(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
2024年7月4日(04.07.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/143431 A1

(51) 国際特許分類:
*G01N 33/531* (2006.01) *G01N 33/542* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/046816

(22) 国際出願日： 2023年12月26日(26.12.2023)

(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 2022-210874 2022年12月27日(27.12.2022) JP

(71) 出願人：株式会社ＴｅａｒＥｘｏ(**TEAREXO INC.**) [JP/JP]；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ Hyogo (JP).

(72) 発明者：竹内 俊文(**TAKEUCHI, Toshifumi**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 株式会社ＴｅａｒＥｘｏ内 Hyogo (JP). ▲高▼野 恵里(**TAKANO, Eri**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 株式会社ＴｅａｒＥｘｏ内 Hyogo (JP). 砂山 博文(**SUNAYAMA, Hirobumi**)；〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 株式会社ＴｅａｒＥｘｏ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人：鎌田 光宜，外(**KAMADA, Mitsunori** et al.)；〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (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, 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：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** SENSOR COMBINED WITH PARTICLES

(54) 発明の名称： 粒子を組み合わせたセンサ

(57) **Abstract:** The present disclosure provides a sensor combined with particles. The present disclosure discloses a kit for detecting a detection target. This kit includes: A) first particles having an ability to bind to the detection target or a binding substance of the detection target; and B) second particles having an ability to bind to a signal substance different from the first particles having the ability to bind to the detection target or the binding substance of the detection target, wherein a detectable signal is generated when a complex of the first particle, the second particle, the detection target, and the binding substance of the detection target is present.

(57) 要約：本開示は、粒子を組み合わせたセンサを提供する。本開示は、検出対象を検出するためのキットを開示する。本キットは、A)前記検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子とB)前記検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子とは異なるシグナル物質に結合する能力を有する第二の粒子と、を含み、前記第一の粒子と前記第二の粒子と前記検出対象と前記検出対象の結合物質との複合体が存在する場合に、検出可能なシグナルが生成される。

WO 2024/143431 A1

# 明　細　書

## 発明の名称 ： 粒子を組み合わせたセンサ

## 技術分野

[0001] 本開示は、粒子の組み合わせを利用した検出キットおよびその製造方法、製造キット、関連する基材、センサ、関連する方法に関する。

## 背景技術

[0002] タンパク質等の生体物質は、代謝、シグナル伝達、免疫、生体構造の形成など多くの生命現象に携わっており、病気の診断等における有益な情報を提供する。そして、このような生体分子の利用価値を更に高めるべく、生体分子を認識する材料をバイオセンサへ応用する研究が行われている。

[0003] バイオセンサにおいて生体分子を認識するレセプタとして用いられる抗体は、その優れた特異性と親和性とにより、バイオセンサの性能に大きく寄与している。特に特異的な検出のためには、標的を捕捉するための抗体、特異的検出のための1次抗体、検出のための標識がされた2次抗体等複数の分子認識素子を用いたサンドイッチアッセイがスタンダードとなる。一方で、抗体は、生体分子であるがゆえに、熱及びｐＨなどの外部刺激に対して脆弱である点、並びに複数種の分子を用いることで高コストである点等の生来的な課題を孕んでいる。

[0004] 抗体の生来的な課題に鑑み、抗体の特異性及び親和性を人工的に獲得すべく、分子インプリンティングの応用が試みられている。分子インプリンティングは、生体分子の鋳型を高分子内に型取る技術として確立されており、具体的には、鋳型となる生体分子と機能性モノマーの複合体を形成させ、架橋剤と共に共重合した後、鋳型を除去することで、鋳型に対して相補的な結合空間（分子インプリント空間）をもつ分子インプリントポリマー（ＭＩＰ）を得る。このようなＭＩＰの膜を基板上に製膜して様々な人工バイオセンサ基板を製造し得る。

## 発明の概要

## 課題を解決するための手段

[0005] 本開示者らは、鋭意研究した結果、簡易に、感度よく、分析および検査をすることができるセンサ、およびそのための基材、さらには関連する基材、粒子ならびに関連する技術を開発し、完成させた。

[0006] 本開示は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目１）

検出対象を検出するためのキットであって、

A)前記検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子と

B)前記検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子とは異なるシグナル物質に結合する能力を有する第二の粒子と、

を含み、前記検出対象と前記検出対象の結合物質とが複合体化すると、検出可能なシグナルが、生成、消失または変化する、キット。

（項目２）

前記第一の粒子は、前記検出対象または前記検出対象の結合物質を収容する第一の空間形成部を有し、前記第一の空間形成部は前記第一の空間形成部に少なくともその一部が露出するように前記検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に前記結合物質と結合する結合物質結合基を有する、項目１に記載のキット。

（項目３）

前記第一の粒子または前記第二の粒子は、基材とともに提供され、前記第一の粒子または前記第二の粒子は前記基材上に配置される、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目４）

前記第二の粒子が、前記検出対象または前記検出対象の結合物質を収容する空間を形成する第二の空間形成部を有し、前記第二の空間形成部は、前記第二の空間形成部に少なくともその一部が露出するように前記検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に前記結合物質と結合する結合物質

結合基およびシグナル物質と結合するシグナル物質結合基を含む、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目５）

前記相互作用基が、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目６）

前記結合物質が、抗体、抗体誘導体、結合タンパク質、核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーである、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目７）

前記結合物質結合基が、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目８）

前記シグナル物質結合基が、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、アジド基、アルキン基、ジベンゾシクロオクチン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目９）

前記シグナル物質が、蛍光分子、放射性元素含有物質、磁性物質、電気化学活性物質、ラマン散乱活性物質、または酵素である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１０）

前記シグナル物質が、光学、磁気、電気化学、または超音波により活性化される物質、放射性元素含有物質、または酵素である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１１）

前記結合物質は、２種類以上使用される、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１２）

２種類以上の前記結合物質は、その検出対象が重複するものである、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１３）

２種類以上の前記結合物質は、その検出対象が異なるものである、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１４）

２種類以上の前記結合物質は、同種の結合物質である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１５）

２種類以上の前記結合物質は、異種の結合物質である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１６）

２種類以上の前記結合物質の結合基は、異種の結合物質ごとに異なる、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１７）

２種類以上の前記結合物質は、抗体である、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目１８）

先行する項目のいずれかに記載の第一の粒子と、

先行する項目のいずれかに記載の第二の粒子と、

先行する項目のいずれかに記載の結合物質と、

基材と、

を含む、センシング用基材の製造キット。

（項目１９）

検出対象を検出するためのセンシング用基材であって、基材と、前記基材に固定された先行する項目のいずれかに記載の第一の粒子とを含む、センシング用基材。

（項目２０）

検出対象を検出するためのセンサであって、項目１２に記載のセンシング用基材と先行する項目のいずれか一項に記載の第二の粒子と項目６に記載の結合物質とを含む、センサ。

（項目２１）

試料において検出対象を検出する方法であって、

（Ａ）先行する項目のキット、項目１２の基材、または項目１３に記載のセンサを提供する工程、

（Ａ’）必要に応じて、結合物質を前記第一の粒子に結合させ、ならびに/またはシグ

ナル物質および／もしくは結合物質を前記第二の粒子に結合させる工程と

（Ｂ）前記試料を前記検出対象に結合する能力を有する粒子と接触させる工程と、

（Ｃ）前記結合物質が結合した粒子を、（Ｂ）で試料を接触させた前記粒子と接触させる工程と

（Ｄ）必要に応じて前記シグナル物質を活性化することで、前記第一の粒子と前記第二の粒子と前記検出対象と前記検出対象の結合物質との複合体が存在する場合に生成される、前記検出可能なシグナルを検出する工程と

（Ｅ）必要に応じて前記シグナルに基づき計算処理をして前記検出対象を検出する工程と

を包含する方法。

（項目２２）

（Ｆ）前記検出対象を分析する工程をさらに包含する、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目２３）

食品分析に使用するための、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目２４）

食品中の予め指定した成分（例えば、豚由来の成分）を検出するための、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目２５）

膠原病検査、感染症検査、梅毒検査、痛風検査、高脂血症検査、糖尿病検査、肝・胆道系検査、腎機能検査、膵機能検査、ウイルス抗原検査およびそれらの組合せからなる群から選択される検査に使用するための、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目２６）

前記第二の粒子は、前記検出対象の結合物質と結合した状態で提供される、先行する項目のいずれか一項に記載のキット。

（項目２７）

検出対象を検出するための、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する粒子。

（項目２８）

検出対象を検出するための、基材に結合した検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する粒子。

（項目２９）

検出対象を検出するための、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力、およびシグナル物質に結合する能力を有する粒子。

[0007] 本明細書において、上記１または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供されうることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

## 発明の効果

[0008] 本開示に関する技術を利用することで、センサ技術において、標的に対して感度および選択性の飛躍的な向上が期待される。特にタンパク質の検出が従来に増して高品質なものが提供される。また、不純物検出における分析時間の短縮が可能となり、プロセス的にもメリットがある。本開示の手法は、高感度な選択性が高いセンサ基材を作製するために重要な基盤技術と位置付けられる。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1]図１は、バイオ／アビオティック（生物学的/非生物学的）サンドイッチアッセイの検量線を示す。

[図2]図２は、ブタ血清アルブミン（ＰＳＡ）と４種の動物血清アルブミン（ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ヤギ血清アルブミン（ＧＳＡ）、ヒツジ血清アルブミン（ＳＳＡ）、ウサギ血清アルブミン（ＲＳＡ））の選択性係数を示す。

[図3]図３は、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）および実肉抽出物中のＰＳＡの検量線を示す。

[図4]図４は、ＰＳＡ検出用バイオ／アビオティックサンドイッチアッセイの分析性能を示す。

[図5]図５は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）のブタ肉不純物の検出比較結果を示す。

[図6]図６は、作製したサンドイッチアッセイの各ＨＳＡ濃度における蛍光応答結果を示す。

[図7]図７は、作製したサンドイッチアッセイの選択性評価結果を示す。

[図8]図８は、作製したサンドイッチアッセイを用いたＨＳＡおよびＧＡの検出結果を示す。

## 発明を実施するための形態

[0010] 以下に、本開示をさらに詳細に説明する。

[0011] 本開示の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の表現（例えば、英語の場合は「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」等）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本開示中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本開示（定義を含めて）が優先する。

[0012] （定義）

最初に本明細書において使用される用語および一般的な技術を説明する。

[0013] 本明細書において「検出」とは、対象（本明細書において、「検出対象」ともいう。）を微量の成分などを検査して見つけ出すことをいう。「検出対象」は、検出されるべき任意の物質であればよく、タンパク質、糖、脂質、核酸、代謝物、ウイルス、大腸菌をはじめとした細菌、微生物類、アスベストなどの鉱物、それらの複合体などの生体物質の他、他の種類の成分であってもよい。

[0014] 本明細書において「結合」とは、二つ以上のものが結びついて一つになることをいう。本明細書では、「（検出対象または検出対象の結合物質等）に結合

する能力」とは、粒子についていうとき、その粒子が、対象となる検出対象や結合物質と、何らかの作用により結合することができる構造を有していることをいう。代表的には、「（検出対象または検出対象の結合物質等）に結合する能力」は、検出対象と結合することができる相互作用基、結合物質と結合する結合物質結合基等を配置することで付与され得る。

[0015] 本明細書において「複合体」とは、2種類以上の実体が組み合わさり、相互作用または結合によって、一体化した状態にある物体をいう。例えば、第一の粒子と第二の粒子と検出対象と検出対象の結合物質との複合体とは、これらの４種類の物体が、相互作用または結合によって、一体化している状態にあることおよびその一体化した物体自体をいう。

[0016] 本明細書において「シグナル」とは、最広義に解され、何らかの情報を伝える手段または媒体をいい、光、蛍光、磁気、化学反応、物理変化等であり得る。シグナルが生成、消失または変化することを検知することで、本開示では、検出対象を検出することができる。

[0017] 本明細書において「収容」とは、当該分野で用いられる最広義に解され、代表的には基材における空間などについていい、検出対象または検出対象の結合物質等の対象物を、おさめ入れることをいう。ある部分（例えば、空間形成部）が対象を収容することができるとは、対象をおさめるおよび/または固定するのに十分な空間を有し、本開示の検出のステップにおいて少なくとも実質的に対象が空間形成部等に相互作用などを介して一体化し状態を維持することができることをいう。

[0018] 本明細書において「露出」とは、ある表面についていうとき、ある露出対象物（例えば、検出対象と結合することができる相互作用基、結合物質と結合する結合物質結合基等）が、その表面が存在する部分（例えば、空間形成部）において、その露出対象物が目的とする機能（例えば、相互作用基であれば相互作用することができ、結合基であれば結合することができることをいう。）が発揮できるような状態にあることをいう。

[0019] 本明細書において「修飾」とは、「改変」と同じ意味で用いられ（英語ではいずれもｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎという。）、共有結合または非共有結合により物質同士が分子間の化学結合している任意の結合または相互作用を変化させることをいう。本開示では、粒子に種々の相互作用基や結合基を修飾させて配置することができ、そのような修飾は、例えば、水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用、分子間相互作用、van der Waals力等によって実現することができるが、修飾のメカニズムはこれらに限定されない。

