

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年8月30日 (30.08.2007)

PCT

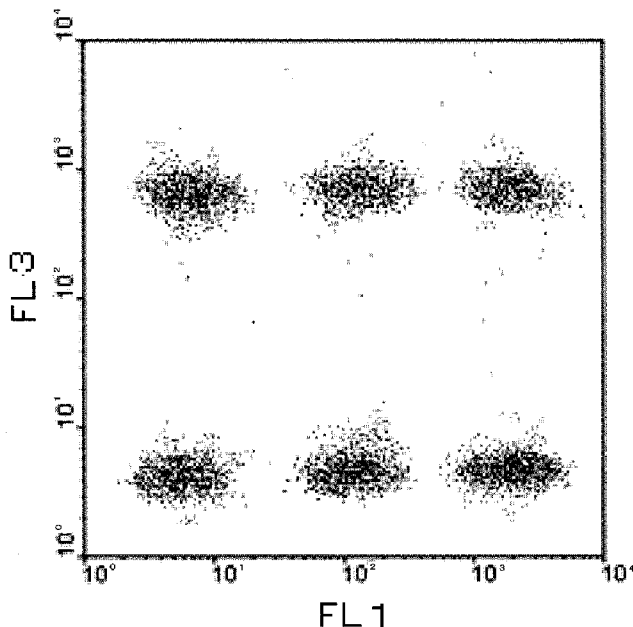
(10) 国際公開番号
WO 2007/097377 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01) G01N 33/552 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/053227
- (22) 国際出願日: 2007年2月21日 (21.02.2007)
- (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2006-049303 2006年2月24日 (24.02.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 古河電気工業株式会社 (THE FURUKAWA ELECTRIC CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008322 東京都千代田区丸の内2丁目2番3号 Tokyo (JP). 国立大学法人 徳島大学 (THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 會澤英樹 (AIZAWA, Hideki) [JP/JP]; 〒1008322 東京都千代田区丸の内2丁目2番3号 古河電気工業株式会社内 Tokyo (JP). 大久保典雄 (OHKUBO, Michio) [JP/JP]; 〒1008322 東京都千代田区丸の内2丁目
- (74) 代理人: 飯田敏三 (IIDA, Toshizo); 〒1050004 東京都港区新橋3丁目1番10号石井ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD,

[続葉有]

(54) Title: SYSTEM FOR QUANTIFYING BIOMOLECULES BY FLOW CYTOMETRY, THE QUANTIFICATION METHOD, SYSTEM FOR DETECTING AND SAMPLING CELLS, THE DETECTION AND SAMPLING METHOD, FLUORESCENT SILICA PARTICLE TO BE USED THEREIN AND KIT COMPRISING MULTIPLE SILICA PARTICLES COMBINED TOGETHER

(54) 発明の名称: フローサイトメトリーによる生体分子の定量システム、その定量方法、細胞の検出・分取システム、その検出・分取方法、それらに用いる蛍光シリカ粒子、及び複数個の蛍光シリカ粒子を組み合わせたキット



(57) Abstract: A system for quantifying biomolecules comprising: allowing fluorescent silica particles, which generate fluorescence detectable with a flow cytometer, to capture the target biomolecules having been labeled with a fluorescent substance for quantification; detecting the fluorescent generated from the fluorescent silica particle moiety as described above with a flow cytometer; and measuring the fluorescent intensity of the labeled target biomolecules to thereby quantify the target biomolecules.

(57) 要約: フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する蛍光シリカ粒子に、定量用の蛍光で標識付けされた標的生体分子を捕捉させ、前記蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、前記の標識付けされた標的生体分子の蛍光強度を測定して前記標的生体分子を定量する、生体分子の定量システム。

WO 2007/097377 A1



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

フローサイトメトリーによる生体分子の定量システム、その定量方法、細胞の検出・分取システム、その検出・分取方法、それらに用いる蛍光シリカ粒子、及び複数個の蛍光シリカ粒子を組み合わせたキット

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光シリカ粒子を用いたフローサイトメトリーアッセイシステム及びそのアッセイ方法に関する。詳しくは、蛍光シリカ粒子標識によるフローサイトメトリーを用いた生体分子の定量システムとその定量方法、蛍光シリカ粒子標識によるフローサイトメトリーを用いた細胞の検出・分取システムとその検出・分取方法、並びにそれらシステム及び方法に用いる、フローサイトメトリーでの同時検出を可能にした特性の異なる蛍光シリカ粒子に関する。

背景技術

[0002] 血漿、リンパ液、組織液などの体液中に含まれるサイトカイン、ホルモン、タンパク質、核酸等の生体分子の量を定量すること、または体液中に含まれる微量の生体分子を検出することは、疾病の早期診断あるいは病態の正確な把握に必要不可欠である。生体分子の定量または検出には主にELISA法、化学発光法あるいはフローサイトメーターを用いたビーズアッセイ等が行われている。

しかしながらELISA法や化学発光法は一回の反応で一種類の生体分子の検出ししか出来ないため、複数の生体分子を検出する場合、測定に手間と時間がかかり、また、サンプルや試薬が多量に必要となるためコストがかかることが問題であった。

一回で複数種類の生体分子の定量が可能な方法として、フローサイトメーターを用いたビーズアッセイが注目されている(例えば、非特許文献1参照)。従来のビーズアッセイに用いられるビーズは、高分子ビーズを蛍光標識し、さらに表面処理を行って表面に官能基を導入し生体分子を導入している。このようなビーズは作製に高度な技術を要する煩雑な操作を必要とし、ビーズが大変高価であった。

非特許文献1:J. Immunological Methods 2001, 254, 109-118.

発明の開示

[0003] 本発明の課題は、上記のような問題点を解消するため、特性を多様化しえる蛍光シリカ粒子を捕捉ないしは標識用ビーズとしてフローサイトメトリーに用いた、生体分子の定量システム、その定量方法、細胞の検出・分取システム、その検出・分取方法、並びにそれらに用いられる蛍光シリカ粒子及び前記シリカ粒子を複数種組み合わせるキットを提供することにある。

[0004] 本発明によれば、以下の手段が提供される：

(1)フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する蛍光シリカ粒子に、定量用の蛍光で標識付けされた標的分子を捕捉させ、前記蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、前記の標識付けされた標的分子の蛍光強度を測定して前記標的分子を定量することを特徴とする生体分子の定量システム、

(2)前記標的分子が2種以上であり、2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて各標的分子を特異的にそれぞれ捕捉することにより、2種以上の標的分子を同時に定量する、(1)に記載の生体分子の定量システム、

(3)前記蛍光シリカ粒子の平均粒径が300nm以上であることを特徴とする(1)又は(2)に記載の生体分子の定量システム、

(4)前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的分子に特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(1)～(3)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

(5)前記蛍光シリカ粒子の表面を修飾する、前記標的分子に特異的に吸着もしくは結合する物質が、さらに蛍光で標識付けされていることを特徴とする(4)に記載の生体分子の定量システム、

(6)前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、各々、1～4種類の蛍光色素化合物を含有していることを特徴とする、(2)～(5)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

[0005] (7)前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、粒子1個毎に蛍光色素化合物含有量が異なり多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする、(2)～(6)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

(8)前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、異なる蛍光スペクトル及び／又は多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする、(1)～(7)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

(9)前記標的生体分子が、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド及び／又は化学物質であることを特徴とする、(1)～(8)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

(10)前記蛍光シリカ粒子が、蛍光色素化合物を含有していないシリカ粒子を含んでもよい、(1)～(9)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

(11)前記シリカ粒子の蛍光を受光するだけで、前記シリカ粒子を認識することを特徴とする、(1)～(10)のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム、

[0006] (12)標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、定量用の蛍光で標識付けされた1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記の標識付けされた1又は2種以上の標的生体分子の蛍光強度をそれぞれ定量する工程を含むことを特徴とする生体分子の定量方法、

(13)標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

定量用の蛍光を発し、かつ前記1又は2種以上の標的生体分子に、それぞれ、特異的に結合する1又は2種以上の蛍光標識プローブを混合する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記1又は2種以上の蛍光標識プローブの蛍光強度をそれぞれ定量する工程を含むことを特徴とする生体分子の定量方法、

(14)標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

前記1又は2種以上の標的生体分子に、それぞれ特異的に結合する1又は2種以上の分子認識物質を混合する工程と、

定量用の蛍光を発生し、かつ前記1又は2種以上の分子認識物質に、それぞれ特異的に結合する1又は2種以上の蛍光標識プローブを混合する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記1又は2種以上の蛍光標識プローブの蛍光強度をそれぞれ定量する工程とを含むことを特徴とする生体分子の定量方法、

(15)前記蛍光標識プローブが、前記標的生体分子もしくは前記分子認識物質に特異的に結合する物質で修飾されている蛍光シリカ粒子である、(13)又は(14)に記載の生体分子の定量方法、

(16)前記分子認識物質が抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド及び／又は化学物質であることを特徴とする(13)～(15)のいずれか1項に記載の生体分子の定量方法、

[0007] (17)2種以上の標的生体分子を同時に定量する、(12)～(16)のいずれか1項に記載の生体分子の定量方法、

(18)フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発生する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて、検体中の1又は2種以上の標的細胞を標識付けし、前記1又は2種以上の標的細胞を標識付けした前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、必要に応じて分取する手段とを有することを特徴とする細胞の検出もしくは分取システム、

(19)前記蛍光シリカ粒子の表面が、前記標的細胞の表面マーカーに特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾され、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(18)に記載の細胞の検出もしくは分取システム、

(20)前記蛍光シリカ粒子の表面が、標的細胞の表層糖鎖に特異的に結合する糖結合タンパク質で修飾され、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(18)に記載の細胞の検出もしくは分取システム、

(21)前記蛍光シリカ粒子の表面が、標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体もしくはレセプターで修飾され、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与え

たことを特徴とする(18)に記載の細胞の検出もしくは分取システム、

[0008] (22)前記標的細胞が骨髄球系細胞、Bリンパ系細胞、Tリンパ系細胞、造血幹細胞、悪性腫瘍細胞、ウイルス感染細胞又は異種移植細胞である、(18)～(21)のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取システム、

(23)前記蛍光シリカ粒子の平均粒径が10nm～100nmであることを特徴とする、(18)～(22)のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取システム、

(24)2種以上の標的細胞を同時に検出もしくは分取する、(18)～(23)のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取システム、

(25)フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて、検体中の1又は2種以上の標的細胞を標識付けし、前記1又は2種以上の標的細胞を標識付けした前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、必要に応じて分取することを特徴とする細胞の検出もしくは分取方法、

(26)前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表面マーカーに特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(25)に記載の細胞の検出もしくは分取方法、

[0009] (27)前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表層糖鎖に特異的に結合する糖結合タンパク質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(26)に記載の細胞の検出もしくは分取方法、

(28)前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体もしくはレセプターで修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(26)に記載の細胞の検出もしくは分取方法、

(29)前記標的細胞が骨髄球系細胞、Bリンパ系細胞、Tリンパ系細胞、造血幹細胞、悪性腫瘍細胞、ウイルス感染細胞又は異種移植細胞である、(25)～(28)のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取方法、

(30)蛍光色素化合物とシリカ成分とが化学的に結合もしくは吸着してなり、平均粒径を300nm以上とし、耐退色性を与えた標識ビーズとしてフローサイトメーターに用いる標的生体分子標識用蛍光シリカ粒子、

(31)蛍光色素化合物とシリカ成分とが化学的に結合もしくは吸着してなり、平均粒

径を10～100nmとし、耐退色性を与えた標識ビーズとしてフローサイトメトリーに用いる標的細胞標識用蛍光シリカ粒子、

(32)前記(30)または(31)に記載の蛍光シリカ粒子からなる蛍光材料、

[0010] (33)耐退色性を与えた標識ビーズとして複数種の(30)または(31)に記載の蛍光シリカ粒子を少なくとも有するセットとするフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット、

(34)前記複数種の蛍光シリカ粒子が、蛍光色素化合物を含有していないシリカ粒子を含んでいてもよい、(33)に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット、

(35)標的生体分子もしくは標的細胞が、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド、化学物質、悪性腫瘍細胞、ウイルス感染細胞及び／又は異種移植細胞であることを特徴とする(33)又は(34)に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット、

(36)前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾し前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする(33)～(35)のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット、

(37)前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子各々が、1～4種類の蛍光色素化合物を含有していることを特徴とする、(33)～(36)のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット、

[0011] (38)前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子が、粒子1個毎に蛍光色素化合物含有量が異なり多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする、(33)～(37)のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット、及び
(39)前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、異なる蛍光スペクトル及び／又は多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする(33)～(38)のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット
を提供するものである。

本発明において、「蛍光」は、燐光も包含する広義の意味をもつ。本発明における

蛍光の蛍光寿命は特に制限されるものではなく、 10^{-3} 秒～1日以上の蛍光寿命の発光であってもよく、 10^{-10} 秒～ 10^{-1} 秒の蛍光寿命の発光が好ましく、 10^{-9} 秒～ 10^{-3} 秒の蛍光寿命の発光がより好ましく、 10^{-9} 秒～ 10^{-5} 秒の蛍光寿命の発光がさらに好ましい。

また、「蛍光」は蛍光色素化合物が発する固有の波長の発光であるので、吸光物質に対する入射光と透過光との強度差で定義される吸光とは相異なる現象である。よって、蛍光の測定と吸光の測定とは、測定対象の光が異なり、測定機構等の測定系も異なる。

本発明の上記及び他の特徴及び利点は、適宜添付の図面を参照して、下記の記載からより明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、得られた蛍光シリカ粒子のTEM写真像を示す図である。

[図2]図2は、488nmで励起したときの530nmの蛍光強度(FL1チャンネル検出)および635nmで励起したときの670nmの蛍光強度(FL3チャンネル検出)の2次元ドットプロットを表す図である。

