

(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
2010年3月18日(18.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/029739 A1

- (51) 国際特許分類:
C08J 3/12 (2006.01) H01F 1/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/004476
- (22) 国際出願日: 2009年9月10日(10.09.2009)
- (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 2008-232832 2008年9月11日(11.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京工業大学(Tokyo Institute of Technology) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2-12-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 半田宏 (HANDA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 畠山士(HATAKEYAMA, Mamoru) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259国立大学法人東京工業大学

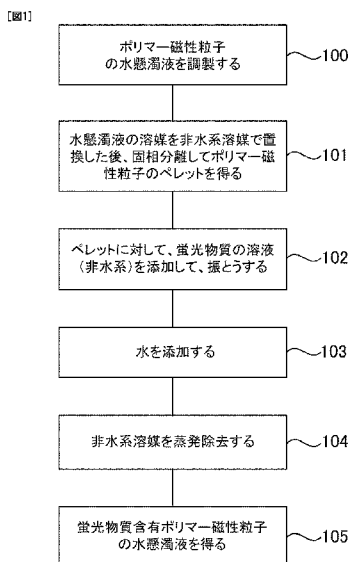
内 Kanagawa (JP). 坂本聡(SAKAMOTO, Satoshi) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 望月勇輔(MOCHIZUKI, Yusuke) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 河田慎太郎(KAWADA, Shintaro) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人エム・アイ・ピー(MAYA-MA INTERNATIONAL PATENT OFFICE); 〒2420007 神奈川県大和市中央林間四丁目5番9号 田園都市建設ビル4階 Kanagawa (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

[続葉有]

(54) Title: POLYMER PARTICLES CONTAINING FLUORESCENT MOLECULE AND PROCESS FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 蛍光分子を含有するポリマー粒子およびその製造方法



- 100 PREPARE WATER SUSPENSION OF MAGNETIC POLYMER PARTICLES
- 101 REPLACE SOLVENT IN WATER SUSPENSION WITH NONAQUEOUS SOLVENT, AND THEN SEPARATE SOLID PHASE TO OBTAIN PELLETS OF MAGNETIC POLYMER PARTICLES
- 102 ADD (NONAQUEOUS) SOLUTION OF FLUORESCENT SUBSTANCE TO PELLETS, AND SHAKE MIXTURE
- 103 ADD WATER
- 104 REMOVE NONAQUEOUS SOLVENT BY EVAPORATION
- 105 OBTAIN WATER SUSPENSION OF MAGNETIC POLYMER PARTICLES CONTAINING FLUORESCENT SUBSTANCE

(57) Abstract: Disclosed are polymer particles comprising a polymer layer having a high fluorescent molecule content. Also disclosed is a process for producing the polymer particles. Swelling of polymer particles in a nonaqueous solvent from which water is removed accelerates swelling of a polymer layer and, at the same time, can realize the introduction of a larger amount of fluorescent molecules into the polymer layer because the migration of the fluorescent molecules into the polymer layer is not inhibited by water molecules. Further, since water is added to the reaction system before the nonaqueous solvent is removed by evaporation, water which stays in the reaction system prevents the polymer particles from drying and, consequently, a high level of dispersion of the polymer particles containing fluorescent molecules can be maintained well.

(57) 要約: 【課題】本発明は、ポリマー層に高い含有率をもって蛍光分子を含有するポリマー粒子およびその製造方法を提供することを目的とする。【解決手段】ポリマー粒子を、水を排除した非水系溶媒中で膨潤させることによってポリマー層の膨潤が促進されることに加え、ポリマー層内部への蛍光分子の移行が水分子に阻害されないため、より多くの蛍光分子がポリマー層の内部に導入される。また、非水系溶媒を蒸発除去する前に、反応系に対して水を添加するため、反応系に残存した水がポリマー粒子の乾燥を防止し、その結果、当該蛍光分子含有ポリマー粒子の高い分散性が好適に維持される。

WO 2010/029739 A1

SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

蛍光分子を含有するポリマー粒子およびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光分子を含有するポリマー粒子に関し、より詳細には、分散性に優れ、そのポリマー層に高い含有率をもって蛍光分子を包含するポリマー粒子およびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、バイオセンシング分野におけるマーカー材料として、磁性粒子の応用展開が種々検討されている。この点につき、本出願人が先に出願した特開2006-88131号公報（特許文献1）は、磁性粒子をポリマーで被膜することによって、磁性粒子の磁気応答性を維持しつつ、マーカーに要求される高い分散性を実現したポリマー磁性粒子を開示している。さらに、その発展形として、本出願人が先に出願した特開2008-127454号公報（特許文献2）は、磁性粒子を被覆するポリマー層に蛍光分子を包含させることによって、蛍光標識としての機能と磁気応答性とを併せ持つ多機能型ポリマー磁性粒子を開示する。ここで、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子には、既存の蛍光検出器によって検出可能な蛍光輝度を実現すべく、その被覆ポリマー層により多くの蛍光分子を導入することが要求される。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2006-88131号公報
特許文献2：特開2008-127454号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、上記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明は、ポリマー層に高い含有率をもって蛍光分子を含有するポリマー粒子およびその製造

方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0005] 本発明者らは、ポリマー粒子のポリマー層により多くの蛍光分子を含有させる方法につき鋭意検討した結果、特開2008-127454号公報（特許文献2）に開示された被覆ポリマー層への蛍光分子の導入方法に一部改良を加えることによって、蛍光分子の含有量を大幅に増大させることに成功した。すなわち、本発明者らは、ポリマー粒子を、水を排除した非水系溶媒中で膨潤させることによって、ポリマー層の膨潤が好適に促進されることに加え、当該ポリマー層への蛍光分子の移行が水分子に阻害されないため、より多くの蛍光分子がポリマー層の内部に導入されること、さらに、非水系溶媒を蒸発除去する前に、反応系に対して水を添加することによって、非水系溶媒の蒸発除去後に反応系に残存する水がポリマー粒子の乾燥を防止することを見出し、上述した手順によって、高い含有率をもって蛍光分子を含有した蛍光分子含有ポリマー粒子が高い分散性を好適に維持した状態で得られることを発見し、本発明に至ったのである。
- [0006] すなわち、本発明によれば、ポリマー磁性粒子を蛍光分子が溶解した非水系溶媒に分散させて被覆ポリマー層を膨潤し、該膨潤した被覆ポリマー層に蛍光分子を吸収させる工程と、前記蛍光分子を吸収した前記ポリマー磁性粒子が分散した前記非水系溶媒に水を添加する工程と、前記非水系溶媒を蒸発除去する工程とを含む、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の製造方法が提供される。本発明においては、前記非水系溶媒を、水との親和性を有し、水よりも沸点が低く蒸気圧の高い有機溶媒とすることができる。
- [0007] また、本発明によれば、被覆ポリマー層の内部に蛍光分子が導入された蛍光分子含有ポリマー磁性粒子であって、前記蛍光分子含有ポリマー磁性粒子1mgあたりに少なくとも100nmolの蛍光分子を含有することを特徴とする、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子が提供される。本発明においては、前記被覆ポリマー層をスチレンを含むモノマー成分からなる重合体によって形成することができる。また、本発明においては、前記蛍光分子を希土類金

属キレート錯体とすることができ、前記希土類金属キレート錯体を構成する希土類金属を、ユーロピウム、サマリウム、テルビウム、およびジスプロシウムからなる群より選択される金属とすることができる。

[0008] さらに、本発明によれば、ポリマー粒子を蛍光分子が溶解した非水系溶媒に分散させてポリマー層を膨潤し、該膨潤したポリマー層に蛍光分子を吸収させる工程と、前記蛍光分子を吸収した前記ポリマー粒子が分散した前記非水系溶媒に水を添加する工程と、前記非水系溶媒を蒸発除去する工程とを含む、蛍光分子含有ポリマー粒子の製造方法が提供され、ポリマー層に蛍光分子が導入された蛍光分子含有ポリマー粒子であって、前記蛍光分子含有ポリマー粒子 1 mg あたりに少なくとも 100 nmol の蛍光分子を含有することを特徴とする、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子が提供される。