[0020] 本明細書において「配置」とは、代表的に共有結合または非共有結合により基材等のある物体に目的とする物質（例えば、粒子など）を結合させることをいう。

[0021] 本明細書において「基」とは、別途指定されない限り、一価基を意味する。一価基でない例としては、アルキレン基（２価）等が挙げられる。また、本明細書において使用される場合、「基」なる用語を省略する場合もあり、説明の箇所では併記されることもある。

[0022] 本明細書において、「相互作用基」とは、別の対象と相互作用する基であって、本開示においては、標的物質上の官能基と相互作用し得る基であり、代表的に空間形成部に少なくともその一部が露出するように配置されることで検出対象と結合することができる基をいう。相互作用基は、本開示の目的であるセンシングに支障がなければ任意の相互作用し得る基を使用し得、代表的にアミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基が用いられる。

[0023] 本明細書において、「結合物質」とは、標的物質、例えばセンシングの対象と結合し得る物質であり、結果として、検出や判定などが行うことができるような物質をいう。代表的には、結合物質は、抗体、リコンビナントであり得

る抗体誘導体(抗体断片、VHH抗体(ナノボディ)など）、結合タンパク質（例えば、標的選択的結合タンパク質）、核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーなどのアプタマーなどを挙げることができるがこれらに限定されない。

[0024] 本明細書において、「結合物質結合基」とは、結合物質に対して結合することができる基をいい、代表的に空間形成部の表面に配置される結合物質と結合する基をいう。結合物質結合基は、結合物質と適合し得、および／または検出などの本開示の目的に適合すれば任意の基を用いることができ、例えば、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基を用いることができる。

[0025] 本明細書において「シグナル物質」とは、本開示の目的である検出を容易または可能にする物質をいい、検出対象が存在することで直接的または間接的に何らかのシグナル（光、蛍光、磁気、化学反応、物理反応等）を発生しる物質であり、その結果標的物質を検出することができる物質をいう。代表的には、結合物質と連携して検出対象が結合すると、結合後の状態でシグナル物質が活性化されシグナルを発生するものである。シグナル物質は、シグナルを発生することができる物質であれば任意の物質を用いることができ、代表的には、光学、磁気、電気化学、もしくは超音波により活性される物質、放射性元素含有物質、または酵素などであり、具体的には、例えば、蛍光分子、放射性元素含有物質、磁性物質、電気活性物質、$^{19}F$、ラマンプローブ等が挙げられる。検出容易性等の観点から、シグナル物質としては蛍光物質であることが好ましい。例えば、蛍光物質・蛍光物質ペアまたは蛍光物質・消光物質ペアを導入することで、標的物質の結合をＦｏｒｓｔｅｒ共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）の阻害（または促進）によって検出することができる。また、別の例では、酵素カスケードを形成する異種酵素を導入することで、酵素カスケード阻害を検出

することで、標的物質を検出することができる。また、別の例では、電気活性物質を導入することで、活性物質の酸化還元反応に伴う電流値や電位、電気抵抗の変化によって検出することができる。また、別の例では、化合物の元素のいくつかを$^{19}$Fに置換することで、NMR,MRI等で化合物中の$^{19}$Fを検出することで、標的物質を検出することができる。また、別の例では、ラマンプローブを導入することで、導入したプローブに由来する特徴的なピーク波長の散乱強度変化によって検出することができる。検出容易性等の観点から、シグナル物質としては蛍光物質であることが好ましいがこれに限定されない。

[0026] 本明細書において「検出可能なシグナル」が生成されるとは、本開示の目的である検出を容易または可能にするなんらかにシグナルが生成されることを言い、検出対象が存在することで、代表的には、検出対象と検出対象の結合物質とが複合体化することで、好ましくは第一の粒子と第二の粒子と検出対象と検出対象の結合物質との複合体が生じることで、直接的または間接的に発生、消失または変化する何らかのシグナル（光、蛍光、磁気、化学反応、物理反応等）である。このようなシグナルは、シグナル物質が存在すると、検出可能なシグナルが発生または増強される。シグナルを発生、消失または変化した結果標的物質を検出することができる。代表的には、結合物質と連携して検出対象が結合すると、結合後の状態でシグナル物質が活性化されシグナルを発生する。

[0027] 本明細書において、「シグナル物質結合基」とは、シグナル物質に対して結合することができる基をいい、代表的に空間形成部の表面に配置されるシグナル物質と結合する基をいう。代表的には、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケルーニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、アジド基、アルキン基、ジベンゾシクロオクチン基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基などを挙げることができる。

[0028] シグナル物質結合基と結合物質結合基は任意の組み合わせで使用され得るが、特定の実施形態では、以下の組み合わせで用いられる。

[0029] [表1A-1]

| シグナル物質結合基<br>結合物質結合基 | シグナル物質上の官能基<br>結合物質上の官能基 |
|---|---|
| 酸性基<br>(カルボキシ基、スルホ基、リン酸基、シラノール基等) | 塩基性基<br>(1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、4級アンモニウム基、ピリジル基、グアニジノ基、アミジノ基、イミダゾール基、アミノオキシ基等) |
| 塩基性基<br>(1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、4級アンモニウム基、ピリジル基、グアニジノ基、アミジノ基、イミダゾール基、アミノオキシ基等) | 酸性基<br>(カルボキシ基、スルホ基、リン酸基、シラノール基等) |
| 芳香族基<br>(置換又は無置換のアリール基、アリーレン基等) | 芳香族基<br>(置換又は無置換のアリール基、アリーレン基等) |
| アルキル基<br>(C=6以上の直鎖または分岐構造) | アルキル基<br>(C=6以上の直鎖または分岐構造) |
| ポリヒスチジン(His)タグ<br>(6×His, 8×His, 10×His 等) | 金属錯体<br>(Ni-NTA(ニッケル-ニトリロトリ酢酸由来基)等) |
| 金属錯体<br>(Ni-NTA(ニッケル-ニトリロトリ酢酸由来基)等) | ポリヒスチジン(His)タグ<br>(6×His, 8×His, 10×His 等) |

[0030] [表1A-2]

| | |
|---|---|
| マレイミド基、アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ビリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等 | チオール基 |
| チオール基 | マレイミド基、アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ビリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等 |
| アミノ基（1級アミノ基、2級アミノ基） | マレイミド基 |
| マレイミド基 | アミノ基（1級アミノ基、2級アミノ基） |
| アミノ基（1級アミノ基、2級アミノ基、アミノオキシ基） | カルボニル基・アルデヒド基 |
| カルボニル基・アルデヒド基 | アミノ基（1級アミノ基、2級アミノ基、アミノオキシ基） |
| アミノ基（1級アミノ基、2級アミノ基）<br>水酸基、フェノール性水酸基、チオール基 | カルボン酸活性エステル基 |
| カルボン酸活性エステル基 | アミノ基（1級アミノ基、2級アミノ基）<br>水酸基、フェノール性水酸基、チオール基 |
| ボロニル基 | cisジオール基<br>（糖基） |
| cisジオール基<br>（糖基） | ボロニル基 |
| アミノ基 | (チオ)ラクトン基 |
| (チオ)ラクトン基 | アミノ基 |
| アルキン基およびその誘導体 | アジド基 |
| アジド基 | アルキン基およびその誘導体 |

[0031] [表1A-3]

| | |
|---|---|
| ビオチン<br>(ビオチン、デスチオビオチンおよびイミノビオチン誘導体) | アビジン<br>(avidin, Neutravidin, Streptavidin) |
| アビジン<br>(avidin, Neutravidin, Streptavidin) | ビオチン<br>(ビオチン、デスチオビオチンおよびイミノビオチン誘導体) |
| グルタチオン(GSH) | グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) |
| グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) | グルタチオン(GSH) |
| Phos-tag | リン酸イオン |
| リン酸イオン | Phos-tag®(リン酸モノエステルアニオン($R\text{-}OPO_3^{2-}$)を中性pH(生理的pH)において捕捉する機能性分子) |
| オリゴヌクレオチド基 | オリゴヌクレオチド基 |
| オリゴペプチド基 | オリゴペプチド基 |
| アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基 | 水素結合可能な官能基全般 |

[0032] 本明細書において「基材」とは、粒子を配置し、および／またはセンサの土台となる物質をいう。基材の材料は、例えば、金属、金属酸化物、ガラス、紙（セルロース）、二酸化ケイ素、シリコンおよび樹脂ならびにこれらの組合せからなる群から選択される材料であってよい。金属としては、金、銀、銅、アルミニウム、チタン、タングステン、およびモリブデン等が挙げられるが、これらに限定されない。樹脂としては、ポリ（メタ）アクリレート、ポリスチレン、アクリロニトリル－ブタジエン－スチレン共重合体（ＡＢＳ）、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリウレタン、シリコーン樹脂、フッ素樹脂、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、および塩化ビニル樹脂等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0033] 本明細書において使用される基材は、ポリマーマトリックスとともに用いられることがある。本明細書において「ポリマーマトリックス」とはマトリック

スを形成するポリマーを言い、通常モノマーが重合してできた物質をいう。有利には、マトリックスは、本開示の分析用センサまたは分析用センサ用基材において配置されるとき、センサに適している形状および構造を有していればどのような形状または構造であってもよい。マトリックスの形状または構造は、例えば薄膜状または球状(粒子状)である。マトリックスの好ましい構成としては、標的以外のものの吸着をできるだけ抑制するため、生体適合性の高いものが主成分である。

[0034] 本明細書において「ポリマーマトリックスの原料」とは、反応させることによってポリマーマトリックスを形成することができる原料をいう。一般に、ポリマーマトリックスを形成するためには、少なくとも１種のモノマーと少なくとも１種の適切な重合開始剤とを含むことで十分であるが、これら以外にも、例えば、追加のモノマー（一部重合していてもよい）、追加の重合開始剤、架橋剤、可逆的付加開裂連鎖移動（ＲＡＦＴ）剤、触媒、還元剤または溶媒等を含むことができる。モノマーとしては、スチレン、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド、２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等が挙げられるが、これらに限定されない。重合開始剤としては、２，２’－アゾビス（イソブチロニトリル）（ＡＩＢＮ）、α－ブロモイソ酪酸エチル等が挙げられるが、これらに限定されない。架橋剤は、メラミン化合物、グアナミン化合物、グリコールウリル化合物、Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド、および(トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ポリ)エチレングリコールジメタクリレート等が挙げられるが、これらに限定されない。ＲＡＦＴ剤としては、ベンゾジチオ酸ベンジル、２－シアノ－２－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］プロパン等が挙げられるが、これらに限定されない。触媒としては、$CuBr_2$等が挙げられるが、これらに限定されない。還元剤としては、アスコルビン酸等が挙げられるが、これらに限定されない。溶媒としては、一般的に溶媒として知られているものから特に制限なく選択され、例えば純水、任意の緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水等）、メタノール（ＭｅＯＨ）、エタノール（ＥｔＯＨ）、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）および

ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、溶媒は緩衝液である。

[0035] 本明細書において「センサ」とは標的物質を検出することができるデバイスをいう。本開示におけるセンサは、好ましくは特異的に認識し、検出、分析、検知等の機能を実現することができる。

[0036] 本明細書において「センシング用基材」とは、センサの作製をするための任意の基材を言い、形状および材質はセンサに適切な限り任意のものを使用することができる。好ましくは、分析用センサ作製用基材は、基材に第一の粒子を修飾することによって、ユーザが、検出対象をより一層感度高く検出可能なセンサへ簡便にカスタマイズできるように構成されていることが有利である。本明細書において「センサ作製用基材」は「測定基材」ともいう。

[0037] 本開示のセンサまたはセンシング基材には、分子インプリントポリマーを用いることができる。本明細書において「分子インプリントポリマー」とは、分子インプリント技術によって合成される任意のポリマーをいい（Ｔａｋｅｕｃｈｉ．Ｔ ｅｔ． ａｌ． Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ， ２０１６，３７ （２）， ４３－６４．を参照）、好ましくは、標的物質またはその誘導体と機能性モノマーの複合体を共有結合および／または非共有結合にて形成し，架橋剤とともに重合し、ポリマーマトリックスを形成した後，標的物質を除去することで得られる標的物質に対する結合空間を持つ物質認識材料をいう。この空間形成部には標的分子上の官能基に対して相補的な官能基が標的分子が結合する上で都合よく配置されている。分子インプリントポリマーを用いた基材やセンサの基本的な技術は、ＷＯ２０１８／２２１２７１などに記載され、その内容は必要に応じて本明細書において参考として援用される。

[0038] 本明細書において「ポリマーマトリックスが重合する条件」または「ポリマーマトリックスの原料が重合する条件」とは、ポリマーマトリックスの原料が存在する場合、当該原料が重合してポリマーマトリックスを生成することができる条件をいう。ポリマーマトリックスの重合などにより基材の作製につい

ては、ＷＯ２０１８／２２１２７１などを必要に応じて参照することができ、これらの内容は本明細書において参考として援用される。

[0039] 本明細書において「機能性モノマー」とは、重合されたときに、作製されるポリマーマトリックスまたは当該ポリマーマトリックスを用いるセンサまたは基材において、何らかの機能を付与し得る官能基を言い、例えば、分子間の化学結合基として塩基性基、酸性基、置換または無置換の芳香族基およびボロニル基等を有するモノマーが挙げられる。塩基性基としては、置換または無置換のアミノ基、置換または無置換の含窒素芳香族基、アミジノ基、およびグアニジノ基等が挙げられるが、これらに限定されない。酸性基としては、カルボキシル基、スルホ基およびリン酸基等が挙げられるが、これらに限定されない。置換または無置換の芳香族基としては、置換または無置換のアリール基、および置換または無置換のアリーレン基等が挙げられるが、これらに限定されない。また上記の官能基は、１つ以上または１種以上使用してもよく、複数または複数種含有する化合物を用いても良いし、複数または複数種の化合物を組み合わせて使用しても良い。

