

(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5月16日(16.05.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/101447 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/543 (2006.01) G01N 29/036 (2006.01)
G01N 29/02 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/040540

(22) 国際出願日: 2023年11月10日(10.11.2023)

(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 2022-180727 2022年11月11日(11.11.2022) JP

(71) 出願人: 国立大学法人信州大学 (SHINSHU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭三丁目1番1号 Nagano (JP).

(72) 発明者: 山口 昌樹 (YAMAGUCHI, Masaki); 〒3868567 長野県上田市常田三丁目1番5号 国立大学法人信州大学繊維学部内 Nagano (JP). 桑原 宏一郎 (KUWAHARA, Koichiro); 〒3908621 長野県松本市旭三丁目1番1号 国

立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP). 南澤 匡俊(MINAMISAWA, Masatoshi); 〒3908621 長野県松本市旭三丁目1番1号 国立大学法人信州大学医学部内 Nagano (JP).

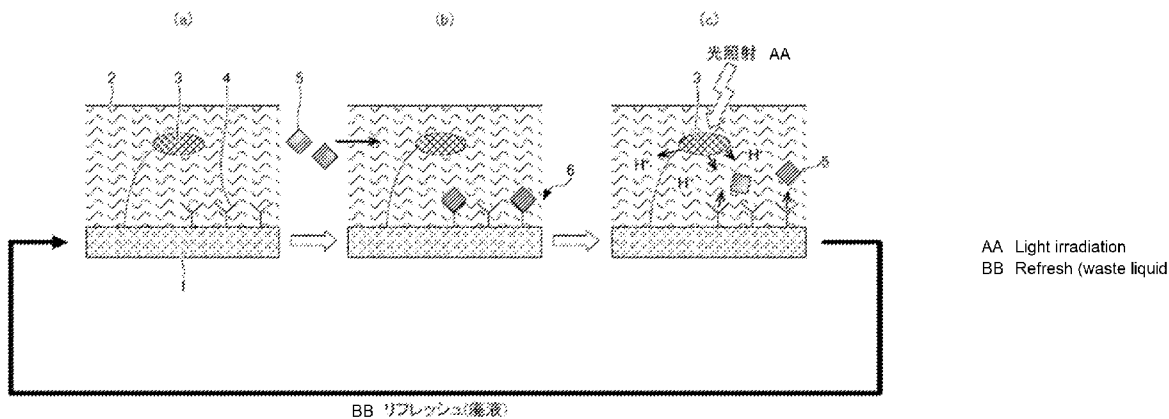
(74) 代理人: 伊東 忠重, 外(ITO, Tadashige et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 16階 Tokyo (JP).

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

(54) Title: DIAGNOSIS METHOD, DIAGNOSIS DEVICE, AND ANTIBODY REGENERATION METHOD

(54) 発明の名称: 診断方法、診断装置、及び抗体再生方法

[図1]



(57) Abstract: This diagnosis method comprises: a marker complex concentration measurement step for disposing, on a substrate, a photoacid and an anti-marker antibody that specifically binds with a marker and providing a test sample thereon to measure the concentration of a marker complex in which the anti-marker antibody and a marker in the test sample are bound; and a marker dissociation step for irradiating the photoacid with light to dissociate the marker from the marker complex.

(57) 要約: 基材上に、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記検査試料中のマーカーと前記抗マーカー抗体とが結合したマーカー複合物の濃度を測定するマーカー複合物濃度測定工程と、前記光酸に光を照射して前記マーカー複合物から前記マーカーを解離させるマーカー解離工程と、を含む診断方法である。

[続葉有]

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))
- 補正された請求の範囲 (条約第19条(1))

明 細 書

発明の名称：診断方法、診断装置、及び抗体再生方法

技術分野

[0001] 本発明は、診断方法、診断装置、及び抗体再生方法に関する。

背景技術

[0002] 抗原抗体反応は、抗体さえ入手できればほとんどのタンパク質等の抗原に適用可能な優れた分子認識技術であり、臨床検査における主流な分析方法となっている。しかし、従来技術では、抗体を再生して繰り返し使用するためには、解離液により抗原抗体複合物から抗原を解離する必要があり（例えば、特許文献1参照）、試薬の補充が発生し、装置が大型化するため生体に装着して時系列的なモニタリングを実現するデバイス化が困難であるという課題がある。

[0003] 光酸を用いた抗体再生に関連する先行技術としては、例えば、非特許文献1には、光酸をセンサに用いてDNAのハイブリダイゼーションの再生に応用することが報告されている。しかし、非特許文献1に記載されているのは、DNAのハイブリダイゼーション／デハイブリダイゼーションプロセスの局所制御であり、光酸を抗体再生に用いることについて開示していない。

[0004] また、非特許文献2には、光酸をタンパク質の濃度センサに応用したことが報告されている。しかし、非特許文献2は、光酸を標的タンパク質の選択的分離（収集）に利用するものであり、光酸を抗体再生に用いた濃度センサを意図したものではない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平3－214051号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Hagit Peretz-Soroka et al., :
Manipulating and Monitoring On-Sur

face Biological Reactions by Light-Triggered Local pH Alterations. Nano Lett. 15 (7) : 4758-68, 2015. doi : 10.1021/acs.nanolett.5b01578.

非特許文献2: E l l a B o r b e r g e t a l . , : L i g h t - C o n t r o l l e d S e l e c t i v e C o l l e c t i o n - a n d - R e l e a s e o f B i o m o l e c u l e s b y a n O n - C h i p N a n o s t r u c t u r e d D e v i c e. Nano Lett. 19 (9), 5868-5878, 2019. doi : 10.1021/acs.nanolett.9b01323.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、マーカーを認識する検出部の抗マーカー抗体を再生でき、その結果としてマーカーを繰り返し測定することができ、マーカーの時系列的なモニタリングを実現できる診断方法、診断装置、及び簡易に抗体を再生して繰り返し使用することができる抗体再生方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

< 1 >

基材上に、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記検査試料中のマーカーと前記抗マーカー抗体とが結合したマーカー複合物の濃度を測定するマーカー複合物濃度測定工程と、

前記光酸に光を照射して前記マーカー複合物から前記マーカーを解離させるマーカー解離工程と、

を含むことを特徴とする診断方法である。

< 2 >

間隔をあけて前記マーカ複合物の濃度を繰り返し測定する、前記< 1 >に記載の診断方法である。

< 3 >

前記基材が、振動体である、前記< 1 >又は< 2 >に記載の診断方法である。

< 4 >

前記光が、レーザー光である、前記< 1 >から< 3 >のいずれかに記載の診断方法である。

< 5 >

前記マーカが、心疾患マーカであり、
前記抗マーカ抗体が、抗心疾患マーカ抗体であり、
前記心疾患マーカが、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）及び脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント（NT-proBNP）の少なくともいずれかである、前記< 1 >から前記< 4 >のいずれかに記載の診断方法である。

< 6 >

前記光酸が、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸（HPTS）である、前記< 1 >から< 5 >のいずれかに記載の診断方法である。

< 7 >

マーカと特異的に結合する抗マーカ抗体及び光酸を表面に配した振動体と、
前記振動体の共振周波数を検出する検出部と、
前記光酸に光を照射する光照射部と、
を有することを特徴とする診断装置である。

< 8 >

前記振動体が振動子上に載置され、前記振動体と前記振動子が機械的に結合されておらず、かつ前記振動体がいずれの部材にも機械的に結合されてい

ない、前記＜7＞に記載の診断装置である。

＜9＞

基材上に、測定対象である抗原と特異的に結合する抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記抗原と前記抗体とが結合した抗原抗体複合物を形成する抗原抗体複合物形成工程と、

前記光酸に光を照射して前記抗原抗体複合物から前記抗原を解離させる抗原解離工程と、

を含むことを特徴とする抗体再生方法である。

発明の効果

[0009] 本発明によると、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、マーカーを認識する検出部の抗マーカー抗体を再生でき、その結果としてマーカーを繰り返して測定することができ、マーカーの時系列的なモニタリングを実現できる診断方法、診断装置、及び簡易に抗体を再生して繰り返し使用することができる抗体再生方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1の（a）～（c）は、抗体再生方法の原理を示す模式図である。

[図2]図2は、光酸としての8-ヒドロキシピレン-1，3，6-トリスルホン酸（HPTS）を光励起した際の化学反応式を示す図である。

[図3]図3は、HPTSの蛍光スペクトル図である。

[図4]図4は、HPTS溶液に波長405nmのレーザー光を照射した際のpHの経時変化を示す図である。

[図5]図5は、HPTS溶液に波長405nmのレーザー光を照射した際のレーザー照射強度とpH変化率との関係を示す図である。

[図6]図6は、HPTS溶液のレーザー光照射によるpH制御能の再現性を示す図である。

[図7]図7は、HPTSの前処理の一例を示す図である。

[図8]図8は、抗BNP抗体及びHPTSの振動体表面への固相化方法の一例を示す模式図である。

[図9]図9の(a)～(d)は、診断方法の原理を示す模式図である。

[図10]図10は、診断装置の一例を示す概略図である。

[図11]図11は、心疾患マーカーであるBNPを繰り返し時系列的に測定しないと、BNPの高値及び低値が見過ごされてしまい、正常と判断され心疾患の診断を誤ってしまうリスクがあることを示すグラフである。

[図12]図12の(a)及び(b)は、生体装着型の心疾患診断装置を腕に装着し、心疾患マーカーを時系列的に計測し、表示した状態を示す概略図である。

[図13]図13の(a)～(f)は、実施例におけるBNPの測定方法を示す模式図である。

[図14]図14は、マイクロプレートへのレーザー光の照射方法を示す概略図である。

[図15]図15は、実施例1及び比較例1におけるHPTS濃度とTMB溶液の吸光度との関係を示すグラフである。

[図16A]図16Aは、実施例2におけるAuメッシュ基材を示す画像である。

[図16B]図16Bは、実施例2におけるAuメッシュ基材への抗BNP抗体固相化と、抗原抗体に基づくBNP検出反応の模式図である。

[図17]図17は、実施例2におけるBNP濃度と発光強度との関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] (抗体再生方法)

本発明の抗体再生方法は、抗原抗体複合物形成工程と、抗原解離工程とを含み、更に必要に応じてその他の工程を含む。

[0012] 本発明においては、測定対象である抗原と特異的に結合する抗体の近傍に光酸を配し、前記光酸に光を照射することによって、抗原抗体複合物から抗原を解離させることができ、物理刺激だけで抗体の再利用が可能となり、抗体を繰り返し使用することができる。この抗体再生方法の原理を利用することによって、後述するように、マーカーを繰り返して測定することができ、

マーカの時系列的なモニタリングを実現できる。

[0013] <抗原抗体複合物形成工程>

抗原抗体複合物形成工程は、基材上に、測定対象である抗原と特異的に結合する抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記抗原と前記抗体とが結合した抗原抗体複合物を形成する工程である。

[0014] ー基材ー

基材としては、形状、大きさ、構造、材質などについて特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記基材の形状としては、例えば、梁状、棒状、板状、膜状、シート状、マイクロプレート状などが挙げられる。

