

(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
2015年4月2日(02.04.2015)

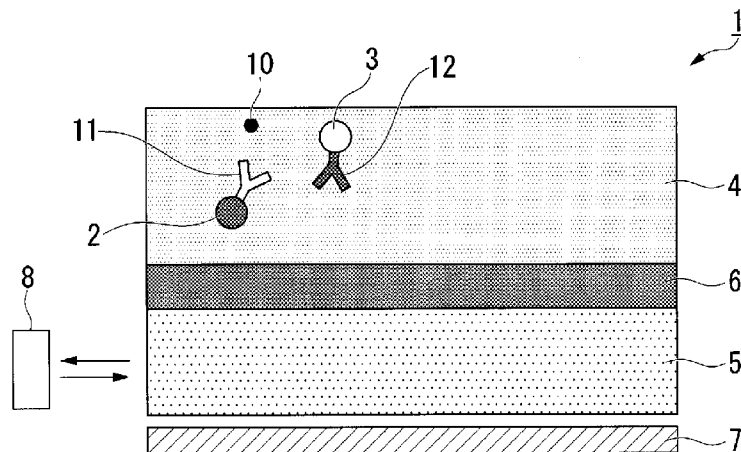


(10) 国際公開番号
WO 2015/046293 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/075363
- (22) 国際出願日: 2014年9月25日(25.09.2014)
- (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 2013-205138 2013年9月30日(30.09.2013) JP
- (71) 出願人: 凸版印刷株式会社(TOPPAN PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 平瀬 匠(HIRASE Takumi); 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 中山 雅人(NAKAYAMA Masato); 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 牧野 洋一(MAKINO Yoichi); 〒1100016 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 鈴木 史朗, 外(SUZUKI Shirou 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: TEST SUBSTANCE DETECTION SYSTEM

(54) 発明の名称: 被検物質の検出システム



(57) Abstract: A test substance detection system provided with a first layer including a carrier modified with a first material capable of binding to a test substance via a binding site of the test substance and a marker modified with a second material capable of binding to the test substance via a site different from the binding site and a second layer that does not contain the carrier or the marker before the application of an external attractive force, wherein it is possible for a complex in which the carrier and the test substance are bound to be made to move from the first layer to the second layer by an external attractive force.

(57) 要約: 被検物質の検出システムは、被検物質の結合部位を介して被検物質と結合することのできる第一物質で修飾された担体と、結合部位とは異なる部位を介して被検物質と結合することのできる第二物質で修飾された標識体とを含む第一層と、外部引力を印加する前には、担体および標識体を含まない第二層と、を備え、外部引力によって担体および被検物質と結合した複合体が、第一層から第二層へ移動可能である。

WO 2015/046293 A1

明 細 書

発明の名称：被検物質の検出システム

技術分野

[0001] 本発明は、担体および標識体を用いた被検物質の検出システムに関する。

背景技術

[0002] 試料中の微量の被検物質を検出する方法としては、E L I S A (enzyme-linked immunosorbent assay) 法やM E I A (microparticle enzyme-based immunoassay) 法等が普及している。

これら検出法は、抗体で特異的・選択的に被検物質を捕捉する手法であり、基板あるいは粒子表面上に固定化された抗体によって、被検物質を捕捉し、更に酵素等を予め標識された抗体と反応させ、サンドイッチ構造を構築している。

ここで、試料中に被検物質が含まれていない場合、標識抗体は捕捉・結合すべき被検物質がないために残存し、反応容器の洗浄によって除去される。即ち、試料中に被検物質が存在すれば、固定化抗体－被検物質－標識抗体からなるサンドイッチ構造が構築される。一方、被検物質がなければ、標識抗体は残存し、洗浄によって除去されることになる。

このような原理を利用して、試料中の被検物質量の違いを、標識抗体の捕捉・結合によって検出する。

従って最終的には反応容器に留まった酵素を発色させると、被検物質の有無を判別したり、被検物質量を求めることができる。

[0003] しかしながら、これらの手法を実行するためには、未反応の標識抗体を除去する必要がある。洗浄は流体操作ステップを必要とし、洗浄が多すぎれば、検出されるべき標識が除去される可能性もある。

しかし、洗浄が少なければ未反応の標識抗体による擬陽性が生じる可能性がある。そのためこれらの手法では、洗浄操作は複数回行う必要があるため、操作時間に長時間を要し、また、測定操作が煩雑である。

[0004] そこで抗体固定化担体として磁性粒子を使用し、磁石により磁性粒子を固定化して、未反応の標識抗体の洗浄・除去する方法が広く使用されている。磁石を用いて固定、洗浄することで洗浄操作時間が短縮される。しかしながら、洗浄操作は複数回行う必要があり、操作も煩雑となる場合がある。

[0005] また、磁性粒子を含む液滴に磁場の変動を与えることにより、液滴を移動させて化学反応に必要な操作を行うことによる、微量化学反応方法が提案されている（特許文献1参照）。提案されている手法では、磁場の変動により、磁性粒子を含む液滴を液中から分取、移動、液滴内攪拌、および洗浄を行うことで、ポンプ、バルブ等の流体制御素子を必要とすることなく、化学反応操作を可能とし、その結果生じる化学反応、生化学反応、および生物学的相互作用等を行わせることが可能である。しかしながら、磁場によって反応液中から切り取られる液滴においては、磁性体粒子とともに反応液の一部も切り取られ、残存するため、特に洗浄操作においては、複数回の操作が必要となる場合がある。

[0006] 更に、貴金属コート磁性粒子を用いて、磁場によって移動させることによる、被検物質の検出方法も提案されている（特許文献2参照）。提案されている手法では、被検物質との複合体形成を磁場の影響下で行うことで、貴金属コート磁性粒子を磁場により移動させ、貴金属の呈色を検出することにより、比較的短い時間で検出が可能である。

しかしながら、磁場によって貴金属コート磁性粒子が検出部分に残存することにより、被検物質がない場合に擬陽性と誤判定される恐れがある。

[0007] 一方、粒子および沈殿試薬を用いて、液相から粒子を遠心分離によって分離し、検出可能な活性を粒子上に残存させることによる、被検物質の検出方法も提案されている（特許文献3参照）。提案されている手法では、被検物質と複合体を形成した粒子を、沈殿試薬を用いて沈殿、遠心分離を行うことにより、臨床化学的分析装置に適用可能な分離、検出が可能である。

しかしながら、沈殿試薬の添加および遠心分離後に検出試薬の添加が必要であり、操作が煩雑となる場合がある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：日本国特許第4 8 4 4 2 6 3 号公報

特許文献2：日本国特許第4 7 9 1 8 6 7 号公報

特許文献3：日本国特許第3 6 8 4 4 5 4 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、試料中の被検物質の検出を迅速且つ簡便に行うことが可能な被検物質の検出システムを提供する。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の第1 態様は、被検物質の検出システムであって、被検物質の結合部位を介して該被検物質と結合することのできる第一物質で修飾された担体と、結合部位とは異なる部位を介して被検物質と結合することのできる第二物質で修飾された標識体とを含む第一層と、外部引力を印加する前には、担体および標識体を含まない第二層と、を備え、外部引力によって担体および被検物質と結合した複合体が、第一層から第二層へ移動可能である。

