(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月9日(09.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/009019 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/686 (2018.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/024617

(22) 国際出願日： 2023年7月3日(03.07.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(71) 出願人: 株式会社日立ハイテク (**HITACHI HIGH-TECH CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1056409 東京都港区虎ノ門一丁目１７番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 手塚 沙也可 (**TEZUKA Sayaka**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 穴沢 隆 (**ANAZAWA Takashi**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 合志 祐美子(**KOSHI Yumiko**); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目６番６号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).

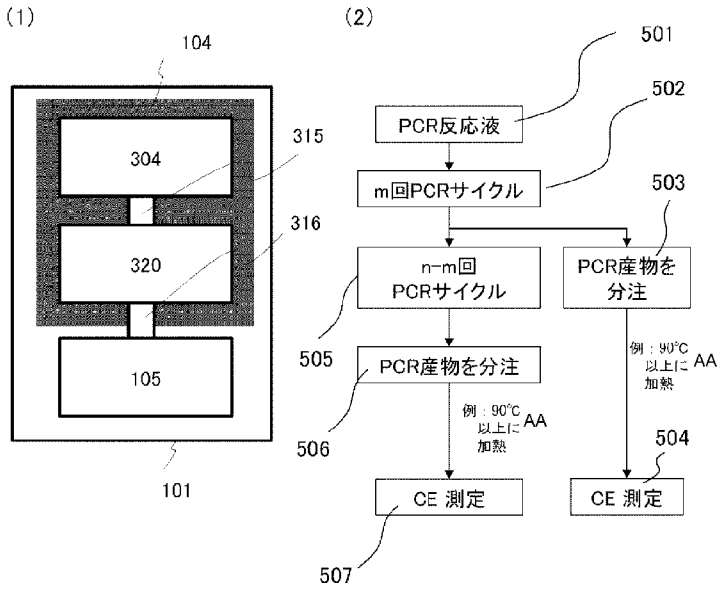
(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズ ＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

(54) **Title:** DNA ANALYSIS SYSTEM

(54) 発明の名称： ＤＮＡ分析システム

【図5】



501 PCR reaction liquid
502 m PCR cycles
503,506 Aliquot PCR product
504,507 CE measurement
505 n-m PCR cycles
AA Example: heat to 90°C or higher

(57) **Abstract:** This DNA analysis system comprises: a flow channel device that has a PCR chamber that performs thermal cycles; and a capillary electrophoresis unit that electrophoretically analyzes a PCR reaction liquid. The DNA analysis system stores values of m and n set in advance, the PCR reaction liquid is subjected to m thermal cycles in the PCR chamber to produce a first reaction liquid, part of the first reaction liquid is taken out from the PCR chamber without changing the composition, the part of the first reaction liquid is electrophoretically analyzed in the capillary electrophoresis unit, the first reaction liquid remaining in the PCR chamber is subjected to n-m thermal cycles (provided that n-m is an integer of

WO 2025/009019 A1

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

2 or more) in the PCR chamber such that the total number of thermal cycles is n to produce a second reaction liquid, at least part of the second reaction liquid is taken out from the PCR chamber without changing the composition, and at least the part of the second reaction liquid is electrophoretically analyzed in the capillary electrophoresis unit.

(57) 要約：サーマルサイクルを実施するPCRチャンバを有する流路デバイスと、PCR反応液を電気泳動分析するキャピラリ電気泳動部と、を有するDNA分析システムにおいて、前記DNA分析システムは、事前に設定されるmおよびnの値を記憶し、前記PCRチャンバにおいて、PCR反応液に対しm回のサーマルサイクルを実施して第1反応液を生成し、前記第1反応液の一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、前記第1反応液の前記一部を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析し、前記PCRチャンバにおいて、前記PCRチャンバに残された前記第1反応液に対し、サーマルサイクルの合計回数がn回となるように、n－m回（ただしn－mは2以上の整数）のサーマルサイクルを実施して第2反応液を生成し、前記第2反応液の少なくとも一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、前記第2反応液の前記少なくとも一部を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析する。

明　細　書

発明の名称 ： ＤＮＡ分析システム

技術分野

[0001]　本発明はDNA分析システムに関する。

背景技術

[0002]　フラグメント解析では、サンプルに含まれるDNAに対して、特定のDNAターゲット用に設計されたプライマを用いたPCRを行い、蛍光標識されたDNA増幅産物をキャピラリ電気泳動（CE）でサイズ別に分離する。遺伝子変異分析や定量、細胞株の認証、ゲノム編集効率の判定、増幅断片長多型（AFLP）、単純配列反復（SSR）、一塩基多型（SNP）のジェノタイピング、マクロサテライトマーカー分析に用いられる。マクロサテライトとは、特定のDNAモチーフが複数回繰り返されている反復性DNAのことを指し、他のDNA領域に比べて変異の頻度が高く、遺伝的多様性が高くなっているという特徴がある。マクロサテライトマーカー分析の代表例として、ショートタンデムリピート（STR）を用いた個体識別・人物鑑定がある。STRを用いたDNA鑑定は、法医学検査で広く用いられており、親子鑑定や犯罪現場のDNAと犯人を照合するといった用途に用いられる。

[0003]　フラグメント解析では、分析対象の蛍光標識されたDNA断片以外に、蛍光標識された既知長さのDNA断片（サイズスタンダード）を複数種類混合してCE分析することがある。サイズスタンダードを用いることにより、各増幅産物の断片長の長さを特定することができる。また、混合されるサイズスタンダードの量を一定量に設定すると、CE分析によって得られた増幅産物のDNA断片の強度とサイズスタンダードの強度の比から、増幅産物の量を計算することができる。また、PCR反応液に既知量・既知長さのDNA（Internal positive control、IPC）とそれを増幅させるためのプライマを混合して増幅させ、併せてフラグメント解析することで、ターゲット増幅産物とIPCの強度の比率から、ターゲットの増幅前のDNA量を推定することができる。

[0004] 非特許文献1による、法医学研究所で行われるDNA鑑定では、(1) 定量PCRを用いたDNA定量によってサンプルに含まれるヒトDNAの濃度を定量、(2) ヒトDNAが適当な濃度になるようにサンプルを調製してSTR-PCR(STR配列を含むPCR)、(3) PCR反応液の一部とサイズスタンダードを含むホルムアミドを一定の比率で混合して熱変性、(4) 熱変性した泳動サンプルをCE測定して電気泳動図を得て、(5)電気泳動図からDNA鑑定を行う。

[0005] 特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献8の前処理一体型CE分析装置によるDNA鑑定またはフラグメント解析では、(1)流路デバイス上で、DNAを含むサンプルをPCR、(2) 流路デバイス上で、反応液の一部とサイズスタンダードを含むホルムアミドを一定の比率で混合して熱変性、(3) 熱変性した泳動サンプルをCE分析して電気泳動図を得て、(4) 電気泳動図からDNA鑑定またはフラグメント解析を行う。特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献8は非特許文献1と比較して、一連の工程が自動化され、短い時間（例えば90分）で結果を得ることができる。

[0006] 特許文献5によるDNA定量では、(1) DNAを含むサンプルのPCRにおいて、連続する複数のサーマルサイクル数n（n0を予め設定した整数として、n＝n0、n0+1、n0+2、…）のそれぞれの段階の反応液の一部を分割、(2)分割した反応液をそれぞれCE分析、(3) CE分析による増幅産物のピーク強度とサーマルサイクル数nの関係、具体的には、ピーク強度が予め定めた閾値を超えるサーマルサイクル数nからDNA定量（サンプルに含まれるDNAの元の濃度を定量）を行う。つまり、特許文献5は、リアルタイムPCRにおける増幅産物の検出をCEで行う分析方法である。

[0007] 特許文献6によるDNA定量では、(1) 流路デバイス上で、DNAを含むサンプルのPCRにおいて、連続する複数のサーマルサイクル数n（n0とmを予め設定した整数として、mは1または2で、n＝n0、n0+m、n0+2m、…）のそれぞれの段階の増幅産物の一部を電気泳動により分割、(2) 流路デバイス上で、それぞれの分割した増幅産物をCE分析、(3) それぞれのCE分析による増幅産物のピーク強度とサーマルサイクル数nの関係、具体的には、ピーク強度が予め定めた閾

値を超えるサーマルサイクル数nからDNA定量（サンプルに含まれるDNAの元の濃度を定量）を行う。つまり、特許文献5は、リアルタイムPCRにおける増幅産物の検出をCEで行う分析方法である。

[0008] 特許文献7によるDNA定量では、(1) 流路デバイス上で、DNAを含むサンプルのPCRにおいて、複数のサーマルサイクル数nのそれぞれの段階の反応液の一部を分割、(2)流路デバイス上で、それぞれの分割した反応液をマイクロアレイ分析、(3) それぞれのマイクロアレイ分析による増幅産物のスポット強度とサーマルサイクル数nの関係、具体的には、スポット強度が予め定めた閾値を超えるサーマルサイクル数nからDNA定量（サンプルに含まれるDNAの元の濃度を定量）を行う。つまり、特許文献7は、リアルタイムPCRにおける増幅産物の分析をマイクロアレイで行う分析方法である。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：米国特許出願公開第2022/0016632号明細書

特許文献2：米国特許第9354199号明細書

特許文献3：米国特許出願公開第2019/0019290号明細書

特許文献4：特開2017-077180号公報

特許文献5：米国特許第7445893号明細書

特許文献6：特許第5494480号公報

特許文献7：米国特許第8715924号明細書

特許文献8：米国特許第10767225号明細書

非特許文献

[0010] 非特許文献1：John M. Butler、Fundamentals of Forensic DNA Typing (2009)、P.29～107およびP.279～336

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] CE分析装置や、CE分析部を搭載した装置において、ピーク強度と濃度がほ

ぼ比例関係になる最小ピーク強度と最大ピーク強度の比は100以下、または1000以下、または10000以下、または100000以下である。フラグメント解析をする場合、CE分析装置の強度ばらつきや、CEに注入されるアンプリコン量のばらつき、アレルごとの増幅効率・アレルごとの存在率のばらつき、色素間のばらつき、サンプル調整時のばらつきなどを加味すると、測定可能なDNA濃度の最小量と最大量の比は、10または30または100または300または1000または3000または10000である。その一方で、分析システムに持ち込まれるサンプルに含まれるDNAの最小量と最大量の比は30または300または3000または30000である。サンプルに含まれるDNA量が、分析システムの測定可能なサンプルDNA量の範囲を超過することで、フラグメント解析が失敗することがある。この場合、分析に費やしたサンプルや分析時間が無駄になってしまう。

[0012] 本発明の目的の一つは、簡単な構成で、低コストな装置により、濃度比が100倍、または1000倍以上の範囲で変化するDNAを含むサンプル（サンプル濃度範囲が100または1000＝2.0または3.0桁以上）をPCRおよびCE分析によって、高精度、高ロバストに、DNA鑑定/フラグメント解析、または、DNA定量（サンプルに含まれる個人のDNAの元の濃度を定量）を行うことである。加えて、特許文献2と同様に、一連の処理が自動化され、短い時間（たとえば180分以内、120分以内、90分以内）で結果を得ることができるようにする。

[0013] 非特許文献1の場合、PCRにもちこまれるDNA量が分析範囲を超えないように、定量PCRで定量して、適切な濃度にDNAを希釈してPCR反応を行う。流路デバイスで本方式を実施する場合、定量PCRを行うための光学系が必要である。また、定量PCR結果に応じて希釈濃度を決めるには複雑な流路構造が必要である。

[0014] 特許文献1において、PCR前に溶液を分割して、STR-PCRと定量PCRを実施する。定量PCRで定量して、STR-PCRのサイクル数を決定する。PCR開始前に溶液を分割するため、感度が低下する。また、2つの異なるPCRを実施するための流路デバイスは複雑で、追加の光学系も必要なため高コスト化は回避できない。

[0015] 特許文献2において、PCR前に溶液を分割して、異なる2つの濃度のDNA溶液を調整し、両方をPCRしてDNA鑑定する。2つのDNA溶液のうち、どちらか一方が分析システムの分析濃度範囲に入るため、分析範囲を拡大できる。PCR前に溶液を分割するため、感度が低下する。また、溶液を分割し、濃度調整するための流路機構を流路デバイスに搭載するため流路デバイスの複雑化は回避できない。

[0016] 特許文献3において、データ分析方法を改良することでDNA鑑定の分析範囲を拡大する。CE分析時に検出限界を下回ってしまったピークの情報は得られない。また、CE分析時に検出強度が飽和すると正しいピーク強度比が得られない。DNA鑑定の解釈を拡大しすぎると、解析によって得られたデータが本来の個人DNA混合比を反映しない恐れがある。誤ったプロファイリングが行われる危険性がある。

[0017] 特許文献4において、PCR後に反応液の一部を取り出し、光学系で増幅産物の有無や量を検出し、適切な増幅が行えていればフラグメント解析を実施する。増幅が不完全であると判断した場合は、PCR部に残された反応液に対して追加のPCR反応を行う。本方式の場合、追加の光学系や光学検出に適した流路デバイスの設計が必要で、高コスト化は避けられない。また、光学系による検出の際に、STR-PCRの蛍光色素が退色する恐れや、STR-PCRの蛍光色素と光学系による検出波長域の重複により、正しく光学検出ができない恐れがある。

[0018] 特許文献5と特許文献6において、多数のサーマルサイクル数n（連続する複数のサーマルサイクル数n）のそれぞれについてCE分析する必要があるため、結果を得るのに長い時間を要する。高精度な定量には、3回以上のCE分析が必要である。PCRをSTR-PCRに置き換え、DNA定量を行うことはできるが、多数回溶液を取り出すため、特殊な流路構造が要求される。また、反応液とサイズスタンダードを含むホルムアミドを一定の比率で混合する工程がないため、DNA鑑定を行うことはできない。また、サイズスタンダードを含むホルムアミド（泳動試薬）との混合行程を該当方式に組み込むことでDNA鑑定を行う場合

、各サイクルのPCR産物と泳動試薬を混合するための分注機構または流路構造が新たに必要となるため、装置が複雑化し、高コスト化につながる。また、特に高精度・高分解能であるCE分析を要求するDNA鑑定については各サイクルのPCR産物をCE分析するのは膨大な分析時間が必要となる。また、特許文献6の場合は、DNAを電圧印加によりPCRチャンバから取り出すため、PCRチャンバ内の増幅産物の組成と取り出された増幅産物の組成が異なっていることが想定される。DNA鑑定の場合、異なる長さのアンプリコンを測定するが、電圧を印加してPCRチャンバから増幅産物を取り出すと、長さに依存したバイアスが生じる懸念がある。

[0019] 特許文献7において、PCRをSTR-PCRに置き換え、DNA定量を行うことはできるが、多数のサーマルサイクル数n（連続する複数のサーマルサイクル数n）のそれぞれについてマイクロアレイ分析する必要があるため、結果を得るのに長い時間を要する。また、CE分析を行わないため、DNA鑑定を行うことはできない。

[0020] 一方、特許文献7では、少数のサーマルサイクル数n（連続しない複数のサーマルサイクル数n）についてマイクロアレイ分析しても良いことに言及されているが、これは現実的ではない。マイクロアレイ分析では、一般に、各スポットに固相化するプローブの密度や数がばらついたり、ハイブリ効率が時間的および空間的にばらついたりする等によって、同じDNA濃度に対するスポット強度が変動し、スポット強度の強弱から対応するDNAの有無を判定することはできるが、スポット強度から対応するDNAを定量する精度が低いためである。つまり、スポット強度が予め定めた閾値を超えるサーマルサイクル数nを高精度に求めるためには、多数のサーマルサイクル数n（連続する複数のサーマルサイクル数n）のそれぞれについてマイクロアレイ分析する必要がある。マイクロアレイ分析によるDNA定量の精度を向上させる手段として、同一のスポットに対して、ターゲットDNAまたはターゲット増幅産物とリファレンスDNAを競合ハイブリさせる方法が知られている。しかしながら、この方法を実施するためには、ターゲットDNAまたはターゲット増幅産物毎に、スポット上の

プローブにターゲットDNAまたはターゲット増幅産物と同等の効率でハイブリするリファレンスDNAを準備し、さらに、ターゲットDNAまたはターゲット増幅産物とリファレンスDNAを異なる蛍光体で標識し、それぞれの発光蛍光を独立に計測する必要が生じる。少数の異なるサイクル数のPCR産物を準備し、マイクロアレイ分析をしてダイナミックレンジを拡大した分析を実現する場合は、コストと労力を要する問題がある。

[0021] 特許文献7のその他の課題は、(1) 流路デバイス上で、DNAを含むサンプルのPCRにおいて、複数のサーマルサイクル数nのそれぞれの段階の反応液の一部を分割する際に分割された反応液と同量の新鮮なPCR溶液を、分割されずに残されたそれぞれの反応液に混合するため、反応液に含まれるDNAの濃度が変化してしまい、DNA定量の精度を低下させることである。

[0022] 特許文献7のさらにその他の課題は、DNAと固相化されたプローブのハイブリと脱ハイブリ（洗浄）を繰り返す必要があり、その度に固相化されたプローブが剥がれたり、ハイブリしたDNAが洗浄されずにキャリーオーバーしたりするため、マイクロアレイ分析の繰り返し再現性が低く、DNA定量の精度が低いことである。

[0023] 以上、DNA鑑定/フラグメント解析またはDNA定量の課題をまとめると、シンプルな流路デバイスで実現できて、低コスト、高ロバスト、シンプル、感度維持、測定時間が短い、分析DNA量範囲を広げることができるDNA分析法が必要とされている。

課題を解決するための手段

[0024] 本発明に係るDNA分析システムの一例は、

サーマルサイクルを実施するPCRチャンバを有する流路デバイスと、

PCR反応液を電気泳動分析するキャピラリ電気泳動部と、

を有するDNA分析システムにおいて、

前記DNA分析システムは、

事前に設定されるmおよびnの値を記憶し、

前記PCRチャンバにおいて、PCR反応液に対しm回のサーマルサイクルを実施

して第1反応液を生成し、

前記第1反応液の一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記第1反応液の前記一部を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析し、

前記PCRチャンバにおいて、前記PCRチャンバに残された前記第1反応液に対し、サーマルサイクルの合計回数がn回となるように、n－m回（ただしn－mは2以上の整数）のサーマルサイクルを実施して第2反応液を生成し、

前記第2反応液の少なくとも一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記第2反応液の前記少なくとも一部を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析する。

[0025] 本発明に係るDNA分析システムの一例は、

サーマルサイクルを実施するPCRチャンバを有する流路デバイスと、

PCR反応液を電気泳動分析するキャピラリ電気泳動部と、

を有するDNA分析システムにおいて、

前記DNA分析システムは、

事前に設定されるmおよびnの値を記憶し、

前記PCRチャンバにおいて、PCR反応液に対しm回のサーマルサイクルを実施して第1反応液を生成し、

前記第1反応液の一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記PCRチャンバにおいて、前記PCRチャンバに残された前記第1反応液に対し、サーマルサイクルの合計回数がn回となるように、n－m回（ただしn－mは2以上の整数）のサーマルサイクルを実施して第2反応液を生成し、

前記第2反応液の少なくとも一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記第1反応液の前記一部および前記第2反応液の前記少なくとも一部のうち一方を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析し、

前記一方の電気泳動分析の結果に基づいて、前記第1反応液の前記一部また

は前記第2反応液の前記少なくとも一部のうち他方について電気泳動分析の実行を制御する。

発明の効果

[0026] 本願において開示される発明の一例によって得られる効果を簡単に説明すれば以下のとおりである。すなわち、本発明の一例によれば、流路デバイスと電気泳動部を備えた分析システムにて、高精度、高感度、短時間で、低コストに小型な装置で、分析DNA量範囲を拡大することができる。

[0027] 上記以外の課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]分析システムの模式図である。

[図2]データの判定方法例である。

[図3]分析システムの模式図である。

[図4]分析システムの実施例である。

[図5]分析システムの模式図と実施例である。

[図6]分析システムの模式図である。

[図7]分析システムの模式図である。

[図8]流路デバイスの模式図である。

[図9]流路デバイスの模式図である。

[図10]流路デバイスの模式図である。

[図11]流路デバイスの模式図である。

[図12]流路デバイスの模式図である。

[図13]流路デバイスの動作例である。

[図14]分析システムの実施例である。

[図15]流路デバイスの模式図である。

[図16]流路デバイスの動作例である。

[図17]流路デバイスの模式図である。

[図18]流路デバイスの模式図である。

[図19]流路デバイスの模式図である。

[図20]流路デバイスの動作例である。

[図21]流路デバイスの動作例である。

[図22]流路デバイスの動作例である。

[図23]泳動試薬とピーク強度の関係を示した結果である。

[図24]本発明の効果を示す図である。

[図25]分析範囲を示す図である。

[図26]サイクル数の設定基準に用いる表の例である。

[図27]得られた電気泳動図の模式図である。

[図28]サイクル数の設定基準に用いる表の例である。

[図29]分析システムの実施例である。

[図30]データの判定方法例である。

[図31]データの判定方法例である。

[図32]分析システムの実施例である。

[図33]分析システムの実施例である。

発明を実施するための形態

[0029] 本明細書では、主にヒトDNA鑑定を実施するための手順や基準について述べるが、分析対象はヒトDNA鑑定に限定されるものではない。

[0030] 以下では、特に指定が無い場合、mとnはPCRのサーマルサイクル数を指す。mとnは整数で、n-m≧2であってもよい。なお、以下では、サーマルサイクルをPCRサイクルまたは単にサイクルと呼ぶ場合がある。

[0031] 以下では、PCR反応試薬とサンプル由来のDNAを混合した液をPCR反応液と呼ぶ。また、サンプル由来のDNAのうち、PCR反応試薬によって増幅されるDNAのことをターゲットDNAと呼ぶ。

[0032] 以下では、サーマルサイクルをm回したときに得られるPCR反応液を「PCR反応液m」、サーマルサイクルをn回したときに得られるPCR反応液を「PCR反応液n」と呼ぶ。

[0033] 以下では、泳動試薬には脱イオン化されたホルムアミドやサイズスタンダ

ード、純水が含まれていてもいい。ホルムアミドや純水は、泳動サンプルのイオン強度を下げるか、DNAを変性させるために含まれていてもいい。泳動試薬には、ホルムアミドや純水だけでなく、低導電率の溶液が用いられてもいい。低導電率の溶液は、10 mS/cm以下の導電率であることが好ましく、より好適には1 mS/cm以下、より好適には100 μS/cm以下、より好適には10 μS/cm以下である。泳動試薬に用いられる溶液の導電率が低いほど、よりCEに注入されるDNA量が増える傾向がある。サイズスタンダードは、検出されたピークとDNA長さを対応づけるために混合されていてもよく、検出されたピークから泳動サンプルに含まれていたDNA量を推定するために混合されていてもいい。

[0034] このように、分析システムの一例は、PCR反応液（たとえば、PCR反応液mの一部およびPCR反応液nの少なくとも一部の少なくとも一方）を、電気泳動分析の前に、純水またはホルムアミドまたは10 mS/cm以下の導電率の溶液と混合して混合液を生成する。導電率の低い溶液と混合することで、CEのピーク強度を高くすることが可能である。また、ホルムアミドと混合することで、DNAを変性させることが可能である。

[0035] 以下では、PCR反応によって得られたDNAを「増幅産物」と呼び、mサイクルで得られた増幅産物を「増幅産物m」、nサイクルで得られた増幅産物を「増幅産物n」と呼ぶ。

[0036] 以下では、PCR反応液を泳動試薬と混合したもの（混合液）を「泳動サンプル」と呼ぶ。泳動サンプルを調整する際は、図5(2)に示すように90℃以上に加熱すると、DNAが変性して1本鎖になりやすくなるため、より高精度なCE分析を実施することができるため、加熱ステップを入れることが好適である。「泳動サンプル」が指すサンプルは、加熱による変性を行う前でも、行った後のものでもいい。増幅産物mから作製した泳動サンプルを「泳動サンプルm」、増幅産物nから作製した泳動サンプルを「泳動サンプルn」と呼ぶことにする。

[0037] 以下では、PCRをmサイクル実施し、PCR反応液mの一部を取り出して、残ったPCR反応液mに対してn-m回PCRサイクルを実施し、最終的にPCR反応液mとnの

両方を準備するPCR反応手順のことを「分割PCR」と呼ぶ。

[0038] 以下では、遺伝子座とは染色体上の遺伝子の位置を指す。典型的なSTR-PCR向けキットには、各遺伝子座を特有に増やすことができるプライマが含まれている。

[0039] 以下では、アレルとは同一遺伝子座上で区別できる遺伝子変異体のことを指す。DNA鑑定をする際、DNAが1人に由来する場合は、同一遺伝子座上に2つのアレルが存在する場合（ヘテロ接合体）と、1つのアレルが存在する場合（ホモ接合体）の両方があり得る。

[0040] 以下では、アンプリコンとは単一の長さを有する増幅産物のことを指す。1つのアレルから異なる長さのアンプリコンが生成されることもある。例えば、複数のアンプリコンはPCRの反応で生じた副産物（アーティファクト）によって生じる。DNA鑑定の場合、1つのアレルに対して1つのアンプリコンのピークが個人のDNAに帰属されることが多いが、ミックスサンプルの場合はアーティファクトとアレル由来のアンプリコンの区別が難しいため、アーティファクトの可能性があるアンプリコンのピークも分析の対象となり得る。

[0041] 以下では、CE分析とは、泳動サンプルを準備し、CE測定し、電気泳動図を取得し、DNA鑑定またはフラグメント解析を行う一連の流れをさす。ただし、「CE分析」が指す範囲に前記行程の一部が含まれていなくてもいい。

[0042] 以下では、電気泳動図とは、CE測定によって得られた図であって、横軸を時間、または測定点、またはDNA鎖長とし、縦軸を強度とした図のことを指す。縦軸は波長で、強度情報を含む3次元のデータであってもいい。また、縦軸は強度で、色素情報を含む3次元のデータであってもいい。泳動サンプルmから得られた電気泳動図を「電気泳動図m」、泳動サンプルnから得られた電気泳動図を「電気泳動図n」と呼ぶことにする。

[0043] 以下では、DNAプロファイルとは、電気泳動図を解析することによって得られるDNA型または、ピーク強度とピーク長さを含む2次元配列または、DNA型に帰属されたDNAの繰り返し数とピーク強度を含むデータセットのことを指す。

[0044] 以下ではSTR-CEとは、STR-PCRのPCR反応液を調整し、PCR反応を行い、CE測

定し、得られた電気泳動図を解析する一連の流れを指す。STR-CEから得られるデータは電気泳動図でもよく、DNAプロファイルでもよい。STR-CEが終了した段階で、データの一部または全体がユーザに提供されてもよく、提供されなくてもよい。

[0045] 以下では、分析範囲とは、たとえば、分析システムまたは分析システムに内包される実施手順の一部または複数の手順について、与えられたサンプルまたは生体分子に対して、正しく分析が実施できる、与えられたサンプル量または生体分子量の範囲のことを指す。ここで、「正しく分析できる」とは、要求条件をすべて満たしている状態を指してもよいが、要求条件をすべて満たす必要はなく、該当システムで実現可能な最も良い状態のデータを提供することができる状態を指してもいい。例えば、与えられたサンプル量が極端に少ない場合、得られるデータがすべての要求条件を満たすことはできないが、最も要求条件を満たすのに近いデータを得られればいい。

[0046] PCR反応液は、2以上のプライマセットを含んでもよく、PCR反応液は、2以上の増幅遺伝子領域を含んでもよい。複数の増幅遺伝子領域を分析することで、個人/個体識別能力が高まる。特に、人物鑑定の場合は、誤って同一人物であると判定されるリスクを低減することができる。複数の遺伝子領域を個別のPCR反応ではなく、まとめて一度にPCR反応させることで、PCRチャンバの数を最小限にすることができる。反応試薬の節約になる。PCRチャンバを分けることで感度が低下するリスクを回避できる。

[0047] 実施形態１.