[図3]図3は、6種類のゲートを掛けた図2の2次元ドットプロットを表す図である。

[図4]図4は、IL-2濃度に対するフィコエリスリンの蛍光強度(FL2チャンネル検出)の相関を示す標準曲線を表す図である。

[図5]図5は、得られた蛍光シリカ粒子のSEM写真像を示す図である。

[図6]図6は、実施例3のフローサイトメリーの測定結果を示す、488nm励起光による530nmの蛍光強度を横軸(FL1)に、カウント数を縦軸にしたヒストグラムである。

発明を実施するための最良の形態

[0013] まず、「本発明の生体分子の定量システム」について説明する。

本発明の生体分子の定量システムは、耐退色性を与えた捕捉ないしは標識用ビーズとして、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する蛍光シリカ粒子に、定量用の蛍光で標識付けされた1又は2種以上の標的分子(生理活性物質を含む。以下、同様である。)を捕捉させ、前記蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、前記の標識付けされた標的分子の蛍光強度を測定して

前記標的生体分子を定量することを特徴とする。

前記定量用の蛍光は、前記蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光とは異なる波長を有することが好ましい。

本発明のシステムは、一回のフローサイトメリー測定操作で1又は2種以上の標的の生体分子を同時に定量することができる。従来のフローサイトメリーでは粒子や細胞は大きさ(粒径)によって識別ないしは検出されたが、本発明においては、前記蛍光シリカ粒子の蛍光が、フローサイトメーターで検出され、前記標的の生体分子の定量ができる。

前記標的の生体分子もしくは標的の生理活性物質としては、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド、化学物質等が挙げられる。

前記標的の生体分子の定量用の蛍光による標識付けは、任意の蛍光標識プローブによる標識であってもよいし、PCR反応によってCy3ないしはCy5等の蛍光色素化合物が導入されたDNA、RNA等の核酸、蛍光タンパク質と融合したタンパク質等の予め標識付けされた標的の生体分子としての標識付けであってもよい。

前記蛍光標識プローブとしては標的の生体分子に特異的に結合または吸着する限り特に制限はなく、任意の蛍光色素化合物が結合した抗体等が挙げられる。

本明細書及び特許請求の範囲において、リガンドとはタンパク質と特異的に結合する物質をいい、例えば、酵素に結合する基質、補酵素、調節因子、あるいはホルモン、神経伝達物質などをいい、低分子量の分子やイオンばかりでなく、高分子量の物質も含む。

また化学物質とは天然有機化合物に限らず、人工的に合成された生理活性を有する化合物や環境ホルモン等を含む。

[0014] 次に、本発明に用いるフローサイトメーターについて説明する。

フローサイトメーターとは、粒子懸濁液を細管中に流し、浮遊している粒子を1個ずつ分別し、各粒子にレーザーを照射して、レーザーによって励起される前記粒子の蛍光発光、レーザーの前記粒子による散乱などを検出・測定する装置をいい、フローサイトメリーとは、その分析方法をいう。

本発明に用いるフローサイトメーターは、特に制限はなく、従来用いられているフロ

ーサイトメーターをそのまま用いることができる。例えば、1又は2以上の検出域で単一波長の光を放射するレーザー(例えばHe/Ne、アルゴン)源を含む。異なる検出域は、異なる波長で光を放射するレーザー源を含めることができる。前記レーザーはビーム整形レンズを用いて集束させてよい。

前記レーザー照射に先立って、シース液(例えば、IsoFlowシース液(商品名、ベックマン・コールター社製)、ダコ シースフルード(商品名、ダコジャパン社製等))、及び標的生体分子、蛍光シリカ粒子等が含有されたサンプル液がフローセルに導入され、ここで、前記シース液と前記サンプル液とが混じりあうことがない層流が形成される。前記フローセルから流れていくときに前記サンプル液はシース液流によって囲まれたサンプルコアを形成して流れ、レーザー照射域を通過するときにレーザーが照射される。

[0015] 本発明に用いるフローサイトメーターは、所定のフロー条件とすることにより、標的の生体分子を標識している前記蛍光シリカ粒子1個だけを、各検出域に存在させることができ、それにより前記蛍光シリカ粒子1個だけの検出データを取得することができる。

それにより、前記フローサイトメーターは、1回の測定操作で複数の標的を同時に測定することができる、いわゆるマルチプレックシング方式である。

本発明において、測定時のフロー速度は特に制限はないが、標的の生体分子の定量のためには、100~1000蛍光シリカ粒子数/秒の条件とすることができ、標的細胞の検出ないしは分取のためには、100~1000細胞/秒の条件とすることができ。

例えば、フローサイトメーターとしてFACSCalibur(商品名;ベクトン・ディッキンソン社製)を用いた場合、シース圧(上記シース液を流す圧力)とサンプル圧(上記サンプル液を流す圧力)の差が1k~2kpsiである条件とすることができ。

[0016] 各検出域においては、光電子増倍管等任意の1又は2以上の蛍光チャンネル(例えば、FL1、FL2、FL3)を用いて、検出域を通過してレーザーによって照射された蛍光シリカ粒子からの蛍光発光を集めることができる。また、光電子増倍管等任意の散乱光集光チャンネルを用いて、各シリカ粒子によって屈折される光(前方散乱光また

は側方散乱光)を集めてもよい。

本発明に用いるフローサイトメーターは、前記検出域を通った各標的生体分子に由来する蛍光発光や散乱光を、蛍光チャンネル等によって検出したデータを記録・記憶し、分析するデータ集積分析手段(ハードウェアもしくはソフトウェア)を含むのが好ましい。

前記データ集積分析手段として、FACSDiVa、EXPO32、Summit、AppSan、LysisII、CellQuest(いずれも商品名)等市販のものを用いてもよい。

本発明の定量システムもしくは定量方法は、蛍光についてだけ異なる複数種の蛍光シリカ粒子を組み合わせて用いる場合、すなわち、粒径が実質的に揃っていて、粒径については実質的に均一である場合(散乱光の違いでは粒子間の違いを識別しにくい場合)、蛍光を受光するだけで用いるシリカ粒子を認識することができる。

具体的には、煩雑な操作を要する散乱光用の照射レーザー及び前記散乱光集光チャンネルを具備する散乱光用検出域を省いた、蛍光用照射レーザー及び前記蛍光チャンネルを具備する蛍光用検出域のみを具備する、本発明の定量システムもしくは定量方法とすることができる。これによりシステムのコンパクト化及び、煩雑な操作を要しない方法とすることができる。

一方で、本発明に用いる1又は2種以上の蛍光シリカ粒子には、蛍光色素化合物を含有していないシリカ粒子を含んでいてもよく、そのシリカ粒子は蛍光発光しない。この場合、用いるフローサイトメーターは、散乱光用の照射レーザー及び前記散乱光集光チャンネルを具備する散乱光用検出域を具備するのが好ましい。

本発明に用いるフローサイトメーターとしては、FACSCalibur(商品名;ベクトン・ディキンソン社製)、PERFLOW Ana(商品名;古河電気工業社製)、EPICS ALTRA(商品名;ベックマン・コールター社製)、CyAn(商品名;ダコジャパン社製)、JSAN(商品名;ベイバイオサイエンス社製)等市販のフローサイトメーターを用いてもよい。

[0017] 次に「本発明に用いる蛍光シリカ粒子」について説明する。

本発明に用いる蛍光シリカ粒子は、蛍光色素化合物とシリカ成分とが化学的に結合もしくは吸着してなり、標的生体分子(生理活性物質を含む。)を捕捉し、標識する

蛍光標識用ビーズとしての蛍光材料である。

本発明において、前記蛍光シリカ粒子中には蛍光色素化合物が固定化された状態にあり、蛍光シリカ粒子に対する蛍光色素化合物の濃度が75mmol/L以下であることが好ましく、5~60mmol/Lであることがより好ましい。

ここで、蛍光シリカ粒子に対する蛍光色素化合物の濃度とは、蛍光色素化合物のモル数を、蛍光シリカ粒子の体積で割ったものである。蛍光色素化合物のモル数は、蛍光シリカ粒子分散コロイドの吸光度から求めたものであり、また蛍光シリカ粒子の体積は、蛍光シリカ粒子コロイドから蛍光シリカ粒子のみを回収し、乾燥させ、質量を求め、シリカ粒子の比重を2.3g/cm³として求めたものである。

本発明に用いる蛍光シリカ粒子は、前記蛍光色素化合物が、前記蛍光シリカ粒子の内部から表面まで前記シリカ粒子全体に分布している蛍光材料であることが好ましい。

本発明において、「耐退色性を与えた」とは、分散液にアルゴンランプを30分照射したときの蛍光強度の減衰の度合いが、同濃度の蛍光色素化合物(例えば、フルオレセイン)溶液の蛍光強度の減衰の度合いの20%以下のことをいう。

前述のようにフローサイトメーターは、標的生体分子を捕捉している前記蛍光シリカ粒子1個1個の検出データを取得することができ、前記蛍光シリカ粒子個々を区別できるので、本発明において、バーコード標識とすることが好ましい。すなわち、本発明に用いる蛍光シリカ粒子は、バーコード標識可能な蛍光材料であることが好ましい。

本発明において、「バーコード標識」とは、シリカ粒子を多様な蛍光特性で標識することをいう。

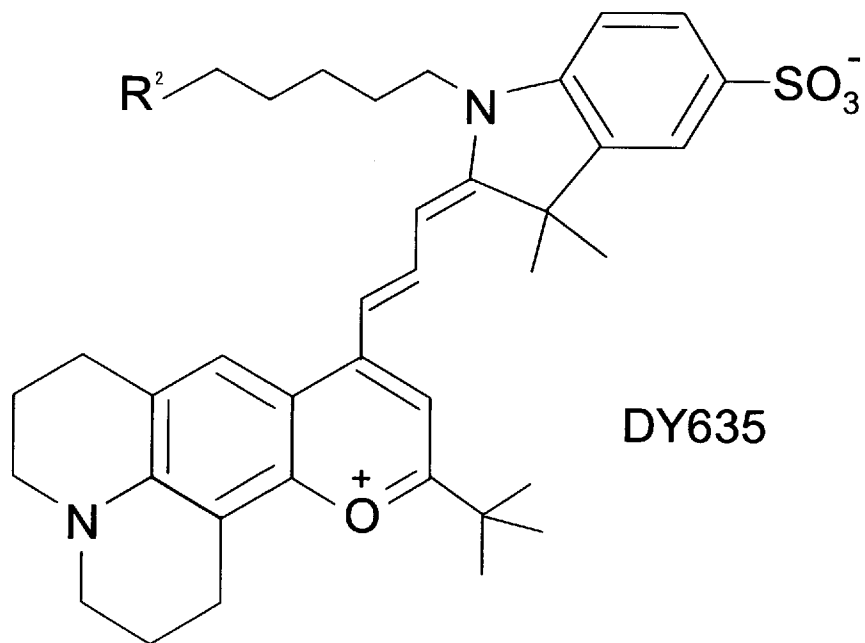
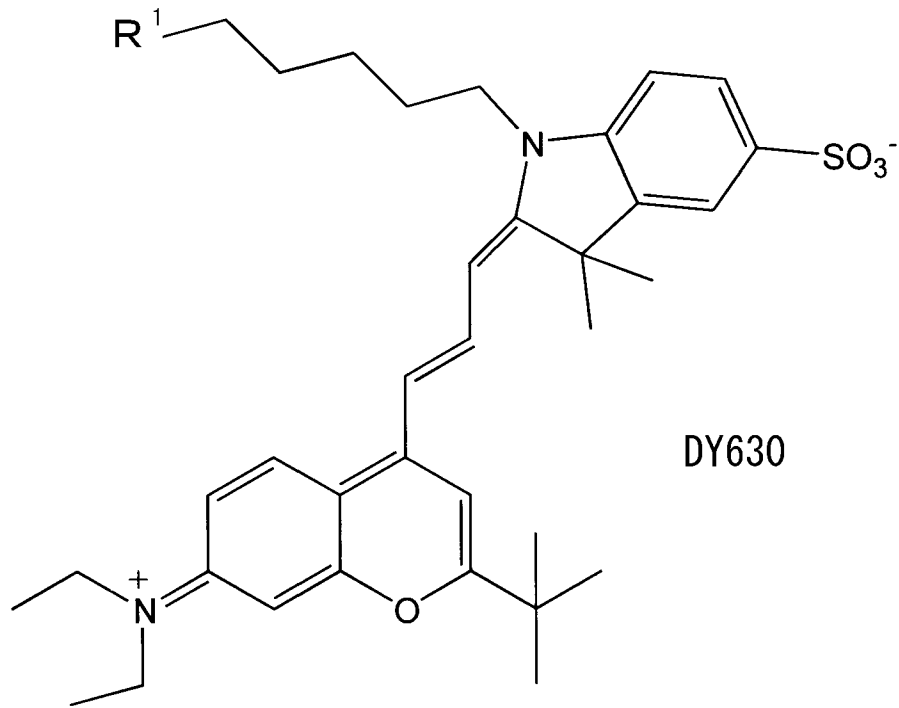
[0018] 本発明において、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子が、蛍光色素化合物を含有していないシリカ粒子を含んでいてもよい。

本発明において、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子各々が、異なる蛍光発光スペクトルを有する1~4種類の蛍光色素化合物を含有していることが好ましい。

例えば、2種類の蛍光色素化合物として、5(6)-カルボキシフルオレセイン及びDY630が含有されるように、本発明に用いる蛍光シリカ粒子の調製について後述する方法により調製された、5(6)-カルボキシフルオレセイン及びDY630含有蛍光シリ