発明の効果

[0009] 上述したように、本発明によれば、分散性に優れ、ポリマー層に高い含有率をもって蛍光分子を含有するポリマー粒子およびその製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本実施形態の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の製造工程を示したフローチャート。

[図2]実施例 1 の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の粒径の重量換算分布の測定結果を示す図。

[図3]比較例 1 の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の粒径の重量換算分布の測定結果を示す図。

[図4]蛍光分子を導入する前のポリマー磁性粒子の粒径の重量換算分布の測定結果を示す図。

[図5]ユーロピウム単体分散液について蛍光強度を測定した結果を示す図。

[図6]蛍光ポリマー磁性粒子分散液について蛍光強度を測定した結果を示す図。

[図7]蛍光ポリマー磁性粒子分散液およびユーロピウム単体分散液のそれぞれ

の蛍光強度とエチレンジアミン四酢酸(EDTA)濃度の関係を示す図。

[図8]実施例1の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子による免疫染色を示す図。

発明を実施するための形態

- [0011] 以下、本発明を図面に示した実施の形態をもって説明するが、本発明は、図面に示した実施の形態に限定されるものではない。
- [0012] 本発明を、磁気応答性を備えるポリマー磁性粒子の被覆ポリマー層に対して蛍光分子を導入する実施形態を例にとって、以下説明する。図1は、本実施形態の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の製造工程を図1に示したフローチャートである。本実施形態においては、まず、工程100において、ポリマー磁性粒子の水懸濁液を調製する。工程100は、例えば、本出願人が先に出願した特開2006-88131号公報(特許文献1)に開示された下記の方法によって行うことができる。
- [0013] まず、フェライトなどの親水性の磁性粒子に界面活性物質を吸着させて疎水化した後、この強磁性粒子にスチレンやグリシジルメタクリレートなどのラジカル付加重合可能なモノマー液と非イオン性の親水基を有する界面活性剤とを加え、さらに適量の水を添加して混合しソニケーション等を行って乳化する。このようにして調製された乳化液を60~80℃に加熱したのち、親水性の開始剤を添加して乳化重合によりモノマーを重合させる。最後に、重合を終えた乳化粒子から界面活性剤を洗浄除去することにより、磁性粒子をポリマー被覆してなるポリマー磁性粒子の水懸濁液が得られる。
- [0014] 続く工程101において、工程100で得られたポリマー磁性粒子の水懸濁液の溶媒(すなわち水)を非水系溶媒で置換した後、固相分離する。工程101は、例えば、以下の手順で行うことができる。まず、ポリマー磁性粒子の水懸濁液を、遠心分離機を用いて固液分離して水を除去し、残ったペレットにメタノール等のアルコールを加え、さらに固液分離するという操作を数回繰り返すことにより行うことができる。このアルコール洗浄によって、被覆ポリマー層に付着している親水性物質が除去され、被覆ポリマー層の膨潤が促進される。

- [0015] 続く工程 102 において、工程 101 で固液分離して得られたポリマー磁性粒子のペレットに対し、蛍光分子を非水系溶媒に溶解してなる溶液（以下、蛍光分子溶液という）を添加して振とうする。工程 102 においては、ポリマー磁性粒子の被覆ポリマー層が蛍光分子溶液の非水系溶媒によって膨潤し、この膨潤したポリマーの内部に蛍光分子が非水系溶媒とともに吸収される。
- [0016] なお、本実施形態においては、被覆ポリマー層に導入する蛍光分子として、希土類金属キレート錯体を用いることができる。希土類金属キレート錯体を構成する希土類金属としては、ユーロピウムのほか、サマリウム、テルビウム、およびジスプロシウムを挙げることができる。
- [0017] 本実施形態においては、先の工程 101 において溶媒置換を行っているため、工程 102 の反応系において水が排除されている。その結果、被覆ポリマー層の膨潤が好適に促進されるとともに、被覆ポリマー層内部への蛍光分子の移行が水分子に阻害されないため、より多くの蛍光分子を被覆ポリマー層の内部に導入することが可能となる。本実施形態においては、蛍光分子溶液の溶媒、ならびに、被覆ポリマー層を膨潤するための溶媒として機能する上記非水系溶媒として、水との親和性を有し、水に比べ沸点が低く蒸気圧の高い有機溶媒を用いることが好ましい。例えば、本実施形態においては、上記非水系溶媒として、親水性基を有し、沸点が 56.5°C のアセトンを用いることができる。
- [0018] 工程 102 において、好ましくは、被覆ポリマー層への蛍光分子の移行が飽和状態になった後、工程 103 において、上記反応系に水を添加する。添加する水は、純水であることが好ましく、蒸留水や milli Q 水を用いることができる。また、添加する水の量は、上記反応系の非水系溶媒と等量程度とすることが好ましい。
- [0019] 最後に、工程 104 において、工程 103 の反応系から非水系溶媒を蒸発除去する。この非水系溶媒の蒸発除去は、水より沸点の低い非水系溶媒のみが気化する条件下で、例えば減圧処理、加熱処理、あるいは減圧しながら加

熱する処理などの方法によって行うことができる。その結果、被覆ポリマー層に吸収された非水系溶媒が除去され、被覆ポリマー層内に蛍光分子のみが残留する。この際、工程103において添加された水が反応系に残存するため、蛍光分子が導入されたポリマー磁性粒子の乾燥が防止され、その結果、ポリマー磁性粒子の高い分散性が好適に維持される。最終的に、工程105において、高い含有率をもって蛍光分子を含有したポリマー磁性粒子の水懸濁液が得られる。

[0020] 以上説明した手順によれば、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子1mgあたり、少なくとも100nmol、好ましくは、150nmol以上、より好ましくは、200nmol以上、望ましくは、250nmol以上の蛍光分子を導入することができる。換言すれば、本実施形態においては、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子1個あたり、少なくとも 4.0×10^5 個以上、好ましくは、 6.0×10^5 個以上、より好ましくは、 8.0×10^5 個以上、望ましくは、 1.0×10^6 個以上の蛍光分子を導入することができるので、マーカールとしての十分な蛍光輝度が実現される。

[0021] 以上説明したように、本発明の製造方法によれば、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を高い分散性を維持した状態で提供することができる。このことは、すなわち、優れた定量性を保証するものである。また、本発明の製造方法によれば、より多くの蛍光分子をポリマーの内部に完全に密封する形で導入することができるので、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子は、細胞中、生体中など、多彩な環境下において、外部環境に影響されることなく、高輝度の蛍光を安定して供給することができる。

[0022] なお、本実施形態のポリマー磁性粒子は、生理活性物質に対する結合性を改善すべく、被覆ポリマー層の表面に、エチレングリコールジグリシジルエーテル（EGDE）、ブチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコール（PEG）などのスペーサ分子を結合させることができるが、上述した蛍光分子の導入方法は、スペーサ分子が結合した状態のポリマー磁性粒子に対しても同様に適用することができる。

[0023] 以上、本発明をフェライトなどの親水性の磁性粒子を核として形成されるポリマー磁性粒子の被覆ポリマー層に蛍光分子を導入する実施形態をもって説明してきたが、本願の技術思想は、粒子状のポリマーに蛍光分子を導入するための汎用的な方法に係るものであり、蛍光分子の導入対象をポリマー磁性粒子に限定して解釈されるべきものではないことに留意されたい。すなわち、本発明によれば、乳化重合や懸濁重合など既知の方法を経て調製される、磁性粒子を含有しない既知のポリマー粒子の水懸濁液に対して、上述した工程102以降の手順を加えることによって、当該ポリマー粒子の内部に、上述したのと同様の高い含有率をもって蛍光分子を包含させることができるのであり、このことは、当業者であれば容易に理解しうるところであろう。

実施例

[0024] 以下、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子について、実施例を用いてより具体的に説明を行なうが、本発明は、後述する実施例に限定されるものではない。

