

(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
2016年7月21日(21.07.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/113801 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) G01N 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/006236
- (22) 国際出願日: 2015年12月15日(15.12.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-004833 2015年1月14日(14.01.2015) JP
- (71) 出願人: セイコーエプソン株式会社 (SEIKO EPSON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1630811 東京都新宿区西新宿二丁目4番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 上原 雅行 (UEHARA, Masayuki); 〒3928502 長野県諏訪市大和3丁目3番5号セイコーエプソン株式会社内 Nagano (JP).
- (74) 代理人: 渡辺 和昭, 外 (WATANABE, Kazuaki et al.); 〒3998702 長野県松本市寿小赤2070セイ

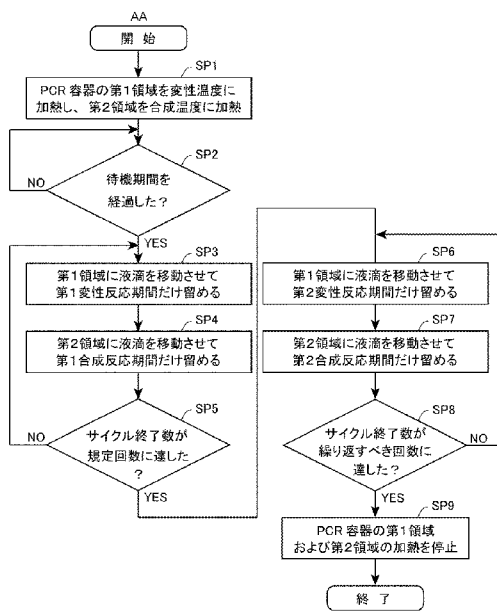
コーエプソン株式会社 知的財産本部内 Nagano (JP).

- (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD AND NUCLEIC ACID AMPLIFICATION DEVICE

(54) 発明の名称: 核酸増幅方法および核酸増幅装置



SP1 Heat first area of PCR container to denaturation temperature and heat second area to synthesis temperature
SP2 Does the standby time lapse?
SP3 Move liquid drops to first area and hold therein for first denaturation reaction time
SP4 Move liquid drops to second area and hold therein for first synthesis reaction time
SP5 Does the number of finished cycles reach a preset number?
SP6 Move liquid drops to first area and hold therein for second denaturation reaction time
SP7 Move liquid drops to second area and hold therein for second synthesis reaction time
SP8 Does the number of finished cycles reach required repetition number?
SP9 Stop heating of first and second areas of PCR container
AA Start
BB End

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a nucleic acid amplification method, whereby a PCR product can be produced in a shortened time while suppressing a lowering in amplification efficiency, and a nucleic acid amplification device. The method according to the present invention comprises: a step for heating a first area of a container, said container containing a target nucleic acid and liquid drops containing a sample required for amplifying the target nucleic acid, to the denaturation temperature of the target nucleic acid, and heating a second area, said second area being different from the first area, to the synthesis temperature of the target nucleic acid; and an amplification step for repeating a plurality of cycles, each cycle comprising a denaturation stage for moving the liquid drops contained in the container to the first area and holding therein and a synthesis stage for moving the liquid drops to the second area and holding therein. In the amplification step, some of the cycles are conducted in a shortened time compared with other cycles.

(57) 要約: 本発明は、増幅効率が低減されることを抑制しつつPCR産物の生成時間を短縮し得る核酸増幅方法および増幅核酸装置を提供することを目的とする。本発明は、標的核酸および標的核酸の増幅に要する試料を含む液滴を収容する容器の第1領域を標的核酸の変性温度に加熱し、当該第1領域とは異なる第2領域を標的核酸の合成温度に加熱するステップと、容器に収容される液滴を第1領域に移動させて留める変性段階、および、当該液滴を第2領域に移動させて留める合成段階を経るサイクルを複数回繰り返す増幅ステップとを備える。この増幅ステップでは、複数回のサイクルのうち一部のサイクルの期間が他のサイクルの期間よりも短くされる。

WO 2016/113801 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：核酸増幅方法および核酸増幅装置

技術分野

[0001] 本発明は核酸増幅方法および核酸増幅装置に関する。

背景技術

[0002] PCR (polymerase chain reaction) 法は、DNA (deoxyribonucleic acid) などの核酸における鎖長の違いなどを要因としてその核酸の変性やアニーリングの違いが生じることを利用し、当該核酸に対して温度変化を繰り返し与えることで核酸を増幅する手法である。

[0003] このようなPCR法を用いた核酸増幅装置として、下記特許文献1のPCR装置が本出願人により提案されている（例えば下記特許文献1参照）。下記特許文献1のPCR装置に装着されるバイオチップには、標的核酸などが含まれる反応液が移動する流路が形成され、その流路には反応液が収容されるとともに、当該反応液よりも比重が小さく反応液とは混和しない液体が充填されている。

[0004] PCR装置には、バイオチップが装着される装着部にそのバイオチップを装着した場合において、当該バイオチップに形成される流路の第1領域を加熱する加熱部と、当該第1領域と異なる温度で第2領域を加熱する加熱部が備えられる。また、PCR装置には、装着部および加熱部の配置を、第1の配置と第2の配置との間で切替える駆動機構が備えられる。この駆動機構によって、装着部に装着されるバイオチップの反応液は、互いに異なる温度に加熱される第1の領域と第2の領域との相互に移動される。このような下記特許文献1のPCR装置によれば、バイオチップ全体の温度を互いに異なる温度に切り替える場合に比べると、増幅反応期間を短縮できるというものである。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2012-115208号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ところで、上述のPCR装置におけるPCR産物の生成時間をより一段と早めるべき要請がある。しかしながら、増幅反応期間（サイクルタイム）を短くし過ぎると増幅効率が著しく低減することが懸念される。

[0007] そこで本発明は、増幅効率が低減されることを抑制しつつPCR産物の生成時間を短縮し得る核酸増幅方法および増幅核酸装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上記目的を達成するため本発明の核酸増幅方法は、標的核酸および前記標的核酸の増幅に要する試料を含む液滴を収容する容器の第1領域を前記標的核酸の変性温度に加熱するとともに、前記第1領域とは独立した第2領域を前記標的核酸の合成温度に加熱する加熱ステップと、前記容器に収容される前記液滴を前記第1領域に移動させて留める変性段階、および、当該液滴を前記第2領域に移動させて留める合成段階を経るサイクルを複数回繰り返す増幅ステップと、を備え、前記増幅ステップでは、複数回の前記サイクルのうち一部のサイクルの期間が他のサイクルの期間よりも短くされることを特徴とする。

[0009] また、本発明の核酸増幅装置は、標的核酸および前記標的核酸の増幅に要する試料を含む液滴を収容する容器が装着される装着部と、前記装着部に装着される前記容器における第1領域を前記標的核酸の変性温度に加熱するとともに、前記第1領域とは独立した第2領域を前記標的核酸の合成温度に加熱するヒーターと、前記装着部に装着される前記容器と前記ヒーターとの相対位置を変えずに、前記第1領域から前記第2領域または前記第2領域から前記第1領域に前記液滴を移動させる移動機構と、前記第1領域に前記液滴を留める変性段階、および、前記第2領域に前記液滴を留める合成段階を経るサイクルを複数回繰り返すように、前記移動機構を制御する制御部と、を

備え、前記制御部は、複数回の前記サイクルのうち一部のサイクルの期間を他のサイクルの期間よりも短くすることを特徴とする。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]カートリッジの断面を示す図である。
- [図2]カートリッジ本体に装着される前のタンクの様子を示す図である。
- [図3]タンクに検体が導入される様子を示す図である。
- [図4]外部から押し込まれる前後のカートリッジの様子を示す図である。
- [図5]カートリッジにおけるPCR容器に着目した図である。
- [図6]核酸増幅装置のブロック図である。
- [図7]回転機構の様子を示す図である。
- [図8]カートリッジが装着部に装着された様子を示す図である。
- [図9]熱サイクル処理の様子を示す図である。
- [図10]液滴の温度推移を模式的に示した図である。
- [図11]制御部の熱サイクル処理手順を示すフローチャートである。
- [図12]第2実施形態における液滴の温度推移を模式的に示した図である。
- [図13]実施形態以外の液滴の温度推移（１）を模式的に示した図である。
- [図14]実施形態以外の液滴の温度推移（２）を模式的に示した図である。

発明を実施するための形態

- [0011] 以下、本発明を実施するための形態が添付図面を用いて例示する。以下に例示する実施形態は、本発明の理解を容易にするためのものであり、本発明を限定して解釈するためのものではない。本発明は、その趣旨を逸脱することなく、変更、改良することができる。

[0012] （１）第１実施形態

第１実施形態として、まず核酸増幅装置に装着されるカートリッジを説明した後に、当該核酸増幅装置およびその方法を説明する。

[0013] ===カートリッジ===

図１は、カートリッジ１の断面を示す図である。図１に示すように、カートリッジ１は、タンク３、アダプター５およびカートリッジ本体９を有し、

当該タンク 3 とカートリッジ本体 9 とはアダプター 5 によって着脱自在に構成される。

[0014] <タンク>

図 2 は、カートリッジ本体 9 に装着される前のタンク 3 の様子を示す図である。図 2 に示すように、タンク 3 は、検体が導入される容器である。このタンク 3 の所定部位には開口が形成され、当該開口には封止部材 3 A が設けられている。

[0015] タンク 3 内には、ヒト・細菌などの生物由来の細胞あるいはウイルスの核酸を抽出するための溶解吸着液 4 1 と、当該核酸に対して結合性を有する固相担体である磁気ビーズ 7 とが収容される。

[0016] 溶解吸着液 4 1 は、緩衝液であってもよいが、pH 6～8 の中性であることが好ましい。この溶解吸着液 4 1 にはカオトロピック剤が含有される。カオトロピック剤は、水溶液中でカオトロピックイオン（イオン半径の大きな 1 価の陰イオン）を生じ、疎水性分子の水溶性を増加させる作用を有しており、核酸の磁気ビーズ 7 への吸着に寄与するものであれば、特に限定されない。具体例として、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、過塩素酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0017] また、溶解吸着液 4 1 には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で界面活性剤が含有されていてもよい。この界面活性剤としては、一般に細胞などからの核酸抽出に使用されるものであれば特に限定されない。具体例として、T r i t o n - X などのトリトン系界面活性剤、T w e e n 2 0 などの非イオン性界面活性剤、N - ラウロイルサルコシンナトリウム（S D S）などの陰イオン性界面活性剤が挙げられる。さらに、溶解吸着液 4 1 には、2 -メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトールなどの還元剤が含有されていてもよい。

[0018] なお、溶解吸着液 4 1 の組成の一例として、5 M グアニジンチオシアン酸塩、2 % T r i t o n X - 1 0 0、5 0 m M T r i s - H C l（pH 7. 2）が挙げられる。

[0019] 図3は、タンク3に検体が導入される様子を示す図である。図3に示すように、タンク3に検体を導入する場合、タンク3から封止部材3Aが取り除かれてタンク3の開口が開かれ、綿棒などの採取具によって採取された検体がタンク3の開口からタンク3内に導入される。

[0020] この検体に例えばウイルスが含まれている場合、そのウイルスのエンベロープやカプシドが溶解吸着液41により溶解され、ウイルス核酸が遊離して磁気ビーズ7の表面に吸着することになる。

[0021] タンク3の開口にはアダプター5が嵌合され、そのアダプター5を介してタンク3の開口がカートリッジ本体9と連通される（図1参照）。

[0022] <カートリッジ本体>

図4は、プランジャー10がシリンジ21に押し込まれる前後のカートリッジ1の様子を示す図である。具体的に図4の（A）は、プランジャー10が押し込まれる前のカートリッジ1の様子を示し、図4の（B）は、プランジャー10が押し込まれた後のカートリッジ1の様子を示している。

[0023] 図4の（A）および（B）に示すように、カートリッジ本体9は、プランジャー10と、チューブ20と、PCR容器30とを有する。

[0024] <<プランジャー>>

プランジャー10は、シリンジとして機能するチューブ20内の所定量の液体をチューブ20側の末端からPCR容器30へ押し出す押子であり、筒状部11および棒状部12を有する。この筒状部11および棒状部12は、一体として形成されてもよいし、別体として形成されてもよい。

[0025] 筒状部11は、アダプター5を介してタンク3の開口と連通される部位である。この筒状部11のタンク3側の開口周囲には、当該開口の外側に向かって筒状部11から外側に突出するフランジ状の取付台11Aが形成されている。取付台11Aに装着されるアダプター5が筒状部11の開口に嵌合されることで、当該筒状部11の開口とタンク3の開口とが連通される。なお、取付台11Aは、核酸増幅装置によって押される押圧部位になっている。

[0026] 筒状部11のチューブ20側の端部は、チューブ20の上シリンジ21の

内壁に嵌合しており、当該上シリンジ 2 1 の内壁に接しながら上シリンジ 2 1 に沿ってスライド自在となっている。なお、プランジャー 1 0 の取付台 1 1 A とチューブ 2 0 の上縁との間隔が、プランジャー 1 0 のスライド長になる。

[0027] 棒状部 1 2 は、筒状部 1 1 のチューブ 2 0 側端部の内壁から突出するリブ 1 3 によって支持されている。この棒状部 1 2 のチューブ 2 0 側の端部は、プランジャー 1 0 が押されていない初期状態では、上シリンジ 2 1 の内部に位置し、下シリンジ 2 2 から離れている（図 4 の（A）参照）。一方、棒状部 1 2 のチューブ 2 0 側の端部は、プランジャー 1 0 が押された場合、チューブ 2 0 の下シリンジ 2 2 に挿入され、当該下シリンジ 2 2 に内壁に接した状態で下シリンジ 2 2 に沿ってスライドする（図 4 の（B）参照）。

