

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年5月16日(16.05.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/069732 A1

(51) 国際特許分類:

B82B 1/00 (2006.01)	B82Y 25/00 (2011.01)
B22F 1/00 (2006.01)	B82Y 40/00 (2011.01)
B22F 9/02 (2006.01)	H01F 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)	C12M 1/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)	C12M 1/34 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)	C12N 15/09 (2006.01)
B82Y 20/00 (2011.01)	C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/078993

(22) 国際出願日: 2012年11月8日(08.11.2012)

(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 2011-244059 2011年11月8日(08.11.2011) JP

(71) 出願人: 財団法人神奈川科学技術アカデミー (KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目2番1号 Kanagawa (JP). 一般社団法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム (ON-CHIP CELLOMICS CONSORTIUM) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内1-3-1 東京銀行協会ビル15階 Tokyo (JP). 国立大学法人東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 安田 賢二 (YASUDA Kenji); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 金 賢徹 (KIM

Hyonchol); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目2番1号 財団法人神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP). 寺園 英之 (TERAZONO Hideyuki); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目2番1号 財団法人神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP). 服部 明弘 (HATTORI Akihiro); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1-3-1 一般社団法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

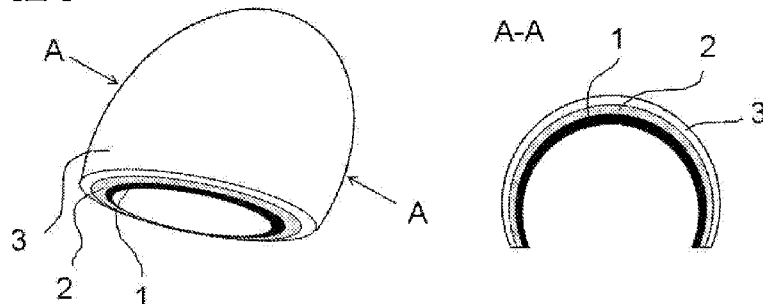
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: MAGNETIC NANOPARTICLES

(54) 発明の名称: 磁気ナノ粒子

[図1]



(57) Abstract: The present invention provides a method for manufacturing small objects that includes using microstructures formed of organic matter as a mold, placing the mold on a circuit board, depositing the desired element on the surface of an organic structure by a method such as vacuum deposition, and decomposing away the organic structure template by a method such as an ultraviolet/ozone treatment to obtain small objects composed of the desired element alone.

(57) 要約: 本発明は、有機物にて構成された微小な構造体を鋳型として、基板上に配置し、真空蒸着法などにより、有機物構造体の表面に目的の元素を堆積させ、その後、紫外線・オゾン処理法などにより、鋳型である有機物構造体を分解除去することにより、目的の元素成分のみで構成された微小体を得ることを含む微小体の製造方法を提供する。



WO 2013/069732 A1

WO 2013/069732 A1



(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 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：磁気ナノ粒子

技術分野

[0001] 本発明は金属、半導体などで構成された中空状の微小体（microscopic object）と、それらを利用した物質精製方法に関する。

背景技術

[0002] 微粒子（microparticle）などの微小構造体（microstructure）は、ナノメートルサイズの構造の物差しとして、新規デバイスの材料として、また、生物分野ではタンパク質やDNAを可視化するための標識物として、多岐に渡って利用されている。大きさの揃った様々な素材の微粒子を作製することは、上記分野での研究開発推進に必須であり、本願の発明者らは、特開平 11-001703「超微粒子の調製方法」（特許文献1）、および特開 2006-153826「生体試料標識物および生体物質標識法および生体物質の検査法」（特許文献2）において、生体分子を標識するために利用することができる微小体の作製方法および電子顕微鏡を利用した検査法を提案した。

[0003] 特開平 11-001703には、平坦な基板上にポリスチレン球を一層に分散し、金属または半導体を蒸着することにより微粒子を形成する方法が開示されている。特開 2006-153826には、作製した微粒子に対してタンパク質やDNAなどの生体分子を固定する方法、走査型電子顕微鏡を利用した観察により表面を被覆した元素の種類を特定する方法が開示されている。

[0004] しかしながら、これらの方法で作製された微粒子はポリスチレンやガラスなどの表面に元素が被覆されたものであり、目的の元素のみで構成された純粋な微粒子を作製する方法は記載されていない。

[0005] 他方、単一分子観測を可能とした技術的大革新は、これまでにないほどの詳細な情報を物理学の様々な分野にもたらし、数多くの驚くべき現象も発見されるようになった。ナノサイズの発光素子は、数多くの物理学的、化学的素過程を追跡する蛍光マーカーとして使うことができる。例えば大きな生体

分子にナノ発光素子を付着させれば、その構造変化や分子機能を直接観測することができる。さらに個々の分子の動きを追うこともできるので、生体細胞の動的な振る舞いを探することもできる。このような単一分子観測がもつ極めて高い潜在能力は、しばしば次に挙げる二つの要因により制限されてしまう。第一は点滅である。点滅が観測中に起こると実験結果から有益な情報を引き出す作業が煩雑になる。第二は測定が光退色(photobleaching)により制限される点である。励起状態の分子はその余分なエネルギーにより非可逆的な化学反応を起こし、蛍光を発さなくなることがある。

[0006] 退色しにくい発光素子が開発されると、長い時間スケールでの点滅現象の研究が行われるようになった。恐らくほぼ無限大の測定時間が可能と考えられるこのナノ発光素子は、半導体ナノ結晶であり、一般的にはコロイド量子ドットと呼ばれている。量子ドットはナノテクノロジー技術が産み出した最も輝かしい成果の一つであり、その大きさに依存した電氣的、光学的な性質は非常に魅力的である (A. P. Alivisatos, Science 271, 933 (1996) (非特許文献1))。

[0007] 孤立した量子ドットからの蛍光の点滅は、1996年にMITのバウエンディ (Moungi Bawendi) とベル研究所(当時)のブルス (Louis Brus) の共同研究により初めて観測された (M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, Nature 383, 802 (1996) (非特許文献2))。

[0008] 実際、ドットの発光に何が影響を及ぼすのかという点については、当時は何も知られていなかったもので、量子ドットの点滅は大変な驚きだった。それに加えて研究グループは、オン状態やオフ状態に留まる時間(逗留時間)が指数関数的には分布していないことも確認していた。この結果は、この新奇な点滅現象の背景には複雑な過程が潜んでいることを示唆する。後に、JILAのクノ (Masaru Kuno)、ネスビット (David Nesbitt) 等のグループは、オン時間とオフ時間の確率密度分布は次式のようなベキ乗則にしたがうことを見いだした (M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt

, J. Chem. Phys. 115, 1028 (2001) (非特許文献3))。

[数1]

$$P(t) \propto t^{-\alpha}, \quad 1 < \alpha < 2$$

[0009] ここで、 t はオンまたはオフ時間の長さ、そして指数 α は1と2の間の数である(典型的には1.5)。

[0010] このベキ乗則は、半導体ナノロッドあるいはナノワイアー、有機分子、蛍光タンパク質、複合ポリマーをはじめとしたほとんど全ての乱雑に配置された単一量子発光素子で確認されている。

[0011] 近年、蛍光光源として利用がされるようになった、コロイド量子ドットについては、たとえばCdSeのようなコロイド量子ドットは、大きさを2~6nm程度のものを化学的に合成することができ、一個一個が孤立した半導体ナノ結晶である。この大きさの範囲は、いろいろな物性値が分子からバルクへと変化するところである。ナノ結晶の大きさが小さくなると電荷の担体が動き回れる範囲が狭くなる。これは量子閉じ込め効果と呼ばれている。結果として小さい量子ドットは離散的なエネルギー準位と大きなバンドギャップをもつ。バンドギャップより大きなエネルギーの光を照射すると、量子ドットは光を吸収して励起子と呼ばれる電子-正孔対を形成する。この励起子はいずれ光を発して消滅する。ドットの大きさや組成を変化させれば、光吸収端や発光波長を可視光領域で自由に制御することができる。CdTe量子ドット(粒径2.5 nm~5nm)、CdHgTe量子ドット、HgTe量子ドットなどが実用化され、さまざまな蛍光を発することが確認されている。

[0012] コロイド量子ドットは大変小さいため、その表面には多数のダングリングボンド(dangling bond)、すなわち、共有結合性物質の表面や欠陥近傍に現れる結合に関与しない結合手(不対電子)があり、そこに励起された電子が捕獲されるために量子ドットの性能が低下する。量子ドット表面を有機物配位子で修飾することが現在試みられており、2つの効能が確認されている。ひとつはコロイド量子ドットが溶液中で分散した形で安定に存在できるようになることと、ダングリングボンドの影響を緩和できることである。量子ドット

表面のダングリングボンドを塞ぐ他の方法として、表面を無機物のシェルで覆う手法もある。シェルとしてはより大きなバンドギャップをもつ半導体がよく使われ、このような量子ドットはコア-シェル量子ドットと呼ばれている。

[0013] ベキ乗則にしたがう振る舞いが何に起因するかを理解はまだ進んでいないが、最近、点滅現象に関して二つの新しい手法が開発された。ひとつは量子ドットを他の応用に利用する目的のため新機能を追加する試みの中で得られ、量子ドット表面にさまざまな分子配位子を結合させたところ、ドットの光学的な性質が大きく変化したというものである (V. Fomenko, D. J. Nesbitt, Nano Lett. 8, 287 (2008) (非特許文献4))。たとえば電子ドナーとなる配位子はオフ時間の長さと頻度を劇的に減少させる。しかし点滅の動力学が同時に変わったとは必ずしも言えない。オフ時間の現れる頻度は少なくなったが、ベキ乗分布には相変わらずしたがっている。したがって、あまり望ましくない点滅の頻度を減らすという現実的な応用に関しては大きな進歩をもたらしたものである。

[0014] 二番目の手法は、CdSe量子ドットをコアとしてその周囲をCdS結晶の厚い(5 - 15 nm)シェルで覆うことで点滅を抑えることができるというものである (B. Mahler, P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J.-P. Hermier, B. Dubertret, Nat. Mater. 7, 659 (2008) (非特許文献5) ; Y. Chen, J. Vela, H. Htoon, J. L. Casson, D. J. Werder, D. A. Bussian, V. I. Klimov, J. A. Hollingsworth, J. Am. Chem. Soc. 130, 5026 (2008) (非特許文献6))。この発見から、ベキ乗則にしたがう点滅は周囲の欠陥に関係しており結晶そのものを起源とするものではないという理解が得られる。実際、高品質の結晶をエピタキシー成長させる際にある条件の下で勝手に形成され基板とほぼ完璧に格子定数が一致する、いわゆる自己組織化量子ドットでは蛍光が点滅しないことはすでによく知られている。

[0015] したがって、各量子ドットの相互の距離を一定以上の距離に隔離すること、3次元に分散配置しないこと、量子ドットがイオン化しないように量子ドッ

トの周囲を被覆すること、などが量子ドットの点滅を防ぐために有効であることが理論および実験の結果より示唆されている。

[0016] 他方、外界と孤立化できるナノ空間を人工的に構築することは、ケージド化合物の光刺激による選択的放出、あるいはシャペロンタンパク質内への変性タンパク質の取り込みによるタンパク質の再生など、さまざまな有用性が予測されるにも関わらず、人工ナノ構造物による効果的な孤立空間の可逆構築技術の開発は行われていない。

[0017] 本発明者らは、このような状況に鑑み、作製を望む厚さの金属、遷移金属または半導体ならびに、これらを層状に組み合わせたもののみで構成された中空構造を持つ微小体、それを作製する方法を既に開発している（特開 2011-101941（特許文献 3））。これによれば、量子ドットを、粒径が有機物鋳型と同程度に揃った、目的の元素のみで構成された粒径の揃った微小体を得ることができる。

[0018] また、近年、特に、がん研究の現場では、血中がん細胞の抽出が早期診断のための手法として着目されているが、実際の回収方法としては、血中の通常の白血球細胞の細胞サイズに対して、血中を循環するガン細胞のサイズが大きい場合が見られるため、細胞のサイズに着目した細胞回収方法の有用性や、ガン細胞特有の表面抗原に結合する抗体を用いた細胞回収方法が検討されている。特定の細胞を精製する手段として、ミリポア社等が販売しているある一定のポアサイズの微小孔が空いたメンブレンフィルターを用いて、その孔を通過できるサイズであるかどうかでサイズ分画する手法があるが、目詰まりの問題や細胞に加えられる圧力による損傷の問題、また、ポアサイズ以上の一定のサイズ以上の細胞を捕獲することはできるがポアサイズ以下の細胞を回収することができない等の問題がある。他方、抗体を表面に付けた微粒子を用いて、この微粒子を回収することで抗体に結合する標的細胞を回収する技術がある。特に、ダイナル社が実用化した磁気ビーズ法では、ポリスチレン製の数ミクロンの微粒子の中に、磁区構造を構築できない程度のサイズに粉碎した鉄などの強磁性体微小粒子を超常磁性体として混入させる事

で、磁気ビーズを作製する手法を開発している。そして磁石などの外磁場があるときだけ強磁性が磁気ビーズに発生し、外磁場が消失したときには、各微小強磁性体は磁区構造を構築できないサイズであるために強磁性を維持できず常磁性体として振る舞うため、集合していた磁気ビーズは分散する。この手法は、抗体と組み合わせる事で抗体と結合する細胞を回収することはできるが、細胞や分子のサイズにあわせてターゲットを回収するという特性は有さない。

先行技術文献

特許文献

- [0019] 特許文献1：特開平 1 1－0 0 1 7 0 3
特許文献2：特開 2 0 0 6－1 5 3 8 2 6
特許文献3：特開 2 0 1 1－1 0 1 9 4 1