[0025] <EGDE修飾ポリマー磁性粒子の調製>

NaOH水溶液(1M)にFeCl₂水溶液を添加し、NaNO₃により酸化処理を行った。定温保持し、平均粒径が40nmのフェライト粒子を析出させた。このフェライト粒子150mgの懸濁液に、10-ウンデセン酸のNaOHの水溶液を添加することにより、強磁性粒子にウンデセン酸を飽和吸着させ、残った10-ウンデセン酸のNaOHの水溶液を洗浄除去することにより、疎水化強磁性粒子を得た。

[0026] この疎水化強磁性粒子に、PEO鎖を有する非イオン性界面活性剤Emulgen 1150S-70(花王株式会社製)0.3gを溶解した水溶液を加えてソニケーションすることにより、この非イオン性界面活性剤を疎水化強磁性粒子の表面に吸着させて粒子を再親水化し水に分散させた。

[0027] 次に、この再親水化フェライト粒子のコロイド溶液に、スチレン(モノマー)2.7g、GMA(グリシジルメタクリレート、モノマー)0.3g、AIBN(アゾビスイソブチロニトリル、開始剤)0.025g、DVB(

ジビニルベンゼン、架橋剤) 0.08 g、およびジエチルエーテル 2.5 g を有するモノマーミックスを添加し、ソニケーションを行って乳化液を得た。

[0028] 次に、この乳化液に対しその全量が 125 g になるように水を添加し、ソニケーションを行なった後、350 rpm で攪拌を続けながら加熱し、20 ~ 30 分後に 70 °C に達したところで水溶性開始剤 V-50 (和光純薬工業 (株) 製) 50 mg を純水 5 ml に溶かした水溶液を添加して重合反応を 12 時間行ない、得られた乳化重合粒子を洗浄し、フェライト粒子がポリマーで被覆されてなるポリマー磁性粒子の水懸濁液を得た。

[0029] さらに、上述した手順で調製したポリマー磁性粒子に、スペーサとしてエチレングリコールジグリシジルエーテル (EGDE) を結合させる修飾を行った。まず、ポリマー磁性粒子にアミノ基を導入するために、NH₄OH 水溶液をこの粒子のスラリーに加え、これを HCl 水溶液で pH を調整して反応させることにより、GMA のエポキシ基を開環しアミノ基を導入した。

[0030] 次に、このポリマー磁性粒子の開環したアミノ基に対し、過剰量の EGDE を仕込み、NaOH 水溶液で pH を調整し攪拌を行なって、ポリマー被覆フェライト粒子のアミノ基と EGDE のエポキシ基とを結合させた。反応後、磁気分離操作を利用して水洗浄を行ない、EGDE で修飾されたポリマー磁性粒子の水懸濁液を得た。

[0031] <蛍光分子の導入>

(蛍光分子溶液の調製)

蛍光分子として、Eu (TTA)₃ (TOPO)₂ 錯体 (テノイルトリフルオロアセトン を配位した Eu 錯体) 1.1 mg をアセトン 0.22 g に添加し、蛍光分子のアセトン溶液を調製した。

[0032] (アルコール洗浄)

ポリマー磁性粒子の高分子層の膨潤を促進するために、高分子層に付着している親水性物質を除くべく、ポリマー磁性粒子のアルコール洗浄を行なった。具体的は、上述した手順で調製したポリマー磁性粒子の水懸濁液 1 mg

を、遠心分離機を用いて固液分離して水を除去し、残ったペレットにメタノールを加えて分散させた後、再び同様の手順で固液分離するという操作を数回繰り返した。最後の固液分離でメタノールを除いた後に残ったペレットを使用して、下記の実施例および比較例に係る実験を行った。

[0033] (実施例 1)

上述した手順で得られたポリマー磁性粒子のペレットに対して、 $1.08 \mu\text{mol}$ の蛍光分子を含むアセトン溶液を添加して、ポリマー磁性粒子をアセトン溶液に分散させた。このアセトン溶液を室温で1時間振とう後、このアセトン溶液に対し、 miliQ 水を添加した。なお、 miliQ 水は、アセトン溶液と等量を添加した。その後、 60°C で真空加熱を行ってアセトンを蒸発除去し、ポリマー磁性粒子の水懸濁液を得た。

[0034] (比較例 1)

上述した手順で得られたポリマー磁性粒子のペレットに対して、 miliQ 水を添加してポリマー磁性粒子を水に分散させた。次に、この水懸濁液に対し、 $1.08 \mu\text{mol}$ の蛍光分子を含むアセトン溶液を添加して混合した。なお、蛍光分子のアセトン溶液は、上記 miliQ 水と等量を加えた。最後に、この混合溶液を室温で1時間振とう後、 60°C で真空加熱を行ってアセトンを蒸発除去し、ポリマー磁性粒子の水懸濁液を得た。

[0035] (比較例 2)

上述した手順で得られたポリマー磁性粒子のペレットに対して、 $1.08 \mu\text{mol}$ の蛍光分子を含むアセトン溶液を添加して、ポリマー磁性粒子を分散させた。このアセトン溶液を室温で1時間振とう後、 60°C で真空加熱を行い、アセトンを蒸発除去し、ポリマー磁性粒子の粉末を得た。

[0036] <分散性の検証>

上記実施例 1 ならびに比較例 1 で得られたポリマー磁性粒子の水懸濁液のそれぞれについて、遠心分離機を用いて固液分離し、得られたペレットを $0.1\% \text{NP40}$ (界面活性剤ノニデット P-40、販売元ナカライテスク) の溶液に分散させて洗浄した後に、再度、水に懸濁して分散性の評価を行った。

。また、比較例 2 で得られたポリマー磁性粒子の粉末についても同様に、0.1% NP40 の溶液を添加し、水への分散を試みた。なお、分散性の評価は、動的光散乱法を用いた粒径の重量換算分布の測定結果に基づいて行った。粒径の重量換算分布の測定には F P A R - 1 0 0 0 (大塚電子株式会社) を使用した。

[0037] 図 2 は、実施例 1 の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の粒径の重量換算分布の測定結果を示し、図 3 は、比較例 1 の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の粒径の重量換算分布の測定結果を示す。また、図 4 は、蛍光分子を導入する前のポリマー磁性粒子の粒径の重量換算分布の測定結果を示す。蛍光分子を導入する前のポリマー磁性粒子は、図 4 に示されるような単峰性の分布を示していたが、実施例 1 および比較例 1 についても、図 2 および図 3 に示されるように、図 4 と同様の単峰性の分布を示す結果となり、平均粒径がいずれも 220 nm 前後であったことから、蛍光分子導入後に単粒子分散を保っていることが分かった。なお、比較例 2 についても測定を試みたが、サンプルのポリマー磁性粒子が著しく凝集してしまったため、水に分散させることができず、測定そのものが不可能であった。上述した実施例の結果から、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子が、好適な分散性を備えることが示された。このことは、センシングマーカーの用途における優れた定量性を保証するものである。

[0038] <蛍光分子の導入量の検証>

次に、実施例 1 および比較例 1 のそれぞれについて、Eu (TTA)₃ (TPO)₂ 錯体の導入量を測定した。具体的には、蛍光分子が導入されたポリマー磁性粒子から、アセトンを用いてユーロピウム錯体を溶出させ、この溶出されたユーロピウムを原子発光分析 (ICP-OES, Leeman Labs, INC U. S. A. 装置名: Prodigy ICP) で定量した。下記表 1 は、その定量結果を示す。

[0039]

[表1]

	ポリマー磁性粒子1mgあたりの ユーロピウム量(nmol)	ポリマー磁性粒子1個あたりの ユーロピウム錯体数
実施例1	386	1.41×10^6
比較例1	55.1	2.01×10^5

[0040] 上記表1に示されるように、比較例1においては、ポリマー磁性粒子1mgあたり55.1nmolのユーロピウムが導入されていることが分かった。これは、ポリマー磁性粒子の1粒子の重さを 6.07×10^{-15} gとして換算すると、ポリマー磁性粒子1個にユーロピウム錯体が 2.01×10^5 個が導入されたことを意味する。なお、本実施例のポリマー磁性粒子の1粒子あたりの重さは、以下の手順で導出した。本実施例のポリマー磁性粒子におけるポリマー層の体積比は、熱分析の結果から約62%であることがわかった。マグネタイトの比重(5.3 g/cm^3)およびポリマーの比重(1.0 g/cm^3)から、本実施例のポリマー磁性粒子の比重を 1.45 g/cm^3 とした。一方、TEM像より本実施例のポリマー磁性粒子の粒径が約200nmであったことから、本実施例のポリマー磁性粒子1個あたりの重さを 6.07×10^{-15} gと推定した。

