

(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
2019年1月3日(03.01.2019)



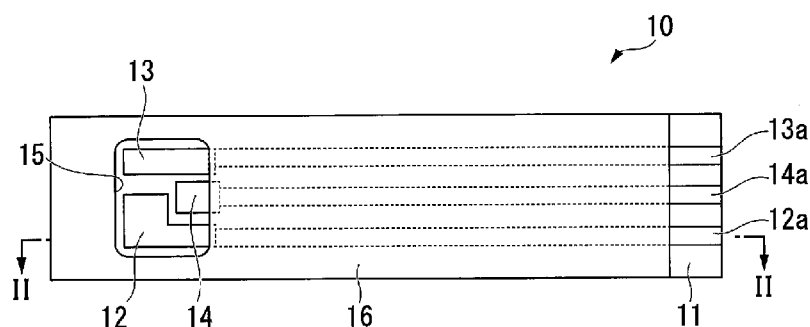
(10) 国際公開番号

WO 2019/004441 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/327 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 27/30 (2006.01) G01N 33/551 (2006.01)
G01N 27/42 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/024860
- (22) 国際出願日: 2018年6月29日(29.06.2018)
- (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 2017-129440 2017年6月30日(30.06.2017) JP
特願 2018-069837 2018年3月30日(30.03.2018) JP
- (71) 出願人: T D K株式会社(TDK CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1080023 東京都港区芝浦三丁目
9番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 坂本 健 (SAKAMOTO Takeshi);
〒1080023 東京都港区芝浦三丁目9番1号 T
D K株式会社内 Tokyo (JP). 崔京九(CHOI
Kyung-Ku); 〒1080023 東京都港区芝浦三丁目
9番1号 T D K株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,

(54) Title: ANALYSIS KIT AND ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 分析キットおよび分析方法



(57) Abstract: This analysis kit is characterized by being provided with: a sensor having a working electrode, a reference electrode, and a counter electrode, primary antibodies being fixed to a surface of the working electrode; and a liquid dispersion including a solvent and magnetic metal nanoparticles dispersed in the solvent, the magnetic metal nanoparticles in which secondary antibodies are fixed to the surface thereof.

(57) 要約: 本発明の分析キットは、作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に一次抗体が固定されているセンサ、及び、溶媒と、前記溶媒に分散された磁性金属ナノ粒子とを含み、前記磁性金属ナノ粒子は、表面に二次抗体が固定されている磁性金属ナノ粒子の分散液を備えることを特徴とする。

[続葉有]



WO 2019/004441 A1

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)）

明 細 書

発明の名称： 分析キットおよび分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗原抗体反応を利用して被検物質を分析するための分析キット及び分析方法に関する。

本願は、2017年6月30日に、日本に出願された特願2017-129440号、2018年3月30日に、日本に出願された特願2018-069837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] 生体物質の検出は、医療、ヘルスケア、環境などの分野において行われている。そして、複数の生体物質から測定対象の生体物質を、選択的に高感度かつ簡便な操作性で定量することができる分析方法の開発が望まれている。

[0003] 液体中の微量な生体物質を選択的に高感度で測定することができる方法の1つとして、免疫測定法が知られている。免疫測定法とは、測定対象の生体物質（抗原、ハプテン等）と、その抗原と結合する物質（抗体）との反応（抗原抗体反応）を利用して、抗原を定量する方法である。

[0004] 抗原を定量する方法としては、サンドイッチ法が知られている。サンドイッチ法とは、一次抗体が固定された固体と、二次抗体が固定された標識とで、抗原を挟む（サンドイッチする）方法である。すなわち、サンドイッチ法は、抗原を一次抗体で補足し、その補足した抗原と二次抗体とを結合させ、その抗原と結合した二次抗体に固定されている標識を定量する方法である。標識を定量する方法として、標識として金属粒子を用い、その金属粒子の量を、電気化学的手法を用いて定量する方法が知られている。なお、抗原および抗体は電気伝導性を有しないため、抗原および抗体に結合した標識（金属粒子）を、直接的に電気化学的手法を用いて定量することは困難である。

[0005] 特許文献1には、コロイド金属粒子で標識した少なくとも1つの試薬と、少なくとも1つの電極、そしてまた、該コロイド金属粒子を化学的に溶解す

るための試薬を含む診断キットが開示されている。この特許文献1に開示されている診断キットでは、標識であるコロイド金属粒子を化学的に溶解し、次いでその金属の溶液を電極に移して還元して、還元した金属を電極に堆積させた後、その電極の表面に堆積した金属を電氣的に再溶解させ、その再溶解後に現れるボルタンメトリーピークを解析することによって、その金属の量を測定する。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表2004-512496号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 標識として金属粒子を用い、その金属粒子の量を、電気化学的手法を用いて定量する方法は、感度や精度の観点では有用な方法である。しかしながら、特許文献1に記載されているコロイド金属粒子の定量方法では、コロイド金属粒子を一旦化学的に溶解させる工程が必要となるなど、操作が煩雑で、分析結果が得られるまでに時間がかかるため、医療現場での臨床検査においてはその導入は困難である。

[0008] 本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、操作が簡便で、被検物質を高い選択性で、かつ高感度で分析することができる分析キットおよび分析方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、一次抗体が固定された特定の作用電極を有するセンサと、二次抗体が固定された磁性金属ナノ粒子を用い、抗原（被検物質）を一次抗体と結合させて作用電極に固定した後、抗原と二次抗体を結合させ、その抗原と結合した二次抗体が固定された磁性金属ナノ粒子を、磁場を利用して作用電極に密着させ、その作用電極に密着した磁性金属ナノ粒子を電気化学的手法によりイオン化（酸化）させることにより、磁性金属ナノ粒子を化学的

に溶解させずに定量することが可能となることを見出した。そして、その磁性金属ナノ粒子を電気化学的手法によりイオン化させたときに発生する電流量と、抗原の量とが高い相関性を有し、その電流量から抗原の量を求めることが可能となることを確認して、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、上記課題を解決するため、以下の手段を提供する。

- [0010] (1) 第1の態様にかかる分析キットは、作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に一次抗体が固定されているセンサ、及び、溶媒と、前記溶媒に分散された磁性金属ナノ粒子とを含み、前記磁性金属ナノ粒子は、表面に二次抗体が固定されている磁性金属ナノ粒子の分散液を備えることを特徴とする。
- [0011] (2) 上記態様にかかる分析キットにおいて、前記作用電極がカーボン電極、金属電極、導電性ダイヤモンド電極または導電性ダイヤモンド様炭素電極であってもよい。
- [0012] (3) 上記態様にかかる分析キットにおいて、前記磁性金属ナノ粒子が、鉄、コバルトおよびニッケルからなる群より選ばれる少なくとも一種の磁性金属を含むものであってもよい。
- [0013] (4) 上記態様にかかる分析キットにおいて、前記磁性金属ナノ粒子が、硫黄を含有していてもよい。
- [0014] (5) 上記態様にかかる分析キットにおいて、前記参照電極が、銀―塩化銀電極であってもよい。
- [0015] (6) 上記態様にかかる分析キットにおいて、前記対極が、カーボン電極、貴金属電極、導電性ダイヤモンド電極または導電性ダイヤモンド様炭素電極であってもよい。
- [0016] (7) 第2の態様にかかる分析方法は、被検物質溶液に含まれる被検物質を分析するための分析方法であって、作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に前記被検物質と結合する一次抗体が固定されているセンサの前記作用電極と、前記被検物質溶液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体と前記被検物質溶液の被検物質とを結合させる第1結合工

程と、前記作用電極を洗浄して前記作用電極に付着している前記被検物質溶液を除去する第1洗浄工程と、前記作用電極と、表面に前記被検物質と結合する二次抗体が固定された磁性金属ナノ粒子が分散されている磁性金属ナノ粒子の分散液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体に結合した前記被検物質と二次抗体とを結合させることによって、前記被検物質と磁性金属ナノ粒子とを接続させる第2結合工程と、前記作用電極を洗浄して前記磁性金属ナノ粒子の分散液を除去する第2洗浄工程と、前記被検物質と結合した前記磁性金属ナノ粒子に溶媒の存在下で磁場を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を作用電極に接触させる磁場印加工程と、前記作用電極と前記対極との間に電圧を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を導電性溶媒の存在下でイオン化させ、前記磁性金属ナノ粒子の全量がイオン化するまでの電流量を計測する電流量計測工程と、前記電流量から磁性金属ナノ粒子量を求め、前記磁性金属ナノ粒子量から被検物質量を算出する算出工程と、を含むことを特徴とする。