[0048] [分析システム]

本実施形態において分析システム101（DNA分析システム）はプログラム命令を格納するメモリと、プログラム命令を実行するプロセッサを含む制御部と、検出部から生データ・光学データ・エレクトロフェログラムデータを受け取り分析する機能と、ポンプやバルブなどの溶液搬送制御機構と、PCR反応液を電気泳動分析するCE部（キャピラリ電気泳動部）と、流路デバイスと、ヒーターとを備え得る。制御分析部は、ネットワークと繋がっていて、個人D

NAのデータベースにデータをアップロードすることや、照合すること、アクセスすることが可能になっていてもいい。例えばCODIS（Combined DNA Index System）と接続可能になっていてもいい。ポンプは、ダイヤフラムポンプやシリンジポンプが用いられていてもいい。バルブの例としてモーター動力を直接/間接的に伝達させ、フィルムを変形させるバルブや、空気圧を使って変形させるバルブが使われてもいい。バルブは制御部によってコントロールされてもいい。熱で変形させてバルブを開閉してもよく、磁力を用いてもいい。

[0049] 分析プロトコルに係る各種パラメータは、あらかじめ分析システム101に備えられたコンピュータ102のデータベース内に保存されていてもよい。コンピュータは、データベース103に記録されているパラメータに基づいて、流路デバイス104やCE部105およびその接続部等のバルブの開閉と、温度制御と、印加圧力および/または流量の制御との役割を担ってもよい。コンピュータ102に記録されているパラメータには、温度・時間・圧力・流量・および保存パラメータおよび実測値を元に、パラメータを設定するための関数が格納されていてもいい。

[0050] ターゲットDNAを含むサンプルを受け付けて、溶解から精製、PCR、CE測定と分析を全自動行うことができてもいい。溶解～精製～PCR～CE測定と分析の一部を全自動でできてもいい。たとえば、分析システム101または流路デバイス104は、後述の図１４に示す処理を、PCR反応液の調整からn－m回のサーマルサイクルまでを全自動で実施する。このようにすると処理が効率化される。非専門家による分析が可能になる。

[0051] 一体化したデバイスで、溶解、精製、およびPCR反応液調整を行ってもいい。一体化したデバイスで、PCRとホルムアミドを混合し、加熱してもいい。一体化したデバイスで、CE測定まで行ってもいい。

[0052] 流路デバイス104は使い捨てでもいい。使い捨てにすることで、サンプル間のコンタミを防ぐことができる。

[0053] CE部105は使い捨てでもいい。使い捨てにすることで、サンプル間のコンタ

ミが防げる。また、デバイスと一体成型ができるため、保管やメンテナンス、運搬が容易になる。前処理部とCE部の接続部がシンプルになり、故障やエラーの頻度を下げることができる。

[0054] 前処理流路デバイスが使い捨てである一方で、CE部は複数回使えるようになっていてもいい。CE部は精密な製造が要求されており、単価が高いため、使いまわし可能にすることで低コスト化が図れる。

[0055] 図1に分析システム101とコンピュータ102の詳細例を示す。

[0056] コンピュータ102はユーザインターフェイス106を備えていてもよい。ユーザインターフェイス106に係るパラメータ（例えば各ステップの時間や温度、圧力、流量、手順、分割液量、PCRサイクル数、サンプル情報、カートリッジ情報、分析プロトコルなど）をユーザから受け付けて、データベース103に保管してもよい。また、各種パラメータは、あらかじめデータベース103内に保存されていてもよい。コンピュータ102は、データベース103に記録されているパラメータに基づいて、流路デバイス104のバルブの開閉と、温度制御と、印加圧力・流量の制御と、の役割を担ってもよい。

[0057] 測定ごとに消耗される流路デバイス104は、内部にタグを有しており、タグの情報を分析システム101が読み取ることで、適切な分析プロトコルを設定してもいい。

[0058] PCRサイクル数（たとえばmおよびnの値）はユーザが設定してもいい。分析システム101は、事前に設定されるmおよびnの値を記憶する。また、ユーザがサンプルの種類に関する情報（例えば頬スワブ/Touch sample/Casework sample/DVIなど）を入力し、コンピュータ内のデータベースと照合して適切なPCRの実施手順を決めてもいい。複数回または複数の泳動サンプルについて電気泳動を行う場合、先に泳動サンプルmに対してCE測定するか、または先に泳動サンプルnに対してCE測定するかを、ユーザのインプットによって選択してもいい。また、実施手順をすべてコンピュータ102の下で自動制御してもよい。また、分析フローの一部をユーザが補助・実施してもよい。

[0059] 従来は、研究所等のように実験設備が整った環境にサンプルを送付し、専

門の知識と技術を持った検査官がサンプル調整と計測を行い、データ解析を行う流れが一般的であった。しかし、サンプルの輸送に時間がかかることや、実験設備の維持には多額の設備費・人件費が必要であることが問題点として挙げられる。また、効率を上げるためにバッチ処理を導入している場合、急ぎのサンプルを割り込ませるのは困難である。近年、サンプルの導入から計測・データの取得までを全自動で実施する、Sample-to-answer(StoA)システムが、様々な分野で登場しつつある。StoAシステムに、チャンバや流路、試薬が統合された、流路デバイスが用いられる場合がある。流路デバイスを導入することには、以下のメリットがある。(1)非専門家でも容易に計測できる、(2)短時間でデータを取得できる、(3)可搬性の高い装置が設計可能、(4)手技に由来するばらつきの低減、(5)試薬の保管が容易。

[0060] StoAシステムの利用分野としては、潜在的な応用も含めると、例えば法医学、DNA鑑定、体外診断、動植物の種の同定、バイオディフェンス、医薬、バイオテクノロジー、ライフサイエンス、防衛、公衆衛生、及び農業があげられる。StoAシステムは研究所や、犯罪捜査現場、交番、病院、自動車などで用いられてもいい。

[0061] [流路デバイス]

本実施形態において、流路デバイス104は試薬やチャンバ、流路を内部に備える、使い捨て、あるいは複数回利用可能なカートリッジを指す。流路デバイス104は、溶液の搬送動力源を内部に備えていてもよい。また、一部またはすべての試薬がデバイスの中に存在していてもよい。チャンバの一部には、温調機能や分子の捕捉機能、検出機能、電圧印加機能が備えられていてもよい。

[0062] 流路デバイスに使用される材料は、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。望ましくは、DNAの吸着量が少ない材料として、ポリプロピレンや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)、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタラート、ポリウレタン、を用いるのがよい。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望ましい。そのほかの材料としては、例えば、

－金、銀、銅、アルミニウム、タングステン、モリブデン、クロム、白金、チタン、ニッケル等の金属；

－ステンレス、ハステロイ、インコネル、モネル、ジュラルミン等の合金；

－シリコン；

－ガラス、石英ガラス、溶融石英、合成石英、アルミナ、サファイア、セラミクス、フォルステライト及び感光性ガラス等のガラス材料；

－ポリエステル樹脂、ポリスチレン、ポリエチレン樹脂、ＡＢＳ樹脂（Acrylonitrile Butadiene Styrene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等のプラスチック；

－アガロース、デキストラン、セルロース、ポリビニルアルコール、ニトロセルロース、キチン、キトサン、

またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

[0063] [チャンバ・試薬貯留部]

典型的なチャンバや試薬貯留部は液体や固体を格納することができて、溶液を反応させたり待機させたり加熱したり変化させたりすることができる空間を指す。チャンバは流路よりも太い径を有している場合もあるが、見た目では流路と区別がつかない場合もあってよい。チャンバは、内部に膜や微細構造を有している場合もあれば、流路とは異なる組成でできていたり、表面処理が異なっていたり、親水度が異なっている場合がある。また、流路デバイスの外側にヒーターやレーザー光源がついていてもいい。チャンバ内に試薬を保管してもよく、チャンバ内でPCRや溶解、精製などを実施してもよい。典型的なチャンバの容量は0.01μL～50mLであることが望ましい。

[0064] 流路デバイスはデバイス内に試薬を保管していてもよく、試薬を流路デバ

イス外・分析システム内部から供給されてもいい。一例として、デバイスには1種類以上の試薬が1つ以上の試薬貯留部に格納されている。試薬は、[溶解液、洗浄液、PCR試薬（ポリメラーゼ・プライマ・界面活性剤などを含みうる）、ホルムアミド、純水、DNA断片、オイル]のうち少なくとも1種類以上を含む。 これらは、意図しないタイミングで混合すると性能の低下、そのほか予期せぬ結果を招くため、使用直前までバルブ、フィルム、空気、あるいは自発的な混合を防げるほど細い流路、またはそれらの組み合わせからなる隔壁機構で隔てられていることが望ましい。また、試薬を外気から隔離することで、長期間の保管と、デバイスの可搬性を実現する。同一の試薬を複数のステップに分けて放出するため、複数の試薬貯留部に保管してもいい。デバイスの外に試薬が保管されている場合も同様に、外気と隔離された状態で保管されていることが望ましく、バルブ、フィルム、空気等でほかの精製システム構成要素と隔てられている。公知の試薬保管技術として、例えばブリスター試薬貯留部、または特許文献1や特許文献2に搭載されている試薬貯留部があり、類似の形態が本実施形態に組み込まれていてもいい。

[0065] [サンプル種]

本実施形態による精製システムに供されるサンプルは、生体由来サンプルであれば特に限定されるものではない。サンプルの由来となる生体も特に限定されるものではなく、脊椎動物（例えば哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類、両生類など）、無脊椎動物（例えば昆虫、線虫、甲殻類など）、植物、原生生物、真菌、細菌、ウイルスなどの任意の生体に由来するサンプルを用いることができる。

[0066] サンプルを採取する際は、スワブやろ紙、布などを担体に用いることができ、担体ごと精製システムに導入するようにしてもよい。

[0067] 法医学的サンプルとは、頬スワブ、骨、筋組織、人体臓器、Touchサンプルと呼ばれるごく微量のDNAを含むサンプル、血痕、皮膚片、毛髪、体液、および、これらが付着していると推定される遺留品を含む。多くの法医学的サンプルは未知量のDNAを含んでおり、濃度は0.001ng～1000μgのDNAを、より高

頻度には、0.01ng～10μgのDNAを含む。また、法医学的サンプルは単一の人物からなるDNAのみを含む場合もあり、複数人の人物からなるDNAを含む場合があり、劣化したDNAが含まれていることがある。

[0068] [溶液搬送制御]

分析システム101は、溶液を搬送するためにポンプやバルブを備えていてもいい。搬送手段は、シリンジポンプ、ダイヤフラムポンプ、電気化学的ポンプ、表面張力を用いたPassive搬送、遠心力、およびこれらの組み合わせが用いられてもよい。

[0069] 分析システム101にはバルブが備えられていてもいい。バルブは溶液の搬送パスを指定するほか、空気圧が印加されるパスを切り替えるために使われる。バルブは空気圧で作動するダイヤフラムバルブ、機械式バルブや表面張力を用いたバルブが用いられていてもいい。搬送に必要な圧力の差で、搬送可能な流路を切り替えてもいい。

[0070] [PCR反応]

デバイス内には、PCR試薬が備えられていてよい。PCR試薬は、ポリメラーゼを含む溶液と、プライマを含む溶液が別々に備えられていてもいい。PCR試薬は乾燥試薬であってもいい。スワブなどサンプルそのものがPCRに供されてもいい。シリカ精製や、Chelex、フェノールクロロホルム等で精製されたDNAをPCR試薬と混合してもいい。DNAがトラップされた膜（シリカ膜など）とPCR試薬を混合してもいい。

[0071] PCR試薬には、サンプルDNAとともに増幅されるIPCとIPCを増幅するためのプライマのセットが含まれていてもいい。IPC用のプライマには、色素がついており、CEで検出可能になっていてもいい。IPCに由来するアンプリコンを分析に利用することができる。IPCとサンプル由来のピークの強度比と、増幅効率補正係数や蛍光強度補正係数を用いることで、サンプルのDNA量を推定してもいい。また、IPCの強度を確認することで、PCR反応が正常に行われているか、阻害されているかを推定してもいい。

[0072] 典型的なPCR反応液の液量は1μl～200μlで、より好適には10μl～50μlで

ある。液量が少ない場合、正確な温調が可能、高速なPCRが可能、試薬コストが安いというメリットがある。一方で液量が多ければ、より多くの溶出DNAを受け取ることが可能である。

[0073] 典型的なPCR反応は、Initial denaturingステップ、Annealingステップ、Extensionステップ、Denatureステップ、Final Extensionステップから構成されていてもよく、一部のステップがなくてもいい。

[0074] Initial denaturingステップはPCRの開始時に90℃～99℃で1s～2min加熱され、PCRの反応を開始することができる。Annealingステップでは50℃～80℃で1s～2min加熱し、鋳型DNAにプライマを結合させる。Extensionステップでは50℃～80℃で1s～2min加熱し、DNAポリメラーゼがよく働く温度に上げ、DNAの伸長反応を行う。Denatureステップでは80℃～99℃で1s～2min加熱する。Final Extensionステップでは50℃～80℃で1min～60min加熱する。Final Extensionステップを設けることで、増幅産物の長さを揃えることができる。Annealing ステップとExtensionステップとDenatureステップの3つは10～40回繰り返される。AnnealingステップとExtensionステップは同一の温度で実施されてもいい。

[0075] [検出方法]

増幅後、CEによる検出が行われる。CEでは、増幅産物を電圧注入によりポリマーで満たされた毛細管に注入する方式が使われてもいい。さらにキャピラリの両端に高電圧をかけると、蛍光を発するDNA断片がサイズごとに分離され、レーザー/カメラシステムで検出される。本実施形態ではCE分析についてのみ言及するが、CE部の代わりに、ほかの実施形態では、Massively parallel sequencing (MPS) 、パイロシーケンシング、サンガーシーケンシング、ナノポアシーケンシング、クロマトグラフィー、電気測定、分光法、NMR、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) 、マイクロアレイ等が用いられてもよい。

[0076] [解析とピークの判定基準]

CE部で得た信号は分析部にて解析される。分析ソフトとして、GeneMapper

（登録商標）ID、GeneMapper ID-X、GeneMarker（登録商標）HID、i-Cubed（商標）、OSIRIS、TrueAllele（商標）などが知られている。CE分析では、解析の際に、信号強度vs時間の情報から、サイズスタンダードピークをもとに、横軸がDNA長さ、縦軸が強度の図が生成される。宇宙線やプルアップ・プルダウンを補正してもいい。ベースライン補正があってもよく、そのほか既存技術を用いて電気泳動図を得てもいい。得られた電気泳動図に対してピーク検出を行い、各アンプリコン強度とピーク位置を調べる。また、解析の際は、部分的に人の介入があってもよく、全自動で実施されてもいい。

[0077] 本章[解析とピークの判定基準]では、DNA鑑定に関するピーク判定基準について述べる。類似の判定基準がほかのフラグメント解析で用いられてもいい。

[0078] マクロサテライトとは、繰り返し単位当たり2～7個のヌクレオチドを有する、反復塩基配列を含むDNA遺伝子座のことである。特定の遺伝子座の繰り返し数は個体ごとにことなっており、STR-PCRによる増幅産物の長さの違いとして検出することが可能である。

[0079] 典型的なSTR-PCR分析では、2か所以上の遺伝子座を検出する。典型的には5か所以上、10か所以上、15か所以上、20か所以上、25か所以上の遺伝子座が含まれる。STR-PCRはGlobalFiler（商標）、PowerPlex（登録商標）などキットとして販売されているものを使用してもいい。また、CODISなどの各国の法医学向けまたはDNA鑑定向けの遺伝子座、または各種遺伝子データベースで指定された遺伝子座を含んでいることが好適である。遺伝子座には、常染色体上に存在する遺伝子座が含まれていてもよく、Y遺伝子上にのみ存在する遺伝子が含まれていてもいい。

[0080] 特定の遺伝子座がホモ接合になっている場合とヘテロ接合になっている場合が混在しており、単一の人物に由来するDNA型を調べたときに検出されるピークの数は、DNA量が劣化していたり不十分量である場合を除き、最小でキットの遺伝子座の数に対応し、最大で、キットの遺伝子座のうち常染色体に割り当てられた遺伝子の2倍量と性染色体に割り当てられた遺伝子の数の和に対

応したピークに対応する。

[0081] 典型的なSTR-PCR分析では、1つの遺伝子座に1色の蛍光色素が割り当てられている。2、3、4、5、6、7、または8色の色素を使ったSTR-PCRキットが用いられてもよい。DNA型を検出する際は、長さとピークの色の情報の組み合わせにより、遺伝子座を帰属してもいい。各種ピークの強度や位置に関する閾値は色ごとに、または遺伝子座またはアレルごとに設定されていてもいい。

[0082] 単一の人物に由来するDNAプロファイルでは、1つの遺伝子座に付き1つまたは2つのアレルが検出される。一方で、複数人に由来するミックスサンプルのDNAプロファイルは1つの遺伝子座につき1つまたは2つまたは3つまたは4つ以上のアレルが検出される。複数人に由来するDNAプロファイルから、個人のDNAプロファイルを帰属する際は、典型的にはピークの強度比から、確立的に分析される。ミックスサンプルを解析するためのプログラムとして例えばKonghо、LikeLTD、LRmix、STRmix、Euroformix、TrueAlleleなどが存在する。

[0083] DNA鑑定におけるアーティファクトとは、一例として、個人に由来するDNA型から取得されるべき理想的な電気泳動図やDNAプロファイルに対して、実際にDNA分析をした際に得られる電気泳動図やDNAプロファイルが異なってしまう原因となる、個人に由来するDNA型に由来しないピークや理想状態と異なるピーク間のバランス、理想状態と異なるピーク形状を指す。

[0084] アーティファクトの発生には複数のメカニズムが関与する。サンプルに含まれるDNAが単一の人物に由来する場合は、多少のアーティファクトの存在は許容される。

[0085] 一方で、アーティファクトが多く存在すると、機械的な判定精度が低下するため、専門家によるレビューが必要になる。

[0086] また、アーティファクトが多い場合、誤ったDNA鑑定結果が出てしまうことがある。

[0087] また、アーティファクトが大きい場合、取得されるべきDNA型が検出できず、得られる情報量が少なくなってしまうことがある。

[0088] また、1人のDNAに由来することが保証できないようなサンプル、典型的に

は法医学的サンプルのように複数人が関わっている可能性が排除できないサンプルの場合は、アーティファクトが存在すると、より電気泳動図の解析が複雑または困難になる。例えば、1つの遺伝子座に3以上のピークが出現した時に、それらのピークがアーティファクトに由来するのか、2人以上の人物に由来するのか解釈が難しくなる。また、ピーク強度の比率から個人のDNAプロファイルを帰属することが一般的に行われるが、アーティファクトの可能性を加味すると、帰属が困難になる。それゆえ、極力アーティファクトが少ない電気泳動図の取得が望ましい。

[0089] 個人のDNAに由来しないピークがCE分析時に発生し、分析結果に反映されてしまう場合、その状態をDrop inと呼ぶ。また、個人のDNAに存在するはずのピークがCE分析時に検出されず、分析結果に反映されない状態をDrop outと呼ぶ。Drop inとDrop outがなるべく生じないように各種閾値を設定することが好適である。

[0090] ＜スタターピーク＞

スタターピークは、PCR増幅の副産物である。伸長反応の際に1つ以上の繰り返し配列がスキップあるいは重複して増幅されることにより生じる。スタターピークは典型的にはサンプル由来のピークの前後に出現し、サンプル由来のピークから1または2繰り返し分多い場所、または少ない場所に出現する。典型的には、スタターピークはサンプル由来のピークの1～20%程度の強度を有する。

[0091] ＜アデニル付加不完全＞

STR-PCRでは伸長反応の際に、正しい長さのアンプリコンに一定確率で余分なアデニル基が付与される(A+ピーク)。典型的なSTR-PCRキットでは、PCR反応の最後に「Final extension」と呼ばれる反応ステップが追加される。このFinal extensionステップ内では、アデニル基が余分に付与されなかったアンプリコンにアデニル基を付与する。十分な時間のFinal extension時間を設けることでほぼすべてのアンプリコンにアデニル基が付与された状態を実現する。ただし、アンプリコンの量に対してFinal extensionの時間が過剰に設定

されていると、さらに余計にアデニル基が付与されたアンプリコン（A++ピーク）の割合が増えてしまう。A++ピークはA+ピークよりも1塩基長い位置に検出される。また、アンプリコンの量が過剰である場合、Final extensionの時間内にアデニル基の付与が完了せず、アデニル付加が行われていないアンプリコンが残存してしまい、1塩基少ないA-ピークとして検出されてしまう。以下ではA++ピークとA-ピークをまとめてIncomplete adenylation Peak（IAP）と呼ぶ。また、A-ピークに限定して記述する際は「IAP-」、A++ピークやさらに多くのアデニル基が付与されたピークのことに限定して記述する際は「IAP+」と記述する。好適なSTR-CEでは、A+ピーク強度に対して、A-ピークとA++ピークはそれぞれ50%以下、より好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下の範囲に収まるように、PCRサイクル数やFinal extension時間、Input DNA量など各種PCRパラメータを調整する。前記範囲にA-ピークまたはA++ピークの強度が収まって好適なSTR-CEが実施できたかどうかを判定するためのIAPの強度閾値またはメインピークに対する強度比閾値（Incomplete adenylation Peak ratio Threshold、IAPT）が設けられていてもいい。A+ピークに対するA-またはA++ピークの強度比が一定以上存在すると、メインピークの強度が本来の遺伝子の存在比率を反映しなくなる。また、ミックスサンプルの場合や、遺伝子多型によって1塩基ずれたピークが出現した場合、正確な帰属ができなくなる。また、誤ったDNA型が検出される原因にもなり得る。

[0092] ＜ピーク強度比＞

DNA量が十分に存在するとき、ヘテロ接合の遺伝子座に由来する2つのピークはほぼ同じ高さを示す。DNA量が不十分である場合は、各遺伝子に由来するDNA量が不均一になる確率が上昇し、2つのピーク強度の差が有意に大きくなる。また、増幅が過剰な場合、短いDNAが長いDNAに優先されて増幅される。同じ遺伝子座に由来するピークの高さも、短いDNAの方が優先されて増幅されるため、ずれが大きくなる。2つのピーク強度の比率が大きくなると、スタターピークとの区別ができなくなる。またミックスサンプルのＤＮＡの帰属が困難になる。そのため、有意なCE分析ができたか判定するために、2つのピー

クのうち、大きいものに対する小さいピークの強度の比率（Peak to height ratio、 PHR）が10%以上、より好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上であることが基準となる。

[0093] ＜Ski-slope＞

DNA量が過剰にある場合、アンプリコンに対するdNTPやPolymeraseの存在比率が低下し、短いDNAが優先的に増幅される傾向が強まる。この場合、得られる電気泳動図は長いDNAのピークが小さく、短いDNAのピークが大きい、スロープ状の電気泳動図が得られる。また、DNAが劣化している場合、長いDNAよりも短いDNAの存在比率が高まる傾向がある。このときもまた、同様にスロープのあるDNAプロファイルが得られる。また、阻害剤が含まれていると、長いDNAの増幅効率が短いDNAよりも下がる傾向にあり、これもまた同様にスロープのあるDNAプロファイルを与える。また、PCR試薬がDNA溶液で本来の混合比よりも希釈された状態になると、増幅効率に差が出て、長いDNAが優先的に増幅されて逆向きのスロープのあるDNAプロファイルを与えることがある。また、PCR試薬に、長いDNAのプライマを多く混ぜて、長いDNAが優先的に増幅されるような反応系になっている場合も、逆向きのスロープがあるDNAプロファイルが得られる。DNA鑑定において、スロープのあるプロファイルや、遺伝子座間のピーク強度比が大きいようなプロファイルは好ましくない。なぜなら、ピーク強度の差が大きくなり、CEを飽和させるか検出下限以下になるピークがより出現しやすくなるためである。また、ミックスサンプルの帰属が困難になるためである。典型的には、遺伝子座間のピーク強度比（Inter locus PHR）は最大のピークに対して最小のピークが1%以上、より好ましくは5%以上、より好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上の強度を有するように、PCR反応パラメータを調整することが望ましい。また、Inter locus PHRの閾値を満たさない小さいピークは、ピーク分析の対象外にしてもいい。また、劣化したDNAに対応するには、PCRの増幅量がSTR-CEに対して適切な範囲に収まっているか、CEのダイナミックレンジが大きく設計されていることが望ましい。

[0094] ＜CEのサチュレーション＞

CE部に導入されたアンプリコン量が過剰で、CE検出時の蛍光強度が検出器の検出範囲上限の強度を上回る場合、飽和が起こる。このとき、最大の強度を示したピークとそれ以外のピーク強度の比率は、本来の強度比を反映しない。また、スタターピークやIAPのメインピークに対する強度比が、本来のアンプリコンの比率よりも高めに検出される。そのため、上記に述べたアーティファクトが強調される。また、サンプルがMixだった場合は、正しい混合比を算出することができない。ゆえに、好ましいDNA鑑定では、CE検出がサチュレーション（Oversaturation、飽和、OS）しないように、PCR反応条件を設定するか、PCR増幅産物を希釈する。ＯＳスレショルドはCE実機で評価して設定してもよく、ユーザが設定してもよく、測定毎にユーザが設定してもよく、コンピュータ上で設定してもいい。

[0095] ＜CEのノイズ、プルアップ＞

CE検出部で生じるアーティファクトも存在する。

[0096] プルアップピークとは、他の色素に由来するピークが誤って検出されることを指す。プルアップは、CEがサチュレーションした際に際立って強く出るが、サチュレーションしていない場合も検出されてしまうことがある。

[0097] 直前の測定で大量のDNAがCE部に持ち込まれた場合、キャリーオーバーとなって次回測定でピークが検出されてしまうことがある。

[0098] また、CE部に混入した気泡や検出部のバックグラウンドノイズなどが電気泳動図に反映されることもある。

[0099] ノイズピークが誤って解析に利用されないよう、解析時はAnalytical Threshold（AT）が設けられ得る。Analytical thresholdは、バックグランドノイズを測定して、十分なＳＮ比が得られるように設定してもよく、ユーザが設定してもよく、装置が実験毎に設定してもよく、プリセットされていてもいい。また、ATを超えたピークであっても、そのピークが増幅産物に由来するのか、CEの泳動不良に由来するのか、CEの各種ノイズに由来するのか判定するためのプログラムが記憶され実行されてもいい。

[0100] ATは第一基準値と第二基準値の2段階またはそれより多くの段階に設定されていてもよい。第一基準より大きいピーク強度を有する場合は、真のピークと判定され、第二基準以上、第一基準以下の強度のピークはユーザまたは専門家によるレビューを要求するか、もしくは他の設定条件を満たしたときにピーク判定されるように設定されていてもいい。また、遺伝子座によって増幅効率が異なることもあり、色素ごとに発光効率やノイズの強度が異なることもあるため、ATは遺伝子座ごとまたは色素ごとに設定されていてもいい。

[0101] ＜アーティファクトの対策＞

以上のアーティファクトの対策方法について述べる。劣化していないDNAおよびPCR阻害物質の含まれていないDNAについては、STR-CEの分析範囲内に収まるようなDNA量をPCRに投入することで、適切なピーク強度（AT以上、OS以下）、PHR、IPAのデータを取得でき、かつSki slopeの出現を抑制することができる。また、劣化している、極微量である、または阻害物質が含まれている、という場合であっても、適切なサイクル数と投入量になっていれば得られる情報量を最大化できる。得られる情報量を最大化しつつ、アーティファクトの出現を最小限に抑えることができる、PCRサイクル数とDNA量のパラメータセットが存在する。

[0102] ＜CE分析結果の評価方法＞

CE分析結果をユーザに提供する際は、得られたCEデータが有用かそうでないか、あるいはどの程度有用であるかをユーザに併せて示してもいい。

[0103] CE分析結果をユーザに提示する際は、得られたCEデータが完全なDNA鑑定結果（Full profile）であるかをユーザに示してもいい。得られたCEデータに対して、再度分析が必要かどうかをユーザにアドバイスしてもいい。

[0104] 図2に、得られたDNAプロファイルが、Full profileであるかどうかを判定するため、またはデータの質をユーザに知らせるための評価フローを示す。本チャートは一例であり、順番が入れ替わっていてもよく、一部が無くてもよく、ここに示されていない工程が含まれていてもよく、複数のフラグが付与されるように一部または全体が同時に行われてもよい。また、各ピークま

たは遺伝子座ごとに図2のようなフローを実施し、すべての遺伝子座で基準を全て満たした場合にFull profileであると判定してもよい。Full profileでない場合も、基準を満たした遺伝子座の情報だけまとめてユーザに提供してもいい。また、遺伝子座ごとに、どの基準を満たさなかったか、あるいは満たしたか表などに出力して提供してもいい。

[0105] 201. すべてのピーク強度のうち、CE検出系を飽和する（OSしている）ものが存在しないこと。OSしているピークが存在する場合は、そのピークまたは遺伝子座、または分析結果にOSフラグを付与してもいい。

[0106] 202. すべての遺伝子座に1つ以上ATを上回るピークが存在すること。1つのピークも検出されていない遺伝子座が存在する場合、その遺伝子座または分析結果にDrop outフラグ（DO）フラグを付与してもいい。

[0107] 203. ATを上回るピークが1つしかない場合は、そのピークがATの2倍以上の強度を有していること（もともと1つしか検出されない遺伝子、たとえば性染色体の遺伝子座は除く）。2倍以上の強度が無い場合は、そのピーク、または遺伝子座、または分析結果にInconclusive homozygousフラグが付与されるものとする（IHフラグ）。

[0108] 204.メインピークに対して±1塩基分ずれたところに存在するピーク強度が、メインピークの強度に対してピーク比率が1%または5%または10%または20%または40%で設定されたIPATを超えていないこと。超えている場合は、そのピークまたは遺伝子座、または分析結果に対してIPAの強度が強いことを示すフラグが付与されるものとする（IPA-、またはIPA++フラグ）。

[0109] 205. 検出されたピークのすべてが、DNA型に帰属できるDNA鎖長に存在していること。帰属されなく、かつIPAに該当しない場合はOff ladder（OL）のピークであると認定され、そのピークまたは遺伝子座、または分析結果に対してOLフラグが付与されるものとする。ただし、スタターピークの位置に出現するピークはOLの判定対象にはしなくてもいい。

[0110] 206. 1つの遺伝子座につき、3つ以上（1つしか存在しないはずの遺伝子座については2つ以上）のピークが検出されないこと。検出されている場合、3

番目に高い強度を有するピークが、2番目に高いピークに対して1%以下、または5%以下、または10%以下、または20%以下、または40%以下の強度であること。3番目に高い強度のピークの、2番目に高いピークに対する強度の比率が閾値を超える場合、サンプルに含まれるDNAは2人以上に由来すると判定されてMixフラグが立ってもいい。ただし、1番または2番のスタターピークが出現する位置に3番目に強い強度を有するピークがくる場合は、スタターピークであると判定される場合があってもいい。スタターピーク位置に、メインのピークに対して1%以下または、5%以下、または10%以下、15%以下、20%以下、40%以下の強度でピークが出現している場合はスタターと判定してMixフラグを立てないようにしてもいい。スタターピークになり得る位置にピークが存在しており、その強度がスタターピークの許容範囲の閾値を超えている場合は、Mixである可能性があるため、Mixのフラグが立ってもいい。また、スタターピークが出現しないはずの位置に3番目に高い強度を有するピークの強度が、閾値を超える場合はMixのフラグが立ってもいい。同様の判定は、4番目、5番目以降の強度を有するピークに対して実施されてもいい。

[0111] 207. 2つ以上のピークが検出されており、2番目の強度を有するピークが1番目のピーク強度の1%以上または5%以上または10%以上であり、かつ60%以下または40%以下または20%以下である場合は、PHRが悪いと判定され、PHRフラグが付与されてもいい。

[0112] PHRが悪くなるのはPCRに回されたDNA量が0.6ngまたは0.3ngまたは0.15ngまたは0.075ngを下回った場合である。たとえば、CE分析でIPCの強度またはPCRサイクル数とピークの強度から、おおよそのDNA量を推定したときに、PCRに回されたDNA量が前述のDNA量を上回っているにもかかわらず、PHRが閾値を超えない場合は、得られたDNAプロファイルがミックスサンプルに由来すると判定されてもいい。

[0113] IPAフラグを与えるピークは、OLフラグも与えるため、判定基準205が204を兼ねていてもよく、すなわちIPAフラグはOLフラグを包含してもよい。

[0114] 上記いずれのフラグも付与されない場合には、Full profileが得られる。F

ull profileが得られない場合は、専門家によるレビューが要求されてもいい。この場合、DNA鑑定が完了するまでの時間が長引く可能性がある。そのため、適切なサイクル数を設定することで、Full profileになる確率を高める必要がある。また、もともとサンプルがミックスになっている場合、量が少ない場合、PCR阻害物質が多い場合、Full profileを得られないが、すべての遺伝子座が正常に検出されていない場合、等であっても、5以上、または10以上の遺伝子座が検出されている場合は、犯罪捜査に役立てることができる。このようなDNAプロファイルはPartial profileと呼ばれる。得られる遺伝子座の情報は多いほど犯罪捜査に役立つ。すなわち、Partial profileになるような状況であっても、できるだけ多くのピークが検出できるように分析プロトコル、特にPCRサイクル数を設定する必要がある。特に、ミックサンプルの場合やDNA量が少ない場合、電気泳動図は201、205、206、を満たしつつ（すなわちこれらのフラグが付与されず）、なるべく多くのピークが検出できるように、プロトコル、特にPCRサイクル数を設定する必要がある。

[0115] DOの原因が、PCR反応に投入されたDNAに該当アレルが含まれていなかったために、生じているのか、PCRサイクル数が少なくて生じているのかを確認できるようにスレショルドを設定してもいい。例えば、ATを上回るピークが1つもない遺伝子座がある場合に、全体の増幅産物の中でATの10倍以上となるピークが存在する場合、サンプルに起因するDOであると判定してよく、そうでない場合は、PCRサイクル数が少ないために生じているのか、サンプルに起因するのか起因できないものと判定してもいい。本判定は、PCRサイクル数を増やした分析をするべきか判定するための材料になりうる。

[0116] [分析範囲について]

STR-CEを実施する際、強度が変動する要因として以下が挙げられる：(1)PCR反応液に含まれる塩や注入阻害になる物質の濃度変動、(2)泳動試薬とPCR反応液の混合比率、(3)増幅効率、(4)泳動試薬の劣化やDenatureが不完全、(5)泳動部の温度ばらつき、(6)電解注入時のばらつき、(7)キャピラリ間・キャピラリアレイ間のばらつき、(8)検出部の検出強度ばらつき。

[0117] 以下では、CEのダイナミックレンジとは、各種CE装置に設定されたマニュアル等に記載されているダイナミックレンジでもよく、実際にCEに投入するアンプリコン量に対してリニアに信号が得られる最小のアンプリコン量に対する最大のアンプリコン量の比でもよく、信号強度からCEに投入するアンプリコン量の相対比を帰属できる最小のアンプリコン量に対する最大のアンプリコンでもよく、任意の分析下限に対する任意の分析上限の比率でもいい。ATに対するＯＴの比率でもいい。測定毎に変動してもいい。

