

(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2月29日(29.02.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/043167 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/41 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2023/029719

(22) 国際出願日:

2023年8月17日(17.08.2023)

(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:

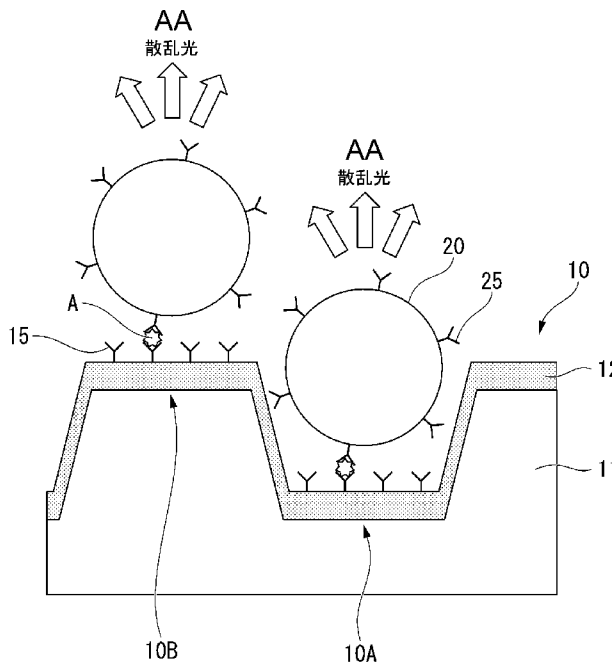
特願 2022-133083 2022年8月24日(24.08.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社 J V C ケンウッド (JVCKENWOOD CORPORATION) [JP/JP];
〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町
3丁目12番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 小野 雅之 (ONO Masayuki); 〒2210022
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12
番地 株式会社 J V C ケンウッド 知的財産部
内 Kanagawa (JP). 糸長 誠 (ITONAGA Makoto);
〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁
目12番地 株式会社 J V C ケンウッド 知的財産
部内 Kanagawa (JP). 長谷川 祐一 (HASEGAWA
Yuichi); 〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守
屋町3丁目12番地 株式会社 J V C ケンウッド
知的財産部内 Kanagawa (JP). 齋藤 敦 (SAITO
Atsushi); 〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区
守屋町3丁目12番地 株式会社 J V C ケンウ
ッド 知的財産部内 Kanagawa (JP). 宮坂 禎也
(MIYASAKA Yoshiya); 〒2210022 神奈川県横

(54) Title: TARGET SUBSTANCE MEASURING METHOD, AND TARGET SUBSTANCE MEASURING SYSTEM

(54) 発明の名称: 対象物質の測定方法、及び対象物質測定システム



AA Scattered light

(57) Abstract: Provided is a method for measuring a target substance (A) using: nanoparticles (20) which have a first specific binding substance (25) for the target substance (A) bound thereto, and which are capable of exciting surface plasmon resonance; and a solid phase carrier (10) which has a nanostructure surface that changes a scattered light spectrum of the nanoparticles (20), and which has a second specific binding substance (15) for the target substance (A) bound thereto. The method includes a step for emitting light onto the solid phase carrier (10) in which the second specific binding

浜市神奈川区守屋町 3 丁目 1 2 番地 株式会社 J
V C ケンウッド 知的財産部内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 松沼 泰史, 外 (MATSUNUMA Yasushi
et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一
丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

substance (15), the target substance (A), the first specific binding substance (25) and the nanoparticles (20) have been bound to the nanostructure surface in the stated order, and identifying and counting the nanoparticles (20) that bind to a specific nanostructure (10A) on the basis of a difference between the scattered light spectrum of the nanoparticles (20) that bind to the specific nanostructure (10A) and the scattered light spectrum of the nanoparticles (20) that bind to a region (10B) that does not have the specific nanostructure.

(57) 要約: 表面プラズモン共鳴を励起可能な、対象物質 (A) に対する第 1 の特異的結合物質 (25) が結合されているナノ粒子 (20) と、ナノ粒子 (20) の散乱光スペクトルを変化させるナノ構造表面を有し、対象物質 (A) に対する第 2 の特異的結合物質 (15) が結合されている固相担体 (10) と、を用いて前記対象物質 (A) を測定する方法。前記第 2 の特異的結合物質 (15) と前記対象物質 (A) と前記第 1 の特異的結合物質 (25) と前記ナノ粒子 (20) とがこの順に前記ナノ構造表面に結合した前記固相担体 (10) に対して光を照射し、所定のナノ構造 (10A) に結合するナノ粒子 (20) の散乱光スペクトルと、所定のナノ構造を有しない領域 (10B) に結合するナノ粒子 (20) の散乱光スペクトルとの差に基づいて、所定のナノ構造 (10A) に結合するナノ粒子 (20) を識別して計数する工程、を含む。

明 細 書

発明の名称：対象物質の測定方法、及び対象物質測定システム 技術分野

[0001] 本発明は、対象物質の測定方法、及び対象物質測定システムに関する。

本願は、2022年8月24日に、日本に出願された特願2022-133083号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 抗原、抗体、遺伝子物質、微生物、ウイルス、及びバイオマーカー等の生化学分子又は生物粒子を、定量的に分析する様々な手法が開発されている。表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance：SPR）検出方式は、プリズム表面に金薄膜を蒸着したセンサーチップを用いて、センサーチップ表面近傍の屈折率の変化を光学的に検出することにより、検出対象分子（アナライト）とリガンドとの相互作用を検出する方式である（特許文献1）。センサーチップ上に固定されたりガンドにアナライトが結合すると、センサーチップ表面近傍の屈折率が変化する。金薄膜が蒸着されたセンサーチップに全反射角度以上の入射角で光を入射すると、反射光がゼロとなる表面プラズモン共鳴が生じる。この共鳴角度変化が、センサーチップ表面の屈折率変化に対して非常に鋭敏に変化する現象を利用して、アナライトの定量を行う。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2019/082637号

発明の概要

[0004] SPR検出方式は、リガンドに対する検出対象分子（アナライト）の反応の度合をリアルタイムに検出可能であり、免疫検定法でよく用いられる酵素又は蛍光などの標識を用いる必要がない。一方、基材となるガラスと入射光プリズムとの界面での反射光を低減するために、屈折率標準液（マッチング

オイル)で密着させる必要がある。屈折率標準液の厚みは、時間経過とともに変化し、これにより検出信号が変位(ドリフト)する。また、検出対象分子が含まれる溶媒の屈折率は、温度変化に非常に敏感に変化する。温度による屈折率の変化も検出信号のドリフト要因となり、これらが相まって、検出精度を低下させる要因となっている。

[0005] 表面プラズモン共鳴を検出する方式として、共鳴角度変化ではなく、共鳴スペクトルの変化を検出する方式も存在する。しかし、高額な分光システムが必要となるなど、簡便で高感度な検出システムは実現されていない。

[0006] 従来のSPR検出方式のシステムは、微量のアナライトの検出には適しておらず、前述のドリフトの課題に対するシステム剛性の強化、温度制御機構、及び各種送液機構などの必要性から装置が高額であるという課題がある。そのため、簡便に利用可能な、高感度の分子検出システムの実現が望まれている。

[0007] そこで、本発明は、簡便且つ高感度で対象物質を測定可能な、対象物質の測定方法、及び対象物質測定システムを提供することを目的とする。

[0008] [1] 対象物質を測定する方法であって、表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子であって、前記ナノ粒子は、可視光を照射したときにミー散乱理論に基づいて可視光領域にピークを有する散乱光スペクトルを生じる粒子径を有し、且つ前記対象物質に特異的に結合する第1の特異的結合物質が結合されている、ナノ粒子と、所定のナノ構造が複数個配置されたナノ構造表面を有する固相担体であって、前記所定のナノ構造は、前記ナノ粒子が結合することで、前記ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるものであり、且つ前記ナノ構造表面に、前記対象物質に特異的に結合する第2の特異的結合物質が結合されている、固相担体と、を用い、前記第2の特異的結合物質と前記対象物質と前記第1の特異的結合物質と前記ナノ粒子とがこの順に前記ナノ構造表面に結合した前記固相担体に対して光を照射し、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前

記ナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する工程、を含む、対象物質の測定方法。

〔２〕１個の前記所定のナノ構造に対して、１個の前記ナノ粒子が結合する、〔１〕に記載の対象物質の測定方法。

〔３〕前記ナノ構造表面において、前記所定のナノ構造が周期的配列で配置されており、前記周期的配列における個々の前記所定のナノ構造の座標を基準として、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子を計数する、〔１〕又は〔２〕に記載の対象物質の測定方法。

〔４〕前記ナノ粒子及び前記所定のナノ構造の表面が、前記散乱光スペクトルの検出に用いる波長の光に対して、

実部（ n ）＜消衰係数（ k ）

の関係を満たす複素屈折率を有する物質を含む、〔１〕～〔３〕のいずれか一つに記載の対象物質の測定方法。

〔５〕〔１〕～〔４〕のいずれか一つに記載の対象物質の測定方法に用いる対象物質測定システムであって、前記固相担体に結合する前記ナノ粒子に対して光を照射する光源と、前記ナノ粒子からの散乱光を検出する検出器と、前記検出器で取得された前記散乱光の画像から、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する計数部と、を含む、対象物質測定システム。

[0009] 本発明によれば、簡便且つ高感度で対象物質を測定可能な、対象物質の測定方法、及び対象物質測定システムが提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]一実施形態の対象物質測定方法の原理を説明する模式図である。

[図2]一実施形態の対象物質測定方法で用いる固相担体の製造方法の一例を示す模式図である。

[図3]一実施形態の対象物質測定方法で用いる固相担体の製造方法の一例を示

す模式図である。

[図4]一実施形態の対象物質測定方法で用いる固相担体の製造方法の一例を示す模式図である。

[図5]一実施形態の対象物質測定方法で用いる固相担体の製造方法の一例を示す模式図である。

[図6]一実施形態の対象物質測定方法で用いる固相担体の製造方法の一例を示す模式図である。

[図7]一実施形態の対象物質測定方法において、散乱光画像の取得以降の処理の流れを示すフローチャートである。

[図8]一実施形態の対象物質測定方法において、散乱光画像の取得以降の処理の流れを示すフローチャートである。

[図9]一実施形態の対象物質測定システムの構成例を示す。

[図10]所定のナノ構造としてナノホール構造を有する流路型固相担体デバイス（1）を用いて、ナノ構造表面に標識ナノ粒子を結合させたときの、ナノホール構造結合粒子及び非ナノホール構造結合粒子の散乱光スペクトルを示す。

[図11]（A）所定のナノ構造としてナノホール構造を有する流路型固相担体デバイス（1）を用いて、ナノ構造表面に標識ナノ粒子を結合させたときの暗視野顕微鏡画像を示す。（B）画像処理ソフト（ImageJ）により、（A）の暗視野顕微鏡画像から赤色スペクトル（600～700nm）のみを抽出した画像を示す。（C）（A）の画像から（B）の画像を差し引き、緑色スペクトル（500～600nm）に由来する輝点のみを抽出した画像を示す。

[図12]所定のナノ構造としてナノピット構造を有する流路型固相担体デバイス（2）を用いて、ナノ構造表面に標識ナノ粒子を結合させたときの、ナノピット構造結合粒子及び非ナノピット構造結合粒子の散乱光スペクトルを示す。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、場合により図面を参照しつつ、本発明の実施形態について詳細に説明する。図面中、同一又は相当部分には同一又は対応する符号を付し、重複する説明は省略する。各図における寸法比は、説明のため誇張している部分があり、必ずしも実際の寸法比とは一致しない。

[0012] 「を含む」(comprise)という用語は、対象となる構成要素以外の構成要素を含んでいてもよいことを意味する。「からなる」(consist of)という用語は、対象となる構成要素以外の構成要素を含まないことを意味する。「から本質的になる」(consist essentially of)という用語は、対象となる構成要素以外の構成要素を特別な機能を発揮する態様（発明の効果を完全に喪失させる態様など）では含まないことを意味する。本明細書において、「を含む」(comprise)と記載する場合、「からなる」(consist of)態様、及び「から本質的になる」(consist essentially of)態様を包含する。

[0013] タンパク質、抗体、ペプチド、ポリヌクレオチド(DNA、RNA)、細胞外小胞(エクソソーム等)、及び細胞は、単離されたものであり得る。「単離された」とは、天然状態又は他の成分から分離された状態を意味する。

「単離された」ものは、他の成分を実質的に含まないものであり得る。「他の成分を実質的に含まない」とは、単離された成分に含まれる他の成分の含有量が無視できる程度であることを意味する。単離された成分に含まれる他の成分の含有量は、例えば、10質量%以下、5質量%以下、4質量%以下、3質量%以下、2質量%以下、1質量%以下、0.5質量%以下、又は0.1質量%以下であり得る。本明細書に記載されるタンパク質、抗体、ペプチド、ポリヌクレオチド(DNA、RNA)、細胞外小胞(エクソソーム等)、及び細胞は、それぞれ、単離されたタンパク質、単離された抗体、単離されたペプチド、単離されたポリヌクレオチド(単離されたDNA、単離されたRNA)、単離された細胞外小胞(単離されたエクソソーム)、及び単離された細胞であり得る。

[0014] 「特異的結合物質」とは、特定の生体分子に対して、特異的に結合する物質を意味する。「特異的に結合する」とは、特定の生体分子に対して高い結合親和性を有するが、他の生体分子に対しては、極めて低い結合親和性しか有さないことを意味する。特異的結合物質は、好ましくは、特定の生体分子に高い結合性を有するが、他の生体分子にはほとんど結合性を有しない。

[0015] 生体分子と特異的結合物質の組合せとしては、例えば、ペプチド若しくはタンパク質と、抗体；核酸と、当該核酸が含む配列に相補的な配列を含む核酸；リガンドと、その受容体；酵素と、その基質、阻害剤若しくは補因子；糖鎖と、レクチン；ペプチド、タンパク質若しくは核酸等と、アプタマー；核酸の転写制御配列部分と、その転写制御因子；等が挙げられるがこれらに限定されない。対象物質がエクソソーム等の細胞外小胞である場合、対象物質に結合する特異的結合物質は、細胞外小胞の膜タンパク質に特異的に結合する物質であってもよい。