前記基材の大きさとしては、特に制限はなく、用途等に応じて適宜選択することができる。

前記基材の構造としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、単層構造であっても複数層構造であっても構わない。

前記基材の材質としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、樹脂、セラミックス、結晶、金属などが挙げられる。

[0015] 前記樹脂としては、例えば、ポリスチレン樹脂、アクリル樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリ乳酸、ポリエチレンテレフタレート樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリスチレン樹脂などが挙げられる。

前記セラミックスとしては、例えば、シリコン、チタン酸バリウム、チタン酸鉛、チタン酸ジルコン酸鉛（PZT）、ニオブ酸カリウム、ニオブ酸リチウム、タングステン酸ナトリウム、タンタル酸リチウムなどが挙げられる。

前記結晶としては、例えば、水晶などが挙げられる。

前記金属としては、例えば、鉄、ケイ素鋼、フェライト、コバルト、ニッケル、アルミニウム、アルニコなどが挙げられる。

[0016] ー抗原ー

抗原としては、検査試料中に含まれ、抗原抗体反応によって測定対象となる成分を意味し、例えば、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、糖質、電解質、ウイルス、細菌、花粉、又はその他の低分子代謝産物などが挙げられる。

[0017] ー抗体ー

抗体としては、測定対象である抗原と特異的に結合する、免疫グロブリン分子自体の他、パパインやペプシン等の蛋白質分解酵素、或いは化学的分解により生じる F a b、F (a b')₂フラグメント等の分解産物も包含される。また、前記抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のどちらを用いても構わない。前記抗体の取得方法については、特に制限はなく、通常使用される方法を用いることができる。

[0018] ー光酸ー

光酸としては、光の照射によって酸を発生する化合物であれば特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記光酸としては、酸強度 (p K a) 値が 5 ～ 1 0 の範囲であるものが好ましい。一重項電子状態では、より強い酸になる。最も一般的な光酸はオキソ塩であるが、酸強度が光励起によって増強できるのは、その一部である。

前記光酸としては、例えば、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸 (H P T S)、フェノール、7-シアノ-2-ナフトール、トリプトファンなどが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、酸強度が大きい点及び可視光領域の蛍光スペクトルを有する点から、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸 (H P T S) が好ましい。

[0019] 前記基材上に光酸及び抗体を配する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、抗体を基材上に自己組織化単分子膜を用いる方法により固相化し、固相化された抗体と抗体の隙間を埋めるブロッキング処理の代わりに光酸を固相化する方法などが挙げられる。なお、前記基材上に光酸及び抗体を配する方法の詳細については後述する。

[0020] ー検査試料ー

検査試料としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、光酸から放出される水素イオンによってpHを下げる点から液体の検査試料が好ましい。

前記液体の検査試料としては、例えば、全血（凝固前）、血漿、血清、羊水、上下気道の粘膜上皮からの分泌物、唾液、滲出液、組織液、分泌液、母乳、汗、鼻汁、漿液、漏出液、囊胞液、尿、脳脊髄液、涙、胃液、胆汁、脾液、粘液などが挙げられる。

前記検査試料が液体である場合には、前処理を行わないで直接そのまま分析することができる。これにより、簡便かつ迅速に分析でき、検査試料の分解や酸化などの変性を避けることができるので、検査試料に含まれる成分を正確かつ精度良く分析することができる。

なお、液体の検査試料は、必要に応じて、希釈、除蛋白、脂質溶出、濃縮等の前処理を行ってもよい。

[0021] <抗原解離工程>

抗原解離工程は、光酸に光を照射して抗原抗体複合物から抗原を解離させる工程である。

本発明の抗体再生方法では、検査試料に含まれる抗原抗体複合物の濃度の測定が終了した後、光酸に光を照射して抗原抗体複合物から抗原を解離させることにより、抗体を再生することができる。

前記検査試料に含まれる抗原の濃度の測定方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法、イムノクロマト法、表面プラズモン共鳴法、磁気ビーズ法、一定周波数で振動している振動体に抗原が付着した際の質量変化に伴う共振周波数を検出する共振型質量センサを用いる方法などが挙げられる。これらの中でも、試薬及び解離液の補充が不要であり、デバイスの小型化が図れる点から共振型質量センサが好ましい。

[0022] 前記光酸に照射する光はレーザー光であることが好ましい。

前記レーザー光の波長としては、特に制限はなく、光酸の種類に応じて適宜選択することができるが、400nm以上1,000nm以下が好ましく、400nm以上800nm以下がより好ましい。

前記レーザー光の出力としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、1mW以上が好ましい。

光酸にレーザー光を照射することにより、光酸が励起状態となり水素イオンが放出され、検査試料のpHが下がることによって抗原抗体複合物から抗原を解離させ、抗体を再生することができる。

[0023] <その他の工程>

その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、洗浄工程、制御工程などが挙げられる。

[0024] ここで、図1の(a)～(c)は、抗体再生方法の原理を示す模式図である。図1の(a)に示すように、基材1上に固相化した測定対象である抗原と特異的に結合する抗体4の近傍に光酸3を固相化し、検査試料2を供する。すると、図1の(b)に示すように、検査試料中の抗原5が抗体4と抗原抗体反応し、抗原抗体複合物6が形成される。次に、図1の(c)に示すように、光酸3に対して特定波長の光を数秒照射することにより、光酸から水素イオンが放出され検査試料2のpHが変化し、極めて短い時間で抗原抗体複合物6から抗原5が解離する。その後、検査試料2を廃液すると、抗体4を再生することができ、抗体を繰り返し使用できる。

[0025] 図2は、光酸としての8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸(HPTS)を光励起した際の反応式を示す。基底状態のHPTSに波長405nmのレーザー光を照射するとHPTSが励起状態となり、水素イオンを放出し、波長512nmの蛍光を発する。HPTSから効率的に水素イオンを放出させるのに有効な励起光波長を検証するために、HPTSの蛍光分光特性を計測した(FP8600、日本分光株式会社製)。結果を図3に示す。図3に示すHPTSの蛍光スペクトルより、励起光波長400nm～

430nmで蛍光ピークが観察され、HPTSの最適波長は405nmであることがわかった。

[0026] 次に、HPTS溶液のレーザー光照射によるpH制御能を検証するために、HPTS溶液のpHの経時的な変化を測定した。まず、HPTS（30080、Cayman Chemical Company製）を蒸留水に溶解し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ のHPTS水溶液を調製した。

次に、pHメーター（PAL-pH、株式会社アタゴ製）をプレートシェイカーの上に固定し、pHメーターの電極部に上記調製したHPTS水溶液1mLを滴下した。

次に、レーザー照射装置（D405C-300-11-1C-11、京セラSOC株式会社製）と拡散レンズ（AL1210M-A、Thorlabs Inc. 製）を設置し、滴下したHPTS水溶液に波長405nmのレーザー光を照射した。このとき、HPTS水溶液全体にレーザー光を照射するために、拡散レンズとpHメーター間の距離を100mmとした。プレートシェイカーを300rpmに設定し、攪拌しながらpHの測定を行った。その結果を図4及び図5に示す。

図4に示すHPTS水溶液のpHの経時変化の結果から、HPTS水溶液に波長405nmのレーザー光を連続照射することにより、HPTS溶液のpHを6から3近傍まで低下させることを確認できた。また、図5の結果から、HPTS水溶液のpHの変化率は、レーザー光の照射強度に比例して増加し、照射強度が50mW以上のレーザー光を照射することによって、抗原抗体複合物から抗原を解離できるpH変化が得られることがわかった。

[0027] 続いて、HPTS溶液のレーザー光照射によるpH制御能の再現性を検証した。 1 mmol/L のHPTS（30080、Cayman Chemical Company製）水溶液1mLを、pHメーター（PAL-pH、株式会社アタゴ製）の検出部に加えた。検出部のHPTS溶液に対して、405nmレーザー（D405C-300-11、京セラSOC株式会社製）の照射（出力50mW）及び停止を繰り返してpH変化を測定した。その

結果を図6に示す。図6から、レーザー光照射によって、HPTSから H^+ の解離（脱プロトン化）が生じてpHが低下し、レーザー光照射を止めると速やかに元の分子構造に戻ることでpHが上昇することが確認された。即ち、光励起のON/OFFに伴う H^+ の放出／吸収が起こっていることが示された。

[0028] （診断方法）

本発明の診断方法は、マーカー複合物濃度測定工程と、マーカー解離工程とを含み、更に必要に応じてその他の工程を含む。

[0029] ＜マーカー複合物濃度測定工程＞

マーカー複合物濃度測定工程は、基材上に、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記検査試料中のマーカーと前記抗マーカー抗体とが結合したマーカー複合物の濃度を測定する工程である。

[0030] 前記マーカーとしては、特に制限はなく目的に応じて適宜選択することができ、例えば、心疾患マーカー、サイトカイン類（IL-1 β 、IL-6、IL-4、INF γ 、TNF等）、タンパク質類（ゾヌリン（Zonulin）、LBP（リポ多糖結合タンパク質）等）などが挙げられる。これらの中でも、心疾患マーカーであることが好ましい。

[0031] ー心疾患マーカーー

心疾患マーカーとしては、例えば、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント（NT-proBNP）、トロポニンT（TnT）、ミオグロビン、CK-MB等の生化学的心筋マーカー、心臓型脂肪酸結合蛋白などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

これらの中でも、BNPとNT-proBNPは心不全のマーカー、トロポニンは心筋梗塞のマーカーとして認知されており、初期診断で検査する項目であり、心疾患特異性が高く、最も重要な心疾患の診断情報となりうるものである。

[0032] 前記BNPと前記NT-proBNPの生成は、同じBNP遺伝子に由来する。BNP遺伝子からは転写・翻訳後、BNP前駆体（proBNP [1-108]）が生成される。その後、生理的に非活性のNT-proBNP（proBNPのN端から76個のアミノ酸 [1-76]）と生理活性を有する成熟型BNP（残りの32個のアミノ酸 [77-108]）に切断される。即ち、BNPとNT-proBNPは、心筋から等モルで分泌される。

前記BNPと前記NT-proBNPは、主として心室における壁応力（進展ストレス）に応じて遺伝子発現が亢進し、速やかに生成・分泌される。したがって、壁応力が増大する心不全では、その重症度に応じて前記BNPと前記NT-proBNPの血中濃度が増加する。

[0033] 前記抗マーカー抗体としては、特に制限はなく目的に応じて適宜選択することができ、例えば、抗心疾患マーカー抗体、サイトカイン（IL-1 β 、IL-6、IL-4、INF γ 、TNF等）を抗原とする抗体、タンパク質（ゾヌリン（Zonulin）、LBP（リポ多糖結合タンパク質）等）を抗原とする抗体などが挙げられる。これらの中でも、抗心疾患マーカー抗体であることが好ましい。

[0034] ー抗心疾患マーカー抗体ー

抗心疾患マーカー抗体としては、心疾患マーカーと特異的に結合する、免疫グロブリン分子自体の他、パパイシンやペプシン等の蛋白質分解酵素、或いは化学的分解により生じるFab、F(ab')₂フラグメント等の分解産物も包含される。また、前記抗心疾患マーカー抗体は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のどちらを用いても構わない。前記抗心疾患マーカー抗体の取得方法も通常使用される方法を用いることができる。