[0017] (8) 第3の態様にかかる分析方法は、被検物質溶液に含まれる被検物質を分析するための分析方法であって、作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に前記被検物質と結合する一次抗体が固定されているセンサの前記作用電極と、前記被検物質溶液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体と前記被検物質溶液の被検物質とを結合させる第1結合工程と、前記作用電極を洗浄して前記作用電極に付着している前記被検物質溶液を除去する洗浄工程と、前記作用電極と、表面に前記被検物質と結合する二次抗体が固定された磁性金属ナノ粒子が分散されている磁性金属ナノ粒子の分散液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体に結合した前記被検物質と二次抗体とを結合させることによって、前記被検物質と磁性金属ナノ粒子とを接続させる第2結合工程と、外部磁場により、前記被検物質と接続していない前記磁性金属ナノ粒子を、作用電極の表面もしくはその近傍から除去する未接続磁性金属ナノ粒子除去工程と、前記被検物質と接続した前記磁性金属ナノ粒子に溶媒の存在下で磁場を印加して、前記磁性金属ナノ粒子

を作用電極に接触させる磁場印加工程と、前記作用電極と前記対極との間に電圧を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を導電性溶媒の存在下でイオン化させ、前記磁性金属ナノ粒子の全量がイオン化するまでの電流量を計測する電流量計測工程と、前記電流量から磁性金属ナノ粒子量を求め、前記磁性金属ナノ粒子量から被検物質量を算出する算出工程と、を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、操作が簡便で、被検物質を高い選択性で、かつ高感度で分析することができる分析キットおよび分析方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の第1実施形態にかかる分析キットで用いるセンサの平面図である。

[図2]図1のII-II線断面図である。

[図3]本発明の第2実施形態にかかる分析方法を説明するフロー図である。

[図4]本発明の第2実施形態にかかる分析方法を説明する概念図である。

[図5]本発明の第3実施形態にかかる分析方法を説明するフロー図である。

[図6]本発明の第3実施形態にかかる分析方法の未接続磁性金属ナノ粒子除去工程を説明する概念図である。

[図7]実施例1で使用した各抗原分析用試料の抗原濃度と、抗原の標識であるコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量とをプロットしたグラフである。

[図8]実施例2で使用した各抗原分析用試料の抗原濃度と、抗原の標識であるコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量とをプロットしたグラフである。

[図9]実施例3で使用した各抗原分析用試料の抗原濃度と、抗原の標識であるコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量とをプロットしたグラフである。

[図10]実施例4で使用した各抗原分析用試料の抗原濃度と、抗原の標識であるコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量とをプロットしたグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本実施形態について、図面を用いてその構成を説明する。以下の説明で用いる図面は、特徴をわかりやすくするために便宜上特徴となる部分を拡大して示している場合があり、各構成要素の寸法比率などは実際と同じであるとは限らない。また、以下の説明において例示される材料、寸法等は一例であって、本発明はそれらに限定されるものではない。

[0021] 「第1実施形態」

[分析キット]

本実施形態の分析キットは、被検物質溶液に含まれる被検物質を、抗原抗体反応を利用して分析するための分析キットである。被検物質は、例えば、生体材料であり、特にタンパク質やメタポロームである。

本実施形態の分析キットは、センサと磁性金属ナノ粒子の分散液を備える。センサは、被検物質溶液に含まれる被検物質を補足する機能を有し、磁性金属ナノ粒子は、補足した被検物質を定量するための標識として機能する。

[0022] (センサ)

本発明の第1実施形態にかかる分析キットで用いるセンサを図1と図2を参照して説明する。図1は、センサの一実施形態を示す平面図である。図2は、図1のII-II線断面図である。

図1に示すセンサ10は、第1基板11と、第1基板11の表面（図2において上面）において一方の端部近傍に設けられた作用電極12、対極13及び参照電極14と、作用電極12、対極13及び参照電極14にそれぞれ接続されるとともに第1基板11の他方の端部まで延在するように第1基板11上に形成されたリード線12a、13a及び14aと、第1基板11に接着された、作用電極12、対極13及び参照電極14が露出するような窓15が形成されている第2基板16とから構成される。第2基板16は、リ

ード線 12a、13a 及び 14a のうち第 1 基板 11 の他方の端部近傍以外の部分を覆っている。

[0023] 作用電極 12 は、金属電極、カーボン電極、導電性ダイヤモンド電極または導電性ダイヤモンド様炭素電極（DLC 電極）であることが好ましい。金属電極としては銅電極、金電極、白金電極、パラジウム電極等を用いることができる。金属電極は、耐食性の観点から貴金属電極が好ましい。カーボン電極は、グラファイト等の導電性をもつ炭素の電極であり、例えば黒鉛を主体としたペーストで印刷したカーボン印刷電極を用いることができる。導電性ダイヤモンド電極としては、ホウ素をドーピングしたホウ素ドーピングダイヤモンド電極を用いることができる。導電性ダイヤモンド電極は、 sp^3 結合を有するダイヤモンド構造を有する結晶質炭素電極である。導電性 DLC 電極は、主として炭素及び水素から構成され、 sp^3 結合および sp^2 結合が混在する非晶質炭素電極である。導電性 DLC 電極としては、窒素、リン、ヒ素、アンチモン及びビスマスからなる群から選ばれる少なくとも一種の元素をドーピングした n 型半導体の DLC 電極と、ホウ素、ガリウム及びインジウムからなる群から選ばれる元素をドーピングした p 型半導体の DLC 電極のいずれも用いることができる。

[0024] sp^3 結合の炭素を主体とする導電性ダイヤモンド電極および DLC 電極は、電気化学反応によって酸化または還元される化学物質が吸着する過程が極めて少ない。このため、例えば水に起因する水素や水酸化物やそれらのイオンによる電極への吸着を経る内圏酸化還元反応が極めて起こりにくい。その結果、残余電流と言われるノイズ電流が極端に小さくなるので、検出対象である被検物質の電気化学的反応を高 SN 比で検出することが可能である。

[0025] 作用電極 12 は、表面（図 2 において上側の面）に、一次抗体が固定されている。一次抗体は、測定対象の被検物質（抗原）に合せて適宜、選択して使用する。一次抗体としては、測定対象の被検物質に対して高い親和性を有し、被検物質（抗原）と結合するものであれば特に制限なく使用することができる。

[0026] 対極 1 3 は、電気化学計測用のセンサにおいて通常用いられる電極用の導電性材料から構成される。対極 1 3 としては、例えば、カーボン電極、白金電極及び金電極などの貴金属電極、導電性ダイヤモンド電極、導電性 D L C 電極を用いることができる。

[0027] 参照電極 1 4 としては、例えば、銀－塩化銀電極または水銀－塩化水銀電極を用いることができる。参照電極 1 4 は、好ましくは銀－塩化銀電極である。

[0028] 第 1 基板 1 1 は、作用電極 1 2、対極 1 3 及び参照電極 1 4 を支持する支持体である。第 1 基板 1 1 は、電気化学センサとしての使用に耐え得る物理的強度を有していればよい。

作用電極 1 2 が n 型半導体の D L C 電極であるときは、第 1 基板 1 1 は n 型結晶性シリコン基板であることが好ましい。また、作用電極 1 2 が p 型半導体の D L C 電極であるときは、第 1 基板 1 1 は p 型結晶性シリコン基板であることが好ましい。これにより、第 1 基板 1 1 と作用電極 1 2 との間に、ショットキー障壁などの界面抵抗が生じにくくなる。

[0029] 第 2 基板 1 6 は、第 1 基板 1 1 と同様の基板が用いられる。第 1 基板 1 1 と第 2 基板 1 6 は接着剤 1 7 によって接着されている。

[0030] (磁性金属ナノ粒子の分散液)

磁性金属ナノ粒子の分散液は、溶媒と溶媒に分散された磁性金属ナノ粒子とからなる。

溶媒としては、水系溶媒、有機系溶媒およびこれらの混合液を用いることができる。水系溶媒の例としては、水、緩衝液を挙げることができる。緩衝液としては、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を用いることができる。有機系溶媒の例としては、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールなどの 1 価アルコール、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトンなどのケトンを挙げることができる。

[0031] 磁性金属ナノ粒子は、常磁性もしくは超常磁性であることが好ましい。

磁性金属ナノ粒子は、平均粒子径が 1 n m 以上 5 0 n m 以下の範囲にある

ことが好ましく、5 nm以上30 nm以下の範囲にあることがさらに好ましい。

[0032] 磁性金属ナノ粒子は鉄、コバルトおよびニッケルからなる群より選ばれる少なくとも一種の磁性金属を含むことが好ましい。磁性金属は一種を単独で使用してもよいし、二種以上を組合せた合金として使用してもよい。磁性金属ナノ粒子は、鉄ナノ粒子、コバルトナノ粒子およびニッケルナノ粒子であることが好ましい。これらの磁性金属ナノ粒子は、一種を単独で使用してもよいし、二種以上を組合せて使用してもよい。

[0033] 磁性金属ナノ粒子は、表面に二次抗体が固定されている。二次抗体は、測定対象の被検物質（抗原）に合せて適宜、選択して使用する。二次抗体としては、測定対象の被検物質に対して高い親和性を有し、被検物質（抗原）と結合するものであれば特に制限なく使用することができる。