[0016] 「抗体」とは、抗原結合活性を有する免疫グロブリンを意味する。抗体は、抗原結合活性を有していれば、インタクトな抗体である必要はなく、抗原結合断片であってもよい。本明細書において、「抗体」という用語は、抗原結合断片を包含する。「抗原結合断片」とは、抗体の一部を含むポリペプチドであって、元の抗体の抗原結合性を維持しているポリペプチドである。抗原結合断片は、元の抗体の6つの相補性決定領域（complementarity determining region: CDR）を全て含むものが好ましい。すなわち、重鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3、並びに軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3を全て含むことが好ましい。抗原結合断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片（Fv）、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv（scFv）、sc（Fv）₂等が挙げられる。

[0017] 抗体は、いずれの生物に由来するものであってもよい。抗体が由来する生物としては、例えば、哺乳類（ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタ、サル、イヌ等）、鳥類（ニワトリ、ダチョウ）等が挙げられるが、

これらに限定されない。

抗体は、免疫グロブリンのいずれのクラス及びサブクラスであってもよい。抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

抗体は、免疫法、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法等の公知の方法により作製することができる。

[0018] 「対象物質」とは、測定対象となる物質を意味する。対象物質は、特に限定されず、当該対象物質に特異的に結合する特異的結合物質が存在する物質であればよい。対象物質としては、例えば、エクソソーム、ペプチド、タンパク質、核酸、糖鎖、レクチン、脂質等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0019] 対象物質は、例えば、生体試料等に含まれるものであってもよい。生体試料は特に限定されず、生体から採取された試料を用いることができる。生体試料としては、例えば、血液、血清、血漿、唾液、尿、涙、汗、乳汁、鼻汁、精液、胸水、消化管分泌液、脳脊髄液、組織間液、及びリンパ液等の体液試料、細胞破碎物試料、及び細胞抽出物試料等が挙げられるが、これらに限定されない。生体試料は、特定の生体物質画分を抽出又は濃縮したものであってもよい。

[0020] [対象物質測定方法]

本発明の第1の態様は、対象物質の測定方法である。一実施形態において、本態様の測定方法は、表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子であって、前記ナノ粒子は、可視光を照射したときにミー散乱理論に基づいて可視光領域にピークを有する散乱光スペクトルを生じる粒子径を有し、且つ対象物質に特異的に結合する第1の特異的結合物質が結合されている、ナノ粒子と、所定のナノ構造が複数個配置されたナノ構造表面を有する固相担体であって、前記所定のナノ構造は、前記ナノ粒子が結合することで、前記ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるものであり、且つ前記ナノ構造表面に、前記対象物質に特異的に結合する第2の特異的結合物質が結合されている、固

相担体と、を用いる。一実施形態において、本態様の方法では、前記第 2 の特異的結合物質と前記対象物質と前記第 1 の特異的結合物質と前記ナノ粒子とがこの順に前記ナノ構造表面に結合している。一実施形態において、本態様の方法は、前記第 2 の特異的結合物質と前記第 1 の特異的結合物質とを介して前記対象物質と前記ナノ粒子とが順に結合した前記固相担体に対して光を照射し、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前記ナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する工程、を含む。つまり、本態様の方法は、前記ナノ粒子と前記固相担体との間に、前記対象物質が、前記第 1 の特異的結合物質と前記第 2 の特異的結合物質とを用いて結合されている、サンドイッチ構造に対して光を照射し、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前記ナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する工程、を含む。

[0021] 図 1 は、本態様の方法の概略を説明する模式図である。

固相担体 10 は、所定のナノ構造 10A と、ナノ構造 10A 以外の領域 10B を含むナノ構造表面を有している。ナノ構造表面には、第 2 の特異的結合物質 15 が結合されている。ナノ構造表面に、対象物質 A を接触させると、第 2 の特異的結合物質 15 に対象物質 A が捕捉される（以下、「工程（i）」ともいう）。次いで、ナノ構造表面に、第 1 の特異的結合物質 25 が固定された標識ナノ粒子 20 を接触させると、第 1 の特異的結合物質 25 が、対象物質 A に結合する。これにより、第 2 の特異的結合物質 15、対象物質 A、及び第 1 の特異的結合物質 25 を介して、ナノ構造表面に、標識ナノ粒子 20 が結合する（以下、「工程（i i）」ともいう）。その結果、固相担体 10 のナノ構造表面に、第 2 の特異的結合物質 15、対象物質 A、及び第 1 の特異的結合物質 25 を介して、標識ナノ粒子 20 が結合されている構造となる。この構造は、対象物質 A が、固相担体 10 と標識ナノ粒子 20 との

間に、第2の特異的結合物質15及び第1の特異的結合物質25を介して結合されたサンドイッチ構造となる。図1におけるサンドイッチ構造は、固相担体10のナノ構造表面に、第2の特異的結合物質15と、対象物質Aと、第1の特異的結合物質25と、標識ナノ粒子20とが、順に結合された構造となっている。ナノ構造表面に結合する標識ナノ粒子20は、所定のナノ構造10A及びナノ構造10A以外の領域10Bのいずれかに結合している。標識ナノ粒子20は、光照射により、表面プラズモン共鳴が励起され、所定の散乱光を生じる。ナノ構造10Aは、標識ナノ粒子20が結合することで、標識ナノ粒子20の散乱光スペクトルを変化させるナノ構造を有している。そのため、ナノ構造10Aに結合する標識ナノ粒子20は、領域10Bに結合する標識ナノ粒子20とは異なる波長の散乱光を生じる。そこで、散乱光の波長の違いに基づいて、ナノ構造10Aに結合する標識ナノ粒子20を識別して計数する（以下、「工程（i i i）」という）。ナノ構造10Aに結合する標識ナノ粒子20の数は、試料中の対象物質の濃度と正の相関を示す。したがって、ナノ構造10Aに結合する標識ナノ粒子20を計数することで、試料中の対象物質を測定することができる。

[0022] <標識ナノ粒子>

本態様の対象物質の測定方法では、表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子（以下、「標識ナノ粒子」ともいう）を用いる。標識ナノ粒子は、可視光を照射したときにミー散乱理論に基づいて可視光領域にピークを有する散乱光スペクトルを生じる粒子径を有する。また、標識ナノ粒子は、対象物質に特異的に結合する第1の特異的結合物質が結合されている。

[0023] 「ナノ粒子」とは、ナノメートルオーダー（1～1000nm）の粒径を有する粒子をいう。

「表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子」とは、ナノ粒子に光を照射したときに、表面プラズモン共鳴を励起可能な、サイズ及び材質を有するナノ粒子をいう。

[0024] 表面プラズモン共鳴とは、導電性材料に光を入射したときに、導電性材料

の表面又はその付近で、入射光の電界振動と導電性材料の自由電子の集団振動とが結合して生成される表面プラズモンポラリトンの伝搬現象をいう。表面プラズモン共鳴は、一般に、負の誘電関数を有する金属と正の誘電関数を有する媒質との界面に沿って伝搬する伝導帯電子の集団的な振動現象である。

[0025] 表面プラズモン共鳴は、金属薄膜と誘電体との界面で観察される伝搬型表面プラズモン共鳴と、ナノ粒子又はナノ構造体の表面で観察される局在表面プラズモン共鳴とに分類され得る。「表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子」は、局在表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子であり得る。

[0026] 一実施形態において、標識ナノ粒子は、その表面の少なくとも一部に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質を含む。「表面プラズモン共鳴を励起可能な物質」とは、例えば、自由電子を有する物質をいう。表面プラズモン共鳴を励起可能な物質は、例えば、入射光に対して〔実部（ n ）＜消衰係数（ k ）〕の関係を満たす複素屈折率を有する物質である。

[0027] 複素屈折率は、吸収のある物質の屈折率である。複素屈折率（ m ）は、下記式で表すことができる。下記式中、実部 n は通常の屈折率を表し、虚部 k は消衰係数と呼ばれる。

$$m = n - i k$$

[0028] 表面プラズモン共鳴を励起可能な物質としては、例えば、金属が挙げられる。金属としては、例えば、金、銀、白金、アルミニウム等が挙げられる。

[0029] 標識ナノ粒子は、表面の一部が表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されていてもよく、表面の全部が表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されていてもよい。標識ナノ粒子は、粒子全体が表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されていてもよく、表面プラズモン共鳴を励起しない物質で構成されたコアと表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されたシェルとを含むものであってもよい。

[0030] 標識ナノ粒子は、表面プラズモン共鳴を励起可能なサイズを有する。表面プラズモン共鳴を励起可能なサイズは、例えば、光の波長と同程度以下のサ

イズであり得る。

一実施形態において、標識ナノ粒子は、可視光を照射したときにミー散乱理論に基づいて可視光領域にピークを有する散乱光スペクトルを生じる粒子径を有する。本明細書において、「可視光」とは、360～830 nmの波長領域の電磁波をいう。「可視光領域」とは、360～830 nmの波長領域をいう。

標識ナノ粒子は、例えば、10 nm～300 nmの粒径を有していてもよく、100 nm～150 nmの粒径を有することが好ましい。前記粒径は、個数基準の平均粒子径を意味する。

[0031] 標識ナノ粒子の形状は、可視光を照射したときに可視光領域に散乱光スペクトルのピークを有し得る形状であれば、特に限定されない。標識ナノ粒子の形状としては、例えば、球状、キューブ型、アーチン型、棒状、三角錐形状等が挙げられる。

[0032] 標識ナノ粒子には、対象物質に特異的に結合する第1の特異的結合物質が結合されている。第1の特異的結合物質は、対象物質に応じて適宜選択される。例えば、対象物質がペプチド又はタンパク質である場合、第1の特異的結合物質としては、前記ペプチド又は蛋白質に特異的に結合する抗体を用いることができる。例えば、対象物質がDNA又はRNA等の核酸である場合、第1の特異的結合物質としては、前記DNA又はRNAに相補的な配列を有する核酸プローブ（ポリヌクレオチドプローブ又はオリゴヌクレオチドプローブ）を用いることができる。

[0033] 標識ナノ粒子への第1の特異的結合物質の結合は、公知の方法で行うことができる。例えば、物理的吸着を利用する方法、第1の特異的結合物質が有する官能基と反応する官能基により標識ナノ粒子表面を修飾する方法（例えば、アミノ基修飾、水酸基修飾、カルボキシ基修飾、スクシンイミド基修飾等）、ビオチン－アビジン結合を利用する方法等が挙げられる。例えば、標識ナノ粒子表面をアビジン又はアビジン誘導体（ストレプトアビジン等）で修飾し、第1の特異的結合物質をビオチン修飾して、ビオチン－アビジン結

合を利用して、標識ナノ粒子に第1の特異的結合物質を結合させてもよい。あるいは、第1の特異的結合物質が結合可能なように、標識ナノ粒子の表面処理を行ってもよい。表面処理方法としては、例えば、酸又はアルカリ等によるウェットタイプの表面処理、及び末端にアミノ基又はカルボキシ基等の官能基を有するリンカー分子等を結合させる化学的表面処理等が挙げられる。

[0034] 標識ナノ粒子は、非特異的吸着を低減する目的で、ブロッキング処理を行ってもよい。ブロッキング処理は、例えば、標識ナノ粒子に第1の特異的結合物質を結合させた後に、行うことができる。ブロッキング処理を行うことにより、第1の特異的結合物質が結合していない粒子表面がブロッキングされる。これにより、標識ナノ粒子に対する非特異的吸着を低減することができる。

[0035] ブロッキング剤は、公知のブロッキング剤を特に制限なく用いることができる。ブロッキング剤としては、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、スキムミルク、フィッシュゼラチン等の生化学の分野で一般的に用いられる生体由来タンパク質系のブロッキング剤；ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）等の合成高分子化合物等が挙げられる。ブロッキング剤は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせて用いてもよい。例えば、PEGとタンパク質系ブロッキング剤とを組み合わせて用いてもよい。

[0036] 標識ナノ粒子は、使用するまで、保存液で保存してもよい。保存液は、標識ナノ粒子表面のゼータ電位が高く（または低く）なるようにして、標識ナノ粒子どうしが互いに反発しあうpHであることが望ましい。保存液は、例えば、イオンを中和する作用を有する分子（例えば、NaCl、KCl等の塩）を含まないことが好ましい。保存液は、非特異吸着及び凝集の抑制の観点から、界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤としては、例えば、Tween 20等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。保存液における界面活性剤の濃度は、例えば、0.01～1質量%とすることができ、0.05

～0.5質量%が好ましい。保存液の具体例としては、例えば、Tween 20等の非イオン性界面活性剤を0.1%程度含むものが挙げられる。

[0037] <固相担体>

本態様の対象物質の測定方法では、所定のナノ構造が複数個配置されたナノ構造表面を有する固相担体を用いる。所定のナノ構造は、標識ナノ粒子が結合することで、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるものである。ナノ構造表面には、対象物質に特異的に結合する第2の特異的結合物質が結合されている。

[0038] 「ナノ構造」とは、構造単位がナノメートルオーダー（1～1000nm）である立体構造をいう。ナノ構造は、ナノ構造を収容し得る仮想的な外接直方体の最長辺が、ナノメートルオーダーであり得る。

「ナノ構造表面」とは、ナノ構造を有する固相担体の表面をいう。

[0039] 固相担体は、標識ナノ粒子が結合することで、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させる所定のナノ構造（以下、「ナノ構造（A）」という）が配置されたナノ構造表面を有する。後述するように、固相担体のナノ構造表面には、第2の特異的結合物質が固定されており、第2の特異的結合物質—対象物質—第1の特異的結合物質の結合を介して、標識ナノ粒子がナノ構造表面に結合し得る。ナノ構造表面において、標識ナノ粒子がナノ構造（A）に結合すると、光照射により励起される局在表面プラズモン共鳴の状態が変化し、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルが変化する。

[0040] ナノ構造（A）は、標識ナノ粒子が結合することで、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させる形状及び材質を有する。

[0041] 一実施形態において、ナノ構造（A）は、その表面の少なくとも一部に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質を含む。表面プラズモン共鳴を励起可能な物質としては、上記と同様のものが挙げられる。ナノ構造（A）は、表面の一部が表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されていてもよく、表面の全部が表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されていてもよい。ナノ構造（A）は、構造全体が表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構

成されていてもよく、表面プラズモン共鳴を励起しない物質で構成された層の上に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成された層が積層されたものであってもよい。ナノ構造（A）は、表面の一部を含む構造の一部が、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で構成されていてもよい。

[0042] ナノ構造（A）の形状は、標識ナノ粒子が結合することで、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させる形状であれば、特に限定されない。ナノ構造（A）の形状としては、例えば、ピット形状、ホール形状、コーン形状、球体形状、ドーナツ型形状等が挙げられる。