[0028] 棒状部 1 2 のチューブ 2 0 側の先端にはシール 1 2 A が形成されており、当該シール 1 2 A によってチューブ 2 0 内の液体がプランジャー 1 0 へ逆流することが防止される。なお、シール 1 2 A が下シリンジ 2 2 内でスライドした体積相当分だけ、チューブ 2 0 内の液体が下流側に押し出される。

[0029] このようなプランジャー 1 0 の内部には、他の溶液とは相分離するオイル 4 2 と、当該オイル 4 2 よりも比重が大きい第 1 洗浄液 4 3 とが収容されている。プランジャー 1 0 内のオイル 4 2 は第 1 洗浄液 4 3 よりも比重が小さい。このため、プランジャー 1 0 の取付台 1 1 A を上にしてカートリッジ本体 9 が立てられた場合には、図 4 の（A）に示すように、タンク 3 内の溶解吸着液 4 1 とカートリッジ本体 9 の第 1 洗浄液 4 3 との間にオイル 4 2 が配置される。

[0030] なお、オイル 4 2 としては例えば 2 C S シリコンオイルが挙げられ、第 1 洗浄液 4 3 としては例えば 8 M グアニジン塩酸塩、0.7% Triton X-100 が挙げられる。また、上述のカオトロピック剤が第 1 洗浄液 4 3 に含有された場合、磁気ビーズ 7 に吸着した核酸の吸着状態を維持または強化させつつ洗浄することが可能となる。

[0031] 《チューブ》

チューブ20は、上シリンジ21、下シリンジ22およびキャピラリー23を有しており、各部の内径がプランジャー10からPCR容器30に向かって段階的に小さくなっている。

[0032] 上シリンジ21は、プランジャー10の筒状部11に対するシリンジとして機能する筒状部位であり、当該上シリンジ21の内壁には、上述したようにプランジャー10の筒状部11がスライド自在に接している。

[0033] 下シリンジ22は、プランジャー10の棒状部12に対するシリンジとして機能する筒状部位であり、当該下シリンジ22の内壁には、上述したようにプランジャー10の棒状部12のシール12Aがスライド自在に嵌合される。

[0034] キャピラリー23は、複数種類の液体を有する細管部位である。このキャピラリー23のPCR30側の端部はPCR容器30に挿入され、当該挿入部分の先端はテーパ状に細くなっている。すなわち、キャピラリー23の末端の内径（キャピラリー23の開口径）は、当該末端以外のキャピラリー23の内径よりも小さくなっている。

[0035] このキャピラリー23内には、第1オイルプラグ44、洗浄液プラグ45、第2オイルプラグ46、反応液プラグ47、第3オイルプラグ48がプランジャー10側から順次配置されている。

[0036] 「プラグ」とは、キャピラリー23内において特定の一区画を占める液体を意味し、図4の例では柱状に保持されている。プラグの中やプラグの間には気泡がないことが好ましい。

[0037] 第1オイルプラグ44、第2オイルプラグ46および第3オイルプラグ48は、その両側の溶液プラグが互いに混合することを防止する機能を有する。これらオイルプラグとしては例えば2CSシリコーンオイルが挙げられ、洗浄液プラグ45としては例えば8Mグアニジン塩酸塩、0.7% Triton X-100が挙げられる。なお、PCR容器30にカオトロピック剤が移行することを抑止するため、洗浄液プラグ45にはカオトロピック剤が含有されていないことが望ましい。

- [0038] 反応液プラグ47には、標的核酸の増幅反応に要する試料が含有される。
この試料としては、溶出液、DNAポリメラーゼ、プライマー、dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate)、バッファーなどが挙げられる。
- [0039] 溶出液は、磁気ビーズ7に吸着される核酸をその磁気ビーズ7から遊離させて液中に溶出させる液体である。磁気ビーズ7から遊離されて液中に溶出される核酸は鋳型核酸であり、その鋳型核酸において増幅させるべき核酸断片が標的核酸である。この標的核酸は、DNA (deoxyribonucleic acid)断片、cDNA (complementary DNA)断片又はPNA (peptide nucleic acid)などである。なお、タンク3に收容される磁気ビーズ7を反応液プラグ47にまで移動させる手法については後述する。
- [0040] ところで、磁気ビーズ7から遊離される核酸がRNA (ribonucleic acid)の場合、そのRNAのcDNAを得るため、逆転写酵素や逆転写酵素用プライマーなども、標的核酸の増幅反応に要する試料として含有される。また、リアルタイムPCR法を用いて標的核酸の増幅を定量する場合、TaqManプローブや、Molecular Beacon、サイクリングプローブなどの蛍光色素が結合するプローブやSYBRグリーンなどのインターカラー用蛍光色素も、標的核酸の増幅反応に要する試料として含有される。
- [0041] このようなチューブ20の外壁面には、核酸増幅装置の所定部位にカートリッジ1を装着するための固定爪25およびガイド板26が形成される。
- [0042] ≪PCR容器≫
図5は、カートリッジにおけるPCR容器に着目した図である。具体的に図5の(A)は外部からプランジャー10が押される前のPCR容器の様子を示し、図5の(B)は外部からプランジャー10が押された後のPCR容器の様子を示している。
- [0043] PCR容器30は、チューブ20から押し出される液滴47Aを收容する容器であり、シール形成部31および流路形成部35を有する。液滴47Aは、キャピラリー23内の反応液プラグ47がチューブ20から押し出されるときに得られる。このため、液滴47Aの組成は、反応液プラグ47の組

成と同じである。すなわち、液滴４７Ａには、磁気ビーズ７から遊離した鋳型核酸と、その鋳型核酸における標的核酸の増幅反応に要する試料とが含有されている。

[0044] シール形成部３１は、チューブ２０が挿入されている部位であり、オイル受容部３２および段差部３３を有する。オイル受容部３２は、筒状の部位であり、当該オイル受容部３２の下流側に位置する流路形成部３５に充填されるオイル３７を受容するリザーバーとして機能する。オイル受容部３２の内壁と、チューブ２０のキャピラリー２３の外壁との間には隙間があり、この隙間が、流路形成部３５から溢れるオイル３７を受容するオイル受容空間３２Ａとなる。オイル受容空間３２Ａの体積は、プランジャー１０のシール１２Ａがチューブ２０の下シリンジ２２でスライドする体積よりも大きい。

[0045] オイル受容部３２の上流側の内壁はチューブ２０の環状の凸部と接触することによって、上シール部３４Ａが形成される。上シール部３４Ａは、空気の通過は許容しつつ、オイル受容空間３２Ａのオイル３７が外部に漏洩することを抑制するシールである。上シール部３４Ａは、オイルの表面張力によってオイルが漏洩しない程度に、通気口が形成されている。上シール部３４Ａの通気口は、チューブ２０の凸部とオイル受容部３２の内壁との間の隙間でもよいし、チューブ２０の凸部に形成した穴、溝または切欠でもよい。また、オイルを吸収するオイル吸収材によって上シール部３４Ａを形成してもよい。

[0046] 段差部３３は、オイル受容部３２の下流側に設けられた段差のある部位である。段差部３３の下流部の内径は、オイル受容部３２の内径よりも小さい。段差部３３の内壁は、チューブ２０のキャピラリー２３の下流側の外壁と接触している。段差部３３の内壁とチューブ２０の外壁が接触することによって、下シール部３４Ｂが形成される。下シール部３４Ｂは、流路形成部３５のオイルがオイル受容空間３２Ａへ流れることを許容しつつ、その流れに抵抗するシールである。下シール部３４Ｂでの圧力損失によって、流路形成部３５の圧力が外気圧よりも高くなるので、流路形成部３５のオイル３７が

加熱されても、そのオイル 37 に気泡が発生しにくい。

[0047] 流路形成部 35 は、管状の部位であり、液滴 47A が移動する流路となる部位である。この流路形成部 35 にはオイル 37 が充填されている。流路形成部 35 の上流側はチューブ 20 の末端によって閉じられており、流路形成部 35 に向かってチューブ 20 の末端が開口している。流路形成部 35 の内径は、チューブ 20 のキャピラリー 23 の内径よりも大きく、液滴 47A の外径よりも大きい。流路形成部 35 の内壁は、液滴 47A が付着しない程度の撥水性を有することが望ましい。

[0048] 上述したように、プランジャー 10 が押されていない初期状態では、当該プランジャー 10 の棒状部 12 がチューブ 20 の上シリンジ 21 の内部に位置している（図 4 の（A）参照）。このため、チューブ 20 内の液体が PCR 容器 30 に押し出されることはない。なお、この初期状態では、オイル 37 の界面は、オイル受容空間 32A の比較的下流側に位置している（図 5 の（A）参照）。

[0049] 一方、プランジャー 10 が押されると、当該プランジャー 10 の棒状部 12 がチューブ 20 の下シリンジ 22 内にスライドするため（図 4 の（B）参照）、チューブ 20 内の液体が PCR 容器 30 に押し出される。

[0050] 具体的には、まず、チューブ 20 の第 3 オイルプラグ 48 が流路形成部 35 に流入し、流入分のオイルが流路形成部 35 からオイル受容空間 32A に流れ込み、オイル受容空間 32A のオイル界面が上昇する。このとき、下シール部 34B の圧力損失によって、流路形成部 35 の液体の圧力が高くなる。第 3 オイルプラグ 48 がチューブ 20 から押し出された後、反応液プラグ 47 がチューブ 20 から流路形成部 35 に流入する。流路形成部 35 の内径がキャピラリー 23 の内径よりも大きいため、チューブ 20 内で柱状の反応液プラグ 47 は、流路形成部 35 のオイル中で液滴 47A となる（図 5 の（B）参照）。この液滴 47A は、オイル 37 よりも比重が大きいため、流路形成部 35 を沈降する。

[0051] ===核酸増幅装置===

図6は、核酸増幅装置のブロック図である。図6に示すように、核酸増幅装置50は、回転機構60、磁石移動機構70、押圧機構80、蛍光測定器55および制御部90を有する。

[0052] <回転機構>

図7は、回転機構の様子を示す図である。図7の(A)は核酸増幅装置50の内部構成の斜視図であり、図7の(B)は核酸増幅装置50の主要構成の側面図である。以下の核酸増幅装置50の説明では、図に示すように、上下、前後、左右を定義する。すなわち、核酸増幅装置50のベース51を水平に設置したときの鉛直方向を「上下方向」とし、重力方向に従って「上」と「下」とを定義する。また、カートリッジ1の回転軸の軸方向を「左右方向」とし、上下方向及び左右方向に垂直な方向を「前後方向」とする。カートリッジ1の回転軸からみてカートリッジ挿入口53の側を「後」とし、逆側を「前」とする。前側からみたときの左右方向の右側を「右」、左側を「左」とする。

[0053] 図7に示すように、回転機構60は、回転体61および回転用モーター66を有する。回転体61には、カートリッジ1が装着される装着部62と、ヒーター65とが設けられている。回転体61は、カートリッジ1とヒーター65との相対位置を変えずに、ベース51に固定された支持台52に支持される回転軸を中心として回転する。

[0054] 回転用モーター66は、回転体61を回転させる動力源であり、制御部90からの指示にしたがって、カートリッジ1が上下反転するように回転体61を回転させる。

[0055] 図8は、カートリッジが装着部に装着された様子を示す図である。図8に示すように、装着部62は、カートリッジ1のチューブ20を固定する固定部63と、PCR容器30を固定する挿入穴64Aとを有する。

[0056] 挿入穴64Aは、ヒーター65に形成されている。本実施形態のヒーター65は、磁気ビーズ7から遊離する核酸の遊離反応が進行する温度に加熱するための溶出用ヒーター65Aと、標的核酸の変性反応が進行する温度に加

熱するための高温側ヒーター 65 B と、標的核酸の合成反応（アニーリング反応および伸長反応）が進行する温度に加熱するための低温側ヒーター 65 C とを有する。挿入穴 64 A は、これら溶出用ヒーター 65 A、高温側ヒーター 65 B および低温側ヒーター 65 C を貫通している。

[0057] 固定部 63 は、挿入穴 64 A の開口脇に互いに対向して設けられる部材である。この固定部 63 には、カートリッジ 1 のガイド板 26 を前後方向に拘束しながら挿入穴 64 A にカートリッジ 1 を案内するガイドレール 63 A が設けられている。

[0058] このような装着部 62 では、ガイドレール 63 A によって案内されるカートリッジ 1 の PCR 容器 30 が挿入穴 64 A に挿入されると、当該カートリッジ 1 の固定爪 25 が固定部 63 のノッチ部位に引っ掛かることによって、カートリッジ 1 が装着される。ここでは、ヒーターの一部が装着部 62 を兼ねていることになるが、装着部 62 とヒーターが別々であってもよい。また、装着部 62 は、溶出用ヒーター 65 A を介して回転体 61 に間接的に固定されているが、回転体 61 に直接設けられてもよい。また、装着部 62 が装着可能なカートリッジ 1 の数は、1 つに限られず、複数でもよい。

[0059] カートリッジ 1 が装着部 62 に装着された場合、そのカートリッジ 1 の反応液プラグ 47 が溶出用ヒーター 65 A に囲まれる。溶出用ヒーター 65 A は、反応液プラグ 47 を例えば 50℃ に加熱する。これによりタンク 3 から反応液プラグ 47 に移動された磁気ビーズ 7 から核酸が遊離することが促進される。

