

(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
2023年12月21日(21.12.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/243490 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/545 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)
C09K 11/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/021018

(22) 国際出願日: 2023年6月6日(06.06.2023)

(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 2022-095905 2022年6月14日(14.06.2022) JP

(71) 出願人: 国立大学法人徳島大学(TOKUSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP).
P H C 株式会社(PHC CORPORATION) [JP/

JP]; 〒7910395 愛媛県東温市南方2131番地1 Ehime (JP).

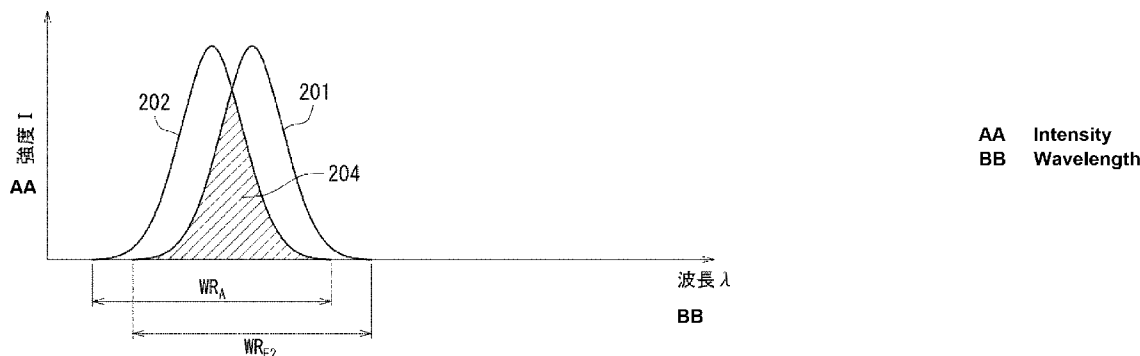
(72) 発明者: 矢野 隆章(YANO, Takaaki); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 加藤 遼(KATO, Ryo); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP). 上杉 充弘(UESUGI, Mitsuhiro). 小松 由枝(KOMATSU, Yoshie). 北脇 文久(KITAWAKI, Fumihisa).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外(YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース 青山特許事務所 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,

(54) Title: NANOPARTICLE BODY, COMPOSITE CONTAINING NANOPARTICLE BODIES, AND METHOD FOR FORMING POLYMER MEMBRANE CONTAINING NANOPARTICLE BODY

(54) 発明の名称: ナノ粒子体、ナノ粒子体を含む複合体、ならびにナノ粒子体に含まれる高分子膜の形成方法



(57) Abstract: Provided is a nanoparticle body comprising: a metallic nanoparticle; a polymer membrane that covers the surface of the metallic nanoparticle; a specific binding substance that specifically binds to a target substance in a sample; and a fluorescent substance that labels the surface of the polymer membrane or the specific binding substance. The fluorescent substance is excited by the light of the luminescence emission wavelength from the plasmon resonance of a composite obtained by two or more of said nanoparticle bodies binding by means of the target substance.

(57) 要約: 金属ナノ粒子と、金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と、高分子膜の表面または特異結合物質に標識された蛍光物質とを含んで成るナノ粒子体であって、蛍光物質は、2以上のナノ粒子体が被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される、ナノ粒子体。

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, 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：

ナノ粒子体、ナノ粒子体を含む複合体、ならびにナノ粒子体に含まれる高分子膜の形成方法

技術分野

[0001] 本発明は、ナノ粒子体（特にプラズモン励起蛍光分析に用いるナノ粒子体）、ナノ粒子体を含む複合体、ならびにナノ粒子体に含まれる高分子膜の形成方法に関する。

背景技術

[0002] バイオセンサーは、検出対象である特定の被験物質を特定の特異結合物質に特異的に反応させて複合体を形成し、複合体における特異的な結合に起因する信号によって、被験物質を検出する。

プラズモン励起蛍光分析では、複合体は、例えば、被験物質、特異結合物質、蛍光物質、および金属粒子を含んで成る。励起光が複合体に照射されると、複体内の金属粒子で表面プラズモン共鳴が誘起され、金属粒子の表面近傍で近接場が形成される。この近接場によって蛍光物質の蛍光強度が増大される。

[0003] 特許文献 1 に記載のイムノクロマトグラム用複合粒子は、金属からなる微粒子の外側が、少なくとも一種の蛍光物質を含有するシリカの少なくとも 1 層で覆われた構造を持ち、標的物質を特異的に認識する標識物質で表面修飾された微粒子からなる。特許文献 1 の複合粒子は、金属粒子の表面をシリカ層で覆い、かつ蛍光物質をシリカ層に固定することによって、表面プラズモン共鳴で形成された近接場によって励起した蛍光物質が金属粒子と接触することを防止している。これにより、励起した蛍光物質の消光を抑制している。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2011-220705号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ところで、上記のようなセンサでは、本発明者らが鋭意検討した結果、検出感度をさらに改善する余地があることが分かった。具体的には、従来、蛍光物質の選択においては、蛍光物質の吸収スペクトルとプラズモン共鳴の発光波長との関係を考慮せず、または当該関係に触れていたとしても単粒子の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴の発光波長との関係を考慮していた。このため、複合体における蛍光物質の放射する蛍光がプラズモン共鳴によって十分に増強されなかった。

[0006] 本発明はかかる課題に鑑みて為されてものである。すなわち、本発明は、適切な蛍光物質を選択して、複合体における蛍光物質の放射する蛍光をプラズモン共鳴によって十分に増強させて、検出感度を高めるナノ粒子体を提供することを主たる目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の一実施形態に係るナノ粒子体は、
金属ナノ粒子と、
該金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、
検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と、
前記高分子膜の表面または前記特異結合物質に標識された蛍光物質と
を含んで成るナノ粒子体であって、
前記蛍光物質は、2以上の前記ナノ粒子体が前記被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される。

[0008] 本発明の別の実施形態に係る複合体は、
前記ナノ粒子体を2以上含んで成り、前記2以上のナノ粒子体が第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体とを含み、前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体とは前記被験物質を介して結合されている。

[0009] 本発明の別の実施形態に係る高分子膜の形成方法は、

ジスルフィド結合を側鎖に有する高分子を金属ナノ粒子に接触させて、前記高分子が前記金属ナノ粒子の表面に硫黄原子を介して結合した高分子膜を形成する工程を含んで成る。

発明の効果

[0010] 本発明は、適切な蛍光物質を選択して、複合体における蛍光物質の放射する蛍光をプラズモン共鳴によって十分に増強させて、検出感度を高めるナノ粒子体を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル、および蛍光物質の吸収スペクトルを示す概念図である。

[図2]図2は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトルおよび複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル、ならびに蛍光物質の吸収スペクトルを示す概念図である。

[図3]図3は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトルおよび複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル、ならびに蛍光物質の吸収スペクトルを示す概念図である。

[図4]図4は、第1実施形態に係るナノ粒子体を模式的に示す断面図である。

[図5]図5は、図4のA部拡大断面図である。

[図6]図6は、高分子膜3の形成方法を示す概略図である。

[図7]図7は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトルおよび複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル、ならびに蛍光物質の蛍光スペクトルを示す概念図である。

[図8]図8は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトルおよび複合体における金属ナノ粒子のプラズモン共鳴スペクトル、ならびに蛍光物質の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す概念図である。

[図9]図9は、複合体を模式的に示す断面図である。

[図10]図10は、複合体を模式的に示す断面図である。

[図11]図11は、2つのナノ粒子体から構成される複合体を模式的に示す断

面図である。

[図12]図12は、3つのナノ粒子体から構成される複合体を模式的に示す断面図である。

[図13]図13は、測定装置を示す図である。

[図14]図14は、実施例1の高分子膜の形成方法を示す模式図を示す。

[図15]図15は、実施例1の高分子膜の形成方法を示す模式図を示す。

[図16]図16は、実施例1の蛍光標識した抗体を結合したナノ粒子体の構造を示す模式図である。

[図17]図17は、イムノクロマトグラフィーストリップを示す模式図である。

[図18]図18は、実施例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す図（（a）ブランク用プレパレートおよび（b）測定用プレパレート）である。

[図19]図19は、実施例1のプラズモン共鳴スペクトル、ならびにRu錯体の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す図である。

[図20]図20は、実施例2のプラズモン共鳴スペクトルを示す図（（a）ブランク用プレパレートおよび（b）測定用プレパレート）である。

[図21]図21は、実施例2のプラズモン共鳴スペクトル、ならびにRu錯体の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを示す図である。

[図22]図22は、実施例3の蛍光物質の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル、ならびに実施例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す図である。

[図23]図23は、実施例3の被験物質－ナノ粒子体系の蛍光スペクトルを示す。

[図24]図24は、比較例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す（（a）一次粒子状態のシリカ被覆銀ナノ粒子および（b）3つのシリカ被覆銀ナノ粒子が略直線状に配列した凝集物）。

[図25]図25は、比較例2のプラズモン共鳴スペクトルを示す（（a）一次粒子状態のシリカ被覆銀ナノ粒子および（b）3つのシリカ被覆銀ナノ粒子がオゾン分子状に配列した凝集物）。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施形態であるナノ粒子体、複合体および測定装置を図示の実施の形態により詳細に説明する。なお、図面は模式的なものを含み、実際の寸法や比率を反映していない場合がある。

[0013] 本明細書で言及する数値範囲は、「未満／より少ない／より小さい」および「超える／より多い／より大きい」などの特段の用語が付されない限り、下限値および上限値そのものも含むことを意図している。つまり、1 nm～10 nmといった数値範囲を例にとれば、その数値範囲は下限値「1 nm」および上限値「10 nm」を含むものとして解釈される。

[0014] 本明細書において、対象部材が実質的に特定の材料から構成されるまたは対象部材が特定の材料からなるとは、対象部材が95質量%以上、97質量%以上、99質量%以上、100質量%の割合で特定の材料を含むことをいう。例えば、金からなるナノ粒子とは、ナノ粒子が95質量%以上、97質量%以上、99質量%以上、100質量%の割合で金を含むことをいう。

[0015] <第1実施形態：ナノ粒子体>

[ナノ粒子体の基本構成]

第1実施形態に係るナノ粒子体は、金属ナノ粒子と、高分子膜と、特異結合物質と、蛍光物質とを含んで成る。金属ナノ粒子は励起光照射によりプラズモン共鳴を引き起こす。高分子膜は、金属ナノ粒子の表面を被覆する。特異結合物質は、検体中の被験物質と特異的に結合して、複合体が形成される。蛍光物質は、高分子膜の表面または特異結合物質に標識されており、プラズモン共鳴に由来する蛍光を放射する。

[0016] (ナノ粒子体を用いた被験物質の検出方法)

はじめに、本実施形態に係るナノ粒子体の説明の便宜上、その理解を助ける目的で、本実施形態に係るナノ粒子体を用いた被験物質の検出方法を説明する。

本実施形態に係るナノ粒子体は、金属ナノ粒子と、金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と

、高分子膜の表面または特異結合物質に標識された蛍光物質とを含んで成る。本実施形態に係るナノ粒子体を検体に分散させて、検体中に含まれる被験物質を捕捉して複合体（第4実施形態）を形成する。より具体的には、複合体は、ナノ粒子体の特異結合物質と、被験物質とが特異的に結合することによって形成される。複合体は、被験物質を介して、例えば、2つのナノ粒子体が結合する構造を有する。この複合体では、例えば、2つの金属ナノ粒子が同一の被験物質に対してそれぞれの特異結合物質と結合することによって、一定の距離で離間して配置されている。

[0017] 表面プラズモン励起増強蛍光分光法（Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy : SPFS）において、複合体に励起光を照射すると、局在表面プラズモン共鳴（以下、単に「プラズモン共鳴」とも称する、Localized Surface Plasmon Resonance : LSPR）が起き、金属ナノ粒子の表面近傍（特に、2つの金属ナノ粒子間の表面近傍）で効率的に近接場が形成される。近接場および双極子－双極子機構によって、複合体の蛍光物質が効率的に励起され、蛍光が増強する。蛍光光量を測定することによって、検体中の被験物質を検出することができる。

[0018] [本発明に至る経緯]

次いで、本実施形態に係るナノ粒子体の説明の便宜上、その理解を助ける目的で、図1～図3を参照して、本発明に至る経緯について詳細に説明する。図1は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル、および蛍光物質の吸収スペクトルを示す概念図である。図1に示すように、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル201は、第2発光波長域 WR_{E2} として、例えば、1つのピークを有する。蛍光物質の吸収スペクトル202は、吸収波長域 WR_A として、例えば、1つのピークを有する。複合体における蛍光物質がプラズモン共鳴で励起する場合、蛍光物質は、双極子－双極子機構（フェルスター機構（Foerster Resonance Energy Transfer, Fluorescence Resonance Energy Transfer : FRET））および近接場により励起すると考えられる。このため、図1に示すように、単粒子状

態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル201と蛍光物質の吸収スペクトル202との重なり（吸収波長域 WR_A と第2発光波長域 WR_{E2} との重なり）204が大きくなるような蛍光物質を選択していた。従来、検出感度を高める観点から、このようにして、複合体における蛍光物質は選択されていた。

[0019] 本願発明者らは鋭意検討した結果、従来の蛍光物質の選択では以下のような問題点があることを見出した。

単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴（すなわち、単粒子の金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴）は、双極子共鳴であり、複合体において誘起されるプラズモン共鳴は、双極子－双極子相互作用由来のプラズモン共鳴（高次の共鳴、つまり多重極子共鳴）である。多重極子共鳴としては、例えば、四重極子共鳴が挙げられる。つまり、被験物質の検出に主として寄与するプラズモン共鳴は、複合体における金属ナノ粒子間の近接によって誘起される多重極子共鳴となる。よって、被験物質の検出において検出感度を効率的に高めるためには、双極子共鳴に起因する蛍光ではなく、主として多重極子共鳴に起因する蛍光を増強する必要がある。

[0020] 図2は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル201および複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル206、ならびに蛍光物質の吸収スペクトル202を示す概念図である。複合体における金属ナノ粒子のプラズモン共鳴スペクトル（以下、多重極子共鳴スペクトルとも称する）206は、図2に示すように、第1発光波長域 WR_{E1} として、例えば、1つのピークを有し、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル（以下、双極子共鳴スペクトルとも称する）201のピークに比べ、長波長側に位置する。つまり、プラズモン共鳴の第1発光波長域 WR_{E1} は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴（すなわち、単粒子の金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴）の第2発光波長域 WR_{E2} に比べ長波長側に位置する。つまり、蛍光物質の吸収スペクトル202と複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズ

モン共鳴スペクトル206との重なり（吸収波長域 WR_A と、第1発光波長域 WR_{E1} との重なり）は存在しない。

[0021] 本発明者らは、被験物質の検出感度を高める視点に立てば、（図1でも述べた）スペクトルの重なり204は見かけ上の重なりといえる。被験物質の検出感度を高める観点から、第1領域 R_1 を存在させるような蛍光物質を選択することが重要であり、好ましくは多重極子共鳴スペクトル206と、蛍光物質の吸収スペクトル202との重なり208が大きくなるような蛍光物質を選択することが重要であることを見出した（参照：後述の図3）。ここで、第1領域 R_1 とは、後述する図3に示すように、多重極子共鳴スペクトル206と、蛍光物質の吸収スペクトル202との重なった領域（重なり208に相当する領域）をいう。

[0022] 図3は、単粒子状態の金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル201および複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル206、ならびに蛍光物質の吸収スペクトル202を示す概念図である。本実施形態では、蛍光物質の吸収スペクトル202と複合体における金属ナノ粒子に由来する共鳴スペクトル206との重なり208が存在するように（好ましくは、大きくなるように）、蛍光物質が選択される。このように蛍光物質の吸収波長域 WR_A がプラズモン共鳴の第1発光波長域 WR_{E1} と重なる場合、蛍光物質が十分に励起され、蛍光が増強されて検出感度が大きく向上する。よって、本実施形態に係るナノ粒子体は、検出感度を高めることができると考えられる。

[0023] 本発明者らは、このような技術的知見に基づいて、蛍光物質の分光特性を調整することに着眼して、検出感度を高める具体的手段を検討した。その結果、本発明者らは、「蛍光物質は、2以上のナノ粒子体が被験物質を介して結合する複合体における局在表面プラズモン共鳴の発光波長の光により励起される」との特徴に想到するに至った。

[0024] 第1実施形態に係るナノ粒子体は、
金属ナノ粒子と、

該金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、
検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と、
前記高分子膜の表面または前記特異結合物質に標識された蛍光物質と
を含んで成るナノ粒子体であって、
前記蛍光物質は、2以上の前記ナノ粒子体が前記被験物質を介して結合する複合体における局在表面プラズモン共鳴の発光波長の光により励起される。

[0025] [作用機序]

本実施形態に係るナノ粒子体は、検出感度を高めることができる。特定の理論に拘束されるわけではないが、その理由は以下のように推測される。本実施形態に係るナノ粒子体では、蛍光物質が、2以上のナノ粒子体が被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される。これにより、蛍光物質の吸収スペクトルと、複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトルとの重なりが生じ、フェルスター機構および近接場によって被験物質を検出するための蛍光が誘起される（以下、このような蛍光を「励起誘起型蛍光」とも称する）。よって、蛍光物質は複合体に由来するプラズモン共鳴の発光波長の光によって十分に励起されるため、検出感度を高めることができる。

また、被験物質を検出するための蛍光は、蛍光物質の蛍光スペクトルと、複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトルとの重なりでも誘起される（以下、このような蛍光を「発光誘起型蛍光」とも称する）。発光誘起型蛍光については、第2実施形態で詳述する。

[0026] [スキーム1]

本実施形態に係るナノ粒子体を用いて被験物質を検出する過程のスキーム1：

[化1]

- (1) $M \xrightarrow{h\nu(\text{外部照射光})} M^*$: プラズモン共鳴 (多重極子共鳴)
- (2) $M^* + \text{Flu}(S_0) \longrightarrow M + \text{Flu}^*(S_1) + \text{共鳴散乱発光}$: 蛍光物質の励起
- (3) $\text{Flu}^*(S_1) \longrightarrow \text{Flu}(S_0) + \text{蛍光}$: 励起した蛍光物質の緩和 (蛍光放射)

(スキーム1の素過程(1)～(3)中、 S_0 は基底状態を示し、 S_1 は励起一重項状態を示し、 $*$ は励起状態を示し、 Flu は(複合体中の)蛍光物質を示し、 M は(複合体中の)金属ナノ粒子を示す)

を参照して、さらに本実施形態での蛍光増強をさらに説明する。

[0027] スキーム1は、素過程(1)～(3)を含んで構成されている。

素過程(1)に示すように、蛍光物質は、2以上のナノ粒子体が被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される。被験物質を捕捉して形成された複合体に励起光としての外部から照射された光(以下、「外部照射光」とも称する)を照射すると、プラズモン共鳴(多重極子共鳴)が誘起される(つまり、複合体におけるプラズモン共鳴は、外部から照射された光によって誘起される)。なお、被験物質としては、例えば、血液、血漿、尿、または唾液である検体に由来する被験物質が挙げられる。

素過程(2)に示すように、双極子-双極子機構および近接場によって蛍光物質が励起される。蛍光物質の吸収波長域 WR_A がプラズモン共鳴の第1発光波長域 WR_{E1} と重なる場合に、蛍光物質は効率よく励起される。

素過程(3)に示すように、励起状態の蛍光物質が緩和して蛍光を放射する。

[0028] 好適な一態様では、第1発光波長域 WR_{E1} における蛍光物質の最大吸収波長が、500～700nm(より好ましくは550～700nm)に位置する。つまり、複合体におけるプラズモン共鳴スペクトルの第1発光波長領域 WR_{E1} 内の500～700nmに、蛍光物質の最大吸収波長が位置する。蛍光物質としては、例えば、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体、シア

ニン色素、およびMolecular Probes社製のAlexa Fluor（登録商標）が挙げられる。これらのうち、最大吸収波長500～700nmである蛍光物質としては、例えば、Alexa Fluor（登録商標）シリーズの532、546、555、568、594、および640が挙げられる。なお、最大吸収波長は、以下のようにして決定できる。蛍光物質の水溶液（溶媒：脱イオン水）の吸収スペクトルを測定し、得られた吸収スペクトルのピーク位置を最大吸収波長とする。

好適な別の態様では、複合体が2つのナノ粒子体1を含んで成る場合、複合体において、第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体との間に蛍光物質が位置づけられている。

[0029] 以下、ナノ粒子体の構成を説明する。図4を参照して、ナノ粒子体を説明する。図4は、本実施形態に係るナノ粒子体を模式的に示す断面図である。本実施形態に係るナノ粒子体1は、金属ナノ粒子2と、金属ナノ粒子2の表面を被覆する高分子膜3と、検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質4と、高分子膜3の表面に標識された蛍光物質6とを含んで成る。

[0030] ナノ粒子体1は、プラズモン励起蛍光分析に用いることができる。別の表現をすれば、ナノ粒子体1は、表面プラズモン励起増強蛍光分光免疫測定法に用いることができる。ナノ粒子体1は、被検体中の被験物質を捕捉し、2以上のナノ粒子体1と被験物質とを含む複合体を形成することができる。複合体に励起光を照射すると、プラズモン共鳴を起こし近接場を形成する。近接場および双極子-双極子機構によって、蛍光が増強される。ナノ粒子体1は、例えば、被検体中の1つの被験物質を捕捉し、2つのナノ粒子体1と被験物質とを含む複合体を形成する。かかる場合、ナノ粒子体1は、ナノ粒子体として第1ナノ粒子体と、第2ナノ粒子体とが含まれ、第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体とが被験物質を介して結合された複合体を形成する。

[0031] ナノ粒子体1はまた、非特異的な結合部位をブロッキング剤によってブロッキングされてもよい。ブロッキングされたナノ粒子体1は、特異結合物質4の検出対象以外の物質（すなわち、被験物質以外の物質）への非特異的な

結合の形成が抑制され、バックグラウンドおよび偽陽性信号を低減し、信号ーノイズ比（S/N比）を向上させることができる。ブロッキング剤としては、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、スキムミルク、およびカゼインのようなタンパク質、ならびに化学合成ポリマーである。

[0032] ナノ粒子体1が溶媒中に存在する場合、ナノ粒子体1の分散液は、ナノ粒子体1の分散性を向上させる目的で、分散剤をさらに含んでもよい。このような分散剤としては、例えば、ヘパリンナトリウムが挙げられる。

[0033] （金属ナノ粒子）

金属ナノ粒子2は、その表面を高分子膜3で被覆されている。金属ナノ粒子2は、金属の種類によって異なるが、特定の波長を有する光と相互作用し、プラズモン共鳴を起こす。銀ナノ粒子では400nm～530nm、金ナノ粒子では510nm～580nmにプラズモンの共鳴ピークがある。これは粒子径により異なる。例えば、粒子径が20nmの銀からなるナノ粒子は、波長405nmの光と共鳴し、粒子径が20nmの金からなるナノ粒子は、波長524nmの光と共鳴する。金属ナノ粒子2の粒子径（平均一次粒子径）は、例えば、5nm～100nm、40nm～90nm、50nm～80nmである。金属ナノ粒子2の粒子径は、走査型電子顕微鏡（SEM）または透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、金属ナノ粒子2の画像を撮像し、画像での金属ナノ粒子2の粒子径を測長し、複数の粒子径の平均値（測定数：例えば、少なくとも10以上）を算出することにより得ることができる。

金属ナノ粒子2は、好ましくは金または銀を含んで成り、より好ましくは銀を含んで成る。

[0034] （高分子膜）

高分子膜3は金属ナノ粒子2の表面を被覆する。高分子膜3は、金属消光分子膜として機能する。複合体においては、高分子膜3は、少なくとも高分子膜3の厚み分、金属ナノ粒子2の表面から蛍光物質6を離間して配置させることができる。このため、励起した蛍光物質6が金属ナノ粒子2の表面に

