

(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
2024年12月12日(12.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/252945 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2024/019022

(22) 国際出願日:

2024年5月23日(23.05.2024)

(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 2023-092423 2023年6月5日(05.06.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP). 株式会社ダイセル (DAICEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町 3 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 水落 憲和 (MIZUOCHI, Norikazu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 大木出 (OHKI, Izuru); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 藤原 正規 (FUJIWARA, Masanori); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 蘇

梓傑 (SO, Tzekit); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 森岡 直也 (MORIOKA, Naoya); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

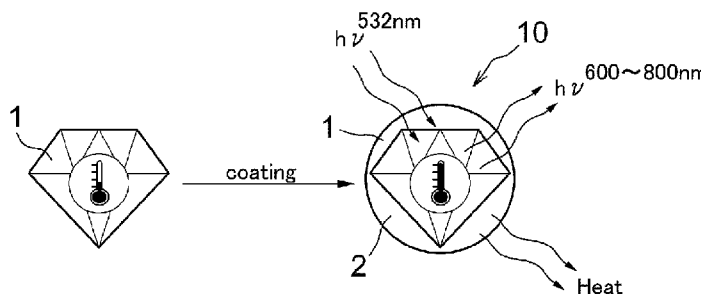
(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1 - 7 - 1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

(54) Title: FLUORESCENT PROBE AND OBSERVATION METHOD USING FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称: 蛍光プローブおよび蛍光プローブを用いた観察方法



(57) Abstract: Provided is an improved fluorescent probe for making it possible to remove and reduce autofluorescence without irradiating microwaves onto a diamond having a luminescent center. The fluorescent probe (10) has a substance (2) coated onto a surface of diamond particles (1) having a luminescent center, the substance (2) absorbing light and emitting heat. The relationship between the intensity of light irradiated onto the fluorescent probe (10) and the intensity of fluorescence emitted from the fluorescent probe (10) is non-linear.

(57) 要約: 発光中心を有するダイヤモンドへマイクロ波を照射することなく自家蛍光を除去または低減することを可能とするための、改良された蛍光プローブを提供する。蛍光プローブ(10)は、発光中心を有するダイヤモンド粒子(1)の表面に、光を吸収して熱を放出する物質(2)がコーティングされている。蛍光プローブ(10)に照射される光の強度と蛍光プローブ(10)から放出する蛍光の強度との関係は非線形である。

[続葉有]

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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： 蛍光プローブおよび蛍光プローブを用いた観察方法 技術分野

[0001] 本発明は、発光中心を有するダイヤモンドを用いた蛍光プローブおよび蛍光プローブを用いた観察方法に関する。

背景技術

[0002] ダイヤモンドの結晶構造において、窒素－空孔中心と呼ばれる複合欠陥が見られることがある。この窒素－空孔中心は、結晶格子の炭素原子の位置に置き換わる形で入った窒素原子と、その窒素原子の隣接位置に存在する（炭素原子が抜けている）空孔との対からなるもので、NV中心（Nitrogen Vacancy center）とも呼ばれている。ダイヤモンドの結晶構造には、NV中心以外にも、珪素－空孔中心（Silicon Vacancy center）と呼ばれる複合欠陥や、ゲルマニウム－空孔中心（Germanium Vacancy center）と呼ばれる複合欠陥が見られることがある。NV中心を含むこれら複合欠陥は、色中心または発光中心と呼ばれている。

[0003] ダイヤモンドは、このような発光中心に由来するユニークな光学特性や磁気的特性を有している。炭素原子からなる物質であることから、ダイヤモンドは生体への毒性が極めて低いと考えられており、生体適合性も高い。表面への化学修飾も容易であることから、ダイヤモンドは、量子情報素子や電子回路素子の材料としての利用にとどまらず、生物医学の分野における診断や治療、イメージングに用途が拡大している。例えばこのような発光中心を有するダイヤモンドを生体の細胞内に導入し、蛍光顕微鏡や共焦点レーザ顕微鏡等を用いて細胞の内部を観察することが行われている。

[0004] 例えば特許文献1には、NV中心を有するダイヤモンドを蛍光プローブとして細胞内部に取り入れて、細胞内部の蛍光プローブから放出される蛍光強度の二次元的な視野観察を行うことが開示されている。自家蛍光は、蛍光を観察する際の信号雑音比（S/N比）の問題の一つとして知られており、特

許文献1では、自家蛍光は、NV中心を有するダイヤモンドから放出される蛍光強度が電子スピン磁気共鳴（ESR）時に減少することを利用して除去されている。磁気共鳴は、NV中心を有するダイヤモンドに、高周波発振器を用いて特定の周波数でマイクロ波を照射することにより生じさせている。

[0005] また例えば非特許文献1には、生体分子で官能基化した蛍光ナノダイヤモンドを用いてウイルスを高感度に検出するための、*in vitro*バイオセンシングが開示されている。自家蛍光は、マイクロ波による変調を観測することにより除去されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2011-180570号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Miller, B.S., Bezing, L., Gliddon, H.D. et al. “Spin-enhanced nanodiamond biosensing for ultrasensitive diagnostics”, *Nature* 587, 588-593 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2917-1>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 自家蛍光を除去するために、これまではマイクロ波を発生し照射する装置が用いられている。発光中心を有するダイヤモンドを蛍光プローブとして利用することをさらに促進するために、自家蛍光をより簡便に除去または低減することが求められている。

[0009] 本発明は、発光中心を有するダイヤモンドへマイクロ波を照射することなく自家蛍光を除去または低減することを可能とするための、改良された蛍光プローブを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を進めていたところ、図1に示すように、発光中心を有するダイヤモンド粒子の表面に、光を吸収

して熱を放出する物質をコーティングしたものを蛍光プローブとして用いると、図3（A）に示すように、蛍光プローブに照射する光の強度と蛍光プローブから放出される蛍光の強度との間に非線形性が生じていることを見出した。

[0011] よって、図3（B）に観察方法の要点を示すように、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であるこのような蛍光プローブに、第1および第2の強度 I_1 、 I_2 で光を照射することにより、第1および第2の蛍光画像 F_1 、 F_2 を作成し、作成したそれら第1および第2の蛍光画像 F_1 、 F_2 の間で蛍光強度の差分をとる。これにより、磁気共鳴を生じさせるためのマイクロ波を蛍光プローブへ照射することなく、自家蛍光を除去または低減した蛍光画像を観察することができる。図6（B）や図12（B）に示すように、蛍光強度の差分をとった蛍光画像では自家蛍光が除去または低減されており、蛍光プローブから放出される蛍光の強度が相対的に強調されている。

[0012] すなわち、上記課題を解決するための本発明は、例えば以下に示す態様を含む。

（項1）

発光中心を有するダイヤモンド粒子の表面に、光を吸収して熱を放出する物質がコーティングされている蛍光プローブ。

（項2）

照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形である、項1に記載の蛍光プローブ。

（項3）

前記コーティングにフリーラジカルが加えられている、項1または2に記載の蛍光プローブ。

（項4）

前記物質は、色素分子、グラフェン、グラファイト、カーボンナノチューブ、高分子化合物、金属ナノ粒子、有機ナノ粒子、および無機ナノ粒子の少

なくとも一つを含む、項 1 から 3 のいずれか一項に記載の蛍光プローブ。

(項 5)

前記物質はポリドーパミンである、項 1 から 3 のいずれか一項に記載の蛍光プローブ。

(項 6)

前記発光中心は珪素－空孔複合欠陥である、項 1 から 5 のいずれか一項に記載の蛍光プローブ。

(項 7)

項 1 から 6 のいずれか一項に記載の蛍光プローブに第 1 の強度で光を照射して、第 1 の蛍光画像を作成する第 1 の蛍光画像作成ステップと、

前記蛍光プローブに前記第 1 の強度より高い第 2 の強度で光を照射して、第 2 の蛍光画像を作成する第 2 の蛍光画像作成ステップと、

前記第 1 の蛍光画像と前記第 2 の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとり、前記蛍光プローブに前記第 2 の強度で光を照射したときに前記蛍光プローブから放出される蛍光の強度が相対的に強調された強調画像を作成する強調画像作成ステップと、

を含む、蛍光プローブを用いた観察方法。

(項 8)

前記強調画像作成ステップは、

前記第 1 の強度と前記第 2 の強度との比率に基づいて、前記第 1 の蛍光画像および前記第 2 の蛍光画像の一方の蛍光強度を補正し、補正した一方の蛍光画像と他方の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとることにより、前記強調画像を作成する、項 7 に記載の観察方法。

(項 9)

前記第 2 の蛍光画像作成ステップは、前記蛍光プローブから放出されて波長フィルタを通過する蛍光から前記第 2 の蛍光画像を作成し、

前記波長フィルタは、前記蛍光プローブに含まれる発光中心のゼロフォノン線の波長より長波長を透過するロングパスフィルタである、項 7 または 8

に記載の観察方法。

(項 10)

前記第 1 の蛍光画像作成ステップは、前記蛍光プローブから放出されて波長フィルタを通過する蛍光から前記第 1 の蛍光画像を作成し、

前記波長フィルタは、前記蛍光プローブに含まれる発光中心のゼロフォノン線の波長より短波長を透過するショートパスフィルタである、項 7 または 8 に記載の観察方法。

発明の効果

[0013] 本発明によると、発光中心を有するダイヤモンドヘマイクロ波を照射することなく自家蛍光を除去または低減することを可能とするための、改良された蛍光プローブを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]一実施形態に係る蛍光プローブの概要を説明するための模式的な図である。

[図2]蛍光観察に用いる装置を説明するための図である。

[図3]蛍光観察の方法を説明するための図である。

[図4]アナログ式の音響光学変調素子 (AOM) の機能を説明するための図である。

[図5]実施例 1 ないし実施例 3 において、実施例および比較例としてガラス基板上に作製した 3 種類の蛍光プローブを模式的に表す図である。

[図6]実施例 1 において観察された蛍光画像であり、実施例および比較例に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像である。

[図7]実施例 1 において測定されたスペクトルであり、実施例に係る蛍光プローブである、ポリドーパミンで表面がコーティングされている PD-SiV から放出される蛍光のスペクトルである。

[図8]実施例 1 において測定されたスペクトルであり、実施例に係る蛍光プローブである、ポリドーパミンで表面がコーティングされている PD-SiV から放出される蛍光のスペクトルである。

[図9]実施例1において測定されたスペクトルであり、比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-SiVから放出される蛍光のスペクトルである。

[図10]実施例1において測定されたスペクトルであり、比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-NVから放出される蛍光のスペクトルである。

[図11]実施例1において測定されたスペクトルであり、比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-NVから放出される蛍光のスペクトルである。

[図12]実施例2において観察された蛍光画像であり、実施例および比較例に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像である。

[図13]実施例2において測定されたスペクトルであり、実施例に係る蛍光プローブである、ポリドーパミンで表面がコーティングされているPD-SiVから放出される蛍光のスペクトルである。

[図14]実施例2において測定されたスペクトルであり、比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-SiVから放出される蛍光のまたは表面がコーティングされていないD-NVから放出される蛍光のスペクトルである。

[図15]実施例3に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像である。

[図16]図15中にラベル「PD-SiV」で示す蛍光のスペクトルである。

[図17]図15中にラベル「Bkg1」または「Bkg2」で示す蛍光のスペクトルである。

[図18]実施例3に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像であり、蛍光プローブに異なる強度で光を照射したときのそれぞれの蛍光画像である。

[図19]図18に示す蛍光画像のうち、図15中にラベル「Bkg1」および「Bkg2」で示す部分を含む蛍光画像である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施形態を、添付の図面を参照して詳細に説明する。なお、以下の説明および図面において、同じ符号は同じまたは類似の構成要素を示すこととし、よって、同じまたは類似の構成要素に関する重複した説明を省略する。

[0016] [蛍光プローブ]

図1は、一実施形態に係る蛍光プローブの概要を説明するための模式的な図である。一実施形態に係る蛍光プローブ10は、発光中心を有するダイヤモンド粒子1の表面に、光を吸収して熱を放出する物質2がコーティングされている。

[0017] 蛍光プローブ10に用いるダイヤモンド1は、発光中心を有するダイヤモンドである。発光中心は、励起波長の光が照射されると蛍光を放出する。発光中心の種類は、例えばNV中心（窒素－空孔中心）や、SiV中心（珪素－空孔中心）、GeV中心（ゲルマニウム－空孔中心）である。本実施形態では、発光中心はSiV中心である。

[0018] ダイヤモンド1のサイズは、例えばナノサイズやマイクロサイズである。粒子の平均粒径が例えば約200nm未満から約5nm程度であるナノサイズのナノダイヤモンドが好ましいが、蛍光プローブとして用いることができる限りダイヤモンド1のサイズは制限されない。本実施形態では、ダイヤモンド1のサイズは、粒子の平均粒径が約1μmのマイクロダイヤモンドである。

[0019] ダイヤモンド1の表面にコーティングする物質2は、光を吸収して熱を放出する物質である。例示的には、光を吸収して熱を放出する物質2として、色素分子、グラフェン、グラファイト、カーボンナノチューブ、高分子化合物、金属ナノ粒子、有機ナノ粒子、および無機ナノ粒子等の物質をダイヤモンド1の表面にコーティングすることができる。本実施形態では、高分子化合物であるポリドーパミン（PDA）をダイヤモンド1の表面にコーティングする。ポリドーパミンは、メラニンを生産する原料となるアミノ酸誘導体

ドーパミンを重合させたものである。

[0020] 光を吸収して熱を放出する物質2がダイヤモンド粒子1の表面にコーティングされていることにより、蛍光プローブ10に光が照射されるとダイヤモンド1の内部の温度が上昇し、発光中心から放出される蛍光のスペクトルが変化する。これにより、発光中心の発光波長および発光強度の変化が増大し、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に非線形性が生じる。この非線形性は、蛍光プローブ10に照射される光の強度が増大するとより増大する。

[0021] 発光中心としてSiV中心を用いる場合、蛍光プローブ10に照射する光の波長は約500nm～700nmであり、このときにSiV中心から放出される蛍光の波長は約700nm～約800nmである。本実施形態では、蛍光プローブ10に照射する光の波長は約532nmである。

[0022] 好ましくは、蛍光プローブ10のコーティングにフリーラジカルを加えることができる。これにより、光の照射による物質2の高温化が促進し、発光中心の発光強度の変化が増大し、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に生じる非線形性がより増大する。本実施形態では、フリーラジカルとして機能する物質として、有機化合物のTEMPOをコーティングに加える。TEMPOは、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl)の略称である。