カ粒子、同様な方法により調製された、5(6)−カルボキシフルオレセイン及びPerCP (Peridinin chlorophyll protein)含有蛍光シリカ粒子、5(6)−カルボキシフルオレセイン、PI(Propidium iodide)及びDY635の3種含有蛍光シリカ粒子、5(6)−カルボキシフルオレセイン、PE(フィコエリスリン)、PerCP及びDY635の4種含有蛍光シリカ粒子等が挙げられる。

[0019] [化1]



[0020] 式中、R¹、R²は、それぞれ、前記シリカ成分と共有結合し得る基である。
前記シリカ成分と共有結合し得る基としては、NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) エ

ステル基等の活性エステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基、イソシアナート基、シアノ基、アルデヒド基等が挙げられる。

また、本発明において、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子が、シリカ粒子1個毎の蛍光色素化合物含有量の違いにより複数種の段階的に異なる蛍光強度を有することが好ましい。

具体的には、DY630が含有されるように、本発明に用いる蛍光シリカ粒子の調製について後述する方法による調製時に、DY630成分(例えば、DY630-NHSエステル)のシリカ粒子調製反応に用いる量の違いにより、DY630含有濃度の異なる複数種の蛍光シリカ粒子等が挙げられる。

例えば、シリカ粒子に対するDY630の濃度が53mmol/LのDY630含有シリカ粒子、及びシリカ粒子に対するDY630の濃度が20mmol/LのDY630含有シリカ粒子からなる2種類のDY630含有シリカ粒子、シリカ粒子に対する5(6)-カルボキシフルオレセインの濃度が55mmol/Lの5(6)-カルボキシフルオレセイン含有シリカ粒子、及びシリカ粒子に対する5(6)-カルボキシフルオレセインの濃度が20mmol/Lの5(6)-カルボキシフルオレセイン含有シリカ粒子からなる2種類のDY630含有シリカ粒子等が挙げられる。

[0021] さらに、本発明において、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子各々が、異なる蛍光発光スペクトルを有する1~4種類の蛍光色素化合物を含有し、かつシリカ粒子1個毎の前記蛍光色素化合物各々の含有量の違いにより複数種の段階的に異なる蛍光強度を有することがより好ましい。

例えば、2種類の蛍光色素化合物を含有させ、各々の蛍光色素化合物含有量が異なり蛍光強度を蛍光色素化合物ごとに独立に4種類に段階化したものを用いる場合、その組み合わせとしては16通りの組み合わせが得られる。すなわち、計16種類の蛍光シリカ粒子を調製することができる。

[0022] 具体例として、

- <1>色素が入っていない無蛍光シリカ粒子、
- <2>シリカ粒子に対する5(6)-カルボキシフルオレセインの濃度が8mmol/Lの5(6)-カルボキシフルオレセイン含有シリカ粒子、

- 〈3〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が20mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン含有シリカ粒子、
- 〈4〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が60mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン含有シリカ粒子、
- 〈5〉シリカ粒子に対するDY630の濃度が8mmol/LのDY630含有シリカ粒子、
- 〈6〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が8mmol/L、DY630の濃度が8mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈7〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が20mmol/L、DY630の濃度が8mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈8〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が60mmol/L、DY630の濃度が8mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈9〉DY630の濃度が20mmol/Lの5(6)−DY630含有シリカ粒子、
- 〈10〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が8mmol/L、DY630の濃度が20mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈11〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が20mmol/L、DY630の濃度が20mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈12〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が60mmol/L、DY630の濃度が20mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈13〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が8mmol/L、DY630の濃度が60mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、
- 〈14〉DY630の濃度が60mmol/LのDY630含有シリカ粒子、

〈15〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が20mmol/L、DY630の濃度が60mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子、及び

〈16〉シリカ粒子に対する5(6)−カルボキシフルオレセインの濃度が60mmol/L、DY630の濃度が60mmol/Lの5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子

からなる16種類の5(6)−カルボキシフルオレセイン及びDY630含有シリカ粒子等が挙げられる。

本発明において、上記16種のシリカ粒子のうちの一部を組み合わせて用いてもよい。

[0023] 本発明に用いる蛍光シリカ粒子は、検体(例えば、任意の細胞抽出液、溶菌液、培地・培養液、溶液、バッファー)中に含まれる定量したい前記標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾された蛍光シリカ粒子とするのが好ましく、前記標的生体分子を分子認識する物質で修飾された蛍光シリカ粒子とするのがより好ましい。

また、本発明において、前記検体中に含まれる定量したい前記標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質として、さらに蛍光で標識付けされた物質を用いることにより、蛍光特性が多様に異なるシリカ粒子を作製しても良い。

前記蛍光は、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光または前記定量用の蛍光とは異なる波長を有することが好ましい。

例えば、〈1〉シリカ粒子に対するDY630の濃度が53mmol/Lであり、かつ標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質がフルオレセインで標識されているDY630含有シリカ粒子、

〈2〉シリカ粒子に対するDY630の濃度が53mmol/Lであり、かつ標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質が蛍光標識されていないDY630含有シリカ粒子、

〈3〉シリカ粒子に対するDY630の濃度が20mmol/Lであり、かつ標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質がフルオレセインで標識されているDY630含有

シリカ粒子、及び

〈4〉シリカ粒子に対するDY630の濃度が20mmol/Lであり、かつ標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質が蛍光標識されていないDY630含有シリカ粒子

からなる4種類のDY630含有シリカ粒子等が挙げられる。

[0024] 本発明に用いる蛍光シリカ粒子の表面に、前記標的生体分子を分子認識する物質を結合させる修飾方法は、「シリカ粒子表面修飾」として後述する。

蛍光シリカ粒子を修飾する前記標的生体分子を分子認識する物質は、抗体、抗原、ペプチド、DNA、RNA、糖鎖、受容体等が挙げられる。

すなわち、前記蛍光シリカ粒子を修飾した標的生体分子を分子認識する物質は、それ自体が受容体部位となって、例えば抗原-抗体反応、ビオチン-アビジン反応、塩基配列の相補性を利用したハイブリダイゼーションなどの特異的な分子認識を利用して、標的生体分子に特異的に結合することができる。

「吸着」とは、ファンデルワールス力、疎水性相互作用または静電的相互作用による一体化をいう。

ここで、分子認識とは、(1)DNA分子間又はDNA-RNA分子間又はRNA分子間のハイブリダイゼーション、(2)抗原抗体反応、(3)酵素(受容体)-基質(リガンド)間の反応など、生体分子(生理活性物質を含む。)間の特異的相互作用をいい、その特異的相互作用をする箇所を認識部位という。

[0025] 次に、本発明に用いる蛍光色素化合物について説明する。

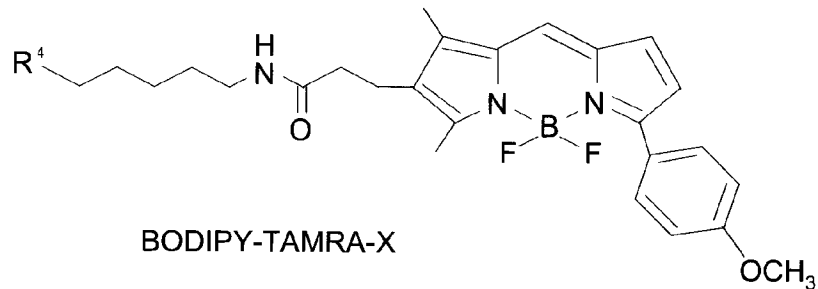
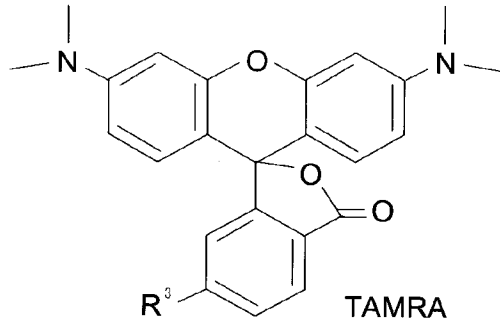
上述のように、本発明に用いる蛍光色素化合物は、広義の蛍光色素化合物であり、燐光色素化合物をも包含するものである。

前記蛍光色素化合物は特に制限はないが、フローサイトメトリーに用いられるレーザーによる励起波長を有する蛍光色素化合物が好ましい。

アルゴンレーザーによる励起波長488nmを有する蛍光色素化合物としては、例えば、5(6)-カルボキシフルオレセイン、PE(フィコエリスリン、Invitrogen社製)、PE-Cy5、PE-Cy7(いずれも商品名;アマシャム・バイオサイエンス社製)、DY495、DY505(いずれも商品名、Dyomics GmbH社製)、BODIPY-TAMRA-X(商

品名;Invitrogen社製)等が挙げられる。

[0026] [化2]

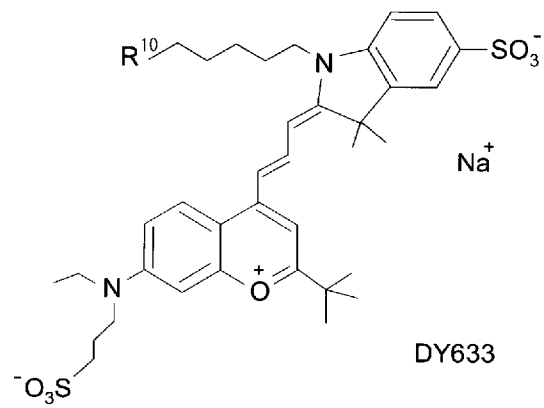
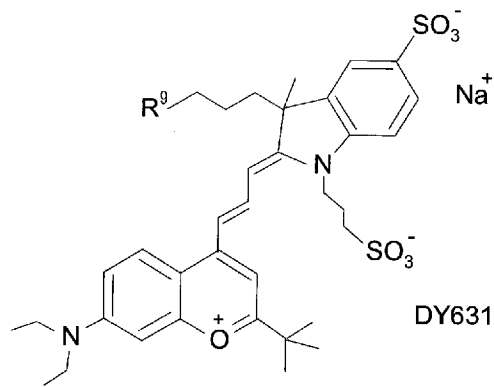
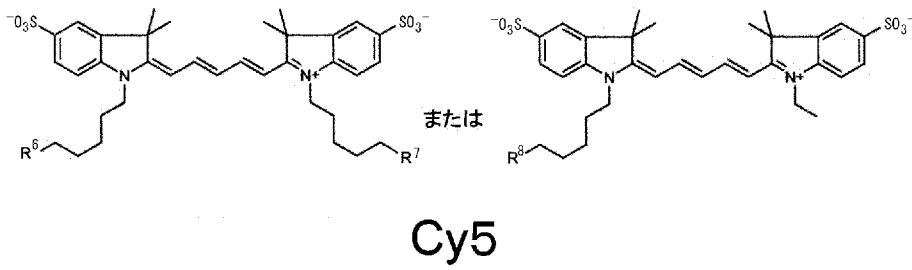
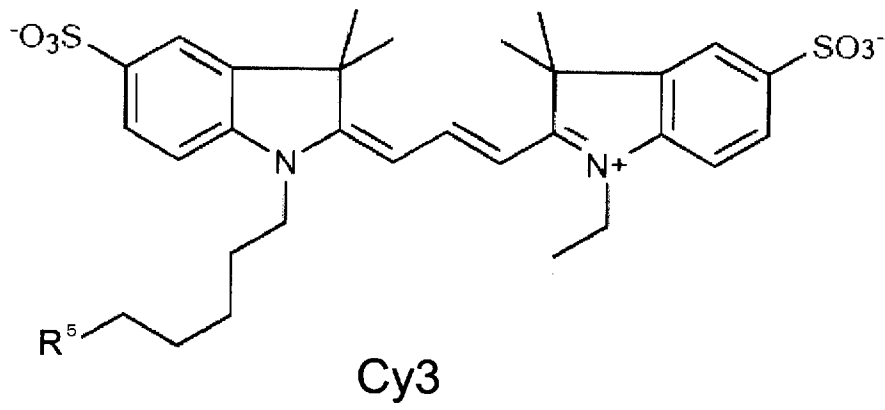


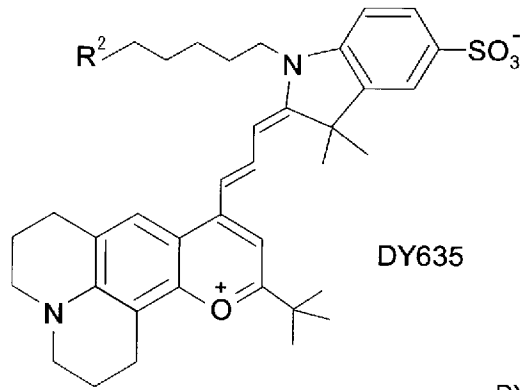
[0027] 式中、R³、R⁴は、それぞれ、前記シリカ成分と共有結合し得る基である。

YAGレーザーによる励起波長532nmを有する蛍光色素化合物としては、5-TAMRA、Cy3(商品名;アマシャム・バイオサイエンス製)、DY550、DY555(いずれも商品名、Dyomics GmbH社製)、Alexa Fluor546、Alexa Fluor555(いずれも商品名、Invitrogen社製)等が挙げられる。

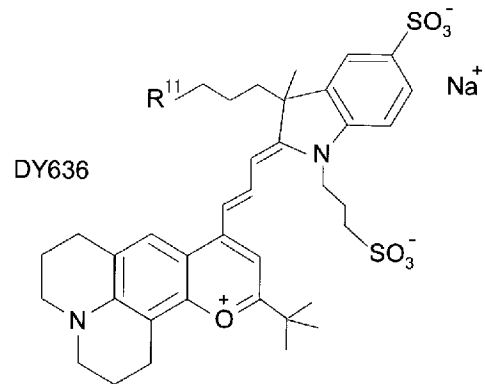
半導体赤色レーザーによる励起波長635nmを有する蛍光色素化合物としては、DY630、DY631、DY633、DY635、DY636、DY650、DY651(いずれも商品名、Dyomics GmbH社製)、Cy5(商品名;アマシャム・バイオサイエンス社製)、BODIPY 630/650、Alexa Fluor633、Alexa Fluor647、APC(アロフィコシアニン)(いずれも商品名、Invitrogen社製)、Oyster643、Oyster656(いずれも商品名、Denovo Biolabels社製)等が挙げられる。