[0011] 本発明の第2 態様は、上記第1 態様の被検物質の検出システムにおいて、更に、第一層と第二層を分離し、担体および被検物質と結合した複合体が通過可能な分離層を備えていてもよい。

[0012] 本発明の第3 態様は、上記第1 または第2 態様の被検物質の検出システムにおいて、第二層内から発せられるシグナルを検出する検出部を更に備え、標識体は、少なくとも被検物質と結合した状態で発光、および反応可能であってもよい。

[0013] 本発明の第4 態様は、上記第1 から第3 態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、外部引力が、磁力、遠心力、および電気泳動力からなる群から選ばれてもよい。

[0014] 本発明の第5態様は、上記第1から第4態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、第一物質が、抗体、断片化抗体、完全抗原、およびハプテンからなる群から選ばれてもよい。

本発明の第6態様は、上記第1から第5態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、第二物質が、抗体、断片化抗体、完全抗原、およびハプテンからなる群から選ばれてもよい。

[0015] 本発明の第7態様は、上記第2から第6態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、分離層が、オイル、多孔質素材、高分子膜、高分子ゲル、および高濃度溶液からなる群から選ばれてもよい。

[0016] 本発明の第8態様は、上記第1から第7態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、第二層が、オイル、多孔質素材、高分子膜、高分子ゲル、および高濃度溶液からなる群から選ばれてもよい。

[0017] 本発明の第9態様は、上記第1から第8態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、担体が、磁性体、金属、無機物質、有機物質、高分子、およびこれらの組み合わせを含む物質からなる群から選ばれてもよい。

[0018] 本発明の第10態様は、上記第1から第9態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、標識体が、比色物質、発光物質、酸化還元物質、核酸、および酵素からなる群から選ばれてもよい。

[0019] 本発明の第11態様は、上記第1から第10態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、第二層内に、標識体と反応する物質を含んでもよい。

[0020] 本発明の第12態様は、上記第11態様の被検物質の検出システムにおいて、標識体と反応する物質が、基質、化学発光物質、および酸化還元物質からなる群から選ばれてもよい。

[0021] 本発明の第13態様は、上記第3から第12態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、検出部は、所定の波長の光のみを透過する第一フィルタと、第一フィルタを透過した光を検出する検出部とを備え、標識体は、非色物質、発光物質、および酵素からなる群によって標識されていても

よい。

[0022] 本発明の第14態様は、上記第3から第12態様のいずれか一つの被検物質の検出システムにおいて、検出部は、所定の波長の励起光を含んだ光を発する光源と、励起光のみを透過させる第一フィルタと、第一フィルタを透過した励起光を第二層へ照射する光路部材と、励起光を除去する第二フィルタと、第二フィルタを透過した光を検出する検出部とを備え、標識体は、励起光により蛍光を発する蛍光物質によって標識されていてもよい。

[0023] 上記本発明の第1態様によれば、第一層において、被検物質と担体、および標識体とで形成される複合体を外部引力により、容易に第二層に移動できる。外部引力により、担体および上記複合体のみが移動され、未反応の標識体を容易に分離することができる。

[0024] また、第二層において、標識体から発せられるシグナルを検出、あるいは標識体との反応により生じるシグナルを検出することである。外部引力により移動された複合体の検出を特別な操作を必要とせず、検出することができる。

発明の効果

[0025] 上記本発明の態様によれば、試料中の被検物質の高感度な検出を迅速且つ簡便に行うことが可能である。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明の第一の実施形態の被検物質の検出システムの模式図である。

[図2A]本発明の第一の実施形態の検出システムの作用を説明する図である。

[図2B]本発明の第一の実施形態の検出システムの作用を説明する図である。

[図3]本発明の第二の実施形態の被検物質の検出システムの模式図である。

[図4A]本発明の第二の実施形態の検出システムの作用を説明する図である。

[図4B]本発明の第二の実施形態の検出システムの作用を説明する図である。

[図5]参考例1の試験結果を示す図である。

[図6]実施例1の試験結果を示す図である。

[図7]参考例2の試験結果を示す図である。

[図8]実施例2の試験結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0027] (第一実施形態)

本発明の一実施形態の被検物質の検出システムについて説明する。図1は、本実施形態の検出システム1の模式図である。図2A、図2Bは、検出システム1の作用を説明する図である。

[0028] 図1に示すように、検出システム1は、試料中の被検物質10の有無を検出するシステムである。本実施形態においては、生体物質、合成物質等あらゆる物質を被検物質10とすることができる。また、試料としては、例えば血液、血清、尿等の生体由来の試料溶液、これらを調製して得られた溶液等を、任意に用いることができる。

[0029] 検出システム1は、担体2と標識体3とを含む第一層4と、第二層5と、分離層6と、磁力発生部7と、検出部8とを備える。

担体2は、磁性体、金属、無機物質、有機物質、高分子、およびこれらの組み合わせを含む物質からなる群から選ばれる。

担体2の一例を挙げると、磁性体が挙げられる。以下、本実施形態では、担体が磁性体である場合を例に説明する。磁性体は、任意の適切な形状の一つ以上の磁性物質または磁化可能粒子を含み、磁力発生部によって引き付けられる。磁性体のサイズは最大直径が5 nm～100 μmが好ましく、100 nm～10 μmがより好ましい。また、磁性体は、被検物質10の結合部位を介して該被検物質10と結合する第一物質11によって表面修飾されている。なお、第一物質11による磁性体の修飾方法は表面修飾でなくてもよい。

[0030] 磁性体の一例を挙げると、磁性物質と、磁性物質を被覆するポリマー層とを備える磁性ポリマー粒子である。磁性ポリマー粒子は、1個のポリマー粒子に、複数個の磁性粒子が被覆されて存在していてもよい。ポリマー粒子を被覆する磁性粒子としては、水中での微粒子生成が可能なマグネタイトなどのフェライト粒子が好ましい。他方、フェライト以外の磁性粒子としては、

例えば各種磁性金属の微粒子、または各種磁性化合物が用いられ、これらの磁性粒子がそれぞれに有する特徴的な磁氣的性質をさまざまに利用することもできる。

[0031] 第一物質 11 は、抗体、断片化抗体、完全抗原、およびハプテンからなる群から選ばれ、被検物質に応じて選択して採用される。第一物質 11 は、被検物質 10 に対する特異性が高いことが好ましい。例えば、第一物質は、試料中において被検物質 10 に対して結合しやすく、被検物質 10 とは別の物質には結合しにくい。

また、第一物質 11 は、標識体 3 および後述する第二物質 12 に対する特異性が低いことが好ましい。

[0032] 標識体 3 は、比色物質、発光物質、酸化還元物質、核酸、および酵素からなる群から選ばれる標識物質であり、発光物質としては、蛍光分子、リン光分子、化学発光分子、酵素結合分子等が挙げられる。核酸を標識物質とした時の検出方法としては、イムノPCR、インベーター法（登録商標）、Taqman 法、蛍光プローブ法等の核酸検出法が挙げられる。また標識体 3 は、第一物質 11 が結合する部位とは異なる部位を介して被検物質 10 と結合する第二物質 12 によって修飾されている。