[0023] 後述する観察方法に沿って、蛍光プローブ10に発光中心の励起波長を含む光を照射して、蛍光プローブ10から放出される蛍光の蛍光画像を作成すると、図6(B)や図12(B)の蛍光画像に示すように、蛍光プローブ10から放出される蛍光の強度が相対的に強調されて、自家蛍光が除去または低減された蛍光画像を作成することができる。図6(A)や図12(A)の蛍光画像は、後述する観察方法でいう第2の蛍光画像F₂に相当する。

[0024] [観察装置]

図2は、蛍光観察に用いる装置を説明するための図である。(A)は、装置の概略的な構成を模式的に示す図である。(B)は、音響光学変調素子(A

OM)の機能を説明するための図である。

[0025] 図2(A)に示すように、一実施形態に係る観察装置20は、レーザ発生装置である光源21と、光をパルス化して出力する音響光学変調素子22 (Acoustic Optical Modulator: AOM) と、ダイクロイックミラー23と、ピエゾステージ24と、対物レンズ25と、集光レンズ26と、ピンホール27と、検出部28と、データ処理部29とを備えている。観察装置20は、第1および第2の強度 I_1 , I_2 で試料100に光を照射することにより、第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 を作成し、作成したそれら第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 の間で蛍光強度の差分をとることにより、自家蛍光が除去または低減された試料100の蛍光画像を作成する。観察装置20は、例えば共焦点レーザ顕微鏡を用いて構成することができる。

[0026] 光源21から照射される連続波レーザ光は、AOM22を通過してパルス化された後、ダイクロイックミラー23で反射されて、対物レンズ25により試料100上に集光される。試料100には、一実施形態に係る蛍光プローブ10が含まれており、試料100からすなわち蛍光プローブ10から放出される光は、対物レンズ25およびダイクロイックミラー23を通過した後、集光レンズ26で集光されて、ピンホール27を通過した後、フォトダイオードで構成される検出部28において強度が検出される。検出部28において検出された光の強度データは、検出部28に接続されたデータ処理部29において処理される。試料100に対する対物レンズ25の位置はピエゾステージ24により変化され、試料100に対する光の集光位置がスキャンされる。これにより、試料100の二次元の蛍光画像が作成される。検出部28が分光器で構成される場合、データ処理部29は、蛍光プローブ10から放出される蛍光のスペクトルを作成する。

[0027] 光源21から照射される光の波長は、試料100に含まれている蛍光プローブ10であるダイヤモンド1の発光中心を励起可能な波長を含む。本実施形態では、ダイヤモンド1の発光中心はSiV中心であり、光源21は波長が約532nm(緑色)の連続波レーザ光を照射する。AOM22はデジタ

ル式のAOMであり、AOM22に印加する電圧信号を制御することにより、AOM22がパルスを出力するタイミングが制御される。ダイクロイックミラー23は、本実施形態では約552nmのロングパスである。データ処理部29は、データを処理するプロセッサとデータを記録するメモリとを備える。データ処理部29は、公知の汎用コンピュータや、ノートブックPC、タブレット端末等の種々の情報端末装置を用いて構成することができる。

[0028] 図2(B)を参照し、AOM22が複数の異なる強度 I_1 、 I_2 で試料100に光を照射する態様の一例を説明する。図中、左側に示すグラフは、AOM22を通過する前のレーザ光強度の時間変化を示し、右側に示すグラフは、AOM22を通過した後のレーザ光強度の時間変化を示している。上段はレーザ光を第1の強度 I_1 で照射するケースを示し、下段はレーザ光を第2の強度 I_2 で照射するケースを示している。

[0029] 本実施形態では、連続波レーザ光をパルス化して出力するAOM22が、出力するパルスの粗密を制御することにより、右側のグラフに示すように、単位時間あたりの照射光強度に強弱をつける。これにより、AOM22は、複数の異なる強度 I_1 、 I_2 で試料100に光を照射する。本実施形態では、連続波レーザ光は、AOM22によりパルス化されて第1の強度 I_1 で照射され、連続波のまま第2の強度 I_2 で照射される。例示的には m 、レーザ光の強度は、第1の強度 $I_1 = 200 \mu W$ 、第2の強度 $I_2 = 2000 \mu W$ であり、第1の強度 $I_1 <$ 第2の強度 I_2 である。

[0030] [観察方法]

図3は、蛍光観察の方法を説明するための図である。(A)は、蛍光プローブに照射する光の強度と蛍光プローブから放出される蛍光の強度との関係を示すグラフである。(B)は、強度が異なる複数の蛍光画像 F_1 、 F_2 の間で蛍光強度の差分をとることにより自家蛍光が除去されることを説明するための模式的な図である。

[0031] 一実施形態に係る蛍光プローブを用いた観察方法は、
蛍光プローブに第1の強度で光を照射して、第1の蛍光画像を作成する第

1の蛍光画像作成ステップと、

前記蛍光プローブに前記第1の強度より高い第2の強度で光を照射して、
第2の蛍光画像を作成する第2の蛍光画像作成ステップと、

前記第1の蛍光画像と前記第2の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとり、
前記蛍光プローブに前記第2の強度で光を照射したときに前記蛍光プローブから放出される蛍光の強度が相対的に強調された強調画像を作成する強調画像作成ステップと、

を含む。

[0032] 照射光の強度補正を行う場合、前記強調画像作成ステップは、前記第1の強度と前記第2の強度との比率に基づいて、前記第1の蛍光画像および前記第2の蛍光画像の一方の蛍光強度を補正し、補正した一方の蛍光画像と他方の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとることにより、前記強調画像を作成する。

[0033] 図3(A)に示すように、一実施形態に係る蛍光プローブ10は、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に非線形性を有している。これに対し、光を吸収して熱を放出する物質2が表面にコーティングされていないベア(bare)な発光中心を有するダイヤモンド粒子1からの光や自家蛍光は、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に蛍光プローブ10ほどの大きな非線形性が生じておらず、蛍光プローブ10との比較では、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に概ね線形性の関係を有している。

[0034] 一実施形態に係る観察方法では、このような非線形性を有する蛍光プローブ10に、第1および第2の強度 I_1 、 I_2 で光を照射することにより、第1および第2の蛍光画像 F_1 、 F_2 を作成し、作成したそれら第1および第2の蛍光画像 F_1 、 F_2 の間で蛍光強度の差分をとる。これにより、磁気共鳴を生じさせるためのマイクロ波を蛍光プローブへ照射することなく、自家蛍光を除去または低減する。

[0035] 図2(A)および図3(B)を参照し、蛍光プローブ10を用いた観察方

法の一例を示す。まず、光源 21 から照射される光を、試料 100 表面の或る位置に集光させる。次に、試料 100 表面のその集光位置に第 1 の強度 I_1 で光を照射して、試料 100 から放出される光を検出し、第 1 の蛍光強度を検出する。引き続きそのままの集光位置に、第 1 の強度 I_1 より高い第 2 の強度 I_2 で光を照射して、試料 100 から放出される光を検出し、第 2 の蛍光強度を検出する。その後、ピエゾステージ 24 を用いて対物レンズ 25 の位置を変えながら、試料 100 上の光の集光位置をスキャンして、第 1 の蛍光強度および第 2 の蛍光強度の検出を各ピクセル毎に繰り返す。試料 100 に対する光の集光位置を例えばラスタースキャンすると、図 3 (B) に示すように、試料 100 上のラスタースキャンした平面領域に対応する、第 1 および第 2 の蛍光画像 $F_1(x, y)$, $F_2(x, y)$ がそれぞれ作成される。

[0036] 第 1 および第 2 の蛍光画像 F_1 , F_2 には、光を吸収して熱を放出する物質 2 がコーティングされている蛍光プローブ 10 から放出される蛍光に限らず、様々な放出源から放出される光が含まれている。第 1 および第 2 の蛍光画像 F_1 , F_2 には、例えば、光を吸収して熱を放出する物質 2 が表面にコーティングされていない、ベアな発光中心を有するダイヤモンド粒子 1 からの蛍光や、細胞からの意図しない蛍光である自家蛍光が含まれている。

[0037] 一実施形態に係る蛍光プローブ 10 では、図 3 (A) を参照して説明したように、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に非線形性が生じている。そして、第 1 の蛍光画像 F_1 と第 2 の蛍光画像 F_2 とでは、照射光の強度が変化しており、第 2 の強度 I_2 は第 1 の強度 I_1 より高い。よって、第 2 の蛍光画像 F_2 では、蛍光プローブ 10 から放出される光は、第 1 の蛍光画像 F_1 と比較して低い強度で写っている。これに対し、光を吸収して熱を放出する物質 2 が表面にコーティングされていないベアな発光中心を有するダイヤモンド粒子 1 からの光や自家蛍光は、第 1 の強度 I_1 から第 2 の強度 I_2 へ照射光の強度が増大することに伴い、第 2 の蛍光画像 F_2 では、第 1 の蛍光画像 F_1 と比較して強い強度で写っている。したがって、第 1 および第 2 の蛍光画像 $F_1(x, y)$, $F_2(x, y)$ の間で蛍光強度の差分を取ると、発光中

心を有するベアなダイヤモンド粒子1からの光や自家蛍光は除去されて、蛍光プローブ10から放出される光のみが画像内に残る。

[0038] 好ましくは、第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 の間で照射光の強度補正を行ったうえで、これら第1および第2の蛍光画像 $F_1(x, y)$, $F_2(x, y)$ の間で蛍光強度の差分を取る。照射光の強度補正は、第1の強度 I_1 と第2の強度 I_2 との比率に基づいて、第1の蛍光画像 F_1 および第2の蛍光画像 F_2 の一方の蛍光強度を補正し、補正した一方の蛍光画像と他方の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとることにより行う。例えば、第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 のうち、第1の蛍光画像 F_1 の蛍光強度を補正して、第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 の間で蛍光強度の差分をとる場合、照射光の強度補正は $| (I_2/I_1) F_1 - F_2 |$ と表すことができる。

[0039] 以上、一実施形態に係る蛍光プローブは、発光中心を有するダイヤモンドヘマイクロ波を照射することなく自家蛍光を除去または低減することを可能とする蛍光プローブである。

[0040] 一実施形態に係る蛍光プローブ10は、発光中心を有するダイヤモンド粒子1の表面に、光を吸収して熱を放出する物質2をコーティングしたものである。これにより、蛍光プローブ10に照射する光の強度と蛍光プローブから放出される蛍光の強度との間に非線形性を生じさせることができる。照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であるこのような蛍光プローブに、第1および第2の強度 I_1 , I_2 で光を照射することにより、第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 を作成し、作成したそれら第1および第2の蛍光画像 F_1 , F_2 の間で蛍光強度の差分をとる。これにより、磁気共鳴を生じさせるためのマイクロ波を蛍光プローブへ照射することなく、自家蛍光を除去または低減した蛍光画像を観察することが可能となる。マイクロ波の照射が不要になると、観察に用いる装置を小型化することが可能となる。これにより、例えば細胞やウイルスを対象した蛍光観察を行う際に、従来から用いている蛍光顕微鏡や共焦点レーザ顕微鏡等をそのまま用いて、S/N比が向上した蛍光画像を観察することが可能となる。蛍光プローブを用いる

蛍光画像の観察は、ウイルス検出や抗原抗体検査（イムノアッセイ）において行われており、一実施形態に係る蛍光プローブ10は、これらウイルス検出やイムノアッセイにおいて利用することができる。

[0041] このように、一実施形態に係る蛍光プローブによると、発光中心を有するダイヤモンドヘマイクロ波を照射することなく自家蛍光を除去または低減することが可能となる。一実施形態に係る蛍光プローブは、自家蛍光を除去するためにマイクロ波の照射を伴うタイプの蛍光プローブと比較して、例えば以下に例示する応用例において有利な効果を奏する。

[0042] 例えば、一実施形態に係る蛍光プローブを用いる蛍光観察において、生体NIRウィンドウ（約620–950nm）波長と呼ばれる近赤外域の波長の光を照射するレーザ光源を励起光源として使用すれば、マイクロ波が届かない組織深部や人体深部、ホールボディレベルにおいて、蛍光観察が可能となる。これは、自家蛍光を除去するためにマイクロ波の照射を伴うタイプの蛍光プローブと比較した有利な効果である。特に、ダイヤモンドの発光中心としてSiV中心を用いる場合には、SiV中心は、約600nm以上の波長が長い照射光であっても励起し蛍光を発するので有利である。また、一実施形態に係る蛍光プローブによると、光の吸収効率を高める事が可能となるため、光音響イメージングの新たな造影剤やイメージング剤としての利用が期待される。また、一実施形態に係る蛍光プローブは、光温熱療法（ハイパーサーミア）にも用いる事が可能である。例えば蛍光プローブを患者に投与し、EPR効果（血管透過性・滞留性亢進効果）で深部病変部位に到達したプローブを蛍光で確認し、同時にプローブの光吸収効率の高さを利用して光照射量を上げることで病変部位の選択的加熱・温熱治療が可能である。

[0043] [その他の形態]

以上、本発明を特定の実施形態によって説明したが、本発明は上記した実施形態に限定されるものではない。

[0044] 上記実施形態では、蛍光プローブを用いた観察方法において、第2の強度 I_2 が第1の強度 I_1 より高く、第1の強度 I_1 および第2の強度 I_2 （ $I_2 > I_1$ ）

1) の順で蛍光プローブ 10 に光を照射しているが、蛍光プローブ 10 に光を照射する順序はこれに制限されない。他の実施形態では、第 2 の強度 I_2 が第 1 の強度 I_1 より高く、第 2 の強度 I_2 ($I_2 > I_1$) および第 1 の強度 I_1 の順で蛍光プローブ 10 に光を照射してもよい。すなわち、一実施形態に係る蛍光プローブを用いた観察方法において、第 1 の蛍光画像作成ステップおよび第 2 の蛍光画像作成ステップを行う順序は入れ替わってもよい。請求の範囲に記載の蛍光プローブを用いた観察方法は、これら第 1 の蛍光画像作成ステップおよび第 2 の蛍光画像作成ステップを行う順序を入れ替えた態様も、請求の範囲に含む。

