

(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
2020年9月10日(10.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/179620 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 27/416 (2006.01) G01N 33/544 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/008049

(22) 国際出願日: 2020年2月27日(27.02.2020)

(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 2019-037899 2019年3月1日(01.03.2019) JP

(71) 出願人: 株式会社デンソー (DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 Aichi (JP). 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 Ishikawa (JP).

(72) 発明者: 糠塚 明 (NUKAZUKA, Akira); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP). 久野 斉 (KUNO, Hitoshi); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP). ▲浜▼田 勉 (HAMADA, Tsutomu); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学内 Ishikawa (JP). 幸田 勝典 (KOUDA, Katsunori); 〒4801192 愛知県長久手市横道4-1番地の1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 小林 泰良 (KOBAYASHI, Taira); 〒4801192 愛知県長久手市横道4-1番地の1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 名古屋国際特許業務法人 (NAGOYA INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒4600003 愛知県名古屋市中区錦一丁目20番19号 名神ビル Aichi (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,

(54) Title: PHOTORESPONSIVE LIPOSOME, COMPOSITE, MEASUREMENT SYSTEM, AND MEASUREMENT METHOD

(54) 発明の名称: 光応答性リポソーム、複合体、計測システム、及び計測方法

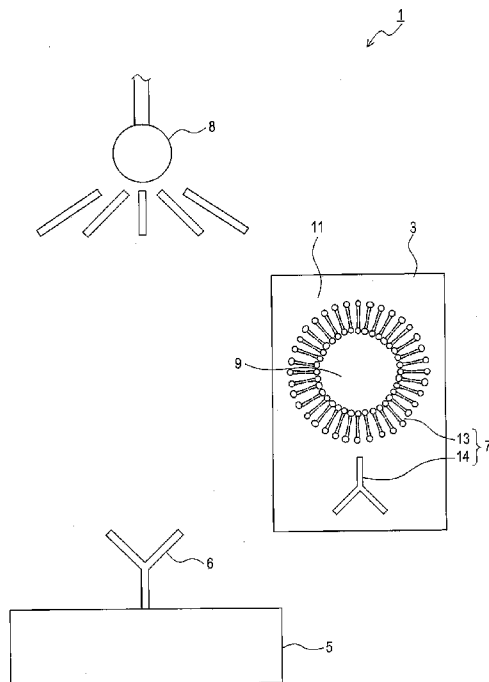


FIG. 1

(57) Abstract: A photoresponsive liposome (7) is provided with a membrane (13) and a membrane-side binding site (14). The membrane comprises an azobenzene compound and a phospholipid. The membrane-side binding site is fixed to the membrane. The membrane-side binding site is capable of binding to a substance to be detected. A composite (3) is provided with the photoresponsive liposome, a first buffer solution (9), and a second buffer solution (11). The first buffer solution is present inside the photoresponsive liposome. The second buffer solution is present outside the photoresponsive liposome. The composition of the first buffer solution is different from the composition of the second buffer solution.

(57) 要約: 光応答性リポソーム (7) は、膜 (13) と、膜側結合部 (14) とを備える。膜はアゾベンゼン化合物及びリン脂質を含む。膜側結合部は膜に固定されている。膜側結合部は被検出物質と結合可能である。複合体 (3) は、光応答性リポソームと、第1緩衝液 (9) と、第2緩衝液 (11) とを備える。第1緩衝液は光応答性リポソームの内部に存在する。第2緩衝液は光応答性リポソームの外部に存在する。第1緩衝液の組成と、第2緩衝液の組成とが異なる。

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, 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,
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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

光応答性リポソーム、複合体、計測システム、及び計測方法

関連出願の相互参照

[0001] 本国際出願は、2019年3月1日に日本国特許庁に出願された日本国特許出願第2019-37899号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願第2019-37899号の全内容を本国際出願に参照により援用する。

技術分野

[0002] 本開示は光応答性リポソーム、複合体、計測システム、及び計測方法に関する。

背景技術

[0003] バイオテクノロジー、ヘルスケア等の技術分野において、抗原等の被検出物質の量を計測する必要がある。被検出物質の量を計測する方法として、リポソーム結合免疫吸着測定法（Liposome Immunosorbent Assay, LISA）がある。

[0004] LISAは特許文献1に開示されている。LISAでは、支持体上に抗体を固定しておく。固定された抗体に被検出物質を結合させる。次に、被検出物質にリポソームを結合させる。リポソームは一次抗体を備えている。リポソームが備える一次抗体が被検出物質と結合する。

[0005] リポソームは、その内部に蛍光分子等の標識物質を含んでいる。次に、リポソームの内部に含まれていた標識物質を、リポソームの外部に漏洩させる。標識物質の量に基づき、被検出物質の量を計測する。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2017-161317号公報

発明の概要

- [0007] 発明者の詳細な検討の結果、以下の課題が見出された。リポソームの内部に含まれていた標識物質を、リポソームの外部に漏洩させるためには、リポソームを破壊又は不安定化する必要があった。リポソームを破壊又は不安定化するためには、ペプチド、タンパク質、界面活性剤等を添加したり、超音波処理を行ったりする必要があった。そのため、被検出物質の量を計測するためには、煩雑な工程が必要であった。
- [0008] 本開示の1つの局面では、必ずしも煩雑な工程を行わなくても被検出物質の量を計測できる光応答性リポソーム、複合体、計測システム、及び計測方法を提供することが望ましい。
- [0009] 本開示の1つの局面は、アゾベンゼン化合物及びリン脂質を含む膜と、前記膜に固定され、被検出物質と結合可能な膜側結合部と、を備える光応答性リポソームである。
- [0010] 本開示の1つの局面である光応答性リポソームを用いれば、必ずしも煩雑な工程を行わなくても被検出物質の量を計測できる。
- [0011] 本開示の別の局面は、被検出物質の量を計測する計測方法である。本開示の別の局面である計測方法では、前記被検出物質と結合可能な支持体側結合部が固定された支持体と、前記被検出物質を含む液とを接触させ、前記被検出物質と、光応答性リポソームを含む液とを接触させる。前記支持体と、前記被検出物質を含む液とを接触させた後であって、且つ、前記被検出物質と、前記光応答性リポソームを含む液とを接触させた後に、前記支持体に固定されていない前記光応答性リポソームを除去する。前記光応答性リポソームを除去した後、前記光応答性リポソームの内部に第1緩衝液が存在し、前記光応答性リポソームの外部に、前記第1緩衝液とは組成が異なる第2緩衝液が存在する状態で、前記光応答性リポソームに光を照射して前記光応答性リポソームに膜孔を形成する。前記光の照射により生じる前記第2緩衝液の組成の変化に基づき前記被検出物質の量を計測する。
- [0012] 本開示の別の局面である計測方法で使用する前記光応答性リポソームは、アゾベンゼン化合物及びリン脂質を含む膜と、前記膜に固定され、前記被検

出物質と結合可能な膜側結合部と、を備える。前記膜側結合部は、前記被検出物質のうち、前記支持体側結合部と結合する部位とは異なる部位において前記被検出物質と結合する。

[0013] 本開示の別の局面である計測方法を用いれば、必ずしも煩雑な工程を行わなくても被検出物質の量を計測できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]計測システムの構成を表す説明図である。