第二物質 12 は、第一物質 11 とは異なる物質であり、被検物質 10 における第一物質 11 の結合部位とは異なる部位に結合する。第二物質 12 は、抗体、断片化抗体、完全抗原、およびハプテンからなる群から選ばれ、被検物質 10 に応じて選択して採用される。第二物質 12 は、被検物質 10 に対する特異性が高いことが好ましい。例えば、第二物質 12 は、試料中において被検物質 10 に対して結合しやすく、被検物質 10 とは別の物質には結合しにくい。

また、第二物質 12 は、担体 2 および第一物質 11 に対する特異性が低いことが好ましい。

[0033] 尚、第一層 4 および第二層 5 は、担体 2、標識体 3、および被検物質 10 を分散できれば、いずれの形状でもよく、また物質も特に制限はない。例え

ば、水溶液、オイル、高濃度溶液等を第一層 4、および第二層 5 とすることができる。また、第一層 4、および第二層 5 として、多孔質部材等が採用されてもよい。例えば、高分子ゲル、不織布、濾紙、高分子膜、多孔質膜等を第一層、および第二層とすることもできる。

[0034] また、分離層 6 としては、第一層 4 と第二層 5 を分離でき、担体、標識体、および被検物質 10 による複合体が通過できれば、いずれの形状でもよく、また物質も特に制限はない。例えば、水溶液、オイル、高濃度溶液等を分離層 6 とすることができる。

また、分離層 6 として、多孔質部材等が採用されてもよい。例えば、高分子ゲル、不織布、濾紙、高分子膜、多孔質膜等を分離層 6 とすることもできる。

[0035] 磁力発生部 7 は、担体 2 を第一層 4 から第二層 5 に移動させるため、第二層 5 下に設けられている。磁力発生部 7 は、例えば永久磁石や電磁石である。また磁力発生部 7 は、第二層 5 下において、着脱可能であってもよい。

[0036] 検出部 8 は、標識体 3 の存在を検出する。本実施形態では、検出部 8 は、標識体 3 から発せられるシグナルあるいは標識体 3 との反応により生じるシグナルを検出する。具体的には、所定の波長の光のみを透過する第一フィルタと、第一フィルタを透過した光を検出する検出部とを有する。

[0037] 次に、検出システム 1 の作用について、検出システム 1 を用いた被検物質 10 の検出方法とともに説明する。

まず、被検物質 10 の有無を検出する対象となる試料と、担体 2 および標識体 3 を含んだ第一層 4 で混合する。

試料中に被検物質が含まれている場合には、担体 2 と被検物質 10 とが第一物質 11 を介して結合し、標識体 3 と被検物質 10 とが第二物質 12 を介して結合する。すなわち、担体 2 と標識体 3 とが被検物質 10 を介して結合した状態となる（図 2 A（陽性）参照）。

試料中に被検物質 10 が含まれていない場合には、担体 2 と標識体 3 とを結合させる物質がないので、担体 2 と標識体 3 とは互いに独立して存在して

いる（図 2 B（陰性）参照）。

[0038] ここで、被検物質 10 が担体 2 と標識体 3 との両方に結合している場合（図 2 A（陽性）参照）には、被検物質 10、担体 2、および標識体 3 が複合体を形成して磁力発生部 7 に引き付けられる。その結果、第一層 4 に広がった混合物中に含まれる被検物質 10 は、被検物質 10 に結合した担体 2 により、標識体 3 とともに磁力発生部 7 からの磁力によって第二層 5 に移動する。

これに対して、担体 2 と標識体 3 とが被検物質 10 を介して結合していない場合（図 2 B（陰性）参照）には、担体 2 は磁力発生部 7 からの磁力により引き付けられる。しかし、標識体 3 は磁力の影響を受けずに第一層 4 に存在する。

[0039] また検出部 8 は、第二層 5 において磁力発生部 7 によって引き付けられた標識体 3 から発せられるシグナルを検出する。なお、標識体 3 のうち担体 2 および被検物質 10 に対して結合していないものは、第一層 4 に分散しているため、検出部 8 には検出されない。

[0040] 以上説明したように、本実施形態の検出システム 1 によれば、従来のイムノアッセイ法における煩雑な洗浄操作等を必要とせず、高感度な検出を迅速且つ簡便に得ることができる。

[0041] 次に、本発明の他の実施形態について、上述の実施形態と異なる点を中心に説明する。

[0042] （第二実施形態）

本発明における第二の実施形態の被検物質の検出システム 31 について説明する。図 3 は、本実施形態の検出システム 31 の模式図である。図 4 A、図 4 B は、検出システム 31 の作用を説明するための図である。

[0043] 本実施形態によれば、担体 2、標識体 3、および被検物質 10 を含む第一層 4 と、第二層 5 は混合することなく、互いに独立して存在している（図 3 参照）。また、担体 2 は磁力発生部 7 の磁力によって引き付けられ、第一層 4 から第二層 5 に移動する。

しかしながら磁力発生部 7 の磁力が無い場合には、担体 2 は第一層 4 に存在する。また標識体 3 および被検物質 10 は、磁力発生部 7 の磁力によらず、第一層 4 に存在する。

[0044] 尚、第一層 4 および第二層 5 としては、例えば、第一層 4 を水溶液とし、第二層 5 を高濃度溶液とした組み合わせが挙げられる。

[0045] ここで、被検物質 10 が担体 2 と標識体 3 との両方に結合している場合（図 4 A（陽性）参照）には、被検物質 10、担体 2、および標識体 3 が複合体を形成して磁力発生部 7 に引き付けられる。その結果、第一層 4 に広がった混合物中に含まれる被検物質 10 は、この被検物質 10 に結合した担体 2 により、標識体 3 とともに磁力発生部 7 からの磁力によって第二層 5 に移動する。

これに対して、担体 2 と標識体 3 とが被検物質 10 を介して結合していない場合（図 4 B（陰性）参照）には、担体 2 は磁力発生部 7 からの磁力により引き付けられる。しかし、標識体 3 は磁力の影響を受けずに第一層 4 に存在する。

[0046] また検出部 8 は、第二層 5 において磁力発生部 7 によって引き付けられた標識体 3 から発せられるシグナルを検出する。なお、標識体 3 のうち担体 2 および被検物質 10 に対して結合していない標識体 3 は、第一層 4 に分散しているため、検出部には検出されない。

[0047] （第三実施形態）

本実施形態では、担体 2 を第一層 4 から第二層 5 に移動する手段が上述の実施形態は異なっている。本実施形態では遠心力、あるいは電気泳動力により、担体および担体が結合した被検物質 10 を含む複合体が、第一層 4 から第二層 5 に移動される。磁力によって集積されない。従って、移動した担体 2 および上記複合体が第二層 5 内で分散して存在することができる。

