

(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
2017 年 3 月 2 日(02.03.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/033922 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/416 (2006.01) *G01N 27/414* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/074493
- (22) 国際出願日: 2016 年 8 月 23 日(23.08.2016)
- (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 2015-164466 2015 年 8 月 24 日(24.08.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 坂田 利弥(SAKATA, Toshiya); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宮澤 雄弥(MIYAZAWA, Yuya); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 前川 侑毅(MAEKAWA, Yuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 南条 雅裕, 外(NANJO, Masahiro et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂 9-7-2-1416 東京 A C T i 国際特許事務所 Tokyo (JP).

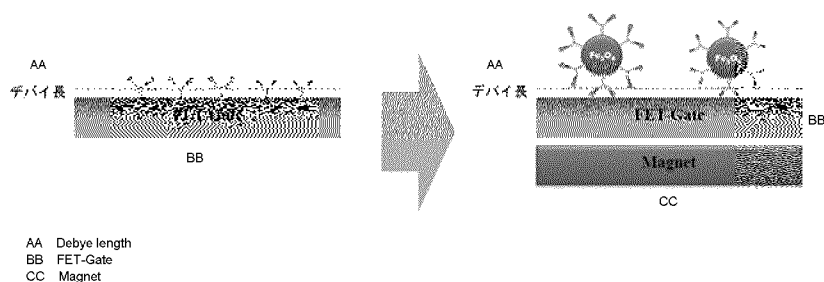
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, 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: METHOD OF DETECTING TARGET SUBSTANCE USING FIELD-EFFECT TRANSISTOR

(54) 発明の名称: 電界効果トランジスタを用いた目的物質の検出方法



(57) Abstract: [Problem] To provide a novel method for detecting the presence or absence of a target substance in a test sample, using a field-effect transistor. [Solution] Provided is a method characterized by including: (a) a step in which a complex including magnetic particles and a factor which binds specifically to the target substance is brought into contact with a test sample in a solvent; (b) a step in which, after step (a), the solvent is removed and the complex is dispersed in water having a specific resistance of at least 1 MΩ·cm; (c) a step in which, after step (b), the electrical characteristics of the complex are measured using the field-effect transistor or while a magnetic force is used to bring the complex into close contact with the surface of the gate electrode of the field-effect transistor; and (d) a step in which the presence or absence of the target substance in the test sample is detected by comparing the electrical characteristics measured in (c) with electrical characteristics obtained in a control experiment in which the complex is not brought into contact with the target substance.

(57) 要約:

[続葉有]



【課題】 電界効果トランジスタを用いて、被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出する新規な方法を提供する。 【解決手段】 (a) 溶媒中で、前記目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体と、被験試料とを接触させるステップ； (b) ステップ (a) の後、前記溶媒を除去し、前記複合体を比抵抗が $1\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上の水に分散させるステップ； (c) ステップ (b) の後、磁力により、前記複合体を前記電界効果トランジスタのゲート電極表面に密着させながら、前記複合体の電気的特性を前記電界効果トランジスタで測定するステップ； (d) (c) において測定される電気的特性を、前記複合体を目的物質と接触させない場合の対照実験における電気的特性と比較することにより、前記被験試料中の前記目的物質の存在・不存在を検出するステップ、を含むことを特徴とする、方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：電界効果トランジスタを用いた目的物質の検出方法 技術分野

[0001] 本発明は、電解効果トランジスタを用いて、被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出する方法、および、その方法を実施するための装置に関する。

背景技術

[0002] 電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor, FET) は、p型半導体上にn型半導体でドレインとソースを形成し、p型半導体のチャネル上をケイ素酸化物で絶縁してゲートを形成したもので、ゲートに与える電位によってチャネルに電子空乏層を生じ、ドレインとソースの間に流れる電流を変化させることができる。

[0003] 抗原抗体反応を検出するFETセンサについてはこれまでも研究がなされているが、良好な結果は得られていない。これまで検討されてきた、抗原抗体反応を検出するFETセンサ (Immuno-FET) は、ゲート絶縁膜表面に抗体もしくは抗原を固定化し、抗原抗体複合体が形成されるとゲート絶縁膜表面の電荷が変化し、ソース・ドレイン間の電気伝導性の変化が生じ、その変化をFETで検出するという構想に基づくものであった。しかし、抗体の典型的な大きさは約10nmであるのに対し、生理学的塩溶液中でのゲート絶縁膜表面におけるデバイ長は約1nmであるため、抗体をゲート絶縁膜表面に固定化すると、溶液中の抗原はデバイ長の外で抗体と結合することになり、抗原の電荷はカウンターイオンによって遮蔽され、原理的にFETで検出することが困難となっていた (本願の図1も参照のこと)。

[0004] 本発明者らは、上記課題を解決する方法として、抗体を、VH領域とVL領域とに分割して使用し、VH領域を含むペプチドとVL領域を含むペプチドと目的物質とからなる複合体を形成させ、この複合体を電解効果トランジスタセンサにより測定することによって、抗原・抗体の複合体を、二次抗体

などを使用することなく直接、電界効果トランジスタを用いて検出する方法を提案している（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献１：特開２００９－１３３８００

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上記特許文献１に記載の発明は、実現困難と考えられてきた抗原抗体反応を検出するFETセンサを、世界に先駆けて開発した点において画期的なものであるが、ある目的物質を検出するために、その目的物質に対応する抗体の抗原結合断片を準備する必要があった。また、目的物質のエピトープの位置によっては、タンパク質の立体構造により、デバイスが捉えるべき電荷の変化がデバイ長の外で起きてしまう場合もあり、そのような場合には安定した測定を行うことができなかった。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、抗原抗体反応を検出するFETセンサの利用可能性をさらに高めるために、既存の抗体（例えば、ある目的物質に対する市販のモノクローナル抗体）を利用した、抗原抗体反応を検出するFETセンサの開発に取り組んだ。その結果、本発明者らは磁性粒子の表面に目的物質に特異的に結合する抗体を結合させた複合体を作成し、磁力によって当該複合体をゲート電極表面に密着させることにより、FETセンサで全長抗体の抗原抗体反応を検出することに成功した（本願の図１のイメージ図も参照のこと）。

[0008] 本明細書において、磁性粒子の表面に目的物質に特異的に結合する因子を結合させた複合体を作成し、磁力によって当該複合体をゲート電極表面に密着させることにより、FETセンサで当該因子と目的物質との結合を検出する方法を、Molecular Charge Contact法（MCC法）と呼ぶことがある。

[0009] また、FETセンサは対象物の電気的特性の変化を検出するものであるから、常法に従えば、対象物が（電気を通す性質を有する）緩衝液中に存在する状態で測定を行う。しかし、本発明者らは、実験の過程において、緩衝液に含まれる様々なイオンが、FETセンサを用いた対象物の電気的特性の変化の検出感度を低下させる原因となっている可能性、すなわち緩衝液に含まれるさまざまなイオンが、デバイス外で検出したい抗原の電荷と対になり、結果として検出感度を下げている可能性に気付いた。