[0060] また、カートリッジ 1 が装着部 62 に装着された場合、そのカートリッジ 1 の PCR 容器 30 における流路形成部 35 の一端側となる第 1 領域 36 A が高温側ヒーター 65 B に囲まれる。高温側ヒーター 65 B は、第 1 領域 36 A を例えば 95～100℃ に加熱する。

[0061] さらに、カートリッジ 1 が装着部 62 に装着された場合、そのカートリッジ 1 の PCR 容器 30 における流路形成部 35 の他端側となる第 2 領域 36 B が低温側ヒーター 65 C に囲まれる。低温側ヒーター 65 C は、第 2 領域

36Bを例えば50～75℃に加熱する。

[0062] このように標的核酸の変性反応が進行する温度にPCR容器30の第1領域36Aが加熱され、当該標的核酸の合成反応が進行する温度にPCR容器30の第2領域36Bが加熱されることにより、流路形成部35に充填されるオイル37には温度勾配が形成される。

[0063] なお、高温側ヒーター65Bと低温側ヒーター65Cとの間には、高温側ヒーター65Bと低温側ヒーター65Cとの間の熱伝導を抑制するスペーサー65Dが配置されている。このスペーサー65Dには、高温側ヒーター65Bおよび低温側ヒーター65Cの挿入穴64Aの長手方向に沿った位置に貫通孔が形成され、挿入穴64Aに対してカートリッジ1のPCR容器30の挿入を妨げることが防止される。

[0064] <磁石移動機構>

磁石移動機構70は、図7の(B)に示すように、一対の磁石71と、それら一対の磁石71を保持するアーム72と、そのアーム72を昇降させる昇降部73とを有し、制御部90からの指示にしたがって駆動する。

[0065] すなわち、磁石移動機構70は、装着部62に装着されたカートリッジ1のタンク3内の磁気ビーズ7を磁石71に引き寄せ、当該磁気ビーズ7をカートリッジ本体9に沿って反応液プラグ47にまで移動させる。

[0066] この磁気ビーズ7に吸着する核酸が反応液プラグ47において磁気ビーズ7から遊離された場合、磁石移動機構70は、反応液プラグ47内の磁気ビーズ7をカートリッジ本体9に沿ってタンク3にまで戻す。

[0067] <押圧機構>

押圧機構80は、図7の(B)に示すように、ロッド駆動部81と、カートリッジ1におけるプランジャー10の取付台11Aを押すロッド82とを有する。このロッド82が取付台11Aを押す方向は、上下方向ではなく、上下方向に対して45度傾いている。このため、押圧機構80によってプランジャー10を押す場合、回転体61が45度回転され、カートリッジ1の長手方向がロッド82の移動方向に合わせられる。

[0068] この状態においてロッド駆動部 8 1 は、制御部 9 0 からの指示にしたがって、カートリッジ 1 の長手方向に沿ってロッド 8 2 を取付台 1 1 A に押す。これによりカートリッジ 1 の反応液プラグ 4 7 が P C R 容器 3 0 に液滴 4 7 A として収容される。

[0069] なお、ロッド 8 2 によってプランジャー 1 0 が押される方向が上下方向に対して 4 5 度傾いているため、昇降部 7 3 と干渉しないように押圧機構 8 0 を配置することが容易になる。また、ロッド 8 2 によってプランジャー 1 0 が押される方向が上下方向に対して 4 5 度傾いているため、核酸増幅装置 5 0 の上下方向の寸法を小さくすることができる。

[0070] <蛍光測定器>

蛍光測定器 5 5 は、P C R 容器 3 0 に収容される液滴 4 7 A の蛍光強度を測定する測定器であり、図 7 の (B) に示すように、装着部 6 2 に装着されるカートリッジ 1 の末端に対して所定距離を隔てて対向する状態で配置される。

[0071] 蛍光測定器 5 5 は、制御部 9 0 からの測定指示に応じて液滴 4 7 A に含有される蛍光色素に対応する励起光を照射し、当該液滴 4 7 A で発光する蛍光強度を測定する。また蛍光測定器 5 5 は、測定結果として得られる蛍光強度を示すデータを制御部 9 0 に与える。なお、蛍光測定器 5 5 は、1 つの蛍光色素に対応する蛍光強度を測定するものであっても、複数の蛍光色素に対応する蛍光強度を測定するものであってもよい。

[0072] <制御部>

制御部 9 0 は、図 6 に示すように、記憶部 9 1 を有し、当該制御部 9 0 には入力部 9 2 および表示部 9 3 などが接続される。記憶部 9 1 には、プログラムを格納する領域と、入力部 9 2 から入力される設定データおよび核酸増幅処理によって得られるデータなどの各種のデータを格納する領域と、当該プログラムやデータを展開する領域とが含まれる。

[0073] 制御部 9 0 は、記憶部 9 1 に格納されるプログラムおよび設定データに基づいて回転機構 6 0、磁石移動機構 7 0、押圧機構 8 0 および蛍光測定器 5

5を適宜制御し、核酸溶出処理、液滴形成処理、熱サイクル処理または増幅解析処理を適宜実行する。

[0074] <<核酸溶出処理>>

核酸溶出処理は、例えば、装着部62の所定部位に設けられる図示しないセンサに基づいてカートリッジ1が装着されたことを制御部90が検知した後に実行される。

[0075] すなわち、制御部90は、昇降部73を制御し、装着部62に装着されたカートリッジ1のタンク3から所定距離隔てた退避位置に配置される一対の磁石71を、当該タンク3の外側面の周囲に配置させる。これによりタンク3内の磁気ビーズ7は磁石71に引き寄せられる。

[0076] 次に制御部90は、磁石71の移動に磁気ビーズ7が追従できる程度の速度で所定期間だけ昇降部73を下降させ、反応液プラグ47が配置されるチューブ20の外側面の周囲に一対の磁石71を配置させる。これにより磁気ビーズ7は反応液プラグ47内に導入される。

[0077] また制御部90は、反応液プラグ47内に磁気ビーズ7が導入される前の時点から所定期間だけ溶出用ヒーター65Aを駆動し、当該反応液プラグ47を例えば50℃に加熱する。これにより磁気ビーズ7に吸着される核酸はその磁気ビーズ7から遊離する。この核酸がRNAの場合、磁気ビーズ7から遊離した後に逆転写反応が進行し、cDNAが得られる。

[0078] 制御部90は、磁気ビーズ7を反応液プラグ47に停滞させるべきとして設定される期間が経過すると、磁石71の移動に磁気ビーズ7が追従できる程度の速度で所定期間だけ昇降部73を上昇させ、磁気ビーズ7をタンク3にまで戻す。

[0079] その後、制御部90は、磁気ビーズ7が磁石71の移動に追従できない程度の速度に切り替え、上述の退避位置にまで磁石71を戻す。これによりタンク3にまで戻された磁気ビーズ7が磁石71から離れ、当該タンク3内に停滞する。こうして、核酸溶出処理が終了する。

[0080] なお、磁気ビーズ7が上シリンジ21にまで移動されていれば、プランジ

ャー 10 を押したときに磁気ビーズ 7 が PCR 容器 30 に導入されることはない。したがって、上シリンジ 21 が配置されるチューブ 20 の外側面の周囲に磁石 71 が配置された時点から、磁気ビーズ 7 が磁石 71 の移動に追従できない程度の速度に制御部 90 が速度を変更して、上シリンジ 21 で磁気ビーズ 7 が磁石 71 から離れるようにしてもよい。

[0081] 《液滴形成処理》

液滴形成処理は、上述の核酸溶出処理を実行した後に実行される。すなわち、制御部 90 は、回転体 61 を基準位置から 45 度回転させ、カートリッジ 1 の長手方向がロッド 82 の移動方向に合わせられる。

[0082] 次いで制御部 90 は、ロッド駆動部 81 を駆動し、所定の速度で所定の期間だけロッド 82 を基準位置から移動させることで、プランジャー 10 の取付台 11A がチューブ 20 の上縁に接触するまでプランジャー 10 を押す。これによりプランジャー 10 における棒状部 12 のシール 12A がチューブ 20 の下シリンジ 22 に嵌合した後にスライドし（図 2 の（B）参照）、当該シール 12A が下シリンジ 22 内でスライドした体積相当分の液滴 47A が PCR 容器 30 の流路形成部 35 に押し出される（図 5 の（B）参照）。

[0083] その後、制御部 90 は、ロッド 82 および回転体 61 を元の基準位置にまで戻す。こうして、液滴形成処理が終了する。

[0084] 《熱サイクル処理》

図 9 は、熱サイクル処理の様子を示す図である。具体的に図 9 の（A）および（B）は標的核酸の変性段階の様子を示し、図 9 の（C）および（D）は標的核酸の合成段階の様子を示す図である。

[0085] 熱サイクル処理は、上述の液滴形成処理を実行した後に実行される。すなわち、制御部 90 は、回転体 61 に設けられた高温側ヒーター 65B を駆動し、PCR 容器 30 の第 1 領域 36A を、標的核酸の変性反応が進行する温度に加熱する。また、制御部 90 は、回転体 61 に設けられた低温側ヒーター 65C を駆動し、PCR 容器 30 の第 2 領域 36B を、標的核酸の合成反応が進行する温度に加熱する。これにより PCR 容器 30 の流路形成部 35

内のオイル 37 に温度勾配が形成される。

[0086] 高温側ヒーター 65B および低温側ヒーター 65C が駆動されてから、第 1 領域 36A における流路形成部 35 内のオイル 37 が例えば 95℃ に達し、第 2 領域 36B における流路形成部 35 内のオイル 37 が例えば 60℃ に達するまでには所定の期間を要する。この期間に標的核酸の増幅反応は適切に進行しないため、制御部 90 は当該期間を待機期間として待機する。

[0087] このとき、図 9 の (A) に示すように、装着部 62 に装着されたカートリッジ 1 のタンク側が上側に配置され、当該カートリッジ 1 の PCR 容器側が下側に配置される基準位置に回転体 61 が位置している。回転体 61 が基準位置に位置している場合、図 9 の (B) に示すように、液滴 47A は自重により沈降して第 2 領域 36B に留まる。したがって、液滴 47A に含有する標的核酸が 1 回目の変性段階に移行することはない。

[0088] 制御部 90 は、上述の待機期間を経過した場合、回転体 61 を 180 度回転させる。この場合、図 9 の (C) に示すように、装着部 62 に装着されたカートリッジ 1 のタンク側が下側に配置され、当該カートリッジ 1 の PCR 容器側が上側に配置される反転位置に回転体 61 が位置することになる。回転体 61 が反転位置に位置している場合、図 9 の (D) に示すように、液滴 47A は自重により沈降して第 1 領域 36A に移動する。したがって、液滴 47A に含有する標的核酸は変性段階に移行することになる。

[0089] また制御部 90 は、回転体 61 を 180 度回転し終えた時点（回転体 61 を停止した時点）から標的核酸の変性反応に要する変性段階の期間として設定された変性反応期間だけ、回転体 61 を停止させる。これにより液滴 47A に含有する標的核酸の変性反応が進行する。なお、変性反応期間は、少なくとも、回転体 61 の回転により流路形成部 35 の一端から他端にまで液滴 47A が移動する期間よりも長い期間とされる。

[0090] 次いで制御部 90 は、変性反応期間を経過すると、回転体 61 を 180 度回転させて、当該回転体 61 を反転位置から基準位置に切り替え、第 2 領域 36B に液滴 47A を移動させる。これにより液滴 47A に含有する標的核

酸は合成段階に移行することになる。

[0091] また制御部 90 は、回転体 61 を 180 度回転し終えた時点（回転体 61 を停止した）時点から標的核酸の合成反応に要する合成段階の期間として設定された合成反応期間だけ、回転体 61 を停止させる。これにより液滴 47A に含有する標的核酸のアニールリング反応および伸長反応が進行する。なお、合成反応期間は、上述の変性期間と同様に、少なくとも流路形成部 35 の一端から他端にまで液滴 47A が移動する期間よりも長い期間とされる。

[0092] このように制御部 90 は、上述の反転位置と基準位置とを交互に切り替えて、第 1 領域 36A に液滴 47A を移動させて留める変性段階および第 2 領域 36B に液滴 47A を移動させて留める合成段階を経るサイクルを複数回繰り返す。繰り返すべきサイクル数は制御部 90 に設定され、例えば 30 回とされる。

[0093] ところで、本実施形態では、初回から起算して規定回数目となる回の 1 つ後の回以降の各サイクルの期間が、当該初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間よりも短くされる。規定回数は制御部 90 に設定され、例えば 1 回～15 回の範囲内とされる。なお、繰り返すべきサイクル数に対する、短くすべきサイクル数の割合は、50%未満されることが望ましい。

[0094] 図 10 は、液滴の温度推移を模式的に示した図である。なお、図 10 では、便宜上、変性反応期間と合成反応期間との間における液滴 47A の移動期間、および、合成反応期間と変性反応期間との間における液滴 47A の移動期間は省略している。

[0095] 図 10 に示すように、本実施形態では、基準となるサイクルである基準サイクル CS と、基準サイクル CS よりも短いサイクルである短縮サイクル SS とが制御部 90 に設定される。基準サイクル CS は、基準となる変性反応期間である第 1 変性反応期間 PD1 と、基準となる合成反応期間である第 1 合成反応期間 PS1 とで構成される。例えば、第 1 変性反応期間 PD1 は 5 秒～60 秒の範囲内とされ、第 1 合成反応期間 PS1 は 6 秒～60 秒の範