非特許文献

- [0020] 非特許文献1：A. P. Alivisatos, Science 271, 933 (1996).
非特許文献2：M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, Nature 383, 802 (1996) .
非特許文献3：M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, J. Chem. Phys. 115, 1028 (2001).
非特許文献4：V. Fomenko, D. J. Nesbitt, Nano Lett. 8, 287 (2008).
非特許文献5：B. Mahler, P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J.-P. Hermier, B. Dubertret, Nat. Mater. 7, 659 (2008)
非特許文献6：Y. Chen, J. Vela, H. Htoon, J. L. Casson, D. J. Werder, D. A. Bussian, V. I. Klimov, J. A. Hollingsworth, J. Am. Chem. Soc. 130, 5026 (2008).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0021] したがって、フィルター分画に替わる特定のサイズの細胞等のターゲット

微粒子を、選択的におよび／または効果的に回収する方法が望まれる。

課題を解決するための手段

[0022] 本発明は、上記状況を鑑み、作製を望む厚さの金属、遷移金属または半導体ならびに、これらを層状に組み合わせたもののみで構成された中空構造を持つ微小体であって、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性もしくはフェリ磁性を示す物質からなる微粒子を含む微小体、および上記中空構造体の最内面の層の内側に細胞結合性の物質が付加された微小体、ならびにそれを作製する方法、およびそれを利用する細胞回収方法を提供する。

[0023] 1つの実施形態では、上記微粒子は中空構造を持つ微小体内部に層状に配置された複数の物質の特定の2つの物質層の間の界面に2次元に分散されて内包配置されている。さらに、これらの微粒子の中に蛍光を発生する物質が含まれている。

[0024] 本発明のさらに別の実施形態によれば、上記層状に構成された金属層のひとつを、磁区構造を維持できない程度に薄い構造とした常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物体とすること、ならびにそれを作製する方法および上記中空構造体の最内面の層の内側に細胞結合性の物質が付加された微小体、ならびにこれを用いた細胞等の微粒子精製方法が提供される。

[0025] ここで、このような常温にて強磁性を示す単体としては、例えば、鉄、コバルト、ニッケル、ガドリニウム等を、常温にてフェリ磁性を示す単体としては、酸化物の磁性体でフェライトと呼ばれる $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 等を用いることができ、また鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素を代入）、例えば、イットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ などの絶縁性のフェリ磁性体を用いることもできる。

[0026] 本発明のさらなる実施形態によれば、上記層状に構成された複数の金属層のうち、最内側から任意の番目の層を、磁区構造を維持できない程度に薄い構造とした常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物体とし、その1層外側の層を常温にて絶縁性を示す物体（絶縁体）、さらにその1層外側の層をまた磁

区構造を維持できない程度に薄い構造とした常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物体とし、この磁性体と絶縁体の積層構造が2回以上N回繰り返された、単層の磁性体層を有する微小体に比べて積層数Nに合わせてN倍大きな磁気モーメントを有する微小体を作製する方法および上記中空構造体の最内面の層の内側に細胞結合性の物質が付加された微小体、ならびにこれを用いた細胞等の微粒子精製方法が提供される。

ここでNは有限の繰り返し回数を意味しており、2以上の整数である。

また、ここで絶縁体とは、当該分野で通常用いられる物質（室温における電気伝導率 σ が、約 10^{-6} S/cm 以下である物質）を意味しており、典型的には酸化ケイ素や二酸化ケイ素などを示す。

[0027] また、さらなる実施形態では、微小体の表面が環境の液体の性質の変化によって溶解することができ、微小体内側表面に結合した高分子が環境の液体の性質の変化、電場および／または磁場の印加、光照射等によって伸縮することができ、および／または2つ以上の中空微小体の内面と高分子の両端が結合しており環境の液体の性質の変化によって2つの中空微小体が接合することができる。

[0028] より具体的には、本発明は、以下の中空微小体およびその製造方法、ならびにその利用方法を提供する。

(1) 外殻を形成し、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造、ならびに該層状構造によって規定された内部空間および開口部を備える、中空状の微小体 (A hollow microscopic object comprising: a layer structure which forms an outer shell and comprises a layer of at least one thin film of a transition metal, a metal or a semiconductor; and an inner space and an opening which are defined by the layer structure.) であって、

上記層状構造が、

2以上の薄膜の層と、

上記2以上の薄膜の層間の界面に二次元的に分散埋没されて配置された微

粒子と、

を含み、

上記微粒子が、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質または量子ドットで構成され、上記薄膜層の物質とは異なるものである、微小体。

(2) 外殻を形成し、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造、ならびに該層状構造によって規定された内部空間および開口部を備える、中空状の微小体であって、

上記層状構造が、

2以上の薄膜の層を含み、

少なくともそれらの層の中の一層が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されている、微小体。

(3) 外殻を形成し、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造、ならびに該層状構造によって規定された内部空間および開口部を備える、中空状の微小体であって、

上記層状構造が、

3以上の薄膜の層を含み、

少なくともそれらの層の中の2層以上が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されており、それを隔てる層が隔てられた磁性体層の間で強磁性を発生させることができない程度の距離を隔てる厚さを有する絶縁体から構成されている、微小体。

(4) 上記遷移金属、金属または半導体が、周期律表で原子番号43番を除く79番までの遷移金属、原子番号13, 31, 32, 33, 49, 50, 51, 81, 82, もしくは83番の金属、または原子番号14, 34, もしくは52番の半導体のいずれかである、上記(1)、(2)または(3)記載の微小体。

(5) 上記常温で強磁性を示す物質が、鉄、コバルト、ニッケル、およびガドリニウムからなる群から選択され、

上記常温でフェリ磁性を示す物質が、 $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素）、およびイットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ からなる群から選択される、上記（1）～（4）のいずれか一項記載の微小体。

(6) (i) 上記層状構造の最外層の物質が金であり、その膜厚が2nm以上である、または(ii) 上記層状構造の最内層の物質が金であり、その膜厚が2nm以上である、上記（1）～（5）のいずれか一項記載の微小体。

(7) (i) 常温にて強磁性またはフェリ磁性を持たない絶縁体を隔てる層の厚さが10nm以上である、または

(ii) 常温にて強磁性またはフェリ磁性を持たない絶縁体を隔てる層として絶縁体物質または金属酸化物を用いたことを特徴とした、上記（3）記載の微小体。

(8) 上記微粒子の層の厚さとして5nm以下の膜厚としたことを特徴とする上記（2）または（3）記載の微小体。

(9) 前記量子ドットが、CdS、CdSe、CdTe、CdHgTe、およびHgTeからなる群から選択される、上記（1）記載の微小体。

(10) 上記層状構造が、2以上の上記薄膜の層を含み、

最外層の薄膜層の物質が、所定の液体によって溶解する性質を有し、

内側の薄膜層の物質が、上記液体によって溶解しない性質を有する、上記

(1)、(2)または(3)記載の微小体。

(11) 上記最外層の薄膜層の物質が金属であり、上記内側の薄膜層の物質が誘電体物質または半導体物質である、上記（10）記載の微小体。

(12) 上記層状構造の上記内部空間に面した表面に、その一端が固定された高分子をさらに含む、上記（1）、(2)または(3)記載の微小体。

(13) 上記層状構造の最内層の物質と最外層の物質とが異っており、上記最内層の物質が、上記高分子の一端が付加されることに適した物質であり

、上記最外層の物質が、上記高分子の一端が付加されにくい物質である、上記（１２）記載の微小体。

（１４）上記最内層の物質が金、銀、シリコン、酸化シリコンのいずれかであり、上記最外層の物質が鉄、銅、ゲルマニウム、アルミニウム、クロム、スズ、チタン、マンガン、ニッケル、コバルト、ガドリニウムのいずれかである、上記（１２）または（１３）記載の微小体。

（１５）上記高分子が、溶液のイオン強度および／もしくはｐＨの変化、電場の印加、磁場の印加、または光照射によって構造が変化する高分子である、上記（１２）～（１４）のいずれか一項記載の微小体。

（１６）上記高分子が、DNA鎖またはセルロースポリマー、またはこれらを電場の印加、磁場の印加、もしくは光照射により構造変化する分子で連結したものである、上記（１２）～（１５）のいずれか一項記載の微小体。

（１７）上記高分子が、核酸分子もしくは分子鎖、核酸誘導体分子もしくは分子鎖、抗体等のタンパク質分子鎖、または細胞表面等への結合性を有する高分子鎖等である、上記（１２）～（１５）のいずれか一項記載の微小体。

（１８）上記高分子の他端が、別の微小体または基板表面に固定されている、上記（１２）～（１５）のいずれか一項記載の微小体。

（１９）有機物で構成された微小構造物を鋳型として、遷移金属、金属または半導体の少なくとも１つ以上の層を上記鋳型に薄膜層状に堆積させて層状構造を形成する工程を含む、中空微小体の作製方法であって、

（ｉ）上記遷移金属、金属または半導体を少なくとも１層堆積させる工程の後に、該堆積させた層の表面に微粒子を分散して結合させる工程と、その工程の後に、再び遷移金属、金属または半導体を少なくとも１層堆積させる工程とをさらに含み、それによって、上記微粒子が、上記第１層の堆積物質と、上記第２層の堆積物質との間に作られる界面にサンドイッチ状に２次元に分散埋没され、

上記微粒子が、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質または量子ドットで構成され、上記薄膜

層の物質とは異なるものである、

または

(i i) 上記層状構造が、2以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の一層が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されている、

または

(i i i) 上記層状構造が、3以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の2層以上が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されており、それを隔てる層が絶縁体で構成されている、方法。

(2 0) 所定の直径を有する有機物鋳型、適量の純水、および有機物鋳型間の静電反発力を抑制するための材料を含む有機物鋳型懸濁液を基板の一面に滴下して、上記基板上に上記有機物鋳型を所定の密度に分布させる工程、

上記基板上に吸着していない過剰量の上記有機物鋳型を洗浄除去する工程、

上記基板上に分布された上記有機物鋳型を乾燥させる工程、

上記有機物鋳型の切削処理を行い、上記基板上に配置された上記有機物鋳型の間隙を所定の間隔に調整する工程、

上記基板上に分布された上記有機物鋳型に、遷移金属、金属または半導体の薄膜の層を少なくとも1層堆積させる工程、

遷移金属、金属または半導体の層を少なくとも1層堆積させた上記有機物鋳型を分解除去し、残存した中空微小体を得る工程、

を含む、遷移金属、金属または半導体で構成された中空微小体の製作方法であって、

(i) 上記遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程の後に、該堆積させた層の表面に微粒子を分散して結合させる工程と、その工程の後に、再び遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程とをさらに含み、それによって、上記微粒子が、上記第1層の堆積物質

と、上記第2層の堆積物質との間に作られる界面にサンドイッチ状に2次元に分散埋没され、

上記微粒子が、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質で構成され、上記薄膜層の物質とは異なるものである、

または

(i i) 上記薄膜の層が、2以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の一層が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されている、

または

(i i i) 上記層状構造が、3以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の2層以上が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されており、それを隔てる層が絶縁体で構成されている、方法。

(2 1) 上記有機物鑄型の切削処理法が、プラズマエッチング処理、イオンミリング処理、収束イオンビーム処理、レジスト処理のいずれかである、上記(2 0)記載の方法。

(2 2) 上記基板上に分布された上記有機物鑄型に遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程が、抵抗加熱式真空蒸着法、スパッタリング法、化学気相成長法のいずれかによって行われる、上記(2 0)記載の方法。

(2 3) 遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層蒸着させた上記有機物鑄型を分解除去する工程が、紫外線-オゾン法、プラズマ分解法、光触媒分解法、加熱焼却法のいずれかによって行われる、上記(2 0)記載の方法。

(2 4) 上記中空微小体を得る工程がさらに、

上記中空微小体上に、微量の液体を滴下し、

上記基板の他面に超音波を作用させながら、上記中空微小体が固定された上記一面側に平坦な底面を有する素材を該底面に若干加重が加わる様に載

置して、該素材を任意の方向に移動させることにより上記微小体を上記基板から剥離させることを含む、

上記（２０）記載の方法。

（２５）上記中空微小体上に滴下する液体が、純水、あるいは純水に牛血清、抗体、牛血清アルブミン（bovine serum albumin (BSA)）を含むタンパク質、合成DNA、クエン酸塩、リン酸塩、および硫酸ドデシルナトリウム（sodium dodecyl sulfate (SDS)）もしくはタンニン酸（tannic acid）を含む界面活性剤を加えたものである、上記（２４）記載の方法。

（２６）上記基板が、シリコン基板、ガラス基板、アルミ基板、またはプラスチック基板である、上記（１９）～（２５）のいずれか一項記載の方法。

（２７）内表面に特異的に特定のターゲット生体物質と結合する物質が修飾された超常磁性の特性を有する中空微小体を用いて、

上記中空微小体とターゲット生体物質を含む溶液とを混合する工程、および

上記中空微小体の内表面に修飾したターゲット生体物質と結合する物質と結合したターゲット生体物質を外磁場によって誘引して磁力によって回収する工程を含む、生体物質回収法。

（２８）上記生体物質が細胞である、上記（２７）記載の方法。

（２９）上記回収する工程の後に、

ターゲット生体物質との結合物質を分解して該ターゲット生体物質を回収する工程を含む上記（２７）または（２８）記載の方法。

（３０）上記ターゲット生体物質との結合物質としてDNAアプタマーを用い、かつ、分解する工程にDNA分解酵素を用いる、上記（２９）記載の方法。

（３１）上記回収する工程の後に、

中空微小体を分解する工程を含む、上記（２７）記載の方法。

（３２）上記中空微小体が、上記（１２）～（１８）のいずれか一項記載の中空微小体である、上記（２７）～（３１）のいずれか一項記載の方法。

(33) 上記中空微小体のサイズを調整することによって、ターゲット生体物質のサイズ分画を可能とした、上記(27)～(32)のいずれか一項記載の方法。

発明の効果

[0029] 本発明では、金属、遷移金属または半導体を、その厚さを制御して1層以上堆積させた各元素成分のみで構成された粒径の揃った微小体を作製するため、活性酸素発生装置などの利用により、有機物鋳型を分解除去する。これにより、堆積させた元素成分のみで構成された微小体を得る。得られた微小体に超音波などの微弱な振動を作用させることにより、任意の溶媒に分散させることができる。