[0048] （第四実施形態）

本実施形態では、第二層 5 内において、標識体 3 と反応する物質を含んだ状態で形成される。反応する物質としては、基質、化学発光物質、および酸

化還元物質等が挙げられる。本実施形態では、標識体 3 と上記物質との反応によるシグナルを検出することにより、標識体 3 が結合した被検物質 10 を含む複合体が、第二層 5 に移動した場合にのみ、検出することができる。すなわち、層位置によらず検出することが可能となることから、検出装置を簡便にすることができる。

[0049] (第五実施形態)

本実施形態では、検出部 8 は、標識体 3 から発せられる蛍光を検出する。具体的には、検出部 3 は、所定の波長の励起光を含んだ光を発する光源、第一フィルタを透過した励起光を第二層 5 へ照射する光路部材、ダイクロイックミラー（励起光のみを透過させる第一フィルタおよび励起光を除去する第二フィルタ）、ならびに第二フィルタを透過した光を検出する検出部を有する。また、本実施形態において、磁力発生部 7 によって第二層 5 に移動された担体 2 および標識体 3 をそれぞれ磁気検出、蛍光検出し、担体 2 と標識体 3 との存在比を算出することができる。

本実施形態では、担体 2 と標識体 3 との使用量を予め既知としておくことにより、被検物質 10 の含有量を定量することができる。

[0050] (第六実施形態)

本実施形態では、上述の実施形態で説明した検出部に代えて、酵素反応を電気化学的に測定する電極およびセンサが設けられている。本実施形態における電極は、銀、金、ステンレス、インジウムスズ酸化物（ITO）等によって形成することができる。

また、本実施形態においても、磁力発生部 7 によって第二層 5 に移動された担体 2 を磁気センサにより定量することができる。なお、本実施形態では、上記電極およびセンサと、上記磁気センサとの少なくとも何れかが設けられていればよい。

[0051] 以上、本発明の実施形態について図面を参照して詳述したが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。

また、上述の各実施形態において示した構成要素は適宜に組み合わせて構成することが可能である。

[0052] 以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。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。

実施例

[0053] 本実施例では、被検物質として前立腺癌のバイオマーカーである前立腺特異抗原（PSA）を用いて、被検物質の検出実験を行った。第1物質としてはPSAを認識するモノクローナル抗体（1H12）を用いた。第2物質としては、PSAの別の部位を認識するモノクローナル抗体（5A6）を用いた。

[0054] 先ず、粒径1 μm の磁性ビーズに対して、第1物質のPSA抗体を結合させ、抗PSA抗体修飾磁性粒子を得た。更に西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）に対して、第2物質の抗PSA抗体を結合させ、HRP修飾抗PSA抗体を得た。同様にアルカリフォスファターゼ（ALP）に対して、第2物質の抗PSA抗体を結合させ、HRP修飾抗PSA抗体を得た。

[0055] （参考例1）

参考例1では上記の抗PSA抗体修飾磁性粒子およびHRP修飾抗PSA抗体を用いて、96穴プレートを用いてPSAの検出を行った。先ず、抗原溶液（PSA濃度：0 ng/mL、1 ng/mL）に対して、抗PSA抗体修飾磁性粒子を加え混合した。混合した溶液を96穴プレートの各ウェルに移した後、96穴プレート用磁石を用いてウォッシングを3回行った。次いで、HRP修飾抗PSA抗体を加え混合した後、同様に96穴プレート用磁石を用いてウォッシングを3回行った。更にHRPの色原性基質として、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン（TMB）溶液を加え混合後、反応停止液として1%塩酸を加え、各ウェルの呈色をプレートリーダー（吸光度：450 nm）にて確認した結果を図5に示す。

[0056] （実施例1）

実施例1では、参考例1と同様に抗PSA抗体修飾磁性粒子およびHRP

修飾抗P S A抗体を用いてP S Aの検出を行った。まず、抗原溶液（P S A濃度：0 n g / m L、1 n g / m L）に対して、抗P S A抗体修飾磁性粒子およびH R P修飾抗P S A抗体を加え混合した。次いで飽和ショ糖溶液とT M B溶液を1：1で混合した混合溶液を、マイクロチューブ内に移し第二層とした。更に抗原、抗P S A抗体修飾磁性粒子、およびH R P修飾抗P S A抗体混合溶液をチューブに加え、第一層とした。第一層および第二層を保持したマイクロチューブに対して遠心分離（6 0 0 0 r p m）を加え、第一層より磁性粒子および複合体の移動を行った後、第二層溶液を9 6穴プレートの各ウェルに移し、反応停止液として1 %塩酸を加え、各ウェルの呈色をプレートリーダー（吸光度：4 5 0 n m）にて確認した結果を図6に示す。

[0057] 参考例1の結果より、抗原の有無（0 n g / m L、1 n g / m L）に対して、吸光度の違いが確認され、抗P S A抗体修飾磁性粒子およびH R P修飾抗P S A抗体を用いて、ビーズアッセイ中でのP S Aの検出が確認された。

[0058] 実施例1の結果より、抗原の有無（0 n g / m L、1 n g / m L）に対して、吸光度の違いが確認され、抗P S A抗体修飾磁性粒子およびH R P修飾抗P S A抗体を用いて、遠心分離により第一層から第二層へ粒子および複合体を移動することでのP S Aの検出が確認された。

[0059] （参考例2）

参考例2では上記の抗P S A抗体およびA L P修飾抗P S A抗体を用いて、9 6穴プレートを用いてP S Aの検出を行った。まず、抗P S A抗体を固定化した9 6穴プレートの各ウェルに対して、5 %スキムミルクを用いてブロッキングを行い、ウォッシングを3回行った後、抗原溶液（P S A濃度：0 n g / m L、0. 0 1 n g / m L、0. 1 n g / m L、1 n g / m L）を加え混合した。反応後ウォッシングを3回行った。次いでA L P修飾抗P S A抗体を加え混合し、反応後同様にウォッシングを3回行った。更にA L Pの化学発光基質としてC S P D + E m e r a l dを加え混合後、各ウェルの化学発光をプレートリーダーにて確認した結果を図7に示す。

[0060] （実施例2）

実施例 2 では、参考例 2 と同様に抗 P S A 抗体修飾磁性粒子および A L P 修飾抗 P S A 抗体を用いて P S A の検出を行った。まず、抗原溶液（P S A 濃度：0 n g / m L、0. 0 1 n g / m L、0. 1 n g / m L、1 n g / m L）に対して、抗 P S A 抗体修飾磁性粒子および A L P 修飾抗 P S A 抗体を加え混合した。次いで飽和シヨ糖溶液と C S P D + E m e r a l d 溶液を 1 : 1 で混合した混合溶液を、マイクロチューブ内に移し第二層とした。更に抗原、抗 P S A 抗体修飾磁性粒子および A L P 修飾抗 P S A 抗体混合溶液をチューブに加え、第一層とした。第一層および第二層を保持したマイクロチューブに対して遠心分離（6 0 0 0 r p m）を加え、第一層より磁性粒子および複合体の移動を行った後、第二層溶液を 9 6 穴プレートの各ウェルに移し、各ウェルの化学発光をプレートリーダーにて確認した結果を図 8 に示す。

