

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/035569

発行日 平成22年1月28日 (2010.1.28)

(43) 国際公開日 **平成20年3月27日 (2008.3.27)**

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543	5 2 5 C	
GO 1 N 33/533 (2006.01)		GO 1 N 33/533		
GO 1 N 37/00 (2006.01)		GO 1 N 37/00	1 0 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

出願番号	特願2008-535312 (P2008-535312)	(71) 出願人	303000420 コニカミノルタエムジー株式会社 東京都日野市さくら町1番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/067281	(72) 発明者	星野 秀樹 日本国東京都日野市さくら町1番地コニカ ミノルタエムジー株式会社内
(22) 国際出願日	平成19年9月5日 (2007.9.5)	(72) 発明者	古澤 直子 日本国東京都日野市さくら町1番地コニカ ミノルタエムジー株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2006-252453 (P2006-252453)	(72) 発明者	岡田 尚大 日本国東京都日野市さくら町1番地コニカ ミノルタエムジー株式会社内
(32) 優先日	平成18年9月19日 (2006.9.19)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子検出用試薬及びそれを用いた生体分子検出方法

(57) 【要約】

本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫測定法等において、検出感度が高く、抗原抗体反応の未反応物の分離が容易な生体分子検出用試薬及びそれを用いた生体分子検出方法を提供する。この手段として、半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子とを無機化合物又は有機ポリマーからなるビーズに含有し、且つビーズ表面に生体検出用分子が修飾されていることを特徴とする生体分子検出用試薬を特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子とを無機化合物又は有機ポリマーからなるビーズに含有し、且つビーズ表面に生体検出用分子が修飾されていることを特徴とする生体分子検出用試薬。

【請求項 2】

前記半導体ナノ粒子が、粒径の違いにより異なる波長の蛍光を発することができる半導体ナノ粒子であることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の生体分子検出用試薬。

【請求項 3】

前記半導体ナノ粒子が、異なる波長の蛍光を発することができる少なくとも 2 種の半導体ナノ粒子であることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の生体分子検出用試薬。 10

【請求項 4】

前記半導体ナノ粒子は、粒径の違いにより異なる波長の蛍光を発することができる半導体ナノ粒子であり、且つ少なくとも 2 種が含有されていることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の生体分子検出用試薬。

【請求項 5】

請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれか 1 項に記載の生体分子検出用試薬を用いることを特徴とする生体分子検出方法。

【請求項 6】

ビーズに含有する半導体ナノ粒子とは異なる粒径の半導体ナノ粒子の表面に生体検出分子を修飾した半導体ナノ粒子複合体を更に前記生体分子検出用試薬と組み合わせて用いることを特徴とする請求の範囲第 5 項に記載の生体分子検出方法。 20

【請求項 7】

請求の範囲第 4 項に記載の生体分子検出試薬を用いる生体分子検出方法であって、マイクロアレイ上で実施することを特徴とする生体分子検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子を利用した生体分子検出用試薬及びそれを用いた生体分子検出方法に関する。 30

【背景技術】

【0002】

分子生物学の進歩によって生体が活動するさまざまな仕組みが明らかになり脳やいろいろな臓器の病気やガンなどを分子レベルで解明する試みが行われている。その一つとして生体の機能とその異常を蛍光画像として捉える所謂バイオ・イメージング法が進展しつつある。

【0003】

この分野において、生体分子検出方法として、従来分子標識物質をマーカー物質に結合した生体物質標識剤を用いる方法が検討されている。しかし、当該方法で従来使用されてきた有機蛍光色素などのマーカー物質は、紫外線照射時の劣化が激しく寿命が短いことが欠点であり、また発光効率が低く、感度も十分ではなかった。 40

【0004】

例えば、蛍光マイクロビーズを抗原抗体反応を利用した免疫測定に用いる方法が知られている（例えば、特許文献 1 参照。）。この方法において、生体高分子間の特異的な反応のサイトとなるマイクロオーダーサイズのビーズは、有機溶媒中で染色し、蛍光顕微鏡やフローサイトメータでビーズの読み取りや識別を行っていた。しかしながら、ビーズの識別化は容易ではなく、特に数十種から数万種の多数のビーズを正確かつ容易に識別することは困難であった。

【0005】

また、蛍光標識粒子及び磁性粒子用いることにより、迅速、簡便に反応結合物と未反応 50

物の分離を容易にした抗体の測定方法が知られているが、操作が煩雑であり、有機蛍光色素を用いているので感度が不十分であるという問題があった（例えば、特許文献2参照）。

【0006】

ところで、ナノテクノロジーにおける最近の進歩は、ナノ粒子を、検出、診断、感知及びその他の用途に使用することの可能性を示唆している。また、生物系と相互作用するナノ粒子複合体は、最近生物及び医学の分野で広く関心を集めている。これらの複合体は、感知（例えば画像化）及び治療目的（例えば薬物送達）の両方にとって新規血管内プローブとして有望であると考えられている。