[0028] [化3]

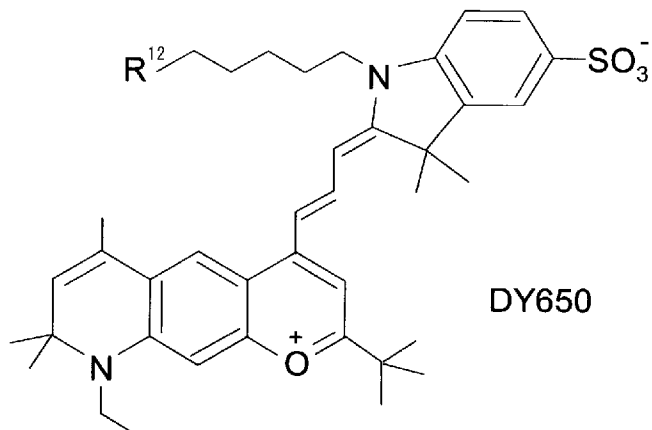




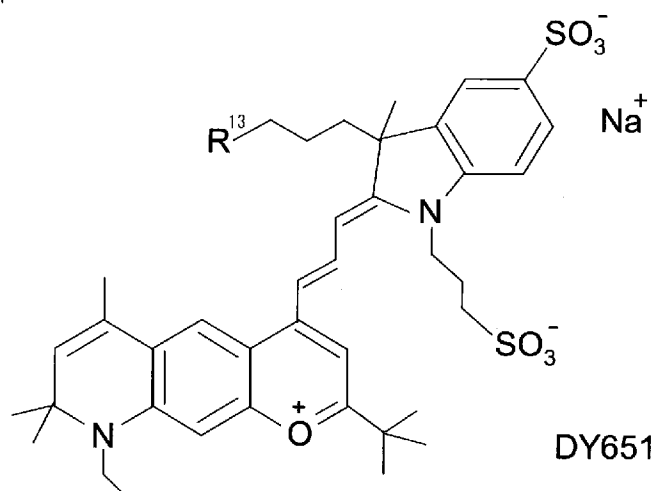
DY635



DY636



DY650



DY651

[0030] 式中、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^2 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} は、それぞれ、前記シリカ成分と共有結合し得る基である。

次に本発明に用いる蛍光シリカ粒子の調製について説明する。

本発明に用いる蛍光シリカ粒子は、蛍光色素化合物とシラン化合物とを反応させ、共有結合、イオン結合その他の化学的に結合もしくは吸着させて得られた生成物に1又は2種以上のシラン化合物を重合させることにより調製することができる。

前記蛍光シリカ粒子の調製法として、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル基、マレイミド基、イソシアナート基、イソチオシアナート基、アルデヒド基、パラニトロフェニル基、ジエトキシメチル基、エポキシ基、シアノ基等の活性基を有する前記蛍光色素化合物と、それら活性基と対応して反応する置換基(例えば、アミノ基、水酸基、チオール基)を有するシランカップリング剤とを反応させ、共有結合させて得られた生成物に1又は2種以上のシラン化合物を重合させることにより調製するのが好ましい。

[0031] 本発明者らは、蛍光シリカ粒子の調製方法について特許出願している(例えば、特願2004-356608)。その方法に準じて行なうのがさらに好ましい。具体的には、前記蛍光シリカ粒子は、下記(a)及び(b)の工程を行なうことにより調製することができる。

(a) N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル等の活性エステル基を有する蛍光色素化合物(1)とアミノ基を有するシランカップリング剤(2)とを反応させて、色素シランカップリング剤複合化合物(3)を生成する工程、及び

(b) 前記(a)で得られた色素シランカップリング剤複合化合物(3)を、シリカ化合物(4)と塩基性条件下で重合させて前記蛍光シリカ粒子(5)を形成する工程。

[0032] 本発明者らは、カルボン酸化合物とN-ヒドロキシスクシンイミドとをエステル化反応する工程について特許出願している(例えば、特願2004-356608)。

前記工程(a)で用いるNHSエステル基を有する蛍光色素化合物(1)は、そのエステル化反応工程に準じて行うことで調製することができる。但し、市販のものを入手することも可能である。

[0033] 前記NHSエステル基を有する蛍光色素化合物(1)として具体的には、5(6)-カルボキシフルオレセイン-NHSエステル(商品名、ロッシュ社製)、DY550-NHSエステル、DY555-NHSエステル、DY630-NHSエステル、DY635-NHSエステル(いずれも商品名、Dyomics GmbH社製)、5-TAMRA-NHSエステル

、Alexa Fluor546-NHSエステル、Alexa Fluor555-NHSエステル、Alexa Fluor633-NHSエステル、Alexa Fluor647-NHSエステル(いずれも商品名、Invitrogen社製)、Oyster643-NHSエステル、Oyster656-NHSエステル(いずれも商品名、Denovo Biolabels社製)等を挙げることができる。中でも、5(6)-カルボキシフルオレセイン-NHSエステル(商品名、ロッシュ社製)、DY630-NHSエステル好ましい。

[0034] 前記アミノ基を有するシランカップリング剤(2)としては、特に制限されないが、例えば、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)、3-[2-(2-アミノエチルアミノ)エチルアミノ]プロピルトリエトキシシラン、N-2(アミノエチル)3-アミノプロピルメチルジメトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシランを挙げることができる。中でも、APSが好ましい。

[0035] 前記NHSエステル基を有する蛍光色素化合物(1)と前記アミノ基を有するシランカップリング剤(2)との反応は、DMSOや水等の溶媒に溶解した後、室温(例えば、25℃)条件下で攪拌しながら反応することによって行うことができる。

反応に用いる前記NHSエステル基を有する蛍光色素化合物(1)とシランカップリング剤(2)との割合は特に制限されないが、前記NHSエステル基を有する蛍光色素化合物(1):前記アミノ基を有するシランカップリング剤(2)=1:0.5~4(モル比)の割合が好ましく、1:0.8~1.2(モル比)の割合がより好ましい。

[0036] 斯くして、蛍光色素化合物(1)のカルボニル基と、アミノ基を有するシランカップリング剤(2)のアミノ基とが、アミド結合(-NHCO-)して、色素シランカップリング剤複合化合物(3)が得られる。すなわち、前記色素シランカップリング剤複合化合物(3)は、アミド結合を介して蛍光色素化合物とシリカ成分が結合している。

[0037] 次いで工程(b)で、前記色素シランカップリング剤複合化合物(3)をシリカ化合物(4)と反応させる。前記シリカ化合物(4)としては、特に制限はされないが、テトラエトキシシラン(TEOS)、 γ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン(MPS)、 γ -メルカプトプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)、3-チオシアナトプロピルトリエトキシシラン、3-グリシジルオキシプロピルトリエトキシシラン、3-イソシアナトプロピルトリエトキシシラン、及び3-[2-(2-アミノエチルアミノ)エチルアミ

ノ]プロピルトリエトキシシランを挙げることができる。中でも、TEOS、MPS又はAPSが好ましい。

- [0038] 色素シランカップリング剤複合化合物(3)とシリカ化合物(4)の割合は、特に制限はないが、色素シランカップリング剤複合化合物(3)1モルに対するシリカ化合物(4)のモル比として、50~40000が好ましく、100~2000がより好ましく、150~1000がさらに好ましい。
- [0039] この反応は、アルコール、水及びアンモニアの存在下で行うのが好ましい。ここでアルコールとしてはメタノール、エタノール、プロパノール等の炭素数1~3の低級アルコールを挙げることができる。
- [0040] かかる反応系における水とアルコールの割合は、特に制限されないが、好ましくは水1容量部に対してアルコールを0.5~20容量部、より好ましくは2~16容量部、さらに好ましくは4~10容量部の範囲である。アンモニアの量も特に制限されないが、アンモニアの濃度が30~1000mMが好ましく、60~500mMがより好ましく、80~200mMがさらに好ましい。
- [0041] この反応は室温で行うことができ、また攪拌しながら行うのが好ましい。通常、数十分~数十時間の反応で、蛍光シリカ粒子(5)を調製することができる。
- [0042] なお、前記工程(b)において、使用するシリカ化合物(4)の濃度を調整したり、反応時間を調整することにより、調製するシリカ粒子の大きさ(直径)を適宜調節することができる。使用するシリカ化合物(4)の濃度を多くしたり、また反応時間を長くすることにより、より大きなシリカ粒子を調製することができる(例えば、Blaaderenet al., "Synthesis and Characterization of Monodisperse Colloidal Organosilica Spheres", J. Colloid and Interface Science 156, 1-18. 1993参照)。また、工程(b)を複数回、繰り返し行うことによっても、より大きなシリカ粒子を調製することができる。このように、得られる蛍光シリカ粒子の粒径(直径)を、所望の大きさに、例えばnmオーダーから μ mオーダーへと自在に調整することができる。また必要に応じて、その後の処理により希望する粒子径分布となるように調整することもでき、斯くして所望の粒子径分布範囲にあるシリカ粒子を得ることができる。

このようにして得られる蛍光シリカ粒子は、必要に応じて、限外ろ過膜などの常法を

利用して共存イオンや共存する不要物を除いて精製してもよい。

上述のように調製すると、球状、もしくは、球状に近いシリカ粒子群が製造できる。球状に近い微粒子とは、具体的には長軸と短軸の比が2以下の形状である。

[0043] 本発明の生体分子の定量システムもしくは定量方法において、フローサイトメーターの検出能(感度)の観点から、蛍光シリカ粒子の平均粒径は300nm以上が好ましく、500nm以上がより好ましく、800nm以上がさらに好ましく、800nm～1200nmが特に好ましい。

一方、本発明の細胞の検出・分取システムもしくは細胞の検出・分取方法において、細胞の検出感度を向上させる観点から、蛍光シリカ粒子の平均粒径は10nm以上が好ましく、10nm～200nmがより好ましく、10nm～100nmがさらに好ましく、10nm～50nmが特に好ましい。

所望の粒径のシリカ粒子を得るためには、YM-10、YM-100(いずれも商品名、ミリポア社製)等の限外ろ過膜を用いて限外ろ過を行い、粒径が小さい粒子を除去することで可能である。

本発明において、前記平均粒径は、透過型電子顕微鏡(TEM)、走査型電子顕微鏡(SEM)等の画像から無作為に選択した50個のシリカ粒子の合計の投影面積からシリカ粒子の占有面積を画像処理装置によって求め、この合計の占有面積を、選択したシリカ粒子の個数(50個)で割った値に相当する円の直径の平均値(平均円相当直径)を求めたものである。

粒度分布の変動係数いわゆるCV値は特に制限はないが、10%以下が好ましく、8%以下がより好ましい。

本明細書及び特許請求の範囲において、単分散とはCV値15%以下の粒子群をいう。

[0044] 蛍光色素化合物をシリカ粒子内に固定し、包含させると、前記蛍光色素化合物複数個がシリカ粒子内に含有され、遊離の蛍光色素化合物よりも感度を上げることができる。

また、本発明者らは、蛍光色素化合物が自己消光を起こすことなく、多くの蛍光色素化合物をシリカ粒子内に固定もしくは包含させることができることを見出し、特許出

願している(例えば、特願2004-356608)。このため、微小な領域でも使用可能な、高感度な標識が可能である。

[0045] 次に「シリカ粒子表面修飾」について説明する。

シリカは、一般に、化学的に不活性であると共に、その修飾が容易であることが知られている。本発明に用いる蛍光シリカ粒子群もまた、容易に所望の物質を表面に結合させることが可能であり、またその表面をメソポーラスや平滑にすることもできる。

[0046] 本発明に用いる蛍光シリカ粒子の表面修飾について、具体的には、上記工程(b)で用いるシリカ化合物(4)の種類に応じて、所望の物質と結合可能なアクセプター基を表面に有する蛍光シリカ粒子群とすることができる。前記アクセプター基として、アミノ基、水酸基、チオール基、カルボキシル基、マレイミド基、スクシンイミジルエステル基等が挙げられる。

反応に用いるシリカ化合物(4)と、それによって得られる蛍光シリカ粒子群の表面に形成されたアクセプター基との関係を表1に示す。

[0047] [表1]

表 1

シリカ化合物(4)	シリカ粒子表面に形成されるアクセプター基
テトラエトキシシラン	OH基
γ-メルカプトプロピルトリエトキシシラン	SH基
アミノプロピルトリエトキシシラン	NH ₂ 基
3-チオシアナトプロピルトリエトキシシラン	SCN基
3-グリシジルオキシプロピルトリエトキシシラン	エポキシ基
3-イソシアナトプロピルトリエトキシシラン	CNO基

[0048] なお、上記得られる蛍光シリカ粒子(5)について、反応に使用したシリカ化合物(4)によって表面に導入されるアクセプター基とは異なるアクセプター基を導入したい場合には、蛍光シリカ粒子(5)を、さらに工程(b)で使用したシリカ化合物(4)とは異なるシリカ化合物で処理することにより達成できる。この処理は、工程(b)で使用したシリカ化合物(4)とは異なるシリカ化合物を用いて、上記工程(b)と同様な操作を行うことにより実施することができる。

[0049] 本発明に用いる蛍光シリカ粒子は、表面に有するアクセプター基の種類に応じて所望の標的生体分子を分子認識する物質[例えば、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、

糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド、化学物質等]を表面に結合もしくは吸着させ、修飾させることができる。

本発明に用いる蛍光シリカ粒子の表面に、前記標的生体分子を分子認識する物質を結合させ、修飾する方法として特に制限はないが、下記(i)～(iii)の例が挙げられる。

(i) MPS等を用いて調製したチオール基を表面に有する前記蛍光シリカ粒子群は、ジスルフィド結合、チオエステル結合、またはチオール置換反応を介した結合を介して、その表面を前記標的生体分子を分子認識する物質で修飾することができる。

(ii) 特に前記標的生体分子を分子認識する物質がアミノ基を有する場合には、前記蛍光シリカ粒子群が有するチオール基と、前記標的生体分子を分子認識する物質が有するアミノ基とをスクシンイミジルートランス-4-(N-マレイミジルメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)等の架橋剤を用いて結合することもできる。

(iii) APS等を用いて調製したアミノ基を表面に有する前記蛍光シリカ粒子は、前述と同様に、このアミノ基と前記標的生体分子を分子認識する物質が有するチオール基とをSMCC、EMCS等の架橋剤を用いて結合することができる。また、このアミノ基と前記標的生体分子を分子認識する物質が有するアミノ基とをグルタルアルデヒド等の架橋剤で結合することもできる。さらに、アミド結合やチオウレア結合を介して、その表面を前記標的生体分子を分子認識する物質で修飾することもできる。

[0050] 本発明において、例えば溶液中に拡散して低濃度で存在する分子であっても、前記蛍光シリカ粒子の表面に結合させて濃縮することができ、こうすることでこれらの分子を高感度に検出することができる。

[0051] 次に「フローサイトメトリー用マルチプレックシングキット」について説明する。

上記蛍光特性が異なる、本発明に用いる2種以上の蛍光シリカ粒子を組み合わせ、耐退色性を与えた捕捉ないしは標識ビーズ(好ましくは、バーコード標識ビーズ)として、フローサイトメトリー用マルチプレックシングキットとすることができる。

本明細書及び特許請求の範囲において、「マルチプレックシング」とは、複数種の標的(生体分子、細胞等)を、1回の測定操作で同時に分析(検出、定量等)すること

をいう。

本発明のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキットは、すぐにフローサイトメトリーに適用する観点から、複数種ある蛍光シリカ粒子それぞれが、別個の標的(生体分子、細胞等)を分子認識するように修飾された複数種の蛍光シリカ粒子を組み合わせることで好ましい。

前記修飾された複数種の蛍光シリカ粒子の構築は、「シリカ粒子表面修飾」について前述した通りである。

[0052] 次に「標的生体分子の定量方法」について説明する。

本発明の定量方法において、前記標的生体分子としては標的生理活性物質も含み、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド、化学物質等が挙げられる。

本発明の生体分子の定量方法は、下記第1～3の態様が挙げられる。

本発明の生体分子の定量方法の第1の態様は、前記標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、定量用の蛍光で標識付けされた1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分の発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記の標識付けされた1又は2種以上の標的生体分子の蛍光強度を、それぞれ、フローサイトメーターで定量する工程とを含む。

[0053] 前記第1の態様は、前記標的生体分子が予め定量用の蛍光で標識されている場合に好ましく用いられる。すなわち、前記標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾された蛍光シリカ粒子によって前記標的生体分子を蛍光シリカ粒子表面に固定した後、フローサイトメーターを用いて測定を行い、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の蛍光をそれぞれ検出し、蛍光シリカ粒子の種類ごとにデータを分け、前記標的生体分子の定量用の蛍光強度から前記標的生体分子を定量する方法である。

前記第1の態様における前記標的生体分子としては、PCR反応によってCy3ないしはCy5が導入されたDNA、RNA等の核酸、蛍光タンパク質と融合したタンパク質等が挙げられる。

本発明の生体分子の定量方法の第1～3の態様において、耐退色性を与えた標識ビーズ(好ましくは、バーコード標識ビーズ)として、前記標的の生体分子を分子認識する物質で表面修飾された1又は2種以上の蛍光シリカ粒子については、「本発明に用いる蛍光シリカ粒子」及び「シリカ粒子表面修飾」について前述した通りである。

- [0054] 本発明の生体分子の定量方法の第2の態様は、標的の生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、1又は2種以上の標的の生体分子を固定する工程と、
定量用の蛍光を発し、かつ前記1又は2種以上の標的の生体分子に、それぞれ、特異的に結合する1又は2種以上の蛍光標識プローブを混合する工程と、
フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記1又は2種以上の蛍光標識プローブの蛍光強度をそれぞれ定量する工程とを含む。

- [0055] 前記第2の態様は、前記1又は2種以上の標的の生体分子それぞれが、2つ以上の認識部位(エピトープ等)を有する場合に好ましく用いられる。すなわち、前記標的の生体分子の認識部位の1つを分子認識する物質で表面修飾された蛍光シリカ粒子によって前記標的の生体分子を蛍光シリカ粒子表面に固定し、さらに定量用の蛍光標識プローブにより標的の生体分子の別の認識部位を定量用に蛍光標識した後、フローサイトメーターを用いて測定を行い、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の蛍光をそれぞれ検出し、蛍光シリカ粒子の種類ごとにデータを分け、前記蛍光標識プローブの蛍光強度から前記標的の生体分子を定量する方法である。

- [0056] 前記認識部位を分子内に2つ以上有する標的の生体分子の具体例としては、任意の抗原(IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、エリスロポエチン、造血幹細胞因子、トランスフォーミング増殖因子 α 及び β 、神経細胞増殖因子等)、その他、核酸(DNA、RNA)、抗体(イムノグロブリンA、イムノグロブリンE、イムノグロブリンG、イムノグロブリンM)等が挙げられる。

前記蛍光標識プローブとしては、用いたシリカ粒子の有する蛍光波長とは異なる蛍光波長を有する蛍光物質を含有し、かつ標的の生体分子に特異的に結合または吸着する限り特に制限はなく、任意の蛍光色素が結合した抗体等が挙げられ、前記標的

生体分子もしくは前記分子認識物質に特異的に結合する物質で修飾されている蛍光シリカ粒子であってもよい。

前記蛍光標識プローブとしては、例えば、PE(フィコエリスリン)で標識された抗IL-2抗体、PEで標識された抗IL-4抗体、PEで標識された抗IL-5抗体、PEで標識された抗IL-10抗体、PEで標識された抗TNF- α 抗体、PEで標識された抗IFN- γ 抗体、PEで標識された抗エリスロポエチン抗体、PEで標識された抗造血幹細胞因子抗体、PEで標識された抗トランスフォーミング増殖因子 α 抗体、PEで標識された抗トランスフォーミング増殖因子 β 抗体、PEで標識された抗神経細胞増殖因子抗体等が挙げられる。

[0057] 本発明の生体分子の定量方法の第3の態様は、標的分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、1又は2種以上の標的分子を固定する工程と、

前記1又は2種以上の標的分子に、それぞれ特異的に結合する1又は2種以上の分子認識物質を混合する工程と、

定量用の蛍光を発し、かつ前記1又は2種以上の分子認識物質に、それぞれ特異的に結合もしくは吸着する1又は2種以上の蛍光標識プローブを混合する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記1又は2種以上の蛍光標識プローブの蛍光強度をそれぞれ定量する工程とを含む。

前記第3の態様において、前記分子認識物質は、前記標的分子に特異的に結合もしくは吸着する限り特に制限はなく、前記標的分子を分子認識する物質が好ましく、例えば、抗原、抗体(好ましくは、任意の1次抗体)、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド及び/又は化学物質が挙げられる。

前記分子認識物質は前記標的分子を認識するように修飾された物質を挙げることもでき、例えば、ビオチンもしくはアビジンで修飾されたDNAもしくはRNA、ビオチンもしくはアビジンで修飾されたマウスIgG、マルトース結合タンパクで修飾されたマウスIgM等が挙げられる。

前記標的分子を認識するように修飾された前記分子認識物質を構築する方法

は、特開平9-154599、特表2003-522158等に記載の方法により行なうことができる。

前記第3の態様において、定量用の前記蛍光標識プローブは、蛍光標識を有し、前記分子認識物質に特異的に結合もしくは吸着する限り特に制限はなく、例えば、前記分子認識物質がビオチン化された抗体である場合、アビジン又はストレプトアビジンと結合した蛍光標識プローブ、前記分子認識物質がアビジン化又はストレプトアビジン化された抗体である場合、ビオチンと結合した蛍光標識プローブ等が挙げられる。また、前記分子認識物質を1次抗体とした場合、蛍光標識プローブは蛍光標識された2次抗体とすることもできる。前記2次抗体としては、前記1次抗体に親和性のあるものである限り特に制限はなく、任意のいかなる抗体でもよい。

[0058] 以下、本発明の別の態様としての、標的細胞の検出もしくは分取システム、及び標的細胞の検出もしくは分取方法(以下、単に、「本発明の標的細胞の検出・分取システム及びその方法」という。)について説明する。

本発明の標的細胞の検出・分取システム及びその方法は、耐退色性を与えた標識ビーズとして、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて、検体中の1又は2種以上の標的細胞を標識付けし、前記1又は2種以上の標的細胞を標識付けした前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光をフローサイトメーターで検出することを特徴とする。

[0059] 前記標的細胞としては特に制限はないが、骨髄球系細胞、Bリンパ系細胞、Tリンパ系細胞、造血幹細胞、悪性腫瘍細胞(例えば、HeLa細胞)、ウイルス感染細胞(例えば、インフルエンザウイルス感染細胞)、異種移植に用いる細胞(例えば、ブタ肝臓細胞)等を挙げることができる。

本発明の標的細胞の検出・分取システム及びその方法において、前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表面マーカーに特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾することが好ましい。

前記標的細胞が表面マーカーとして表層糖鎖(例えば、任意の細胞表層糖鎖中に含有されるマルトース、任意の細胞表層のシアリル・ルイスX含有糖鎖)を有する場合、前記蛍光シリカ粒子の表面を、標的細胞の表層糖鎖に特異的に結合する抗体な

いはレセプター(例えば、マルトース結合タンパク、シアリル・ルイスXを認識する任意のセレクトイン)で修飾することが好ましい。

前記標的細胞が表面マーカーとして表面抗原(例えば、ブタ肝臓細胞表層の α -Galエピトープ)を有する場合、前記蛍光シリカ粒子の表面を、標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体(例えば、ヒト抗 α -Gal抗体)もしくはレセプターで修飾することが好ましい。

[0060] 本発明の標的細胞の検出・分取システム及びその方法において、標的細胞を分取するためには、用いるフローサイトメーターに任意のセルソーターを設けることが好ましい。前記セルソーターは水滴荷電方式、セルキャプチャー方式等任意の方式であってよい。

セルソーターは、例えば、フローサイトメーターにおいて、前述のようにレーザー照射され、各蛍光シリカ粒子について検出データが取得された後、この取得データに基づき前記サンプルコアをプラスまたはマイナスに帯電させ、電圧板を用いてソーティングする等の装置である。

本発明において、MoFlo(商品名;ダコジャパン社製)等市販のセルソーターを用いてもよいし、市販のセルソーター装備フローサイトメーターとして、例えば、PERFlow All(商品名;古河電気工業社製)等を用いてよい。

[0061] 本発明の生体分子の定量システムは、フローサイトメトリーを利用した蛍光シリカ粒子アッセイ法に用いることによって、複数種の生体分子をわずか一回の測定で定量することができ、臨床試料等の入手試料に限界がある場合、極微量成分を定量する場合等に有用である。

本発明の生体分子の定量システムは、シリカ粒子の蛍光を受光するだけで、前記シリカ粒子を認識することができるので、散乱光検出域を省いてコンパクト化が可能である。

本発明の生体分子の定量方法は、従来、細胞を検出することを目的としていたフローサイトメトリーに対し、任意の生体分子を定量することができる。

本発明の生体分子の定量方法は、シリカ粒子の蛍光を受光するだけで、前記シリカ粒子を認識することができるので、散乱光を用いた煩雑な操作を要しない。

[0062] 本発明の細胞の検出もしくは分取システム及びその方法は、ガン細胞表層、ウイルス感染細胞表層、異種移植細胞表層等の細胞表層の特徴に基づき、任意の複数種の細胞をわずか一回の測定で検出し、それぞれ単離することができる。臨床試料等の入手試料に限界がある場合、極微量細胞を単離する場合に有用である。

本発明の生体分子の定量システム、細胞の検出もしくは分取システムに用いられる蛍光シリカ粒子は、低コストで、任意の生体分子、細胞等を標的とするための表面修飾ができ、複数種の蛍光色素の導入ができ、蛍光強度を変えて多様に異なるシリカ粒子としえる。また、前記蛍光シリカ粒子は、蛍光材料として耐退色性に優れる。

本発明のマルチプレックシングキットは、前記蛍光シリカ粒子複数種組み合わせとなり、バーコード標識ビーズである蛍光材料として用いることができる。

実施例

[0063] 以下、本発明を実施例に基づいてさらに詳細に説明する。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1(表面を抗体修飾した蛍光シリカ粒子をフローサイトメトリーに応用することによる多種類サイトカインの同時定量法)

ここでは蛍光シリカ粒子の調製法、及び蛍光シリカ粒子を利用した多種類サイトカインの同時定量法の実施例を示す。

[0064] (フルオレセイン-シランカップリング剤複合体の調製)

5(6)-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ロッシュ社製)3.3mgを1mlのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。ここに1.3 μ lのAPSを加え、室温(23°C)で1時間反応を行い、溶液Aを得た。

(DY630-シランカップリング剤複合体の調製)

DY630-NHSエステル(商品名、Dyomics GmbH社製)5.3mgを1mlのDMSOに溶解した。ここに1.3 μ lのAPSを加え、室温で1時間反応を行い、溶液Bを得た。

