

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-179762

(P2018-179762A)

(43) 公開日 平成30年11月15日(2018.11.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 O 1 J
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	U
	GO 1 N 33/53	J
	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数 33 O L (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2017-79793 (P2017-79793)  
 (22) 出願日 平成29年4月13日 (2017. 4. 13)

(71) 出願人 390014960  
 シスメックス株式会社  
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

(74) 代理人 100111383  
 弁理士 芝野 正雅

(72) 発明者 赤間 健司  
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

(72) 発明者 渡辺 敏弘  
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

(72) 発明者 岡田 昌也  
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検物質の情報取得方法

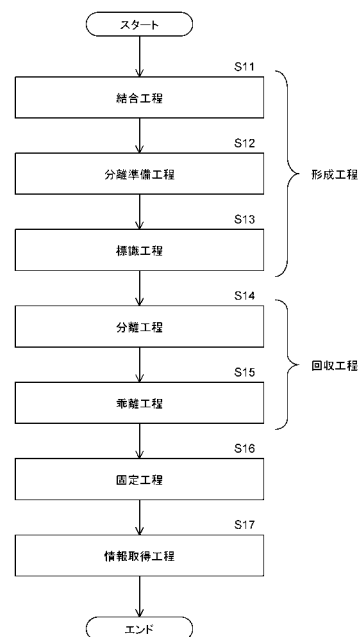
(57) 【要約】

【課題】被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できる被検物質の情報取得方法を提供する。

【解決手段】被検物質の情報取得方法は、試料中の被検物質に捕捉物質を結合させて複合体を形成するステップ S 1 1 ~ S 1 3 からなる形成工程と、試料から少なくとも複合体を選択的に回収するステップ S 1 4、S 1 5 からなる回収工程と、試料から回収された複合体を基板に固定するステップ S 1 6 の固定工程と、基板に固定された複合体から被検物質の構造に関する情報を取得するステップ S 1 7 の情報取得工程と、を備える。

【選択図】 図 1

実施形態1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中の被検物質に捕捉物質を結合させて複合体を形成する工程と、  
前記試料から少なくとも前記複合体を選択的に回収する工程と、  
前記試料から回収された前記複合体を基板に固定する工程と、  
前記基板に固定された前記複合体から前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程と、を備える、被検物質の情報取得方法。

**【請求項 2】**

前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程において、前記被検物質の大きさ、形態、構造および凝集度の少なくとも一つを取得する、請求項 1 に記載の被検物質の情報取得方法。

10

**【請求項 3】**

前記捕捉物質は、前記被検物質を蛍光標識するための捕捉物質を含む、請求項 1 または 2 に記載の被検物質の情報取得方法。

**【請求項 4】**

前記捕捉物質は、固相に結合可能な捕捉物質を含む、請求項 1 ないし 3 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

**【請求項 5】**

前記捕捉物質は、前記基板に結合可能な捕捉物質を含む、請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

20

**【請求項 6】**

前記被検物質を蛍光標識するための前記捕捉物質は、蛍光色素により標識された抗体を含み、

前記複合体を形成する工程において、前記蛍光色素により標識された抗体を前記被検物質に結合させる、請求項 3 に記載の被検物質の情報取得方法。

**【請求項 7】**

前記固相に結合可能な前記捕捉物質を介して前記固相を前記複合体に結合させた後、前記試料から前記複合体を回収する工程において、前記固相を選択的に分離する、請求項 4 に記載の被検物質の情報取得方法。

**【請求項 8】**

前記試料から前記複合体を回収する工程において、前記固相を選択的に分離した後、前記複合体を前記固相から乖離させる、請求項 7 に記載の被検物質の情報取得方法。

30

**【請求項 9】**

前記固相は、磁性粒子を含み、

前記磁性粒子を磁力で引き寄せることにより、前記固相を選択的に分離する、請求項 7 または 8 に記載の被検物質の情報取得方法。

**【請求項 10】**

前記固相に結合可能な前記捕捉物質は、前記被検物質と結合する抗体と、前記固相と結合する第 2 の結合物質とを含み、

前記固相は、前記第 2 の結合物質と特異的に結合する第 2 の結合パートナーを含み、

前記複合体と前記固相との結合が、前記被検物質と、前記固相に結合可能な前記捕捉物質の前記抗体との結合と、前記第 2 の結合物質と、前記第 2 の結合パートナーとの特異的結合とにより行われる、請求項 7 ないし 9 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

40

**【請求項 11】**

前記第 2 の結合物質と前記第 2 の結合パートナーとの組み合わせが、抗原とその抗体、リガンドとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、ピオチン、デスチオピオチンなどのピオチン類縁体を含むピオチン類とアビジン、ストレプトアビジンなどのアビジン類縁体を含むアビジン類の組み合わせから選択される、請求項 10 に記載の被検物質の情報取得方法。

50

## 【請求項 1 2】

前記第 2 の結合物質が抗ハプテンであり、前記第 2 の結合パートナーが抗ハプテン抗体である、請求項 1 0 または 1 1 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 3】

前記第 2 の結合物質がジニトロフェニル基であり、前記第 2 の結合パートナーが抗ジニトロフェニル基抗体である、請求項 1 2 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 4】

ジニトロフェニルアミノ酸を用いて前記第 2 の結合物質と前記第 2 の結合パートナーとの結合を乖離する、請求項 1 3 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 5】

前記捕捉物質は、前記基板に結合可能な捕捉物質と、固相に結合可能な捕捉物質と、を含み、

前記基板に結合可能な前記捕捉物質と、前記固相に結合可能な前記捕捉物質とが、互いに異なる、請求項 1 ないし 1 4 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 6】

前記基板に結合可能な前記捕捉物質と前記固相に結合可能な前記捕捉物質とを、略同時に前記試料に投入する、請求項 1 5 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 7】

前記試料から前記複合体を回収する工程において、前記複合体と夾雑物質との比重の違い、大きさの違い、電気的性質の違い、および免疫反応の違いの少なくとも一つの違いに基づいて、前記複合体を前記夾雑物質から分離する、請求項 1 ないし 1 6 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 8】

前記基板に結合可能な前記捕捉物質は、前記被検物質と結合する抗体と、前記基板と結合する結合物質とを含み、

前記基板が、前記結合物質と特異的に結合する結合パートナーを含み、

前記基板に結合可能な前記捕捉物質に含まれる前記抗体を前記被検物質に結合させた後、前記複合体を前記基板に固定する工程において、前記結合パートナーと前記結合物質との特異的結合により、前記複合体を前記基板に固定する、請求項 5 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 1 9】

前記結合物質と前記結合パートナーとの組み合わせが、抗原とその抗体、リガンドとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、ビオチン、デスチオビオチンなどのビオチン類縁体を含むビオチン類とアビジン、ストレプトアビジンなどのアビジン類縁体を含むアビジン類の組み合わせから選択される、請求項 1 8 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 2 0】

前記結合物質がビオチン類であり、前記結合パートナーがアビジン類である、請求項 1 8 または 1 9 に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 2 1】

前記試料から前記複合体を回収する工程の後、前記基板に結合可能な捕捉物質を前記被検物質に結合させる、請求項 1 ないし 2 0 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 2 2】

前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程において、前記基板上の前記被検物質を撮像して前記被検物質の画像を取得する、請求項 1 ないし 2 1 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

## 【請求項 2 3】

前記試料から複合体を回収する工程において、前記被検物質と夾雑物質とが分離され、前記被検物質は、前記試料中に含まれる被検対象のタンパク質であり、前記夾雑物質は、前記被検対象のタンパク質以外のタンパク質を含む、請求項 1 ないし 2 2 の何れか一項

10

20

30

40

50

に記載の被検物質の情報取得方法。

【請求項 2 4】

前記被検物質は、アミロイド である、請求項 1 ないし 2 3 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

【請求項 2 5】

前記試料は、脳脊髄液である、請求項 1 ないし 2 4 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

【請求項 2 6】

前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程を顕微鏡により行う、請求項 1 ないし 2 5 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

10

【請求項 2 7】

前記顕微鏡が、蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、プローブ顕微鏡、または電子顕微鏡である、請求項 2 6 に記載の被検物質の情報取得方法。

【請求項 2 8】

前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程を、光の回折限界を超えた分解能を有する顕微鏡により行う、請求項 1 ないし 2 7 の何れか一項に記載の被検物質の情報取得方法。

【請求項 2 9】

試料中の被検物質に磁性粒子を結合させる工程と、

前記被検物質に結合した磁性粒子を用いて、前記試料から少なくとも前記被検物質を選択的に回収する工程と、

20

前記試料から回収された前記被検物質を基板に固定する工程と、

前記基板に固定された前記被検物質から前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程と、を備える、被検物質の情報取得方法。

【請求項 3 0】

試料中の被検物質に蛍光色素を含む捕捉物質を結合させて複合体を形成する工程と、

前記試料から少なくとも前記複合体を選択的に回収する工程と、

前記試料から回収された前記複合体を基板に固定する工程と、

前記基板に固定された前記複合体に結合する複数の蛍光色素から発せられる蛍光に応じた輝点に基づいて、前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程と、を備える、被検物質の情報取得方法。

30

【請求項 3 1】

試料中の被検物質と夾雑物質とを分離する工程と、

前記夾雑物質から分離された前記被検物質を基板に固定する工程と、

前記基板に固定された前記被検物質の構造に関する情報を取得する工程と、を備える、被検物質の情報取得方法。

【請求項 3 2】

前記被検物質は、前記試料中に含まれる被検対象のタンパク質であり、前記夾雑物質は、前記被検対象のタンパク質以外のタンパク質を含む、請求項 3 1 に記載の被検物質の情報取得方法。

40

【請求項 3 3】

前記試料は、脳脊髄液である、請求項 3 1 または 3 2 に記載の被検物質の情報取得方法

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、被検物質から情報を取得するための情報取得方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

検体中の被検物質の構造に関する情報を取得することは、病理診断および投薬方針の決

50

定において有用である。たとえば、アルツハイマー病では、病状の進行に伴ってアミロイド などの被検物質の構造（大きさ、長さ、縦横比、等）が変化するため、被検物質から構造に関する情報を取得することにより、病状を的確に把握できる。タンパク質の変性を要因とする疾患としては、アルツハイマー病の他、ハンチントン病、パーキンソン病、プリオン、およびALS（筋萎縮性側索硬化症）が挙げられる。

【0003】

非特許文献1には、図19(a)に示すように、CSF(cerebrospinal fluid:脳脊髄液)をガラス基板200上に供給し、被検物質であるアミロイド 211を物理吸着させた後、図19(b)に示すように、1次抗体220を介してアミロイド 211に標識抗体230を結合させて、超解像顕微鏡で画像を検出することが記載されている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】William I. Zhang、外5名、"Super-Resolution Microscopy of Cerebrospinal Fluid Biomarkers as a Tool for Alzheimer's Disease Diagnostics"、Journal of Alzheimer's Disease 46、2015年3月27日、p. 1007 1020

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

非特許文献1の手法では、図19(a)に示すように、ガラス基板200にアミロイド 211だけでなく、夾雑物質212も付着する。1次抗体220と標識抗体230は、ガラス基板200に付着した夾雑物質212にも非特異的に結合する場合がある。この場合、図19(b)に示すように、夾雑物質212は、標識抗体230により標識されてしまう。また、標識抗体230が、ガラス基板200に非特異的に結合する場合もある。この場合、図19(b)に示すように、ガラス基板200の一部が、標識抗体230により標識されてしまう。このように、アミロイド 211だけでなく夾雑物質212やガラス基板200なども標識抗体230により標識されると、被検物質であるアミロイド 211の構造に関する情報を精度良く取得できなくなる。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の第1の態様は、被検物質の情報取得方法に関する。本態様に係る被検物質の情報取得方法は、試料(10)中の被検物質(11)に捕捉物質(30、40、50)を結合させて複合体(60、61)を形成する工程(S11~S13、S21、S22)と、試料(10)から少なくとも複合体(60、61)を選択的に回収する工程(S14、S15、S23、S24)と、試料(10)から回収された複合体(60、61)を基板(80)に固定する工程(S16、S26)と、基板(80)に固定された複合体(60)から被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)と、を備える。