[0040] 本開示のセンサには、検出対象の測定または検出に種々の物質を用いることが必要な場合がある。ここで測定または検出に必要な「測定用に必要な物質」とは標的物質を捕捉し、検出することができる物質をいう。測定用に必要な物質としては、例えば、標識等のシグナル物質、抗体等の結合物質（捕捉剤（測定対象を捕捉するための任意の薬剤）も例示される）等があげられる。抗体等の結合物質とは、例えば、抗体、抗体断片等の抗体誘導体、核酸アプタマー（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ペプチド核酸、人工核酸含む）、ペプチドアプタマー、およびリン脂質認識タンパク質、レクチンなどの標的選択的でありうる結合タンパク質を挙げることができる。

[0041] 本明細書において「結合タンパク質」とは、標的物質、例えばセンシングの対象と結合し得るタンパク質であり、結果として、検出や判定などが行うことができるようなタンパク質であり特定の状況下で抗体および抗体誘導体以外のものを指す。結合タンパク質としては、ペプチドアプタマー、およびリン脂質

認識タンパク質、糖結合タンパク質、酵素、金属結合性タンパク質、生物活性物質受容体タンパク質などを挙げることができる。

[0042] 本明細書において「抗体誘導体」とは、抗体と同様の機能を発揮する任意の物質をいう。例えば、抗体断片、VHH抗体(ナノボディ)、アフィボディ（Affibody）、アフィマー、モノボディ等を挙げることができる。

[0043] 本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、ＲＩ（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。本明細書において、マーカーまたはそれを捕捉する因子または手段を複数（２以上）、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、１０ｎｍ以上であることが好ましい。リガンドを標識する場合、機能に影響を与えないものならば何れも用いることができるが、蛍光物質としては、Ａｌｅｘａ™Ｆｌｕｏｒ　ＢＯＤＩＰＹ、ＡＴＴＯ、量子ドット（ＱＤｏｔ）および蛍光タンパク質（ＧＦＰ，　ＹＦＰ，　ｍＣｈｅｒｒｙなど）が例示される。Ａｌｅｘａ™Ｆｌｕｏｒは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またｐＨ感受性が低い。蛍光極大波長が１０ｎｍ以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、Ａｌｅｘａ™５５５とＡｌｅｘａ™６３３の組み合わせ、Ａｌｅｘａ™４８８とＡｌｅｘａ™５５５の組み合わせ等を挙げることができる。核酸を標識する場合は、その塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、ＣｙＤｙｅ™シリーズのＣｙ３、Ｃｙ５等）、ローダミン６Ｇ試薬、２－アセチルアミノフルオレン（ＡＡＦ）、ＡＡＩＦ（ＡＡＦのヨウ素誘導体）等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が１０ｎｍ以上である蛍光物質としては、例えば、Ｃｙ５とローダミン６Ｇ試薬との組み合わせ、Ｃｙ３とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン６Ｇ試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を

挙げることができる。本開示では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

[0044] 本明細書において「標的物質」とは「検出対象」または「分析対象」とも称され、場合により交換可能に用いられ、本開示のセンサまたは方法の対象をいう。標的物質は、目的を達成し得る、例えば、センサの対象を検知または分析等を行い得る限り、どのような対象または物質でもよい。

[0045] 本明細書において「センサで所望される性質」とは、センサにおいて用いられる場合に、標的物質に結合することができる性質、および/またはシグナル物質と結合できる性質を含むがこれらに限定されない。

[0046] 本明細書において「食品分析」とは、食品中に含まれる成分を分析し、食品中に含まれる特定の物質を検出することをいう。例えば、意図されるまたは意図されない成分（例えば、ハラル食品のための、食品中に豚由来の成分）が含まれているかの分析等が挙げられるが、これに限定されない。

[0047] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本開示中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0048] １つの局面において、本開示は、検出対象を検出するためのキットを提供する。ここで、本開示のキットはA)検出対象または検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子と、B)検出対象または検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子とは異なるシグナル物質に結合する能力を有する第二の粒子と、を含み、検出対象と検出対象の結合物質とが複合体化すると、検出可能なシグナルが、生成、消失または変化する。第一の粒子と第二の粒子

とを組み合わせて標的物質の検出センサに用いることで、アッセイの感度は、これまでに報告されているＥＬＩＳＡ、サンドイッチＥＬＩＳＡ、ラテラルフロー免疫センサに基づく免疫測定法よりも高く検出することができる。本開示のセンサの利点は、高感度と選択性だけでなく、標的物質の検出における分析時間の短縮を挙げることができる。

[0049] 本明細書において、第一の粒子と第二の粒子は以下のように模式的に説明することができる。

[0050] 一つの実施形態では、第一の粒子は、代表的には捕捉分子インプリントポリマー（ＭＩＰ）ナノ粒子として説明され（下記模式図では捕捉ＭＩＰナノ粒子と称しているが、あくまでも例示であり、ナノレベルのサイズである必要はない。）、機能性モノマー(例えば、ピロリジルアクリレート)などとブタ血清アルブミン（ＰＳＡ）のような対象と接触させ、重合化条件（例えば、７０℃などを例示するがこれに限定されない。）で適宜の時間（例えば１２時間を例示するがこれに限定されない。）において重合させ、粒子を形成し、精製することでＰＳＡのような対象を除去し、各種結合基を必要に応じて固定化することで対象となるＰＳＡ等に結合する結合用の空間形成部を形成し、第一の空間形成部は第一の空間形成部に少なくともその一部が露出するように検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に結合物質と結合する結合物質結合基を配置させることができる（ここでは固定化ＰＳＡ－ＭＩＰ－ＮＧｓを例示するがこれに限定されない。）。

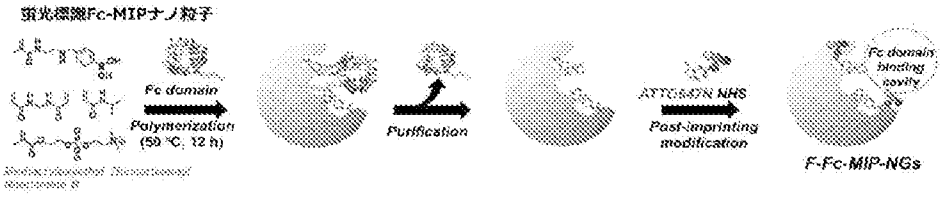
[0051] [化1]




[0052] 一つの実施形態では、第二の粒子は、代表的には（蛍光などの）標識Ｆｃ－ＭＩＰナノ粒子を例示として説明でき、機能性モノマー（例えば、（４－（（（２－メタクリルアミドエチル）アミノ）メチル）フェニル）ホウ酸）などとＦｃドメインなどの検出対象または前記検出対象の結合物質（またはその

一部）を用いて重合化条件（例えば、５０℃）で適切な時間（１２時間など）重合化させ粒子を形成し、Ｆｃドメイン等の検出対象または検出対象の結合物質は精製し除去することで、Ｆｃドメインなどに対応した空間形成部が形成され、必要に応じてその一部が露出するように各種結合基（例えば、検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に結合物質と結合する結合物質結合基およびシグナル物質と結合するシグナル物質結合基）を配置した第二の粒子を形成することができる。例えばこの粒子にＡＴＴＯ６４７Ｎ　ＮＨＳを反応させることで空間形成部内に蛍光分子をシグナル物質として導入することができる（模式図では、Ｆ－Ｆｃ－ＭＩＰ－ＮＧｓと称しているがこれに限定されない。）。

[0053] [化2]




[0054] 別の実施形態では、本開示の第一の粒子は、検出対象または検出対象の結合物質を収容する第一の空間形成部を有し、第一の空間形成部は第一の空間形成部に少なくともその一部が露出するように検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に結合物質と結合する結合物質結合基を有する。ここで、一つの実施形態では第一の粒子または第二の粒子は、基材とともに提供され、基材上に配置されることができる。

[0055] 別の実施形態では、本開示の第二の粒子が、検出対象または検出対象の結合物質を収容する空間を形成する第二の空間形成部を有し、第二の空間形成部は、第二の空間形成部に少なくともその一部が露出するように検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に前記結合物質と結合する結合物質結合基およびシグナル物質と結合するシグナル物質結合基を含む。

[0056] 別の実施形態では、本開示の第一の粒子のみ、基材に結合した本開示の第一の粒子、基材に本開示の第一の粒子、本開示の第一の粒子と本開示の第二の粒

子、基材に結合した本開示の第一の粒子と本開示の第二の粒子、基材と結合した本開示の第一の粒子と本開示の第二の粒子、本開示の第一の粒子と検出対象の結合物質に結合した本開示の第二の粒子、基材に結合した本開示の第一の粒子と検出対象の結合物質に結合した本開示の第二の粒子、基材に結合した本開示の第一の粒子と検出対象の結合物質に結合した本開示の第二の粒子、本開示の第二の粒子、検出対象の結合物質に結合した本開示の第二の粒子を提供する。

[0057] 別の実施形態では、本開示の結合物質は、２種類以上使用され、その検出対象が重複するものでも異なるものでもよい。また本開示の２種類以上の結合物質は、同種の結合物質であっても、異種の結合物質であってもよく、結合物質の結合基は、本開示の異種の結合物質ごとに異なる。本開示の２種類以上の結合物質は、検出対象と検出対象の結合物質とが複合体化すると、結合物質ごとにそれぞれ異なる検出可能なシグナルが、生成、消失または変化してもよい。それぞれ異なる検出可能なシグナルが、生成、消失または変化することにより、同一センサを用いて、異なる検出対象を測定することができ、さらに1つのセンサを用いて、1種または複数種の検出対象を同時にまたは逐次的に分析することができる。

[0058] 別の局面では、本開示は本開示のキット、基材またはセンサを用いて試料において検出対象を検出する方法を提供する。この方法は、

（Ａ）本開示のキット、本開示のセンシング用基材、または本開示に記載の分析用センサを提供する工程、

（Ａ’）必要に応じて、シグナル物質および／または結合物質を、前記第一の粒子および第二の粒子に結合させる工程と

（Ｂ）前記試料を前記検出対象に結合する能力を有する粒子と接触させる工程と、

（Ｃ）前記結合物質が結合した粒子を、（Ｂ）で試料を接触させた前記粒子と接触させる工程と

（Ｄ）必要に応じて前記シグナル物質を活性化する（例えば、蛍光物質である場合、蛍光が発せられる条件に供する）ことで、前記第一の粒子と前記第二の粒子と前記検出対象と前記検出対象の結合物質との複合体が存在する場合に生成される、前記検出可能なシグナルを検出する工程と

（Ｅ）必要に応じて前記シグナルに基づき計算処理をして前記検出対象を検出する工程とを包含する。

[0059] 一つの実施形態では、本開示方法は、検出対象を分析する工程をさらに包含してもよい。ここで用いられる分析手法は、検出された情報に基づいて実現できるものであれば、どのような分析であってもよい。例えば、医学的、生物学的、食品用途などの分析が挙げられるがこれらに限定されない。

[0060] 一つの実施形態では、本開示のキットは、本開示の使用方法を記載した指示書を含みうる。使用方法は以下のように説明することができる。

[0061] （１）本開示のキットに含まれる、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子には、適時に検出対象または検出対象の結合物質（例えば、ＰＳＡ）を接触させ複合体化させておく。

[0062] 好ましくは、検出対象または検出対象の結合物質を収容する第一の空間形成部を有し、第一の空間形成部は前記第一の空間形成部に少なくともその一部が露出するように前記検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に結合物質と結合する結合物質結合基を有するように構成しておく。

[0063] （２）本開示のキットに含まれる、検出対象または検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子とは異なるシグナル物質に結合する能力を有する第二の粒子は、所望のシグナル物質（例えば、ＡＴＴＯ６４７Ｎであり得るがこれに限定されない。）を複合体化させておく。キットではシグナル物質（例えば、ＡＴＴＯ６４７Ｎであり得るがこれに限定されない。）が結合された状態で提供されてもよい。

[0064] 好ましくは、第二の粒子は、第一の粒子が結合する対象（検出対象または検出対象の結合物質）に結合する物質（第一の粒子が検出対象を結合する場合

は、当該検出対象の結合物質であり、第一の粒子が検出対象の結合物質を結合する場合は、当該検出対象）を収容する第一の空間形成部を形成しておく。

[0065] （３）第一の粒子が検出対象を収容するように構成している場合、第二の粒子には、検出対象の結合物質を複合体化させる。他方、第一の粒子が検出対象の結合物質を収容するように構成している場合は、第二の粒子には、検出対象を含むと予想される試料を接触させ、複合体化させる条件に供する（下記化３では前者を例示している）。