[0030] また、本発明は、作製を望む厚さの金属、遷移金属または半導体ならびに、これらを層状に組み合わせたものの層の間に、量子ドット微粒子を配置して構成された微小体、および、この微小体を作製する手法を提供する。これにより、蛍光の点滅を減少させることができる。

[0031] 本発明では、粒径が揃ったポリスチレンなどの有機物で構成された微小な構造体を鋳型とし、その表面に金属、遷移金属または半導体を1層以上、厚さを制御して堆積させた後、量子ドット微粒子を、これら1層以上堆積させた各元素成分の上に配置し、さらに、その表面に金属、遷移金属または半導体を1層以上堆積させた後、活性酸素発生装置などの利用により、有機物鋳型を分解除去する。これにより、堆積させた元素成分のみで構成された微小体を得ることができる。

[0032] 本発明によれば、ポリスチレンやガラスなどの不純成分を含まない、目的の元素のみで構成された微小体を得ることができる。また、有機物鋳型の粒径を揃えることで、従来の自己重合法や破碎法では困難であった元素について、粒径が有機物鋳型と同程度に揃った目的の元素のみで構成された微小体を得ることができる。また、有機物鋳型の形状や大きさを様々なものとすることにより、様々な形状、大きさの目的の元素のみで構成された微小体を得ることができる。また、微小体内の異なる物質の層の間に微粒子を分散して2

次元に（すなわち、層間界面に平行な方向に広がって）配置して内包することが可能となる。

[0033] また、本発明によれば、量子ドットを、粒径が有機物鋳型と同程度に揃った、目的の元素のみで構成された粒径の揃った微小体を得ることができる。

[0034] また、本発明の中空微小体を用いることによって、中空微小体の内表面に結合する細胞等の生体物質を、外磁場を用いて簡便に回収することができる。特に、中空微小体のサイズより小さな、すなわち、中空微小体の中空部分に収容可能な、特定の細胞等の生体物質を選択的に回収することが可能であることから、細胞等のターゲット生体物質のサイズ分画が可能となる。さらには磁性体層が複層構造の微小体を作製することで、細胞等のターゲット生体物質の回収速度を磁性体層の層数に応じて任意に制御しより高速に、かつ、選択的に回収することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0035] [図1]本発明において作製する中空状微小体の概念図である。

[図2]微小体を作製する手順の概念図である。

[図3]基板上に配置した有機物鋳型の概念図である。

[図4] (a) はプラズマエッチング処理を行う前、(b) は処理後の有機物鋳型の走査型電子顕微鏡写真である。

[図5]真空蒸着法により元素を堆積させた有機物鋳型の概念図である。

[図6] (a) 直径100nmのポリスチレン球微小体表面に金、ゲルマニウム、銅、ニッケルを1層目として10nm蒸着した後、その上に2層目として金を蒸着しなかった場合、および (b) 金を2nm蒸着した場合、の微小体に対して、5' 末端にチオール基を持つDNAを3 μ Mの濃度で反応させた後、上清に残った未反応のDNAに対して光吸収スペクトル測定を行った結果のグラフである。図中の"Before"の線は、微小体と反応を行う前の、3 μ Mの濃度に相当するDNAに対して光吸収スペクトル測定を行った結果である。

[図7]直径100nmのポリスチレン球微小体表面に金、ゲルマニウム、銅、ニッケルを1層目として10nm蒸着した後、その上に2層目として金を0, 2, 5, 10nm

の各膜厚で蒸着した場合において、微小体表面に固定化された、チオール基を含有するDNAの固定化密度を計算した結果をまとめた表である。

[図8] (a) は元素を堆積させた有機物鑄型に紫外線-オゾン処理を行う手順の概念図である。(b) 紫外線-オゾン処理により有機物鑄型を分解除去した後の概念図である。

[図9] (a) は作製した鉄製微小体の走査型電子顕微鏡2次電子像、(b) は同反射電子像である。

[図10] (a) は量子ドットを挟み込んだ微小体と(a') 元素を1層除去した際の概念図、(b) および(b') は(a) および(a') それぞれの場合に微小体から発せられる蛍光波長特性を示す概念図である。

[図11] (a) は中空状微小体内部に生体分子を固定化し、電氣的誘引により標的生体分子を捕捉する場合の概念図である。(a') は電氣的誘引を行った結果、標的生体分子が捕捉された様子の概念図である。(b) は鎖状生体分子を直線状に伸ばして標的生体分子を中空状微小体内に捕捉する場合の概念図である。(b') は鎖状生体分子により標的生体分子が捕捉された様子の概念図である。(c) は鎖状生体分子により連結された二つの中空状微小体内部に標的生体分子を捕捉する場合の概念図である。(c') は二つの中空状微小体内部に標的生体分子が捕捉された様子の概念図である。

[図12] 磁区構造を維持できない膜厚での強磁性体層を持つ中空微小体の、外磁場印加前、印加中、印加後の粒子の状態を示す図である。

[図13] 常温で超常磁性特性を持つ磁性中空微小体を用いた細胞回収法の一例を模式的に示した概念図である。

[図14] (a) は磁区構造を維持できない膜厚での強磁性体層を2層有し、それらの層が絶縁体層で隔てられた合計3層構造の複層薄膜構造を持つ中空微小体の概念図である。(b) は微小体が有する磁区構造を維持できない膜厚での強磁性体層の層数と印加された磁場に対する応答性の関係を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0036] 1. 本発明の中空微小体

本発明は、1つの実施形態において、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造を備え、該層状構造によって規定された内部空間および開口部を有する、中空状の微小体を提供する。

[0037] 本発明の中空状の微小体は、層状構造によって規定された内部空間および開口部を有するキャップ様の構造を有する。キャップ部分の形状は、該微小体の製造過程で用いる鋳型の形に応じて変化し得、半球形、円柱形、円錐形、角柱形などでありうるが、これらに限定されない。

[0038] 本発明の中空状微小体のサイズ（または粒径）もまた、用途に応じて、製造過程で用いる鋳型のサイズに応じて変化させることができ、約0.1nm～約1mmの範囲内にあり、好ましくは、約1nm～約500 μ m、より好ましくは、約5nm～100 μ m、最も好ましくは、約5nm～1 μ mである。

[0039] 本明細書中、単に「金属」という場合、典型元素の金属を指すものとする。「典型元素」とは、周期表の1族、2族と12族から18族の元素で、全ての非金属および一部の金属から構成される元素の区分である。本発明において使用される「金属」としては、例えば、Al、Ga、Ge、As、In、Sn、Sb、Tl、Pb、Biなどの金属が好ましい。

[0040] 本明細書中、「遷移金属」とは、遷移元素を意味し、周期表の3族から11族の元素をいうものとする。本発明に使用する「遷移金属」としては、原子番号43番を除く21番から79番までの遷移金属が好ましい。

[0041] 本明細書中、「半導体」という用語は、当該分野で通常用いられる意味（「室温における電気伝導率 σ が、金属と絶縁体の中間の $10^3 \sim 10^{-10} \text{ S/cm}$ 程度である物質」（岩波 理化学辞典 第5版、1998 岩波書店））で用いられる。本発明において使用する「半導体」としては、例えば、Si、Se、Teなどが好ましい。

[0042] 図1は本発明の中空状の微小体の例を示す。この例では、3種類の元素1、2、3の層からなる半球状の中空微小体が表示されているが、層の数、微小体の形状などはこれに限定されない。

[0043] 図1に示すように、本発明の中空微小体の外殻は、各元素1、2、3が薄膜状に積層された層状構造を有しており、それぞれの層の厚さは、典型的には、約1nm～約1 μ mの範囲であり、より好ましくは、約1nmから約500nmであり、最も好ましくは、約1nm～約100nmの範囲であるが、これらの範囲に限定されず、下限は、約0.1nmから、上限は約10 μ mまでの任意の範囲で目的に応じて適宜設定可能である。

[0044] 図2は中空微小体の作製方法を模式的に示したものである。真空蒸着法やスパッタリング法などにより、微小体の鋳型となる、例えば、5nmから100ミクロンの有機物構造体4の上に、蒸着源5₁、5₂から発せられた元素1、2、3を1nmから500nmの範囲で順次堆積させた後、有機物鋳型4を、例えば、紫外線-オゾン法、プラズマ分解法、光触媒分解法、加熱焼却法等の方法により分解除去することにより中空状の微小体を得る。さらに具体的な作製手順については本明細書の後の部分で示す。

[0045] 本発明の中空微小体の1つの実施形態では、常温で強磁性あるいはフェロ磁性を持つ元素あるいは化合物の磁区構造を維持できない膜厚の薄い層が導入され、超常磁性の特性を持った中空状微小体とされた中空微小体が提供される。ここで、このような元素または化合物としては、常温にて強磁性を示す鉄、コバルト、ニッケル、ガドリニウム等の単体元素の強磁性体、あるいはフェライトと呼ばれる $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 等の酸化物磁性体、鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素を代入）、イットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ 等の絶縁性フェリ磁性体などのフェリ磁性体などを用いることができる。磁区構造を維持できない膜厚としては、物質の種類にもよるが、概して、10nm以下、9nm以下、8nm以下、7nm以下、6nm以下、好適には約5nm以下、4nm以下、3nm以下、2nm以下、または1nm以下とすることで磁区構造を維持できない超常磁性を実現できる。

[0046] 本発明の中空微小体の別の実施形態では、常温で強磁性あるいはフェロ磁性を持つ元素あるいは化合物の磁区構造を維持できない膜厚の薄い層が2層以

上導入され、その層が絶縁体層を間に挟むことにより隔離された、超常磁性の特性を持った中空微小体が提供される。ここで、絶縁体層を構成する元素または化合物としては、 SiO 、 SiO_2 、酸化マンガン、酸化ニッケル、アルミナなどの酸化物や、テフロン（登録商標）等の高分子やプラスチック等の有機高分子、碍子などを用いることができる。磁性体層を隔てる膜厚としては、物質の種類にもよるが、概して、約5 nm以上、好適には約10 nm以上とすることで各磁性体層が絶縁体層で隔てられた複層構造の超常磁性を実現できる。

[0047] 本発明の中空微小体のさらなる実施形態においては、層状構造が2以上の薄膜の層を含み、2以上の薄膜の層間の界面に二次元的に分散埋没されて配置された微粒子を含む中空状の微小体が提供される。これらの微粒子は、薄膜の層を形成する物質とは異なるものである。

[0048] 一つの実施形態では、これらの粒子として、蛍光を発光する物質が用いられる。そのような微粒子には、例えば、カドミウム-セレン (CdSe) などの元素により構築された直径数 nm の微粒子（量子ドット）が含まれる。その他の量子ドットの例としては、 CdS 、 CdTe 、 CdHgTe 、 HgTe 、等が挙げられる。この実施形態では、量子ドットの周辺環境を層界面への分散埋没により一定なものに保つことができるので、安定な蛍光特性を発する量子ドットを提供することができる。このようにして、量子ドットイオン化の問題を解決することが可能である。

[0049] また、別の実施形態では、上記微粒子として、常温にて強磁性を示す鉄、コバルト、ニッケル、ガドリニウム等の単体元素の強磁性体、あるいはフェライトと呼ばれる $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 等の酸化物磁性体、鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素を代入）、イットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ 等の絶縁性フェリ磁性体などのフェリ磁性体について、磁区構造を維持できない程度の微小サイズにしたものを用いる事もできる。粒子サイズとして約10 nm以下、9 nm以下、8 nm以下、7 nm以下、6 nm以下、好適には約5 nm以下、4 nm以下

、3 nm以下、2 nm以下、または1 nm以下とすることで磁区構造を構築できない超常磁性を実現できる。

[0050] 好適な実施形態では、上記微粒子として、上記蛍光を発生する物質および上記常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質を同時にまたは混合して用いることができる。

[0051] 本発明の中空微小体のさらなる実施形態においては、上記層状構造の内部空間に面した表面に、その一端が固定された高分子をさらに含む中空微小体を提供される。「高分子」には、生体分子、例えば、核酸分子（例：DNA、RNA）、タンパク質、高分子ポリマー（例：セルロースポリマー、ポリエチレングリコール）等が含まれる。この実施形態の特定の用途には、例えば、溶液のイオン強度、pHの変化によって構造が変化する高分子が好ましく用いられる。

[0052] この実施形態の中空微小体において、殻の最外層を形成する物質には、例えば、鉄、銅、ゲルマニウム、アルミニウム、クロム、スズ、チタン、マンガ、ニッケル等の高分子の一端が結合しにくい物質が含まれる。また、最内層を形成する物質には、例えば、金、銀、シリコン、酸化シリコン等の高分子の一端が結合しやすい物質が含まれる。いずれの物質を用いるかは、用途に応じて、当業者が容易に決定しうる。

[0053] 本発明の中空微小体のさらなる実施形態においては、外殻を形成する層状構造が2以上の薄膜の層を含み、外殻の最外層の薄膜層の物質が、所定の液体によって溶解する性質を有し、内側の薄膜層の物質が、上記液体によって溶解しない性質を有する中空微小体を提供される。

[0054] この実施形態では、例えば、最外層とその直ぐ内側の層（Aとする）を所定の溶液によって溶解する性質を有する物質2（例えば、アルミニウム、銅）からなる層とし、そのさらに内側の層（B）とさらにその内側の層（C）（最内層であり得る）とを上記溶液によって溶解しない性質の物質であって、かつ、好ましくは化学修飾し易い物質1（例えば、金）からなる層とし、最外層と層Aとの間にナノサイズの量子ドット8を二次元的に分散埋没させ