30

【0007】

試料は、生体から採取した液体であり、たとえば、CSF(cerebrospinal fluid:脳脊髄液)、血液、血漿、組織液、尿などである。被検物質は、細胞、ポリペプチド、タンパク質、核酸、エクソソーム、糖鎖などであり、本態様に係る被検物質の情報取得方法においては、多量体が好適である。被検物質は、たとえば、アミロイド モノマーが重合したアミロイド オリゴマー、タウタンパク質が重合したタウオリゴマーなどである。「複合体の選択的な回収」とは、複合体のみを回収することに限らず、複合体以外の物質も僅かに含んだ状態で複合体を回収することをも含む概念である。基板は、たとえば、ガラス板などにより構成される。「被検物質の構造に関する情報」とは、被検物質の大きさ(たとえば、長さ)、形態(たとえば、縦横比)、構造(たとえば、タンパク質の1次構造、1次構造、3次構造、4次構造)、化学結合、凝集度などを広く含み得る。

40

【0008】

50

本態様に係る被検物質の情報取得方法によれば、試料から複合体が選択的に回収され、回収された複合体が基板に固定される。このとき、試料に含まれていた被検物質以外の物質や複合体を形成しなかった捕捉物質などの夾雑物質は、複合体から分離され、基板に転移されることが抑制される。したがって、基板には、ほぼ被検物質のみが転移されて固定される。よって、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できる。

【0009】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)において、被検物質(11)の大きさ、形態、構造および凝集度の少なくとも一つを取得する。

【0010】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、捕捉物質は、被検物質(11)を蛍光標識するための捕捉物質(40)を含む。この捕捉物質が複合体を形成しなかった場合でも、この捕捉物質が基板に転移されることが抑制されるため、この捕捉物質がノイズとなることを抑制できる。

【0011】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、捕捉物質は、固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)を含む。この捕捉物質が複合体を形成しなかった場合でも、この捕捉物質が基板に転移されることが抑制されるため、この捕捉物質がノイズとなることを抑制できる。

【0012】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、捕捉物質は、基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)を含む。この捕捉物質が複合体を形成しなかった場合でも、この捕捉物質が基板に転移されることが抑制されるため、この捕捉物質がノイズとなることを抑制できる。

【0013】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)を蛍光標識するための捕捉物質(40)は、蛍光色素(41)により標識された抗体(42)を含み、複合体(60、61)を形成する工程(S13、S22)において、蛍光色素(41)により標識された抗体(42)を被検物質(11)に結合させる。こうすると、基板が直接的に蛍光標識されてしまうことを抑制できるため、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得

【0014】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)を介して固相(20)を複合体(60、61)に結合させた後、試料(10)から複合体(60、61)を回収する工程(S14、S15、S23、S24)において、固相(20)を選択的に分離する(S14、S23)。こうすると、試料から複合体を選択的に回収することが容易になる。また、後段の工程において、複合体を固相から乖離しやすくなる。

【0015】

この場合に、試料(10)から複合体(60、61)を回収する工程(S14、S15、S23、S24)において、固相(20)を選択的に分離した後、複合体(60、61)を固相(20)から乖離させる(S15、S24)。こうすると、基板に固相が転移されないため、より精度良く被検物質の構造に関する情報を取得できる。

【0016】

また、固相(20)は、磁性粒子(21)を含み、磁性粒子(21)を磁力で引き寄せることにより、固相(20)を選択的に分離する。こうすると、複合体と夾雑物質との分離を円滑に行うことができる。

【0017】

また、固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)は、被検物質(11)と結合する抗体(32)と、固相(20)と結合する第2の結合物質(31)とを含み、固相(20)

10

20

30

40

50

は、第2の結合物質(31)と特異的に結合する第2の結合パートナー(22)を含む。複合体(60、61)と固相(20)との結合が、被検物質(11)と、固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)の抗体(32)との結合と、第2の結合物質(31)と、第2の結合パートナー(22)との特異的結合とにより行われる。

【0018】

この場合に、第2の結合物質(31)と第2の結合パートナー(22)との組み合わせが、抗原とその抗体、リガンドとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、ビオチン、デスチオビオチンなどのビオチン類縁体を含むビオチン類とアビジン、ストレプトアビジンなどのアビジン類縁体を含むアビジン類の組み合わせから選択される。こうすると、第2の結合物質と第2の結合パートナーとを安定的に結合できる。

10

【0019】

また、第2の結合物質(31)が抗ハプテンであり、第2の結合パートナー(22)が抗ハプテン抗体である。この場合も、第2の結合物質と第2の結合パートナーとを安定的に結合できる。

【0020】

この場合に、第2の結合物質(31)がジニトロフェニル基であり、第2の結合パートナー(22)が抗ジニトロフェニル基抗体である。こうすると、第2の結合物質と第2の結合パートナーとを容易に乖離できる。

【0021】

この場合に、ジニトロフェニルアミノ酸を用いて第2の結合物質(31)と第2の結合パートナー(22)との結合を乖離する。

20

【0022】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、捕捉物質は、基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)と、固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)と、を含み、基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)と、固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)とが、互いに異なる。この場合、2種類の捕捉物質が、個別に被検物質に結合する。このように、被検物質を基板に固定させるための捕捉物質と、被検物質を固相に結合させるための捕捉物質とが異なると、被検物質と結合していない後者の捕捉物質を、複合体の回収時に除去できる。これにより、被検物質と結合していない基板に結合可能な捕捉物質が、基板に固定されることを抑制でき、基板への被検物質の固定をより円滑に行うことができる。

30

【0023】

この場合に、基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)と固相(20)に結合可能な捕捉物質(30)とを、略同時に試料(10)に投入する。こうすると、被検物質の結合サイトに2つの捕捉物質を円滑に結合させることができる。

【0024】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、試料(10)から複合体(60、61)を回収する工程(S14、S15、S23、S24)において、複合体(60、61)と夾雑物質(13)との比重の違い、大きさの違い、電気的性質の違い、および免疫反応の違いの少なくとも一つの違いに基づいて、複合体(60、61)を夾雑物質(13)から分離する。大きさの違い、電気的性質の違い、および免疫反応の違いとは、たとえば、それぞれ、ゲル濾過、電気泳動、および免疫反応である。こうすると、適切に分離を行うことができる。

40

【0025】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)は、被検物質(11)と結合する抗体(52)と、基板(80)と結合する結合物質(51)とを含み、基板(80)が、結合物質(51)と特異的に結合する結合パートナー(81)を含む。基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)に含まれる抗体(52)を被検物質(11)に結合させた後、複合体(60)を基板(80)に固定する工程(S16、S26)において、結合パートナー(81)と結合物質(51)との特異的結合

50

により、複合体(60)を基板(80)に固定する。こうすると、物理的な吸着ではなく、捕捉物質を仲介として被検物質を基板に特異的に結合させることができる。よって、基板に夾雑物質が転移されることを抑制しながら、被検物質を基板に安定的に固定できる。

【0026】

この場合に、結合物質(51)と結合パートナー(81)との組み合わせが、抗原とその抗体、リガンドとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、ビオチン、デスチオビオチンなどのビオチン類縁体を含むビオチン類とアビジン、ストレプトアビジンなどのアビジン類縁体を含むアビジン類の組み合わせから選択される。こうすると、結合物質と結合パートナーとを安定的に結合できる。

【0027】

また、結合物質(51)がビオチン類であり、結合パートナー(81)がアビジン類である。こうすると、親和性が高いため、より安定的に被検物質を基板に固定できる。

【0028】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、試料(10)から複合体(61)を回収する工程の後、基板(80)に結合可能な捕捉物質(50)を被検物質(11)に結合させる。

【0029】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)において、基板(80)上の被検物質(11)を撮像して被検物質(11)の画像を取得する。こうすると、取得した画像に基づいて被検物質の構造に関する情報を取得できる。

【0030】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、試料(10)から複合体(60、61)を回収する工程において、被検物質(11)と夾雑物質(13)とが分離され、被検物質(11)は、試料(10)中に含まれる被検対象のタンパク質であり、夾雑物質(13)は、被検対象のタンパク質以外のタンパク質を含む。

【0031】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)は、アミロイドである。この場合、アミロイドの構造に関する情報を取得することにより、取得した情報を、たとえば、アルツハイマー病の診断や投薬方針の決定に役立てることができる。

【0032】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、試料(10)は、脳脊髄液である。

【0033】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)を顕微鏡により行う。

【0034】

この場合に、顕微鏡が、蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、プローブ顕微鏡、または電子顕微鏡である。

【0035】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)を、光の回折限界を超えた分解能を有する顕微鏡により行う。こうすると、光の回折限界を超えた分解能で被検物質の構造に関する情報を取得できる。

【0036】

本発明の第2の態様は、被検物質の情報取得方法に関する。本態様に係る被検物質の情報取得方法は、試料(10)中の被検物質(11)に磁性粒子(21)を結合させる工程(S12、S21)と、被検物質(11)に結合した磁性粒子(21)を用いて、試料(10)から少なくとも被検物質(11)を選択的に回収する工程(S14、S15、S23、S24)と、試料(10)から回収された被検物質(11)を基板(80)に固定する工程(S16、S26)と、基板(80)に固定された被検物質(11)から被検物質

10

20

30

40

50

(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)と、を備える。

【0037】

本態様に係る被検物質の情報取得方法によれば、たとえば磁石により試料から被検物質が選択的に回収され、回収された被検物質が基板に固定される。このとき、試料に含まれていた被検物質以外の夾雑物質は、被検物質から分離され、基板に転移されることが抑制される。したがって、基板には、ほぼ被検物質のみが転移されて固定される。よって、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できる。

【0038】

本発明の第3の態様は、被検物質の情報取得方法に関する。本態様に係る被検物質の情報取得方法は、試料(10)中の被検物質(11)に蛍光色素(41)を含む捕捉物質(40)を結合させて複合体(60、61)を形成する工程(S11~S13、S21、S22)と、試料(10)から少なくとも複合体(60、61)を選択的に回収する工程(S14、S15、S23、S24)と、試料(10)から回収された複合体(60、61)を基板(80)に固定する工程(S16、S26)と、基板(80)に固定された複合体(60)に結合する複数の蛍光色素(41)から発せられる蛍光に応じた輝点に基づいて、被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)と、を備える。

10

【0039】

本態様に係る被検物質の情報取得方法によれば、試料から複合体が選択的に回収され、回収された複合体が基板に固定される。このとき、試料に含まれていた被検物質以外の物質や複合体を形成しなかった捕捉物質などの夾雑物質は、複合体から分離され、基板に転移されることが抑制される。したがって、基板には、ほぼ被検物質のみが転移されて固定される。よって、蛍光色素から発せられる蛍光に応じた輝点に基づいて、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できる。

20

【0040】

本発明の第4の態様は、被検物質の情報取得方法に関する。本態様に係る被検物質の情報取得方法は、試料(10)中の被検物質(11)と夾雑物質(13)とを分離する工程(S14、S23)と、夾雑物質(13)から分離された被検物質(11)を基板(80)に固定する工程(S16、S26)と、基板(80)に固定された被検物質(11)の構造に関する情報を取得する工程(S17、S27)と、を備える。

30

【0041】

本態様に係る被検物質の情報取得方法によれば、被検物質と夾雑物質とが分離され、分離された被検物質が基板に固定される。このとき、試料に含まれていた被検物質以外の物質や分離に用いた捕捉物質などの夾雑物質は、被検物質から分離され、基板に転移されることが抑制される。したがって、基板には、ほぼ被検物質のみが転移されて固定される。よって、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できる。

【0042】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、被検物質(11)は、試料(10)中に含まれる被検対象のタンパク質であり、夾雑物質(13)は、被検対象のタンパク質以外のタンパク質を含む。