(色素2種類を含有したバーコード蛍光シリカ粒子の調製)

上記得られた溶液A及び溶液Bを、それぞれ、表2に示した混合比で混合し、エタノール3.95ml、MPS20 μ l、蒸留水1ml、28質量%アンモニア水100 μ lを加え室

温で24時間反応を行った。

反応液を2000×gの重力加速度で5分間遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿したシリカ粒子に蒸留水を1ml加え分散させ、再度2000×gの重力加速度で5分間遠心分離を行った。本洗浄操作をさらに2回繰り返し、蛍光シリカ粒子分散液に含まれる未反応のMPSやアンモニア等を除去した。

これによって、表2に示した混合比に対応して、5(6)-カルボキシフルオレセインとDY630の2色の色素の含有量比が異なる6種類のシリカ粒子(ビーズNo. 1~No. 6)を得た。

図1に得られた蛍光シリカ粒子ビーズNo. 1のTEM写真像を示す。図中、黒く見える球形状物質が、得られた蛍光シリカ粒子ビーズNo. 1である。図1のTEM写真を観察し、前記蛍光シリカ粒子が得られたことを確認した。

下記表3にそれぞれの収率及び平均粒径を示す。

[0065] [表2]

表 2 色素溶液の混合比

色素溶液 ビーズ No.	溶液 A (μ l)	溶液 B (μ l)
1	5	0
2	5	40
3	15	0
4	15	40
5	40	0
6	40	40

溶液 A は 5(6)-カルボキシフルオレセインを含有し、
溶液 B は DY630 を含有する。

[0066] [表3]

ビーズ No.	1	2	3	4	5	6
収率 (%)	12	17	15	14	17	13
平均粒径 (nm)	981	970	935	1012	953	966

[0067] 前記平均粒径は、TEM観察において異なる5箇所を観察し、それぞれのTEM写真から無作為に50個ずつ選択したシリカ粒子の平均粒径として平均円相当直径を求め、さらにこれを5箇所について平均したものである。

(蛍光シリカ粒子の抗体修飾)

No. 1の蛍光シリカ粒子50 μ lに3-スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド(Sulfo-NHS)と1-エチル-3(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)の混合物(0.05M Sulfo-NHS、0.2M EDC、リン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解)を450 μ l加え10分間混合後、抗マウスIL-2抗体(100 μ g/ml)を50 μ l加え、さらに1時間混合した。

遠心分離によってシリカ粒子を沈殿させ上清を除去した後、PBSに対して透析を2回行って未反応の試薬を除去した。これによってシリカ粒子の表面に抗マウスIL-2抗体が導入された蛍光シリカ粒子が得られた。

[0068] (ビーズの複数種化)

No. 2~No. 6の蛍光シリカ粒子に関しても同様の方法でそれぞれ抗マウスIL-4抗体、抗マウスIL-5抗体、抗マウスIL-10抗体、抗マウスTNF- α 抗体、抗マウスIFN- γ 抗体で表面修飾し、表4に示すような、ビーズの種類と抗体の対応関係を有する6種類のビーズを調製した。

[0069] [表4]

表 4

ビーズ No.	修飾抗体
1	抗マウス IL-2 抗体
2	抗マウス IL-4 抗体
3	抗マウス IL-5 抗体
4	抗マウス IL-10 抗体
5	抗マウス TNF- α 抗体
6	抗マウス IFN- γ 抗体

[0070] (シリカ粒子上での抗原抗体反応)

サイトカイン標準サンプルとして、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、IFN- γ それぞれが5 μ g/mlずつ混合されたサンプルを用意した。このサンプルを1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256倍に希釈し9種類の標準サンプルを調製した。

抗体で修飾した6種類のシリカ粒子をPBS中で混合した。得られたビーズ混合液を50 μ lずつ10本のマイクロチューブに分けた。

ここに、定量用標識プローブとして、PE(フィコエリスリン)で標識された抗IL-2抗体、PEで標識された抗IL-4抗体、PEで標識された抗IL-5抗体、PEで標識された抗IL-10抗体、PEで標識された抗TNF- α 抗体、PEで標識された抗IFN- γ 抗体(それぞれシリカ粒子の表面に結合した抗体とは別のエピトープに結合する抗体)が各々20 μ g/ml含まれた溶液を50 μ lずつ加えた。

続いて、これら10本のマイクロチューブの内、9本には標準サンプルを1種類ずつ50 μ l、残りの1本にはマウス血清を50 μ l加え、さらに各マイクロチューブにPBSを350 μ lずつ加えて混合し、室温で3時間反応を行った。

反応後、シリカ粒子を遠心分離で沈降させ、上清を除去した。ここに500 μ lのPBSを加え分散させ、もう一度遠心分離でシリカ粒子を沈降させ、上清を除去することによりシリカ粒子の洗浄を行った。

[0071] (フローサイトメーターによる測定とサイトカインの定量)

洗浄後、500 μ lのPBSを加え、シリカ粒子を分散させた。このうち100 μ lを測定用チューブに採り、Assay Diluent(商品名、ベクトン・デッキンソン社製)で2mlに希釈した。この溶液をFACSCalibur(商品名、ベクトン・デッキンソン社製)で測定した。2種類の蛍光励起レーザー(488nm及び635nm)を用い、測定は10000個の粒子を検出するまで行った。

測定データから、初めに2種類の蛍光(488nmで励起したときの530nmの蛍光(FL1)および635nmで励起したときの670nmの蛍光(FL3))の2次元ドットプロットを作成した。

図2は、488nmで励起したときの530nmの蛍光(FL1)および635nmで励起したときの670nmの蛍光(FL3)の2次元ドットプロットを表す図である。

図2から明らかなように、本発明の蛍光シリカ粒子(ビーズ)のバーコード標識により、6種類のサイトカイン(IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、IFN- γ)が区別された。

[0072] さらに各サイトカインの定量のため、6種類の蛍光シリカ粒子のデータを1種類ずつ分けるようにゲートを掛けた。

図3は、6種類のゲートを掛けた図2の2次元ドットプロットを表す図である。図3中、R1、R2、R3、R4、R5、R6はそれぞれゲートを示す。

下記表5に、ビーズNo. とゲートの対応関係を示す。

[0073] [表5]

表 5

ビーズNo.	ゲート
1	R1
2	R2
3	R3
4	R4
5	R5
6	R6

[0074] 次に、各シリカ粒子の粒子数、及び定量用プローブに由来する488nmで励起したときの585nmの蛍光強度(FL2)のデータから、1ビーズ当たりのフィコエリスリンの蛍光強度を算出した。

図4は、IL-2濃度に対するFL2カウント数の相関を示す標準曲線を表す図である

。

他のサイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、IFN- γ)についても、9種類の濃度の標準サンプルから得られる、各サイトカインの濃度と1シリカ粒子当たりのフィコエリスリンの蛍光強度(FL2チャンネル検出)の相関からIL-2についての標準曲線と同様な標準曲線を作成した。

図4に示したFL2強度と各サイトカインの濃度の標準曲線、及び他のサイトカインについての標準曲線からマウス血清サンプル中に含まれる6種類のサイトカインの濃度各々を算出した。

同じマウス血清サンプルを用い、6回サイトカインの定量実験を行った。6回の測定から得られた各サイトカインの濃度の平均値とCV値を表6に示す。

[0075] [表6]

表 6

サイトカイン	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	TNF- α	INF- γ
平均濃度 (pg/ml)	0.39	0.88	0.61	0.18	1.03	1.12
%CV	8%	6%	8%	9%	6%	5%

[0076] 表6に示した結果から明らかなように、マウス血清中の6種のサイトカインを一回のフローサイトメトリー操作で定量できた。

[0077] 実施例2(細胞標識用蛍光シリカ粒子の調製)

まず、実施例1と同様にフルオレセイン-シランカップリング剤複合体を調製した。

具体的には、5(6)-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ロッシュ社製)3.3mgを1mlのジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。ここに1.3 μ lのAPSを加え、室温(23 $^{\circ}$ C)で1時間反応を行い、フルオレセイン-シランカップリング剤複合体の溶液を得た。

続いて、エタノール6.4ml、蒸留水1.6ml、28質量%アンモニア水100 μ lを混合し、ここにフルオレセイン-シランカップリング剤複合体40 μ l、TEOS20 μ lを加え、室温で24時間反応を行った。

反応液を22000 \times gの重力加速度で30分間遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿したシリカ粒子に蒸留水を1ml加え分散させ、再度22000 \times gの重力加速度で

30分間遠心分離を行った。本洗浄操作をさらに2回繰り返し、蛍光シリカ粒子分散液に含まれる未反応のTEOSやアンモニア等を除去した。

これによって、5(6)-カルボキシフルオレセイン含有シリカ粒子(平均粒径39nm)を得た。収率48%。

図5に得られた蛍光シリカ粒子ビーズのSEM写真像を示す。図中、白く見える球形物質が、得られた蛍光シリカ粒子ビーズである。図5のSEM写真を観察し、前記蛍光シリカ粒子が得られたことを確認した。

蛍光シリカ粒子分散液(2mg/ml、蒸留水に分散)9mlに50mM KH_2PO_4 (pH6.5)を1ml加え軽く混合した。ここに蒸留水に溶解した抗マウスCD4抗体60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を1ml加え、室温で10分間静置した。続いて10%BSAを1.1ml加え、軽く攪拌した。

8000 $\times g$ の重力加速度で30分間遠心分離を行い、上清を除去した。ここに20mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(pH8.0)を20ml加え、粒子を分散させた。再度8000 $\times g$ の重力加速度で30分間遠心分離を行い、上清を除去後、20mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(pH8.0)を2ml加え、粒子を分散させ、抗マウスCD4抗体で修飾された蛍光シリカ粒子分散液を得た(8.2mg/ml \times 2ml)。

[0078] 実施例3(蛍光シリカ粒子によるマウス脾細胞の標識)

マウス3匹から摘出した脾臓よりマウス脾細胞を取り出した。マウス脾細胞を0.1%BSA(ウシ血清アルブミン)添加PBSで1回洗浄後、遠心分離し上清を除去した。ここに赤血球除去用トリス緩衝液(ACTB)を10ml加えピペティングによって混合後、5分間放置して赤血球破碎処理を行った。続いて0.1%BSA添加PBSを20ml加えて希釈し、遠心分離を行って上清を除去後0.1%BSA添加PBSで2回脾細胞を洗浄し、0.1%BSA添加PBS5mlに分散させた。得られたマウス脾細胞分散液500 μl に、抗マウスCD4抗体で修飾された蛍光シリカ粒子分散液を100 μl 加え0 $^{\circ}\text{C}$ で3時間、抗原抗体反応を行った。

反応後、マウス脾細胞を0.1%BSA添加PBSで2回洗浄し、500 μl の0.1%BSA添加PBSに分散させた。

得られたマウス脾細胞分散液をフローサイトメーターで測定した。

図6は、前記測定結果を示す、488nm励起光による530nmの蛍光強度を横軸(F L1)に、カウント数を縦軸にしたヒストグラムである。図6中、蛍光強度の弱いゲート1(G1)の領域は、CD4陰性細胞のカウント数を示し、蛍光強度の強いゲート2(G2)の領域は、CD4陽性細胞を標識付けした蛍光シリカ粒子のカウント数を示す。このヒストグラムから全体の約20%の細胞がCD4陽性細胞であることを確認した。

産業上の利用可能性

[0079] 本発明の生体分子の定量システム及び定量方法は、フローサイトメトリーを活かし、一回の測定操作で複数種の標的分子の同時定量が可能である。また、標的は生体分子に限られず、複数種の細胞の同時検出・分取が可能なシステム及び方法も提供される。さらに、上述のような、複数種の生体分子及び細胞の定量、検出及び分取を同時に可能とするフローサイトメトリー用の、複数種の蛍光シリカ粒子を組み合わせたセット等の蛍光材料が提供される。

本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであるとする。

請求の範囲

- [1] フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する蛍光シリカ粒子に、定量用の蛍光で標識付けされた標的生体分子を捕捉させ、前記蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、前記の標識付けされた標的生体分子の蛍光強度を測定して前記標的生体分子を定量することを特徴とする生体分子の定量システム。
- [2] 前記標的生体分子が2種以上であり、2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて各標的生体分子を特異的にそれぞれ捕捉することにより、2種以上の標的生体分子を同時に定量する、請求項1に記載の生体分子の定量システム。
- [3] 前記蛍光シリカ粒子の平均粒径が300nm以上であることを特徴とする、請求項1または2に記載の生体分子の定量システム。
- [4] 前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子の部分の発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム。
- [5] 前記蛍光シリカ粒子の表面を修飾する、前記標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質が、さらに蛍光で標識付けされていることを特徴とする請求項4に記載の生体分子の定量システム。
- [6] 前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、各々、1～4種類の蛍光色素化合物を含有していることを特徴とする、請求項2～5のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム。
- [7] 前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、粒子1個毎に蛍光色素化合物含有量が異なり多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする、請求項2～6のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム。
- [8] 前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、異なる蛍光スペクトル及び／又は多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム。
- [9] 前記標的生体分子が、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド及び／又は化学物質であることを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載

載の生体分子の定量システム。

[10] 前記蛍光シリカ粒子が、蛍光色素化合物を含有していないシリカ粒子を含んでいてもよい、請求項1～9のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム。

[11] 前記シリカ粒子の蛍光を受光するだけで、前記シリカ粒子を認識することを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の生体分子の定量システム。

[12] 標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、定量用の蛍光で標識付けされた1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記の標識付けされた1又は2種以上の標的生体分子の蛍光強度をそれぞれ定量する工程を含むことを特徴とする生体分子の定量方法。