【0007】

一般に、ナノ・メートルサイズの半導体物質で量子閉じ込め（quantum confinement）効果を示す物質は「量子ドット」と称されている。このような量子ドットは、半導体原子が数百個から数千個集まった10数nm程度以内の小さな塊であるが、励起源から光を吸収してエネルギー励起状態に達すると、量子ドットのエネルギーバンドギャップに相当するエネルギーを放出する。したがって、量子ドットの大きさまたは物質組成を調節すると、エネルギーバンドギャップを調節することができて様々な水準の波長帯のエネルギーを利用することができる。

【0008】

そのため、近年、上記マーカ物質として半導体ナノ粒子を用いる方法が注目されている。例えば、極性官能基を有する高分子を半導体ナノ粒子の表面に物理的および／または化学的に吸接合した生体物質標識剤が検討されている（例えば、特許文献3参照）。また、有機分子をSi/SiO₂型半導体ナノ粒子の表面に結合した生体物質標識剤が検討されている（例えば、特許文献4参照）。

【0009】

例えば、特許文献5には、粒径の違いにより異なる励起波長及び蛍光を持つ半導体ナノ粒子を利用して、DNAやタンパク質等の生体高分子を容易に検出する技術が開示されている。

【0010】

しかしながら、上記のような生体物質標識剤を抗原抗体反応原理の免疫測定法等に用いた方法においては、未だ検出感度が不十分、又は検出感度はあっても未反応物の分離が煩雑であるという問題等があり、検出と分離の両方を一つの生体物質検出剤でできる技術の開発が望まれていた。また、遺伝子診断等多量の情報を1度に標識できるようなシステムが望まれていた。

【特許文献1】特開2004-226234号公報

【特許文献2】特開平7-151756号公報

【特許文献3】特開2003-329686号公報

【特許文献4】特開2005-172429号公報

【特許文献5】特開2003-322654号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、上記課題を鑑みてなされたものであり、その目的は、抗原抗体反応を利用した免疫測定法等において、検出感度が高く、抗原抗体反応の未反応物の分離が容易な生体分子検出用試薬及びそれを用いた生体分子検出方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明に係る上記課題は、下記的手段により解決される。

【0013】

1. 半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子とを無機化合物又は有機ポリマーからなるビーズに含有し、且つビーズ表面に生体検出用分子が修飾されていることを特徴とする生体分子

10

20

30

40

50

検出用試薬。

【0014】

2. 前記半導体ナノ粒子が、粒径の違いにより異なる波長の蛍光を発することができる半導体ナノ粒子であることを特徴とする前記1に記載の生体分子検出用試薬。

【0015】

3. 前記半導体ナノ粒子が異なる波長の蛍光を発することができる少なくとも2種の半導体ナノ粒子であることを特徴とする前記1に記載の生体分子検出用試薬。

【0016】

4. 前記半導体ナノ粒子は、粒径の違いにより異なる波長の蛍光を発することができる半導体ナノ粒子であり、且つ少なくとも2種が含有されていることを特徴とする前記1に記載の生体分子検出用試薬。 10

5. 前記1～4のいずれか一項に記載の生体分子検出用試薬を用いることを特徴とする生体分子検出方法。

6. ビーズに含有する半導体ナノ粒子とは異なる粒径の半導体ナノ粒子の表面に生体検出分子を修飾した半導体ナノ粒子複合体を更に前記生体分子検出用試薬と組み合わせて用いることを特徴とする前記5に記載の生体分子検出方法。

7. 前記4項に記載の生体分子検出試薬を用いる生体分子検出方法であって、マイクロアレイ上で実施することを特徴とする生体分子検出方法。

【発明の効果】

【0017】

本発明の上記手段により、抗原抗体反応を利用した免疫測定法等において、検出感度が高く、抗原抗体反応の未反応物の分離が容易な生体分子検出用試薬及びそれを用いた生体分子検出方法を提供することができる。 20

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明の生体分子検出用試薬は、半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子とを無機化合物又は有機ポリマーからなるビーズに含有してなり、且つビーズ表面に生体検出用分子が修飾されていることを特徴とする。

【0019】

なお、「無機化合物又は有機ポリマーに、半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子とを含有してなるビーズ」とは、コアに半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子を主に含むコアシェル構造のビーズや、無機化合物又は有機ポリマーからなるマトリックス内に分散含有された半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子を含有してなるビーズを代表例として示すことができる。 30

【0020】

ここで、「ビーズ」とは、半導体ナノ粒子又は磁性体ナノ粒子を含有している微小粒子をいう。当該ビーズの粒径は10 nm～10 μmであることが好ましい。更に、50 nm～500 nmであることが好ましい。

【0021】

以下、本発明とその構成要素等について詳細な説明をする。

【0022】

(無機化合物)

本発明で用いられる無機化合物としては、半導体ナノ粒子と磁性体ナノ粒子の安定性を確保できるものであれば、特に限定されない。また、特にナノ粒子材料として希土類金属を用いる場合には、水分子の配位を防ぐことができるものが好ましい。具体的には、ガラス、シリカ、酸化イットリウム等の金属酸化物、リン酸カルシウム、リン酸ストロンチウム等の金属リン酸化合物、硫化亜鉛等の金属硫黄化合物等が挙げられる。これらのうち、光の吸収性の点でガラスが好ましい。 40