[0045] 図 4 は、アナログ式の音響光学変調素子 (AOM) の機能を説明するための図である。上記実施形態では、図 2 (B) の右側の上段および下段のグラフに示すように、AOM 22 を用いて出力するパルスの粗密を制御して、単位時間あたりの照射光強度に強弱をつけることにより、複数の異なる強度 I_1 , I_2 で試料 100 に光を照射しているが、照射光の強度を複数の異なる強度 I_1 , I_2 にする方法はこれに制限されない。例えば図 4 に例示するように、アナログ式の AOM を用いて連続波レーザ光の強度に強弱をつけてもよい。アナログ式の AOM 22 は、印加される電圧に応じて、出力光の強度に強弱をつけることができる。

[0046] 上記実施形態では、試料 100 から放出される光をそのまま検出して蛍光画像を作成しているが、試料 100 から放出されて波長フィルタを通過する光を検出して、蛍光画像を作成してもよい。波長フィルタは、例えばダイクロミックミラー 23 から検出部 28 の間の光学ラインに配置すればよい。後述する実施例においても言及するように、SiV 中心を含む発光中心は、放出する蛍光のピーク波長が、温度上昇に伴って長波長側にシフトする。したがって、第 1 の強度 I_1 より高い第 2 の強度 I_2 で光を照射して第 2 の蛍光画像 F_2 を作成する際に、光学ラインの上記した位置に配置されている、ゼロフォノン線の波長ピーク付近にエッジを有するロングパスフィルタを透過する光で第 2 の蛍光画像 F_2 を作成すれば、ロングパスフィルタは発光中心のゼロ

フォノン線の波長より長波長を透過するので、信号雑音比をさらに向上することができる。同様に、第1の強度 I_1 で光を照射して第1の蛍光画像 F_1 を作成する際に、ゼロフォノン線の波長ピーク付近にエッジを有するショートパスフィルタを透過する光で第1の蛍光画像 F_1 を作成すれば、信号雑音比をさらに向上することができる。

[0047] 以下に本発明の実施例を示し、本発明の特徴をより明確にする。

実施例 1

[0048] 実施例1では、本発明に係る蛍光プローブを実際に作製し、作製した蛍光プローブを用いて蛍光観察を行った。

[0049] 図5は、実施例1ないし実施例3において、実施例および比較例としてガラス基板上に作製した3種類の蛍光プローブを模式的に表す図である。本発明の実施例に係る蛍光プローブとして、S i V中心を有するマイクロダイヤモンド61aの表面にポリドーパミン(PDA)62をコーティングした蛍光プローブ(以下、PD-S i Vとも記載する)を、ガラス基板69上に作製した。比較例として、2種類の蛍光プローブを同じガラス基板69上に作製した。第1の比較例に係る蛍光プローブとして、S i V中心を有するマイクロダイヤモンド61a(以下、D-S i Vとも記載する)を作製した。第1の比較例に係る蛍光プローブでは、S i V中心を有するマイクロダイヤモンド61aの表面にポリドーパミン(PDA)をコーティングしていない。第2の比較例に係る蛍光プローブとして、NV中心を有するマイクロダイヤモンド61b(以下、D-NVとも記載する)を作製した。第2の比較例に係る蛍光プローブでは、NV中心を有するマイクロダイヤモンド61bの表面にポリドーパミン(PDA)をコーティングしていない。なお後述するように、実施例3では、実施例1, 2において用いたマイクロダイヤモンド61aよりもさらにサイズが小さいナノダイヤモンドを用いた。

[0050] 実施例に係る蛍光プローブは、次に説明する手順でガラス基板上に作製した。まず、超遠心機を用いて、マイクロダイヤモンドの溶媒をトリス塩酸緩衝液(pH約8.5)に置換した。次に、4mgのTEMPOを緩衝液に加

え、アイスバス超音波処理によりTEMPOを溶解させた。アイスバス超音波処理は、オンが10秒でオフが10秒のオンオフ繰り返しのサイクルで、合計10分間行った。次に、0.5mgの塩酸ドーパミン($(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$)粉末を緩衝液に加えた。塩酸ドーパミン粉末を加えた段階から重合反応が開始し、マイクロダイヤモンド表面へのポリドーパミン(PDA)コーティングが開始した。この間、上記した繰り返しのサイクルで、反応混合物にアイスバス超音波処理を継続して行った。コーティングの開始から2時間後に、混合物を洗浄して反応物(塩酸ドーパミン)を除去し、コーティング反応を一旦停止した。コーティングされたマイクロダイヤモンドは、超純水を加えてから超遠心機による分離作業(約9000rpm、10分間)を3回繰り返すことで回収した。ダイヤモンド表面へのこのようなコーティング反応を1~5回繰り返し行って、ポリドーパミンの膜厚を、弱いレーザ光強度であっても観察が可能な最適な膜厚に作製した。なお、分子間の凝集を防ぐために、1回あたりのコーティング反応時間は比較的短時間な2時間とした。マイクロダイヤモンドは、米国 Adamas Nanotechnologies, Inc. 製のSiVマイクロダイヤモンドを用いた。

[0051] 次に、作製した蛍光プローブを用いて蛍光観察を行った。蛍光観察は、ガラス基板上に作製した蛍光プローブに第1および第2の強度で光を照射して、強度が異なる第1および第2の蛍光画像を作成し、照射光の強度補正を行ったうえで、作成したそれら第1および第2の蛍光画像の間で蛍光強度の差分をとることにより行った。照射光の強度は第1の強度<第2の強度とした。蛍光プローブに照射する光の波長は約532nmであった。

[0052] 図6は、実施例1において観察された蛍光画像であり、蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像である。(A)は、作製した蛍光プローブに第1の強度より高い第2の強度で光を照射したときの第2の蛍光画像である。(B)は、照射光の強度補正を行ったうえで、第1および第2の蛍光画像の間で蛍光強度の差分をとった蛍光画像である。

[0053] (A)の蛍光画像に破線の枠で示すように、視野内には、ガラス基板上に

5つの蛍光が確認された。このうち、実施例に係るPD-SiVからの蛍光は2つであり、第1の比較例に係るD-SiVからの蛍光は1つであり、第2の比較例に係るD-NVからの蛍光は2つであった。

[0054] (A) および (B) の間で蛍光画像を対比した。(B) の蛍光画像に示されているように、実施例に係る蛍光プローブであるPD-SiVからの蛍光は、2つとも強度が相対的に強調されていることが確認された。これに対し、比較例に係る蛍光プローブである、D-SiVからの蛍光およびD-NVからの蛍光はどれも、ほぼ消失しているか、または、強度が相対的に低減されていることが確認された。

[0055] 次に、視野内のガラス基板上に確認されている5つの蛍光のそれぞれについて、蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルの測定結果を図7～図11に示す。なお、図7～図11の蛍光スペクトルでは、スペクトルの形を比較し易いように縦軸に示す蛍光強度を調整しており、測定された蛍光強度そのままの値ではない。

[0056] 図7および図8は、実施例1において測定されたスペクトルであり、実施例に係る蛍光プローブである、ポリドーパミンで表面がコーティングされているPD-SiVから放出される蛍光のスペクトルである。(B) は (A) に示す蛍光スペクトルのピーク波長付近での拡大図である。図7 (B) および図8 (B) の蛍光スペクトルに示すように、照射光の強度が増大 (Low から High へ) すると、検出される蛍光強度が低下することが確認された。これにより、実施例に係る蛍光プローブについて、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であることが確認された。あわせて、照射光の強度が増大すると、強度がピークとなる波長も長波長側にシフトしていることが確認された。

[0057] 図9は、実施例1において測定されたスペクトルであり、第1の比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-SiVから放出される蛍光のスペクトルである。(B) は (A) に示す蛍光スペクトルのピーク波長付近での拡大図である。図9 (B) の蛍光スペクトルに示すよ

うに、照射光の強度が増大（LowからHighへ）しても、検出される蛍光強度が低下していないことが確認された。検出される蛍光強度は、照射光の強度が増大すると僅かに増大していた。あわせて、照射光の強度が増大しても、強度がピークとなる波長のシフトは確認されなかった。

[0058] 図10および図11は、実施例1において測定されたスペクトルであり、第2の比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-NVから放出される蛍光のスペクトルである。図10および図11の蛍光スペクトルに示すように、照射光の強度が増大（LowからHighへ）しても、検出される蛍光強度が低下していないことが確認された。検出される蛍光強度は、照射光の強度が増大すると僅かに増大していた。あわせて、照射光の強度が増大しても、強度がピークとなる波長のシフトは確認されなかった。

[0059] 以上、実施例に係る蛍光プローブについて、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であることが確認された。実施例に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察によると、強度が異なる複数の蛍光画像の間で蛍光強度の差分をとることにより、実施例に係る蛍光プローブ以外からの蛍光はどれも、ほぼ消失しているか、または、強度が相対的に低減されていることが確認された。

実施例 2

[0060] 実施例2でも実施例1と同様に、作製した蛍光プローブを用いて蛍光観察を行った。実施例2では、実施例に係る蛍光プローブを、実施例1と同じ作製方法により、実施例1とは異なる別のガラス基板上に新たに作製した。作製に用いるマイクロダイヤモンドも、実施例1と同じ米国 Adamas Nanotechnologies, Inc. 製のSiVマイクロダイヤモンドとした。作製した蛍光プローブを用いた蛍光観察も、実施例1と同様に行った。

[0061] 図12は、実施例2において観察された蛍光画像であり、蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像である。（A）は、作製した蛍光プローブに第1の強度より高い第2の強度で光を照射したときの第2の蛍光画

像である。(B)は、照射光の強度補正を行ったうえで、第1および第2の蛍光画像の間で蛍光強度の差分をとった蛍光画像である。

[0062] (A)および(B)の間で蛍光画像を対比した。(B)の蛍光画像に示されているように、実施例に係る蛍光プローブであるPD-SiVからの蛍光は強度が相対的に強調されていることが確認された。これに対し、比較例に係る蛍光プローブである、D-SiVからの蛍光またはD-NVからの蛍光は、ほぼ消失しているか、または、強度が相対的に低減されていることが確認された。

[0063] 次に、視野内のガラス基板上に確認されている蛍光のそれぞれについて、蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルの測定結果を図13～図14に示す。なお、図13～図14の蛍光スペクトルも、図7～図11同様、スペクトルの形を比較し易いように縦軸に示す蛍光強度を調整しており、測定された蛍光強度そのままの値ではない。

[0064] 図13は、実施例2において測定されたスペクトルであり、実施例に係る蛍光プローブである、ポリドーパミンで表面がコーティングされているPD-SiVから放出される蛍光のスペクトルである。(B)は(A)に示す蛍光スペクトルのピーク波長付近での拡大図である。(B)の蛍光スペクトルに示すように、照射光の強度が増大(LowからHighへ)すると、検出される蛍光強度が低下することが確認された。これにより、実施例に係る蛍光プローブについて、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であることが確認された。あわせて、照射光の強度が増大すると、強度がピークとなる波長も長波長側にシフトしていることが確認された。

[0065] 図14は、実施例2において測定されたスペクトルであり、比較例に係る蛍光プローブである、表面がコーティングされていないD-SiVから放出される蛍光の、または、表面がコーティングされていないD-NVから放出される蛍光のスペクトルである。(B)は(A)に示す蛍光スペクトルのピーク波長付近での拡大図である。(B)の蛍光スペクトルに示すように、照射光の強度が増大(LowからHighへ)しても、検出される蛍光強度が

低下していないことが確認された。検出される蛍光強度は、照射光の強度が増大すると僅かに増大していた。あわせて、照射光の強度が増大しても、強度がピークとなる波長のシフトは確認されなかった。

[0066] 以上、実施例に係る蛍光プローブについて、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であることが確認された。実施例に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察によると、強度が異なる複数の蛍光画像の間で蛍光強度の差分をとることにより、実施例に係る蛍光プローブ以外からの蛍光はどれも、ほぼ消失しているか、または、強度が相対的に低減されていることが確認された。

実施例 3

[0067] 実施例 3 でも実施例 1 と同様に、本発明に係る蛍光プローブを実際に作製し、作製した蛍光プローブを用いて蛍光観察を行った。実施例 3 では、実施例 1, 2 において用いたマイクロダイヤモンドよりもさらにサイズが小さいナノダイヤモンドを用いた。

[0068] 実施例 3 において、ナノダイヤモンドは、爆轟法により得られる S i V ナノダイヤモンドを用いた。S i V ナノダイヤモンドは次の手順により調製した。

トリニトロトルエン (T N T) とシクロトリメチレントリニトラミン (R D X) を含む爆薬 1 0 0 質量部に、異原子化合物としてトリフェニルシラノールを 1 質量部又は添加した爆薬組成物約 1 k g を使用し、ナノダイヤモンド製造の常法に従い、ケイ素ドーブナノダイヤモンドを製造した。得られたケイ素ドーブナノダイヤモンドについて、以下の処理 (i) ~ (i v) を行った。なお、爆薬中のトリフェニルシラノールの添加量は 1 質量%であった。

(i) 混酸処理

濃硫酸 : 濃硝酸 = 1 1 : 1 (重量比) の混酸 2 8 0 0 g に爆轟試験で得たナノダイヤモンド 1 5 g を加え、攪拌しながら 1 5 0 ° C で 1 0 時間処理した。

(i i) アルカリ処理

8 Nの水酸化ナトリウム水溶液100 mLに混酸処理したナノダイヤモンド1 gを加え、攪拌しながら70℃で8時間処理した。

(i i i) 気相酸化処理

得られたSiドーブナノダイヤモンド原料をガス雰囲気気炉において、570℃、4%酸素雰囲気において2時間気相酸化処理を行い、Siドーブナノダイヤモンド粒子を得た。

得られたSiドーブナノダイヤモンド粒子について、顕微ラマン分光装置（商品名：顕微レーザーラマン分光光度計LabRAM HR Evolution、堀場製作所株式会社製）を用いて高速マッピング、738 nm輝点イメージングを行い、蛍光強度、輝点数（中心部、中間層、外周部）を測定した。さらに、全自動多目的X線回折装置（株式会社リガク製）を用いた粉末X線回折法（XRD）により一次粒子の平均サイズをシェラーの式に基づき測定した。さらに、Si導入量を蛍光X線分析装置ZSX Primus IV 株式会社リガク製を用いたXRFにより測定した。さらに、sp²炭素とsp³炭素のピーク面積比を顕微ラマン分光装置（商品名：顕微レーザーラマン分光光度計 LabRAM HR Evolution、堀場製作所株式会社製）を用いて、顕微ラマン分光法により測定した。測定には325 nmのレーザーを使用し、sp²炭素のピーク面積は1250 cm⁻¹と1328 cm⁻¹付近に現れるピークの面積を参照し、sp³炭素のピーク面積は1500 cm⁻¹と1590 cm⁻¹付近に現れるピークの面積を参照した。作製したナノダイヤモンドの平均粒径は約10.8 nmであった。