40

【0043】

本態様に係る被検物質の情報取得方法において、試料(10)は、脳脊髄液である。

【発明の効果】

【0044】

本発明によれば、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1は、実施形態1に係る情報取得方法を示すフローチャートである。

【図2】図2(a)は、実施形態1に係る結合工程、分離準備工程および標識工程を模式的に示す図である。図2(b)は、実施形態1に係る分離工程を模式的に示す図である。

50

【図 3】図 3 ( a )、( b ) は、実施形態 1 に係る乖離工程を模式的に示す図である。

【図 4】図 4 は、実施形態 1 に係る固定工程を模式的に示す図である。

【図 5】図 5 は、実施形態 2 に係る情報取得方法を示すフローチャートである。

【図 6】図 6 は、実施形態 2 に係る固定工程を模式的に示す図である。

【図 7】図 7 は、実施形態 3 に係る情報取得方法を示すフローチャートである。

【図 8】図 8 ( a ) は、実施形態 3 に係る分離準備工程および標識工程を模式的に示す図である。図 8 ( b ) は、実施形態 3 に係る分離工程を模式的に示す図である。

【図 9】図 9 ( a )、( b ) は、実施形態 3 に係る乖離工程を模式的に示す図である。図 9 ( c ) は、実施形態 3 に係る結合工程を模式的に示す図である。

【図 10】図 10 は、実施形態 4 に係る情報取得方法を示すフローチャートである。

【図 11】図 11 は、実施形態 4 に係る結合工程を模式的に示す図である。

【図 12】図 12 は、実施形態 1 ~ 4 に係る情報取得工程を示すフローチャートである。

【図 13】図 13 ( a ) は、実施形態 1 ~ 4 に係る情報取得工程において、全ての蛍光色素が発光状態にあることを示す模式図である。図 13 ( c )、( d ) は、実施形態 1 ~ 4 に係る情報取得工程において、一部の蛍光色素が発光状態にあることを示す模式図である。

【図 14】図 14 は、実施形態 1 ~ 4 に係る情報取得工程において、超解像画像を取得し輝点をグループに分類する手順を説明する図である。

【図 15】図 15 は、実施形態 1 ~ 4 に係る情報取得工程において、表示部に表示される画面の例示図である。

【図 16】図 16 ( a ) は、実施形態 1 の検証の手順により取得された超解像画像を示す図である。図 16 ( b ) は、実施形態 1 の検証の手順において取得された蛍光画像である。図 16 ( c ) は、実施形態 1 の検証において取得された蛍光画像上の輝点の数と被検物質の濃度との関係を示すグラフである。

【図 17】図 17 ( a ) は、比較例の検証の手順により取得された超解像画像を示す図である。図 17 ( b ) は、比較例の検証の手順において取得された蛍光画像である。図 17 ( c ) は、比較例の検証において取得された蛍光画像上の輝点の数と被検物質の濃度との関係を示すグラフである。

【図 18】図 18 は、実施形態 1 ~ 4 に係る情報取得工程を自動で行うための検出装置の構成を示す模式図である。

【図 19】図 19 ( a )、( b ) は、関連技術の構成を説明するための模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0046】

以下に示す実施形態 1 ~ 4 は、本発明の実施の形態を示すものである。試料は、生体から採取した液体であり、たとえば、CSF (cerebrospinal fluid: 脳脊髄液)、血液、血漿、組織液、尿などである。被検物質は、細胞、ポリペプチド、タンパク質、核酸、エクソソーム、糖鎖などであり、実施形態 1 ~ 4 の情報取得方法においては、多量体が好適である。被検物質は、たとえば、アミロイドモノマーが重合したアミロイドオリゴマー、タウタンパク質が重合したタウオリゴマーなどである。実施形態 1 ~ 4 では、試料は CSF であり、被検物質はアミロイドである。

【0047】

< 実施形態 1 >

図 1 に示すように、実施形態 1 の情報取得方法は、ステップ S 11 ~ S 17 の処理工程を含む。ステップ S 11 ~ S 16 の各工程は、オペレータにより手動で行われてもよく、処理装置により自動で行われてもよい。ステップ S 17 の情報取得工程は、オペレータにより顕微鏡を用いて行われてもよく、検出装置により自動で行われてもよい。ステップ S 17 の情報取得工程を自動で行う検出装置については、追って図 18 を参照して説明する。

【0048】

図 2 ( a ) に示すように、試料 10 は、被検物質 11 と夾雑物質 12 を含んでいる。夾

10

20

30

40

50

雑物質 12 は、被検物質 11 以外の不要な物質であり、たとえば被検物質 11 以外のタンパク質である。図 1 に示す各ステップでは、後述するように、固相 20 と、第 2 の捕捉物質 30 と、第 3 の捕捉物質 40 と、第 1 の捕捉物質 50 が用いられる。以下、図 1 に示す各ステップを、図 2 ( a ) ~ 図 4 を参照して説明する。ステップ S 11 ~ S 13 からなる形成工程では、ステップ S 11 ~ S 13 の工程が、同時に行われる。形成工程では、試料 10 中の被検物質 11 に各捕捉物質が結合されて複合体 60 が形成される。ステップ S 14、S 15 からなる回収工程では、試料 10 から複合体 60 が選択的に回収される。

#### 【 0049 】

ステップ S 11 の結合工程において、第 1 の捕捉物質 50 が被検物質 11 に結合される。図 2 ( a ) に示すように、第 1 の捕捉物質 50 は、図 4 に示す基板 80 と結合可能な物質であり、結合物質 51 と、結合物質 51 が結合した抗体 52 とを含む。結合物質 51 は後述する基板 80 の結合パートナー 81 と特異的に結合し、抗体 52 は被検物質 11 と特異的に結合する。抗体 52 と被検物質 11 が結合することにより、第 1 の捕捉物質 50 と被検物質 11 が結合する。

10

#### 【 0050 】

ステップ S 12 の分離準備工程において、固相 20 が、第 2 の捕捉物質 30 を介して複合体 60 に結合される。図 2 ( a ) に示すように、固相 20 は、磁性粒子 21 と、磁性粒子 21 が結合した第 2 の結合パートナー 22 とを含む。第 2 の捕捉物質 30 は、第 2 の結合物質 31 と、第 2 の結合物質 31 が結合した抗体 32 とを含む。第 2 の結合パートナー 22 は第 2 の結合物質 31 と特異的に結合し、抗体 32 は被検物質 11 と特異的に結合する。第 2 の結合パートナー 22 と第 2 の結合物質 31 が結合し、抗体 32 と被検物質 11 が結合することにより、固相 20 と複合体 60 が結合する。

20

#### 【 0051 】

このように、固相 20 に対する複合体 60 の特異的な結合が、固相 20 と結合可能な第 2 の捕捉物質 30 を介して行われると、後段の乖離工程において、複合体 60 を固相 20 から乖離できるようになる。また、固相 20 と被検物質 11 とを安定的に結合させることができる。

#### 【 0052 】

第 2 の結合物質 31 と第 2 の結合パートナー 22 との組み合わせが、抗原とその抗体、リガンドとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、ビオチン、デスチオビオチンなどのビオチン類縁体を含むビオチン類とアビジン、ストレプトアビジンなどのアビジン類縁体を含むアビジン類の組み合わせから選択される。こうすると、第 2 の結合物質 31 と第 2 の結合パートナー 22 とを安定的に結合できる。リガンドとその受容体の組み合わせとしては、酵素とその基質、ホルモンや神経伝達物質などのシグナル物質とその受容体などの組み合わせが挙げられる。あるいは、第 2 の結合物質 31 が抗ハプテンであり、第 2 の結合パートナー 22 が抗ハプテン抗体でもよい。この場合も、第 2 の結合物質 31 と第 2 の結合パートナー 22 とを安定的に結合できる。

30

#### 【 0053 】

実施形態 1 では、第 2 の結合物質 31 が、ジニトロフェニル基であり、第 2 の結合パートナー 22 が抗ジニトロフェニル基抗体である。この場合、後述する遊離剤としてジニトロフェニルアミノ酸が用いられると、第 2 の結合物質 31 と第 2 の結合パートナー 22 との結合を容易に乖離できる。

40

#### 【 0054 】

なお、実施形態 1 では、第 1 の捕捉物質 50 と第 2 の捕捉物質 30 は、互いに異なるよう構成されているが、これに限らない。たとえば、第 1 の捕捉物質 50 と第 2 の捕捉物質 30 に代えて、1つの抗体に対して結合物質 51 と第 2 の結合物質 31 とが結合されることにより、他の捕捉物質が構成されてもよい。ただし、この場合、分離工程において、被検物質 11 だけでなく被検物質 11 が結合していない他の捕捉物質も、被検物質 11 と併せて取り出されるため、固定工程において、被検物質 11 が結合していない他の捕捉物質が基板 80 の結合パートナー 81 に固定されてしまう。このため、被検物質 11 が結合パ

50

ートナー 81 に結合しにくくなり、基板 80 への被検物質 11 の固定を効率は低下する。したがって、基板 80 への被検物質 11 の固定を円滑に行うためには、第 1 の捕捉物質 50 と第 2 の捕捉物質 30 は、互いに異なるよう構成され、個別に被検物質 11 に結合するのが好ましい。

#### 【0055】

ステップ S13 の標識工程において、第 3 の捕捉物質 40 が被検物質 11 に結合される。図 2 (a) に示すように、第 3 の捕捉物質 40 は、蛍光標識である蛍光色素 41 と、蛍光色素 41 により標識された抗体 42 とを含む。抗体 42 は被検物質 11 と特異的に結合する。抗体 42 と被検物質 11 が結合することにより、被検物質 11 に蛍光標識が付与される。

10

#### 【0056】

実施形態 1 では、第 1 の捕捉物質 50 の抗体 52、第 2 の捕捉物質 30 の抗体 32、および第 3 の捕捉物質 40 の抗体 42 のエピトープの少なくとも一部は重複しており、ステップ S11 ~ S13 の工程は、同時に行われる。このように、各抗体のエピトープの少なくとも一部が重複する場合、ステップ S11 ~ S13 の工程は、同時に行われるのが好ましい。より詳細には、ステップ S11 における第 1 の捕捉物質 50 を試料 10 に混合する工程と、ステップ S12 における第 2 の捕捉物質 30 を試料 10 に混合する工程と、ステップ S13 における第 3 の捕捉物質 40 を試料 10 に混合する工程とは、同時に行われるのが好ましい。

#### 【0057】

たとえば、第 1 の捕捉物質 50 を試料 10 に混合する前に、第 2 の捕捉物質 30 を試料 10 に混合すると、第 2 の捕捉物質 30 により被検物質 11 の結合サイトが占有されて、第 1 の捕捉物質 50 が被検物質 11 に円滑に結合しないことが起こり得る。このように混合するタイミングが異なると、後で混合した物質が被検物質 11 に結合しにくくなる。第 1 の捕捉物質 50 と、第 2 の捕捉物質 30 と、第 3 の捕捉物質 40 とを同時に試料 10 に混合することにより、各物質を、円滑に被検物質 11 に結合させることができる。

20

#### 【0058】

なお、各抗体のエピトープが重複しない場合は、ステップ S11 ~ S13 の工程は、同時に行われなくてもよく、ステップ S11 ~ S13 の順序も図 1 に示す順に限らない。

#### 【0059】

ステップ S11 ~ S13 の工程が終了した時点で、図 2 (a) に示すように、容器内の試料 10 において、被検物質 11 に第 1 の捕捉物質 50 と、第 2 の捕捉物質 30 と、第 3 の捕捉物質 40 とが結合して複合体 60 が形成され、複合体 60 に固相 20 が結合した状態となる。

30

#### 【0060】

ステップ S14 の分離工程において、固相 20 が選択的に分離され、試料 10 から被検物質 11 が分離される。具体的には、複合体 60 が夾雑物質 13 から分離されることにより、試料 10 から被検物質 11 が取り出される。実施形態 1 の夾雑物質 13 は、図 2 (b) に示すように、夾雑物質 12 と、複合体 60 を形成しなかった捕捉物質 30、40、50 とを含む。