[0061] 参考例 2 の結果より、抗原濃度に対して、化学発光強度の変化が確認され、抗 P S A 抗体および A L P 修飾抗 P S A 抗体を用いて、プレート中での P S A の高感度検出が確認された。

[0062] 実施例 2 の結果より、抗原濃度に対して、化学発光強度の違いが確認され、抗 P S A 抗体修飾磁性粒子および A L P 修飾抗 P S A 抗体を用いて、遠心分離により第一層から第二層へ粒子および複合体を移動することでの P S A の高感度検出が確認された。

[0063] 以上の結果が示すように、第一層から第二層へ粒子および複合体を移動することでの抗原の検出が確認され、バックグラウンドおよびシグナルにおいても、ビーズアッセイ及びプレートアッセイでの洗浄を行った場合と同等であることが確認された。これより、通常のイムノアッセイでの煩雑な洗浄工程を行わずに、迅速且つ簡便に抗原を検出することが可能となった。

符号の説明

[0064] 1, 3 1 …検出システム、2 …担体、3 …標識体、4 …第一層、5 …第二層、6 …第二層、7 …磁力発生部、8 …検出部、1 0 …被検物質、1 1 …第一物質、1 2 …第二物質

請求の範囲

- [請求項1] 被検物質の結合部位を介して前記被検物質と結合することのできる第一物質で修飾された担体と、前記結合部位とは異なる部位を介して前記被検物質と結合することのできる第二物質で修飾された標識体とを含む第一層と、
- 外部引力を印加する前には、担体および標識体を含まない第二層と、を備え、
- 外部引力によって前記担体および前記被検物質と結合した複合体が、前記第一層から前記第二層へ移動可能である、被検物質の検出システム。
- [請求項2] 更に、前記第一層と前記第二層とを分離し、前記担体および前記被検物質と結合した複合体が通過可能な分離層を備える、請求項1に記載の被検物質の検出システム。
- [請求項3] 前記第二層内から発せられるシグナルを検出する検出部を更に備え、
- 前記標識体は、少なくとも前記被検物質と結合した状態で発光および反応が可能である、請求項1または2に記載の被検物質の検出システム。
- [請求項4] 前記外部引力が、磁力、遠心力、および電気泳動力からなる群から選ばれる、請求項1～3のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。
- [請求項5] 前記第一物質が、抗体、断片化抗体、完全抗原、およびハプテンからなる群から選ばれる、請求項1～4のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。
- [請求項6] 前記第二物質が、抗体、断片化抗体、完全抗原、およびハプテンからなる群から選ばれる、請求項1～5のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。
- [請求項7] 前記分離層が、オイル、多孔質素材、高分子膜、高分子ゲル、およ

び高濃度溶液からなる群から選ばれる、請求項 2 ～ 6 のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。

[請求項8] 前記第二層が、オイル、多孔質素材、高分子膜、高分子ゲル、および高濃度溶液からなる群から選ばれる、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。

[請求項9] 前記担体が、磁性体、金属、無機物質、有機物質、高分子、およびこれらの組み合わせを含む物質からなる群から選ばれる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。

[請求項10] 前記標識体が、比色物質、発光物質、酸化還元物質、核酸および酵素からなる群から選ばれる、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。

[請求項11] 前記第二層内に、前記標識体と反応する物質を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。

[請求項12] 前記標識体と反応する物質が、基質、化学発光物質、および酸化還元物質からなる群から選ばれる、請求項 11 に記載の被検物質の検出システム。

[請求項13] 前記検出部は、所定の波長の光のみを透過する第一フィルタと、前記第一フィルタを透過した光を検出する検出部とを備え、

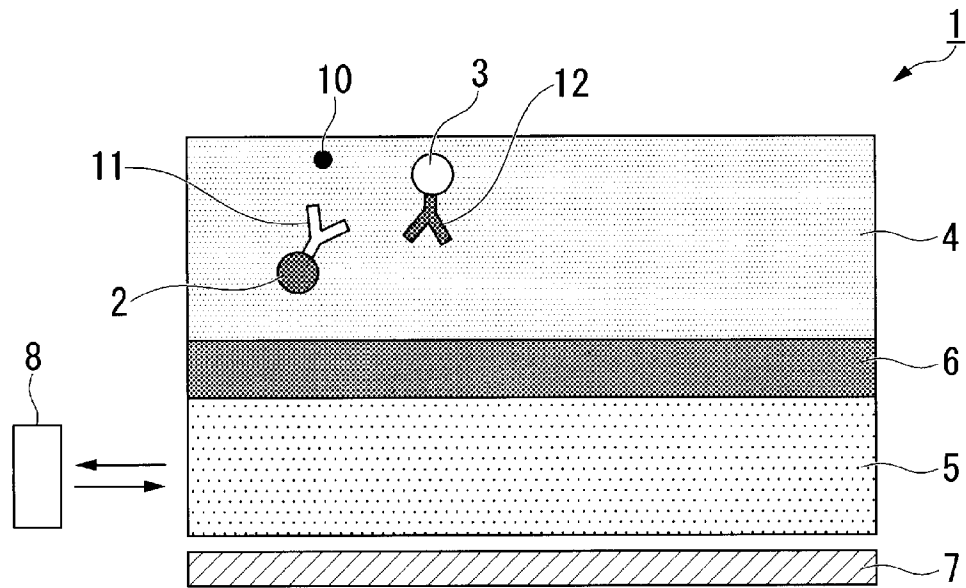
前記標識体は、非色物質、発光物質、および酵素からなる群によって標識されている請求項 3 ～ 12 のいずれか一項に記載の被検物質の検出システム。

[請求項14] 前記検出部は、所定の波長の励起光を含んだ光を発する光源と、前記励起光のみを透過させる第一フィルタと、前記第一フィルタを透過した前記励起光を前記第二層へ照射する光路部材と、前記励起光を除去する第二フィルタと、前記第二フィルタを透過した光を検出する検出部とを備え、