[0118] 以下では、STR-CEの分析範囲は、特に限定が無ければ、単にCEのダイナミックレンジに対応していてもよく、実際に実験でPCRに入れるDNA量を変えて実験を行い特定のアレルが正しく検出できるDNA量を調べてもよく、実際に実験でPCRに入れるDNA量を変えて実験を行い特定のアレルセットが正しく検出できるDNA量を調べてもよく、そのようなDNA量の範囲を異なる複数の個人に対して実験で調べて平均または最小または最大の範囲を分析範囲としてもいい。CE測定に供されるDNA量は、おおむねSTR-PCRに入れたDNA量に比例することが多いが、CE注入効率のDNA濃度依存や、PCR増幅効率のDNA濃度依存およびサイクル数依存があるため、つねに比例するとは限らない。また、PCRのサイクル数を変えた際に、STR-CEの分析範囲は大きく変動しないことが大半であるが、特にDNA量を減らしていくとStochastic effect（増幅したい遺伝子座に対応するDNA量が投入したDNA量に比例しなくなる、確率的効果）が生じるためずれていくことがあり得る。そのため、真のSTR-CEの分析範囲は、上記の検討をサイクル毎に行うことが望ましく、そのような検討を経て設定されたサイクルごとの分析範囲もSTR-CEの分析範囲の一種であるものとする。ただし、すべて実験で確認するのは多量の労力が必要なので、一部は計算で置き換えられてもいい。

[0119] CEのダイナミックレンジやSTR-CEの分析範囲は上記で挙げた(1)～(8)のばらつきを加味して評価してもいい。

[0120] 設定する閾値を変更することで、分析範囲を広げることも、狭めることもできる。ただし分析範囲を広げようとすると、精度が低下するという代償が

発生する可能性がある。機械学習等の方法でアーティファクトと真のピークの切り分けをより確実にできる場合、閾値を分析範囲が広がる方向に変更できる。

[0121] 以下では、分析システムの分析範囲とは、たとえば、分析システムに投入されたDNAサンプルに対して、正しくDNA分析が実施できる、サンプルに含まれるDNA量の範囲のことを指す。分析範囲を拡大するには、STR-CEの分析範囲を拡大するか、STR-CEに投入されるDNA量をコントロールすることが必要である。STR-CEの分析範囲を拡大する際は、CEのダイナミックレンジと感度を向上させるか、STR-CEのばらつきを小さくするか、複数サイクルの増幅産物を準備するか、溶出液を異なる希釈率で準備してそれぞれSTR-CEに供するか、等が可能である。STR-CEに投入されるDNA量をコントロールする際は、精製膜で処理できるDNA量の上限をカットオフできるように精製膜の体積を小さくするか目を粗くしてもよく、精製後に定量して希釈率を変えてもいい。

[0122] 《分割PCR向け分析システムとその動作例》

[0123] 〔分析システム〕

[一般的な分析システムの構成例]

図3は、分析システム101の一例を示す。図4は分析システム101の動作手順の一例を示す。生体分子分析装置には、生体分子分析を実施するためのコンピュータ102と、流路デバイス104が備えられている。

[0124] 流路デバイス104には採取したサンプルを導入し溶解するための溶解チャンバ301と、精製膜302が格納された精製膜チャンバ303と、DNAの増幅などを行うPCRチャンバ304（サーマルサイクルを実施するPCRチャンバ）と、廃液チャンバ305が存在する。デバイスの外と流体的に接続された外部接続口306が存在する。溶液の搬送は外部接続口306を介して行われ、デバイスの外と試薬や増幅産物などのやり取りを行うことができる。分析システム101にて溶液を搬送する際は、ポンプおよびバルブ307を用いて送液をコントロールしてもいい。ポンプおよびバルブ307はすべて流路デバイス外に備えられていてもよく、一部が流路デバイス104内に備えられていてもいい。また、PCR試薬貯留部308

にはPCR反応に必要なPCR試薬309（ポリメラーゼ、Primer、dNTP、バッファーなど）が備えられており、泳動試薬貯留部310には泳動試薬311が備えられていてもいい。また、そのほか前処理に必要な試薬を保管するための試薬貯留部312、313、314が含まれている。サンプル投入ステップ401において、サンプルが溶解チャンバ301に格納される前後に、試薬貯留部312から溶解バッファーが溶解チャンバ301に搬送される。次に、溶解ステップ402において溶解が開始する。精製ステップ403において、溶解産物は溶解チャンバ301から精製膜チャンバ303に送られ、DNAを精製膜302に結合させ、試薬貯留部313から洗浄液が放出され、精製が行われる。精製後に、洗浄液などを乾燥させるステップが入ってもよい。試薬貯留部314から溶出液を放出して、精製膜チャンバ303から溶出したDNAがPCRチャンバ304に搬送される。PCR試薬貯留部308からPCRチャンバ304にPCR試薬が搬送され、溶出されたDNAと混合される。増幅ステップ404において、PCRチャンバ304にて精製されたDNAはPCR試薬309と混合され、PCR反応に供される。検出ステップ405において増幅されたDNAは泳動試薬貯留部310に貯留されている泳動試薬311と混合され、CE部105にて計測が実施される。

[0125] 泳動試薬とPCR反応液を混合したのちに、CE分析する前に、80～100℃で加熱して、0℃～10℃に急冷するステップを設けてもいい。本ステップを設けることにより、DNAをより完全に一本鎖化し、高精度なCE分析を実現する。

[0126] [本実施形態に用いられる分析システムの例]

図5に本実施形態の分析システム101の概略(図5(1))と動作手順の例(図5(2))を示す。動作ステップ501～507は増幅ステップ404および検出ステップ405に相当していてもいい。

[0127] 図5(1)のように本実施形態の分析システム101では、流路デバイス104とCE部105を有しており、流路デバイスにはPCRチャンバ304が備えられている。また、分析システム101には分注チャンバ320が備えられている。分注チャンバ320には、PCR反応液または泳動サンプルが送り込まれる。ただし、分注チャンバ320は省略されていてもいい。それぞれの要素が流路315、316で接続されて

いる。

[0128] 図5(2)のように、分析システム101はステップ501にてPCR反応液を準備し、ステップ502にてPCRチャンバ304にてm回のPCRサイクルを実施したのちに、ステップ503にて増幅産物の一部を組成を変えずにPCRチャンバ304からPCR反応液mを取り出し、ステップ504にてCE部105にて泳動サンプルmについてCE測定し、ステップ505にてPCRチャンバ304残されたPCR反応液mに対してn-m回サーマルサイクルし、PCR反応液nを得る。ステップ506にてPCR反応液nの一部を組成を変えずにPCRチャンバ304から取り出し、ステップ507にてCE部105にて泳動サンプルnのCE測定をする。

[0129] ステップ506の分注ステップを省略して、ステップ507にてnサイクルの増幅産物全てを泳動試薬と混合してもいい。

[0130] ステップ503から505を複数回繰り返して、分割数を3回、4回、またはそれ以上に増やしてもいい。

[0131] ステップ504と507は同時に実施されてもよく、504のあとに507を実施してもいい。504のあとに507を実施することで、504の結果に応じて505の設定を変えることができる。

[0132] ステップ503が終わったら直ちに505を開始してもいい。502と505の間の時間が短いため、アーティファクトの発生を抑制できる。また、504が終わるタイミングに合わせて507が開始できるように505と506の実施タイミングを設定してもいい。

[0133] [本発明の実施に用いられる分析システムの派生例]

図6のように分析システム101はPCRチャンバ304内でサーマルサイクルするための加熱部317、318（温調・加熱機構）が付いていてもいい。PCRチャンバ304には流路319と流路315が接続されており、試薬の供給や圧力の制御を受けてもいい。図6のように分析システム101は、流路デバイスやCE測定など各種ステップ適した溶液搬送を実施するためのポンプおよびバルブ307を備えていてもいい。図6のように分析システム101は、コンピュータ102を備えていてもよく、コンピュータは、ポンプおよびバルブ307の制御、CE測定の制御、温調

制御、CE部105や加熱部317、318等から得られたデータを分析してフィードバックする機能、ユーザに提供する機能、等を備えていてもいい。流路デバイスには分注チャンバ320が備えられていてもよい。分注チャンバ320は、m回のサーマルサイクルが完了したタイミングで、増幅産物の一部を組成を変えずにPCRチャンバ304から取り出す機能を有する。分注チャンバ320は、PCR反応液mまたはnを規定量取り出すための計量機能を備えていてもいい。分注チャンバ320にPCR反応液を送り込む際は、分注チャンバ320がPCR反応液を吸い上げてもよく、加圧によってPCR反応液が分注チャンバ320に送り込まれてもいい。また、分注チャンバ320は単にPCR反応液を一時的に溜めるためだけに備えられていてもよく、計量機能が付与されていなくてもいい。分注チャンバ320は流路デバイス104の外に備えられていてもいい。

[0134] PCR反応液mは、CE測定するまでの間、分注チャンバ320内に待機される時間があってもいい。分注チャンバ320にて、泳動試薬（ホルムアミドやサイズスタンダード）と混合されてもいい。すなわち、分析システム101は、反応液（たとえば、PCR反応液mの一部およびPCR反応液の少なくとも一部の少なくとも一方）を、複数種のDNA断片を含む溶液と混合する。これによって、サイズスタンダードのピークの高さを基準として濃度を測定することができる。

[0135] 図6のように分析システム101はCE部105とPCR部の間に、待機部321を有していてもいい。待機部321では、ステップ506から507または503から504にかけてPCR反応液やPCR反応液とホルムアミドを混合した泳動サンプルを一時的に保持してもいい。図6（および以降の図面も含めて）の流路デバイスは縦向きに、すなわち流路の主な部分または流路の少なくとも一部が重力の向きと並行になるように、配置されてもいい。流路デバイスの一形態では、図面の下側が重力方向で下向きになって使われている。縦向きに使うことで、各チャンバ内の気泡/混入した空気がチャンバの上部に溜まるため、次のチャンバ/流路に搬送する際は溶液を下から取り出すことで、空気の次のステップへの混入を最小限にすることができる。

[0136] 流路デバイスについて、以下のような変形を施すことができる。

[0137] 図6のように本実施形態の分析システム101の一形態では、流路デバイスの中にCE部105を有している。また、図7のように分析システム101の一形態では、流路デバイスの中にポンプおよびバルブ307を有している。なお、光学系は流路デバイスの外でも、分析システム101内部に配置されていてもいい。

[0138] 〔流路デバイス〕

図8のように、流路デバイス104は分析システム101と外部接続口306を介して、溶液のやり取りおよび空気圧の制御を受けてもいい。外部接続口306から流路322を介して圧力を印加し、分注チャンバ320からPCR産物または泳動サンプルを送り出してもいい。流路デバイスの中にはバルブ323、324、325、326が備えられており、分析ステップに応じて開閉する。

[0139] 図9のように、流路デバイスは分注チャンバ320と外部接続口306の間に混合チャンバ327を備えていてもいい。混合チャンバ327にて、分注チャンバ320のPCR反応液と泳動試薬を混合してもいい。混合チャンバ327は、流路328で分注チャンバ320と接続されていてもいい。混合チャンバ327は、流路デバイスの外、分析システム101内部に備えられていてもよく、場合によっては待機部321がその役割を担ってもいい。混合チャンバ327には流路329が接続されており、流路329に圧力をかけることで混合チャンバ327に気泡を送り込み攪拌してもよく、CE部105に泳動サンプルを送り込んでもいい。

[0140] 図9のように、PCRチャンバ304は3つの流路319、315、330を備えていてもいい。流路319はサンプルの上流側に、流路315は分注チャンバ320に、流路330は混合チャンバ327に接続されていてもいい。PCRチャンバ304から取り出されたPCR反応液mは分注チャンバ320を経由して混合チャンバ327へ搬送され、PCRチャンバ304から取り出されたPCR反応液nは分注チャンバ320を経由せずに流路330を経由して混合チャンバ327に搬送されてもいい。PCR反応液mとPCR反応液nが別のパスを通るため、液残りに由来する再現性の低下を抑制することができる。また、反応液nは計量し、反応液mは計量せず全量を混合チャンバ327やCE部105に搬送する場合、反応液mを分注チャンバ320に搬送する必要が無いため、本流路デバイス構造のほうが簡便に分割PCRを実施できる。

[0141] PCR反応液mも計量する場合、PCR反応液nに使用する分注チャンバ320とは別にもう一つ分注チャンバを設けてもいい。

[0142] 流路デバイス104は図10のように、泳動試薬（ホルムアミド・DNA断片・純水など）を保管する泳動試薬貯留部310、331を備えていてもいい。泳動試薬貯留部310、331は流路315上にあってもよく、流路319上にあってもいい。試薬貯留部は図10のように1種の試薬につき2つ以上に貯留部が分かれていてもいい。2つに分けることによって、分割時にそれぞれ規定量の試薬を放出することができる。もしくは、貯留部から放出される液量を制御し1つの試薬貯留部から2回以上に分けて試薬が放出されてもいい。図10のように流路デバイス104は空気貯留部332、333を備えていてもいい。空気貯留部332、333は流路315上にあってもよく、流路319上にあってもいい。分割時に、空気貯留部332または333から規定量の空気を放出することにより、規定量のPCR反応液をPCRチャンバ304の外に搬送することができる。本流路デバイス構成の場合は、分注チャンバ320が省略されていても分割PCRを実施することが可能である。本流路デバイス構成の場合は、分注チャンバ320を混合チャンバ327が兼ねていてもいい。空気貯留部332または333には空気ではなく、オイルなどPCR反応に影響が出ない液体を入れてもいい。空気貯留部332または333にはPCR反応液を入れて、押し出したPCR液に相当する体積のPCR反応液が新しく補充されてもいい。

[0143] 図11のように泳動試薬貯留部310と331は、それぞれPCRチャンバ304をまたいで対になる流路に備えられていてもいい。図11のように泳動試薬貯留部331は空気貯留部333よりもPCRチャンバ304寄りに設置されていることが好適である。なぜなら、流路319またはPCRチャンバ304内に溜まった泳動試薬311をすべて分注チャンバ320または混合チャンバ327に全量またはより多くの液を送り込むことができて、再現性の向上に寄与できるからである。図11のように流路デバイス104は流路315上で泳動試薬貯留部310よりもPCRチャンバ304寄りに空気貯留部334を備えていてもいい。空気貯留部334は分注チャンバ320内にある泳動サンプルmを混合チャンバ327またはCE部105に搬送するために用いら

れてもいい。空気貯留部334は流路322に置き換えられてもよい。

[0144] 〔分割PCR実施方法の例〕

本項では、分割PCRを流路デバイス104上で実施するための方法について述べる。随所で分注チャンバに言及するが、分注チャンバ/混合チャンバを使わずに直接CE部105に溶液を搬送してもいい。

[0145] 図12に流路デバイス104の一例を、図13に図12の流路デバイス上で分割PCRを実施するための搬送方法例を示す。なお図示の便宜上、一部の参照符号は図12に示し図13では省略する。

[0146] ステップI：PCR反応液335を納めたPCRチャンバ304があり、バルブ326、323、325を閉めた状態でPCRチャンバ304にて、mサイクルPCR反応を行う。本ステップは、ステップ502に対応していてもいい。

[0147] このように、分析システム101は、PCRチャンバ304において、PCR反応液335に対しm回のサーマルサイクルを実施してPCR反応液m（第1反応液）を生成する。

[0148] ステップII：mサイクルのPCR反応が終了したら、バルブ326と323を開放し、PCRチャンバ304の溶液の一部を分注チャンバ320に搬送する。本ステップはステップ503に対応していてもいい。

[0149] このように、分析システム101は、PCR反応液mの一部を、組成を変えずにPCRチャンバ304から取り出す。ここで、分析システム101は、PCR反応液mの当該一部を、CE部105において電気泳動分析してもよい。

[0150] このように、流路デバイス104は開閉可能なバルブ326、323を有しており、m回のサーマルサイクルの開始前にバルブ326、323を閉じて、m回のサーマルサイクルの終了後にバルブ326、323を開放することにより、PCR反応液mの一部を分割して取り出す。このようにすると、分割処理を適切に実施することができる。

[0151] ステップIII：バルブ323と326を閉めて泳動試薬貯留部310から泳動試薬311を押し出し、分注チャンバ320内に格納されたPCR反応液mを混合チャンバ327に搬送する。PCR反応液mは泳動試薬311と混合されることで泳動サンプル336

になる。

[0152] ステップIV：バルブ325を開放し、混合チャンバ327内の泳動サンプルを流路デバイス104の外（分析システムの待機部321またはCE部105）に搬送する。本ステップはステップ504に対応していてもいい。

[0153] ステップV：バルブ326を閉じ、n-m回サーマルサイクルを実行する。本ステップはステップ505に対応していてもいい。

[0154] このように、分析システム101は、PCRチャンバ304において、PCRチャンバ304に残されたPCR反応液mに対し、サーマルサイクルの合計回数がn回となるように、n－m回（ただしn－mは2以上の整数）のサーマルサイクルを実施してPCR反応液n（第2反応液）を生成する。

[0155] ステップVI：合計n回のサーマルサイクルが完了したら、バルブ325を閉めて、バルブ326と323を開放し、PCR反応液nを混合チャンバ327に搬送する。

[0156] このように、分析システム101は、PCR反応液nの少なくとも一部を、組成を変えずにPCRチャンバ304から取り出す。

[0157] 泳動試薬貯留部331から泳動試薬を押し出し、分注チャンバ320内に格納されたPCR反応液nを混合チャンバ327に搬送する。バルブ325を開けて、混合チャンバ内の泳動サンプルを流路デバイス104の外（分析システムの待機部321またはCE部105）に搬送する。本ステップはステップ507に対応していてもいい。

[0158] 分析システム101は、PCR反応液nの当該少なくとも一部を、CE部105において電気泳動分析してもよい。

[0159] 〔分割PCR実施方法のそのほかの例〕

図14に分割PCRの分析プロセスを、図15に流路デバイス104の一例を、図16に図15のm=24サイクルとn=30サイクルでPCR反応液を分割する搬送方法の例を示す。なお図示の便宜上、一部の参照符号は図15に示し図16では省略する。

[0160] 流路デバイス104は分注チャンバ320とPCRチャンバ304を接続する流路315上にバルブ337を有する。バルブ337は泳動試薬貯留部310との分岐よりもPCRチャンバ304側に設置されている。また流路316にはバルブ338が設置されている

。また、流路319上で泳動試薬貯留部331との分岐よりも流路329側にバルブ339が設置されている。

[0161] ステップI：すべてのバルブが閉じられている。PCR反応液335をa μl納めたPCRチャンバ304があり、PCRチャンバ304にて、24回のサーマルサイクルを行う。24回のサーマルサイクル完了後、Final extensionを8分実施する。（ステップ601～604はステップ501、502に対応していてもいい。）

[0162] ステップII：24サイクルのPCR反応が終了したら、バルブ326と323と337を開放し、PCRチャンバ304の溶液の一部b μl（ただしa>b）を流路315を経由して分注チャンバ320に搬送する。（ステップ605、ステップ503に対応していてもいい）

[0163] ステップIII：バルブ323と326と337を閉めてバルブ324と325を開放し、泳動試薬貯留部310からc μl泳動試薬311を押し出し、分注チャンバ320内に格納されたPCR反応液mを混合チャンバ327に搬送する。PCR反応液mは泳動試薬311と混合されることで泳動サンプル336になる。（ステップ606、ステップ504に対応していてもいい）このとき、分注チャンバ320と流路315の一部には泳動試薬311が残っていてもよい。

[0164] ステップIV：バルブ324を閉めて、バルブ338を開放し、混合チャンバ327内の泳動サンプルを流路デバイス104の外（分析システムの待機部321またはCE部105）に搬送する。（ステップ607、ステップ504に対応していてもいい）

[0165] ステップV：すべてのバルブを閉じて、PCRチャンバ304に残されたa-b μlのPCR反応液335に対して、6回のサーマルサイクルを実行した後、Final extensionを8分実施する。（ステップ608～610、ステップ505に対応していてもいい）

[0166] ステップVI：合計30回のサーマルサイクルが完了したら、バルブ326と323と325を開放し、泳動試薬貯留部331からd μlの泳動試薬を押し出し、PCR反応液nを混合チャンバ327に搬送する。（ステップ506に対応していてもいい）

[0167] ステップVII：バルブ325を閉め、バルブ339を開放して、空気圧を印加し、PCRチャンバ304内に残された溶液をすべて混合チャンバ327に送り込んでもい

い。また混合チャンバ327内に空気を送り込むことで泳動サンプル336を攪拌して均質化してもいい。（ステップ611、ステップ507に対応していてもいい）

[0168] ステップVIII：バルブ338を開放し、混合チャンバ327内の泳動サンプルを流路デバイス104の外（分析システムの待機部321またはCE部105）に搬送する。（ステップ612、ステップ507に対応していてもいい）

[0169] 図14で示した分割PCRプロセスの各ステップの時間と温度の例を表1に示す。

[0170] [表1]

表 1 分割 PCR プロトコル

ステップ	ステップ詳細	時間	温度	サイクル回数
603	Initial Denaturation	60 s	95℃	
	Denaturation	3 s	94℃	24 サイクル
	Annealing & Extension	30 s	60℃	
604	Final Extension	480 s	60℃	
605	Dispensation		RT～95℃	
608	Denaturation	3 s	94℃	6 サイクル
	Annealing & Extension	30 s	60℃	
609	Final Extension	480 s	60℃	

[0171] 基本のサーマルサイクルの設定はSTR-PCRキット（GlobalFiler（商標） Express）のマニュアル（https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4477672_GlobalFilerExpress_UG.pdf）を参考にした。ステップ605において、分注時のPCRチャンバ304の温度は常温からDenaturation間の任意の温度に設定してもよい。

[0172] ステップ605, 606, 610, 611ではそれぞれ溶液が低温（4℃）で保持されていてもいい。低温で保持することで、サンプルの劣化を防ぐことや余計な反応の進行を防ぐことができる。

[0173] ステップ605において、分割時の温度はDenaturationステップの温度と同じくらいに設定することで、余計な伸長反応を防げるため、アーティファクトの発生を抑制できるため好適である。

[0174] ステップ605において、分割時の温度をExtension温度と同等にする場合、余計な伸長反応が起きるが、非特異増幅は抑制できる。また、ポリメラーゼや蛍光体の不活性化を回避できるため好適である。余計な伸長反応によるSTR-CEの分析精度への影響は無視できる。

[0175] ステップ605において、分割時の温度をExtension温度とRTの間にしてもいい。この場合、正確な温調が要求されないため簡便である。mサイクルのPCRが完了した時点で十分なアンプリコンが存在するため、非特異増幅の影響は無視できる。

[0176] ステップ605において、分割に必要な時間は短いほど好適である。分割にかかる時間が長いと、アーティファクトが増えてしまう可能性がある。また、分割にかかる時間が長いほど、ポリメラーゼなど各種生体分子の不活性化が進行する恐れがある。

[0177] なお、図１４に示すように、本実施例では、分析システム101は、各反応液（PCR反応液mの一部およびPCR反応液nの少なくとも一部を含む）に対し、電気泳動分析の前に電気泳動分析以外の方法による分析を実行しない。このようにすると装置の構成が簡素になり、たとえば追加の光学系が不要となる。

[0178] [PCR反応液、泳動試薬の量]

本流路デバイスに用いられるPCR反応液の液量は1μl～200μlで、より好適には10μl～50μlである。液量は少ないほうが温調を正確・高速に行える。一方で、液量が多いほうがより多くの精製済みDNAを受け入れることができるため、高感度化が実現しやすい。また、液量が多いほうが、分割時に高精度な溶液計量が不要になる。

[0179] 表2に分割時の液量の例を示す。実際に計量される液量は表の値そのものにならなくてよく、複数回測定した時の中央値が表の値になっていてもいい。

[0180]

[表2]

表 2 分割 PCR の液量

	a [μl]	b [μl]	c [μl]	d [μl]
セット1 セット2	a 15	b 5	10a 50	10(b-a) 100
セット3	a	b	10a+e	10(b-a)
セット4	a	b	11a	10(b-a)

[0181] ステップ502にてPCR反応液量の総量がa μl、ステップ503にてmサイクルの時に取り出される液量が b μl、ステップ504にてPCR反応液mと混合される泳動試薬がc μl、ステップ507にてPCR反応液nと混合される泳動試薬がd μlであるとする。好適な、a～dの関係式または設定値の例を上記表2に示す。CEに増幅産物やサイズスタンダードを効率よく導入するためには、泳動サンプルのイオン強度が十分に低くなっていることが必要である。そのため、泳動試薬の量はPCR反応液の量に対して体積で2倍、5倍、10倍、20倍、等の比率で、PCR反応液より多く混合されることが好適である。

[0182] PCRの分割は、PCR反応液mとPCR反応液nが等しくなるように設定してもいい。PCR反応液mとnの量が近いほうが、泳動試薬をCE部に送液する際に安定した送液が実現できる。

[0183] PCRの分割は、PCR反応液mのほうがPCR反応液nよりも少なくなるように設定してもいい。分割時に取り出す液量が少ないほうが、n-mのPCRを行うときの液量のばらつきが小さくて済むため、より再現性高く増幅産物nを準備できる。

[0184] セット1は、泳動試薬の量がPCR反応液に対して10倍で設定されているときの溶液量の例である。

[0185] セット2は、PCR試薬量が15μlで、mサイクルの分割時に5μlの溶液を取り出し、nサイクルの時に全量のPCR反応液を泳動試薬と混合する場合の溶液量の例である。この例では、分析システム101は、n回のサーマルサイクル終了時に、PCRチャンバ内のPCR反応液を全量PCRチャンバの外に搬送する。このようにすると、計量に必要な装置が省略でき、流路の構成が簡素になる。

[0186] 図16に示した送液手順では、分注チャンバ320内に泳動試薬が残される。分

注チャンバ320に対して、泳動試薬貯留部310内の泳動試薬量が十分に多い場合は、泳動試薬が分注チャンバ320内に残されても分析精度や範囲への影響を無視することができる。また、流路315上で、バルブ337と分注チャンバ320の間に、エアラインとして流路322が設けられているか、または空気貯留部334が設けられていれば、全量を分注チャンバ320および混合チャンバ327に押し流すことができる。体積が大きい構成の場合、分注チャンバ320内のPCR反応液mはほぼ全量混合チャンバに送り込まれる。また、分注チャンバ320内に泳動試薬の一部が取り残されるのを加味して、余分に泳動試薬を試薬貯留部内に保管しておくことが好適である。

[0187] セット3は分注チャンバ320内にeμlの泳動試薬が残留することを見越して、泳動試薬を多めに泳動試薬貯留部310に　格納する場合の溶液量の例である。

[0188] セット4は分注チャンバ320の体積がbμlで、bμl分だけ泳動試薬が分注チャンバ320内に残留することを見越して、泳動試薬を多めに泳動試薬貯留部310内に保管しておく場合の溶液量の例である。

[0189] [詳細な分割方法]

分割時の溶液量のばらつきは、分析システムの実効的な分析範囲を狭める方向に働くため、PCR反応液を分割する際は、溶液分割の精度は高いことが望ましい。高精度な溶液分割を実現するために、適切な加圧圧力と加圧時間をあらかじめ設定しておく、規定された体積をもつ液体や気体でPCR反応液を押し出す、液面検知センサの利用、規定された体積の分注チャンバ320にPCR反応液を押し出す、等の機能を組み込んでもいい。複数の押し出しと計量方法を組み合わせてもいい。

[0190] 計量はステップ503のPCR反応液mの分注の時と、ステップ506のPCR反応液nの分注のときに実施されてもいい。ステップ506を省略し、PCR反応液nを全量泳動試薬と混合する場合は、計量はステップ503の時にのみ行われればいい。すなわち、計量の回数は、分割数から1を引いた数でもいい。同様に、2回計量した場合、PCRチャンバ内には規定量の液があるため、PCRチャンバ内に残

された反応液に対して追加でPCRのサーマルサイクルをp回行い、n+pサイクルのPCR反応を行った3分割目の反応液をCE測定してもいい。

[0191] PCR反応液をPCRチャンバから取り出す際は、PCRチャンバにポンプで圧力をかけて、溶液を分注チャンバに送り出してもいい。また、PCR加熱時にバルブを閉じている場合、内圧がかかっているため、ステップIIでバルブ326と323を開放しなくても、内圧で溶液が分注チャンバに移動するように設定してもいい。

[0192] ステップ502にて、mサイクルが終わったのちに、ステップ503にて新しいPCR試薬でPCR反応液mを押し出し、規定量を分注チャンバ320または混合チャンバ327に搬送してもいい。本分割方法は、図10の空気貯留部332に空気ではなくPCR試薬を封入することで実施してもいい。溶液で押し出すため、押し出される体積が規定しやすいというメリットがある。また、PCR反応液で押し出す場合、気泡やオイルの混入による反応への悪影響が無いというメリットがある。その反面、新しいPCR試薬が後段にまわる可能性があり、分析範囲の上記ばらつき要因(1)～(8)に加えて新たな要因が追加されてしまう。また、PCR反応液で希釈するため、PCRチャンバ内に残されるPCR反応液がmサイクルの時点で薄まり、より多くのPCRサイクルが必要になる。また、常温の試薬を追加する場合、PCRチャンバの温度が低下してしまう。また、ステップ505でInitial denatureを再度行う必要がある。そのため、PCR反応液で押し出す場合は、PCR反応時間がやや長くなる。また、サイクル数を増やすこと、Initial denatureを再度実施することは、アーティファクトの発生に寄与してしまう。なお、押し出しに使われるPCR反応液のInitial denatureは、ステップ503よりも前に実施しておくことで、上記課題の一部を解決することも可能である。

[0193] 図10のように、流路デバイス104に空気貯留部332および333を設置して、ステップ502にてmサイクルが終わったタイミングで、空気チャンバでPCR試薬を押し出し、ステップA3にて規定量を分注チャンバ320または混合チャンバ327に搬送してもいい。

[0194] 空気やPCR試薬で押し出す代わりに、オイルでPCR反応液を押し出してもい

い。本分割方法は、図10の空気貯留部332に空気ではなくオイルを封入することで実施してもいい。オイルは、PCR反応に影響を及ぼさないオイルであれば何でもよい。たとえば、シリコンオイルでもよく、ミネラルオイルでもよく、フロリナートオイルでもよく、複数のオイルの混合物であってもいい。オイルで押し出す場合、試薬で押し出すのと同様に、押し出される体積が規定しやすく、PCR反応液で押し出す場合と違ってPCR反応液と混ざらないというメリットがある。一方で、PCR反応産物にオイルが混ざって後段に流れてきてしまうと、CE測定に支障をきたす可能性がある。PCR反応液mが取り出される際は、オイルをチャンバに残すための分離膜や遠心分離によって分離してもいい。

[0195] [計量機構の詳細]

分割時に分注チャンバ320にPCR反応液を導入する際、PCR反応液の代わりにPCRチャンバ内の空気や気泡が入ってしまうと、計量精度が低下する。そのため、分注チャンバ320と流路315には、空気が入らないようにするための工夫が施されていることが好適である。空気が入るのを防ぐための構造の一例を図17に示す。図17(a)、(b)のように、流路315はPCR反応液335の液面701よりも重力方向で下側からPCRチャンバ304より分岐している。空気はPCRチャンバ304の上側に溜まるため、分割時に流路315に導入される空気の量を最小限にすることができる。また、分割完了時に液面701がPCRチャンバ304と流路315の接続部よりも重力方向で上に位置するように液量やチャンバ形状を設計することが望ましい。図17(b)のように、液面701はバルブ326または323よりも重力方向で上に位置していてもいい。この場合、PCRチャンバ304に混入する気泡を最小限にでき、あるいは完全に排除できる。バルブ326または323よりも上に位置するPCR反応液335はPCR反応に供されなくてもいい。ただし、この場合、未反応試薬がCE測定に混入して感度が低下する可能性がある。

[0196] 図17(c)のように、流路315はPCRチャンバ304の下部に接続されていてもいい。この構成では、空気が入りにくいという長所があるが、流路315がやや長くなり液ロスが生じやすいという傾向がある。

[0197] 流路315には、気泡を抜くための構造が設けられていてもいい。また、流路315上にはPCRチャンバ304と分注チャンバ320をつなぐ流路の中に空気を通さない親水性のフィルタが入っていてもいい。