[0010] 本発明の方法において用いる磁性粒子と抗体との複合体は、それ自体が水中で荷電粒子となり、水溶液に電気を通す特性を有する。そこで、本発明者らは、本発明の方法において、測定対象物のみが純水中に存在する低イオン濃度の状態で測定を行ってみたところ、驚くべきことに、対象物が緩衝液中に存在する状態で測定した場合と比較して、目的物質の検出限界濃度が飛躍的に低下し、検出感度も数十倍に上昇した（本願の実施例を参照のこと）。これらの知見から、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち本発明は、一実施態様において、電界効果トランジスタを用いて被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出する方法であって、

（a）溶媒中で、前記目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体と、被験試料とを接触させるステップ、

（b）ステップ（a）の後、前記溶媒を除去し、前記複合体を比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水に分散させるステップ、

（c）ステップ（b）の後、磁力により、前記複合体を前記電界効果トランジスタのゲート電極表面に密着させながら、前記複合体の電気的特性を前記電界効果トランジスタで測定するステップ、および、

（d）ステップ（c）において測定される電気的特性を、前記複合体を目的物質と接触させない場合の対照実験における電気的特性と比較することにより、前記被験試料中の前記目的物質の存在・不存在を検出するステップ、を含むことを特徴とする、方法に関する。

[0012] 本発明の一実施態様においては、前記「比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水」

が、比抵抗が $1.5\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水であることを特徴とする。

[0013] 本発明の一実施態様においては、前記「目的物質に特異的に結合する因子」が、前記目的物質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、もしくは、前記目的物質に特異的に結合する核酸であることを特徴とする。

[0014] 本発明の一実施態様においては、前記目的物質がビオチンであり、前記「目的物質に特異的に結合する因子」がストレプトアビジンであることを特徴とする。

[0015] 本発明の一実施態様においては、前記電解効果トランジスタのゲート表面が、溶液中において表面官能基を生じるように表面処理されていることを特徴とする。

[0016] 本発明の一実施態様においては、前記電界効果トランジスタのゲート電極表面が、酸化物または窒化物でコーティングされていることを特徴とする。

[0017] 本発明の一実施態様においては、前記酸化物または窒化物が、酸化タンタル、酸化アルミニウム、窒化ケイ素、酸化チタン、または、酸化ケイ素であることを特徴とする。

[0018] 本発明の一実施態様においては、前記電界効果トランジスタのゲート電極表面が、溶液中で表面官能基を実質的に生じない金属でコーティングされている場合、溶液中で、前記ゲート電極表面に表面官能基が生じるように、さらに表面処理されていることを特徴とする。

[0019] 本発明の一実施態様においては、前記金属が、金または白金であることを特徴とする。

[0020] 本発明の一実施態様においては、前記電界効果トランジスタが *Ion Sensitive FET* であることを特徴とする。

[0021] 本発明の他の実施形態は、被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出するための装置であって、

電界効果トランジスタ、

前記目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体、および

、

前記複合体を前記電界効果トランジスタのゲート電極表面に引き寄せるための磁力発生源を備え、

前記装置は、磁力によって、前記複合体を前記電界効果トランジスタのゲート電極表面に密着させながら前記複合体の電気的特性を測定し、測定された電気的特性を、前記複合体を目的物質と接触させない場合の対照実験における電気的特性と比較することにより、前記被験試料中の前記目的物質の存在・不存在を検出し、

前記測定は、前記複合体が、比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水中に存在する状態で行われることを特徴とする、装置に関する。

[0022] 以上述べた、本発明の一又は複数の特徴を任意に組み合わせた発明も、本発明の範囲に含まれる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図1は、従来想定されていた Immuno-FET と、本発明の一実施形態における Immuno-FET の模式図を示す。

[図2]図2は、本発明の一実施形態である、ビオチンーストレプトアビジン系を用いたMCC法の実験概要の模式図を示す。

[図3]図3は、本発明の一実施形態である、ビオチンーストレプトアビジン系を用いたMCC法（純水中で測定）の実験結果を示す。

[図4]図4は、ビオチンーストレプトアビジン系を用いたMCC法（緩衝液中で測定）の実験結果を示す。

[図5]図5は、磁性粒子上での抗原抗体反応の模式図と、本発明の一実施形態である、抗原抗体反応系を用いたMCC法の実験結果を示す。

発明を実施するための形態

[0024] 本発明の方法においては、電界効果トランジスタ（ $\text{Field Effect Transistor}$, FET ）を用いて被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出する。電界効果トランジスタは、 p 型半導体上に n 型半導体でドレインとソースを形成し、 p 型半導体のチャネル上をケイ素酸化物

で絶縁してゲートを形成したもので、金属酸化半導体（Metal Oxide Semiconductor, MOS）構造を持ったトランジスタの一種である。FETは、ゲートに与える電位によってチャネルに電子空乏層を生じ、ドレインとソースの間に流れる電流を変化させることができる。本発明において用いる電解効果トランジスタは、例えばIon Sensitive Field Effect Transistor（ISFET）であってよい。

[0025] 本発明の方法においては、溶媒中で、目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体と、被験試料とを接触させるステップを含む。本ステップにおいて、溶媒の種類は限定されず、結合反応の種類に応じて当業者が適宜選択することができる。例えば、本ステップにおいて用いられる溶媒は緩衝液であってもよく、純水または超純水であってもよい。また、複合体と目的物質との反応条件も、それぞれの因子の性質に応じて、当業者が適宜選択することができる。

[0026] 本発明における、「目的物質」と「目的物質に特異的に結合する因子」との組み合わせは、特異的に結合する2種類の物質／因子の組み合わせ（あるいは2種類以上の物質／因子の組み合わせ）であってよく、これまで知られている様々な物質／因子の組み合わせを利用することができる。また、本発明において用いられる、ある1つの「目的物質」と「目的物質に特異的に結合する因子」との組み合わせは、その組み合わせを逆にしても本発明に適用可能である（例えば、「目的物質」が”A”、「目的物質に特異的に結合する因子」が”B”である場合に、「目的物質」を”B”、「目的物質に特異的に結合する因子」を”A”としても利用可能である）。

[0027] 例えば、「目的物質に特異的に結合する因子」としては、目的物質に特異的に結合する抗体（例えば、目的物質に特異的に結合するモノクローナル抗体）またはその抗体結合断片、もしくは、目的物質に特異的に結合する核酸（例えば、目的とする核酸に相補的な配列を有する核酸）を用いることができる。また、これまでに知られているタンパク質間の特異的な相互作用（例

例えば、ビオチン－streptavidinの組み合わせ、受容体－リガンド（またはアゴニスト）の組み合わせ、酵素－基質の組み合わせ）、特定の分子と特異的に結合するアプタマー（例えば、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー）、化合物間の特異的な相互作用（例えば、グルコースとフェニルボロン酸）、特定の分子と特異的に結合可能なように製造された分子鑄型ポリマー等も本発明に適用することが可能である。