[0041] 一方、実施例1においては、ポリマー磁性粒子1mgあたり386nmolのユーロピウムが導入されていることが分かった。これは、ポリマー磁性粒子1個にユーロピウム錯体が 1.41×10^6 個が導入されたことを意味し、比較例1に比べて蛍光分子の導入量が7倍近く増大したことが分かった。

[0042] <蛍光分子の導入形態の検証>

さらに、実施例1で作製した蛍光ポリマー磁性粒子について、蛍光分子($\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{TOPO})_2$ 錯体)が、ポリマーの表面に単に付着しているのではなく、その内部に密封される形で導入されていることを以下の手順

で検証した。

[0043] (蛍光強度のpH依存性)

実施例1で作製した蛍光ポリマー磁性粒子を、4種類のバッファー(酢酸バッファー、ホウ酸+塩化カリウム-水酸化ナトリウムバッファー、リン酸バッファー、Hepes-NaOHバッファー)の各pH溶液中に分散させたもの(以下、蛍光ポリマー磁性粒子分散液として参照する)を用意した。なお、各蛍光ポリマー磁性粒子分散液は、粒子濃度が20 μg/mlとなるように調製した。

[0044] 一方、比較例として、上述したのと同じ4種類のバッファーの各pH溶液中にEu(TTA)₃(TOPO)₂錯体をミセル化して分散させたもの(以下、ユーロピウム単体分散液として参照する)を用意した。なお、各ユーロピウム単体分散液は、1 nmol/mlになるように調整した。

[0045] 上述した手順で調製した蛍光ポリマー磁性粒子分散液およびユーロピウム単体分散液のそれぞれについて、蛍光分光光度計LS-55(PerkinElmer)を用いて蛍光強度を測定した。なお、測定においては、Excitationを340 nmとし、Emissionを550-700 nmで計測し、618 nmの値を蛍光強度とした。スリットはExcitation、Emissionとも10.0 nmとした。

[0046] 図5は、ユーロピウム単体分散液について蛍光強度を測定した結果を示す。図5に示されるように、ユーロピウム単体分散液については、全てのバッファーにおいて中性付近で強い蛍光強度が測定されたものの、その他のpH領域においては蛍光強度が急落しており、Eu(TTA)₃(TOPO)₂錯体の蛍光強度は、外部環境のpHの影響を大きく受けることが示された。

[0047] 一方、図6は、蛍光ポリマー磁性粒子分散液について蛍光強度を測定した結果を示す。図6に示されるように、蛍光ポリマー磁性粒子分散液については、全てのpH領域において強い蛍光強度が維持しており、その蛍光強度が外部環境のpHの影響を受けないことがわかった。

[0048] (蛍光強度の消光剤濃度依存性)

上述した手順で調製した蛍光ポリマー磁性粒子分散液(pH 7.95)およびユーロピウム単体分散液(pH 7.95)に対して、ユーロピウム錯体の消光剤

として知られるEDTAを添加した後、上述したのと同様の条件で蛍光強度を測定した。なお、EDTA濃度については、5条件（0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1 mM、3 mM）を設定した。

[0049] 図7は、蛍光ポリマー磁性粒子分散液およびユーロピウム単体分散液のそれぞれの蛍光強度とEDTA濃度の関係を示す。図7に示されるように、ユーロピウム単体分散液においては、EDTA濃度が1 mMになったあたりから蛍光強度が減少しはじめ、EDTA濃度が3 mMになると蛍光強度は50%にまで減少した。一方、図7に示されるように、蛍光ポリマー磁性粒子分散液においては、EDTA濃度の上昇に伴う蛍光強度の低下は観察されなかった。

[0050] 上述した2つの測定結果は、実施例1で作製した蛍光ポリマー磁性粒子に導入されたユーロピウム錯体が外的環境の影響を受けていないことを示している。このことは、実施例1で作製した蛍光ポリマー磁性粒子においては、ユーロピウム錯体がポリマーの表面に単に付着しているのではなく、ポリマーの内部に密封される形で導入されていることを推察させるものである。

[0051] 上述した実施例の結果から、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子においては、より多くの蛍光分子がポリマーの内部に完全に密封されていることが示された。このことは、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子が、外部環境に影響されることなく、高輝度の蛍光を安定して供給することを保証するものである。

[0052] 次に、実施例1で作製した蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を使用して、乳腺C N B検体の蛍光抗体法による免疫染色（蛍光免疫染色法）を以下の手順で実施した。

[0053] （蛍光分子含有ポリマー磁性粒子に対する抗EGFR抗体の固定化）

実施例1において調製したEGDE修飾ポリマー磁性粒子に対して、3.0M NH₄OHで24時間70°Cで反応を行うことによりEGDE末端のエポキシ基にアミノ基を導入した後、0.5M無水コハク酸DMF溶液中で12時間（室温）反応させることによって、ポリマー磁性粒子の表面にカルボキシル基を導入した。このポリマー磁性粒子に対して、実施例1と同様の方法でユーロピウム錯体を

導入し、カルボキシル化蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を作製した。

[0054] 上述した手順で作製したカルボキシル化蛍光分子含有ポリマー磁性粒子1 mgに対し、EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド) のmilliQ溶液 (20 mg/ml) を200 μ l添加した後、4°Cで30分間浸とうを行い、カルボキシル基の活性化を行った。その後、500 μ lの氷上で冷やしたmilliQ及び粒子上抗体固定化バッファーを1回ずつ使用して、遠心分離を用いて素早く洗浄した。次に50 μ g分の抗EGFR抗体を粒子上抗体固定化バッファー50 μ lに溶解した溶液を添加し、4°Cで2時間振とうした後、1 Mのエタノールアミン溶液を5 μ l添加して、4°Cで一昼夜浸とうした。最後に、1 mlの抗体固定化後洗浄バッファーで5回洗浄した後、作製された抗EGFR抗体固定化蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を4°Cで遮光保存した。

[0055] (抗EGFR抗体固定化蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を用いた免疫染色)

乳腺C N B検体のパラフィン切片をスライドガラスに貼付した後、キシレンによる脱パラフィン処理、メタノールによる親水処理、流水水洗 (15min) を行なった。さらにこれについて、DAKO Proteinase K (0.4mg/ml/0.05M TBS pH7.5~7.7) を使用して抗原賦活化処理 (室温30min) を行なったのち、さらに、流水水洗 (15min) を経て、5%BSAによるブロッキング処理 (20min) を実施した。

[0056] 上記サンプルに対し、上述した手順で作製した抗EGFR抗体固定化蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の分散液 (分散溶媒: 10mM HEPES-NaOH (pH7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.1%(w/v) Tween 20) を滴下した後、スライドガラスの裏側にネオジウム磁石を10min配置した。その後、サンプルをTBSで洗浄し、親水性封入材によって封入した。

[0057] なお、対照サンプルとして、免疫ペルオキシダーゼ法 (染色液: マイヤーヘマトキシリン) によって免疫染色を行なった同じ乳腺C N B検体の組織切片を用意した。

[0058] 図8 (a) は、実施例1の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を使用して免疫染色を行なったサンプルの蛍光顕微鏡写真を示し、図8 (b) は、免疫ペル

オキシダーゼ法によって免疫染色を行なった対照サンプルの顕微鏡写真を示す。図8に示されるように、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を使用した免疫染色によれば、対照サンプルと同等のコントラストをもって、がん化している部分を蛍光染色できることが確認された。

[0059] 上述した実施例の結果から、本発明の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子をアフィニティ反応の利用したバイオセンシングにおける蛍光マーカに適用した場合、必要十分な輝度の蛍光を供給できることが示された。