[0043] ナノ構造（A）のサイズは、標識ナノ粒子が結合することで、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるサイズであれば、特に限定されない。画像処理において、ナノ構造（A）に結合した標識ナノ粒子の散乱光を抽出しやすくなることから、ナノ構造（A）は、1個のナノ構造（A）に対して、1個の標識ナノ粒子が結合するサイズであることが好ましい。例えば、ナノ構造（A）を収容し得る仮想的な外接直方体の最長辺が、標識ナノ粒子の粒径の0.2倍以上2倍未満であることが好ましい。

[0044] 固相担体のナノ構造表面には、複数個のナノ構造（A）が配置されている。一実施形態において、ナノ構造表面に配置される複数個のナノ構造（A）は、全て同じナノ構造である。画像処理において、ナノ構造（A）に結合した標識ナノ粒子の散乱光を抽出しやすくなることから、ナノ構造（A）は、固相担体のナノ構造表面において、周期的配列で配置されていることが好ましい。「周期的配列」とは、一定の周期でナノ構造（A）が配列されていることをいう。ナノ構造（A）の周期的配列としては、例えば、格子状配置が挙げられる。

[0045] 固相担体のナノ構造表面は、ナノ構造（A）以外の構造を有していてもよく、有していなくてもよい。画像処理において、ナノ構造（A）に結合した標識ナノ粒子の散乱光を抽出しやすくなることから、ナノ構造表面は、ナノ構造（A）以外のナノ構造を有さないことが好ましい。

[0046] 固相担体は、基板の表面に、ナノ構造（A）が形成されたものであり得る

。基板は、基板の材質は、特に制限されない。基板は、例えば、誘電体で構成される。基板の材質としては、例えば、ガラス、シリコン、プラスチック樹脂等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0047] (固相担体の製造方法)

図2～6に、固相担体の製造方法の例を示す。

[0048] 図2は、リソグラフィ法を用いた固相担体の製造例である。

まず、基板の表面を研磨及び洗浄して、平滑な表面を有するスタンパー用基板1を作製する(図2(A))。

次いで、スタンパー用基板1の表面にレジスト膜Rを形成する(図2(B))。レジスト膜Rは、ポジ型レジスト、及びネガ型レジストのいずれで形成してもよい。レジストは、作製するナノ構造(A)に応じて、適宜選択可能である。レジスト膜Rは、スピンコーティング法等の公知の方法により形成することができる。

次いで、レジスト膜Rに、パターンを描画する(図2(C))。パターンの描画方法は、公知の方法を用いることができる。パターンの描画方法としては、電子線描画法、レーザー描画法等が挙げられる。パターンは、ナノ構造(A)の配置に合わせて適宜形成することができる。ナノ構造(A)を周期的配列とする場合、当該周期的配列に合わせてパターンを描画する。

次いで、レジスト膜Rの現像を行う(図12(D))。ポジ型レジストの場合には、露光部のレジスト膜が除去されて、レジストパターンが形成される。ネガ型レジストの場合には、非露光部のレジスト膜が除去されて、レジストパターンが形成される。

次いで、前記レジストパターンを用いて、電鍍(メッキ)により凹凸形状が反転したスタンパーSを作製する(図2(E))。

次いで、スタンパーSを型にして、基板11を成型する(図2(F))。スタンパーSからは、複数の基板11を作製することが可能である。成型には、射出成型法、ナノインプリント法等を適宜用いることができる。ナノインプリント法を用いることで、ベースの基材と基板表面のナノ構造とを、そ

れぞれ異なった材料で作製することもできる。

次いで、基板 1 1 の表面に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質の薄膜 1 2 を形成する（図 2（G））。これにより、ナノ構造（A）であるナノ構造 1 0 A と、ナノ構造（A）以外の領域 1 0 B とを有するナノ構造表面を備えた固相担体 1 0 を得ることができる。

[0049] 図 3 は、ナノ粒子を用いた固相担体の製造例である。

まず、基板の表面を研磨及び洗浄して、平滑な表面を有する基板 1 1 1 を作製する（図 3（A））。

次いで、基板 1 1 1 上に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で形成されたナノ粒子 1 1 2 を塗布する（図 3（B））。ナノ粒子 1 1 2 は、例えば、可視光の照射により、ミー散乱理論に基づいて可視光領域にピークを有する散乱光スペクトルが生じる大きさとすることができる。ナノ粒子 1 1 2 の粒径としては、例えば、10 nm～300 nm が挙げられる。ナノ粒子 1 1 2 の形状としては、例えば、球状、キューブ型、アーチン型、棒状、三角錐形状等が挙げられる。ナノ粒子 1 1 2 の塗布方法は、特に限定されず、公知の方法を用いることができる。例えば、ナノ粒子 1 1 2 を溶媒に分散して作製したナノ粒子 1 1 2 の分散液を、基板 1 1 1 の表面に滴下し、乾燥することで、ナノ粒子 1 1 2 を基板 1 1 1 に塗布することができる。あるいは、スピコーティング法により、ナノ粒子 1 1 2 の分散液を基板 1 1 1 に塗布することができる。ナノ粒子 1 1 2 が、基板 1 1 1 の表面で均一に分散した状態となるように、溶媒の種類、ナノ粒子 1 1 2 の濃度、乾燥時間等を適宜調整可能である。スピコーティング法を用いる場合、基板 1 1 1 の回転速度、回転時間等を適宜調整可能である。このようにして、ナノ構造（A）であるナノ構造 1 1 0 A と、ナノ構造（A）以外の領域 1 1 0 B とを有するナノ構造表面を備えた固相担体 1 1 0 を得ることができる。

[0050] 図 4 は、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質の薄膜を形成した基板を用いた固相担体の作製例である。

まず、基板の表面を研磨及び洗浄して、平滑な表面を有する基板 2 1 1 を

作製する（図4（A））。

次いで、基板211の表面に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質の薄膜212Lを形成する（図4（B））。薄膜212Lは、公知の方法を用いて形成することができる。薄膜212Lの形成方法としては、例えば、真空成膜法（スパッタリング法、真空蒸着法等）、スピンコーティング法等が挙げられる。薄膜212Lの厚さは、例えば、10～300nm、20～200nm、又は40～100nmとすることができる。

次いで、薄膜212Lの表面に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質で形成されたナノ粒子212Pを塗布する（図4（C））。ナノ粒子212Pの塗布方法としては、図3の方法におけるナノ粒子112の塗布方法と同様の方法が挙げられる。このようにして、ナノ構造（A）であるナノ構造210Aと、ナノ構造（A）以外の領域210Bとを有するナノ構造表面を備えた固相担体210を得ることができる。

[0051] なお、基板211の表面に形成する薄膜は、表面プラズモン共鳴を励起しない物質の薄膜であってもよい。例えば、薄膜は、樹脂で形成してもよい。薄膜形成に用いる樹脂は、特に限定されないが、例えば、アクリル樹脂、ポリオレフィン、シクロオレフィンポリマー、シクロオレフィンコポリマー、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、ポリスチレン、ポリジメチルシロキサン（PDMS）等が挙げられる。

[0052] 図5は、エッチング法を用いた固相担体の作製例である。

まず、基板の表面を研磨及び洗浄して、平滑な表面を有する基板311を作製する（図5（A））。

次いで、基板311の表面に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質の薄膜312Lを形成する（図5（B））。薄膜312Lは、公知の方法を用いて形成することができる。薄膜312Lの形成方法としては、例えば、真空成膜法（スパッタリング法、真空蒸着法等）、スピンコーティング法等が挙げられる。薄膜312Lの厚さは、特に限定されないが、標識ナノ粒子の粒径に応じて選択することができる。薄膜312Lの厚さは、例えば、10～

300 nm、20～200 nm、又は40～100 nmとすることができる。

次いで、薄膜312Lの表面に、ナノ粒子Pを塗布する（図5（C））。ナノ粒子Pの材質は、特に限定されず、所望の材質を用いることができる。ナノ粒子Pは、例えば、樹脂ビーズ等（例えば、ポリスチレンビーズ）を用いることができる。ナノ粒子Pの粒径は、最終的に形成するナノ構造（A）のサイズに合わせて適宜選択可能である。ナノ粒子Pの粒径は、例えば、標識ナノ粒子の粒径の0.2倍以上2倍未満とすることができる。ナノ粒子Pの塗布方法としては、図3の方法におけるナノ粒子112の塗布方法と同様の方法が挙げられる。ナノ粒子Pの具体例としては、粒径100 nmのポリスチレンビーズが挙げられる。

次いで、エッチングプロセスにより、ナノ粒子Pをマスクとして、薄膜312Lをエッチングする（図5（D））。これにより、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質により構成される構造312Cが形成される。エッチングプロセスは、反応性イオンエッチング等のドライエッチングであってもよく、酸又はアルカリ等を用いたウェットエッチングであってもよい。エッチング条件は、最終的に作製するナノ構造（A）の形状及び材質に合わせて、適宜選択可能である。

次いで、ナノ粒子（P）を除去する（図5（E））。ナノ粒子（P）の除去方法は、特に限定されない。ナノ粒子（P）の除去方法としては、例えば、超音波処理が挙げられる。このようにして、ナノ構造（A）であるナノ構造310Aと、ナノ構造（A）以外の領域310Bとを有するナノ構造表面を備えた固相担体310を得ることができる。

[0053] 図5に示す方法の具体例としては、以下の方法が挙げられる。例えば、ガラス基板上にスパッタリング法で金薄膜を50 nm形成し、直径100 nmのポリスチレンビーズをスピンコーティングで塗布し、次いで、ポリスチレンビーズをマスクとしてArガスで金薄膜をエッチングした後、ポリスチレンビーズを超音波処理で除去する。このようにして、ガラス基板上に、10

0 nmの金ナノ構造が配置されたナノ構造表面を有する固相担体を作製することができる。

[0054] 図6は、リソグラフィ法とエッチング法とを組み合わせた固相担体の作製例である。

まず、基板の表面を研磨及び洗浄して、平滑な表面を有する基板411を作製する(図6(A))。

次いで、基板411の表面に、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質の薄膜412Lを形成する(図6(B))。薄膜412Lの形成方法及び厚さとしては、図5の方法における薄膜312Lと同様のものが挙げられる。

次いで、薄膜412Lの表面に、レジスト膜Rを形成する(図6(C))。

次いで、レジスト膜Rに、パターンを描画する(図6(D))。パターンの描画方法としては、図2で挙げたものと同様の方法が挙げられる。

次いで、レジスト膜Rの現像を行う(図6(E))。ポジ型レジストの場合には、露光部のレジスト膜が除去されて、レジストパターンが形成される。ネガ型レジストの場合には、非露光部のレジスト膜が除去されて、レジストパターンが形成される。

次いで、前記レジストパターンをマスクとして用いて、薄膜412Lをエッチングする(図6(F))。これにより、表面プラズモン共鳴を励起可能な物質により構成される構造412Cが形成される。エッチングプロセスとしては、図5の方法で挙げたものと同様の方法が挙げられる。

次いで、レジスト膜Rを除去する(図6(G))。このようにして、ナノ構造(A)であるナノ構造410Aと、ナノ構造(A)以外の領域410Bとを有するナノ構造表面を備えた固相担体410を得ることができる。

[0055] 固相担体のナノ構造表面には、対象物質に特異的に結合する第2の特異的結合物質が結合されている。第2の特異的結合物質は、対象物質に応じて適宜選択される。第2の特異的結合物質は、第1の特異的結合物質と同じであってもよく、異なってもよい。第2特異的結合物質—対象物質—第1特

異的結合物質の複合体の形成の観点から、第2特異的結合物質は、第1特異的結合物質と異なることが好ましい。例えば、対象物質がペプチド又はタンパク質である場合、第1の特異的結合物質及び第2特異的結合物質は、互いに異なるエピトープに結合する抗体であってもよい。例えば、対象物質がRNA又はDNA等の核酸である場合、第1の特異的結合物質及び第2特異的結合物質は、互いに異なる領域にハイブリダイズする核酸プローブ（ポリヌクレオチドプローブ又はオリゴヌクレオチドプローブ）であってもよい。

[0056] 固相担体のナノ構造表面への第2の特異的結合物質の結合は、公知の方法で行うことができる。ナノ構造表面への第2の特異的結合物質の結合方法としては、標識ナノ粒子への第1の特異的結合物質の結合方法として挙げたものと同様の方法が挙げられる。

[0057] 第2の特異的結合物質を結合するために、固相担体のナノ構造表面の表面処理を行ってもよい。表面処理としては、例えば、紫外線処理等により光学的処理、プラズマ処理、酸又はアルカリ等によるウェットタイプの処理、末端にアミノ基又はカルボキシ基等の官能基を有するリンカー分子等を結合させる化学的処理等が挙げられる。

[0058] ナノ構造表面への第2の特異的結合物質の結合は、固相担体のナノ構造表面に、第2の特異的結合物質を含む反応液を留置可能な構造を形成することにより行ってもよい。例えば、ナノ構造表面の反応液を留置可能な構造内に、第2の特異的結合物質を含む反応液を一定時間留置することで、ナノ構造表面への第2の特異的結合物質の結合反応を行うことができる。反応液を留置可能な構造としては、例えば、ウェル構造、流路構造等が挙げられる。ウェル構造は、例えば、所望の大きさの貫通孔を有する樹脂シート等を、ナノ構造表面に積層することにより、形成することができる。流路構造は、例えば、ナノ構造表面に流路が形成されるように樹脂シートを配置し、前記流路の上部を別の樹脂シートで封鎖することにより形成することができる。樹脂シートの材質は、特に限定されないが、例えば、PDMS、シクロオレフィンポリマー、シクロオレフィンコポリマー等が挙げられる。ナノ構造表面へ

の第2の特異的結合物質の結合反応は、室温（20～30℃）で行ってもよく、所定温度に維持した恒温槽内で行ってもよい。結合反応の温度は、第2の特異的結合物質の種類に応じて、適宜選択することができる。

[0059] 固相担体のナノ構造表面は、非特異的吸着を低減する目的で、ブロッキング処理を行ってもよい。ブロッキング処理は、例えば、固相担体のナノ構造表面に第2の特異的結合物質を結合させた後に、行うことができる。ブロッキング処理を行うことにより、第2の特異的結合物質が結合していないナノ構造表面がブロッキングされる。これにより、ナノ構造表面に対する非特異的吸着を低減することができる。ブロッキング剤としては、上記標識ナノ粒子のブロッキング剤として挙げたものと同様のものが挙げられる。