(i v) 高温長時間混酸処理

濃硫酸：濃硝酸＝3：1（重量比）の混酸に気相酸化処理（ i i i ）で得られたナノダイヤモンド粒子を加え、130℃で72時間混酸処理を行った。混酸処理したナノダイヤモンドは遠心分離により、回収し、純水で繰り返し洗浄を行った。洗浄後回収したナノダイヤモンドは乾燥工程を行って、ナノダイヤモンド粉体を得た。

[0069] 実施例3に係るS i V中心を有するナノダイヤモンドを用いた蛍光プローブは、アイスバス超音波処理をTEMP Oが溶解するまで継続（典型的には約10分間）する点以外は、実施例1と同じ手順でガラス基板上に作製した。作製に用いたナノダイヤモンドの平均粒径は約10.8nmであった。作製した蛍光プローブを用いた蛍光観察も、実施例1と同様に行った。ただし実施例3では実施例1と異なり、蛍光観察時のレーザ強度は、第1の強度 I_1 を第2の強度 I_2 より高く（ $I_1 > I_2$ ）した。

[0070] 図15は、実施例3に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像である。図15の蛍光画像は、作製した蛍光プローブに第1の強度 I_1 （ $I_1 > I_2$ ）で光を照射したときの第1の蛍光画像である。図中の蛍光画像に破線の枠で示すように、視野内には、ガラス基板上に3つの蛍光が確認された。このうち、実施例3に係る蛍光プローブであるPD-S i Vからの蛍光は1つであった。後述する図17に関する考察から、残り2つの蛍光は作製した実施例3に係る蛍光プローブからの蛍光ではないと考えられることから、以下の説明ではこれら2つの蛍光にはラベル「Bkg1」、「Bkg2」を付して説明する。

[0071] 図16は、図15中にラベル「PD-S i V」で示す蛍光のスペクトルである。（B）は（A）に示す蛍光スペクトルのピーク波長付近での拡大図である。なお（B）では蛍光強度の最大値が1になるように規格化している。

（A）の蛍光スペクトルに示すように、照射光の強度が低下（HighからLowへ）すると、検出される蛍光強度が増大することが確認された。これにより、実施例3に係る蛍光プローブについても、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であることが確認された。あわせて（B）の蛍光スペクトルに示すように、照射光の強度が低下すると、強度がピークとなる波長も低波長側にシフトしていることが確認された。

[0072] 図17は、図15中にラベル「Bkg1」または「Bkg2」で示す蛍光のスペクトルである。（A）は図15中にラベル「Bkg1」で示す蛍光のスペクトルであり、（B）は図15中にラベル「Bkg2」で示す蛍光のス

ペクトルである。(A) および (B) の蛍光スペクトルに示すように、ラベル「B k g 1」および「B k g 2」を付した蛍光については、照射光の強度が低下 (H i g h から L o w へ) しても、検出される蛍光強度が増大していないことが確認された。検出される蛍光強度は、照射光の強度が低下すると僅かに低下していた。あわせて、照射光の強度が低下しても、強度がピークとなる波長のシフトは確認されなかった。

[0073] 図 1 8 は、実施例 3 に係る蛍光プローブを用いた蛍光観察により得られた蛍光画像であり、蛍光プローブに異なる強度で光を照射したときのそれぞれの蛍光画像である。(A) は、作製した蛍光プローブに第 1 の強度で光を照射したときの第 1 の蛍光画像である。(B) は、作製した蛍光プローブに第 1 の強度より低い第 2 の強度で光を照射したときの第 2 の蛍光画像である。(C) は、照射光の強度補正を行ったうえで、第 1 および第 2 の蛍光画像間で蛍光強度の差分をとった蛍光画像である。なお (C) の蛍光画像において、右側の矢印で示す蛍光は、図 1 5 中にラベル「P D - S i V」で示す蛍光であり、左側の矢印で示す蛍光は、図 1 5 中にラベル「B k g 1」および「B k g 2」で示す蛍光である。

[0074] 図 1 8 の蛍光画像について考察する。照射光の強度と検出される蛍光強度との変化を蛍光画像 (A) ないし (C) にわたって確認したところ、図 1 5 中にラベル「P D - S i V」で示す蛍光に対応する、(C) の蛍光画像において右側の矢印で示す蛍光は、相対的な蛍光強度が非線形で変化していることが確認された。

[0075] 図 1 9 は、図 1 8 に示す蛍光画像のうち、図 1 5 中にラベル「B k g 1」および「B k g 2」で示す部分を含む蛍光画像である。

[0076] 図 1 9 の蛍光画像について考察する。照射光の強度と検出される蛍光強度との変化を蛍光画像 (A) ないし (C) にわたって確認したところ、蛍光強度の変化は概ね直線的であり、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との間に概ね線形性の関係があることが確認された。すなわち図 1 5 中にラベル「B k g 1」および「B k g 2」で示す蛍光については、強度が異なる複

数の蛍光画像の間で蛍光強度の差分をとることにより、蛍光がほぼ消失していることが確認された。

[0077] 以上、実施例 1, 2 において用いたマイクロダイヤモンドよりもさらにサイズが小さいナノダイヤモンドを用いた実施例 3 に係る蛍光プローブについても、実施例 1, 2 と同様に、照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形であることが確認された。

[0078] なお実施例 3 では、爆轟法により得られる SiV ナノダイヤモンドを用いて蛍光プローブを作製しているが、蛍光プローブの作製に用いるナノダイヤモンドは、爆轟法により得られるものに制限されない。ナノダイヤモンドへ異元素（例えば Si）をドーピングする爆轟法以外の方法としては、例えば高温高压（High Pressure and High Temperature, HPHT）法や、CVD 法、爆縮法などがある。例示するこれらの方法では、ダイヤモンドを合成するときに Si 元素を導入することにより、または、Si 元素を含有しないダイヤモンド粒子に対して後から Si イオンを注入することなどにより、SiV マイクロダイヤモンドまたは SiV ナノダイヤモンドを作製することができる。蛍光プローブの作製には、これらの方法により得られる複合欠陥を有するマイクロダイヤモンドまたはナノダイヤモンドを用いることができる。

符号の説明

- [0079] 1 ダイヤモンド
- 2 光を吸収して熱を放出する物質
- 10 蛍光プローブ
- 20 観察装置
- 21 光源
- 22 音響光学変調素子（AOM）
- 23 ダイクロイックミラー
- 24 ピエゾステージ
- 25 対物レンズ
- 26 集光レンズ

- 2 7 ピンホール
- 2 8 検出部
- 2 9 データ処理部
- 6 1 a S i V 中心を有するダイヤモンド
- 6 1 b N V 中心を有するダイヤモンド
- 6 2 ポリドーパミン (P D A)
- 6 9 ガラス基板
- 1 0 0 試料

請求の範囲

- [請求項1] 発光中心を有するダイヤモンド粒子の表面に、光を吸収して熱を放出する物質がコーティングされている蛍光プローブ。
- [請求項2] 照射される光の強度と放出する蛍光の強度との関係が非線形である、請求項1に記載の蛍光プローブ。
- [請求項3] 前記コーティングにフリーラジカルが加えられている、請求項1に記載の蛍光プローブ。
- [請求項4] 前記物質は、色素分子、グラフェン、グラファイト、カーボンナノチューブ、高分子化合物、金属ナノ粒子、有機ナノ粒子、および無機ナノ粒子の少なくとも一つを含む、請求項1に記載の蛍光プローブ。
- [請求項5] 前記物質はポリドーパミンである、請求項1に記載の蛍光プローブ。
- [請求項6] 前記発光中心は珪素－空孔複合欠陥である、請求項1に記載の蛍光プローブ。
- [請求項7] 請求項1から6のいずれか一項に記載の蛍光プローブに第1の強度で光を照射して、第1の蛍光画像を作成する第1の蛍光画像作成ステップと、
前記蛍光プローブに前記第1の強度より高い第2の強度で光を照射して、第2の蛍光画像を作成する第2の蛍光画像作成ステップと、
前記第1の蛍光画像と前記第2の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとり、前記蛍光プローブに前記第2の強度で光を照射したときに前記蛍光プローブから放出される蛍光の強度が相対的に強調された強調画像を作成する強調画像作成ステップと、
を含む、蛍光プローブを用いた観察方法。
- [請求項8] 前記強調画像作成ステップは、
前記第1の強度と前記第2の強度との比率に基づいて、前記第1の蛍光画像および前記第2の蛍光画像の一方の蛍光強度を補正し、補正した一方の蛍光画像と他方の蛍光画像との間で蛍光強度の差分をとる

ことにより、前記強調画像を作成する、請求項 7 に記載の観察方法。

[請求項9]

前記第 2 の蛍光画像作成ステップは、前記蛍光プローブから放出されて波長フィルタを通過する蛍光から前記第 2 の蛍光画像を作成し、

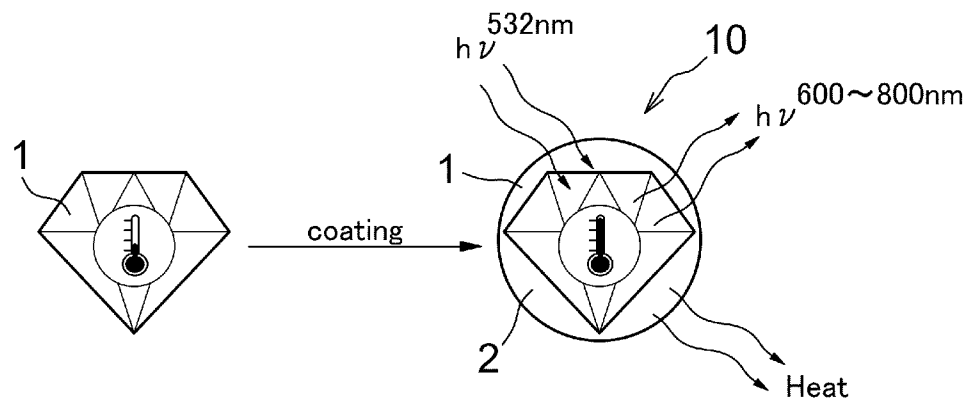
前記波長フィルタは、前記蛍光プローブに含まれる発光中心のゼロフォノン線の波長より長波長を透過するロングパスフィルタである、請求項 7 に記載の観察方法。

[請求項10]

前記第 1 の蛍光画像作成ステップは、前記蛍光プローブから放出されて波長フィルタを通過する蛍光から前記第 1 の蛍光画像を作成し、

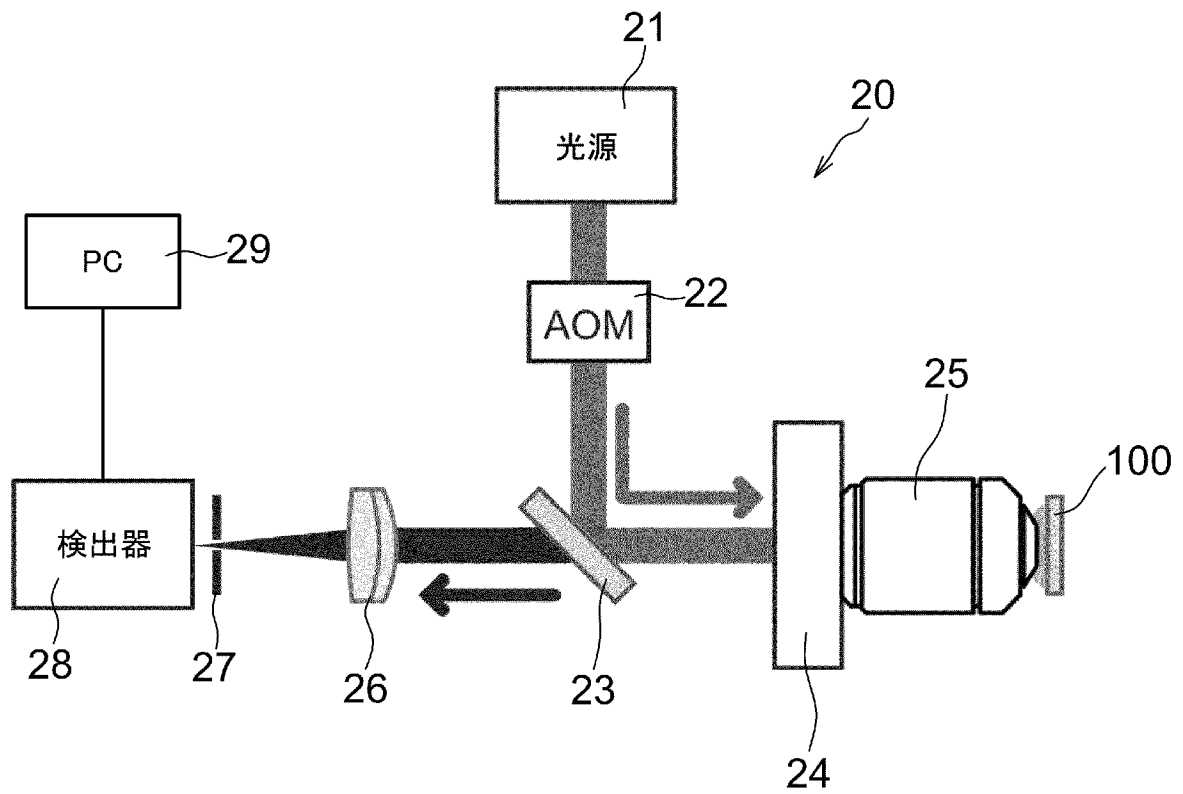
前記波長フィルタは、前記蛍光プローブに含まれる発光中心のゼロフォノン線の波長より短波長を透過するショートパスフィルタである、請求項 7 に記載の観察方法。

[図1]