例えば、心疾患マーカーがBNPである場合には抗BNPモノクローナル抗体が用いられる。また、心疾患マーカーがNT-proBNPである場合には抗NT-proBNPモノクローナル抗体が用いられる。

[0035] ー基材ー

基材としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、

上記抗体再生方法と同様な基材を用いることができる。これらの中でも、基材として振動体を用いることが、振動体の共振周波数を測定することによってマーカーの濃度を測定できる点から好ましい。

[0036] ー光酸ー

光酸としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、上記抗体再生方法と同様な光酸を用いることができる。これらの中でも、酸強度が大きい点及び可視光領域の蛍光スペクトルを有する点から、光酸として8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸（HP TS）を用いることが好ましい。

[0037] ここで、基材としての振動体表面に、抗心疾患マーカー抗体としての抗BNP抗体及び光酸としてのHP TSを固相化する方法について説明する。

振動体の表面に金属薄膜を形成し、この金属薄膜上に分子層オーダーの分子膜をスパッタ法等により形成し、この分子膜に抗体を修飾することにより振動体に抗体を固定することができる。前記金属薄膜としては、密着層と密着層上に形成される白金（Pt）膜を用いることができる。前記密着層としては、例えば、Ti、Crなどが挙げられる。前記分子層オーダーの分子膜としては、自己組織化単分子膜（以下、「SAM膜」と称することがある）を用いることができる。

具体的には、振動体（水晶板）の一面に、チタン（Ti）と白金（Pt）を、スパッタ法により500 Åに成膜する。白金（Pt）膜表面に抗BNP抗体を固相化するには、SAM膜を形成し、SAM膜に抗BNP抗体を修飾する。SAM膜と抗BNP抗体の結合には、アミンカップリング法を用いることができる。

以上により、図8の（a）に示すように振動体11の表面に、抗BNP抗体を固相化する。

[0038] 次に、図7に示すように、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウムの4つの基（3つのSO₃Naと1つのOH）のうち、OHをアセチル基で保護しておき、3つのSO₃Naの1つをClに置換し、図

8の(c)に示すように、振動体11表面のNH₂-末端に8-アセトキシ-ピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウムを固相化する。

[0039] ー前処理（官能基の置換）ー

図7に示す反応式により、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウムの官能基を置換して8-アセトキシピレン-1, 3, 6-トリスルホンクロリドとする前処理をする。

まず、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウム（20g、0.038mol）をNaOH（2.4g、0.06mol）の水（30mL）に溶解し、約0℃に冷却する。

次に、無水酢酸（5g、4.8mL、0.48mol）を溶液に滴下し、反応混合物を2時間攪拌する。

次に、エタノール（20mL）を添加して沈殿を完了させ、沈殿物を濾過によって回収し、エタノール（3×10mL）で洗浄し、減圧下で24時間乾燥させて、黄色の固体である8-アセトキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウム（17g、収率80%）を得る。

次に、8-アセトキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウム（5g、0.0088mol）とトルエン（150mL）の混合物を、自動水分離器（ディーンスタークトラップ）と冷却器を備えた0.25リットルの丸底フラスコに入れる。

次に、混合物を2時間加熱還流して、反応混合物を乾燥させる。

次に、乾燥した反応混合物を60℃に冷却し、塩化オキサリル（6mL）及びN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）（2滴）を添加する。混合物を加熱する。加熱した混合物を8時間加熱還流し、トルエンと過剰の塩化オキサリル（30mL）の混合物を蒸留する。

次に、塩化ナトリウムの沈殿物を濾取し、濾液から溶媒を減圧下で除去する。

次に、固体残留物を真空中で24時間乾燥させて、8-アセトキシピレン-1, 3, 6-トリスルホンクロリド（4g）を得る（収率81.5%

）。

[0040] ー振動体表面への固相化ー

図8の（a）に示すように抗BNP抗体を固相化した振動体11を、上記前処理で得た8-アセトキシピレン-1, 3, 6-トリスルホンクロリドとピリジンの混合液中で24時間インキュベーションした後、フェノール官能基の飽和炭酸水素ナトリウム溶液へ曝露する。

以上により、図8の（c）に示すように、振動体11の表面に抗BNP抗体及び8-アセトキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸三ナトリウムを固相化することができる。

[0041] ーマーカー複合物の濃度測定ー

検査試料中のマーカーと抗マーカー抗体とが結合したマーカー複合物の濃度を測定方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法、イムノクロマト法、表面プラズモン共鳴法、磁気ビーズ法、一定周波数で振動している振動体に心疾患マーカーが付着した際の質量変化に伴う共振周波数を検出する共振型質量センサを用いる方法などが挙げられる。これらの中でも、試薬及び解離液の補充が不要であり、デバイスの小型化が図れ、光酸に光を照射するだけで抗マーカー抗体の再生が可能となり、抗マーカー抗体を繰り返し使用でき、時系列的なモニタリングを実現できる点から、共振型質量センサを用いる方法が好ましい。

共振型質量センサを用いる方法としては、例えば、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸が固相化された振動体が検査試料に供されると、検査試料中のマーカーが抗マーカー抗体に捕捉され、振動体の質量が増加し、振動体の共振周波数が低下する。その結果、共振周波数の変化割合から検査試料中のマーカーの濃度を測定することができる。

[0042] <マーカー解離工程>

マーカー解離工程は、光酸に光を照射してマーカー複合物からマーカーを解離させる工程である。

本発明の診断方法では、検査試料に含まれるマーカの濃度の測定が終了した後、光酸に光を照射してマーカと前記抗マーカ抗体とが結合したマーカ複合物からマーカを解離させることにより、抗マーカ抗体を再生することができる。

前記光は、レーザー光であることが好ましい。レーザー光を光酸に照射することにより、光酸から水素イオンが放出され、液体の検査試料のpHが低下することによってマーカ複合物からマーカを解離させ、抗マーカ抗体を再生することができる。

[0043] 本発明においては、抗マーカ抗体を再生し、間隔をあけてマーカ複合物の濃度を繰り返し測定することにより、マーカの時系列的なモニタリングを実現することができる。

[0044] <その他の工程>

その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、洗浄工程、制御工程などが挙げられる。

[0045] ここで、図9の(a)～(d)は、診断方法の原理を示す模式図である。図9の(a)に示すように、振動体11上に測定対象であるマーカと特異的に結合する抗マーカ抗体14の近傍に光酸3を固相化し、検査試料2を供する。すると、図9の(b)に示すように、検査試料中のマーカ15が抗マーカ抗体14と抗原抗体反応し、マーカ複合物16が形成される。次に、図9の(c)に示すように、検査試料中のマーカ15が抗マーカ抗体14によって捕捉され、振動体11の質量が増加する。その結果、振動体11の共振周波数が低下し、共振周波数の変化割合から検査試料中のマーカの濃度を測定することができる。振動体11の共振周波数の変化は、レーザー変位計を用いて測定することができる。

次に、図9の(d)に示すように、光酸3に対して特定波長の光を照射することにより検査試料2のpHが変化し、マーカ複合物16からマーカ15が解離する。その後、検査試料2を廃液すると、図9の(a)に示すように抗マーカ抗体14を再生することができ、繰り返し使用できる。

[0046] 本発明の診断方法は、上述した通り、検査試料に含まれるマーカーの定量方法、及び検査試料に含まれるマーカーの評価方法を含む。

[0047] (診断装置)

本発明の診断装置は、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を表面に配した振動体と、前記振動体の共振周波数を検出する検出部と、前記光酸に光を照射する光照射部とを有し、更に必要に応じてその他の手段を有する。

[0048] <振動体>

マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を表面に配しており、圧電結晶などを用いることができる。圧電結晶は、歪みを与えると電気的な応答を示し、逆に、電圧を加えると歪みが生じる性質を持つ材料であり、例えば、水晶、チタン酸バリウム、チタン酸鉛、チタン酸ジルコン酸鉛（PZT）、ニオブ酸カリウム、ニオブ酸リチウム、タングステン酸ナトリウム、タンタル酸リチウムなどが挙げられる。

振動体表面に、抗マーカー抗体及び光酸を配する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、上記診断方法と同様の方法により行うことができる。

[0049] 前記振動体は振動子上に載置され、前記振動体と前記振動子が機械的に結合されておらず、かつ前記振動体がいずれの部材にも機械的に結合されていないことが好ましい。これにより、給電や固定による共振現象の阻害がなく、振動体の形状寸法の設計の制約を無くすことができ、質量変化を高感度で測定できる点から好ましい。

[0050] <検出部>

検出部は、振動体の共振周波数を検出する手段であり、発光素子と受光素子からなる光学的な検出手段を使用することができる。前記光学的な検出手段は、振動体の周波数、変位、速度、及び加速度のいずれかを測定してもよい。

前記検出部としては、レーザー変位計などを用いることができる。前記レ

ーザー変位計によれば、振動体の共振周波数の変化を非接触で計測することができる。

[0051] <光照射部>

光照射部は、光酸に光を照射する手段であり、レーザー光照射部であることが好ましい。レーザー光照射部は、例えば、レーザー光源と、拡散レンズと、電源とを有する。

[0052] <その他の手段>

その他の手段としては、例えば、入力手段、記録手段、表示手段、通信手段、メンテナンス手段などが挙げられる。

[0053] ここで、図10は、診断装置の一例を示す概略図である。この図10の診断装置10は、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体14及び光酸3を表面に配した振動体11と、振動体11の共振周波数を検出する検出部12と、光酸3に光を照射する光照射部13と、振動体11を駆動する電源17とを有する。

[0054] 振動体11としては、特に制限はなく、振動体単独で用いることができるが、振動体11を振動子上に載置して用いることが好ましい。この場合、振動体11と振動子は機械的に結合されておらず、かつ振動体11はいずれの部材にも機械的に結合されていない、つまり、振動体11はどこにも固定化されていない構造を有していることが、給電や固定による共振現象の阻害がなく、振動体11の形状寸法の設計の制約を無くすことができ、質量変化を高感度で測定できる点から好ましい。

[0055] 振動体11は、共振現象に最適な形状寸法に加工されている。振動体11は、圧電素子などの振動子の上に非拘束状態で載置されており、圧電素子が任意の周波数で振動すると、振動体11が、振動体11自身の共振周波数で振動できる構造になっている。圧電素子に梁状の振動体の固有周波数付近の交流電圧を印加すると、振動体は自らの固有の共振周波数で共振する。このようにすれば、振動体は材質や形状寸法に何ら制約を受けることが無くなるので、設計の自由度は飛躍的に改善できる。

[0056] 振動体 11 の振動モードは、定在波型超音波モータのように、ある一定の方向へ移動するような 1 軸振動等の振動モードとならないように設定される。つまり、振動体 11 の振動モードは、ある一定の方向へ移動するような振動モードではなく、かつ、その振幅もナノメートル（nm）オーダーと小さいので、振動体 11 が振動子の上から脱離することはない。