【0023】

(有機ポリマー)

本発明で用いられる有機ポリマーとしては特に限定されないが、例えば、(不)飽和炭 50

化水素、芳香族炭化水素、(不)飽和脂肪酸、芳香族カルボン酸、(不)飽和脂ケトン、芳香族ケトン、(不)飽和アルコール、芳香族アルコール、(不)飽和アミン、芳香族アミン、(不)飽和チオール、芳香族チオール、有機珪素化合物、これらの1種以上の化合物からなる縮合体、これらの1種以上の化合物からなる重合体等が挙げられる。なお、上記「(不)飽和」とは、飽和及び不飽和の両方を意味するものである。上記縮合体及び重合体としては、例えば、ポリエチレン、ポリブタジエン等のポリオレフィン；ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等のポリエーテル；ポリスチレン、ポリ(メタ)アクリル酸、ポリ(メタ)アクリル酸エステル、ポリビニルアルコール、ポリビニルエステル、フェノール樹脂、メラミン樹脂、アリル樹脂、フラン樹脂、ポリエステル、エポキシ樹脂、シリコン樹脂、ポリイミド樹脂、ポリウレタン、テフロン(登録商標)、アクリロニトリル/スチレン樹脂、スチレン/ブタジエン樹脂、ビニル樹脂、ポリアミド樹脂、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリエーテルスルホン、ポリフェニレンオキシド、糖、澱粉、セルロース、ポリペプチド等が挙げられる。これらの有機化合物は単独で用いられても、2種以上が併用されてもよい。

10

【0024】

(半導体ナノ粒子)

〈半導体ナノ粒子の形成材料〉

本発明に係る半導体ナノ粒子は種々の半導体材料を用いて形成することができる。例えば、元素の周期表のIV族、II-VI族、及びIII-V族の半導体化合物を用いることができる。

20

【0025】

なお、半導体材料としては、半導体ナノ粒子が粒径の違いにより、量子サイズ効果を発現し、所望の異なる波長の蛍光を発する材料を用いることが好ましい。また、蛍光色の異なる少なくとも2種類以上の半導体ナノ粒子を用いることも好ましい態様である。

【0026】

II-VI族の半導体の中では、特に、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、HgS、HgSe及びHgTeを挙げることができる。

30

【0027】

III-V族の半導体の中では、GaAs、GaN、GaP、GaSb、InGaAs、InP、InN、InSb、InAs、AlAs、AlP、AlSb及びAlSが好ましい。

【0028】

VI族の半導体の中では、Ge、Pb及びSiは特に適している。

【0029】

本発明においては、半導体ナノ粒子がコア/シェル構造を有する粒子であることが好ましい。この場合、半導体ナノ粒子は半導体ナノ粒子からなるコア部と該コア部を被覆するシェル部とで構成されるいわゆるコア/シェル構造を有する半導体ナノ粒子であって、該コア部とシェル部の化学組成が相異なるものであることが好ましい。

40

【0030】

以下、コア粒子とシェル層について説明する。

【0031】

〈コア粒子〉

コア粒子に用いられる半導体材料としては、種々の半導体材料を用いることができる。具体例としては、例えば、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、GaAs、GaP、GaSb、InGaAs、InP、InN、InSb、InAs、AlAs、AlP、AlSb、AlS、PbS、PbSe、Ge、Si、又はこれらの混合物等が挙げられる。本発明において、特に好ましい半導体材料は

50

、Si、及びCdSeである。

【0032】

なお、必要があればGaなどのドーパ材料を極微量含んでもよい。

【0033】

上記コア部の平均粒径に関しては、発明の効果発現のために、1nm～10nmであることが好ましい。なお、平均粒径を1nm～10nmとすることにより小粒径の生体分子の標識及び検知が可能となり、更に、1nm～5nmであれば、十分に生体1分子に対する標識並びに動態イメージングが可能となる。従って、特に好ましいのは1nm～5nmである。

【0034】

10

なお、シェル部を加えたコア/シェル型半導体粒子の平均粒径としては、3nm～50nmにすることが好ましい。更には、3nm～10nmにすることが好ましい。

【0035】

本発明において、「平均粒径」とは、累積50%体積粒径をいう。この測定は、例えば、一般的に用いられるTEM（透過型電子顕微鏡）にて、粒子を100個観察し、その分布の値を用いて算出することができる。

【0036】

〈シェル層〉

シェルに用いられる半導体材料としては、種々の半導体材料を用いることができる。具体例としては、例えば、ZnO、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdO、CdS、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、GaS、GaN、GaP、GaAs、GaSb、InAs、InN、InP、InSb、AlAs、AlN、AlP、AlSb、又はこれらの混合物等が挙げられる。