[0034] 磁性金属ナノ粒子は、硫黄を含有していてもよい。硫黄は金属粒子ナノ粒子の表面に付着してもよいし、金属原子間に挿入されていてもよい。硫黄は、金属ナノ粒子の酸化を抑制する効果ある。磁性金属ナノ粒子の硫黄の含有量は、0.001質量%以上0.5質量%以下の範囲にあることが好ましい。

[0035] 磁性金属ナノ粒子の分散液は、さらに、増粘剤、界面活性剤、分散剤、酸化防止剤などを含有していてもよい。

[0036] 「第2実施形態」

次に、本発明の第2実施形態の分析方法を、図3と図4を参照して説明する。

図3は、本発明の第2実施形態にかかる分析方法を説明するフロー図である。図4は、本発明の第2実施形態にかかる分析方法を説明する概念図である。

本実施形態の分析方法は、図3に示すように、第1結合工程S01、第1洗浄工程S02、第2結合工程S03、第2洗浄工程S04、磁場印加工程S05、電流量計測工程S06、算出工程S07を含む。

[0037] (第1結合工程S01)

第1結合工程S01では、上述のセンサ10の作用電極12と、被検物質溶液とを接触させる。図4(a)に示すように、作用電極12の表面には、測定対象物である被検物質と選択的に結合可能な一次抗体31が固定されている。このため、第1結合工程S01では、図4(b)に示すように、測定対象となる被検物質32のみが一次抗体31に補足される。

[0038] (第1洗浄工程S02)

第1洗浄工程S02では、作用電極12を洗浄して作用電極12に付着している被検物質溶液を除去する。洗浄液としては、水系溶媒、有機系溶媒を用いることができる。

[0039] (第2結合工程S03)

第2結合工程S03では、作用電極12と、前述の磁性金属ナノ粒子の分散液とを接触させる。図4(c)に示すように、磁性金属ナノ粒子33の表面には、測定対象物である被検物質32と選択的に結合可能な二次抗体34が固定されている。このため、第2結合工程S03により、図4(c)に示すように、被検物質32と二次抗体34が結合し、被検物質32に標識となる磁性金属ナノ粒子33が接続される。

[0040] (第2洗浄工程S04)

第2洗浄工程S04では、作用電極12を洗浄して作用電極12に付着している磁性金属ナノ粒子の分散液を除去する。この第2洗浄工程S04により、被検物質32に接続されていない磁性金属ナノ粒子33が除去される。洗浄液としては、水系溶媒、有機系溶媒を用いることができる。

[0041] (磁場印加工程S05)

磁場印加工程S05では、被検物質32と接続された磁性金属ナノ粒子33に溶媒の存在下で磁場を印加する。磁場は、作用電極12の背面側から磁性金属ナノ粒子33を引き付ける方向に印加することが好ましい。磁場は、例えば、図4(d)に示すように、作用電極12の背面(図4(d)において下面)の側に磁石35を配置することによって印加することができる。磁

石 3 5 としては、ネオジム磁石などの永久磁石、またはコイルで磁界を与える電磁石を用いることができる。この磁場印加工程 S 0 5 により、被検物質 3 2 と接続された磁性金属ナノ粒子 3 3 が作用電極 1 2 に接触する。

[0042] 溶媒は、印加された磁場によって、磁性金属ナノ粒子 3 3 を作用電極 1 2 に接触するように移動させることができるものであれば、特に制限はないが、次の電流量計測工程 S 0 6 で使用できる導電性溶媒を用いることが好ましい。

[0043] (電流量計測工程 S 0 6)

電流量計測工程 S 0 6 では、作用電極 1 2 と対極 1 3 との間に電圧を印加して、磁性金属ナノ粒子 3 3 を導電性溶媒の存在下でイオン化（酸化）させ、磁性金属ナノ粒子 3 3 の全量がイオン化するまでの電流量を計測する。例えば、磁性金属ナノ粒子 3 3 がコバルトナノ粒子である場合、図 4 (d) に示すように、作用電極 1 2 と対極 1 3 との間に電圧を印加することによって、コバルトナノ粒子が 2 価のイオンとして溶解するときの電流量を計測する。具体的には、センサ 1 0 のリード線 1 2 a、1 3 a、1 4 a をポテンシオスタットに接続し、ボルタンメトリー法を用いて、作用電極 1 2 と対極 1 3 との間に電圧を印加しながら、作用電極 1 2 と対極 1 3 との間に流れる電流量を測定する。

[0044] 導電性溶媒としては、電解質溶液を用いることが好ましい。電解質溶液の電解質としては、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化リチウムなどの塩化物を用いることができる。塩化物は、磁性金属ナノ粒子 3 3 をイオン化させる際に、磁性金属ナノ粒子 3 3 の表面に形成されている酸化物被膜（不働態被膜）を破壊し、磁性金属を溶液に露呈させ、イオン化を進行し易くする効果がある。電解質溶液の溶媒としては、水系溶媒を用いることができる。水系溶媒の例としては、水、緩衝液を挙げることができる。電解質溶液の塩化物イオン濃度は、0.05 モル/L 以上 1.0 モル/L 以下の範囲にあることが好ましい。

[0045] (算出工程 S 0 7)

算出工程 S 0 7 では、電流量から磁性金属ナノ粒子 3 3 の量を求め、磁性金属ナノ粒子 3 3 の量から被検物質量を算出する。電流量計測工程 S 0 6 で得られる電流量は、磁性金属ナノ粒子 3 3 の量（すなわち、被検物質）と相関する。従って、既知量の被検物質を含む試料を用いて検量線を作成することによって、被検物質溶液に含まれる被検物質を正確に定量することが可能となる。

[0046] 「第 3 実施形態」

次に、本発明の第 2 実施形態の分析方法を、図 5 と図 6 を参照して説明する。

図 5 は、本発明の第 2 実施形態にかかる分析方法を説明するフロー図である。図 6 は、本発明の第 2 実施形態にかかる分析方法の未接続磁性金属ナノ粒子除去工程を説明する概念図である。

本実施形態の分析方法は、図 5 に示すように、第 1 結合工程 S 1 1、洗浄工程 S 1 2、第 2 結合工程 S 1 3、未接続磁性金属ナノ粒子除去工程 S 1 4、磁場印加工程 S 1 5、電流量計測工程 S 1 6、算出工程 S 1 7 を含む。洗浄工程 S 1 2 は、上述した第 1 実施形態の第 1 洗浄工程 S 0 2 と同じである。第 2 実施形態の分析方法は、第 1 実施形態の第 2 洗浄工程 S 0 4 の代わりに未接続磁性金属ナノ粒子除去工程 S 1 4 を行う点を除いて、第 1 実施形態の分析方法と同様に構成されている。

[0047] （未接続磁性金属ナノ粒子除去工程 S 1 4）

未接続磁性金属ナノ粒子除去工程 S 1 4 では、外部磁場により被検物質 3 2 と接続していない磁性金属ナノ粒子 3 3 を作用電極 1 2 の表面もしくはその近傍から除去する。例えば、図 6 に示すように、磁石 3 5 を作用電極 1 2 の表面もしくはその近傍に配置して、被検物質 3 2 と接続していない磁性金属ナノ粒子 3 3 を、磁石 3 5 に付着させて、磁石 3 5 を移動することによって除去する。磁石 3 5 と磁性金属ナノ粒子 3 3 とが直接接触しないように、磁石 3 5 の表面をプラスチック製フィルムで覆ってもよい。磁石 3 5 は、永久磁石であってもよいし、電磁石であってもよい。また、外部から磁場をか

ける方法は、特に制限はなく、磁石以外のものを用いてもよい。

[0048] 以上説明したように、第1実施形態の分析キットによれば、センサ10の作用電極12は、一次抗体が固定されているので、被検物質溶液に含まれる被検物質を高い選択性で補足することができる。また、センサ10の作用電極12として、導電性ダイヤモンド電極または導電性ダイヤモンド様炭素電極（DLCE電極）を用いることによって、磁性金属ナノ粒子の電気化学反応を高SN比で検出することが可能となる。

[0049] また、第1実施形態の分析キットによれば、二次抗体が固定されている磁性金属ナノ粒子の分散液を備えるので、標識として磁性金属ナノ粒子を用い、その磁性金属ナノ粒子の量を、電気化学的手法を用いて定量することによって、一次抗体で補足された被検物質を高い感度で分析することができる。

[0050] また、第2実施形態および第3実施形態の分析方法によれば、被検物質と接続した磁性金属ナノ粒子に溶媒の存在下で磁場を印加して、磁性金属ナノ粒子を作用電極に接触させるので、従来行われていた金属を化学的に溶解させる工程を実施せずに、電気化学的手法を用いて、被検物質を定量することができる。従って、本発明の分析キットおよび分析方法によれば、操作が簡便で、被検物質を高い選択性で、かつ高感度で分析することが可能となる。

実施例

[0051] 以下、具体的実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に限定されない。

[0052] [実施例1]