[0028] 本発明において用いる磁性粒子の素材は、様々な種類のものを使用可能であるが、例えばマグネタイト (Fe_3O_4)、各種フェライト (XFe_2O_4 、 $\text{X}=\text{Mn}$ 、 Co 、 Ni 、 Mg 、 Cu 、 $\text{Li}_{0.5}$ 、 $\text{Fe}_{0.5}$ など)、三酸化二鉄 (Fe_2O_3) などから選択することができる。

[0029] 本発明において用いる「目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体」は、「目的物質に特異的に結合する因子」と磁性粒子とを、直接または間接的に結合させたものであってよい。「目的物質に特異的に結合する因子」と磁性粒子との結合形式は特に限定されず、「目的物質に特異的に結合する因子」の性質や、用いる磁性粒子の性質に応じて、当業者が適切な方法で結合させてよい。例えば、本願の実施例において行ったように、磁性粒子の表面に、スペーサー（本願実施例ではカルボン酸基修飾磁性粒子及びジアミノデカンを使用）を介して「目的物質に特異的に結合する因子」を結合させる方法や、例えば、streptavidinが直接的または間接的に結合した磁性粒子を準備しておき、ビオチン化された「目的物質に特異的に結合する因子」（例えば、ビオチン標識抗体）を結合させる方法によって、本発明において用いる「目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体」を準備することができる。

[0030] 本発明の方法では、磁力によって、「目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体」を電解効果トランジスタのゲート表面に密着させることにより、「目的物質」と、「目的物質に特異的に結合する因子」との結合によって生じる電気的特性の変化を測定することが可能となる。本発明において用いられる「磁力」の発生方法は限定されず、例えば磁石や電磁石

を用いることができる。

[0031] 本発明においては、電解効果トランジスタによる電気的特性の測定対象である”複合体”が、比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水中に存在する状態で測定が行われる。本明細書においては、比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水を「純水」、比抵抗が $1.5\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水を「超純水」と呼ぶことがある。本発明において用いる「純水」や「超純水」は、実験用に市販されているものを用いてもよく、市販の純水製造装置や超純水製造装置を用いて製造した水を用いてもよい。本発明において用いる「純水」や「超純水」を製造するための装置の水精製の原理は限定されず、例えばイオン交換樹脂や逆浸透膜、もしくはこれらの組み合わせによって水を精製するものであってよい。

[0032] 本発明の一実施態様においてはIon Sensitive FETを用いる。Ion Sensitive FETでは、その測定原理の前提として、ゲート電極表面にイオンの層が形成される必要がある（例えば、ゲート表面をタンタルオキサイドでコーティングする場合、ゲート表面が溶液（水、緩衝液等）に接触すると、コーティングされた表面に水酸基（すなわち、表面官能基）が生じ、その水酸基が溶液中の水素イオンを捉え、イオンの層が生じる）。そして、ゲート電極表面に形成されたイオンの層に対して（荷電粒子を有する）物質が接触することにより、ゲート電極表面において電気的な変化が生じる。ゲート電極表面において生じる電気的な変化は、接触する物質の電気的な状態（例えば、他の物質との結合の有無）によって異なるため、測定対象物において測定された値と、その測定対象物について電気的な状態の変化が起こる前のもの（すなわち、コントロール）において測定された値とを比較することにより、その物質の電気的な状態の変化の有無を検出することができる。

[0033] すなわち、本発明の方法において用いる電界効果トランジスタのゲート電極表面は、本発明の方法に使用可能なものであれば、どのように加工されたものであってもよいが、例えば、電界効果トランジスタのゲート電極表面が、溶液中（例えば、水中、緩衝液中）において表面官能基を生じるように表

面処理されているものを好適に用いることができる。そのような表面処理の例としては、酸化物または窒化物（より具体的には、金属酸化物または金属窒化物）による表面コーティングを挙げることができ、より好ましくは、酸化タンタル、酸化アルミニウム、窒化ケイ素、酸化チタン、または、酸化ケイ素による表面コーティングを用いることができる。

[0034] また、一般的に電解効果トランジスタのゲート表面として用いられる金属のうち、溶液中で表面官能基を実質的に生じないもの（例えば、金、白金等）を用いる場合であっても、水酸基、カルボキシル基等の官能基によって表面をさらに修飾することによって、あるいは、溶液中で表面官能基を生じる物質（例えば、酸化物、窒化物、ポリマー等の有機物）をさらにコーティングすることによって、本発明に用いることができる。金属表面への官能基の修飾方法は特に限定されず、当業者が公知の方法を用いて適宜行うことができる。

[0035] 本明細書において用いられる用語は、特に定義されたものを除き、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0036] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

[0037] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0038] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載

される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0039] 実施例 1 : ビオチン-ストレプトアビジン系を用いた MCC 法 (超純水中で測定)

[0040] 本発明者らは、まず、抗原 - 抗体反応系を用いた MCC 法のモデルとして、ビオチン-ストレプトアビジン系を用いた MCC 法を用いて実験を行った。

[0041] (1) 磁性ビーズの表面をアミノ基で修飾

本実施例では、表面にカルボン酸基を有する $\phi 1 \mu\text{m}$ の磁性ビーズ ($7 - 12 \times 10^9 \text{ beads/ml}$, Dynabeads MyOne Carboxylic Acid、インビトロジェン社から購入) を使用した。磁性ビーズを含む $50 \mu\text{l}$ 溶液をマイクロチューブに分散させ、脱イオン水で 2 回洗浄した。磁石を用いて磁性ビーズを引き寄せながら、上清を除去した。6 mM WSC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Dojindo Laboratories Co., Ltd.) を含む、熱した脱イオン水に、ジアミノデカン (1, 10-diaminodecane, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) を飽和濃度で溶解させることにより、ジアミノデカン溶液を準備した。100 μl の前記ジアミノデカン溶液に磁性ビーズを溶解させ、50°C で 1 晩静置することによって、磁性ビーズ表面へのアミノ基の修飾を行った。そして、磁石によって前記磁性ビーズを集め、室温で、脱イオン水で 2 回洗浄することによって、残留試薬を除去した。

[0042] この段階における磁性ビーズは、磁性ビーズ表面のカルボン酸基に、ジアミノデカンの有する 2 つのアミノ基のうち 1 つが結合しており、結合に使われていないもう 1 つのアミノ基がフリーになっている。

[0043] (2) 磁性ビーズ上へのビオチンの固定化

60 mM WSC を含む脱イオン水にビオチン ((+)-Biotin, Wako Co., L

td.) を溶解させることによって、0.9 mMの濃度のビオチン溶液を準備した。(1) で準備した磁性ビーズを、前記のビオチン溶液500 μ l中に溶解させ、50℃で1晩静置することによって、磁性ビーズ表面のアミノ基へビオチンを固定化した。そして、磁石によって前記磁性ビーズを集め、室温で、脱イオン水で2回洗浄することによって、固定化されなかったビオチンを除去した。