接触して消光すること（デクスター機構（Dexter Electron Transfer）により消光すること）を抑制し、検出感度の低下を抑制できる。高分子膜3の存在は、SEMまたはTEMを用いて、ナノ粒子体1の画像を撮像し、画像でのナノ粒子体1を観察し、確認することができる。

[0035] 図5を参照して、高分子膜3を説明する。図5は、図4のA部拡大図であり、ナノ粒子体1の高分子膜3と金属ナノ粒子2の表面との界面付近の拡大断面図である。高分子膜3は、金属ナノ粒子2の表面との間に硫黄原子を介した結合部位3a、正帯電性基3b、および疎水性基3cからなる群より選択される少なくとも1つを含む。より具体的には、高分子膜3は、金属ナノ粒子2の表面との間に硫黄原子を介した結合部位3aと、正帯電性基3bとしての第1級アンモニウム基（ $-NH_3^+$ ）と、疎水性基3cとを含む。結合部位3aは、硫黄原子を介して金属ナノ粒子2の表面と高分子膜3との間を結合する。正帯電性基3bは、負帯電性の金属ナノ粒子2の表面との間に静電結合（イオン結合）bを形成する。疎水性基3cは、金属ナノ粒子2の表面と疎水結合cを形成する。

[0036] 上記3つの結合はいずれも金属ナノ粒子2の表面と、高分子膜3との間に比較的強く結びつけるため、高分子膜3は、上記3つの結合のうち少なくとも1つの結合によって、金属ナノ粒子2の表面に安定的に固定される。これにより、高分子膜3の金属ナノ粒子2の表面からの剥離等が防止される。その結果、高分子膜3の剥離等に伴う特異結合物質4の脱離が抑制され、検出感度の低下が抑制される。加えて、高分子膜3の剥離等に伴う金属ナノ粒子2の表面の露出が抑制され、励起した蛍光物質6との接触による消光が抑制され、検出感度の低下が抑制される。さらに、高分子膜3は、高分子3Aを含んで構成されているため、シリカ層に比べ、化学修飾しやすく、表面改質等の必要性が低い。これにより、シリカ層に比べ膜厚を小さくして、複合体における金属ナノ粒子2間距離を減少させることができる。よって、より効率的に近接場が形成され、検出感度を向上させることができる。以上から、本実施形態に係るナノ粒子体1は、検出安定性により優れる。

[0037] 高分子膜 3 を構成する高分子 3 A は、図 5 に示すように、金属ナノ粒子 2 の表面との間に硫黄原子を介した結合部位 3 a、正帯電性基 3 b、および疎水性基 3 c からなる群より選択される少なくとも 1 つを含むことができる。硫黄原子を介した結合部位 3 a、正帯電性基 3 b、および疎水性基 3 c の存在は、赤外分光法、核磁気共鳴分光法、エネルギー分散型 X 線分光法（TEM-EDS）、X 線光電子分光法（XPS）、および飛行時間型二次イオン質量分析法（TOF-SIMS）を用いて、それらに由来する信号を測定することで、確認することができる。また、高分子膜 3 を構成する高分子 3 A は、側鎖としてジスルフィド結合（-S-S-）を含む部位を有することができる。ジスルフィド結合を含む部位は正帯電性基 3 b および／または疎水性基 3 c を有することができる。

[0038] ー硫黄原子を介した結合部位ー

硫黄原子を介した結合部位 3 a は、例えば、側鎖としてジスルフィド結合を含む部位を有する高分子と、金属ナノ粒子 2 とを混合することで形成される。原料としての高分子が、例えば、図 5 に示すように、側鎖にジスルフィド結合を介して疎水性基 3 c を有する場合、金属ナノ粒子 2 の表面との間に硫黄原子を介した結合部位を形成する（図 5 および後述する図 15 参照）。

[0039] ー正帯電性基ー

高分子膜 3 は、高分子膜 3 を構成する高分子 3 A の側鎖に正帯電性基 3 b を少なくとも含むことができる。正帯電性基 3 b は、金属ナノ粒子 2 の表面と比較的強い静電結合を形成する。正帯電性基は、本明細書において、1 価以上の価数を有し、完全に正に電離した基である。高分子膜 3 を構成する高分子 3 A に含まれる複数の正帯電性基 3 b を考慮した場合、正帯電性基 3 b は、下記の数式（1）：

[数1]

$$pKa = pH - \log \frac{[B]}{[BH^+]} \cdots (1)$$

[数式（1）中、pKa は高分子膜 3 を構成する高分子 3 A に含まれる電気

的に中性な基であって、正に帯電すれば、正帯電性基（より具体的には、第 1 級アンモニウム基（ $-\text{NH}_3^+$ ）等）3 b となり得る基（以下、電気的中性基とも称する）（より具体的には、第 1 アミノ基（ $-\text{NH}_2$ ）等）の pK_a を示し、 pH は被験物質を検出する環境（より具体的には、検体等）の pH を示し、 B は高分子 3 A に含まれる電気的中性基を示し、 BH^+ は高分子 3 A に含まれる正帯電性基 3 b を示す]

で表される pK_a が 7 以上である基をいう。つまり、正帯電性基 3 b は、高分子膜 3 を構成する高分子 3 A の電気的中性基および正帯電性基 3 b とが被験物質を検出する環境（例えば、 pH おおよそ 6～8 の検体）中で、下記の化学平衡式（2）：

[化2]



[化学平衡式（2）中、 H^+ はプロトンを示し、 B および BH^+ は、数式（1）中の B および BH^+ はとそれぞれ同義である]

で表される平衡状態を形成している場合であって、正帯電性基の濃度（ $[BH^+]$ ）が電気的中性基の濃度（ $[B]$ ）に比べ 10 倍以上大きい基をいう。

[0040] 正帯電性基は、例えば、第 1 級アンモニウム基、第 2 級アンモニウム基、第 3 級アンモニウム基、第 4 級アンモニウム基およびグアニジル基（ $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$ ）からなる群より選択される少なくとも 1 種である。

[0041] 疎水性基—

高分子膜 3 は、高分子膜 3 を構成する高分子 3 A の側鎖に疎水性基 3 c を少なくとも含むことができる。疎水性基 3 c は、例えば、芳香族環状基、脂肪族環状基、および脂肪族鎖状基からなる群より選択される少なくとも 1 種である。

[0042] 芳香族環状基としては、例えば、芳香族炭素環基、および芳香族複素環基が挙げられる。芳香族炭素環基は、芳香族複素環を含まず、環員原子がすべて炭素原子である芳香族環を含む基である。芳香族炭素環基としては、例え

ば、アリール基（より具体的には、フェニル基等）およびアリールアルキル基（より具体的には、ベンジル基等）が挙げられる。芳香族複素環基は、環員原子の少なくとも1つがヘテロ原子（より具体的には、酸素原子、硫黄原子および窒素原子等）である芳香環を含む基である。芳香族複素環基としては、例えば、含窒素芳香族複素環基（より具体的には、イミダゾイル基およびピリジル基（ピリジニル基）等）、含硫黄芳香族複素環基、および含酸素芳香族複素環基が挙げられる。

[0043] 脂肪族環状基は、芳香族環を含まず、非芳香族環からなる環状基を含む基である。脂肪族環状基としては、例えば、脂肪族炭素環基および脂肪族複素環基が挙げられる。脂肪族炭素環基は、環員原子がすべて炭素原子である非芳香族環を含む基であり、例えば、シクロアルキル基が挙げられる。脂肪族複素環基は、環員原子の少なくとも1つがヘテロ原子である非芳香族環を含む基である。

[0044] 脂肪族鎖状基は、芳香環および非芳香環を含まない鎖状（より具体的には、直鎖状および分岐鎖状）の基である。脂肪族鎖状基としては、例えば、脂肪族炭素鎖基（より具体的には、アルキル基およびアルキレン基等）および脂肪族ヘテロ鎖基が挙げられる。

[0045] 高分子膜3を構成する高分子3Aは、高分子3Aが有し得る疎水性基3cと、金属ナノ粒子2の表面との間で疎水結合cを形成することができる。高分子膜3を構成する高分子3Aは、これ以外の疎水結合cも形成できる。例えば、金属ナノ粒子2の表面に硫黄原子を介して結合する疎水性基（より具体的には、後述する図15中の金属ナノ粒子2の表面に硫黄原子を介して結合するピリジル基等）3cと、高分子膜3を構成する高分子3Aが有し得る疎水性基（より具体的には、図15中の高分子3Aが有するアルキレン基）3cとの間で疎水結合cを形成できる。このような疎水結合cが形成される場合、高分子膜3は、金属ナノ粒子2の表面にさらに安定的に固定される。なお、金属ナノ粒子2の表面に硫黄原子を介して結合する疎水性基3cは以下のようにして形成される。硫黄原子を介した結合部位3aは、既述したよ

うに、例えば、側鎖にジスルフィド結合を介して疎水性基 3 c を有する高分子と、金属ナノ粒子 2 と混合させて形成することができる。ここで、硫黄原子と結合した疎水性基 3 c も金属ナノ粒子 2 の表面と結合する。このようにして金属ナノ粒子 2 の表面に硫黄原子を介して結合する疎水性基 3 c が形成される。

[0046] 高分子膜 3 を構成する高分子 3 A は、架橋剤に由来する部位（リンカー部分）を介して硫黄原子を介する結合を形成してもよい。このような架橋剤としては、例えば、アミノ基－スルフヒドリル基間架橋剤（より具体的には、NHS－マレイミド基架橋剤等）が挙げられる。

[0047] 高分子膜 3 の膜厚は、好ましくは 1 nm ～ 50 nm であり、より好ましくは 1 nm ～ 10 nm である。高分子膜 3 の膜厚が 50 nm 以下であると、例えば、2 つの金属ナノ粒子 2 を含んで構成される複合体において、2 つの金属ナノ粒子 2 間の空間に近接場が効率的に形成される離間距離（離隔距離）となるため、検出感度がさらに向上する。また、高分子膜 3 の膜厚が 1 nm 以上であると、複合体における金属ナノ粒子 2 と蛍光物質 6 とが所定の距離を設けて配置されるため、測定において励起した蛍光物質 6 から放射される蛍光の消光が抑制され、検出感度がさらに向上する。

なお、本明細書において、離間距離（離隔距離）とは、複合体において被験物質を介して結合する 2 つのナノ粒子体にそれぞれ含まれる金属ナノ粒子 2 表面間の距離の最小値（最短距離）をいう。

[0048] （高分子膜の形成方法）

高分子膜 3 の形成方法は、ジスルフィド結合を側鎖に有する高分子を金属ナノ粒子 2 に接触させて、高分子が金属ナノ粒子 2 の表面に硫黄原子を介して結合した高分子膜 3 を形成する工程を含んで成る。原料としての高分子は、例えば、ジスルフィド結合を介して結合する正帯電性基 3 b および疎水性基 3 c からなる群より選択される少なくとも一方の基を含む。この場合、前記工程は、高分子膜 3 の形成とともに、正帯電性基 3 b および疎水性基 3 c からなる群より選択される少なくとも一方の基を金属ナノ粒子 2 の表面に結

合させる。

なお、高分子膜 3 の形成方法において、側鎖にジスルフィド基を介して正帯電性基 3 b および／または疎水性基 3 c を有する高分子を原料として使用した場合、形成される高分子膜 3 において、高分子膜 3 を構成する高分子 3 A は、側鎖にジスルフィド基を介して正帯電性基 3 b および／または疎水性基 3 c を有してもよい。高分子 3 A 中の正帯電性基 3 b および／または疎水性基 3 c は、高分子膜 3 の形成方法において、反応しきれずに残った基である。

[0049] 図 6 を参照して、具体的に説明する。図 6 は、高分子膜 3 の形成方法を示す概略図である。高分子 3 B は、ジスルフィド結合を介して結合する正帯電性基 3 b および疎水性基 3 c を側鎖に有する。高分子 3 B を金属ナノ粒子 2 と接触させると、ジスルフィド結合の硫黄原子間の結合が開裂し、高分子 3 B が金属ナノ粒子 2 の表面に硫黄原子を介して結合し、並行して正帯電性基 3 b および疎水性基 3 c が金属ナノ粒子 2 の表面に硫黄原子を介してそれぞれ結合する。高分子膜 3 の形成方法は、1 つの工程で、金属ナノ粒子 2 の表面への高分子膜 3 の形成と、並行して金属ナノ粒子 2 の表面の改質（例えば、機能性基である正帯電基 3 b および／または疎水性基 3 c の表面修飾）を行うことができる。よって、本方法は、コストに優れる。

[0050] （特異結合物質）

特異結合物質 4 は、検体中の被験物質（第 4 実施形態にて説明する）と特異的に結合するナノサイズ（最長が 3 ～ 15 nm であるサイズ）の物質である。特異結合物質 4 としては、例えば、抗体（以下、ナノ抗体と称する）、リガンド、酵素、ならびに核酸鎖（より具体的には、DNA 鎖および RNA 鎖）が挙げられる。例えば、特異結合物質 4 としてのナノ抗体は、抗原抗体反応により、その先端部（抗原結合部位：Antigen Binding Site）で、被験物質としての抗原と特異的に結合して複合体を形成する。特異結合物質 4 としてのリガンドは、被験物質としてのタンパク質と、リガンド・レセプター反応によって特異的なタンパク質ーリガンド結合して複合体を形成する。特

異結合物質 4 としての核酸鎖は、塩基対の相補性に基づいて、相補的な関係にある核酸鎖と核酸鎖の対（二本鎖）を形成する。特異結合物質 4 としての酵素は、その活性部位（活性中心）で基質特異性（立体特異性）に基づいて被験物質としての基質と酵素－基質複合体を形成する。これらの特異的結合は、非共有結合であり、例えば、水素結合、ならびに分子間力、疎水的相互作用および電荷的相互作用に起因する結合である。

[0051] ナノ抗体は、例えば、V H H（variable domain of heavy chain antibody）抗体、F a b（Fragment Antigen Binding）抗体およびそれらの変異体である。V H H 抗体は、単ドメイン抗体である。変異体は、抗原に対する特異的結合性を有する範囲内で、アミノ酸配列の一部を組み換えた抗体または置換基を導入した抗体である。ナノ抗体は、好ましくは V H H 抗体である。ナノ抗体が V H H 抗体であると、V H H 抗体は比較的体積が小さいため、複合体における 2 つの金属ナノ粒子 2 間の距離（離隔距離）を狭め、近接場をより効率的に形成し、蛍光強度をさらに増大させることができる。

[0052] ナノ抗体の分子質量は、好ましくは 60,000 Da 以下であり、より好ましくは 30,000 Da 以下であり、さらに好ましくは 20,000 Da 以下である。分子質量が 60,000 Da 以下（特に、30,000 Da 以下、または 20,000 Da 以下）であると、ナノ抗体の体積が比較的小さいため、複合体における離隔距離を狭め、近接場をより効率的に形成し、蛍光強度をさらに増大させることができる。分子質量の測定方法は、電気泳動（SDS-PAGE）、ゲルろ過クロマトグラフィー、および静的光散乱法などである。

[0053] 特異結合物質 4 は、高分子膜 3 に直接結合してもよく、架橋剤（より具体的には、NHS-マレイミド基架橋剤等）に由来するリンカー部（より具体的には、SM（PEG）_n等）を介して間接的に高分子膜 3 に結合してもよい。

[0054]（蛍光物質）

蛍光物質 6 は高分子膜 3 の表面および／または特異結合物質 4 に標識され

る。蛍光物質 6 は、プラズモン共鳴で形成される近接場により励起され、蛍光を発する。蛍光物質 6 は、例えば、ユーロピウムおよびルテニウムのような金属の錯体（金属錯体）、ならびに Alexa Fluor シリーズ（登録商標）（Molecular Probes 製）の色素が挙げられる。

[0055] 蛍光物質 6 は、ストークスシフトが大きいことが好ましい。ここで、ストークスシフトは、蛍光物質 6 の吸収スペクトルにおける吸収ピーク波長（最大励起波長）と、蛍光スペクトルにおける蛍光ピーク波長（最大蛍光波長）との差である。蛍光物質 6 のストークスシフトが大きい場合、吸収スペクトルと蛍光スペクトルとが重なりにくく、検出する蛍光に励起光（の散乱光）が入りにくく、より正確な蛍光強度を測定することができる。

[0056] 蛍光物質の蛍光スペクトルは、シャープであることが好ましい。蛍光スペクトルがシャープであると、吸収スペクトルとの重なりにくいため、検出する蛍光に励起光（の散乱光）が入りにくく、より正確な蛍光強度を測定することができる。

[0057] （被験物質を検出するための測定装置）

上述した被験物質の検出方法を用いる測定装置を、図 13 を参照して、説明する。図 13 は、測定装置を示す図である。図 13 に示すように、測定装置 100 は、励起用光源 110 と、励起光照射光学系 120 と、試薬容器 130 と、受光光学系 140 と、受光素子 150 とを備える。

励起用光源 110 は、励起光 112 を照射する。励起用光源 110 は、例えば、レーザー光源である。励起光照射光学系 120 は、励起光 112 の集光のように断面径の調整等を行い、入射励起光 122 を出力する。励起光照射光学系 120 は、レンズ 124 および偏光素子（ $\lambda/2$ 板） 126 である。励起光照射光学系 120 から出力した入射励起光 122 は、試薬容器 130 に入射し、試薬容器 130 内の測定試料に照射される。試薬容器 130 は、例えば、着脱可能な容器（より具体的には、セル、およびプレパラート等）、およびマイクロ流路チップである。マイクロ流路チップは、微小な流路を有するチップである。試薬容器 130 がマイクロ流路チップである場合、

例えば、第1実施形態に係るナノ粒子体（試薬）と検体とを混合して連続的に供給することができる。このため、あらかじめ測定試料を混合して調製する必要がなく、連続的に測定することが可能となる。

[0058] 入射励起光122が照射された測定試料は、蛍光（検出光132）を発する。受光光学系140は、試薬容器130への入射励起光122の進行方向に対して直角方向に配置される。受光光学系140は、測定試料から発せられた検出光132の断面径等を調整し、入射励起光122の散乱光を取り除く、もしくは光量を調整することが出来る。受光光学系140は、レンズ144および光学フィルタ146である。光学フィルタ146は、例えば、バンドパスフィルタ、およびダイクロイックミラーである。

[0059] 受光光学系140を通過した蛍光142は、受光素子150で検出される。受光素子150は、例えば、PD、APD、PMT、CCDカメラ、および分光器である。受光素子150は、単一波長の蛍光量の測定、蛍光スペクトルの測定、および2次元平面の蛍光イメージング作成が可能である。

[0060] <第2実施形態：ナノ粒子体>

第2実施形態は、第1実施形態とは、蛍光物質の分光特性が異なる。この相違する構成を主として以下に説明する。なお、第2実施形態において、第1実施形態と同一の符号は、第1実施形態と同じ構成であるため、その説明を省略する。

[0061] 第1実施形態において被験物質を検出するための蛍光は、蛍光物質6の吸収スペクトル202とプラズモン共鳴スペクトル206との重なり208で誘起される「励起誘起型蛍光」であった。第2実施形態において被験物質を検出するための蛍光は、蛍光物質6Aの蛍光スペクトルとプラズモン共鳴スペクトル206との重なりで誘起される「発光誘起型蛍光」である。

なお、本明細書において、第2実施形態に係るナノ粒子体での蛍光物質は、第1実施形態に係るナノ粒子体での蛍光物質6と分光特性が異なることを示しかつ区別すべく、「蛍光物質6A」とも称する。

[0062] 本実施形態に係るナノ粒子体は、検出感度を高めることができる。特定の

理論に拘束されるわけではないが、その理由は以下のように推測される。本実施形態に係るナノ粒子体では、蛍光物質 6 A が、2 以上のナノ粒子体が被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される。これにより、蛍光物質 6 A の蛍光スペクトルと、複合体における金属ナノ粒子に由来するプラズモン共鳴スペクトル 206 との重なりが生じ、多重極子共鳴による双極子—双極子機構およびパーセル効果によって被験物質を検出するための蛍光が誘起される。よって、蛍光物質 6 A は複合体に由来するプラズモン共鳴の発光波長の光によって十分に励起されるため、検出感度を高めることができる。

[0063] 図 7 を参照して説明する。図 7 は、単粒子状態の金属ナノ粒子 2 に由来するプラズモン共鳴スペクトル 201 および複合体における金属ナノ粒子 2 に由来するプラズモン共鳴スペクトル 206、ならびに蛍光物質 6 A の蛍光スペクトル 210 を示す概念図である。本実施形態では、蛍光物質 6 A の蛍光スペクトル 210 と複合体における金属ナノ粒子に由来する共鳴スペクトル 206 との重なり 212 が存在するように（好ましくは、大きくなるように）、蛍光物質 6 A が選択される。このように、蛍光物質 6 A の蛍光波長域 WR_E がプラズモン共鳴の第 1 発光波長域 WR_{E1} と重なる場合、蛍光物質 6 A が十分に励起され、蛍光が増強されて検出感度が大きく向上する。よって、本実施形態に係るナノ粒子体は、検出感度を高めることができると考えられる。

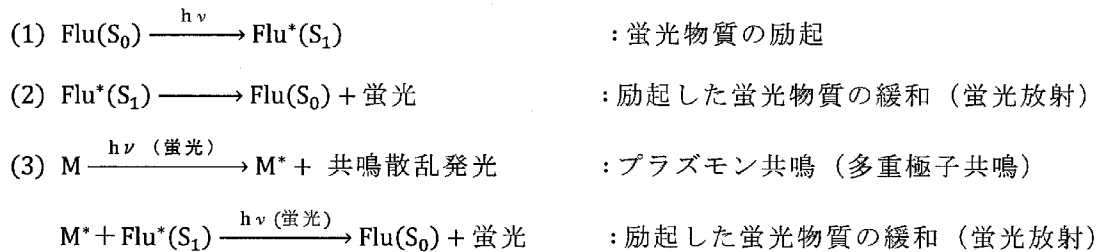
換言すれば、被験物質の検出感度を高める観点から、第 2 領域 R_2 を存在させるような蛍光物質 6 A を選択することが重要である。ここで、第 2 領域 R_2 とは、図 7 に示すように、多重極子共鳴スペクトル 206 と、蛍光物質の蛍光スペクトル 210 とが重なった領域（重なり 212 に相当する領域）をいう。被験物質の検出感度をより高める観点から、好ましくは第 2 領域 R_2 が大きくなるような蛍光物質 6 A を選択することが重要である。

[0064] [スキーム 2]

本実施形態に係るナノ粒子体を用いて被験物質を検出する過程のスキーム

2 :

[化3]



（スキーム2の素過程（1）～（3）中、 S_0 は基底状態を示し、 S_1 は励起一重項状態を示し、 $*$ は励起状態を示し、 Flu は（複合体中の）蛍光物質6Aを示し、 M は（複合体中の）金属ナノ粒子2を示す）

を以下に示す。

[0065] スキーム2は、素過程（1）～（3）を含んで構成されている。

素過程（1）に示すように、例えば、外部照射光によって蛍光物質6Aが励起される。

素過程（2）に示すように、励起状態の蛍光物質6Aが緩和して蛍光を放射する。

素過程（3）に示すように、放射された蛍光によって、金属ナノ粒子2の表面にプラズモン共鳴（多重極子共鳴）が誘起される（つまり、複合体におけるプラズモン共鳴は、蛍光物質6Aが放射する蛍光によって誘起される）。このプラズモン共鳴（多重極子共鳴）は、蛍光物質6Aの発光波長域 WR_E がプラズモン共鳴の第1発光波長域 WR_{E1} と重なる場合に、効率よく、励起状態の蛍光物質6Aの蛍光放射が誘起される。

[0066] 好適な一態様では、第1発光波長域 WR_{E1} における蛍光物質6Aの最大蛍光波長が、500～700nm（より好ましくは、550～700nm、さらに好ましくは600～700nm）に位置する。つまり、複合体における金属ナノ粒子2由来のプラズモン共鳴スペクトルの第1発光波長領域 WR_{E1} 内の500～700nmに、蛍光物質6Aの最大蛍光波長が位置する。蛍光物質としては、例えば、フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体、シアニ

