

(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2日 (02.08.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/086501 A1

(51) 国際特許分類:		カミノルタエムジー株式会社内 Tokyo (JP). 星野 秀樹 (HOSHINO, Hideki) [JP/JP]; 〒1630512 東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 6 番 2 号 コニカミノルタエムジー株式会社内 Tokyo (JP).
<i>G01N 33/58</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)	
<i>C09K 11/59</i> (2006.01)	<i>G01N 21/78</i> (2006.01)	
<i>C12N 15/09</i> (2006.01)	<i>C12M 1/00</i> (2006.01)	

(21) 国際出願番号:	PCT/JP2007/051255	(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.
(22) 国際出願日:	2007年1月26日 (26.01.2007)	
(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2006-019458	2006年1月27日 (27.01.2006)	JP
特願2006-019459	2006年1月27日 (27.01.2006)	JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): コニカミノルタエムジー株式会社 (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC, INC.) [JP/JP]; 〒1630512 東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 6 番 2 号 Tokyo (JP).	(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, 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).
(72) 発明者; および	
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚田 和也 (TSUKADA, Kazuya) [JP/JP]; 〒1630512 東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 6 番 2 号 コニカミノルタエムジー株式会社内 Tokyo (JP). 古澤 直子 (FURUSAWA, Naoko) [JP/JP]; 〒1630512 東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 6 番 2 号 コニカミノルタエムジー株式会社内 Tokyo (JP). 午菴 一賀 (GOAN, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒1630512 東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 6 番 2 号 コニ	添付公開書類: — 国際調査報告書

(54) Title: FLUORESCENT LABEL FOR BIOMATERIAL AND METHOD OF FLUORESCENT-LABELING BIOMATERIAL

(54) 発明の名称: 生体物質の蛍光標識物質および生体物質の蛍光標識方法

(57) Abstract: A fluorescent label for a biomaterial which comprises an inorganic fluorescent nanoparticle characterized by having a modifying group bonded to the surface of the inorganic fluorescent nanoparticle, the modifying group having a site specifically binding to a biomaterial, the site specifically binding to a biomaterial containing at least one member selected from among a base constituting a DNA or an RNA, a nucleotide, a polynucleotide and an intercalator, and the site being located at the farthest position from the surface of the inorganic fluorescent nanoparticle. Use of this fluorescent label makes it possible to conduct an analysis at an elevated sensitivity and an elevated accuracy in, for example, analyzing a biomaterial such as detecting a DNA or an RNA by the hybridization method or determining the base sequence of a DNA, detecting an antigen by the ELISA method and so on.

(57) 要約: 本発明は、無機蛍光ナノ粒子からなる生体物質の蛍光標識物質であって、該無機蛍光ナノ粒子の表面に結合した修飾基を有し、該修飾基は生体物質と特異的に結合する部位を有し、該生体物質と特異的に結合する部位は、DNAもしくはRNAを構成する塩基、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよびインターカレーター少なくとも1つを含み、かつ該無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に位置することを特徴とする。本発明により、ハイブリッド形成法でのDNA、RNAの検出や、DNAの塩基配列の決定などの生体物質を対象とした分析、ELISA法での抗原の検出を行う分析などにおいて、より高感度で、より高精度の分析を行うことが可能となる。

WO 2007/086501 A1

明 細 書

生体物質の蛍光標識物質および生体物質の蛍光標識方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体物質を対象とした蛍光標識剤および生体物質の蛍光標識方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、バイオインフォマティクス、プロテオミクスの観点から、mRNAやタンパク質の生体内での作用、動態を解析するために、ゲノムの機能、遺伝子の発現調節または個々の生体分子の振る舞いを分子レベルで把握する、いわゆる「1分子イメージング」なる方法概念が提起されている。これに基づき病気の原因や医薬の作用を解明しようとする1分子イメージング技術の研究開発が進められている。このような1分子イメージング技術においては、標的とする生体物質(タンパク質、例えば抗体、DNA、RNA、オリゴヌクレオチドなど)の1分子に対して蛍光標識物質1分子を結合させ、これに所定の励起光を照射し、蛍光標識物質の発光を検出することにより、生体物質の動態などに関する情報を得ることが試みられる。蛍光標識物質の発光寿命が短く退色が早い場合や、発光強度が不足している場合には、1分子イメージングとして十分な観察が行えないことは明らかである。

[0003] これまで生体物質を対象とした分析に一般的に用いられている有機蛍光色素、例えば蛍光タンパク質であるルシフェリンとルシフェラーゼとの反応を利用した生物発光、発光分子などを利用した有機蛍光色素は、上記のような発光寿命や発光強度の点で充分ではなかった。そこで1分子イメージング技術分野においては、これらの有機蛍光色素に替わるものとして、無機蛍光ナノ粒子を利用した蛍光標識物質が開発の途にある。無機蛍光ナノ粒子は、発光スペクトルがシャープな形状である(半値幅が狭い)こと、発光強度が強いこと、励起波長と発光波長が離れているため検出精度が高いこと、粒子サイズに応じて励起波長を制御できること、ならびに蛍光寿命が長いことなど、有機蛍光色素と比較して有利な点をもっている。

[0004] このような、1分子イメージング技術分野における無機蛍光ナノ粒子を利用した蛍光

標識剤については、上記のような事項だけでなく、標的とする生体物質との結合性、すなわち特異性、結合力も重要視される。ところが、従来の無機蛍光ナノ粒子を利用した蛍光標識剤(例えば特許文献1参照)においては、結合性に大きく関与する立体障害などの面から修飾基に関する結合性を改善することについて、何ら検討されてこなかった。また、無機蛍光ナノ粒子を利用した蛍光標識物質については、検出精度を改善するため、発光強度の向上が追求されている。従来は、個々の無機蛍光ナノ粒子の粒径や材質、またはコアシェル構造などの粒子の構造の面から、発光強度を向上させようとする試みられてきた(例えば特許文献1参照)が、さらなる改善の余地が残されていた。

特許文献1:特開2005-172429号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、無機蛍光ナノ粒子を用いた、生体物質への結合性を高め、より好適な標識を実現しうる蛍光標識物質および生体物質の蛍光標識方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 上記目的は、下記構成により達成される。