なお、前記振動体及び前記振動子を有する共振型質量センサの詳細については、例えば、特許第 6086347 号公報の記載を参照することができる。

[0057] マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体 14 及び光酸 3 が、固相化された振動体 11 が検査試料に供されると、検査試料中のマーカー 15 が抗マーカー抗体 14 に捕捉され、振動体 11 の質量が増加する。その結果、振動体 11 の共振周波数が低下し、共振周波数の変化割合から検査試料中のマーカー 15 の濃度を測定することができる。振動体 11 の共振周波数の変化は、検出部 12 により検知される。検出部 12 は、振動体 11 の共振周波数の計測手段としてレーザー変位計を用いている。

次に、検査試料に含まれるマーカー 15 の濃度の測定が終了すると、光酸 3 に光照射部 13 からレーザー光を照射する。すると、光酸から放出される水素イオンによって検査試料の pH が低下し、マーカー複合物 16 からマーカー 15 が解離し、抗マーカー抗体 14 を再生することができる。

[0058] 市販のポータブル式・卓上式等のスタンドアロン型心疾患診断装置は、小規模な医療機関での初期診断には非常に有用であるが、即時性のある情報取得（POCT）では専門医師が常駐している施設で行われているのが一般的であり、ポータブル式・卓上式の心疾患診断装置の普及は限定的である。

また、心疾患マーカーとしての BNP 濃度の測定は、図 11 に示すように、生体装着型の心疾患診断装置を用い、間隔をあけて繰り返し時系列的に測定しないと、BNP の高値及び低値が見過ごされてしまい、正常と判断され、心疾患の診断を誤ってしまうリスクがある。

図 12 の（a）は、心疾患マーカーを迅速に、その場で、繰り返し計測で

きる生体装着型の心疾患診断装置の一例を示す概略図である。この生体装着型の心疾患診断装置 22 は、患者の手首に装着することにより、BNP 濃度を、間隔をあけて繰り返し測定することができる。そして、生体装着型の心疾患診断装置 22 で測定した BNP 濃度をスマートフォン 21 に随時送信することにより、図 12 の (b) に示すように、BNP 濃度を時系列的に表示することができるので、心疾患の診断を正確かつ迅速に行うことが可能となる。

[0059] 本発明の診断方法及び診断装置によると、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体の近傍に光酸を配し、前記光酸に光を照射することによって、マーカー複合物からマーカーを解離させることができ、物理刺激だけで抗マーカー抗体の再利用が可能となり、抗マーカー抗体を繰り返し使用することができるので、マーカーの時系列的なモニタリングを実現することができる。

実施例

[0060] 以下、本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0061] (実施例 1)

光酸 (HPTS) への光照射による心疾患マーカー複合物からの心疾患マーカー (BNP) の解離を実験により実証すると共に、HPTS 濃度の変化による BNP の解離度の影響を評価した。

[0062] まず、図 13 の (a) に示すように、抗 BNP 抗体 (14) (4BNP2cc-50E1cc、HyTest Ltd. 製) を基材 (1) としてのマイクロプレート (SpectraPlate-384 HB、Perkin Elmer Inc. 製) のウェルに自己組織化単分子膜を用いる方法により固相化後、表 1 に示す条件に基づき、心疾患マーカーとしての BNP (15) (ナノピア (登録商標) BNP 用 BNP コントロール、積水メディカル株式会社製) を添加し、1 時間インキュベートし、心疾患マーカー複合物 (16) を形成させた。

[0063] 次に、マイクロプレートを洗浄した後、図13の(b)に示すように、酵素標識された検出抗体(7)(4BNP2cc-24C5cc、HyTest Ltd. 製)を添加し、1時間インキュベートし、抗BNP抗体(14)、BNP(15)、及び酵素標識された検出抗体(7)の順でマイクロプレートのウェルに結合させた(図13の(c)参照)。

[0064] HPTS(30080、Cayman Chemical Company 製)を蒸留水に溶解し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \sim 7.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ のHPTS水溶液を調製した(表1参照)。

次に、マイクロプレートを洗浄した後、図13の(d)に示すように、上記所定の濃度に調製したHPTS水溶液を添加し、30分間レーザー光照射することによりHPTS水溶液のpHが低下し、抗BNP抗体(14)からBNP(15)及び酵素標識された検出抗体(7)が解離した。

図14は、マイクロプレートへのレーザー光の照射方法を示した。レーザー照射装置(33)(D405C-300-11-1C-11、京セラSOC株式会社製)により波長405nmのレーザー光を $f=10$ 拡散レンズ(32)(AL1210M-A、Thorlabs Inc. 製)に通し、マイクロプレート(31)の底面に拡散したレーザー光を照射した。 $f=10$ 拡散レンズ(32)とマイクロプレート(31)の距離を変更することにより、レーザー光が照射されるマイクロプレート(31)のウェルの数を調節することができる。図14中34は出力可変電源である。本実施例では、10ウェルへのレーザー光照射を行うために、 $f=10$ 拡散レンズ32とマイクロプレート31の距離を200mmとした(照射直径40mm)。

[0065] 次に、図13の(e)に示すように、レーザー光を照射後の各ウェルに検出抗体(7)に標識した酵素に反応し発色するTMB溶液(8a)(E102、Bethyl Laboratories, Inc. 製)を添加し、1時間インキュベートした。

[0066] 次に、図13の(f)に示すように、発色したTMB溶液(8b)の吸光度をプレートリーダー(Wallac 1420、PerkinElmer

Inc. 製)で計測し、BNP解離の割合を測定した(計測波長355nm)。結果を表2及び図15に示した。なお、TMB溶液の吸光度が高いほどBNPの結合量が多く、吸光度が低いほどBNPが解離しBNPの結合量が少ないことを示す。

[0067] [表1]

BNP標準液 (ナノピア(登録商標)BNP用BNPコントロール)	386pg/mL~578pg/mL
液量	10μL
レーザー照射波長	405nm
レーザー照射強度	3mW(照射表面:0.24mW/cm ²)
レーザー照射時間	30分
HPTS水溶液濃度(評価サンプル)	1.0×10 ⁻³ mol/L
	3.0×10 ⁻³ mol/L
	5.0×10 ⁻³ mol/L
	7.0×10 ⁻³ mol/L

[0068] (比較例1)

実施例1において、HPTS水溶液を添加した後、レーザー光を照射しなかった以外は、実施例1と同様にして、BNP解離の割合を測定した。結果を表2及び図15に示した。

[0069] [表2]

	比較例1	実施例1
HPTS濃度(mol/L)	吸光度	吸光度
0	0.750	0.807
0.001	0.709	0.659
0.003	0.599	0.553
0.005	0.718	0.543
0.007	0.694	0.570

[0070] 表2及び図15の結果から、HPTS水溶液を添加した後、レーザー光を照射した実施例1は、HPTS水溶液の濃度上昇に伴い、吸光度が低下している。これは、HPTS水溶液にレーザー光を照射した際に水素イオン(H⁺)が放出されHPTS水溶液のpHが低下し、その結果、BNPの解離が起

こっていることを示している。

これに対して、HPTS水溶液を添加した後、レーザー光を照射しなかった比較例1は、HPTS水溶液の濃度上昇に伴う吸光度の変化は観察されなかった。これは、HPTS水溶液のみでは抗原抗体反応に影響を与えないことを示している。

[0071] (実施例2)

心疾患の診断方法を実証するために、BNP分析用センサを構成し、BNP濃度変化による発光強度の影響を評価した。

(1) Auメッシュ基材の作製

ステンレスメッシュ(SUS304、線径160 μ m、メッシュ粗さ30メッシュ、E9107、株式会社久宝金属製作所製)を直径6mmの円状に切り取り、スパッタリング装置(MSP-20UM、株式会社真空デバイス製)を用いて膜厚100nmの金薄膜を形成して、Auメッシュ基材を得た(図16A参照)。

このようなメッシュ形状を有する基材を用いると、基材表側だけでなく裏側に固相化されたHPTSにも光照射による光が到達するため、センサ性能を向上させることができる。また、発光素子と受光素子とからなる光学的な信号検出部を裏側に設置することもできる。なお、Au薄膜の形成方法は、蒸着に限定されるものではなく、メッキ等の方法を用いてもよい。

[0072] (2) BNP抗体の固相化

作製したAuメッシュ基材をピラニア溶液でタンパク洗浄後、エタノールで溶解した10mmol/Lの6-Amino-1-hexanethiol(A425、株式会社同仁化学研究所製)に25℃で16時間浸漬し、自己組織化単分子(SAM)膜を形成した。その後、pH7.8の緩衝液(Phosphate buffered saline、PBS)で溶解した100mmol/Lのbis(sulfosuccinimidyl)suberate(BS3、品番B574、株式会社同仁化学研究所製)溶液に30分間浸漬し、SAM膜を活性化した。さらに、pH7.8のPBSで溶

解した $10 \mu\text{mol/L}$ の BNP キャプチャー抗体 (4BNP2cc-50E1cc, HyTest, Ltd.) 溶液に 30 分間浸漬し、抗体をメッシュ表面に固相化した。ブロッキング処理として、 $\text{pH} 7.8$ の PBS で溶解したエタノールアミン (012-12455、富士フイルム和光純薬株式会社製) 溶液に 60 分間浸漬し、その後ブロッキング剤であるスキムミルク溶液 (UKB80、株式会社ケー・エー・シー製) に 120 分間浸漬した。

[0073] (3) BNP 濃度測定工程

0 pg/mL 、 1 pg/mL 、及び 100 pg/mL の BNP 標準液 (ナノピア (登録商標) BNP 用 BNP コントロール、積水メディカル株式会社製) に抗体を固相化したメッシュを 30 分間浸漬し、洗浄液で洗浄後、ALP で標識した BNP 検出抗体 (4BNP2cc-24C5cc, HyTest, Ltd.) に 30 分間浸漬した (図 16B 参照)。メッシュを洗浄後、ホルダーに移し、発光基質 (Chemiluminescent AP Microwell, SurModics 社製) を $50 \mu\text{L}$ 加え、光電子増倍管とカウンティングユニットからなる検出器で 900 秒間、発光強度を測定した。結果を図 17 に示した。

[0074] 図 17 の結果から、このようなセンサ構成・工程とすれば、BNP 濃度に依存して検出信号が増大し、BNP センサとして機能することが示された。

[0075] 本国際出願は 2022 年 11 月 11 日に出的した日本国特許出願 2022-180727 号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願 2022-180727 号の全内容を本国際出願に援用する。

符号の説明

[0076]	1	基材
	2	検査試料
	3	光酸
	4	抗体
	5	抗原
	6	抗原抗体複合物

7	酵素標識された検出抗体
8 a	T M B
8 b	発色した T M B
1 0	心疾患診断装置
1 1	振動体
1 2	検出部
1 3	光照射部
1 4	抗マーカー抗体
1 5	マーカー
1 6	マーカー複合物
1 7	電源
2 0	生体装着型の心疾患診断装置
2 1	スマートフォン
3 1	マイクロプレート
3 2	拡散レンズ
3 3	レーザー照射装置
3 4	出力可変電源