(1) 一次抗体付きセンサの作製

作用電極に導電性DLCE膜、対極とリード線にカーボンペーストのスクリーン印刷により作成したカーボン膜、参照電極にペースト化したAg/AgClのスクリーン印刷により作成したAg/AgCl膜を用いたセンサチップを用意した。このセンサチップの作用電極（電極面積 $S = 0.0962 \text{ cm}^2$ ）に、一次抗体として未標識の抗ヤギIgGを固定して、作用電極の表面に一次抗体が固定されている一次抗体付きセンサを作製した。

[0053] (2) 二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液

4. 60 mM 硫酸コバルト (II) 四水和物、および 0.460 mM クエン酸三ナトリウム二水和物を、2 L の脱イオン水に溶解させた。8.80 mM 水素化ホウ素ナトリウムを混合物に添加し、10 分間反応させた。ネオジム磁石を用いて生成したコバルトナノ粒子を分離し、エタノールで数回洗浄した。洗浄後、コバルトナノ粒子を室温にて真空オーブンで一晩乾燥させた。乾燥したコバルトナノ粒子を 450 °C で水素と窒素の混合ガスの下で 1 時間熱処理を行った。得られたコバルトナノ粒子の平均粒子径は 18 nm であった。

[0054] 上記のコバルトナノ粒子と、オボアルブミン (OA、グレード III) と、抗ヤギ IgG と、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート (Tween 20、非イオン系界面活性剤) を混合し、コバルトナノ粒子の表面に、抗ヤギ IgG (二次抗体) を固定した二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液を作製した。二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液のコバルトナノ粒子の濃度は 0.007 質量% とした。抗ヤギ IgG としては、Jackson ImmunoResearch Laboratories 社から市販されているポリクローナル抗体を使用した。

[0055] (3) 抗原分析用試料

抗原分析用試料として、下記に示すように抗原濃度がそれぞれ異なる No. 1 ~ No. 6 を用意した。下記の No. 1 ~ No. 6 は、0.1% の Tween 20 を含む PBS 緩衝液と、ヤギ IgG (抗原) とを抗原濃度が下記の濃度となるように混合することによって調製した。

No. 1 : 抗原濃度 = 0.001 ng/mL

No. 2 : 抗原濃度 = 0.01 ng/mL

No. 3 : 抗原濃度 = 0.1 ng/mL

No. 4 : 抗原濃度 = 1 ng/mL

No. 5 : 抗原濃度 = 10 ng/mL

N o. 6 : 抗原濃度 = 1 0 0 n g / m L

[0056] (4) 抗原の分析

(3) で用意した N o. 1 ~ N o. 6 の各抗原分析用試料について、3 5 μ L を正確に量り取り、これを上記 (1) で作製した一次抗体付きセンサの作用電極の上に滴下した後、4 0 分間インキュベートした (第 1 結合工程)。

[0057] 次に、一次抗体付きセンサの作用電極を、洗浄液を用いて洗浄して、抗原分析用試料を洗い流した (第 1 洗浄工程)。洗浄液には、P B S を用いた。

[0058] 次に、上記 (2) で調製した二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液を 1 μ L 正確に量り取り、これを、一次抗体付きセンサの作用電極の上に滴下した後、3 時間インキュベートした (第 2 結合工程)。

[0059] 次に、一次抗体付きセンサの作用電極を、洗浄液を用いて洗浄して、二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液を洗い流した (第 2 洗浄工程)。洗浄液には、P B S を用いた。

[0060] 次に、一次抗体付きセンサのリード線をポテンシオスタットに接続し、一次抗体付きセンサを、プラスチック製角型容器に、その一次抗体付きセンサの背面 (作用電極側とは反対側の面) がプラスチック製角型容器の底面に接触するように収容した。次いで、プラスチック製角型容器に、P B S に 0. 1 モル / L 塩化カリウムを溶解させた電解質溶液を注入し、一次抗体付きセンサを電解質溶液に浸漬させた。そしてプラスチック製角型容器の底部外側にネオジム磁石を密着配置して、一次抗体付きセンサの作用電極に、センサ背面側からコバルトナノ粒子を引き付ける方向に磁場を印加した (磁場印加工程)。

[0061] 次に、ポテンシオスタットを用いて、作用電極と対極との間に電圧を印加して、作用電極と対極との間に流れる電流量を計測した (電流量計測工程)。

[0062] 図 7 に、N o. 1 ~ N o. 6 の各抗原分析用試料の抗原濃度と、作用電極と対極との間に流れた電流量 (すなわちコバルトナノ粒子をイオン化させる

ために要した電流量)とをプロットしたグラフを示す。図7のグラフから電流値と、抗原分析用試料の抗原濃度との間には相関関係があることが確認された。従って、既知量の抗原(被検物質)を含む試料を用いて検量線(電流値-抗原濃度曲線)を作成することによって、被検物質溶液に含まれる抗原(被検物質)を正確に定量することが可能となることが確認された。

[0063] [実施例2]

(1) 一次抗体付きセンサの作製

ポリエチレンテレフタレート基板に対極とリード線をマスクでパターンニングした金蒸着膜、作用電極にSiウエハに成膜した導電性DL膜、参照電極にペースト化したAg/AgClのスクリーン印刷により作成したAg/AgCl膜を用いたセンサチップを用意した。このセンサチップの作用電極(電極面積 $S = 0.0962 \text{ cm}^2$)に、一次抗体として未標識の抗8-ヒドロキシデオキシグアノシン(抗8-OHdG)抗体を固定して、作用電極の表面に一次抗体が固定されている一次抗体付きセンサを作製した。

[0064] (2) 二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液

4.60 mM硫酸コバルト(II)四水和物、および0.460 mMクエン酸三ナトリウム二水和物を、2 Lの脱イオン水に溶解させた。8.80 mM水素化ホウ素ナトリウムを混合物に添加し、10分間反応させた。ネオジム磁石を用いて生成したコバルトナノ粒子を分離し、エタノールで数回洗浄した。洗浄後、コバルトナノ粒子を室温にて真空オーブンで一晩乾燥させた。乾燥したコバルトナノ粒子を450°Cで水素と窒素の混合ガスの下で1時間熱処理を行った。得られたコバルトナノ粒子の平均粒子径は40 nmであった。

[0065] 上記のコバルトナノ粒子と、抗8-ヒドロキシデオキシグアノシン(抗8-OHdG)抗体と、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)と、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート(Tween 20、非イオン系界面活性剤)を混合し、コバルトナノ粒子の表面に、抗8-OHdG抗体(二次抗体)を固定した二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液を作製した。二次抗体付

きコバルトナノ粒子分散液のコバルトナノ粒子の濃度は0.007質量%とした。抗8-OHdG抗体としては、IMMUNDIAGNOSTIK GMBH社から市販されているモノクローナル抗体AA1005.1を使用した。

[0066] 抗原分析用試料として、下記に示すように抗原濃度がそれぞれ異なるNo. 1～No. 6を用意した。下記のNo. 1～No. 6は、0.1%のTween 20を含むPBS緩衝液と、8-OHdG（抗原）とを抗原濃度が下記の濃度となるように混合することによって調製した。

No. 1：抗原濃度＝0.01 ng/mL

No. 2：抗原濃度＝0.1 ng/mL

No. 3：抗原濃度＝1 ng/mL

No. 4：抗原濃度＝10 ng/mL

No. 5：抗原濃度＝100 ng/mL

No. 6：抗原濃度＝1000 ng/mL

[0067] (4) 抗原の分析

(3) で用意したNo. 1～No. 6の各抗原分析用試料について、35 μ Lを正確に量り取り、これを上記(1)で作製した一次抗体付きセンサの作用電極の上に滴下した後、40分間インキュベートした（第1結合工程）。

[0068] 次に、一次抗体付きセンサの作用電極を、洗浄液を用いて洗浄して、抗原分析用試料を洗い流した（洗浄工程）。洗浄液には、PBSを用いた。

[0069] 次に、上記(2)で調製した二次抗体付きコバルトナノ粒子分散液を1 μ L正確に量り取り、これを、一次抗体付きセンサの作用電極の上に滴下した後、3時間インキュベートした（第2結合工程）。

[0070] 次に、一次抗体付きセンサのリード線をポテンシオスタットに接続し、一次抗体付きセンサを、プラスチック製角型容器に、その一次抗体付きセンサの背面（作用電極側とは反対側の面）がプラスチック製角型容器の底面に接触するように収容した。次いで、プラスチック製角型容器に、PBSに0.