1. 無機蛍光ナノ粒子からなる生体物質の蛍光標識物質であって、該無機蛍光ナノ粒子の表面に結合した修飾基を有し、該修飾基は生体物質と特異的に結合する部位を有し、該生体物質と特異的に結合する部位は、DNAもしくはRNAを構成する塩基、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよびインターカレーター少なくとも1つを含み、かつ該無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に位置することを特徴とする生体物質の蛍光標識物質。
2. 前記無機蛍光ナノ粒子が、粒径が1~10nmの球状の半導体ナノ粒子であることを特徴とする1に記載の生体物質の蛍光標識物質。
3. 前記無機蛍光ナノ粒子が、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子であることを特徴とする2に記載の生体物質の蛍光標識物質。

4. 前記コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子のコアがSiであり、シェルがSiO₂であることを特徴とする3に記載の生体物質の蛍光標識物質。
5. 前記無機蛍光ナノ粒子が、無機蛍光ナノ粒子同士が互いに連結するための修飾基であるリンク形成修飾基を有することを特徴とする1～4のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
6. 無機蛍光ナノ粒子からなり、該無機蛍光ナノ粒子の表面に、生体物質と特異的に結合する部位を有する修飾基と、該無機蛍光ナノ粒子同士が互いに連結するための修飾基であるリンク形成修飾基とを有することを特徴とする生体物質の蛍光標識物質。
7. 前記リンク形成修飾基を形成する分子の無機蛍光ナノ粒子における表面被覆率が10～50%であることを特徴とする6に記載の生体物質の蛍光標識物質。
8. 前記無機蛍光ナノ粒子は、粒径が1～10nmの球状の無機蛍光ナノ粒子であることを特徴とする6または7に記載の生体物質の蛍光標識物質。
9. 前記無機蛍光ナノ粒子は、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子であることを特徴とする6～8のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
10. 前記コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子のコアがSiであり、シェルがSiO₂であることを特徴とする9に記載の生体物質の蛍光標識物質。
11. 前記リンク形成修飾基を介して水素結合、イオン結合、共有結合またはファンデルワールス力により前記無機蛍光ナノ粒子同士が互いに連結していることを特徴とする6～10項のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
12. 前記無機蛍光ナノ粒子が互いに連結することによって、粒子数が2～20の無機蛍光ナノ粒子クラスターを形成していることを特徴とする、6～11のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
13. 生体物質の蛍光標識方法であって、1～12のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質を用い、前記無機蛍光ナノ粒子を前記生体物質と特異的に結合する部位を有する修飾基を介して生体物質に結合させることを特徴とする生体物質の蛍光標識方法。

- [0007] 本発明者らは、DNAもしくはRNAを構成する塩基、ヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド、インターカレーターを含む生体物質に特異的に結合する部位を無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に有する修飾基を、該無機蛍光ナノ粒子の表面に導入することにより、立体障害などの問題が回避され、分析の対象とする生体物質への結合性が従来よりも向上した蛍光標識剤が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。以下、生体物質に結合する部位を有する修飾基を、単に生体物質結合修飾基ともいう。
- [0008] 本発明において、上記無機蛍光ナノ粒子は、粒径が1～10nmの球状である無機蛍光ナノ粒子であることが好ましい。また、上記無機蛍光ナノ粒子は、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子であることがより好ましく、Siをコア、SiO₂をシェルとする無機蛍光ナノ粒子が特に好ましい。
- [0009] 上記のような修飾基を介することにより、蛍光標識剤を生体物質に好適に結合させることが可能となる。
- [0010] また、本発明者らは、蛍光標識物質として用いられる無機蛍光ナノ粒子の表面に、該蛍光標識物質同士を連結させるための修飾基を導入し、該蛍光標識物質同士が結合したクラスターを形成させることにより、分析対象を検出するための発光強度が従来よりも向上しうることを見出し、本発明を完成させるに至った。
- [0011] 本発明の上記構成6に係る無機蛍光ナノ粒子は、その表面に、生体物質に結合する部位を有する修飾基(生体物質結合修飾基)と、該無機蛍光ナノ粒子同士を互いに連結させるための修飾基(リンク形成修飾基)とを有する。無機蛍光ナノ粒子同士は、上記リンク形成修飾基を介した水素結合、イオン結合、共有結合またはファンデルワールス力により互いにリンクすることが好ましい。
- [0012] 上記リンク形成修飾基を形成する分子による無機蛍光ナノ粒子の表面被覆率は、10～50%であることが好ましい。また、上記無機蛍光ナノ粒子は、互いにリンクすることによって粒子数が2～20の無機蛍光ナノ粒子クラスターを形成することが好ましく、該粒子数は温度もしくはpHによって調整されるものであることが望ましい。
- [0013] 本発明の上記構成6において、上記無機蛍光ナノ粒子は、粒径が1～10nmの球

状である無機蛍光ナノ粒子であることが好ましい。また、上記無機蛍光ナノ粒子は、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子であることがより好ましく、Siをコア、SiO₂をシェルとする無機蛍光ナノ粒子が特に好ましい。

発明の効果

- [0014] 本発明により、ハイブリッド形成法でのDNA、RNAの検出や、DNAの塩基配列の決定などの生体物質を対象とした分析、ELISA法での抗原の検出を行う分析などにおいて、蛍光標識剤の結合性が改善され、1分子イメージング技術により、より高感度およびより高精度の分析を行うことが可能となる。

発明を実施するための最良の形態

- [0015] (無機蛍光ナノ粒子)

本発明の蛍光標識物質に用いられる無機蛍光ナノ粒子は、ナノオーダーの粒子中に空間的に励起子を閉じ込め、いわゆる量子閉じ込め効果により、バルク以上の発光強度が得られる蛍光物質である。この無機蛍光ナノ粒子は、その粒径により発光強度や蛍光波長が変化することが知られており、所望の粒径のものを適宜調製することが可能である。本発明においては、1分子イメージングによる分析に好適な蛍光を発色するなどの点から、無機蛍光ナノ粒子は、粒径が0.5～20nm、好ましくは1～10nm、より好ましくは2～5nmの、球状またはほぼ球状の半導体ナノ粒子であることが好ましい。なお、このような粒径は、TEM(透過型電子顕微鏡)での観察により確認することが可能であり、少なくとも200個の粒子像を観察した測定値の平均を用いるものとする。