[0066] （４）必要に応じて、粒子は、基板などセンシングを容易にする補助部材に固定して用いることができる。固定する場合は、基板に固定対象の粒子の固定化させるための官能基を配置し（化３では、ＮＨＳ、ＥＤＣを使用）、予め粒子を固定して提供または使用時に固定することができる。固定は第一または第二の粒子のいずれでもよく両方してもよい。模式図では第一の粒子が固定されている。

[0067] （５）ユーザーは、目的とする検出対象に適合した粒子を選択し、当該検出対象に適合した結合物質（例えば、抗体、抗体誘導体などであり、例えば、検出対象がＰＳＡである場合は、抗ＰＳＡ抗体を例示できる。）を準備する。このような結合物質はキットに提供されてもよい。

[0068] （６）ユーザーは、検出対象の結合物質を収容するように構成された粒子（化３では第二の粒子）にアッセイ前に当該検出対象の結合物質が粒子に複合体化する条件に供しておき、複合体化しておく。複合体化された状態でキットで提供されてもよい。

[0069] （７）（６）までが準備できた段階で、検出対象を含むと推測されるサンプルを検出対象の結合物質が配置された（複合体化された）粒子と、検出対象と結合物質との複合体化が生じる条件に供する。このとき、サンプルに検出対象が存在する場合は、結合物質を含む粒子が検出対象と複合体化されている。

[0070] （８）ユーザーは検出対象を収容するように構成された粒子（化３では第一の粒子、好ましくは固定されている）を、（７）で生じた複合体を含むと予想される試料を接触させる。検出対象が存在する場合は、シグナル物質からのシ

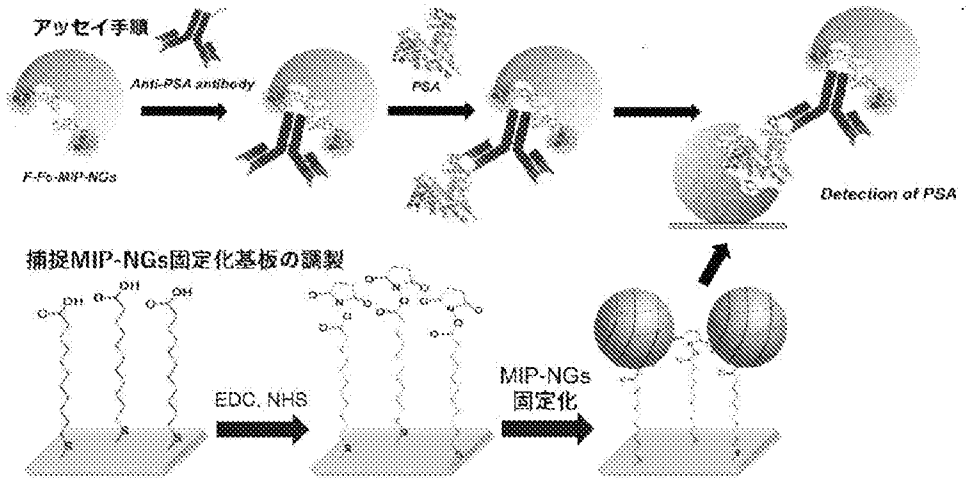
グナルが発せられる。好ましい実施形態では、基板に固定されているため、基板上に、シグナルを観察することができる。

[0071] （９）観察されたシグナルに基づいて、検出対象となる検出対象の有無、量、レベルなどを測定、判定することができる。

[0072] 一つの特定の実施形態では、下記の模式図（化３）を用いて、代表例でさらに説明すると、検出対象であるＰＳＡなどに結合する結合物質として、代表的に抗ＰＳＡ抗体を対象として用いる場合、第二の粒子と結合物質とを使用前または使用時に混合して結合物質と第二の粒子とが結合するのに十分な条件で結合させ、その後、実際の検査またはアッセイを行う。この検査またはアッセイにおいては、対象が含まれると推測されるサンプル（以下の模式図ではＰＳＡと表示）を第二の粒子と相互作用が生じる条件（ここではＰＳＡと抗ＰＳＡ抗体とが結合するのに十分な条件）で接触させる。その後、第二の粒子を検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子（ここでは、ＰＳＡと結合するように準備されている。）に接触させ、抗ＰＳＡ抗体とＰＳＡとが相互作用し得る条件に配置して、第一の粒子と第二の粒子とが複合化するようにし、その状態でシグナル物質から発せられるシグナルを検知することでセンシングを実施することができる。

[0073] なお、好ましい実施形態では、第一の粒子は、下記模式図で示されるように、基板に固定して用いてもよい。固定する場合、好ましくは事前に第一の粒子（ここでは、代表的に捕捉ＭＩＰ－ＮＧｓとしている）を適宜の基板に固定しておくことができる。固定には、基板をあらかじめ1(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド　塩酸塩（ＥＤＣ），N-ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）などの固定用の試薬を用いて修飾を行い、第一の粒子を固定が起きる条件にて配置することで、第一の粒子を基板に固定することができる。

[0074] [化3]




[0075] 本明細書において、粒子を形成する際に使用されるポリマーマトリックスの原料は、意図する分析に適切な材料であれば、どのような物質を使用してもよい。ポリマーマトリックスの原料は、一般に、ポリマーマトリックスを形成するためには、少なくとも１種のモノマーと少なくとも１種の適切な重合開始剤とを含むことで十分であるが、これら以外にも、例えば、追加のモノマー（一部重合していてもよい）、追加の重合開始剤、架橋剤、ＲＡＦＴ剤、触媒、還元剤または溶媒等を含むことができる。モノマーとしては、スチレン、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド、２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等が挙げられるが、これらに限定されない。重合開始剤としては、２，２’－アゾビス（イソブチロニトリル）（ＡＩＢＮ）、α－ブロモイソ酪酸エチル等が挙げられるが、これらに限定されない。架橋剤は、メラミン化合物、グアナミン化合物、グリコールウリル化合物、Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド、および（トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ポリ）エチレングリコールジメタクリレート等が挙げられるが、これらに限定されない。ＲＡＦＴ剤としては、ベンゾジチオ酸ベンジル、２－シアノ－２－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］プロパン等が挙げられるが、これらに限定されない。触媒としては、$CuBr_2$等が挙げられるが、これらに限定されない。還元剤としては、アスコルビン酸等が挙げられるが、これらに限定されない。溶媒としては、一般的に溶媒として知られているものから特に制限なく選

択され、例えば純水、緩衝液、メタノール、エタノール、ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）およびジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0076] 本開示において、第一の粒子を基材に配置する工程は、任意の方法で実施することができ、例えば、本開示の粒子を溶液中に分散し、基材上に滴下して、静置することにより配置する。

[0077] １つの実施形態において、相互作用基は、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴヌクレオチド基であってもよい。ここで本開示の相互作用基は１つまたは２つ以上、あるいは１種または２種以上含まれてもよい。１つの実施形態において、結合物質結合基は、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、または、オリゴヌクレオチド基であってもよい。ここで本開示の結合物質結合基は１つまたは２つ以上、あるいは１種または２種以上多く含まれてもよい。１つの実施形態において、シグナル物質は、蛍光分子、放射性元素含有物質、磁性物質、電気活性物質、$^{19}F$、ラマンプローブ、または酵素であり、好ましくは、蛍光分子であってもよい。１つの実施形態において、シグナル物質結合基は、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、アジド基、アルキン基またはジベンゾシクロオクチンであってもよい。１つの実施形態において、結合

物質は、抗体、リコンビナントの抗体誘導体(抗体断片、ＶＨＨ抗体（ナノボディ）、アフィボディ（Ａｆｆｉｂｏｄｙ）、アフィマー、モノボディ等）またはアプタマーであってもよい。

[0078] 別の局面において、本開示は、検出対象または検出対象の結合物質に結合する能力を有する粒子を提供する。この粒子は、検出対象を検出するためのものであり、これを第一の粒子として用いて、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力、およびシグナル物質に結合する能力を有する粒子（ここでは第二の粒子）とともに用いることができる。

[0079] 従って別の局面において、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力、およびシグナル物質に結合する能力を有する粒子を提供する。検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力、およびシグナル物質に結合する能力を有する粒子はこれを第二の粒子として用いて、検出対象または検出対象の結合物質に結合する能力を有する粒子（第一の粒子）とともに用いることができる。

[0080] 一つの実施形態では、検出対象または検出対象の結合物質に結合する能力を有する粒子および／または検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力、およびシグナル物質に結合する能力を有する粒子は、基材に配置されて提供されてもよい。

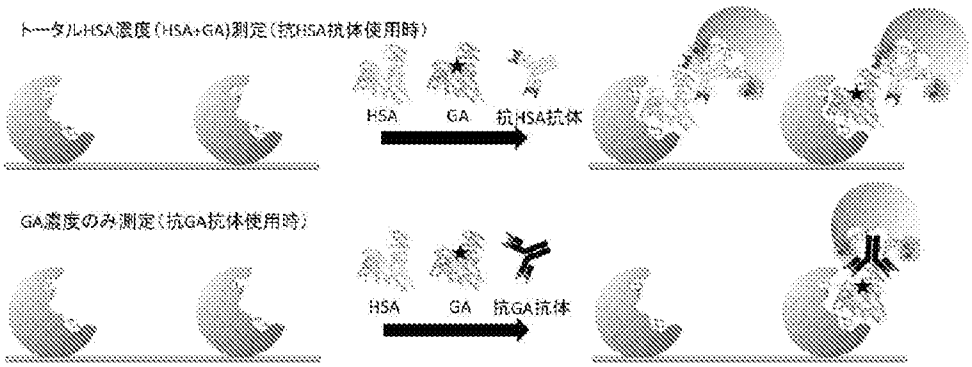
[0081] 一つの特定の実施形態では、下記の模式図（化４）を用いて、代表例でさらに説明すると、この例では、２種の検出対象が想定される。検出対象である第一の物質（アルブミン（ＨＳＡ）など）および第二の物質（グリコアルブミン（ＧＡ）など）の両方に結合する結合物質として、代表的に抗ＨＳＡ抗体を対象として用いる場合と、一方の物質のみ（例では、グリコアルブミン（ＧＡ））に結合し、他方の物質（アルブミン（図ではＨＳＡ））には結合しない結合物質（代表的に、抗ＧＡ抗体（ここでこの抗ＧＡ抗体は、アルブミンには有意に結合しない））が想定される。この実施形態では、２種類以上の結合物質を駆使することで、２種類以上の検出対象を適宜測定することができる。ここで、第二の粒子と結合物質のいずれか（両方でもよい）とを使用前または

使用時に混合して結合物質と第二の粒子とが結合するのに十分な条件で結合させ、その後、実際の検査またはアッセイを行う。次に、この検査またはアッセイにおいては、対象が含まれると推測されるサンプル（以下の模式図ではＨＳＡおよびＧＡと表示）を第二の粒子と相互作用が生じる条件（ここではＨＳＡまたはＧＡと抗ＨＳＡ抗体とが結合するのに十分な条件）で接触させる。その後、第二の粒子を検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子（ここでは、ＨＳＡまたはＧＡと結合するように準備されている。）に接触させ、抗ＨＳＡ抗体とＨＳＡまたはＧＡとが相互作用し得る条件に配置して、第一の粒子と第二の粒子とが複合化するようにし、その状態でシグナル物質から発せられるシグナルを検知することで検出対象であるＨＳＡおよびＧＡのレベルや濃度を検出することができる。同様の操作を、同じサンプルで異なる検出対象（下記の模式図（化４）においてＧＡのみ）と結合する第二の粒子（ここでは抗ＧＡ抗体を使用）を用いて行うことにより、異なる検出対象のレベルや濃度を検出することができる。したがって、同サンプル内の２種類以上の検出対象のレベルや濃度を測定することができ、サンプル内の検出対象の含有する比率を測定することができ、疾患の検出等に利用することができる。ここで、代表例で挙げたＨＳＡとＧＡとは、区別して検出することで、ＧＡ／ＨＳＡ等の数値から、糖尿病などの疾患またはその前状態を診断ないしスクリーニングすることができる。

[0082] なお、好ましい実施形態では、第一の粒子は、下記模式図で示されるように、基板に固定して用いてもよい。固定する場合、好ましくは事前に第一の粒子（ここでは、代表的に捕捉ＭＩＰ－ＮＧｓとしている）を適宜の基板に固定しておくことができる。固定には、基板をあらかじめ１（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド　塩酸塩（ＥＤＣ），Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）などの固定用の試薬を用いて修飾を行い、第一の粒子を固定が起きる条件にて配置することで、第一の粒子を基板に固定することができる。

[0083] 本開示において代表的な実施形態として、アルブミン糖化率測定キットが挙げられる。グリコアルブミン（ＧＡ）は血糖の管理指標で、主に糖尿病の検査に使用されている。アルブミン（ＨＳＡ）の一部は、血液中のブドウ糖とくっついてＧＡになり、ＧＡの量は血糖値が低ければ減少し、高ければ増加する。ＧＡは採血の、例えば、１ヵ月（特に直近の２週間前）前から採血時までの平均血糖状態がわかるので、食事によって変動しやすい血糖値測定より、病状を正確に判定できる。したがって、アルブミン糖化率測定本キットは、ＭＩＰナノ粒子固定化基板と同じ検出用ＭＩＰナノ粒子を用い、抗ＨＳＡ抗体を用いて血中総ＨＳＡ量、抗ＧＡ抗体を用いて血中ＧＡ量を測定することで、糖尿病の指標となるＨＳＡの糖化率を、通常のＥＬＩＳＡによる測定が4時間以上必要なところ、本開示を用いれば、4時間未満、好ましくは、3時間未満、2時間未満、1時間未満、さらに好ましい実施形態では約30分で測定可能となり、簡便、迅速な測定を達成した。