40

#### 【0061】

図 2 (b) に示すように、分離工程における複合体 60 と夾雑物質 13 の分離は、たとえば、磁石 70 を用いて行われる。磁石 70 が容器に近付けられると、磁力によって磁石 70 が位置付けられた容器の内壁に磁性粒子 21 が引き寄せられる。このとき、磁性粒子 21 と被検物質 11 は一体化しているため、磁性粒子 21 とともに被検物質 11 も容器の内壁に引き寄せられる。この状態で、容器内の液体が取り除かれる。取り除かれた液体は夾雑物質 13 を含んでいる。こうして、被検物質 11 と夾雑物質 13 とが分離され、試料 10 から被検物質 11 が取り出される。

#### 【0062】

実施形態 1 では、分離工程よりも先に、第 1 の捕捉物質 50 を被検物質 11 に結合させ

50

る工程が行われている。このため、被検物質 1 1 に結合しなかった第 1 の捕捉物質 5 0 を、分離工程において、夾雑物質 1 2 の分離と併せて被検物質 1 1 から分離できる。よって、被検物質 1 1 に結合しなかった第 1 の捕捉物質 5 0 が、ステップ S 1 6 の固定工程において基板 8 0 に転移することを抑制できる。同様に、分離工程よりも先に、第 2 の捕捉物質 3 0 と第 3 の捕捉物質 4 0 を、被検物質 1 1 に結合させる工程が行われている。このため、被検物質 1 1 に結合しなかった第 2 の捕捉物質 3 0 と第 3 の捕捉物質 4 0 とを、分離工程において、夾雑物質 1 2 の分離と併せて被検物質 1 1 から分離できる。よって、被検物質 1 1 に結合しなかった第 2 の捕捉物質 3 0 と第 3 の捕捉物質 4 0 とが、ステップ S 1 6 の固定工程において基板 8 0 に転移することを抑制できる。

#### 【 0 0 6 3 】

なお、分離工程後に第 1 の捕捉物質 5 0 を被検物質 1 1 に結合させる工程を行う場合、さらに、被検物質 1 1 に結合しなかった第 1 の捕捉物質 5 0 を取り除く工程を行うことが好ましい。また、分離工程における分離とは、複合体 6 0 のみが分離されることに限らず、複合体 6 0 以外の物質も僅かに含んだ状態で複合体 6 0 を分離することをも含む概念である。

#### 【 0 0 6 4 】

実施形態 1 では、免疫反応の違いに基づいて、すなわち、第 2 の捕捉物質 3 0 の抗体 3 2 と被検物質 1 1 とが抗原抗体反応により特異的に結合することに基づいて、分離工程において、固相 2 0 が選択的に回収され、被検物質 1 1 と夾雑物質 1 3 とが分離された。しかしながら、これに限らず、被検物質 1 1 と夾雑物質 1 2 とを分離する方法は、複合体 6 0 と夾雑物質 1 3 との比重の違い、大きさの違い、電気的性質の違い、および免疫反応の違いのうち、少なくとも一つの違いに基づく分離方法であればよい。具体的には、分離方法は、ゲル濾過、電気泳動、免疫反応などであればよい。こうすると、適切に分離を行うことができる。なお、上記のように免疫反応の違いを用いると、複合体 6 0 と固相 2 0 との結合の特異性が高くなるため、より精度良く被検物質 1 1 を夾雑物質 1 3 から分離できる。

#### 【 0 0 6 5 】

また、被検物質 1 1 の分離は、上記のように固相 2 0 を用いて行われるのが好ましい。固相 2 0 は、上記のように磁性粒子 2 1 を含むのが好ましく、被検物質 1 1 に結合した磁性粒子 2 1 を磁石 7 0 により引き寄せることで、被検物質 1 1 を分離するのが好ましい。磁性粒子 2 1 を磁石 7 0 により引き寄せることにより、被検物質 1 1 と夾雑物質 1 3 との分離を円滑に行うことができる。

#### 【 0 0 6 6 】

ステップ S 1 5 の乖離工程において、複合体 6 0 が固相 2 0 から乖離される。具体的には、図 3 ( a ) に示すように、分離された複合体 6 0 を含む液体に対して遊離剤が混合され、固相 2 0 が複合体 6 0 から乖離させられる。これにより、固相 2 0 が液体中に遊離する。そして、図 3 ( b ) に示すように、磁石 7 0 が容器に近付けられ、磁石 7 0 によって磁石 7 0 が位置付けられた容器の内壁に固相 2 0 が引き寄せられる。この状態で、容器内の液体が取り出される。取り出された液体は、複合体 6 0 を含んでいる。こうして、複合体 6 0 が固相 2 0 から乖離される。固相 2 0 が乖離されることにより、被検物質 1 1 に結合した固相 2 0 や、固相 2 0 に非特異的に結合した他の物質などが、被検物質 1 1 の観察においてノイズとなることを抑制できる。

#### 【 0 0 6 7 】

なお、複合体 6 0 と固相 2 0 との乖離は、たとえば、競合反応による免疫学的な分離に基づいて行われてもよく、還元剤を用いた化学的な分離に基づいて行われてもよい。また、実施形態 1 では、図 3 ( a ) に示すように、第 2 の結合パートナー 2 2 と第 2 の結合物質 3 1 とが乖離することにより、複合体 6 0 と固相 2 0 とが乖離する。しかしながら、複合体 6 0 と固相 2 0 との乖離は、これに限らず、磁性粒子 2 1 と複合体 6 0 とを繋ぐいずれかの部分において、複合体 6 0 側と固相 2 0 側とが乖離されればよい。

#### 【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

ステップ S 1 6 の固定工程において、図 4 に示すように、第 1 の捕捉物質 5 0 が基板 8 0 に結合され、被検物質 1 1 が基板 8 0 に固定される。基板 8 0 は、たとえば、ガラス板などにより構成される。基板 8 0 は、第 1 の捕捉物質 5 0 の結合物質 5 1 と特異的に結合する結合パートナー 8 1 を含む。固定工程では、結合パートナー 8 1 と結合物質 5 1 との特異的結合により、被検物質 1 1 が基板 8 0 に固定される。このように、物理的な吸着ではなく、第 1 の捕捉物質 5 0 を仲介として被検物質 1 1 を基板 8 0 に特異的に結合させると、基板 8 0 に夾雑物質 1 3 が転移されることをさらに抑制しながら、被検物質 1 1 を基板 8 0 に安定的に固定できる。

#### 【 0 0 6 9 】

結合物質 5 1 と結合パートナー 8 1 との組み合わせが、抗原とその抗体、リガンドとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、ビオチン、デスチオビオチンなどのビオチン類縁体を含むビオチン類とアビジン、ストレプトアビジンなどのアビジン類縁体を含むアビジン類の組み合わせから選択される。こうすると、結合物質 5 1 と結合パートナー 8 1 とを安定的に結合できる。リガンドとその受容体の組み合わせとしては、酵素とその基質、ホルモンや神経伝達物質などのシグナル物質とその受容体などの組み合わせが挙げられる。実施形態 1 では、結合物質 5 1 がビオチン類であり、結合パートナー 8 1 がアビジン類である。この場合、結合物質 5 1 と結合パートナー 8 1 との親和性が高いため、より安定的に被検物質 1 1 を基板 8 0 に固定できる。

10

#### 【 0 0 7 0 】

実施形態 1 では、固定工程の前に標識工程が行われている。これにより、第 3 の捕捉物質 4 0 が直接的に基板 8 0 に付着することを抑制して、後述する情報取得工程において、被検物質 1 1 の構造に関する情報を精度良く取得できる。また、複合体 6 0 が固相 2 0 から乖離された後で、固相 2 0 から乖離した複合体 6 0 に結合する第 1 の捕捉物質 5 0 が基板 8 0 に結合され、被検物質 1 1 が基板 8 0 に固定される。これにより、基板 8 0 に固相 2 0 が転移されないため、精度良く被検物質 1 1 の構造に関する情報を取得できる。

20

#### 【 0 0 7 1 】

ステップ S 1 7 の情報取得工程において、基板 8 0 に固定された被検物質 1 1 から被検物質 1 1 の構造に関する情報が取得される。なお、「被検物質の構造に関する情報」とは、被検物質 1 1 についての、大きさ、形態、構造、化学結合、凝集度などを広く含む概念である。情報取得工程の詳細については、追って図 1 2 を参照して説明する。

30

#### 【 0 0 7 2 】

実施形態 1 では、試料 1 0 から被検物質 1 1 が分離され、分離された被検物質 1 1 が基板 8 0 に固定される。このため、基板 8 0 に夾雑物質 1 3 が転移することが抑制され、基板 8 0 には、ほぼ被検物質 1 1 のみが転移されて固定される。よって、被検物質 1 1 の構造に関する情報を精度良く取得できる。また、基板 8 0 に夾雑物質 1 3 が転移することが抑制されるため、被検物質 1 1 の濃度が低い場合でも、被検物質 1 1 由来のシグナルが、夾雑物質 1 3 由来のシグナルによって妨げられにくい。これにより、夾雑物質 1 3 による影響を抑制して、高精度に被検物質 1 1 の構造に関する情報を精度良く取得できる。

#### 【 0 0 7 3 】

また、被検物質 1 1 の構造に関する情報は、病状の進行等に伴って変化するため、病理診断や投薬方針の決定等において有用である。たとえば被検物質 1 1 がアミロイドである場合、アミロイドの構造に関する情報を、アルツハイマー病の診断や投薬方針の決定に役立てることができる。また、実施形態 1 によれば、夾雑物質 1 3 が除去されるため、アミロイドの濃度が低い場合でも高精度にアミロイドの構造に関する情報を取得できる。したがって、アルツハイマー病の初期段階など、アミロイドの濃度が低い場合においても、取得した構造に関する情報を、病状の進行の診断に役立てることができる。

40

#### 【 0 0 7 4 】

##### < 実施形態 2 >

図 5 に示すように、実施形態 2 では、実施形態 1 と比較して、図 1 に示したフローチャートからステップ S 1 5 の乖離工程が省略される。すなわち、実施形態 2 では、実施形態

50

1と同様にステップS 1 1～S 1 3の工程が行われた後、乖離工程が行われることなく、ステップS 1 6、S 1 7の工程が行われる。実施形態2の回収工程は、ステップS 1 4の分離工程からなる。

【0075】

実施形態2では、ステップS 1 1～S 1 4の工程が行われることにより、実施形態1と同様、図2(b)に示すように、被検物質11と夾雑物質13とが分離され、試料10から被検物質11が取り出される。続いて、実施形態2では、ステップS 1 6の固定工程が行われる。ステップS 1 6の固定工程において、図6に示すように、第1の捕捉物質50が基板80に結合され、被検物質11が基板80に固定される。このとき、実施形態1とは異なり、被検物質11には固相20が結合している。そして、ステップS 1 7の情報取得工程において、実施形態1と同様に、基板80に固定された被検物質11から被検物質11の構造に関する情報が取得される。

10

【0076】

実施形態2においても、実施形態1と同様、基板80に夾雑物質13が転移されることが抑制され、基板80には、ほぼ被検物質11のみが転移されて固定される。よって、被検物質11の構造に関する情報を精度良く取得できる。また、実施形態2では、固相20を取り除くための工程が省略されているため、固相20を取り除くための工程において被検物質11が取り除かれることがない。なお、乖離工程が省略される場合、磁性粒子21は、第2の捕捉物質30を介さずに被検物質11に結合されてもよい。たとえば、磁性粒子と結合した抗体が被検物質11に結合されることにより、磁性粒子21が被検物質11に結合されてもよい。あるいは、磁性粒子21が被検物質11に直接結合されてもよい。

20

【0077】

<実施形態3>

図7に示すように、実施形態3では、実施形態1と比較して、図1に示したフローチャートにおいて結合工程が乖離工程と固定工程の間で実行される。すなわち、実施形態3では、分離準備工程と、標識工程と、分離工程と、乖離工程とが行われた後で、結合工程が行われる。ステップS 2 1、S 2 2からなる形成工程では、ステップS 2 1、S 2 2の工程が、同時に行われる。形成工程では、試料10中の被検物質11に各捕捉物質が結合されて複合体61が形成される。ステップS 2 3、S 2 4からなる回収工程では、試料10から複合体61が選択的に回収される。