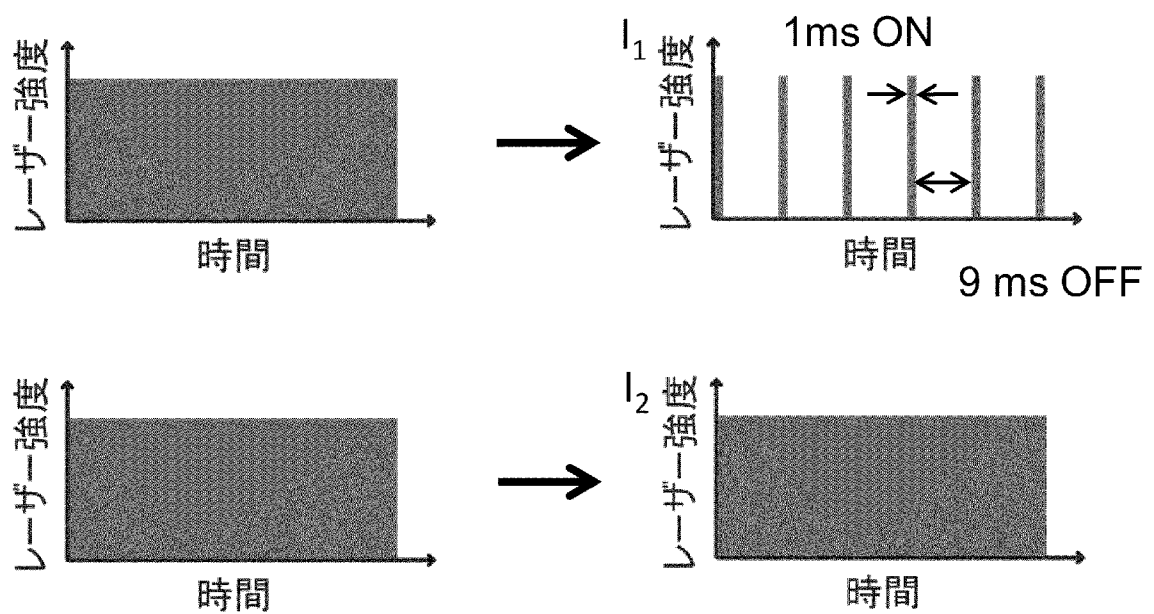


[図2]

(A)

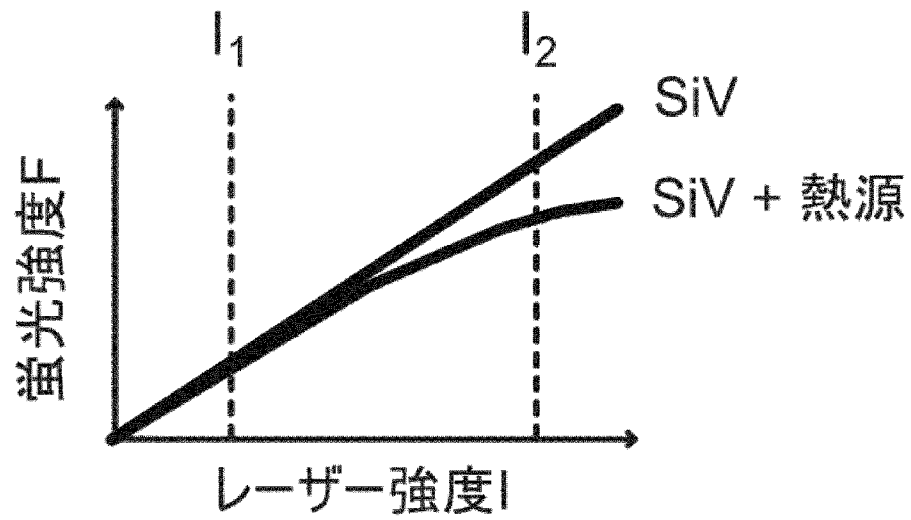


(B)

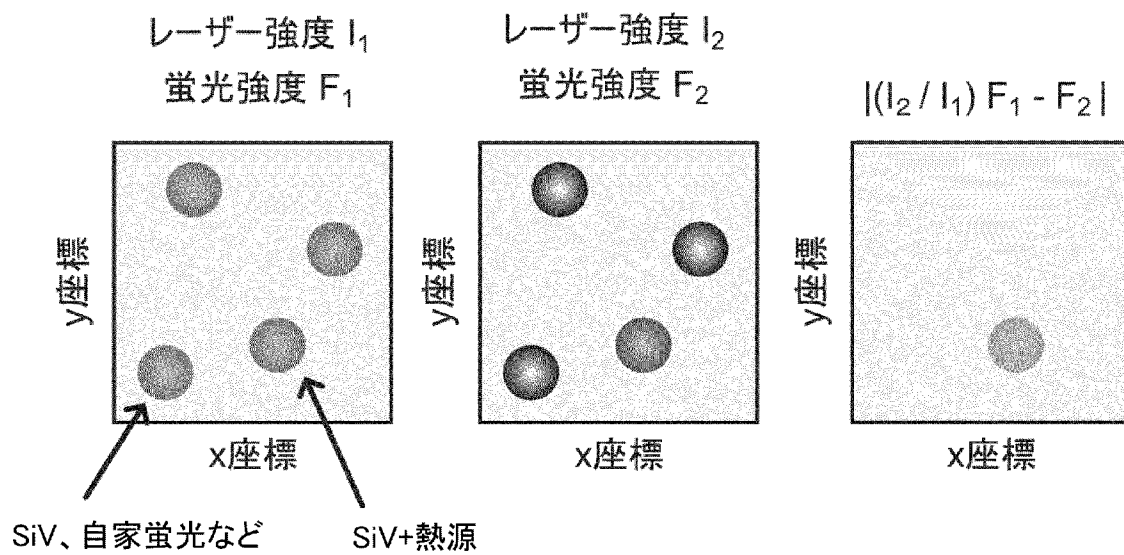


[図3]

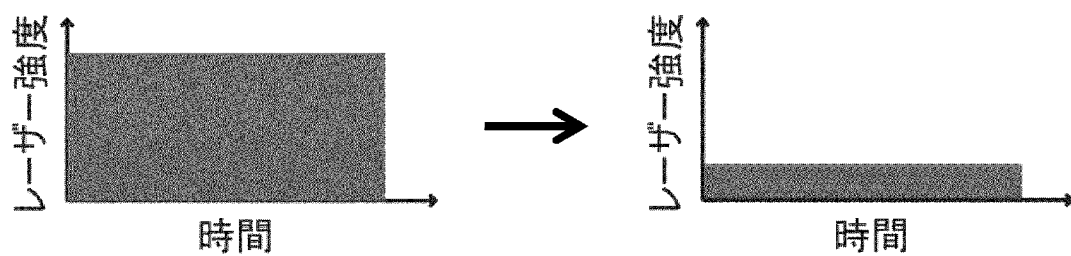
(A)



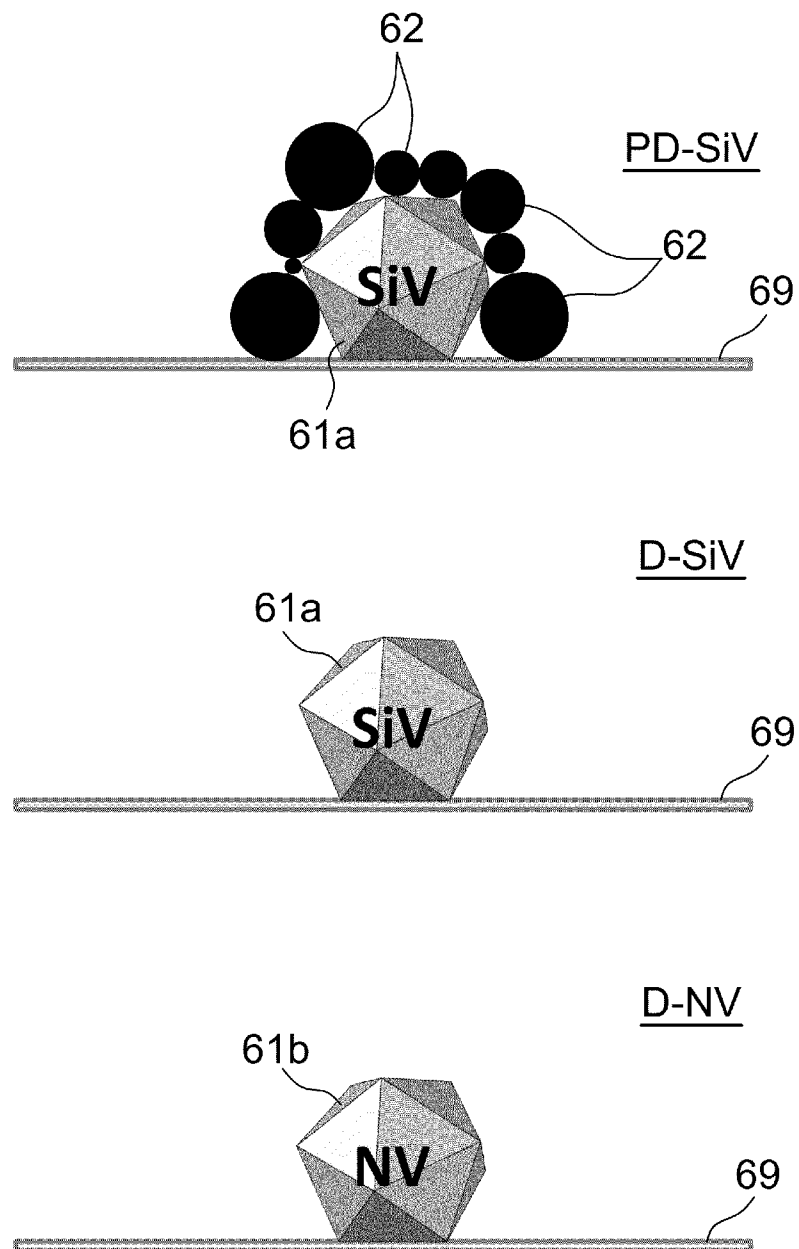
(B)



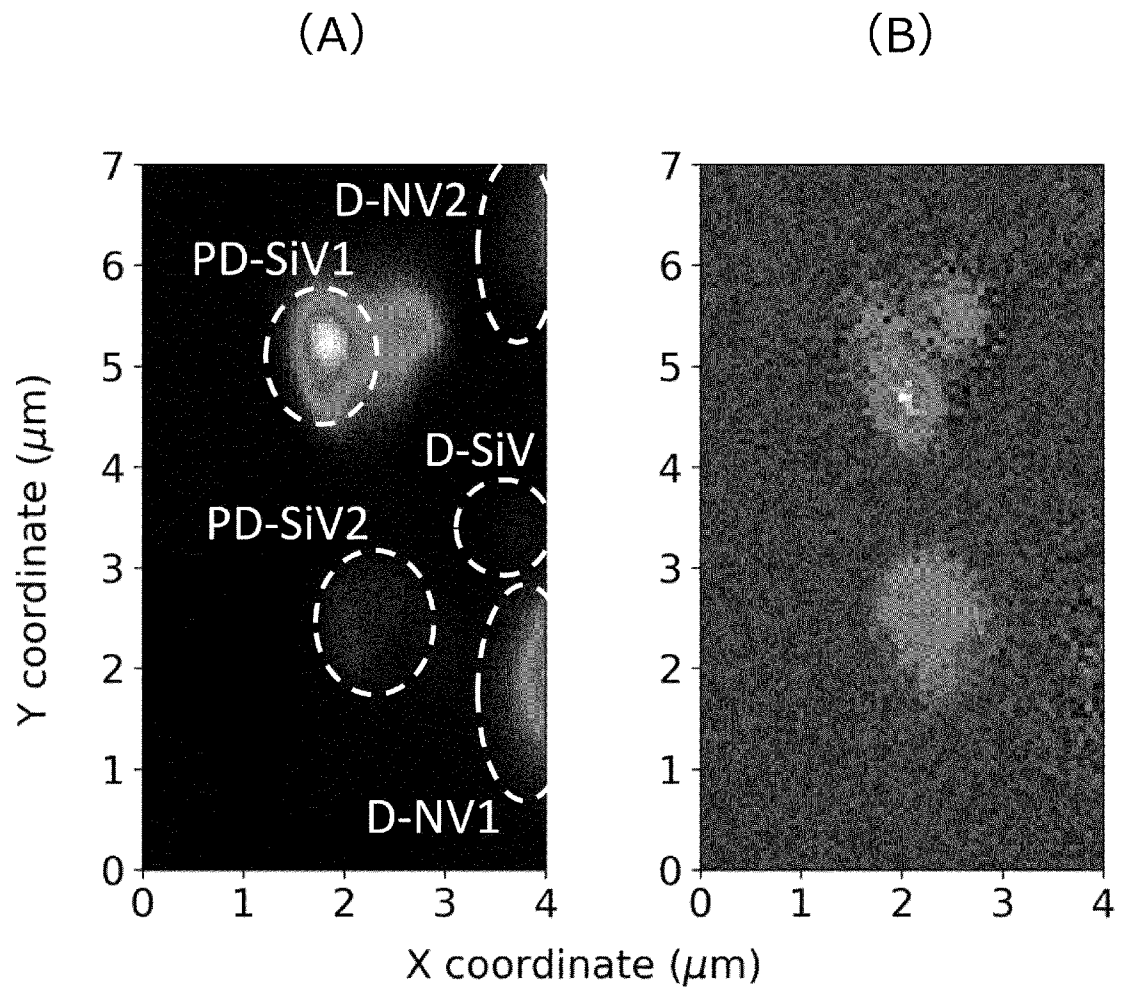
[図4]



[図5]

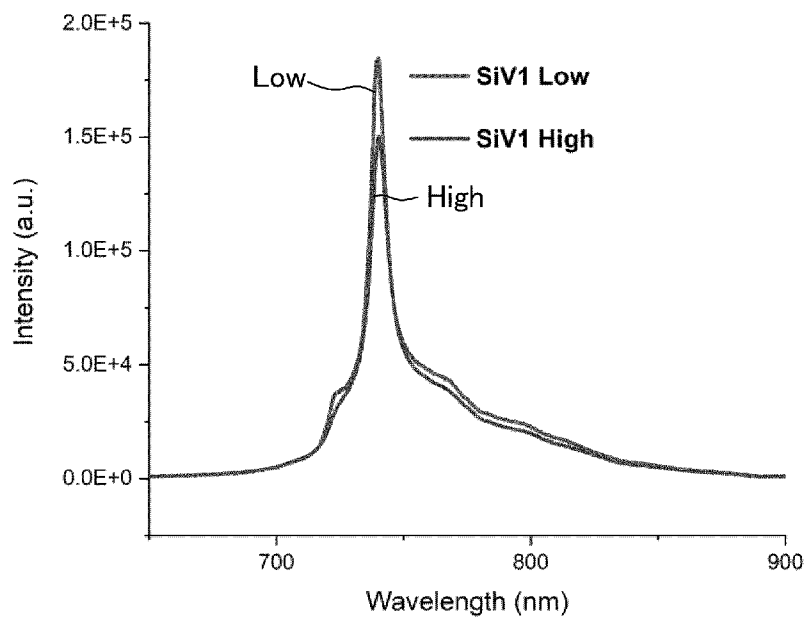


[図6]