請求の範囲

- [請求項1] 基材上に、マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記検査試料中のマーカーと前記抗マーカー抗体とが結合したマーカー複合物の濃度を測定するマーカー複合物濃度測定工程と、
前記光酸に光を照射して前記マーカー複合物から前記マーカーを解離させるマーカー解離工程と、
を含むことを特徴とする診断方法。
- [請求項2] 間隔をあけて前記マーカー複合物の濃度を繰り返し測定する、請求項1に記載の診断方法。
- [請求項3] 前記基材が、振動体である、請求項1又は2に記載の診断方法。
- [請求項4] 前記光が、レーザー光である、請求項1から3のいずれかに記載の診断方法。
- [請求項5] 前記マーカーが、心疾患マーカーであり、
前記抗マーカー抗体が、抗心疾患マーカー抗体であり、
前記心疾患マーカーが、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）及び脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント（NT-proBNP）の少なくともいずれかである、請求項1から4のいずれかに記載の診断方法。
- [請求項6] 前記光酸が、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸（HPTS）である、請求項1から5のいずれかに記載の診断方法。
- [請求項7] マーカーと特異的に結合する抗マーカー抗体及び光酸を表面に配した振動体と、
前記振動体の共振周波数を検出する検出部と、
前記光酸に光を照射する光照射部と、
を有することを特徴とする診断装置。
- [請求項8] 前記振動体が振動子上に載置され、前記振動体と前記振動子が機械的に結合されておらず、かつ前記振動体がいずれの部材にも機械的に

結合されていない、請求項 7 に記載の診断装置。

- [請求項9] 基材上に、測定対象である抗原と特異的に結合する抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記抗原と前記抗体とが結合した抗原抗体複合物を形成する抗原抗体複合物形成工程と、
- 前記光酸に光を照射して前記抗原抗体複合物から前記抗原を解離させる抗原解離工程と、
- を含むことを特徴とする抗体再生方法。

補正された請求の範囲
[2024年3月26日(26.03.2024) 国際事務局受理]

- [請求項1] （補正後）メッシュ形状の基材の両面に、マーカースと特異的に結合する抗マーカース抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記検査試料中のマーカースと前記抗マーカース抗体とが結合したマーカース複合物の濃度を測定するマーカース複合物濃度測定工程と、
- 前記光酸に光を照射して前記マーカース複合物から前記マーカースを解離させるマーカース解離工程と、
- を含むことを特徴とする診断方法。
- [請求項2] 間隔をあけて前記マーカース複合物の濃度を繰り返し測定する、請求項1に記載の診断方法。
- [請求項3] 前記基材が、振動体である、請求項1又は2に記載の診断方法。
- [請求項4] 前記光が、レーザー光である、請求項1から3のいずれかに記載の診断方法。
- [請求項5] 前記マーカースが、心疾患マーカースであり、
- 前記抗マーカース抗体が、抗心疾患マーカース抗体であり、
- 前記心疾患マーカースが、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）及び脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント（NT-proBNP）の少なくともいずれかである、請求項1から4のいずれかに記載の診断方法。
- [請求項6] 前記光酸が、8-ヒドロキシピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸（HPTS）である、請求項1から5のいずれかに記載の診断方法。
- [請求項7] （補正後）マーカースと特異的に結合する抗マーカース抗体及び光酸を両面に配した、メッシュ形状の振動体と、
- 前記振動体の共振周波数を検出する検出部と、
- 前記光酸に光を照射する光照射部と、
- を有することを特徴とする診断装置。
- [請求項8] 前記振動体が振動子上に載置され、前記振動体と前記振動子が機械的に結合されておらず、かつ前記振動体がいずれの部材にも機械的に

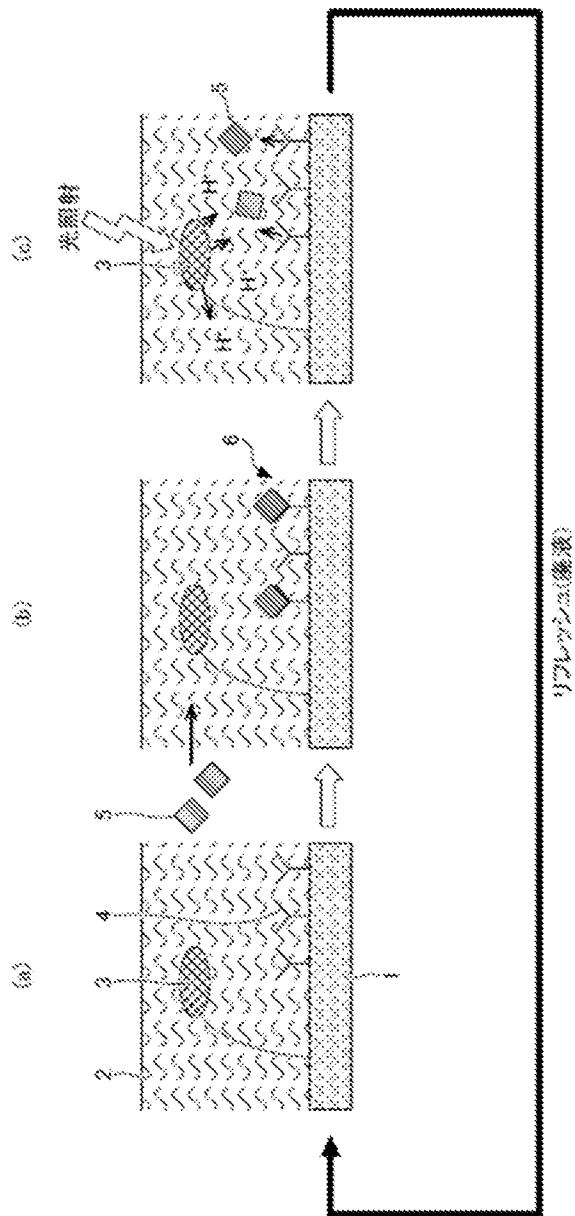
結合されていない、請求項 7 に記載の診断装置。

[請求項9] (補正後) メッシュ形状の基材の両面に、測定対象である抗原と特異的に結合する抗体及び光酸を配し、検査試料を供することにより前記抗原と前記抗体とが結合した抗原抗体複合物を形成する抗原抗体複合物形成工程と、

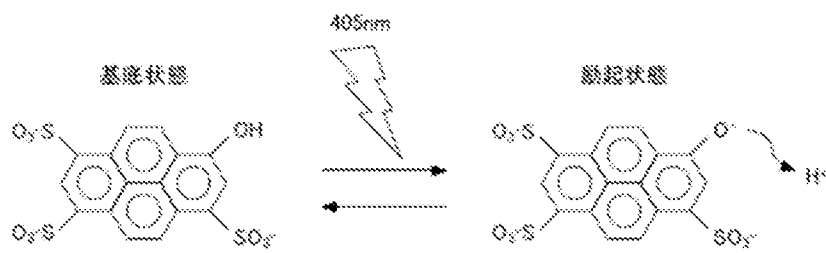
前記光酸に光を照射して前記抗原抗体複合物から前記抗原を解離させる抗原解離工程と、

を含むことを特徴とする抗体再生方法。

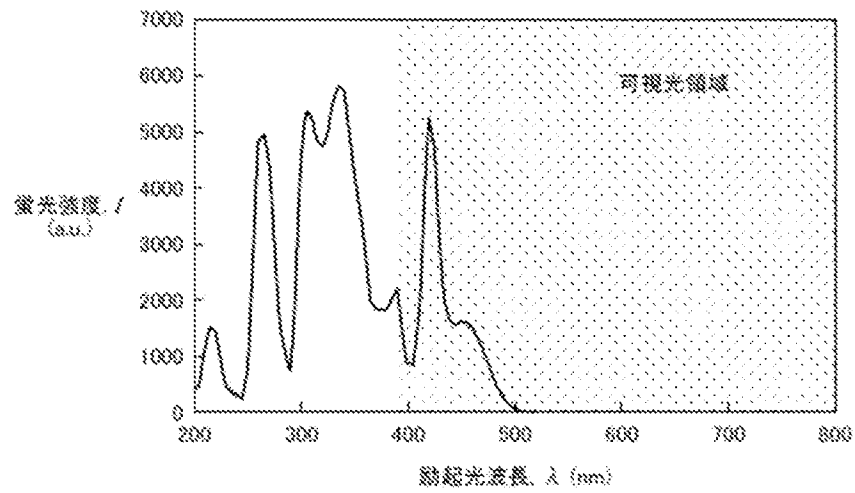
[図1]



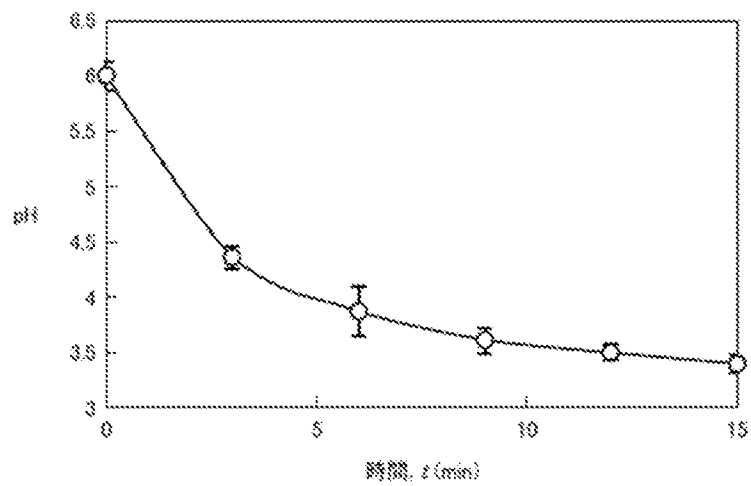
[図2]



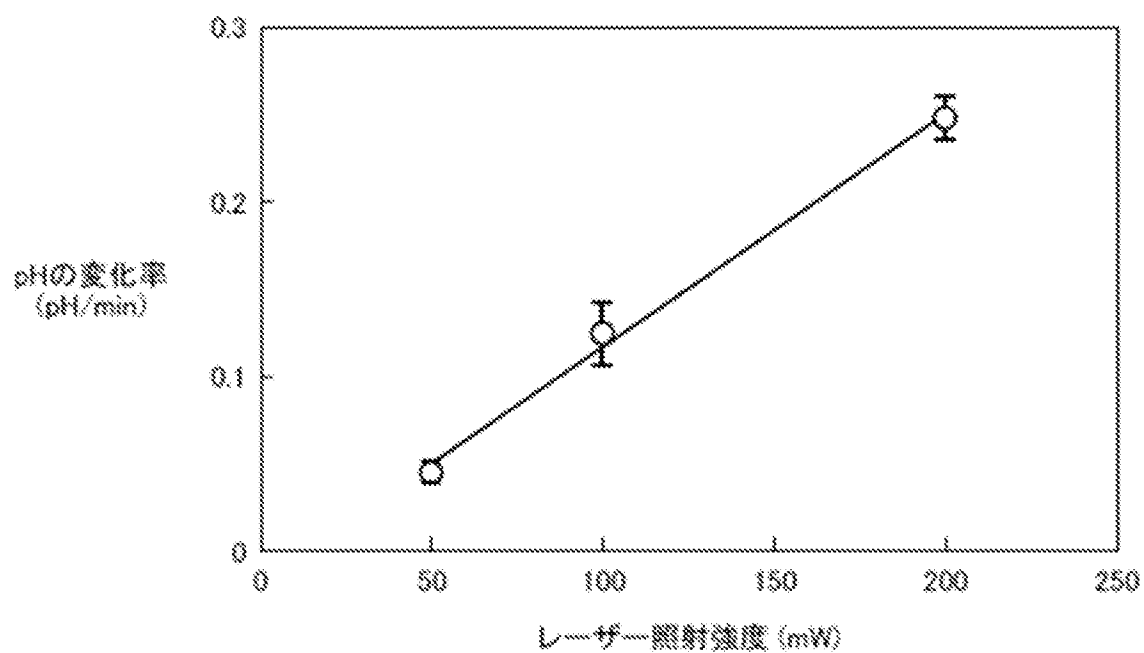
[図3]