ン色素、およびMolecular Probes社製のAlexa Fluor（登録商標）が挙げられる。これらのうち、最大蛍光波長500～700nmである蛍光物質6Aとしては、例えば、東京化成工業株式会社製「Ruthenium(II) tris (Bipyridyl) -C5-NH S ester」、ならびにAlexa Fluor（登録商標）シリーズの430、488、532、546、555、568、594、および640が挙げられる。なお、最大蛍光波長は、以下のようにして決定できる。蛍光物質の水溶液（溶媒：脱イオン水）の吸収スペクトルを測定し、得られた吸収スペクトルのピーク位置を決定する。当該ピーク位置の波長の励起光を蛍光物質6Aに照射し、蛍光物質の水溶液の蛍光スペクトルを測定し、得られた蛍光スペクトルのピーク位置を最大蛍光波長とする。

[0067] <第3実施形態：ナノ粒子体>

第3実施形態は、第1実施形態および第2実施形態とは、蛍光物質の分光特性が異なる。この相違する構成を主として以下に説明する。なお、第3実施形態において、第1実施形態および第2実施形態と同一の符号は、第1実施形態および第2実施形態と同じ構成であるため、その説明を省略する。

[0068] 第3実施形態において被験物質を検出するための蛍光は、第1実施形態で示した蛍光物質6の吸収スペクトル202とプラズモン共鳴スペクトル206との重なり208で誘起され、かつ第2実施形態で示した蛍光物質6Aの蛍光スペクトル210とプラズモン共鳴スペクトル206の重なり212で誘起される。つまり、複合体におけるプラズモン共鳴は、外部照射光によって誘起される励起誘起型蛍光であり、かつ蛍光によって誘起される発光誘起型蛍光である。

なお、本明細書において、第3実施形態に係るナノ粒子体での蛍光物質は、第1実施形態に係るナノ粒子体での蛍光物質6および第2実施形態に係るナノ粒子体での蛍光物質6Aと分光特性が異なることを示しかつ区別すべく、「蛍光物質6B」とも称する。

[0069] 図8を参照して説明する。図8は、単粒子状態の金属ナノ粒子2に由来す

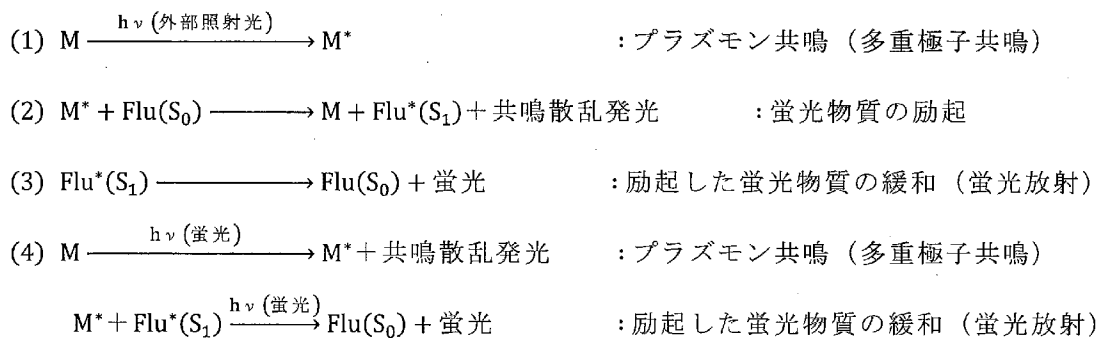
るプラズモン共鳴スペクトル 201 および複合体における金属ナノ粒子 2 のプラズモン共鳴スペクトル 206、ならびに蛍光物質 6B の吸収スペクトル 202 および蛍光スペクトル 210 を示す概念図である。本実施形態では、被験物質の検出感度を高める観点から、蛍光物質 6B の吸収スペクトル 202 および蛍光スペクトル 210 と複合体における金属ナノ粒子 2 に由来する共鳴スペクトル 206 との重なり（それぞれ吸収波長域 WR_A と第 1 発光波長域 WR_{E1} との重なり 208 ならびに蛍光波長域 WR_E と第 1 発光波長域 WR_{E1} との重なり 212）が存在するように蛍光物質 6B が選択される。さらに、好適な態様では、被験物質の検出感度をさらに高める観点から、重なり 208 および重なり 212 が大きくなるように、蛍光物質 6B が選択され得る。このため、蛍光物質 6B が十分に励起され、蛍光が増強されて検出感度が大きく向上する。よって、本実施形態に係るナノ粒子体は、検出感度を高めることができると考えられる。

[0070] [スキーム 3]

本実施形態に係るナノ粒子を用いて被験物質を検出する過程のスキーム 3

:

[化 4]



(スキーム 3 の素過程 (1) ~ (4) 中、 S_0 は基底状態を示し、 S_1 は励起一重項状態を示し、* は励起状態を示し、Flu は (複合体中の) 蛍光物質 6B を示し、M は (複合体中の) 金属ナノ粒子 2 を示す) を以下に示す。

[0071] スキーム 3 は、素過程 (1) ~ (4) を含んで構成されている。

素過程（１）に示すように、被験物質を捕捉して形成された複合体に外部照射光を照射すると、金属ナノ粒子２の表面にプラズモン共鳴（多重極子共鳴）が誘起される（つまり、複合体におけるプラズモン共鳴は、外部照射光によって誘起される）。

素過程（２）に示すように、双極子－双極子機構および近接場によって蛍光物質６Ｂが励起される。蛍光物質６Ｂの吸収波長域 WR_A がプラズモン共鳴の第１発光波長域 WR_{E1} と重なる場合に、蛍光物質６Ｂは効率よく励起される。

素過程（３）に示すように、励起状態の蛍光物質６Ｂが緩和して蛍光を放射する。

素過程（４）に示すように、放射された蛍光によって、金属ナノ粒子２の表面にプラズモン共鳴（多重極子共鳴）が誘起される（つまり、複合体におけるプラズモン共鳴は、蛍光物質６Ｂが放射する蛍光によって誘起される）。このプラズモン共鳴（多重極子共鳴）は、蛍光物質６Ｂの発光波長域 WR_E がプラズモン共鳴の第１発光波長域 WR_{E1} と重なる場合に、効率よく励起状態の蛍光物質６Ｂの蛍光放射が誘起される。

[0072] 外部照射光の光量は蛍光の光量に比べ大きい。よって、検出感度をより向上させる観点から、好ましくは、第１発光波長域 WR_{E1} と蛍光物質６Ｂの吸収波長域 WR_A とが重なる第１領域 R_1 が、第２発光波長域 WR_{E2} と蛍光物質６Ｂの吸収波長域 WR_A とが重なる第２領域 R_2 に比べ大きくなるように、蛍光物質６Ｂが選択される（参照：図８）。

[0073] （第１領域 R_1 と第２領域 R_2 との大小関係の判定方法）

第１領域 R_1 と第２領域 R_2 との大小関係の判定方法は、以下のようにして実施する。蛍光顕微分光測定装置（実施例にて詳述する）を用いて、複合体のプラズモン共鳴スペクトルを測定する。プラズモン共鳴スペクトルにおける多重極子共鳴スペクトル２０６を特定する。蛍光物質６Ｂの吸収スペクトル２０２および蛍光スペクトル２１０を測定する（蛍光物質６Ｂの測定試料は、溶媒としての脱イオン水で調製する）。

規格化した多重極子共鳴スペクトル 206 と蛍光物質 6B の規格化した吸収スペクトル 202 との重なり 208 を作成する。重なり 208 の積分値を算出する。規格化した多重極子共鳴スペクトル 206 と蛍光物質 6B の規格化した蛍光スペクトル 210 との重なり 212 を作成する。重なり 212 の積分値を算出する。得られた積分値の大小関係に基づいて、第 1 領域 R_1 と第 2 領域 R_2 との大小関係を判定する。

[0074] <第 4 実施形態：複合体>

図 9 を参照して、複合体を説明する。図 9 は、第 4 実施形態に係る複合体を模式的に示す断面図である。第 4 実施形態に係る複合体は、第 1 実施形態に係るナノ粒子体 1 を 2 つ含んで成り、2 つのナノ粒子体 1 が第 1 ナノ粒子体 10 と、第 2 ナノ粒子体 20 とを含み、第 1 ナノ粒子体 10 と、第 2 ナノ粒子体 20 とは被験物質 30 を介して結合する。複合体 40 は、検出対象である被験物質 30 と、2 つのナノ粒子体 10, 20 とを含んで成る。2 つのナノ粒子体 10, 20 は、複合体 40 において、被験物質 30 を介して結合されている。つまり、第 1 実施形態に係るナノ粒子体 10, 20 は、被験物質 30 を介して結合された、第 4 実施形態に係る複合体を形成する。2 つのナノ粒子体 10, 20 のうち、一方を第 1 ナノ粒子体 10 と称し、もう一方のナノ粒子体を第 2 ナノ粒子体 20 と称する。

[0075] 複合体 40 において、第 1 ナノ粒子体 10 は、第 1 金属ナノ粒子 12 と、第 1 金属ナノ粒子 12 の表面を被覆する第 1 高分子膜 13 と、検体中の被験物質 30 と特異的に結合する第 1 特異結合物質 14 と、第 1 高分子膜 13 に標識された第 1 蛍光物質 16 とを含んで成る。第 1 特異結合物質 14 は、第 1 高分子膜 13 の表面に結合している。つまり、第 1 ナノ粒子体 10 は、金属ナノ粒子としての第 1 金属ナノ粒子 12 と、高分子膜としての第 1 高分子膜 13 と、特異結合物質としての第 1 特異結合物質 14 と、蛍光物質としての第 1 蛍光物質 16 とを含む。

また、複合体 40 において、第 2 ナノ粒子体 20 は、第 2 金属ナノ粒子 22 と、第 2 金属ナノ粒子 22 の表面を被覆する第 2 高分子膜 23 と、検体中

の被験物質 30 と特異的に結合する第 2 特異結合物質 24 と、第 2 高分子膜 23 に標識された第 2 蛍光物質 26 とを含んで成る。第 2 特異結合物質 24 は、第 2 高分子膜 23 の表面に結合している。つまり、第 2 ナノ粒子体 20 は、金属ナノ粒子としての第 2 金属ナノ粒子 22 と、高分子膜としての第 2 高分子膜 23 と、特異結合物質としての第 2 特異結合物質 24 と、蛍光物質としての第 2 蛍光物質 26 とを含む。

[0076] 蛍光強度をより増大させる観点から、励起した蛍光物質 16, 26 が消光されにくい範囲で、離隔距離 L が小さい方が好ましい。より具体的には、好適な態様では、複合体 40 における 2 つのナノ粒子体 10, 20 が互いに近接する。より好適な態様では、複合体 40 における第 1 ナノ粒子体 10 の第 1 高分子膜 13 と第 2 ナノ粒子体 20 の第 2 高分子膜 23 とが接触するように 2 つのナノ粒子体 10, 20 が互いに近接する。さらに好適な態様では、複合体 40 における第 1 ナノ粒子体 10 の第 1 高分子膜 13 および第 2 ナノ粒子体 20 の第 2 高分子膜 23 のうちの少なくともいずれかの高分子膜が収縮して接触するように 2 つのナノ粒子体 10, 20 が互いに近接する。

[0077] さらに好適な態様において、高分子膜 13, 23 のうちの少なくともいずれかの高分子膜が収縮して互いに接触する場合、例えば、図 9 に記載の複合体 40 では、被験物質 30 と、被験物質 30 に結合する特異結合物質 14, 24 と、蛍光物質 16, 26 とのうちの少なくとも 1 つを、高分子膜 13, 23 中に入り込ませることができると考えられる。また、より好適な態様において、高分子膜 13, 23 が互いに接触する場合、例えば、図 9 に記載の複合体 40 では、さらに好適な態様と同様に被験物質 30 と、被験物質 30 に結合する特異結合物質 14, 24 と、蛍光物質 16, 26 とのうちの少なくとも 1 つを、高分子膜 13, 23 中に入り込ませることができると考えられる（後述する図 10 で示される複合体も同様である）。

[0078] 本実施形態では、金属ナノ粒子 12, 22 の表面を被覆する膜が高分子膜 13, 23 であるため、蛍光強度を増大させることができる。特定の理論に拘束されるわけではないが、その理由は以下のように推測される。金属ナノ

粒子 1 2, 2 2 の表面を被覆する膜が高分子膜 1 3, 2 3 であり、高分子膜 1 3, 2 3 は、無機酸化物を含む無機膜に比べ、比較的高い柔軟性を有する。このため、複合体 4 0 において、高分子膜 1 3, 2 3 が収縮することができ、これにより 2 つの金属ナノ粒子 1 2, 2 2 が高分子膜の膜厚 2 つ分（高分子膜 1 3 の膜厚 + 高分子膜 2 3 の膜厚）に相当する距離よりも近接することが可能となる。つまり、金属ナノ粒子 1 2, 2 2 の表面を被覆する膜が高分子膜 1 3, 2 3 であるため、離隔距離 L は、高分子膜の膜厚 2 つ分未満となり得る。これにより、プラズモン増強効果が得やすく、蛍光強度がより増大する。なお、本明細書において、「高分子膜の膜厚 2 つ分」における高分子膜の膜厚とは、離隔距離の対象となる収縮した部分の高分子膜 1 3, 2 3 の膜厚ではなく、離隔対象とならない収縮していない部分の高分子膜 1 3, 2 3 の膜厚である。

[0079] 本実施形態では、高分子膜 1 3, 2 3 が硫黄原子を介した結合部位 3 a、正帯電性基 3 b、および疎水性基 3 c からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む（例えば、高分子膜 1 3, 2 3 を構成する高分子 3 A が硫黄原子を介した結合部位 3 a、正帯電性基 3 b、および疎水性基 3 c からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む）ため、蛍光強度をさらに増大させることができる。特定の理論に拘束されるわけではないが、その理由は以下のように推測される。かかる場合、結合部位 3 a、正帯電性基 3 b、および疎水性基 3 c の少なくとも 1 つは金属ナノ粒子 1 2, 2 2 の表面と結合を形成する。このため、高分子 3 A は網目状構造を有し、金属ナノ粒子 1 2, 2 2 の表面を網目状に被覆すると考えられる。このように高分子 3 A は網目状構造を有するため、さらに比較的高い柔軟性を有する。このため、複合体 4 0 において、高分子膜 1 3, 2 3 がさらに収縮することができ、これにより 2 つの金属ナノ粒子 1 2, 2 2 が高分子膜の膜厚 2 つ分に相当する距離よりもさらに近接することが可能となる。よって、本実施形態では、離隔距離 L は、高分子膜の膜厚 2 つ分未満となり得、プラズモン増強効果がさらに得られ、蛍光強度がさらに増大する。

[0080] 好適な態様では、高分子膜 13, 23 を構成する高分子 3A が、その側鎖（より具体的には、側鎖末端）に硫黄原子を介した結合部位 3a、正帯電性基 3b、および疎水性基 3c からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む。好適な態様では、蛍光強度をさらに増大させることができる。特定の理論に拘束されるわけではないが、その理由は以下のように推測される。かかる場合、結合部位 3a、正帯電性基 3b、および疎水性基 3c の少なくとも 1 つは金属ナノ粒子 12, 22 の表面と結合を形成する。このため、高分子 3A は網目状構造を有し、側鎖を結合部位として金属ナノ粒子 12, 22 の表面を網目状に被覆すると考えられる。このように高分子 3A は網目状構造を有するため、さらに比較的高い柔軟性を有する。このため、複合体 40 において、高分子膜 13, 23 がさらに収縮することができ、これにより 2 つの金属ナノ粒子 12, 22 が高分子膜の膜厚 2 つ分に相当する距離よりもさらに近接することが可能となる。よって、本実施形態では、離隔距離 L は、高分子膜の膜厚 2 つ分未満となり得、プラズモン増強効果がさらに得られ、蛍光強度がさらに増大する。

[0081] 第 1 ナノ粒子体 10 と第 2 ナノ粒子体 20 との間の離隔距離 L は、例えば、12 nm ～ 52 nm であり、好ましくは 12 nm ～ 27 nm である。離隔距離 L は、第 1 金属ナノ粒子 12 と第 2 金属ナノ粒子 22 との間の距離であって、第 1 ナノ粒子体 10 の表面上の第 1 点 P1 と、第 2 ナノ粒子体 20 の表面上の第 2 点 P2 とで結ばれる線分が最小となる距離である。離隔距離 L が 52 nm 以下である場合、複合体 40 に励起光が照射されると、第 1、第 2 金属ナノ粒子 12, 22 間の表面近傍の空間でより効率的に近接場が発生するため、蛍光強度をより増大させることができる。

[0082] 金属ナノ粒子 12, 22 の表面を被覆する膜が高分子膜 13, 23 であり、高分子膜 13, 23 を構成する高分子 3A が（例えば、側鎖に（より具体的には、側鎖末端に））硫黄原子を介した結合部位 3a、正帯電性基 3b、および疎水性基 3c からなる群より選択される少なくとも 1 つを有する。このため、離隔距離 L は、上述のように、複合体 40 における 2 つの金属ナノ

粒子 1 2, 2 2 の表面を被覆する高分子膜の膜厚 2 つ分に相当する距離よりも近接することができる。例えば、高分子膜 1 3, 2 3 の膜厚が 5 nm である場合、離隔距離 L は、10 nm 未満（より具体的には、2 ~ 9 nm、3 ~ 8 nm および 4 ~ 7 nm 等）となり得る。

[0083] 複合体 4 0 は、図 9 ~ 1 1 に示すように、2 つのナノ粒子体 1 0, 2 0 を含んで構成されてもよく、例えば、図 1 2 に示すように、3 つのナノ粒子体 1 0, 2 0, 6 0 を含んで構成されてもよい。また、複合体は、4 つ以上のナノ粒子体を含んで構成されてもよい。図 1 1 は、2 つのナノ粒子体から構成される複合体 4 0 を示す図である。図 1 2 は、3 つのナノ粒子体から構成される複合体 4 0 を示す図である。

[0084] 第 1 ~ 3 実施形態では、多重極子共鳴は、複合体 4 0 における金属ナノ粒子 1 2, 2 2 に由来するプラズモン共鳴であると説明した。図 1 1 および図 1 2 を参照してより詳細に説明する。図 1 1 では、複合体 4 0 におけるナノ粒子体 1 0, 2 0 間の結合部位（より具体的には、被験物質 3 0 および特異結合物質 1 4, 2 4）を結合ポイント 5 0 で表記している（図 1 2 も同様である）。2 つのナノ粒子体 1 0, 2 0 で構成される複合体 4 0 では、励起光の電場成分の振動方向（励起光の電場成分の偏光方向）が複合体 4 0 の長軸方向 D_{LA} と平行となる場合は、金属ナノ粒子 1 2, 2 2 表面の自由電子が長軸方向 D_{LA} に集団的な振動を起こし得る。このため、多重極子共鳴が双極子 - 双極子相互作用により引き起こされる。一方、励起光の電場成分の振動方向が複合体 4 0 の短軸方向 D_{SA} と平行となる場合は、金属ナノ粒子 1 2, 2 2 表面の自由電子が短軸方向 D_{SA} に集団的な振動を起こし得る。このため、単粒子状態の金属ナノ粒子と同様に、双極子共鳴が引き起こされる。

[0085] 3 つのナノ粒子体 1 0, 2 0, 6 0 で構成される複合体 4 0 では、多重極子共鳴に許容な励起光の電場成分の振動方向 D_1, D_2, D_3 の数が 3 であり、2 つのナノ粒子体 1 0, 2 0 で構成される複合体 4 0 に比べ、多い。さらに、3 つのナノ粒子体 1 0, 2 0, 6 0 で構成される複合体 4 0 は、結合ポイント 5 0 の数が 3 であり、2 つのナノ粒子体 1 0, 2 0 で構成される複合体

40に比べ、多い。このように、（2つのナノ粒子体10, 20が1つの被験物質30を介して結合している）結合ポイント50を複数含んでもよい。よって、複合体40を構成するナノ粒子体10, 20の数が多いほど、蛍光が増強されやすく、検出感度に優れる可能性がある。

[0086] （蛍光物質）

蛍光物質16, 26は、図9～10に示すように、第1金属ナノ粒子12と第2金属ナノ粒子22との間に位置づけられていることが好ましい。金属ナノ粒子12, 22間では近接場が効率的に生じる空間であるため、金属ナノ粒子12, 22間の空間に蛍光物質16, 26が位置づけられることでパーセル効果によって蛍光強度が増大されやすいからである。

[0087] （被験物質）

被験物質30は、検体に含まれる検出対象となる物質である。被験物質30としては、例えば、抗原、タンパク質、基質、および核酸鎖が挙げられる。被験物質30は、特異結合物質14, 24と特異的に結合する。例えば、抗原は、少なくとも2つの抗原決定基（epitope）を有し、抗原決定基で第1, 第2特異結合物質14, 24と特異的結合を形成する。抗原は、例えば、c反応性タンパク質、ミオグロビン、トロポニンT、トロポニンI、およびBNP等のようなタンパク質、ならびにインフルエンザウイルス、およびRSウイルス等のようなウイルスの抗原タンパク質である。被験物質30は、例えば、血液、血漿、尿、または唾液のような検体に由来する被験物質である。つまり、被験物質30を含む検体としては、例えば、血液、血漿、血清、尿、および唾液である。検体は、溶媒および緩衝液（より具体的には、リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline：PBS）、Tris緩衝液、HEPES緩衝液、MOPS緩衝液、およびMES緩衝液など）をさらに含んでもよい。

[0088] ＜その他の実施形態＞

本発明は上述の実施形態に限定されず、本発明の要旨を逸脱しない範囲で設計変更可能である。

[0089] 第1実施形態では、高分子3Bがジスルフィド結合を介して結合する正帯電性基3bおよび疎水性基3cをそれぞれ1つずつ有していたが、これに限定されない。高分子3Bは、正帯電性基3bおよび疎水性基3cを各々独立に2以上有していてもよい。すなわち、高分子3Bにおいて正帯電性基3bおよび疎水性基3cがそれぞれ結合する側鎖の数が2以上であってもよい。

[0090] 第4実施形態では、第1、第2蛍光物質16、26は、それぞれ第1、第2高分子膜13、23に標識されていたが、これに限定されない。例えば、図10は第4実施形態の変形例に係る複合体を模式的に示す断面図である。図10に示すように、第1、第2蛍光物質16、26が、それぞれ第1、第2特異結合物質14、24に標識されてもよい。この場合、第1、第2蛍光物質16、26を第1金属ナノ粒子12と第2金属ナノ粒子22との間に位置づけやすく、検出強度が向上するため、より好ましい。また、第1、第2蛍光物質16、26のうち一方が高分子膜13、23に標識され、他方が特異結合物質14、24に標識されてもよい。

[0091] 第4実施形態では、複合体40に2つの蛍光物質16、26が標識されていたが、これに限定されない。例えば、複合体40に標識される蛍光物質の数は、1または3以上であってもよい。

[0092] 第5実施形態では、測定装置100における受光光学系140は、試薬容器130への入射励起光122の進行方向に対して直角方向に配置されているが、これに限定されない。受光光学系140は、例えば、入射励起光122の進行方向に対して平行方向に配置されてもよく、または入射励起光122の進行方向に対して鋭角もしくは鈍角となる方向に配置されてもよい。

実施例

[0093] 以下、本発明について実施例を用いてさらに詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。また、特に明記しない限り、実施例における部および%は質量基準である。実施例および比較例は、特に明記がない限り、大気下常温下（1気圧、25℃）で実施された。

[0094] また、実施例および比較例では、金属ナノ粒子の分散液中での濃度を吸光度で表記することもある。吸光度は、紫外可視分光光度計（TECANジャパン株式会社製「infinite M200 PRO」）を用いて、測定された。吸収波長は、それぞれの試料により異なるため、各試料ごとに記載した。なお、吸光度の表記ODに下付きに付された数字は、吸収波長を示す。例えば、 $OD_{455} = 0.1$ は、波長455 nmでの吸光度が0.1であることを示す。