[0198] 分注チャンバ320が計量機能を備えていてもいい。例えば、図18に、計量機能を備えた分注チャンバ320の例を示す。分注チャンバ320に接続する流路315と328にはバルブ324、337がついている。バルブ337は計量だけでなく、PCR反応中に液が分注チャンバ320に飛び出してくるのを防ぐことや、分注後に泳動試薬および泳動サンプルがPCRチャンバ304に逆流するのを防ぐために用いられてもいい。また、バルブ324は計量だけでなく、混合チャンバに搬送したのちに、泳動サンプルが逆流するのを防ぐために備えられていてもいい。分注チャンバの体積は、増幅産物mを分割して測り取りたい液量に一致していてもいい。分注チャンバは球形または円筒形でもよく、直方体でもよく、細長くてもよく、蛇行流路になっていてもよく、楕円体または楕円筒形でもいい。

[0199] たとえば、分析システム101は、m回のサーマルサイクルの終了後に、分注チャンバ320（計量部）にPCR反応液mを搬送することにより、0.1%～50%の範囲内の所定量のPCR反応液mを計量してもよい。このようにすると追加の計量処理が不要となる。

[0200] 図19に計量機構の例を示す。図19に示すような機構を複数組み合わせて計量してもいい。示されていない計量機構を用いてもいい。複数の計量機構を組み合わせることでよりロバストな計量を実現してもいい。

[0201] 図19(a)は計量機構の一例で、ベントフィルタ702と、流路328を接続する流路703が備えられている。流路703は流路328のバルブ324よりも分注チャンバ320側に接続している。ベントフィルタ702の素材はPPやフッ素系樹脂などでできた疎水性の多孔質フィルタが好適である。図20のステップI～IIIは本計量機構の動作例を示す。

[0202] ステップI： PCRチャンバ304に圧力を印加し、PCR反応液を分注チャンバ320に送り込む。分注チャンバ320やその前後に存在する空気は流路703を経由してベントフィルタ702から放出される。

[0203] ステップII：ベントフィルタ702を増幅産物や泳動試薬は超えることができないため、分注チャンバ320およびその前後の流路の体積分のPCR反応液を計量する。

[0204] ステップIII：バルブ337を閉じて、バルブ324を開放する。泳動試薬か空気で分注チャンバ320内のPCR反応液を混合チャンバ327に送り出す。

[0205] 図19(b)のように、流路328上には流路抵抗704が設けられていてもいい。流路抵抗704はPPやフッ素系樹脂など疎水性のフィルタであってもいい。また、流路抵抗704における流路表面の疎水性が流路328部分よりも高くなっていてもいい。また、流路幅が流路抵抗704で狭くなっていてもよく、障害物が設置されていてもいい。また、流路抵抗704は急激に流路幅が広くなっていてもいい。流路抵抗704ではキャピラリストップバルブの原理を用いて流路抵抗を設けてもよい。流路抵抗704が液体に接するまでは空気が容易に抜けることができる。図21のI～IIIは本計量機構の動作例を示す。

[0206] ステップI： PCRチャンバ304に圧力（A kPa）を印加し、PCR反応液を分注チャンバ320に送り込む。分注チャンバ320やその前後に存在する空気は流路抵抗704に対してスムーズに抜けることができる。

[0207] ステップII：A kPaの印加圧力では、PCR反応液は流路抵抗704を超えることができないか、長時間かけないと超えることができないため、規定量のPCR反応液量を分注チャンバ320で計り取ることができる。

[0208] ステップIII：バルブ337を閉じて、泳動試薬か空気でB kPa（ただしB>A）を分注チャンバ320に印加する。分注チャンバ320内のPCR反応液を混合チャンバ327に送りこむことができる。

[0209] 図19(c)のように、流路328上、または分注チャンバ320上に液面検知センサ705を取り付け、規定量の液で分注チャンバ320が満たされたら、液の搬送をとめるような構造にしてもいい。

[0210] 図22に液面検知センサやベントフィルタ、流路抵抗体を用いない、簡便な計量機構の例を示す。ただし、本方式に、液面検知センサやベントフィルタ、流路抵抗体などを組み合わせてロバストに分注する機構を設けてもいい。

[0211] ステップI：PCR反応液335を納めたPCRチャンバ304があり、すべてのバルブを閉めた状態でPCRチャンバ304にて、mサイクルPCR反応を行う。

[0212] ステップII：mサイクルのPCR反応が終了したら、バルブ326と323を開放し、PCRチャンバ304内の圧力を大気圧(=100kPa)にする。

[0213] ステップIII：流路319と流路330から100kPaの圧力を印加する。

[0214] ステップIV：バルブ337を開放し、PCRチャンバ304の溶液の一部を分注チャンバ320に搬送する。分注チャンバ320内の空気が半分ほどまで圧縮されると分注チャンバ320とPCRチャンバ304の圧力がつりあい、溶液の搬送が停止する。

[0215] ステップV：バルブ337を閉じ、バルブ324を開放することで分注チャンバ320内の圧力を大気圧に戻す。

[0216] 本方式では、PCRチャンバ304から溶液を分注チャンバ320に搬送する際、分注チャンバ320内に印加した圧力で分注チャンバ320内に侵入した液量を規定できる。分注チャンバ320の容積がV1で中が圧力P1空気で満たされているとき、分注チャンバに液体が容積V2だけ侵入すると、ボイルの法則より、圧力はP2＝P1*V1/V2に変化する。P2が印加される圧力と釣り合うと、溶液は停止する。ステップIにて、分注チャンバ内の圧力が100kPaである場合、分注チャンバ320の容積が半分まで減少すると、分注チャンバとPCRチャンバ内の圧力がどちらも200kPaになって力が釣り合う。そのため、分注チャンバの体積の約50%に相当するPCR反応液335を分注することができる。なお、ここで示した圧力は一例にすぎず、分注チャンバの容積や、その前後の流路の空間、および計量したい液量を適切に設定して計量してもいい。本方式のデメリットは、バルブに高い耐圧が要求される傾向があるという点である。分注チャンバ320の容積を計量したい量に対して大きめに設定すれば分注と計量に必要な圧力は下がるが、そのあと泳動試薬で押し出す場合の残液量が多くなるというデメリットが生じる。

[0217] [計量精度について]

CE分析では、同一サンプルを複数回計測した時のピーク強度にばらつきが

存在すると、実効的な分析範囲が狭くなる。分割PCRを導入したことによって、分析強度が大きくばらついてしまうと、実効分析範囲が狭くなって好ましくない。分割PCRの導入により、泳動試薬とPCR反応液の混合比のばらつきが大きくなると、ピーク強度のばらつきに反映され、実効的な分析範囲が狭くなる。

[0218] 図14のように、PCR反応液と泳動試薬を混合したときに、混合比率の変動がどの程度CEのピーク強度に影響を与えるか実験で確認した。図23に泳動試薬に対するPCR反応液の比率を変化させた場合の、CE強度を示す。キャピラリ間のピーク強度のばらつきは、別途計測したPCR反応液を含まないサイズスタンダードの平均強度で規格化した。サイズスタンダードのピーク強度は、PCR反応液の比率の上昇に伴って単調減少した。その一方で増幅産物のピーク強度は、単調増加し、液量の変動に対してピーク強度の変動は限定的であった。

[0219] CE測定において、増幅産物をキャピラリに引き込む際は、泳動サンプルとキャピラリに電圧をかけて電界注入する。電界注入では、キャピラリに導入される増幅産物は他のイオンや核酸と競合的に注入される。電圧と注入時間が一定の場合、式1のような関係が成り立つ（βは電流値、αは定数）。

[数1]

$$\alpha(k_0 * C_0 + k_1 * C_1 + k_2 * C_2 + k_3 * C_3) = \beta \qquad \cdots \text{（式 1）}$$

ただし：

k_0, C_0：ホルムアミドに含まれるイオンの移動度と濃度

k_1, C_1：サイズスタンダードのDNAの移動度と濃度

k_2, C_2：PCR反応液に含まれる塩やプライマ、dNTPの移動度と濃度

k_3, C_3：PCR反応液に含まれる増幅産物の移動度と濃度

である。

[0220] 泳動試薬10μlに対して、PCR反応液の量が1μlで混合される場合を標準として、PCR反応液の量がγμl変動する場合、式1は、以下のように表される。

[数2]

$$\alpha * \left(k_0 * C_0 * \frac{11}{11+\gamma} + k_1 * C_1 * \frac{11}{11+\gamma} + k_2 * C_2 * \ (1+\gamma) + k_3 * C_3\ (1+\gamma)\right) = \beta$$

[0221] サイズスタンダードの注入量k_1*C_1について整理すると以下のようになり、γの増加に対して単調減少する。

[数3]

$$k_1 * C_1 = \frac{\beta}{\alpha} - \left(k_0 * C_0 + \frac{11+\gamma}{11}\ (1+\gamma)\ (k_2 * C_2 * + k_3 * C_3)\right)$$

[0222] 一方で、増幅産物の注入量k_3*C_3は、式1を変形すると以下のようになり、PCR反応液量に対して単調増加する。

[数4]

$$k_3 * C_3 = \frac{\beta}{\alpha} - \left(k_2 * C_2 + \frac{11}{(11+\gamma)(1+\gamma)}\ (k_0 * C_0 * + k_1 * C_1)\right)$$

[0223] PCR反応液には多くの塩、プライマ、dNTP、等が含まれており、注入量はほぼ飽和している。そのため、PCR反応液の割合が泳動試薬に対して多少増えても、ピーク強度の変動は限定的である。PCR反応液の比率が標準条件（PCR反応液：泳動試薬=1:10)に対して±20%変動しても、ピーク強度の変動率は10%以内に留まる。また、標準条件よりもややPCR反応液が濃い条件(PCR反応液：泳動試薬=1.6:10)を目標にすると、PCR反応液の比率がターゲット比率から±50%変動してもピーク強度の変動率が10%以下になる。本実験結果は、分割PCRの分注精度が多少悪くても、PCR反応液と泳動試薬の混合比率の変動に由来する増幅産物由来のピーク強度の変動は限定的であることを示唆している。

[0224] 計量機構の精度が多少悪くても、シンプルで低コストな計量機構を採用することが好適な場合がある。精度の低い計量機構を採用する場合、上記で示したように、PCR反応液と泳動試薬の混合比率の変動がピーク強度に影響を与えにくいような溶液組成を選択することが好適である。これは、泳動試薬に塩を加えてもよく、PCR反応液に含まれる塩、プライマ、dNTP等がその役割を

担ってもいい。また、泳動試薬とPCR反応液の混合比率が、PCR反応液がやや多いような条件で実施し、より飽和に近い状態で測定することで、変動比率の影響を受けにくくする。この場合、泳動試薬に含まれているサイズスタンダードのピーク強度が測定に必要な水準に達するように、標準的な混合比率よりもやや多めにサイズスタンダードを混合しておくことが好適である。

[0225] 《分割PCRプロトコルの設定方法》

[分割PCRによる分析範囲拡大の原理]

[0226] サンプルに含まれる種々濃度のターゲットDNAを分析可能とするために、互いに異なる濃度の増幅産物を含むPCR反応液mおよびPCR反応液nをそれぞれ電気泳動分析する。サンプルに含まれ得る前記ターゲットDNAの濃度範囲に応じて、mおよびnを適切な範囲内からあらかじめ設定しておくことで、感度が低下することなく、1つの増幅産物を準備してCE分析するよりも広い範囲のDNA量に対して、適切なDNAプロファイルを得られる。

[0227] 図24に分割PCRによる分析範囲拡大原理を示す。図24の横軸はPCRに投入されたDNA量を示し、縦軸は、増幅産物の濃度またはCEにおけるピーク強度を示す。801はCEの検出上限強度またはPCRが正確に増幅できる増幅産物濃度の上限で、802はCEの検出下限を指している。図中では、増幅産物の濃度はDNA投入量に対してリニアに増えていくように表記しているが、実際の増幅はシグモイド状になっており、増幅産物が一定量に達するとプラトーに近づくと考えられる。あるPCRサイクル数mにおいて、正しく分析できるDNA量範囲が下限aと上限bの間にあるとする。1つのサイクル数で分析できるSTR－CEの分析範囲を803とする。また、あるPCRサイクル数nにおいて、正しく分析できるDNA量範囲が下限cと上限dの間であるとする。この時、$a<d$であれば、分析範囲はb/aまたはd/cからb/cまで拡大できる。分割PCRで拡大したときのSTR-CEの分析範囲を804とする。804は、mまたはnのどちらかがSTR-CEの分析範囲に収まっているDNA量の範囲で、原則として範囲のなかに分析範囲からこぼれるDNA量は存在しないものとする。以下では、各サイクル数における分析範囲（b/a）はほぼ一定で、サイクル数差xに対して2^x倍変化するものとする。このときm

とnの間隔は以下の式2の範囲に限定される。

[数5]

$$n - m \leqq \log_2\left(\frac{b}{a}\right) \quad (\mathbf{n}\text{と}\mathbf{m}\text{は整数}) \quad \cdots (\text{式 2})$$

[0228] これを満たす場合の例を図24(1)に示す。例えば、PCRに持ち込まれたDNA量に対する分析範囲 b/a が80倍であるとき、n-mは6以下が適切で、拡大率は64である。拡大率は、分割数yに対して$(b/a)^{y-1}$で増やすことができるが、分割数が少ないほうが安定した送液を簡便な流路デバイス上で実現できると考えられる。以下ではmとnを設定し、増幅産物mとnを分析する場合について主に述べる。一方で、同様な設定方法で、3分割にするためにlを、4分割にするためにkを設定してもよい。

[0229] cまたはdが0.2ngまたは0.1 ngを下回る場合、ピーク間の強度バランスのばらつきが大きくなるため、式2で設定されたサイクル数よりも大きいサイクル数を設定し、mとnの間隔は式2で規定される最大のサイクル数よりも狭くすることが好適である。以下では特に断りが無い場合、STR-CEの分析上限と下限はサイクル数差xに対して2^x倍変化するものとする。

[0230] 図24(2)に、mとnの間隔が式2を満たさない場合の分析範囲を示す。この場合、mで分析できる下限aがnで分析できる上限dを上回っており、aとdの間に位置するDNA濃度では正しいDNA鑑定が行えない。a>dで、aとdの間に位置するサンプルが存在しない場合、または頻度が極めて低い場合は敢えて、a>dの関係が成立するようなmとnの数値を設定してもいいが、実際に投入されるサンプルのDNA量は未知であることが多いため、式2を満たすことが好適である。

[0231] nのサイクル数で極めて低濃度のDNAをカバーする場合、Stochastic effectが生じるため、式2で指定されるnとmの差分の上限よりも少ない差分で設定することが望ましい。

[0232] STR-CE分析には複数の分析結果がばらつく要因があるため、ばらつきを加味して、mサイクルのSTR-PCRがカバーできる分析DNA量範囲と、nサイクルのSTR-PCRが分析できるDNA量範囲に重複を持たせる必要がある。重複が存在しな

い場合、mとnの分析範囲に収まっているにも関わらず、分析が失敗するDNA量が存在してしまう。すなわち、想定される、分析ばらつきに対して、a<dが必ず成り立つようにmとnを設定する必要がある。以下では、mとnは分析システムのばらつきを加味して設定されているものとする。

[0233] [nをmのCE分析結果に応じて設定する]

装置にはmの数値がプリセットされていてもいい。

[0234] ステップ504のあとにステップ505を開始または終了するような分析システムの場合は、泳動サンプルmの測定結果に応じて、nが設定されてもいい。

[0235] 以下の条件に分岐してnが設定されてもいい:

(1)増幅産物mのピークが全く検出されない場合

(2)ピークが検出され、一部のピークがATを下回っている場合

(3)ピークが検出され、すでに一部のピークが飽和している、または、IAPスレショルドを超えている場合。

[0236] (1)の場合は、STR-CEの分析範囲がxである場合、追加でn-mサイクル（n-m≦log(x)、ただしxはSTR-PCRの分析範囲）実施してもいい。この場合、n-mは式 2を満たすように最大の値を用いることが好適である。

[0237] (2)の場合は、検出されたピークの最大強度yに対して、CEの飽和強度がzである場合、追加でn-mサイクル（n-m≦log(z/y)）で規定されるPCRを実施してもいい。

[0238] (3)の場合は追加のPCRを行わなくてもいい。

[0239] [分析したいサンプルの強度比を加味したmとnの間隔の設定方法]

特にCE分析にかかる時間が長い場合、上記のようなmサイクルの電気泳動が完了するまで待っていると、n-mのPCR反応の待ち時間が長すぎて、アーティファクトが増える可能性や、PCR反応がうまくいかなくなる可能性もある。そのため、mとnは事前に設定されていてもいい。

[0240] STR-CEでは、ホモ接合の遺伝子座とヘテロ接合の遺伝子座が混在して含まれているため、仮にすべての増幅効率、CE注入効率、蛍光色素の発光効率が等しい理想的な分析系であっても、ヘテロ接合のピークとホモ接合のピーク

で、ピーク間には強度の差が1:2で存在する。

[0241] 実際のSTR-CEでは、遺伝子座およびDNA長に依存した増幅効率の差、CE注入効率の差、色素間の発光効率の差があるため、DNA量が適切に調整されていても、ピーク間には強度の差が1:2～1:20で存在する。なお、ATは色素間で異なる数値が設定されている場合がある。その場合、ATの設定値の差を加味して、分析範囲を検討する必要がある。

[0242] DNAが複数人に由来する場合、アレルの存在比には1:2～1:1000の差が存在する。

[0243] DNAが劣化している場合、アレルの存在比には、1:2～1:1000の差が存在する。典型的には短い遺伝子座またはアレルのDNAが多く増幅され、長い遺伝子座またはアレルのDNAのピーク強度は少なくなる傾向がある。

[0244] PCRが阻害されている場合、短いDNAがより多く増幅され、長いDNAのピーク強度が小さくなる傾向がある。このような場合、ピーク強度の差が1:2～1:1000になる。

[0245] 投入DNA量が0.1ngを切ると、ピーク間の強度ばらつきが大きくなる傾向がある。この場合、実効分析範囲はさらには小さくなっている。ゆえに、mとnでカバーできる実効ダイナミックレンジは必ずしも同一とは限らない。

[0246] 以下では、ピーク間の強度比を決める要因は、STR-PCRに投入されたDNAに含まれるアレルの存在比の差に由来するものとして議論を進める。増幅効率の差、CE注入効率の差、および発光効率の差も影響するため、本来はこれらの差も加味するべきであるが割愛し、アレル間の存在比率の議論に内包されるものとする。

[0247] 分析するアレルの存在比に差がある場合の、実効的なSTR-CEの分析範囲について図25を用いて説明する。増幅産物にはアレルαとアレルβが含まれているものとする。ただし、アレルαとβの量は増幅前または増幅後の時点でα>βであるものとする。アレルαの投入DNA量に対する増幅産物中の量またはCEのピーク強度のプロットをプロット805とする。アレルβの投入DNA量に対する増幅産物中の量またはCEのピーク強度のプロットをプロット806とする

。プロット805、806は必ずしも直線とは限らない。アンプリコンαはDNA投入量aからbまでの範囲で分析できるものとする。また、アンプリコンβはDNA投入量cからdの範囲まで分析できるものとする。仮に、PCRの増幅がa～bの濃度範囲でリニアである場合、

[数6]

$$c = a * \frac{\alpha}{\beta}$$

が成り立つ。アンプリコンαとアンプリコンβの両方が正しく検出される実効的なSTR-CEの分析範囲803は、以下の式3

[数7]

$$\boldsymbol{J05} = \frac{\boldsymbol{b}}{\boldsymbol{a}} * \frac{\boldsymbol{\alpha}}{\boldsymbol{\beta}} \quad \cdots \text{（式 3）}$$

により表すことができる。b/a(範囲807)はCEのダイナミックレンジに対応していてもよく、ピークαを検出できるSTR-CEの分析範囲でもいい。

[0248] 実効分析範囲は式3のように、分析したいDNAの強度比が大きいほど小さくなる。

[0249] 図26に、範囲807に対応する数値と、n-mの設定値に対して、分割PCRで分析できる最小のアンプリコンに対する最大のアンプリコンの強度比α/βの対応表を示す。例えば、範囲807が120で、n-mが5に設定されている場合、存在比率が一番高いアレルに対して1/3.75の存在比率のアレルが、分析対象になる。逆に、分析したいアレルセットの強度比が図26に示す比率よりも大きい場合、最大のピークまたは最小のピークが分析上限または下限に抵触してしまう濃度が、分析範囲の内部に出現することを意味する。たとえば、図27(1)のように、αとβが両方検出できる濃度であれば問題ないが、図27(2)のように、αだけが検出できて、βは検出できないという状況が発生し得る。

[0250] ピーク強度比が大きすぎるものは分析の対象としなくてもいい。例を以下に示す。

・STR-CEにはスタターピークが含まれており、1つの遺伝子座の中でピーク強

度が1:20以上離れているピークはスタターピークとの区別が困難なため、1つの遺伝子座の中で1:20または1:40よりも強度比の大きいピークを分析しなくてもいい。

・劣化したDNAは、全体のDNA量も少なくなっている場合があるため、ピーク強度が1:20または1:40または1:100以上離れているピークを分析しなくてもいい。

・上記のように、極端にピーク間の強度比が大きくなるような電気泳動図では、小さいピークが有意でないため、分析対象となる最大のピーク強度に対する最小のピーク強度を規定するInter locus PHRの閾値が設定されていてもいい。図27を用いてmとnの間隔を設定する場合、分析対象とするアレルの存在比率はInter locus PHRの閾値よりもやや少なく設定することが好適である。

[0251] [nの設定方法]

Partial profileも分析の対象とする場合、30～34サイクルが適切である。

[0252] 1コピーのDNAに由来するピークはサイクル数を36に設定すれば検出することができる。

[0253] サイクル数が36を超えると、アーティファクト（特にスタターやDrop inの出現頻度が顕著に高くなる）が増えるにもかかわらず、個人に由来するピークの検出確率は向上しないため、36以上のサイクル数を設定することは好適でない。

[0254] Partial profileを分析の対象としない場合は、30または29サイクル以下が適切である。

[0255] 最小DNA量を含むサンプルについて、エラー判定数が一番少ない最小サイクル数を選択することが好ましく、実験で調べてもいい。

[0256] nサイクルは1コピーに由来するアンプリコンのピークがATを必ず上回る最小のPCRサイクル数に設定されてもいい。

[0257] nサイクルは20コピーのゲノムDNAに由来する増幅産物が必ずFull profileになる最小のPCRサイクル数に設定されていてもいい。

[0258] nサイクルはスタッターピークやそのほか増幅エラーに由来するピーク（IAPを除く）の強度比が閾値以上にならない最大のPCRサイクル数に設定されてもいい。

[0259] 特定のサイクル数における検出下限を実験または計算で明らかにしたうえで、1サイクルごとに2倍ずつ検出下限が増減するという仮定の下、nを設定してもいい。ただし、DNA量があまりにも少ない場合はStochastic effectによってよりピーク強度のばらつきが大きくなるため、やや余裕のあるサイクル数を設定することがより好適である。

[0260] mとは独立して、上記で述べた方法でnを設定してもいい。ただし、mとnの間隔が広すぎる場合、間に分析できないDNA量が残ってしまう可能性がある。

[0261] mが先に設定されている場合、図26に示したような、分析対象としたいピークの強度比をカバーできるn-mの差分と、mの数値から設定してもいい。

[0262] 分析範囲803が既知の場合、mに対して$\log_2$(分析範囲803)以下のサイクル数差を持ったnを設定することが好適である。

[0263] 各種分析システムのゆらぎやピーク強度比を加味して余裕をもったサイクル数を設定してもいい。

[0264] [mの設定方法]

DNA鑑定にて、PCRに投入されるDNAが1.5 μgを超えることはほぼないため、サイクル数を20よりも小さくしても、正しく検出できる遺伝子座の数が増えることはない。そのため、サイクル数は20以上に設定することが好適である。

[0265] 分析システムに持ち込まれ得る最大のDNA量を含むサンプルからPCRに投入されるDNA量を評価し、そのDNAをSTR-CE分析した時にOSやIPAフラグが出ていない最大のPCRサイクルに設定されることが好ましい。

[0266] STR-CEに投入される最大のDNA量が決まっている場合、より好適にはそのDNA量を入れたときに、図２の201～207を満たすことができる最大のサイクル数を設定することが望ましい。

[0267] 各種分析システムのゆらぎやピーク強度比を加味して余裕をもったサイク

ル数を設定してもいい。

[0268] 特定のサイクル数における検出下限、PCR投入DNA量、検出上限DNA量を調べ、1サイクルごとに2倍ずつ下限と上限が増減するという仮定の下、mを設定してもいい。

[0269] nとは独立して、上記で述べた方法でmを設定してもいい。ただし、mとnの間隔が広すぎる場合、間に分析できないDNA量が残ってしまう可能性がある。

[0270] nを先に設定する場合、図26に示したような、分析対象としたいピークの強度比をカバーできるn-mの差分と、nの数値から設定してもいい。

[0271] 分析範囲803が既知の場合、$\log_2$(分析範囲803)以下のサイクル数差を持ったmを設定することが好適である。

[0272] mとnの間隔が2または3であっても、分析範囲の拡大率は4倍または8倍に留まる。ロバスト性の高いDNA鑑定を実施するには分析範囲を1桁以上広げることが望ましい。それゆえ、mとnの間隔は4以上に設定されることが好適である。前述のとおり好適な分割PCRでは、nの設定値の最大は36で、mの設定値の最小は20であることから、nの設定値の最小値は24で、mの設定値の最大は32である。

[0273] [mとnを表から設定する]

図28(1)にmとnを設定した時の分析範囲拡大率を示す。本表に基づいて、必要な拡大率を得るためにmとnの間隔を決めてもよい。ただし、本表は、Stochastic effectなどのDNA濃度範囲に依存した分析範囲の変化を考慮していない。また、もとの分析範囲が拡大率よりも大きい場合、図24(2)のように分析できないDNA量範囲が生じてしまうため不適である。また、アレル間の存在比の差が大きいDNAを分析対象とする場合、もとの分析範囲に対してギリギリの拡大率を設定すると分析できないアレルが出てしまう。

[0274] 図28(2)に分割PCRによって拡大された分析範囲（の桁数）を示す。典型的なSTR-CEでは、PCR25サイクルの時に、Genomic DNA0.75 ng～48 ng（1.8桁）を分析することができる。ただし、この範囲は、個人のDNAによって変化し、またDNAの質によっても変化し、CE測定系によっても変化する。そのため、こ

の範囲は都度測定系に対して評価する必要がある。また、ばらつきも加味する必要がある。ここではこの結果をもとに、mとnを変えたときの分析範囲の桁数と、nサイクルの分析下限とmサイクルの分析上限を示している。DNA量を減らした時のStochastic effectは加味していない。すべてサイクル数に対して2^nで変化するものとして表は作製した。本表のようなものを作って、適切な下限と上限、分析範囲からmとnを決めてもいい。ただし、分析範囲の拡大率が、この場合は1.8桁を超える場合、図24(2)のように、分析範囲とされる区間に分析範囲からこぼれるDNA量範囲が生じてしまう。

[0275] 典型的なCEのダイナミックレンジは2000以下である。理想的なDNA鑑定であってもピーク強度比が2倍以上になるため、nとmの差は9以下になっていることが望ましい。

[0276] より高性能なCEのダイナミックレンジは4000以下である。多くのDNA鑑定ではピーク強度比が4倍以上あるため、nとmの差は9以下になっていることが望ましい。

[0277] 上述のように、好適な範囲の一例では、mが20以上32以下である。また、好適な範囲の一例では、nが24以上36以下である。また、好適な範囲の一例では、nがmよりも4～9多い。

[0278] [分割のタイミング]

図14のようにm回のサーマルサイクルが終わったのちにFinal extensionステップを行い分割し、n回のサーマルサイクルが終わったのちに再度Final extensionを行ってもいい。この場合には、たとえば、分析システム101は、PCR反応液mを50℃～80℃の範囲内の一定温度で1～20分保持し、その後に一部を取り出す。本構成の場合、PCR周りに必要なヒーターが1つで済むため、装置や流路デバイス構造がシンプルになる。

[0279] m回のサーマルサイクルが終わったのちに分割してからFinal extensionステップを行ってもいい。

[0280] 図29に分析システム101の使い方の抜粋を示す。図14と共通する部分は説明を省略する場合がある。図29に示すステップ601～612はステップ404（サンプ

ルの増幅）からステップ405の詳細なステップの例に相当していてもよく、図29に示すステップ601～612に示すステップはステップ404から405のステップとは独立したプロセスであってもいい。

[0281] 図29のような動作は図6の流路デバイス104で実施できる。図6では分注チャンバ320に接するように加熱部318が設置されている。ステップ603でm回のサイクルが終わったあと、ステップ605で分注チャンバ320で分割し、ステップ604でヒーターFinal extensionステップを行う。PCRチャンバに残されたPCR反応液はステップ604と並行してステップ608にてn-m回サーマルサイクルされてもよく、時間差で実施されてもいい。n回のサーマルサイクルののちに、産物nに対して保持チャンバにてFinal extensionステップを実施してもいい。すなわち、図29の例では、たとえば、分析システム101は、PCR反応液mの一部を50℃～80℃の範囲内の一定温度で1～20分保持する。

[0282] 分割後に行うことのメリットとして、産物nがFinal extensionステップを2回経験しないため、アーティファクトが減ること、全体の時間が長くならないことが挙げられる。

[0283] [CE分析回結果のユーザへの提供方法]

分割PCRでCEを2回以上行う場合、電気泳動図が2つ以上発生する。2つの電気泳動図またはDNA鑑定結果はどちらもユーザに提供してもいい。2つ以上の電気泳動図について、よりDNA鑑定に望ましいかどうかをスコアリングしてCE分析結果と併せて提供してもいい。

[0284] たとえば、分析システム101は、PCR反応液mの一部に対する電気泳動分析の結果と、PCR反応液nの少なくとも一部に対する電気泳動分析の結果とのうち、いずれがより良い結果であるかを判定し、当該より良い結果を出力してもよい。または、どちらが良い結果であるかを判定できる情報を出力してもよい。また、図2に示したフローチャートの一部を用いて、Full profileかどうかを知らせてもよい。スコアリングには、図2に登場する判定基準を満たした遺伝子座の数を用いてもよく、判定基準を満たさなかった遺伝子座の数を用いてもよく、判定基準を満たさないと判定したフラグの数を用いてもよく、

あるいは判定基準をもとにしたアルゴリズムによって総合的に計算されてもいい。ユーザに提供されるのはDNA鑑定解析の途中段階のデータでもいい。Full profileが得られた方、またはより良い電気泳動図であると判定された方の分析結果のみをユーザに提供してもいい。このようにすると、結果の比較が効率的に行える。また、非専門家がシステムからデータを受け取ったときに、適切な結果を選択しやすい。

[0285] 分析結果がどちらも悪い場合は、専門家によるレビューを要求してもいい。

[0286] 2個のデータを合成してDNA鑑定してもいい。特にピーク強度比が大きいようなDNA鑑定の場合、mでは最小の強度を示すアレルがAT未満になり、nでは最大の強度を示すアレルがOversaturationすることが想定し得る。この場合、mとnそれぞれから有意なピークまたはDNA鑑定結果を抜き出して、合成して提供することができる。すなわち、CEのダイナミックレンジを拡大するために本実施形態を利用することが可能である。

[0287] 分析システムでCE測定する回数は2回であっても、1回であっても、さらに3回以上であってもいい。

[0288] サンプルの状態に応じて、1回だけ分析する場合と、2回分析する場合、またはそれ以上分析する場合があってもいい。毎回、1つのPCR産物だけを準備し、1回のCE分析しかしない場合と比べて、正しいDNA鑑定結果を得られる可能性があがり、かつ毎回多数回の測定を行わなくて済むため、低コスト、短時間での分析、スループットの向上が得られる。