- [0016] さらに、本発明において、上記無機蛍光ナノ粒子は、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、いわゆるコアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子であることが望ましい。コアとなる物質よりも大きなバンドギャップを有する物質をシェルとすることにより、量子閉じ込め効果を安定化させ、コアシェル構造をもたない同サイズの無機蛍光ナノ粒子よりも発光強度を高めることが可能である。なお、このようなコアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子についての粒径は、シェル層を含めた部分の粒径をさす。

[0017] 上記無機蛍光ナノ粒子を構成する半導体ナノ粒子は特に制限されず、例えば、CuCl等のI-VII族化合物半導体、CdS、CdSe等のII-VI族化合物半導体、InAs等のIII-V族化合物半導体またはSi、Ge等のIV族半導体もしくはこれらの化合物半導体などの結晶を適宜選択して用いることができる。また、上記コアおよびシェルの構成については、例えば、CdSeをコア/ZnSをシェル、Siをコア/SiO₂をシェルとするなど、用いる半導体ナノ粒子に応じて好適な組み合わせを適宜選択することができる。本発明では、環境汚染や人体に対する毒性が懸念される物質を用いることなく、しかも発光が良好であることから、Siをコア/SiO₂をシェルとする、またはGeをコア/GeO₂をシェルとするコアシェル構造を有する半導体ナノ粒子を用いることが好適である。

[0018] (上記構成1に係る修飾基)

本発明の蛍光標識物質は、上述したような無機蛍光ナノ粒子の表面に、特定の「修飾基」が導入されたものである。この修飾基は、生体物質と特異的に結合しうる部位(以下「生体物質結合部位」という。)を有し、例えば、生体物質結合部位、無機蛍光ナノ粒子の表面に直接結合している部位(以下「表面結合部位」という。)およびこれらの生体物質結合部位と表面結合部位を連結している中間部位(以下「スペーサー」という。)から構成される。このような修飾基を介して、上記無機蛍光ナノ粒子は、標識の対象とする生体物質に結合することが可能となる。

[0019] 上記生体物質結合部位としては、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルといったDNAまたはRNAを構成する塩基や、単独のヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドが結合したポリヌクレオチド(オリゴヌクレオチドを含む)、インターカレーター、が挙げられる。これらの物質は、いずれも標的とする生体物質(遺伝子部位)に特異的に結合しうるものである。上記DNAまたはRNAを構成する塩基はそれぞれに対応する相補的となる塩基に結合し、上記ヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドはそれと相補的な塩基配列を有するヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドと結合する。上記ポリヌクレオチドは複数の塩基を有するため、DNAまたはRNAを構成する塩基が単独である場合と比較し、より安定した結合を形成することができる。

[0020] また、上記インターカレーターは、ds(二本鎖)DNAの塩基対間に挿入結合する化合物である。本発明で用いられるインターカレーターとしては、例えば、蛍光剤として

も用いられるエチジウムブロマイドやアクリジンなどの、ヘテロ環構造を有する化合物を用いることができる。このようなインターカレーターは、dsDNAが形成される際に塩基対間に挿入結合するため、例えばハイブリッド形成法においてdsDNAを検出するための蛍光標識物質に用いることが可能である。

[0021] このような生体物質結合部位は、修飾基の、無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に存在する。これにより、無機蛍光ナノ粒子は立体障害を起こすことなく対象とする生体物質に結合し、これを標識することが可能となる。

[0022] 例えば、分子の構造が剛直で直線的な化合物に生体物質結合部位を導入して修飾基とする場合、その化合物の末端に生体物質結合部位を結合させることにより、無機蛍光ナノ粒子の表面から最も遠ざけて位置させることが可能となる。また、後述するようなポリエチレングリコールなどによる構造を有する長鎖状の化合物に生体物質結合部位を導入する場合は、無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた炭素原子に反応性官能基を位置させ、その官能基を介して生体物質結合部位を結合させればよい。

[0023] 生体物質結合部位が、修飾基の無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に存在することは、生体物質結合部位の導入位置と、生体物質との結合性との検量線を作成することで確認できる。例えば、長鎖状の分子構造におけるそれぞれの炭素原子に反応性官能基を位置させた化合物を用いて無機蛍光ナノ粒子に修飾基を導入し、それぞれの蛍光標識物質を生体物質に結合させて蛍光の強度を測定する。この際、最も強い蛍光が検出された蛍光標識物質に用いられている修飾基が、無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に生体物質結合部位が存在している修飾基である。

[0024] なお、本発明の蛍光標識物質は、本発明による効果を阻害しない範囲において、必要に応じて上述した以外のその他の修飾基、例えばリン酸基、アミノ基またはポリオキシエチレン基などを用いた親水性を向上させるための修飾基などを有することも可能である。

[0025] (上記構成6に係る修飾基)

本発明の上記構成6の蛍光標識物質は、上述したような無機蛍光ナノ粒子に2種

類の「修飾基」がそれぞれ少なくとも1個以上導入されたものである。本発明の修飾基の1つは、生体物質などに特異的に結合しうるものであり、以下これを「生体物質結合修飾基」とよぶ。もう1つの本発明の修飾基は、本発明の蛍光標識物質同士をリンク(連結)させるためのものであり、以下これを「リンク形成修飾基」とよぶ。なお、本発明の蛍光標識物質は、本発明による効果を阻害しない範囲において、必要に応じてその他の修飾基を有することも可能である。

[0026] 上記リンク形成修飾基を形成する分子の無機蛍光ナノ粒子における表面被覆率は、好ましいクラスターを形成できるようにするなどの点から、10～50%であることが好ましく、15～40%であることがより好ましい。なお、本発明における上述のような「表面被覆率」は、リンク形成修飾基を形成する分子が被覆している領域の面積の、無機蛍光ナノ粒子の表面積全体に対する割合であり、例えばTEMを用いた観察により測定することが可能である。

[0027] 上記生体物質結合修飾基は、公知の手法により、対象とする分析における蛍光標識の用途に応じたものを導入すればよく、その態様は特に限定されない。例えば、ハイブリッド形成法によるDNAの検出に用いられるような、ss(1本鎖)DNAを結合させた修飾基、ELISA法によるタンパク質の検出に用いられるような、ビオチンまたはアビジンを結合させた修飾基、あるいは、ガン細胞の検出に用いられるような、レクチンまたは特異的抗体を結合させた修飾基などを、本発明の生体物質結合修飾基とすることができる。