[0095] <実施例1>

[1. 高分子膜の形成]

図14～15を参照して、高分子膜の形成方法を説明する。図14～15は、実施例1の高分子膜の形成方法を示す模式図を示す。図14に示すように、ポリーレーリシン（株式会社ペプチド研究所製「3075」）と、3-（2-ピリジルジチオ）プロピオンアミド-PEG₄-NHS（Thermo Fisher Scientific社製、製造番号「26128」、「NHS-PEG₄-SPDP」）とを、室温および4時間の条件で、小型回転培養器（タイテック株式会社製「RT-30mini」）を用いて攪拌し、混合した。その結果、高分子を得た。この合成反応は、ポリーレーリシンの第1級アミノ基が3-（2-ピリジルジチオ）プロピオンアミド-PEG₄-NHSのNHSエステル基に攻撃する求核置換反応である。合成した高分子3Bは、ジスルフィド結合を側鎖に有していた。より具体的には、合成した高分子は、ジスルフィド結合を介して結合する疎水性基（ピリジル基）3cと、正帯電性基（第1アンモニウム基）3bとを有していた。

[0096] 得られた高分子3Bを金属ナノ粒子2に接触させて、高分子膜3を形成した。より具体的には、得られた高分子3Bを金属ナノ粒子2としての銀ナノ粒子（nanocomposix製「AGCB80-1M」、直径80 nm、 $OD_{455} = 0.1$ ）の分散液1 mLに、添加し、室温およびオーバーナイトの条件で、小型回転培養器（タイテック株式会社製「RT-30mini」）を用いて攪拌し、混合した。その結果、高分子膜で被覆された銀ナノ粒子の

分散液を得た。

[0097] 図15に示すように、高分子膜3は、銀ナノ粒子2の表面に硫黄原子を介した結合部位3aと、銀ナノ粒子2の表面と疎水結合を形成する疎水性基（ピリジル基）3cと、銀ナノ粒子2の表面と静電結合bを形成する正帯電性基（第1級アンモニウム基）3bとを含んでいる。つまり、高分子膜3を構成する高分子3Aは、銀ナノ粒子2の表面に硫黄原子を介した結合部位3aと、銀ナノ粒子2の表面と疎水結合cをする疎水性基（ピリジル基）3cと、銀ナノ粒子2の表面と静電結合を形成する正帯電性基（第1級アンモニウム基）3bとを有する。得られた銀ナノ粒子2のSEM画像（倍率500, 000倍）を作成し、銀ナノ粒子2の表面が高分子膜3によって連続的に被覆されていることが確認された（以下、高分子膜3で被覆された銀ナノ粒子を「高分子被覆銀ナノ粒子」との称する）。また、SEM画像から銀ナノ粒子2を被覆する高分子膜3の膜厚を測定した。

[0098] [2. ナノ粒子体の作製]

図16は、実施例1の蛍光標識した抗体を結合したナノ粒子体1の構造を示す模式図である。図16に示すナノ粒子体は、はじめに、高分子被膜金属ナノ粒子の表面に架橋剤を結合させ、別途、ナノ抗体に蛍光物質および架橋剤を結合させ、次いで、高分子被膜金属ナノ粒子に結合した架橋剤と、ナノ抗体に結合した架橋剤とを結合させて作製した。以下、蛍光標識抗体を結合したナノ粒子体の作製の詳細について説明する。

[0099] (2-1. 高分子被膜銀ナノ粒子への架橋剤の結合)

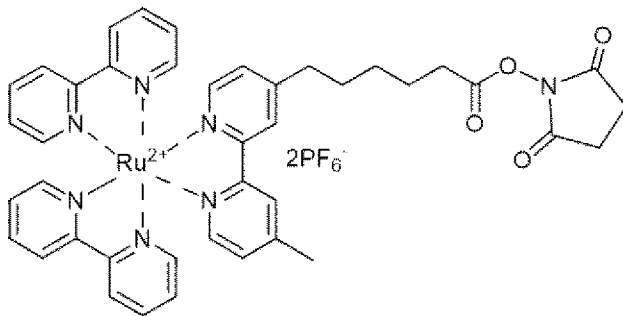
作製した高分子被膜銀ナノ粒子の分散液1mLに、さらに架橋剤SM (PEG) 2 (PEGylated, long-chain SMCC cross linker) (ThermoFisher Scientific社製「22105」) およびヘパリンナトリウム（富士フイルム和光純薬株式会社製「081-00136」）を添加し、室温および1時間の条件で、小型回転培養機（タイテック株式会社製「RT-30mini」）を用いて攪拌し、混合した。その結果、高分子膜3に架橋剤SM (PEG) 2が結合した銀ナ

ノ粒子（以下、SM（PEG）2リンカーが結合した高分子被膜銀ナノ粒子とも称する）の分散液を得た。高分子被膜銀ナノ粒子に結合するSM（PEG）2リンカーは、マレイミド基を有していた。

[0100] （2-2. VHH抗体への蛍光標識）

VHH抗体（RePHAGEN社製、分子質量18,000Da）100 μ gに対して[化5]の化学式：

[化5]



で表されるNHS標識Ru錯体誘導体（東京化成工業株式会社製「Ruthenium(II) tris(Bipyridyl)-C5-NHS ester」）を添加し、室温および1時間の条件で、小型回転培養機（タイテック株式会社製「RT-30mini」）を用いて攪拌し、混合した。その結果、蛍光物質が結合したVHH抗体（以下、蛍光標識VHH抗体とも称する）を得た。なお、当該NHS標識Ru錯体誘導体は、500～700nmに最大蛍光波長を有する蛍光物質である。

[0101] （2-3. 蛍光標識VHH抗体への架橋剤の結合）

次いで、蛍光物質標識VHH抗体にNHS-ビピリジルジスルフィド架橋剤としての3-（2-ピリジルジチオ）プロピオンアミド-PEG4-NHS（Thermo Fisher Scientific社製 製品番号「26128」、「NHS-PEG4-SPDP」）をモル比で8倍当量加え、室温および1時間の条件で小型回転培養機（タイテック株式会社製「RT-30mini」）を用いて攪拌し、混合した。その結果、蛍光物質およびSPDPリンカーが結合したVHH抗体（以下、SPDPリンカーが結合した蛍光標識VHH抗体とも称する）を得た。

[0102] (2-4. 架橋剤が結合した蛍光標識VHH抗体のチオール化)

次いで、SPDPリンカーが結合した蛍光標識VHH抗体に対して、還元剤TCEP (ThermoFisherSCIENTIFIC社製「77720」) をモル比で2倍当量加え、37℃および1時間の条件で攪拌機 (BioSan社製「TS-100」) を用いて攪拌し、混合した。その結果、蛍光物質と、還元されたSPDPリンカー (以下、還元SPDPリンカーとも称する) とが結合したVHH抗体 (以下、還元SPDPリンカーが結合した蛍光標識VHH抗体とも称する) を得た。還元SPDPリンカーは、ジスルフィド結合の還元により生成されたチオール基 (-SH基) を有していた。

[0103] (2-5. 蛍光標識VHH抗体の銀ナノ粒子への結合)

次いで、マレイミド基を有するSM (PEG) 6リンカーが結合した高分子被膜銀ナノ粒子の分散液 ($OD_{430} = 0.1$) に対して還元SPDPリンカーが結合した蛍光標識VHH抗体を加え、室温およびオーバーナイトの条件で、小型回転培養機 (タイテック株式会社製「RT-30mini」) を用いて攪拌し、混合した。その結果、SM (PEG) 6リンカーのマレイミド基と還元SPDPリンカーのチオール基とが反応して、蛍光標識VHH抗体がリンカー部を介して結合したナノ粒子体を得た (図16参照)。

[0104] [3. 複合体の作製]

得られたナノ粒子体のリン酸塩緩衝溶液に被験物質30としてのC Reactive Protein (ADVY CHEMICALシグマアルドリッチ社製「00-AGN-AP-CRP-00」) (以下、CRP抗原とも称する) を添加し、室温および5分の条件で、小型回転培養機 (タイテック株式会社製「RT-30mini」) を用いて攪拌して、測定試料 ($OD_{455} = 0.4$) を調製した。ブランクとして、CRP抗原30を含まないナノ粒子体のリン酸緩衝溶液を別途準備した。

[0105] [4. 評価方法]

(4-1. イムノクロマトグラフィー法による被験物質の検出)

図17は、イムノクロマトグラフィーストリップ（以下、単に「ストリップ」とも称する）を示す模式図である。このストリップ300は、短冊状であって、その一方の端部に配置され、測定試料を滴下するサンプルパッド301と、中央に配置された判定ライン303とを備える。判定ライン303には、被験物質30としてのCPR抗原が固定されている。測定試料をサンプルパッド301に滴下すると、毛細管現象により測定試料中の複合体40が判定ライン303側へ（方向305に沿って）移動する。複合体40が判定ライン303に到達すると、CPR抗原と抗原抗体反応に起こし、複合体40が捕捉される。

[0106] ストリップ300のサンプルパッド301に測定試料を滴下して所定の時間静置した。静置したストリップ300を蛍光光度計（PHC株式会社製「社内実験用蛍光光度計」）にセットした。励起光（波長：415～455 nm）を判定ライン303に照射して、蛍光光量（検出波長573 nmまたは613 nm）を測定した。得られた測定値からブランクの測定値を差し引き、蛍光物質由来の蛍光光量の有無を判定した。その結果、測定試料の調製において、CPR抗原の濃度が42 pM（単位： $\times 10^{-12}$ mol/L）以上で蛍光が検出された。

[0107] 静置したストリップ300を吸光光度計（PHC株式会社製「社内実験用吸光光度計」）にセットした。可視光（波長415～455 nm）を判定ライン303に照射して、反射光を測定した。得られた測定値からブランクの測定値を差し引き、金属ナノ粒子由来の反射光の有無を判定した。その結果、測定試料の調製において、CPR抗原の濃度が670 pM以上で反射光が検出された。

[0108] イムノグラフィー法によって被験物質30であるCPR抗原が検出された。これにより、測定試料において、複合体40が形成されていること、判定ラインに複合体40が存在することが裏付けられた。

[0109] （4-2. 被験物質存在下のプラズモン共鳴波長の分析）

はじめに、測定用試料を準備した。4-1と同様にして測定試料を調整し

た。スライドガラスに測定試料を滴下して、液滴の上にガラス製カバープレート置いて液滴を挟み込んで、測定用試料としての測定用プレパラートを作製した。なお、測定用プレパラートは液滴が存在する状態でプラズモン共鳴スペクトルの測定に使用された。

C R P 抗原を添加しないこと以外は測定用プレパラートと同様にして、ブランク用プレパラートを作製した。

[0110] 次いで、蛍光顕微分光測定装置を用いて測定対象のプラズモン共鳴スペクトルを測定した。測定用プレパラート上の測定対象（複合体）に、励起光（波長：400～650 nm）を細かく絞って連続的に照射し、プラズモン共鳴スペクトルを測定した。実施例1の測定対象（複合体）は、2個のナノ粒子体が被験物質（C R P 抗原）を介して2原子分子状に結合して構成される複合体であった。測定結果を図18（b）に示す。図18（b）は、測定用試料としての測定用プレパラートについての、実施例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す図である。

[0111] 同様にして、ブランク用プレパラートについて測定した。この測定では単分散状態（一次粒子状態）のナノ粒子体を測定対象とした。測定結果を図18（a）に示す。図18（a）は、測定用試料としてのブランク用プレパラートについての、実施例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す図である。

[0112] （測定結果）

図18（a）に示すように、ブランク用プレパラートについてのプラズモン共鳴スペクトルは、460～470 nm付近に単一のピークを有するスペクトル形状を示していた。このピークは、単分散のA g ナノ粒子に起因するプラズモン共鳴（双極子共鳴）に帰属された。

[0113] 図18（b）に示すように、測定用プレパラートについてのプラズモン共鳴スペクトルは、460～470 nm付近のピーク（短波長側のピーク）と、590～600 nm付近に存在するピーク（長波長側のピーク）とを有するスペクトル形状を示していた。短波長側のピークは、複合体（2つのナノ粒子体を含んで構成される、サンドイッチ型の複合体）の短軸方向と平行な

電場成分の偏光方向を有する励起光により誘起されたプラズモン共鳴（双極子共鳴）に帰属された。長波長側のピークは、複合体の長軸方向と平行な電場成分の偏光方向を有する励起光により誘起されたプラズモン共鳴（多重極子共鳴）に帰属された。

[0114] 別途、分光光度計装置（（TECANジャパン株式会社製「infinite M200 PRO」））を用いて蛍光物質（Ru錯体東京化成工業株式会社製「Ruthenium(II) tris (Bipyridyl) - C5-NHS ester」））の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。吸収スペクトルの測定条件は、測定波長230～500 nm、水溶液中で任意の濃度で測定した。蛍光スペクトルの測定条件は、励起波長450 nm、測定波長500～700 nm、および吸収スペクトルと同一の測定試料であった。得られた蛍光物質の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを図18（b）の測定用プレパラートについてのプラズモン共鳴スペクトルと重ね合わせて図19を作成した。

[0115] 図19は、実施例1のプラズモン共鳴スペクトル、ならびにRu錯体の吸収スペクトル202および蛍光スペクトル210を示す図である。図19に示すように、Ru錯体の蛍光スペクトル210の蛍光波長域 WR_E と、プラズモン共鳴スペクトルの長波長側のピーク（プラズモン共鳴スペクトル206）の第1発光波長域 WR_{E1} との重なり212（第2領域 R_2 ）が確認された。よって、実施例1での系で検出される蛍光は、発光誘起型蛍光であると結論付けた。

[0116] <実施例2>

[3. ナノ粒子体の作製]

実施例2のナノ粒子体の調製では、金属ナノ粒子を銀ナノ粒子（nanocomposix製「AGCB80-1M」，直径80 nm， $OD_{455}=0.1$ ）の分散液1 mLから銀ナノ粒子（nanocomposix製「AGCB50-1M」，直径50 nm， $OD_{455}=0.1$ ）に変更した以外は実施例1と同様にしてナノ粒子体を調製した。

[0117] (4-2. 被験物質存在下でのプラズモン共鳴波長の分析)

実施例1と同様にして、被験物質存在下のプラズモン共鳴波長の分析を行った。図20に測定結果を示す。図20は、(a) ブランク用プレパレートおよび(b) 測定用プレパレートについての、実施例2のプラズモン共鳴スペクトルを示す図である。なお、実施例2の測定対象は、15個のナノ粒子体から構成される複合体であった。

[0118] 図20(a)に示すように、ブランク用プレパレートについてのプラズモン共鳴スペクトルは、460~470nm付近に単一のピークを有するスペクトル形状を示していた。このピークは、単分散のAgナノ粒子に起因するプラズモン共鳴(双極子共鳴)に帰属された。

[0119] 図20(b)に示すように、測定用プレパレートについてのプラズモン共鳴スペクトルは、460~470nm付近のピーク(短波長側のピーク)と、590~600nm付近に存在するピーク(長波長側のピーク)とを有するスペクトル形状を示していた。短波長側のピークは、複合体の短軸方向と平行な電場成分の偏光方向を有する励起光により誘起されたプラズモン共鳴(双極子共鳴)に帰属された。長波長側のピークは、複合体の長軸方向と平行な電場成分の偏光方向を有する励起光により誘起されたプラズモン共鳴(多重極子共鳴)に帰属された。

[0120] 実施例1で得たRu錯体の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを図20(b)の測定用プレパレートについてのプラズモン共鳴スペクトルと重ね合わせて図21を作成した。図21に示すように、Ru錯体の蛍光スペクトル210の蛍光波長域 WR_E と、プラズモン共鳴スペクトルの長波長側のピーク(プラズモン共鳴スペクトル206)の第1発光波長域 WR_{E1} との重なり212(第2領域 R_2)が確認された。よって、実施例2での系で検出される蛍光は、発光誘起型蛍光であると結論付けた。

[0121] <実施例3>

[3. ナノ粒子体の作製]

実施例3のナノ粒子体の調製では、蛍光物質をNHS標識Ru錯体誘導体

(東京化成工業株式会社製「Ruthenium(II) tris (Bipyridyl) -C5-NHS ester」) から Alexa Fluor 594 carboxylic acid, succinimidyl ester (invitrogen社製「A10169」) に変更した以外は実施例1と同様にしてナノ粒子体を調製した。当該 Alexa Fluor 594 は、500～700 nm に最大吸収波長および最大蛍光波長を有する蛍光物質である。

[0122] (4-1. イムノクロマトグラフィー法による被験物質の検出)

実施例1と同様に、イムノクロマトグラフィー法による被験物質の検出を行った。判定ライン303に照射した励起光の波長は、600 nm であった。蛍光光量を測定した結果、測定試料の調製において CPR 抗原の濃度が 42 pM 以上で蛍光が検出された。反射光を測定した結果、測定試料の調製において CPR 抗原の濃度が 670 pM 以上で反射光が検出された。イムノグラフィー法によって被験物質である CPR 抗原が検出された。これにより、測定試料において、複合体40が形成されていること、判定ラインに複合体40が存在することが裏付けられた。

[0123] (4-2. 被験物質存在下でのプラズモン共鳴波長の分析)

別途、分光光度計装置 ((TECAN ジャパン株式会社製「infinite M200 PRO」)) を用いて蛍光物質 (Alexa Fluor 594 carboxylic acid, succinimidyl ester (invitrogen社製「A10169」20004)) の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。吸収スペクトルの測定条件は、測定波長 450～650 nm、測定試料の溶媒は、脱イオン水であった。

[0124] 得られた蛍光物質の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを図20(b)の測定用プレパラートについてのプラズモン共鳴スペクトルと重ね合わせて図22を作成した。図22は、実施例3の蛍光物質の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル、ならびに実施例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す図である。実施例3の蛍光物質の蛍光スペクトル210は、584 nm 付近にピークを示す。

ークを有する。実施例3の蛍光物質の蛍光スペクトル210は、613 nm付近にピークを有する。

なお、実施例3の系の代替として実施例1の系のプラズモン共鳴スペクトルを採用した。この理由は、実施例3の複合体では、実施例1の複合体に比べ、蛍光物質の種類が異なるだけで、プラズモン共鳴スペクトルを主として特徴づける金属ナノ粒子の材質および粒径が同じであるためである（わずかに、プラズモン共鳴スペクトルに蛍光物質の吸収が加味されるため、この点が異なると考えられる）。

[0125] 図22に示すように、蛍光物質の吸収スペクトル202の吸収波長域 WR_A と、プラズモン共鳴スペクトルの長波長側のピーク（多重極子共鳴スペクトル）206の第1発光波長域 WR_{E1} との重なり208（第1領域 R_1 ）が確認された。よって、実施例3での系で検出される蛍光は、主として励起誘起型蛍光であると結論付けた。

[0126] （4-3. 複合体の作製）

得られたナノ粒子体のリン酸塩緩衝溶液に被験物質30としてのCRP抗原を添加し、最終濃度90 ng/mLとして、室温および10分の条件で反応（抗体抗原反応）させた。これにより、ナノ粒子体と被験物質とで構成される複合体の混合液を調製した。調製した混合液を測定試料とした。ブランクとして、CRP抗原30を含まないナノ粒子体のリン酸緩衝溶液を別途準備した。

[0127] （4-4. 被験物質-ナノ粒子体系の蛍光分析）

被験物質-ナノ粒子体系の蛍光分析を行った。分光蛍光光度計（日本分光株式会社製「FP-8550」）を用いて、励起波長580 nm、測定波長範囲600~720 nmの条件で、複合体形成後の蛍光スペクトルを測定した。測定した結果を図23に示す。図23は、被験物質-ナノ粒子体系の蛍光スペクトルを示す図である。実線は被験物質-ナノ粒子体系の蛍光スペクトル、および破線はブランク試料の蛍光スペクトルをそれぞれ示す。被験物質-ナノ粒子体系の蛍光スペクトルは、614 nm付近に位置するピークを

有する。614 nm 付近のピーク強度は、ブランク試料の蛍光スペクトルにおける614 nm 付近のピーク強度に比べ、約4倍超である。

[0128] 図22に示すように、実施例3の蛍光物質は、586 nm 付近に最大吸収波長を有する。かつ実施例3の蛍光物質の吸収スペクトル202は、多重極子共鳴スペクトル206と大きく重なる。図22を示すような複合体のプラズモン共鳴波長の光に合わせた吸収を有する蛍光物質を用いることにより、図23に示すように効果的に蛍光増強していることを確認した。

[0129] <比較例1>

シリカ被覆された銀ナノ粒子（nanoComposix製、銀ナノ粒子の粒子径（コア粒子径）50 nm、シリカ膜の膜厚20 nm）を水（脱イオン水）で希釈して、シリカ被覆した銀ナノ粒子の水分散液を調製した。得られた水分散液を測定サンプルとした。詳しくは、測定サンプル中には、シリカ被覆された銀ナノ粒子（以下、シリカ被覆銀ナノ粒子とも称する）の一次粒子状態の他に、2以上の銀ナノ粒子が凝集した凝集体も存在していた。

[0130] 実施例1と同様にして、被験物質存在下のプラズモン共鳴波長の分析を行った。図24に測定結果を示す。図24は、比較例1のプラズモン共鳴スペクトルを示す（（a）一次粒子状態のシリカ被覆銀ナノ粒子および（b）3つのシリカ被覆銀ナノ粒子が略直線状に配列した凝集物）。図24（a）では、一次粒子状態のシリカ被覆銀ナノ粒子を測定試対象とし、図24（b）では、3つのシリカ被覆銀ナノ粒子が略直線状に配列した凝集物を測定対象としている。図24（a）に示すプラズモン共鳴スペクトルは、450 nm 付近に双極子共鳴に帰属されるピークを1つ有するスペクトル形状を示していた。図24（b）に示すプラズモン共鳴スペクトルは、図24（a）と同様に470 nm 付近に双極子共鳴に帰属されるピークを1つ有するスペクトル形状を示していた。比較例1では、多重極子に起因するプラズモン共鳴スペクトルのピークが観測されなかった。

[0131] <比較例2>

シリカ被覆された銀ナノ粒子（nanoComposix製、銀ナノ粒子

の粒子径（コア粒子径）50 nm、シリカ膜の膜厚7 nm）を水（脱イオン水）で希釈して、シリカ被覆した銀ナノ粒子の水分散液を調製した。得られた水分散液を測定サンプルとした。詳しくは、測定サンプル中には、シリカ被覆された銀ナノ粒子の一次粒子状態の他に、2以上の銀ナノ粒子が凝集した凝集体も存在していた。

[0132] 実施例1と同様にして、被験物質存在下のプラズモン共鳴波長の分析を行った。図25に測定結果を示す。図25は、比較例2のプラズモン共鳴スペクトルを示す（（a）一次粒子状態のシリカ被覆銀ナノ粒子および（b）3つのシリカ被覆銀ナノ粒子が略オゾン分子状に配列した凝集物）。図25（a）では、一次粒子状態のシリカ被覆銀ナノ粒子を測定試対象とし、図25（b）では、3つのシリカ被覆銀ナノ粒子が略オゾン分子状に配列した凝集物を測定対象としている。図25（a）に示すプラズモン共鳴スペクトルは、450 nm付近に双極子共鳴に帰属されるピークを1つ有するスペクトル形状を示していた。図25（b）に示すプラズモン共鳴スペクトルは、図25（a）と同様に450 nm付近に双極子共鳴に帰属されるピークを1つ有するスペクトル形状を示していた。比較例2では、多重極子に起因するプラズモン共鳴スペクトルのピークが観測されなかった。