産業上の利用可能性

[0060] 以上、説明したように、本発明によれば、ポリマー層の内部により多くの蛍光分子を含有するポリマー粒子およびその製造方法が提供される。本発明の蛍光分子含有ポリマー粒子は、高輝度の蛍光標識として安定して機能することができ、バイオセンシング分野における有用なマーカー材料として更なる応用展開が期待される。

請求の範囲

- [請求項1] ポリマー磁性粒子を蛍光分子が溶解した非水系溶媒に分散させて被覆ポリマー層を膨潤し、該膨潤した被覆ポリマー層に蛍光分子を吸収させる工程と、
- 前記蛍光分子を吸収した前記ポリマー磁性粒子が分散した前記非水系溶媒に水を添加する工程と、
- 前記非水系溶媒を蒸発除去する工程とを含む、
- 蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の製造方法。
- [請求項2] 前記非水系溶媒が、水との親和性を有し、水よりも沸点が低く蒸気圧の高い有機溶媒である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 被覆ポリマー層の内部に蛍光分子が導入された蛍光分子含有ポリマー磁性粒子であって、
- 前記蛍光分子含有ポリマー磁性粒子1mgあたりに少なくとも100nmolの蛍光分子を含有することを特徴とする、蛍光分子含有ポリマー磁性粒子。
- [請求項4] 前記被覆ポリマー層がスチレンを含むモノマー成分からなる重合体によって形成される、請求項3に記載の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子。
- [請求項5] 前記蛍光分子が希土類金属キレート錯体である、請求項3または4に記載の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子。
- [請求項6] 前記希土類金属キレート錯体を構成する希土類金属が、ユーロピウム、サマリウム、テルビウム、およびジスプロシウムからなる群より選択される、請求項5に記載の蛍光分子含有ポリマー磁性粒子。
- [請求項7] ポリマー磁性粒子の水懸濁液を非水系溶媒で溶媒置換することによって水を除去した後、該ポリマー磁性粒子を蛍光分子が溶解した非水系溶媒に分散させて被覆ポリマー層を膨潤し、該膨潤した被覆ポリマー層の内部に蛍光分子を吸収させる工程と、
- 前記蛍光分子を吸収した前記ポリマー磁性粒子が分散した前記非水

系溶媒に水を添加する工程と、

前記非水系溶媒を蒸発除去して、前記蛍光分子を吸収した前記ポリマー磁性粒子の水懸濁液を得る工程とを含む、

蛍光分子含有ポリマー磁性粒子の製造方法。

[請求項8]

ポリマー粒子を蛍光分子が溶解した非水系溶媒に分散させてポリマー層を膨潤し、該膨潤したポリマー層に蛍光分子を吸収させる工程と、

前記蛍光分子を吸収した前記ポリマー粒子が分散した前記非水系溶媒に水を添加する工程と、

前記非水系溶媒を蒸発除去する工程とを含む、

蛍光分子含有ポリマー粒子の製造方法。

[請求項9]

ポリマー層に蛍光分子が導入された蛍光分子含有ポリマー粒子であって、

前記蛍光分子含有ポリマー粒子 1 mg あたりに少なくとも 100 nmol の蛍光分子を含有することを特徴とする、蛍光分子含有ポリマー粒子。

[請求項10]

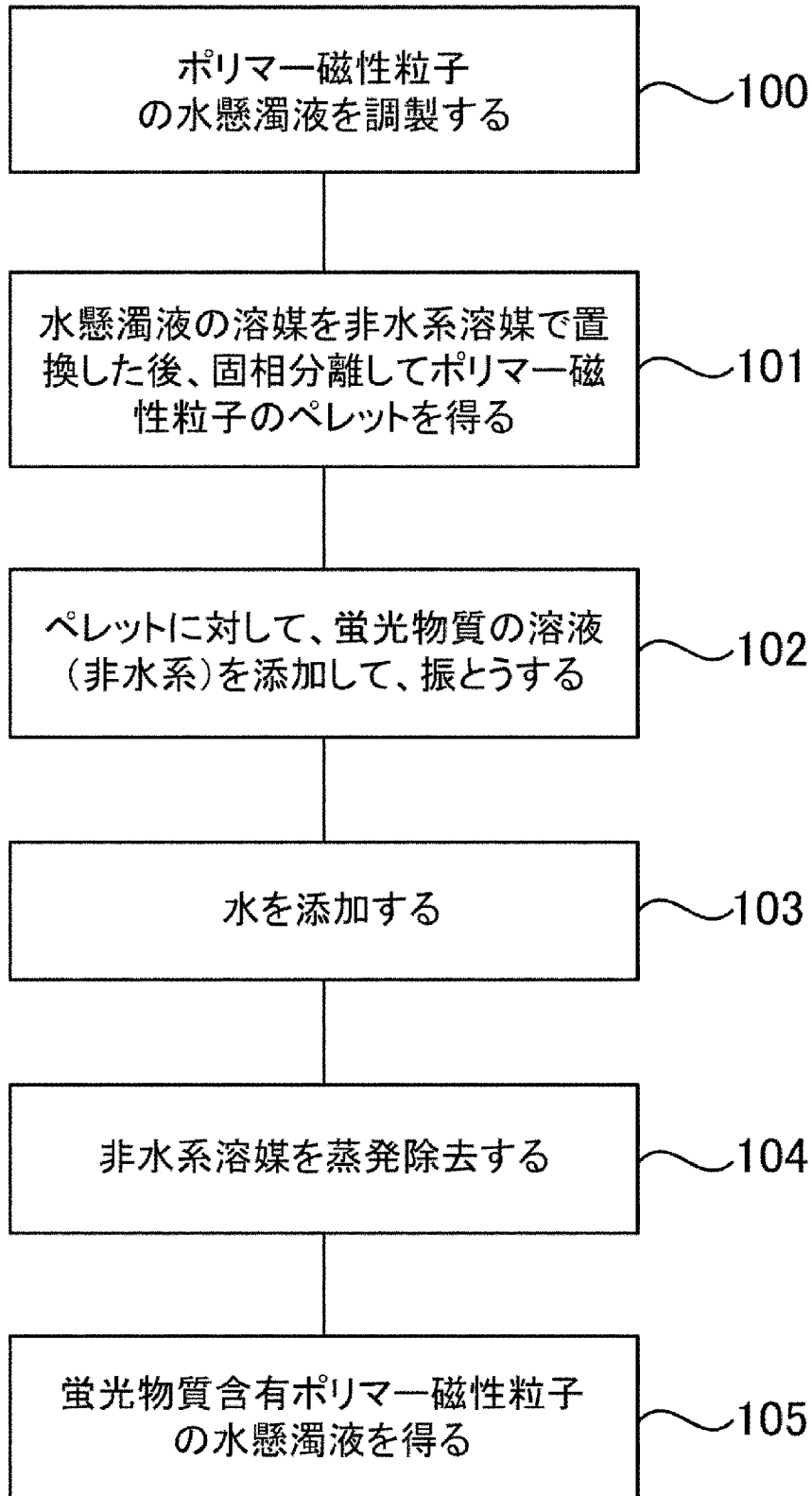
蛍光抗体法によって免疫染色する方法であって、

基板に貼付した組織切片に対して、抗体を固定化した請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載の前記蛍光分子含有ポリマー磁性粒子を付与し、該蛍光分子含有ポリマー磁性微粒子を前記組織切片に向けて強制的に磁気誘導することを特徴とする、蛍光免疫染色方法。