囲内とされる。短縮サイクルＳＳは、第１変性反応期間ＰＤ１よりも短い第２変性反応期間ＰＤ２と、第１合成反応期間ＰＳ１よりも短い第２合成反応期間ＰＳ２とで構成される。例えば、第２変性反応期間ＰＤ２は２秒～５秒の範囲内とされ、第２合成反応期間ＰＳ２は４秒～６秒の範囲内とされる。

[0096] このように制御部９０は、初回から起算して規定回数目となる回まで基準サイクルＣＳを繰り返し、当該回の１つ後の回から最終回まで短縮サイクルＳＳを繰り返すようになっている。

[0097] ≪増幅解析処理≫

増幅解析処理は、熱サイクル処理と同時期に並行して実行される。すなわち、制御部９０は、蛍光測定器５５に対して合成反応期間（第１合成反応期間ＰＳ１および第２合成反応期間ＰＳ２）ごとに測定指示を与え、当該測定指示結果として蛍光測定器５５から与えられる蛍光強度を示すデータを記憶部９１に記憶する。

[0098] なお、図９の（Ａ）および（Ｂ）に示したように、合成反応期間では回転体６１が基準位置にあるため、ＰＣＲ容器３０内の液滴４７ＡはＰＣＲ容器３０の底３５Ａに沈降していく。しかしながら、基準位置になった直後では、液滴４７ＡがＰＣＲ容器３０の底３５Ａに到達していない場合がある。したがって、制御部９０が蛍光測定器５５に対して測定指示を与える時期は、回転体６１を反転位置から基準位置にまで回転し終えた時点から所定時間経過した後であることが望ましい。特に、基準位置から反転位置に回転させる直前であることが望ましい。

[0099] また制御部９０は、入力部９２から入力される命令に応じて、繰り返すべきサイクル数として設定される回数分の蛍光強度を示すデータを記憶部９１から読み出し、当該データに基づいてサイクル数に対する蛍光強度の推移を示す増幅曲線を生成する。そして制御部９０は、増幅曲線を生成した場合、その増幅曲線に基づいて基準の増幅効率に対する良否を判定し、当該判定結果と増幅曲線との双方またはいずれか一方を適宜表示部９３に表示させる。

[0100] ＜熱サイクル処理手順＞

図 1 1 は、制御部の熱サイクル処理手順を示すフローチャートである。図 1 1 に示すように、制御部 9 0 は、核酸溶出処理を実行した以降にステップ S P 1 に進んで、P C R 容器 3 0 における第 1 領域 3 6 A を、標的核酸の変性反応が進行する温度として設定される変性温度に加熱する。また制御部 9 0 は、P C R 容器 3 0 における第 2 領域 3 6 B を、標的核酸の合成反応が進行する温度として設定される合成温度に加熱し、ステップ S P 2 に進む。

[0101] 制御部 9 0 は、ステップ S P 2 では、加熱し始めた時点から加熱対象が目的の温度に達するとして設定される待機期間を経過するまで待機し、当該待機期間を経過した場合にはステップ S P 3 に進む。

[0102] 制御部 9 0 は、ステップ S P 3 では、回転体 6 1 を基準位置から反転位置にまで回転させて P C R 容器 3 0 の変性温度領域（第 1 領域 3 6 A）に液滴 4 7 A を移動させる。次いで制御部 9 0 は、回転体 6 1 を反転位置に位置させた時点から第 1 変性反応期間 P D 1 を経過するまで、回転体 6 1 を停止させ続けて P C R 容器 3 0 の変性温度領域に液滴 4 7 A を留める。制御部 9 0 は、第 1 変性反応期間 P D 1 を経過した場合にはステップ S P 4 に進む。

[0103] 制御部 9 0 は、ステップ S P 4 では、回転体 6 1 を反転位置から基準位置にまで回転させて P C R 容器 3 0 の合成温度領域（第 2 領域 3 6 B）に液滴 4 7 A を移動させる。次いで制御部 9 0 は、回転体 6 1 を基準位置に位置させた時点から第 1 合成反応期間 P S 1 を経過するまで、回転体 6 1 を停止させ続けて P C R 容器 3 0 の合成温度領域に液滴 4 7 A を留める。制御部 9 0 は、第 1 合成反応期間 P S 1 を経過した場合にはステップ S P 5 に進む。

[0104] 制御部 9 0 は、ステップ S P 5 では、サイクル期間を切り替えるべき回数として設定される規定回数にサイクル終了数が至ったかを認識する。ここで、サイクル終了数が規定回数に至っていない場合、制御部 9 0 は、サイクル終了数を 1 回分だけ増加させた後、ステップ S P 3 に戻って上述の処理を繰り返す。一方、サイクル終了数が規定回数に至った場合、制御部 9 0 は、サイクル終了数を 1 回分だけ増加させた後、ステップ S P 6 に進む。

[0105] 制御部 9 0 は、ステップ S P 6 では、回転体 6 1 を基準位置から反転位置

にまで回転させてPCR容器30の変性温度領域（第1領域36A）に液滴47Aを移動させる。次いで制御部90は、回転体61を反転位置に位置させた時点から第2変性反応期間PD2を経過するまで、回転体61を停止させ続けてPCR容器30の変性温度領域に液滴47Aを留める。制御部90は、第2変性反応期間PD2を経過した場合にはステップSP7に進む。

[0106] 制御部90は、ステップSP7では、回転体61を反転位置から基準位置にまで回転させてPCR容器30の合成温度領域（第2領域36B）に液滴47Aを移動させる。次いで制御部90は、回転体61を基準位置に位置させた時点から第2合成反応期間PS2を経過するまで、回転体61を停止させ続けてPCR容器30の合成温度領域に液滴47Aを留める。制御部90は、第2合成反応期間PS2を経過した場合にはステップSP8に進む。

[0107] 制御部90は、ステップSP8では、繰り返すべきサイクル数として設定される回数にサイクル終了数が達したかを認識する。ここで、サイクル終了数が繰り返すべきサイクル数に達していない場合、制御部90は、サイクル終了数を1回分だけ増加させた後、ステップSP6に戻って上述の処理を繰り返す。一方、サイクル終了数が繰り返すべきサイクル数に達した場合、制御部90は、ステップSP9に進む。

[0108] 制御部90は、ステップSP9では、PCR容器30における第1領域36Aおよび第2領域36Bの加熱を停止した後、熱サイクル処理を終了する。

[0109] <小括>

以上のとおり、本実施形態では、PCR容器30における第1領域36Aが標的核酸の変性温度に加熱され、当該第1領域36Aとは独立した第2領域36Bが標的核酸の合成温度に加熱される。

[0110] また、PCR容器30内の液滴47Aを変性温度領域（第1領域36A）に移動させて留める変性段階、および、当該47Aを合成温度領域（第2領域36B）に移動させて留める合成段階を経るサイクルが複数回繰り返される。

[0111] ここで、初回から起算して規定回数目となる回の1つ後の回以降の各サイクルの期間が、当該初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間よりも短くされる。すなわち、複数回のサイクルのうち最初の数サイクルは基準サイクルCSとされ、当該数サイクルを経た以降の各サイクルは短縮サイクルSSとされる。このため、複数回のサイクルのすべてが基準サイクルCSとされる場合に比べると、最初の数サイクルを経た以降の各サイクルの期間が短縮される。

[0112] PCR法では、増幅反応が生じ難い要因として、鑄型として採取される核酸の鎖長が長く変性し難い場合、当該核酸においてスーパーコイル部位が存在して変性し難い場合、あるいは、当該核酸の合成反応で伸長鎖が完全に伸びきらずに終了する場合などがある。このような場合、標的核酸以外の増幅サイクルが進んで目的とするPCR産物の増幅効率が著しく低減することになる。

[0113] 本実施形態では、複数回のサイクルのうち最初の数サイクルは基準サイクルCSとされ、当該数サイクルを経た以降の各サイクルは短縮サイクルSSとされる。このため、増幅反応が生じ難い要因が増幅対象の標的核酸に存在していたとしても、最初の数サイクルをその後のサイクルよりも長めに確保しない場合に比べると、鎖長が短く線形で変性し易いPCR産物や完全長のPCR産物が獲得し易くその割合が多くなる。したがって、最初の数サイクルを経た以降の各サイクルをその数サイクルの期間よりも短くしても、少なくとも最低限確保すべき増幅効率が維持される。

[0114] このように本実施形態によれば、ある一定の増幅効率を維持しながらも増幅反応期間（サイクルタイム）を短縮することができ、この結果、増幅効率が低減することを抑制しつつPCR産物の生成時間を短縮することが実現される。

[0115] なお、本実施形態の場合、PCR容器30内の液滴47Aを変性温度領域（第1領域36A）に移動させて留める変性段階、および、当該47Aを合成温度領域（第2領域36B）に移動させて留める合成段階を経るサイクル

が複数回繰り返されている。このため、PCR容器30における温度を標的核酸の変性温度と合成温度とに切り替える場合に比べると、当該温度に達するまでの待機期間が省略され、その分だけ増幅反応期間（サイクルタイム）が短縮されている。

[0116] (2) 第2実施形態

次に、第2実施形態を説明する。なお、本実施形態のカートリッジは上記第1実施形態と同一であるため、当該カートリッジの説明は省略する。また、本実施形態の核酸増幅装置のうち制御部90の熱サイクル処理以外は上記第1実施形態と同一であるため、当該熱サイクル処理以外の説明は省略する。

[0117] ≪熱サイクル処理≫

本実施形態の熱サイクル処理は、複数回のサイクルのうち一部のサイクルの期間を他のサイクルの期間よりも短くする点では、第1実施形態の熱サイクル処理と共通する。これに対し、複数回のサイクルのなかで短くするサイクルの時間的部位が、本実施形態の熱サイクル処理と第1実施形態の熱サイクル処理とで相違する。

[0118] すなわち、第1実施形態では、初回から起算して規定回数目となる回の1つ後の回以降の各サイクルの期間が、当該初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間よりも短くされた。

[0119] これに対し、本実施形態では、初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間が、当該回の1つ後の回以降の各サイクルの期間よりも短くされる。

[0120] 図12は、第2実施形態における液滴の温度推移を模式的に示した図である。なお、図12では、図10に示した合と同様に、変性反応期間と合成反応期間との間における液滴47Aの移動期間、および、合成反応期間と変性反応期間との間における液滴47Aの移動期間は省略されている。

[0121] 図12に示すように、本実施形態の制御部90は、初回から起算して規定回数目となる回まで短縮サイクルSSを繰り返し、当該回の1つ後の回から

最終回まで基準サイクルC Sを繰り返すようになっている。

[0122] <熱サイクル処理手順>

第1実施形態の熱サイクル処理（図10参照）では基準サイクルC Sを経てから短縮サイクルS Sが実行されていたのに対し、本実施形態の熱サイクル処理（図12参照）では短縮サイクルS Sを経てから基準サイクルC Sが実行される。すなわち、本実施形態の熱サイクル処理と第1実施形態の熱サイクル処理とでは、基準サイクルC Sと短縮サイクルS Sとの順序が逆となっている。

[0123] したがって、本実施形態の熱サイクル処理手順は、上記第1実施形態における熱サイクル処理手順（図11参照）のステップS P 3、ステップS P 4、ステップS P 6およびステップS P 7のみ異なる。

[0124] 具体的には本実施形態の熱サイクル処理手順のステップS P 3では上述のステップS P 6の処理が実行され、ステップS P 4では上述のステップS P 7の処理が実行される。また、ステップS P 6では上述のステップS P 3の処理が実行され、ステップS P 7では上述のステップS P 4の処理が実行される。

[0125] <小括>

以上のとおり、本実施形態では、初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間が、当該回の1つ後の回以降の各サイクルの期間よりも短くされる。すなわち、複数回のサイクルのうち最初の数サイクルは短縮サイクルS Sとされ、当該数サイクルを経た以降の各サイクルは基準サイクルC Sとされる。このため、複数回のサイクルのすべてが基準サイクルC Sとされる場合に比べると、最初の数サイクルにおける各サイクルの期間が短縮される。

[0126] PCR法では、非特異的な合成反応が生じ易い要因として、鋳型として採取される核酸の量が採取者の技量などによって異なる場合、あるいは、その採取方法に応じて、増幅対象である生物の核酸とは別にその生物由来とは異なる由来の核酸が混ざる場合などがある。このような場合、標的核酸以外の

増幅サイクルが進んで目的とするPCR産物の増幅効率が著しく低減することになる。

[0127] 本実施形態では、複数回のサイクルのうち最初の数サイクルは短縮サイクルSSとされ、当該数サイクルを経た以降の各サイクルは基準サイクルCSとされる。このため、非特異的な合成反応が生じ易い要因が存在していても、最初の数サイクルも基準サイクルCSとされる場合に比べると、非特異的な合成反応量が少なくなり、目的とするPCR産物に対する非特異的なPCR産物の割合が少なくなる。したがって、数サイクルを経た以降の各サイクルにおいて非特異的な合成反応が生じたとしても、ある一定以上の特異的な合成反応量が確保され、少なくとも最低限確保すべき増幅効率が維持される。

[0128] このように本実施形態によれば、ある一定の増幅効率を維持しながらも増幅反応期間（サイクルタイム）を短縮することができ、この結果、増幅効率が低減することを抑制しつつPCR産物の生成時間を短縮することが実現される。

[0129] （３）変形例

上記実施形態では、短縮サイクルSSにおける第２変性反応期間PD２が第１変性反応期間PD１よりも短くされ、当該短縮サイクルSSにおける第２合成反応期間PS２が第１合成反応期間PS１よりも短くされた（図１０および図１２参照）。