[0133] 本開示に係るナノ粒子体、ナノ粒子体を含む複合体、ならびにナノ粒子体に含まれる高分子膜の形成方法の態様は、以下の通りである。

<1>

金属ナノ粒子と、

該金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、

検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と、

前記高分子膜の表面または前記特異結合物質に標識された蛍光物質とを含んで成るナノ粒子体であって、

前記蛍光物質は、2以上の前記ナノ粒子体が前記被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される、ナノ粒子体。

<2>

前記複合体におけるプラズモン共鳴は、外部から照射された光によって誘起される、<1>に記載のナノ粒子体。

<3>

前記複合体におけるプラズモン共鳴は、前記蛍光物質が放射する蛍光によって誘起される、<1>または<2>に記載のナノ粒子体。

<4>

前記蛍光物質の吸収波長域が、前記プラズモン共鳴の第1発光波長域と重なる、<1>～<3>のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

<5>

前記プラズモン共鳴の第1発光波長域は、単粒子の前記金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴の第2発光波長域に比べ長波長側に位置する、<1>～<4>のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

<6>

前記第1発光波長域と前記蛍光物質の吸収波長域とが重なる第1領域が、前記第2発光波長域と前記蛍光物質の前記吸収波長域とが重なる第2領域に比べ大きくなるように、前記蛍光物質が選択される、<5>に記載のナノ粒子体。

<7>

前記第1発光波長域における前記蛍光物質の最大吸収波長が、500～700nmに位置する、<5>または<6>に記載のナノ粒子体。

<8>

前記第1発光波長域における前記蛍光物質の最大蛍光波長が、500～700nmに位置する、<5>～<7>のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

<9>

前記複合体において誘起されるプラズモン共鳴が多重極子共鳴である、<1>～<8>のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

<10>

前記単粒子の前記金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴は、双極子共鳴である、＜5＞～＜8＞のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

＜11＞

前記高分子膜が、前記金属ナノ粒子の表面との間に硫黄原子を介した結合部位、正帯電性基、および疎水性基からなる群より選択される少なくとも1つを含む、＜1＞～＜10＞のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

＜12＞

前記高分子膜が、前記高分子膜を構成する高分子の側鎖に前記正帯電性基を少なくとも含み、

前記正帯電性基は、第1級アンモニウム基、第2級アンモニウム基、第3級アンモニウム基、第4級アンモニウム基、およびグアニジル基（ $\text{—NH—C(=NH}_2^+)\text{NH}_2$ ）からなる群より選択される少なくとも1種である、＜11＞に記載のナノ粒子体。

＜13＞

前記高分子膜が、前記高分子膜を構成する高分子の側鎖に前記疎水性基を少なくとも含み、

前記疎水性基は、芳香族環状基、脂肪族環状基、および脂肪族鎖状基からなる群より選択される少なくとも1種である、＜11＞に記載のナノ粒子体。

＜14＞

前記高分子膜の膜厚は、1 nm～10 nmである、＜1＞～＜13＞のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

＜15＞

プラズモン励起蛍光分析に用いるナノ粒子体である、＜1＞～＜14＞のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

＜16＞

前記特異結合物質がナノ抗体である、＜1＞～＜15＞のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

< 1 7 >

前記特異結合物質がV H H抗体である、< 1 >～< 1 6 >のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

< 1 8 >

前記金属ナノ粒子が金または銀を含んで成る、< 1 >～< 1 7 >のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

< 1 9 >

前記金属ナノ粒子の粒子径は、5～1 0 0 n mである、< 1 >～< 1 8 >のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

< 2 0 >

前記ナノ粒子体として第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体とが含まれ、

前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体とが前記被験物質を介して結合された複合体を形成する、< 1 >～< 1 9 >のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

< 2 1 >

前記被験物質が、血液、血漿、尿、または唾液である前記検体に由来する被験物質である、< 1 >～< 2 0 >のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

< 2 2 >

前記複合体において、前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体との間に蛍光物質が位置づけられている、< 2 0 >に記載のナノ粒子体。

< 2 3 >

< 1 >～< 2 2 >のいずれか1項に記載のナノ粒子体を2以上含んで成り、前記2以上のナノ粒子体が第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体とを含み、前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体とは前記被験物質を介して結合されている、複合体。

< 2 4 >

2つの前記ナノ粒子体が1つの前記被験物質を介して結合している結合ポイントを複数含む、< 2 3 >に記載の複合体。

< 2 5 >

ジスルフィド結合を側鎖に有する高分子を金属ナノ粒子に接触させて、前記高分子が前記金属ナノ粒子の表面に硫黄原子を介して結合した高分子膜を形成する工程を含んで成る、高分子膜の形成方法。

< 2 6 >

前記高分子は、前記ジスルフィド結合を介して結合する正帯電性基および疎水性基からなる群より選択される少なくとも一方の基を含み、

前記工程は、前記高分子膜の形成とともに、前記正帯電性基および前記疎水性基からなる群より選択される少なくとも一方の基を前記金属ナノ粒子の表面に結合させる、< 2 5 >に記載の高分子膜の形成方法。

符号の説明

- [0134] 1 . . . ナノ粒子体
 2 . . . 金属ナノ粒子
 3 . . . 高分子膜
 3 A . . . 高分子膜を構成する高分子
 3 B . . . 高分子膜を形成する高分子
 3 a . . . 硫黄原子を介した結合部位
 3 b . . . 正帯電性基
 3 c . . . 疎水性基
 4 . . . 特異結合物質
 6 . . . 蛍光物質
 1 0 . . . 第 1 ナノ粒子体
 1 2 . . . 第 1 金属ナノ粒子
 1 3 . . . 第 1 高分子膜
 1 4 . . . 第 1 特異結合物質
 1 6 . . . 第 1 蛍光物質
 2 0 . . . 第 2 ナノ粒子体
 2 2 . . . 第 2 金属ナノ粒子

- 2 3 . . . 第 2 高分子膜
- 2 4 . . . 第 2 特異結合物質
- 2 6 . . . 第 2 蛍光物質
- 3 0 . . . 被験物質
- 4 0 . . . 複合体
- L . . . 離隔距離（離間距離）
- R₁ . . . 第 1 領域
- R₂ . . . 第 2 領域
- W R_A . . . 蛍光物質の吸収波長域
- W R_E . . . 蛍光物質の発光波長域
- W R_{E 1} . . . 第 1 発光波長域
- W R_{E 2} . . . 第 2 発光波長域

請求の範囲

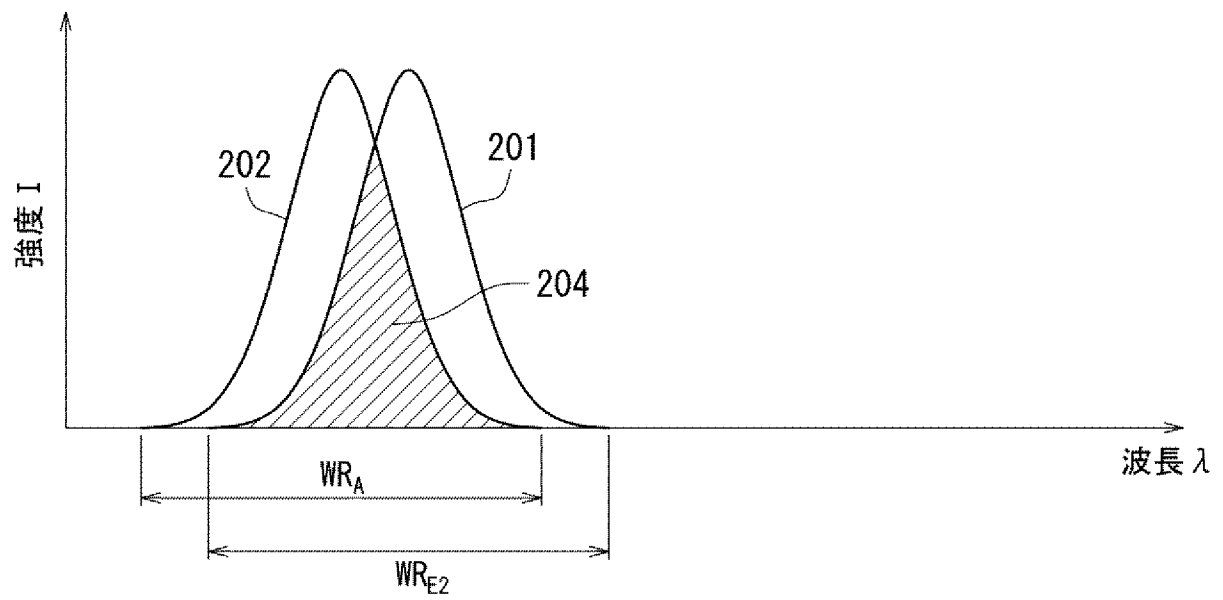
- [請求項1] 金属ナノ粒子と、
 該金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、
 検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と、
 前記高分子膜の表面または前記特異結合物質に標識された蛍光物質
と
 を含んで成るナノ粒子体であって、
 前記蛍光物質は、2以上の前記ナノ粒子体が前記被験物質を介して
結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起さ
れる、ナノ粒子体。
- [請求項2] 前記複合体におけるプラズモン共鳴は、外部から照射された光によ
って誘起される、請求項1に記載のナノ粒子体。
- [請求項3] 前記複合体におけるプラズモン共鳴は、前記蛍光物質が放射する蛍
光によって誘起される、請求項1または2に記載のナノ粒子体。
- [請求項4] 前記蛍光物質の吸収波長域が、前記プラズモン共鳴の第1発光波長
域と重なる、請求項1～3のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項5] 前記プラズモン共鳴の第1発光波長域は、単粒子の前記金属ナノ粒
子において誘起されるプラズモン共鳴の第2発光波長域に比べ長波長
側に位置する、請求項1～4のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項6] 前記第1発光波長域と前記蛍光物質の吸収波長域とが重なる第1領
域が、前記第2発光波長域と前記蛍光物質の前記吸収波長域とが重な
る第2領域に比べ大きくなるように、前記蛍光物質が選択される、請
求項5に記載のナノ粒子体。
- [請求項7] 前記第1発光波長域における前記蛍光物質の最大吸収波長が、50
0～700nmに位置する、請求項5または6に記載のナノ粒子体。
- [請求項8] 前記第1発光波長域における前記蛍光物質の最大蛍光波長が、50
0～700nmに位置する、請求項5～7のいずれか1項に記載のナ
ノ粒子体。

- [請求項9] 前記複合体において誘起されるプラズモン共鳴が多重極子共鳴である、請求項1～8のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項10] 前記単粒子の前記金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴は、双極子共鳴である、請求項5～8のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項11] 前記高分子膜が、前記金属ナノ粒子の表面との間に硫黄原子を介した結合部位、正帯電性基、および疎水性基からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項12] 前記高分子膜が、前記高分子膜を構成する高分子の側鎖に前記正帯電性基を少なくとも含み、
前記正帯電性基は、第1級アンモニウム基、第2級アンモニウム基、第3級アンモニウム基、第4級アンモニウム基、およびグアニジル基 ($-NH-C(=NH_2^+)-NH_2$) からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項11に記載のナノ粒子体。
- [請求項13] 前記高分子膜が、前記高分子膜を構成する高分子の側鎖に前記疎水性基を少なくとも含み、
前記疎水性基は、芳香族環状基、脂肪族環状基、および脂肪族鎖状基からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項11に記載のナノ粒子体。
- [請求項14] 前記高分子膜の膜厚は、1 nm～10 nmである、請求項1～13のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項15] プラズモン励起蛍光分析に用いるナノ粒子体である、請求項1～14のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項16] 前記特異結合物質がナノ抗体である、請求項1～15のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項17] 前記特異結合物質がVHH抗体である、請求項1～16のいずれか1項に記載のナノ粒子体。

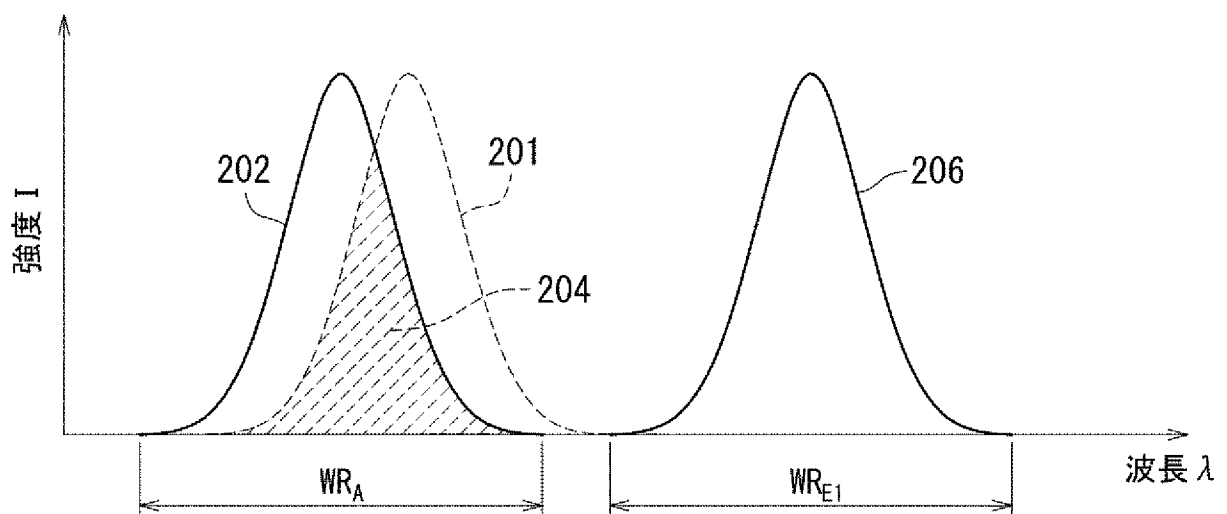
- [請求項18] 前記金属ナノ粒子が金または銀を含んで成る、請求項1～17のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項19] 前記金属ナノ粒子の粒子径は、5～100nmである、請求項1～18のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項20] 前記ナノ粒子体として第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体とが含まれ、
前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体とが前記被験物質を介して結合された複合体を形成する、請求項1～19のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項21] 前記被験物質が、血液、血漿、尿、または唾液である前記検体に由来する被験物質である、請求項1～20のいずれか1項に記載のナノ粒子体。
- [請求項22] 前記複合体において、前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体との間に蛍光物質が位置づけられている、請求項20に記載のナノ粒子体。
- [請求項23] 請求項1～22のいずれか1項に記載のナノ粒子体を2以上含んで成り、前記2以上のナノ粒子体が第1ナノ粒子体と第2ナノ粒子体とを含み、前記第1ナノ粒子体と前記第2ナノ粒子体とは前記被験物質を介して結合されている、複合体。
- [請求項24] 2つの前記ナノ粒子体が1つの前記被験物質を介して結合している結合ポイントを複数含む、請求項23に記載の複合体。
- [請求項25] ジスルフィド結合を側鎖に有する高分子を金属ナノ粒子に接触させて、前記高分子が前記金属ナノ粒子の表面に硫黄原子を介して結合した高分子膜を形成する工程を含んで成る、高分子膜の形成方法。
- [請求項26] 前記高分子は、前記ジスルフィド結合を介して結合する正帯電性基および疎水性基からなる群より選択される少なくとも一方の基を含み、
前記工程は、前記高分子膜の形成とともに、前記正帯電性基および

前記疎水性基からなる群より選択される少なくとも一方の基を前記金属ナノ粒子の表面に結合させる、請求項 25 に記載の高分子膜の形成方法。

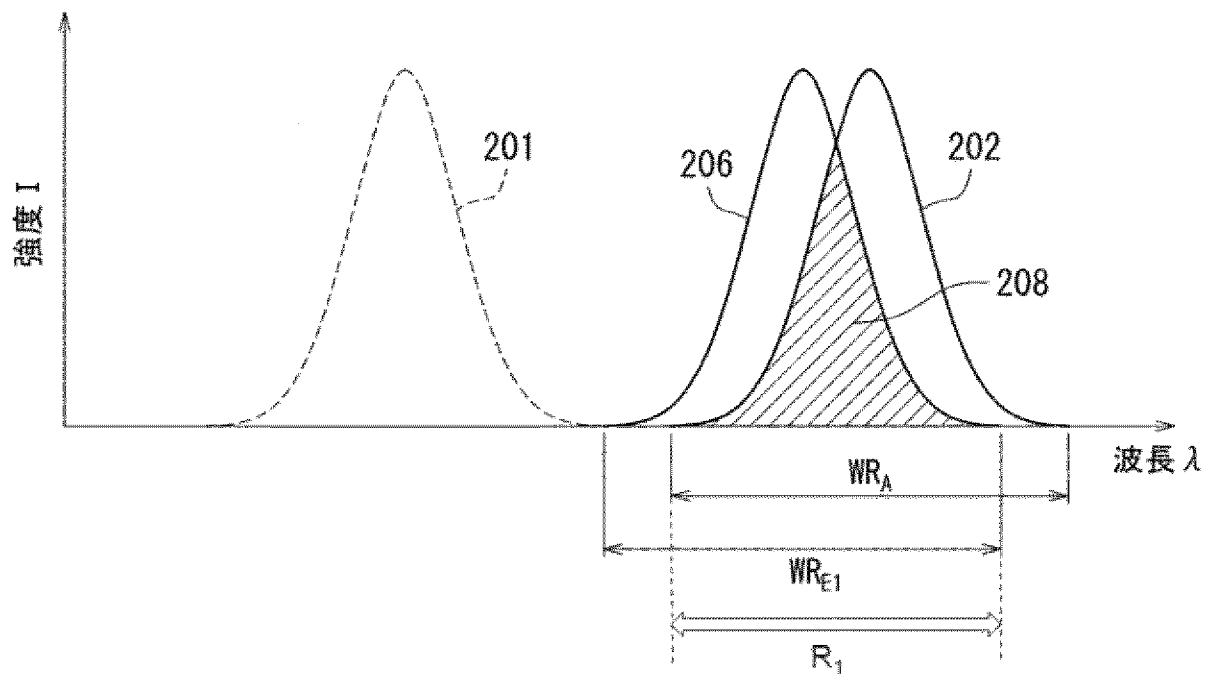
[図1]



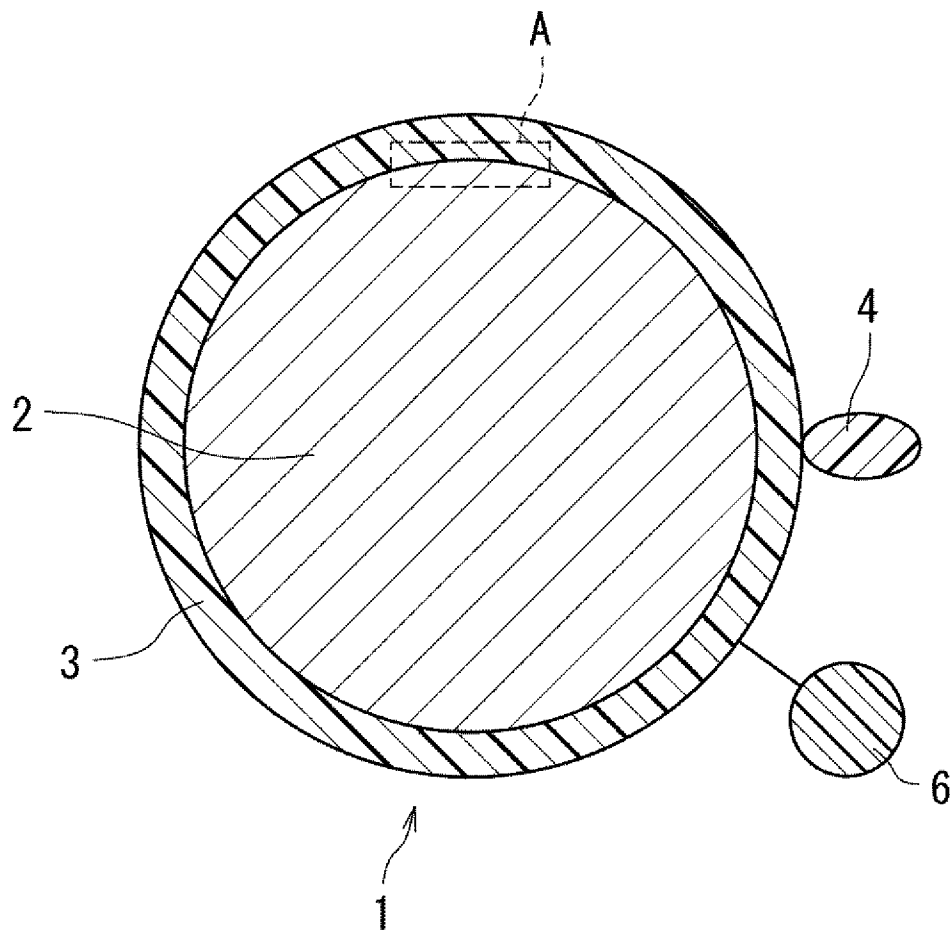
[図2]



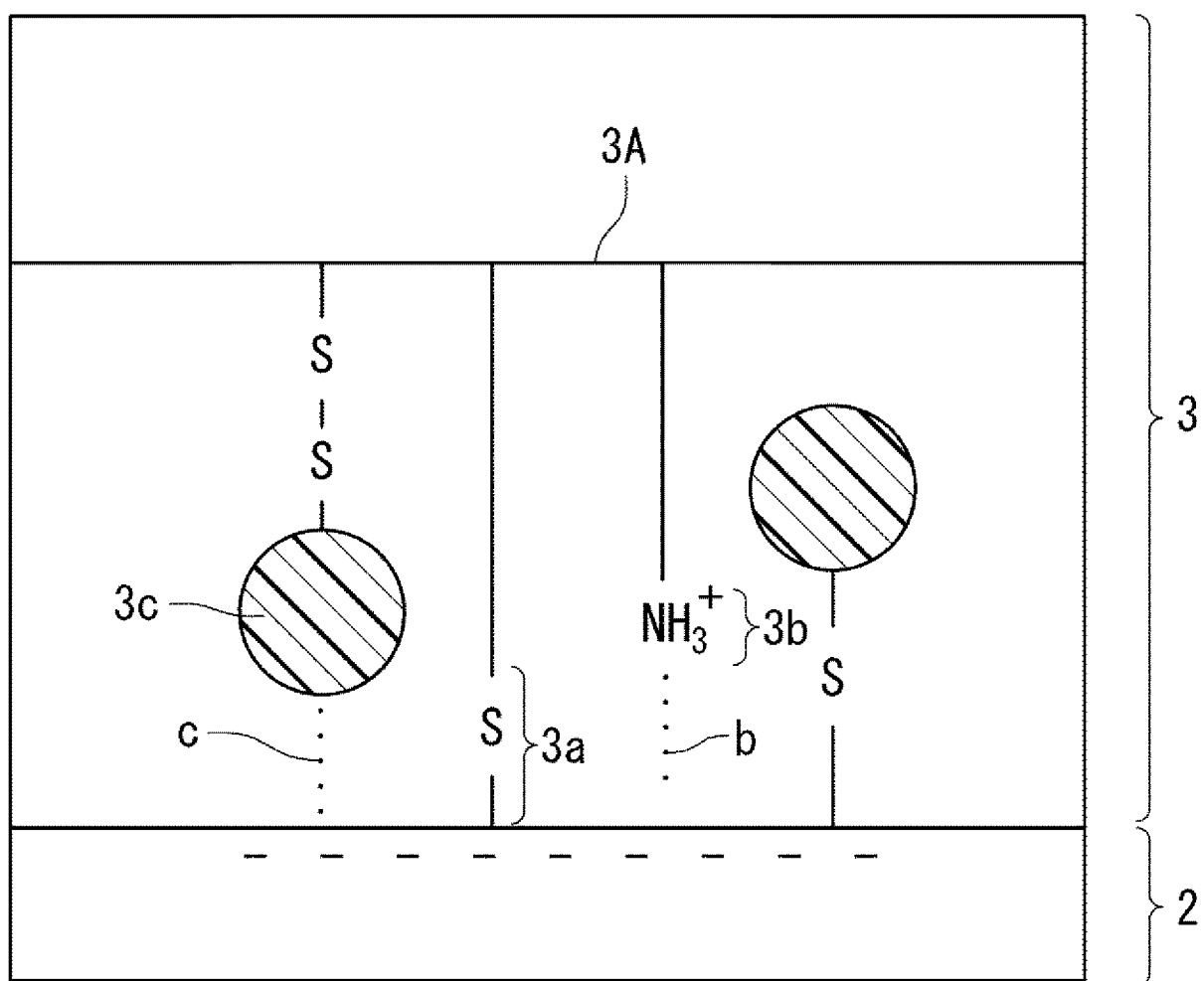
[図3]