[0084] [化4]




[0085] （製造）

センサを製造するための工程は、以下のように実施することができる。国際公開第２０１６／０８８３８４号に記載と同様の方法で第一の粒子を作製することができる。国際公開第２０２１／１７２５９１号に記載と同様の方法で第二の粒子を作製することができる。第一の粒子を基材に固定化することができる。第二の粒子と測定試料の混合物を第一の粒子固定化基材に滴下し、蛍光

顕微鏡またはプレートリーダー等を用いて蛍光観察することにより、標的物質を検出することができる。

[0086] （用途）

本開示の分析用センサは、検出対象のセンシングに用いられる。より具体的な用途としては、特異的結合性基の種類に応じて決定されるが、例えば、腎機能、肝機能、炎症の有無又は程度；腫瘍の有無又は程度等に基づく診断目的又は治療モニタリング等の目的で用いることができる。本開示の分析用センサの用途は、ＷＯ２０１８／２２１２７１等に記載されておりその内容のすべてを必要に応じ本明細書において援用する。具体的には、例えば、低分子物質、タンパク質、及び膜構造を有する微小粒体が挙げられる。低分子物質としては、ホルモン・薬剤・除草剤・農薬・糖・コレステロール・脂質・尿酸・環境ホルモン・ペプチド等任意の物質が挙げられる。タンパク質としては、ＨＳＡ，ＩｇＧ，フィブリノーゲン，トランスフェリン、ＡＳＴ、ＡＬＴ、ＬＤＨ、ＡＬＰ、ＬＡＰ、γ－ＧＴＰ、ＣＲＰ、ＡＦＰ、ＰＳＡ等の任意のタンパク質が挙げられる。膜構造を有する微小粒体としては、細胞外微粒子、細胞内小胞、オルガネラ及び細胞が挙げられる。膜構造としては、脂質二重膜構造が挙げられる。細胞外微粒子としては、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体等が挙げられる。細胞内小胞としては、リソソーム、エンドソーム等が挙げられる。オルガネラとしてはミトコンドリア等が挙げられる。細胞としては、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）等の癌細胞、その他の疾患関連細胞等が挙げられる。本開示の技術は、分子インプリンティングを用いた空孔形成を基盤技術としたすべてのセンシングチップ作製に適用可能で、センシングチップの大量生産には重要でありうる。

[0087] 別の実施形態では、本開示の分析用センサは、以下の用途で用いることができる。

[0088] 測定対象のｉｎ　ｖｉｖｏ／ｉｎ　ｖｉｔｒｏイメージングや、治療への応用

健康診断または人間ドック

人体または環境中のウイルスセンサおよび

食品、農作物、家畜等の分析

に利用することができる。

[0089] 別の実施形態では、本開示の分析用センサは、食品分析に使用することができ、例えば、食品中の予め指定した成分（例えば、豚由来の成分）を検出することができ、食品がハラル食品であるかの分析をすることができる。

[0090] 別の実施形態では、本開示の分析用センサは、健康診断または人間ドックに使用することができ、例えば、膠原病検査、感染症検査、梅毒検査、痛風検査、高脂血症検査、糖尿病検査、肝・胆道系検査、腎機能検査、膵機能検査、および/またはウイルス抗原検査に利用することができる。

[0091] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本開示に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

## 実施例

[0092] 本実施例では、本開示の化合物の製造、用途に関する実施例を説明する。

[0093] （使用機器）

粒度分布とゼータ電位は、DLS（Dynamic Light Scattering）システムZetasizer Nano ZS（Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.）を使用して測定した。タンパク質濃度は、NanoDrop™ One UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)を用いて測定した。蛍光スペクトルは，F-2500 fluorescence spectrophotometer (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)を用いて得た。蛍光強度の測定は，蛍光顕微鏡（システムインスツルメンツ株式会社，東京，日本）を搭載した特注の液体分注ロボットを用いて行った。ELISAアッセイの450nmにおける吸光度は、Perkin Elmer Wallac Envision 2100 Multilabel Microplate Reader (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA)を用いて測定

した。透過型電子顕微鏡（TEM）観察は，JEM-2000FEX II（加速電圧：200kV，日本電子株式会社，東京，日本）を用いて実施した。

[0094] （使用試薬）

ヒト免疫グロブリンG（IgG）、ヒト血清アルブミン（HSA）、ブタ血清アルブミン（PSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）、ヤギ血清アルブミン（GSA）、ヒツジ血清アルブミン（SSA）、ウサギ血清アルブミン（RSA）、リゾチーム（Lyz）。N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、エタノールアミン、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、DEAE-セファデックスA50、はSigma-Aldrich（アメリカ、MO）より購入した。エチレンジアミンテトラアセテート（EDTA）、N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAm）およびN, N’-メチレンビスアクリルアミド（MBAA）はナカライテスク株式会社（京都、日本）より購入した。Sephadex G-100は、GEヘルスケア（東京、日本）から購入した。エタノール（EtOH）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、2, 2’-アゾビス（2-メチルプロピオンアミジン）ジヒドロクロライド（V-50）は和光純薬工業株式会社から購入した。(日本、大阪)から購入した。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）は、日油株式会社（東京、日本）から購入した。1(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)は東京化成工業(東京、日本)から購入した。Protein-Free (PBS) ブロッキングバッファーおよびMethacryloxyethyl Thiocarbamoyl Rhodamine B (MTRB) はThermo Fisher Scientific (MA, USA)から購入した。ATTO 647N NHS-esterは、ATTO-TEC GmbH (Siegen, Germany)から購入した。Pig Albumin ELISA Kit (E101-110) とブタ血清アルブミンのポリクローナル抗体 (Anti-PSA) は、Bethyl Laboratories, Inc (Montgomery, USA)から購入した。PSA認識能を有するPSA-MIP-NGは既報の手順で調製した(C. Cheubong, A. Yoshida, Y. Mizukawa, N. Hayakawa, M. Takai, T. Morishita, Y. Kitayama, H. Sunayama, T. Takeuchi, Anal. Chem. 2020. 92, 6401-6407.)。機能性モノマーとして4-(2-methacrylamidoethylaminomethyl) phenylboronic acid (MAPBA) は既報の手順

で合成した(T. Saeki, E. Takano, H. Sunayama, Y. Kitayama, T. Takeuchi, J. Mater. Chem. B, 2020, 8, 7987.)。

[0095] (実施例１：検出用の蛍光性Fcドメインインプリントナノ粒子(F-Fc-MIP-NG)の合成)

鋳型分子として Fc ドメイン (2.5 mg, 50 nmol)、機能性モノマーとして MAPBA (15.7 mg, 0.06 mmol)、蛍光モノマーとして MTRB (0.42 mg, 0.63 μmol)、MPC (3.7 mg, 0.012 mmol) および NIPAm (102 mg, 0. 9 mmol)、架橋剤として MBAA (7.71 mg, 0.05 mmol)、開始剤として V-50 (54.2 mg, 0.2 mmol) を 2% dimethyl sulfoxide を含む 10 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.2, 25 mL) に溶解させた。ナノゲルを，50℃，12時間，乳化剤フリーの沈殿重合を行い合成した。重合後、溶媒を10 mMリン酸緩衝生理食塩水 (PBS；140 mM of NaCl, pH 7.4) を用いて10 kDaカットオフの限外ろ過を行い (7500 ×g, 25 ℃で20分間3回)、回収したナノゲルをSDS水溶液 (40 mg／mL, 1 mL) とともに25 ℃で5分間インキュベートした。鋳型 (Fcドメイン) の除去は、公知の方法で、サイズ排除クロマトグラフィーに続いて陰イオン交換クロマトグラフィーで行った (C. Cheubong, A. Yoshida, Y. Mizukawa, N. Hayakawa, M. Takai, T. Morishita, Y. Kitayama, H. Sunayama, T. Takeuchi, Anal. Chem. 2020. 92, 6401-6407.) 最後に、PD-10カラム (Desaltカラム) を用いてSDSを除去する精製をさらに実施した。回収した画分 (2.5 mL) を脱塩カラム (PD-10) に適用し、10 mM PBSで溶出 (3.5 mL) し、SDSを除去することでFc-MIP-NGを得た。ナノゲル画分を回収するために、MTRB 残基からの蛍光 (λem: 575 nm、λex: 548 nm) をナノゲルのマーカーとして使用した。Fcドメインを添加せず、Fc-MIP-NGと同様の手順で非インプリントポリマーナノゲル (NIP-NG) を調製した。得られたMIP-NGおよびNIP-NGの精製前後の粒度分布を動的光散乱 (DLS) 測定により測定したところ、MIP-NGの粒度分布は、Fc-MIP-NGの粒度分布とほぼ同じであった。 ATTO 647N NHSエステルを蛍光レポーターとして、キャビティ内ポス

トインプリンティング修飾（PIM）によりF-Fc-MIP-NGsを作製した。得られたFc-MIP-NG（500 μg／mL, 1000 μL）をDMSO中10 mg／mL ATTO 647N NHS-ester 5 μLとともに25℃で2時間インキュベートし、アミコン超遠心フィルター（10 kDa cut-off, 7500 ×g, 25℃で20分間3回）でPBSと共に未反応蛍光色素を除去した。Fc-MIP-NGに蛍光色素がうまく結合していることを確認するため、PIMの前後でATTO 647Nの蛍光強度を蛍光分光法（λex：646 nm, λem：664 nm）を用いて測定した。

[0096] （実施例２：Biotic/abiotic 抗体サンドイッチアッセイ）

（１）PSA-MIP-NGs をセンサーチップに固定化し、0.5w/v% BSA を用いたブロッキング処理をした。

（２）0.5w/v%BSAを含むPBSに溶解した0.1μg/mLの抗PSA抗体と100μg/mLのF-Fc-MIP-NGsを等量混合してカクテル溶液を調製した。

（３）このカクテル溶液に試料（PSA）を加え、30分間反応させた。

（４）この反応溶液をPSA-MIP-NGs固定化センサーチップに滴下し、30分間反応させた。純水（3×500μL）およびPBS（3×500μL）で洗浄後、センサーチップをフラット型ピペットチップに挿入し、蛍光顕微鏡を搭載した特注の液体分注ロボットで蛍光強度を測定した。

（５）相対蛍光強度を、PSAとのインキュベーション前後の蛍光強度をそれぞれ$F_0$とFとすると、$(F-F_0)/F_0$の式で算出した。

[0097] （実施例３：吸着等温線）

F-Fc-MIP-NGsまたはF-NIP-NGsを用いて作製したbiotic/abiotic sandwich assayに対するPSAの結合挙動を検討した（図１）。PSAの相対蛍光強度は、Fc-MIP-NGsを用いたアッセイにおいて、溶液中のPSA濃度の増加とともに増加することが確認された。しかし、F-NIP-NGsの蛍光強度変化はどの濃度でも小さく、F-NIP-NGsでは、開発したbiotic/abiotic sandwich assayに対する選択性が低いことが示唆された。これらの結果は、分子インプリンティングにより、提案するセンサにおけるPSAの高い親和性が実現したことを示している。

[0098] （実施例４：添加回収実験）

アッセイの精度を実証するために、100倍に希釈した牛肉抽出物に様々な濃度のPSA（0～100 nM）を添加して結合試験を実施した。その時の検量線は、PBS溶液の検量線と同様であった。（図３）回収率結果は、90～136%であり、牛肉抽出物中であってもPSAを検出できることが示された。

[0099] （実施例５：安定性試験）

アッセイの安定性は、4℃で30日間保存した後に1 nMのPSAを検出することで評価した。30日後、相対蛍光強度は調製当日と有意な差はなかった。これらの結果は、センサが安定であり、少なくとも1ヶ月間PSAの検出が可能であることを示した（図４）。

[0100] （実施例６：ELISAのブタ肉不純物の検出比較）

ハラール食肉エキス試料（牛肉およびラム肉）中の豚肉混入物を検出した。

[0101] 牛肉およびラム肉エキスに含まれる豚肉エキスの含有量は、0、0.001、0.01、0.1、1、10、100 wt%の範囲で希釈した。

[0102] 蛍光応答は、牛肉とラム肉のいずれの試料においても、豚肉混入量の増加とともに増加し、豚肉混入の検出限界は 0.01 wt% であることが示された。この結果は、ハラール生肉サンプル中の豚肉不純物を特定するために商業利用できる可能性は大きい。

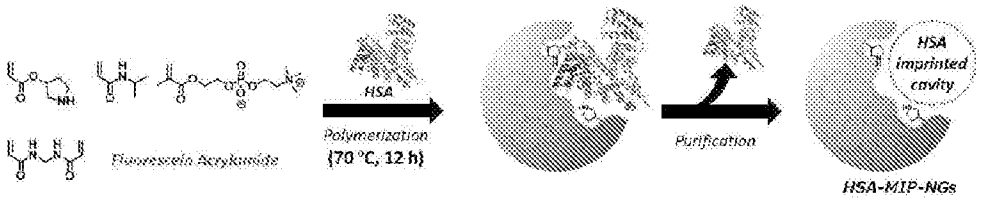
[0103] イムノアッセイと比較しても検出感度は勝り、測定時間は4時間から30分に短縮、S/N比はより高いことが分かった。（図５）