[0060] 固相担体のナノ構造表面は、洗浄処理を行ってもよい。洗浄処理は、例えば、固相担体のナノ構造表面に第2の結合物質を結合させた後、及び／又はブロッキング処理の後に、行うことができる。洗浄処理は、洗浄液をナノ構造表面に供給し、洗浄液を除去することを1～3回程度繰り返すことにより、行うことができる。洗浄液としては、PBS（Phosphate-buffered saline）等の緩衝液にTween 20等の非イオン性界面活性剤を添加したもの等が挙げられる。洗浄処理を行うことにより、ナノ構造表面に付着する夾雑物を除去することができる。

[0061] <工程（i）>

本実施形態の方法は、工程（i）を有してもよい。工程（i）は、第2の特異的結合物質との結合を介して、前記ナノ構造表面に、前記対象物質を結合させる工程である。

[0062] 工程（i）は、固相担体のナノ構造表面に、対象物質を含み得る試料を接触させることにより、行うことができる。ナノ構造表面に対する試料の接触は、固相担体のナノ構造表面に、試料を留置可能な構造を形成することにより行ってもよい。例えば、ナノ構造表面の試料を留置可能な構造内に、試料を一定時間留置することで、ナノ構造表面への試料の接触を行うことができる。試料を留置可能な構造としては、例えば、ウェル構造、流路構造等が挙

げられる。ナノ構造表面に試料を接触させることで、試料中の対象物質が第2の特異的結合物質に結合する。これにより、第2の特異的結合物質との結合を介して、ナノ構造表面に、対象物質を結合させることができる。

[0063] 第2の特異的結合物質と対象物質との結合反応の条件は、対象物質及び第2の特異的結合物質の種類に応じて、適宜選択可能である。例えば、対象物質がタンパク質又はペプチドであり、第2の特異的結合物質が抗体である場合、反応温度としては、20℃以上、30℃以上、又は35℃以上等が挙げられる。反応温度の上限は、特に限定されないが、例えば、50℃以下、45℃以下、又は40℃以下等が挙げられる。反応温度の範囲としては、例えば、20～50℃、30～45℃、又は30～40℃等が挙げられる。

反応時間は、特に限定されず、第2の特異的結合物質と対象物質との結合反応が十分に進行する程度の時間とすることができる。反応時間は、対象物質及び第2の特異的結合物質の種類に応じて適宜選択することができる。対象物質がタンパク質又はペプチドであり、第2の特異的対象物質が抗体である場合、反応時間としては、例えば、3分以上、5分以上、又は10分以上等が挙げられる。反応時間の上限は、特に限定されないが、例えば、60分以下、45分以下、30分以下、又は20分以下等とすることができる。反応時間の範囲としては、例えば、3～60分、5～45分、又は10～30分等が挙げられる。

[0064] 試料は、希釈バッファーで適宜希釈してもよい。希釈バッファーとしては、ゼータ電位（表面電位）を低下させて反応効率を維持するために、NaCl又はKCl等の塩を含むものであってもよい。例えば、塩を含む緩衝液（PBS等）等を用いることができる。また、希釈バッファーは、非特異的吸着を低減するために、ブロッキング剤及び／又は界面活性剤（Tween 20等）を含んでいてもよい。

[0065] 第2の特異的結合物質と対象物質との結合反応の後、ナノ構造表面から試料を除去し、洗浄処理を行ってもよい。洗浄処理を行うことで、ナノ構造表面に残存する未反応の夾雑物を除去することができる。洗浄処理は、洗浄液

をナノ構造表面に供給し、洗浄液を除去することを1～3回程度繰り返すことにより、行うことができる。洗浄液としては、上記と同様のものが挙げられる。

[0066] <工程 (i i) >

本実施形態の方法は、工程 (i i) を有してもよい。工程 (i i) は、対象物質と第1の結合物質との結合を介して、ナノ構造表面に、標識ナノ粒子を結合させる工程である。

[0067] 工程 (i i) は、固相担体のナノ構造表面に、標識ナノ粒子を含む分散液を接触させることにより、行うことができる。ナノ構造表面に対する標識ナノ粒子分散液の接触は、固相担体のナノ構造表面に、試料を留置可能な構造を形成することにより行ってもよい。例えば、ナノ構造表面の標識ナノ粒子分散液を留置可能な構造内に、試料を一定時間留置することで、ナノ構造表面への標識ナノ粒子分散液の接触を行うことができる。標識ナノ粒子分散液を留置可能な構造としては、例えば、ウェル構造、流路構造等が挙げられる。ナノ構造表面に標識ナノ粒子分散液を接触させることで、標識ナノ粒子に結合する第1の特異的結合物質が、第2の特異的結合物質に捕捉された対象物質に結合する。これにより、第2の特異的結合物質、対象物質、及び第1の特異的結合物質との結合を介して、ナノ構造表面に、標識ナノ粒子を結合させることができる。

[0068] 標識ナノ粒子分散液は、ゼータ電位（表面電位）を低下させて反応効率を維持するために、NaCl又はKCl等の塩を含むものであってもよい。例えば、塩を含む緩衝液（PBS等）等を用いることができる。また、標識ナノ粒子分散液は、非特異的吸着を低減するために、ブロッキング剤及び又は界面活性剤（Tween 20等）を含んでいてもよい。

[0069] 第1の特異的結合物質と対象物質との結合反応の条件は、対象物質及び第1の特異的結合物質の種類に応じて、適宜選択可能である。例えば、対象物質がタンパク質又はペプチドであり、第1の特異的結合物質が抗体である場合、反応温度としては、20℃以上、30℃以上、又は35℃以上等が挙げ

られる。反応温度の上限は、特に限定されないが、例えば、50℃以下、45℃以下、又は40℃以下等が挙げられる。反応温度の範囲としては、例えば、20～50℃、30～45℃、又は30～40℃等が挙げられる。

反応時間は、特に限定されず、第1の特異的結合物質と対象物質との結合反応が十分に進行する程度の時間とすることができる。反応時間は、対象物質及び第1の特異的結合物質の種類に応じて適宜選択することができる。対象物質がタンパク質又はペプチドであり、第1の特異的対象物質が抗体である場合、反応時間としては、例えば、3分以上、5分以上、又は10分以上等が挙げられる。反応時間の上限は、特に限定されないが、例えば、60分以下、45分以下、30分以下、又は20分以下等とすることができる。反応時間の範囲としては、例えば、3～60分、5～45分、又は10～30分等が挙げられる。

[0070] 第1の特異的結合物質と対象物質との結合反応の後、ナノ構造表面から標識ナノ粒子分散液を除去し、洗浄処理を行ってもよい。洗浄処理を行うことで、ナノ構造表面に残存する未反応の夾雑物を除去することができる。洗浄処理は、洗浄液をナノ構造表面に供給し、洗浄液を除去することを1～3回程度繰り返すことにより、行うことができる。洗浄液としては、上記と同様のものが挙げられる。

[0071] 工程(i)及び工程(ii)により、対象物質が第2の特異的結合物質を介してナノ構造表面と結合されており、標識ナノ粒子に結合する第1の特異的結合物質が前記第2の特異的結合物質に結合する対象物質に結合している、固相担体を得ることができる。すなわち、工程(i)及び工程(ii)後の固相担体は、対象物質が、固相担体のナノ構造表面と標識ナノ粒子との間に、第2の特異的結合物質及び第1の特異的結合物質を介して結合されたサンドイッチ構造を有する。このサンドイッチ構造では、固相担体のナノ構造表面に、第2の特異的結合物質と、対象物質と、第1の特異的結合物質と、標識ナノ粒子とが、この順で結合された構造となっている。

[0072] <工程(iii)>

固相担体は、対象物質が第2の特異的結合物質を介してナノ構造表面と結合されており、ナノ粒子は、ナノ構造表面に、第2の特異的結合物質、対象物質、及び第1の特異的結合物質を介して結合されているとよい。工程（i i i）では、この固相担体のナノ構造表面に光を照射し、所定のナノ構造（ナノ構造（A））に結合する標識ナノ粒子の散乱光スペクトルと、所定のナノ構造（ナノ構造（A））を有しない領域に結合する標識ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、ナノ構造（ナノ構造（A））に結合する標識ナノ粒子を識別して計数する。

[0073] 一実施形態において、固相担体のナノ構造表面に照射する光は、可視光である。ナノ構造表面に光を照射すると、ナノ構造表面に結合する標識ナノ粒子が散乱光を発生する。この散乱光を検出することで、ナノ構造表面に結合する標識ナノ粒子を検出することができる。ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子は、ナノ構造（A）により表面プラズモン共鳴の状態が変化し、散乱光スペクトルが変化する。そのため、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子は、ナノ構造（A）に特異的な散乱光スペクトル（以下、「散乱光スペクトル（A）」ともいう）を発生する。一方、ナノ構造（A）を有しない領域（以下、「領域（B）」ともいう）に結合する標識ナノ粒子は、散乱光スペクトル（A）とは異なる散乱光スペクトルを発生する。領域（B）が、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるナノ構造を有しない場合、領域（B）に結合する標識ナノ粒子は、標識ナノ粒子単体で発生する散乱光スペクトルと同一の散乱光スペクトルを発生する。領域（B）が、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるナノ構造（ナノ構造（A）とは異なる構造）を有する場合、領域（B）に結合する標識ナノ粒子は、当該ナノ構造に特異的な散乱光スペクトルを発生する。したがって、ナノ構造表面に光を照射し、散乱光スペクトルを測定することで、散乱光スペクトルの差異に基づいて、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子と、領域（B）に結合する標識ナノ粒子とを識別することができる。

[0074] 照射光の光源は、特に限定されない。照射光源としては、例えば、ハロゲ

ンランプ、LEDランプ、レーザー光源が挙げられる。照射光源は、標識ナノ粒子から生じる散乱光スペクトルに合わせて、適宜選択することができる。例えば、暗視野光学系の顕微鏡を用いることができる。

[0075] 標識ナノ粒子から生じる散乱光スペクトルは、CCDカメラ及びCMOSカメラ等の受光素子を備えた検出器で検出することができる。受光素子としては、光電子増倍管（PMT）、EM-CCD等の高感度な受光素子を用いてもよい。

固相担体と受光素子との間に、特定の波長を透過又は遮断する光学フィルターを用いてもよい。例えば、固相担体と受光素子との間に、領域（B）に結合する標識ナノ粒子が発生する散乱光スペクトルのピーク波長を遮断する光学フィルターを用いてもよい。あるいは、例えば、固相担体と受光素子との間に、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子が発生する散乱光スペクトルのピーク波長のみを透過する光学フィルターを用いてもよい。

[0076] ナノ構造表面に結合する標識ナノ粒子の散乱光スペクトルは、散乱光画像として取得し、コンピュータ等の演算装置により画像処理を行って、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子が発生する散乱光の輝点のみを計数してもよい。図7は、画像取得以降の処理の流れを示すフローチャートである。

S11により画像を取得後、画像は、RGB情報又はHSV情報等を用いて色相分離を行う（S12）。次いで、元の画像から、領域（B）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点を差し引く。これにより、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点のみの画像を取得する（S13）。次いで、S13で取得した画像から、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の輝点を計数する（S14）。計数結果を出力し（S15）、処理を終了する。S13において、元画像から、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点のみを抽出し、画像を取得してもよい。

[0077] 図8は、固相担体と受光素子との間に、特定の波長を透過又は遮断する光学フィルターを用いた場合の画像取得以降の処理の流れを示すフローチャー

トである。この場合、光学フィルターにより、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の散乱光スペクトルのみが受光素子に検出される。そのため、S 2 1により取得される画像は、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点のみの画像である。次いで、S 2 1により取得された画像から、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点を計数する（S 2 2）。計数結果を出力し（S 2 3）、処理を終了する。

[0078] ナノ構造表面において、ナノ構造（A）が、周期的配列で配置されている場合、画像処理において、周期的配列の座標情報を用いて、領域（B）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点を除去してもよい。あるいは、周期的配列の座標情報を用いて、ナノ構造（A）に結合する標識ナノ粒子の散乱光に由来する輝点のみを抽出してもよい。

[0079] ナノ構造（A）に結合した標識ナノ粒子から生じた散乱光の輝点は、ポアソン分布による統計処理を用いて、非常に少ない数の計数精度を向上させる方式を用いてもよい。複数の観察視野において計数を行い、それらの合計値、平均値、又はその他の統計的手法を用いて、総合的に対象物質の定量を行うこともできる。ポアソン分布の統計処理を用いることにより、比較的少ない観察視野で、対象物質を定量してもよい。

[0080] 本態様の方法では、標識ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させる所定のナノ構造が配置されたナノ構造表面を有する固相担体を用いて、対象物質を捕捉し、標識ナノ粒子をナノ構造表面に結合させる。これにより、光を照射して散乱光スペクトルを検出することで、所定のナノ構造に結合した標識ナノ粒子のみを精度よく計数することができる。所定のナノ構造に結合する標識ナノ粒子の数は、試料中の対象物質の濃度と高い相関を示す。そのため、微量の対象物質も精度よく定量することができる。

[0081] [対象物質測定システム]

本発明の第2の態様は、前記第1の態様の対象物質の測定方法に用いる対象物質測定システムである。本態様の対象物質測定システムは、前記固相担体に結合する前記ナノ粒子に対して光を照射する光源と、前記ナノ粒子から

の散乱光を検出する検出器と、前記検出器で取得された散乱光の画像から、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する計数部と、を含む。

[0082] 図9は、対象物質測定システムの構成の一例を示す図である。対象物質測定システム100は、光源40と、検出器30と、演算装置50と、出力装置60とを備えている。

[0083] 光源40は、固相担体10のナノ構造表面に結合する標識ナノ粒子20に、光を照射する光源である。光源としては、上記で例示したものが挙げられる。光源は、暗視野光学系の顕微鏡の光源を用いてもよい。標識ナノ粒子20は、図示しない第2の特異的結合物質、対象物質、及び第1の特異的結合物質を介して、ナノ構造表面に結合していてもよい。例えば、固相担体10と標識ナノ粒子20との結合構造は、図1と同様であってもよい。

[0084] 検出器30は、固相担体10のナノ構造表面に結合する標識ナノ粒子20からの散乱光を検出する。検出器30は、受光素子31、フィルター32、及びレンズ33を備えることができる。