しかしながら、各短縮サイクルSSのうち一部の短縮サイクルSSにおける変性反応期間は第１変性反応期間PD１より短くされていなくてもよい。

[0130] また、図１３に示すように、短縮サイクルSSにおける第２変性反応期間PD２は第１変性反応期間PD１よりも短くされ、当該短縮サイクルSSにおける合成反応期間は短くされずに第１合成反応期間PS１と同程度としてもよい。なお、図１３の（Ａ）は第１実施形態の第２変性反応期間PD２だけを第１変性反応期間PD１よりも短くした場合に相当し、図１３の（Ｂ）は第２実施形態の第２変性反応期間PD２だけを第１変性反応期間PD１よ

りも短くした場合に相当する。

[0131] このようにした場合、第2合成反応期間PS2が第1合成反応期間PS1よりも短い上記実施形態に比べて、当該第2合成反応期間PS2に実行される蛍光測定の期間を長く確保することができる。したがって、蛍光測定精度を低減させることなく、増幅反応全体の期間を短縮することができる。なお、この図13に示す例では、各短縮サイクルSSにおけるすべての変性反応期間が第1変性反応期間PD1よりも短くされているが、当該変性反応期間の一部が第1変性反応期間PD1より短くされていなくてもよい。

[0132] また、第2変性反応期間PD2が第1変性反応期間PD1よりも短くされ、当該第2合成反応期間PS2が第1合成反応期間PS1よりも短くされない場合、図14に示すように、第2変性反応期間PD2を第1変性反応期間PD1よりも短くした分の期間SHPの一部の期間PPが、当該第1合成反応期間PS1に割り当てられてもよい。このようにすれば、増幅反応全体の期間を短縮させつつも、増幅効率に影響し易い合成反応期間を長めにとって増幅効率が低減することを抑えることができる。なお、この図14に示す例では、各サイクルにおけるすべての変性反応期間が第1変性反応期間PD1よりも短くされ、各変性反応期間を短くした分の一部の期間PPが、当該サイクルの第1合成反応期間PS1に割り当てられている。しかしながら、各サイクルにおける一部の变性反応期間だけが第1変性反応期間PD1よりも短くされていてもよく、その短くした分の一部の期間PPが、当該サイクルの第1合成反応期間PS1以外の第1合成反応期間PS1に割り当てられていてもよい。

[0133] また、短縮サイクルSSにおける変性反応期間が短くされずに第1変性反応期間PD1と同程度とし、当該短縮サイクルSSにおける第2合成反応期間PS2が第1合成反応期間PS1よりも短くされるようにしてもよい。

[0134] また、上記第1実施形態では複数回のサイクルのうち最初の数サイクルを経た以降のサイクルが短縮サイクルSSとされ（図10参照）、上記第2実施形態では複数回のサイクルのうち最初の数サイクルが短縮サイクルSSと

された（図 1 2 参照）。しかしながら、短縮サイクル S S と基準サイクル C S とが交互に繰り返されてもよい。なお、交互に繰り返されるべき短縮サイクル S S のサイクル数と、基準サイクル C S のサイクル数とは同じであっても異なってもよい。

[0135] また、複数回のサイクルのうち最初の数サイクルを短縮サイクル S S とする第 1 サイクルパターンと、当該複数回のサイクルのうち最初の数サイクル以降を短縮サイクル S S とする第 2 サイクルパターンとが切り替えられるようにしてもよい。この切り替え方法としては、例えば、入力部 9 2 からの切り替え命令に応じて制御部 9 0 が第 1 サイクルパターンと第 2 サイクルパターンとを切り替える手法が挙げられる。

[0136] 要するに、複数回のサイクルのうち一部のサイクルの期間が他のサイクルの期間よりも短くされていれば、上記実施形態と同様に、増幅効率が低減することを抑制しつつ増幅反応期間を短縮することができる。

[0137] また上記実施形態では、変性反応期間および合成反応期間の始期が回転体 6 1 を 1 8 0 度回転し終えた（回転体 6 1 を停止した）時点とされたが、当該回転体 6 1 を 1 8 0 度回転し始める時点とされてもよい。

[0138] また上記実施形態では、PCR 容器 3 0 内の液滴 4 7 A を PCR 容器 3 0 の第 1 領域 3 6 A と第 2 領域 3 6 B とに交互に移動させる機構として回転機構 6 0 が採用された。しかしながら、PCR 容器において標的核酸の変性温度にされる第 1 領域と、その第 1 領域とは独立した領域であって標的核酸の合成温度にされる第 2 領域とに液滴 4 7 A を交互に移動させる機構であれば、上記回転機構 6 0 以外の種々の移動機構を適用することが可能である。

[0139] また、上記実施形態では、PCR 容器内で液滴 4 7 A を移動させるべき領域として、標的核酸の変性温度にされる第 1 領域と、その第 1 領域とは独立した領域であって標的核酸の合成温度にされる第 2 領域とが配置された。しかしながら、例えば特願 2 0 1 4 - 1 0 7 8 4 4 のように 3 つの領域が配置されていてもよい。すなわち、PCR 容器内の第 1 領域として、標的核酸の変性温度にされる領域が配置される。また、第 2 領域として、互いに独立し

た2つ領域が配置され、一方の領域は標的核酸の合成反応におけるアニーリング反応が進行する温度として設定されるアニーリング温度にされ、他方の領域は標的核酸の伸長反応が進行する温度として設定される伸長温度にされる。このように、サイクルにおける温度変化が変性段階および合成段階の2段階とされる上記実施形態の場合に限らず、変性段階、アニーリング段階および伸長段階の3段階とされる場合であっても、PCR容器内で液滴47Aを移動させることができる。なお、サイクルにおける温度変化が3段階とされる場合であっても、回転機構以外の種々の移動機構を適用することが可能である。

[0140] また上記実施形態では、PCR容器30内に収容される液滴47AがそのPCR容器30内に充填されるオイル37の比重よりも大きくされた。しかしながら、液滴47Aがオイル37の比重よりも小さくされていてもよい。このようにしても上記実施形態と同様の効果を奏する。

[0141] また上記実施形態では、PCR容器30内にオイル37が充填された。しかしながら、液滴47Aが壊れることなくPCR容器30内を移動する限りにおいて、オイル37が省略されてもよい。すなわち、PCR容器30内に充填されるオイル37は必須の構成要素となるものではない。

[0142] 上記実施形態では、高温側ヒーター65Bおよび低温側ヒーター65Cを備えた核酸増幅装置50が適用された。しかしながら、PCR容器30の内部に温度勾配を形成できるのであれば、上記実施形態の核酸増幅装置50以外の核酸増幅装置が適用されてもよい。例えば、高温側ヒーターのみが備えられていてもよく、低温側ヒーター65Cが冷却器に変更されてもよい。あるいは、回転体61の外部に高温側ヒーターおよび低温側ヒーターが備えられていてもよい。あるいは、高温側ヒーター65Bを設ける部位と、低温側ヒーター65Cを設ける部位とが逆にされてもよい。

[0143] また上記実施形態では、溶出用ヒーター65Aが備えられたが省略されていてもよい。ただし、核酸増幅装置50が溶出用ヒーター65Aを備えていれば、核酸の磁気ビーズからの遊離が促進されるので望ましい。

[0144] また上記実施形態では、磁石移動機構 70 が備えられたが省略されていてもよい。磁石移動機構 70 を省略する場合、例えば、作業者が磁石を持ち、チューブ 20 に沿って磁石を移動させるとよい。ただし、作業者の技量に応じて、核酸結合性を有する固相担体である磁気ビーズ 7 の移動速度などが異なるおそれがあるため、磁石移動機構 70 が備えられることが望ましい。

[0145] また上記実施形態では、押圧機構 80 が備えられたが省略されていてもよい。押圧機構 80 を省略する場合、例えば、作業者がカートリッジのプランジャー 10 を手で押すとよい。ただし、作業者の技量に応じて、単位時間あたりにプランジャー 10 を押す圧力量などが異なるおそれがあるため、押圧機構 80 が備えられることが望ましい。

[0146] また上記実施形態では、蛍光測定器 55 が備えられたが省略されていてもよい。蛍光測定器 55 を省略する場合、核酸の増幅を定量することができないが、当該核酸を増幅させることは可能である。

符号の説明

[0147] 1…カートリッジ、3…タンク、5…アダプター、9…カートリッジ本体、10…プランジャー、20…チューブ、30…PCR 容器、35…流路形成部、36A…第1領域、36B…第2領域、37…オイル、47A…液滴、50…核酸増幅装置、60…回転機構、65B…高温側ヒーター、65C…低温側ヒーター、90…制御部、CS…基準サイクル、SS…短縮サイクル。

請求の範囲

- [請求項1] 鋳型核酸および前記鋳型核酸における標的核酸の増幅に要する試料を含む液滴を収容する容器の第1領域を前記標的核酸の変性温度に加熱するとともに、前記第1領域とは異なる第2領域を前記標的核酸の合成温度に加熱する加熱ステップと、
- 前記容器に収容される前記液滴を前記第1領域に移動させて留める変性段階、および、当該液滴を前記第2領域に移動させて留める合成段階を経るサイクルを複数回繰り返す増幅ステップと、を備え、
- 前記増幅ステップでは、複数回の前記サイクルのうち一部のサイクルの期間が他のサイクルの期間よりも短くされることを特徴とする核酸増幅方法。
- [請求項2] 前記増幅ステップでは、初回から起算して規定回数目となる回の1つ後の回以降の各サイクルの期間が、当該初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間よりも短くされることを特徴とする請求項1に記載の核酸増幅方法。
- [請求項3] 前記増幅ステップでは、初回から起算して規定回数目となる回までの各サイクルの期間が、当該回の1つ後の回以降の各サイクルの期間よりも短くされることを特徴とする請求項1に記載の核酸増幅方法。
- [請求項4] 前記一部のサイクルにおける前記変性段階の変性反応期間は、前記他のサイクルにおける前記変性段階の変性反応期間よりも短くされ、
- 前記一部のサイクルにおける前記合成段階の合成反応期間は、前記他のサイクルにおける前記合成段階の合成反応期間よりも短くされないことを特徴とする請求項1～請求項3いずれか1項に記載の核酸増幅方法。
- [請求項5] 前記一部のサイクルにおける前記変性段階の変性反応期間を、前記他のサイクルにおける前記変性段階の変性反応期間よりも短くした分の期間の一部の期間は、前記一部のサイクルにおける前記合成段階の合成反応期間に割り当てられることを特徴とする請求項4に記載の核

酸増幅方法。

[請求項6]

鋳型核酸および前記鋳型核酸における標的核酸の増幅に要する試料を含む液滴を収容する容器が装着される装着部と、

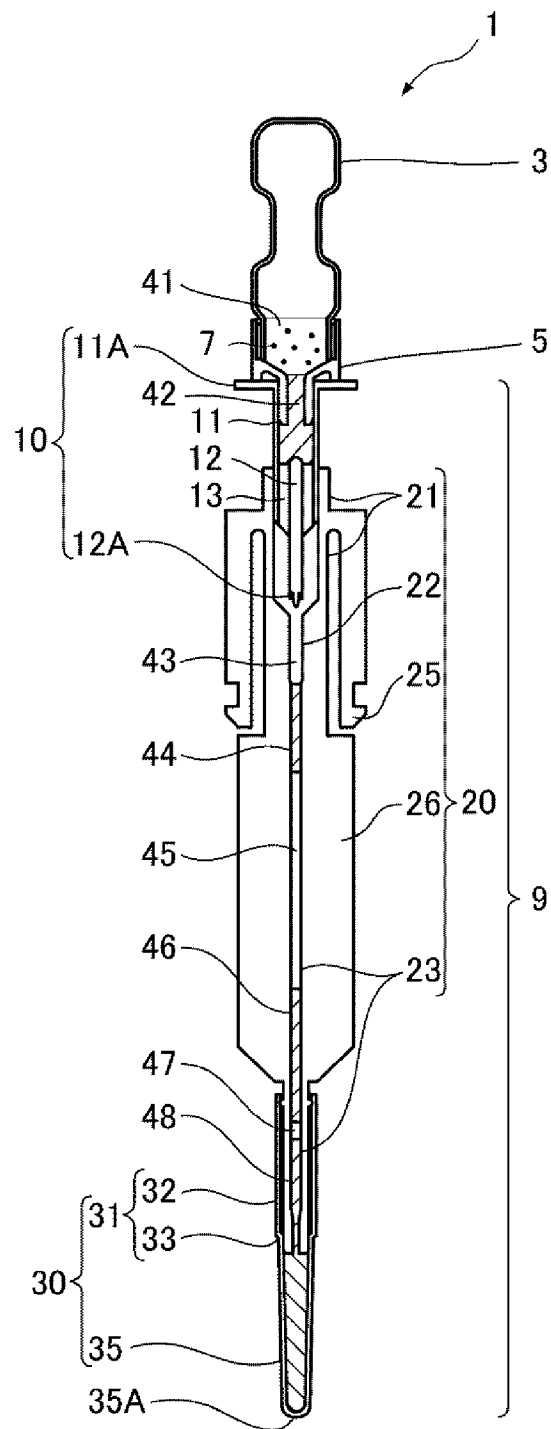
前記装着部に装着される前記容器における第1領域を前記標的核酸の変性温度に加熱するとともに、前記第1領域とは独立した第2領域を前記標的核酸の合成温度に加熱するヒーターと、