20

【0037】

なお、好ましいシェル層の材料としては、半導体ナノ結晶粒子コアより高いバンドギャップエネルギーを有する半導性材料が挙げられる。

【0038】

半導体ナノ結晶粒子コアより高いバンドギャップエネルギーを有することに加えて、シェルに適切な材料は、コア半導性ナノ粒子粒子に関して、良好な伝導性および原子価バンドオフセットを有するべきである。従って、伝導性バンドは、コア半導性ナノ結晶粒子の伝導性バンドよりも望ましくは高く、そして原子価バンドは、コア半導性ナノ結晶の原子価バンドよりも望ましくは低い。可視で（例えば、Si、Ge、GaP、）または近赤外で（例えば、InP、InN、PbS、PbSe）エネルギーを放出する半導性ナノ結晶粒子コアについて、紫外線領域でバンドギャップエネルギーを有する材料が使用され得る。具体例としては、例えば、ZnS、GaNおよびマグネシウムカルコゲニド（例えば、MgS、MgSeおよびMgTe）が挙げられる。

30

【0039】

近赤外で放出する半導性ナノ結晶粒子コアについて、可視でバンドギャップエネルギーを有する材料もまた使用され得る。

【0040】

40

本発明において、特に好ましい半導体材料は、SiO₂、ZnSである。

【0041】

なお、本発明に係るシェル層は、コア粒子が部分的に露出して弊害を生じない限り、コア粒子の全表面を完全に被覆するものでなくてもよい。

【0042】

〈半導体ナノ粒子の製造方法〉

本発明に係る半導体ナノ粒子の製造については、従来公知の種々の方法を用いることができる。

【0043】

液相法の製造方法としては、沈殿法である、共沈法、ゾルーゲル法、均一沈殿法、還元

50

法などがある。そのほかに、逆ミセル法、超臨界水熱合成法、などもナノ粒子を作製する上で優れた方法である（例えば、特開2002-322468号、特開2005-239775号、特開平10-310770号、特開2000-104058号公報等を参照。）。

【0044】

気相法の製造方法としては、(1) 対向する原料半導体を電極間で発生させた第一の高温プラズマによって蒸発させ、減圧雰囲気中において無電極放電で発生させた第二の高温プラズマ中に通過させる方法（例えば特開平6-279015号公報参照。）、(2) 電気化学的エッチングによって、原料半導体からなる陽極からナノ粒子を分離・除去する方法（例えば特表2003-515459号公報参照。）、レーザーアブレーション法（例えば特開2004-356163号参照。）などが用いられる。また、原料ガスを低圧状態で気相反応させて、粒子を含む粉末を合成する方法も、好ましく用いられる。

10

【0045】

本発明の半導体ナノ粒子の製造方法としては、特に液相法による製造方法が好ましい。

【0046】

なお、本発明に係る半導体ナノ粒子の粒径や発光強度の均一性を実現するために、原材料の純度、合成濃度、合成温度と時間、粒子形成後のアニール温度・時間等の条件を最適化して、格子欠陥が少なく結晶性の高い半導体ナノ粒子とすることを要する。

【0047】

（磁性体ナノ粒子）

本発明に係る磁性体ナノ粒子は、平均粒子径が1~50 nmの磁性を有するナノ粒子であることが好ましい。平均粒子径が1 nm以上であるので安定可能に作製可能であり、50 nm以下であるので、例えば細胞内の物質を標的とした場合であっても細胞内まで侵入して標的物質を捉えることができる。また、磁性体ナノ粒子の表面が大きいため反応効率が高く、極微量の標的物質も迅速に捕集することができる。磁性体ナノ粒子の平均粒子径は、結晶の安定性および磁力応答性の観点から3~40 nmが好ましく、5~20 nmが特に好ましい。

20

【0048】

このような磁性体ナノ粒子は、例えば特表2002-517085号等に記載された方法に従って製造することができる。例えば鉄(II)化合物、または鉄(II)化合物および金属(II)化合物を含有する水溶液を、磁性酸化物の形成のために必要な酸化状態下に置き、溶液のpHを7以上の範囲に維持して、酸化鉄またはフェライト磁性体ナノ粒子を形成することができる。また、金属(II)化合物含有の水溶液と鉄(III)含有の水溶液をアルカリ性条件下で混合することによっても、本発明の磁性体ナノ粒子を得ることができる。さらに、バイオカタリシス(Biocatalysis)1991年、第5巻、61~69頁に記載の方法を用いることもできる。

30

【0049】

本発明で好ましい磁性体ナノ粒子は、金属酸化物、特に、酸化鉄およびフェライト($Fe, M)_3O_4$ からなる群から選択されるものである。ここで酸化鉄には、とりわけマグネタイト、マグヘタイト、またはそれらの混合物が含まれる。また、表面と内部が異なるコアシェル型構造であっても良い。前記式中Mは、該鉄イオンと共に用いて磁性金属酸化物を形成することのできる金属イオンであり、典型的には遷移金属の中から選択され、最も好ましくは Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} などであり、M/Feのモル比は選択されるフェライトの化学量論的な組成に従って決定される。金属塩は固形でまたは溶液状で供給されるが、塩化物塩、臭化物塩、または硫酸塩であることが好ましい。これらのうち、安全性の観点から酸化鉄が好ましい。

40

【0050】

例えばマグネタイトを形成するためには、溶液中に鉄が2種類の異なる酸化状態、 Fe^{2+} および Fe^{3+} で存在することが好ましい。2つの酸化状態は、鉄(II)塩および鉄(II)塩の混合物を、好ましくは所望の磁性酸化物の組成に対して $Fe(II)$ 塩を $Fe(III)$