[0028] 上記リンク形成修飾基としては、水素結合、イオン結合、共有結合またはファンデルワールス力などにより相互に連結しうる化合物を用いることができる。例えば、上記共有結合としては、チオール基同士によるジスルフィド結合、アミノ基およびカルボキシル基によるペプチド結合などが挙げられ、これらの官能基を有する化合物を無機蛍光ナノ粒子の表面に導入すればよい。また、リンク形成修飾基としてヌクレオチド鎖を用いて、相補的なヌクレオチド鎖を有する無機蛍光ナノ粒子同士を連結させるようにすることも可能である。

[0029] なお、リンク形成修飾基における、上記水素結合、イオン結合、共有結合などの反応部位の数は特に限定されず、適宜調節することが可能である。例えば、リンク形成

修飾基は、結合力の比較的強い共有結合が1つ形成されるものでもよく、結合力の比較的弱い水素結合が複数形成されるものでもよい。

[0030] 本発明において、リンク形成修飾基は相互にリンクしあえるものであれば、単独の種類を用いてもよいし、複数種を組み合わせ用いてもよい。例えば、本発明の一態様において、すべての蛍光標識物質には、リンク形成修飾基として、チオール基を有する同一の修飾基を導入することができる。また、アミノ基を有するリンク形成修飾基とカルボキシル基を有するリンク形成修飾基のような、2種類のリンク形成修飾基を1つの蛍光標識物質に導入したのも本発明の態様に含まれる。さらに、本発明の別の態様において、リンク形成修飾基として、アミノ基を有する同一または複数種の修飾基が導入された蛍光標識物質と、カルボキシル基を有する同一または複数種の修飾基が導入された蛍光標識物質とを組み合わせ、ペプチド結合によりリンクできるよう利用することができる。蛍光標識物質同士のリンク形成に影響を及ぼさないようにする観点からは、同一の蛍光標識物質に存在する官能基同士は互いに結合しないものであることがより好ましい。

[0031] 以上のような生体物質結合修飾基およびリンク形成修飾基は、通常、それぞれが異なる分子として無機蛍光ナノ粒子の表面に導入されるものであるが、本発明の一態様として、分岐構造を有する同一の分子に生体物質結合修飾基およびリンク形成修飾基の両方が備えられたものを導入することも可能である。

[0032] また本発明においては、上記構成1の構成であり、かつ構成6の構成を有する態様即ち、上記構成5の態様が本発明の効果が大きく特に好ましい態様である。

[0033] (蛍光標識物質の製造方法:無機蛍光ナノ粒子の調製)

本発明で用いられる無機蛍光ナノ粒子は、公知の方法に従って製造することができる。その製造方法は特に制限されないが、例えば、CVD法、レーザーアブレーション法、シラン分解法、Si電極蒸発法などの気相法や、電気分解法、逆ミセル法などの液相法が挙げられる。これらの方法により製造された無機蛍光ナノ粒子は、液体中に懸濁分散した状態、プレート上に固定化された状態などの態様で存在する場合があるが、後述するような修飾基の導入が行える態様であればとくに限定されるものではない。

[0034] より具体的には、例えば、プラズマCVD法やスパッタ法を用いてSi基板の上にアモルファスの SiO_2 膜を堆積させ、これを高温でアニールし、 SiO_2 膜内にSiナノ粒子を形成させた後、HFで SiO_2 膜を溶解することにより、液面に凝集したSiナノ粒子が得られる。さらに、その表面を酸素雰囲気下で自然酸化させれば、または加熱して熱酸化させれば、Siをコア/ SiO_2 をシェルとする無機蛍光ナノ粒子となる。

[0035] (修飾基の導入)

本発明の修飾基は、無機蛍光ナノ粒子の表面に結合しうる化合物を用いて前記表面結合部位を形成し、この化合物に前記生体物質結合部位を形成する物質を結合させることにより、導入することが可能である。また、表面結合部位を形成する化合物に、スペーサーを形成する化合物を結合させた後、前記生体物質結合部位を形成する物質を結合させてもよい。

[0036] 表面結合部位を形成する化合物としては、例えば、無機物と有機物とを結合させるために広く用いられている化合物であるシランカップリング剤を用いることができる。このシランカップリング剤は、分子の一端に加水分解でシラノール基(Si-OH)を与えるエトキシ基またはメトキシ基を有し、他端にチオール基(メルカプト基)、アミノ基、エポキシ基(グリシジル基)、アルデヒド基などの官能基を有する化合物であり、上記シラノール基の酸素原子を介して無機物に結合する。従来用いられているシランカップリング剤としては、例えば、メルカプトプロピルトリエトキシシランなどが挙げられる。

[0037] シランカップリング剤は、公知の手法を用いて反応させることにより、酸素原子を介して蛍光ナノ粒子と結合させることが可能である。例えば、以下に示すような手順の通りである。まず、Siをコア/ SiO_2 をシェルとする無機蛍光ナノ粒子を調整し、これを過酸化水素水中に分散させ、シェルの表面を水酸化させる。続いて、溶剤をトルエンに置換し、メルカプトプロピルトリエトキシシランを添加して2時間程度かけて反応させることにより、シェルの表面にメルカプトプロピルトリエトキシシランが導入される。

[0038] また、上記シランカップリング剤の代わりに、ジメルカプトコハク酸や11-メルカプトウンデカン酸などを用いて表面結合部位を形成することもできる。例えば、後述するような逆ミセル法により半導体ナノ粒子を製造した場合、その表面はTOPO(tri-n-octylphosphine oxide)などで被覆されているが、これとジメルカプトコハク酸または11-

メルカプトウンデカン酸とを置換反応させることが可能である。これにより、ジメルカプトコハク酸または11-メルカプトウンデカン酸は硫黄原子を介して無機蛍光ナノ粒子の表面に結合するが、他端にはカルボキシル基を有するため、後述するような生体物質結合部位を形成するための化合物を結合させることができる。