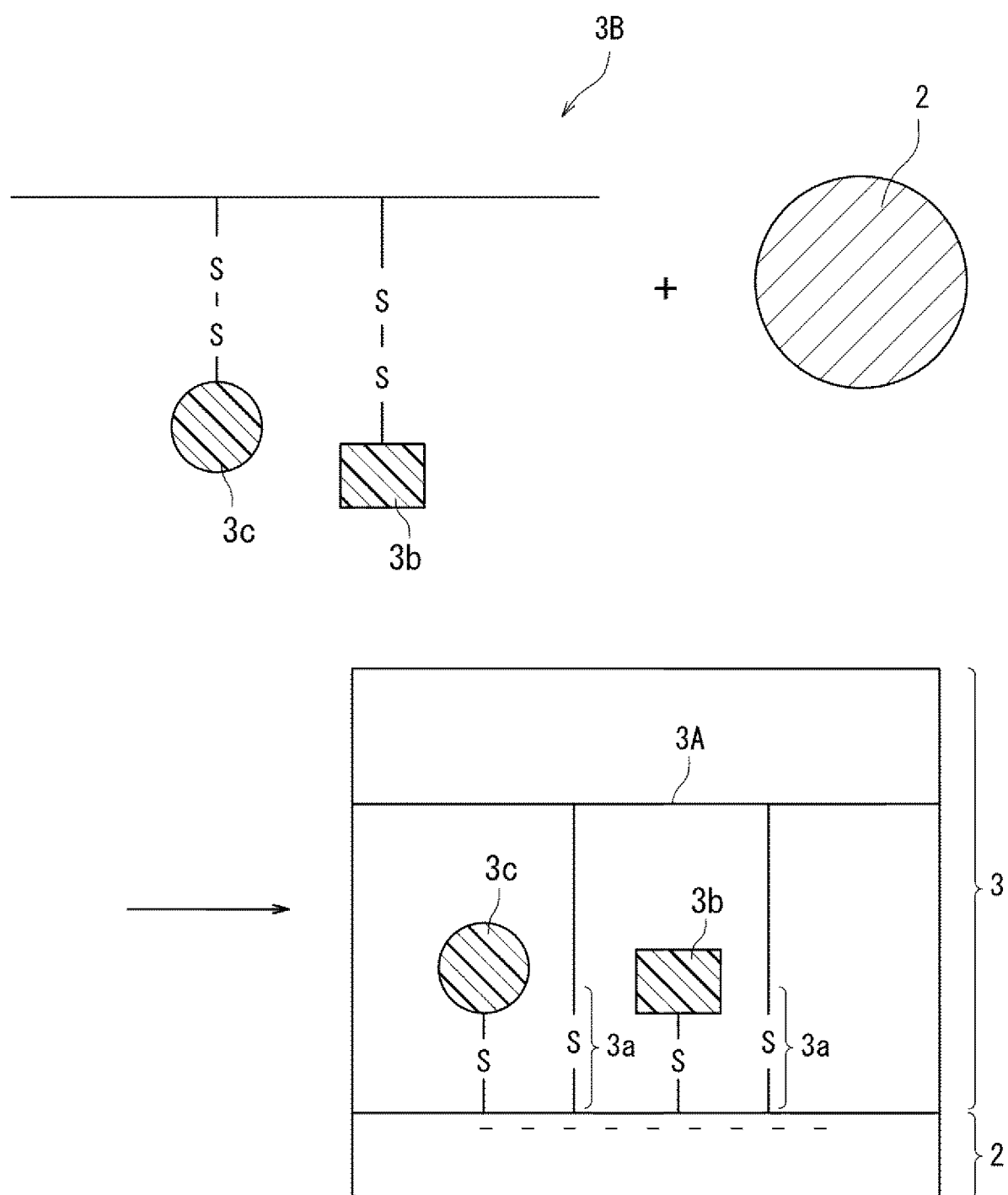
[図4]



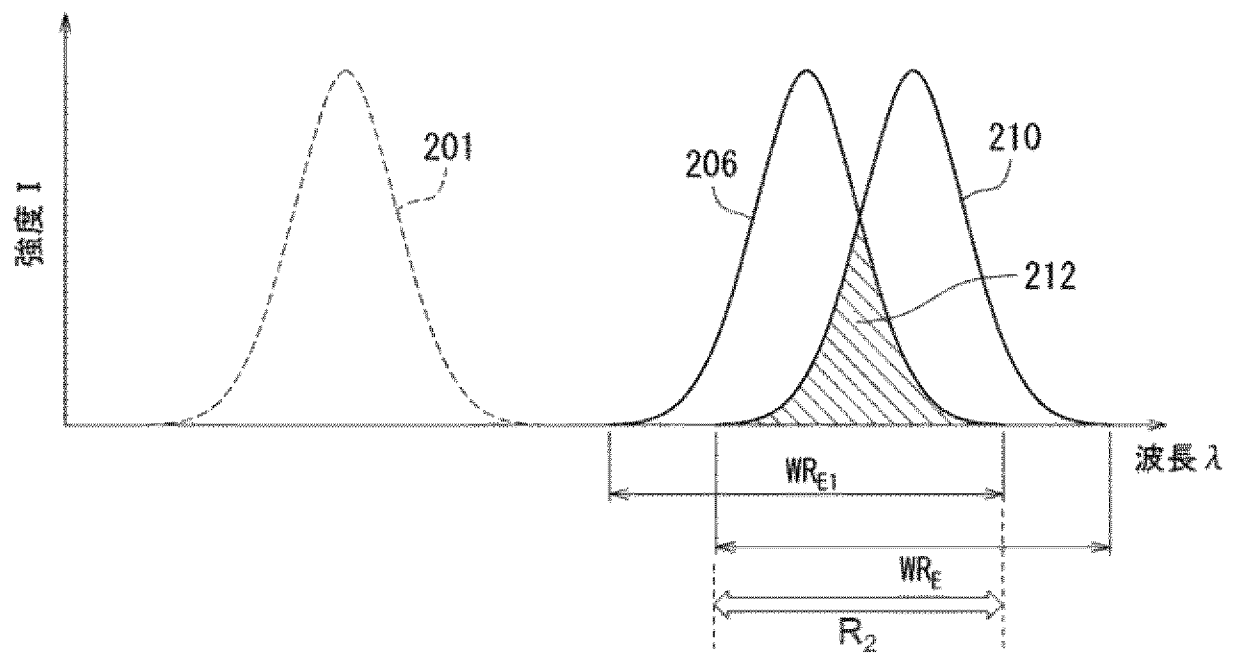
[図5]



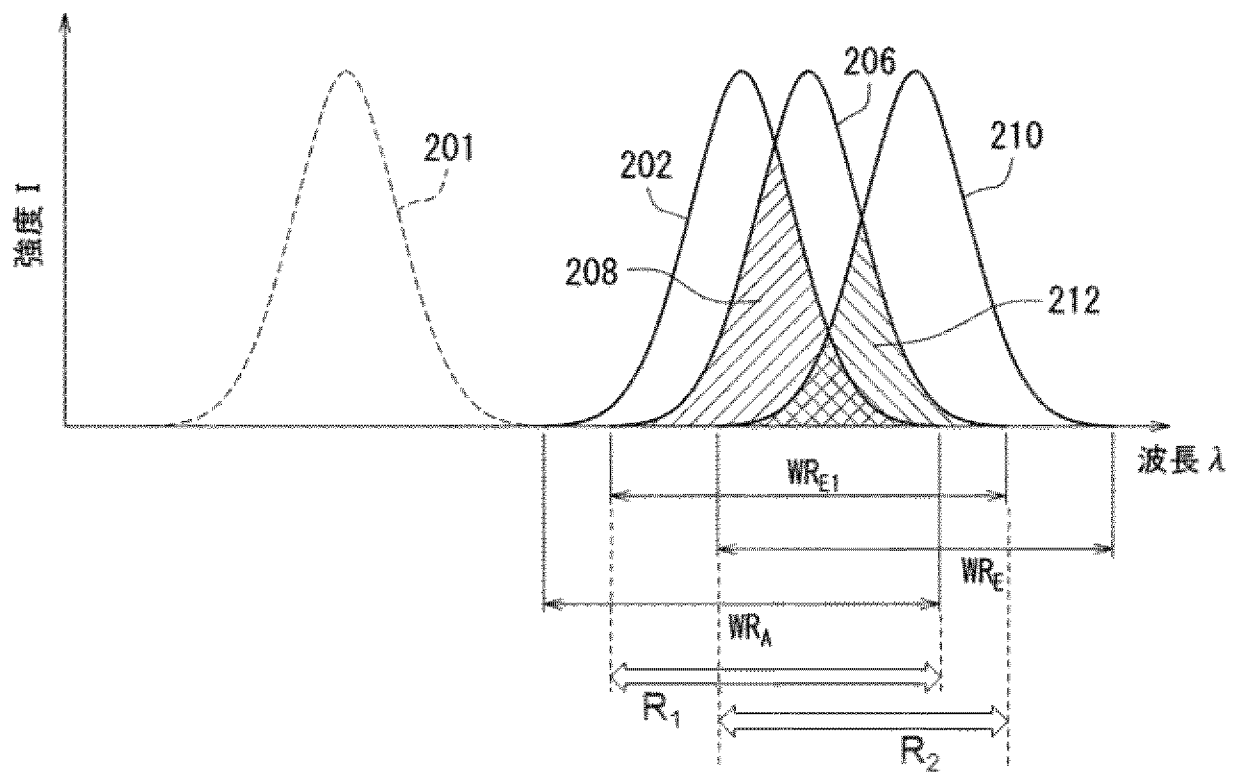
[図6]



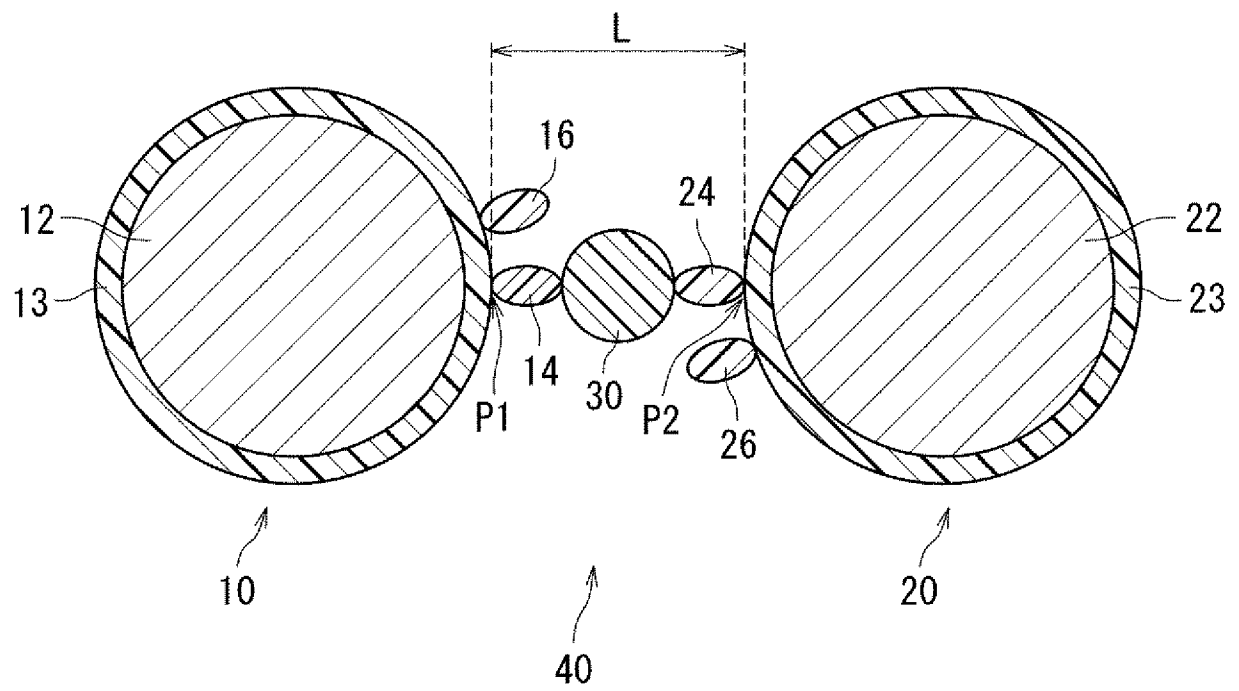
[図7]



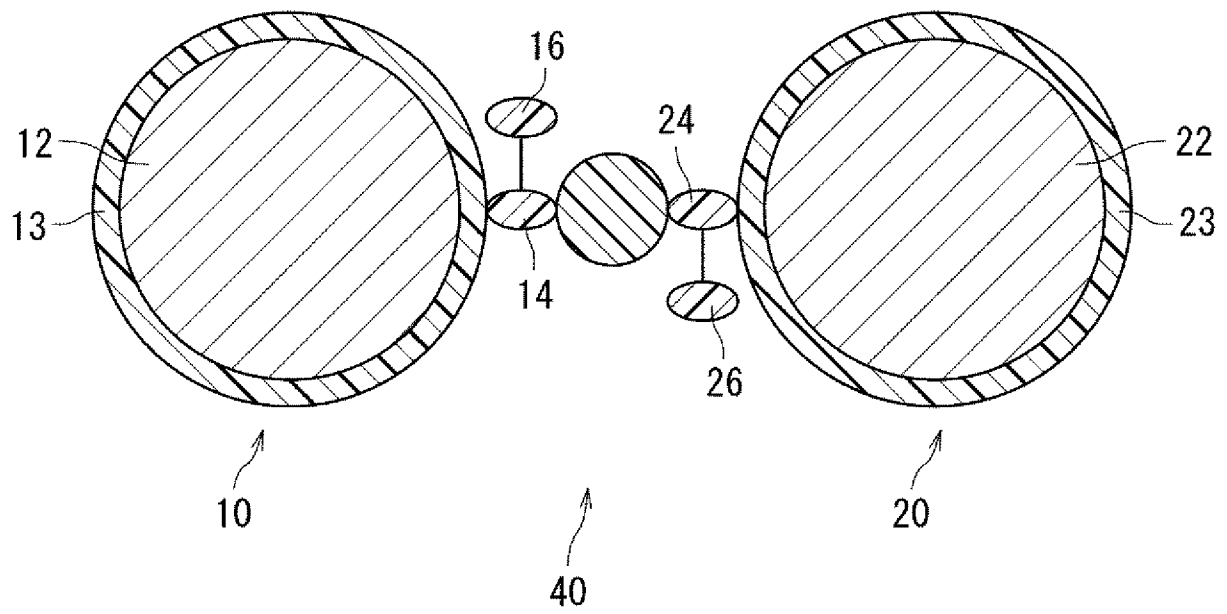
[図8]



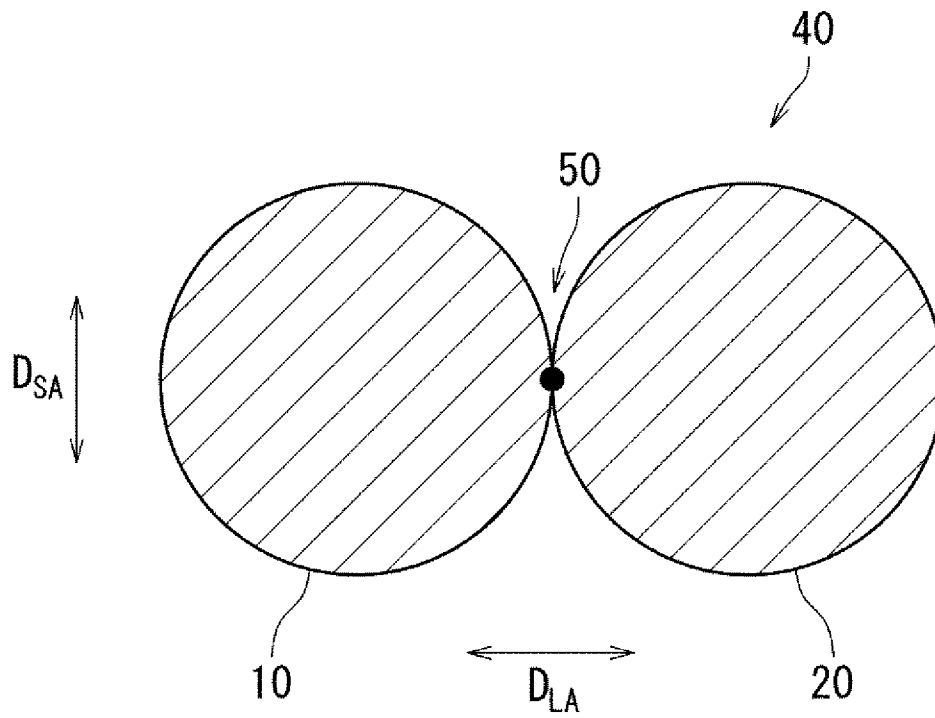
[図9]



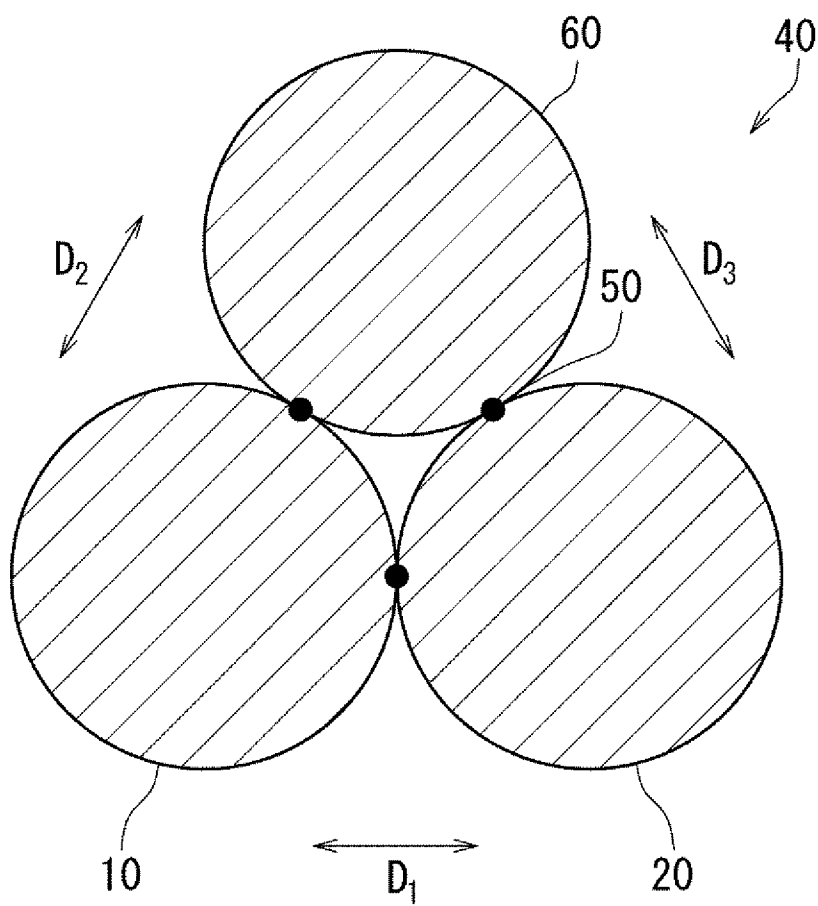
[図10]



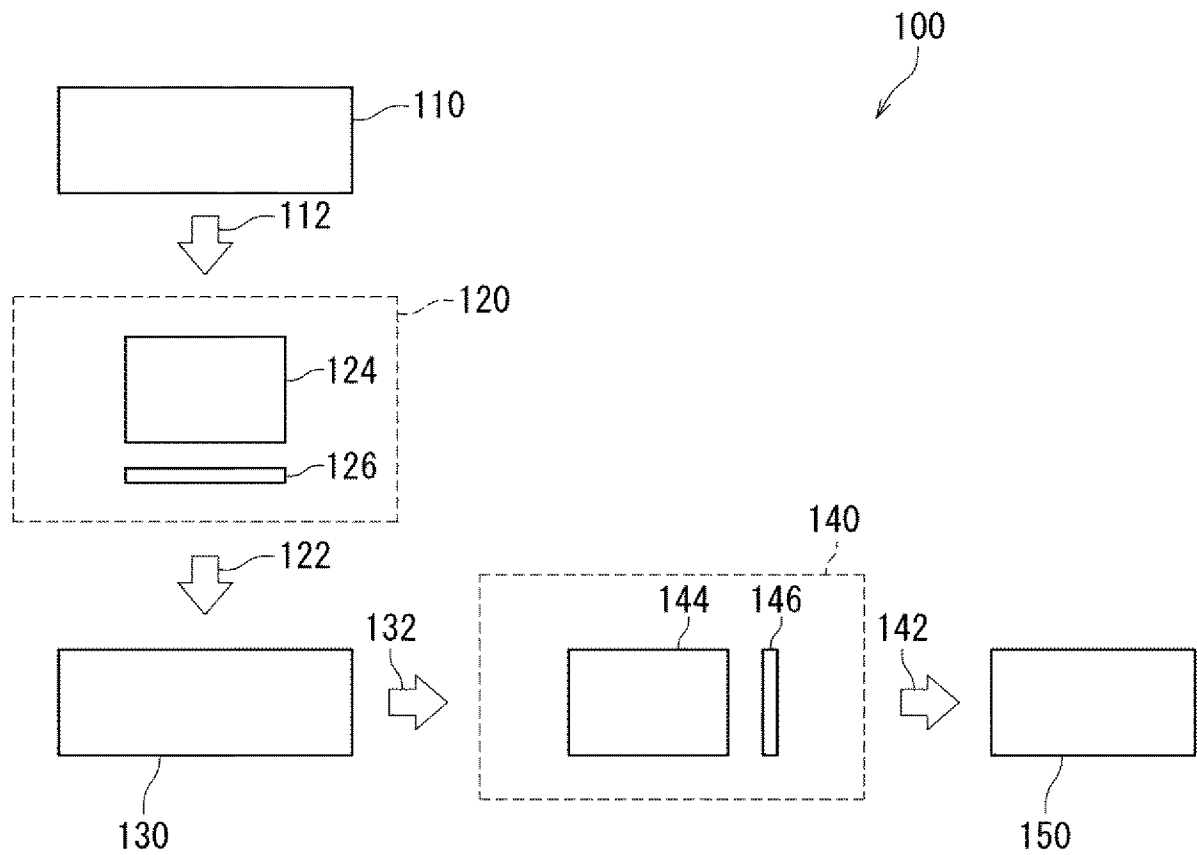
[図11]