[0104] （実施例７：ヒト血清アルブミン(HSA)および糖化アルブミン(GA)検出）

1.HSA-MIP-NGsの合成

既報(薬物輸送担体としての応用：Angew. Chem. Int. Ed., 2017, 56, 7088, DOI: 10.1002/anie.201700647、振動数(質量)センサとしての応用：Anal. Chem., 2020, 92, 6401, DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05499) を参考に合成を行った。

[0105] [化5]




[0106] 精製後の粒子の粒径を動的光散乱(DLS)計測から行ったところ、粒径(Z-average)は37 nmであった。

[0107] 生物学的／非生物学的サンドイッチアッセイ（Biotic/abiotic sandwich assay）によるヒト血清アルブミン（HSA）検出

洗浄した金コートガラス基板(4.3 mm×9.8 mm)を1 mM 11 mercaptoundecanoic acid EtOH溶液に浸漬(25℃, 24 h)させ、表面にカルボキシ基の修飾を行った。この基板にEDC (0.2 M)とNHS (0.05 M)を含む水溶液(100 μL)を滴下し、2時間静置することで表面のカルボン酸を活性化した。純水で洗浄後、HSA-MIP-NGs PBS分散液 (100 μg/mL) 100 μLを滴下し、1時間静置することで表面にMIP-NGsを固定化した。PBSで洗浄後、0.5 wt% BSA溶液(100 μL)を滴下し、1時間静置することで表面のブロッキングを行った。

[0108] PBSに溶解した0. 1 μg/mLの抗HSA抗体(ポリクローナル抗体:pAb-HSA,またはモノクローナル抗体: mAb-HSA)と100 μg/mLのF-Fc-MIP-NGsを等量混合してカクテル溶液を調製した。この溶液に各濃度のHSA (0-100 nM)PBS溶液を添加し30分間インキュベートした。この反応溶液をHSA-MIP-NGs固定化センサーチップに滴下し、30分間反応させた。純水（3×500 μL）およびPBS（3×500 μL）で洗浄後、センサーチップをフラット型ピペットチップに挿入し、蛍光顕微鏡を搭載した特注の液体分注ロボットでチップ表面の蛍光強度を測定した。(測定条件はPSA測定時と同様)

[0109] また選択性実験については上記各濃度のHSAを添加する代わりにブタ血清アルブミン (PSA)、免疫グロブリン (IgG)、フィブリノーゲン (Fib)各10 nMを添加し同様に基板表面の蛍光を測定した。

[0110] Biotic/abiotic sandwich assay による糖化アルブミン(GA)の検出

上記カクテル溶液調製時に抗HSA抗体(pAb-HSA)または抗GA抗体(mAb-GA)(0.1 μg/mL)を添加し、これに100 nMのHSAまたはGAを加え上記と同様に測定を行った。

[0111] (結果と考察)

・HSA検出能評価

図６に示すようにpAb-HSA、mAb-HSAのどちらにおいてもHSA濃度に依存して蛍光強度が増加することが確認されたことから本アッセイによってHSAを検出できることが確認された。各抗体においては低濃度領域ではmAb-HSAの方がpAb-HSAより大きな蛍光応答を示した。これはpAb-HSAではHSA-MIP-NGsと認識部位が重複するため低濃度領域で蛍光応答が低下したと考えられる。また3σ法により算出した本アッセイの検出限界は9.0 pMであった。

[0112] 図７に示すように、参照タンパク質としてブタアルブミン(PSA)、免疫グロブリン(IgG)、フィブリノーゲン(Fib)を用いて本アッセイの選択性を評価したところ、HSA添加時に最も大きな蛍光応答を示したことから、本アッセイによりHSAを選択的に検出できることが示された。

[0113] ・糖化アルブミン(GA)の検出

抗体としてpAb-HSAまたはmAb-GAを用いて各タンパク質(100 nM)の検出を試みたところ、図８に示すように、GAについてはどちらの抗体を用いても蛍光応答が確認されたのに対し、HSAについてはpAb-HSA使用時に大きな蛍光応答が確認されたが、mAb-GAでは1/6以下の応答であったことから、本アッセイにおいて適切な抗体を組み合わせて用いることにより、HSAおよびGAを区別して検出できることが示唆された。

[0114] (実施例８：動物における診断例)

獣医が確定診断したがんや内臓疾患の犬や猫の血液を採取して、疾病マーカーを測定する。完治後に、再度疾病マーカーを測定して、その違いを観察することで、犬や猫のがんや内臓疾患が検出可能か検討する。

[0115] 本開示の分析用センサの用途

人以外の使用

１．愛玩動物（ネコ、イヌ、鳥類など）の動物のがんを含む疾病の検査

２．家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリなど）の保有する感染症原因ウイルスや感染性タンパク質（プリオンなど）、その他の病原性／感染性因子の検出

３．有害動物（鳥類、コウモリ、キツネ、マングース、アライグマ等）の保有する感染症原因ウイルスや感染性タンパク質（プリオンなど）、その他の病原性／感染性因子の検出

４．水産物の品質や鮮度チェック

５．農産物の品質や鮮度チェック

６．植物や樹木などの病原菌・ウイルスチェック

[0116] （実施例９：臨床応用例）

臨床実験実施病院の臨床研究審査委員会の承認を得た臨床研究にて、患者様の同意の下、がん検出の有無は全摘手術前後のセンサの応答の違いを観察することで、本センサにより、がんの検出が可能かどうか検討する。継続的に観察して、がんの転移や再発のチェックが可能かどうか検討する。薬物療法の治療効果は、投薬前後でのセンサ応答の違いで評価できるかどうか検討する。生活習慣病は、摂取食物とセンサ応答の関係から診断可能かどうか検討する。また、センサ応答から、がん細胞表面抗原の存在を推定し、コンパニオン診断が可能かどうか検討する。さらに、細胞を用いる治療における細胞の品質管理をセンサ応答から可能かどうか検討する。

[0117] （実施例１０：本開示の分析用センサの用途：臨床応用例）

代表例として、A. Hoshino et al , Cell, 2020, 182 (4), 1044-1061. e18を参考に以下の用途で本開示の分析センサを使用する。

[0118] がんの検査

がんの手術の際の摘出残しチェック

がんの転移や再発のチェック

薬物療法の治療効果

生活習慣病の検査

投薬のためのコンパニオン診断

細胞工学における細胞の品質管理。

[0119] （注記）

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および他の文献は、その内容自体が具体的に本開示に記載されているのと同様にその内容が本開示に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は２０２２年１２月２７日に日本国特許庁に提出した特願２０２２－２１０８７４に対して優先権主張をするものであり、その内容はそのすべてが本願において参考として援用される。

## 産業上の利用可能性

[0120] 本開示で提供される技術は、分子インプリンティングを用いた空孔形成を基盤技術としたすべてのセンサ作製に適用可能であり、検査分析技術を利用するあらゆる分野（診断を含む）において利用することができる。

# 請求の範囲

[請求項1] 検出対象を検出するためのキットであって、

Ａ）前記検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子と

Ｂ）前記検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子とは異なるシグナル物質に結合する能力を有する第二の粒子と、

を含み、前記検出対象と前記検出対象の結合物質とが複合体化すると、検出可能なシグナルが、生成、消失または変化する、キット。

[請求項2] 前記第一の粒子は、前記検出対象または前記検出対象の結合物質を収容する第一の空間形成部を有し、前記第一の空間形成部は前記第一の空間形成部に少なくともその一部が露出するように前記検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に前記結合物質と結合する結合物質結合基を有する、請求項１に記載のキット。

[請求項3] 前記第一の粒子または前記第二の粒子は、基材とともに提供され、前記第一の粒子または前記第二の粒子は前記基材上に配置される、請求項１または２に記載のキット。

[請求項4] 前記第二の粒子が、前記検出対象または前記検出対象の結合物質を収容する空間を形成する第二の空間形成部を有し、前記第二の空間形成部は、前記第二の空間形成部に少なくともその一部が露出するように前記検出対象と結合することができる相互作用基またはその表面に前記結合物質と結合する結合物質結合基およびシグナル物質と結合するシグナル物質結合基を含む、請求項１に記載のキット。

[請求項5] 前記相互作用基が、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒ

ドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基である、請求項１～４のいずれか一項に記載のキット。

[請求項6] 前記結合物質が、抗体、抗体誘導体、結合タンパク質、核酸アプタマーまたはペプチドアプタマーである、請求項１～５のいずれか一項に記載のキット。

[請求項7] 前記結合物質結合基が、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、ベンジル基、ピリジン基、アルキル基、アミド基、ウレア基、チオウレア基、カルバミド基、ウレタン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基である、請求項１～６のいずれか一項に記載のキット。

[請求項8] 前記シグナル物質結合基が、アミノ基、カルボキシル基、ボロニル基、マレイミド基、カルボニル基、アルデヒド基、アミノオキシ基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、ビオチン基、ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基、チオール基またはピリジルジスルフィド基、アジド基、アルキン基、ジベンゾシクロオクチン基、オリゴヌクレオチド基、またはオリゴペプチド基である、請求項１～７のいずれか一項に記載のキット。

[請求項9] 前記シグナル物質が、蛍光分子、放射性元素含有物質、磁性物質、電気化学活性物質、ラマン散乱活性物質、または酵素である、請求項１～８のいずれか一項に記載のキット。

[請求項10] 前記シグナル物質が、光学、磁気、電気化学、または超音波により活性化される物質、放射性元素含有物質、または酵素である、請求項１～８のいずれか一項に記載のキット。

[請求項11] 前記結合物質は、２種類以上使用される、請求項１～１０のいずれか一項に記載のキット。

[請求項12] ２種類以上の前記結合物質は、その検出対象が重複するものである、請求項１～１１のいずれか一項に記載のキット。

[請求項13] ２種類以上の前記結合物質は、その検出対象が異なるものである、請求項１～１１のいずれか一項に記載のキット。

[請求項14] ２種類以上の前記結合物質は、同種の結合物質である、請求項１～１１のいずれか一項に記載のキット。

[請求項15] ２種類以上の前記結合物質は、異種の結合物質である、請求項１～１１のいずれか一項に記載のキット。

[請求項16] ２種類以上の前記結合物質の結合基は、異種の結合物質ごとに異なる、請求項１５に記載のキット。

[請求項17] ２種類以上前記結合物質は、抗体である、請求項１～１６のいずれか一項に記載のキット。

[請求項18] 請求項１～１７のいずれかに記載の第一の粒子と、
請求項１～１７のいずれかに記載の第二の粒子と、
請求項１～１７のいずれかに記載の結合物質と、
基材と、
を含む、センシング用基材の製造キット。

[請求項19] 検出対象を検出するためのセンシング用基材であって、基材と、前記基材に固定された請求項１～１７のいずれかに記載の第一の粒子とを含む、センシング用基材。

[請求項20] 検出対象を検出するための分析用センサであって、請求項１９に記載のセンシング用基材と請求項１～１７のいずれか一項に記載

の第二の粒子と請求項６に記載の結合物質とを含む、分析用センサ。

[請求項21] 試料において検出対象を検出する方法であって、

（Ａ）請求項１～１７のキット、請求項１９のセンシング用基材、または請求項２０に記載の分析用センサを提供する工程、

（Ａ’）必要に応じて、結合物質を前記第一の粒子に結合させ、ならびに/またはシグナル物質および／もしくは結合物質を前記第二の粒子に結合させる工程と

（Ｂ）前記試料を前記検出対象に結合する能力を有する粒子と接触させる工程と、

（Ｃ）前記結合物質が結合した粒子を、（Ｂ）で試料を接触させた前記粒子と接触させる工程と

（Ｄ）必要に応じて前記シグナル物質を活性化することで、前記第一の粒子と前記第二の粒子と前記検出対象と前記検出対象の結合物質との複合体が存在する場合に生成される、前記検出可能なシグナルを検出する工程と