[図2]膜孔が形成されていない光応答性リポソームを含む複合体の構成を表す説明図である。

[図3]膜孔が形成されている光応答性リポソームを含む複合体の構成を表す説明図である。

[図4]A z o T A Bが示すトランス・シス体間の異性化を表す説明図である。

[図5]計測システムを用いて被検出物質の量を計測する計測方法を表す説明図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本開示の例示的な実施形態について図面を参照しながら説明する。

[0016] 1. 計測システム1の構成

計測システム1の構成を、図1～図4に基づき説明する。図1に示すように、計測システム1は、複合体3と、支持体5と、支持体側結合部6と、光源8と、を備える。

[0017] 図1に示すように、複合体3は、光応答性リポソーム7と、第1緩衝液9と、第2緩衝液11と、を備える。光応答性リポソーム7は、第2緩衝液11の中に複数分散している。図1～図3に示すように、光応答性リポソーム7は、微小なカプセル状の形態を有する膜13と、膜側結合部14と、を備える。

[0018] 図2、図3に示すように、膜13は、リン脂質15と、アゾベンゼン化合物17とを含む。脂質とは、疎水基と親水基とを含む分子を意味する。アゾベンゼン化合物17は、青～緑色光を照射すると、シスからトランスに変化

する。また、アゾベンゼン化合物 17 は、紫外光を照射すると、トランスからシスに変化する。

[0019] アゾベンゼン化合物 17 として、例えば、Az oTAB、KAON、AZTMA、Paz o PC、等が挙げられる。特に、光反応性の面から、Az oTAB、KAON が好ましい。

[0020] Az oTAB の名称は、azobenzene trimethyl ammonium bromide である。Az oTAB の詳細は、J Am Chem Soc. 2012 Mar 14;134(10):4898-904 に開示されている。KAON の名称は、N-[4-[4'-[N,N-ビス-[3-(N-リジルアミノ)プロピル]アミノカルボニル]フェニルアゾ]フェノキシアセチル]ジドデシルアミンである。KAON として、KAON8、KAON12 等がある。KAON8 における疎水基の炭素数は 8 はである。KAON12 における疎水基の炭素数は 12 である。KAON12 は、緑色光を照射すると、シスからトランスに変化する。また、KAON12 は、紫外光を照射すると、トランスからシスに変化する。KAON の詳細は、Langmuir 2005, 21, 17, 7626-7628 に開示されている。

[0021] AZTMA の名称は、4-Butylazobenzene-4'-(oxyethyl)trimethyl ammonium bromide である。AZTMA の詳細は、J. Phys. Chem. B 1999, 103, 49, 10737-10740 に開示されている。

[0022] Paz o PC の名称は、1-Hexadecanoyl-2-(4'-n-butylphenyl)azo-4''(gamma-phenylbutyroyl)-glycero-3-phosphocholine である。Paz o PC の詳細は、FEBS Lett. 1999 Dec 10;463(1-2):165-8 に開示されている。

[0023] リン脂質 15 として、少なくとも 1 つの疎水基が二重結合を有した不飽和脂質が好ましい。このようなリン脂質 15 として、例えば、ジオレオイルフォスフォコリン（以下では DOPC とする）、ステアロイルオレオイルフォ

スフォコリン（以下ではSOPCとする）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（以下ではDPPCとする）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-ポリエチレングリコール2,000-ジベンゾシクロオクチン（以下では、DSPE-PEG（2000）-DBCOとする）等が挙げられる。

[0024] DOPCの名称は、1, 2-di oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholineである。DPPCの名称は、1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholineである。DSPE-PEG（2000）-DBCOの名称は、1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[dibenzocyclooctyl（polyethylene glycol）-2000]である。

[0025] リン脂質15のゲル-液晶相転移温度は、膜生成の観点から、光応答性リポソーム7の使用温度より低いことが好ましい。ゲル-液晶相転移温度は、凝固温度とも呼ばれる。光応答性リポソーム7の使用温度とは、後述するように、光応答性リポソーム7を用いて被検出物質21の量を計測するときの光応答性リポソーム7の温度を意味する。

[0026] 光応答性リポソーム7の使用温度は、通常、室温から体温程度の温度である。リン脂質15のゲル-液晶相転移温度が光応答性リポソーム7の使用温度より低い場合、リン脂質15は、光応答性リポソーム7の使用温度において液晶になる。DOPCのゲル-液晶相転移温度は-23℃である。SOPCのゲル-液晶相転移温度は6℃である。

[0027] アゾベンゼン化合物17がK A O Nである場合、リン脂質15のゲル-液晶相転移温度が光応答性リポソーム7の使用温度より低いことが好ましい。この場合、K A O Nが示すトランス・シス体間の異性化の際に膜13の線張力がスイッチされる。その結果、光応答性リポソーム7が確実な光応答性を示す。アゾベンゼン化合物17がA z o T A Bである場合、光応答性リポソーム7は、以下のものであることが好ましい。

- [0028] 光応答性リポソーム 7 において、例えば、第 1 のリン脂質と、第 2 のリン脂質と、コレステロールとが混合されている。第 1 のリン脂質は、ゲルー液晶相転移温度が光応答性リポソーム 7 の使用温度より低いリン脂質 15 である。第 2 のリン脂質は、ゲルー液晶相転移温度が光応答性リポソーム 7 の使用温度より高いリン脂質 15 である。
- [0029] 光応答性リポソーム 7 が上記のものである場合、第 1 のリン脂質と、第 1 のリン脂質とはゲルー液晶相転移温度が異なる第 2 のリン脂質及びコレステロールとが混在する。そのことにより、膜 13 の面内で相分離が発生し、秩序相と無秩序相が共存した状態が形成される。その結果、例えば、AzoTAB が示すトランス・シス体間の異性化によって、膜 13 の崩壊が惹起される。AzoTAB が示すトランス・シス体間の異性化を図 4 に示す。
- [0030] アゾベンゼン化合物 17 の濃度と、リン脂質 15 の濃度との合計を 100 % とする。濃度の単位はモル濃度である。アゾベンゼン化合物 17 が KAN12 である場合、アゾベンゼン化合物 17 の濃度は 30 % より大きく 40 % 未満であることが好ましい。アゾベンゼン化合物 17 の濃度が 30 % より大きく 40 % 未満である場合、光応答性リポソーム 7 を確実に得ることができる。
- [0031] アゾベンゼン化合物 17 が AzoTAB である場合、アゾベンゼン化合物 17 の濃度は 5 % より大きく 20 % 未満であることが好ましい。アゾベンゼン化合物 17 の濃度が 5 % より大きく 20 % 未満である場合、光応答性リポソーム 7 を確実に得ることができる。
- [0032] リン脂質 15 として、例えば、J Am Chem Soc. 2012;134(10):4898-4904 に開示されているものを使用することができる。リン脂質 15 として、例えば、不飽和状態である炭化水素鎖を有するリン脂質と、飽和状態である炭化水素鎖を有するリン脂質とを含むものが挙げられる。
- [0033] 図 3 に示すように、光応答性リポソーム 7 は、第 1 の光が照射されると、膜 13 上に膜孔 19 を形成する。膜孔 19 は光応答性リポソーム 7 の内外を連通する。膜孔 19 が形成されると、光応答性リポソーム 7 の内部に存在し