、さらに層Bと層Cとの間にも量子ドット8とは異なる光学特性を有する量子ドット7を二次元的に分散埋没させる。このような形態にすることにより、量子ドット8と7との間で蛍光共鳴現象が起こり、特徴的な波長の蛍光が安定に発せられる（図10（a）及び（b）を参照）。このようにして、量子ドットの点滅やイオン化の問題を解決することができる。量子ドット7と8との距離は、層Aと層Bの厚さを適宜調節することにより、蛍光共鳴現象が起こるように適切に調節可能である。

[0055] また、この実施形態の本発明の中空微小体では、物質2を溶解することができる溶液（例えば、塩酸）に上記中空微小体を曝すことにより最外層とその直ぐ内側の層Aとを溶出し、これらの層と共に量子ドット8を取り除くことができる。それによりこの実施形態に係る本発明の微小体から発せられる蛍光は量子ドット7が本来発する波長となる。このようにして、溶媒条件により異なる光を発するセンサーを提供することができる（図10（a'）及び（b'）を参照）。

[0056] この実施形態における最外層の薄膜層を形成する物質には、溶媒条件により溶出可能な物質が好ましく、例えば、マグネシウム、アルミニウムなどの金属、亜鉛、銅などの遷移金属、ゲルマニウムなどの半導体が含まれるが、これらに限定されない。また、最内層の薄膜層を形成する物質には、化学修飾し易い物質が好ましく、例えば、金、銀などの遷移金属、誘電体、一酸化ケイ素、二酸化ケイ素などの半導体酸化物が含まれるが、これらに限定されない。さらに、上記「所定の液体」としては、最外層に用いる物質によって異なるが、例えば、アルミニウムの場合には塩酸や水酸化ナトリウム、銅の場合には硝酸、または亜鉛の場合には塩酸や硫酸等が用いられうる。

[0057] 2. 本発明の中空微小体の作製方法

本発明は、一つの実施形態において、有機物で構成された微小構造物を鋳型として、遷移金属、金属または半導体の少なくとも1つ以上の層を上記鋳型に薄膜層状に堆積させる工程を含む、中空微小体の作製方法を提供する。

[0058] より具体的には、本発明の一実施形態では、

所定の直径を有する有機物鋳型、適量の純水、および有機物鋳型間の静電反発力を抑制するための材料を含む有機物鋳型懸濁液を基板の一面に滴下して、上記基板上に上記有機物鋳型を所定の密度に分布させる工程、

上記基板上に吸着していない過剰量の上記有機物鋳型を洗浄除去する工程、

上記基板上に分布された上記有機物鋳型を乾燥させる工程、

上記有機物鋳型の切削処理を行い、上記基板上に配置された上記有機物鋳型の間隙を所定の間隔に調整する工程、

上記基板上に分布された上記有機物鋳型に、遷移金属、金属または半導体の薄膜の層を少なくとも1層堆積させる工程、

遷移金属、金属または半導体の層を少なくとも1層堆積させた上記有機物鋳型を分解除去し、残存した中空微小体を得る工程、

を含む、遷移金属、金属または半導体で構成された中空微小体の製作方法が提供される。

[0059] 図3は本発明の中空状微小体を作製する際の鋳型となる有機物構造体を基板上に配置した一例を示す模式図である。ここでは平坦な基板6の上に配置した角柱状の有機物鋳型4を例とする。基板の材質はシリコン、ガラス、アルミ、プラスチックなどが一般的であるが、平坦であるならどのような材質でも構わない。

[0060] 有機物鋳型4のサイズは、用途に応じて変化させることができ、約0.1nm～約1mmの範囲内にあり、好ましくは、約1nm～約500 μ m、より好ましくは、約5nm～約100 μ m、最も好ましくは、約5nm～約1 μ mである。代表的には、約5nmから約100ミクロンであり、球や円柱、円錐、賽子のような形状のものをを用いることができる。材質はポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリメチルシロキサン（PDMS）、ポリメタクリル酸メチル樹脂（PMMA）などの中から最終的に作製を望む微小体の形状に合わせて適宜選択する。例えば、球状にするにはポリスチレン、半球、円柱、円錐、賽子状にするにはPDMSやPMMAなどがそれぞれ適している。

[0061] 有機物鋳型 4 の基板 6 上への配置法は、基板上に塗布した有機物薄膜を切削する方法、自己組織化膜形成法を応用する方法、溶媒中の有機物鋳型の分散力を制御する方法などがある。一例として、溶媒中の有機物鋳型の分散力を制御する方法では、有機物鋳型が分散している溶媒に適量の塩を添加して、有機物鋳型間の静電反発力を抑制した状態で基板上に塗布することにより、基板上に有機物鋳型を高密度に配置することができる。添加する塩の量は有機物鋳型の大きさや材質により異なるが、例えば100nm径のポリスチレン球を鋳型とする場合では、有機物鋳型溶液と500mMの塩溶液を1:2の比率で混合するとよい。

[0062] 基板 6 上に配置した有機物鋳型 4 は、プラズマエッチング処理、イオンミリング処理、収束イオンビーム処理、レジスト処理などの物理的切削や、酸性溶媒、アルカリ性溶媒、有機溶媒による化学的切削を行うことにより、大きさと有機物鋳型間の距離を適宜制御することができる。例えば図 4 に示すように、基板上に互いに接するよう配置した100nm径のポリスチレン球（図 4（a）を参照）を15秒間プラズマエッチング処理することにより、直径約80nm、間隔約30nm（図 4（b）を参照）とすることができる。

[0063] 基板 6 上に有機物鋳型 4 を適切な大きさ、間隔にて配置した後、作製を望む微小体の元素を鋳型上に堆積させる。堆積させる方法は、（抵抗加熱式）真空蒸着法、スパッタリング法、化学気相成長法などの中から適切な方法を選択するとよい。以下、真空蒸着法により微小体を作製する方法を例として説明する。

[0064] 本発明において蒸着源（微小体を構成する元素）として利用できる元素の例を列挙すると周期律表において以下のようなものである。

- （1）原子番号 43 番を除く 79 番までの遷移金属、
 - （2）原子番号 13, 31, 32, 33, 49, 50, 51, 81, 82, 83 番の金属、および
 - （3）原子番号 14, 34, 52 番の半導体
- である。

[0065] 基板 6 と、その上に配置した有機物鋳型 4 共に、真空蒸着装置内に配置して 1 層以上の元素の蒸着を行う。蒸着は、例えば、次のように行うことができる。

[0066] まず、抵抗加熱式蒸着装置のチャンバー内に、基板 6 上に予め配置した有機物鋳型 4 が、装置内の蒸着源に向くようにセットする。チャンバーの真空度は、たとえば、 5×10^{-4} パスカル、チャンバー内の温度は室温である。有機物鋳型 4 と蒸着源との間にはシャッターが設けられている。蒸着源は蒸着源容器と加熱用抵抗器とから構成される。シャッターは前後または左右に移動させることができ、シャッターが基板 6 の全面を覆うときは有機物鋳型への蒸着が阻止され、シャッターの移動により基板 6 が蒸着源に曝されるときは有機物鋳型 4 への蒸着が行われる。蒸着源容器には有機物鋳型の表面に蒸着される金属、遷移金属あるいは半導体が入れられる。加熱用抵抗器は蒸着源容器に入れられた元素を加熱し、蒸発させるために使用される。

[0067] 図 5 に、有機物鋳型 4 の上に元素 1、2 を 2 層堆積させた場合の模式図を示す。元素を 2 層以上堆積させる場合は、内部の層となる元素から順次蒸着を行うとよい。例えば図 5 の例では、元素 1 の蒸着を行った後に元素 2 の蒸着を行う。蒸着を行う元素の膜厚は、例えば、1nm から 500nm の範囲で適切に選択するとよい。

[0068] 図 5 において元素 2 に相当する、微小体表面に堆積させる元素のうち最も外側となる層を金や銀などの分子修飾が容易な素材とすることにより、微小体の表面に有機分子を固定化することができる。例えば、金の表面にはチオール基が強く結合することがよく知られているが、この結合反応を利用して末端にチオール基が導入された DNA や RNA、チオール基を含有する抗体などのタンパク質、チオール基を含有する単分子膜形成試薬など、各種有機分子を固定化することができる。この最も外側を構成する元素の層の厚さは、安定した固定化層とするためには、少なくとも約 1nm とすることが好ましく、少なくとも約 1.5nm とすることがより好ましく、少なくとも約 2nm とすることが最も好ましい。

[0069] 図6は、直径100nmのポリスチレン球微小体表面に金、ゲルマニウム、銅、ニッケルを1層目として10nm蒸着した後、その上に2層目として金を蒸着しなかった場合（図6(a)）、および金を2nm蒸着した場合（図6(b)）の微小体に対して、5'末端にチオール基を持つDNAを3 μ Mの濃度で反応させた後、上清に残った未反応のDNAに対して光吸収スペクトル測定を行った結果である。横軸は光の波長、縦軸は光吸収度である。図中には微小体と反応を行う前の、3 μ Mの濃度に相当するDNAに対して光吸収スペクトル測定を行った結果を同時に示してある。DNAは260nmに吸収ピークを持つため、微小体へのDNA固定反応前後の260nm光吸収度の差分を計算することにより、微小体表面へ固定化されたDNA分子数を定量化することができる。外側の層として金が存在しない図（6(a)）では、ゲルマニウム、銅、ニッケルを1層目とした場合、チオール基が各元素の表面に密に結合しないため、反応前後で260nmの光吸収度に顕著な変化が見られないが、外側に2nmの金の層を2層目として形成した図（6(b)）では、ゲルマニウム、銅、ニッケルを1層目とした場合においても1層目を金とした場合と同程度に、反応前後で260nmの光吸収度に顕著な変化が見られた。すなわち、微小体表面に2nmの金の層を形成することにより、チオール基を含有するDNAを高密度固定化することができることが確認できた。

[0070] さらに、図7は、直径100nmのポリスチレン球微小体表面に金、ゲルマニウム、銅、ニッケルを1層目として10nm蒸着した後、その上に2層目として金を0, 2, 5, 10nmの各膜厚で蒸着した場合において、微小体表面に固定化された、チオール基を含有するDNAの固定化密度を上記の光吸収スペクトル測定の差分計測により計算した結果をまとめた表である。1層目が金の場合を比較対象として1層目がゲルマニウムやニッケルの場合の固定化密度を見ると、2層目の金の膜厚が2nmの場合にDNAの固定化密度が金の場合と同程度となり、かつ膜厚が5nm, 10nmと増加しても固定化密度はほとんど変化しないことから、最外層となる2層目の金の膜厚は2nm以上であれば十分に分子の固定層として利用することができ、それ以上の膜厚に変化させても性能は変化しないことが確認された。

[0071] さらに、目的の中空状の微小体を得るために、紫外線-オゾン法、プラズマ分解法、光触媒分解法、加熱焼却法いずれかの方法にて有機物鋳型の分解除去を行うことができるが、これらの方法に限定されない。ここでは、図8に示すように、紫外線-オゾン法による分解除去を例として説明する。元素1、2を堆積させた有機物鋳型4を基板6と共に紫外線-オゾン分解装置庫内に配置する。庫内に酸素を導入して紫外線を照射することによりオゾンが発生し、有機物鋳型4を含む有機物が分解除去される。処理を行う時間は有機物鋳型の大きさなどに依存して当業者が適宜調整し得るが、100nm径のポリスチレン球鋳型の例では約60分の処理で十分である。

[0072] 有機物鋳型4の分解除去により、蒸着を行った元素のみで構成された中空状の微小体を得る。図8の例では、分解処理後に元素1および2の2層構造の微小体を得ることができる。作製した微小体は、超音波処理などの方法により基板6から剥離させて適切な溶媒に懸濁することができる。例えば、基板6上に純水を滴下し、基板6の微小体が付着している側と反対側に超音波を作用させることにより、微小体を純水中に懸濁することができる。

[0073] したがって、本発明の中空微小体の製造方法の好ましい実施形態では、上記の中空微小体を得る工程においてさらに、

上記中空微小体上に、微量の液体を滴下し、

上記基板の他面に超音波を作用させながら、上記中空微小体が固定された上記一面側に平坦な底面を有する素材を上記底面に若干加重が加わる様に載置して、上記素材を任意の方向に移動させることにより上記微小体を上記基板から剥離させることを行ってもよい。

[0074] 上記中空微小体上に滴下する液体は、純水に限らず、例えば、純水に牛血清、抗体、牛血清アルブミン (bovine serum albumin (BSA)) を含むタンパク質、合成DNA、クエン酸塩、リン酸塩、および硫酸ドデシルナトリウム (sodium dodecyl sulfate (SDS)) もしくはタンニン酸 (tannic acid) を含む界面活性剤を加えたもの等であってもよい。また、硫酸、塩酸、硝酸などの酸、アンモニア、水酸化カリウムなどのアルカリ、エタノール、ジメチルスル

ホキシド（DMSO）などの有機溶媒等であってもよい。

[0075] 以上の手順により、蒸着を行った元素のみで構成された中空状の微小体を得ることができる。得られた微小体の一例を図9に示す。図9は、100nm径ポリスチレン球鋳型の上に鉄を10nm堆積させ、紫外線-オゾン法により有機物鋳型を分解除去し、純水に懸濁した後に別の基板上に微小体を再度配置して走査型電子顕微鏡により観察を行った例である。2次電子計測により微小体の詳細な構造を見ることができ、また、反射電子計測では作製した微小体の反射電子輝度がほぼ均一であることがわかる。