1 モル／L 塩化カリウムを溶解させた電解質溶液を注入し、一次抗体付きセンサを電解質溶液に浸漬させた。そして、ネオジム磁石を一次抗体付きセンサ基板の作用電極の表面に配置して、未接続の二次抗体付コバルトナノ粒子をネオジム磁石に付着させて除去した（未接続磁性金属ナノ粒子除去工程）。

[0071] 次に、プラスチック製角型容器の底部外側にネオジム磁石を密着配置して、一次抗体付きセンサの作用電極に、センサ背面側からコバルトナノ粒子を引き付ける方向に磁場を印加した（磁場印加工程）。

[0072] 次に、ポテンシオスタットを用いて、作用電極と対極との間に電圧を印加して、作用電極と対極との間に流れる電流量を計測した（電流量計測工程）。

[0073] 図 8 に、No. 1 ～ No. 6 の各抗原分析用試料の抗原濃度と、作用電極と対極との間に流れた電流量（すなわちコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量）とをプロットしたグラフを示す。図 8 のグラフから電流値と、抗原分析用試料の抗原濃度との間には相関関係があることが確認された。従って、既知量の抗原（被検物質）を含む試料を用いて検量線（電流値－抗原濃度曲線）を作成することによって、被検物質溶液に含まれる抗原（被検物質）を正確に定量することが可能となることが確認された。

[0074] [実施例 3]

一次抗体付きセンサの作用電極をカーボン印刷電極としたこと以外は、実施例 2 と同様にして、各抗原分析用試料の抗原濃度と、抗原の標識であるコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量とをプロットしたグラフを作成した。その結果を、図 9 に示す。図 9 のグラフから電流値と、抗原分析用試料の抗原濃度との間には相関関係があることが確認された。従って、作用電極としてカーボン印刷電極を使用した場合でも、被検物質溶液（に含まれる抗原（被検物質）を正確に定量することが可能となることが確認された。

[0075] [実施例 4]

一次抗体付きセンサの作用電極を、蒸着法により形成した金蒸着電極としたこと以外は、実施例2と同様にして、各抗原分析用試料の抗原濃度と、抗原の標識であるコバルトナノ粒子をイオン化させるために要した電流量とをプロットしたグラフを作成した。その結果を、図10に示す。図10のグラフから電流値と、抗原分析用試料の抗原濃度との間には相関関係があることが確認された。従って、作用電極として金蒸着電極を使用した場合でも、被検物質溶液に含まれる抗原（被検物質）を正確に定量することが可能となることが確認された。

符号の説明

[0076] 10…センサ、11…第1基板、12…作用電極、13…対極、14…参照電極、12a、13a、14a…リード線、15…窓、16…第2基板、17…接着剤、31…一次抗体、32…被検物質、33…磁性金属ナノ粒子、34…二次抗体、35…磁石

請求の範囲

- [請求項1] 作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に一次抗体が固定されているセンサ、及び、溶媒と、前記溶媒に分散された磁性金属ナノ粒子とを含み、前記磁性金属ナノ粒子は、表面に二次抗体が固定されている磁性金属ナノ粒子の分散液を備えることを特徴とする分析キット。
- [請求項2] 前記作用電極がカーボン電極、金属電極、導電性ダイヤモンド電極または導電性ダイヤモンド様炭素電極である請求項1の分析キット。
- [請求項3] 前記磁性金属ナノ粒子が、鉄、コバルトおよびニッケルからなる群より選ばれる少なくとも一種の磁性金属を含む請求項1または2に記載の分析キット。
- [請求項4] 前記磁性金属ナノ粒子が、硫黄を含有することを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の分析キット。
- [請求項5] 前記参照電極が、銀－塩化銀電極である請求項1～4のいずれか一項に記載の分析キット。
- [請求項6] 前記対極が、カーボン電極、貴金属電極、導電性ダイヤモンド電極または導電性ダイヤモンド様炭素電極である請求項1～5のいずれか一項に記載の分析キット。
- [請求項7] 被検物質溶液に含まれる被検物質を分析するための分析方法であって、
作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に前記被検物質と結合する一次抗体が固定されているセンサの前記作用電極と、前記被検物質溶液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体と前記被検物質溶液の被検物質とを結合させる第1結合工程と、
前記作用電極を洗浄して前記作用電極に付着している前記被検物質溶液を除去する第1洗浄工程と、
前記作用電極と、表面に前記被検物質と結合する二次抗体が固定された磁性金属ナノ粒子が分散されている磁性金属ナノ粒子の分散液と

を接触させて、前記作用電極の前記一次抗体に結合した前記被検物質と二次抗体とを結合させることによって、前記被検物質と磁性金属ナノ粒子とを接続させる第2結合工程と、

前記作用電極を洗浄して前記磁性金属ナノ粒子の分散液を除去する第2洗浄工程と、

前記被検物質と接続した前記磁性金属ナノ粒子に溶媒の存在下で磁場を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を作用電極に接触させる磁場印加工程と、

前記作用電極と前記対極との間に電圧を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を導電性溶媒の存在下でイオン化させ、前記磁性金属ナノ粒子の全量がイオン化するまでの電流量を計測する電流量計測工程と、

前記電流量から磁性金属ナノ粒子量を求め、前記磁性金属ナノ粒子量から被検物質量を算出する算出工程と、

を含むことを特徴とする分析方法。

[請求項8] 被検物質溶液に含まれる被検物質を分析するための分析方法であって、

作用電極と、参照電極と、対極と、を有し、前記作用電極の表面に前記被検物質と結合する一次抗体が固定されているセンサの前記作用電極と、前記被検物質溶液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体と前記被検物質溶液の被検物質とを結合させる第1結合工程と、

前記作用電極を洗浄して前記作用電極に付着している前記被検物質溶液を除去する洗浄工程と、

前記作用電極と、表面に前記被検物質と結合する二次抗体が固定された磁性金属ナノ粒子が分散されている磁性金属ナノ粒子の分散液とを接触させて、前記作用電極の前記一次抗体に結合した前記被検物質と二次抗体とを結合させることによって、前記被検物質と磁性金属ナノ粒子とを接続させる第2結合工程と、

外部磁場により、前記被検物質と接続していない前記磁性金属ナノ

粒子を、作用電極の表面もしくはその近傍から除去する未接続磁性金属ナノ粒子除去工程と、

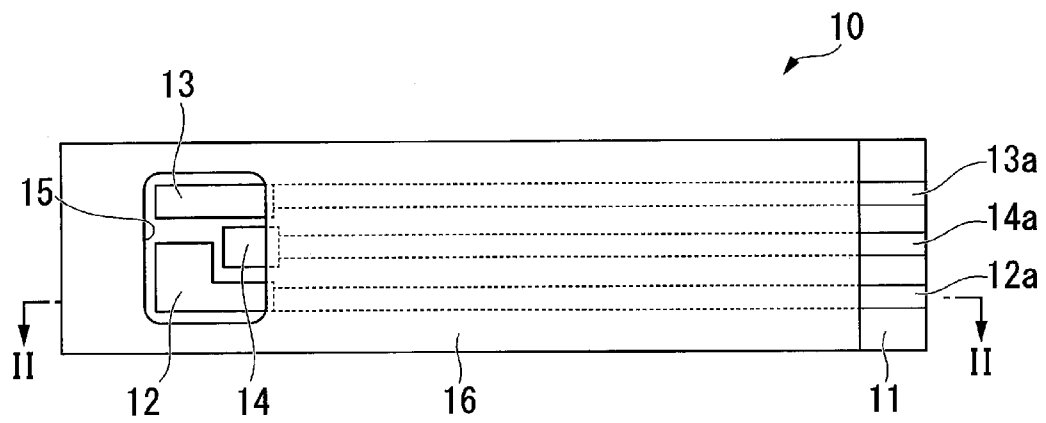
前記被検物質と接続した前記磁性金属ナノ粒子に溶媒の存在下で磁場を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を作用電極に接触させる磁場印加工程と、

前記作用電極と前記対極との間に電圧を印加して、前記磁性金属ナノ粒子を導電性溶媒の存在下でイオン化させ、前記磁性金属ナノ粒子の全量がイオン化するまでの電流量を計測する電流量計測工程と、

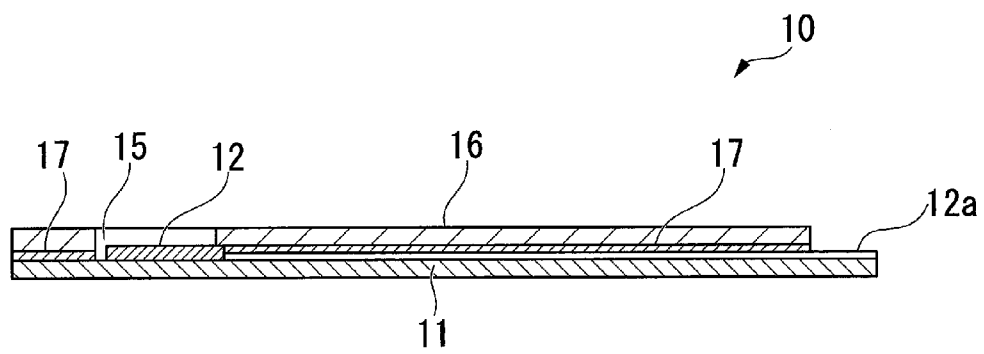
前記電流量から磁性金属ナノ粒子量を求め、前記磁性金属ナノ粒子量から被検物質量を算出する算出工程と、