30

【0078】

ステップS 2 1の分離準備工程において、図8(a)に示すように、固相20が、第2の捕捉物質30を介して被検物質11に結合される。固相20と被検物質11との結合は、実施形態1と同様である。ステップS 2 2の標識工程において、図8(a)に示すように、第3の捕捉物質40が被検物質11に結合される。第3の捕捉物質40と被検物質11との結合は、実施形態1と同様である。

【0079】

図7では、ステップS 2 1、S 2 2の工程が、便宜上この順に並べられたが、実際には同時に行われる。なお、ステップS 2 1、S 2 2の工程は同時に行われなくてもよく、ステップS 2 1、S 2 2の順序は、図7に示す順と逆でもよい。ただし、第2の捕捉物質30と第3の捕捉物質40を被検物質11に円滑に結合させるためには、ステップS 2 1、S 2 2の工程は同時に行われるのが好ましい。

40

【0080】

ステップS 2 1、S 2 2の工程が終了した時点で、図8(a)に示すように、容器内の試料10において、被検物質11に第2の捕捉物質30と第3の捕捉物質40が結合して複合体61が形成され、複合体61に固相20が結合した状態となる。

【0081】

ステップS 2 3の分離工程において、固相20が選択的に分離され、試料10から被検物質11が分離される。具体的には、複合体61が夾雑物質13から分離されることにより、試料10から被検物質11が取り出される。実施形態3の夾雑物質13は、図8(b)

50

)に示すように、夾雑物質12と、複合体61を形成しなかった捕捉物質30、40とを含む。図8(b)に示すように、分離工程における被検物質11と夾雑物質13の分離は、実施形態1と同様、たとえば、磁石70を用いて行われる。

#### 【0082】

ステップS24の乖離工程において、複合体61が固相20から乖離される。具体的には、図9(a)に示すように、分離された複合体61を含む液体に対して遊離剤が混合され、固相20が複合体61から乖離させられる。そして、図9(b)に示すように、磁石70によって磁石70が位置付けられた容器の内壁に固相20が引き寄せられる。この状態で、容器内の液体が取り出される。取り出された液体は、複合体61を含んでいる。こうして、複合体61が固相20から乖離される。固相20が乖離されることにより、被検物質11に結合した固相20や、固相20に非特異的に結合した他の物質などが、被検物質11の観察においてノイズとなることを抑制できる。

10

#### 【0083】

ステップS25の結合工程において、第1の捕捉物質50が被検物質11に結合される。図9(c)に示すように、乖離工程において取り出された被検物質11を含む液体に、第1の捕捉物質50が混合される。抗体52と被検物質11が結合することにより、第1の捕捉物質50と被検物質11が結合し、複合体60が生成される。なお、結合工程は、分離工程と乖離工程の間で行われてもよい。

#### 【0084】

ステップS26の固定工程において、実施形態1と同様、図4に示すように、第1の捕捉物質50が基板80に結合され、被検物質11が基板80に固定される。

20

#### 【0085】

実施形態3においても、実施形態1と同様、基板80に夾雑物質13が転移されることが抑制され、基板80には、ほぼ被検物質11のみが転移されて固定される。よって、被検物質11の構造に関する情報を精度良く取得できる。また、複合体61が固相20から乖離された後で、固相20から乖離した被検物質11に第1の捕捉物質50が結合され、第1の捕捉物質50を介して被検物質11が基板80に固定される。これにより、基板80に固相20が転移されないため、精度良く被検物質11の構造に関する情報を取得できる。

#### 【0086】

30

##### <実施形態4>

図10に示すように、実施形態4では、実施形態3と比較して、図7に示したフローチャートからステップS24の乖離工程が省略される。すなわち、実施形態4では、実施形態3と同様にステップS21～S23の工程が行われた後、乖離工程が行われることなく、ステップS25～S27の工程が行われる。実施形態4の回収工程は、ステップS23の分離工程からなる。

#### 【0087】

実施形態4では、ステップS21～S23の工程が行われることにより、実施形態3と同様、図8(b)に示すように、被検物質11と夾雑物質13とが分離され、試料10から被検物質11が取り出される。続いて、実施形態4では、ステップS25の結合工程が行われる。ステップS25の結合工程において、図11に示すように、分離工程において分離された複合体61を含む液体に、第1の捕捉物質50が混合される。抗体52と被検物質11が結合することにより、第1の捕捉物質50と被検物質11が結合し、複合体60が生成される。ステップS26の固定工程において、図6に示すように、第1の捕捉物質50が基板80に結合され、被検物質11が基板80に固定される。そして、ステップS27の情報取得工程において、実施形態3と同様に、基板80に固定された被検物質11から被検物質11の構造に関する情報が取得される。

40

#### 【0088】

実施形態4においても、実施形態3と同様、基板80に夾雑物質13が転移されることが抑制され、基板80には、ほぼ被検物質11のみが転移されて固定される。よって、被

50

検物質 11 の構造に関する情報を精度良く取得できる。また、実施形態 4 では、固相 20 を取り除くための工程が省略されているため、固相 20 を取り除くための工程において被検物質 11 が取り除かれることがない。

【0089】

< 情報取得工程 >

次に、実施形態 1 ~ 4 の情報取得工程の詳細について説明する。

【0090】

情報取得工程は、光の回折限界を超えた分解能を有する超解像蛍光顕微鏡によって、基板 80 上の被検物質 11 を測定する工程を含む。光の回折限界を超えた分解能を有する顕微鏡が用いられると、光の回折限界を超えた分解能で被検物質 11 の構造に関する情報を取得できる。なお、情報取得工程は、図 18 を参照して後述する検出装置 100 により自動で行われてもよい。

10

【0091】

図 12 は、情報取得工程を示すフローチャートである。以下の説明では、適宜、図 13 (a) ~ (c) に示す模式図を参照する。図 13 (a) ~ (c) は、基板 80 に固定された被検物質 11 を示している。

【0092】

ここで、蛍光色素 41 は、励起光が照射され続けると、蛍光を生じる発光状態と蛍光を生じない消光状態とに切り替わるよう構成されている。このような蛍光色素 41 として、市販の色素を用いることができる。図 13 (a) ~ (c) において、発光状態の蛍光色素 41 は黒丸で示されており、消光状態の蛍光色素 41 は白丸で示されている。

20

【0093】

図 12 に示すように、ステップ S101 において、励起光が基板 80 上の蛍光色素 41 に照射される。図 13 (a) に示すように、初期状態では、全ての蛍光色素 41 が発光状態にある。この状態で、励起光の照射が開始されると、全ての蛍光色素 41 から蛍光が励起される。その後、励起光が蛍光色素 41 に照射され続けると、時間の経過とともに、たとえば、図 13 (b)、(c) に示すように、発光状態の蛍光色素 41 の分布が変化する。

【0094】

ステップ S102 において、蛍光色素 41 に励起光が照射されている間に、生じた蛍光が撮像され、蛍光色素 41 の画像が取得される。ステップ S102 では、蛍光色素 41 に励起光が照射されている間に撮像が繰り返され、たとえば 3000 枚の画像が取得される。上記のように時間の経過に応じて発光状態の蛍光色素 41 の分布が変化するため、取得される画像上の蛍光の分布も、撮像タイミングごとに異なる。

30

【0095】

ステップ S103 において、所定時間が経過し、必要な画像の取得が終了したか否かが判定される。必要な画像の取得が完了すると、処理がステップ S104 に進められる。このように画像を取得すると、後段のステップにおいて被検物質 11 の構造に関する情報を取得できるようになる。

【0096】

なお、ステップ S101 ~ S103 の工程に代えて、STORM、PALM、STED、または SIM の手法に基づく工程によって、画像が取得されてもよい。STORM に基づく工程によって画像が取得される場合、蛍光色素 41 は、蛍光を生じる活性状態と蛍光を生じない不活性状態とに切り替わるよう構成される。そして、蛍光色素 41 が 2 種類の光により活性状態と不活性状態に切り替えられることにより、上記と同様に、蛍光の分布が異なる複数の画像が取得される。

40

【0097】

続いて、ステップ S104 において、超解像画像が作成される。

【0098】

図 14 に示すように、超解像画像は、図 12 のステップ S102 の工程で取得された複

50

数の蛍光画像に基づいて作成される。具体的には、各蛍光画像について、ガウスフィッティングにより蛍光の輝点が抽出される。これにより、2次元平面において、各輝点の座標が取得される。ここで、ガウスフィッティングにより、所定範囲で基準波形とマッチングする蛍光領域の輝点については、この範囲に応じた広さの輝点領域が割り当てられる。基準波形と1点でマッチングする蛍光領域の輝点については、最低レベルの広さの輝点領域が割り当てられる。こうして、各蛍光画像から得られた輝点領域が重ね合わせられることにより、超解像画像が作成される。

#### 【0099】

したがって、ステップS102において3000枚の蛍光画像が取得された場合、蛍光画像の超解像画像は、3000枚の蛍光画像から輝点が抽出され、抽出された輝点の輝点領域が重ね合わせられることにより作成される。

10

#### 【0100】

図12に戻り、ステップS105において、被検物質11の構造に関する情報が取得される。ステップS105では、被検物質11の構造に関する情報として、被検物質11についての、大きさ、形態、構造、凝集度などが取得される。

#### 【0101】

ステップS105では、以下のような手順で被検物質11の構造に関する情報が取得される。

#### 【0102】

図14に示すように、図12のステップS104の工程で取得された超解像画像の作成時に抽出した輝点が、凝集した被検物質11に対応するグループに分類される。すなわち、まず、複数の蛍光画像から抽出された全ての輝点が、座標平面にマッピングされる。続いて、所定の広さの参照領域で座標平面が走査され、参照領域に含まれる輝点の数が取得される。そして、参照領域に含まれる輝点の数が閾値よりも多く、かつ、周囲よりも多い参照領域の位置が抽出され、抽出された位置において参照領域に含まれる輝点が、1つのグループに分類される。こうして得られた1つのグループは、被検物質11の1つの凝集塊とみなされる。

20

#### 【0103】

なお、1つのグループに輝点を分類する方法は、これに限らず、他のクラスタリングの手法でもよい。たとえば、全ての蛍光画像を足し合わせて生成した蛍光画像上で所定の閾値以上の輝度を有する領域を1つの凝集塊とみなしてもよい。また、情報取得工程のステップS101の開始直後に全ての蛍光色素41から励起された蛍光を撮像した蛍光画像上で、所定の閾値以上の輝度を有する領域を1つの凝集塊とみなしてもよい。

30

#### 【0104】

続いて、被検物質11の凝集塊ごとに、超解像画像に基づいて、以下の情報が取得される。すなわち、被検物質11の大きさとして、長手方向の長さ、短手方向の長さ、周囲長、面積などが取得される。また、被検物質11の形態として、縦横比、真円率、分岐数、分岐角度などが取得される。縦横比は、たとえば、長手方向の長さを短手方向の長さで除算することにより得られる。また、被検物質11の構造として、被検物質11の凝集塊が、タンパク質の一次構造、二次構造、三次構造、四次構造のいずれであるかが取得される。また、被検物質11の凝集度として、凝集塊を形成するモノマーの個数が取得される。モノマーの個数は、モノマーの標準の大きさと凝集塊の大きさとを比較することにより取得される。

40

#### 【0105】

ステップS105では、被検物質11の構造に関する情報が、超解像画像に基づいて取得されたが、これに限らず、蛍光色素41から生じた蛍光を撮像して得られる蛍光画像に基づいて取得されてもよい。たとえば、ステップS101の開始直後に全ての蛍光色素41から生じた蛍光を撮像して得られる蛍光画像に基づいて、被検物質11の構造に関する情報が取得されてもよい。ただし、この場合は、光の回折限界を超えた分解能で分析を行うことができない。したがって、上記のように超解像画像に基づいて被検物質11の構造