前記第1領域から前記第2領域または前記第2領域から前記第1領域に前記液滴を移動させる移動機構と、

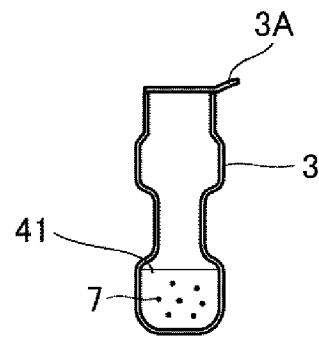
前記第1領域に前記液滴を留める変性段階、および、前記第2領域に前記液滴を留める合成段階を経るサイクルを複数回繰り返すように、前記移動機構を制御する制御部と、を備え、

前記制御部は、複数回の前記サイクルのうち一部のサイクルの期間を他のサイクルの期間よりも短くする、ことを特徴とする核酸増幅装置。

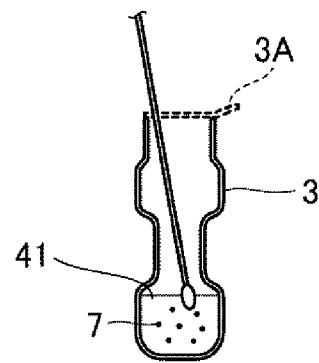
[図1]



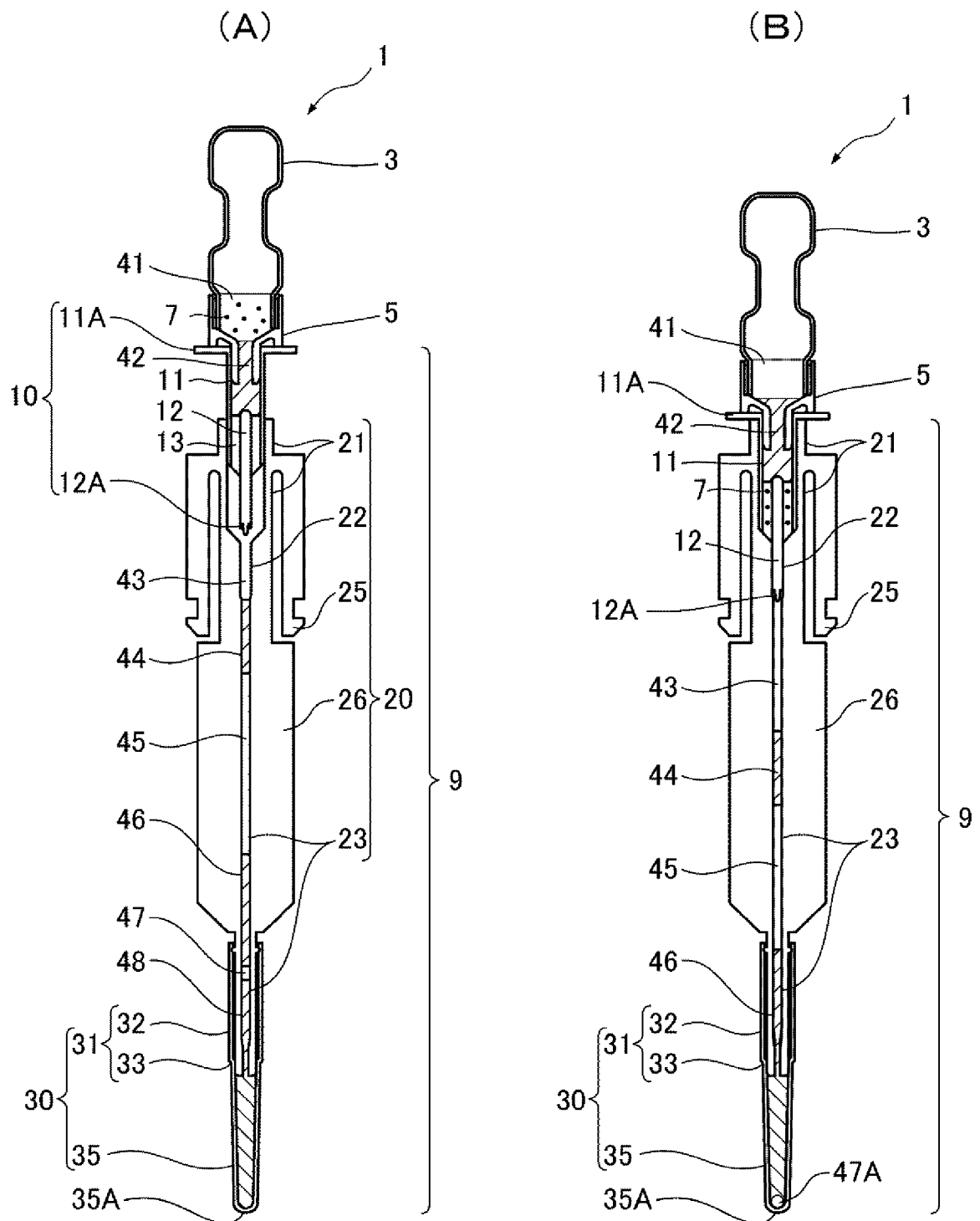
[図2]



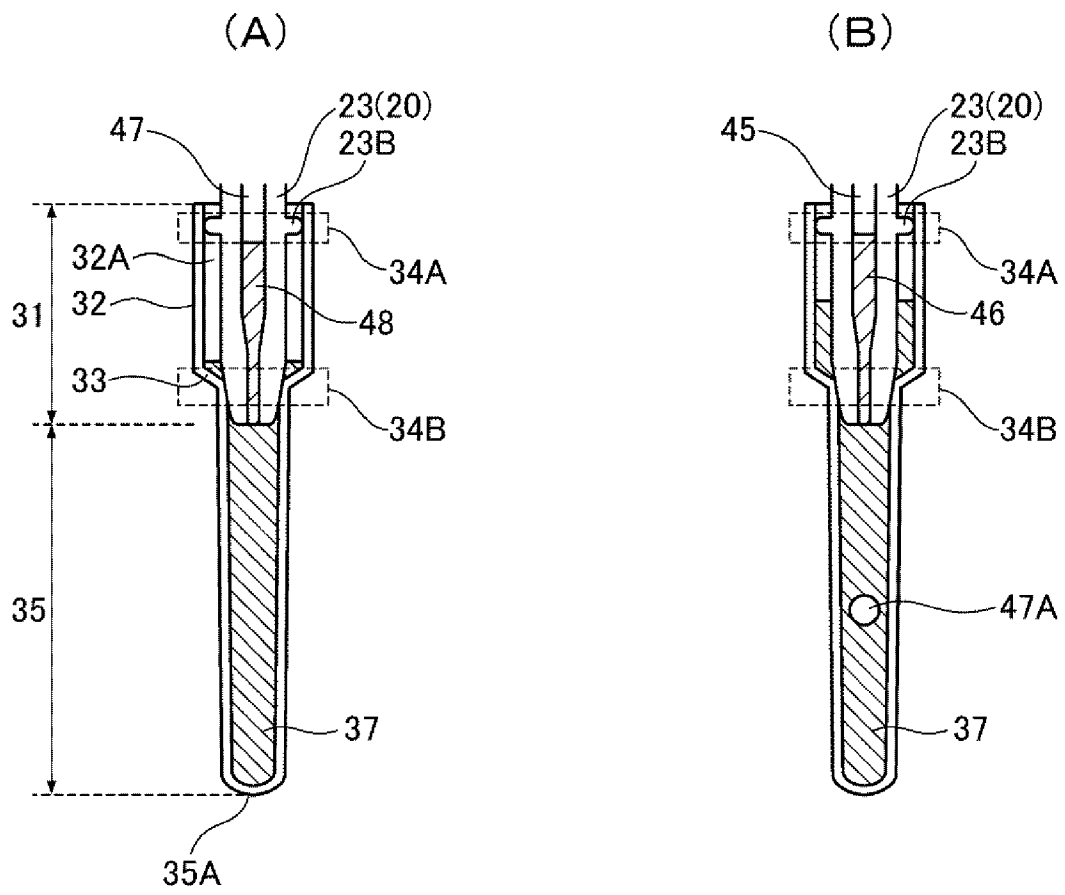
[図3]



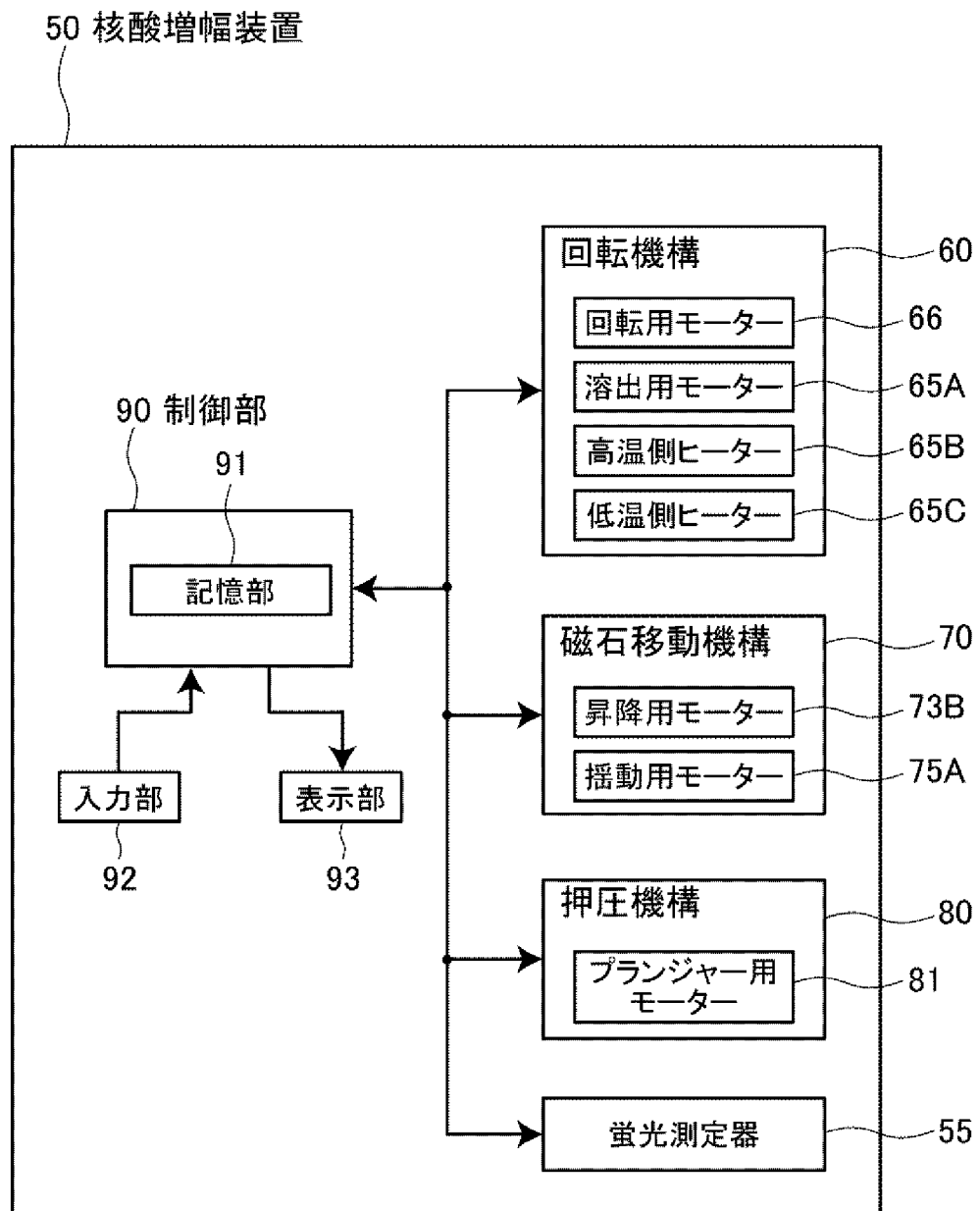
[図4]