50

) 塩より少し多いモル量で添加すること、または鉄 (II) 塩もしくは鉄 (III) 塩を添加して、必要に応じて Fe^{2+} または Fe^{3+} の一部を他方の酸化状態に、好ましくは酸化または場合により還元によって変換することにより、溶液中に存在できるようになる。

【0051】

この磁性金属酸化物は、30～100℃の温度、好ましくは50～90℃の間の温度で熟成することが好ましい。

【0052】

磁性金属酸化物を形成するために各種の金属イオン間の相互作用を起こさせるには溶液のpHが7以上である必要がある。pHは、適切なバッファー溶液を最初の金属塩の添加時の水溶液として用いるか、または必要な酸化状態にした後に溶液に塩基を添加することによって所望の範囲に維持される。ひとたびpH値としてその7以上の範囲にある特定の値を選択した後は、最終産物の大きさの分布が実質的に均一となることを確保するために、そのpH値を磁性ナノ粒子の調製工程の全体にわたって維持することが好ましい。

【0053】

また磁性ナノ粒子の粒子サイズを制御する目的で、追加の金属塩を溶液に添加する工程を設けてもよい。この場合、次の2つの異なる操作様式にて行うことができる。1つの操作様式は段階的増加によるもので、以後段階的様式の操作と呼ぶが、その操作様式では各成分(金属塩、酸化剤および塩基)を数回に分けて、好ましくは毎回等量で、定めた順序で溶液に連続的に添加し、それらの工程を所望のナノ粒子のサイズが得られるまで必要な回数繰り返し、その各回の添加量は溶液中(すなわち粒子の表面上以外)での金属イオンの重合を実質的に避けることのできる量とする。

【0054】

他方は、連続した操作様式であり、各成分(金属塩、酸化剤、および塩基)を定められた順序で、粒子表面以外の部位での金属イオンの重合を避けるために各成分毎に実質的に均一な流速で、連続的に溶液中に添加する。この段階的又は連続的操作様式を用いることによって、大きさの分布が狭い粒子を形成することができる。

【0055】

〈検出用分子によるビーズの表面修飾〉

本発明に係るビーズ表面が、疎水性である場合には、そのままでは水分散性が悪く、粒子が凝集してしまう等の問題が生じる場合がある。従って、ナノ粒子の表面(コア/シェル型半導体ナノ粒子の場合は、シェル部の表面)を親水化処理することが好ましい。

【0056】

親水化処理の方法としては、例えば、表面の親油性基をピリジン等で除去した後に粒子表面に表面修飾剤を化学的および/または物理的に結合させる方法がある。表面修飾剤としては、親水基として、カルボキシル基・アミノ基を持つものが好ましく用いられ、具体的にはメルカプトプロピオン酸、メルカプトウンデカン酸、アミノプロパンチオールなどがあげられる。

【0057】

本発明に係る検出用分子としては、生体高分子の特異的検出のために使用し得るものであれば特に限定するものではないが、例えばアビジン若しくはストレプトアビジンまたはビオチン、抗原または抗体、DNAまたはRNA等のオリゴ若しくはポリヌクレオチド等が挙げられる。

【0058】

例えば、アビジン若しくはストレプトアビジンを検出用分子として結合させる場合には、例えば置換アルキルチオールとしてカルボキシル基を有するアルキルチオール化合物(以下、チオールカルボン酸という場合もある。)を用い、カルボキシル基が表面に露出した半導体ナノ粒子を調製し、これを更に例えばN-ヒドロキシスルホスクシンイミド等を用いて誘導体化した後、アビジンまたはストレプトアビジン(例えばシグマアルドリッチジャパン株式会社等から入手可能。)と反応させて結合することができる。

【0059】

10

20

30

40

50

また、ビオチンを検出用分子として結合させる場合には、例えば置換アルキルチオールとしてアミノ基を有するアルキルチオール化合物（以下、アミノチオールという場合もある）を用い、アミノ基が表面に露出した半導体ナノ粒子を調製し、これを、例えば B i o t i n - S u l f o - O s u（スルホスクシンイミジルD-ビオチン）（株式会社同仁科学研究所）等の誘導体化したビオチンと反応させて結合することができる。

【0060】

当業者であれば、ビーズ上の官能基と目的の検出用分子の種類等に応じて、置換反応による結合に適した反応条件及び試薬を適宜選択することができる。

【0061】

本発明においては、検出用分子がアビジン、ストレプトアビジン、又はビオチンである 10
ことが好ましい。

【0062】

（生体分子検出方法）

本発明の生体分子検出用試薬を用いた生体高分子等の生体分子の検出は、生体分子、例えば予め検出用分子と特異的に反応し得る分子によって標識されたポリヌクレオチドやタンパク質を含有するサンプルに本発明の生体分子検出用試薬を添加し、特異的結合が生じた半導体ナノ粒子を単離してその蛍光を検出することによって行うことができ、溶液中で結合反応及び検出を行うこともできる。