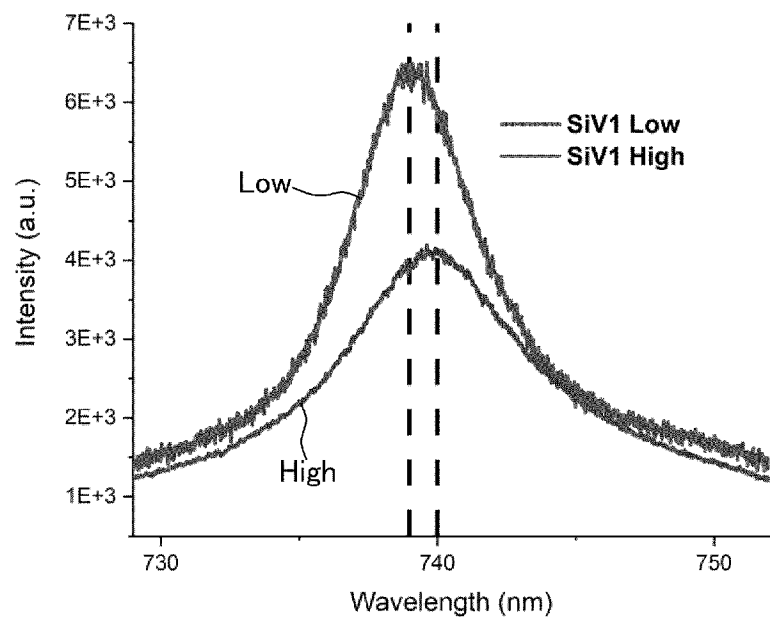


[図7]

(A)

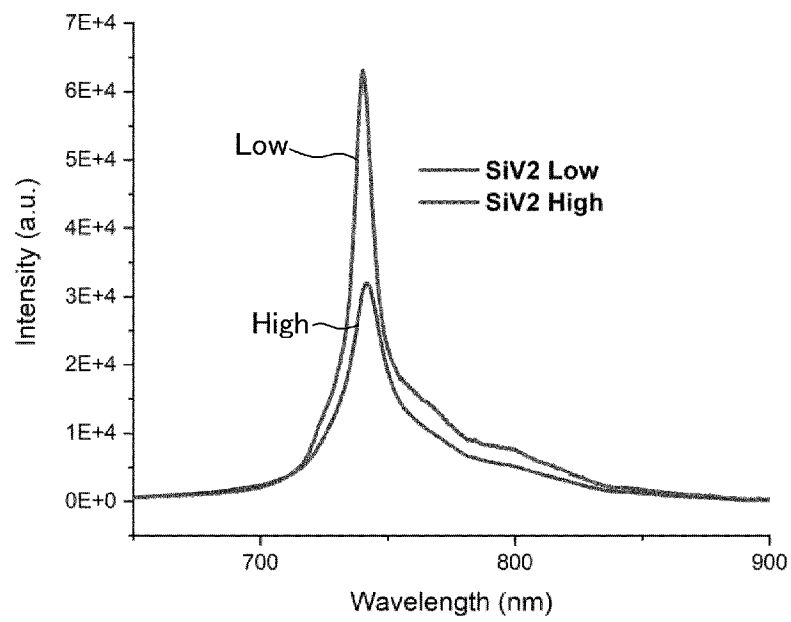


(B)

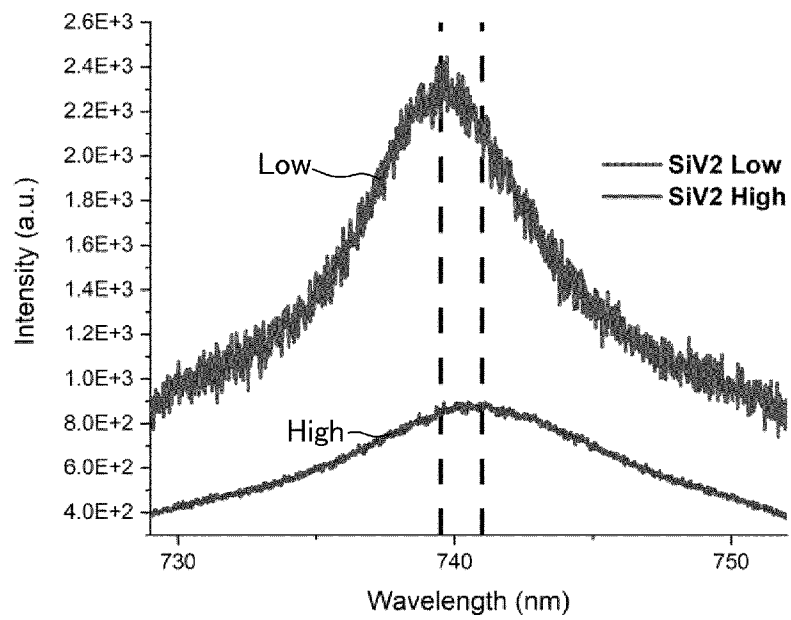


[図8]

(A)

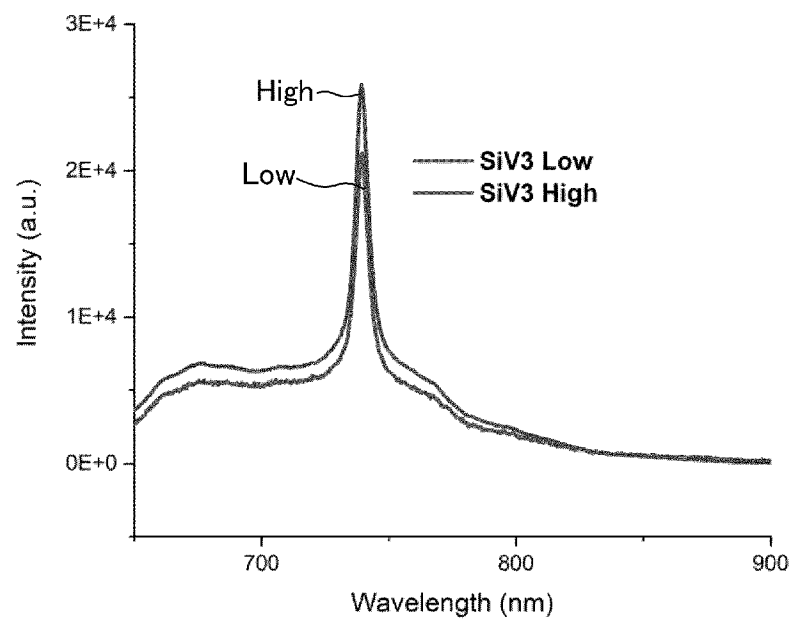


(B)

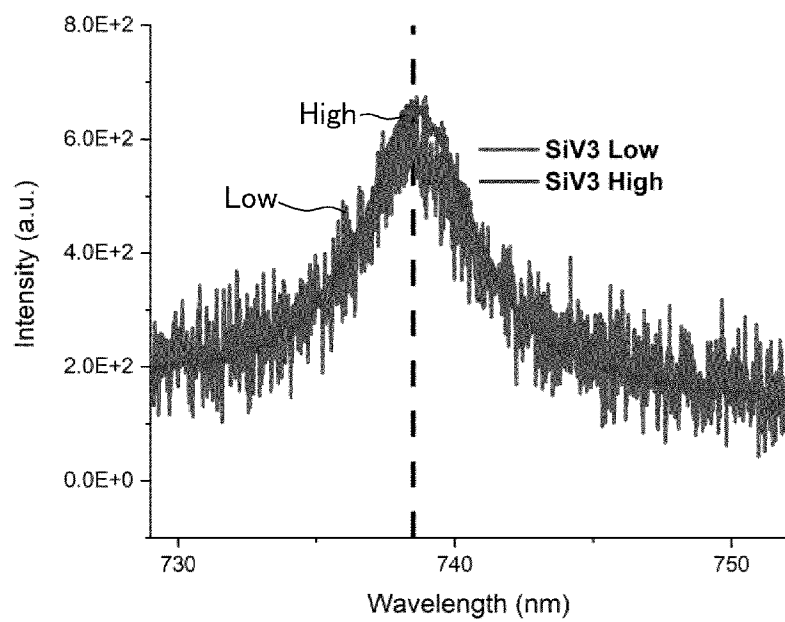


[図9]

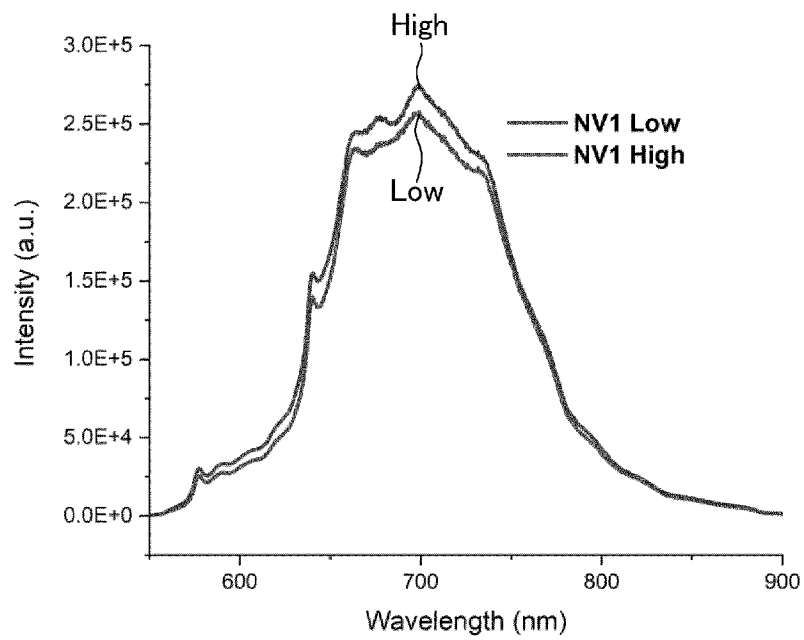
(A)



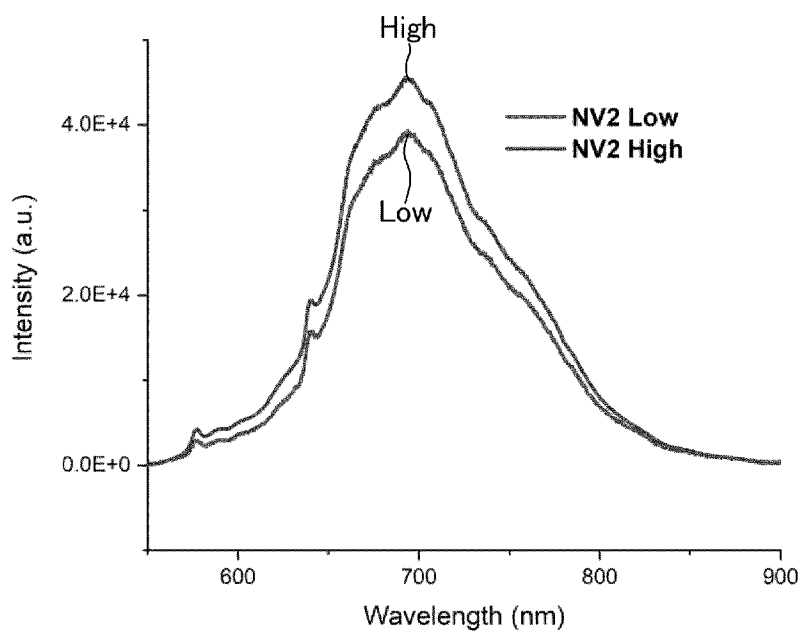
(B)



[図10]

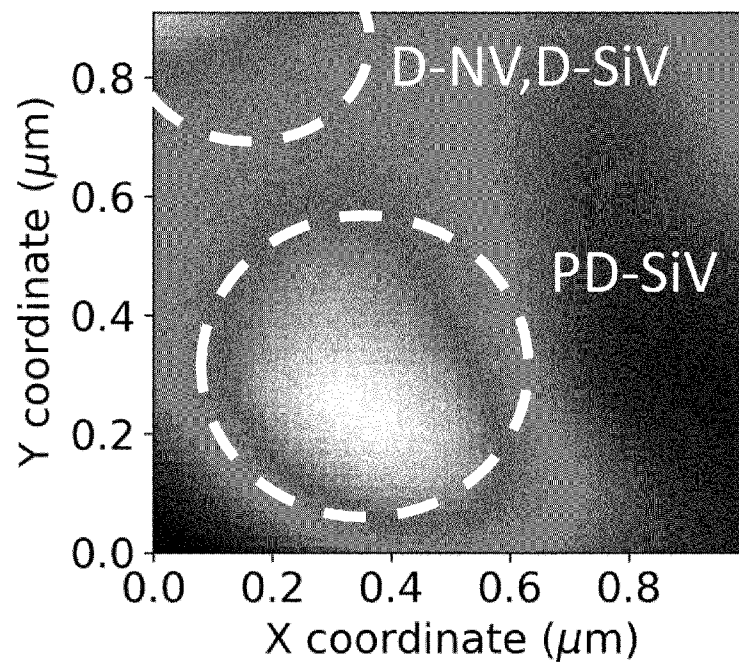


[図11]