受光素子31は、標識ナノ粒子20からの散乱光を検出できるものであればよい。受光素子31としては、例えば、CCD、CMOS、光電子増倍管(PMT)、EM-CCD等が挙げられる。

フィルター32は、特定の波長の光を透過するフィルター、又は特定の波長の光を遮断するフィルターを用いることができる。フィルター32は、例えば、ナノ構造(A)(図9中の10A)に結合する標識ナノ粒子20の散乱光スペクトルのピーク波長を透過するフィルターであってもよい。あるいは、ナノ構造(A)を有しない領域(領域(B):図9中の10B)に結合する標識ナノ粒子20の散乱光スペクトルのピーク波長を遮断するフィルターであってもよい。

レンズ33は、対物レンズを用いることができる。対物レンズの倍率とし

ては、例えば、50～100倍が挙げられる。

[0085] 演算装置50は、CPU等のプロセッサとメモリとを備え、検出器30で取得された画像の画像処理を実行する。演算装置50は、検出器30で取得された散乱光の画像から、ナノ構造(A)に結合する標識ナノ粒子を識別して計数する計数部を備える。検出器30がフィルター32を含む場合、検出器30が取得する散乱光画像は、ナノ構造(A)に結合する標識ナノ粒子20から生じる散乱光の輝点のみの画像であり得る。計数部は、検出器30で取得された散乱光画像の輝点を計数ことにより、ナノ構造(A)に結合する標識ナノ粒子20の数を計数することができる(図8参照)。

[0086] 検出器30がフィルター32を含まない場合、検出器30が取得する散乱光画像は、ナノ構造(A)に結合する標識ナノ粒子20からの散乱光の輝点と、領域(B)に結合する標識ナノ粒子20からの散乱光の輝点との両方を含む。この場合、演算装置50は、検出器30で取得された元画像から、ナノ構造(A)に結合する標識ナノ粒子20からの散乱光の輝点のみを抽出した画像を取得する。前記で取得した画像において、輝点を計数することにより、ナノ構造(A)に結合する標識ナノ粒子20の数を計数する(図7参照)。

[0087] 演算装置50は、検出器30に接続された外部コンピュータであってもよく、検出器30及び光源40を含む暗視野光学系の顕微鏡装置等に内蔵されるコンピュータであってもよい。前記外部コンピュータは、有線で接続されてもよく、無線で接続されてもよく、インターネット等のネットワーク又は電話回線当の通信回線を介して検出器30に接続されてもよい。

[0088] 出力装置60は、計数部で計数された結果等の各種情報を出力する。出力装置60は、例えばCRTディスプレイや液晶ディスプレイ、有機ELディスプレイ等の表示装置を含んで構成される。

[0089] 本態様の対象物質測定システムは、第1の態様の対象物質の測定方法を実行するために用いることができる。

実施例

[0090] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0091] [実施例 1]

(固相担体 (1) の作製)

図 2 (A) ~ 2 (F) に示す方法に従い、ナノホールが周期的配列で形成されたナノ構造表面を有する成型基板 (1) を作製した。成型基板の材質には、シクロオレフィンポリマー樹脂 (日本ゼオン製 Zeonor) を用いた。ナノホールは、底面部の直径 100 nm、開口部の直径 160 nm、深さ 100 nm の逆円錐台型ホールとした。ナノホールのピッチは、500 nm とした。次いで、真空スパッタ法を用いて、前記成型基板の表面に、厚さ 50 nm の金薄膜を形成した。このようにして、固相担体 (1) を得た。

[0092] (流路型固相担体デバイス (1) の作製)

次に、固相担体 (1) のナノ構造表面に、厚さ 140 μ m の流路形成用シート (microfluidic 社製、型番 10001380) を積層し、流路幅 1 mm、流路長 100 mm の流路を形成した。次いで、流路カバー用シートとして、厚さ 100 μ m のシクロオレフィンポリマーシートを前記流路形成用シートに積層して張り合わせた。このようにして、流路型固相担体デバイス (1) を作製した。流路型固相担体デバイス (1) では、流路底面が、固相担体 (1) のナノ構造表面により構成されている。

流路形成用シート及び流路カバー用シートは、上記のものに限定されず、任意のものを使用することができる。検出対象物質の反応効率、使用する検体量、及び光学的検出法における収差の観点から、流路形成用シート及び流路カバー用シートの厚さは、できる限り小さいほうが好ましい。

[0093] (ナノ構造表面への抗 P S A 抗体の固定)

抗 P S A 抗体 (H y T e s t 社製、型番 4 P 3 3 - 1 H 1 2) を P B S で希釈し、濃度 5 μ g / mL の抗 P S A 抗体溶液を調製した。

流路型固相担体デバイス (1) の流路の排出口に、不要な溶液を吸収するパッド (例えばキムワイプ等) を置いた。次いで、流路の導入口から、抗 P

PSA抗体溶液1 μL を、流路内にピペットで流し込んだ。抗PSA抗体を流路内に留置して、室温で、10分間静置し、ナノ構造表面に抗PSA抗体を吸着させた。次いで、0.05%Tween 20含有PBS 1 μL を流路にピペットで流し込み、未反応の抗PSA抗体を除去した。この洗浄操作を2回繰り返した。

[0094] (ナノ構造表面のブロッキング処理)

次いで、アナライト及び標識ナノ粒子の非特異的吸着を抑制するために、ナノ構造表面のブロッキング処理を行った。BSA（牛血清アルブミン、サーモフィッシャー製、型番37525）をPBSで1%となるように希釈して、ブロッキング液を調製した。ブロッキング液1 μL を、流路内にピペットで流し込み、室温で、10分間静置した。次いで、0.05%Tween 20含有PBS 1 μL を、流路内にピペットで流し込み、未反応のBSAを除去した。この洗浄操作を2回繰り返した。

[0095] (アナライトとの反応)

PSA（HyTest社製、型番8P78）をPBSで10 ng/mLに希釈し、アナライトサンプルを調製した。アナライトサンプル1 μL を、ピペットで流路内に流し込み、室温で、10分間静置した。次いで、0.05%Tween 20含有PBS 1 μL を、流路内にピペットで流し込み、未反応のPSA抗原を除去した。この洗浄操作を2回繰り返した。

[0096] (標識金ナノ粒子との反応)

直径150 nmの金ナノ粒子（Cytodiagnosics社製、型番G-150-100）の表面に、抗PSA抗体（HyTest社製、型番4P33-5A6）を結合し、0.05%Tween 20含有PBSで希釈して、濃度0.06 mg/mL（OD 0.5）の標識金ナノ粒子懸濁液を調製した。

標識金ナノ粒子懸濁液1 μL を、ピペットで流路内に流し込み、室温で、10分間静置した。次いで、0.05%Tween 20含有PBS 1 μL を、ピペットで流路内に流し込み、未反応の標識金ナノ粒子を除去した。こ

の洗浄操作を2回繰り返した。

[0097] (散乱光スペクトルの測定)

次いで、流路型固相担体デバイス(1)の上方から、流路内のナノ構造表面を暗視野顕微鏡(対物レンズ倍率50倍、NA0.55)で観察した。暗視野顕微鏡では、サンプル表面に存在する物質及び構造に起因して生じた散乱光のみを観察する。暗視野顕微鏡により、抗PSA抗体/PSA/抗PSA抗体の抗原抗体複合体を介して流路型固相担体デバイス(1)のナノ構造表面に結合した標識金ナノ粒子、及びナノ構造表面のナノホールによる散乱光が観察された。ナノホール構造により生じる散乱光スペクトルから、ナノ構造表面におけるナノホールの座標を特定した。照射光強度及びCMOSカメラの露出等を調整することにより、ナノホールの座標と一致する位置の金ナノ粒子(以下、「ナノホール構造結合粒子」という)の散乱光の色と、ナノホールの座標と一致しない位置の金ナノ粒子(以下、「非ナノホール構造結合粒子」という)の散乱光の色とを区別できることが確認された。非ナノホール構造結合粒子は、赤い散乱光で観測された。ナノホール構造結合粒子は、緑色の散乱光で観測された。

[0098] 図10に、ナノホール構造結合粒子、及び非ナノホール構造結合粒子の散乱光スペクトルを測定した結果を示す。図10で示すように、非ナノホール構造結合粒子の散乱光スペクトルは、波長600nm~700nmにピークを有していた。一方、ナノホール構造結合粒子の散乱光スペクトルは、波長500nm~600nmにピークを有していた。両者の散乱光スペクトルは、互いに大きく異なるスペクトルであった。

[0099] (アナライト濃度測定の検討)

次いで、この暗視野顕微鏡の観察像をCMOSカメラで撮影した画像(元画像(A))をパソコンに取り込んだ(図11(A))。次いで、画像処理ソフト(ImageJ)を使って、赤色のスペクトル(600nm~700nm)だけを抽出した画像(B)を取得した(図11(B))。この画像(B)を元画像(A)から差し引き、緑色のスペクトル(500nm~600

n m) に由来する輝点だけを抽出した画像 (C) を取得した (図 1 1 (C))。次いで、この画像 (C) から輝点の数を計数した。測定位置を移動して合計 5 視野の測定を同様に言い、その平均値を求めた。

[0100] アナライトサンプルにおける P S A 濃度を 1. 0 n g / m L、0. 1 n g / m L、又は 0 n g / m L としたこと以外は、上記と同様にして、アナライト及び標識金ナノ粒子の反応を行い、ナノ構造表面に結合した標識金ナノ粒子の散乱光スペクトルを測定した。上記と同様に、緑色のスペクトル (5 0 0 n m ~ 6 0 0 n m) に由来する輝点だけを抽出した画像 (C) を取得し、輝点の数を計数した。結果を表 1 に示す。

[0101] [表1]

PSA (ng/mL)	視野1	視野2	視野3	視野4	視野5	合計	平均
0	4	6	6	7	3	26	5.2
0.1	10	11	9	10	10	50	10
1	47	21	37	36	24	165	33
10	303	333	291	376	466	1769	353.8

[0102] 画像 (C) における輝点の数は、P S A 濃度に依存して線形に変化し、P S A 濃度 0. 1 n g / m L は、P S A 濃度 0 n g / m L と十分な差をもって測定可能であることが確認できた。これにより、従来の S P R 検出方式のようなドリフトによる変動の影響無しに、非常に低濃度のアナライトを精度良く検出できることが示された。

[0103] [実施例 2]

(固相担体 (2) の作製)

実施例 1 と同様に、図 2 (A) ~ 2 (E) に示す方法に従い、スタンパー (A) を作製した。このスタンパー (A) を用いて、再度電鍍プロセスを行い、スタンパー (B) を作製した。このスタンパー (B) を用いて、成型基板 (2) を作製した。成型基板 (2) は、実施例 1 の成型基板 (1) とは凹凸パターンが反転しており、ナノピットが周期的配列で形成されたナノ構造表面を有していた。次いで、真空スパッタ法を用いて、前記成型基板の表面

に、厚さ50nmの金薄膜を形成した。このようにして、固相担体（2）を得た。

[0104]（流路型固相担体デバイス（2）の作製）

固相担体（1）に替えて固相担体（2）を用いたこと以外は、実施例1と同様の方法で、流路型固相担体デバイス（2）を作製した。

[0105]（ナノ構造表面への抗PSA抗体の固定～標識金ナノ粒子との反応）

流路型固相担体デバイス（1）に替えて流路型固相担体デバイス（2）を用いたこと以外は、実施例1と同様の方法で、ナノ構造表面への抗PSA抗体の固定、ナノ構造表面のブロッキング処理、アナライトとの反応、及び標識金ナノ粒子との反応を行った。アナライトとの反応において、PSA濃度10ng/mL、1.0ng/mL、0.1ng/mL、又は0ng/mLのアナライトサンプルを用いた。

[0106]（散乱光スペクトルの測定）

次いで、流路型固相担体デバイス（2）の上方から、流路内のナノ構造表面を暗視野顕微鏡（対物レンズ倍率50倍、NA0.55）で観察した。暗視野顕微鏡により、抗PSA抗体/PSA/抗PSA抗体の抗原抗体複合体を介して流路型固相担体デバイス（2）のナノ構造表面に結合した標識金ナノ粒子、及びナノ構造表面のナノピットによる散乱光が観察された。ナノピット構造により生じる散乱光スペクトルから、ナノ構造表面におけるナノピットの座標を特定した。照射光強度及びCMOSカメラの露出等を調整することにより、ナノピットの座標と一致する位置の金ナノ粒子（以下、「ナノピット構造結合粒子」という）の散乱光の色と、ナノピットの座標と一致しない位置の金ナノ粒子（以下、「非ナノピット構造結合粒子」という）の散乱光の色とを区別できることが確認された。非ナノ構造結合粒子は、赤い散乱光で観測された。ナノ構造結合粒子は、ピンクの散乱光で観測された。

[0107] 図12に、ナノピット構造結合粒子、及び非ナノピット構造結合粒子の散乱光スペクトルを測定した結果を示す。図12で示すように、非ナノピット構造結合粒子の散乱光スペクトルは、波長600nm～700nmにピーク

を有していた。一方、ナノ構造結合粒子の散乱光スペクトルは、約波長800nmにピークを有していた。両者の散乱光スペクトルは、互いに大きく異なるスペクトルであった。

[0108] 次いで、この暗視野顕微鏡の観察像をCMOSカメラで撮影した画像（元画像（A））をパソコンに取り込んだ。次いで、画像処理ソフト（ImageJ）を使って、赤色のスペクトル（600nm～700nm）だけを抽出した画像（B）を取得した。この画像（B）を元画像（A）から差し引き、緑色のスペクトル（500nm～600nm）に由来する輝点だけを抽出した画像（C）を取得した。次いで、この画像（C）から輝点の数を計数した。測定位置を移動して合計5視野の測定を同様に行い、その平均値を求めた。結果を表2に示す。

[0109] [表2]

PSA (ng/mL)	視野1	視野2	視野3	視野4	視野5	合計	平均
0	7	7	4	8	6	31	6.3
0.1	12	13	10	15	9	59	12
1	18	37	46	28	26	156	31
10	428	346	234	481	471	1959	392

[0110] 画像（C）における輝点の数は、PSA濃度に依存して線形に変化し、PSA濃度0.1ng/mLは、PSA濃度0ng/mLと十分な差をもって測定可能であることが確認できた。これにより、従来のSPR検出方式のようなドリフトによる変動の影響無しに、非常に低濃度のアナライトを精度良く検出できることが示された。