- [0039] さらに、本発明において、無機蛍光ナノ粒子に直接結合する化合物と、生体物質結合修飾基および／またはリンク形成修飾基を形成するための化合物、上記シランカップリング剤などの表面結合部位を形成する化合物が、中間部位(「スペーサー」ともいう。)を介して結合するような態様であっても構わない。すなわち、該スペーサーは、無機蛍光ナノ粒子に直接結合する化合物と結合しうる部位と、生体物質結合修飾基および／またはリンク形成修飾基を形成するための化合物と結合しうる部位とを有する化合物であり、このような化合物としては、sulfo-SMCC (maleimidomethylcyclohexanecarboxylic acid sulfohydroxysuccinimide ester sodium salt)などのビファンクショナルクロスリンカーと呼ばれる有機分子を用いることが可能である。
- [0040] 例えば、上記sulfo-SMCCは、アミノ基またはチオール基に対する指向性を有する反応部位を2つ有するので、その片方を例えばシランカップリング剤に結合させ、他方を生体物質結合部位を形成するための化合物との結合に用いることができる。また、ビファンクショナルクロスリンカーとしては、ポリエチレングリコール(PEG)などのオキシアルキレンの両端に、表面結合部位を形成する物質に結合しうる機能性官能基と、生体物質結合部位を形成する物質とに結合しうる機能性官能基とが導入された構造のものを用いることもできる。
- [0041] 一方、生体物質結合部位は、標的とする生体物質に結合しうる、例えばDNAまたはRNAを構成する塩基やポリヌクレオチド、インターカレーターなどの一部に、表面結合部位またはスペーサーを形成する化合物が有する官能基と結合しうる官能基をあらかじめ公知の方法に従って導入することにより、それらの化合物に結合させることが可能である。例えば、チオール基を有するシランカップリング剤と、同じくチオール基を導入したヌクレオチドとを反応させた場合、ジスルフィド結合により、修飾基にヌクレオチドが導入される。
- [0042] また、リンク形成修飾基については、例えば、チオール基、アミノ基、カルボキシル

基などの反応性官能基を2つ以上有する化合物を用いることにより導入することができる。これらの官能基のうち、1つは、前述したような水素結合、イオン結合、共有結合またはファンデルワールス力などにより相互に連結するために用いられ、もう1つは、表面結合部位またはスペーサーを形成する化合物が有する官能基と結合するために用いられる。このようなリンク形成修飾基を形成するための化合物としては、例えば、ジカルボン酸類や、アミノ基およびカルボキシル基を少なくとも有する化合物であるアミノ酸などが挙げられる。

[0043] 本発明において、上記生体物質結合修飾基およびリンク形成修飾基がそれぞれ異なる分子として無機蛍光ナノ粒子の表面に導入される場合、例えば、2種類のシランカップリング剤を混合して用いるなどの手法により、それぞれの分子の表面被覆率を調整することが可能である。例えば、この手法においては、無機蛍光ナノ粒子および生体物質結合修飾基を形成する化合物とのみ結合しうるシランカップリング剤と、無機蛍光ナノ粒子およびリンク形成修飾基を形成する化合物とのみ結合しうるシランカップリング剤を、目的とする表面被覆率の割合と同じ割合で混合し、これら2種類のシランカップリング剤を含む混合溶液と無機蛍光ナノ粒子とを反応させ、その後生体物質結合修飾基およびリンク形成修飾基を含む溶液と反応させるようにすればよい。無機蛍光粒子へ結合する、結合力の順位に従って官能基の結合部位を選択することにより平衡状態での表面修飾の割合をコントロールできる。

[0044] (クラスター)

本発明の蛍光標識物質において、上述したようなリンク形成修飾基を介して無機蛍光ナノ粒子同士は互いに連結し、クラスターを形成する。このクラスターを構成する無機蛍光ナノ粒子の数は、温度またはpHにより調整することが可能であることが望ましい。リンク形成修飾基同志の結合力は、例えば温度、またはpHなどの環境を変更したり、リンク形成修飾基の結合を妨げる修飾基を導入しその数をコントロールすることによって調整することができる。また、リンク形成修飾基として例えばオリゴヌクレオチドを利用する場合、相補的な塩基配列と相補的でない塩基配列とを混在させることにより、リンク形成修飾基の結合力を調整することも可能である。

[0045] また、上記クラスターを構成する無機蛍光ナノ粒子の数は適宜調整することができ

るが発光強度を十分に高めると共に、生体内の移動を妨げないようにするなどの点から、その数は2～20であることが好ましい。なお、クラスター中の無機蛍光ナノ粒子の数は、TEM(透過型電子顕微鏡)での観察により確認することが可能である。

[0046] 標的とする生体物質に結合した無機蛍光ナノ粒子に、生体物質には直接的に結合していない無機蛍光ナノ粒子が連結するような態様のクラスターが形成されることにより、1分子の生体物質を従来より多数の無機蛍光ナノ粒子で標識することが可能である。

[0047] 上述した本発明の蛍光標識物質は、従来の蛍光標識物質を用いて行われていた各種分析において好適に利用することが可能である。このような分析としては、例えば、固定細胞を用いた免疫染色、レセプター・リガンドのリアルタイムトラッキング、1分子イメージングなどが挙げられる。これらの分析において、本発明の蛍光標識物質により形成されたクラスターは、蛍光標識物質が単独である場合と比較して、より強力な蛍光を発するため、生体物質の検出精度を向上させることが可能となる。

[0048] (蛍光標識物質を用いた分析方法)

本発明の蛍光標識剤は、DNAまたはRNAなどの遺伝子情報を持つ、生体物質を対象とした各種分析に用いることができるが、とりわけ下記のような分析に好適に用いることができる。

[0049] 例えば、生体物質結合部位にアデニン、グアニン、シトシン、チミンまたはそれぞれの塩基を有するヌクレオチドを導入した、異なる波長の蛍光を発する4種類の蛍光標識剤は、それぞれの対応する塩基を有するssDNAまたはヌクレオチドに結合する。したがって、それらの4種類の結合標識剤を用いて、未知の塩基配列のssDNAの個々の塩基に蛍光標識剤を結合させた場合、これに励起光を照射し、蛍光の配列を読みとることにより、ssDNAの塩基配列を決定することが可能となる。また、未知の塩基配列のssDNAを、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性または5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素でヌクレオチドを1分子ずつ切断し、次々と切り離されるヌクレオチドのそれぞれに上記4種類の蛍光標識剤のいずれかを結合させるようにした場合、結合した蛍光標識剤が発する蛍光を高感度の蛍光検出器を用いて経時的に検出することにより、ssDNAの塩基配列を決定することが可能となる。

実施例

[0050] 実施例1

(HFエッチング法による無機蛍光ナノ粒子の調製)