[0076] 本発明の中空微小体の製造方法のさらなる実施形態においては、中空微小体を構成する2層以上の薄膜層の間の特定の層の表面に薄膜層の物質とは異なるナノサイズの微粒子を分散して配置して、前記微粒子を前記2層以上の層の特定の2層の間の界面にサンドイッチ状に2次元に分散（すなわち、層間界面に平行な方向に広がって）埋没させた構造を持つことを特徴とした微小体を製造することができる。

[0077] 具体的には、たとえば、上記の遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程の後に、その表面に微粒子を分散して結合させる工程と、その工程の後に、再び遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程を用いることで、前記微粒子が、前記第1層の堆積物質と、前記第2層の堆積物質との間に作られる界面にサンドイッチ状に2次元に分散埋没させることで製作することができる。

[0078] 例のひとつとして、量子ドットを微小体に挟み込み、光学特性を制御する方法を紹介する。量子ドットはカドミウム-セレンなどの元素により構築された直径数nmの微小な粒子で、サイズに依存した蛍光を発することが特徴である。生物分野では目的生体分子の標識として広く利用されているが、隣り合う量子ドット間の距離や溶媒条件など周辺環境要因により蛍光の点滅や消光が起こることが知られている。また、異なる波長の光を発する2種類の量子ドットを一定距離で近づけると、エネルギー異動による共鳴現象が起こり、特徴的な波長の光を発することが知られている。

[0079] また、別の例として、常温にて強磁性を示す鉄、コバルト、ニッケル、ガドリニウム等の単体元素の強磁性体、あるいはフェライトと呼ばれる $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 等の酸化物磁性体、鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素を代入）、イットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ 等の絶縁性フェリ磁性体などのフェリ磁性体について、磁区構造を維持できない程度の微小サイズにしたものを上記微粒子として互いに接合しないように分散して2層間に配置する事で、超常磁性の特性を持った中空状微小体として用いる事もできる。ここで超常磁性を維持する粒子サイズとして好適には5 nm以下とすることで確実に磁区構造を構築できない超常磁性を実現できる。

[0080] 本発明にて開発した微小体を利用すると、量子ドット間の距離を制御することにより光学特性を制御することができる。図10にその方法を示す。微小体を構成する元素1を金などの化学修飾が容易な素材とし、その上に量子ドット7を固定化する。固定化の方法はDNAの2次元空間構造構築の利用や両末端にアミノ基、チオール基、ビオチンを導入して架橋を行う方法、BSAや抗体などのタンパク質を介する方法、2架性架橋剤を使用する方法などがある。量子ドット7を元素1の表面に固定化した後、同じ種類の元素1'を積層して量子ドット7を元素1中に閉じ込める。これにより隣接する量子ドットの距離を制御することが可能であり、また閉じ込めにより周辺環境を一定に保つことができ、安定な蛍光特性を発することができる。

[0081] 次に異なる種類の元素2を積層し、量子ドット7とは異なる光学特性を示す別の量子ドット8を元素2の表面に固定化する。その後、同様に元素2'を再度積層し、量子ドット8を閉じ込める。元素1'と元素2の合計の厚さを2nmから1ミクロンの間の適切な値とすることにより、量子ドット7と8の間で蛍光共鳴現象が起こり、特徴的な波長の蛍光が安定に発せられる。また、元素2の種類をアルミニウムや銅などの溶媒条件により溶出可能な材質とすることにより、微小体から元素2および2'、それと共に量子ドット8を取り除くことができる。それにより微小体から発せられる蛍光は量子ドット

7が本来発する波長となり、これを利用して溶媒条件により異なる光を発するセンサーとして応用することが可能である。

[0082] 本発明にて開発した微小体は、標的生体分子を捕捉するための微小な罫としても利用することができる。図11にその方法を示す。1層もしくは複層の中空状微小体9を、図11(a)のように開口部が基板6と逆を向くように配置する。微小体9をそのように配置させる方法は、基板6の素材として粘着性テープなどを利用し、図8にて作製した中空状微小体の上にテープをそっと貼った後に剥がすことにより行う。次に、標的生体分子11と反応を行うことを望む生体分子10を微小体9の内側に固定する。中空状微小体9の内部の素材を金や銀などの素材とすることにより、タンパク質が持つアミノ基やチオール基を介して中空状微小体9の内部に固定化することができる。基板6と、標的生体分子11が分散している溶媒中に配置した別の基板6'の間に電場を印加することにより、標的生体分子を中空状微小体内部に捕捉することができる。この方法により、例えば反応用生体分子10を抗体、標的生体分子11を抗原とすることにより、溶媒中から抗原のみを選択的に回収することができる。また、反応用生体分子10をシャペロンタンパク質、標的生体分子11を構造が壊れたタンパク質とすることにより、目的のタンパク質を中空状微小体内部空間に閉じ込めて効率よく修復することができる。

[0083] 別の方法として、図11(b)のように中空状微小体9の内部に鎖状生体分子14を固定化し、鎖の伸縮により標的生体分子12を回収する方法がある。鎖状生体分子14の素材はDNAや高分子ポリマー、さらにはこれらを光照射および／または電場印加により構造変化する分子で連結した素材を用いると良い。光照射、電場印加、磁場印加等により構造変化する分子としては、例えば波長365nmの光を照射することにより構造変化するジアゾベンゼンのような物質を用いると良い。また、鎖状生体分子14には標的生体分子12を捕捉するための捕捉生体分子13を固定化しておく。固定化の方法は、鎖状生体分子14の側鎖と捕捉生体分子13のアミノ基、チオール基もしくはカル

ボキシル基を化学的に架橋するとよい。鎖状生体分子 1 4 を電場および／もしくは磁場の印加、光照射、または溶媒塩濃度の変化により直線状に伸ばして、溶媒中の標的生体分子 1 2 を捕捉生体分子 1 3 に結合させる。次に、電場、磁場、もしくは溶媒塩濃度の逆方向への変化、あるいは光照射の中止により鎖状生体分子 1 4 を中空状微小体内部に折りたたませることで、標的生体分子 1 2 を中空状微小体 9 の内部に回収する。中空状微小体 9 の内部に反应用生体分子 9 を予め固定化しておくことにより、微小体内部で標的生体分子 1 2 と反应用生体分子 9 を効率的に反応させることができる。反応後は電場および／もしくは磁場の再印加、光照射、または溶媒塩濃度を再度変化させることにより鎖状生体分子 1 4 を伸張させて、標的生体分子 1 2 を溶媒中に戻すことができる。例えば反应用生体分子 1 0 をシャペロンタンパク質、標的生体分子 1 2 を構造が壊れたタンパク質、捕捉生体分子 1 3 をタンパク質に対する抗体とすることにより、効率的にタンパク質の修復を行うことができる。

[0084] 中空状微小体 9 を基板に固定化せず、図 1 1 (c) に示すように二つの中空状微小体を鎖状生体分子 1 4 により連結して溶媒中の標的生体分子 1 2 を捕捉する方法がある。二つの中空状微小体を連結する方法は、微小体内部の素材を金もしくは銀とし、鎖状生体分子 1 4 の両末端にアミノ基、チオール基もしくはカルボキシル基を導入して混合することで作製可能である。鎖状生体分子 1 4 を電場や磁場の印加、光照射、もしくは溶媒塩濃度の変化により直線状に伸ばして、二つの中空状微小体 9 の距離を離し、捕捉用生体分子 1 3 を露出させることにより、溶媒中の標的生体分子 1 2 を捕捉生体分子 1 3 に結合させる。次に、電場、磁場、もしくは溶媒塩濃度の逆方向への変化、あるいは光照射の中止により鎖状生体分子 1 4 を中空状微小体内部に折りたたませる。これにより二つの中空状微小体が閉じ、標的生体分子 1 2 を中空状微小体 9 の内部に捕捉することができる。電場および／もしくは磁場の再印加、光照射、または溶媒塩濃度を再度変化させることにより鎖状生体分子 1 4 を伸張させて、標的生体分子 1 2 を溶媒中に戻すことができる。

[0085] 中空状微小体について、常温で強磁性あるいはフェロ磁性を持つ元素あるいは化合物を、磁区構造を維持できない膜厚の薄い層を導入すること、あるいは磁区構造を維持できない微小な粒径の微粒子をレイヤー間に含有させることによって、超常磁性の特性を持った中空状微小体とすることができる。ここで、用いる物質として具体的には、常温にて強磁性を示す鉄、コバルト、ニッケル、ガドリニウム等の単体元素の強磁性体、あるいはフェライトと呼ばれる $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 等の酸化物磁性体、鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素を代入）、イットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ 等の絶縁性フェリ磁性体などのフェリ磁性体などを用いることができる。

[0086] 図12は、磁区構造を維持できない膜厚での強磁性体層を持つ中空微小体の、外磁場印加前、印加中、印加後の粒子の状態を示す図である。図にあるように、外層に強磁性体金属であるニッケルを、内側に金を用いた2層からなる中空状微小体について、直径 $10\mu\text{m}$ 、微小体内側の金の膜厚が 10nm 、外側のニッケルの膜厚が 2nm の場合の、外磁場を与えた場合の微小体の応答を観察した場合、磁石（ネオジウム、 0.6T ）を近づけると、微小体は互いに引き寄せ合い集合するが、磁石を外して外磁場を除去すると、微小体は分散することが確認され、ニッケルの膜厚が 2nm の場合には磁区構造が維持できず超常磁性の特性を持っていることが確認できる。他方、図12と同じ、直径 $10\mu\text{m}$ 、微小体内側は金 10nm 、微小体外側はニッケル 5nm とした場合には、外磁場を磁石で加えた後に、再度、外磁場を除去しても若干の凝集が残る事から、ニッケル層の膜厚 5nm が、ちょうど磁区構造を維持できない超常磁性体と磁区構造を構築できる強常磁性体の境界膜厚となっていることが分かる。

[0087] 図13に、実際に、常温で超常磁性特性を持つ磁性中空微小体を用いた細胞回収法の一例を模式的に示す。図Aに、磁性中空微小体1301の半球のサイズに対してそのサイズより小さい細胞1302が、微小体1301と相互作用して回収精製される様子を模式的に示している。まず（i）の攪拌の

工程で微小体 1301 内面の表面に修飾した DNA アプタマーや抗体等のターゲットとする細胞と相互作用をする分子が、細胞サイズが微小体 1301 の内面に物理的接触が可能な程度に小さなサイズであったときに、細胞表面と相互作用して細胞 1302 と微小体 1301 は結合することができる。次に (i i) の工程として、微小体を永久磁石 1306 等の外磁場によって凝集させ、微小体 1301 と結合しなかった細胞を除去し、微小体 1301 とターゲット細胞 1302 のみとした後、DNA 分解酵素 1303 等の微小体 1301 内面で細胞を固定している因子を分解する。ここで、上記手法でも示したが、逆に微小体を分解させても良い。次に、微小体 1301 のみを再度、永久磁石 1306 によって回収する事で、ターゲット細胞 1302 のみを回収することができる。図 B は、細胞 1304 のサイズが微小体 1301 の中空部分のサイズより大きい場合の例である。図からもわかるように、細胞 1304 は微小体 1301 内面の細胞と相互作用する修飾高分子等と接触ができないため、微小体 1301 を永久磁石 1306 によって回収しても、細胞 1304 は回収されることは無い。図 C は、実際に試験管 1305 を使った場合の手順を、模式的に示したものである。さまざまな細胞 1302, 1304 を含む試験管 1305 中に微小体 1301 を混合させ、微小体 1301 を永久磁石 1306 によって保持しながら溶液を交換すると、微小体 1301 と結合しなかった細胞 1304 は除去される。次に、ターゲット結合物質が DNA アプタマーで会った場合には DNA 分解酵素 1303 等の細胞結合物質を分解する物質を添加して、再度、永久磁石 1306 を用いて微小体 1301 を除去すると、ターゲットとした回収したい細胞 1302 を回収することができる。

[0088] この実施例では、1 種類のサイズの微小体 1301 を用いたが、上記図 13 で示した工程を繰り返し、複数のサイズの微小体を段階的に粒径の大きな微小体から小さな微小体に対して行う事で、サイズ分画を行うことができる。

[0089] 超常磁性を有する微小体に対して、印加された磁場に対する応答性を向上

させるには、磁性体層を複数層（２層以上）有する微小体を作製するとよい。図１４（a）はその最も単純な例として、磁区構造を維持できない膜厚での強磁性体層を２層（１４０１、１４０３）持ち、かつそれが絶縁体層（１４０２）で隔てられた微小体を模式的に示したものである。絶縁体層を構成する元素または化合物としては、 SiO 、 SiO_2 、酸化マンガン、酸化ニッケル、アルミナなどの酸化物や、テフロン（登録商標）等の高分子やプラスチック等の有機高分子、碍子などを用いることができる。磁性体層を隔てる膜厚としては、物質の種類にもよるが、概して、約５nm以上、好適には約１０nm以上とすることで各磁性体層が絶縁体層で隔てられた複層構造の超常磁性を実現できる。その好適な非限定的（non-limiting）例のひとつとして、直径１０ μm のポリスチレン球鋳型上にNi層を２nm形成した後、 SiO_2 層を２０nm形成し、さらにNi層を２nm形成するといった工程を繰り返すことで、Ni層を１、２、３、４または５層有する微小体をそれぞれ作製した後、０.１%のTween20を含む水に分散させた状態で磁石（ネオジウム、０.６T）を近づけ、微小体が磁場により吸い寄せられる力と溶媒の粘性抵抗が釣り合って速度が一定となった段階で微小体の移動速度を顕微鏡観察により計測し、微小体が有する磁性体層の数と磁場印加に対する応答（移動）速度の関係をまとめたグラフが図１４（b）である。図１４（b）に示したとおり、微小体が有する磁性体層の数が増加するにつれて磁場に対する応答速度は概ね線形に増加するため、磁場印加による速やかな回収を望む場合は多数の磁性体層を有する微小体を、緩やかな回収を望む場合は少数の磁性体層を有する微小体を作製することが望ましいと分かる。