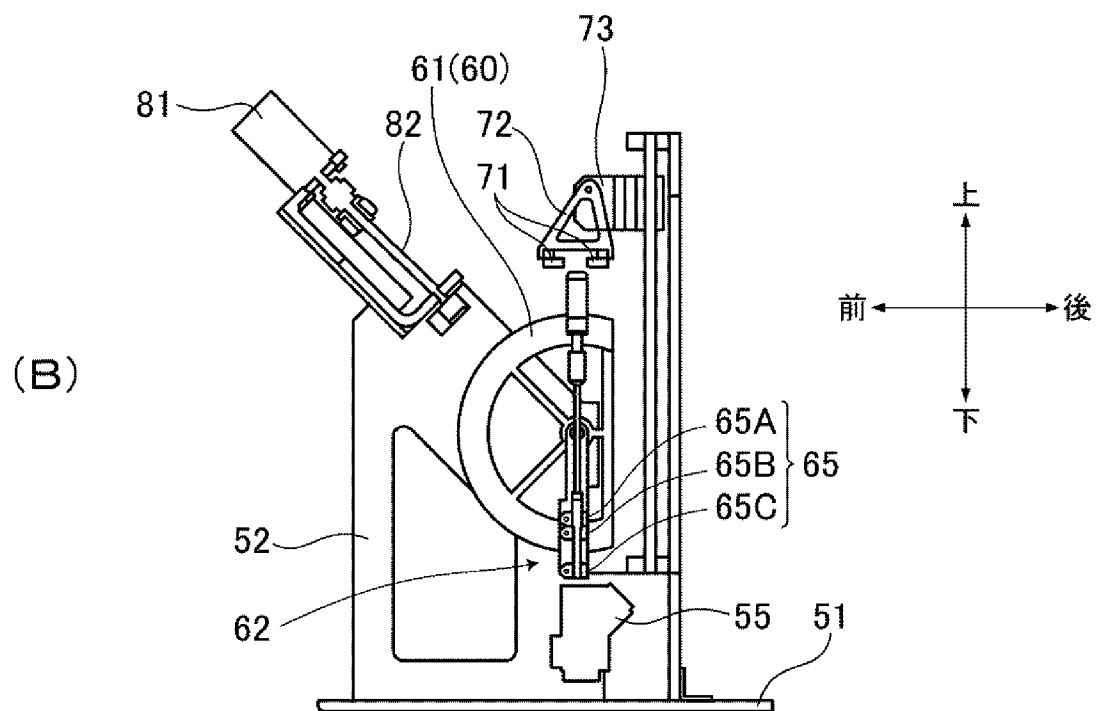
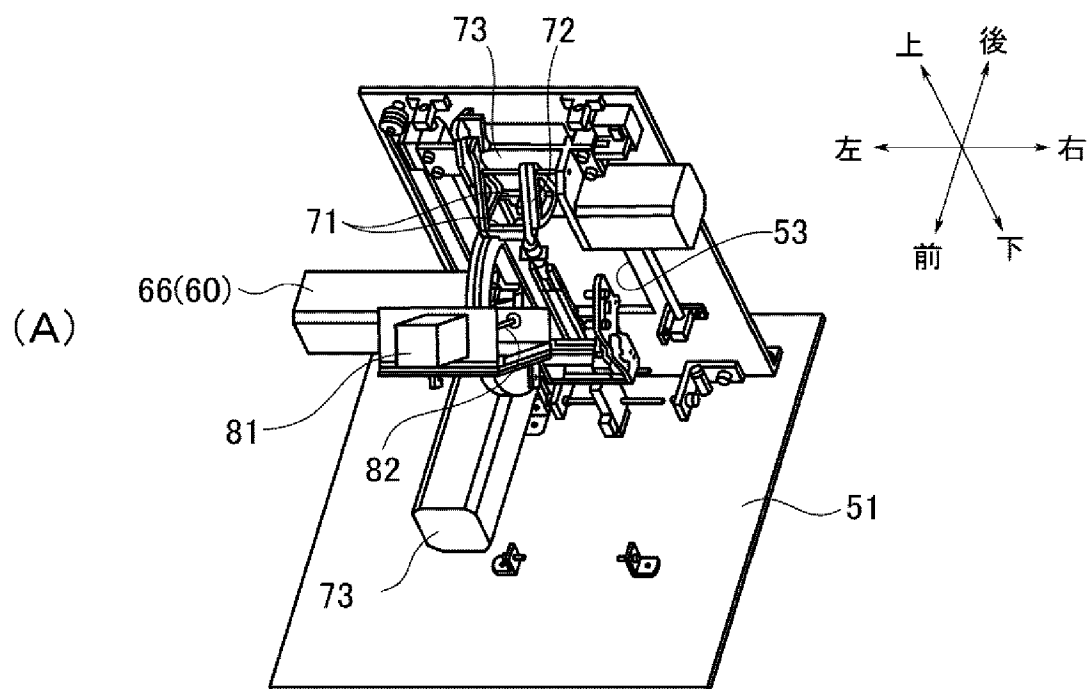
[図5]



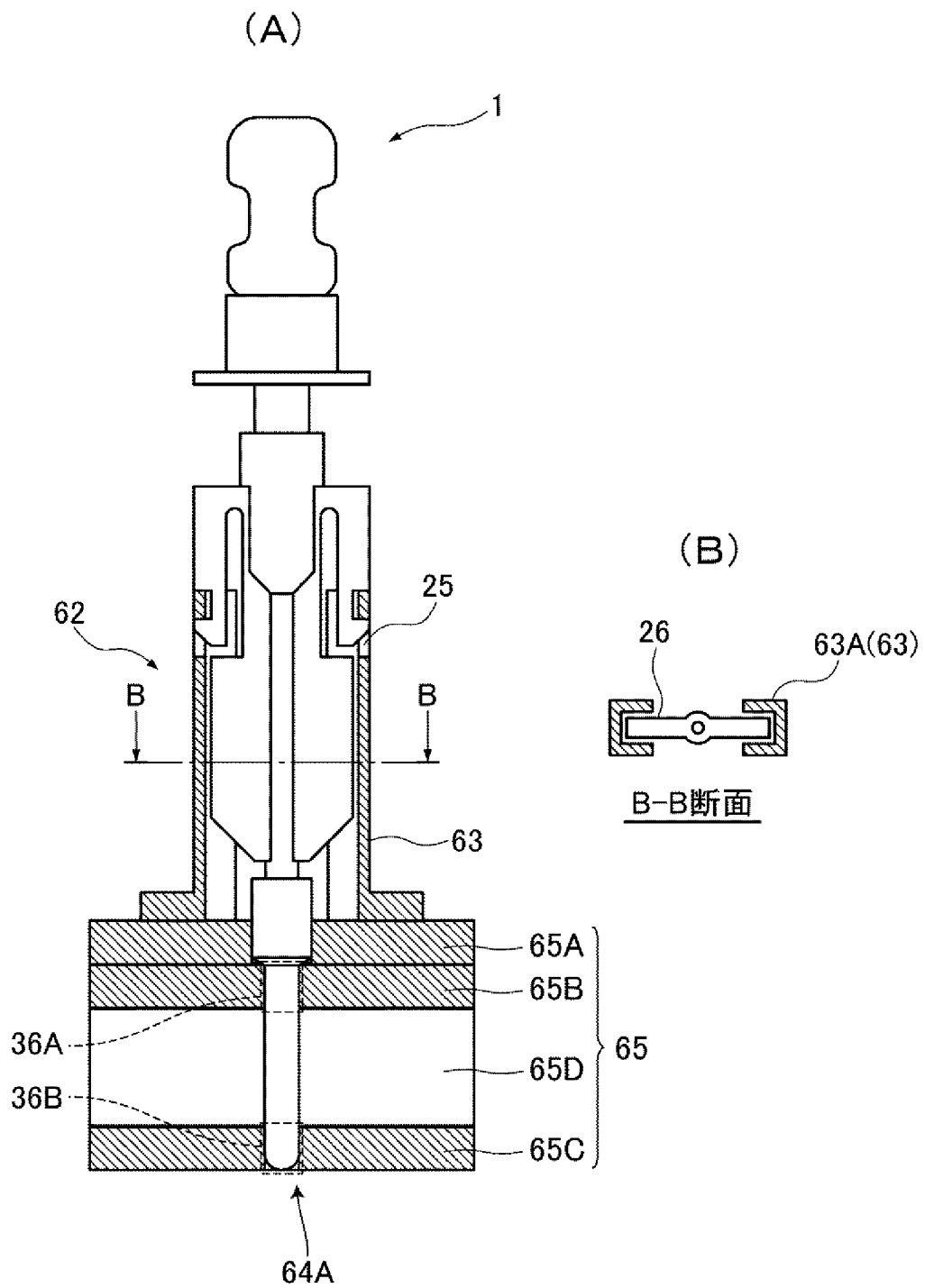
[図6]



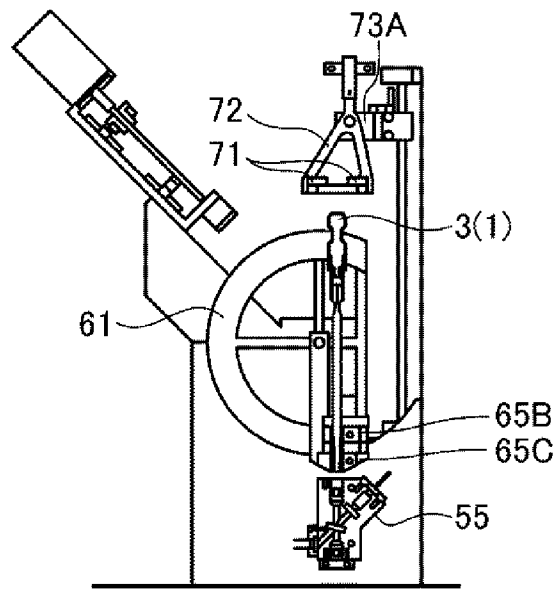
[図7]



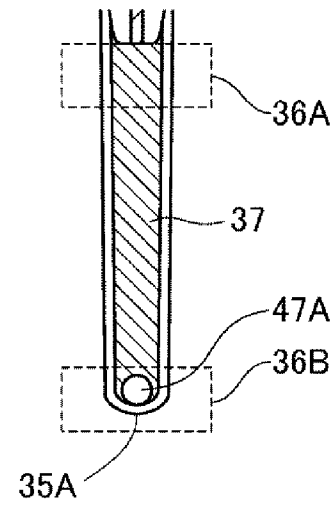
[図8]



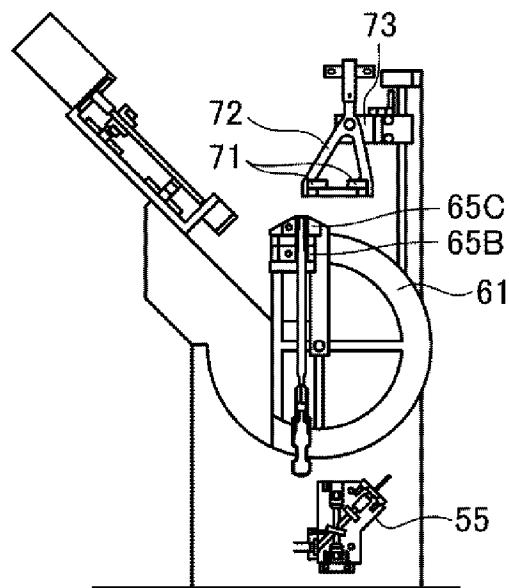
[図9]



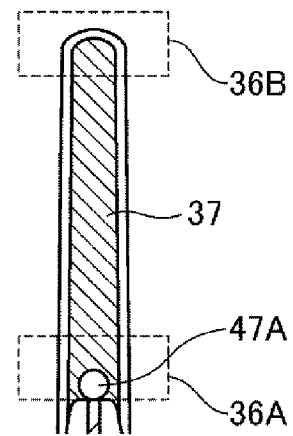
(A)



(B)

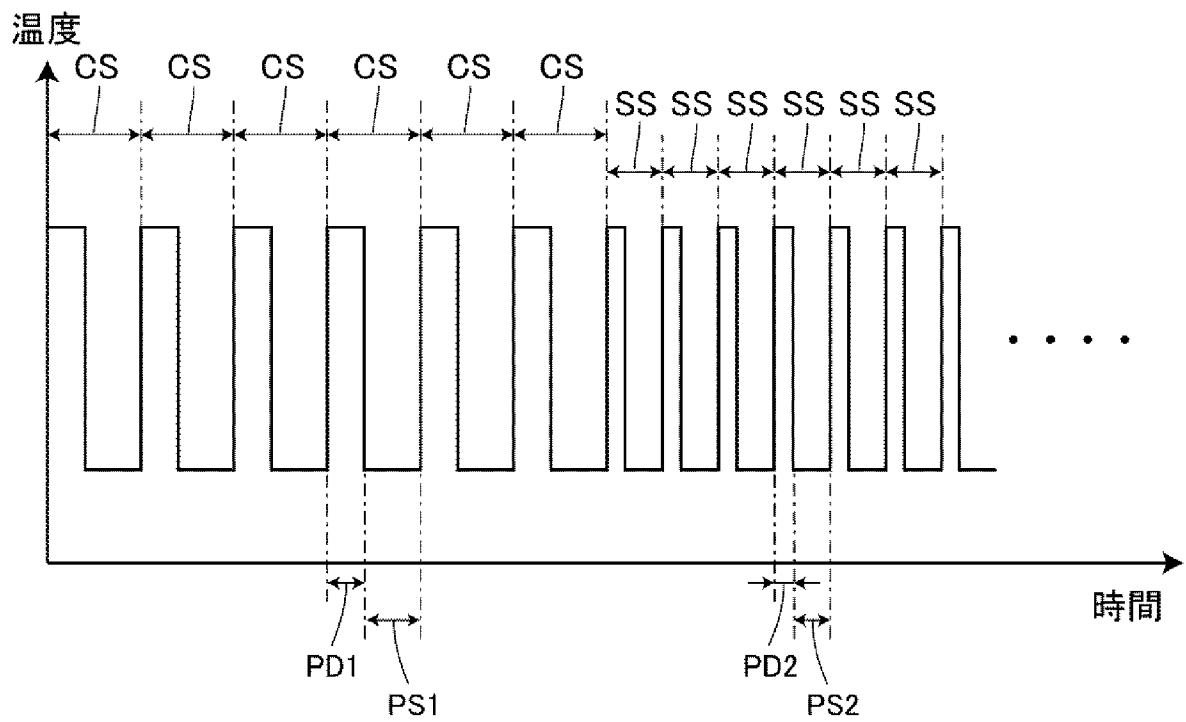


(C)

