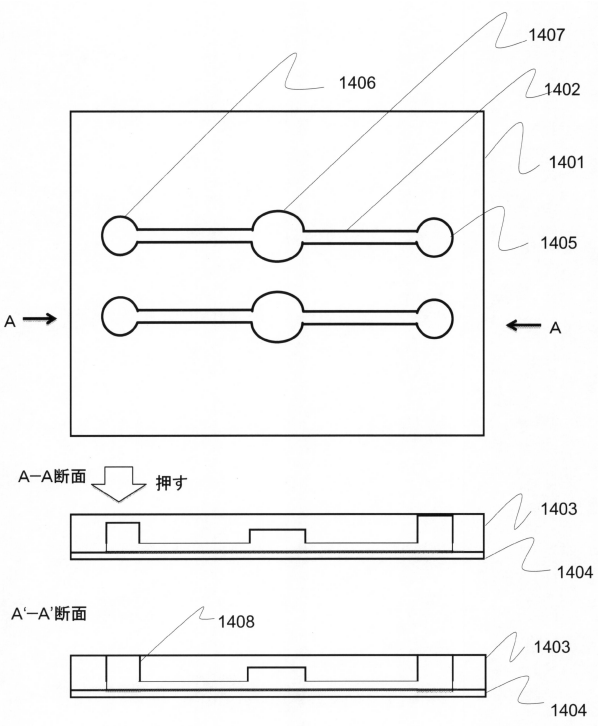
【図１８】



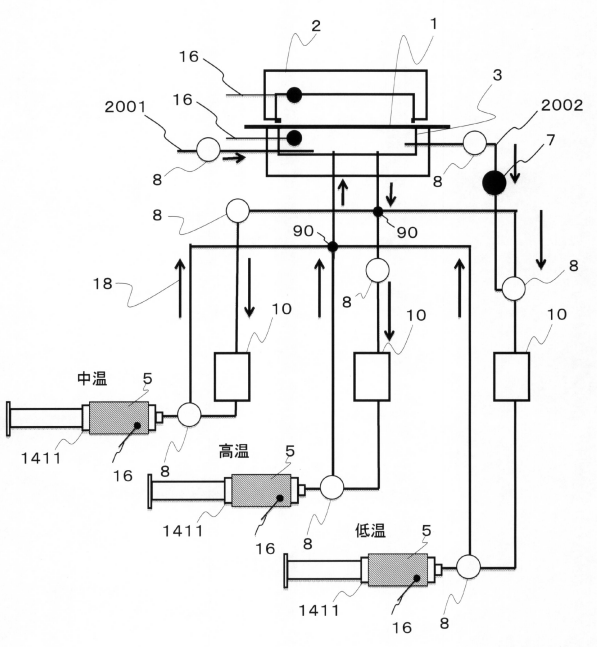
【図１９】



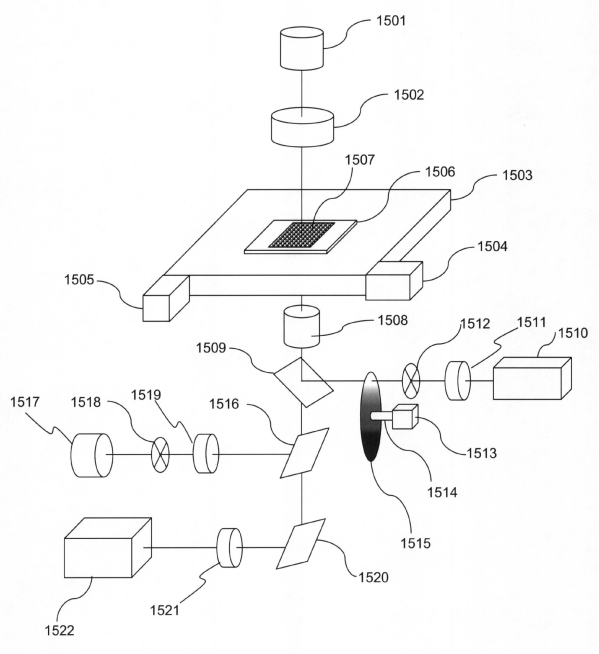
【図２０】



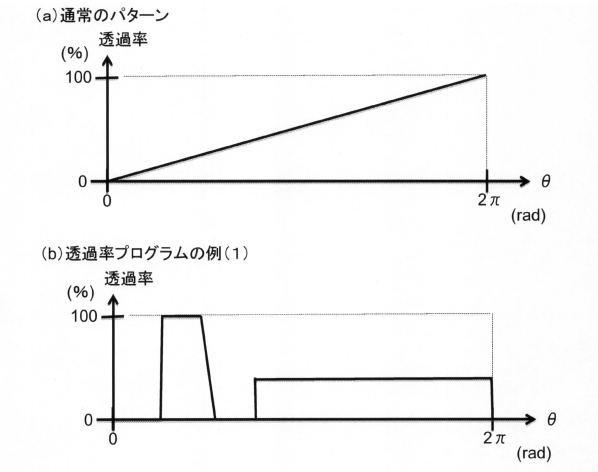
【図２１】



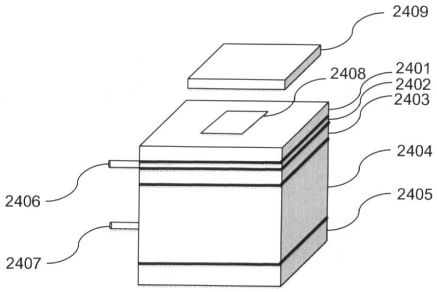
【図２２】



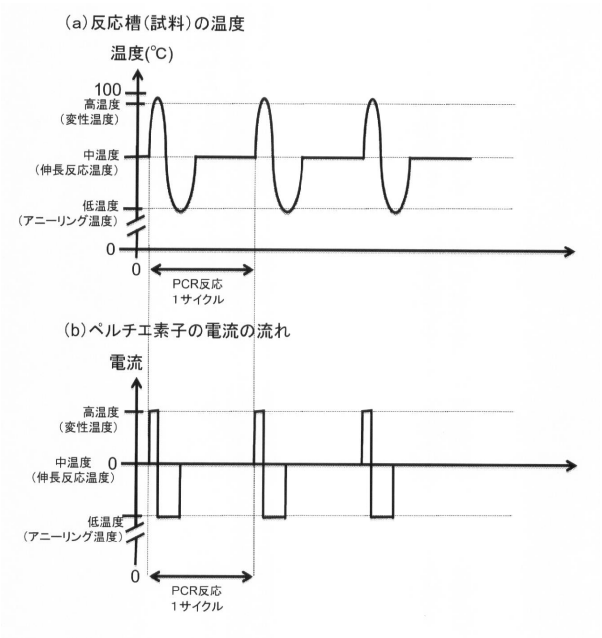
【図２３】


(a)通常のパターン
透過率
(%)
100
0
0
2π
θ
(rad)
(b)透過率プログラムの例(1)
透過率
(%)
100
0
0
2π
θ
(rad)

【図２４】


2409
2408
2401
2402
2403
2404
2405
2406
2407

【図２５】


(a)反応槽(試料)の温度
温度(℃)
100
高温度
(変性温度)
中温度
(伸長反応温度)
低温度
(アニーリング温度)
0
0
PCR反応
1サイクル
(b)ペルチエ素子の電流の流れ
電流
高温度
(変性温度)
中温度
(伸長反応温度)
0
低温度
(アニーリング温度)
0
PCR反応
1サイクル

フロントページの続き

(72)発明者　寺薗　英之
神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目２番１号　財団法人神奈川科学技術アカデミー内
(72)発明者　金　賢徹
神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目２番１号　財団法人神奈川科学技術アカデミー内
(72)発明者　服部　明弘
東京都千代田区丸の内１－３－１　一般社団法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム内

審査官　柴原　直司

(56)参考文献　特表２０１０－５２３１１６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１０／１１３９９０（WO，Ａ１）
国際公開第９９／０３９００５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｍ　　１／００－３／１０
Ｃ１２Ｑ　　１／６８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）