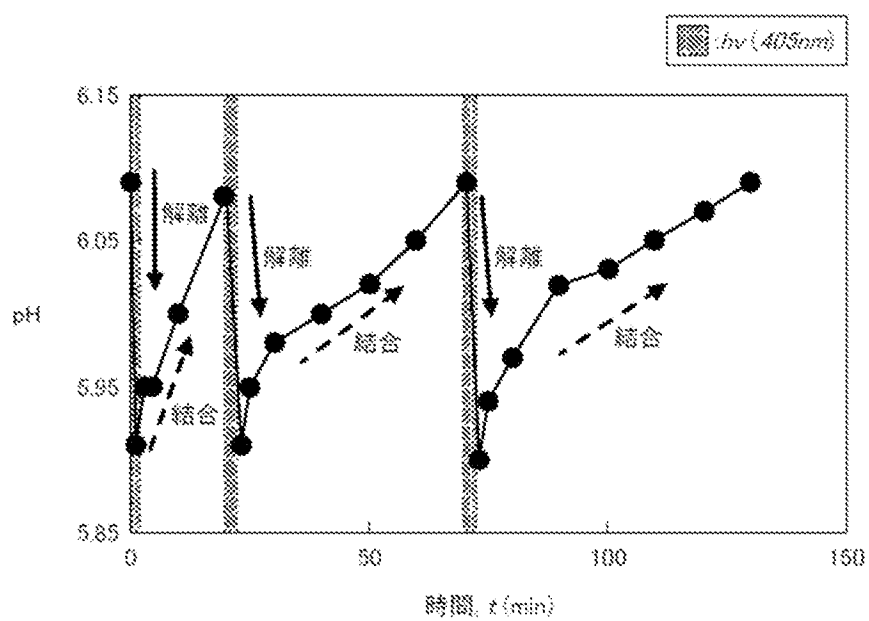
[図4]



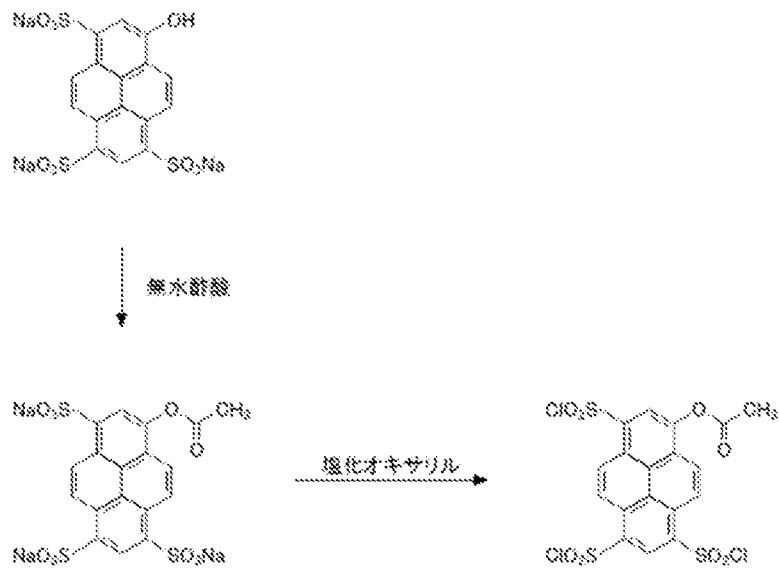
[図5]



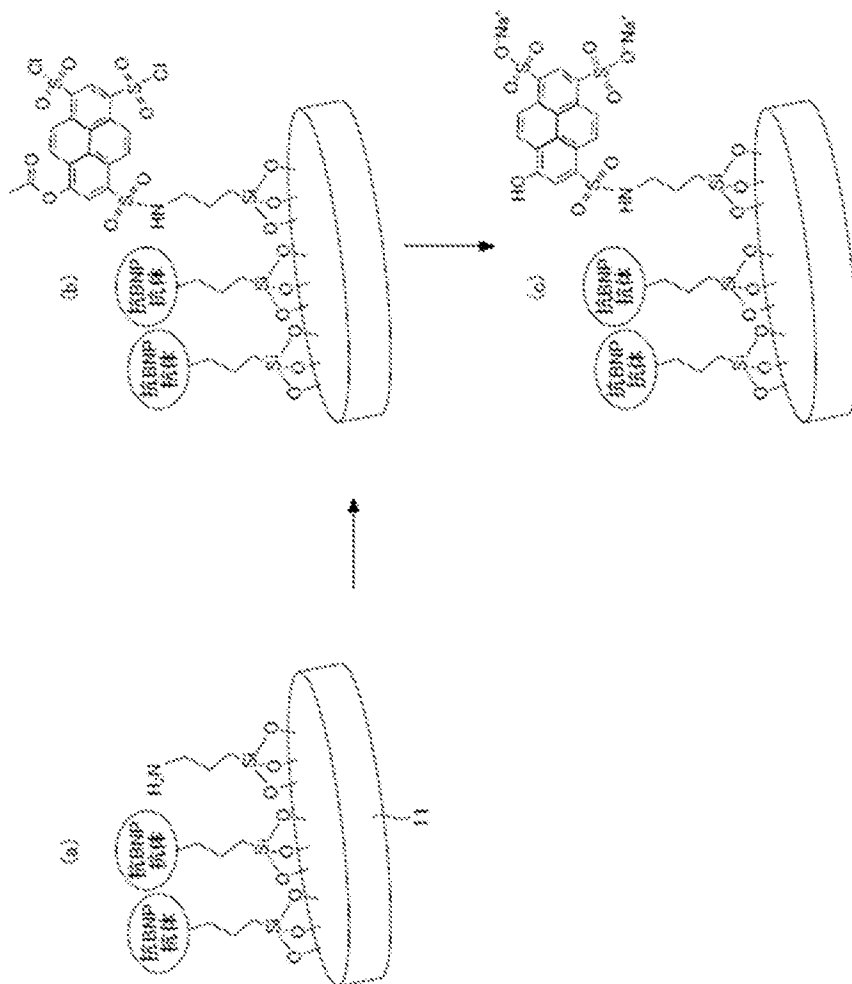
[図6]



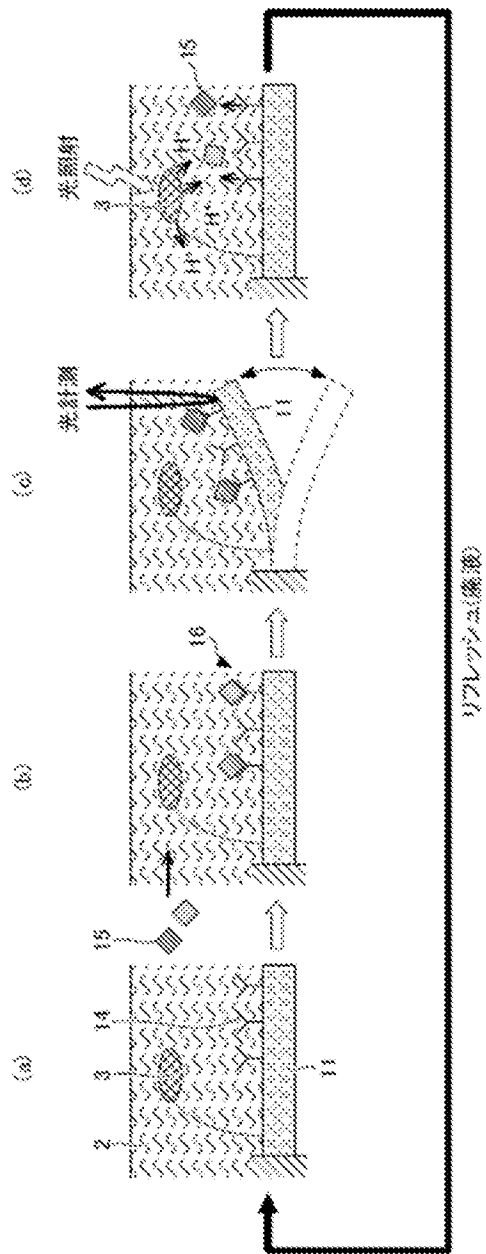
[図7]



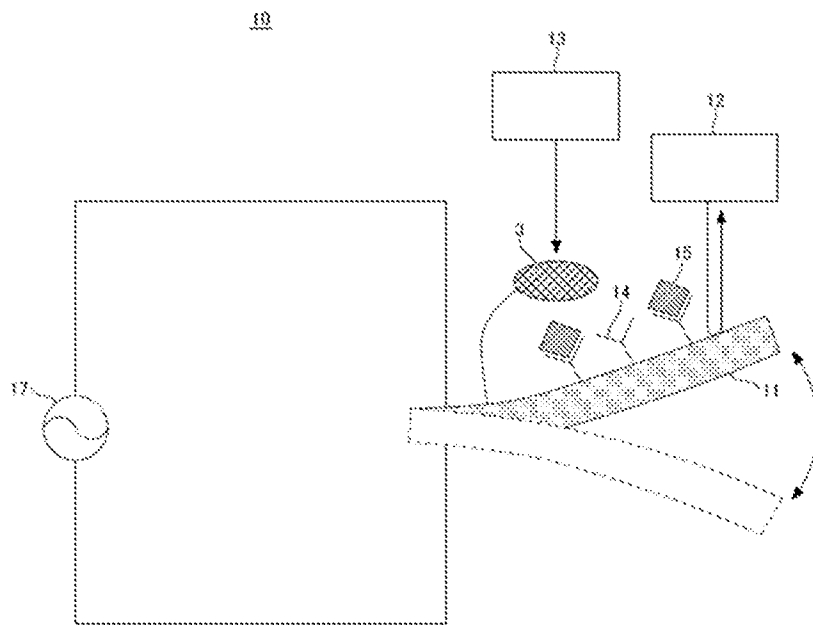
[図8]