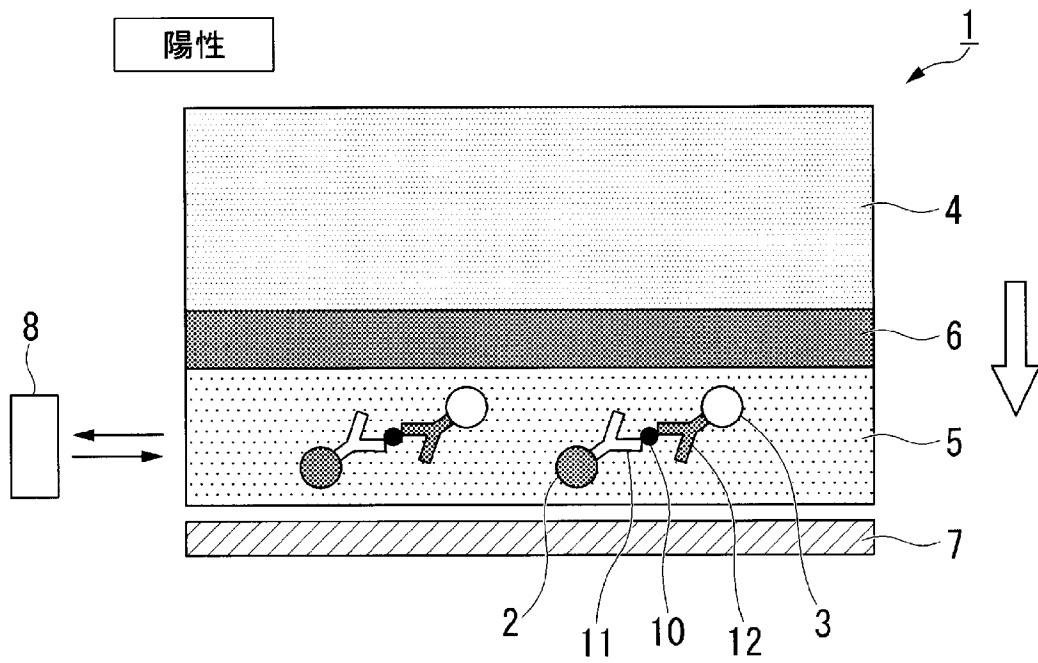
前記標識体は前記励起光により蛍光を発する蛍光物質によって標識されている、請求項 3 ～ 12 のいずれか一項に記載の被検物質の検出

システム。

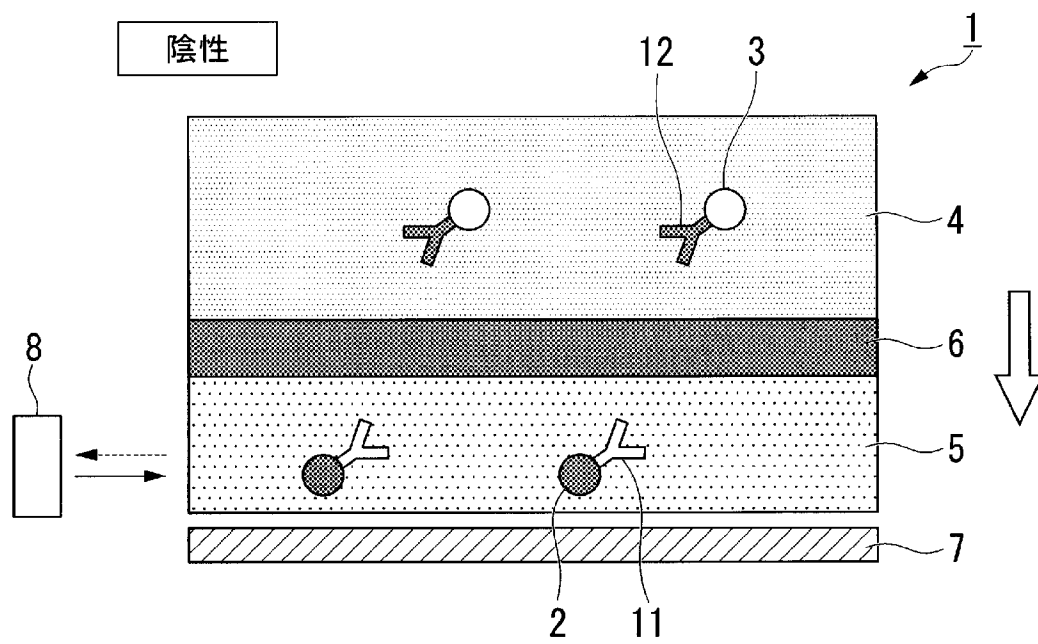
[図1]



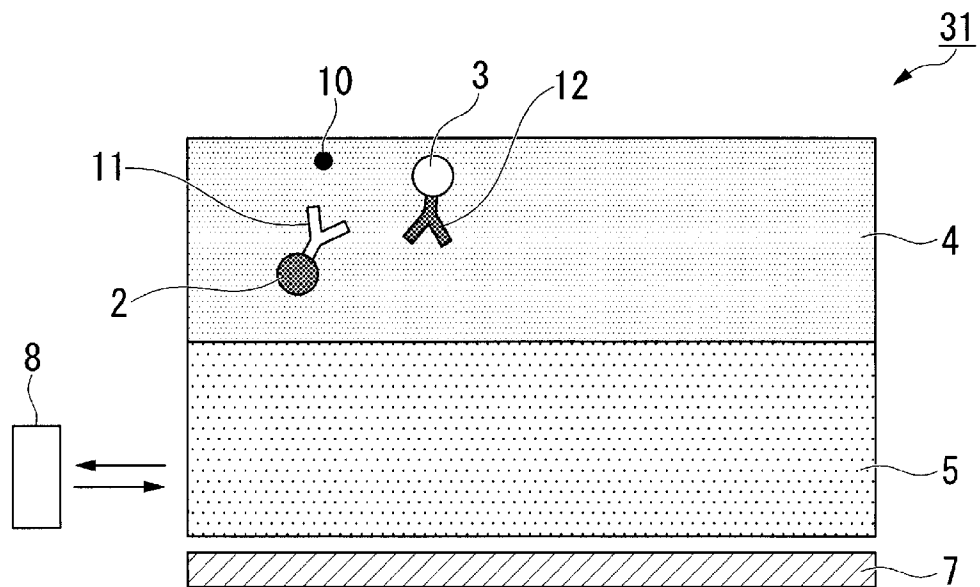
[図2A]



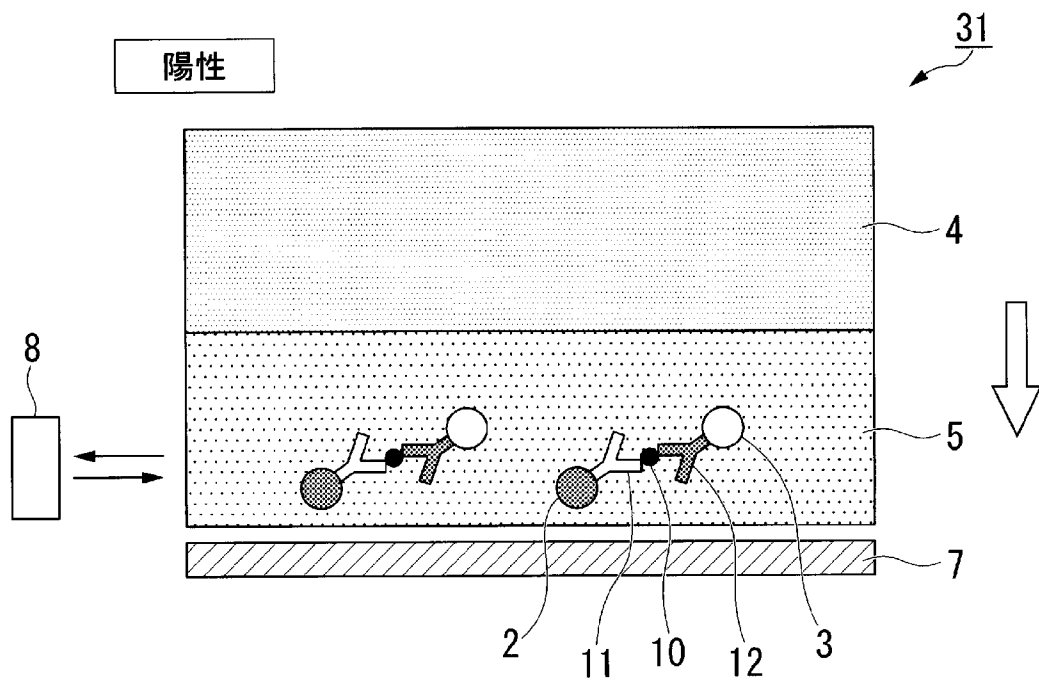
[図2B]