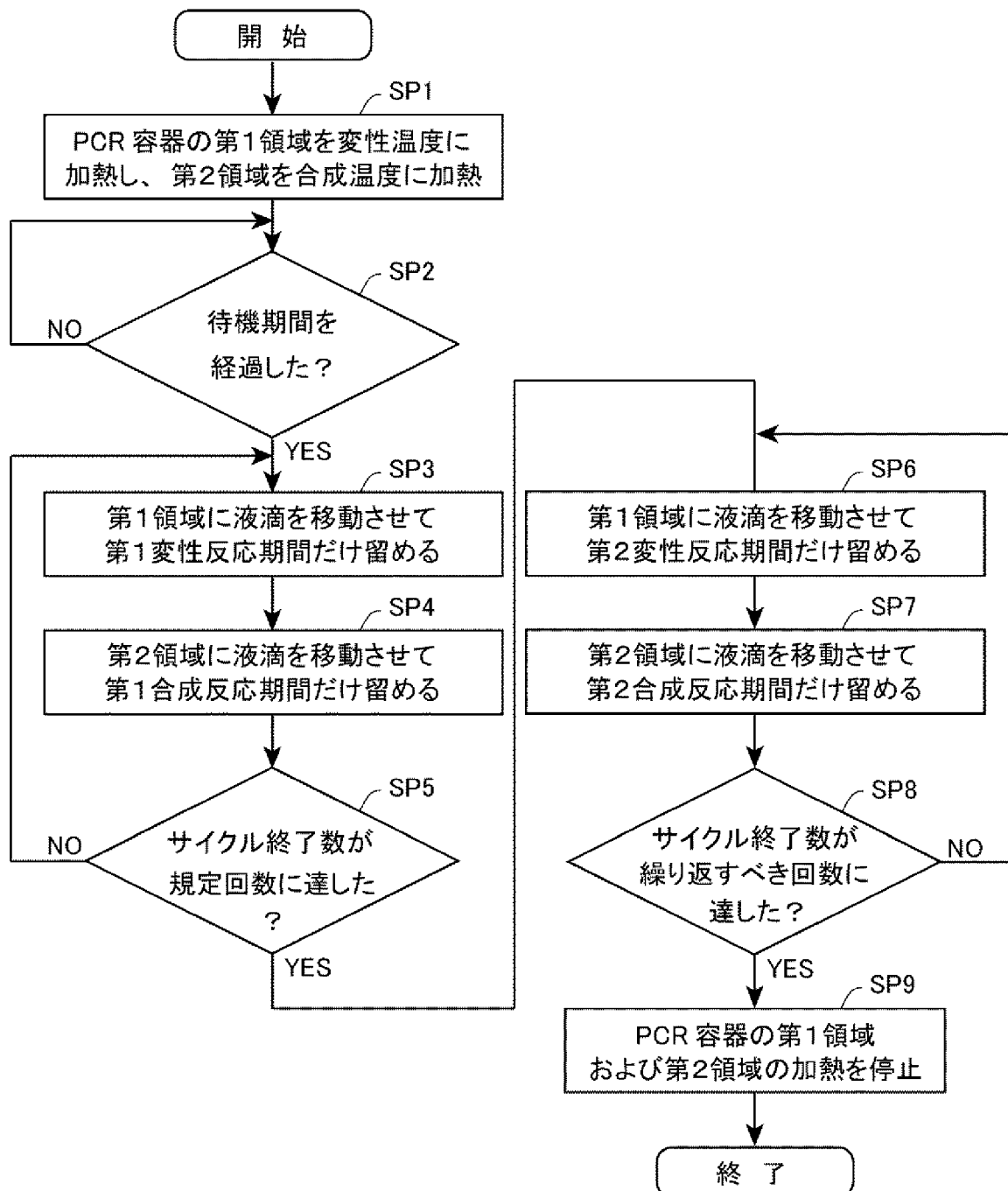


(D)

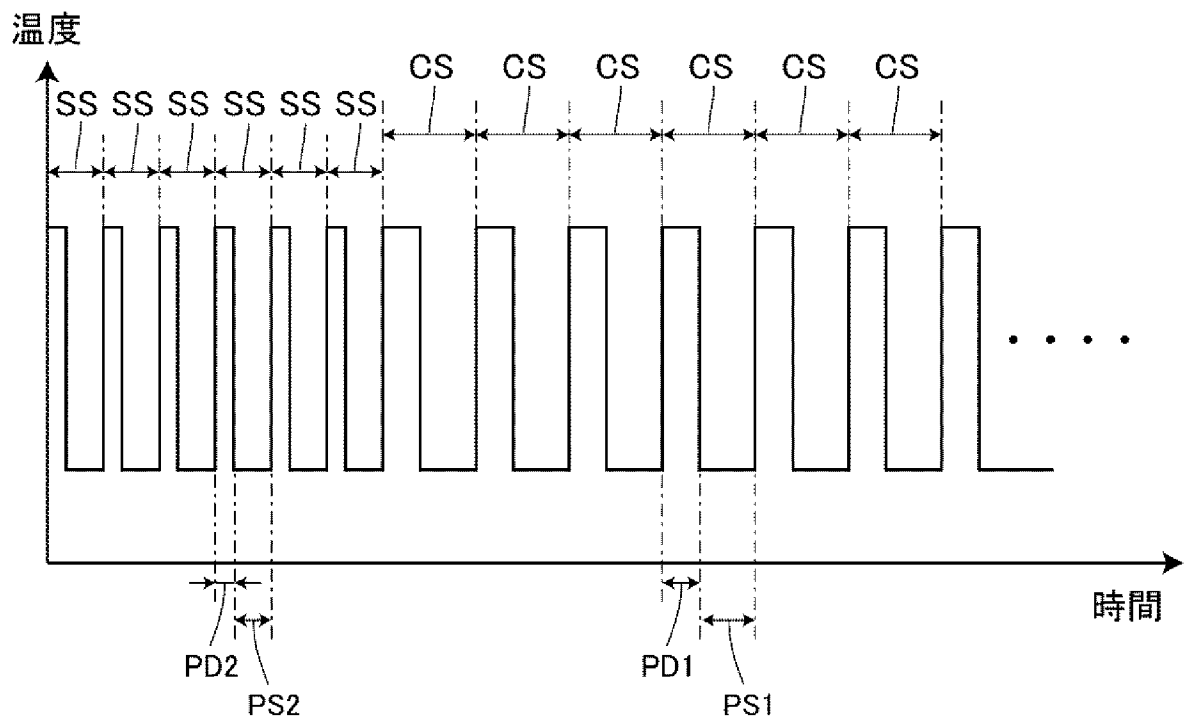
[図10]



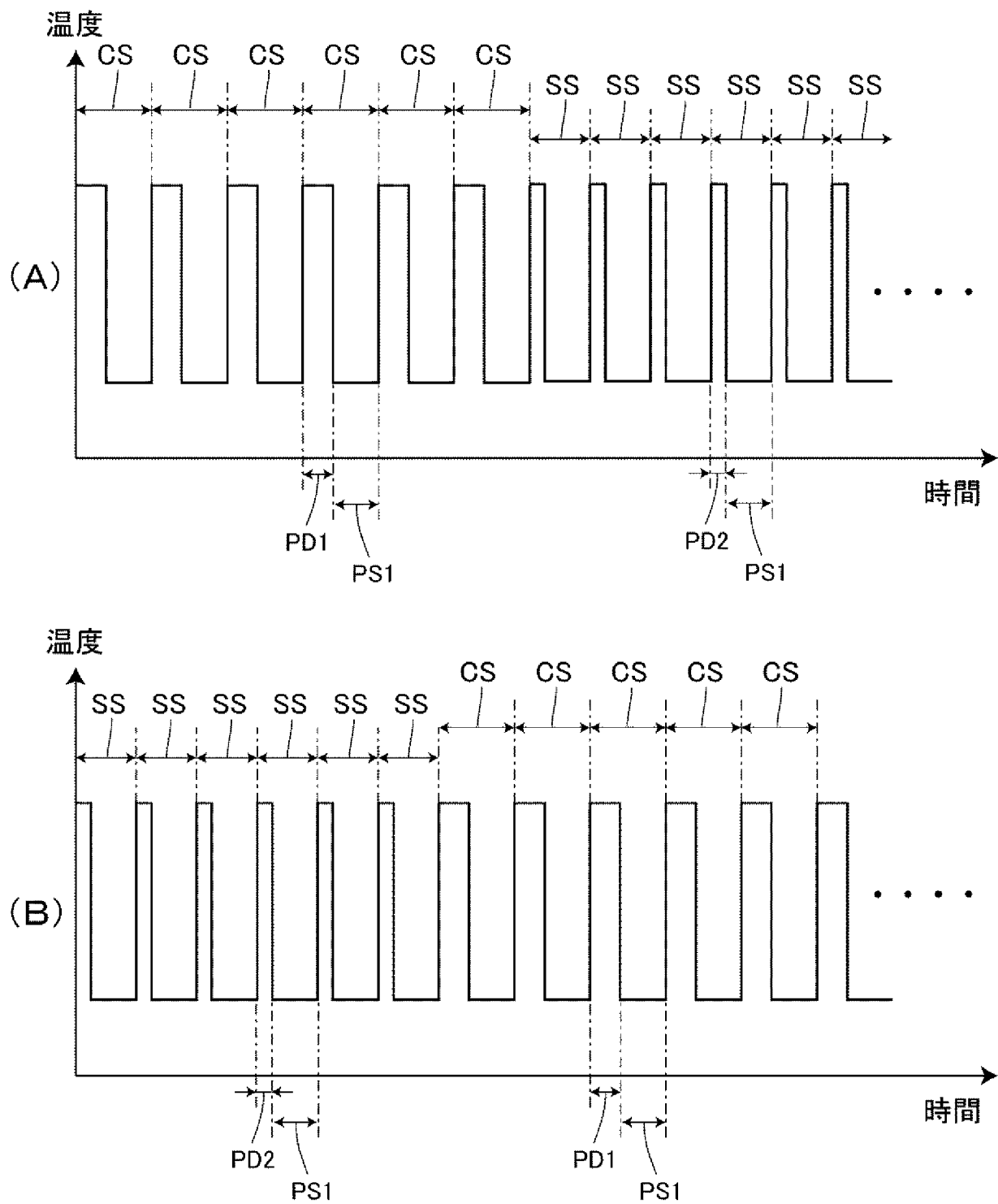
[図11]



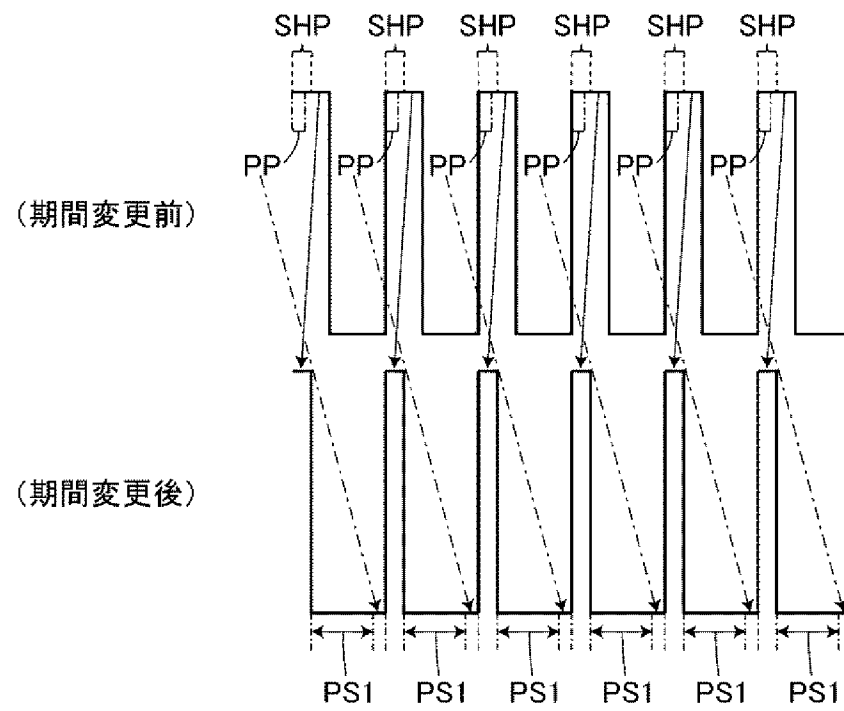
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/006236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/00, C12N15/09, G01N35/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

DWPI(Thomson Innovation), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-247882 A (Seiko Epson Corp.), 12 December 2013 (12.12.2013), paragraphs [0063] to [0077], [0091]; fig. 1, 5 (Family: none)	1-6
X	JP 2014-176305 A (Seiko Epson Corp.), 25 September 2014 (25.09.2014), fig. 1, 7 & US 2014/0273202 A1 fig. 1, 7 & CN 104046555 A	6
A	JP 2006-504429 A (Megabase Research Products), 09 February 2006 (09.02.2006), & WO 2004/042086 A1 & EP 1558757 A1 & CN 1720333 A	1-6

☐ 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
03 March 2016 (03.03.16)

Date of mailing of the international search report
15 March 2016 (15.03.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N35/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12M1/00, C12N15/09, G01N35/00

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

DWPI (Thomson Innovation)
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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 2013-247882 A (セイコーエプソン株式会社) 2013.12.12, 【0063】-【0077】、【0091】、図1, 5 (ファミリーなし)	1-6
X	JP 2014-176305 A (セイコーエプソン株式会社) 2014.09.25, 図1, 7 & US 2014/0273202 A1 FIGs. 1, 7 & CN 104046555 A	6

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

国際調査を完了した日

03.03.2016

国際調査報告の発送日

15.03.2016

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

福岡 信子

4N

3539

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2006-504429 A (メガベース リサーチ プロダクツ) 2006.02.09, & WO 2004/042086 A1 & EP 1558757 A1 & CN 1720333 A	1-6