を含むことを特徴とする分析方法。

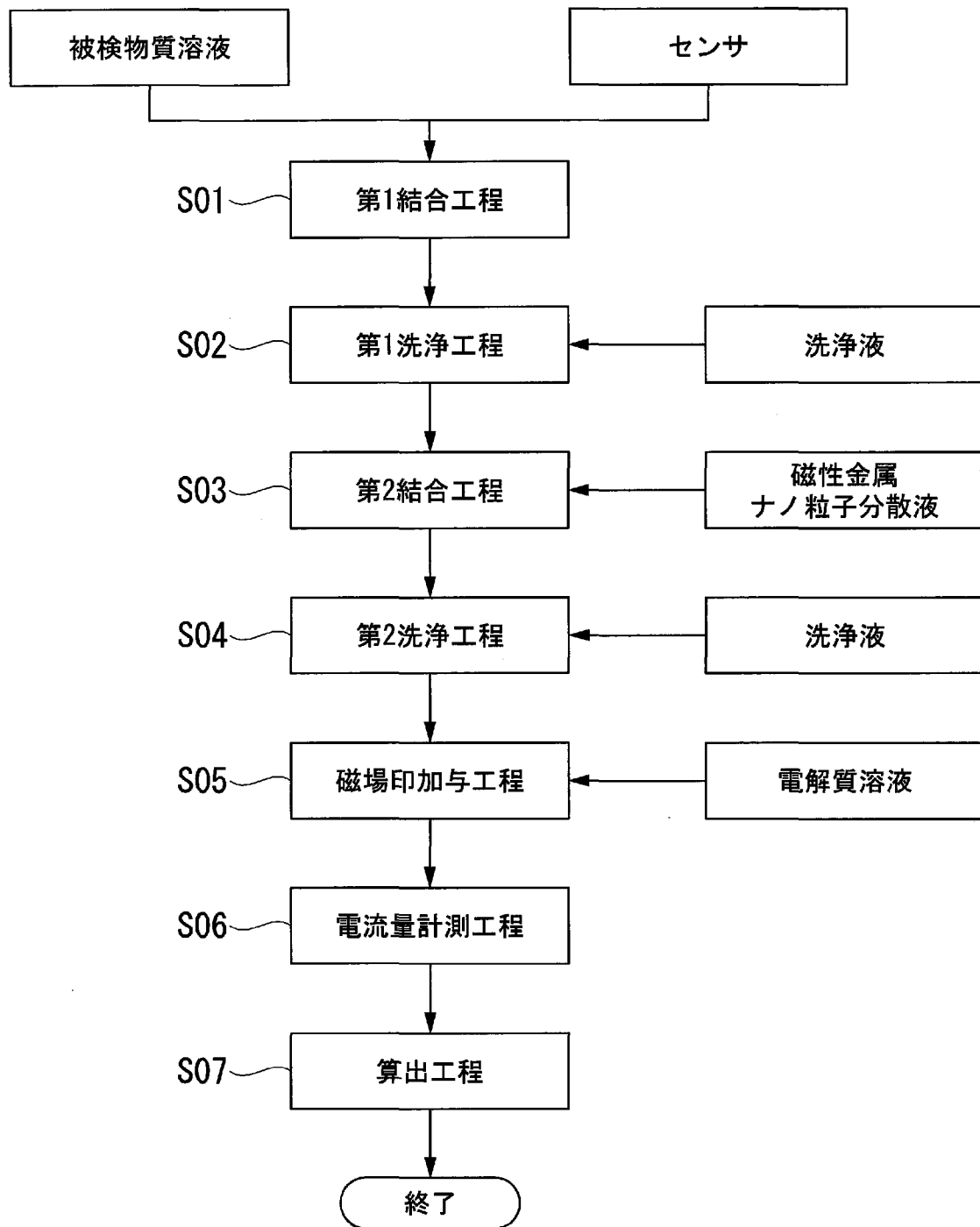
[図1]



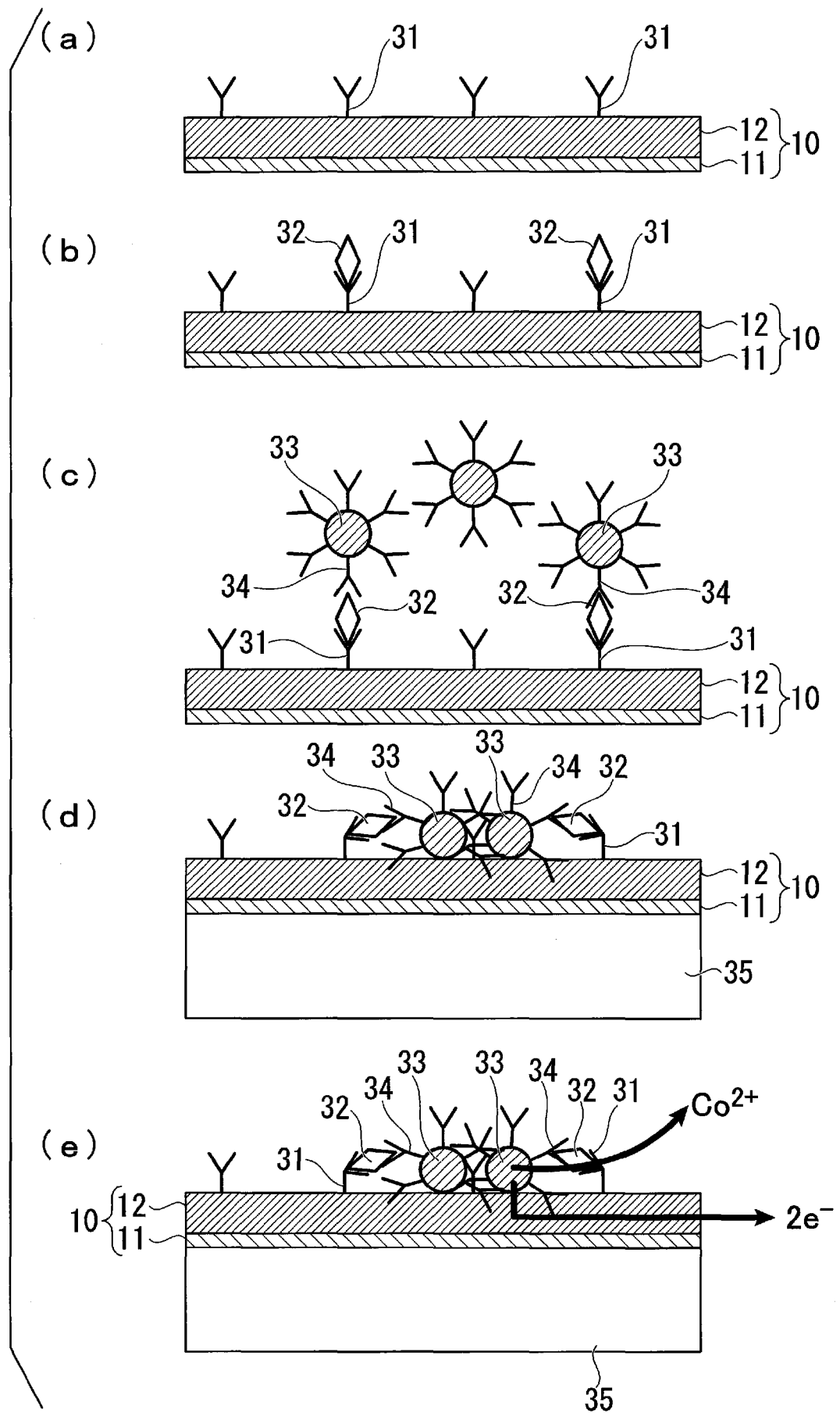
[図2]