[0289] 1回だけ分析する場合、測定するのは増幅産物mでもよく、増幅産物nでもいい。

[0290] 2回測定する場合、mサイクルの産物を2回測定してもよく、nサイクルの産物を2回測定してもよく、mサイクルのあとにnサイクルの産物を測定してもよく、nサイクルのあとにmサイクルの分析をしてもよく、mサイクルのデータの状況に関係なくnサイクルの分析を開始してもよく、nサイクルのデータの状態に関係なくmサイクルの分析を開始してもよく、mとnの分析を完全に同時に

実施してもいい。

[0291] 1回目の泳動結果が泳動不良になったら、もう一度おなじサイクル数の増幅産物を分析してもいい。また、1回目の泳動結果が泳動不良になったら、もう一方のサイクル数の産物を分析してもいい。ここでいう、泳動不良とは、サイズスタンダードピークの一部または全部が検出できていない状況、または溶液の搬送中にどこかで引っかかってしまった状況を指す。

[0292] 増幅産物mまたはnのどちらかの分析結果を得たのちに、得られたDNA鑑定結果をデータベースと照合し、得られたフィードバックをもとに、もう一つの増幅産物の分析を開始または続行してもいい。

[0293] 増幅産物mまたはnのどちらかの分析結果を得たのちに、もう一方の増幅産物を分析するかどうかは、ユーザが判断してもいい。ユーザが1つめのデータまたは分析スコアを見て判断してもよく、データ関係なく任意のタイミングで2回目を測定するかを判断してもいい。産物mまたはnはデバイス内部または外部に保持され、測定がいったん終了したのちにカートリッジまたは分析システム101から取り出され、装置の外で測定されてもいい。また、一定期間カートリッジ内に保管し、あとから装置内で再測定してもいい。その間は、増幅産物は冷蔵または冷凍で保管されていることが望ましい。増幅産物は泳動試薬と混合されて泳動サンプルの状態で保管されていてもよく、泳動試薬と混合される前の状態で保管されていてもいい。

[0294] ＜増幅産物mを先に分析する場合＞

mの増幅産物を先に分析する場合、図30に示すようなフローチャートにのっとって増幅産物nを分析するかどうか決定してもいい。ただし、図30に示すフローチャートは1例で、ここにない判定基準や分岐条件が含まれていてもいい。例えば得られたピーク数、遺伝子座数、データがミックスかどうか、等に応じて判定基準が変化してもいい。また、図30に示されている判定基準が部分的にまたは全部省略されてもよく、または別の基準に置き換えられていてもいい。

[0295] mの泳動結果をユーザに提供して、nの産物を分析するか判定して開始して

もいい。

[0296] また、nを同時または並行して分析している場合は、ユーザまたは図30のフローチャートの判定結果に基づいて、途中で分析を中断してもよい。

[0297] 判定セット1:ＣＥ検出系を飽和しているピークが存在するか。もし存在する場合は増幅産物nの分析は行わないまたは中断する。

[0298] 判定セット2: Full profileが得られているか。もし得られている場合は増幅産物nの分析は行わないまたは中断する。

[0299] 判定セット3: IAP+フラグが出ているか。もし出ている場合は、増幅産物nの分析を開始または続行する。

[0300] 判定セット4:すべてのピークがOS強度の1/2以下になっているか。または、すべてのピークが分割PCRによって期待される拡大率でOSを割った強度以下になっているか。または追加のPCRサイクルn-m回を行ったときにサチュレーションを起こさない強度以下になっているか。または任意のピーク強度に達していないか。もし達している場合は増幅産物nの分析は行わないまたは中断する。

[0301] mとnの間隔が2の場合、泳動産物mのＣＥ分析でほとんどピークが検出されなければ、泳動産物nでも有意なデータを得ることはできないため、mの分析結果を得た後にnの分析をすることは有意でない。同様に、mとnの間隔が狭い場合、mの分析結果からあまりにもDNA量が少ないと判定されればnの分析を行わなくてもいい。DNA量が少なすぎるかどうか判定する際は、検出されたピークの数を用いてもよく、ピーク強度を用いてもいい。

[0302] 各種判定セットは、各遺伝子座がヘテロ接合か、ホモ接合か、mixか、またはSingleかに応じ、異なる判定基準セットが用いられてもいい。

[0303] IAP-ピークが閾値を超えてしまっている場合は、nサイクルの分析をしてもいい。IAP-ピークは、投入DNA量がPCRサイクルに対して過少量しか回されなかった場合に生じるため、サイクル数を増やすことで軽減できると考えられる。

[0304] そのほか、mのCE分析結果から、nの分析を行っても有意なCE分析結果が明

らかに得られないと判断した場合は、nの分析は中断または実施しないという判断ができるように、各種閾値や判定アルゴリズムが設けられていてもいい。

[0305] ＜増幅産物nを先に分析する場合＞

nの増幅産物を先に分析する場合、図31に示すようなフローチャートにのっとって増幅産物mを分析するかどうか決定してもいい。ただし、図31に示すフローチャートは1例で、ここにない判定基準や分岐条件が含まれていてもいい。例えば得られたピーク数、遺伝子座数、データがミックスかどうか、等に応じて変化する判定基準が想定し得る。また、図31に示されている判定基準が部分的にまたは全部省略され、または別の基準に置き換えられていてもいい。

[0306] nの泳動結果をユーザに提供して、mの産物を分析するか判定して開始してもいい。

[0307] また、mを同時または並行して分析している場合は、ユーザまたは図30のフローチャートの判定結果に基づいて、途中で分析を中断してもよい。

[0308] 判定セット1:ＣＥ検出系を飽和しているピークが存在するか。もし存在する場合は増幅産物mの分析を開始または続行する。

[0309] 判定セット2: IAP+フラグが出ているか。もし出ていない場合は、増幅産物mの分析を行わないまたは中断する。

[0310] そのほか、nのCE分析結果から、mの分析を行っても有意なCE分析結果が明らかに得られないと判断した場合は、mの分析は中断または実施しないという判断ができるように、各種閾値や判定アルゴリズムが設けられていてもいい。

[0311] このように、分析システム101は、PCR反応液mの一部およびPCR反応液nの少なくとも一部のうち一方を、CE部105において電気泳動分析し、当該一方の電気泳動分析の結果に基づいて、他方について電気泳動分析の実行を制御する。たとえば、一方の電気泳動分析の結果に基づいて他方の電気泳動分析を開始するか否かを決定してもよいし、他方の電気泳動分析が開始された後に、

一方の電気泳動分析の結果に基づいて他方の電気泳動分析を継続するか否かを決定してもよい。このようにすると、不要または非効率な電気泳動分析が省略され、全体の処理が効率化される。

[0312] [nとmの両方がプリセットされている]

分析システム101には2つの異なるサイクル数、nとmがプリセットされていてもいい。mとnは先に述べたように、CE分析範囲やDNAの増幅可能量に応じて適切に設定されていることが好適である。

[0313] 測定サンプル種によって、表3のように、異なるnとmのセットと分析プロトコルが設定されていてもいい。

[0314] [表3]

表3 プリセットモードの例

	m	n	先に測定
頬スワブモード	26	—	—
DVI モード	25	31	m から
Casework	26	31	n から
Touch sample	28	32	n から

[0315] 例えば、頬スワブのように多量のDNAがある程度安定して含まれている場合は、「頬スワブモード」を選択し、分割を行わずに（または分割しても一方のCE分析のみの分析をし、失敗した場合にのみもう一方の増幅産物の分析をおこなう）26サイクルでSTR-CE分析してもいい。また、DVIサンプル（disaster victim identification、災害や大規模テロで生じた遺体の身元特定を行うためのDNA鑑定）を行う場合向けに「DVIサンプルモード」が備えられていてもいい。DVIサンプルには、比較的多くのDNAが含まれている可能性が高いので、例えば[m=25,n=31]に設定する。多くの場合、DVIサンプルには比較的多くのDNAが含まれているため、先にmサイクルの分析を開始し、図30に示したような判定フローで増幅産物nの分析を開始または継続してもいい。また、犯罪現場で得られたDNAを分析する際は、DNA量が少ない頻度が高いため、[m=26,n=31]が設定された「Casework sampleモード」を選択してもいい。Casework sampleの場合は、含まれるDNA量が極微量である確率のほうが高いため、先にnの分析を開始し、図31に示したような判定フローでmの分析を行うかま

たは継続するための判定を下してもいい。また、Touch sampleの場合、含まれるDNAはごく微量であるか、劣化していてピーク強度のばらつきが大きくなっているか、混合DNAになっている可能性が高い。そのため「Touch sampleモード」ではほかのモードに比べて、mとnの間隔が狭く設定されていることが好適である。また、含まれるDNAが少ない確率が高いため、nのサンプルから分析することが好適である。

[0316] CEが1サンプルにつき2本以上存在する場合は、mとnの分析は同時に行ってもよい。また、上記のプリセットmおよびnおよび測定順はユーザが都度変更してもいい。表3に示したmとnの数値は一例であり、プリセットされたmおよびnは、開発時にValidationテストを行い、もっともDNA鑑定が成功する確率が高くなるように設定されていてもよい。

[0317] [本実施形態のポイント]

以上の実施形態では、mとnの分析を毎回両方行う場合と、mとnのどちらかのみを分析する回が存在する実施について述べた。

[0318] 2つのサイクル数で準備された増幅産物のうち、どちらか一方が、要求される品質のデータを提供することができなくても、もう一つの増幅産物からは要求される品質のデータが得られる可能性は、1つのサイクル数で準備した場合に比べて高い。

[0319] 2つのサイクル数で準備された増幅産物のうち、どちらか一方が、要求される品質のデータを提供することができなくても、もう一つの増幅産物が準備されているため、サンプルが無駄になる確率を下げることができる。また、サンプルが無駄になる確率が減るため、再度サンプルを採取および前処理する手間が省ける。結果的に、本実施形態を用いてサンプルを2つ準備して、2つ分析するほうが、本実施形態を用いない場合に比べて平均のデータ取得時間が短くなる。

[0320] mサイクルのPCR産物を分割して、残りのPCR産物をPCRサイクルせずに、mサイクルのPCR産物のみCE分析する場合、もしmサイクルのPCR産物のCE分析結果が要求される品質を満たさなかった時に残りのPCR産物に対してn-mのPCRを実

施してnサイクルのPCR産物を準備することもできる。ただし、泳動サンプルmのCE分析の待ち時間、PCR産物を放置するとポリメラーゼの活性が低下したり、放置温度によってはアーティファクトが大量に増えてしまうため、nサイクルのPCR産物のCE分析結果も要求される品質を満たせない。

[0321] nサイクルのPCR産物のみを準備して、nサイクルのPCR産物のみＣＥ分析する場合、もしnサイクルのPCR産物のＣＥ分析結果が要求される品質を満たさなかった時にmサイクルのPCR産物の準備が無いと、サンプルは無駄になってしまう。

[0322] PCR反応に使うDNA溶液をPCR前に分割する場合、それぞれに投入されるDNA量が減るため、感度が下がる。一方で、PCR反応がある程度進んだ後であれば（例えば4サイクル以上）、1つのアレルにつき10以上のアンプリコンが含まれているため、分割が感度に影響を及ぼさない。

[0323] 分割は、mサイクルが終わったタイミングで行うことが望ましい。mサイクルが終わる前に分割し、分割後にそれぞれのチャンバで合計mサイクルになるように残りのPCR反応を行う場合、それぞれのチャンバにPCR温調機を設置する必要があるため、装置が大型化する。また、分割時にアーティファクトが生じる可能性があるため、サイクル数が可能な限り大きくなってから分割することが好適である。

[0324] PCR後に異なる希釈率の泳動サンプルを複数準備することで、実効的なＣＥの分析範囲を拡大することができる。すなわちCEのOversaturationの発生やピーク強度がＡＴを下回る頻度を抑制できる。ただし、増幅産物が多すぎることで、ピークの強度バランスや、ピーク割れが生じる問題は、PCR後の希釈では解決せず、PCR前またはPCR中に対処することが必要である。すなわち、分割PCRが適当である。

[0325] 分割するためのサイクル数が分析サンプルに対して適切に設定されているため最低限の分割数で最大限の分析範囲拡大率が得られる。すなわち、分析範囲拡大時の、測定時間は最低限で済む。

[0326] PCRに投入する前のDNA量をコントロールすることで、実効的な分析範囲を

拡大することもできる。例えば、精製膜に吸着するDNA量の上限を、精製膜の容量や体積、精製プロトコルの変更等によって削減することができる。しかし、典型的な精製膜では、吸着上限を下げるために体積を小さくすると、溶液の通過具合が悪くなったり、DNAの収率（特に短い、劣化したDNA）が低下したりしてしまう。そのため、精製段階でのDNA量コントロールには限界がある。また、PCR前にDNA量を定量することで、PCRサイクル数をコントロールするか、希釈率を変えて、実効的な分析範囲を広げることも可能である。しかし、定量ステップは、追加の検出系が必要なうえに、流路デバイスの複雑化は免れない。定量エラーによる分析失敗の可能性もあるため、分割PCRのほうが好適である。

[0327] 本実施形態とPCR後の希釈および精製DNA量の制御は組み合わせて実施されてもいい。組み合わせることで、より確実にまたは広範囲DNA量のDNA分析が可能になる。

[0328] 各サイクルごと、または1サイクル飛ばして、都度PCR反応液を取り出してCE測定することで、すべてのDNA濃度範囲に対して適したDNA分析ができる。しかし、流路デバイスでは、3回以上、または4回以上、または5回以上溶液を取り出して、かつそのあと泳動試薬との混合ができるような機構を設けることは困難である。また、各サイクルごと、または1サイクル飛ばしで分割して、2つまたは3つまたは4つの増幅産物を測定しても、分析範囲の拡大率は2倍、4倍、8倍に留まり、様々なDNA量を含むサンプルの分析に適するとは限らない。加えて、STR-PCRで、Final extensionをPCRチャンバと同一のチャンバで実施する場合、mとnの間隔が狭いと（例えば1サイクル、または2サイクル）PCRに投入されたDNA量によってはFinal extensionの時間が過剰で、A++ピークが多く出てしまう可能性もある。特に、加熱部318が設けられていないような分析システムで、図14のような同一のチャンバでFinal extensionを行うような分割PCRデバイスの場合は、nとmの間隔が狭いとA++ピークが多く出てしまうため、2以上が好ましい。

[0329] [キャピラリ本数に応じた流し方]

i)1つサンプルにつき、1本のキャピラリしか使えない場合

図32に分析システム101の動作タイミングについて典型例を示す。本動作タイミングは、まずステップ401にて1つ目のサンプルAが投入され、ステップ402～404にて前処理カートリッジでサンプルが処理され、ステップ405で泳動サンプルmまたはnがCEで分析される。

[0330] 図32のような動作手順は、1つのサンプル前処理部に対して、1つのCE部がある場合に好適である。このような構成は装置が小型で持ち運びに便利である。

[0331] ステップ405で1つ目のCE分析が終わったタイミングでユーザにデータを提供してもいい。ユーザが2つめの泳動サンプルの分析の開始または続行を判断してもいい。また、先に述べた判定方法で2つ目の分析の開始または続行を判断してもいい。なぜなら、毎回2回測定すると、CEの測定時間が2倍になるため、スループットが上がらないからである。

[0332] サンプルAの前処理が終わったタイミングでサンプルBの前処理（ステップ401～404）が開始されてもいい。この場合、サンプルAの入ったカートリッジは取り外されるため、CE分析が開始されていない泳動サンプルは待機部321に保持されていてもよく、CEサンプルは泳動中であってもいい。

[0333] ii)1つのサンプルにつき、2本のキャピラリが使える場合

図33に分析システムの動作タイミングについて典型例を示す。

[0334] 1つのサンプル分析部に対して、2つのCE部が用意されていてもいい。この場合、CE部はサンプル処理部に対して2倍の本数備えられていることが好適である。また、複数のサンプル分析部と同数またはそれ以上のCE部が備えられていてもいい。

[0335] 図33(1)のように、泳動サンプルmと泳動サンプルnはそれぞれ準備出来次第ステップ405でCE測定されてもよく、図33(2)のように両方の準備ができた後に同時にステップ405で分析開始してもいい。また、CE部の本数がサンプル処理部と同数しか無くて空きがない時は、泳動サンプルmまたは泳動サンプルnから順に測定してもいい。

[0336] ［実施例1］

分析システム101には、1つの流路デバイス104と1つのCE部105が備えられている。

[0337] 流路デバイス104の溶解チャンバ301(サンプル等入口)に、未知量のDNAが含まれる法医学サンプルが投入される。ステップ401～403の処理が流路デバイス104内で自動で実施される。

[0338] ステップ502にてmサイクルのPCRを行った後に、ステップ503でmサイクルの増幅産物を取り出す。サンプルをCE部105にサンプルを送り込み、ステップ504でCE測定を開始する。320ステップと並行して、ステップ505にて、PCRチャンバ304内に残されたPCR反応液に対してnサイクルのPCRを実施する。ステップ504のCE測定が終了し、次のCE測定が開始可能になったら、nサイクルの産物をCE部105に送り込み、ステップ507にてCE測定する。

[0339] ［実施例2］

分析システム101には、1つの流路デバイス104と2つのCE部105が備えられている。

[0340] 流路デバイス104の溶解チャンバ301（サンプル等入口）に、未知量のDNAが含まれる法医学サンプルが投入される。ステップ401～403の処理が流路デバイス104内で自動で実施される。

[0341] ステップ502にてmサイクルのPCRを行った後に、ステップ503でPCRチャンバ304から増幅産物mを取り出す。サンプルをCE部105の一方にサンプルを送り込む。503ステップと並行して、ステップ505にて、PCRチャンバ内に残されたPCR反応液に対してnサイクルのPCRを実施する。ステップ506にて、nサイクルの産物をCE部105に送り込み、2本のキャピラリに、泳動サンプルmとnそれぞれが格納された状態で、ステップ504とステップ507を同時に開始する。

符号の説明

[0342] 101 分析システム

102 コンピュータ

103 データベース

104　流路デバイス

105　CE部

106　ユーザインターフェイス

201～207　判定基準

301　溶解チャンバ

302　精製膜

303　精製膜チャンバ

304　PCRチャンバ

305　廃液チャンバ

306　外部接続口

307　ポンプおよびバルブ

308　PCR試薬貯留部

309　PCR試薬

310　泳動試薬貯留部

311　泳動試薬

312～314　試薬貯留部

315　流路

316　流路

317　加熱部

318　加熱部

319　流路

320　分注チャンバ

321　待機部

322　流路

323～326　バルブ

327　混合チャンバ

328～330　流路

331　泳動試薬貯留部

332～334　空気貯留部

335　PCR反応液

336　泳動サンプル

337～339　バルブ

401　サンプル投入ステップ

402　溶解ステップ

403　精製ステップ

404　増幅ステップ

405　検出ステップ

701　液面

702　ベントフィルタ

703　流路

704　流路抵抗体

705　液面検知センサ

801　CEの検出上限またはPCRの増幅産物濃度上限

802　CEの検出下限

803　STR-CEの分析範囲

804　分割PCRによるSTR-CEの分析範囲

805,806　プロット

807　CEのダイナミックレンジ

請求の範囲

[請求項1] サーマルサイクルを実施するPCRチャンバを有する流路デバイスと、

PCR反応液を電気泳動分析するキャピラリ電気泳動部と、

を有するDNA分析システムにおいて、

前記DNA分析システムは、

事前に設定されるmおよびnの値を記憶し、

前記PCRチャンバにおいて、PCR反応液に対しm回のサーマルサイクルを実施して第1反応液を生成し、

前記第1反応液の一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記第1反応液の前記一部を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析し、

前記PCRチャンバにおいて、前記PCRチャンバに残された前記第1反応液に対し、サーマルサイクルの合計回数がn回となるように、n－m回（ただしn－mは2以上の整数）のサーマルサイクルを実施して第2反応液を生成し、

前記第2反応液の少なくとも一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記第2反応液の前記少なくとも一部を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析する、

DNA分析システム。

[請求項2] 請求項1において、mが20以上32以下であるDNA分析システム。

[請求項3] 請求項1において、nが24以上36以下であるDNA分析システム。

[請求項4] 請求項1において、nがmよりも4～9多いDNA分析システム。

[請求項5] 請求項1において、前記DNA分析システムは、前記第1反応液の前記一部および前記第2反応液の前記少なくとも一部に対し、前記電気泳動分析の前に電気泳動分析以外の方法による分析を実行しない、DNA

分析システム。

[請求項6] 請求項1において、前記DNA分析システムは、前記第1反応液の前記一部および前記第2反応液の前記少なくとも一部の少なくとも一方を、複数種のDNA断片を含む溶液と混合する、DNA分析システム。

[請求項7] 請求項1において、前記DNA分析システムは、前記第1反応液の前記一部および前記第2反応液の前記少なくとも一部の少なくとも一方を、電気泳動分析の前に、純水またはホルムアミドまたは10 mS/cm以下の導電率の溶液と混合して混合液を生成する、DNA分析システム。

[請求項8] 請求項7において、前記DNA分析システムは前記混合液を90℃以上に加熱する、DNA分析システム。

[請求項9] 請求項1において、前記流路デバイスはPCR反応液の調整から前記n－m回のサーマルサイクルまでを全自動で実施する、DNA分析システム。

[請求項10] 請求項1において、

前記流路デバイスは計量部を有しており、

前記DNA分析システムは、前記m回のサーマルサイクルの終了後に、前記計量部に前記第1反応液を搬送することにより、0.1%～50%の範囲内の所定量の第1反応液を計量する、

DNA分析システム。

[請求項11] 請求項1において、前記流路デバイスは開閉可能なバルブを有しており、前記m回のサーマルサイクルの開始前に前記バルブを閉じて、前記m回のサーマルサイクルの終了後に前記バルブを開放することにより、前記第1反応液の前記一部を分割して取り出す、DNA分析システム。

[請求項12] 請求項1において、前記DNA分析システムは、前記第1反応液の前記一部を50℃～80℃の範囲内の一定温度で1～20分保持する、DNA分析システム。

[請求項13] 請求項1において、前記DNA分析システムは、前記第1反応液を50℃

～80℃の範囲内の一定温度で1～20分保持し、その後に前記一部を取り出す、DNA分析システム。

[請求項14] 請求項1において、前記DNA分析システムは、n回のサーマルサイクル終了時に、PCRチャンバ内のPCR反応液を全量PCRチャンバの外に搬送するDNA分析システム。

[請求項15] 請求項1において、

前記PCR反応液は、2以上のプライマセットを含み、

前記PCR反応液は、2以上の増幅遺伝子領域を含むDNAを含む、

DNA分析システム。

[請求項16] 請求項1において、前記DNA分析システムは、

前記第1反応液の前記一部に対する前記電気泳動分析の結果と、前記第2反応液の前記少なくとも一部に対する前記電気泳動分析の結果とのうち、いずれがより良い結果であるかを判定し、

前記より良い結果を出力する、または、どちらが良い結果であるかを判定できる情報を出力する、

DNA分析システム。

[請求項17] サーマルサイクルを実施するPCRチャンバを有する流路デバイスと、

PCR反応液を電気泳動分析するキャピラリ電気泳動部と、

を有するDNA分析システムにおいて、

前記DNA分析システムは、

事前に設定されるmおよびnの値を記憶し、

前記PCRチャンバにおいて、PCR反応液に対しm回のサーマルサイクルを実施して第1反応液を生成し、

前記第1反応液の一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

前記PCRチャンバにおいて、前記PCRチャンバに残された前記第1反応液に対し、サーマルサイクルの合計回数がn回となるように、n－m

回（ただしn－mは2以上の整数）のサーマルサイクルを実施して第2反応液を生成し、

前記第2反応液の少なくとも一部を、組成を変えずに前記PCRチャンバから取り出し、

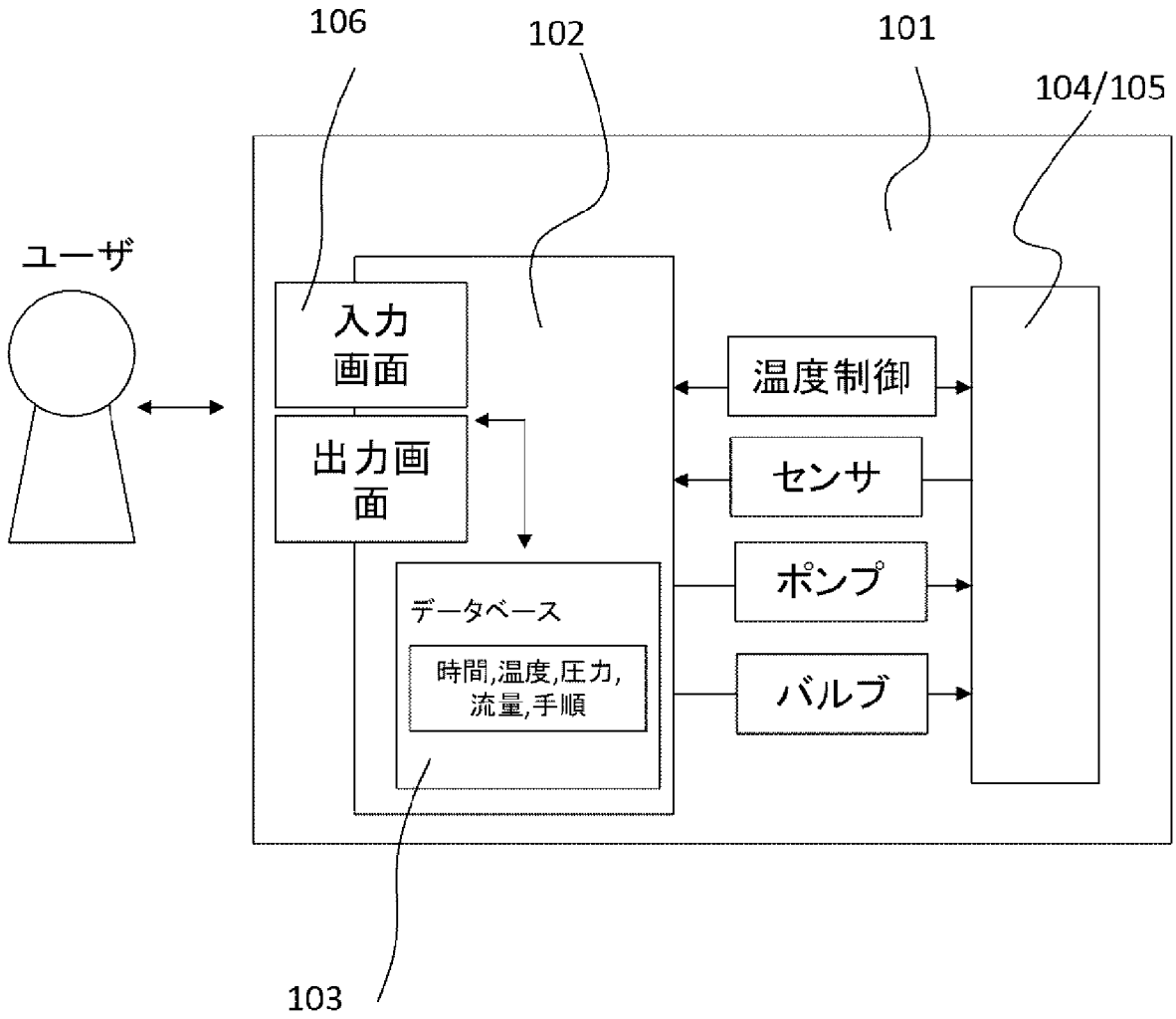
前記第1反応液の前記一部および前記第2反応液の前記少なくとも一部のうち一方を、前記キャピラリ電気泳動部において電気泳動分析し、

前記一方の電気泳動分析の結果に基づいて、前記第1反応液の前記一部または前記第2反応液の前記少なくとも一部のうち他方について電気泳動分析の実行を制御する、

DNA分析システム。

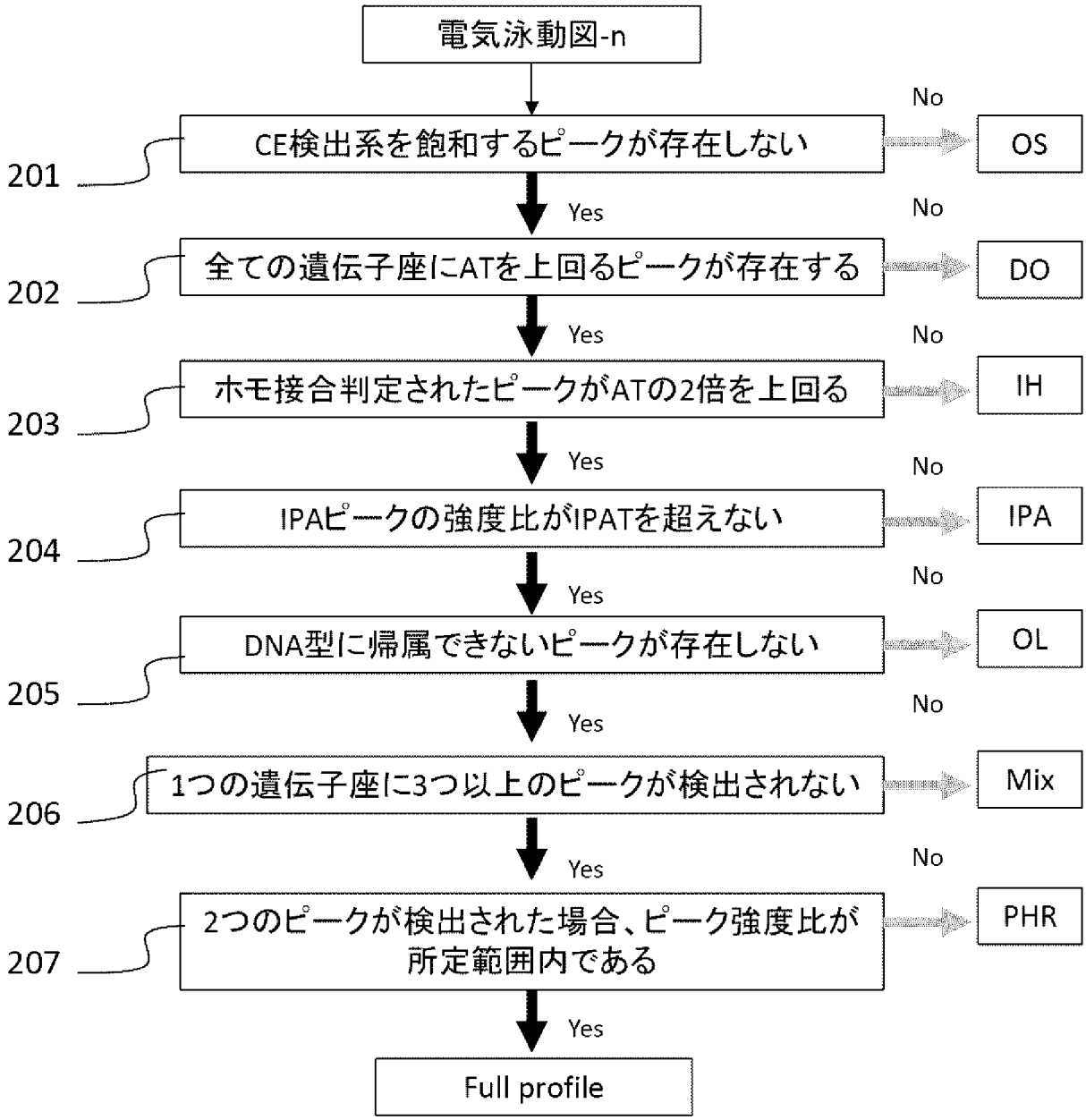
[図1]