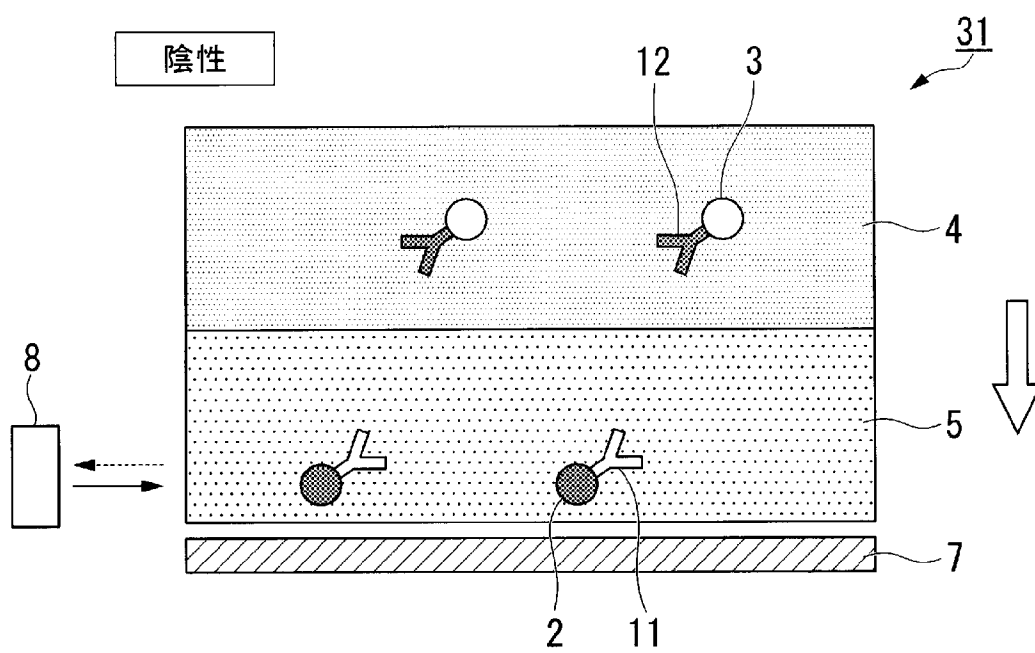
[図3]



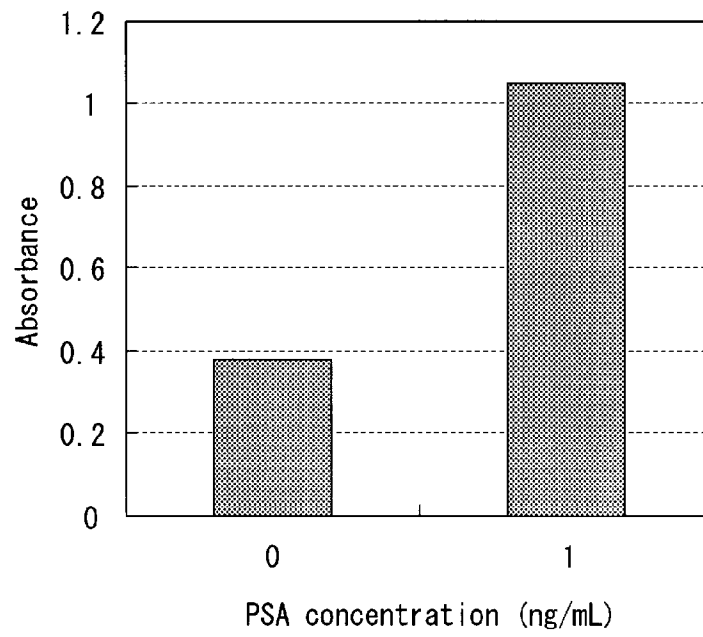
[図4A]



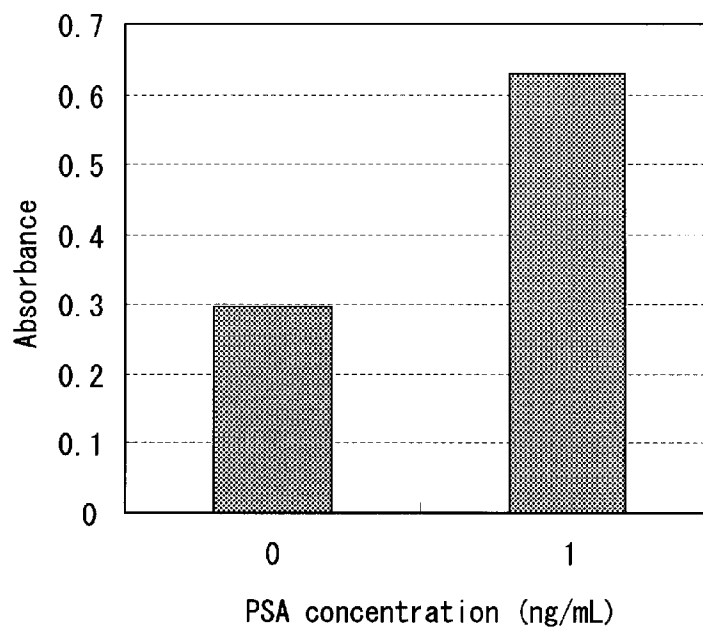
[図4B]



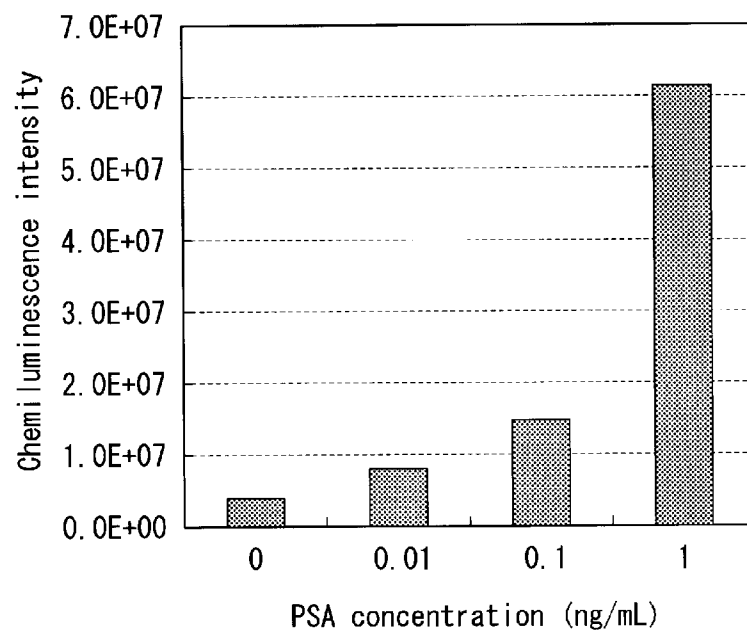
[図5]