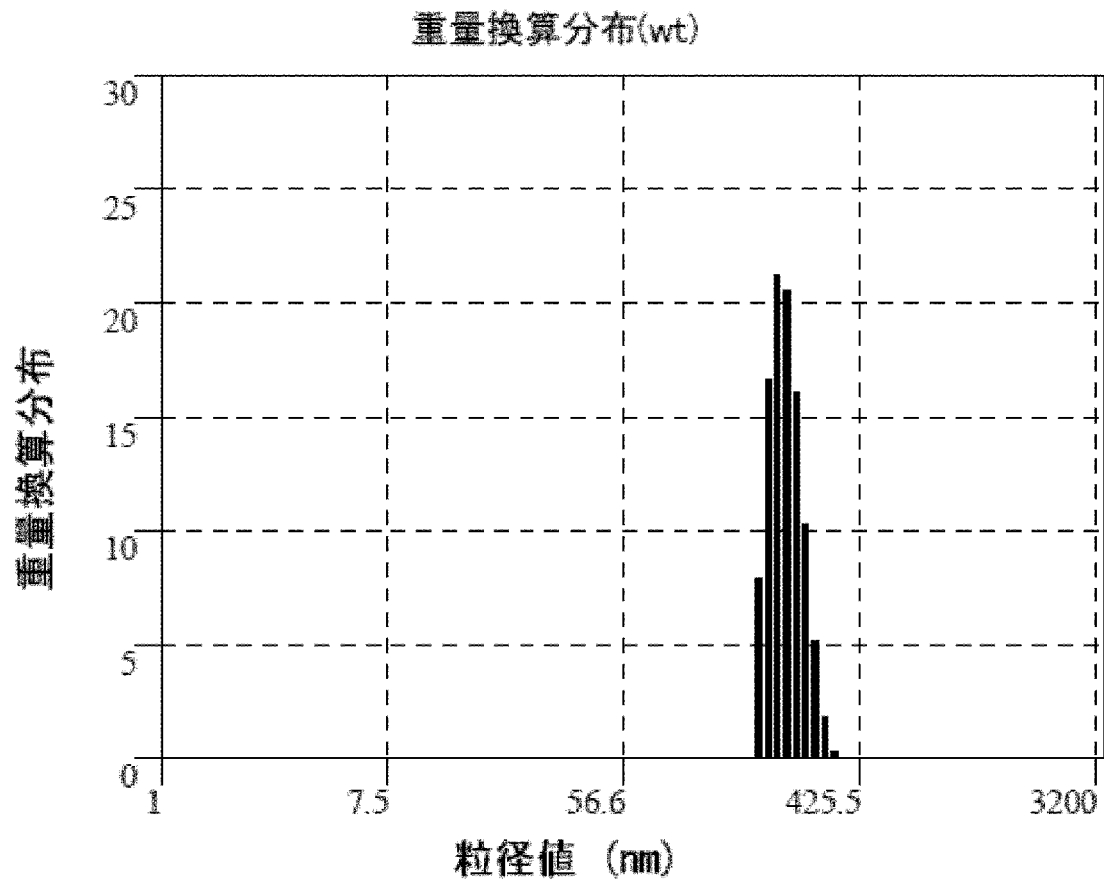
[請求項11]

前記磁気誘導は、前記基板の裏側に磁石を配置することによって行なう、請求項 10 に記載の蛍光免疫染色方法。

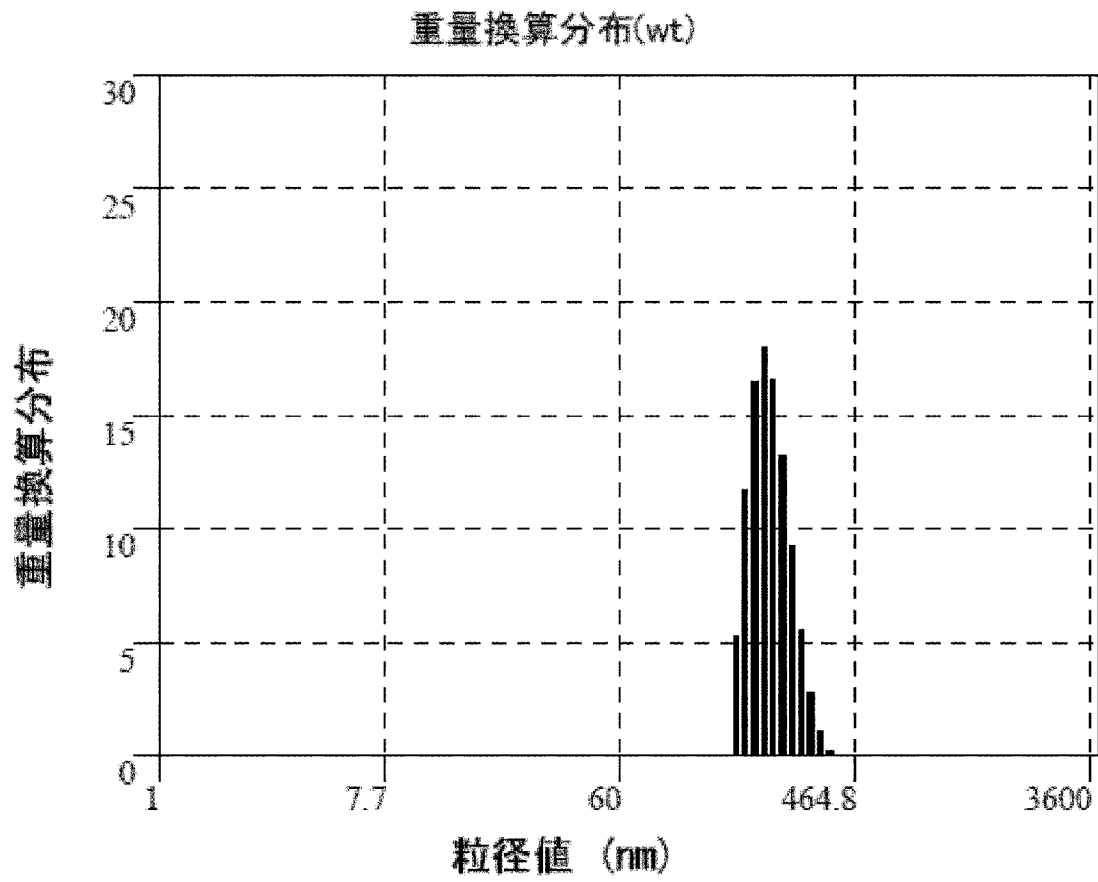
[図1]



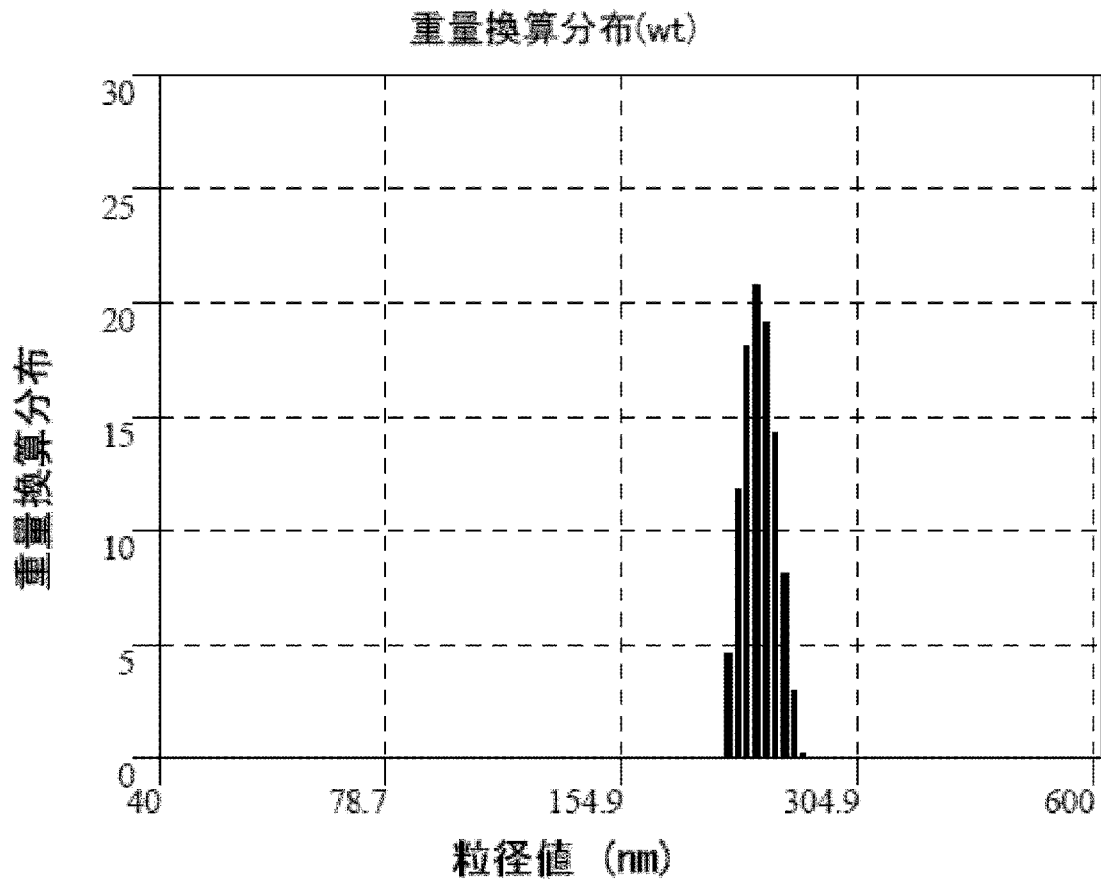
[図2]