【図1】


106
102
101
104/105
ユーザ
入力画面
出力画面
データベース
時間,温度,圧力,流量,手順
温度制御
センサ
ポンプ
バルブ
103

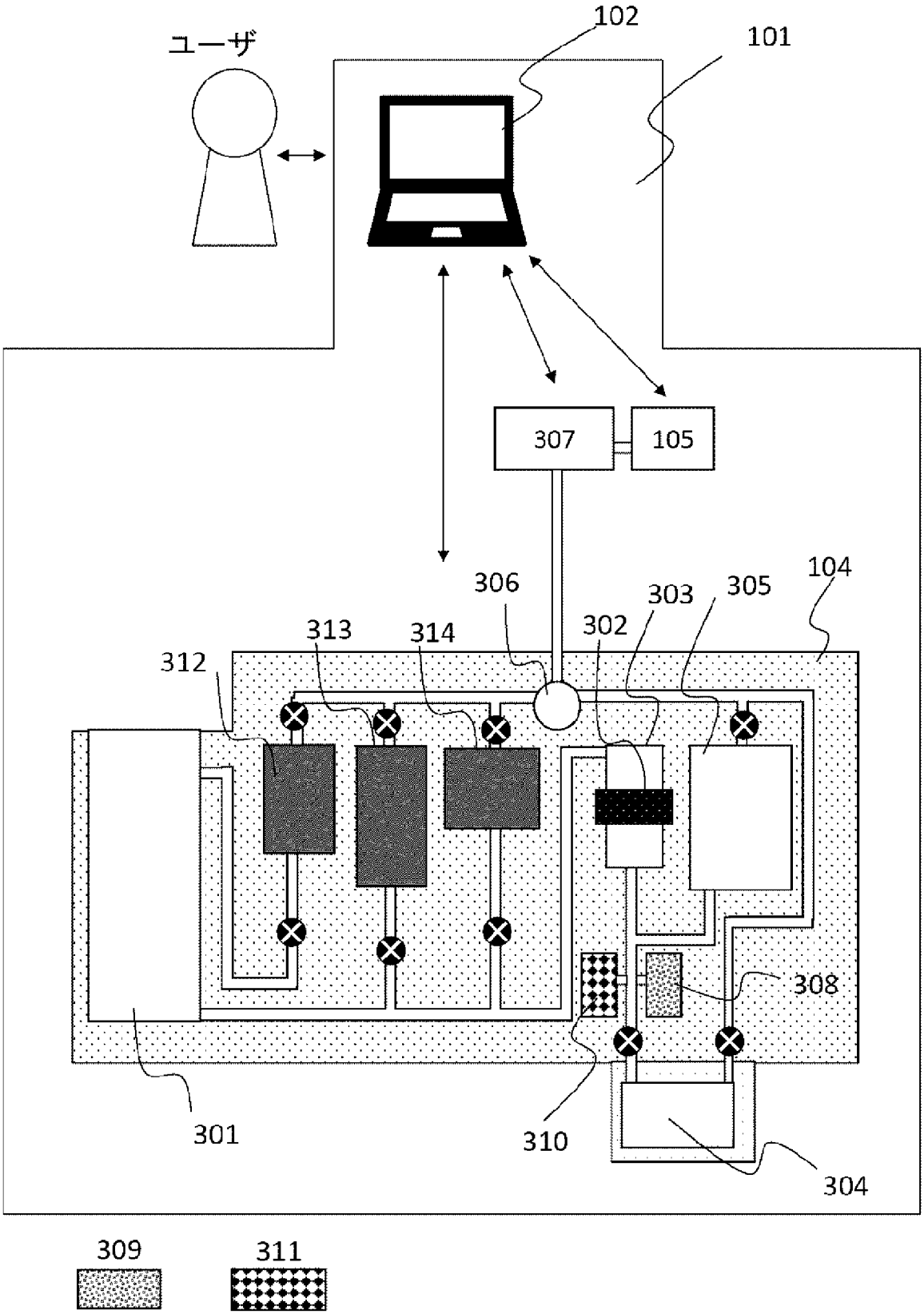
[図2]

【図2】


電気泳動図-n
201
CE検出系を飽和するピークが存在しない
No
OS
Yes
202
全ての遺伝子座にATを上回るピークが存在する
No
DO
Yes
203
ホモ接合判定されたピークがATの2倍を上回る
No
IH
Yes
204
IPAピークの強度比がIPATを超えない
No
IPA
Yes
205
DNA型に帰属できないピークが存在しない
No
OL
Yes
206
1つの遺伝子座に3つ以上のピークが検出されない
No
Mix
Yes
207
2つのピークが検出された場合、ピーク強度比が所定範囲内である
No
PHR
Yes
Full profile

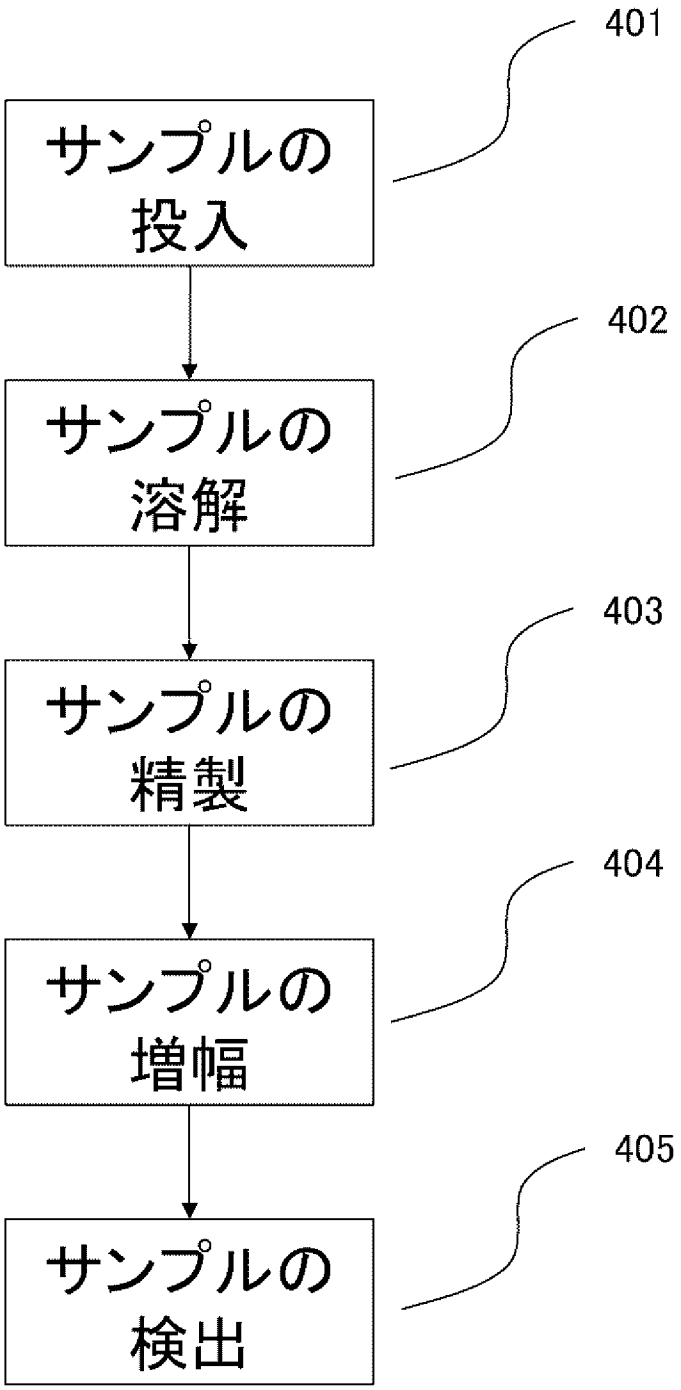
[図3]

【図3】


ユーザ
102
101
307
105
306
303
305
104
313
314
302
312
308
301
310
304
309
311

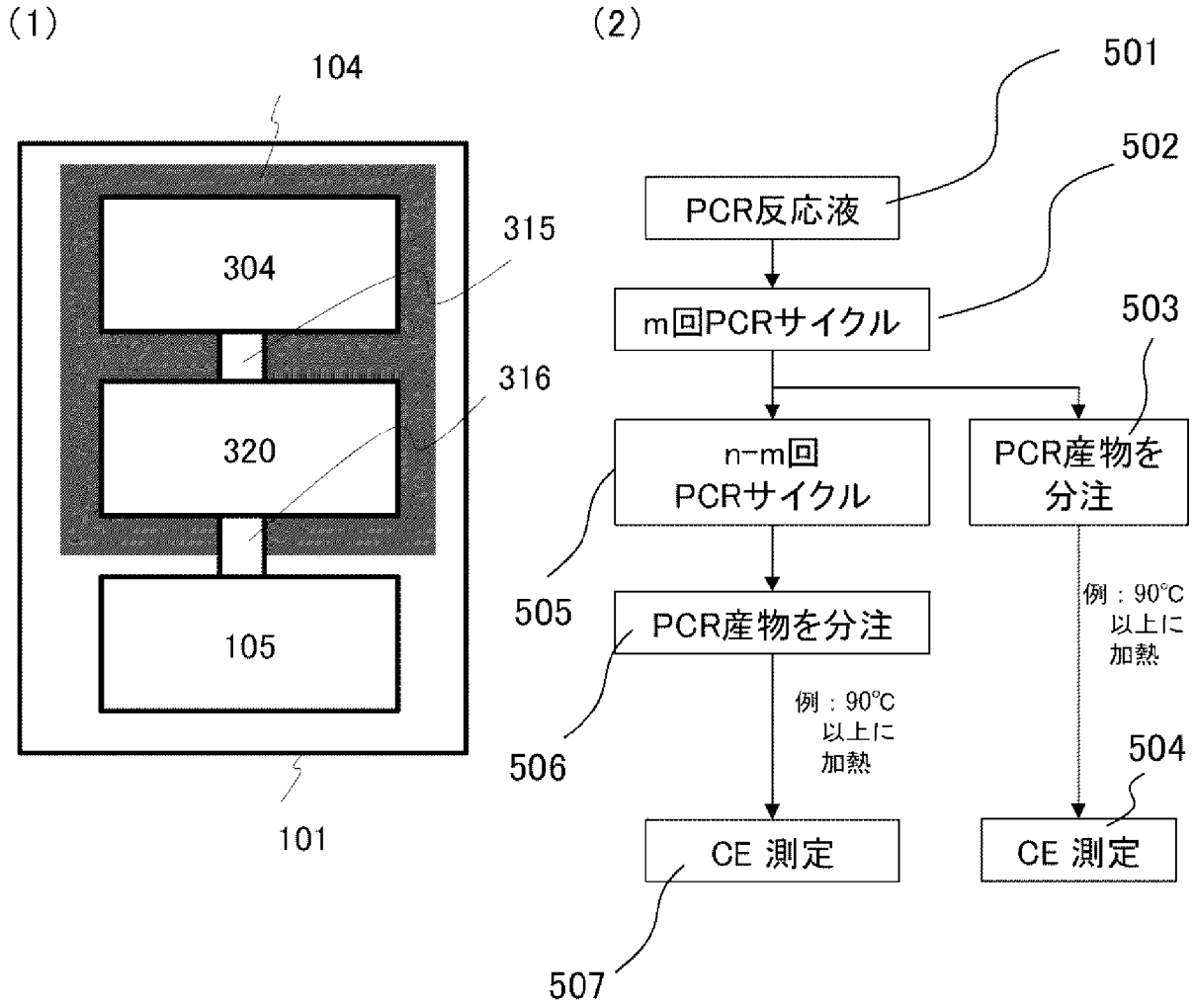
[図4]

【図4】


401
サンプルの投入
402
サンプルの溶解
403
サンプルの精製
404
サンプルの増幅
405
サンプルの検出

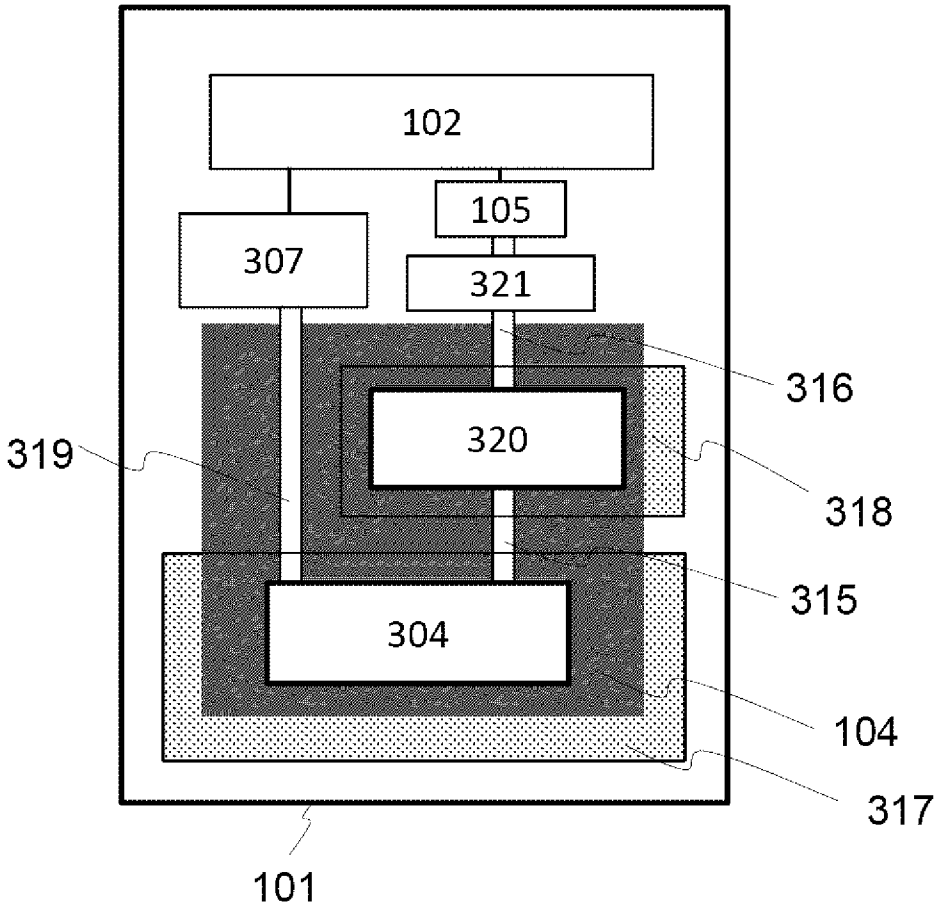
[図5]

【図5】


(1)
104
304
315
320
316
105
101
(2)
501
PCR反応液
502
m回PCRサイクル
503
n−m回
PCRサイクル
PCR産物を
分注
505
PCR産物を分注
例：90℃
以上に
加熱
506
例：90℃
以上に
加熱
504
CE 測定
CE 測定
507

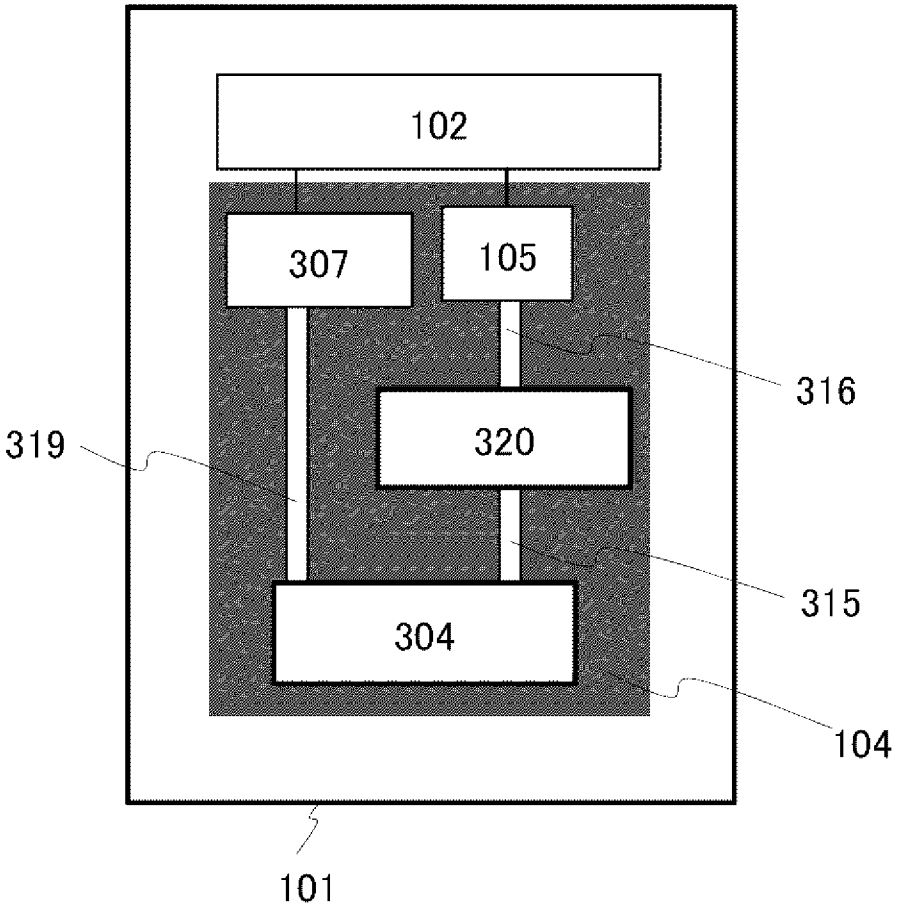
[図6]

【図6】



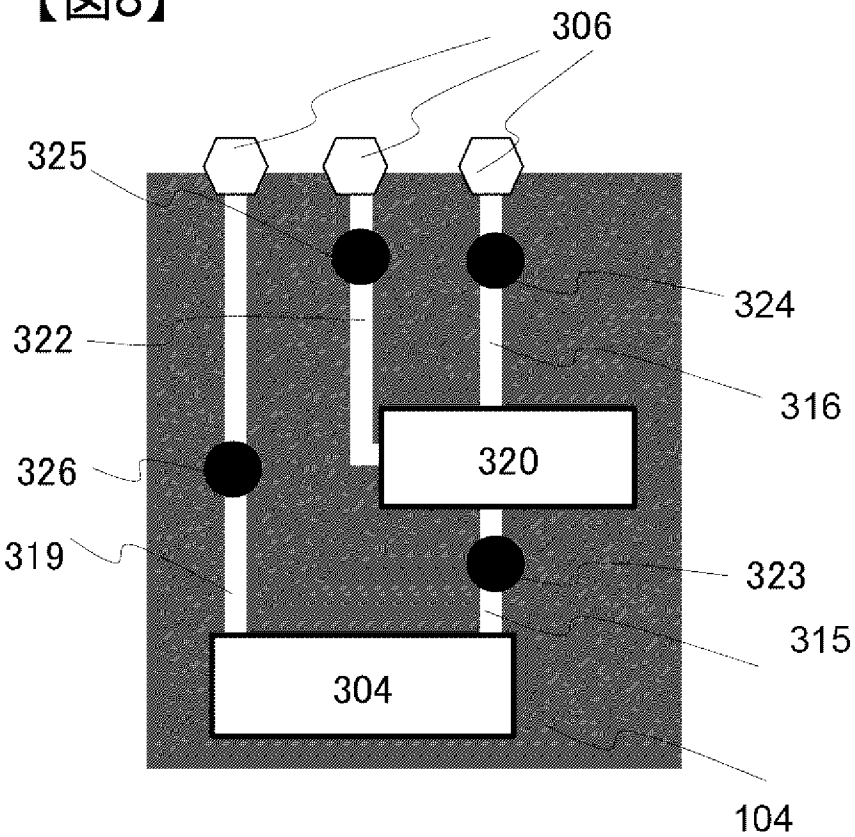
[図7]

【図7】



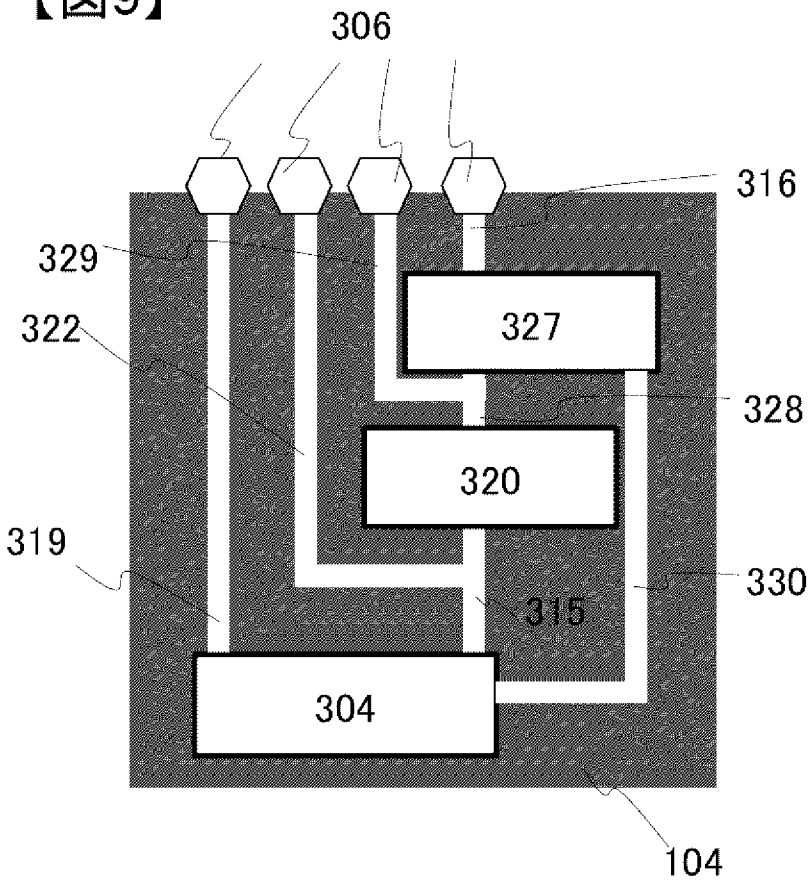
[図8]

【図8】


306
325
324
322
316
320
326
319
323
315
304
104

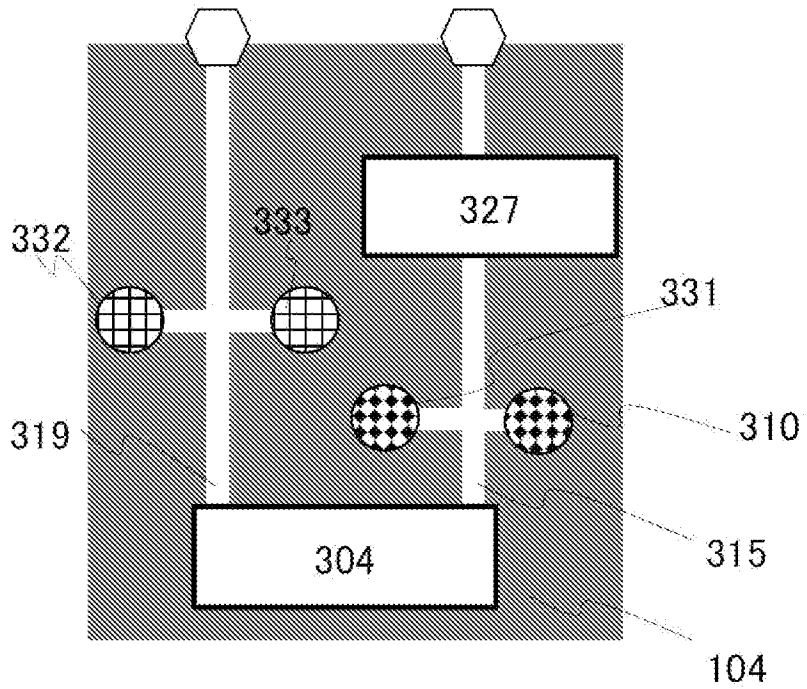
[図9]

【図9】


306
316
329
327
322
328
320
319
330
315
304
104

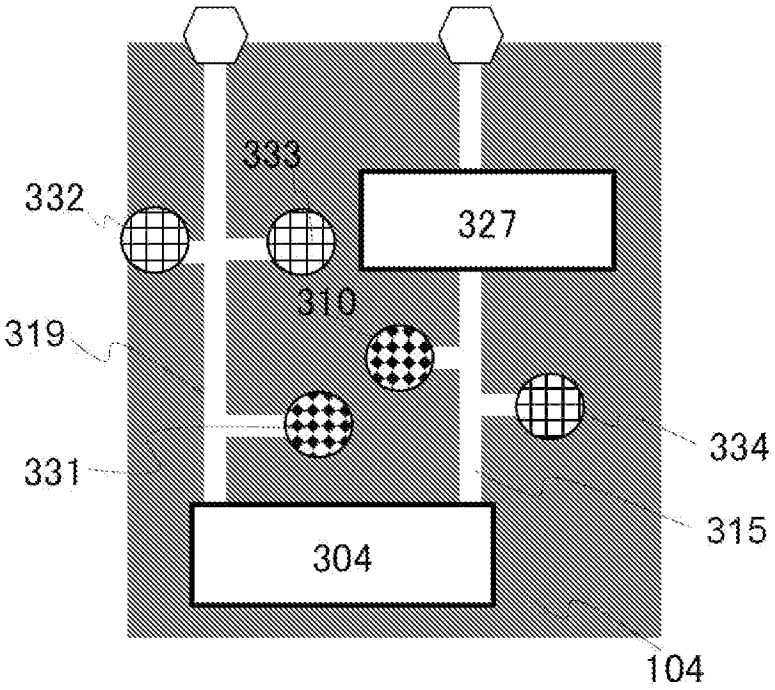
[図10]

【図10】



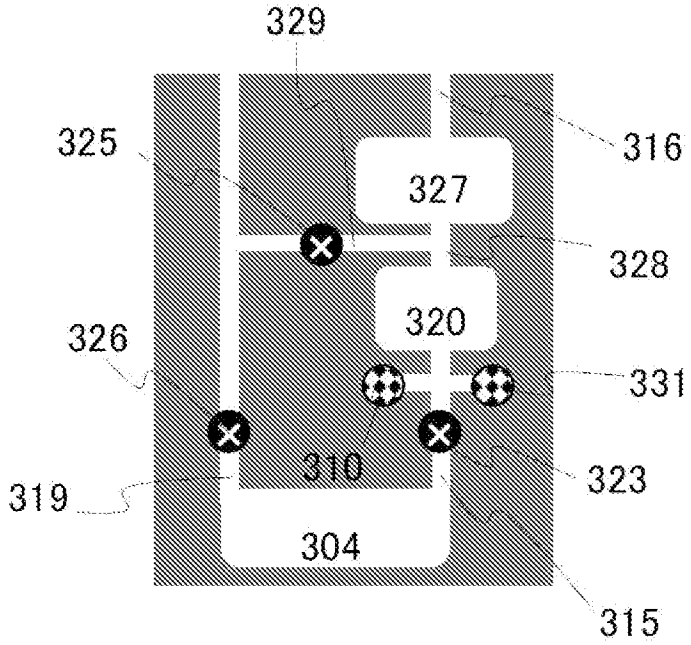
[図11]

【図11】



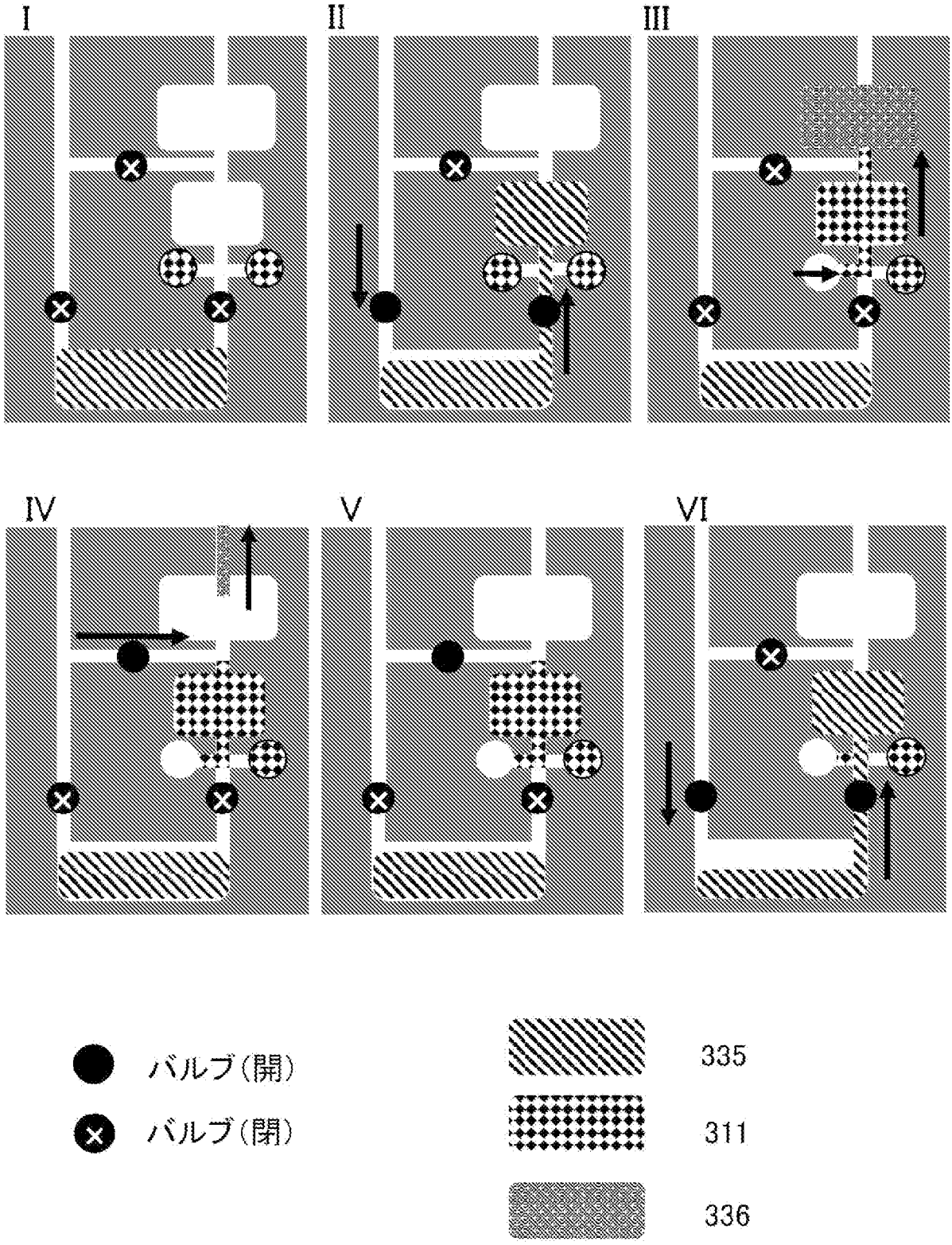
[図12]