プラズマCVDによりシリコンウエハー上に成膜した SiO_x ($x=1.999$)を不活性ガス雰囲気中で 1100°C 、1時間度アニールを行った。これにより、 SiO_2 膜中にSi結晶が析出した。次に、このシリコンウエハーを室温で1%のフッ酸水溶液で処理することにより SiO_2 膜を除去し、液面に凝集した数nmサイズのSi結晶を回収した。なお、このフッ酸処理により、結晶表面のSi原子のダングリングボンド(未結合手)が水素終端され、Si結晶が安定化する。その後、回収したSi結晶の表面を酸素雰囲気中で自然酸化し、Si結晶からなるコアの周囲に SiO_2 からなるシェル層を形成させた。

[0051] (陽極酸化法による無機蛍光ナノ粒子の調製)

フッ酸(46%)、メタノール(100%)及び過酸化水素水(30%)を1:2:2の割合で混合した溶液中で、p型シリコンウエハー及び白金を対向電極として $320\text{mA}/\text{cm}^2$ で約1時間通電し、Si結晶を析出させた。このようにして得られたSi結晶の表面を酸素雰囲気中で自然酸化し、Si結晶からなるコアの周囲に SiO_2 からなるシェル層を形成させた。

[0052] 以上のように製造された、Siをコア/ SiO_2 をシェルとする無機蛍光ナノ粒子は、いずれも平均粒径 3.5nm であった。

[0053] (オリゴヌクレオチド末端修飾基の導入: サンプルAおよびC)

先ず、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子を $30\%\text{H}_2\text{O}_2$ 中に10分間分散させ、結晶表面を水酸化させた。次に、溶剤をトルエンに置換し、メルカプトプロピルトリエトキシシランをトルエンの2%加えて、2時間かけて無機蛍光ナノ粒子の最表面の SiO_2 をシラン化すると共にメルカプト基を導入した。続いて、溶剤を純水に置換してバッファ塩を添加し、さらに一端にメルカプト基の導入されたオリゴヌクレオチドを 100nM となるように加えて1時間放置することで、無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとを結合させた。このようにして得られた蛍光標識物質をサンプルAとした。

[0054] また、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子に代えて、陽極酸化法により調製された無機蛍光ナノ粒子を用いて、上述と同じ方法により蛍光標識物質を

製造し、これをサンプルCとした。

[0055] (オリゴヌクレオチドを中間位置させた修飾基の導入: サンプルBおよびD)

まず、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子を30% H_2O_2 中に10分間分散させ、結晶表面を水酸化させた。次に、溶剤をトルエンに置換し、メルカプトエチルトリエトキシシランをトルエンの2%加えて、2時間かけて無機蛍光ナノ粒子の最表面の SiO_2 をシラン化すると共にメルカプト基を導入した。続いて、溶剤を純水に置換してバッファ塩を添加し、さらに一方の末端にメルカプト基を導入し、他方の末端にメチルオキシカルボニル基を導入したオリゴヌクレオチドを100nMとなるように加えて1時間放置することで、メルカプト基をスルフィド結合させることにより無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとを結合させた。この無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとが結合している状態は、サンプルAの修飾基の末端部にさらにメチルオキシカルボニル基が結合している状態に相当する。このようにして得られた蛍光標識物質をサンプルBとした。

[0056] また、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子に代えて、陽極酸化法により調製された無機蛍光ナノ粒子を用いて、上述と同じ方法により蛍光標識物質を製造し、これをサンプルDとした。

[0057] (DNA塩基末端修飾基の導入: サンプルE)

まず、HFエッチング法により得られた無機蛍光ナノ粒子を平均粒径1.5nm、2.0nm、2.5nm、3.0nmの4つのサイズ別に分けた。それぞれについて、サンプルAの調製の場合と同様に最表面の SiO_2 をシラン化するとともにメルカプト基を導入した。続いて、溶剤を純水に置換しバッファ塩を添加し、さらに一端にメルカプト基の導入されたアデニン塩基を100nMになるように加えて1時間放置し、メルカプト基同志でスルフィドを形成することで、末端にアデニン塩基を結合させた。同様にしてグアニン塩基、シトシン塩基、チミン塩基を末端にもつ修飾基を導入した無機蛍光ナノ粒子を調製した。これら4つの修飾基の異なるサイズの異なるSi量子ドットを混合することでサンプルEとした。

[0058] (DNA解析方法)

マイクロアレイスライドのウェルにあらかじめオリゴヌクレオチドが末端に結合された

無機蛍光ナノ粒子を入れておき、検出対象DNAを滴下後、恒温層等に移し、ウェル内を数十度に加熱し、加湿化された条件で1日インキュベーションした。この際、互いの塩基配列が対応したオリゴヌクレオチドと検出対象DNAとが同一のウェルにある場合には、それらがハイブリダイゼーション反応を起こす。

- [0059] 続いて、ウェルを純水等で洗浄し、ハイブリダイゼーション反応を起こしていないウェル内のオリゴヌクレオチドを結合した蛍光標識物質(サンプルA)を除去する。この結果、ウェル内にはハイブリダイゼーション反応を起こしたオリゴヌクレオチド結合無機蛍光ナノ粒子が残存することとなる。
- [0060] 続いて、蛍光顕微鏡(オリンパス社製)を用いて、430nmの励起光を所定のウェルに照射したときの、蛍光アドレス情報を検出し、目視で検出精度を判断した。検出精度は明らかに蛍光が明るくハイブリダイゼーションを起こしているマップが明確わかる場合は良好とし、蛍光強度が低く一見してわかりづらい場合には検出不良とした。また、別途、インキュベートしてハイブリダイゼーションを起こさせたサンプルを日本分光社製FP-6500を用いて400nm励起光を照射したときの蛍光強度を測定した。
- [0061] サンプルB、CおよびDについても上記サンプルAの場合と同様に測定を行った。これらの蛍光強度、目視検出精度に関する結果を表1に示す。なお、蛍光強度はサンプルBを100とした時の相対値で示している。
- [0062] 表1に示されたように、本発明に従って末端部分に相補結合する部位を導入することによって蛍光強度が増大し、DNAに対する検出精度も大きく向上することがわかる。
- [0063] またサンプルEについても検出対象DNAとウェル上で混合しマイクロアレイスライドのウェル上で検出することによりDNAの塩基配列を異なる色の配列で表すことができ、DNA配列情報を知ることができる。アデニン塩基修飾無機蛍光ナノ粒子は青色、グアニン塩基修飾無機蛍光ナノ粒子は青緑、シトシン塩基修飾無機蛍光ナノ粒子は緑、チミン塩基修飾無機蛍光ナノ粒子は赤色であった。
- [0064] [表1]