（Ｅ）必要に応じて前記シグナルに基づき計算処理をして前記検出対象を検出する工程と

を包含する方法。

[請求項22] （Ｆ）前記検出対象を分析する工程をさらに包含する、請求項２１に記載の方法。

[請求項23] 食品分析に使用するための、請求項１～１７のいずれか一項に記載のキット。

[請求項24] 食品中の豚由来の成分を検出するための、請求項２３に記載のキット。

[請求項25] 膠原病検査、感染症検査、梅毒検査、痛風検査、高脂血症検査、糖尿病検査、肝・胆道系検査、腎機能検査、膵機能検査、ウイルス

抗原検査またはそれらの組合せからなる群から選択される検査に使用するための、請求項１～１７のいずれか一項に記載のキット。

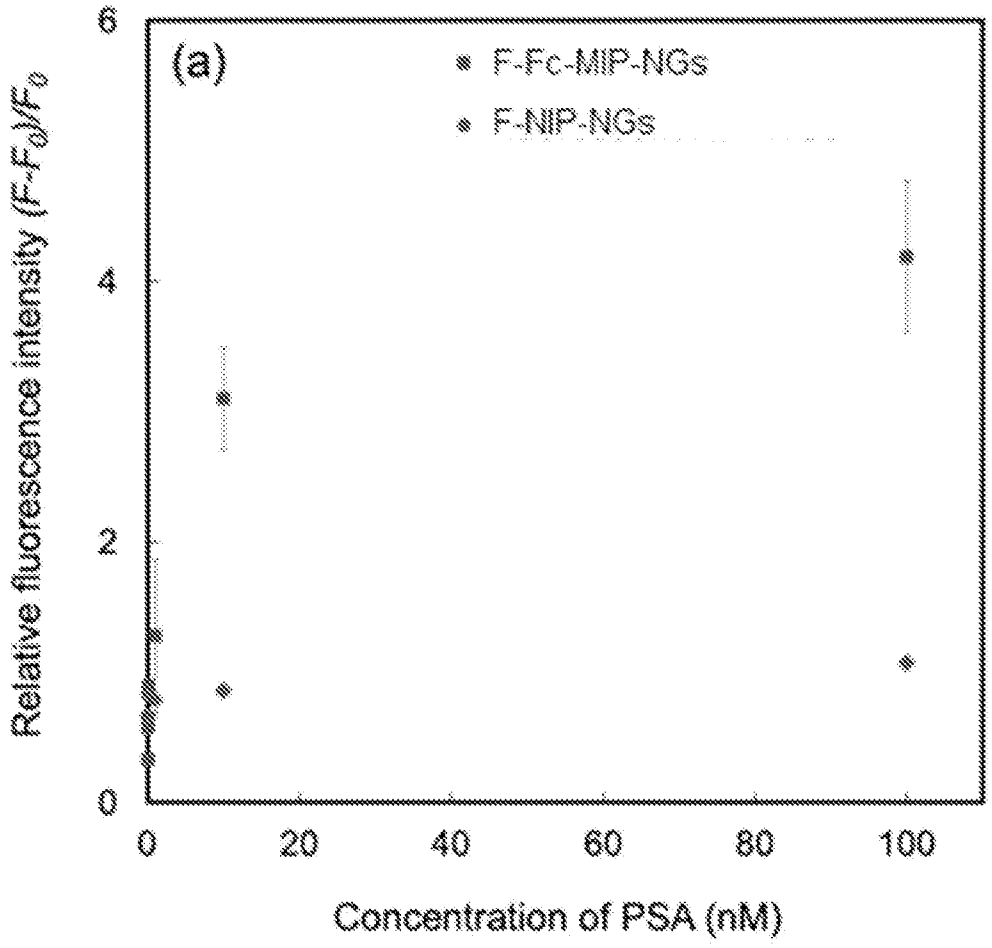
[請求項26] 第二の粒子が検出対象の結合物質と結合している、請求項１～１７のいずれか一項に記載のキット。

[請求項27] 検出対象を検出するための、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子。

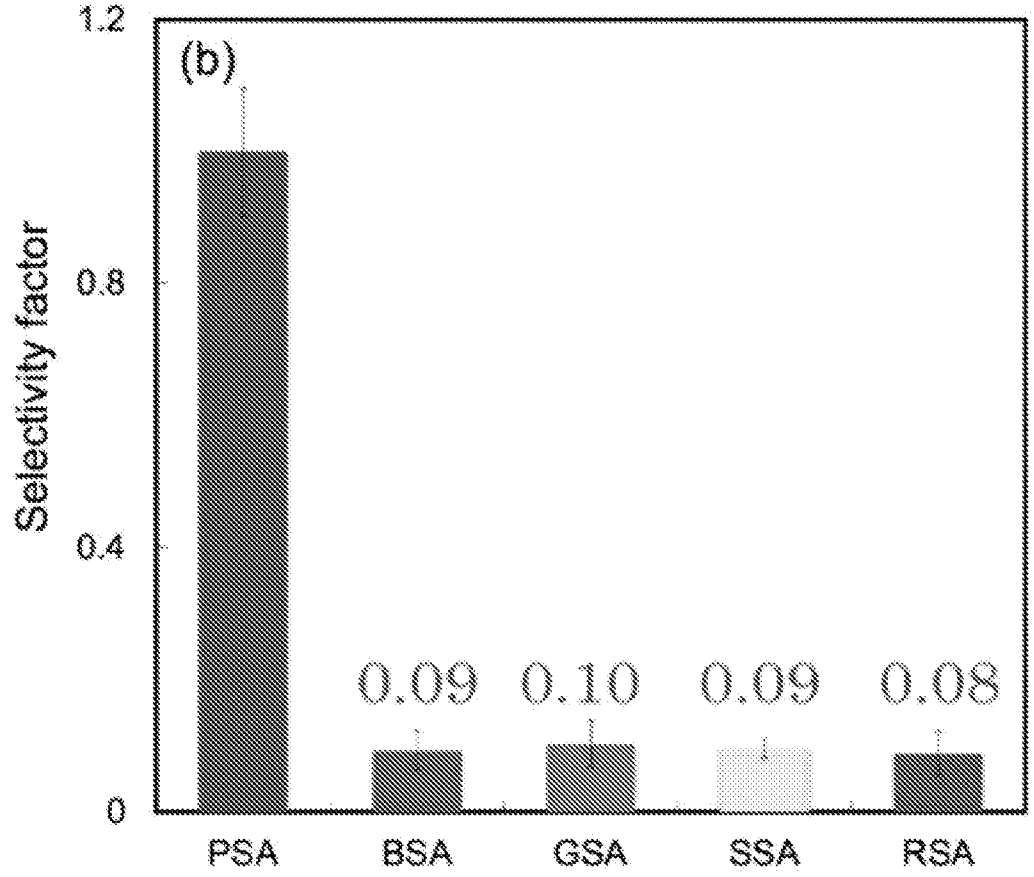
[請求項28] 検出対象を検出するための、基材に結合した検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する第一の粒子。

[請求項29] 検出対象を検出するための、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力、およびシグナル物質に結合する能力を有する第二の粒子。

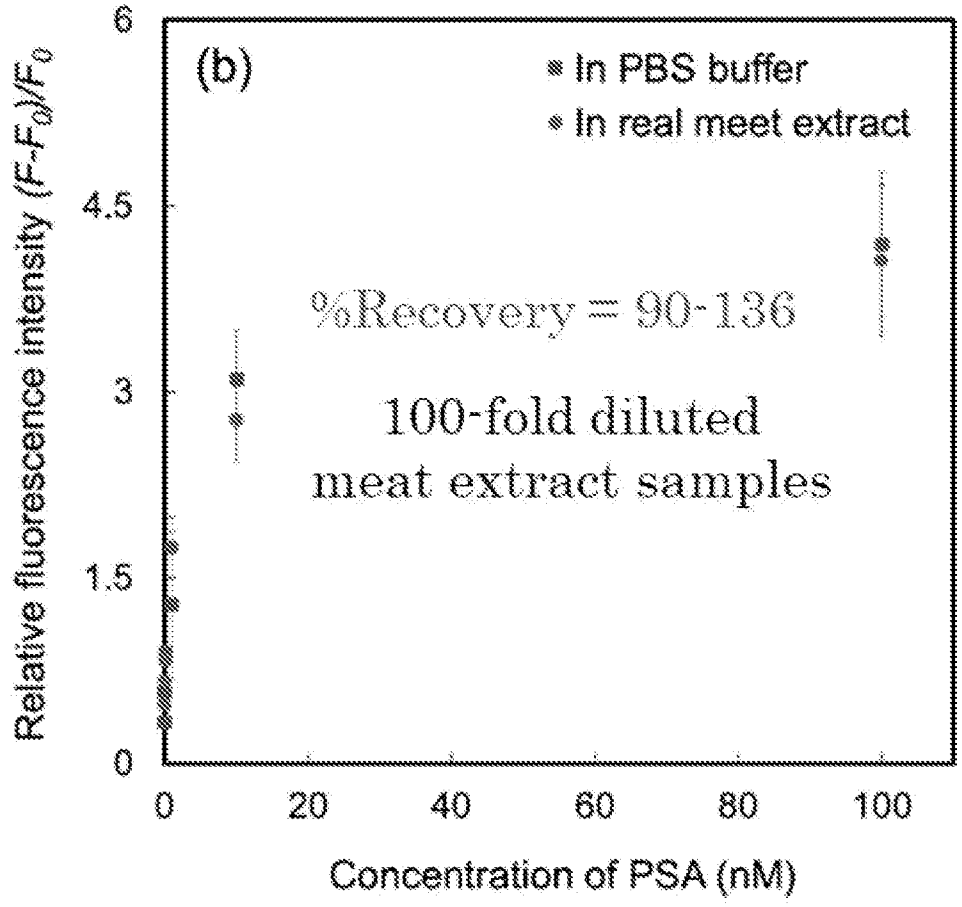
[図 1]


(a)
F-Fc-MIP-NGs
F-NIP-NGs
Relative fluorescence intensity (F-F0)/F0
Concentration of PSA (nM)
0
2
4
6
0
20
40
60
80
100

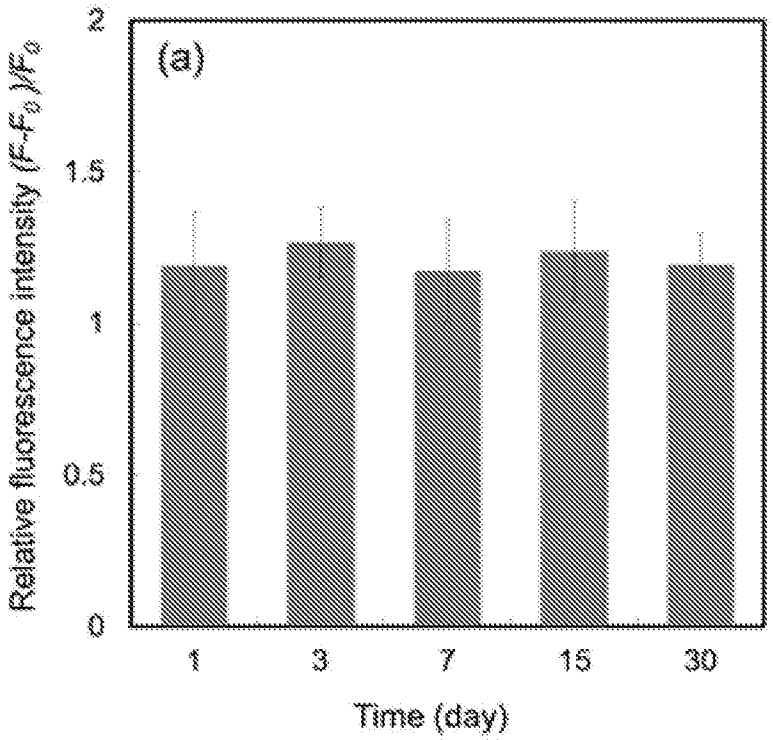
[図 2]


(b)
Selectivity factor
1.2
0.8
0.4
0
0.09
0.10
0.09
0.08
PSA
BSA
GSA
SSA
RSA

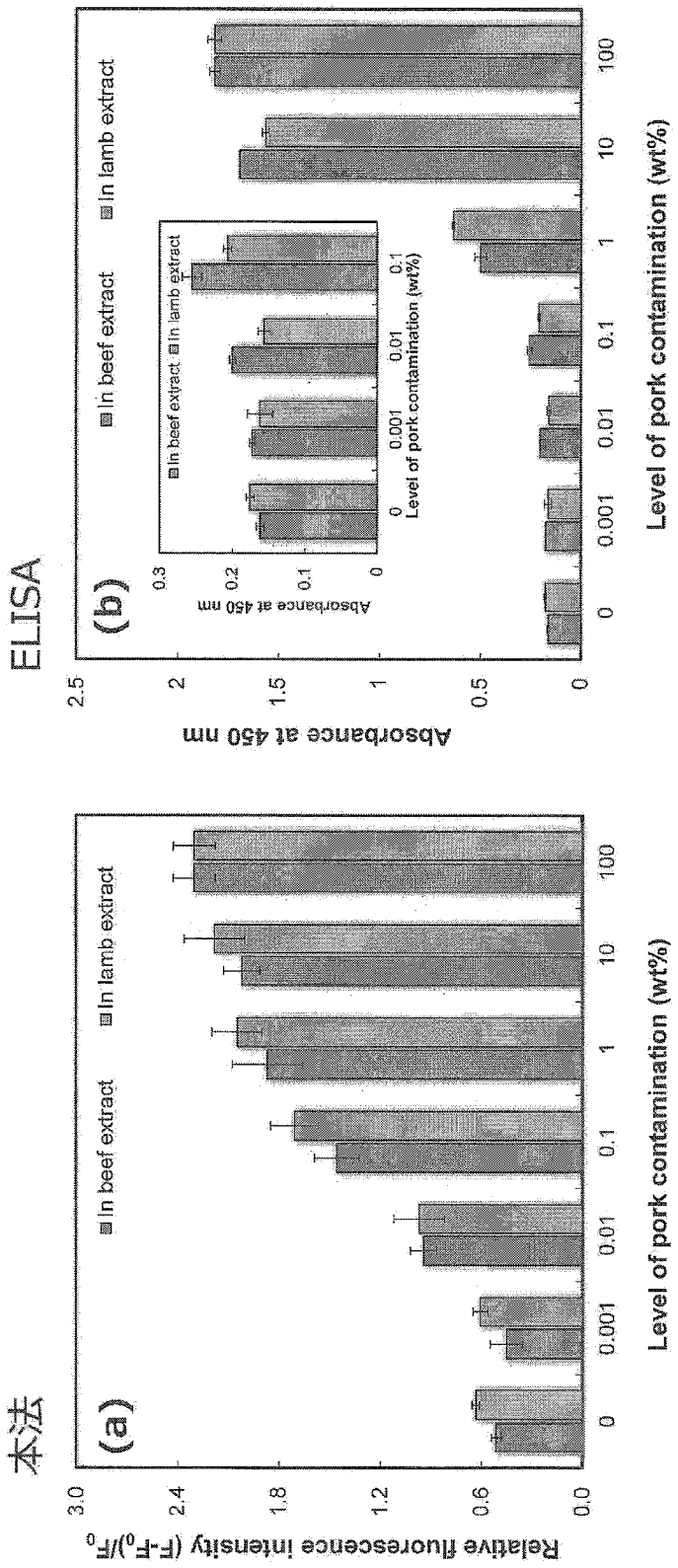
[図 3]