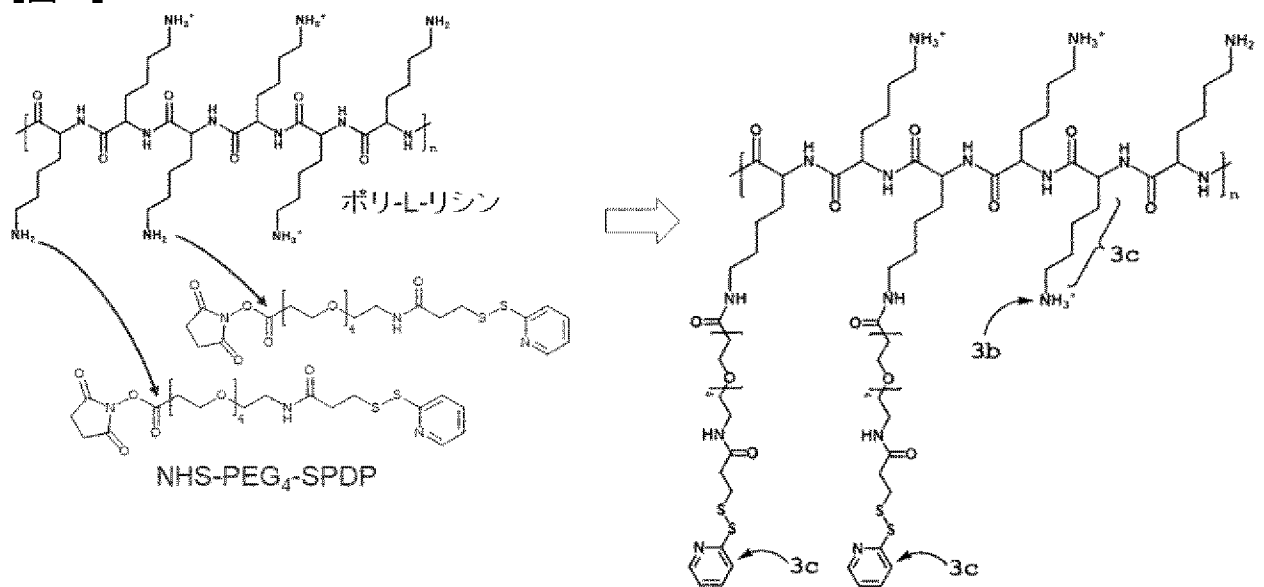
[図12]



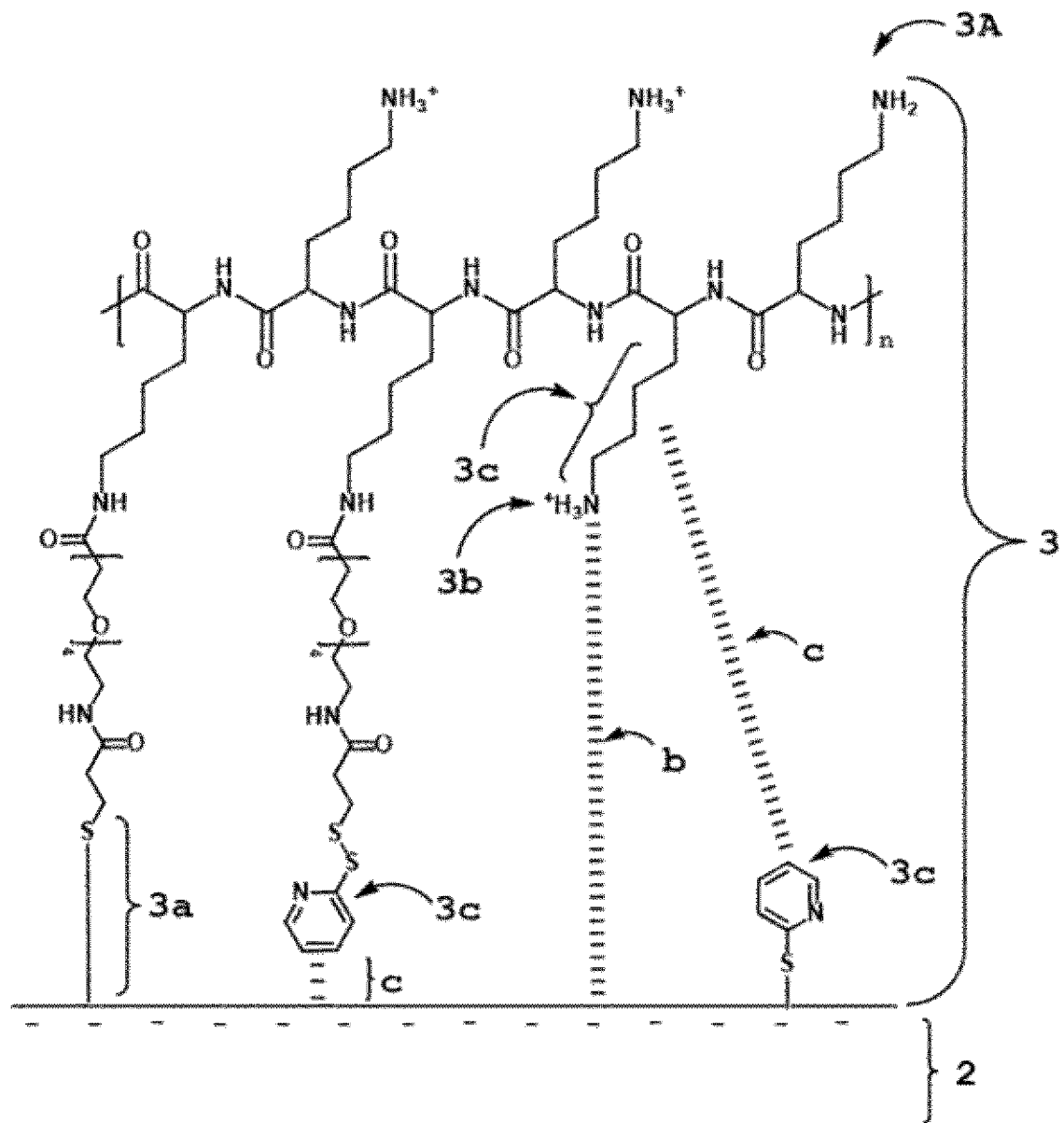
[図13]



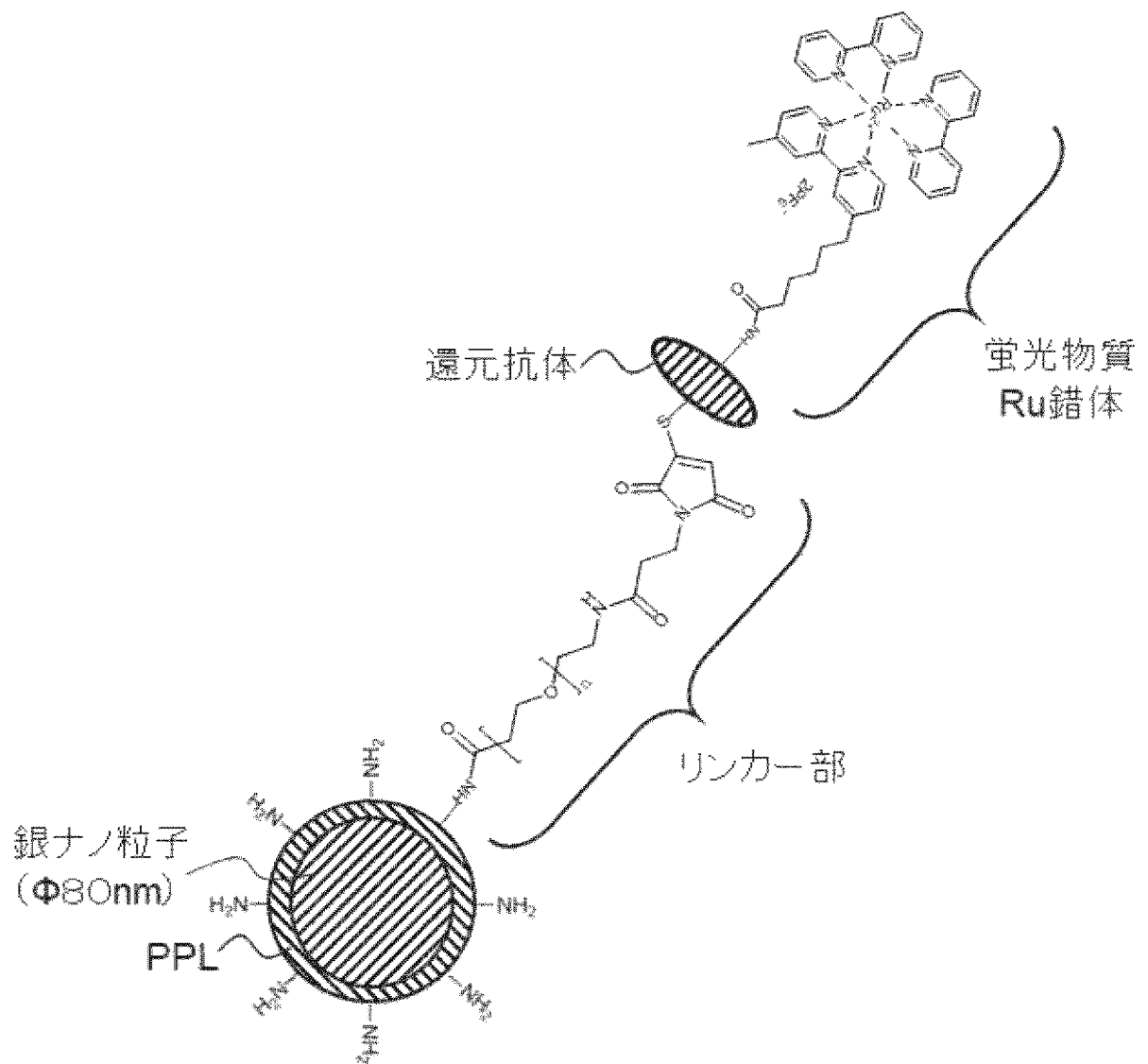
[図14]



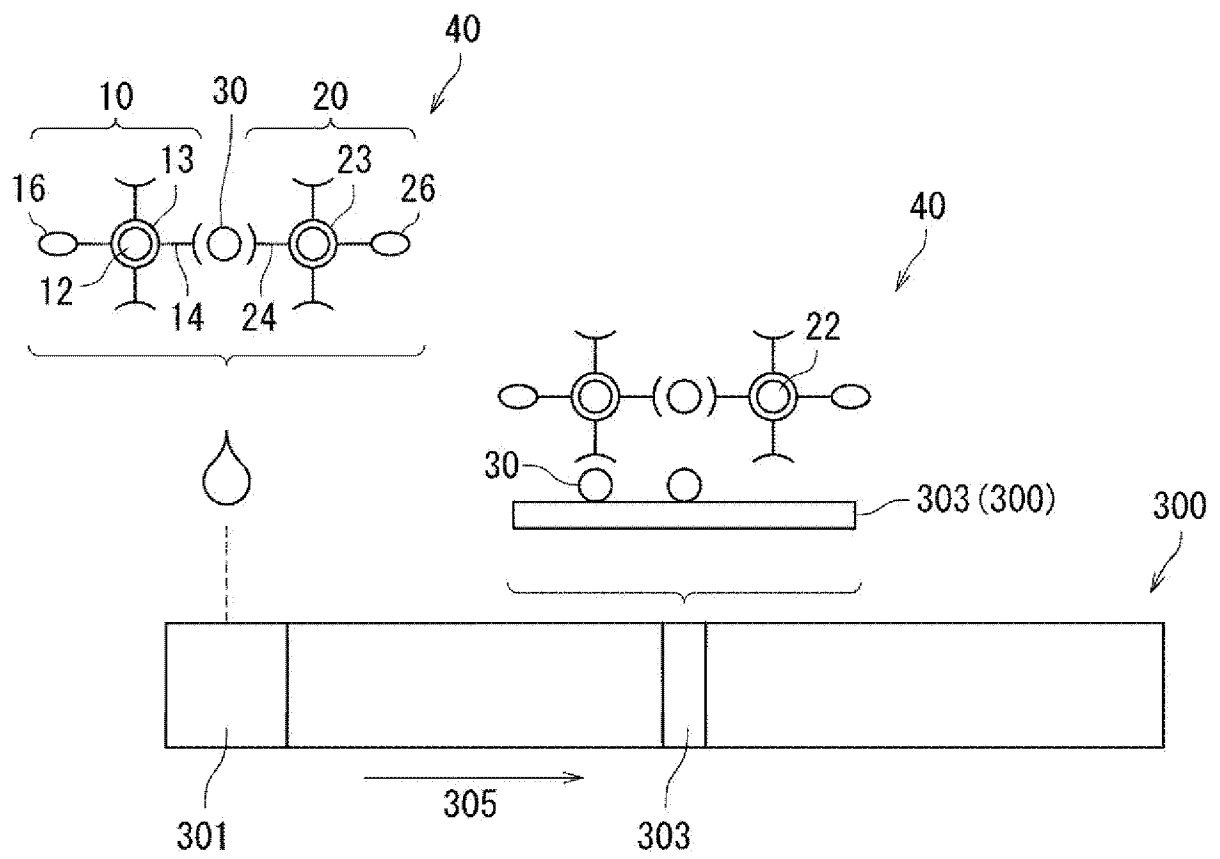
[図15]



[図16]

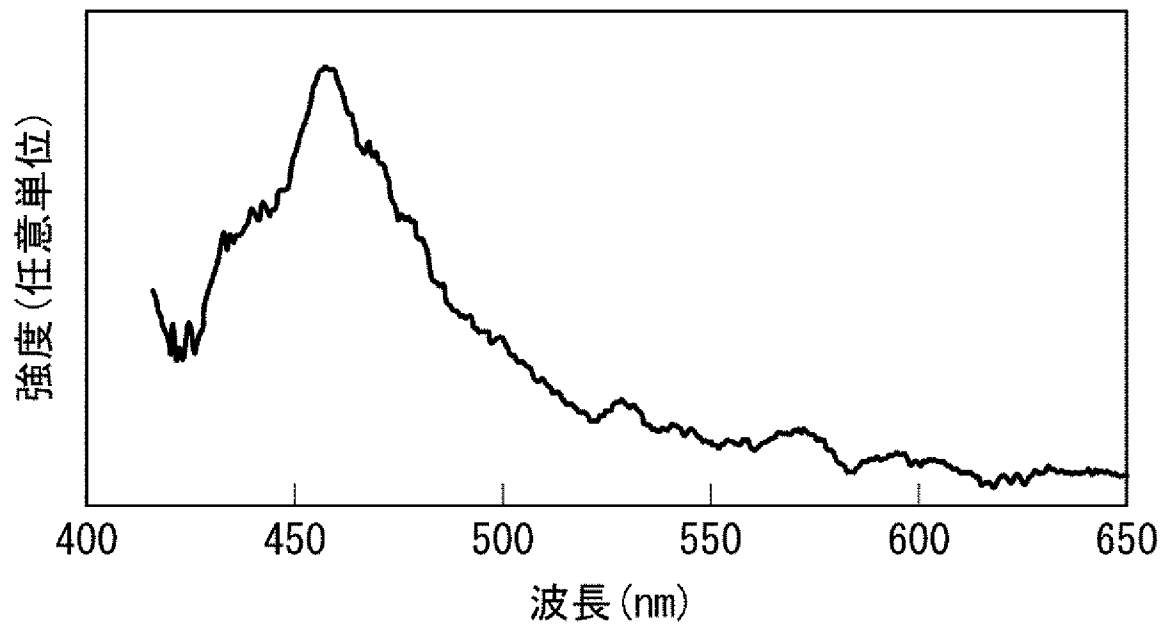


[図17]

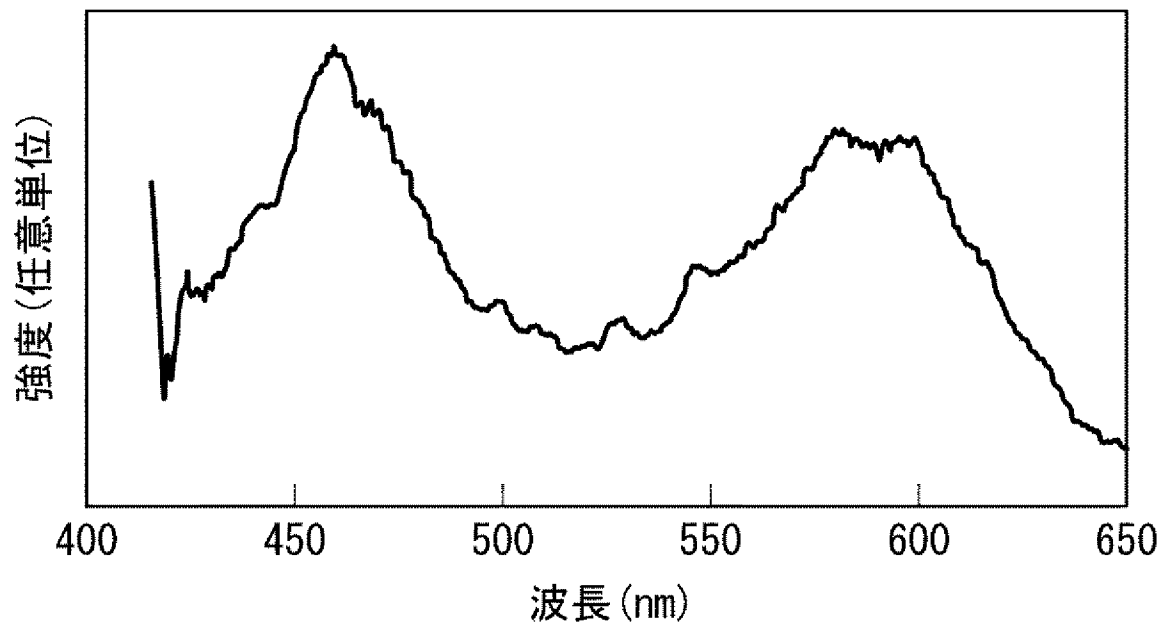


[図18]

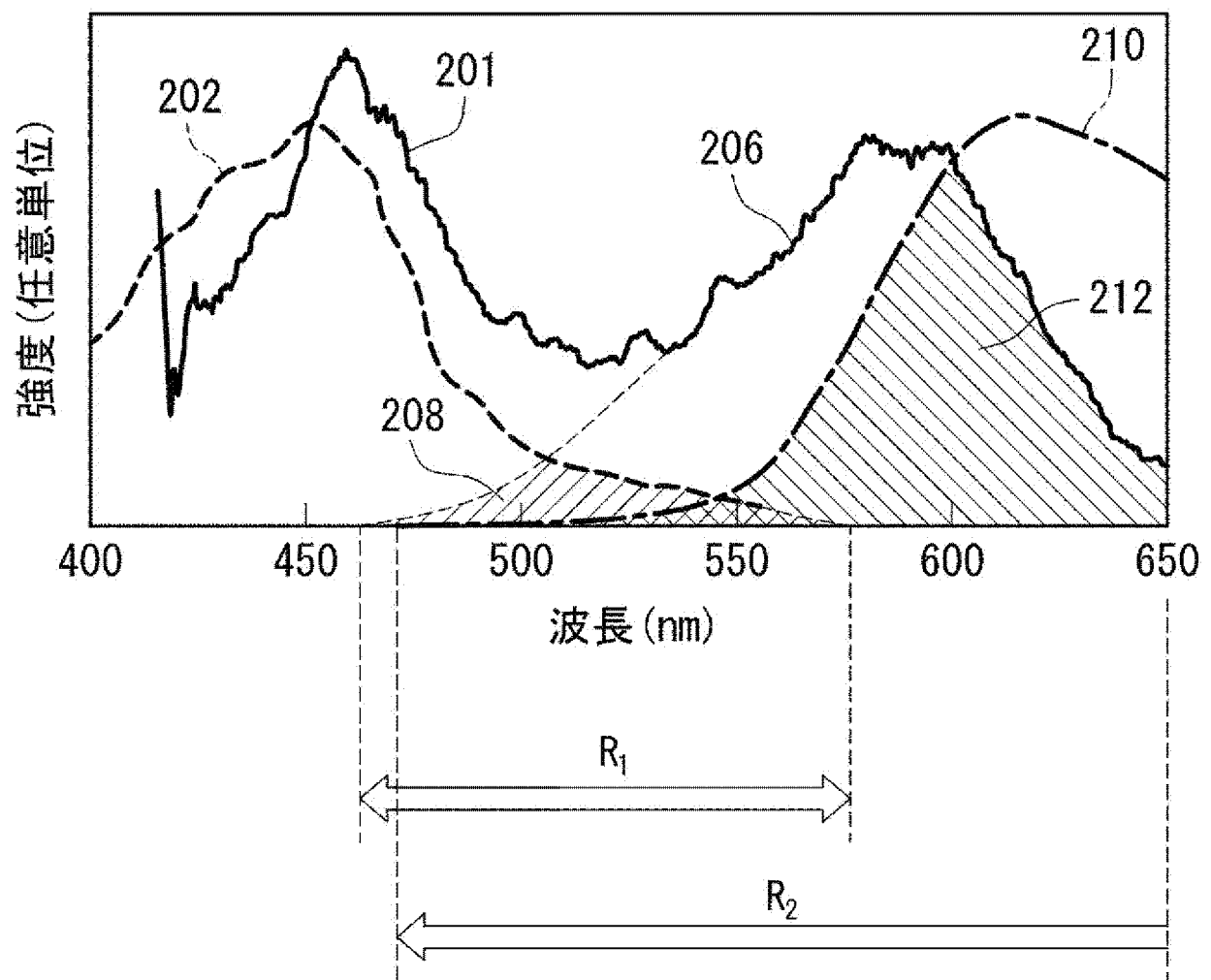
(a)



(b)

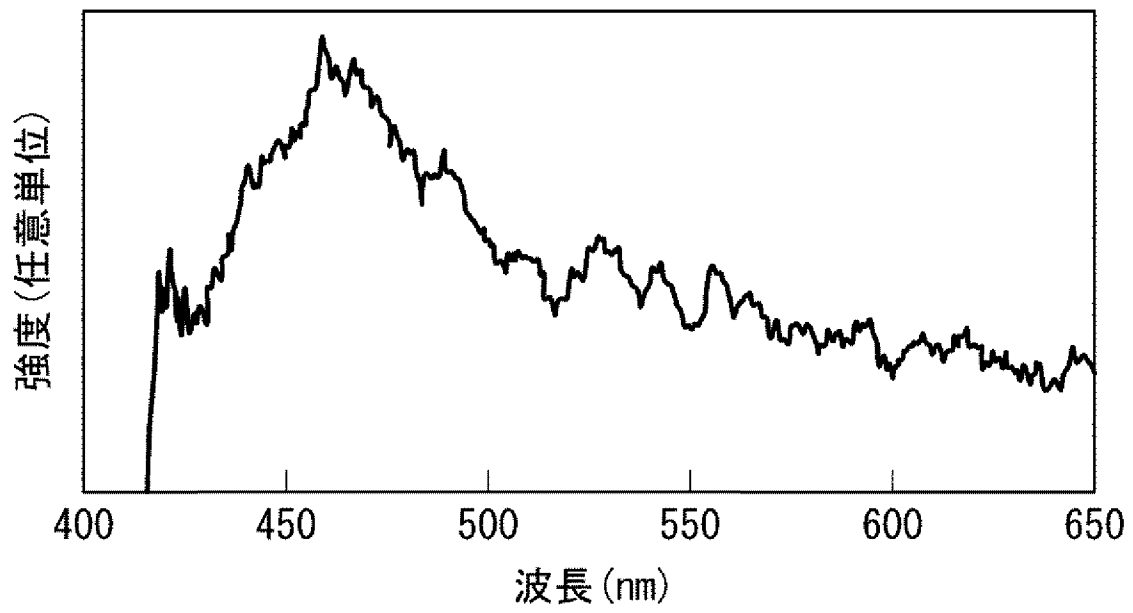


[図19]