サンプル	無機蛍光ナノ粒子 の 製造方法	修飾基の種類	蛍光強度： サンプルBを基準(100) とした相対強度	検出精度 (目視)	備考
A	HFエッチング法	末端：オリゴヌクレオチド	150	良好	本発明
B	HFエッチング法	中間位置：オリゴヌクレオチド (サンプルAと同じもの)	100	検出不良	比較
C	陽極酸化法	末端：オリゴヌクレオチド (サンプルAとは異なる塩基配列のもの)	160	良好	本発明
D	陽極酸化法	中間位置：オリゴヌクレオチド (サンプルCと同じもの)	98	検出不良	比較

[0065] 実施例2

(オリゴヌクレオチド末端修飾基の導入：サンプルA2およびサンプルC2)

実施例1で作製したHFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子を2つに分けた。

- [0066] まず一方を用いて、30% H_2O_2 中に10分間分散させ、結晶表面を水酸化させた。次に、溶剤をトルエンに置換し、メルカプトプロピルトリエトキシシランとアミノプロピルトリエトキシシランとを4:1の割合で混合した混合物をトルエンの2%加えて、2時間かけて無機蛍光ナノ粒子の最表面の SiO_2 をシラン化すると共に、4:1の割合の表面積でメルカプト基およびアミノ基を導入した。続いて、溶剤を純水に置換してバッファ塩を添加し、さらに一端にメルカプト基の導入されたオリゴヌクレオチドを100nMとなるように加えて1時間放置することで、メルカプト基同士をスルフィド結合させ、無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとを結合させた。
- [0067] 残る他方については、上記アミノプロピルトリエトキシシランの代わりにアルデヒド基が導入されたシランカップリング剤を用いた以外は上記と同様の方法にて、4:1の割合の表面積でメルカプト基およびアルデヒド基を導入し、さらに一端にメルカプト基の導入されたオリゴヌクレオチドを結合させた。
- [0068] この2種類の無機蛍光ナノ粒子を30°Cで2時間混合させ、得られた蛍光標識物質をサンプルA2とした。サンプルAはIR、分子量解析によりアミノ基とアルデヒド基が反応してリンクを形成し、無機蛍光ナノ粒子ナノ粒子が平均6つ集ったクラスターを形成していることが分かった。
- [0069] また、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子に代えて、陽極酸化法により調製された無機蛍光ナノ粒子を用いて、上述と同じ方法により蛍光標識物質を製造し、これをサンプルC2とした。
- [0070] (オリゴヌクレオチドを中間位置させた修飾基の導入: サンプルB2)
まず、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子を30% H_2O_2 中に10分間分散させ、結晶表面を水酸化させた。次に、溶剤をトルエンに置換し、メルカプトエチルトリエトキシシランをトルエンの2%加えて、2時間かけて無機蛍光ナノ粒子の最表面の SiO_2 をシラン化すると共にメルカプト基を導入した。続いて、溶剤を純水に置換してバッファ塩を添加し、さらに一方の末端にメルカプト基を導入し、他方の末端にメチルオキシカルボニル基を導入したオリゴヌクレオチドを100nMとなるように加えて1時間放置することで、メルカプト基をスルフィド結合させることにより無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとを結合させた。このようにして得られた蛍光標識物質をサン

プルB2とした。これは、本発明における生体物質結合修飾基のみが導入された状態のものである。

[0071] また、HFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子に代えて、陽極酸化法により調製された無機蛍光ナノ粒子を用いて、上述と同じ方法により蛍光標識物質を製造し、これをサンプルD2とした。

(オリゴヌクレオチドを中間に位置させ、リンクされた修飾基の導入、:サンプルE2)

実施例1で作製したHFエッチング法により調製された無機蛍光ナノ粒子を2つに分けた。

[0072] まず一方を用いて、30% H_2O_2 中に10分間分散させ、結晶表面を水酸化させた。次に、溶剤をトルエンに置換し、メルカプトプロピルトリエトキシシランとアミノプロピルトリエトキシシランとを4:1の割合で混合した混合物をトルエンの2%加えて、2時間かけて無機蛍光ナノ粒子の最表面の SiO_2 をシラン化すると共に、4:1の割合の表面積でメルカプト基およびアミノ基を導入した。続いて、溶剤を純水に置換してバッファ塩を添加し、さらに一方の末端にメルカプト基を導入し、他方の末端にメチルオキシカルボニル基を導入したオリゴヌクレオチドを100nMとなるように加えて1時間放置することで、メルカプト基をスルフィド結合させることにより無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとを結合させた。

[0073] 残る他方については、上記アミノプロピルトリエトキシシランの代わりにアルデヒド基が導入されたシランカップリング剤を用いた以外は上記と同様の方法にて、4:1の割合の表面積でメルカプト基およびアルデヒド基を導入し、さらに一方の末端にメルカプト基を導入し、他方の末端にメチルオキシカルボニル基を導入したオリゴヌクレオチドを100nMとなるように加えて1時間放置することで、メルカプト基をスルフィド結合させることにより無機蛍光ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとを結合させた。

[0074] この2種類の無機蛍光ナノ粒子を30°Cで2時間混合させ、得られた蛍光標識物質をサンプルE2とした。サンプルAはIR、分子量解析によりアミノ基とアルデヒド基が反応してリンクを形成し、無機蛍光ナノ粒子が平均6つ集ったクラスターを形成していることが分かった。

[0075] 上記に記載の方法で作製したA2-E2を実施例1と同様の方法でDNA解析を行っ

た。

これらの蛍光強度、目視検出精度に関する結果を表2に示す。なお、蛍光強度はサンプルB2を100としたときの相対値で示している。

[0076] 表2に示されたように、本発明に従ってリンク形成修飾基を導入した蛍光標識物質を用いることにより蛍光強度が増大し、DNAに対する検出精度も大きく向上することがわかる。

[0077] [表2]