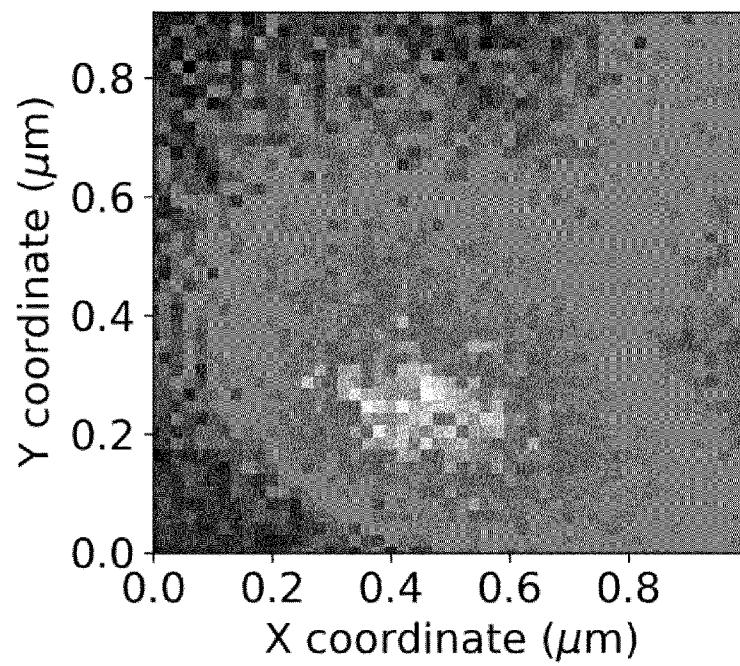


[図12]

(A)

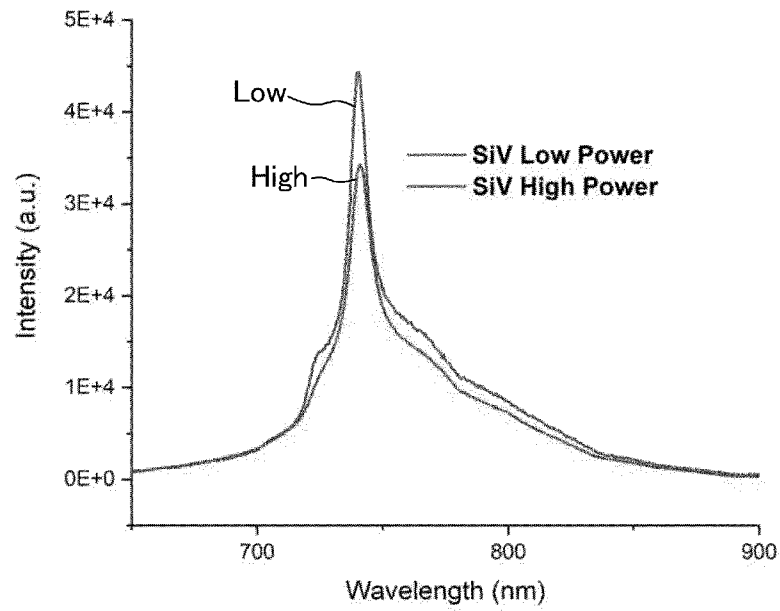


(B)

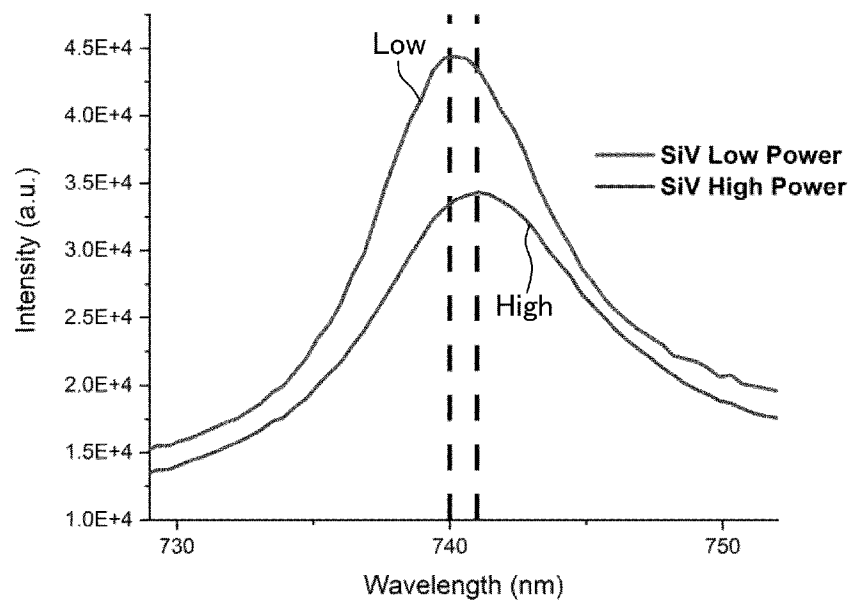


[図13]

(A)

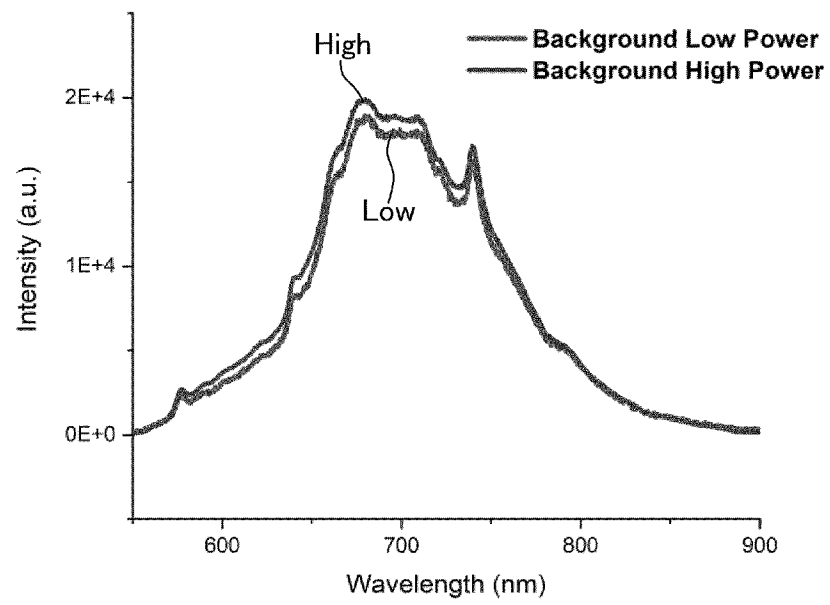


(B)

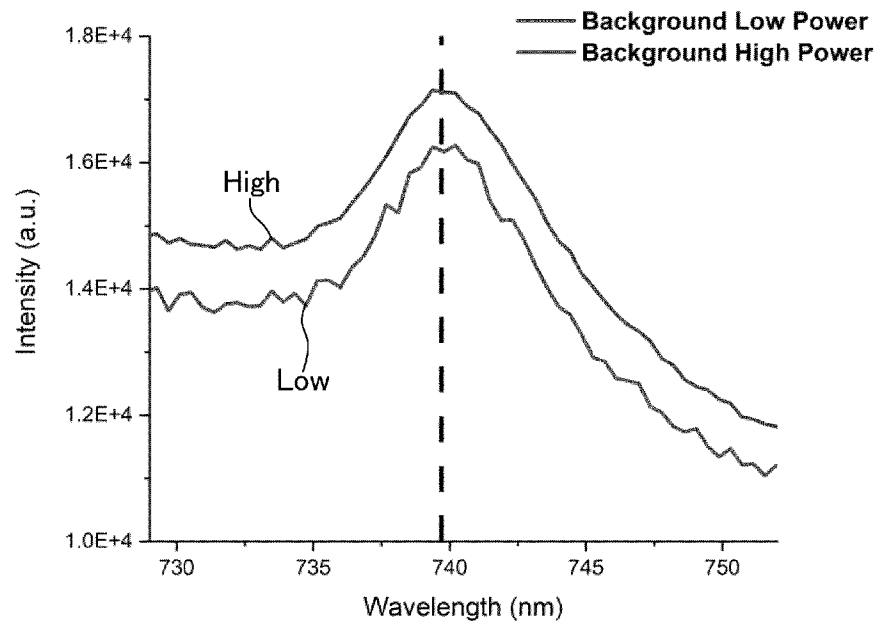


[図14]

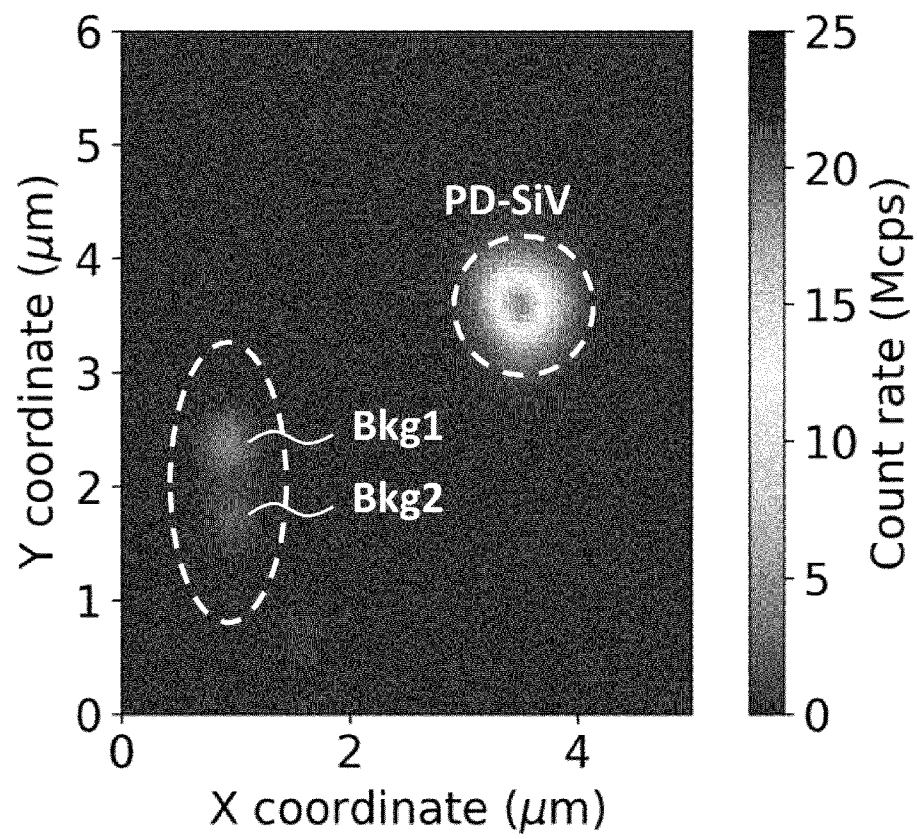
(A)



(B)

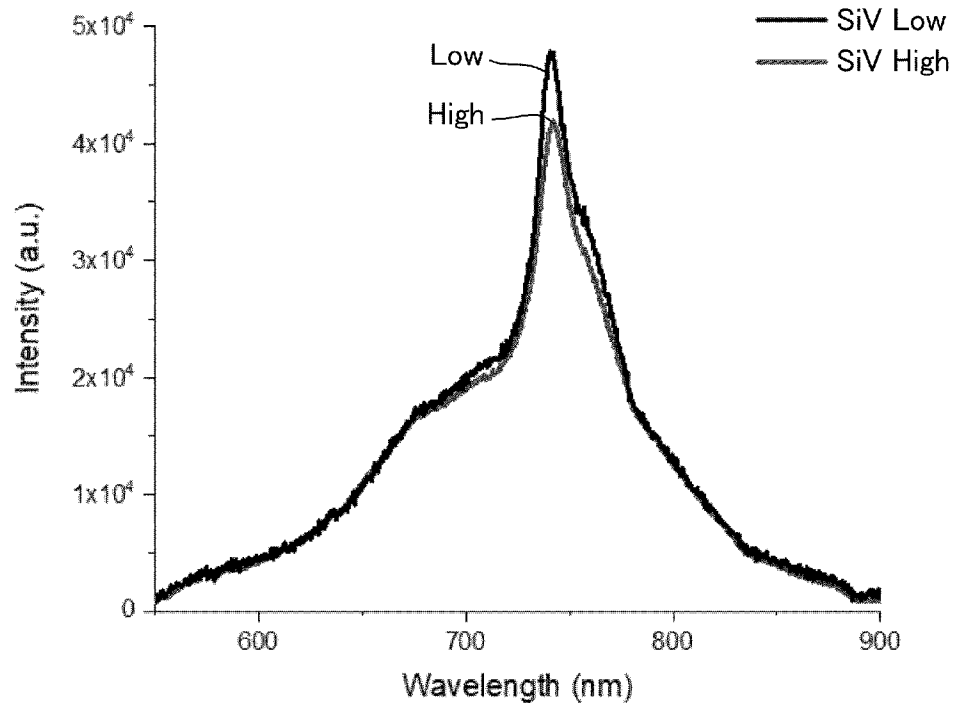


[図15]

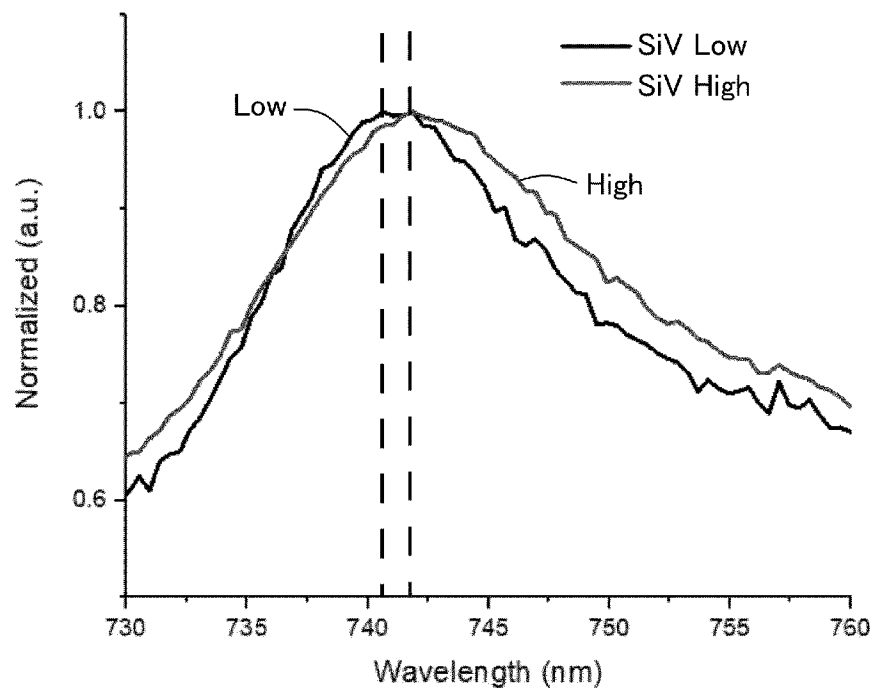


[図16]

(A)