ていた第1緩衝液9は光応答性リポソーム7の外部に放出される。

[0034] また、光応答性リポソーム7は、第2の光が照射されると、図2に示すように、膜13上の膜孔19を閉じる。アゾベンゼン化合物17がK A O Nである場合、第1の光として、緑色光を使用することができる。また、第2の光として、紫外光を使用することができる。第1の光である緑色光は、例えば、500nm～600nmの波長を有する光である。第1の光である緑光は、532nm付近にピークを持つことが好ましい。第2の光である紫外光は、例えば、300nm～400nmの波長を有する光である。

[0035] アゾベンゼン化合物17がA z o T A Bである場合、第1の光として、紫外光を使用することができる。第1の光である紫外光は、例えば、300nm～400nmの波長を有する光である。第1の光である紫外光は、365nm付近にピークを持つことが好ましい。

[0036] 光応答性リポソーム7における膜孔19の形成と消滅とは、以下の作用による。光の照射により、アゾベンゼン化合物17がシス体とトランス体とのうちの一方から他方に変化する。そのことにより、アゾベンゼン化合物17を含む光応答性リポソーム7は変形し、膜13上に膜孔19が形成されたり、膜孔19が消滅したりする。

[0037] 膜13は、例えば、積層膜水和法によって生成することができる。積層膜水和法は、例えば、以下の方法である。まず、アゾベンゼン化合物17及びリン脂質15を含む脂質の分子をクロロホルム等の有機溶媒に溶解させ、溶液を調製する。調製した溶液を試験管に入れ、有機溶媒を蒸発させることで、試験管の底に積層膜を作製する。積層膜は2分子膜である。次に、試験管にトリス塩酸緩衝液を加える。すると、積層していた2分子膜が分離・小胞化し、光応答性リポソーム7が生成する。

[0038] 膜側結合部14は膜13に固定されている。膜側結合部14は、被検出物質21と結合可能である。膜側結合部14は、例えば、分子識別素子である。分子識別素子として、例えば、抗体、DNAアプタマー、ペプチド等が挙げられる。膜側結合部14は、被検出物質21に応じて適宜選択することが

できる。

[0039] 膜側結合部 1 4 を膜 1 3 に固定する方法は特に限定されない。例えば、膜側結合部 1 4 と膜 1 3 との間に、クリック化学反応に基づく共有結合を形成することで、膜側結合部 1 4 を膜 1 3 に固定することができる。この場合、膜側結合部 1 4 の少なくとも片末端がアジド基で修飾されていることが好ましい。

[0040] 図 1 ～図 3 に示すように、第 1 緩衝液 9 は、膜 1 3 の内部に存在する。第 2 緩衝液 1 1 は、膜 1 3 の外部に存在する。第 1 緩衝液 9 の組成と、第 2 緩衝液 1 1 の組成とは異なる。

[0041] 例えば、第 1 緩衝液 9 と前記第 2 緩衝液 1 1 との間にイオン勾配が存在する。イオン勾配として、例えば、プロトン勾配が挙げられる。イオン勾配は、プロトン以外のイオンのイオン勾配であってもよい。第 1 緩衝液 9 と第 2 緩衝液 1 1 との間にプロトン勾配が存在する場合、第 1 緩衝液 9 の pH は、第 2 緩衝液 1 1 の pH より高くてもよいし、低くてもよい。

[0042] 第 1 緩衝液 9 の浸透圧と、第 2 緩衝液 1 1 の浸透圧との差は、プラスマイナス 1 mOsm/Kg 以内であることが好ましい。この場合、光応答性リポソーム 7 の破裂や収縮を抑制することができる。

[0043] 第 1 緩衝液 9 及び第 2 緩衝液 1 1 として、例えば、トリス塩酸緩衝液等が挙げられる。第 1 緩衝液 9 及び第 2 緩衝液 1 1 の pH は、 $5.0 \sim 10.0$ の範囲内であることが好ましい。

[0044] 支持体 5 は特に限定されない。支持体 5 として、例えば、公知の ELISA において使用される支持体が挙げられる。支持体 5 として、例えば、シリコン基板等が挙げられる。

[0045] 支持体側結合部 6 は支持体 5 に固定される。支持体側結合部 6 は、被検出物質 2 1 と結合可能である。支持体側結合部 6 は、被検出物質 2 1 のうち、膜側結合部 1 4 と結合する部位とは異なる部位において被検出物質 2 1 と結合する。

[0046] 支持体側結合部 6 は、例えば、分子識別素子である。分子識別素子として

、例えば、抗体、DNAアプタマー、ペプチド等が挙げられる。支持体側結合部6は、被検出物質21に応じて適宜選択することができる。支持体側結合部6を支持体5に固定する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して用いることができる。

[0047] 光源8は、光応答性リポソーム7の少なくとも一部に光を照射可能である。光源8が照射する光は、例えば、上述した第1の光又は第2の光である。また、光源8は、例えば、第1の光と第2の光とのうち的一方を選択して照射することができる。また、第1の光を照射する光源8と、第2の光を照射する光源8とを、それぞれ備えていてもよい。光源8は、複合体3の全体に光を照射してもよいし、複合体3の一部に局所的に光を照射してもよい。

[0048] 2. 計測方法について

計測システム1を用いて、被検出物質21の量を計測する計測方法を行うことができる。計測方法には、例えば、以下の第1～第4工程がある。

[0049] 第1工程では、支持体側結合部6が固定された支持体5と、被検出物質21を含む液とを接触させる。第1工程において、図5に示すように、支持体側結合部6は被検出物質21と結合する。被検出物質21は、支持体側結合部6を介して支持体5に固定される。

[0050] 第2工程では、被検出物質21と、光応答性リポソーム7を含む液とを接触させる。光応答性リポソーム7を含む液は、例えば、複合体3である。第2工程において、膜側結合部14は被検出物質21に結合する。

[0051] 第2工程は、例えば、第1工程の後に、支持体5と、光応答性リポソーム7を含む液とを接触させる工程である。この場合、支持体5に固定されている被検出物質21と、光応答性リポソーム7を含む液とが接触する。

[0052] また、第2工程は、例えば、第1工程の前に、被検出物質21を含む液と、光応答性リポソーム7を含む液とを混合し、混合液を生成する工程である。この場合、液中にある被検出物質21と、光応答性リポソーム7を含む液とが接触する。次に、支持体5と混合液とを接触させる。支持体5と混合液とを接触させる工程は第1工程に対応する。混合液は、被検出物質21を含

む液に対応する。

[0053] 第1工程及び第2工程の後、図5に示すように、膜側結合部14は被検出物質21と結合する。光応答性リポソーム7は、膜側結合部14と被検出物質21との結合、及び、被検出物質21と支持体側結合部6との結合により、支持体5に固定される。

[0054] 第3工程は、第1工程及び第2工程の後に行われる。第3工程では、支持体5に固定されていない光応答性リポソーム7を除去する。

[0055] 第4工程は、第3工程の後に行われる。第4工程では、光応答性リポソーム7の内部に第1緩衝液9が存在し、光応答性リポソーム7の外部に第2緩衝液11が存在する状態で、図5に示すように、光応答性リポソーム7に第1の光を照射して光応答性リポソーム7に膜孔19を形成する。第1の光は例えば紫外光である。なお、第4工程における光応答性リポソーム7とは、図5に示すように、支持体5に固定されている光応答性リポソーム7を意味する。