[0044] (3) 磁性ビーズ上でのビオチン-ストレプトアビジン反応

磁性ビーズのビオチン化された表面で、ビオチン-ストレプトアビジン反応を行った。ビオチン化された表面を有する磁性ビーズを、52.2 μ g/mlのストレプトアビジン(streptavidin, Wako Co., Ltd.)を含む1437 μ lのリン酸緩衝液食塩水(PBS pH 7.4 (1x), gibco)に溶解させた。そして、ビオチン化された表面を有する磁性ビーズを含むPBSを、室温で30分インキュベートし、ビオチンとストレプトアビジンとを反応させた。反応後、磁石によって前記磁性ビーズを引き寄せたまま、室温で、PBSおよび脱イオン水で洗浄した。

[0045] 本実施例においては、ここで調製されたビオチン化磁性ビーズ-ストレプトアビジン複合体(本実施例において、サンプル磁性ビーズと呼ぶことがある)が、本発明における「目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体」に該当する。ストレプトアビジンは4量体を形成しており、4分子のビオチンと結合する能力を有するため、ビオチン化された磁性ビーズに結合した後も、さらなるビオチンと結合する能力を有している(図2を参照のこと)。

[0046] (4) ビオチン化磁性ビーズ-ストレプトアビジン複合体とビオチンとの反応

(3) で調製したビオチン化磁性ビーズ-ストレプトアビジン複合体(サンプル磁性ビーズ)は、50 μ lのPBS(-)で分散させることで原液濃度($7-12 \times 10^9$ beads/ml)へと濃度調整し、1サンプル4 μ l分になるようマイクロチューブへ分注した。反応させるビオチンは、PB

S (－) を使って 0.9 mM、0.9 μ M、0.9 nM、0.9 pM、0.9 fM、90 aM、9 aM、0.9 aM の濃度で、それぞれ調製した。

[0047] 磁石でサンプル磁性ビーズを引き寄せながら、分注したサンプル磁性ビーズの上清液を除いた後、各濃度のビオチン PBS (－) 溶液 115 μ l を、4 μ l 分のサンプル磁性ビーズの入ったマイクロチューブにそれぞれ添加し、ピペティングで攪拌した後、室温で 30 分間反応させた。反応後は、サンプル磁性ビーズを磁石で引き寄せながら、PBS (－) で、室温下条件で、サンプル磁性ビーズを 2 回洗浄し、未反応のビオチンを洗い流した。洗浄後、測定に使用するまでサンプル磁性ビーズは乾燥を防ぐため超純水中に浸した。

[0048] (5) Molecular Charge Contact (MCC) 法によるビオチン - ストレプトアビジン反応の測定

MCC 法による電気シグナル測定には、ネルンスト応答が確認できる市販の N チャネルディプレッション型の Ion Sensitive FET チップ (ISFET COM Co., Ltd.) を用いた。FET チップのゲート構造としては、絶縁膜が Ta₂O₅/SiO₂ の積層構造になっており、膜厚はトータルで約 120 nm となっている。測定の際、FET のゲートセンシング部 (10 × 340 μ m) が 400 μ l の測定液に浸せるようガラスリング (内径 10 mm、厚さ 1 mm) をエポキシ樹脂で取り付け、サンプル磁性粒子が同センシング部位に引き寄せられるよう ISFET の下に磁石 (ネオジム、約 26 × 76 mm) を敷いた。ゲート電圧 (V_G) ドレイン電流 (I_D) 特性といった FET の電気的特性は、Ag/AgCl 参照電極と飽和 KCl (3.3 mol/l, Wako)、そして KCl を含んだ 3.3% 寒天塩橋を使い、ガラスリング内を超純水で満たした状態で、ドレイン電圧 (V_D) = 2.5 V の条件で半導体パラメーターアナライザー (B1500A, Agilent) により室温下で測定された。

[0049] なお、本実施例においては、比抵抗が 18 M Ω · cm の超純水 (超純水製造装置 うるびゅあ (小松電子株式会社) を用いて製造) を用いた。

[0050] (4) で調製したサンプル磁性ビーズは、測定直前に超純水で一度洗浄し、製品濃度になるよう超純水で濃度調整した。調整後、サンプル磁性ビーズを含む溶液各 $4 \mu\text{l}$ を超純水 $400 \mu\text{l}$ 中へ、FETのゲートセンシング部を粒子で覆うよう静かに添加した。約5分後、粒子添加前後におけるドレイン電流 (I_D) = 1 mA 時のゲート電圧 (V_G) の変化量を、サンプル磁性ビーズ添加により生じたしきい値電圧の変化量 (ΔV_T) として測定した。この測定をサンプル磁性ビーズそれぞれに対して行い、得られたしきい値電圧の変化量 (ΔV_T) を比較することで、ビオチン磁性粒子-ストレプトアビジン複合体と反応したビオチンの有無、をゲート表面上の電荷密度の変化として電氣的に測定した。

[0051] 本実験の模式図を図2に示し、各サンプル磁性ビーズの電氣的特性の測定結果を図3に示した。

[0052] (5) FETの洗浄

測定後はISFETのゲート下に敷かれた磁石を外し、ゲート上のサンプル粒子をピペティングでより大まかに取り除いた。その後、アセトン、エタノール、水でそれぞれ1分間超音波洗浄することで、FETゲート表面に残ったサンプル粒子を除去した。粒子除去の確認については、光学顕微鏡（キーエンス）を使い目視にて行った。ゲート上の粒子の除去が確認された場合、次のサンプル粒子の測定に同FETを使用した。ゲート上に粒子が残った場合、再び超音波洗浄を行った。

[0053] 比較例1：ビオチン-ストレプトアビジン系を用いたMCC法（緩衝液中で測定）

[0054] サンプル磁性ビーズの電氣的特性の測定を、緩衝液 (Na_2HPO_4 と NaH_2PO_4 (それぞれWako) を含む $10 \mu\text{M}$ リン酸塩溶液) 中で行った以外は、実施例1と同様の工程で実験を行った。各サンプル磁性ビーズの電氣的特性の測定結果を図4に示した。

[0055] 実施例1と比較例1において得られた結果を、下記の表にまとめた。

[0056]

[表1]

表1：しきい値電圧の変化量差 ($\Delta V_{\text{threshold}}$ (mV)) の比較

目的物質濃度	0.9aM	9aM	90aM	0.9fM	0.9pM	0.9nM	0.9uM	0.9mM
純水	N/D	16.6	76.9	56.6	61.0	70.2	64.7	56.2
緩衝液	N/D	N/D	N/D	2.0	4.0	8.0	8.0	18.0