50

に関する情報が取得されるのが好ましい。

【0106】

図12に戻り、ステップS106において、ステップS105で取得された情報が出力される。具体的には、取得された情報が、ディスプレイからなる表示部に表示される。この他、取得された情報が、スピーカから音声として出力されてもよく、デジタルデータとして他の装置に送信されてもよい。

【0107】

図15は、ステップS106において表示部に表示される画面90を示す模式図である。

【0108】

画面90は、画像91、92と領域93を備える。画像91は、図12のステップS105で取得された超解像画像である。画像92は、画像91の一部を拡大した画像である。領域93は、図12のステップS106で取得された被検物質11の構造に関する情報を表示する領域である。情報取得工程において図15に示すような画面90が表示されると、たとえば、医師等は、視覚的に超解像画像および被検物質11の構造に関する情報を把握できるため、円滑に病状を診断し投薬方針を決定できる。

【0109】

<実施形態1の検証>

次に、発明者らが行った実施形態1の検証について説明する。この検証において、発明者らは、実施形態1の手順に従って超解像画像を取得するとともに、夾雑物質を除去しない比較例の手順に従って超解像画像を取得した。

【0110】

[試料の作製]

Amyloid peptide 1-42 human (Eisai製)をCSF (Access Biologicals社製)で希釈し、被検物質を含む複数の異なる濃度の試料を作製した。作製した試料は、実施形態1の試料10に相当する。

【0111】

[基板の作製]

以下の方法により、ストレプトアビジンを修飾したガラス基板を作製した。作製したガラス基板は、実施形態1の基板80に相当する。

(1) シリコンゴムシート(タイガースポリマー株式会社、SR-50)に直径6mmの貫通孔を作製し、MASコートガラス(松浪硝子工業株式会社製)に貼り付けた。

(2) 30 μg/mL ビオチン結合BSA 0.5 μLをシリコンゴムシート内側のガラス上に滴下し、室温で1時間静置した。

(3) HISCL洗浄液(シスメックス株式会社製) 20 μLでピペッティングによる洗浄を計3回実施した。

(4) 1%BSA / 0.05%PBST溶液 20 μLを滴下し、4 で一晩静置した。

(5) HISCL洗浄液 20 μLでピペッティングによる洗浄を計3回実施した。

(6) 10 μg/mL ストレプトアビジン / 1%BSA / 0.05%PBST溶液 20 μLを滴下し、室温で1時間静置した。

(7) HISCL洗浄液 20 μLでピペッティングによる洗浄を計4回実施した。

【0112】

[その他の物質の作製]

ビオチンで修飾したAnti-human Amyloid Mouse IgG (82E1)を作製し、基板と結合可能な第1の捕捉物質とした。作製した第1の捕捉物質は、実施形態1の第1の捕捉物質50に相当する。抗DNP抗体を結合した磁性ビーズ(Anti-DNP labeled Antibody labeled beads (シスメックス株式会社製))を固相とした。用意した固相は、実施形態1の固相20に相当する。DNPで修飾したAnti-human Amyloid Mouse IgG (82E1)を作製し、固相と結合可能な第2の捕捉物質とした。作製した第2の捕捉物質は、実施形態1の第2の捕捉物質30に相当する。シリルローダミン系蛍光色素で修飾したAnti-human Amyloid

10

20

30

40

50

Mouse IgG (82E1) を作製し、蛍光標識抗体とした。作製した蛍光標識抗体は、実施形態 1 の第 3 の捕捉物質 40 に相当する。5 m M DNP-Lys. 溶液を、遊離剤とした。用意した遊離剤は、実施形態 1 で用いた遊離剤に相当する。

【 0 1 1 3 】

なお、シリルローダミン系蛍光色素は、以下の文献の記載に従い合成したものを使用した。蛍光色素の合成において参考とした文献は、Jonathan B Grimm et al., "A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy", nature methods, VOL.12 NO.3 (2015) p.244-250、である。

【 0 1 1 4 】

[ 実施形態 1 の検証の手順 ]

( 1 ) 上記で作製した第 1 の捕捉物質 (Biotin-IgG)、第 2 の捕捉物質 (DNP-IgG) および蛍光標識抗体 (蛍光色素-IgG) を混合し、下表のとおり組成となるように HISCL R3 希釈液 (シスメックス株式会社製) で調製して抗体溶液を作製した。

【 表 1 】

抗体溶液の組成

Antibody	Antibody concentration (fmol/assay)
Biotin-IgG	200
DNP-IgG	200
蛍光色素-IgG	200

( 2 ) 抗体溶液 80  $\mu$  L と、試料 500  $\mu$  L とを混合し、37 で 30 分間反応させた。

( 3 ) 固相 20  $\mu$  L を混合し、37 で 15 分間反応させた。

( 4 ) 集磁し上清を除去 (BF 分離) 後、HISCL 洗浄液 20  $\mu$  L を添加し攪拌した。本工程を計 3 回実施した。

( 5 ) BF 分離後、遊離剤である 5 m M DNP-Lys. 溶液 10  $\mu$  L を添加し攪拌した。37 で 10 分間反応させた。

( 6 ) BF 分離後、上清を回収し、基板に滴下した。室温で 2 時間静置した。

( 7 ) HISCL 洗浄液 20  $\mu$  L でピペッティングによる洗浄を計 3 回実施した。

( 8 ) 超解像蛍光顕微鏡を用いて図 1 2 と同様の情報取得工程を行い、基板の上の被検物質を観察した。これにより、超解像画像を取得した。

【 0 1 1 5 】

[ 比較例の検証の手順 ]

( 1 ) 上記で作製した第 1 の捕捉物質 (Biotin-IgG) を、HISCL R3 希釈液で 200 fmol/assay となるように調製し、80  $\mu$  L を基板に添加し、37 で 30 分間反応させた。

( 2 ) 上清を除去後、HISCL 洗浄液 20  $\mu$  L で洗浄した。本工程を計 3 回実施した。

( 3 ) 試料 500  $\mu$  L を添加し、37 で 60 分間反応させた。

( 4 ) 上清を除去後、HISCL 洗浄液 20  $\mu$  L で洗浄した。本工程を計 3 回実施した。

( 5 ) 蛍光標識抗体 (蛍光色素-IgG) を、HISCL R3 希釈液で 200 fmol/assay となるように調製し、80  $\mu$  L を基板に添加し、37 で 60 分間反応させた。

( 6 ) 上清を除去後、HISCL 洗浄液 20  $\mu$  L で洗浄した。本工程を計 3 回実施した。

( 7 ) 超解像蛍光顕微鏡を用いて図 1 2 と同様の情報取得工程を行い、基板の上の被検物質を観察した。これにより、超解像画像を取得した。

【 0 1 1 6 】

10

20

30

40

50

図16(a)～(c)を参照して、実施形態1の検証結果について説明する。

【0117】

図16(a)は、実施形態1の検証の手順により取得された超解像画像を示す図である。図16(a)は、試料における被検物質の濃度が任意の濃度の場合の超解像画像である。図16(a)に示すように、回折限界を超えた分解能により、4つの超解像画像において、100nm程度の被検物質の凝集塊の形状が識別可能に表示されている。このように、実施形態1によれば、回折限界を超えた微小な被検物質の形状を捉えることができるため、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できると言える。

【0118】

図16(b)は、実施形態1の検証の手順(8)において、情報取得工程のステップS101の開始直後に全ての蛍光色素41から励起された蛍光を撮像した蛍光画像である。図16(b)に示す3つの蛍光画像は、左から順に、試料における被検物質の濃度が0pM、0.3pM、1pMのときの蛍光画像である。図16(c)は、図16(b)に示す3つの蛍光画像上の輝点の数と、被検物質の濃度との関係を示すグラフである。輝点のカウントは、蛍光画像において所定の閾値を超える輝度を有する領域を輝点領域とし、特定した輝点領域の数をカウントすることにより行われた。

10

【0119】

図16(c)に示すように、実施形態1では、被検物質の濃度が0pMのとき、輝点数は0に近い値となり、濃度の増加に伴って輝点数が増加している。したがって、実施形態1によれば、被検物質の濃度が低い場合であっても、夾雑物質の影響を抑制して、被検物質の特異的な蛍光の検出ができると言える。

20

【0120】

図17(a)～(c)を参照して、比較例の検証結果について説明する。

【0121】

図17(a)は、比較例の検証の手順により取得された超解像画像を示す図である。図17(a)は、試料における被検物質の濃度が0pMの場合の超解像画像である。図17(a)に示すように、比較例では、被検物質の濃度が0pMであるにもかかわらず、複数の輝点が存在していることから、夾雑物質に基づくノイズ光が多いことが分かる。したがって、比較例では、基板上において被検物質に夾雑物質が混じるため、被検物質と夾雑物質とを峻別できず、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得することが困難になる。

30

【0122】

図17(b)は、比較例の検証の手順(7)において、情報取得工程のステップS101の開始直後に全ての蛍光色素41から励起された蛍光を撮像した蛍光画像である。図17(b)に示す3つの蛍光画像は、左から順に、作製した試料における被検物質の濃度が0pM、0.3pM、1pMのときの蛍光画像である。図17(c)は、図17(b)に示す3つの蛍光画像上の輝点の数と、被検物質の濃度との関係を示すグラフである。輝点のカウントは、実施形態1の検証と同様に行われた。

【0123】

図17(c)に示すように、比較例では、被検物質の濃度が0pMであるにもかかわらず、輝点が数千個存在し、濃度の増加に伴って輝点数が増加していない。したがって、比較例によれば、夾雑物質に基づくノイズ光の影響により、被検物質の特異的な蛍光の検出が困難である。

40

【0124】

以上の検証から、実施形態1によれば、夾雑物質を除去することにより、夾雑物質の影響を抑制して、被検物質の構造に関する情報を精度良く取得できることが分かった。

【0125】

< 検出装置 >

図18に示すように、検出装置100は、情報取得部101と情報処理部102を備える。検出装置100は、図12の情報取得工程の各工程を自動で行うための装置である。

【0126】

50

情報取得部 101 は、光源部 110 と、シャッター 121 と、1/4 波長板 122 と、ビームエキスパンダ 123 と、集光レンズ 124 と、ダイクロイックミラー 125 と、対物レンズ 126 と、集光レンズ 127 と、ステージ 130 と、撮像部 140 と、コントローラ 151、152 と、を備える。ステージ 130 には、被検物質 11 が固定された基板 80 が設置される。

#### 【0127】

光源部 110 は、光源 111 とミラー 112 を備える。光源 111 は、励起光を出射する。光源 111 としては、レーザ光源を用いるのが好ましいが、水銀ランプ、キセノンランプ、LED 等を用いてもよい。光源 111 から出射される励起光は、被検物質 11 に結合した蛍光色素 41 を発光状態と消光状態とに変化させるとともに、発光状態の蛍光色素 41 を励起させて蛍光を生じさせる。ミラー 112 は、光源 111 からの励起光を反射して、シャッター 121 へと導く。

10

#### 【0128】

なお、蛍光色素 41 が蛍光を生じる活性状態と蛍光を生じない不活性状態とに切り替わるよう構成される場合、光源部 110 は、2つの光源と、ミラーと、ダイクロイックミラーと、を備えるよう構成される。この場合、一方の光源は、蛍光色素 41 を活性状態にする光を出射し、他方の光源は、蛍光色素 41 を不活性状態にする光を出射する。2つの光源からの光の光軸は、ミラーとダイクロイックミラーによって、互いに一致させられる。

#### 【0129】

シャッター 121 は、コントローラ 151 により駆動され、光源部 110 から出射された励起光を通過させる状態と、光源部 110 から出射された励起光を遮断する状態とに切り替える。これにより、被検物質 11 に対する励起光の照射時間が調整される。1/4 波長板 122 は、光源部 110 から出射された直線偏光の励起光を円偏光に変換する。蛍光色素 41 は、所定の偏光方向の励起光に反応する。よって、光源部 110 から出射された励起光を円偏光に変換することにより、励起光の偏光方向が、蛍光色素 41 が反応する偏光方向に一致し易くなる。これにより、蛍光色素 41 に効率良く蛍光を励起させることができる。ビームエキスパンダ 123 は、基板 80 上における励起光の照射領域を広げる。集光レンズ 124 は、対物レンズ 126 から基板 80 に平行光が照射されるよう励起光を集光する。