[0056] 膜孔19が形成されると、光応答性リポソーム7の内部に存在していた第1緩衝液9は、膜孔19から、光応答性リポソーム7の外部に放出される。放出された第1緩衝液9は、光応答性リポソーム7の外部に存在する第2緩衝液11と混合される。第1緩衝液9の組成は第2緩衝液11の組成とは異なるので、第1の光を照射する前に比べて、第2緩衝液11の組成が変化する。すなわち、第1の光の照射により、第2緩衝液11の組成が変化する。

[0057] 第2緩衝液11の組成の変化は、光応答性リポソーム7の量が多いほど、大きい。光応答性リポソーム7の量は、被検出物質21の量が多いほど、多い。よって、第2緩衝液11の組成の変化は、被検出物質21の量が多いほど、大きい。第4工程では、第1の光の照射により生じる第2緩衝液11の組成の変化に基づき、被検出物質21の量を計測する。

[0058] 例えば、第1の光の照射前に、第1緩衝液9と第2緩衝液11との間にイオン勾配が存在する場合、第1の光の照射により、第2緩衝液11のイオン濃度変化する。第4工程では、第1の光の照射により生じる第2緩衝液1

1のイオン濃度の変化に基づき、被検出物質21の量を計測する。

[0059] 例えば、第1の光の照射前に、第1緩衝液9と第2緩衝液11との間にプロトン勾配が存在する場合、第1の光の照射により、第2緩衝液11のpHが変化する。第4工程では、第1の光の照射により生じる第2緩衝液11のpHの変化に基づき、被検出物質21の量を計測する。

[0060] 3. 実施例

(3-1) 複合体3の製造

DOPC、DPPC、DSPE-PEG(2000)-DBCO、AzotAB、及びコレステロールをクロロホルム等の有機溶媒に溶解させ、溶液を調製した。溶液におけるDOPCの濃度は、0.3mMであった。溶液におけるDPPCの濃度は、0.3mMであった。溶液におけるDSPE-PEG(2000)-DBCOの濃度は、0.036mMであった。溶液におけるAzotABの濃度は、0.2mMであった。溶液におけるコレステロールの濃度は、0.4mMであった。mMはミリモラーを意味する。

[0061] 次に、調製した溶液を試験管に入れ、有機溶媒を蒸発させることで、試験管の底に積層膜を作製した。積層膜は2分子膜であった。次に、試験管に第1緩衝液9を加えた。すると、積層膜が分離・小胞化し、光応答性リポソーム7のうち、膜13の部分が生成した。膜13を生成する方法は、積層膜水和法である。

[0062] 第1緩衝液9は、10mMのHEPESと、180mMのトレハロースとを混合し、pHを8.5に調整したものである。HEPESの名称は、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acidである。第1緩衝液9の浸透圧は220mOsm/kgであった。

[0063] 次に、膜13の表面に、FcIIIペプチド（配列番号1）を固定した。FcIIIペプチドは膜側結合部14に対応する。FcIIIペプチドのアミノ酸配列における、N末端から2番目及び12番のシステインに酸化的ジスルフィド結合を施した。その結果、FcIIIペプチドは環状ペプチドと

なった。FcIIIペプチドはIgGと結合する。IgGは免疫グロブリンの一種である。IgGは被検出物質21に対応する。

[0064] 膜13の表面にFcIIIペプチドを固定する方法は以下のとおりである。FcIIIペプチドのN末端にアジド基を修飾した。

[0065] 次に、FcIIIペプチドが備えるアジド基と、膜13に散在するDSPE-PEG(2000)-DBCO中のDBCO基との間に、クリック化学反応に基づく共有結合を生じさせることで、FcIIIペプチドを膜13の表面に固定した。以上の工程により、光応答性リポソーム7が得られた。

[0066] 次に、光応答性リポソーム7に対し、室温下で外液置換を施した。外液置換とは、光応答性リポソーム7の外部に存在する液を、別の液に置換することである。外液置換により、光応答性リポソーム7の外部に存在する液を、第2緩衝液11とした。

[0067] 第2緩衝液11は、10mMのHEPESと180mMのグルコースとから成る混合液であった。第2緩衝液11の浸透圧は、第1緩衝液9の浸透圧と同じであった。塩化ナトリウムを第2緩衝液11に添加することで、第2緩衝液11の浸透圧を調整することができる。第2緩衝液11のpHは5.0であった。

[0068] 本実施例では、遠心分離により外液置換を行った。遠心分離における遠心力は2000×gであった。遠心分離の時間は2分間であった。本実施例では、外液置換を3回繰り返した。なお、外液置換の方法は遠心分離以外の方法であってもよい。外液置換の方法として、例えば、限外濾過、ゲル濾過等が挙げられる。以上の工程により、複合体3が得られた。

[0069] (3-2) 支持体側結合部6が固定された支持体5の製造

シリコン基板を用意した。シリコン基板の表面を、128個×128個の升目に区切った。それぞれの升目に電位検出部を形成した。電位検出部は、シリコン基板上に、シリコン酸化膜と、シリコン窒化膜とを順次積層した構成を有していた。以上の工程により、支持体5が得られた。支持体5は、電位検出部ごとに表面電位を検出することができる。

[0070] 次に、支持体5の表面にDNAアプタマー（配列番号2）を固定した。DNAアプタマーは支持体側結合部6に対応する。DNAアプタマーは分子識別材料に対応する。DNAアプタマーの5'末端はアジド基で修飾されている。DNAアプタマーは、IgGのうち、FcIIIペプチドが結合する部位とは異なる部位においてIgGと結合する。

[0071] 支持体5の表面にDNAアプタマーを固定する方法は以下のとおりとした。まず、支持体5の表面を、熱水処理等を施すことで親水化した。次に、支持体5の表面を、シランカップリング効果を利用して、飽和3-アミノプロピルトリエトキシシランでコートした。次に、ジベンゾシクロオクチン-N-ヒドロキシコハク酸イミド（Dibenzocyclooctyne-N-hydroxysuccinimide ester）を添加することにより、3-アミノプロピルトリエトキシシランがもつアミノ基を、ジベンゾシクロオクチン（Dibenzocyclooctyne）基に置換した。次に、5'末端がアジド基で修飾されているDNAアプタマーを、支持体5の表面に固定した。なお、支持体側結合部6を支持体5に固定する方法は、他の方法であってもよい。

[0072] （3-3）計測方法の実施

前記（3-2）製造した支持体5の表面に、IgGを含む緩衝液（以下ではIgG含有緩衝液とする）を滴下した。IgG含有緩衝液のpHは5.0であった。IgG含有緩衝液の組成は、IgGを含む点を除き、第2緩衝液11と同じであった。

[0073] なお、IgG含有緩衝液の組成は、IgGを含む点以外でも、第2緩衝液11の組成と異なってもよい。ただし、IgG含有緩衝液のpHは、第2緩衝液11のpHで同じであることが好ましい。IgG含有緩衝液のpHと、第2緩衝液11のpHとが同じである場合、後の工程においてpHの変化を計測することが容易になる。