[0057] 表1から明らかなように、本発明においては、サンプル磁性ビーズの電気的特性を純水中で測定することにより、驚くべきことに、常法である緩衝液中での測定と比較して、目的物質の測定限界濃度が2オーダーも低下した。さらに、検出感度の観点からも、本発明においては、緩衝液中での測定と比較して、数倍～数十倍上昇した（例えば、0.9 f Mの目的物質濃度で比較すると、本発明では、緩衝液中での測定と比較して、 $56.6 / 2.0 \div$ 約30倍検出感度が上昇したことがわかる）。

[0058] 本発明のような簡易な装置を用いて、a M（アトモラー： 10^{-18} M）レベルの濃度の物質を、高い検出感度で検出する技術はこれまで知られていない。また、磁性ビーズに結合させる、目的物質に特異的に結合する因子を、核酸や抗体等に置き換えることにより、本システムを用いて様々な目的物質の検出に応用可能である。MCC法を用いて核酸を検出可能であることは、本発明者らによる特開2012-80873、および、Eur Biophys J (2014) 43:217-225に開示されている。以下の実施例2では、MCC法を、抗原-抗体反応系においても利用可能であることを示す。

[0059] 実施例2：抗原-抗体反応系を用いたMCC法

[0060] (1) 磁性ビーズの表面をアミノ基で修飾

本実施例では、表面にカルボン酸基を有する $\phi 1 \mu\text{m}$ の磁性ビーズ ($7-12 \times 10^9 \text{ beads/ml}$, Dynabeads MyOne Carboxylic Acid、インビトロジェン社から購入) を使用した。磁性ビーズを含む $50 \mu\text{l}$ 溶液をマイクロチューブに分散させ、脱イオン水で2回洗浄した。磁石を用いて磁性ビーズを引き寄せながら、上清を除去した。6 mM WSC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-am

inopropyl) carbodiimide hydrochloride, Dojindo Laboratories Co., Ltd.) を含む、熱した脱イオン水に、ジアミノデカン (1, 10-diaminodecane, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) を飽和濃度で溶解させることにより、ジアミノデカン溶液を準備した。100 μ l の前記ジアミノデカン溶液に磁性ビーズを溶解させ、50°C で1晩静置することによって、磁性ビーズ表面へのアミノ基の修飾を行った。そして、磁石によって前記磁性ビーズを集め、室温で、脱イオン水で2回洗浄することによって、残留試薬を除去した。

[0061] この段階における磁性ビーズは、磁性ビーズ表面のカルボン酸基に、ジアミノデカンの有する2つのアミノ基のうち1つが結合しており、結合に使われていないもう1つのアミノ基がフリーになっている。

[0062] (2) 磁性ビーズ表面への抗体の固定化

本実施例では、Monoclonal Anti-Dinitrophenyl antibody produced in mouse (IgE isotype, $\sim 1\text{mg/ml}$, clone SPE-7, affinity purified immunoglobuline, buffered aqueous solution, SIGMA-ALDRICH) を使用した。前述で調製した、表面にアミノ基を導入した磁性ビーズを原液濃度で20 μ l 分マイクロチューブに分注し、磁石で引き寄せながら、phosphate buffer saline (PBS pH 7.4 (1x), gibco) で2回洗浄した。上清液を破棄した後、20 μ l のIgE固定溶液 (60mM WSC, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ IgEを含んだPBS (-)) を添加し、ピペティングで攪拌した後、50°Cで一晩インキュベートした。インキュベート後、磁石で引き寄せながら磁性ビーズをPBS (-) で室温下で2回洗浄することで、固定されなかったIgE抗体と残留試薬を洗い流した。以上の処理により、磁性ビーズ表面にIgE抗体を固定した。

[0063] 本実施例においては、ここで調製した磁性ビーズ-IgE複合体（以下、本実施例において、サンプル磁性ビーズと呼ぶことがある）が、本発明の「目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体」に該当する。

[0064] (3) 磁性ビーズ上での抗原抗体反応

抗原抗体反応には、抗原としてAlbumin from Bovine Serum, 2,4-Dinitrophenylated (DNP-BSA, Invitrogen)を使用した。(2)で調製したサンプル磁性ビーズを、原液濃度で5 μ l分マイクロチューブに分注し、磁石を使ってサンプル磁性ビーズを集め、上清液を破棄した。その後、抗原を0.1 mg / ml 含んだPBS (-)を20 μ l添加し、ピペティングで攪拌した後、室温で30分間インキュベートすることで抗原抗体反応を行った。反応後、磁石を使いサンプル磁性ビーズを引き寄せながら、室温下で、サンプル磁性ビーズをPBS (-)で2回洗浄することで、未反応の抗原を洗い流した。

[0065] (4) Molecular Charge Contact (MCC) 法による抗原抗体反応の測定

MCC法による電気シグナル測定には、ネルンスト応答が確認できる市販のNチャネルディプレッション型のIon Sensitive FETチップ (ISFET COM Co., Ltd.)を用いた。FETチップのゲート構造としては、絶縁膜がTa₂O₅/SiO₂の積層構造になっており、膜厚はトータルで約120 nmとなっている。測定の際、FETのゲートセンシング部 (10 $\times$ 340 μ m) が400 μ lの測定液に浸せるようガラスリング (内径10 mm、厚さ1 mm) をエポキシ樹脂で取り付け、サンプル磁性粒子が同センシング部位に引き寄せられるようISFETの下に磁石 (ネオジム、約26 $\times$ 76 mm) を敷いた。ゲート電圧 (V_G) ドレイン電流 (I_D) 特性といったFETの電気的特性は、Ag / AgCl 参照電極と飽和KCl (3.3 mol / l, Wako)、そしてKClを含んだ3.3%寒天塩橋を使い、ガラスリング内を超純水で満たした状態で、ドレイン電圧 (V_D

) = 2.5 V の条件で半導体パラメーターアナライザー (B 1 5 0 0 A, A g i l e n t) により室温下で測定された。

[0066] なお、本実施例においては、比抵抗が $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ の超純水 (超純水製造装置 うるびゅあ (小松電子株式会社) を用いて製造) を用いた。

[0067] (3) で抗原抗体反応を行ったサンプル磁性ビーズは、測定直前に超純水で一度洗浄し、製品濃度 ($7 - 12 \times 10^9 \text{ beads} / \text{ml}$) になるよう超純水で濃度調製した。調整後、サンプル磁性ビーズを含む溶液各 $4 \mu\text{l}$ を超純水 $400 \mu\text{l}$ 中へ、FET のゲートセンシング部を粒子で覆うよう静かに添加した。約 5 分後、粒子添加前後におけるドレイン電流 (I_D) = 1 mA 時のゲート電圧 (V_G) の変化量を、サンプル磁性ビーズ添加により生じたしきい値電圧の変化量 (ΔV_T) として測定した。この測定をサンプル磁性ビーズそれぞれに対して行い、得られたしきい値電圧の変化量 (ΔV_T) を比較することで、サンプル磁性ビーズ上で起きた抗原抗体反応を、ゲート表面上の電荷密度の変化として電氣的に測定した。