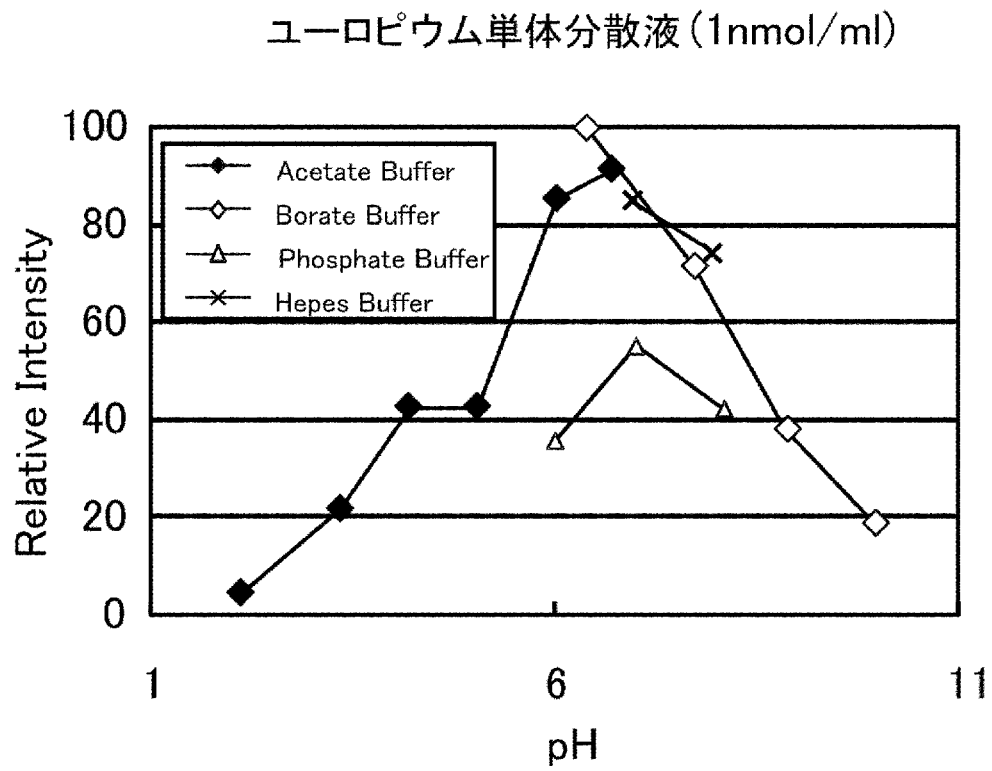
[图3]



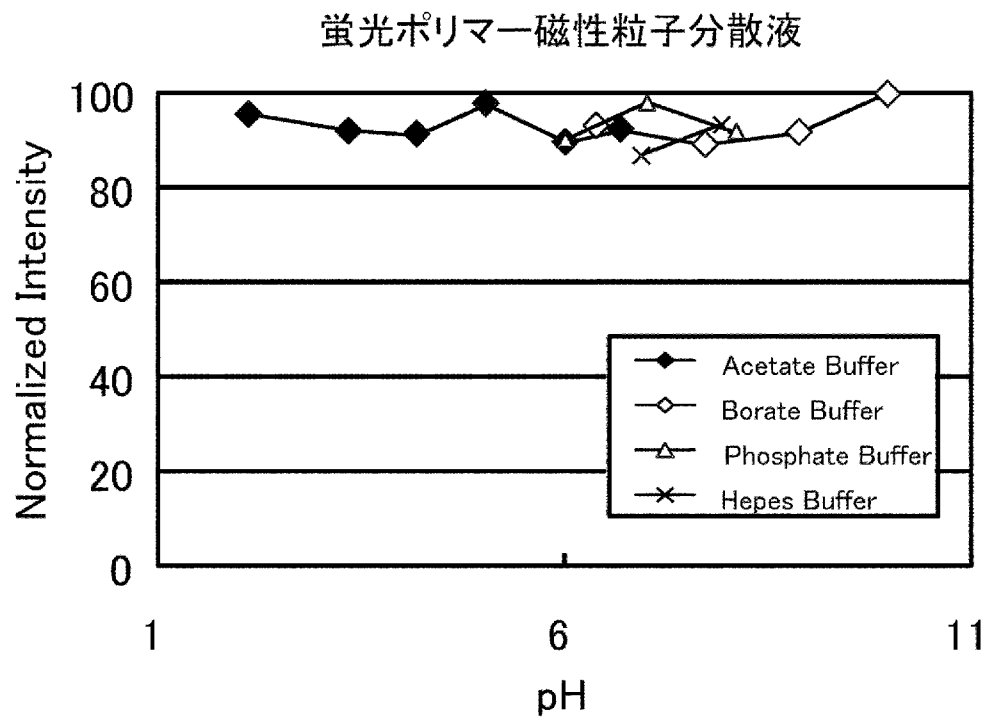
[图4]



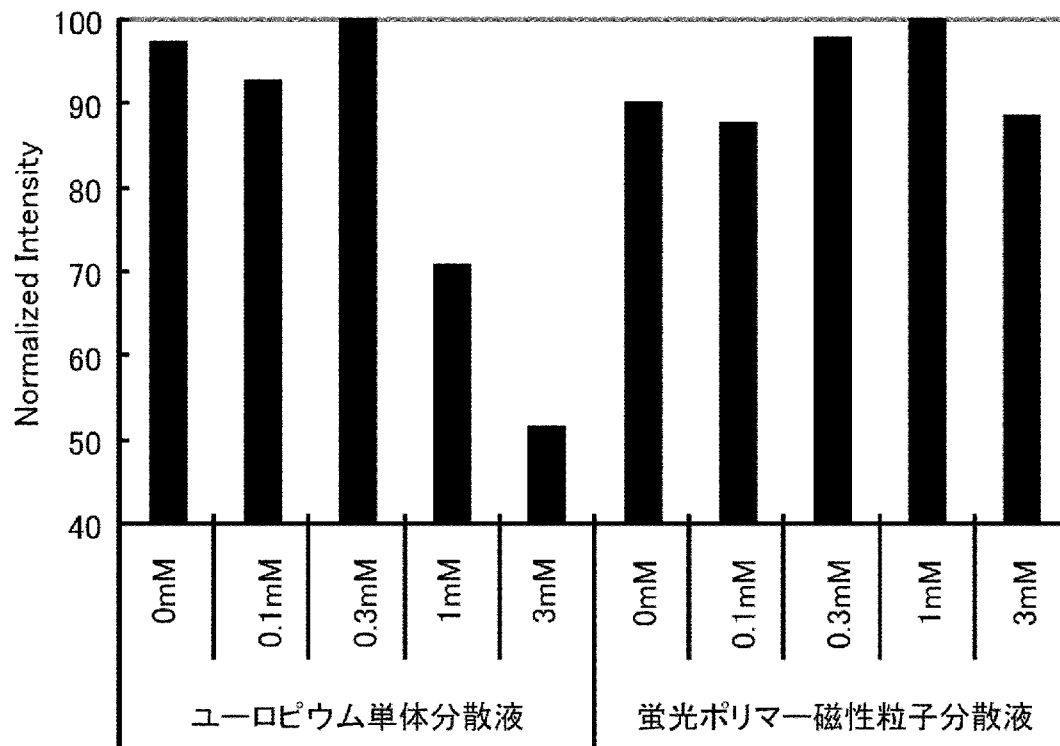
[図5]