【図12】



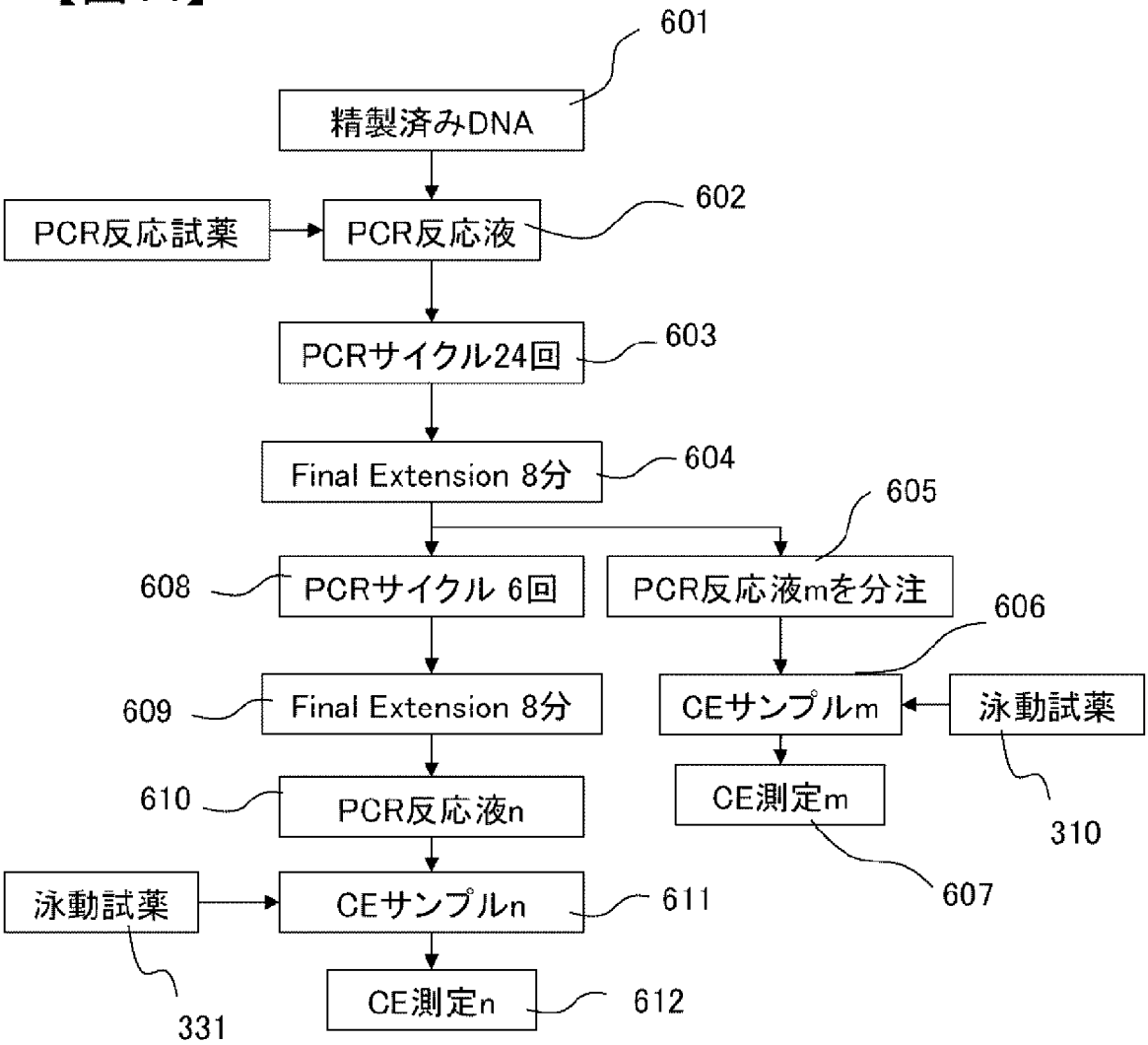
[図13]

【図13】



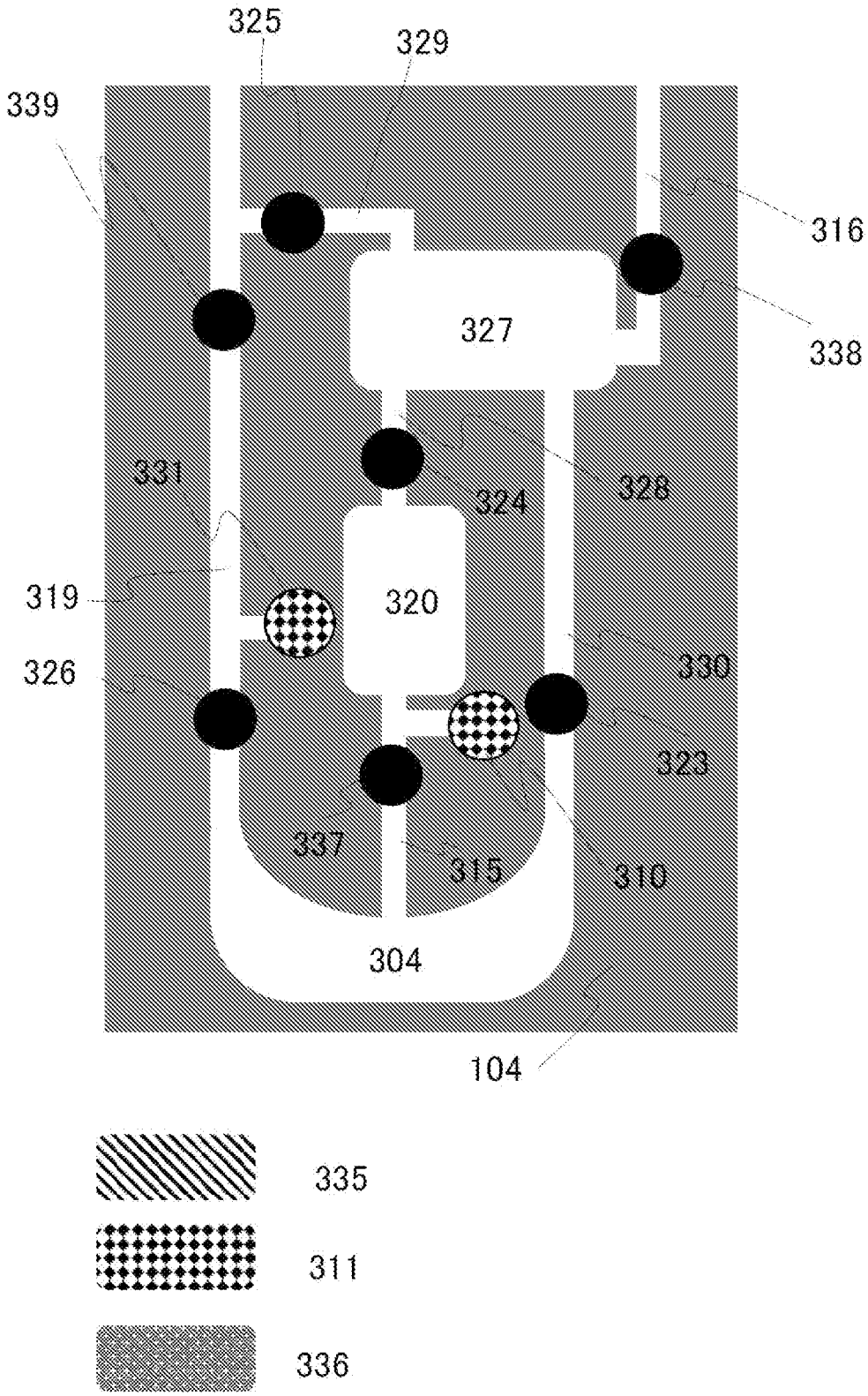
[図14]

【図14】


601
精製済みDNA
PCR反応試薬
PCR反応液
602
PCRサイクル24回
603
Final Extension 8分
604
605
608
PCRサイクル 6回
PCR反応液mを分注
606
609
Final Extension 8分
CEサンプルm
泳動試薬
610
PCR反応液n
CE測定m
310
607
泳動試薬
CEサンプルn
611
CE測定n
612
331

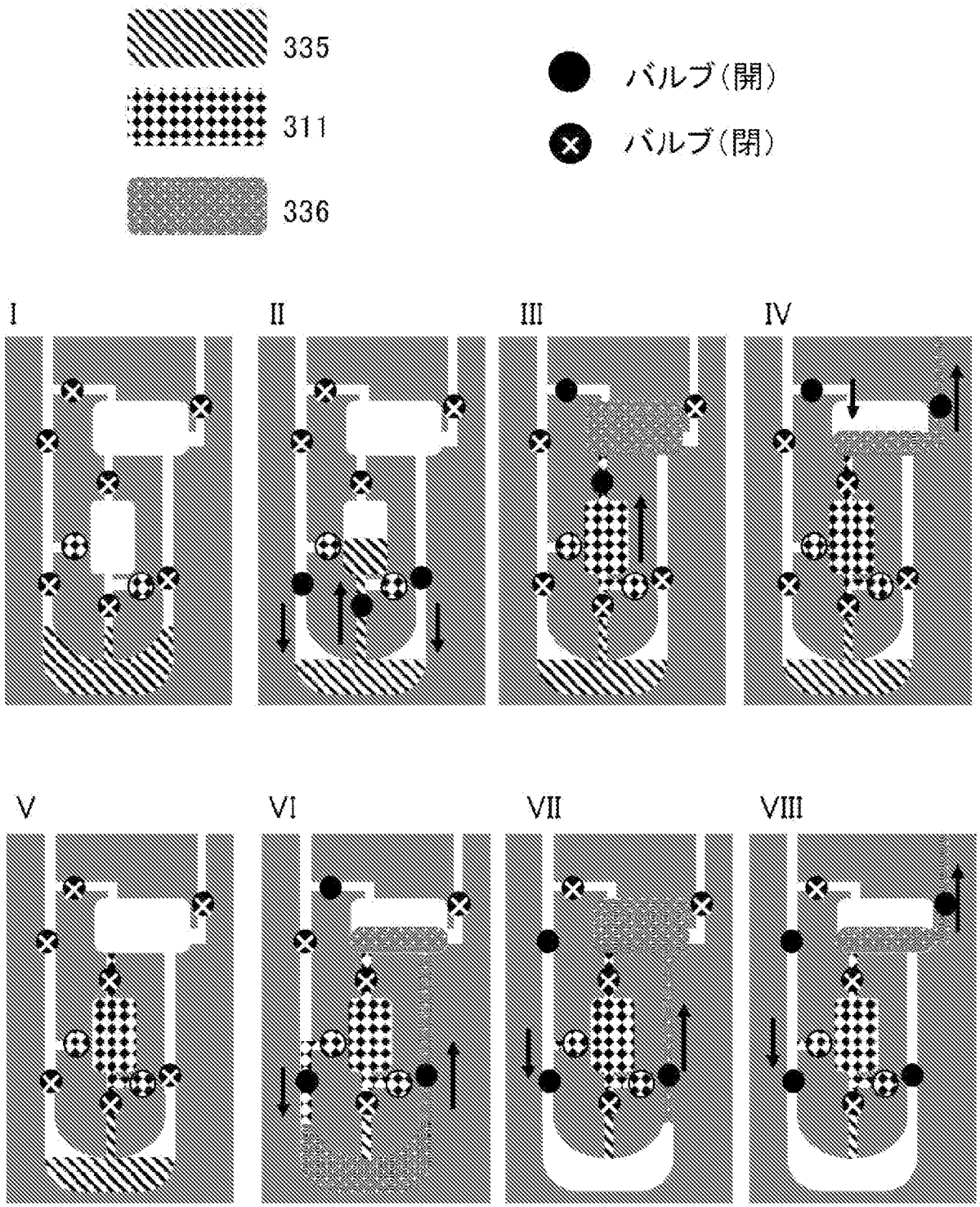
[図15]

【図15】


325
329
339
316
338
327
331
324
328
319
320
326
330
323
337
315
310
304
104
335
311
336

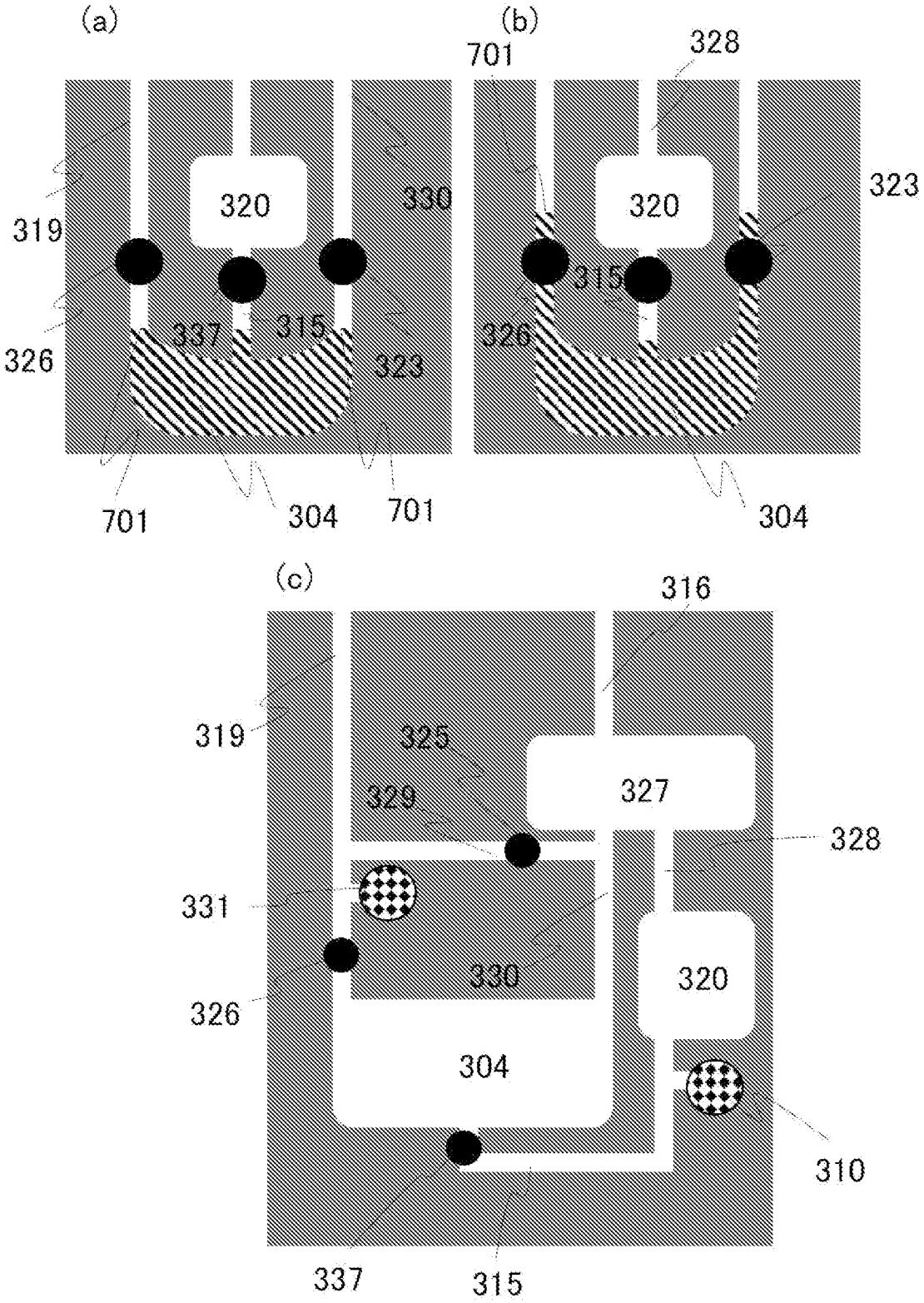
[図16]

【図16】



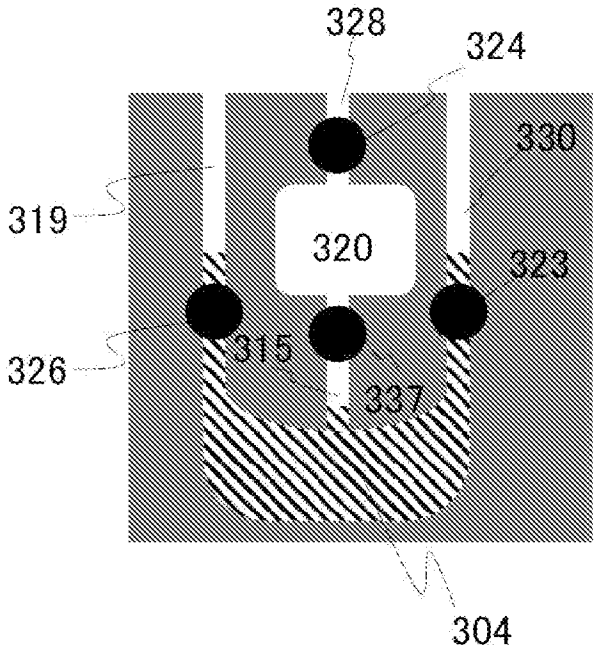
[図17]

【図17】


(a)
319
326
320
330
337
315
323
701
304
701
(b)
701
328
320
323
315
326
304
(c)
316
319
325
329
327
328
331
330
320
326
304
310
337
315

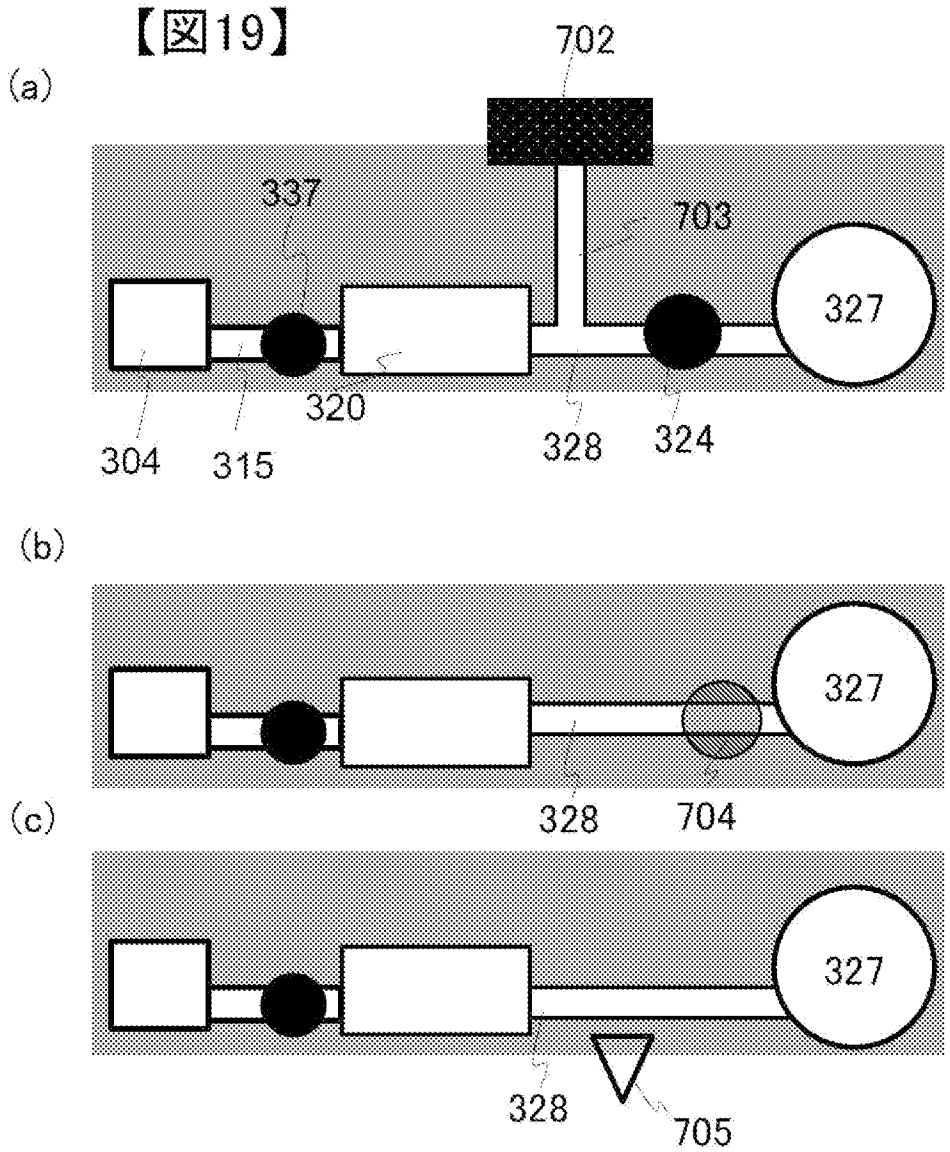
[図18]

【図18】



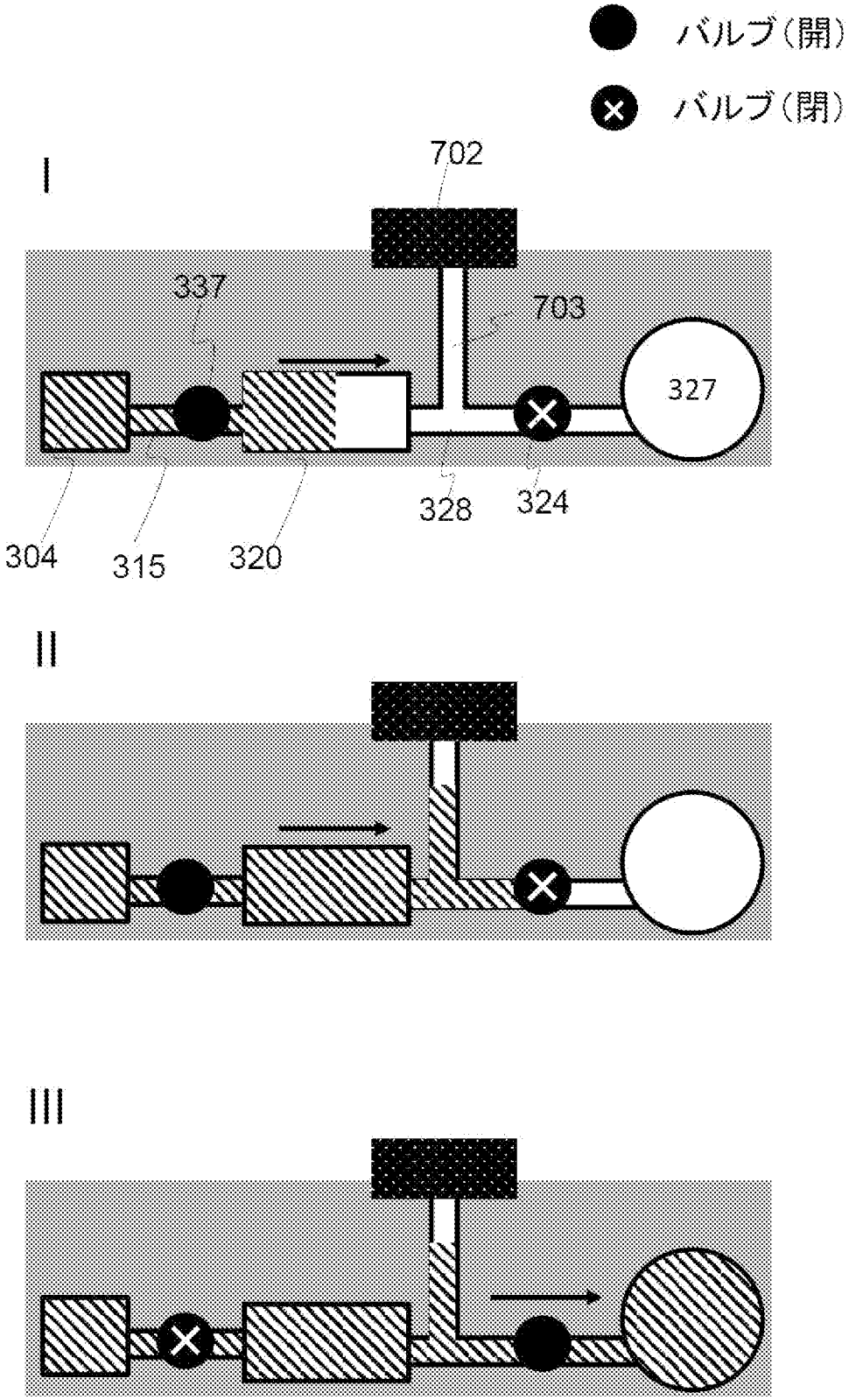
[図19]

【図19】



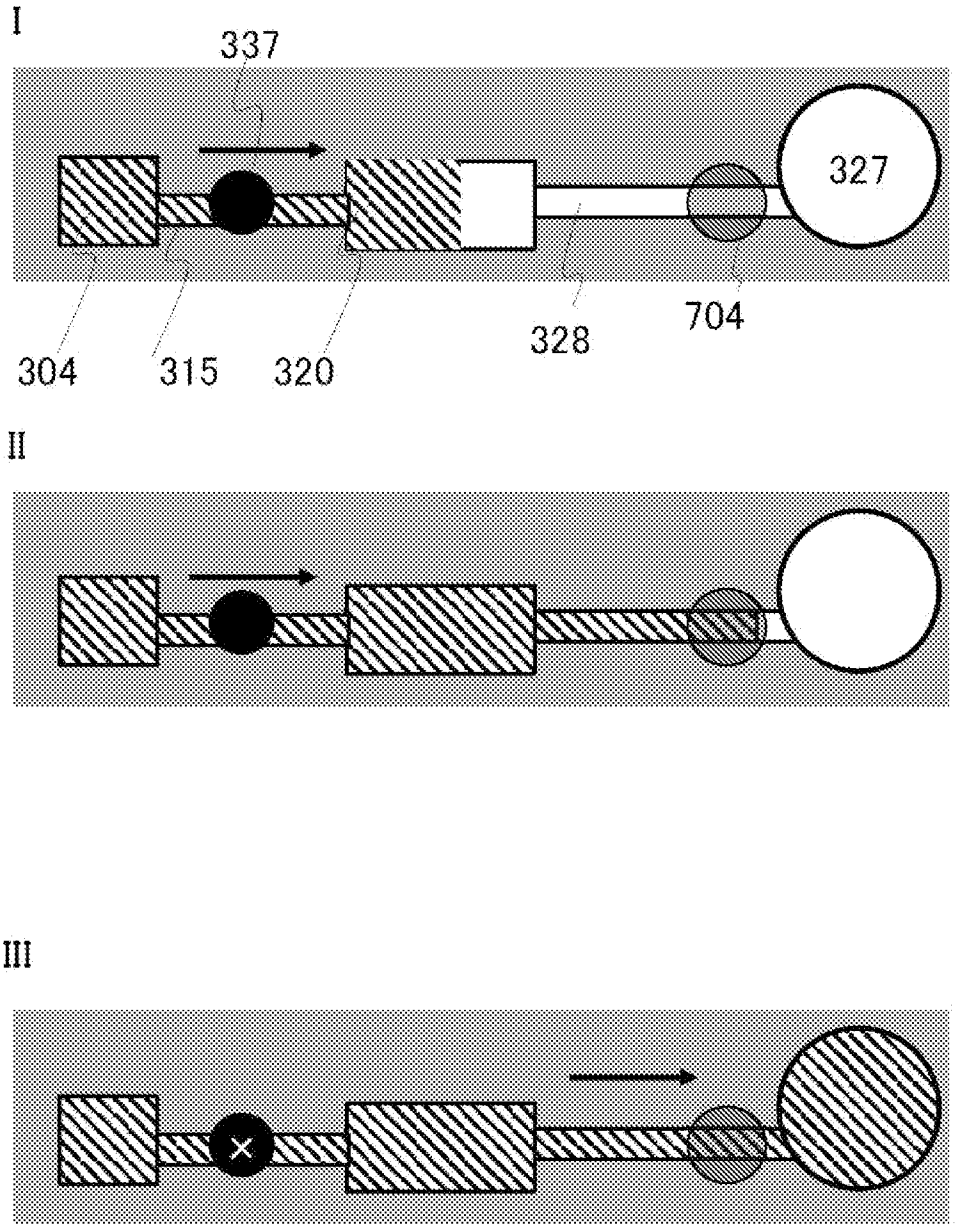
[図20]

【図20】



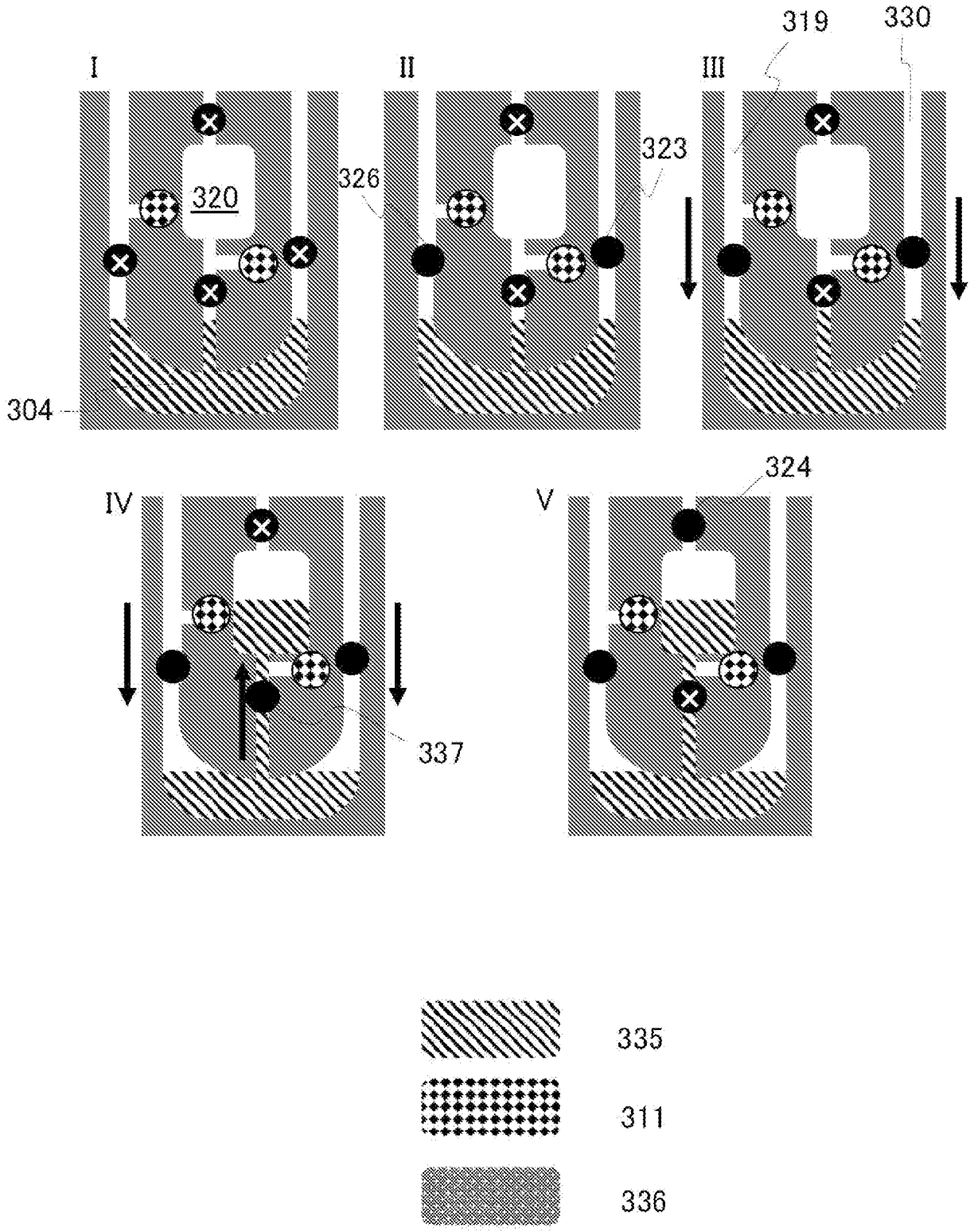
[図21]