[0068] 本実施例において行った磁性ビーズ上の抗原抗体反応のイメージ図と、測定結果を図 5 に示した。図 5 に示すとおり、本発明によって、抗原抗体反応が起きたサンプル磁性ビーズと、抗原抗体反応を行わなかったサンプル磁性ビーズとを明確に識別することができた。すなわち、MCC 法は、抗原抗体反応系にも適用可能であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 電界効果トランジスタを用いて被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出する方法であって、
- (a) 溶媒中で、前記目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体と、被験試料とを接触させるステップ、
 - (b) ステップ(a)の後、前記溶媒を除去し、前記複合体を比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水に分散させるステップ、
 - (c) ステップ(b)の後、磁力により、前記複合体を前記電界効果トランジスタのゲート電極表面に密着させながら、前記複合体の電気的特性を前記電界効果トランジスタで測定するステップ、および、
 - (d) ステップ(c)において測定される電気的特性を、前記複合体を目的物質と接触させない場合の対照実験における電気的特性と比較することにより、前記被験試料中の前記目的物質の存在・不存在を検出するステップ、
- を含むことを特徴とする、方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の方法であって、
- 前記「比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水」が、比抵抗が $1.5\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水であることを特徴とする、方法。
- [請求項3] 請求項1または2に記載の方法であって、
- 前記「目的物質に特異的に結合する因子」が、前記目的物質に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、もしくは、前記目的物質に特異的に結合する核酸であることを特徴とする、方法。
- [請求項4] 請求項1または2に記載の方法であって、
- 前記目的物質がビオチンであり、前記「目的物質に特異的に結合する因子」がストレプトアビジンであることを特徴とする、

方法。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の方法であって、
前記電解効果トランジスタのゲート表面が、溶液中において表面官能基を生じるように表面処理されていることを特徴とする、
方法。

[請求項6] 請求項5に記載の方法であって、
前記電界効果トランジスタのゲート電極表面が、酸化物または窒化物でコーティングされていることを特徴とする、
方法。

[請求項7] 請求項6に記載の方法であって、
前記酸化物または窒化物が、酸化タンタル、酸化アルミニウム、窒化ケイ素、酸化チタン、または、酸化ケイ素であることを特徴とする、
方法。

[請求項8] 請求項5に記載の方法であって、
前記電界効果トランジスタのゲート電極表面が、溶液中で表面官能基を実質的に生じない金属でコーティングされている場合、溶液中で、前記ゲート電極表面に表面官能基が生じるように、さらに表面処理されていることを特徴とする、
方法。

[請求項9] 請求項8に記載の方法であって、
前記金属が、金または白金であることを特徴とする、
方法。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法であって、
前記電界効果トランジスタがIon Sensitive FETであることを特徴とする、
方法。

[請求項11] 被験試料中の目的物質の存在・不存在を検出するための装置であっ

て、

電界効果トランジスタ、

前記目的物質に特異的に結合する因子と磁性粒子とを含む複合体、
および、

前記複合体を前記電界効果トランジスタのゲート電極表面に引き寄
せるための磁力発生源

を備え、

前記装置は、磁力によって、前記複合体を前記電界効果トランジス
タのゲート電極表面に密着させながら前記複合体の電気的特性を測定
し、測定された電気的特性を、前記複合体を目的物質と接触させない
場合の対照実験における電気的特性と比較することにより、前記被験
試料中の前記目的物質の存在・不存在を検出し、

前記測定は、前記複合体が、比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水中に存
在する状態で行われることを特徴とする、
装置。

[請求項12]

請求項 1 1 に記載の装置であって、

前記「比抵抗が $1\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水」が、比抵抗が $1.5\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
以上の水であることを特徴とする、
装置。

[請求項13]

請求項 1 1 または 1 2 に記載の装置であって、

前記「目的物質に特異的に結合する因子」が、前記目的物質に特異
的に結合する抗体またはその抗原結合断片、もしくは、前記目的物質
に特異的に結合する核酸であることを特徴とする、
装置。

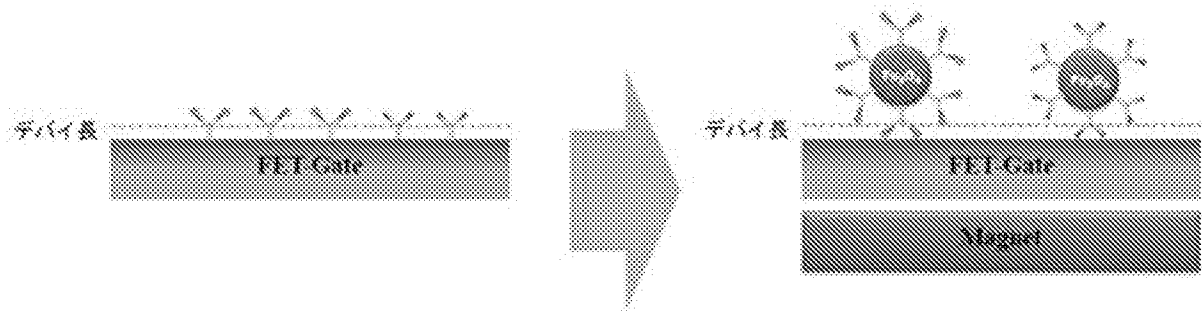
[請求項14]

請求項 1 1 または 1 2 に記載の装置であって、

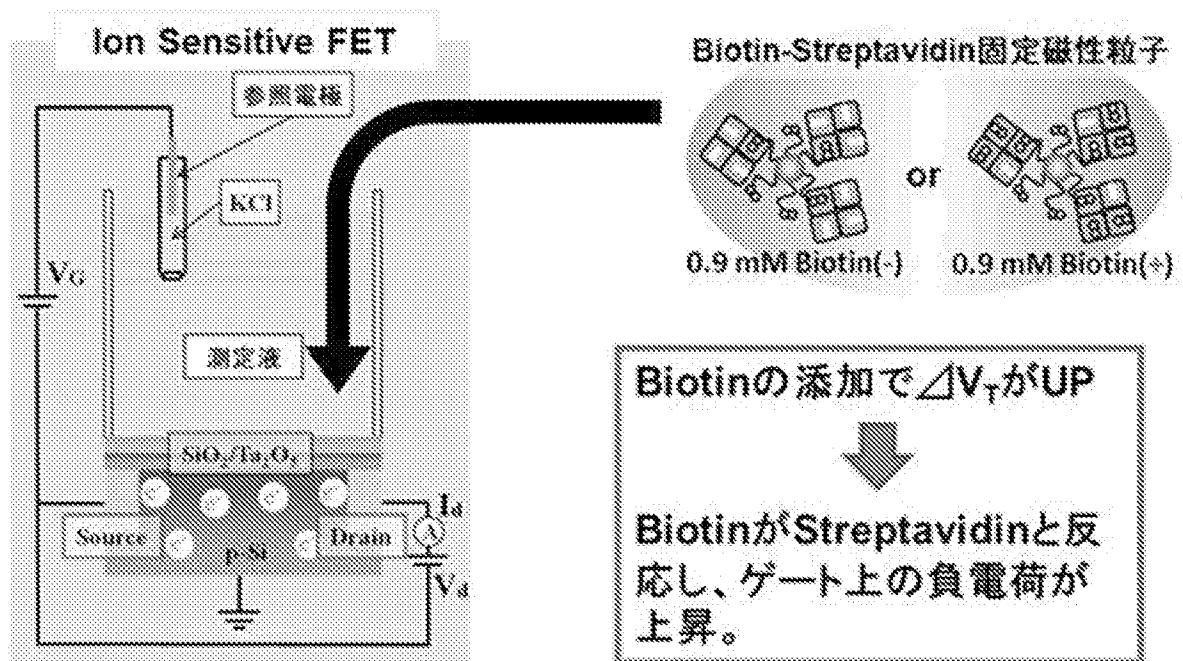
前記目的物質がビオチンであり、前記「目的物質に特異的に結合す
る因子」がストレプトアビジンであることを特徴とする、
装置。