[13] 標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

定量用の蛍光を発し、かつ前記1又は2種以上の標的生体分子に、それぞれ、特異的に結合する1又は2種以上の蛍光標識プローブを混合する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発する蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記1又は2種以上の蛍光標識プローブの蛍光強度をそれぞれ定量する工程を含むことを特徴とする生体分子の定量方法。

[14] 標的生体分子を分子認識する物質で表面修飾され、フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の表面に、1又は2種以上の標的生体分子を固定する工程と、

前記1又は2種以上の標的生体分子に、それぞれ特異的に結合する1又は2種以上の分子認識物質を混合する工程と、

定量用の蛍光を発し、かつ前記1又は2種以上の分子認識物質に、それぞれ特異的に結合する1又は2種以上の蛍光標識プローブを混合する工程と、

フローサイトメーターを用いて、前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子の部分が発す

る蛍光をそれぞれ検出し、かつ前記1又は2種以上の蛍光標識プローブの蛍光強度をそれぞれ定量する工程とを含むことを特徴とする生体分子の定量方法。

- [15] 前記蛍光標識プローブが、前記標的的生体分子もしくは前記分子認識物質に特異的に結合する物質で修飾されている蛍光シリカ粒子である、請求項13又は14に記載の生体分子の定量方法。
- [16] 前記分子認識物質が抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド及び／又は化学物質であることを特徴とする請求項13～15のいずれか1項に記載の生体分子の定量方法。
- [17] 2種以上の標的的生体分子を同時に定量する、請求項12～16のいずれか1項に記載の生体分子の定量方法。
- [18] フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて、検体中の1又は2種以上の標的細胞を標識付けし、前記1又は2種以上の標的細胞を標識付けした前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、必要に応じて分取する手段とを有することを特徴とする細胞の検出もしくは分取システム。
- [19] 前記蛍光シリカ粒子の表面が、前記標的細胞の表面マーカーに特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾され、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項18に記載の細胞の検出もしくは分取システム。
- [20] 前記蛍光シリカ粒子の表面が、標的細胞の表層糖鎖に特異的に結合する糖結合タンパク質で修飾され、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項18に記載の細胞の検出もしくは分取システム。
- [21] 前記蛍光シリカ粒子の表面が、標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体もしくはレセプターで修飾され、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項18に記載の細胞の検出もしくは分取システム。
- [22] 前記標的細胞が骨髄球系細胞、Bリンパ系細胞、Tリンパ系細胞、造血幹細胞、悪性腫瘍細胞、ウイルス感染細胞又は異種移植細胞である、請求項18～21のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取システム。
- [23] 前記蛍光シリカ粒子の平均粒径が10nm～100nmであることを特徴とする、請求

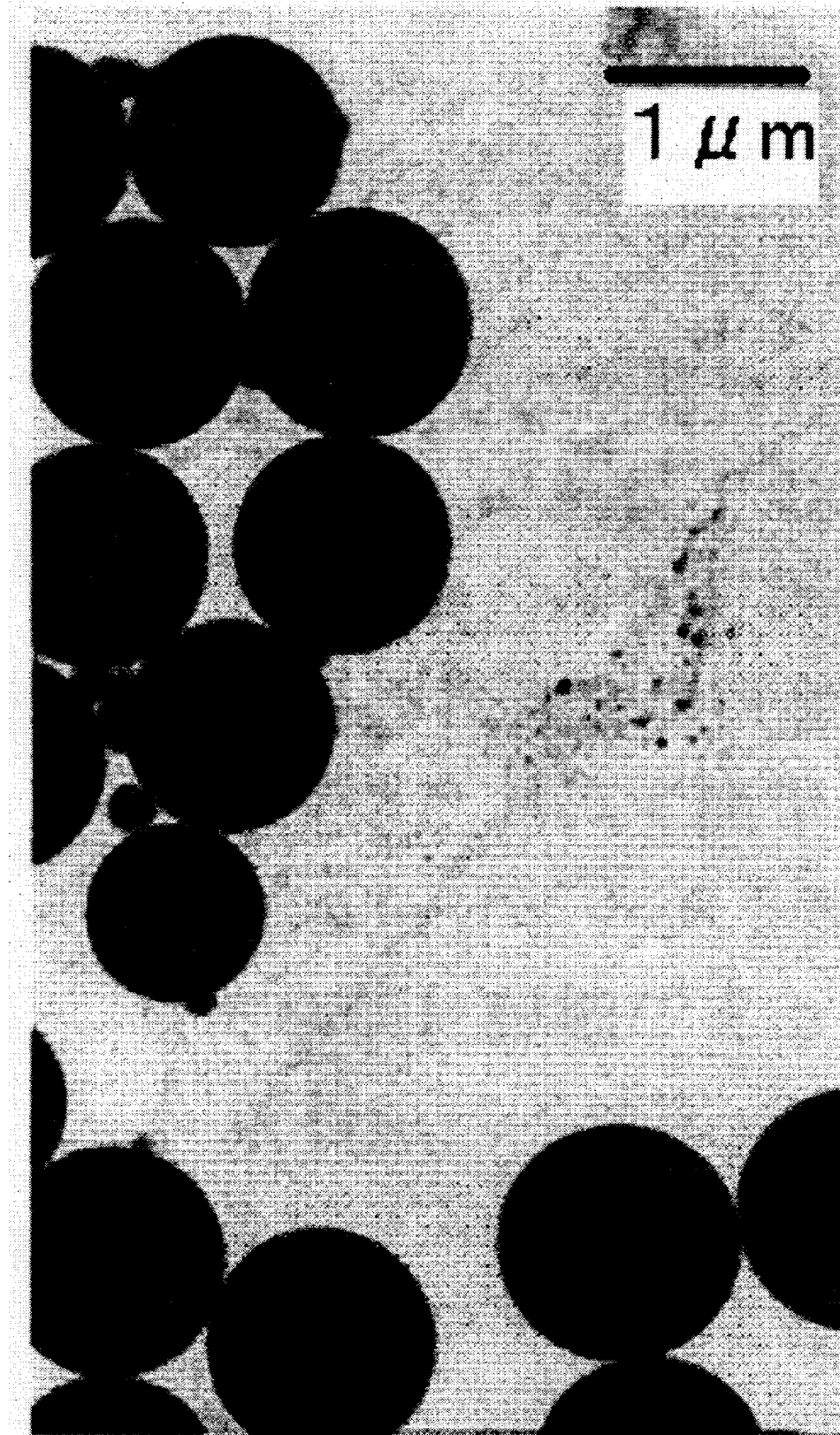
項18～22のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取システム。

- [24] 2種以上の標的細胞を同時に検出もしくは分取する、請求項18～23のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取システム。
- [25] フローサイトメーターで検出可能な蛍光を発する1又は2種以上の蛍光シリカ粒子を用いて、検体中の1又は2種以上の標的細胞を標識付けし、前記1又は2種以上の標的細胞を標識付けした前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光をフローサイトメーターで検出し、必要に応じて分取することを特徴とする細胞の検出もしくは分取方法。
- [26] 前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表面マーカーに特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項25に記載の細胞の検出もしくは分取方法。
- [27] 前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表層糖鎖に特異的に結合する糖結合タンパク質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項26に記載の細胞の検出もしくは分取方法。
- [28] 前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体もしくはレセプターで修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項26に記載の細胞の検出もしくは分取方法。
- [29] 前記標的細胞が骨髄球系細胞、Bリンパ系細胞、Tリンパ系細胞、造血幹細胞、悪性腫瘍細胞、ウイルス感染細胞又は異種移植細胞である、請求項25～28のいずれか1項に記載の細胞の検出もしくは分取方法。
- [30] 蛍光色素化合物とシリカ成分とが化学的に結合もしくは吸着してなり、平均粒径を300nm以上とし、耐退色性を与えた標識ビーズとしてフローサイトメトリーに用いる標的生体分子標識用蛍光シリカ粒子。
- [31] 蛍光色素化合物とシリカ成分とが化学的に結合もしくは吸着してなり、平均粒径を10nm～100nmとし、耐退色性を与えた標識ビーズとしてフローサイトメトリーに用いる標的細胞標識用蛍光シリカ粒子。
- [32] 請求項30または31に記載の蛍光シリカ粒子からなる蛍光材料。
- [33] 耐退色性を与えた標識ビーズとして複数種の請求項30または31に記載の蛍光シリカ粒子を少なくとも有するセットとするフローサイトメトリー用マルチプレックシングキ

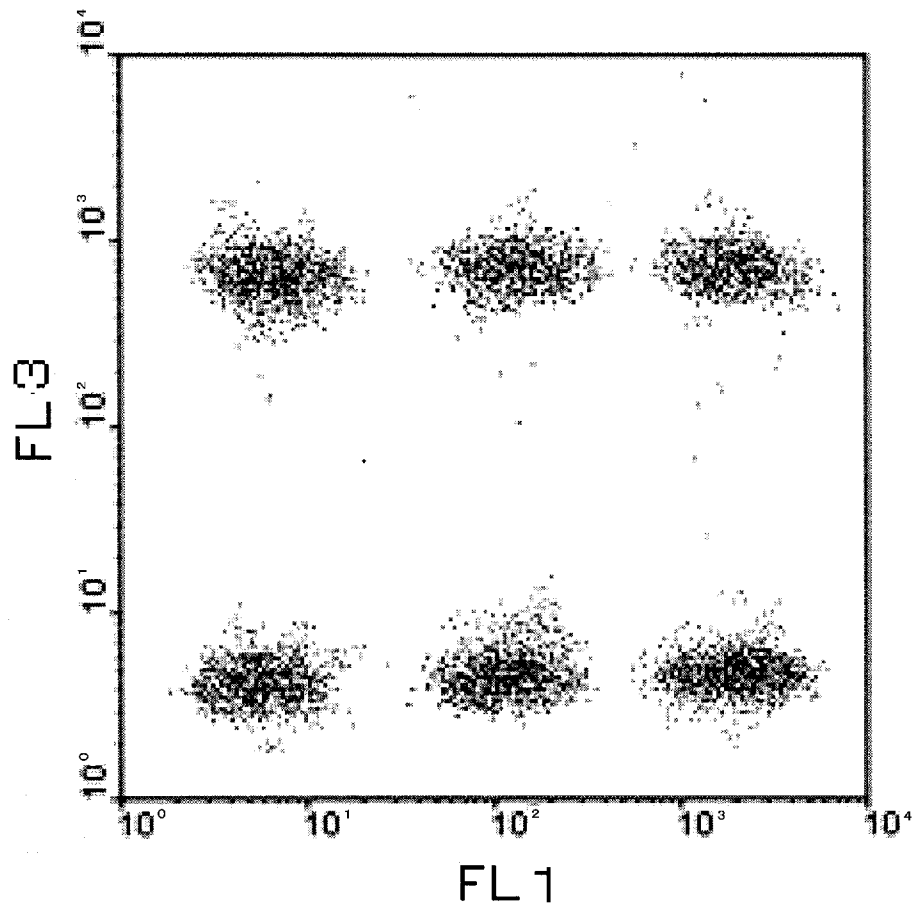
ット。

- [34] 前記複数種の蛍光シリカ粒子が、蛍光色素化合物を含有していないシリカ粒子を含んでいてもよい、請求項33に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット。
- [35] 標的生体分子もしくは標的細胞が、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド、化学物質、悪性腫瘍細胞、ウイルス感染細胞及び／又は異種移植細胞であることを特徴とする請求項33又は34に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット。
- [36] 前記蛍光シリカ粒子の表面を、前記標的生体分子に特異的に吸着もしくは結合する物質で修飾し、前記蛍光シリカ粒子が発する蛍光に耐退色性を与えたことを特徴とする請求項33～35のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット。
- [37] 前記1又は2種以上の蛍光シリカ粒子各々が、1～4種類の蛍光色素化合物を含有していることを特徴とする、請求項33～36のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット。
- [38] 前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、粒子1個毎に蛍光色素化合物含有量が異なり多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする、請求項33～37のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット。
- [39] 前記2種以上の蛍光シリカ粒子が、異なる蛍光スペクトル及び／又は多段階化された異なる蛍光強度を有することを特徴とする請求項33～38のいずれか1項に記載のフローサイトメトリー用マルチプレックシングキット。

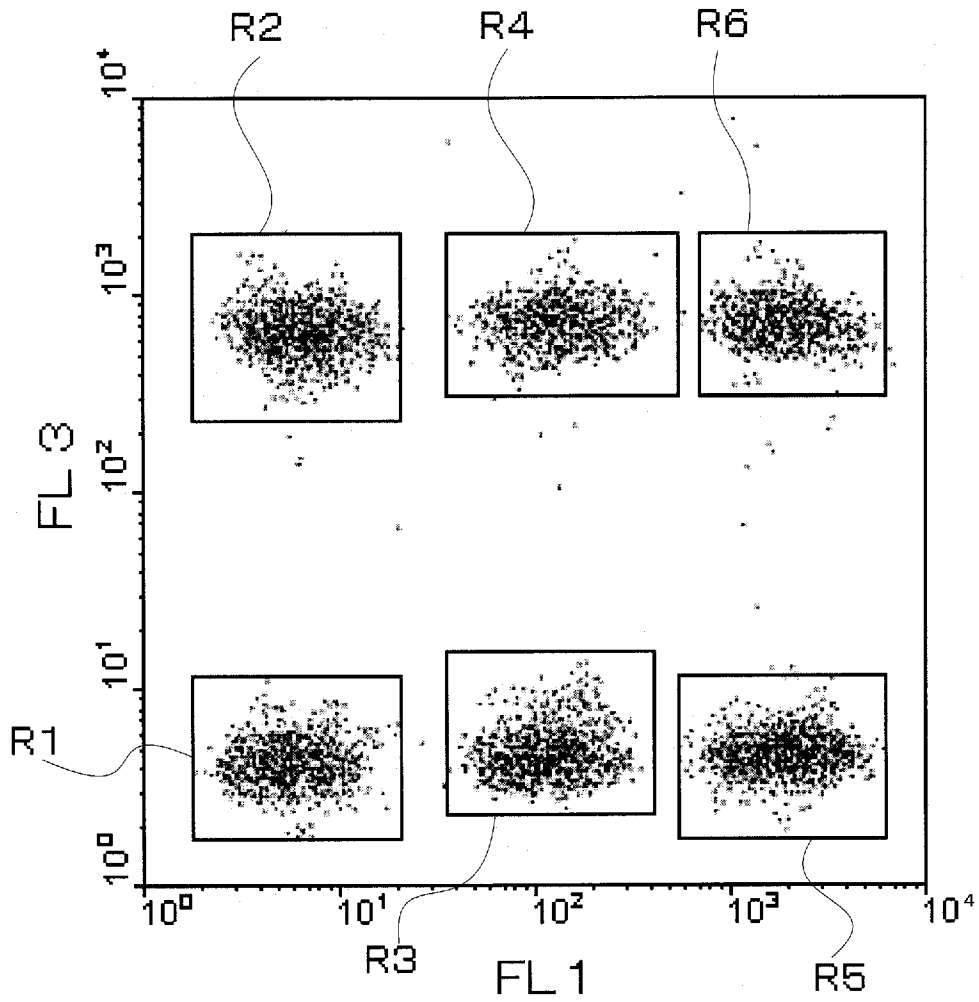
[図1]