[0074] IgG含有緩衝液におけるIgGの濃度は、10nMと50nMとの2水準とした。また、比較例として、支持体5の表面に、IgGを含まない第2

緩衝液 11のみを滴下した。

[0075] 次に、支持体5の表面に、前記(3-1)で製造した複合体3を滴下した。滴下後、60分間静置した。

[0076] 次に、支持体5の表面を、洗い用の緩衝液で3回洗浄した、その結果、支持体5に固定されていない光応答性リボソーム7は除去された。洗い用の緩衝液の組成は、第2緩衝液11の組成と同じであった。洗い用の緩衝液のpHは5.0であった。

[0077] 次に、支持体5の表面を、100 μ Lの第2緩衝液11で浸した。次に、図5に示すように、支持体5の表面に接する第2緩衝液11に、参照電極23を挿入した。参照電極23は、銀/塩化銀参照電極であった。参照電極23は、ESA製の66-EE009であった。参照電極23の挿入後、第2緩衝液11のpHの計測を開始した。

[0078] 支持体5を用いて、紫外光を照射する前の表面電位を計測した。このときの表面電位を以下では初期表面電位とする。初期表面電位は約745mVであった。

[0079] 次に、図5に示すように、支持体5の全体領域に紫外光を5秒間照射した。紫外光における波長ピークは365nmであった。紫外光の照射強度は、100 μ m $\times$ 100 μ mの照射領域当たり120 μ Wであった。

[0080] 紫外光の照射後、支持体5を用いて、表面電位を計測した。このときの表面電位を、以下では光照射後表面電位とする。IgG含有緩衝液におけるIgGの濃度が10nMであった場合、光照射後表面電位は、初期表面電位に比べて、約3.75mV低下した。IgG含有緩衝液におけるIgGの濃度が50nMであった場合、光照射後表面電位は、初期表面電位に比べて、10.60mV低下した。IgG含有緩衝液の代わりに第2緩衝液11のみを支持体5に滴下した場合、光照射後表面電位は、初期表面電位と同じであった。計測結果を表1に示す。

[0081]

[表1]

IgG濃度 (nM)	表面電位変化量 (mV)	標準偏差(±SD) (mV)
0	0	0.12
10	-3.75	0.62
50	-10.63	2.87

表1における「表面電位変化量」は、光照射後表面電位から初期表面電位を差し引いた値を意味する。表1における「標準偏差」は、複数回算出した「表面電位変化量」の標準偏差を意味する。

[0082] 支持体5の表面に1gG含有緩衝液を滴下した場合に光照射後表面電位が低下する理由は以下のとおりである。図5に示すように支持体5に固定された光応答性リポソーム7に紫外光を照射すると、図3、図5に示すように、光応答性リポソーム7に膜孔19が生じた。すると、第1緩衝液9は、膜孔19を通り、光応答性リポソーム7の外部に放出され、第2緩衝液11と混合された。第1緩衝液9のpHは、第2緩衝液11のpHよりも高い。その結果、第2緩衝液11のpHが上昇した。

[0083] 数1に示すように、ネルンストの式によると、表面電位変化量とpH変化量とは、負の比例関係にある。よって、第2緩衝液11のpHが上昇することで、光照射後表面電位が低下した。

[0084] [数1]

$$\text{式(1)} \quad E_H = E - E_0 = \frac{RT}{nF} \ln a_{H^+} = 0.059 \times \text{pH}$$

なお、支持体5に固定化されたDNAアプタマーの密度は、DNAアプタマーと1gGとの結合を相互干渉するほど高密度ではないことが好ましい。また、支持体5に固定化されたDNAアプタマーの密度は、1gGの検出を

可能にするだけの密度であることが好ましい。支持体 5 に固定化された DNA アプタマーの密度は、任意にコントロールすることが可能である。

[0085] 膜 13 の大きさは、FcIII ペプチドと IgG との結合を相互干渉する大きさではないことが好ましい。また、膜 13 の大きさは、IgG の検出を可能にするだけの量の第 1 緩衝液 9 を保持できる大きさであることが好ましい。膜 13 の大きさは、任意にコントロールすることが可能である。

[0086] 4. 光応答性リポソーム 7、複合体 3、計測システム 1、及び計測方法が奏する効果

(1A) 光応答性リポソーム 7 は、第 1 の光を照射すれば膜孔 19 を形成し、第 1 緩衝液 9 を外部に放出する。放出された第 1 緩衝液 9 は第 2 緩衝液 11 と混ざる。第 1 緩衝液 9 の組成と、第 2 緩衝液 11 の組成とは異なるため、第 1 緩衝液 9 の放出により、第 2 緩衝液 11 の組成が変化する。計測システム 1 は、第 2 緩衝液 11 の組成の変化に基づき被検出物質 21 の量を計測する。そのため、計測システム 1 を用いれば、煩雑な工程を行わなくても、被検出物質 21 の量を計測することができる。

[0087] (1B) 膜 13 を構成するリン脂質 15 として、例えば、不飽和状態である炭化水素鎖を有するリン脂質と、飽和状態である炭化水素鎖を有するリン脂質とを含むものを用いることができる。この場合、光応答性リポソーム 7 の使用温度において、リポソーム膜の面内で相分離が発生し、秩序相と無秩序相が共存した状態が形成されるという効果が得られる。

[0088] (1C) 膜 13 を構成するアゾベンゼン化合物 17 として、例えば、AzobTAB を用いることができる。この場合、第 1 の光の照射により AzobTAB が示すトランス体・シス体間の異性化によって、リポソーム膜の崩壊が惹起されるという効果が得られる。

[0089] (1D) 例えば、第 1 緩衝液 9 と第 2 緩衝液 11 との間にイオン勾配が存在する。この場合、光応答性リポソーム 7 に第 1 の光を照射したとき、第 2 緩衝液 11 のイオン濃度が増加する。計測システム 1 は、第 2 緩衝液 11 におけるイオン濃度の変化に基づき被検出物質 21 の量を計測することができる。

る。

[0090] (1 E) 例えば、第1緩衝液9と第2緩衝液11との間にプロトン勾配が存在する。この場合、光応答性リボソーム7に第1の光を照射したとき、第2緩衝液11のpHが変化する。計測システム1は、第2緩衝液11におけるpHの変化に基づき被検出物質21の量を計測することができる。

[0091] 5. 他の実施形態

以上、本開示の実施形態について説明したが、本開示は上述の実施形態に限定されることなく、種々変形して実施することができる。

[0092] (1) 上記実施形態における1つの構成要素が有する複数の機能を、複数の構成要素によって実現したり、1つの構成要素が有する1つの機能を、複数の構成要素によって実現したりしてもよい。また、複数の構成要素が有する複数の機能を、1つの構成要素によって実現したり、複数の構成要素によって実現される1つの機能を、1つの構成要素によって実現したりしてもよい。また、上記実施形態の構成の一部を省略してもよい。また、上記実施形態の構成の少なくとも一部を、他の上記実施形態の構成に対して付加又は置換してもよい。