【図21】



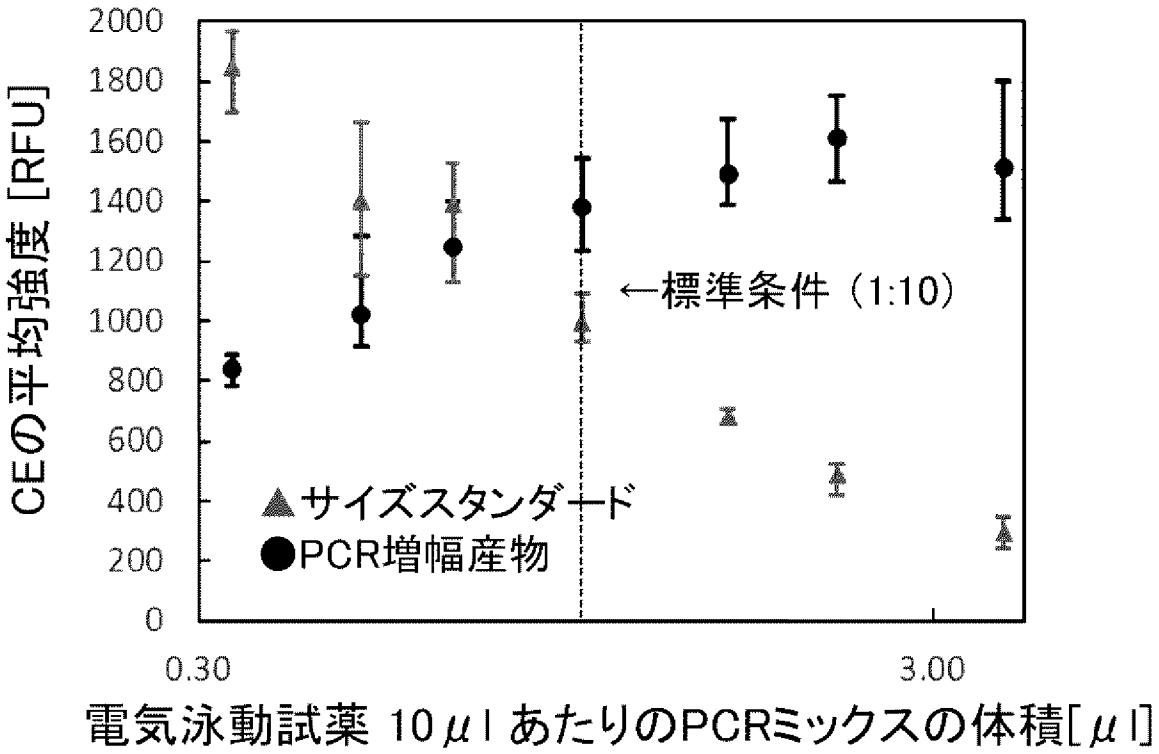
[図22]

【図22】



[図23]

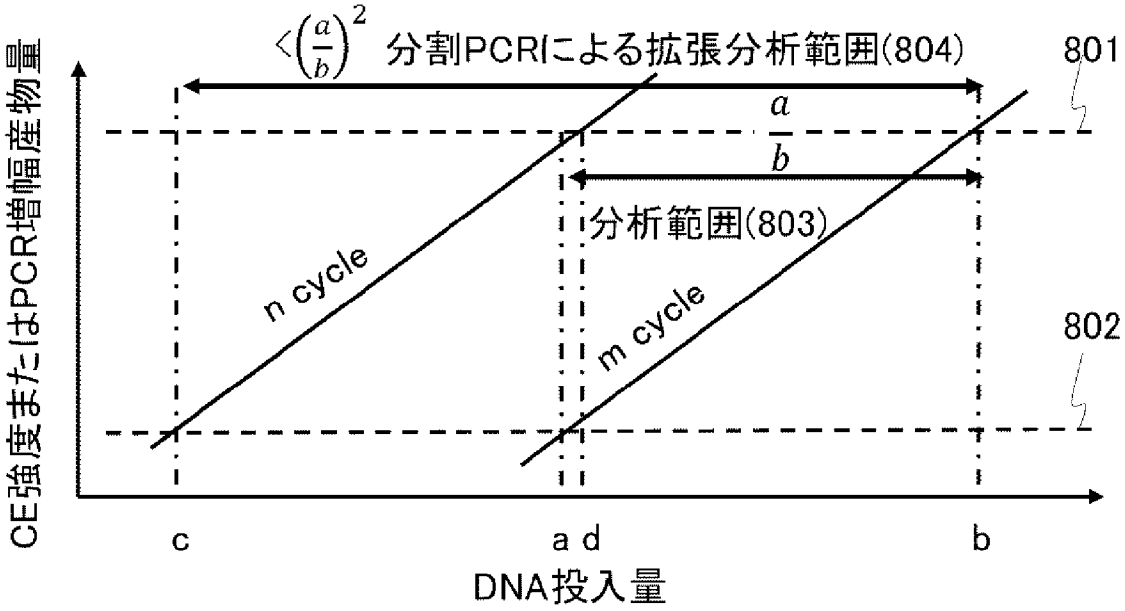
【図23】


2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
CEの平均強度 [RFU]
←標準条件（1:10）
▲サイズスタンダード
●PCR増幅産物
0.30
3.00
電気泳動試薬 10μl あたりのPCRミックスの体積[μl]

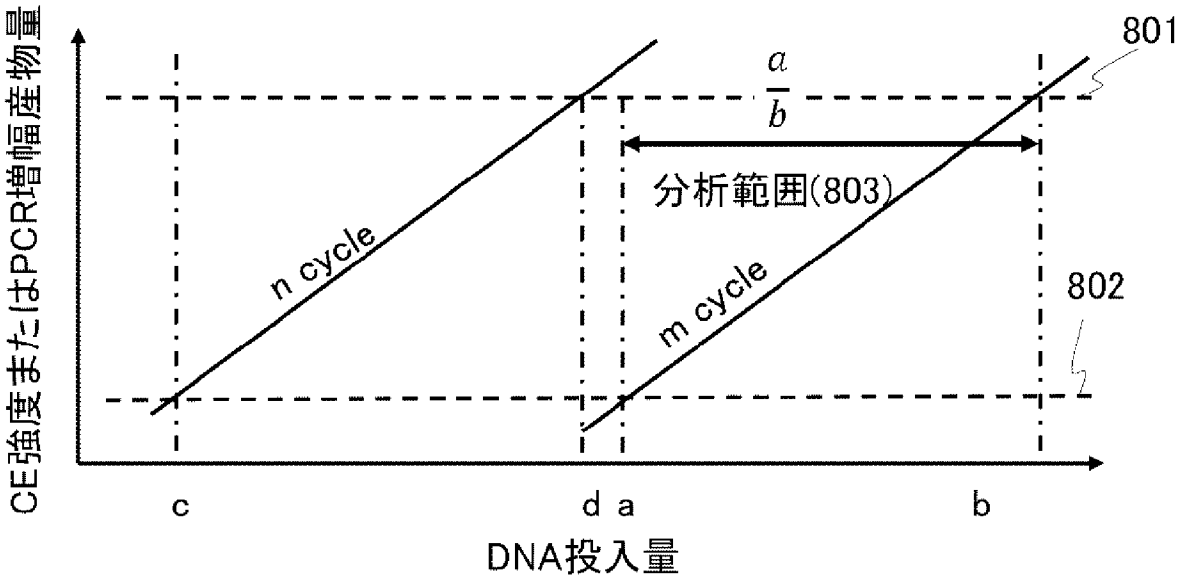
[図24]

【図24】

（1）a<dの場合

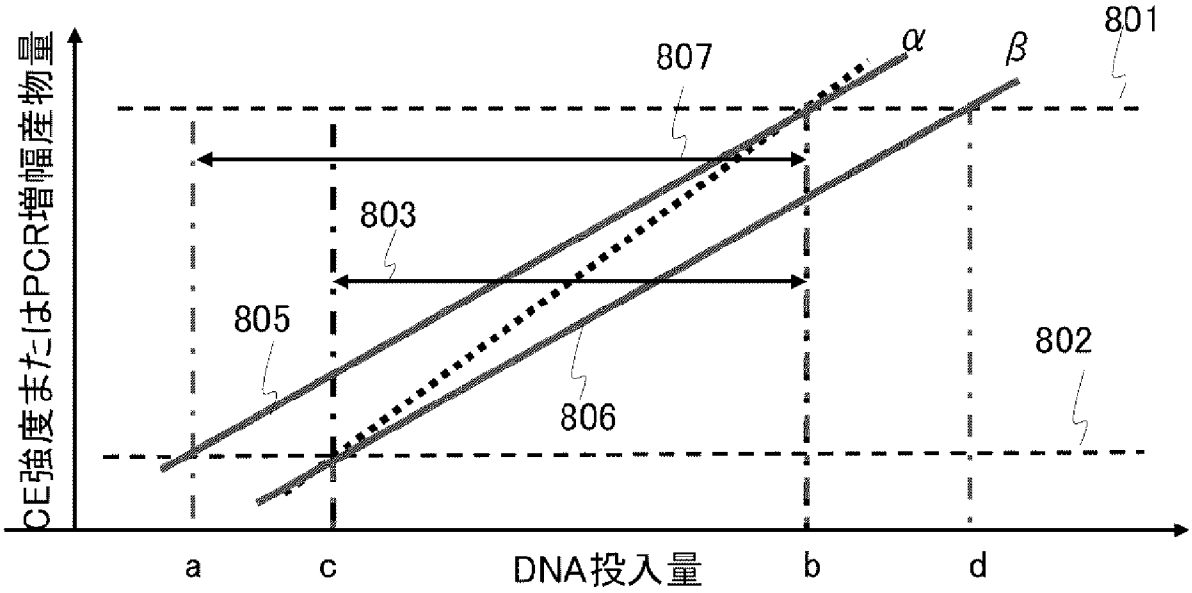


（2） d<aの場合



[図25]

【図25】



[図26]

【図26】

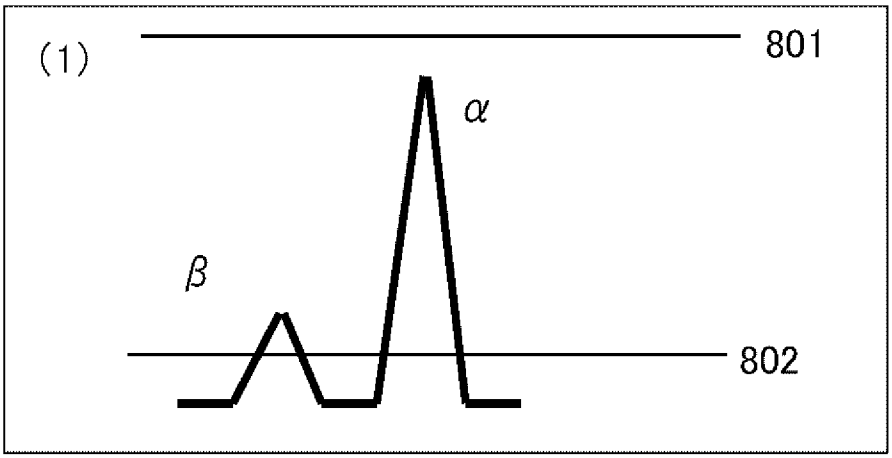
分析可能なプロファイルの最大のピーク強度比

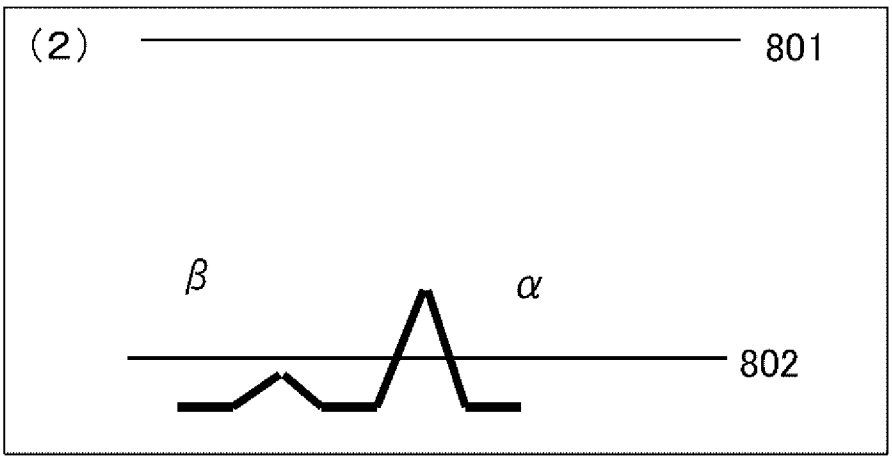
CEのダイナミックレンジまたは最大のフラグメントの分析範囲(807)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
30	15	7.5	3.75	1.88						
60	30	15	7.5	3.75	1.88					
120	60	30	15	7.5	3.75	1.88				
240	120	60	30	15	7.5	3.75	1.88			
480	240	120	60	30	15	7.5	3.75	1.88		
960	480	240	120	60	30	15	7.5	3.75	1.88	
1920	960	480	240	120	60	30	15	7.5	3.75	1.88
3840	1920	960	480	240	120	60	30	15	7.5	3.75
7680	3840	1920	960	480	240	120	60	30	15	7.5
15360	7680	3840	1920	960	480	240	120	60	30	15

n−m

[図27]

【図27】





[図28]

【図28】

分析範囲拡大率

(1)

mサイクル　設定値

m	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21
20	65536	32768	16384	8192	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8
21	32768	16384	8192	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4
22	16384	8192	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
23	8192	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	
24	4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2		
25	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2			
26	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2				
27	512	256	128	64	32	16	8	4	2					
28	256	128	64	32	16	8	4	2						
29	128	64	32	16	8	4	2							
30	64	32	16	8	4	2								
31	32	16	8	4	2									
32	16	8	4	2										

n

nサイクル　設定値

(2)

mサイクル分析DNA量上限[ng]

分析範囲

mサイクル　設定値と分析上限

mサイクル分析DNA量上限[ng]	m	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21
1536	20	12.0	11.7	11.4	11.1	10.8	10.5	10.2	9.9	9.6	9.3	9.0	8.7	8.4	8.1
768	21	6.6	6.3	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7
384	22	6.3	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4
192	23	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4	
96	24	5.7	5.4	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4		
48	25	5.4	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4			
24	26	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4				
12	27	4.8	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4					
6	28	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4						
3	29	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4							
1.5	30	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4								
0.75	31	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4									
0.375	32	3.3	3.0	2.7	2.4										

n

nサイクル分析DNA量上限[ng]

0.0015	0.0029	0.006	0.012	0.023	0.047	0.094	0.19	0.38	0.75	2	3	6	12

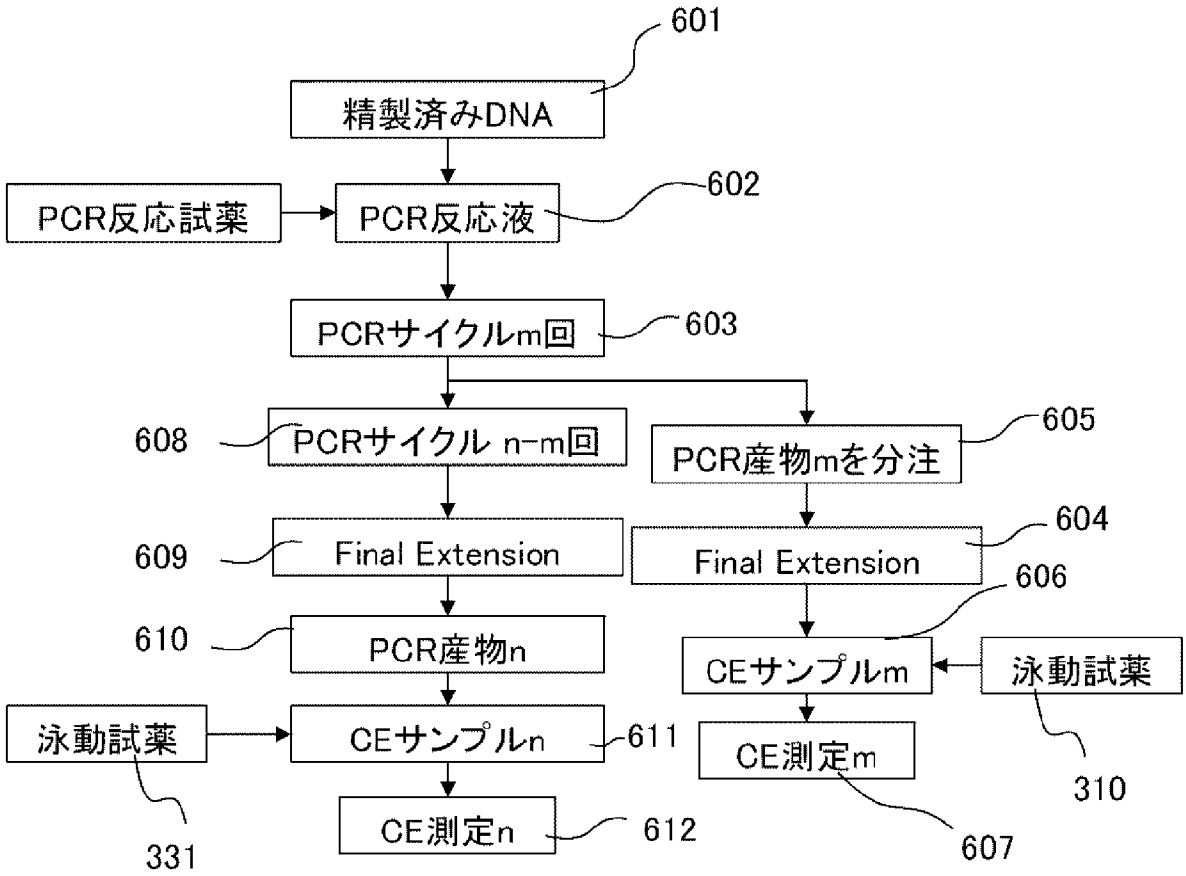
nサイクル　設定値と分析下限

範囲例：

- mが20以上32以下
- nが24以上36以下
- nがmよりも4～9多い

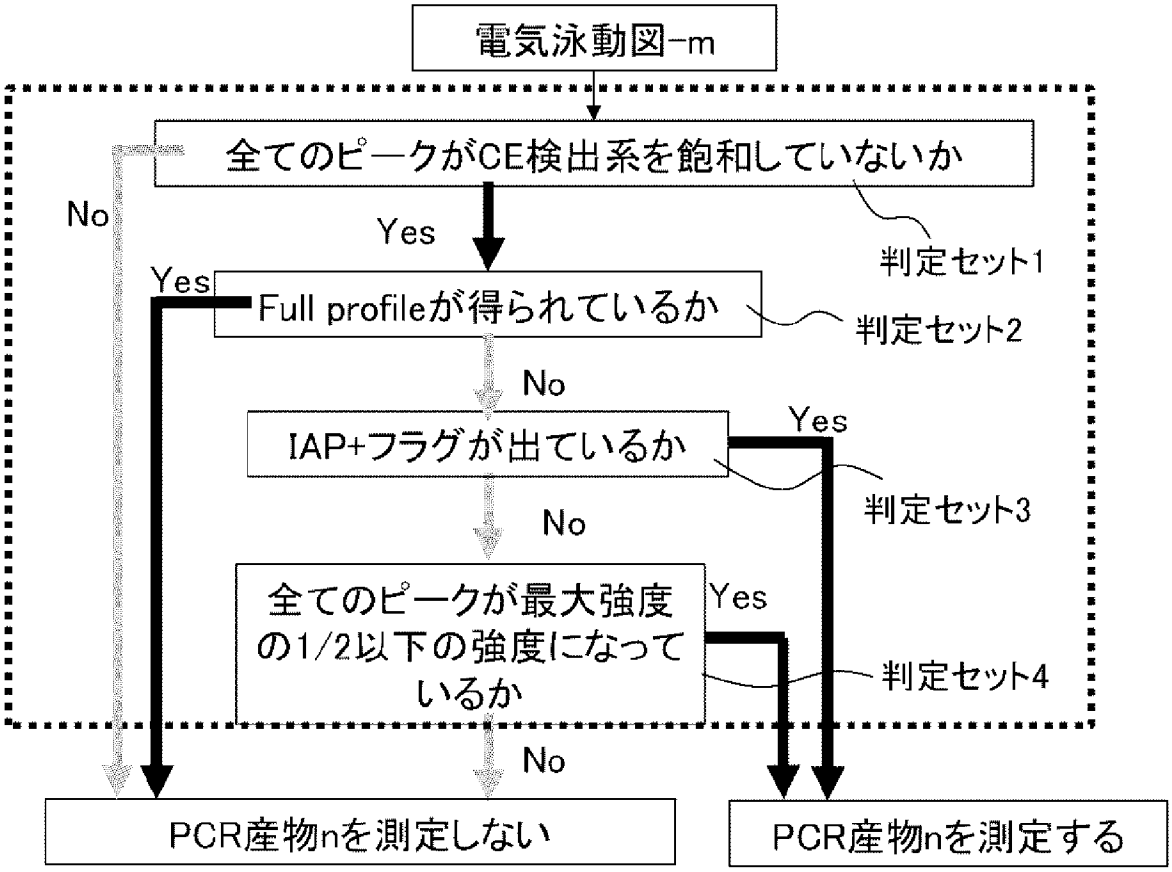
[図29]

【図29】


601
精製済みDNA
PCR反応試薬
PCR反応液
602
PCRサイクルm回
603
608
PCRサイクル n−m回
PCR産物mを分注
605
609
Final Extension
Final Extension
604
606
610
PCR産物n
CEサンプルm
泳動試薬
泳動試薬
CEサンプルn
611
CE測定m
310
CE測定n
612
331
607

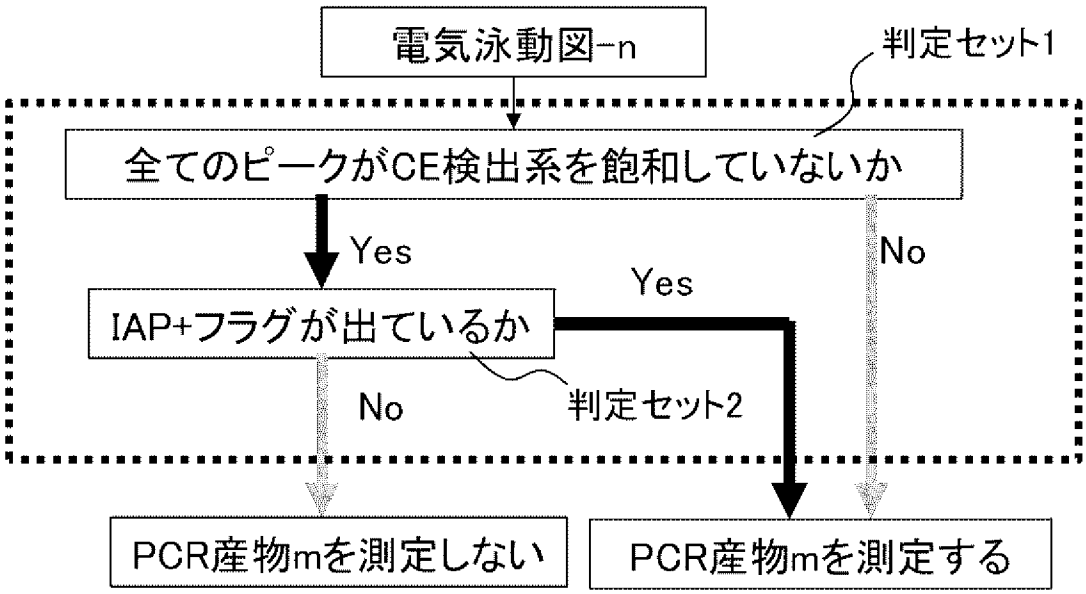
[図30]

【図30】



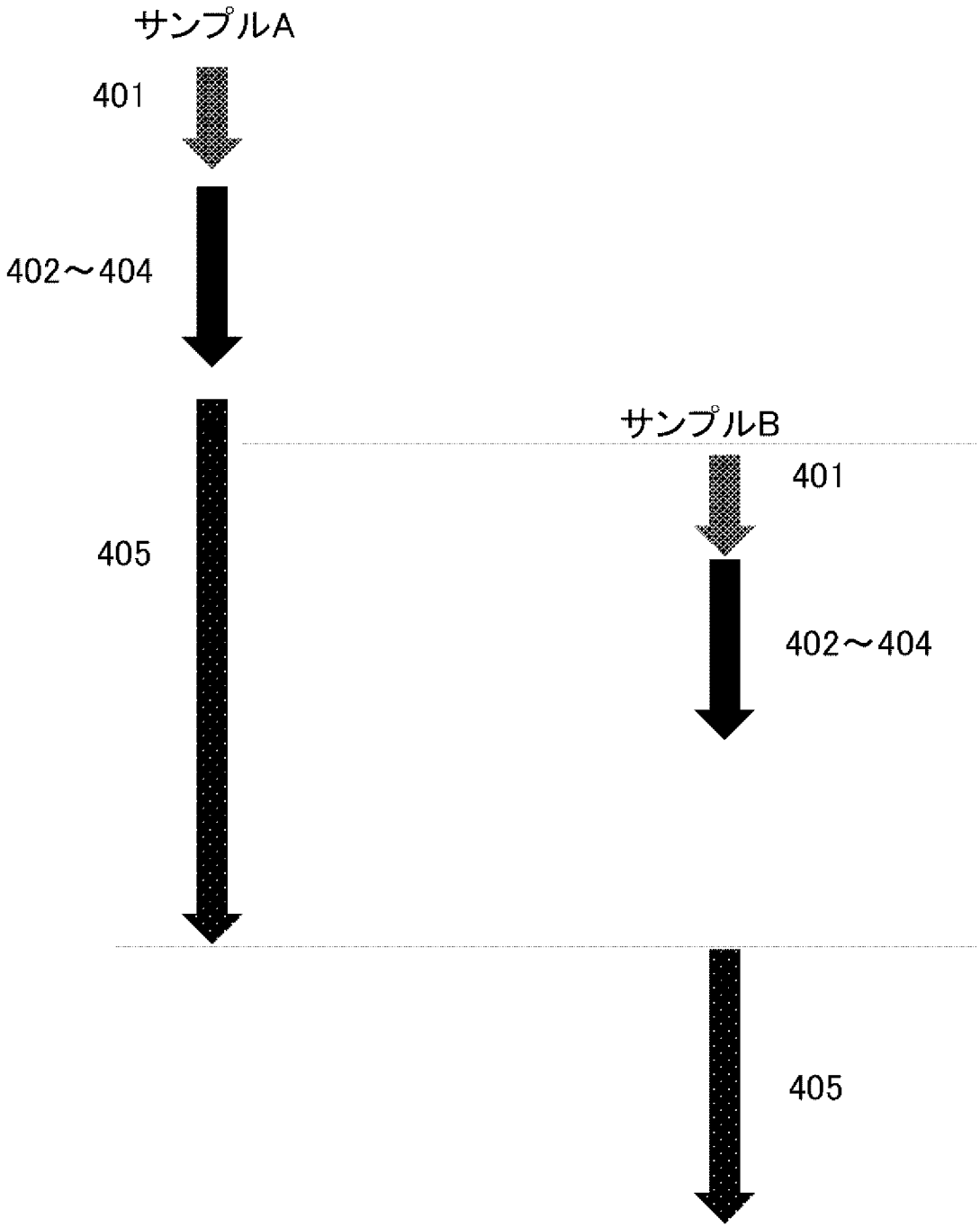
[図31]

【図31】



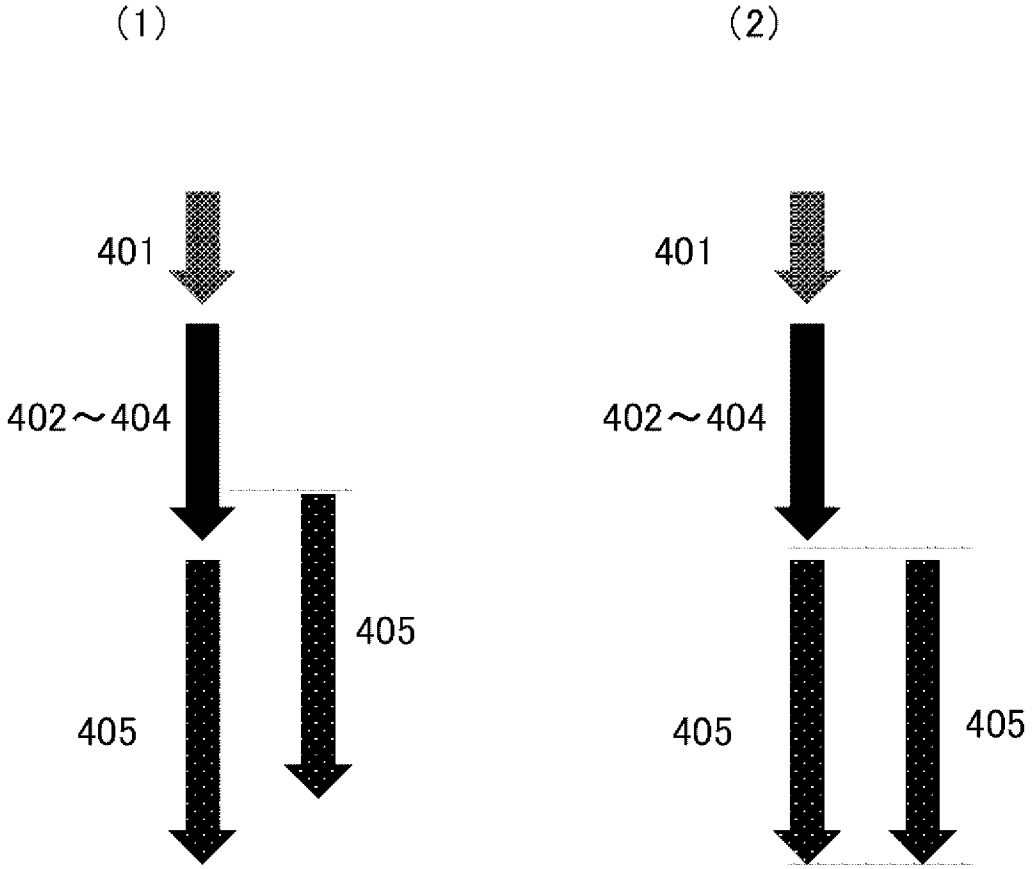
[図32]

【図32】



[図33]

【図33】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/686(2018.01)i
FI: C12Q1/686

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/686, C12M, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-519611 A (PRIMERA BIOSYSTEMS, INC.) 31 August 2006 (2006-08-31) claims 1, 5, paragraph [0108]	1-17
Y	claim 1	1-17
Y	JP 2017-077180 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) 27 April 2017 (2017-04-27) claim 1, paragraphs [0015], [0025], fig. 1	1-17
Y	US 2006/0269932 A1 (PRIMERA BIOSYSTEMS, INC.) 30 November 2006 (2006-11-30) claim 1, paragraph [0027]	1-17
A	JP 2006-507849 A (PRIMERA BIOSYSTEMS, INC.) 09 March 2006 (2006-03-09) entire text, all drawings	1-17

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 August 2023	**05 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/024617

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2006-519611 A	31 August 2006	US 2003/0235844 A1 claims 1, 5, paragraph [0114] EP 1601780 B1	
JP 2017-077180 A	27 April 2017	WO 2015/111443 A1 claim 1, paragraphs [0015], [0025], fig. 1	
US 2006/0269932 A1	30 November 2006	WO 2006/065971 A2 claim 1, paragraph [0027]	
JP 2006-507849 A	09 March 2006	US 2004/0166513 A1 whole document EP 1563097 A2 KR 10-2005-0075436 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024617

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/686(2018.01)i
FI: C12Q1/686

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q1/686, C12M, G01N

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2006-519611 A (プライメラ バイオシステムズ インコーポレイテッド) 31.08.2006 (2006-08-31) 請求項1,5, 段落0108	1-17
Y	請求項1	1-17
Y	JP 2017-077180 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 27.04.2017 (2017-04-27) 請求項1, 段落0015,0025, 図1	1-17
Y	US 2006/0269932 A1 (PRIMERA BIOSYSTEMS, INC.) 30.11.2006 (2006-11-30) Claim 1, Paragraph 0027	1-17
A	JP 2006-507849 A (プリメラ バイオシステムズ) 09.03.2006 (2006-03-09) 全文、全図	1-17

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
18.08.2023	05.09.2023

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

大西　隆史 4N 1149

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/024617

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2006-519611 A	31.08.2006	US 2003/0235844 A1 Claims 1,5, Paragraphs 0114 EP 1601780 B1	
JP 2017-077180 A	27.04.2017	WO 2015/111443 A1 請求項1, 段落0015,0025, 図1	
US 2006/0269932 A1	30.11.2006	WO 2006/065971 A2 Claim 1, Paragraph 0027	
JP 2006-507849 A	09.03.2006	US 2004/0166513 A1 Whole Document EP 1563097 A2 KR 10-2005-0075436 A	