【0063】

検出は、生体分子を含有する細胞中で行っても良く、また、DNAチップやタンパク質 20
チップ等のマイクロアレイ上で反応させても良い。

【0064】

本発明の方法の一実施形態として、例えば、DNAチップ上に固定されたオリゴヌクレオチドとビオチンにより標識されたオリゴヌクレオチドとをハイブリダイゼーションさせた後、これにアビジン若しくはストレプトアビジンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。ハイブリダイゼーションの有無によって、対象サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを決定することができる。尚、本明細書中において、「オリゴヌクレオチド」とは、特に限定するものではないが、100塩基長以下の長さのDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドをいい、天然起源のものでも合成したものでも良い。 30

【0065】

また、DNAチップ上に固定されたcDNAとビオチンにより標識されたcDNAとをハイブリダイゼーションさせた後、これにアビジン若しくはストレプトアビジンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。ハイブリダイゼーションの有無によって、対象サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを決定することができる。

【0066】

さらに、DNAチップ上に固定されたオリゴヌクレオチドとビオチンにより標識されたcDNAとをハイブリダイゼーションさせた後、これにアビジン若しくはストレプトアビジンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってハイブリダイゼーションの有無 40
を検出することができる。ハイブリダイゼーションの有無によって、対象サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを決定することができる。

【0067】

あるいはまた、DNAチップ上に固定されたオリゴヌクレオチドとアビジン若しくはストレプトアビジンにより標識されたオリゴヌクレオチドとをハイブリダイゼーションさせた後、これにビオチンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。上記と同様に、ハイブリダイゼーションの有無によって、対象サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを決定することができる。

【0068】

また、DNAチップ上に固定されたcDNAとアビジン若しくはストレプトアビジンに 50

より標識されたcDNAとをハイブリダイゼーションさせた後、これにビオチンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってハイブリダイゼーションの有無を検出することができる、ハイブリダイゼーションの有無によって、対象サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを決定することができる。

【0069】

また、DNAチップ上に固定されたオリゴヌクレオチドとアビジン若しくはストレプトアビジンにより標識されたcDNAとをハイブリダイゼーションさせた後、これにビオチンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。ハイブリダイゼーションの有無によって、対象サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを決定することができる。

10

【0070】

一方、タンパク質の検出の場合には、例えば、タンパク質チップ上に固定されたタンパク質とビオチンにより標識されたタンパク質とを結合させた後、これにアビジン若しくはストレプトアビジンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってタンパク質間の結合の有無を検出することができる。

【0071】

また、タンパク質チップ上に固定されたタンパク質とアビジン若しくはストレプトアビジンにより標識されたタンパク質とを結合させた後、これにビオチンを結合させた半導体ナノ粒子を添加することによってタンパク質間の結合の有無を検出することができる。

【0072】

本発明に係る生体分子検出方法としては、半導体ナノ粒子をアビジン又はストレプトアビジンと結合させ、ビオチンにより標識された生体分子を該半導体ナノ粒子の蛍光により検出する態様の方法が好ましい。

20

【0073】

本発明の方法においては、粒径または化学組成の異なる複数種類の半導体ナノ粒子を用いて複数種類の生体高分子を検出することができる。用いる半導体ナノ粒子の蛍光スペクトルの各ピークが識別可能であれば複数種類の生体高分子を同時に検出することができ、ピークの鋭さにも依存するが、例えば100nm程度離れた2本のピークは十分識別可能である。尚、検出可能範囲は400～700nmである。

30

【実施例】

【0074】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0075】

以下の実験において使用した洗浄液および分散液の組成は、50mMトリス（トリス(2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール)、0.9%NaCl、0.1%Tween20、pH9.0からなる。

【0076】

(比較例)

平均粒径0.7 μ mの磁性体(Fe₂O₃)含有ポリスチレンラテックス(以下、Mgラテックスとする。ロースプーラン社)に、抗ヒトIgMモノクローナル抗体(Medix Biochemica社)をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、牛血清アルブミン(BSA)で処理することにより粒子を安定化させ緩衝液に0.05%の濃度で懸濁させMgラテックス試薬を作製した。

40

【0077】

希土類キレートEu-NTA(β -ナフトイルトリフルオロアセトン)化合物(自製)3 \times 10⁻⁴モルとTOPO(トリオクチルホスフィンオキシド)(同仁化学)6 \times 10⁻⁴モルをアセトン40gに溶解した後、平均粒径0.459 μ mのポリスチレンラテックス(日本合成ゴム社)3gを水40mlに懸濁させたものを混合し、エバポレーターによりアセトンを除去することによりラテックス粒子中にEuキレート含有させ、Eu標識

50

ラテックス（以下、E uラテックスとする。）を作製した。

【0078】

E uラテックスに、カルボジイミドを用いて、遺伝子組換え法により産生したB型肝炎ウイルスコア抗原（HBcAg）（化学及血清療法研究所）を化学結合法により固定化した後、BSAで処理し、緩衝液に0.003%の濃度で懸濁させ、E uラテックス試薬を作製した。RIA法にて、IgM型抗HBcAg抗体を測定済みの、陰性検体98検体、陽性検体93検体を用いて特異性を調べた。