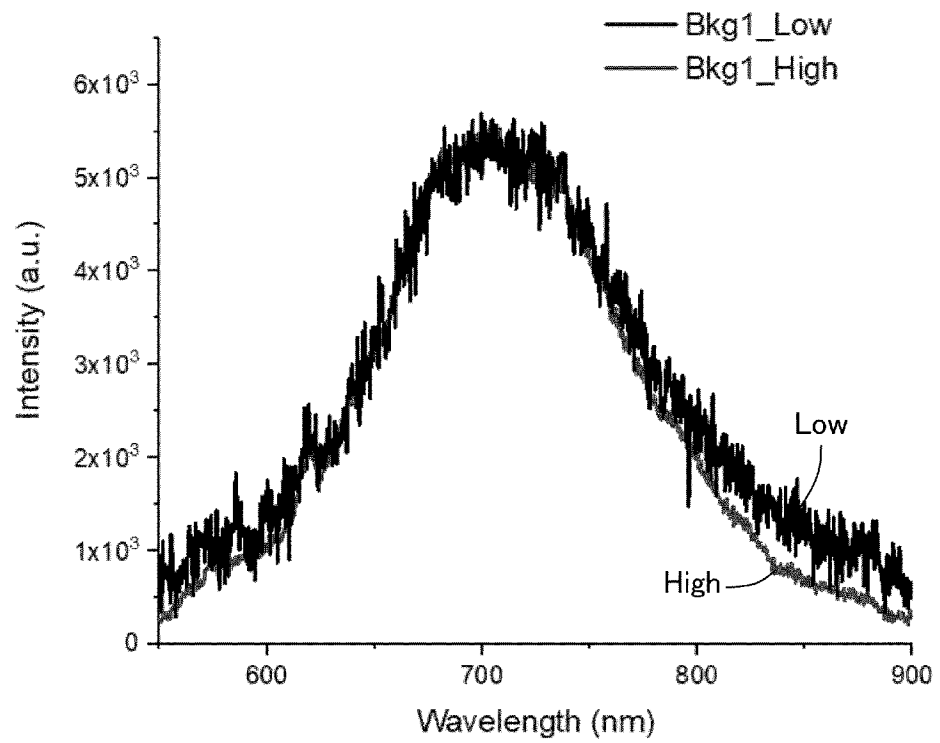


(B)

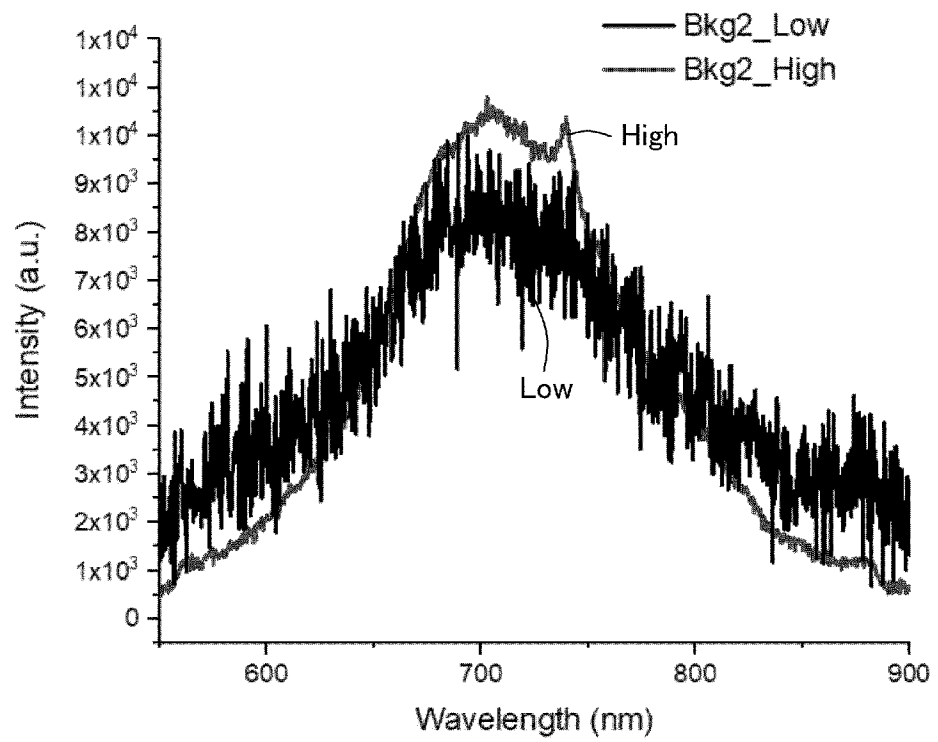


[図17]

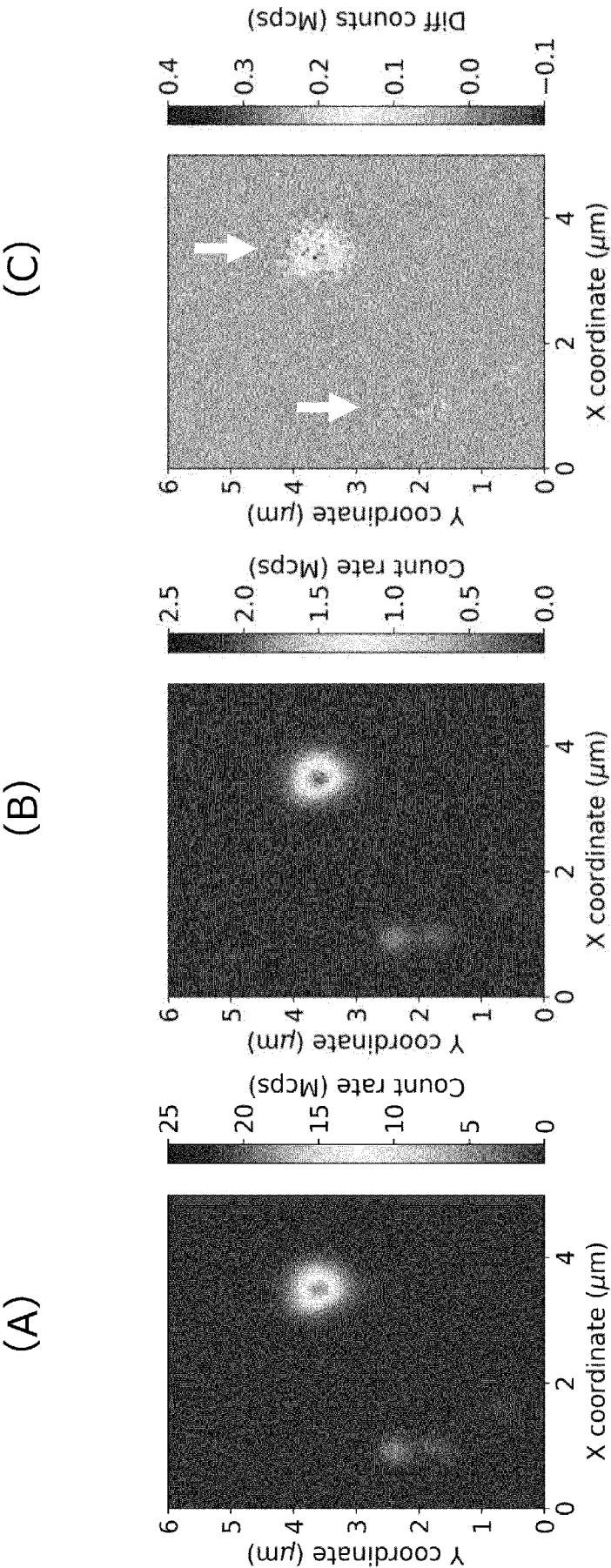
(A)



(B)

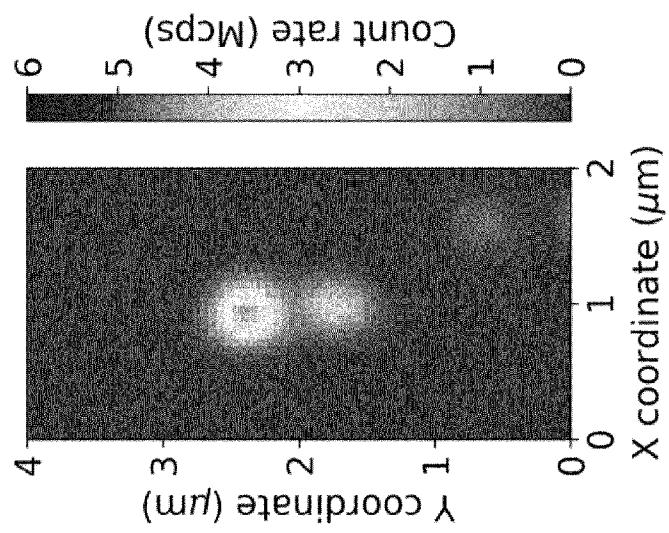


[図18]

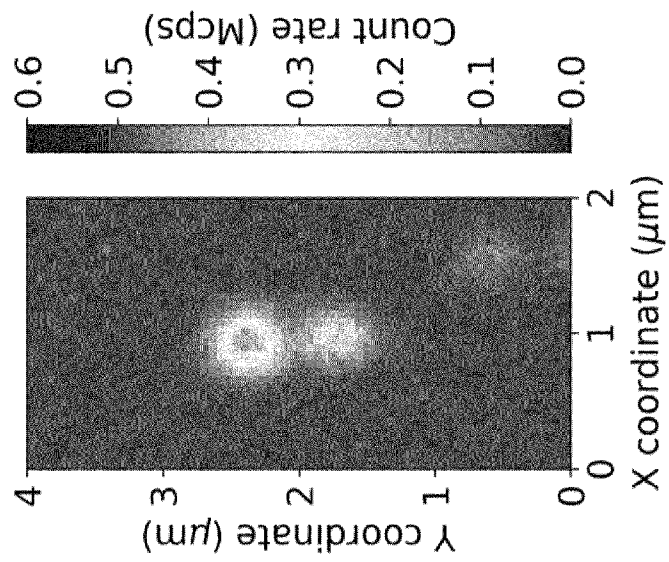


[図19]

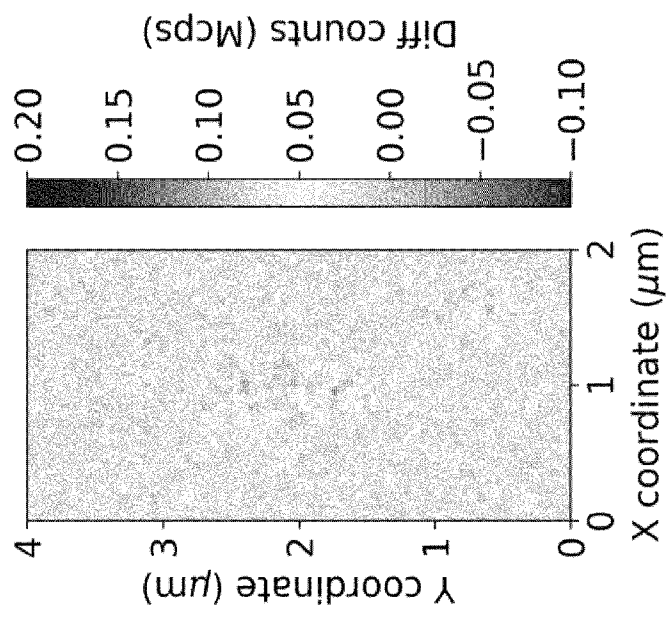
(A)



(B)



(C)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/019022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 21/64 (2006.01)i FI: G01N21/64 F 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) G01N21/64, G01N24/10, G01R33/00, A61K49/00, C01B32/25 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 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 2021-134127 A (DAICEL CORP.) 13 September 2021 (2021-09-13) paragraphs [0001]-[0015]	1-2, 4
A		3, 5-10
A	JP 3215716 U (BIKANTA CORPORATION) 12 April 2018 (2018-04-12) paragraphs [0043]-[0124], fig. 2-22	1-10
A	WO 2010/084381 A1 (EPPENDORF AG) 29 July 2010 (2010-07-29) p. 42, line 26 to p. 43, line 5	1-10
A	JP 2016-008961 A (RENESAS ELECTRONICS CORPORATION) 18 January 2016 (2016-01-18) paragraphs [0024]-[0157], fig. 1-16	1-10
☐ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 05 June 2024		Date of mailing of the international search report 25 June 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/019022

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2021-134127	A	13 September 2021	US 2021/0371740 A1 paragraphs [0001]-[0026]	
JP	3215716	U	12 April 2018	US 2018/0120219 A1 paragraphs [0064]-[0145], fig. 2-22	
				WO 2016/164827 A1	
				CA 2982180 A1	
				AU 2016246057 A1	
				CN 209264567 U	
WO	2010/084381	A1	29 July 2010	EP 2389576 A1	
JP	2016-008961	A	18 January 2016	US 2015/0374250 A1 paragraphs [0038]-[0186], fig. 1-16	
				CN 105223521 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

G01N 21/64(2006.01)i
FI: G01N21/64 F

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））
G01N21/64, G01N24/10, G01R33/00, A61K49/00, C01B32/25

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 - 2024年
日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年
日本国登録実用新案公報 1994 - 2024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 請求項の番号
X	JP 2021-134127 A（株式会社ダイセル）13.09.2021（2021 - 09 - 13） [0001]-[0015]	1-2, 4
A		3, 5-10
A	JP 3215716 U（ビカンタ コーポレイション）12.04.2018（2018 - 04 - 12） [0043]-[0124], 図2-22	1-10
A	WO 2010/084381 A1（EPPENDORF AG）29.07.2010（2010 - 07 - 29） page 42, line 26-page 43, line 5	1-10
A	JP 2016-008961 A（ルネサスエレクトロニクス株式会社）18.01.2016（2016 - 01 - 18） [0024]-[0157], 図1-16	1-10

☐ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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抵触するものではなく、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

05.06.2024

国際調査報告の発送日

25.06.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

三宅 克馬 2W 1571

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/019022

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2021-134127	A	13.09.2021	US	2021/0371740	A1	
				[0001]-[0026]			
JP	3215716	U	12.04.2018	US	2018/0120219	A1	
				[0064]-[0145], FIGs. 2-22			
				WO	2016/164827	A1	
				CA	2982180	A1	
				AU	2016246057	A1	
				CN	209264567	U	
WO	2010/084381	A1	29.07.2010	EP	2389576	A1	
JP	2016-008961	A	18.01.2016	US	2015/0374250	A1	
				[0038]-[0186], FIGs. 1-16			
				CN	105223521	A	