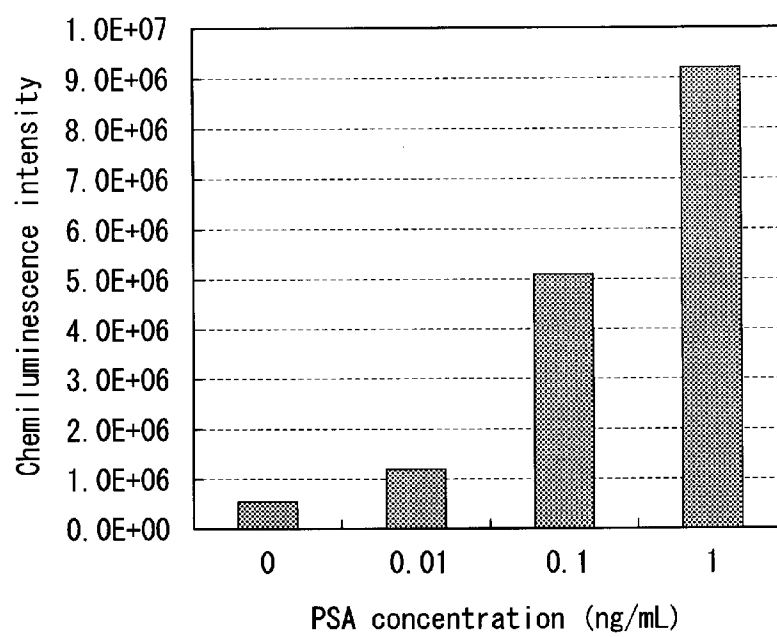
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/075363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(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)

G01N33/543, G01N33/553

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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/Y	JP 62-501647 A (Labsystems Oy), 02 July 1987 (02.07.1987), entire text; all drawings; particularly, claims; page 2, upper right column, line 23 to page 3, upper left column, line 12; fig. 1 to 10 & EP 214167 A & WO 1986/004684 A1	1, 3-6, 8-12/ 13, 14

☒ 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
19 December 2014 (19.12.14)

Date of mailing of the international search report
06 January 2015 (06.01.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/075363

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 01-500688 A (Unilever N.V.), 09 March 1989 (09.03.1989), entire text; all drawings; particularly, claims; page 3, upper right column, line 1 to lower right column, line 15; page 8, upper left column, lines 6 to 16; page 8, lower right column, line 13 to page 10, upper right column, line 10; fig. 1, 2 & EP 270206 A1 & WO 1988/001744 A1 & AU 7857587 A	1, 3-6, 8-12/ 13, 14
X/Y	JP 2010-518398 A (Lyzer Diagnostics, Inc.), 27 May 2010 (27.05.2010), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0046], [0056]; fig. 9 to 14 & US 2008/0230388 A1 & EP 2115455 A1 & WO 2008/097803 A1 & CN 101680865 A & CA 2714024 A & AU 2008214063 A & AT 546731 T	1-12/13, 14
Y	JP 2012-189453 A (Toppan Printing Co., Ltd.), 04 October 2012 (04.10.2012), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0012], [0036] (Family: none)	13, 14
A	JP 4844263 B2 (Shimadzu Corp.), 28 December 2011 (28.12.2011), entire text & JP 2008-12490 A	1-14
A	JP 4791867 B2 (Hitachi Maxell, Ltd.), 12 October 2011 (12.10.2011), entire text; all drawings; particularly, fig. 7 & JP 2006-308572 A	1-14
A	JP 3684454 B2 (Dade Behring Marburg GmbH), 17 August 2005 (17.08.2005), entire text & JP 8-220095 A & US 6143575 A & EP 713094 A1 & DE 4440487 A & DE 59510050 D & AU 3775195 A & AT 213330 T & ES 2172547 T & AU 705684 B & CA 2162660 A1	1-14
A	JP 08-211061 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 20 August 1996 (20.08.1996), entire text; all drawings (Family: none)	1-14

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
Int.Cl. G01N33/543(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（I P C））

Int.Cl. G01N33/543, G01N33/553

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 62-501647 A（ラブシステムズ オイ）1987.07.02, 全文・全図、特に、請求の範囲、第2頁右上欄第23行－第3頁左上欄12行、F i g . 1－10等参照 & EP 214167 A & WO 1986/004684 A1	1, 3-6, 8-12 /13, 14

☒ 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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
1 9 . 1 2 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日
0 6 . 0 1 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（I S A / 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）	2 J	4 0 7 5
草川 貴史		
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
X/Y	JP 01-500688 A (ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノートシヤープ) 1989.03.09, 全文・全図、特に、請求の範囲、第3頁右上欄第1行ー右下 欄第15行、第8頁左上欄第6行ー16行、右下欄第13行ー第10頁右 上欄第10行、F i g. 1, 2等参照 & EP 270206 A1 & WO 1988/001744 A1 & AU 7857587 A	1, 3-6, 8-12 /13, 14
X/Y	JP 2010-518398 A (ライザー ダイアグノスティックス, インコーポレテ ッド) 2010.05.27, 全文・全図、特に、段落【0046】、【0056】、【図 9】ー【図14】等参照 & US 2008/0230388 A1 & EP 2115455 A1 & WO 2008/097803 A1 & CN 101680865 A & CA 2714024 A & AU 2008214063 A & AT 546731 T	1-12/13, 14
Y	JP 2012-189453 A (凸版印刷株式会社) 2012.10.04, 全文・全図、特に、 【特許請求の範囲】、段落【0012】、【0036】等参照 (ファミリーなし)	13, 14
A	JP 4844263 B2 (株式会社島津製作所) 2011.12.28, 全文等参照 & JP 2008-12490 A	1-14
A	JP 4791867 B2 (日立マクセル株式会社) 2011.10.12, 全文・全図、特に【図 7】等参照 & JP 2006-308572 A	1-14
A	JP 3684454 B2 (デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼルシャフト・ミツ ト・ベシユレンクテル・ハフツング) 2005.08.17, 全文等参照 & JP 8-220095 A & US 6143575 A & EP 713094 A1 & DE 4440487 A & DE 59510050 D & AU 3775195 A & AT 213330 T & ES 2172547 T & AU 705684 B & CA 2162660 A1	1-14
A	JP 08-211061 A (オリンパス光学工業株式会社) 1996.08.20, 全文・全図 等参照 (ファミリーなし)	1-14