[0093] (2) 上述した光応答性リボソーム、複合体の他、それらを構成要素とする製品やシステム、種々の形態で本開示を実現することもできる。

請求の範囲

- [請求項1] アゾベンゼン化合物（17）及びリン脂質（15）を含む膜（13）と、
前記膜に固定され、被検出物質（21）と結合可能な膜側結合部（14）と、
を備える光応答性リポソーム（7）。
- [請求項2] 請求項1に記載の光応答性リポソームであって、
前記リン脂質は、不飽和状態である炭化水素鎖を有するリン脂質と、飽和状態である炭化水素鎖を有するリン脂質とを含む光応答性リポソーム。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の光応答性リポソームであって、
前記アゾベンゼン化合物の少なくとも一部がAzoTABである光応答性リポソーム。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の光応答性リポソームと、
前記光応答性リポソームの内部に存在する第1緩衝液（9）と、
前記光応答性リポソームの外部に存在する第2緩衝液（11）と、
を備え、
前記第1緩衝液の組成と、前記第2緩衝液の組成とが異なる複合体（3）。
- [請求項5] 請求項4に記載の複合体であって、
前記第1緩衝液と前記第2緩衝液との間にイオン勾配が存在する複合体。
- [請求項6] 請求項5に記載の複合体であって、
前記イオン勾配はプロトン勾配である複合体。
- [請求項7] 請求項1～3のいずれか1項に記載の光応答性リポソームと、
支持体（5）と、
前記支持体に固定され、前記被検出物質と結合可能な支持体側結合部（6）と、

を備え、

前記支持体側結合部は、前記被検出物質のうち、前記膜側結合部と結合する部位とは異なる部位において前記被検出物質と結合する計測システム（１）。

[請求項8]

請求項７に記載の計測システムであって、

前記光応答性リポソームに膜孔を形成する光を照射可能な光源（８）をさらに備える計測システム。

[請求項9]

被検出物質（２１）の量を計測する計測方法であって、

前記被検出物質と結合可能な支持体側結合部（６）が固定された支持体（５）と、前記被検出物質を含む液とを接触させ、

前記被検出物質と、光応答性リポソーム（７）を含む液とを接触させ、

前記支持体と、前記被検出物質を含む液とを接触させた後であって、且つ、前記被検出物質と、前記光応答性リポソームを含む液とを接触させた後に、前記支持体に固定されていない前記光応答性リポソームを除去し、

前記光応答性リポソームを除去した後、前記光応答性リポソームの内部に第１緩衝液（９）が存在し、前記光応答性リポソームの外部に、前記第１緩衝液とは組成が異なる第２緩衝液（１１）が存在する状態で、前記光応答性リポソームに光を照射して前記光応答性リポソームに膜孔（１９）を形成し、前記光の照射により生じる前記第２緩衝液の組成の変化に基づき前記被検出物質の量を計測し、

前記光応答性リポソームは、

アゾベンゼン化合物（１７）及びリン脂質（１５）を含む膜（１３）と、

前記膜に固定され、前記被検出物質と結合可能な膜側結合部（１４）と、

を備え、

前記膜側結合部は、前記被検出物質のうち、前記支持体側結合部と結合する部位とは異なる部位において前記被検出物質と結合する計測方法。

[請求項10]

請求項9に記載の計測方法であって、

前記光の照射前に、前記第1緩衝液と前記第2緩衝液との間にプロトン勾配が存在し、

前記光の照射により生じる前記第2緩衝液のpHの変化に基づき前記被検出物質の量を計測する計測方法。

[図1]

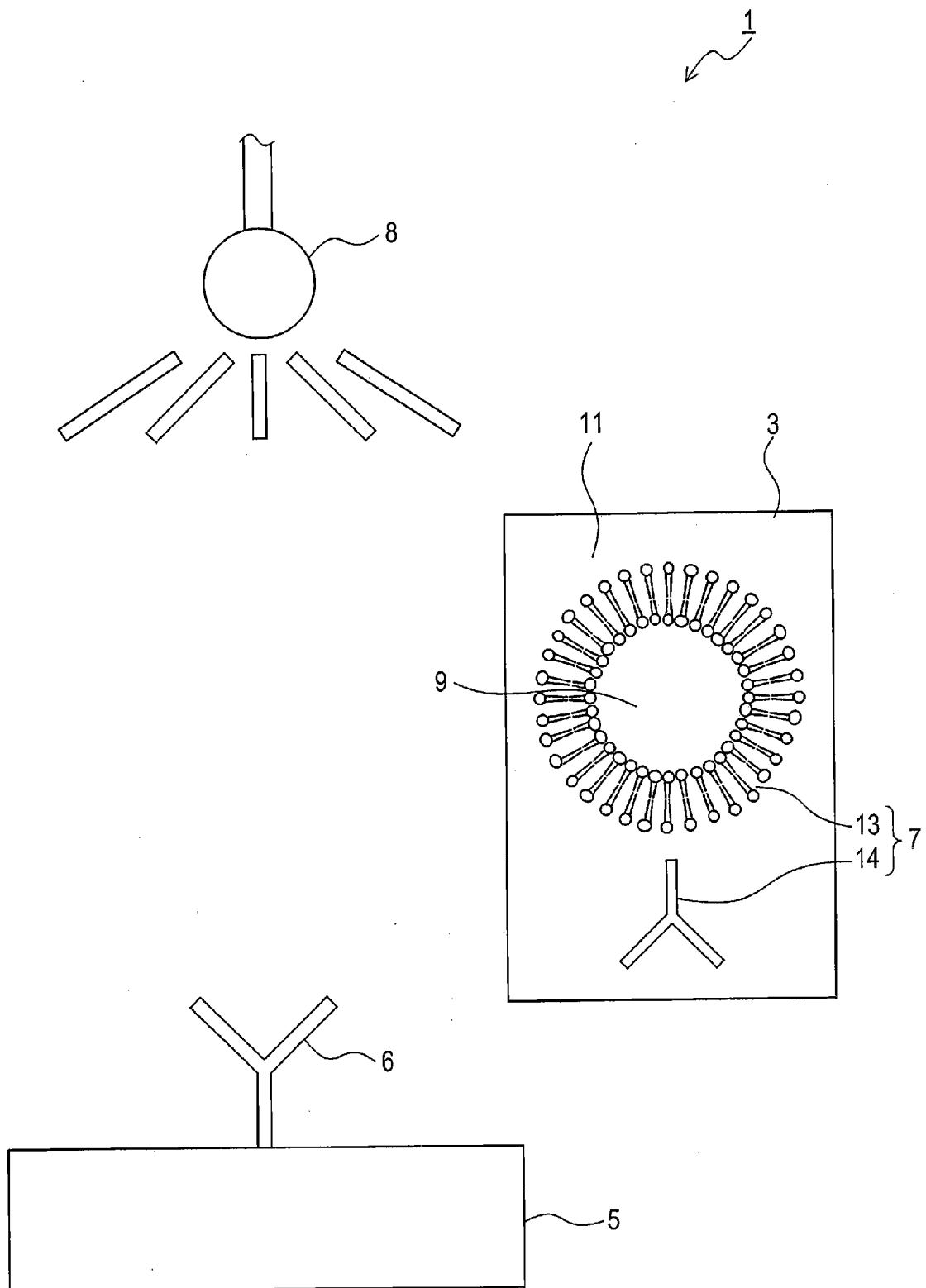


FIG. 1

FIG. 2

[図3]