【0079】

検体3 μ L、BSA含有トリス緩衝液300 μ L、上記Mgラテックス試薬40 μ Lを加えた後攪拌し、5分間免疫反応を行わせた。次に、磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、上清を除いた後、緩衝液250 μ L、上記E uラテックス試薬40 μ Lを加えて攪拌し、10分間免疫反応を行わせた。

10

【0080】

磁石を用いて反応セル中のMgラテックスを反応液から分離し、残りの反応液を除去し、洗浄液を300 μ L加える。この分離、洗浄工程を3回繰返した後、分離したMgラテックスに最終分散液300 μ Lを加え、攪拌して分散させた後、蛍光強度を計測した。

【0081】

結合サンプルに含まれるE uラテックスの量から蛍光を測定した。抗原量が少量の陰性検体では、E uラテックスとMgラテックスの結合により蛍光強度が観察された。一方、陽性検体では、殆どE uラテックスとMgラテックスの結合が少なく、陰性検体より低い蛍光強度が観測されたが、明確な差は無く、20回行った検体検査によっては陽性・陰性の判断に迷い、検出精度が乏しかった。

20

【0082】

（実施例1）

10nmのFe₂O₃磁性体ナノ粒子と6nmのCdSe半導体ナノ粒子を1:1の比率（質量比）で混ぜた存在下で乳化重合を行い、平均粒径0.7 μ mのポリスチレンラテックス（以下、複合ラテックス1とする）を合成した。

【0083】

複合ラテックス1に、抗ヒトIgMモノクローナル抗体（Medix Biochemica社）をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、牛血清アルブミン（BSA）で処理することにより粒子を安定化させ緩衝液に0.05%の濃度で懸濁させた複合ラテックス試薬を作製した。

30

【0084】

検体3 μ L、BSA含有トリス緩衝液300 μ L、上記複合ラテックス試薬40 μ Lを加えた後攪拌し、5分間免疫反応を行わせた。更に抗ヒトIgMモノクローナル抗体を表面に固定化させた4.5nmのCdSe半導体ナノ粒子を添加して5分間免疫反応することにより検体中の抗原を抗体のサンドイッチ型構造で接合させた。

次に、磁石を用いて反応液から分離し、上清を除いた後、洗浄液を300 μ L加える。この分離、洗浄工程を3回繰返した後、分離した複合ラテックス1の複合体に最終分散液300 μ Lを加え、攪拌して分散させた後、蛍光強度を計測する。

40

【0085】

結合サンプルに含まれる複合ラテックス1の6nmの半導体粒子と抗原をサンドイッチした抗体の4.5nm半導体粒子を測定試料として蛍光を測定した。6nmの半導体ナノ粒子の蛍光では陽性検体で、高い蛍光強度、陰性検体では、低い蛍光強度が観測された。更に4.5nmの半導体ナノ粒子の蛍光測定により高い精度で陽性の検出が可能となった。これは20回繰返しの検出においても陽性、陰性の区別が明確であり、再現性精度も高いことを証明した。

【0086】

（実施例2）

10nmのFe₂O₃磁性体ナノ粒子と3nmと6nmのCdSe半導体ナノ粒子を1:

50

0.5 : 0.5 の比率 (質量比) で混ぜた存在下で乳化重合を行い、平均粒径 $0.7 \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス (以下、複合ラテックス 2 とする) を合成した。

【0087】

複合ラテックス 2 に、抗マウス IgM モノクローナル抗体 (Medix Biochemica 社) をカルボジイミドを用いて、化学結合法により固定化した後、牛血清アルブミン (BSA) で処理することにより粒子を安定化させ緩衝液に 0.05% の濃度で懸濁させた複合ラテックス試薬 2 を作製した。

【0088】

検体 $3 \mu\text{L}$ 、BSA 含有トリス緩衝液 $300 \mu\text{L}$ 、上記複合ラテックス試薬 1 及び 2 をそれぞれ $20 \mu\text{L}$ 加えた後攪拌し、5 分間免疫反応を行わせた。更に抗ヒト IgM モノクローナル抗体を表面に固定化させた 4.5 nm の CdSe 半導体ナノ粒子を添加して 5 分間免疫反応することにより検体中の抗原を抗体のサンドイッチ型構造で接合させた。次に、磁石を用いて反応液から分離し、上清を除いた後、洗浄液を $300 \mu\text{L}$ 加える。この分離、洗浄工程を 3 回繰返した後、分離した複合ラテックスに最終分散液 $300 \mu\text{L}$ を加え、攪拌して分散させた後、実施例 1 と同様に蛍光強度を計測する。

10

【0089】

結合サンプルに含まれる複合ラテックス 1 および 2 の残量を測定試料として、それぞれ半導体 3 nm 、 6 nm 粒子の蛍光を測定した。陽性検体では、高い蛍光強度、陰性検体では、低い蛍光強度が観測された。更に 4.5 nm 粒子の発光も検出することにより、より高い精度での検出が可能となった。

20

【0090】

(実施例 3)