産業上の利用可能性

[0111] 本発明によれば、簡便且つ高感度で対象物質を測定可能な、対象物質の測定方法、及び対象物質測定システムが提供される。

[0112] 以上、本発明の好ましい実施例を説明したが、本発明はこれら実施例に限定されることはない。本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。本発明は前述した説明によって

限定されることはなく、添付のクレームの範囲によってのみ限定される。

符号の説明

[0113]	1	対象物質検出装置
	1 0, 1 1 0, 2 1 0, 3 1 0, 4 1 0	固相担体
	1 1, 1 1 1, 2 1 1, 3 1 1, 4 1 1	基板
	1 5	第 2 の特異的結合物質
	2 0	標識ナノ粒子
	2 5	第 1 の特異的結合物質
	3 0	検出器
	3 1	受光素子
	3 2	フィルター
	3 3	レンズ
	4 0	光源

請求の範囲

[請求項1]

対象物質を測定する方法であって、

表面プラズモン共鳴を励起可能なナノ粒子であって、前記ナノ粒子は、可視光を照射したときにミー散乱理論に基づいて可視光領域にピークを有する散乱光スペクトルを生じる粒子径を有し、且つ対象物質に特異的に結合する第1の特異的結合物質が結合されている、ナノ粒子と、

所定のナノ構造が複数個配置されたナノ構造表面を有する固相担体であって、前記所定のナノ構造は、前記ナノ粒子が結合することで、前記ナノ粒子の散乱光スペクトルを変化させるものであり、且つ前記ナノ構造表面に、前記対象物質に特異的に結合する第2の特異的結合物質が結合されている、固相担体と、を用い、

前記第2の特異的結合物質と前記対象物質と前記第1の特異的結合物質と前記ナノ粒子とがこの順に前記ナノ構造表面に結合した前記固相担体に対して光を照射し、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前記ナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する工程、

を含む、対象物質の測定方法。

[請求項2]

1個の前記所定のナノ構造に対して、1個の前記ナノ粒子が結合する、請求項1に記載の対象物質の測定方法。

[請求項3]

前記ナノ構造表面において、前記所定のナノ構造が周期的配列で配置されており、前記周期的配列における個々の前記所定のナノ構造の座標を基準として、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子を計数する、請求項1又は2に記載の対象物質の測定方法。

[請求項4]

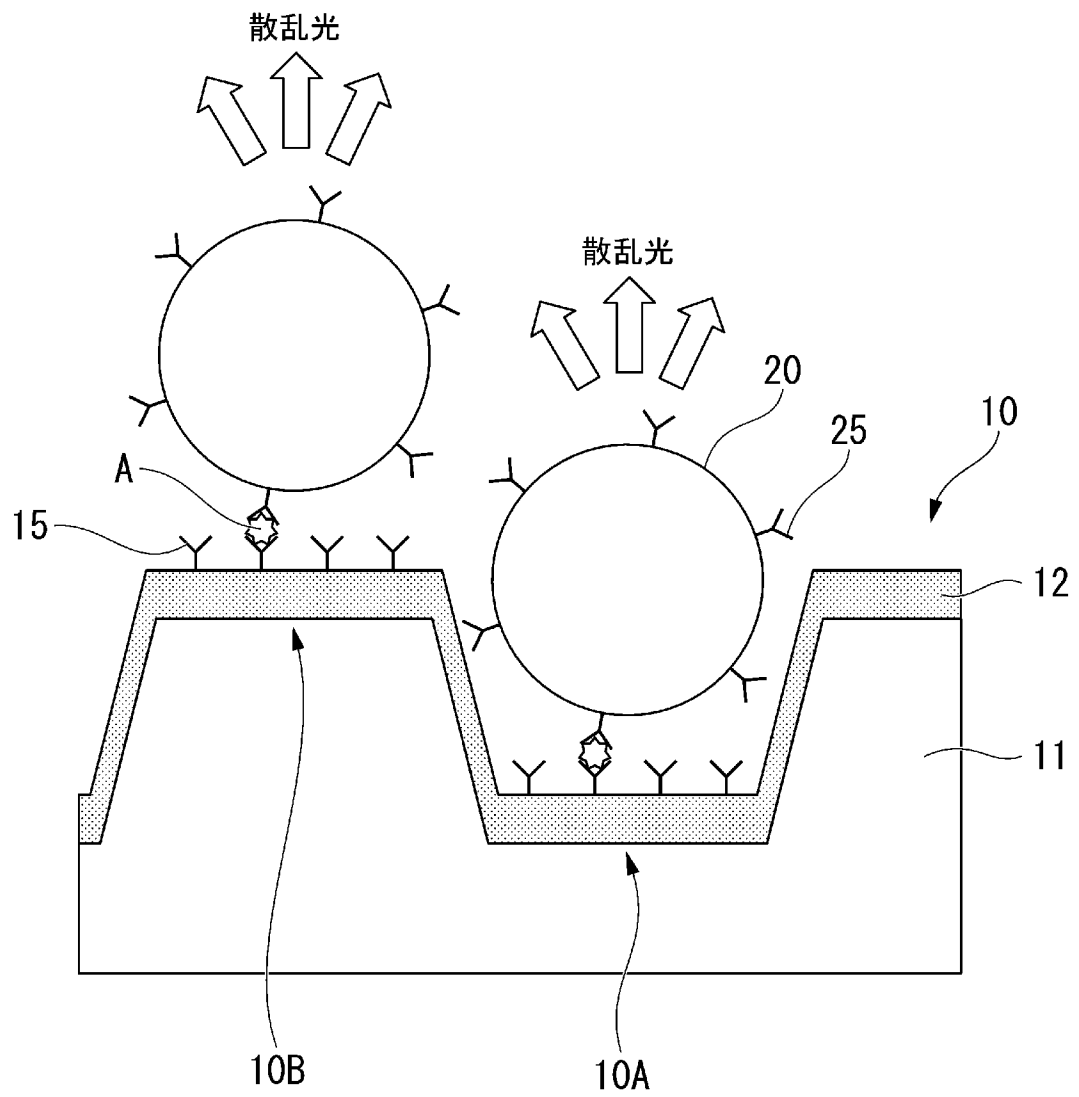
前記ナノ粒子及び前記所定のナノ構造の表面が、前記散乱光スペクトルの検出に用いる波長の光に対して、

実部 (n) < 消衰係数 (k)

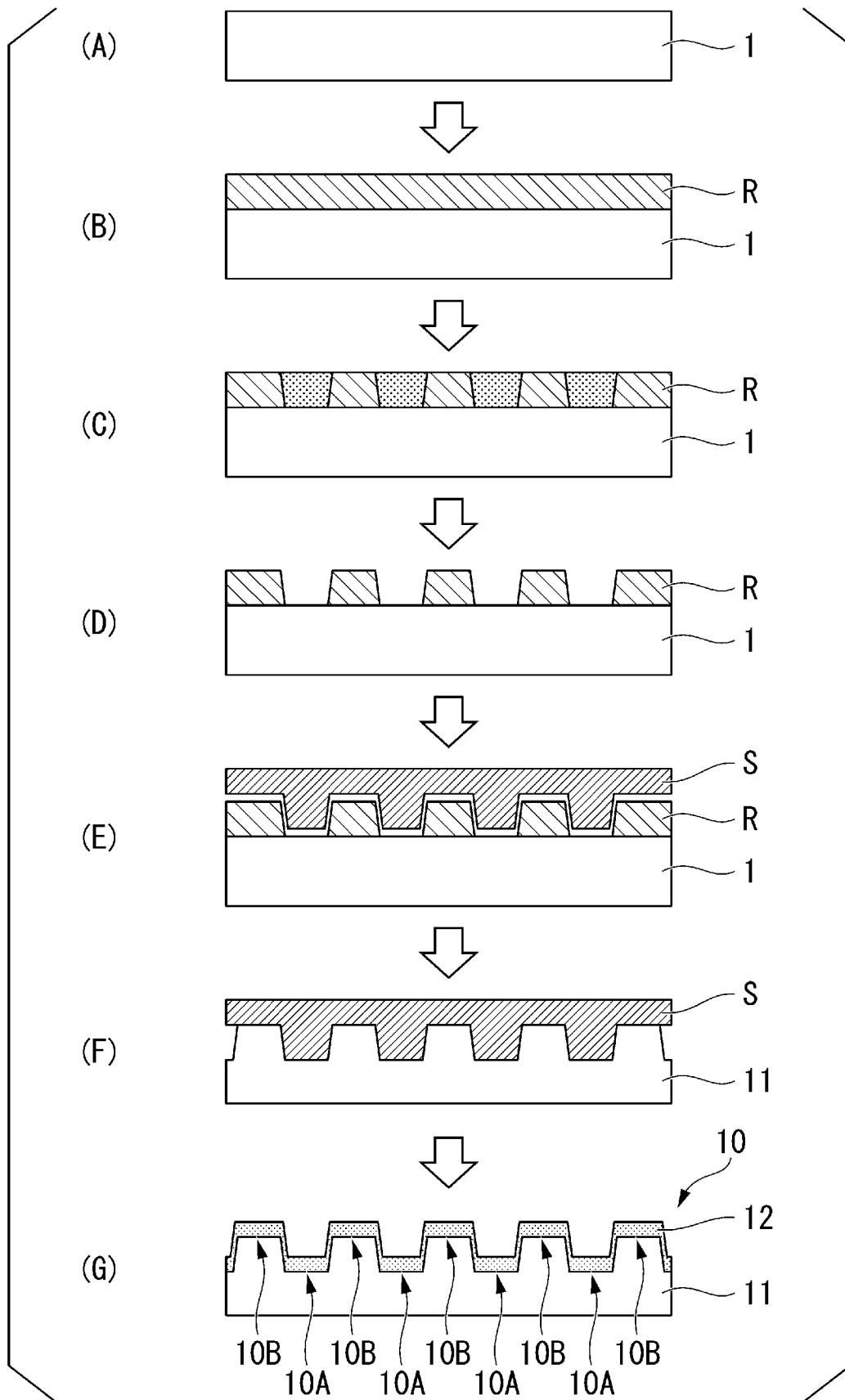
の関係を満たす複素屈折率を有する物質を含む、請求項 1 又は 2 に記載の対象物質の測定方法。

- [請求項5] 請求項 1 又は 2 に記載の対象物質の測定方法に用いる対象物質測定システムであって、
- 前記固相担体に結合する前記ナノ粒子に対して光を照射する光源と、
- 、
- 前記ナノ粒子からの散乱光を検出する検出器と、
- 前記検出器で取得された前記散乱光の画像から、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルと、前記所定のナノ構造を有しない領域に結合する前記ナノ粒子の散乱光スペクトルとの差に基づいて、前記所定のナノ構造に結合する前記ナノ粒子を識別して計数する計数部と、
- を含む、対象物質測定システム。

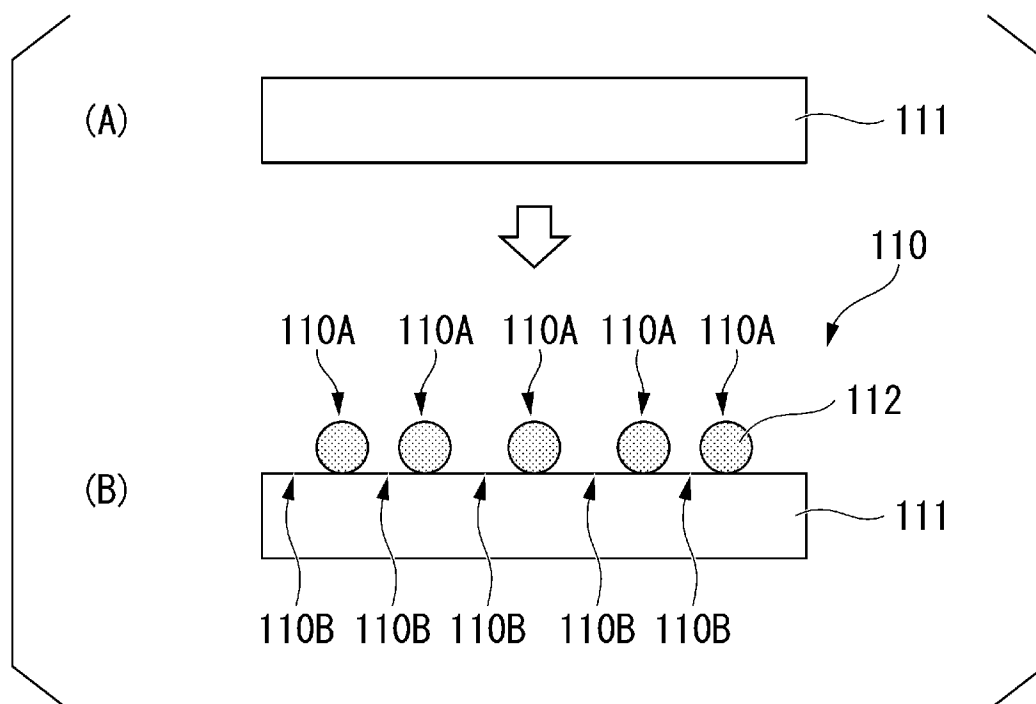
[図1]