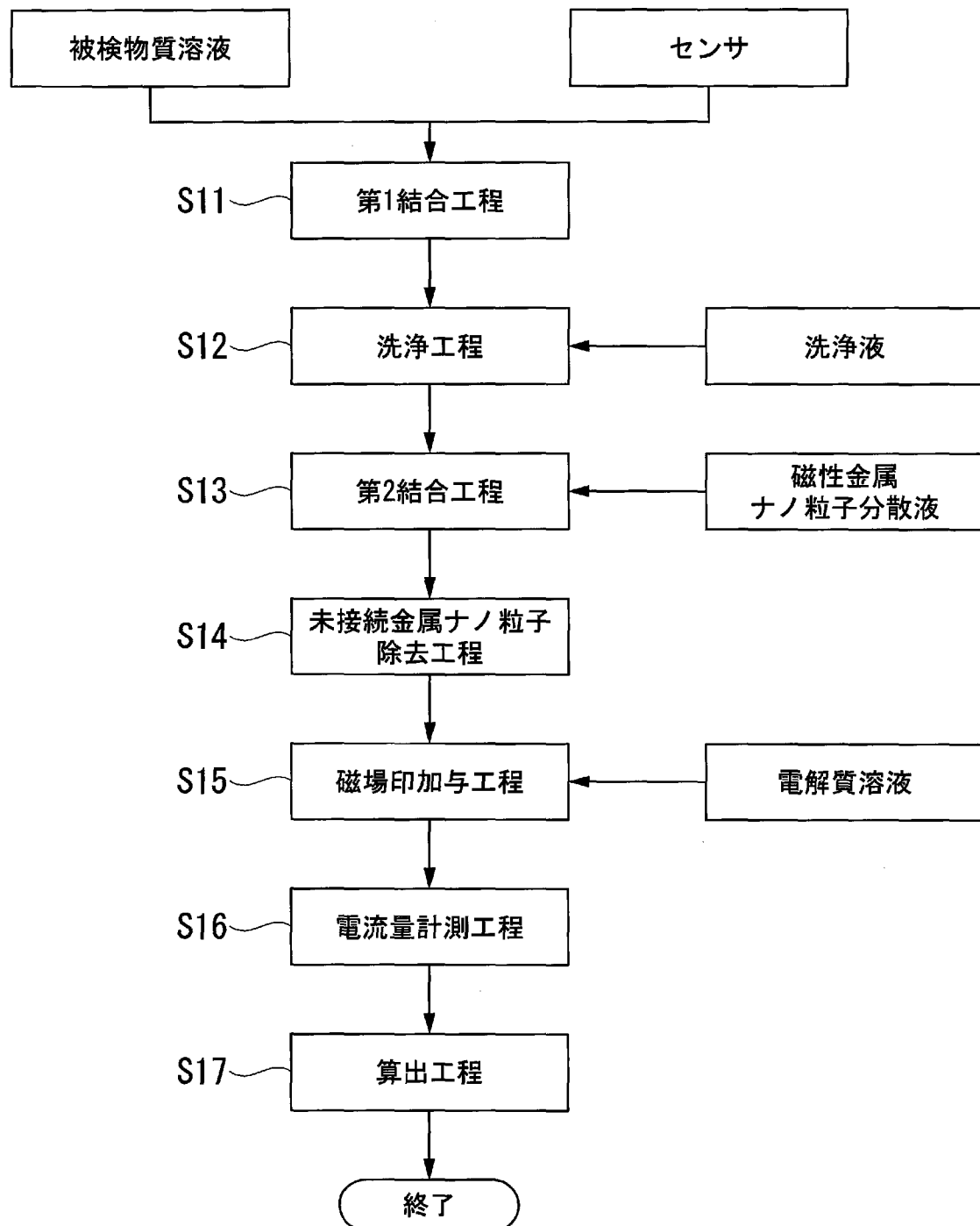
[図3]



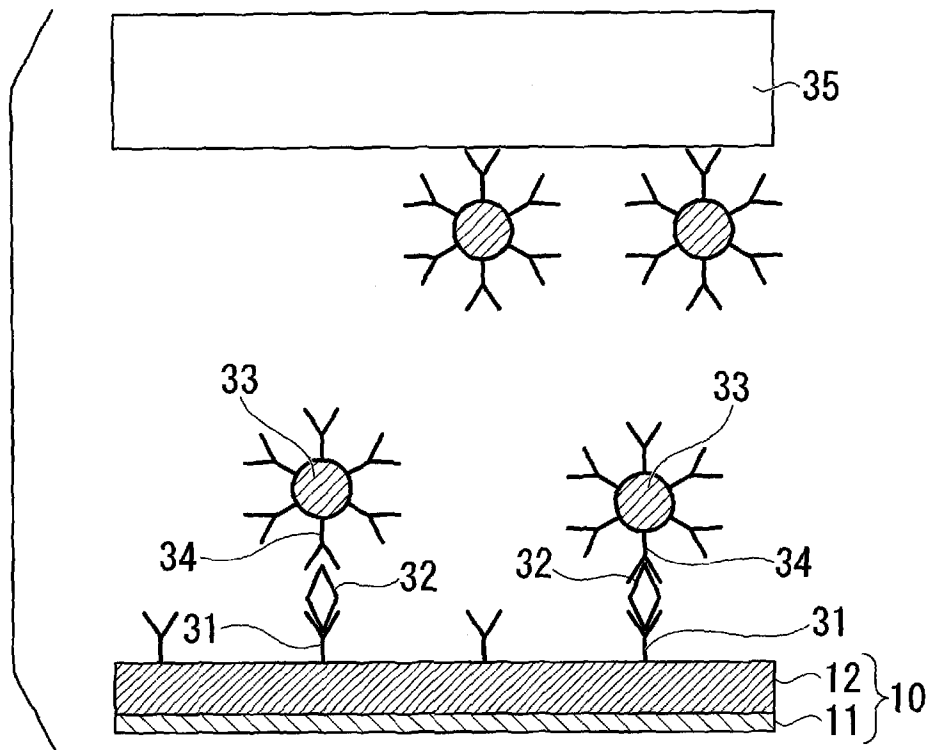
[図4]



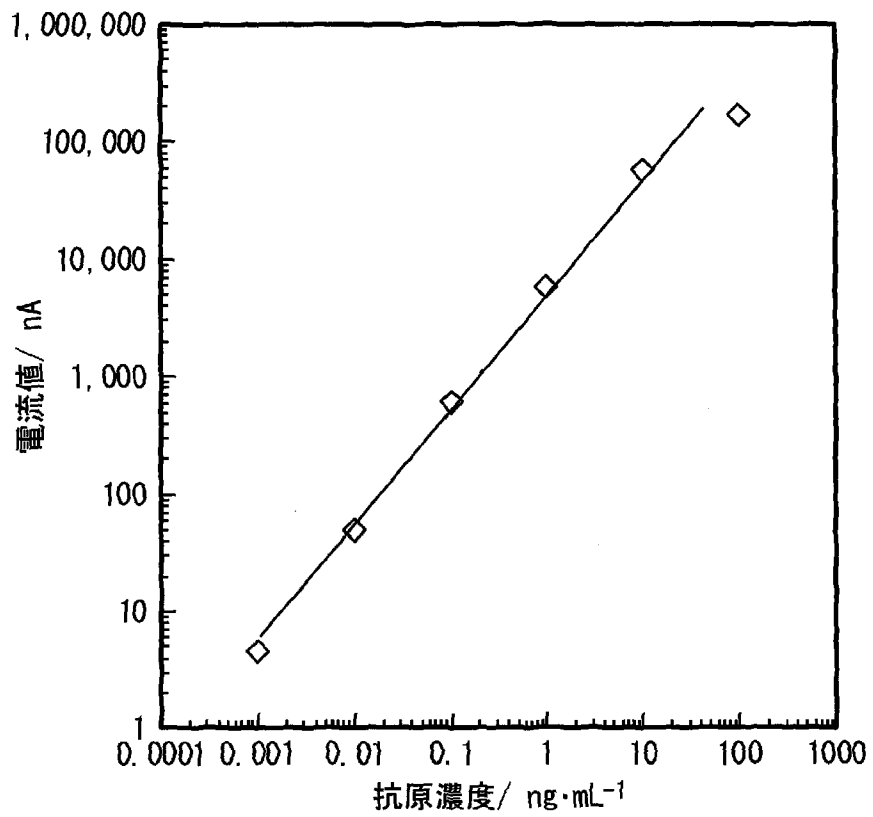
[図5]



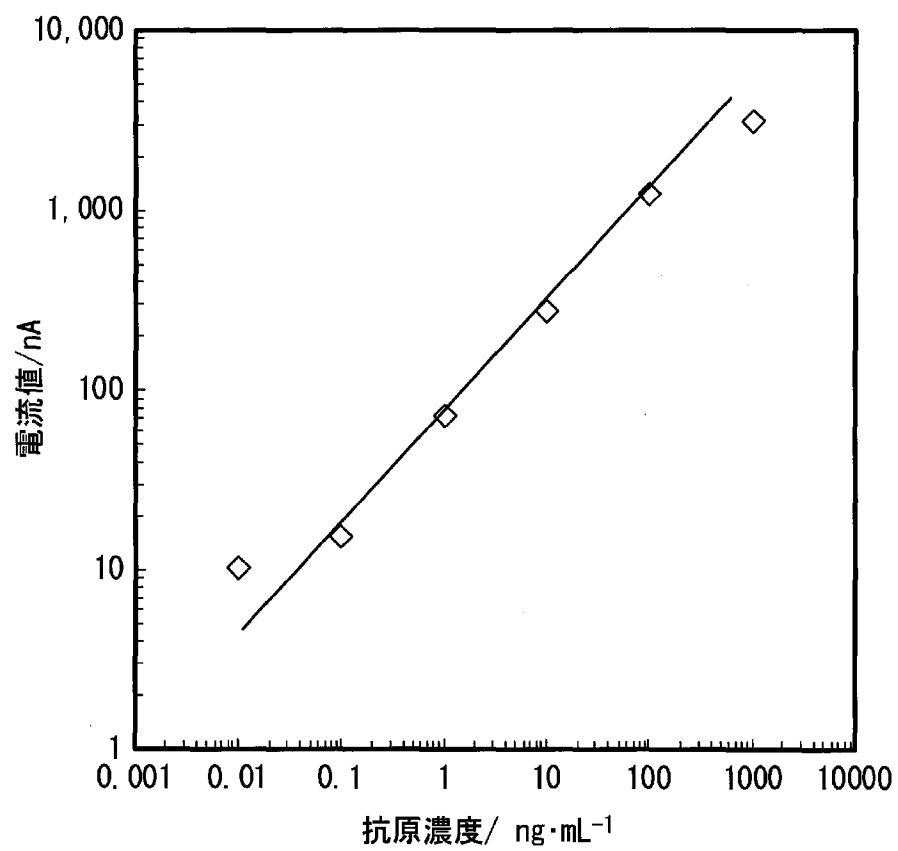
[図6]