ポリスチレンラテックスをガラスに変更した複合ガラスビーズにすること以外は実施例 2 に示される上記操作を実施して、結合サンプルに含まれる複合ガラスビーズ 1 および 2 の残量を測定試料としてそれぞれの蛍光を測定した。

【0091】

本発明の生体分子検出試薬を用いることにより比較例と比較して、有機蛍光色素の溶解・反応等のための操作が必要なく、簡便な方法で検出できることが確認された。また高い発光強度を得て、特異性が高く高精度で検出も可能となった。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/067281
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, G01N37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-226234 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 12 August, 2004 (12.08.04), Claims; Par. Nos. [0008], [0013], [0014]; Fig. 1 & US 2004/0147031 A1 & EP 1441227 A2	1-7
Y	JP 2006-070249 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 16 March, 2006 (16.03.06), Claims & US 2006/0263908 A1	1-7
Y	JP 2005-528466 A (Muller-Shulte, Detlef, P.), 22 September, 2005 (22.09.05), Claims & WO 2003/083481 A2 & US 2005/0147974 A1 & EP 1490691 A & DE 10214019 A	7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 October, 2007 (15.10.07)	Date of mailing of the international search report 23 October, 2007 (23.10.07)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/067281

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-265654 A (Hitachi Maxell, Ltd.), 29 September, 2005 (29.09.05), & US 2006/0062999 A1	1-7
A	US 2005/0032244 A1 (Shuming Nie), 10 February, 2005 (10.02.05), & WO 2005/017525 A & JP 2007-521460 A & EP 1664772 A	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 7 2 8 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, G01N37/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	JP 2004-226234 A (日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) 2004.08.12, 【特許請求の範囲】、【0008】、【0013】、【0014】、【図1】 & US 2004/0147031 A1 & EP 1441227 A2	1-7	
Y	JP 2006-070249 A (富士写真フイルム株式会社) 2006.03.16, 【特許請求の範囲】 & US 2006/0263908 A1	1-7	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 15. 10. 2007		国際調査報告の発送日 23. 10. 2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 白形 由美子	2 J 3 4 9 6
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 2 5 2

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 7 2 8 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2005-528466 A (ミュラー-シュルテ, デトレフ, ペー) 2005.09.22, 【特許請求の範囲】 & WO 2003/083481 A2 & US 2005/0147974 A1 & EP 1490691 A & DE10214019 A	7
A	JP 2005-265654 A (日立マクセル株式会社) 2005.09.29 & US 2006/0062999 A1	1 - 7
A	US 2005/0032244 A1 (Shuming Nie) 2005.02.10 & WO 2005/017525 A & JP 2007-521460 A & EP 1664772 A	1 - 7

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于生物分子检测的试剂和使用其的生物分子检测方法		
公开(公告)号	JPWO2008035569A1	公开(公告)日	2010-01-28
申请号	JP2008535312	申请日	2007-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达医疗印刷器材有限公司		
[标]发明人	星野秀樹 古澤直子 岡田尚大		
发明人	星野 秀樹 古澤 直子 岡田 尚大		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/5434 B82Y15/00 G01N33/588		
FI分类号	G01N33/543.525.C G01N33/533 G01N37/00.102		
优先权	2006252453 2006-09-19 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种生物分子检测用试剂，其具有高检测灵敏度，并且利用抗原-抗体反应在免疫测定等中容易地分离抗原-抗体反应的未反应物质，以及使用该试剂的生物分子检测方法。这意味着，一种生物分子检测试剂，其特征在于半导体纳米颗粒和磁性纳米颗粒包含在由无机化合物或有机聚合物组成的珠子中，并且生物检测分子在珠子表面上被修饰。和特征。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/067282
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543 (2006.01) 1, G01N33/00 (2006.01) 1		
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, G01N37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched JIKENYO SHIRYAN KOHO 1994-1996 JIKENYO SHIRYAN KOHO 1996-2007 Kobun Jitayugo Shiryan Koho 1971-2007 Tokoku Jitayugo Shiryan Koho 1994-2007		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-226234 A (HEICHL SOFTWARE ENGINEERING CO., LTD.), 12 August, 2004 (12.08.04) CLAIMS: Para. 0001, [0013], [0014], FIG. 1 & US 2004/0147031 A1 & EP 1441227 A2	1-7
Y	JP 2006-070249 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 16 March, 2006 (16.03.06). CLAIMS & US 2006/0263908 A1	1-7
Y	JP 2005-228466 A (Miller-Shulte, Detlef, P.), 22 September, 2005 (22.09.05) CLAIMS & WO 2003/083481 A2 & US 2005/0147974 A1 & EP 1490691 A	7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "I" earlier application or patent has 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 issue (as specified) "P" document referred to in 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 of priority date and not in conflict with the application but either underlies the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance (the claimed invention cannot be derived therefrom 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 taken alone with one or more cited in the document, each modification) "Z" document of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	15 October, 2007 (15.10.07)	Date of mailing of the international search report
Name and mailing address of the ISA/ Examining Office	European Patent Office	23 October, 2007 (23.10.07)
Examiner's Name		Authorized officer
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)		Telephone No.