産業上の利用可能性

[0090] 本発明は上述のように、基板上に配置した有機物鋳型の上に目的の元素を堆積させた後、有機物鋳型を分解除去することにより、作製を望む元素のみで構成された中空状の微小体を作製することができる。これを利用すれば、様々な種類の微小体を大量に作製することができるため、様々な生体分子を同時に標識できるのみでなく、ナノメートルサイズの様々な元素の微小体を

利用した新規素材を開発することができる。

[0091] 本発明の中空微小体およびそれを用いた生体物質等回収方法は、フィルター分画に替わる特定のサイズの細胞等のターゲット微粒子を、選択的におよび／または効果的に回収するために有用である。また、微小体を作製する際の元素層の材質と厚み、層数を最適に選択することで、速やかまたは緩やかな回収が可能となる。さらには、１ミクロン以下の微小体を用いることで、これまで困難であった細胞内構造物など小さなターゲット微粒子を選択的におよび／または効果的に、サイズ依存的に回収するために有用である。

符号の説明

[0092] １…元素１、１′…元素１と同じ素材の堆積層、２…元素２、２′…元素２と同じ素材の堆積層、３…元素３、４…有機物鋳型、４′…紫外線-オゾン処理により分解除去された有機物鋳型、５－１…元素１を堆積させる蒸着源、５－２…元素２を堆積させる蒸着源、６…基板１、６′…基板２、７…量子ドット１、８…量子ドット２、９…１層もしくは複層の中空状微小体、１０…生体分子１、１１…生体分子２、１２…生体分子３、１３…１２を捕捉するための生体分子、１４…鎖状生体分子、１３０１…磁性中空状微小体、１３０２…微小体内面に入ることができる小さなサイズの細胞、１３０３…DNAアプタマー分解酵素、１３０４…微小体内面に入ることができない大きなサイズの細胞、１３０５…試験管、１３０６…永久磁石、１４０１…磁性体層、１４０２…絶縁体層、１４０３…磁性体層。

請求の範囲

- [請求項1] 外殻を形成し、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造、ならびに該層状構造によって規定された内部空間および開口部を備える、中空状の微小体であって、
- 前記層状構造が、
- 2以上の薄膜の層と、
- 前記2以上の薄膜の層間の界面に二次元的に分散埋没されて配置された微粒子と、
- を含み、
- 前記微粒子が、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質または量子ドットで構成され、前記薄膜層の物質とは異なるものである、微小体。
- [請求項2] 外殻を形成し、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造、ならびに該層状構造によって規定された内部空間および開口部を備える、中空状の微小体であって、
- 前記層状構造が、
- 2以上の薄膜の層を含み、
- 少なくともそれらの層の中の一層が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されている、微小体。
- [請求項3] 外殻を形成し、遷移金属、金属または半導体の1以上の薄膜の層を含む層状構造、ならびに該層状構造によって規定された内部空間および開口部を備える、中空状の微小体であって、
- 前記層状構造が、
- 3以上の薄膜の層を含み、
- 少なくともそれらの層の中の2層以上が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されており、それを隔てる層が隔てられた磁性体層の間で強

磁性を発生させることができない程度の距離を隔てる厚さを有する絶縁体から構成されている、微小体。

[請求項4] 前記遷移金属、金属または半導体が、周期律表で原子番号43番を除く79番までの遷移金属、原子番号13, 31, 32, 33, 49, 50, 51, 81, 82, もしくは83番の金属、または原子番号14, 34, もしくは52番の半導体のいずれかである、請求項1、2または3記載の微小体。

[請求項5] 前記常温で強磁性を示す物質が、鉄、コバルト、ニッケル、およびガドリニウムからなる群から選択され、

前記常温でフェリ磁性を示す物質が、 $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{MnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{NiO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CoO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 、鉄ガーネット（ザクロ石） $\text{M}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ （MはFe、Y、Mnなどの元素）、およびイットリウム鉄ガーネット（YIG） $\text{Y}_3 \cdot \text{Fe}_5\text{O}_{12}$ からなる群から選択される、請求項1～4のいずれか一項記載の微小体。

[請求項6] (i) 前記層状構造の最外層の物質が金であり、その膜厚が2nm以上である、または

(ii) 前記層状構造の最内層の物質が金であり、その膜厚が2nm以上である、請求項1～5のいずれか一項記載の微小体。

[請求項7] (i) 常温にて強磁性またはフェリ磁性を持たない絶縁体を隔てる層の厚さが10nm以上である、または

(ii) 常温にて強磁性またはフェリ磁性を持たない絶縁体を隔てる層として絶縁体物質または金属酸化物を用いたことを特徴とした、請求項3記載の微小体。

[請求項8] 前記微粒子の層の厚さとして5nm以下の膜厚としたことを特徴とする請求項2または3記載の微小体。

[請求項9] 前記量子ドットが、CdS、CdSe、CdTe、CdHgTe、およびHgTeからなる群から選択される、請求項1記載の微小体。

[請求項10] 前記層状構造が、2以上の前記薄膜の層を含み、

最外層の薄膜層の物質が、所定の液体によって溶解する性質を有し、
内側の薄膜層の物質が、前記液体によって溶解しない性質を有する、請求項 1、2 または 3 記載の微小体。

[請求項11] 前記最外層の薄膜層の物質が金属であり、前記内側の薄膜層の物質が誘電体物質または半導体物質である、請求項 10 記載の微小体。

[請求項12] 前記層状構造の前記内部空間に面した表面に、その一端が固定された高分子をさらに含む、請求項 1、2 または 3 記載の微小体。

[請求項13] 前記層状構造の最内層の物質と最外層の物質とが異っており、前記最内層の物質が、前記高分子の一端が付加されることに適した物質であり、前記最外層の物質が、前記高分子の一端が付加されにくい物質である、請求項 12 記載の微小体。

[請求項14] 前記最内層の物質が金、銀、シリコン、酸化シリコンのいずれかであり、前記最外層の物質が鉄、銅、ゲルマニウム、アルミニウム、クロム、スズ、チタン、マンガン、ニッケル、コバルト、ガドリニウムのいずれかである、請求項 12 または 13 記載の微小体。

[請求項15] 前記高分子が、溶液のイオン強度および／もしくは pH の変化、電場の印加、磁場の印加、または光照射によって構造が変化する高分子である、請求項 12 ～ 14 のいずれか一項記載の微小体。

[請求項16] 前記高分子が、DNA 鎖またはセルロースポリマー、またはこれらを電場の印加、磁場の印加、もしくは光照射により構造変化する分子で連結したものである、請求項 12 ～ 15 のいずれか一項記載の微小体。

[請求項17] 前記高分子が、核酸分子もしくは分子鎖、核酸誘導体分子もしくは分子鎖、抗体等のタンパク質分子鎖、または細胞表面等への結合性を有する高分子鎖等である、請求項 12 ～ 15 のいずれか一項記載の微小体。

[請求項18] 前記高分子の他端が、別の微小体または基板表面に固定されている

、請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項記載の微小体。

[請求項19]

有機物で構成された微小構造物を鋳型として、遷移金属、金属または半導体の少なくとも 1 つ以上の層を前記鋳型に薄膜層状に堆積させて層状構造を形成する工程を含む、中空微小体の作製方法であって、

(i) 前記遷移金属、金属または半導体を少なくとも 1 層堆積させる工程の後に、該堆積させた層の表面に微粒子を分散して結合させる工程と、その工程の後に、再び遷移金属、金属または半導体を少なくとも 1 層堆積させる工程とをさらに含み、それによって、前記微粒子が、前記第 1 層の堆積物質と、前記第 2 層の堆積物質との間に作られる界面にサンドイッチ状に 2 次元に分散埋没され、

前記微粒子が、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質または量子ドットで構成され、前記薄膜層の物質とは異なるものである、

または

(i i) 前記層状構造が、2 以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の一層が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されている、

または

(i i i) 前記層状構造が、3 以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の 2 層以上が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されており、それを隔てる層が絶縁体で構成されている、方法。

[請求項20]

所定の直径を有する有機物鋳型、適量の純水、および有機物鋳型間の静電反発力を抑制するための材料を含む有機物鋳型懸濁液を基板の一面に滴下して、前記基板上に前記有機物鋳型を所定の密度に分布させる工程、

前記基板上に吸着していない過剰量の前記有機物鋳型を洗浄除去す

る工程、

前記基板上に分布された前記有機物鋳型を乾燥させる工程、

前記有機物鋳型の切削処理を行い、前記基板上に配置された前記有機物鋳型の間隙を所定の間隔に調整する工程、

前記基板上に分布された前記有機物鋳型に、遷移金属、金属または半導体の薄膜の層を少なくとも1層堆積させる工程、

遷移金属、金属または半導体の層を少なくとも1層堆積させた前記有機物鋳型を分解除去し、残存した中空微小体を得る工程、

を含む、遷移金属、金属または半導体で構成された中空微小体の製作方法であって、

(i) 前記遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程の後に、該堆積させた層の表面に微粒子を分散して結合させる工程と、その工程の後に、再び遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程とをさらに含み、それによって、前記微粒子が、前記第1層の堆積物質と、前記第2層の堆積物質との間に作られる界面にサンドイッチ状に2次元に分散埋没され、

前記微粒子が、磁区構造を維持できない程度に微小なサイズの常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質で構成され、前記薄膜層の物質とは異なるものである、

または

(ii) 前記薄膜の層が、2以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の一層が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成されている、

または

(iii) 前記層状構造が、3以上の薄膜の層を含み、少なくともそれらの層の中の2層以上が、磁区構造を維持できない程度に薄い構造を有する常温にて強磁性またはフェリ磁性を示す物質から構成され

ており、それを隔てる層が絶縁体で構成されている、方法。

[請求項21] 前記有機物鋳型の切削処理法が、プラズマエッチング処理、イオンミリング処理、収束イオンビーム処理、レジスト処理のいずれかである、請求項20記載の方法。

[請求項22] 前記基板上に分布された前記有機物鋳型に遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層堆積させる工程が、抵抗加熱式真空蒸着法、スパッタリング法、化学気相成長法のいずれかによって行われる、請求項20記載の方法。

[請求項23] 遷移金属、金属または半導体を少なくとも1層蒸着させた前記有機物鋳型を分解除去する工程が、紫外線-オゾン法、プラズマ分解法、光触媒分解法、加熱焼却法のいずれかによって行われる、請求項20記載の方法。

[請求項24] 前記中空微小体を得る工程がさらに、
前記中空微小体上に、微量の液体を滴下し、
前記基板の他面に超音波を作用させながら、前記中空微小体が固定された前記一面側に平坦な底面を有する素材を該底面に若干加重が加わる様に載置して、該素材を任意の方向に移動させることにより前記微小体を前記基板から剥離させることを含む、
請求項20記載の方法。

[請求項25] 前記中空微小体上に滴下する液体が、純水、あるいは純水に牛血清、抗体、牛血清アルブミン (bovine serum albumin (BSA)) を含むタンパク質、合成DNA、クエン酸塩、リン酸塩、および硫酸ドデシルナトリウム (sodium dodecyl sulfate (SDS)) もしくはタンニン酸 (tannic acid) を含む界面活性剤を加えたものである、請求項24記載の方法。

[請求項26] 前記基板が、シリコン基板、ガラス基板、アルミ基板、またはプラスチック基板である、請求項19～25のいずれか一項記載の方法。

[請求項27] 内表面に特異的に特定のターゲット生体物質と結合する物質が修飾

された超常磁性の特性を有する中空微小体を用いて、

前記中空微小体とターゲット生体物質を含む溶液とを混合する工程、および

前記中空微小体の内表面に修飾したターゲット生体物質と結合する物質と結合したターゲット生体物質を外磁場によって誘引して磁力によって回収する工程を含む、生体物質回収法。

[請求項28] 前記生体物質が細胞である、請求項27記載の方法。

[請求項29] 前記回収する工程の後に、

ターゲット生体物質との結合物質を分解して該ターゲット生体物質を回収する工程を含む請求項27または28記載の方法。

[請求項30] 前記ターゲット生体物質との結合物質としてDNAアプタマーを用い、かつ、分解する工程にDNA分解酵素を用いる、請求項29記載の方法。

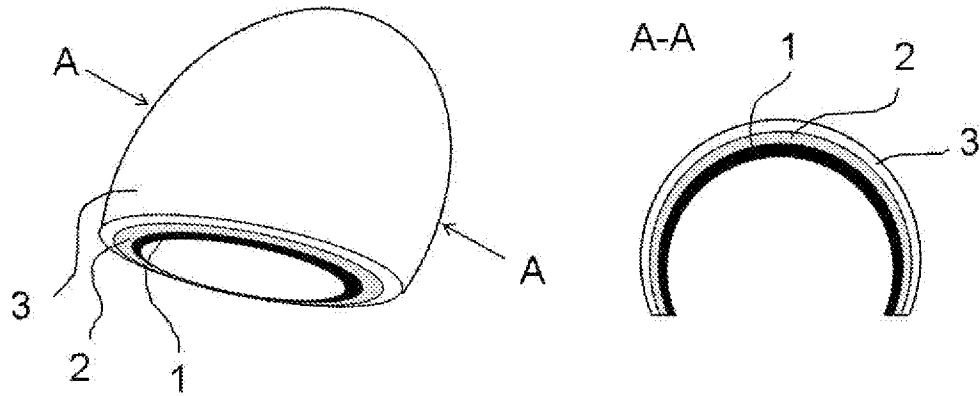
[請求項31] 前記回収する工程の後に、

中空微小体を分解する工程を含む、請求項27記載の方法。

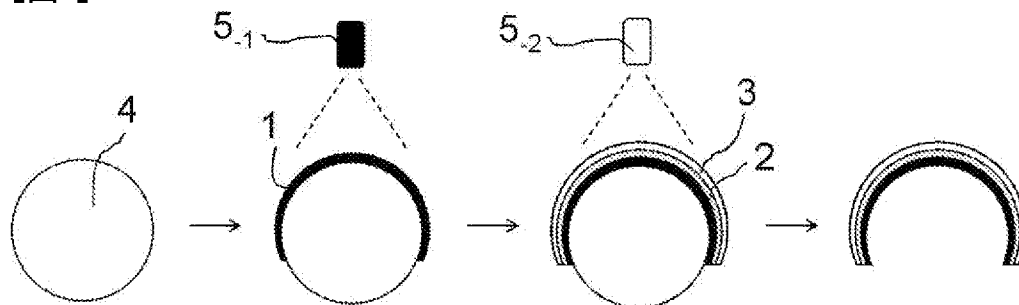
[請求項32] 前記中空微小体が、請求項12～18のいずれか一項記載の中空微小体である、請求項27～31のいずれか一項記載の方法。