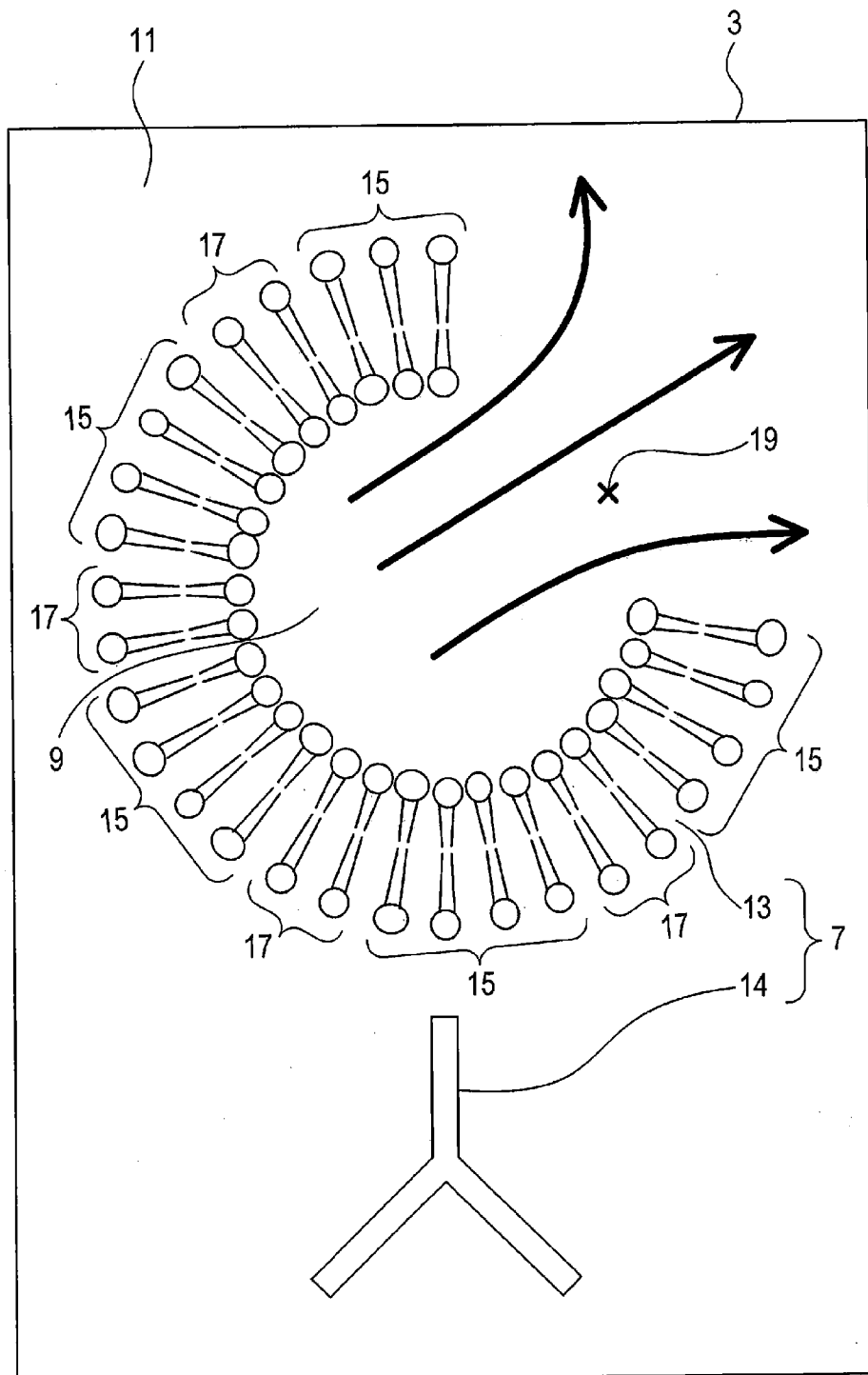


FIG. 3

[図4]

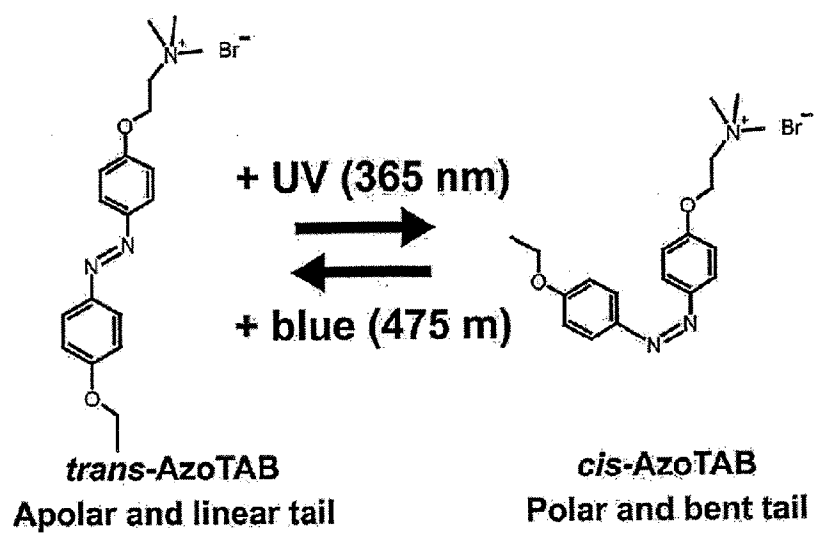


FIG. 4

[図5]