20

#### 【0130】

ダイクロイックミラー 125 は、光源部 110 から出射された励起光を反射し、蛍光色素 41 から生じた蛍光を透過する。対物レンズ 126 は、ダイクロイックミラー 125 で反射された励起光を、基板 80 に導く。ステージ 130 は、コントローラ 152 により駆動され、ステージ 130 を面方向に移動させる。基板 80 上の蛍光色素 41 から生じた蛍光は、対物レンズ 126 を通り、ダイクロイックミラー 125 を透過する。集光レンズ 127 は、ダイクロイックミラー 125 を透過した蛍光を集光して、撮像部 140 の受光面 141 に導く。撮像部 140 は、受光面 141 に照射された蛍光を撮像し、蛍光画像を生成する。撮像部 140 は、たとえば CCD などにより構成される。

30

#### 【0131】

情報処理部 102 は、処理部 161 と、記憶部 162 と、表示部 163 と、入力部 164 と、インターフェース 165 と、を備える。

40

#### 【0132】

処理部 161 は、たとえば CPU である。記憶部 162 は、ROM、RAM、ハードディスク等である。処理部 161 は、記憶部 162 に記憶されたプログラムに基づいて、インターフェース 165 を介して、情報処理部 102 の各部と、光源部 120 の光源 111 と、撮像部 140 と、コントローラ 151、152 と、を制御する。

#### 【0133】

また、処理部 161 は、記憶部 162 に記憶されたプログラムに基づいて、図 12 に示した情報取得工程を実行する。すなわち、処理部 161 は、情報取得工程において、光源 111 を駆動して、蛍光色素 41 から生じた蛍光を撮像部 140 により受光し、撮像部 1

50

40を駆動して蛍光画像を取得する。処理部161は、撮像部140により取得した蛍光画像に基づいて、超解像画像を生成する。処理部161は、生成した超解像画像に基づいて、被検物質11の構造に関する情報を取得し、取得した情報を含む画面を表示部163に表示する。

【0134】

表示部163は、処理部161による処理結果等を表示するためのディスプレイである。表示部163は、図15に示す画面90を表示する。入力部164は、オペレータによる指示の入力を受け付けるためのキーボードとマウスである。

【0135】

<変更例>

図12に示す情報取得工程では、光の回折限界を超えた分解能を有する超解像蛍光顕微鏡によって基板80上の被検物質11が測定されたが、これに限らず、ラマン顕微鏡、プローブ顕微鏡、電子顕微鏡によって、基板80上の被検物質11が測定されてもよい。プローブ顕微鏡と電子顕微鏡によれば、光の回折限界を超えた分解能で被検物質11を測定できる。情報取得工程において蛍光を用いた測定が行われない場合、たとえば、ラマン顕微鏡やプローブ顕微鏡を用いる場合、上記の標識工程は省略される。標識工程が省略されると、被検物質11の結合サイトに第1の捕捉物質50を結合させやすくなるため、被検物質11をより円滑に基板80に固定できる。

【0136】

被検物質11の構造に関する情報のうち、被検物質11についての、大きさ、形態、凝集度については、超解像蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、プローブ顕微鏡、または電子顕微鏡を用いて被検物質11を測定した場合に取得可能である。被検物質11の構造に関する情報のうち、被検物質11の構造については、超解像蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、またはプローブ顕微鏡を用いて被検物質11を測定した場合に取得可能である。

【0137】

ラマン顕微鏡を用いて被検物質11を測定した場合、被検物質11を構成する分子や原子を反映したラマンスペクトル、および、被検物質11の形状を反映した画像が取得される。したがって、ラマン顕微鏡によれば、被検物質11の構造に関する情報として、大きさ、形態、構造、凝集度に加えて、化学結合も取得可能である。具体的には、被検物質11の化学結合として、被検物質11を構成する分子または原子についての、種類、数、濃度、割合などが取得される。この場合、図15の画面90内の領域93に、大きさ、形態、構造、凝集度に加えて、取得された被検物質11の化学結合が表示される。たとえば、領域93には、取得された被検物質11の化学結合として、「C=Oは...濃度、C-Hは...濃度」などが表示される。

【符号の説明】

【0138】

- 10 試料
- 11 被検物質
- 12、13 夾雑物質
- 20 固相
- 21 磁性粒子
- 22 第2の結合パートナー
- 30 第2の捕捉物質
- 31 第2の結合物質
- 32 抗体
- 40 第3の捕捉物質
- 41 蛍光色素
- 42 抗体
- 50 第1の捕捉物質
- 51 結合物質

10

20

30

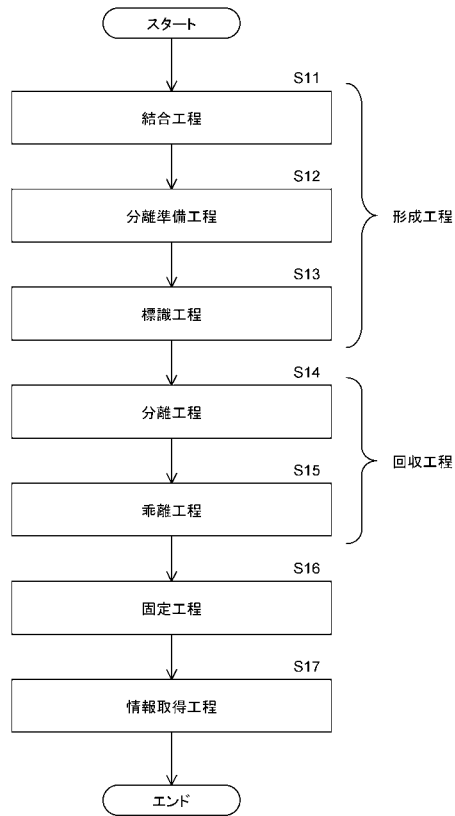
40

50

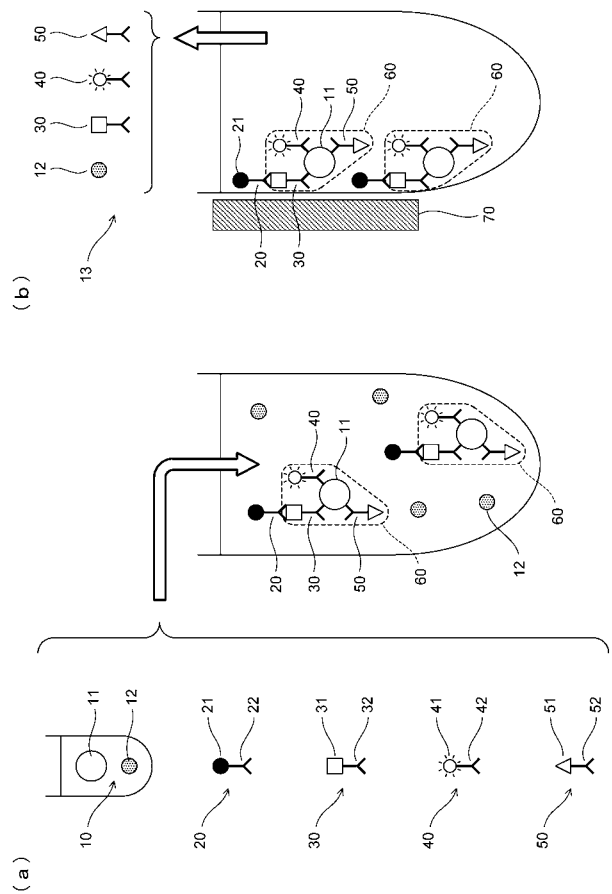
- 5 2 抗体
- 6 0、6 1 複合体
- 8 0 基板
- 8 1 結合パートナー