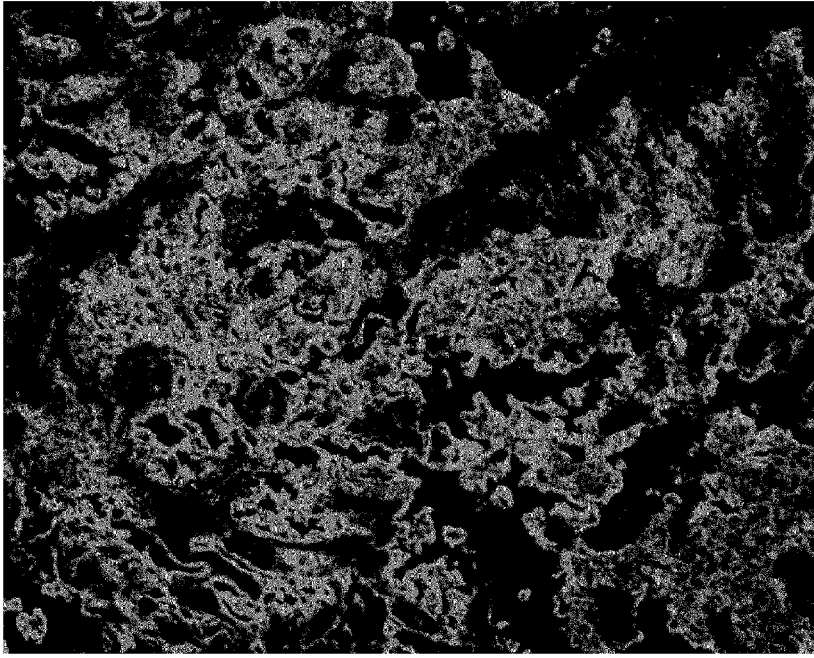
[図6]



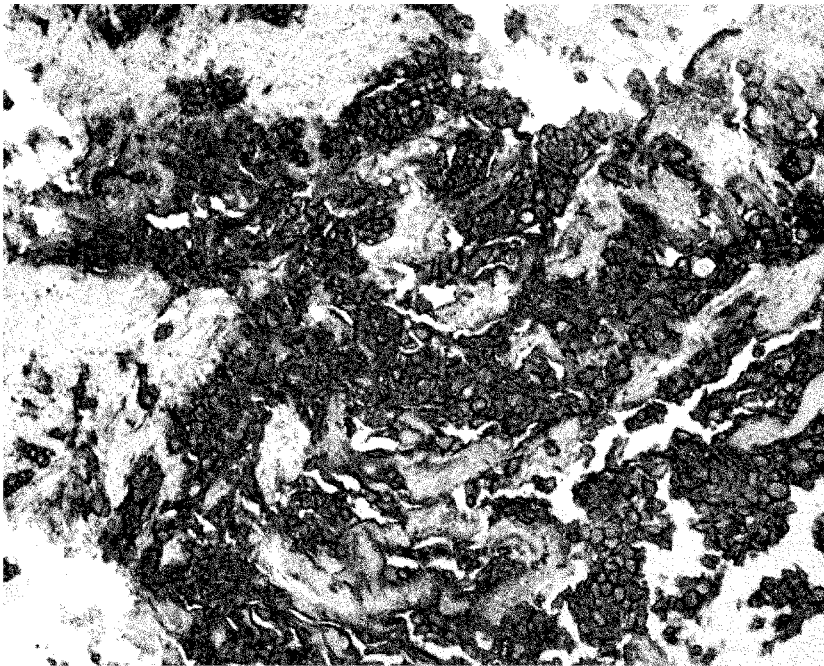
[図7]



[図8]



(a)



(b)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08J3/12(2006.01) i, G01N33/543(2006.01) i, H01F1/00(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08J3/00-28, D06P1/00-7/00, G01N33/543, H01F1/00

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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 A	JP 2008-127454 A (Tokyo Institute of Technology), 05 June 2008 (05.06.2008), claims; paragraphs [0002], [0003], [0014], [0034] to [0036]; examples (Family: none)	3-6, 9-11 1, 2, 7, 8
A	JP 2007-308548 A (Yamaguchi University), 29 November 2007 (29.11.2007), entire text (Family: none)	1-11
A	JP 2001-126909 A (Tokushu Paper Mfg. Co., Ltd.), 11 May 2001 (11.05.2001), entire text (Family: none)	1-11

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
13 November, 2009 (13.11.09)

Date of mailing of the international search report
24 November, 2009 (24.11.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004476

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 1-103631 A (Soken Chemical & Engineering Co., Ltd.), 20 April 1989 (20.04.1989), entire text (Family: none)	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004476

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004476

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

The "technical feature" common to claims 1 to 11, that is, a "fluorescent molecule-containing polymer particle", is a well-known matter without citing the document.

The "technical feature" common to the invention of claim 1 and the inventions of claims 3 to 6, 10 and 11, the "technical feature" common to the inventions of claims 2, 7, and 8, and the "technical feature" common to the invention of claim 9 are different among each other, and, thus, a plurality of invention groups exist.

Accordingly, there is no technical relationship among these inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Thus, the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept.

The "technical feature" common to the invention of claim 1 and the invention of claim 3, that is, "fluorescent molecule-containing magnetic polymer particles comprising a covering polymer layer into which fluorescent molecules have been introduced", is stated in the following document 1 and is a publicly-known matter and thus is not a "special technical feature".

This is true for the invention of claim 1 and the invention of claim 9.

Document 1: JP 2008-127454 A (Tokyo Institute of Technology), 05 June 2008 (05.06.2008), claims, [0002], [0003], [0014], [0034] to [0036], and working examples

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C08J3/12(2006.01) i, G01N33/543(2006.01) i, H01F1/00(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. C08J3/00-28, D06P1/00-7/00, G01N33/543, H01F1/00

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	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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 A	JP 2008-127454 A (国立大学法人東京工業大学) 2008.06.05, 特許請求の範囲, 【0002】, 【0003】, 【0014】, 【0034】 ~ 【0036】, 実施例 (ファミリーなし)	3-6, 9-11 1, 2, 7, 8
A	JP 2007-308548 A (国立大学法人山口大学) 2007.11.29, 全文 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2001-126909 A (特種製紙株式会社) 2001.05.11, 全文 (ファミリーなし)	1-11

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 13.11.2009	国際調査報告の発送日 24.11.2009
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) 芦原 ゆりか 電話番号 03-3581-1101 内線 3457

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 1-103631 A (綜研化学株式会社) 1989.04.20, 全文 (ファミリーなし)	1-11

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

請求項1-11に共通する「技術的特徴」すなわち「蛍光分子含有ポリマー粒子」は、文献をあげるまでもなく周知事項である。

そして、請求項1に係る発明と、請求項3-6, 10, 11に係る発明において共通する「技術的特徴」、請求項2, 7, 8に係る発明において共通する「技術的特徴」、請求項9に係る発明において共通する「技術的特徴」は、それぞれ異なり、複数の発明群が把握されるものである。

したがって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

なお、請求項1に係る発明と請求項3に係る発明において共通する「技術的特徴」、すなわち、「被覆ポリマー層の内部に蛍光分子が導入された蛍光分子含有ポリマー磁性粒子」は、下記文献1に記載されるように公知事項であり、「特別な技術的特徴」ではない。

請求項1に係る発明と請求項9に係る発明についても同様である。

文献1: JP 2008-127454 A (国立大学法人東京工業大学) 2008. 06. 05, 特許請求の範囲, 【0002】, 【0003】, 【0014】, 【0034】 ~ 【0036】, 実施例