[請求項33] 前記中空微小体のサイズを調整することによって、ターゲット生体物質のサイズ分画を可能とした、請求項27～32のいずれか一項記載の方法。

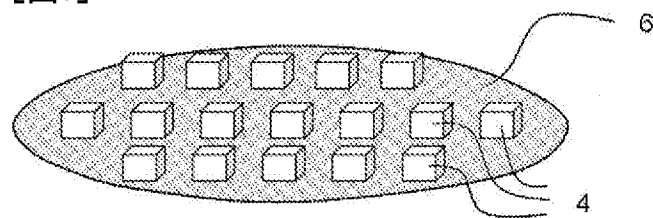
[図1]



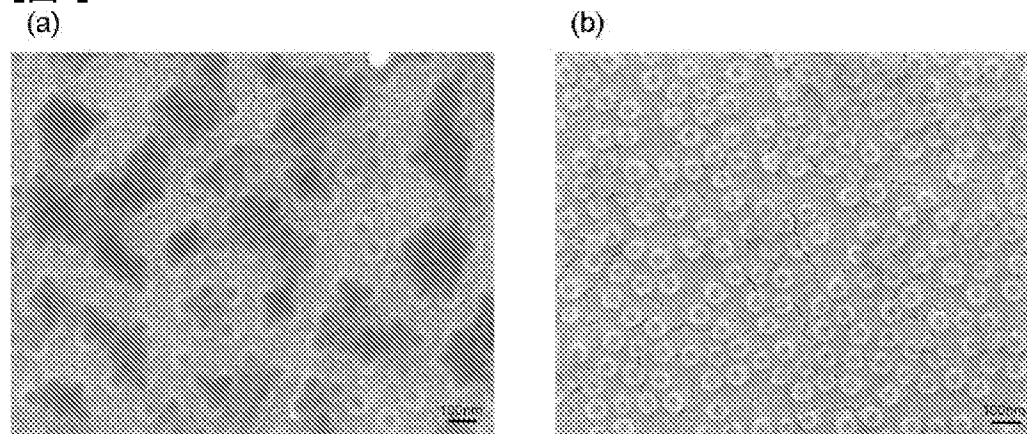
[図2]



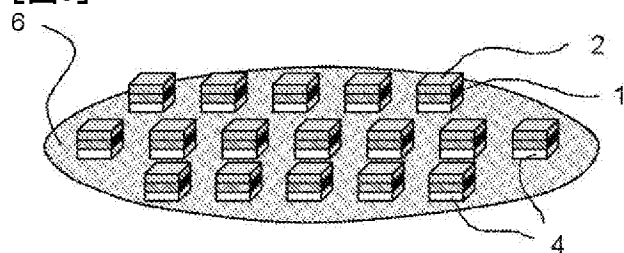
[図3]



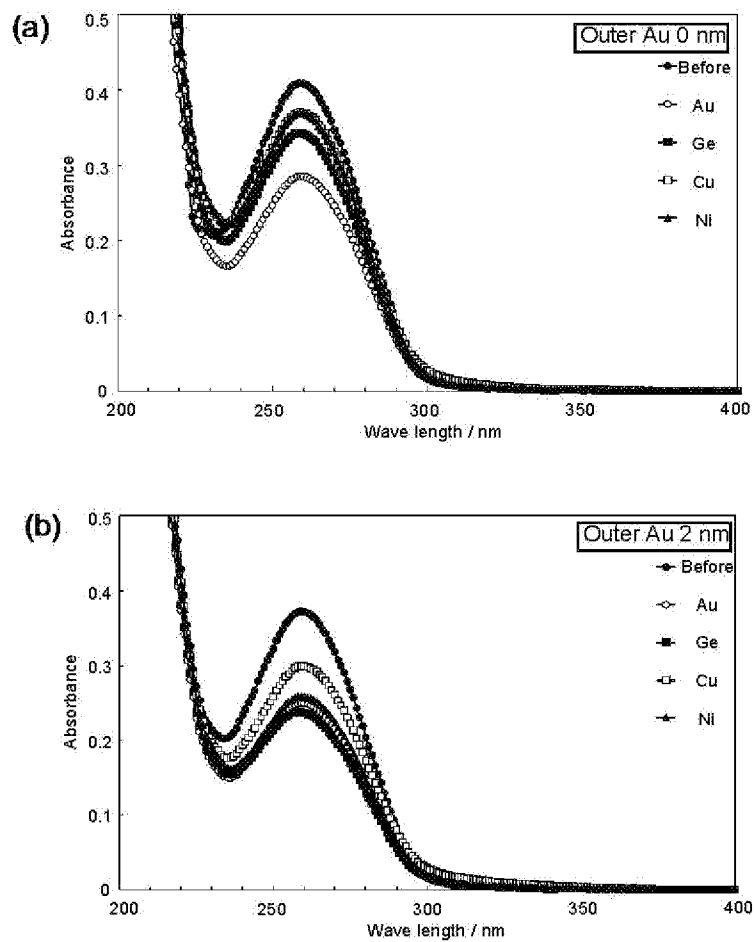
[図4]



[図5]



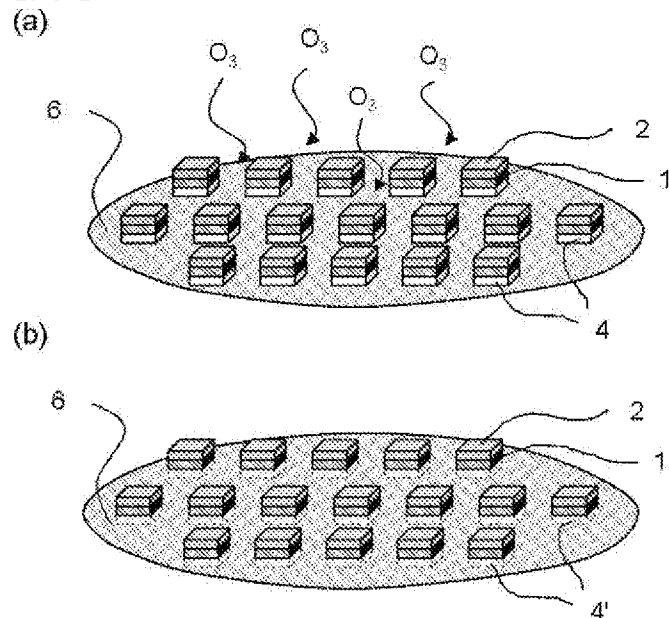
[図6]



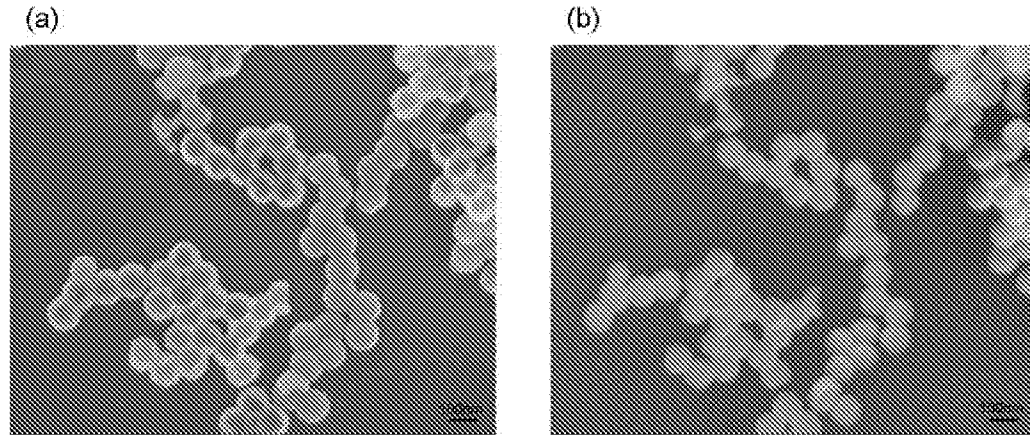
[図7]

2層目の金の膜厚 (nm)	微小体表面に固定化されたDNAの密度 (10^{13} cm^{-2})			
	Au	Ge	Cu	Ni
0	2.74 ± 0.07	1.51 ± 0.07	1.03 ± 0.07	1.26 ± 0.03
2	2.84 ± 0.02	2.98 ± 0.07	1.74 ± 0.07	2.71 ± 0.08
5	2.81 ± 0.14	2.77 ± 0.06	2.01 ± 0.31	2.99 ± 0.04
10	2.76 ± 0.02	2.71 ± 0.21	2.22 ± 0.18	2.94 ± 0.24

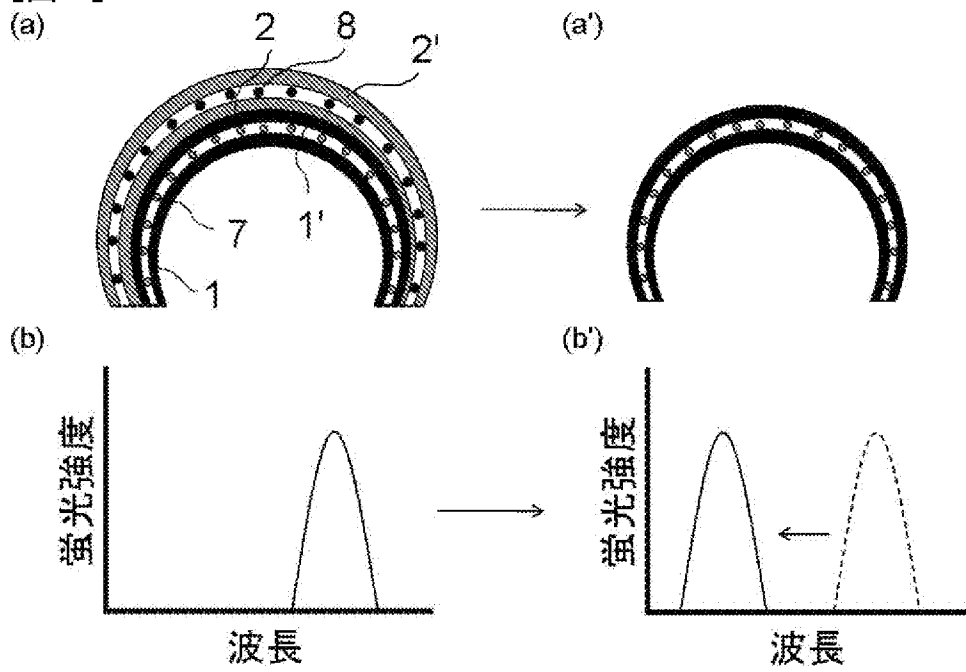
[図8]



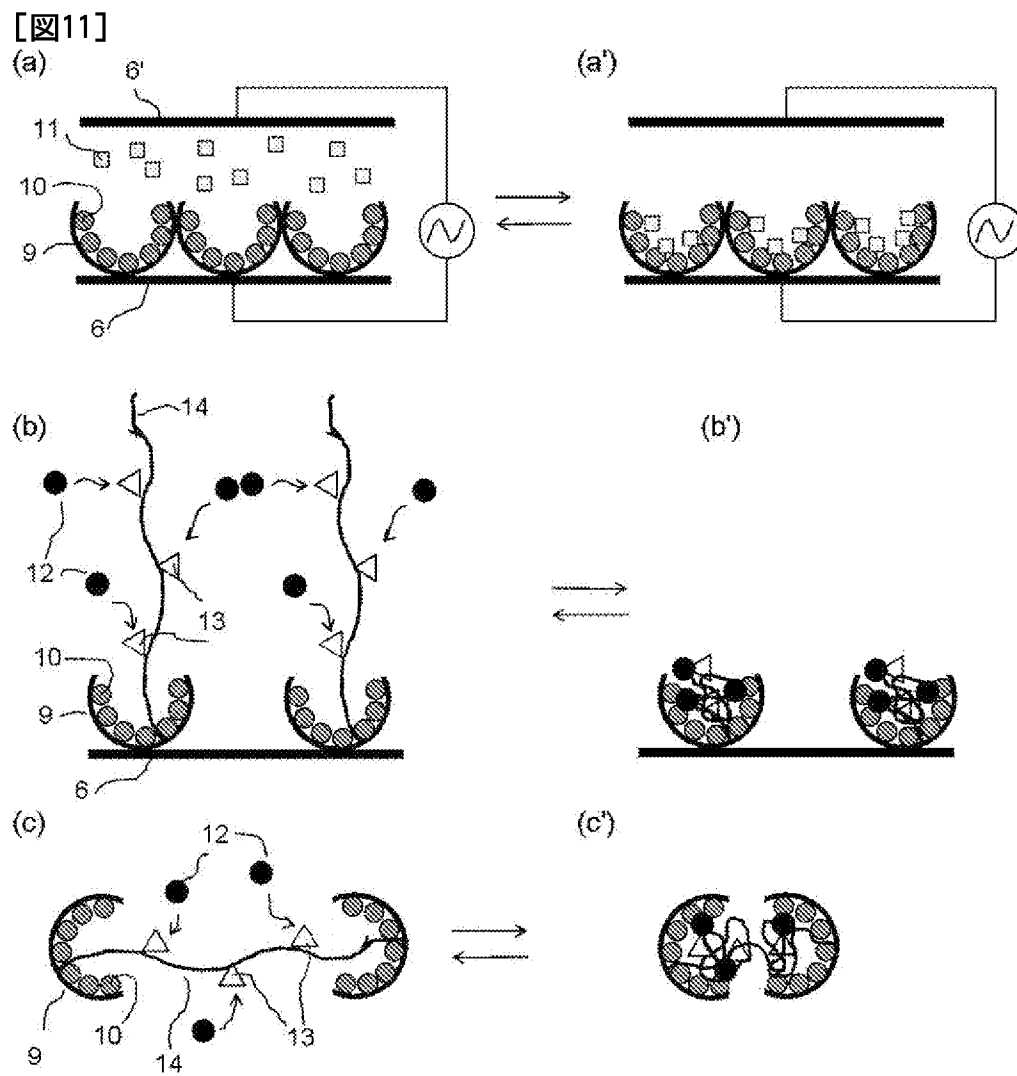
[図9]