- [請求項15] 請求項 1 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の装置であって、
前記電解効果トランジスタのゲート表面が、溶液中において表面官能基を生じるように表面処理されていることを特徴とする、
装置。
- [請求項16] 請求項 1 5 に記載の装置であって、
前記電界効果トランジスタのゲート電極表面が、酸化物または窒化物でコーティングされていることを特徴とする、
装置。
- [請求項17] 請求項 1 6 に記載の装置であって、
前記酸化物または窒化物が、酸化タンタル、酸化アルミニウム、窒化ケイ素、酸化チタン、または、酸化ケイ素であることを特徴とする、
装置。
- [請求項18] 請求項 1 5 に記載の装置であって、
前記電界効果トランジスタのゲート電極表面が、溶液中で表面官能基を実質的に生じない金属でコーティングされている場合、溶液中で、前記ゲート電極表面に表面官能基が生じるように、さらに表面処理されていることを特徴とする、
装置。
- [請求項19] 請求項 1 8 に記載の装置であって、
前記金属が、金または白金であることを特徴とする、
装置。
- [請求項20] 請求項 1 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の装置であって、
前記電解効果トランジスタが Ion Sensitive FET であることを特徴とする、
装置。

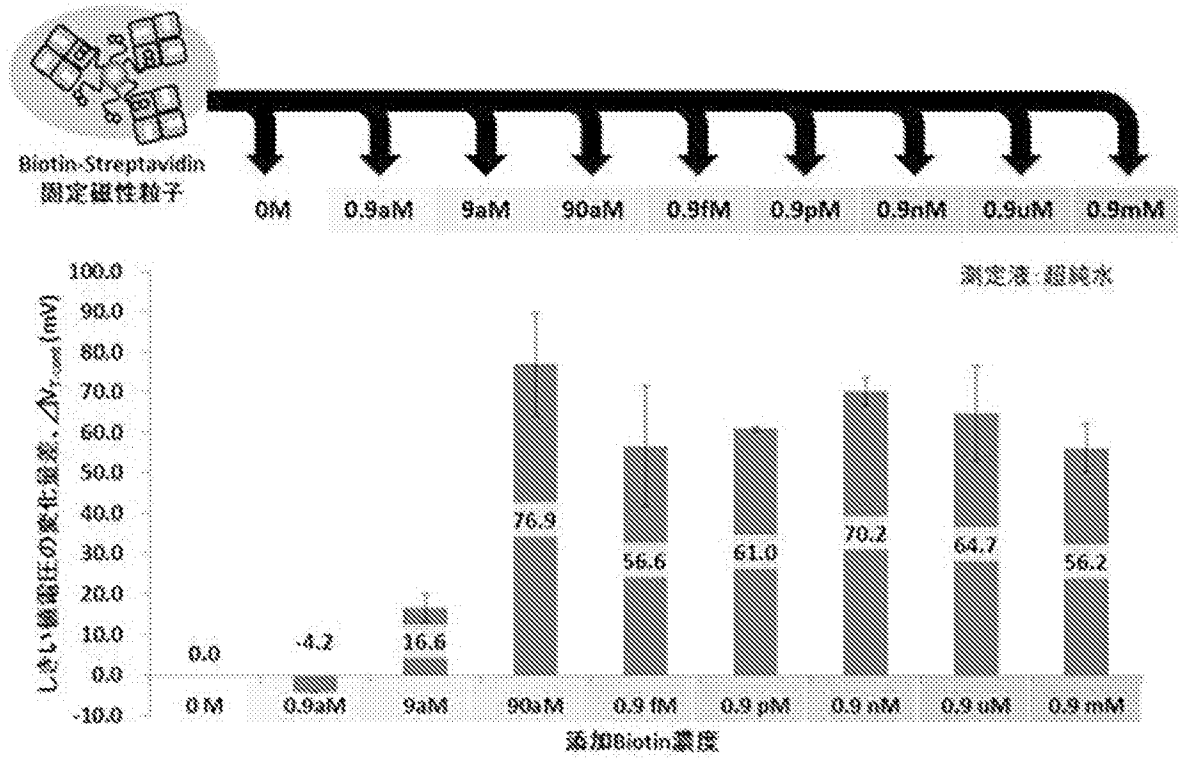
[図1]



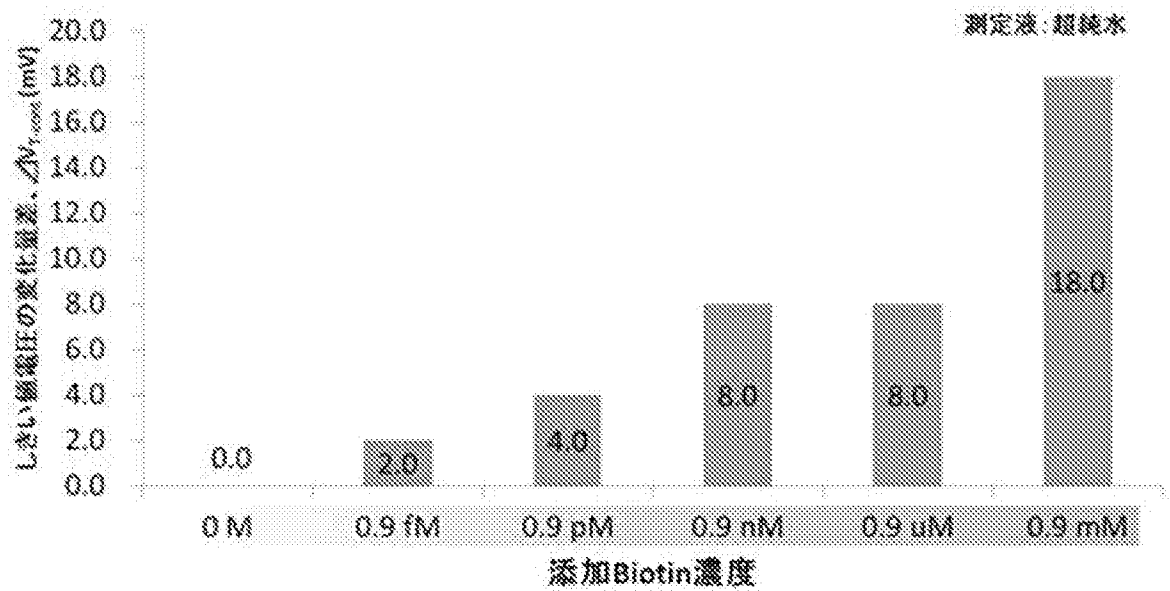
[図2]