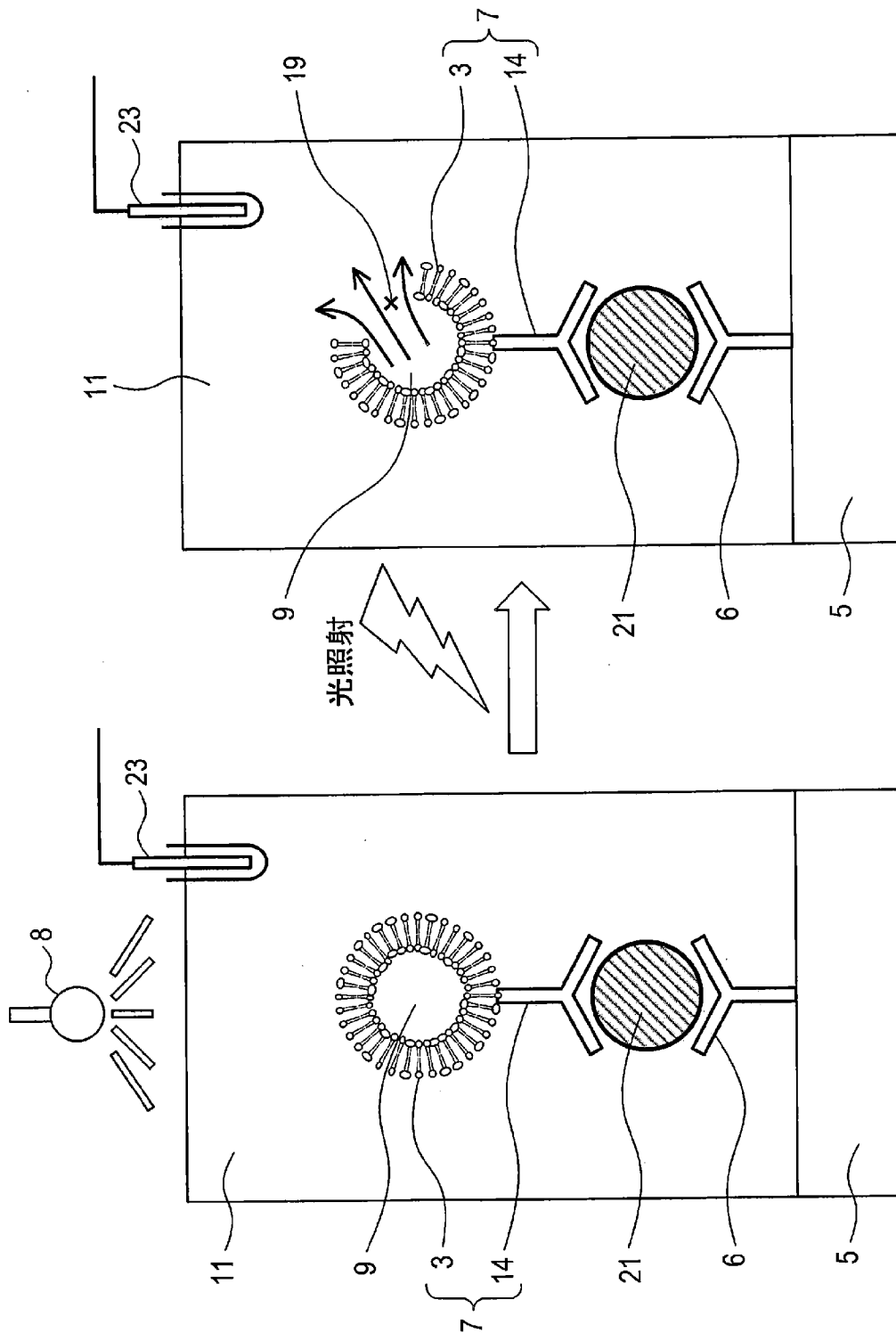


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/008049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N27/416(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/544(2006.01)i
FI: G01N33/543541Z, G01N33/544A, G01N27/416353Z, G01N27/416356,
G01N27/416341G

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. G01N27/416, G01N33/543, G01N33/544

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-69646 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 07.04.2011 (2011-04-07), abstract, paragraphs [0046], [0056], [0084], [0085]	1-10
Y	松本洋太郎, 新たな DDS 戦略: 光でリポソームの破壊を制御する, ファルマ シア, 01 October 2012, vol. 48, no. 10, p. 987, entire text, (MATSUMOTO, Yotaro, Farumashia), non- official translation (New DDS strategy: control liposome destruction with light)	1-10
Y	JP 2011-178689 A (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE & TECHNOLOGY HOKURIKU) 15.09.2011 (2011- 09-15), paragraphs [0027]-[0034], [0042], [0043]	2
Y	JP 2009-257764 A (NIHON UNIVERSITY) 05.11.2009 (2009-11-05), paragraphs [0029], [0037], [0038]	5-6, 10
P, Y	JP 2019-51470 A (DENSO CORPORATION) 04.04.2019 (2019-04-04), claims, paragraphs [0015], [0022]	1-10



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

14.04.2020

Date of mailing of the international search report

28.04.2020

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/JP2020/008049

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-47923 A (PANASONIC CORPORATION) 10.03.2011 (2011-03-10), abstract, fig. 1	1-10
A	JP 2005-265737 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY) 29.09.2005 (2005-09-29), claims	1-10
A	JP 4-52985 A (OKI ELECTRIC IND CO., LTD.) 20.02.1992 (1992-02-20), page 5, upper right column, line 16 to lower right column, line 1	1-10
A	JP 3-161047 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) 11.07.1991 (1991-07-11), claims	1-10
A	US 2008/0124329 A1 (SCHREINER, G. F.) 29.05.2008 (2008-05-29), paragraph [0096]	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/008049

JP 2011-69646 A	07.04.2011	(Family: none)
JP 2011-178689 A	15.09.2011	(Family: none)
JP 2009-257764 A	05.11.2009	WO 2008/018631 A1
JP 2019-51470 A	04.04.2019	(Family: none)
JP 2011-47923 A	10.03.2011	US 2011/0065135 A1 abstract, fig. 1
JP 2005-265737 A	29.09.2005	(Family: none)
JP 4-52985 A	20.02.1992	(Family: none)
JP 3-161047 A	11.07.1991	US 5169635 A claims
US 2008/0124329 A1	29.05.2008	US 2010/0028344 A1 WO 2008/006036 A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 27/416(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/544(2006.01)i FI: G01N33/543 541Z; G01N33/544 A; G01N27/416 353Z; G01N27/416 356; G01N27/416 341G		
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）） G01N27/416; G01N33/543; G01N33/544		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020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); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
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	JP 2011-69646 A (積水化学工業株式会社) 07.04.2011 (2011-04-07) [要約][0046][0056][0084][0085]	1-10
Y	松本洋太郎, 新たなDDS戦略: 光でリボソームの破壊を制御する, ファルマシア, 2012.10.01, Vol.48 No.10, Page.987 全文	1-10
Y	JP 2011-178689 A (国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学) 15.09.2011 (2011-09-15) [0027]-[0034][0042][0043]	2
Y	JP 2009-257764 A (学校法人日本大学) 05.11.2009 (2009-11-05) [0029][0037][0038]	5-6, 10
P, Y	JP 2019-51470 A (株式会社デンソー) 04.04.2019 (2019-04-04) [特許請求の範囲][0015][0022]	1-10
A	JP 2011-47923 A (パナソニック株式会社) 10.03.2011 (2011-03-10) [要約][図1]	1-10
☒ 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 14.04.2020		国際調査報告の発送日 28.04.2020
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） 三木 隆 2J 3312 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	JP 2005-265737 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 29.09.2005 (2005 - 09 - 29) [特許請求の範囲]	1-10
A	JP 4-52985 A (沖電気工業株式会社) 20.02.1992 (1992 - 02 - 20) 5 ページ右上欄 1 6 行～右下欄 1 行	1-10
A	JP 3-161047 A (富士写真フイルム株式会社) 11.07.1991 (1991 - 07 - 11) 特許請求の範囲	1-10
A	US 2008/0124329 A1 (SCHREINER, George F.) 29.05.2008 (2008 - 05 - 29) [0096]	1-10

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、P C T 規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(P C T 規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式 (P C T 規則13の3.1(b)及びP C T 実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

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/JP2020/008049

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2011-69646	A	07.04.2011	(ファミリーなし)	
JP	2011-178689	A	15.09.2011	(ファミリーなし)	
JP	2009-257764	A	05.11.2009	WO	2008/018631 A1
JP	2019-51470	A	04.04.2019	(ファミリーなし)	
JP	2011-47923	A	10.03.2011	US	2011/0065135 A1 Abstract, Fig.1
JP	2005-265737	A	29.09.2005	(ファミリーなし)	
JP	4-52985	A	20.02.1992	(ファミリーなし)	
JP	3-161047	A	11.07.1991	US	5169635 A Claims
US	2008/0124329	A1	29.05.2008	US	2010/0028344 A1
				WO	2008/006036 A2