サンプル	無機蛍光ナノ粒子 の 製造方法	修飾基の種類	蛍光発光強度： サンプルB2を基準(100) とした相対強度	検出精度 (目視)	備考
A 2	HFエッチング法	末端：オリゴヌクレオチド	190	良好	本発明
B 2	HFエッチング法	中間位置：オリゴヌクレオチド (サンプルA2と同じもの)	100	検出不良	比較
C 2	陽極酸化法	末端：オリゴヌクレオチド (サンプルA2とは異なる塩基配列のもの)	180	良好	本発明
D 2	陽極酸化法	中間位置：オリゴヌクレオチド (サンプルC2と同じもの)	98	検出不良	比較
E 2	HFエッチング法	中間位置：オリゴヌクレオチド(サンプルA2と同じもの)でリンク形成修飾基有り	130	良好	本発明

請求の範囲

- [1] 無機蛍光ナノ粒子からなる生体物質の蛍光標識物質であって、該無機蛍光ナノ粒子の表面に結合した修飾基を有し、該修飾基は生体物質と特異的に結合する部位を有し、該生体物質と特異的に結合する部位は、DNAもしくはRNAを構成する塩基、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよびインターカレーター少なくとも1つを含み、かつ該無機蛍光ナノ粒子の表面から最も離れた位置に位置することを特徴とする生体物質の蛍光標識物質。
- [2] 前記無機蛍光ナノ粒子が、粒径が1～10nmの球状の半導体ナノ粒子であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [3] 前記無機蛍光ナノ粒子が、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子であることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [4] 前記コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子のコアがSiであり、シェルがSiO₂であることを特徴とする請求の範囲第3項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [5] 前記無機蛍光ナノ粒子が、無機蛍光ナノ粒子同士が互いに連結するための修飾基であるリンク形成修飾基を有することを特徴とする請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [6] 無機蛍光ナノ粒子からなり、該無機蛍光ナノ粒子の表面に、生体物質と特異的に結合する部位を有する修飾基と、該無機蛍光ナノ粒子同士が互いに連結するための修飾基であるリンク形成修飾基とを有することを特徴とする生体物質の蛍光標識物質。
- [7] 前記リンク形成修飾基を形成する分子の無機蛍光ナノ粒子における表面被覆率が10～50%であることを特徴とする請求の範囲第6項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [8] 前記無機蛍光ナノ粒子は、粒径が1～10nmの球状の無機蛍光ナノ粒子であることを特徴とする請求の範囲第6または7項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [9] 前記無機蛍光ナノ粒子は、半導体のコアと、該コアとは異なる組成からなり該コアを被覆する層状のシェルとで構成される、コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子で

あることを特徴とする請求の範囲第6～8項のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。

- [10] 前記コアシェル構造を有する無機蛍光ナノ粒子のコアがSiであり、シェルがSiO₂であることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [11] 前記リンク形成修飾基を介して水素結合、イオン結合、共有結合またはファンデルワールス力により前記無機蛍光ナノ粒子同士が互いに連結していることを特徴とする請求の範囲第6～10項のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [12] 前記無機蛍光ナノ粒子が互いに連結することによって、粒子数が2～20の無機蛍光ナノ粒子クラスターを形成していることを特徴とする、請求の範囲第6～11のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質。
- [13] 生体物質の蛍光標識方法であって、請求の範囲第1～12項のいずれか1項に記載の生体物質の蛍光標識物質を用い、前記無機蛍光ナノ粒子を前記生体物質と特異的に結合する部位を有する修飾基を介して生体物質に結合させることを特徴とする生体物質の蛍光標識方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/051255

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/58(2006.01)i, C09K11/59(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)n

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)
G01N33/58, C09K11/59, C12N15/09, C12Q1/68, G01N21/78, C12M1/00

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-539454 A (The Regents of the University of Michigan), 19 November, 2002 (19.11.02), & WO 2000/55631 A1 & AU 200037127 A & US 6207392 B & EP 1166118 A1	1-13

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 24 April, 2007 (24.04.07)	Date of mailing of the international search report 01 May, 2007 (01.05.07)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051255

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:

Although the technical feature of the invention according to claim 1 and the inventions according to claims depending on claim 1 (invention group 1) agrees with the technical feature of the invention according to claim 6 and the inventions according to claims depending on claim 6 (invention group 2), in being an inorganic fluorescent nanoparticle which carries a modifying group having a site specifically binding to a biomaterial, an inorganic fluorescent nanoparticle having a site specifically binding to a biomaterial is a technique that had been publicly known prior to the application of the present case, as disclosed in Patent Document JP 2005-172429A presented by the applicant of (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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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/JP2007/051255

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

the present case. Therefore, the technical feature as described above makes no contribution over prior art.

Such being the case, there is no special technical feature common to the invention group 1 and the invention group 2 and, therefore, these invention groups do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/58(2006.01)i, C09K11/59(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, C12M1/00(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 (IPC)) Int.Cl. G01N33/58, C09K11/59, C12N15/09, C12Q1/68, G01N21/78, C12M1/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007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		
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)		
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 請求の範囲の番号
X	JP 2002-539454 A (サ・リージ・エンツ・オブ・サ・エハバーシティー・オブ・カリフォルニア) 2002.11.19 & WO 2000/55631 A1 & AU 200037127 A & US 6207392 B & EP 1166118 A1	1-13
<input 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。		
* 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 24.04.2007	国際調査報告の発送日 01.05.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 宮澤 浩	2 J 9 4 0 7
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

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 (PCT17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. 請求の範囲 _____ 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. 請求の範囲 _____ 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. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT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。

請求の範囲1及び請求の範囲1を引用する請求の範囲に係る発明(発明1)と、請求の範囲6及び請求の範囲6を引用する請求の範囲に係る発明(発明2)の技術的特徴は、生体物質と特異的に結合する部位を有する修飾基を有する無機蛍光ナノ粒子である点で一致するが、生体物質と特異的に結合する部分を有する無機蛍光ナノ粒子は、本願出願人が提示する特許文献: JP 2005-172429 A においても明らかにされているように、本願出願前に公知の技術であるから、上記技術的特徴は先行技術に対して貢献するものではない。

したがって、発明1および発明2の間には共通する特別な技術的特徴が存在しないものであるから、単一性を満たしていない。

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の範囲について作成した。
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の範囲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の範囲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の範囲について作成した。

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を伴う異議申立てがなかった。