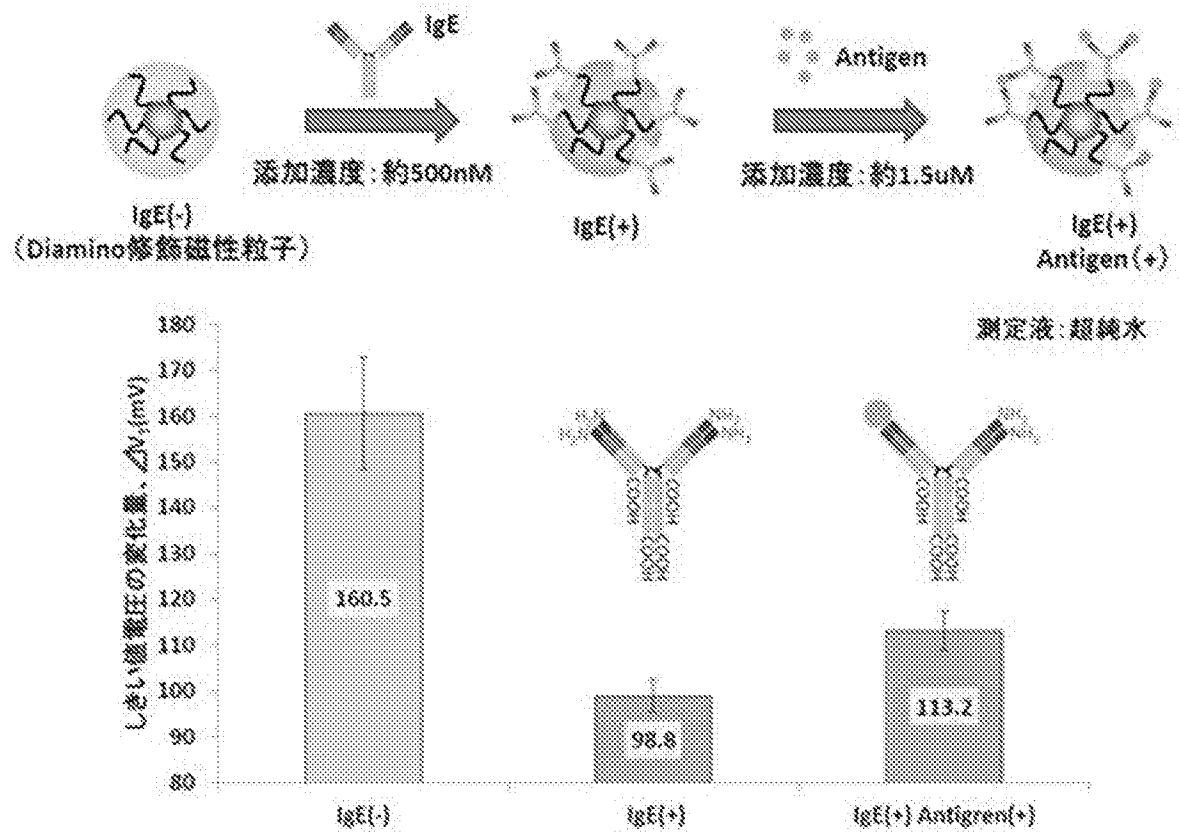
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/074493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/416(2006.01) i, G01N27/414(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)

G01N27/416, G01N27/414

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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	JP 2014-232032 A (National Center for Geriatrics and Gerontology), 11 December 2014 (11.12.2014), abstract; paragraphs [0002] to [0024]; all drawings & WO 2014/192830 A1	1-20
Y	JP 2012-247432 A (Nanomix, Inc.), 13 December 2012 (13.12.2012), paragraphs [0010], [0032] & US 2007/0178477 A1 paragraphs [0012], [0033]	1-20
Y	JP 2010-230379 A (Riken, Japan), 14 October 2010 (14.10.2010), paragraphs [0032] to [0037] (Family: none)	2, 12

☒ 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
26 October 2016 (26.10.16)

Date of mailing of the international search report
08 November 2016 (08.11.16)

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/JP2016/074493

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 2008-525822 A (Nanomix, Inc.), 17 July 2008 (17.07.2008), paragraph [0163] & WO 2006/071895 A2 paragraph [00270]	4, 14
Y	JP 4-363651 A (Hitachi, Ltd.), 16 December 1992 (16.12.1992), paragraph [0023]; fig. 1 & US 5250168 A column 5, lines 41 to 56; fig. 1	8-9, 18-19
A	JP 2015-500640 A (Genapsys Inc.), 08 January 2015 (08.01.2015), paragraphs [0166] to [0168] & US 2014/0057339 A1 paragraphs [0306] to [0309] & CA 2837486 A1 & CN 103717753 A & KR 10-2014-0044342 A	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/416(2006.01)i, G01N27/414(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. G01N27/416, G01N27/414

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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	JP 2014-232032 A (独立行政法人国立長寿医療研究センター) 2014.12.11, [要約], 段落[0002]-[0024], 全図 & WO 2014/192830 A1	1-20
Y	JP 2012-247432 A (ナノミックス・インコーポレーテッド) 2012.12.13, 段落[0010], [0032] & US 2007/0178477 A1, 段落[0012], [0033]	1-20

☒ 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

26.10.2016

国際調査報告の発送日

08.11.2016

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 2010-230379 A (独立行政法人理化学研究所) 2010.10.14, 段落[0032]-[0037] (ファミリーなし)	2, 12,
Y	JP 2008-525822 A (ナノミックス・インコーポレーテッド) 2008.07.17, 段落[0163] & WO 2006/071895 A2, 段落[00270]	4, 14
Y	JP 4-363651 A (株式会社日立製作所) 1992.12.16, 段落[0023], 図1 & US 5250168 A 第5欄第41-56行, 図1	8-9, 18-19
A	JP 2015-500640 A (ジナプシス インコーポレイテッド) 2015.01.08, 段落[0166]-[0168] & US 2014/0057339 A1, 段落[0306]-[0309] & CA 2837486 A1 & CN 103717753 A & KR 10-2014-0044342 A	1-20