(b)
In PBS buffer
In real meet extract
%Recovery = 90-136
100-fold diluted
meat extract samples
Relative fluorescence intensity (F-F0)/F0
6
4.5
3
1.5
0
0
20
40
60
80
100
Concentration of PSA (nM)

[図 4]


(a)
Relative fluorescence intensity (F-F0)/F0
2
1.5
1
0.5
0
1
3
7
15
30
Time (day)

[図 5]




規則 26,
08.03.2024

[図 6]

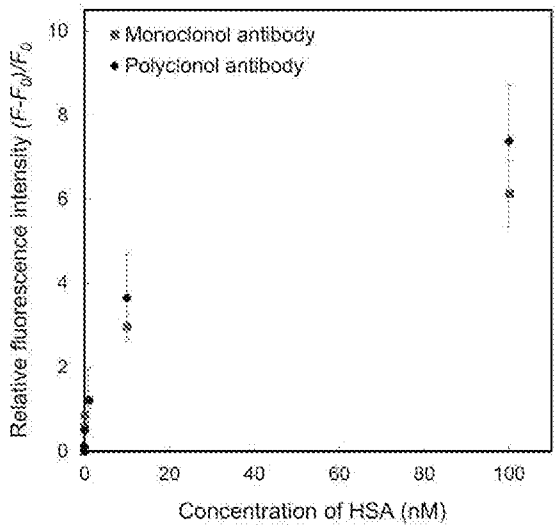



図 6：作製したサンドイッチアッセイの各 HSA 濃度における蛍光応答

[図 7]

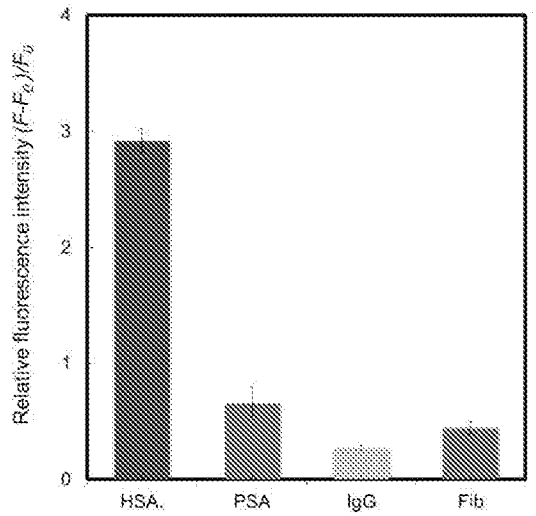



図 7：作製したサンドイッチアッセイの選択性評価(タンパク質濃度: 10 nM)

[図 8]

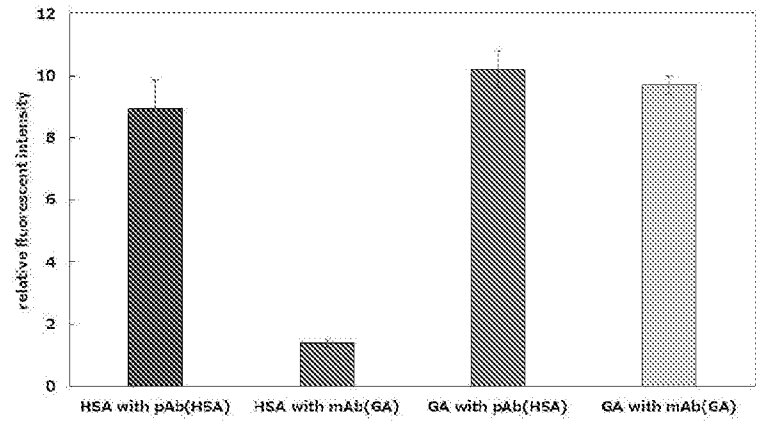



図 8：作製したサンドイッチアッセイを用いた HSA および GA の検出(タンパク質濃度: 100 nM)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/JP2023/046816**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***G01N 33/531***(2006.01)i; ***G01N 33/542***(2006.01)i
FI: G01N33/531 A; G01N33/542 A

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/48-33/98

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

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 2015-508180 A (LABORATORY CORPORATION OF AMERICA HOLDINGS) 16 March 2015 (2015-03-16)<br>claims, paragraphs [0022]-[0023], [0031]-[0034], fig. 2-1 | 1, 3, 6, 9-22, 25-28 |
| Y | | 23-24 |
| X | WO 2017/175523 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 12 October 2017 (2017-10-12)<br>paragraphs [0180]-[0183], embodiment 12, fig. 4(L) | 1, 6, 9-17, 21-22, 25, 27, 29 |
| X | WO 2021/172591 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 02 September 2021 (2021-09-02)<br>claims | 27-29 |
| Y | claims, paragraphs [0219]-[0222] | 23-24 |
| A | JP 2018-132527 A (SHIBAURA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 23 August 2018 (2018-08-23)<br>entire text, all drawings | 1-26 |

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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 |
|---|---|
| **11 March 2024** | **19 March 2024** |

| Name and mailing address of the ISA/JP | Authorized officer |
|---|---|
| **Japan Patent Office (ISA/JP)**<br>**3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915**<br>**Japan** | Telephone No. |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/JP2023/046816**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP 2007-520700 A (THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEWYORK) 26 July 2007 (2007-07-26)<br>entire text, all drawings | 1-26 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/JP2023/046816**

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-18 and 23-26 and claims 21-22 as depending from claims 1-17
Claim 1 and claims 2-18 and 21-26 as depending therefrom are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 19-20 and claims 21-22 as depending from claims 19-20
Claim 19 shares the technical feature of "a first particle" with claim 1 classified as invention 1.
However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 3, and thus cannot be considered a special technical feature. Apart from this feature, there are not the same or corresponding special technical features among these inventions.
Accordingly claim 19 and claims 20-22 as depending therefrom cannot be identified as invention 1.

(Invention 3) Claims 27-28
Claims 27-28 share the technical feature of "a first particle or the first particle bound to a substrate" with claim 1 classified as invention 1 and claim 19 classified as invention 2.
However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1, and thus cannot be considered a special technical feature. Apart from this feature, there are not the same or corresponding special technical features among these inventions.
Accordingly claims 27-28 cannot be identified as either of inventions 1 and 2.

(Invention 4) Claim 29
Claim 29 shares the technical feature of "a second particle" with claim 1 classified as invention 1. However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1, and thus cannot be considered a special technical feature. Apart from this feature, there are not the same or corresponding special technical features among these inventions.
Claim 29 shares the technical feature of a detection target or a particle having the capability of binding to a binding agent of the detection target" with claim 19 classified as invention 2 and claim 27 classified as invention 3.
However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1, and thus cannot be considered a special technical feature. Apart from this feature, there are not the same or corresponding special technical features among these inventions.
Accordingly claim 29 cannot be identified as any of inventions 1, 2, and 3.

Document 3: WO 2021/172591 A1 (KOBE UNIVERSITY) 02 September 2021 (2021-09-02),
claims
& US 2023/0152306 A1, claims
& EP 4113118 A1 & CN 115667932 A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/JP2023/046816**

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☑ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/JP2023/046816**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| JP 2015-508180 A | 16 March 2015 | US 2013/0217049 A1<br>claims, paragraphs [0024]-[0025], [0033]-[0037], fig. 2a<br>WO 2013/126522 A1<br>EP 2817423 A1<br>AU 2013222444 A1<br>CA 2865303 A1<br>CN 104245960 A<br>MX 2014010068 A<br>HK 1205761 A1<br>BR 112014020513 A2 | |
| WO 2017/175523 A1 | 12 October 2017 | US 2019/0079081 A1<br>paragraphs [0276]-[0282], fig. 4L<br>EP 3441761 A1 | |
| WO 2021/172591 A1 | 02 September 2021 | US 2023/0152306 A1<br>claims, paragraphs [0229]-[0231]<br>EP 4113118 A1<br>CN 115667932 A | |
| JP 2018-132527 A | 23 August 2018 | (Family: none) | |
| JP 2007-520700 A | 26 July 2007 | US 2005/0214876 A1<br>whole document<br>WO 2005/068980 A1<br>EP 1706728 A1<br>CA 2552520 A1<br>CN 1910444 A<br>AU 2005205341 A1 | |

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/046816

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/531(2006.01)i; G01N 33/542(2006.01)i
FI: G01N33/531 A; G01N33/542 A

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））

G01N33/48-33/98

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 | １９７１－２０２４年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２０２４年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２０２４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)

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 2015-508180 A (ラボラトリー コーポレイション オブ アメリカ ホールディングス) 16.03.2015 (2015-03-16)<br>[特許請求の範囲], ［００２２］－［００２３］, ［００３１］－［００３４］, ［図２－１］ | 1,3,6,9-22,25-28 |
| Y | | 23-24 |
| X | WO 2017/175523 A1 (コニカミノルタ株式会社) 12.10.2017 (2017-10-12)<br>［０１８０］－［０１８３］第１２実施形態, ［図４］（Ｌ） | 1,6,9-17,21-22,25,27,29 |
| X | WO 2021/172591 A1 (国立大学法人神戸大学) 02.09.2021 (2021-09-02)<br>請求の範囲 | 27-29 |
| Y | 請求の範囲, ［０２１９］－［０２２２］ | 23-24 |
| A | JP 2018-132527 A (学校法人 芝浦工業大学) 23.08.2018 (2018-08-23)<br>全文, 全図 | 1-26 |

☑ 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
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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 |
|---|---|
| 11.03.2024 | 19.03.2024 |

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）

倉持　俊輔 2J 3209

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

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 |
|---|---|---|
| A | JP 2007-520700 A（ザ リサーチ ファウンデイション オブ ステイト ユニバーシティー オブ ニューヨーク）26.07.2007（2007-07-26）<br>全文，全図 | 1-26 |

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/046816

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明１）請求項１－１８，２３－２６及び請求項１－１７に従属する請求項２１－２２
請求項１及びこれに従属する請求項２－１８，２１－２６を発明１に区分する。

（発明２）請求項１９－２０及び請求項１９－２０に従属する請求項２１－２２
請求項１９は、発明１に区分された請求項１と、「第一の粒子」という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴は、文献３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
したがって、請求項１９及びこれに従属する請求項２０－２２は発明１に区分できない。

（発明３）請求項２７－２８
請求項２７－２８は、発明１に区分された請求項１及び発明２に区分された請求項１９と、第一の粒子ないし基材に結合した第一の粒子という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴は、文献１の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
したがって、請求項２７－２８は発明１又は２のいずれにも区分できない。

（発明４）請求項２９
請求項２９は、発明１に区分された請求項１と、「第二の粒子」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
また、請求項２９は、発明２に区分された請求項１９、及び発明３に区分された請求項２７と、検出対象または前記検出対象の結合物質に結合する能力を有する粒子という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴は、文献１の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
したがって、請求項２９は発明１，２又は３のいずれにも区分できない。

文献３：WO 2021/172591 A1 (国立大学法人神戸大学) 02.09.2021(2021-09-02)
請求の範囲
& US 2023/0152306 A1, Claims
& EP 4113118 A1 & CN 115667932 A

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/046816

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

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/JP2023/046816

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|---|---|---|---|
| JP 2015-508180 A | 16.03.2015 | US 2013/0217049 A1<br>Claims, [0024]-[0025], [0033]-[0037], FIG.2A<br>WO 2013/126522 A1<br>EP 2817423 A1<br>AU 2013222444 A1<br>CA 2865303 A1<br>CN 104245960 A<br>MX 2014010068 A<br>HK 1205761 A1<br>BR 112014020513 A2 | |
| WO 2017/175523 A1 | 12.10.2017 | US 2019/0079081 A1<br>[0276] -[0282], FIG.4L<br>EP 3441761 A1 | |
| WO 2021/172591 A1 | 02.09.2021 | US 2023/0152306 A1<br>Claims, [0229]-[0231]<br>EP 4113118 A1<br>CN 115667932 A | |
| JP 2018-132527 A | 23.08.2018 | （ファミリーなし） | |
| JP 2007-520700 A | 26.07.2007 | US 2005/0214876 A1<br>Whole Document<br>WO 2005/068980 A1<br>EP 1706728 A1<br>CA 2552520 A1<br>CN 1910444 A<br>AU 2005205341 A1 | |