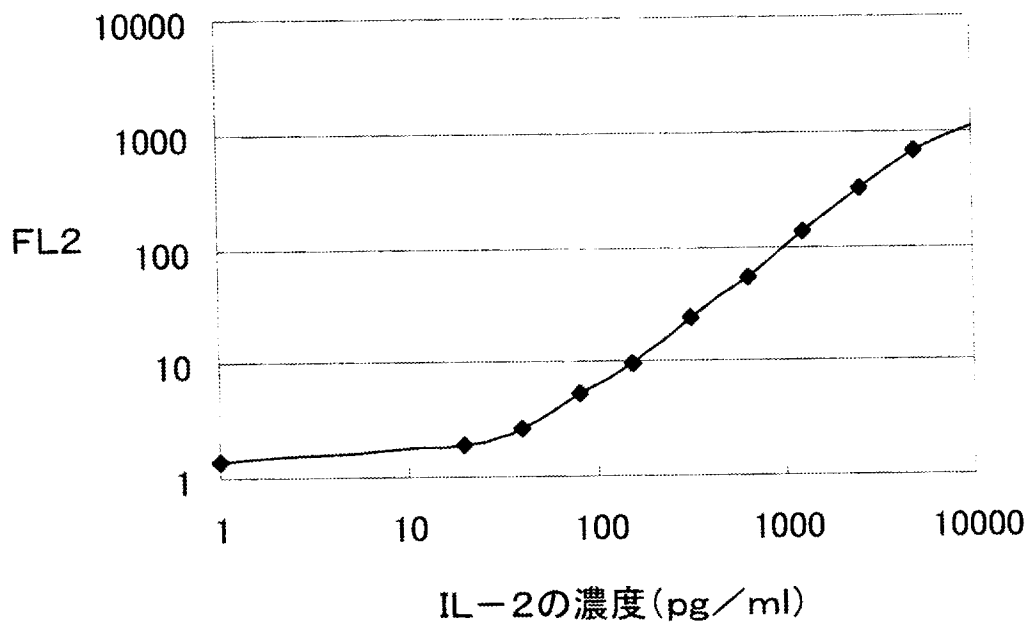
[図2]



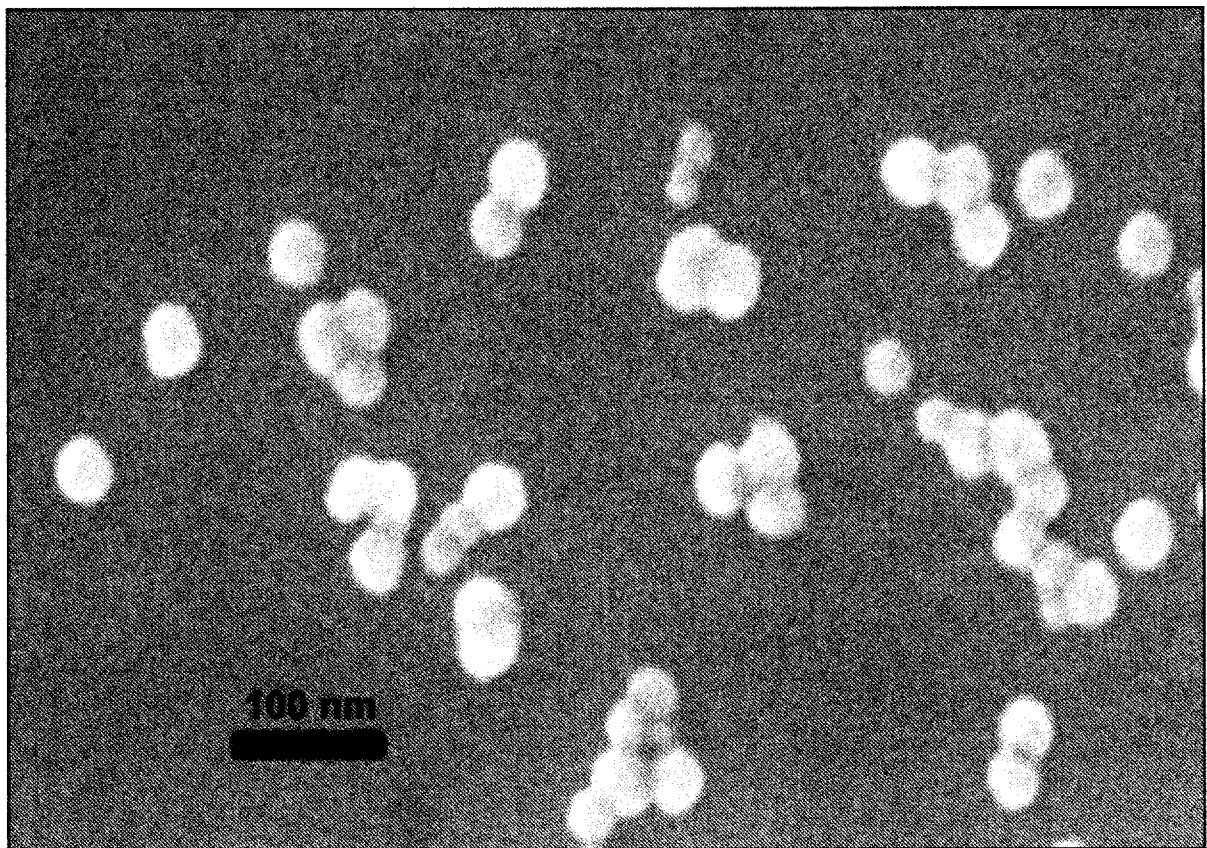
[図3]



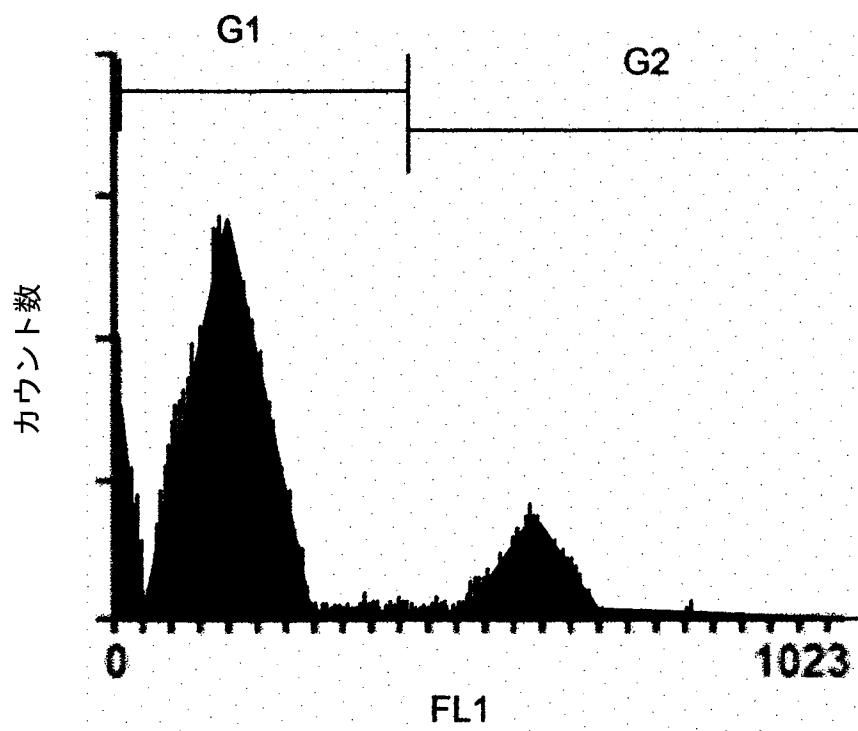
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i, G01N15/14(2006.01) i, G01N33/483(2006.01) i,
G01N33/552(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, G01N15/14, G01N33/483, G01N33/552

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-537564 A (Derutagen Puroteomikusu Inc.), 05 November, 2002 (05.11.02), & WO 2000/049417 A1 & US 2003/0027214 A1 & EP 1071958 A	1-30, 33-39
X/Y	YANG, H.-H., et al., "Nanometer fluorescent hybrid silica particle as ultrasensitive and photostable biological labels", Analyst, 2003, Vol. 128, p.462-466	31, 32 /1-30, 33-39
Y	JP 05-072204 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 23 March, 1993 (23.03.93), (Family: none)	1-39

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
04 April, 2007 (04.04.07)

Date of mailing of the international search report
17 April, 2007 (17.04.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053227

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 2002-501184 A (Luminex Corp.), 15 January, 2002 (15.01.02), & US 6268222 B1 & EP 1049807 A & WO 1999/037814 A1	1-39
A	JP 04-127061 A (Hitachi, Ltd.), 28 April, 1992 (28.04.92), (Family: none)	1-39
A	JP 04-363663 A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 16 December, 1992 (16.12.92), & EP 0482571 A1	1-39
A	JP 2004-533626 A (Arctic Diagnostics OY), 04 November, 2004 (04.11.04), & US 2004/0157231 A1 & EP 1402263 A & WO 2003/005030 A1	30-39
A	Varadan, P. & Solomon, M. J. "Direct visualization of flow-induced microstructure in dense colloidal gels by confocal laser scanning microscopy", 2003, J. Rheol., Vol.47, No.4, p.943-968	30-39

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N15/14(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i, G01N33/552(2006.01)i</p>												
<p>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. G01N33/543, G01N15/14, G01N33/483, G01N33/552</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2007年											
日本国実用新案登録公報	1996-2007年											
日本国登録実用新案公報	1994-2007年											
<p>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) JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2002-537564 A (デルタゲン プロテオミクス、インコーポレイテッド) 2002.11.05 & WO 2000/049417 A1 & US 2003/0027214 A1 & EP 1071958 A</td> <td>1-30, 33-39</td> </tr> <tr> <td>X/Y</td> <td>YANG, H.-H., et al., "Nanometer fluorescent hybrid silica particle as ultrasensitive and photostable biological labels", <i>Analyst</i>, 2003, Vol. 128, p.462-466</td> <td>31, 32 /1-30, 33-39</td> </tr> </tbody> </table>			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 請求の範囲の番号	Y	JP 2002-537564 A (デルタゲン プロテオミクス、インコーポレイテッド) 2002.11.05 & WO 2000/049417 A1 & US 2003/0027214 A1 & EP 1071958 A	1-30, 33-39	X/Y	YANG, H.-H., et al., "Nanometer fluorescent hybrid silica particle as ultrasensitive and photostable biological labels", <i>Analyst</i> , 2003, Vol. 128, p.462-466	31, 32 /1-30, 33-39	
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 請求の範囲の番号										
Y	JP 2002-537564 A (デルタゲン プロテオミクス、インコーポレイテッド) 2002.11.05 & WO 2000/049417 A1 & US 2003/0027214 A1 & EP 1071958 A	1-30, 33-39										
X/Y	YANG, H.-H., et al., "Nanometer fluorescent hybrid silica particle as ultrasensitive and photostable biological labels", <i>Analyst</i> , 2003, Vol. 128, p.462-466	31, 32 /1-30, 33-39										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	
「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												
<p>国際調査を完了した日 04.04.2007</p>	<p>国際調査報告の発送日 17.04.2007</p>											
<p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252</p>	<table border="1"> <tr> <td>2 J</td> <td>3 4 9 6</td> </tr> </table>	2 J	3 4 9 6								
2 J	3 4 9 6											

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 請求の範囲の番号
Y	JP 05-072204 A (住友製薬株式会社) 1993.03.23 (ファミリーなし)	1-39
Y	JP 2002-501184 A (ルミネックス コーポレイション) 2002.01.15 & US 6268222 B1 & EP 1049807 A & WO 1999/037814 A1	1-39
A	JP 04-127061 A (株式会社日立製作所) 1992.04.28 (ファミリーなし)	1-39
A	JP 04-363663 A (住友電気工業株式会社) 1992.12.16 & EP 0482571 A1	1-39
A	JP2004-533626 A (アークティク ダイアグノスティックス オサ ケユイチア) 2004.11.04 & US 2004/0157231 A1 & EP 1402263 A & WO 2003/005030 A1	30-39
A	Varadan, P. & Solomon, M. J.” Direct visualization of flow-induced microstructure in dense colloidal gels by confocal laser scanning microscopy” , 2003, J. Rheol., Vol.47, No.4, p.943-968	30-39