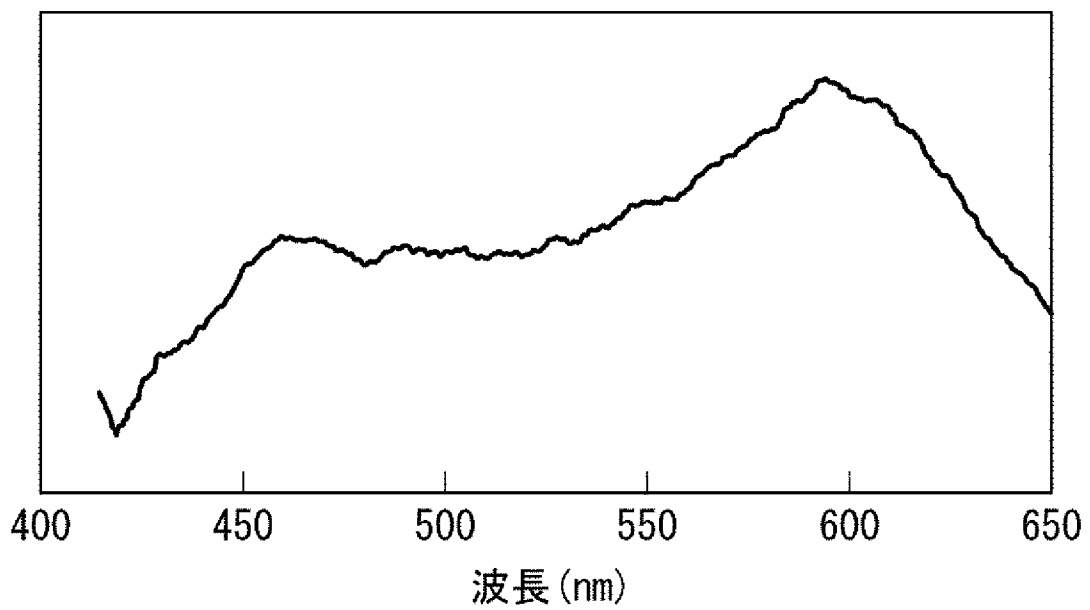


[図20]

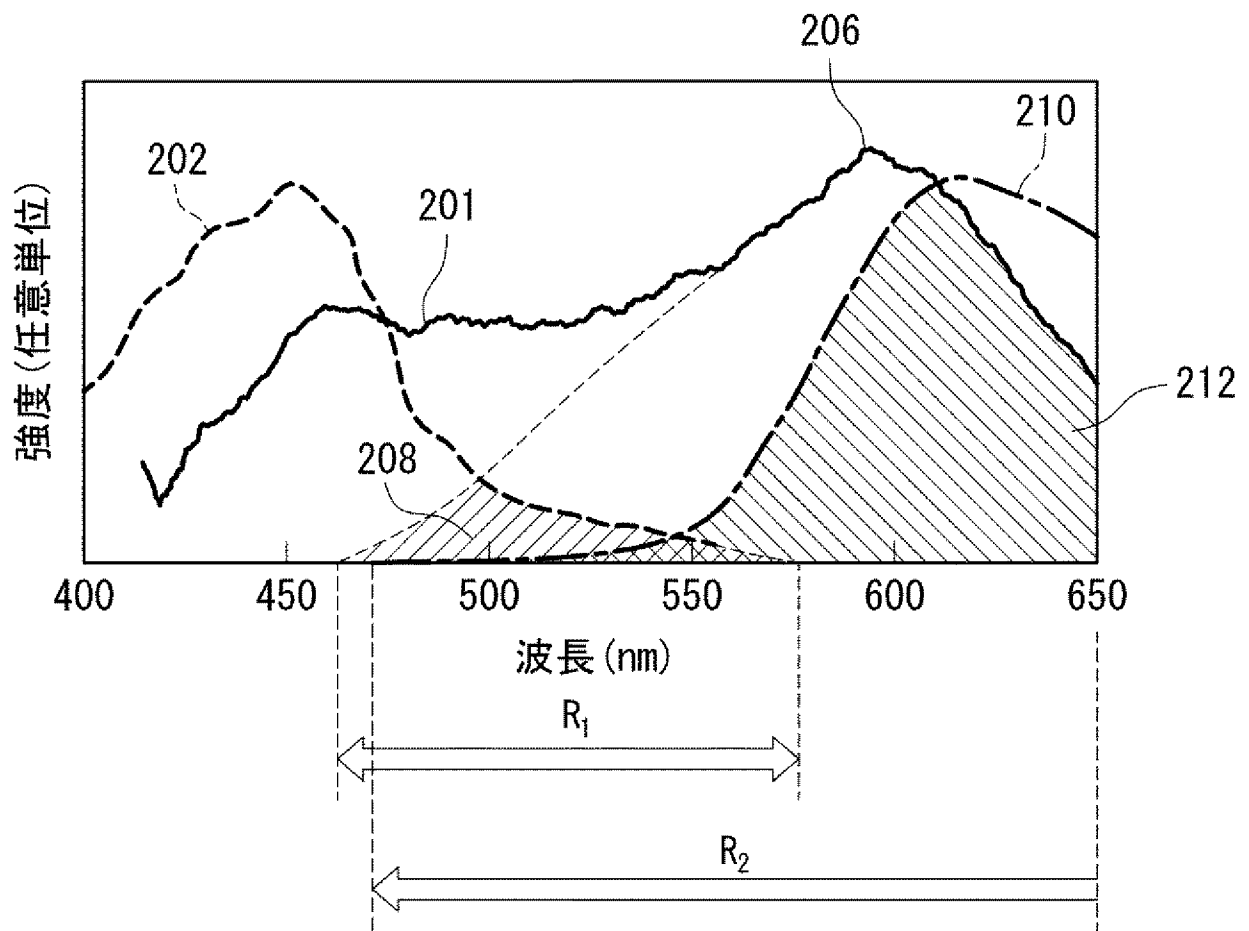
(a)



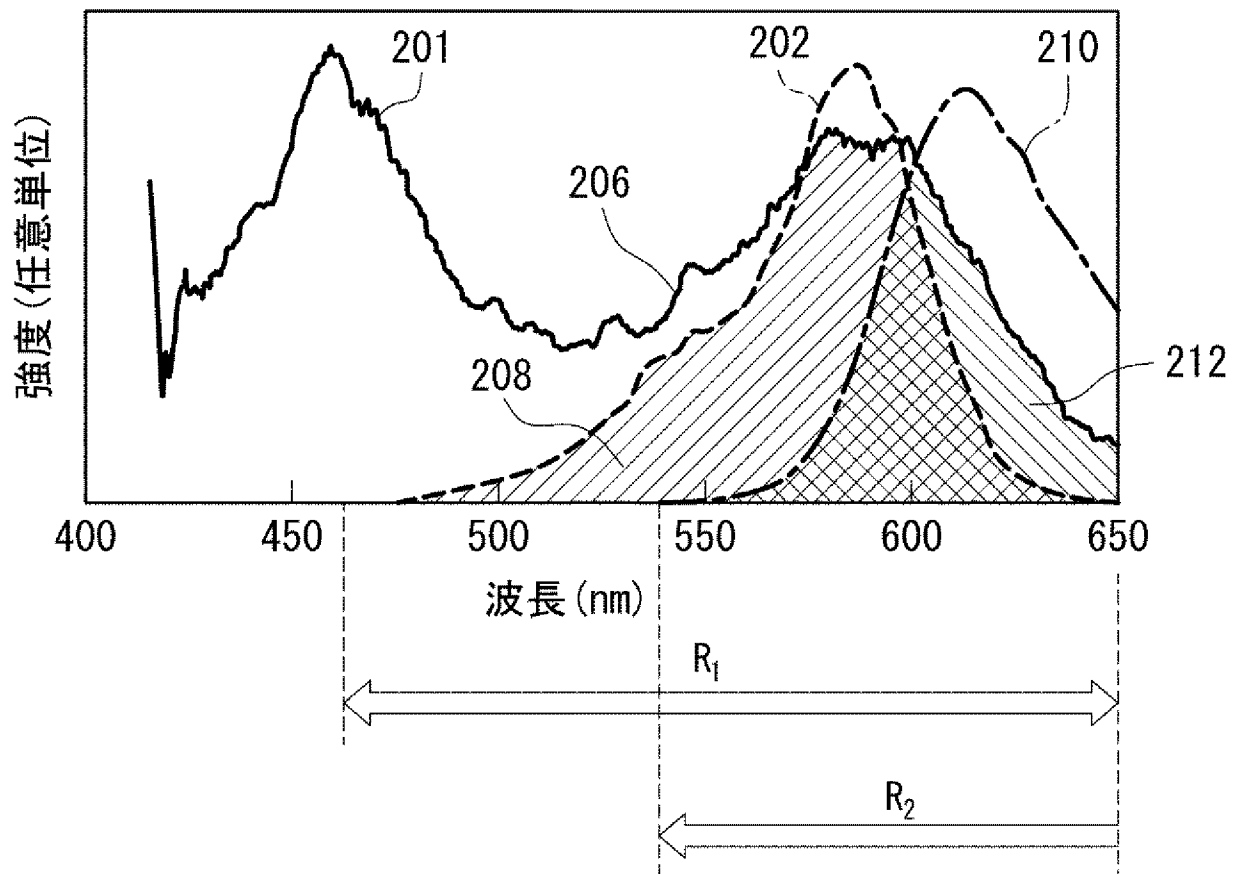
(b)



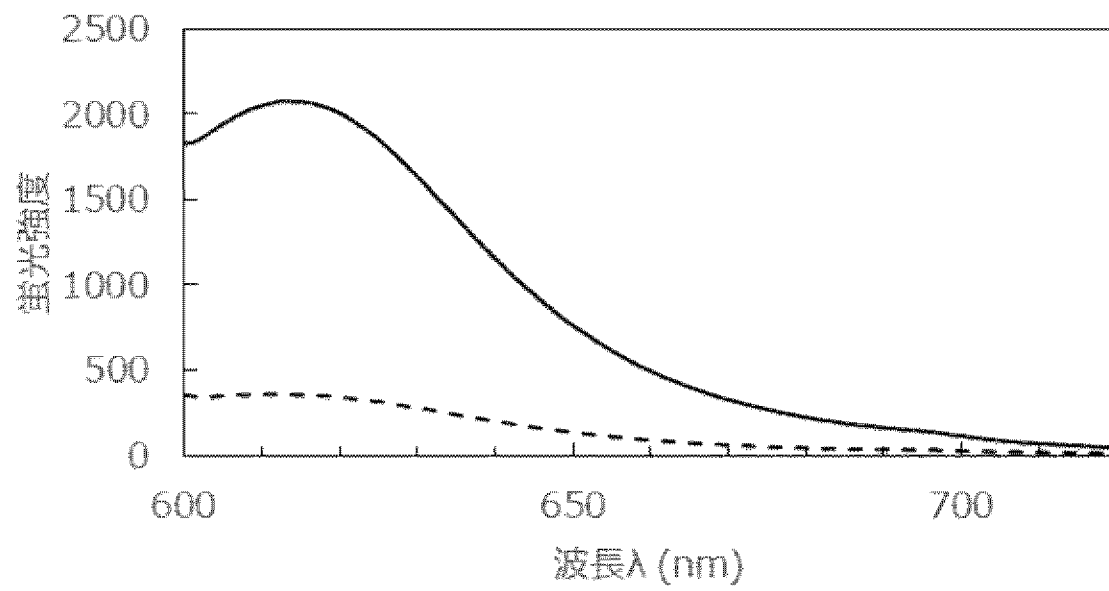
[図21]



[図22]

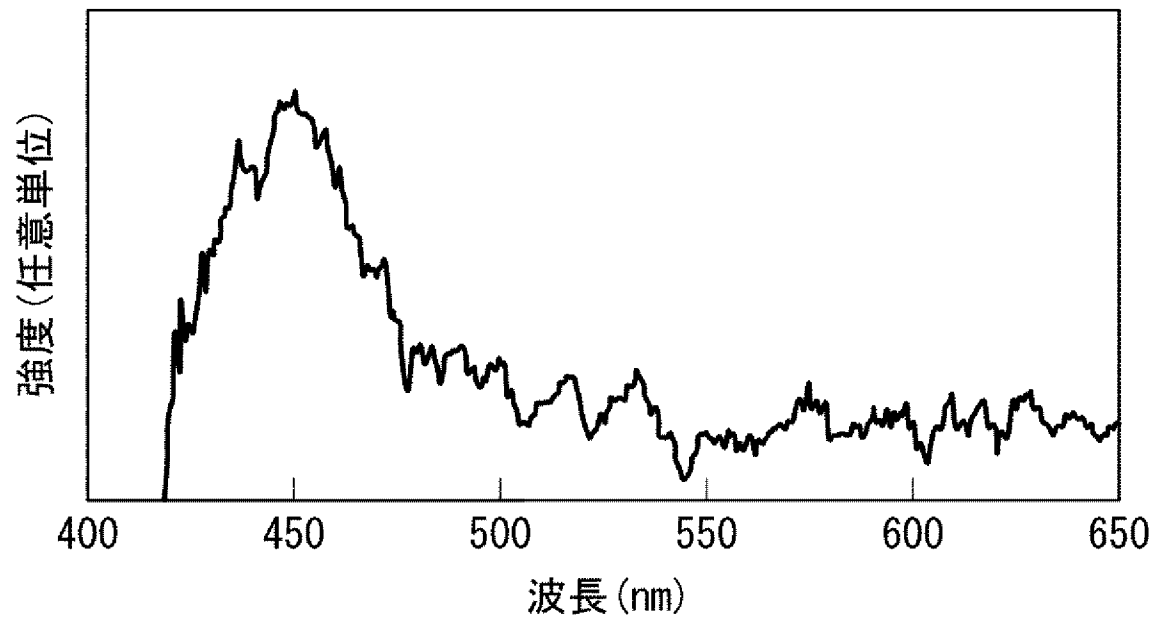


[図23]

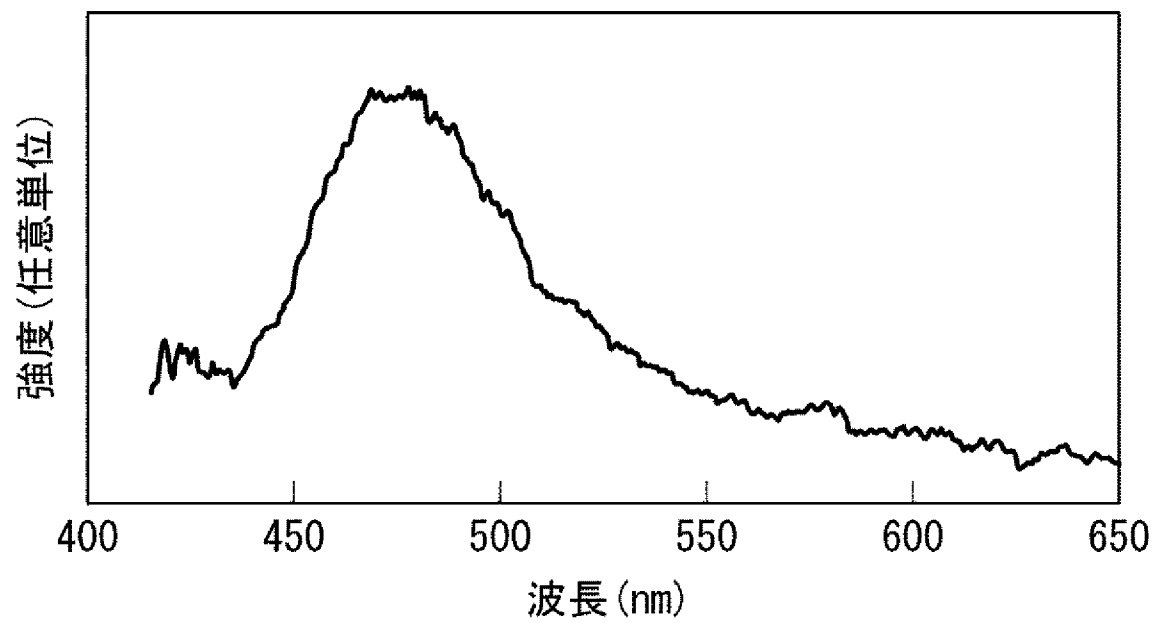


[図24]

(a)

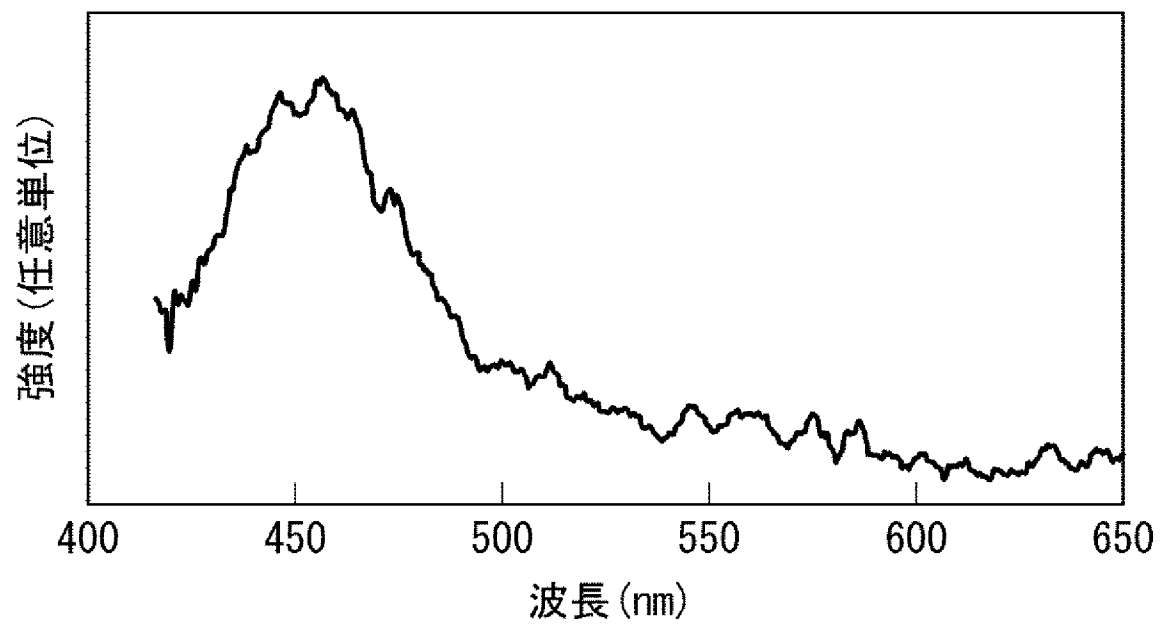


(b)

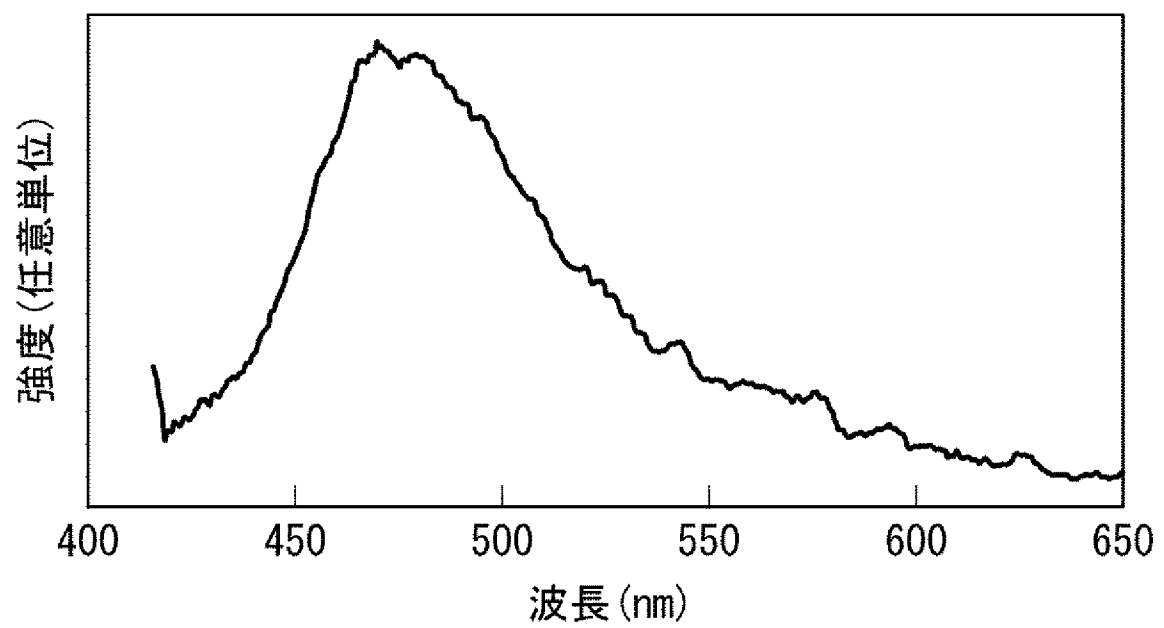


[図25]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/021018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543(2006.01)i; **C09K 11/06**(2006.01)i; **C09K 11/08**(2006.01)i; **G01N 33/545**(2006.01)i; **G01N 33/553**(2006.01)i
 FI: G01N33/543 525C; G01N33/553; G01N33/545; G01N33/543 575; G01N33/543 595; C09K11/06 660; C09K11/08 G;
 C09K11/08 A

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543; C09K11/06; C09K11/08; G01N33/545; G01N33/553

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 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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 2015-129773 A (KONICA MINOLTA, INC.) 16 July 2015 (2015-07-16) paragraphs [0023], [0027]-[0029], [0093], [0094], fig. 2	25-26
A		1-24
A	JP 2001-513198 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 August 2001 (2001-08-28) p. 25, lines 16-21	1-26
A	JP 2022-512606 A (WASHINGTON UNIVERSITY) 07 February 2022 (2022-02-07) paragraph [0218]	1-26
A	WO 2019/059171 A1 (PANASONIC INTELLECTUAL PROPERTY MANAGEMENT CO., LTD.) 28 March 2019 (2019-03-28) claim 1	1-26

☐ 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

18 August 2023

Date of mailing of the international search report

29 August 2023

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/JP2023/021018

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
JP	2015-129773	A	16 July 2015	WO	2011/096394	A1
JP	2001-513198	A	28 August 2001	US	6180415	B1
				column 9, lines 57-59		
				US	2001/0002315	A1
				US	2009/0161104	A1
				US	2011/0244479	A1
				US	2013/0038868	A1
				US	2014/0209683	A1
				WO	1998/037417	A1
				EP	979409	A1
JP	2022-512606	A	07 February 2022	US	2021/0396747	A1
				example 5		
				WO	2020/072924	A1
				EP	3861343	A1
				CN	113167791	A
				CA	3115117	A1
WO	2019/059171	A1	28 March 2019	US	2020/0166455	A1
				claim 1		

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/543(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; C09K 11/08(2006.01)i; G01N 33/545(2006.01)i; G01N 33/553(2006.01)i FI: G01N33/543 525C; G01N33/553; G01N33/545; G01N33/543 575; G01N33/543 595; C09K11/06 660; C09K11/08 G; C09K11/08 A		
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）） G01N33/543; C09K11/06; C09K11/08; G01N33/545; G01N33/553 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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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 2015-129773 A（コニカミノルタ株式会社）16.07.2015（2015-07-16） 段落[0023]、[0027]～[0029]、[0093]～[0094]、図2	25-26
A		1-24
A	JP 2001-513198 A（ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア）28.08.2001（2001-08-28） 第25頁第16～21行	1-26
A	JP 2022-512606 A（ワシントン・ユニバーシティ）07.02.2022（2022-02-07） 段落[0218]	1-26
A	WO 2019/059171 A1（パナソニックIPマネジメント株式会社）28.03.2019（2019-03-28） 請求項1	1-26
☐ 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、一般的な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 18.08.2023		国際調査報告の発送日 29.08.2023
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） 海野 佳子 2J 3906 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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/JP2023/021018

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2015-129773	A	16.07.2015	WO	2011/096394	A1	
JP	2001-513198	A	28.08.2001	US	6180415	B1	
				第9欄第57-59行			
				US	2001/0002315	A1	
				US	2009/0161104	A1	
				US	2011/0244479	A1	
				US	2013/0038868	A1	
				US	2014/0209683	A1	
				WO	1998/037417	A1	
				EP	979409	A1	
JP	2022-512606	A	07.02.2022	US	2021/0396747	A1	
				example 5			
				WO	2020/072924	A1	
				EP	3861343	A1	
				CN	113167791	A	
				CA	3115117	A1	
WO	2019/059171	A1	28.03.2019	US	2020/0166455	A1	
				請求項 1			