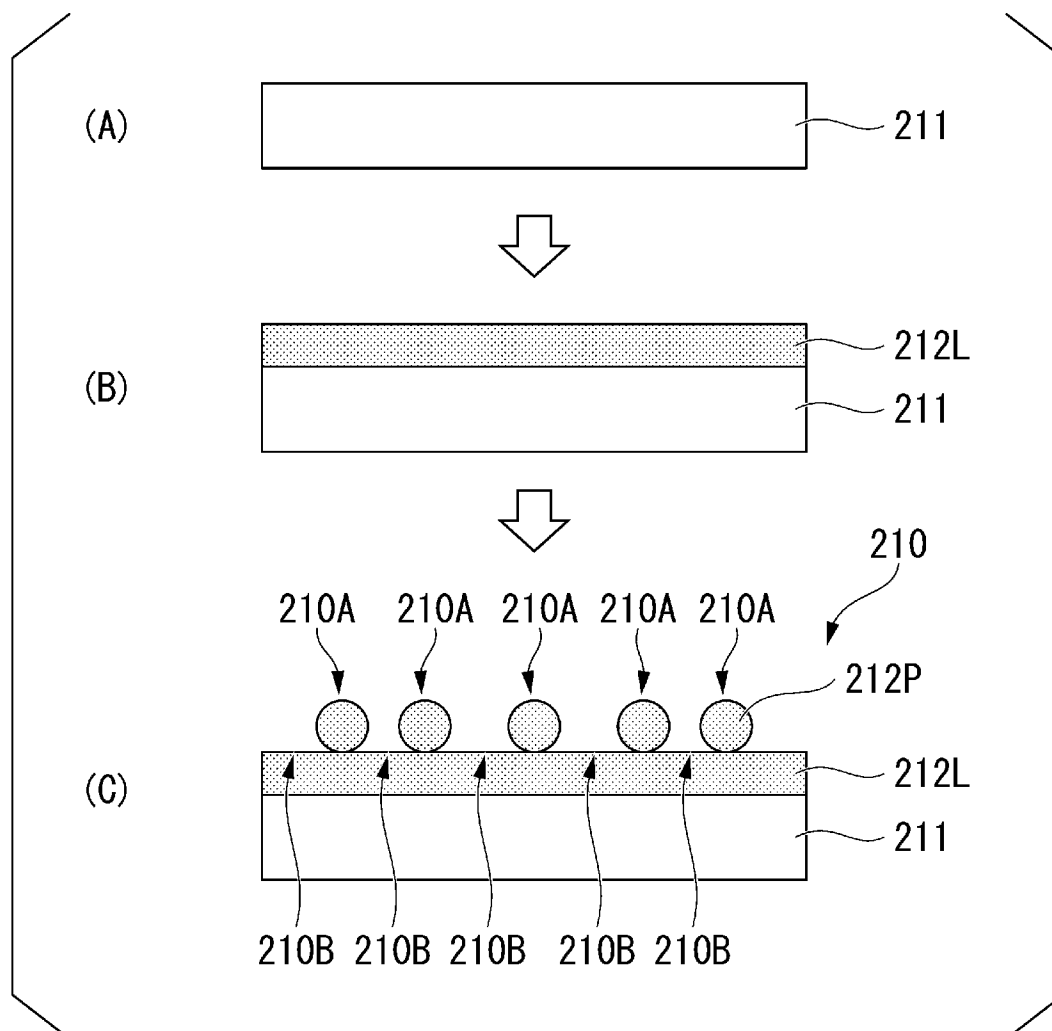
[図2]



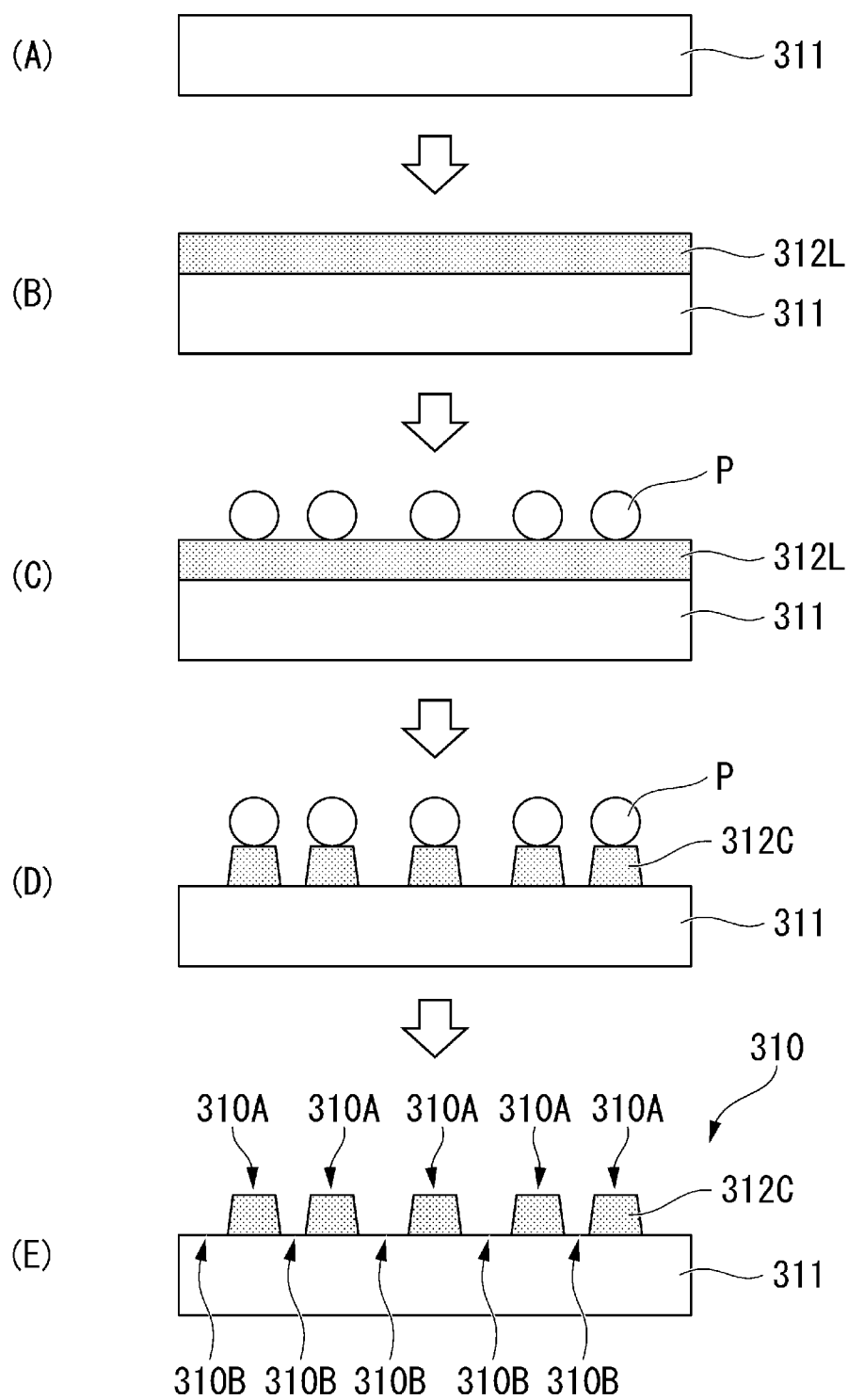
[図3]



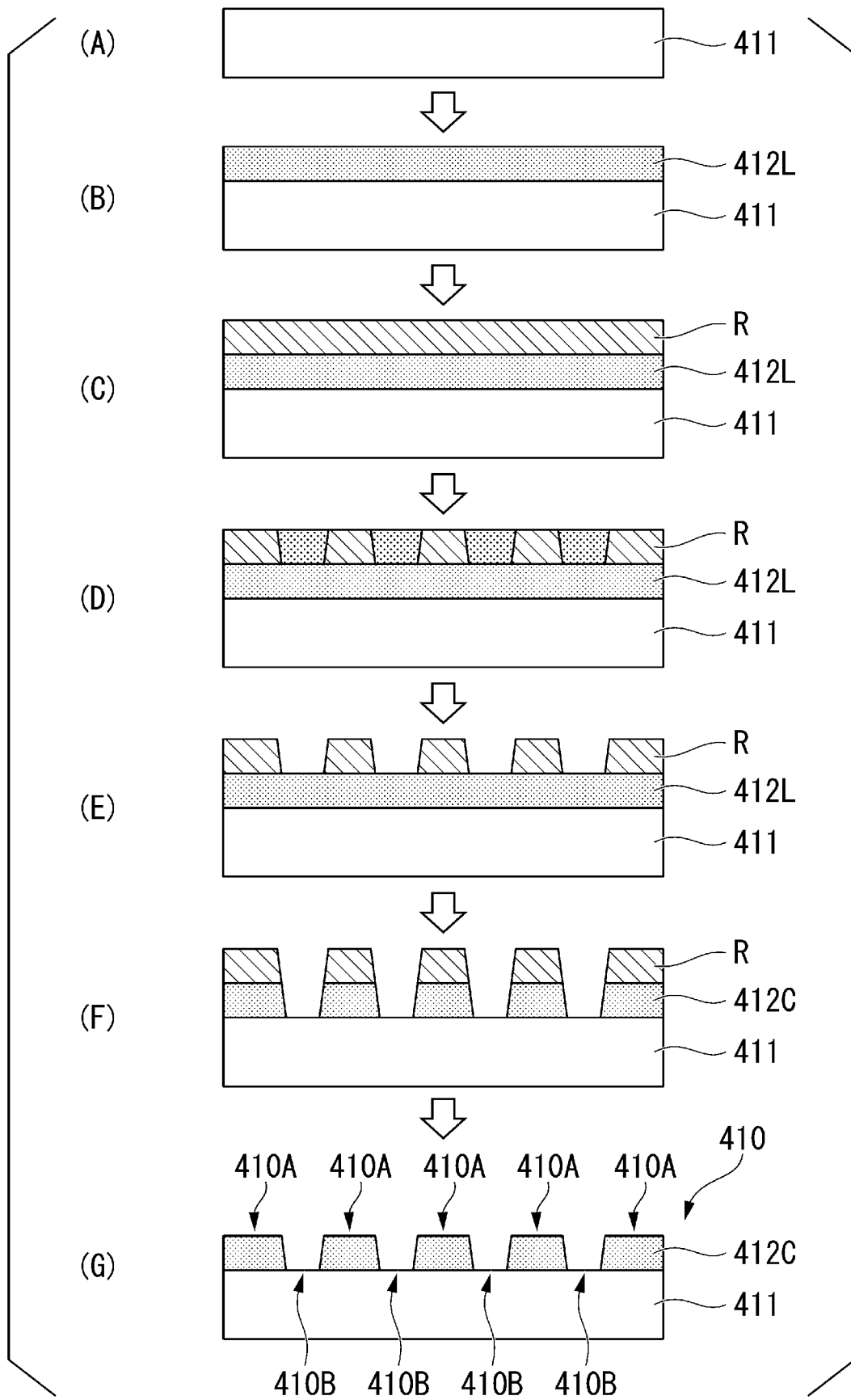
[図4]



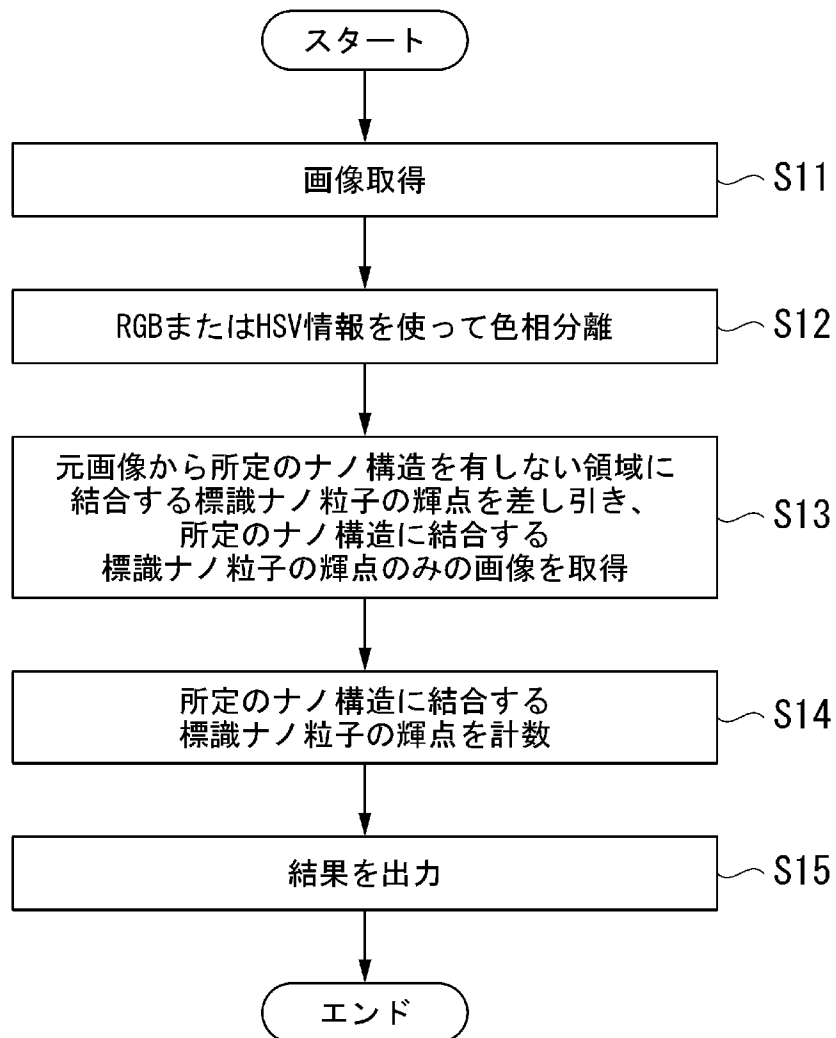
[図5]



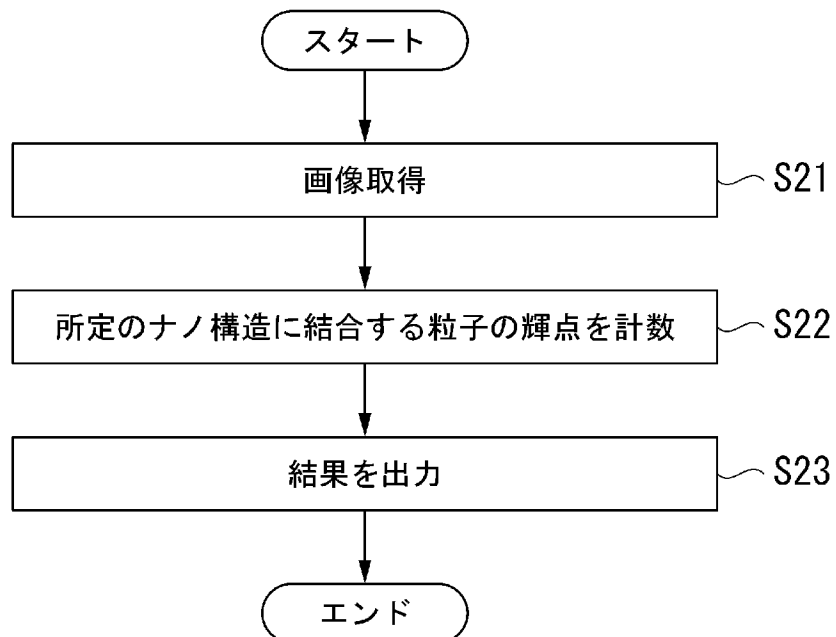
[図6]