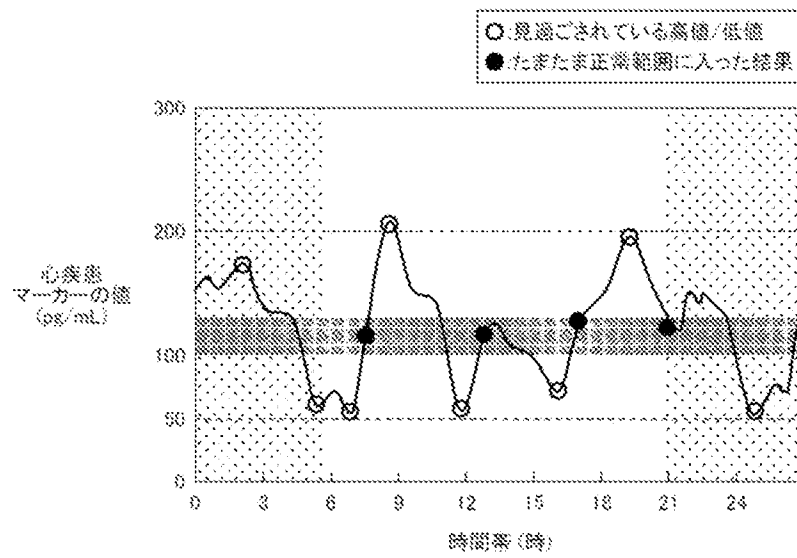
[図9]



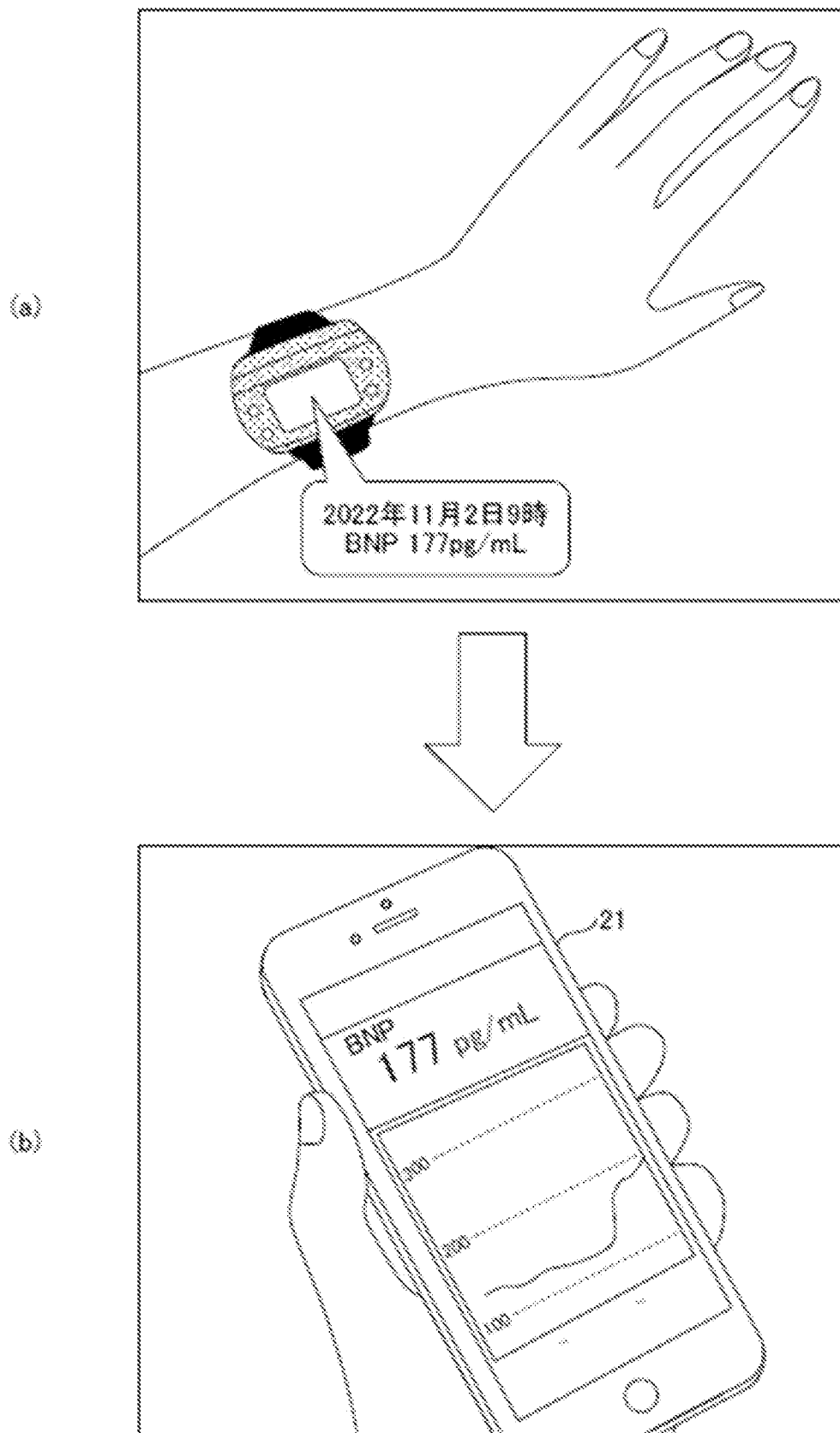
[図10]



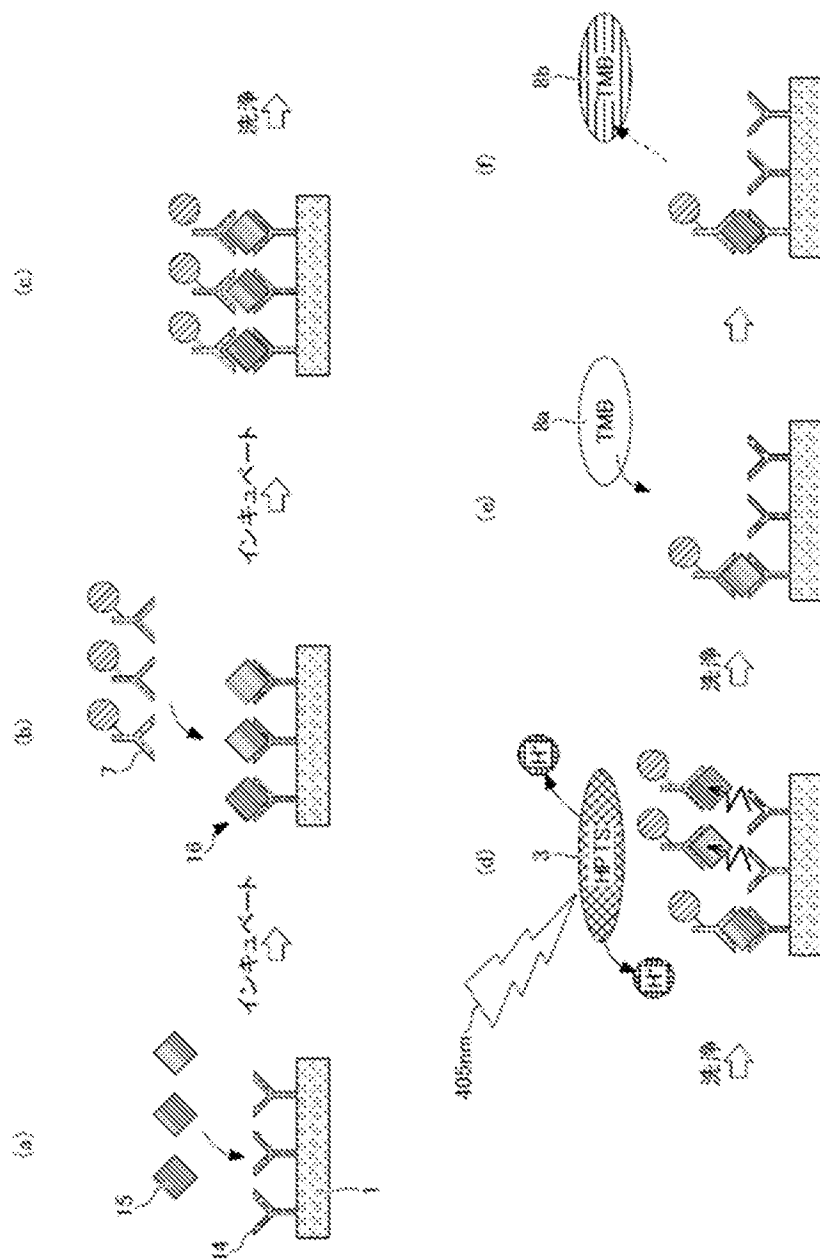
[図11]



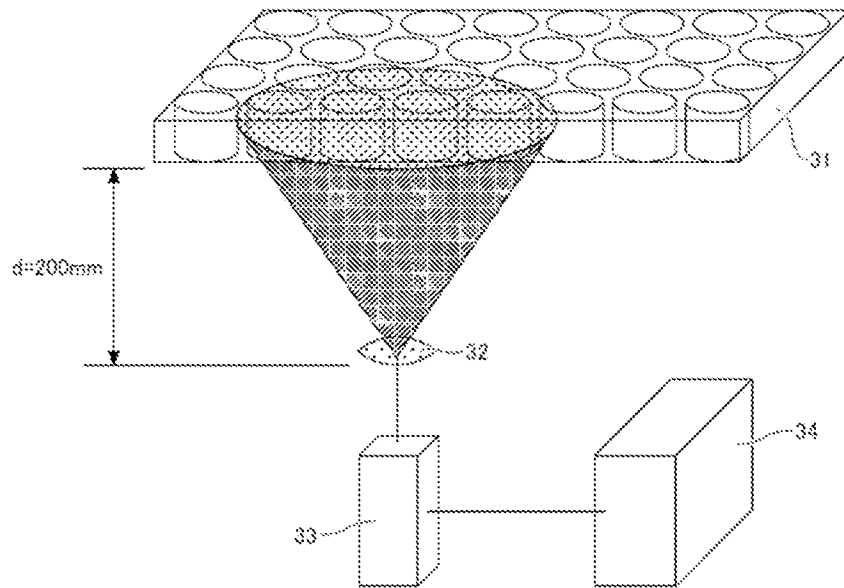
[図12]



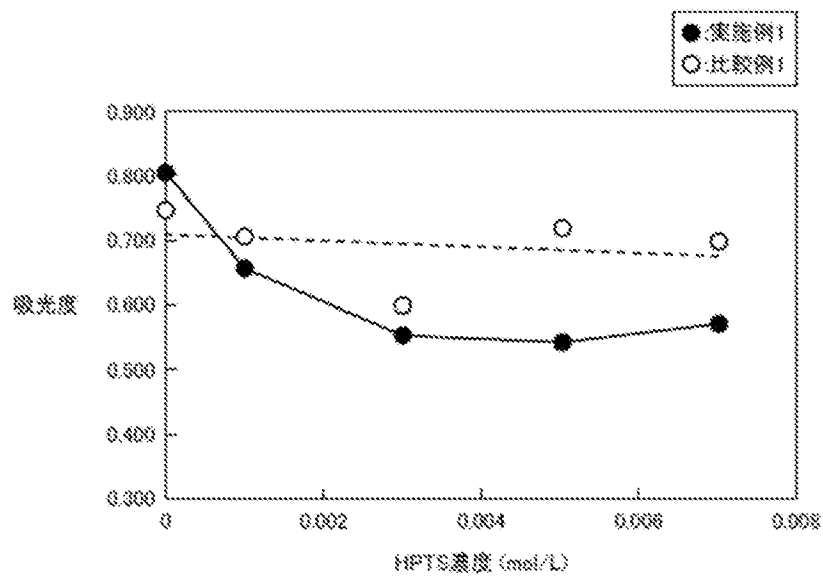
[図13]