【 図 1 】

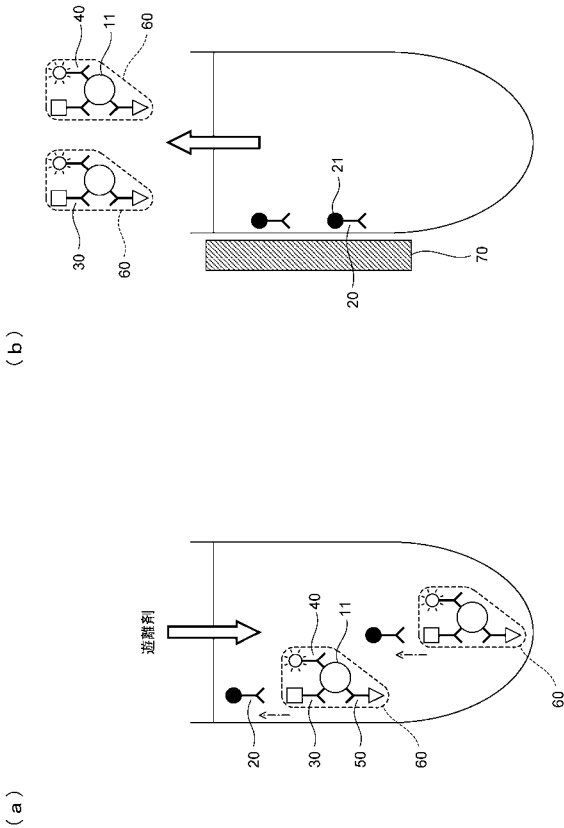
実施形態1



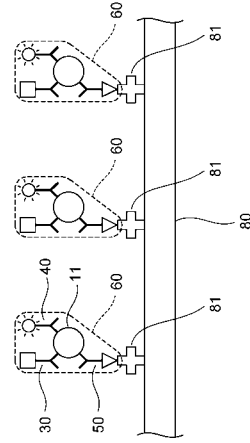
【 図 2 】



【 図 3 】

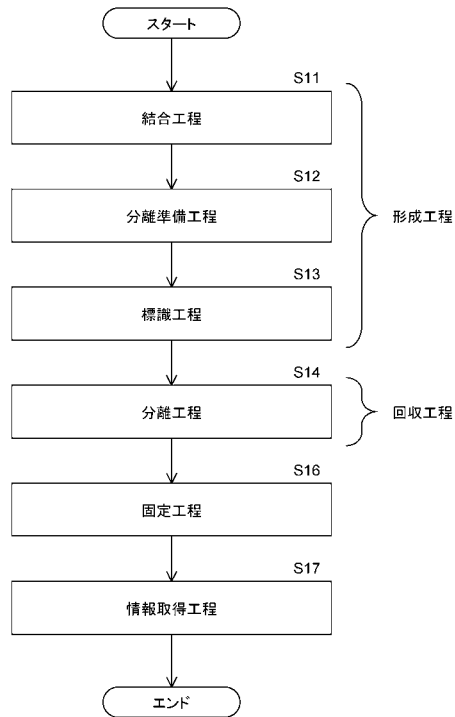


【 図 4 】

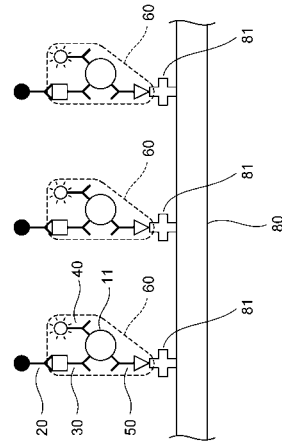


【 図 5 】

実施形態2

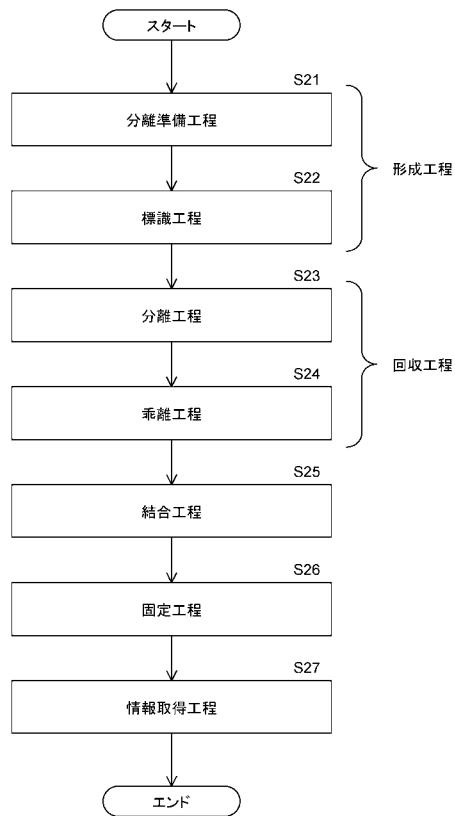


【 図 6 】

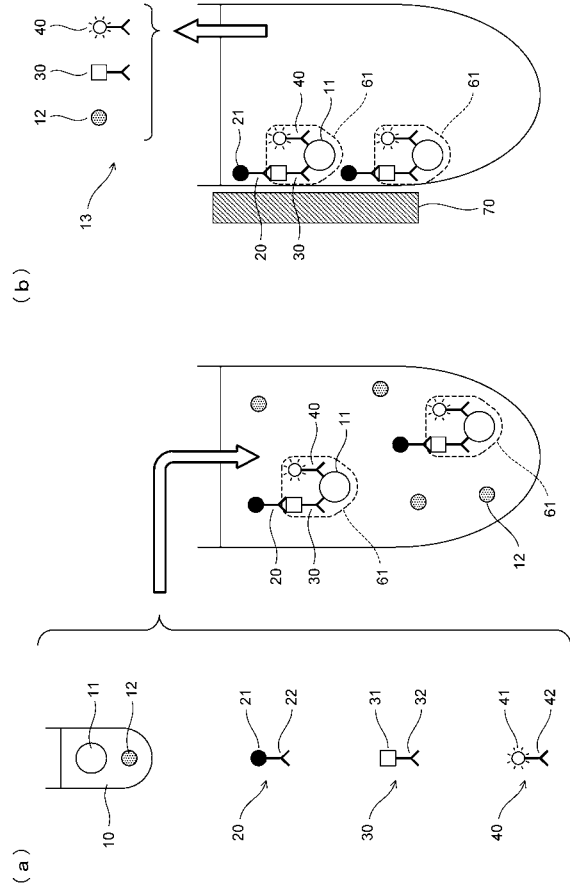


【図7】

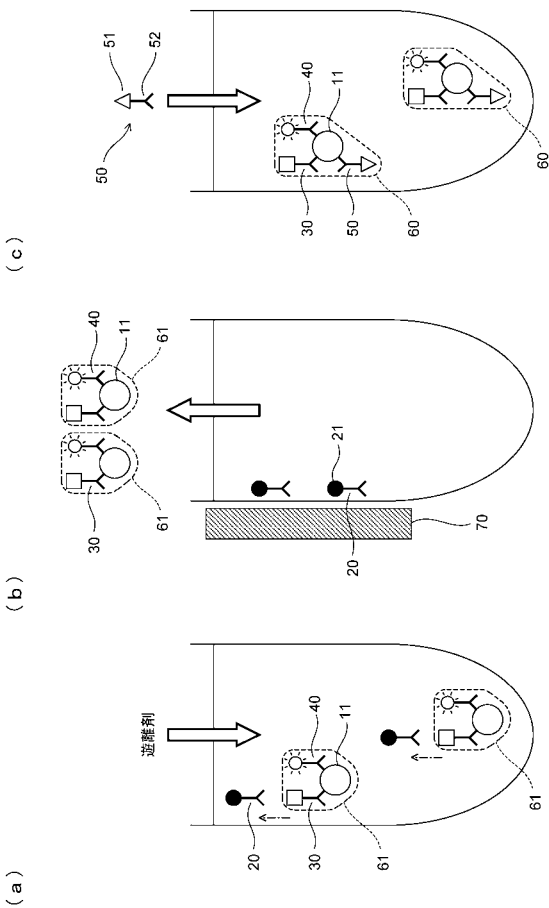
実施形態3



【図8】

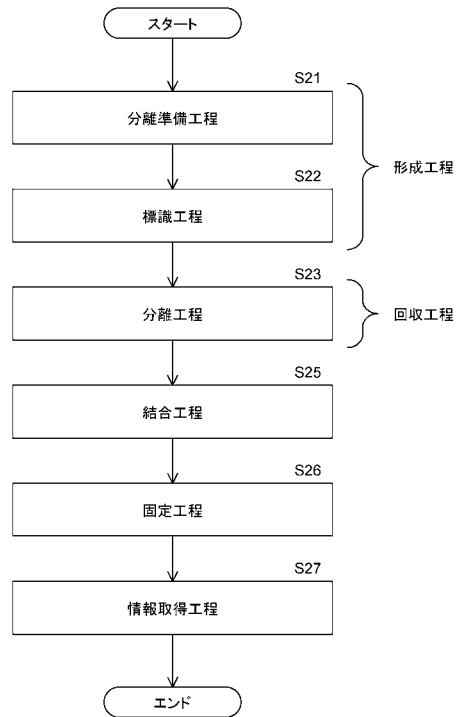


【図9】

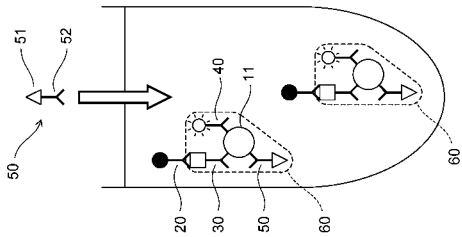


【図10】

実施形態4

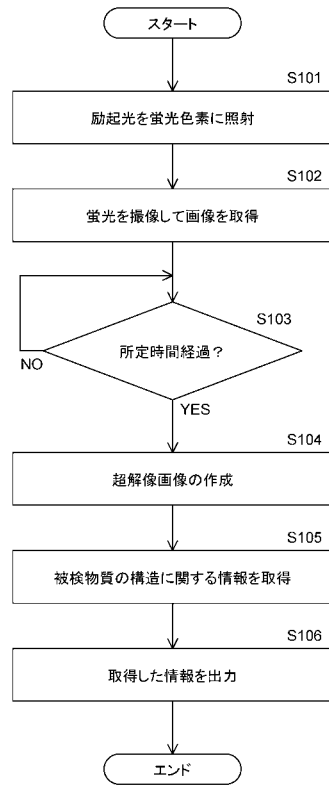


【図 1 1】

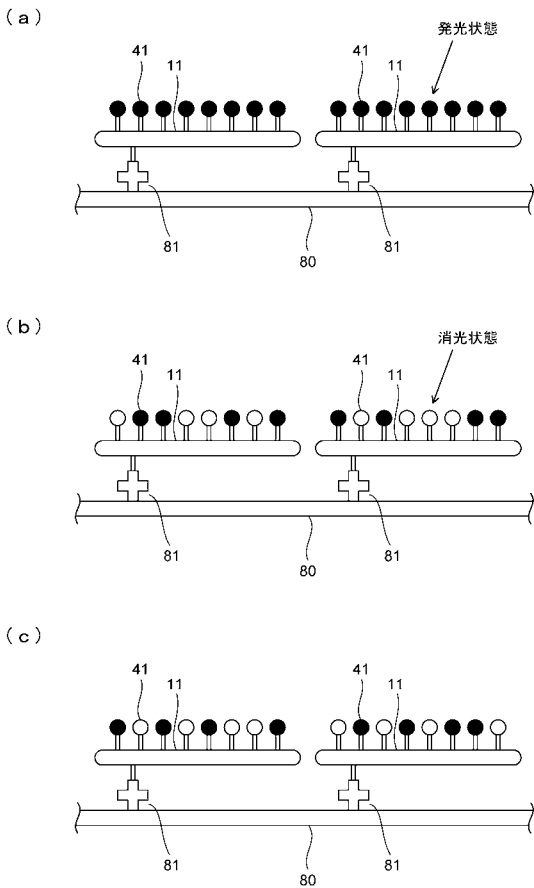


【図 1 2】

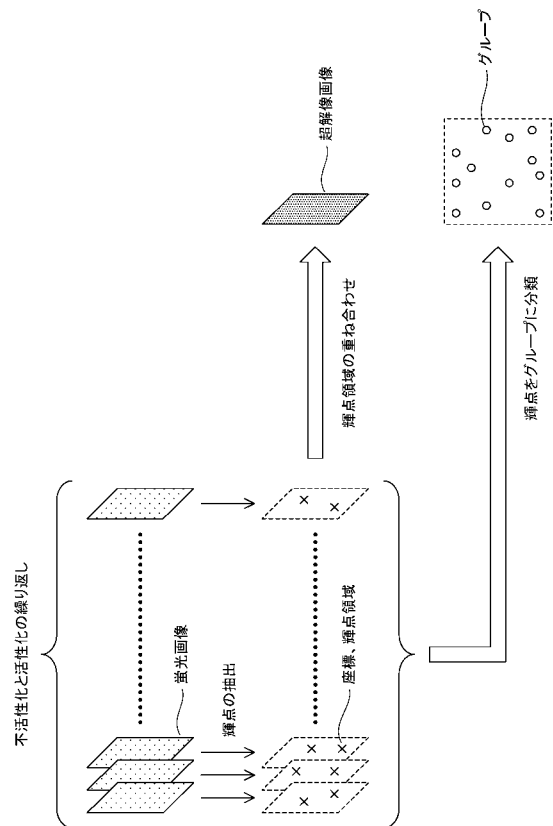
情報取得工程



【図 1 3】

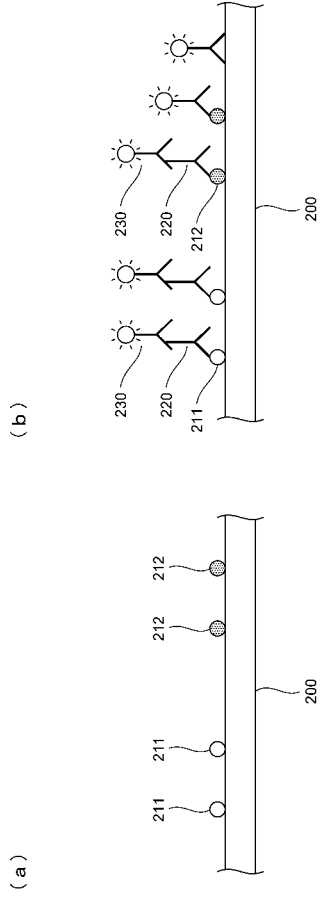


【図 1 4】





【 図 19 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 山下 和人  
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 アクシェイ ガングリ  
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 岩永 茂樹  
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

专利名称(译)	获取测试物质信息的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018179762A</a>	公开(公告)日	2018-11-15
申请号	JP2017079793	申请日	2017-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	赤間健司 渡辺敏弘 岡田昌也 山下和人 岩永茂樹		
发明人	赤間 健司 渡辺 敏弘 岡田 昌也 山下 和人 アクシエイ ガングリ 岩永 茂樹		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54326 C07K16/18 C07K2317/70 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/533 G01N33/54353 G01N33/5436 G01N33/54366 G01N33/582 G01N33/6896 G01N2333/4709		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/53.U G01N33/53.J G01N33/53.D		
代理人(译)	柴野Seimiyabi		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种获取测试物质信息的方法，该测试物质能够准确地获取测试物质结构的信息。获取测试物质信息的方法包括形成步骤，该步骤包括将捕获物质结合到样品中的测试物质以形成复合物的步骤S11至S13，以及选择性地从样品中形成至少一种复合物的步骤收集步骤包括用于收集的步骤S14和S15，以及回收从样品中回收的复合物的步骤在固定到板上的步骤S16中固定的步骤和从固定到基板上的复合物获取关于测试物质的结构的信息的步骤S17的信息获取步骤。

実施形態1