[図10]



[図11]



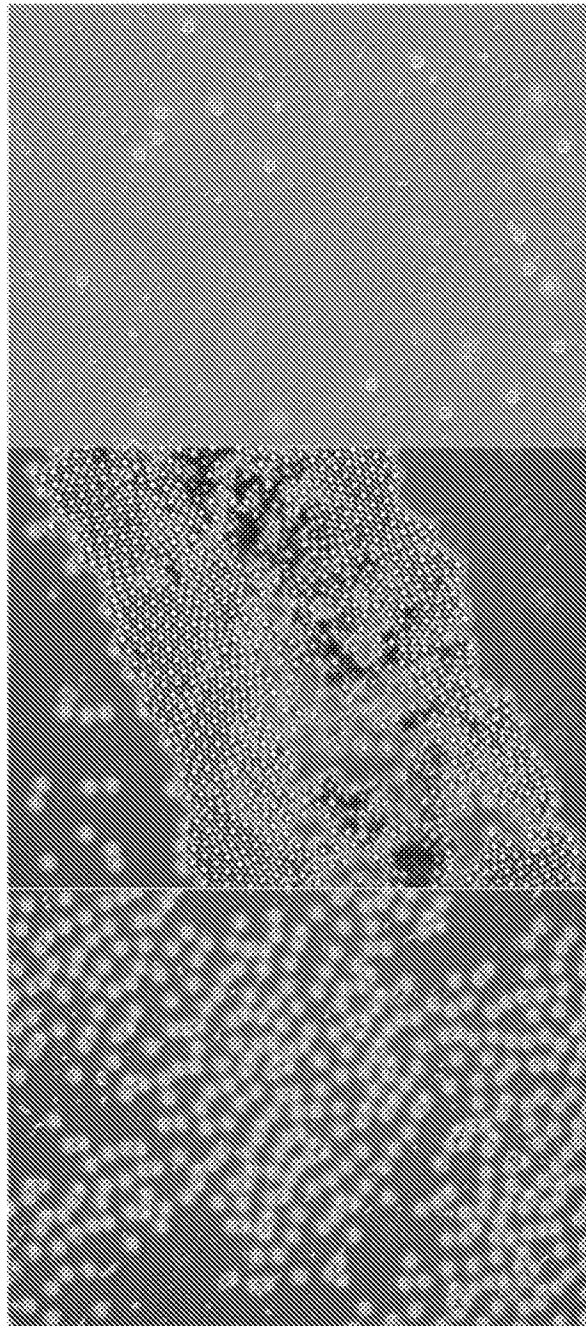
[図12]



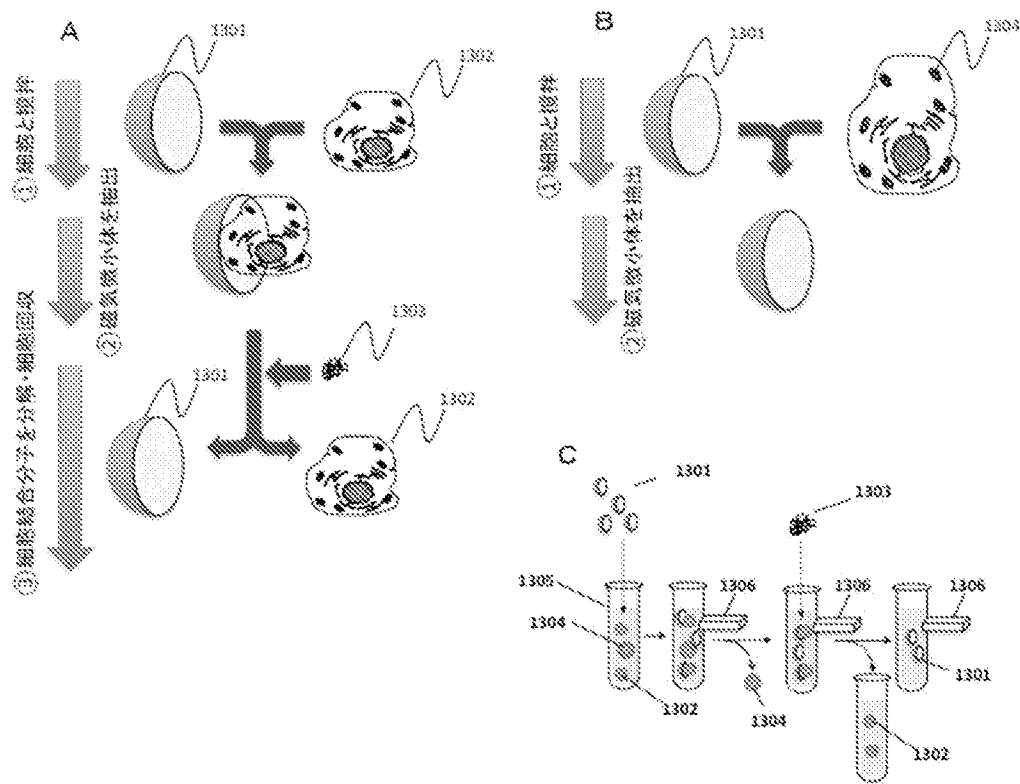
磁場印加前

磁場印加終了直後
(600mT, 10sec印加、
3次元的に凝集せず
2次元的に配向)

磁場印加終了10分後
(拡散により分散)

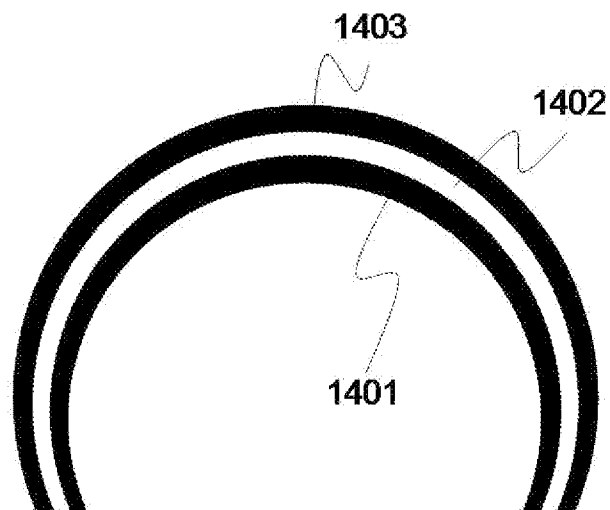


[図13]



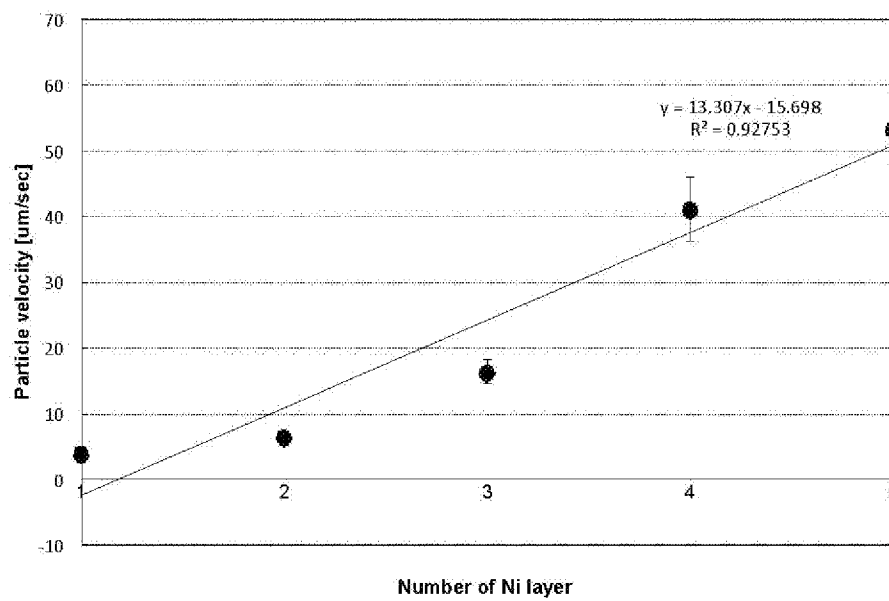
[図14]

(a)



(b)

Relationship between particle velocity and number of Ni layer



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B82B1/00(2006.01)i, B22F1/00(2006.01)i, B22F9/02(2006.01)i, B82B3/00(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y15/00(2011.01)i, B82Y20/00(2011.01)i, B82Y25/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i, H01F1/00(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)

B82B1/00, B22F1/00, B22F9/02, B82B3/00, B82Y5/00, B82Y15/00, B82Y20/00, B82Y25/00, B82Y40/00, H01F1/00, C12M1/00, C12M1/34, C12N15/09, C12Q1/02

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 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-101941 A (Kanagawa Academy of Science and Technology),	1, 4-6, 9-19, 26
Y	26 May 2011 (26.05.2011),	1, 19-33
A	paragraphs [0022], [0036], [0039], [0040] to [0044], [0070] to [0072]; fig. 1, 2, 11 (Family: none)	2, 3, 7, 8
Y	Kenji YASUDA, "On-chip Cellomics Technology for Drug Screening System Using Cardiomyocyte Cells from Human Stem Cell", YAKUGAKU ZASSHI, 01 April 2010 (01.04.2010), vol.130, no.4, pages 545 to 557	1, 19-33
A		2-18
Y	JP 2009-139308 A (Panasonic Corp.),	1, 19-33
A	25 June 2009 (25.06.2009), paragraphs [0031] to [0033] (Family: none)	2-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January, 2013 (22.01.13)

Date of mailing of the international search report

05 February, 2013 (05.02.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078993

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-81399 A (Korea University Foundation), 10 April 2008 (10.04.2008), entire text; all drawings & US 2008/0075957 A1 & KR 10-0759716 B1	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078993

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C12M1/00 (2006.01) n, *C12M1/34* (2006.01) n, *C12N15/09* (2006.01) n,
C12Q1/02 (2006.01) n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078993

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions in claims 1-26, 32, and 33 are an invention relating to a hollow microscopic object that has two or more thin-film layers, whereas the inventions in claims 27-31 are an invention which is a hollow microscopic object that has superparamagnetic properties. The two hence do not have the same or corresponding special technical features.

The following two inventions (invention groups) are involved in claims.
(Invention 1) the inventions of claims 1-26, 32 and 33

An invention which is a hollow microscopic object that has two or more thin-film layers.

(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078993

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(Invention 2) the inventions of claims 27-31

An invention which is a hollow microscopic object that has superparamagnetic properties.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. B82B1/00(2006.01)i, B22F1/00(2006.01)i, B22F9/02(2006.01)i, B82B3/00(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y15/00(2011.01)i, B82Y20/00(2011.01)i, B82Y25/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i, H01F1/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)n, C12M1/34(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n, C12Q1/02(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. B82B1/00, B22F1/00, B22F9/02, B82B3/00, B82Y5/00, B82Y15/00, B82Y20/00, B82Y25/00, B82Y40/00, H01F1/00, C12M1/00, C12M1/34, C12N15/09, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2011-101941 A (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2011.05.26, [0022], [0036], [0039], [0040]-[0044], [0070]-[0072], 図 1, 2, 11 (ファミリーなし)	1, 4-6, 9-19, 26
Y		1, 19-33
A		2, 3, 7, 8
Y	安田賢二, オンチップ・セロミクス・テクノロジーのヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニングシステムへの展開, YAKUGAKU ZASSHI, 2010.04.01, Vol.130, No. 4, pp. 545-557	1, 19-33
A		2-18

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 0 1 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 2 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 真一

2 M

9 1 1 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 7 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 2009-139308 A (パナソニック株式会社) 2009. 06. 25, [0031]-[0033] (ファミリーなし)	1, 19-33 2-18
A	JP 2008-81399 A (コリア・ユニヴァーシティ・ファウンデーション) 2008. 04. 10, 全文、全図 & US 2008/0075957 A1 & KR 10-0759716 B1	1-33

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1～26, 32, 33に係る発明は、2以上の薄膜の層を有する中空状の微小体に関する発明であるが、請求項27～31に係る発明は、超常磁性を有する中空微小体の発明であるから、両者は、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しない。

そして、請求の範囲には以下に示す2の発明（群）が含まれる。

- （発明1）請求項1～26, 32, 33に係る発明
2以上の薄膜の層を有する中空状の微小体の発明。
（発明2）請求項27～31に係る発明
超常磁性を有する中空微小体の発明。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。