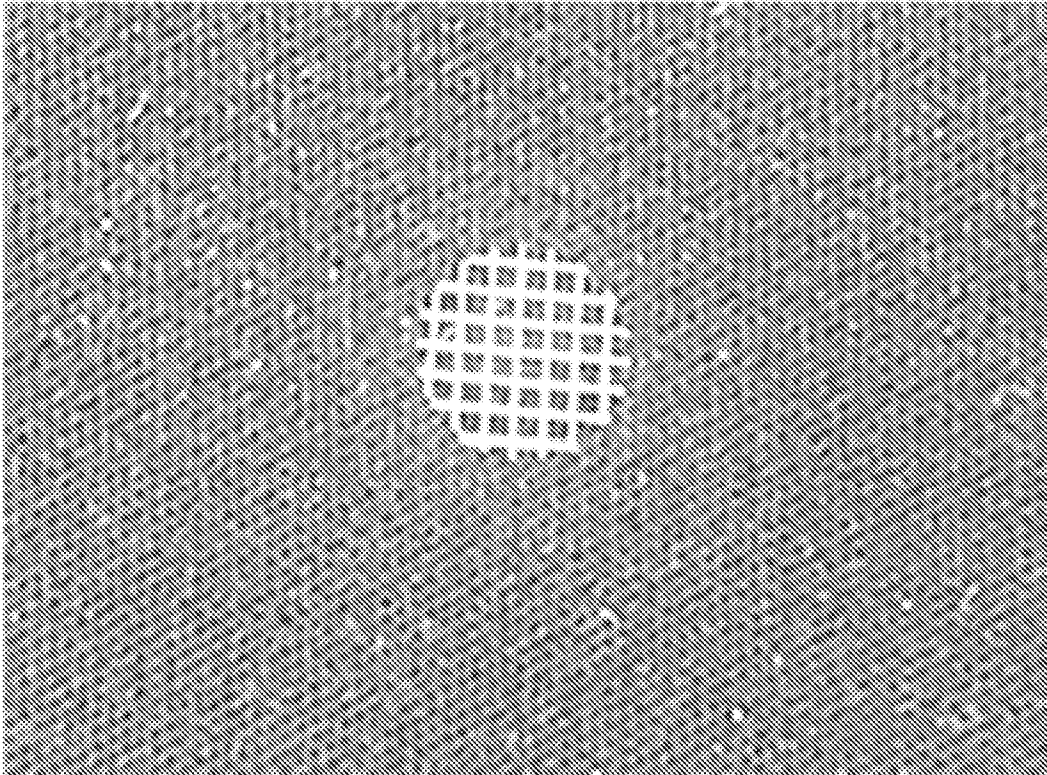
[図14]



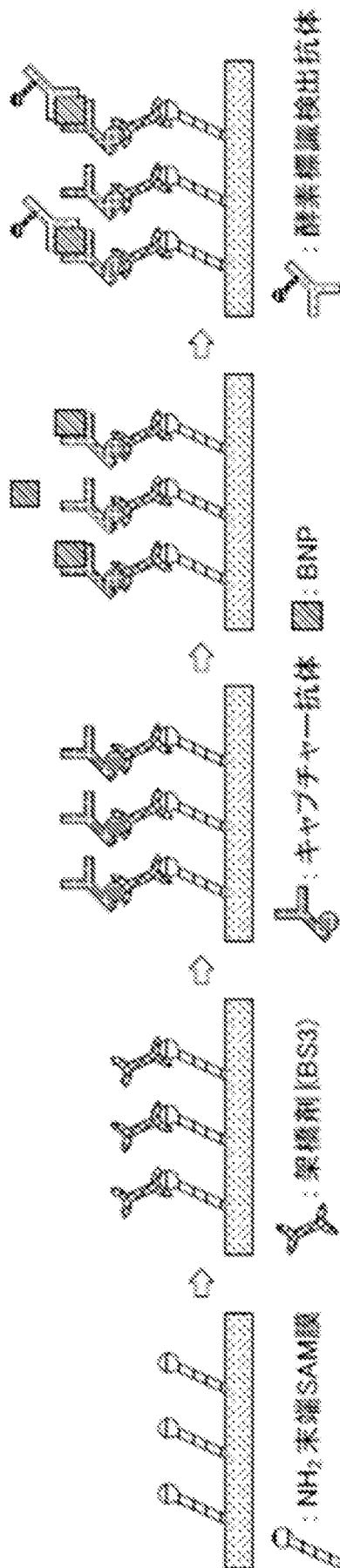
[図15]



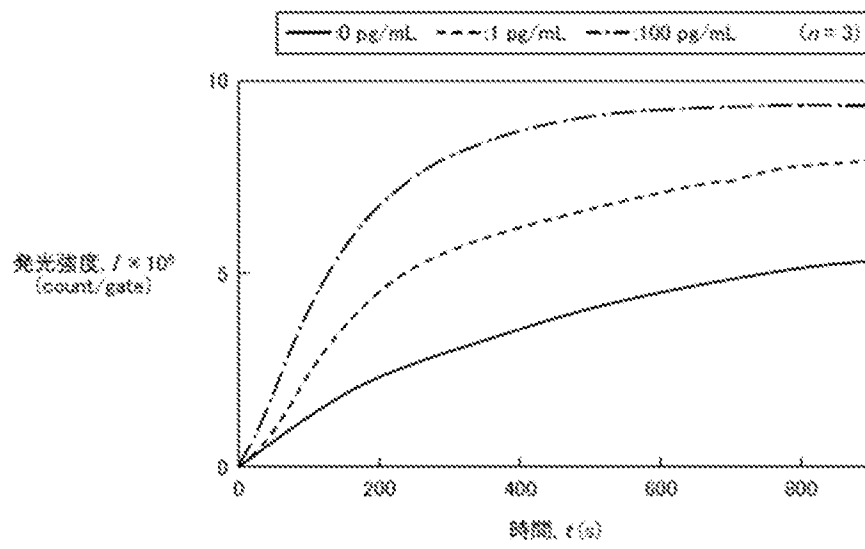
[図16A]



[図16B]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/040540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G01N 33/543**(2006.01)i; **G01N 29/02**(2006.01)i; **G01N 29/036**(2006.01)i; **G01N 33/53**(2006.01)i

FI: G01N33/543 525U; G01N33/543 525W; G01N33/53 D; G01N29/02; G01N29/036

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)

G01N33/543; G01N29/02; G01N29/036; G01N33/53

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	PERETZ-SOROKA, H. et al., Manipulating and Monitoring On-Surface Biological Reactions by Light-Triggered Local pH Alterations, NANO LETTERS, 18 June 2015, vol. 15, pp. 4758-4768, DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b 01578, Abstract, Results and Discussion, fig. 1-8 in particular, p. 4764, left paragraph, line 12 to p. 4766, right column, line 23, fig. 7	9
Y		1-8
Y	JP 2016-003935 A (INSTITUTE OF MICROCHEMICAL TECHNOLOGY) 12 January 2016 (2016-01-12) paragraphs [0012]-[0050], fig. 1-8	1-8
Y	JP 2004-184381 A (KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA) 02 July 2004 (2004-07-02) paragraphs [0011]-[0060], fig. 1-8	1-8
Y	JP 2014-157099 A (UNIV IWATE) 28 August 2014 (2014-08-28) paragraphs [0017]-[0070], fig. 1-20	3, 7-8

☒ 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

18 January 2024

Date of mailing of the international search report

30 January 2024

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

International application No.

PCT/JP2023/040540**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BORBERG, E. et al., Light-Controlled Selective Collection-and-Release of Biomolecules by an On-Chip Nanostructured Device, NANO LETTERS, 05 August 2019, vol. 19, pp. 5868-5878, DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b 01323 in particular, abstract	1-9
A	JP 2018-522214 A (ACCESS MEDICAL SYSTEMS LTD.) 09 August 2018 (2018-08-09) paragraphs [0053], [0054]	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/040540

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2016-003935	A	12 January 2016	(Family: none)	
JP	2004-184381	A	02 July 2004	(Family: none)	
JP	2014-157099	A	28 August 2014	US 2014/0234171 A1	paragraphs [0040]-[0138], fig. 1-20
JP	2018-522214	A	09 August 2018	US 2018/0128826 A1	paragraphs [0071]-[0073]
				WO 2016/183092 A1	
				EP 3295174 A1	
				CN 107533052 A	

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 29/02(2006.01)i; G01N 29/036(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i FI: G01N33/543 525U; G01N33/543 525W; G01N33/53 D; G01N29/02; G01N29/036		
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）） G01N33/543; G01N29/02; G01N29/036; G01N33/53		
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 (JDreamII)		
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	PERETZ-SOROKA, H. et al., Manipulating and Monitoring On-Surface Biological Reactions by Light-Triggered Local pH Alterations, NANO LETTERS, 2015.06.18, Vol.15, pp.4758-4768, DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b01578, Abstract, Results and Discussion, 図1-8	9
Y	特に、第4764頁左段第12行-第4766頁右欄第23行, 図7	1-8
Y	JP 2016-003935 A (マイクロ化学技研株式会社) 12.01.2016 (2016 - 01 - 12) 段落0012-0050, 図1-8	1-8
Y	JP 2004-184381 A (株式会社東芝) 02.07.2004 (2004 - 07 - 02) 段落0011-0060, 図1-8	1-8
Y	JP 2014-157099 A (国立大学法人岩手大学) 28.08.2014 (2014 - 08 - 28) 段落0017-0070, 図1-20	3, 7-8
☒ 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 18.01.2024	国際調査報告の発送日 30.01.2024	
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） 西浦 昌哉 2J 5704 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

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	BORBERG, E. et al., Light-Controlled Selective Collection-and-Release of Biomolecules by an On-Chip Nanostructured Device, NANO LETTERS, 2019.08.05, Vol.19, pp.5868-5878, DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b01323 特に、Abstract	1-9
A	JP 2018-522214 A (アクセス メディカル システムズ, リミテッド) 09.08.2018 (2018 - 08 - 09) 段落0053-0054	1-9

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/JP2023/040540

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2016-003935	A	12.01.2016	(ファミリーなし)	
JP	2004-184381	A	02.07.2004	(ファミリーなし)	
JP	2014-157099	A	28.08.2014	US 2014/0234171 A1	
				段落0040-0138, 図1-20	
JP	2018-522214	A	09.08.2018	US 2018/0128826 A1	
				段落0071-0073	
				WO 2016/183092 A1	
				EP 3295174 A1	
				CN 107533052 A	