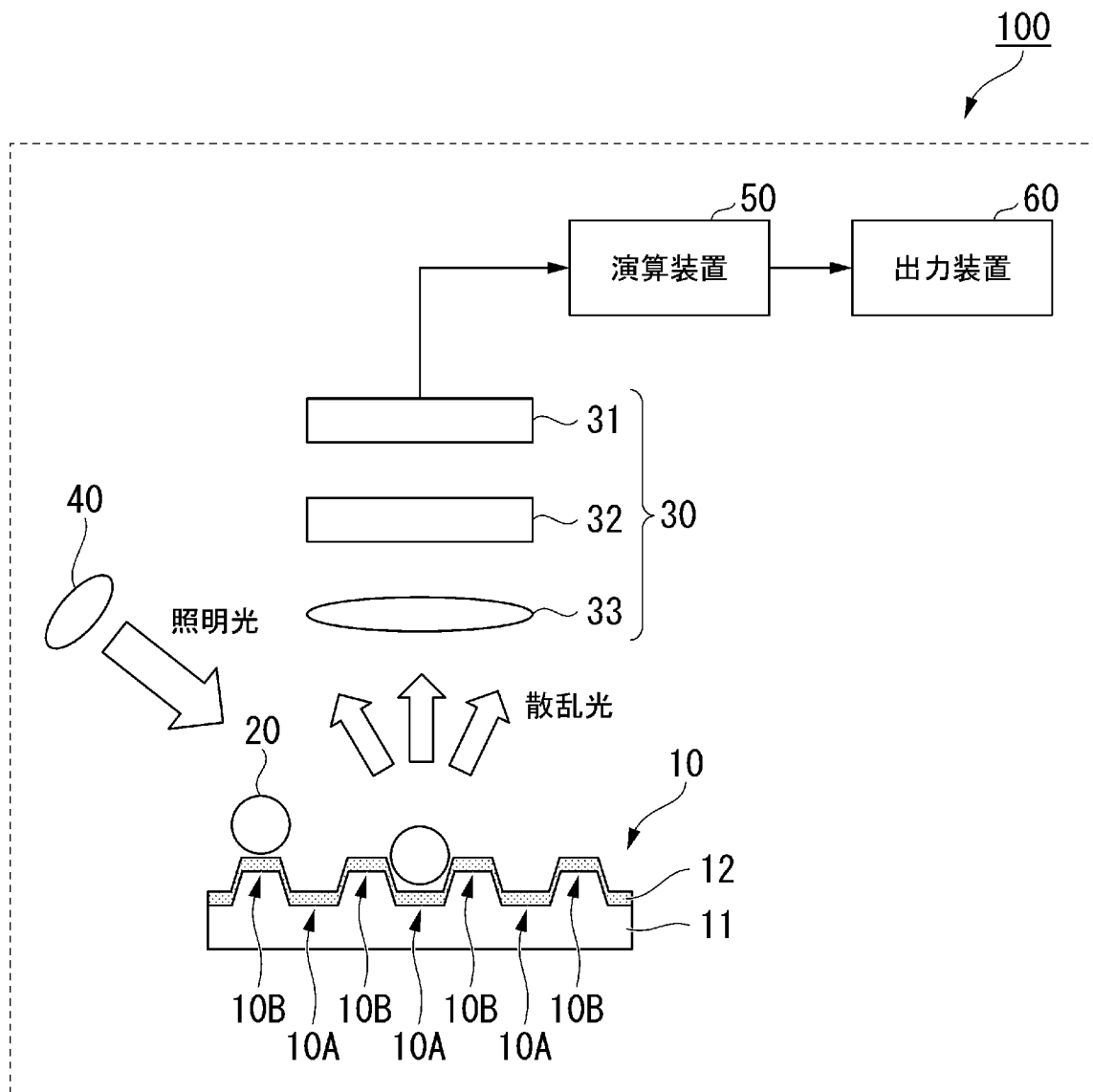
[図7]



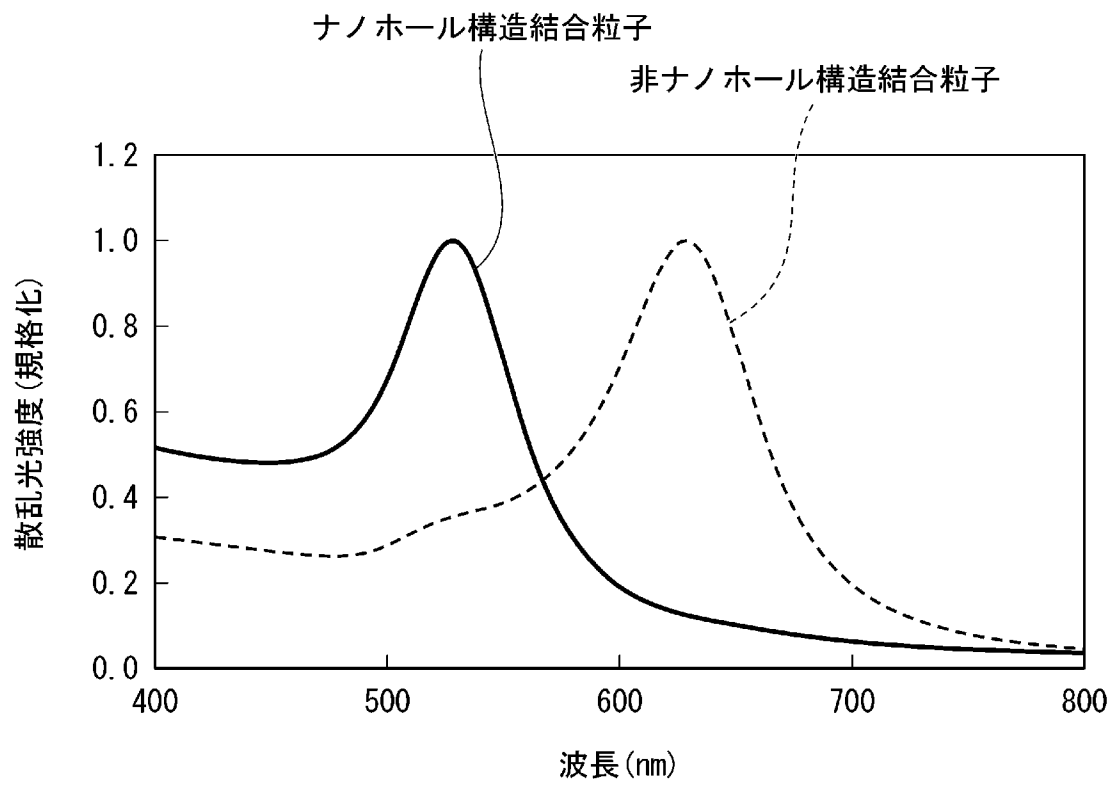
[図8]



[図9]

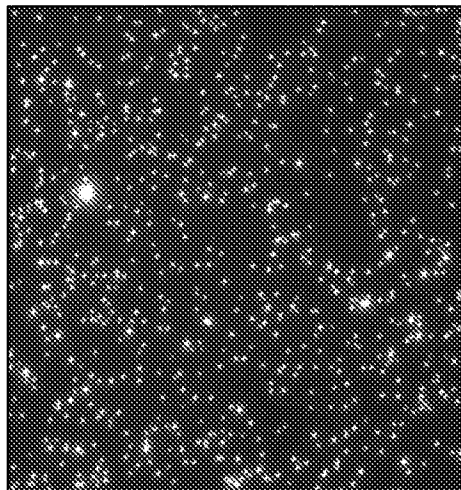


[図10]

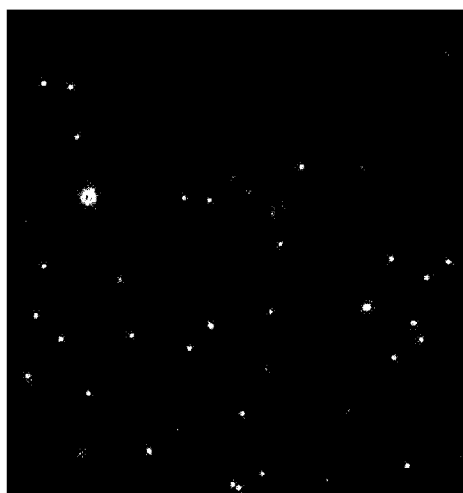


[図11]

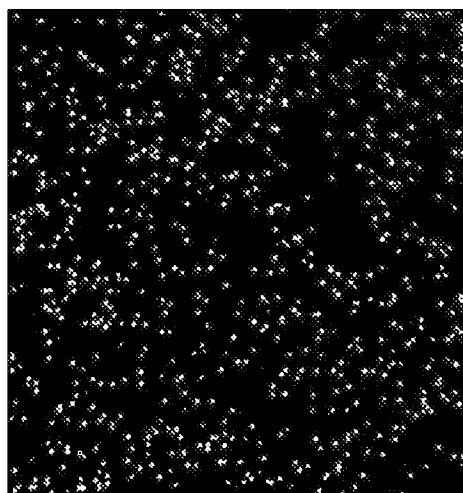
(A)



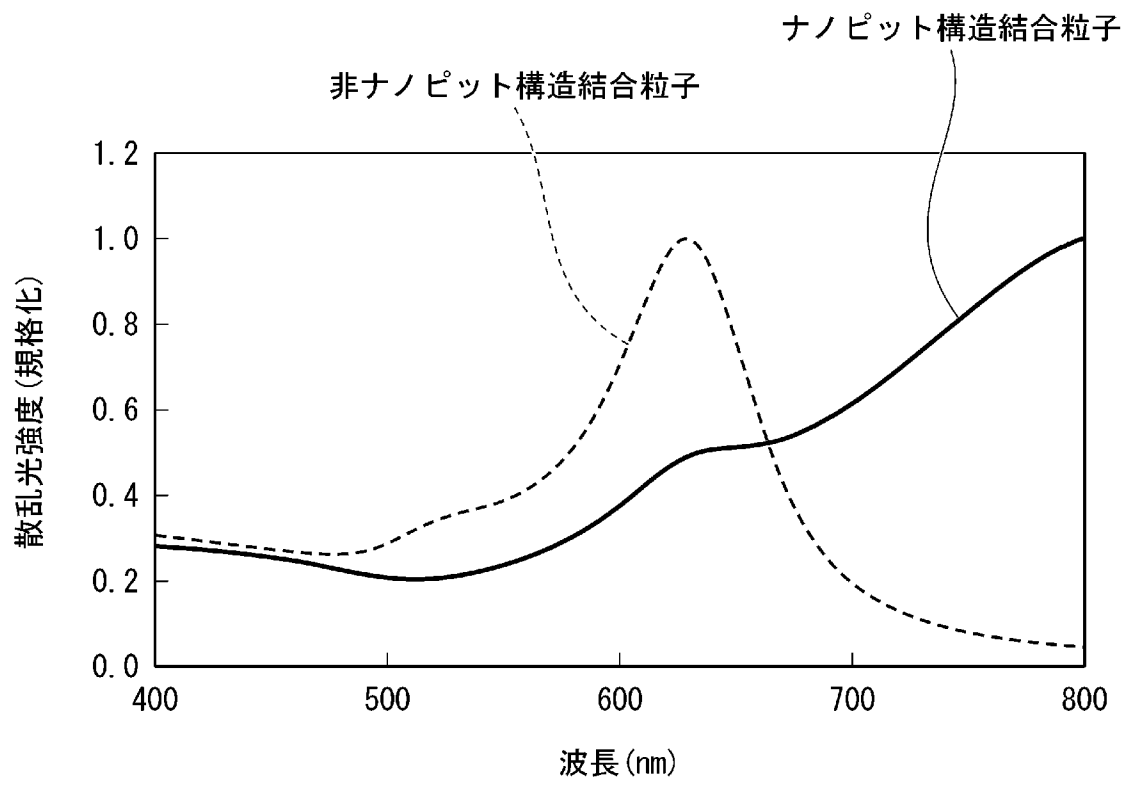
(B)



(C)



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/029719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G01N 33/543**(2006.01)i; **G01N 21/41**(2006.01)i

FI: G01N21/41 101; G01N33/543 595

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)

G01N21/41; G01N21/64; G01N33/543

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023

Registered utility model specifications of Japan 1996-2023

Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/040021 A1 (UNIVERSITY PUBLIC CORPORATION OSAKA) 04 March 2021 (2021-03-04)	1-5
A	JP 2022-61692 A (PHC HOLDINGS CORP) 19 April 2022 (2022-04-19)	1-5
A	WO 2014/168237 A1 (KANEKA CORPORATION) 16 October 2014 (2014-10-16)	1-5
A	JP 2008-170248 A (FUJIFILM CORP) 24 July 2008 (2008-07-24)	1-5



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

29 September 2023

Date of mailing of the international search report

10 October 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)

3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915

Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/029719

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021/040021	A1	04 March 2021	US	2022/0326249	A1	
				EP	4024030	A1	

JP	2022-61692	A	19 April 2022	(Family: none)			

WO	2014/168237	A1	16 October 2014	(Family: none)			

JP	2008-170248	A	24 July 2008	US	2008/0169430	A1	
				EP	1944599	A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/543(2006.01)i; G01N 21/41(2006.01)i FI: G01N21/41 101; G01N33/543 595										
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）） G01N21/41; G01N21/64; G01N33/543										
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)										
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	WO 2021/040021 A1 (公立大学法人大阪) 04.03.2021 (2021 - 03 - 04)	1-5								
A	JP 2022-61692 A (PHCホールディングス株式会社) 19.04.2022 (2022 - 04 - 19)	1-5								
A	WO 2014/168237 A1 (株式会社カネカ) 16.10.2014 (2014 - 10 - 16)	1-5								
A	JP 2008-170248 A (富士フイルム株式会社) 24.07.2008 (2008 - 07 - 24)	1-5								
☐ 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。										
<table border="0"> <tr> <td> * 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 </td> <td> “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 </td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献						
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 29.09.2023	国際調査報告の発送日 10.10.2023									
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 吉田 将志 2W 4636 電話番号 03-3581-1101 内線 3258									

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/JP2023/029719

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/040021	A1	04.03.2021	US	2022/0326249	A1	
				EP	4024030	A1	
JP	2022-61692	A	19.04.2022	(ファミリーなし)			
WO	2014/168237	A1	16.10.2014	(ファミリーなし)			
JP	2008-170248	A	24.07.2008	US	2008/0169430	A1	
				EP	1944599	A2	