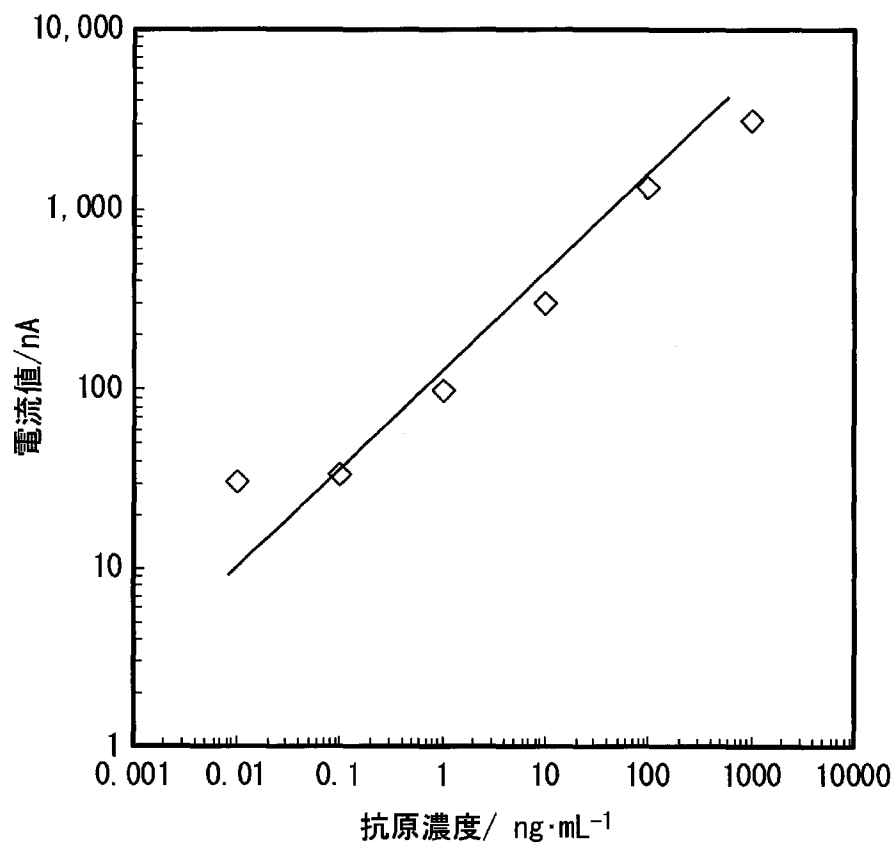
[図7]



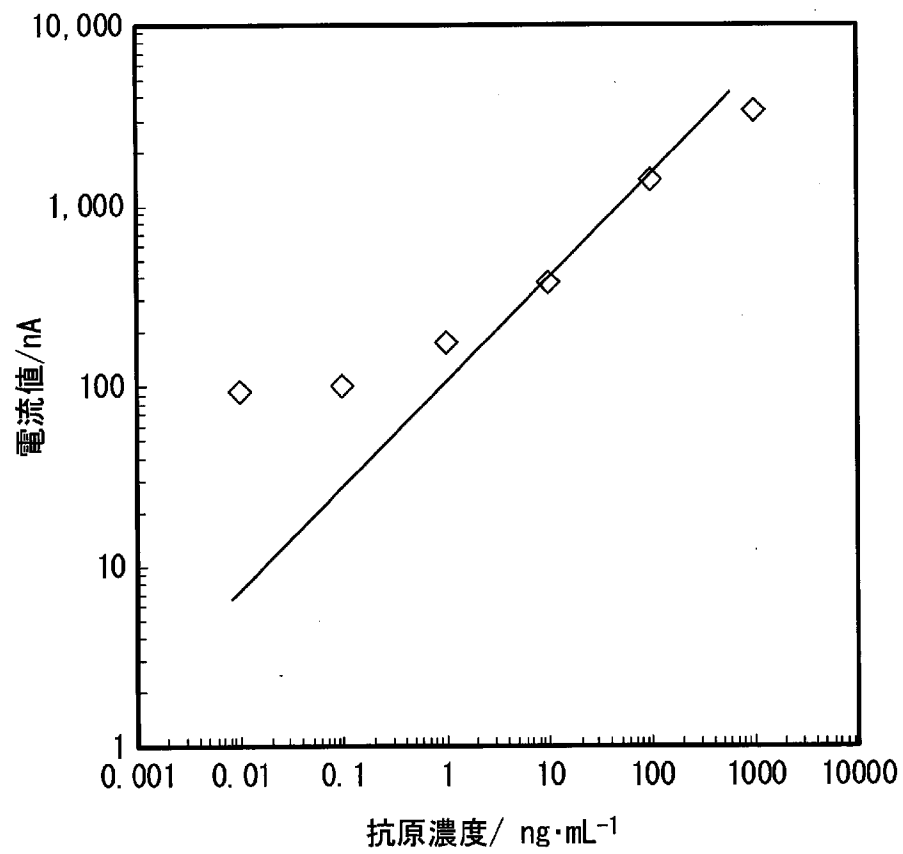
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/024860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N27/327 (2006.01)i, G01N27/30 (2006.01)i, G01N27/42 (2006.01)i,
G01N33/543 (2006.01)i, G01N33/551 (2006.01)i, G01N33/553 (2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N27/26-G01N27/49, G01N33/48-G01N33/98

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 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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.
Y	WANG, Yaoguang et al., "Ultrasensitive electrochemical aptasensor for the detection of thrombin based on dual signal amplification strategy of Au@GS and DNA-CoPd NPs conjugates", Biosensors and Bioelectronics, 16 February 2016, vol. 80, pp. 640-646	1-6
Y	JP 2006-48906 A (TAKAHASHI, Ken) 16 February 2006, paragraph [0045] (Family: none)	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 September 2018 (07.09.2018)

Date of mailing of the international search report
18 September 2018 (18.09.2018)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/024860

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-25217 A (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 05 February 2009, paragraph [0020], fig. 1-2 (Family: none)	1-6
Y	JP 2009-276343 A (CANON INC.) 26 November 2009, paragraph [0053] & US 2011/0024308 A1, paragraph [0058] & WO 2009/128557 A1	2, 6
A	JP 2013-501921 A (NANOMIX, INC.) 17 January 2013, paragraphs [0007], [0016], fig. 1-2 & US 2012/0178187 A1, paragraphs [0007], [0021], fig. 1-2 & WO 2011/017660 A2 & EP 2462051 A2 & CN 102471051 A & HK 1171004 A1	7-8
A	JP 2015-127694 A (AISIN SEIKI CO., LTD.) 09 July 2015, paragraphs [0033]-[0034] & US 2015/0185213 A1, paragraphs [0055]-[0056]	7-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/327(2006.01)i, G01N27/30(2006.01)i, G01N27/42(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i,
G01N33/551(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/26- G01N27/49, G01N33/48-G01N33/98

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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
Y	WANG, Yaoguang 外6名, Ultrasensitive electrochemical aptasensor for the detection of thrombin based on dual signal amplification strategy of Au@GS and DNA-CoPd NPs conjugates, Biosensors and Bioelectronics, 2016.02.16, Vol.80, p.640-646	1-6
Y	JP 2006-48906 A (高橋 研) 2006.02.16, 段落[0045] (ファミリーなし)	1-6

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.09.2018

国際調査報告の発送日

18.09.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

櫃本 研太郎

2 J

4 4 1 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-25217 A (国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学) 2009.02.05, 段落[0020], 図 1-2 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2009-276343 A (キヤノン株式会社) 2009.11.26, 段落[0053] & US 2011/0024308 A1, 段落[0058] & WO 2009/128557 A1	2, 6
A	JP 2013-501921 A (ナノミックス・インコーポレーテッド) 2013.01.17, 段落[0007], [0016], 図 1-2 & US 2012/0178187 A1, 段落[0007], [0021], 図 1-2 & WO 2011/017660 A2 & EP 2462051 A2 & CN 102471051 A & HK 1171004 A1	7-8
A	JP 2015-127694 A (アイシン精機株式会社) 2015.07.09, 段落[0033]-[0034] & US 2015/0185213 A1, 段落[0055]-[0056]	7-8