

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/122391

発行日 平成29年3月30日(2017.3.30)

(43) 国際公開日 平成27年8月20日(2015.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542	A
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

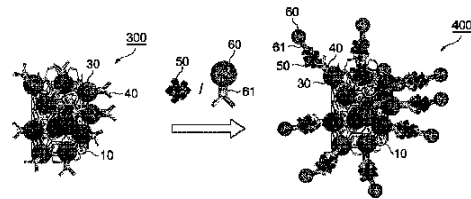
出願番号	特願2015-562818 (P2015-562818)	(71) 出願人	304023318 国立大学法人静岡大学 静岡県静岡市駿河区大谷836
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/053572	(71) 出願人	512190930 釜山大学校 大韓民国 プサングムジョングブサンデハ ンロ63 ボンギル2
(22) 国際出願日	平成27年2月10日(2015.2.10)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	特願2014-25431 (P2014-25431)	(74) 代理人	100124800 弁理士 諏澤 勇司
(32) 優先日	平成26年2月13日(2014.2.13)	(74) 代理人	100126653 弁理士 木元 克輔
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 量子ドット蛍光増強免疫測定法

(57) 【要約】

試料中の標的物質を検出する方法であって、試料及び標的物質を含まない陰性対照のそれぞれに、第1のプロープ及び第2のプロープを添加してインキュベーションするインキュベーション工程であって、第1のプロープは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、第2のプロープは、量子ドットに結合されている、工程と、インキュベーション工程後の試料及び陰性対照中の量子ドットの蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、試料中の量子ドットの蛍光強度が、陰性対照中の量子ドットの蛍光強度と比較して強い場合に、試料中に標的物質が存在すると判定する判定工程と、を含み、第1のプロープ及び第2のプロープは、上記標的物質と結合するが互いに結合せず、第1のプロープ及び第2のプロープが上記標的物質と結合することにより、上記金属ナノ粒子及び上記量子ドットが近接し、それにより上記量子ドットの蛍光強度が増強する、方法を提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中の標的物質を検出する方法であって、

試料及び標的物質を含まない陰性対照のそれぞれに、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブを添加してインキュベーションするインキュベーション工程であって、第 1 のプローブは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、第 2 のプローブは、量子ドットに結合されている、工程と、

インキュベーション工程後の試料及び陰性対照中の量子ドットの蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、

試料中の量子ドットの蛍光強度が、陰性対照中の量子ドットの蛍光強度と比較して強い場合に、試料中に標的物質が存在すると判定する判定工程と、

を含み、

第 1 のプローブ及び第 2 のプローブは、前記標的物質と結合するが互いに結合せず、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブが前記標的物質と結合することにより、前記金属ナノ粒子及び前記量子ドットが近接し、それにより前記量子ドットの蛍光強度が増強する、方法。

【請求項 2】

試料中の標的物質を定量する方法であって、

試料及び既知濃度の標的物質を含む複数の標準試料のそれぞれに、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブを添加してインキュベーションするインキュベーション工程であって、第 1 のプローブは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、第 2 のプローブは、量子ドットに結合されている、工程と、

インキュベーション工程後の試料及び複数の標準試料中の量子ドットの蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、

試料中の量子ドットの蛍光強度を、複数の標準試料中の量子ドットの蛍光強度と比較して、試料中の標的物質を定量する定量工程と、

を含み、

第 1 のプローブ及び第 2 のプローブは、前記標的物質と結合するが互いに結合せず、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブが前記標的物質と結合することにより、前記金属ナノ粒子及び前記量子ドットが近接し、それにより前記量子ドットの蛍光強度が増強する、方法。

【請求項 3】

前記金属ナノ粒子は、金平糖状金属ナノ粒子である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記金属ナノ粒子は、金ナノ粒子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記量子ドットは、可視光領域の蛍光を発するものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

第 1 のプローブ及び第 2 のプローブは、抗原、抗体、レクチン、糖、レセプター、リガンド、アプタマー又は核酸である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

試料中の標的物質の検出又は定量用キットであって、

第 1 のプローブ及び第 2 のプローブとを含み、

第 1 のプローブは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、

第 2 のプローブは、量子ドットに結合され、

第 1 のプローブ及び第 2 のプローブは、前記標的物質と結合するが互いに結合せず、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブが前記標的物質と結合することにより、前記金属ナノ粒子及び前記量子ドットが近接し、それにより前記量子ドットの蛍光強度が増強する、キット。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

前記金属ナノ粒子は、金平糖状金属ナノ粒子である、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

前記金属ナノ粒子は、金ナノ粒子である、請求項 7 又は 8 に記載のキット。

【請求項 10】

前記量子ドットは、可視光領域の蛍光を発するものである、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 11】

第 1 のプローブ及び第 2 のプローブは、抗原、抗体、レクチン、糖、レセプター、リガンド、アプタマー又は核酸である、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、量子ドット蛍光増強免疫測定法に関する。

【背景技術】

【0002】

最近、ナノ素材を用いた感染症の検出や診断に関する研究が多く行われている。特に、ナノ粒子の光学的特性、電気伝導性、蛍光特性及び磁性特性を利用し、標的細胞を検出又は診断する研究例が報告されている。例えば、金ナノ粒子に抗体を修飾させ、抗原の量に応じた金ナノ粒子凝集度の変化、これに伴う光学的特性の変化により抗原を検出する方法、また抗体を修飾した磁性ナノ粒子と金ナノ粒子を用いた磁気泳動、これに伴う金ナノ粒子の光学的特性の変化による結核の検出方法、疾病の相補的 DNA をナノ粒子の表面に修飾して標的 DNA とハイブリダイゼーションを誘導し、電子的信号の変化による疾病を診断する方法など、ナノ粒子を用いた疾病の検出又は診断する方法が報告されている。例えば、非特許文献 1 には、ガラス様炭素電極にカーボンナノチューブを担持させ、該カーボンナノチューブに CdTe 量子ドットを介してメチルパラチオン分解酵素を固定化させたデバイスを用いて、メチルパラチオンの検出が増強されることを報告している。

20

【0003】

一方、本発明者らは、これまでに金属ナノ粒子に量子ドットをコーティングする技術について報告している。具体的には、非特許文献 2 では、酸化鉄 Fe_3O_4 の表面を CdTe 量子ドットでコーティングした蛍光磁性ナノ粒子を、静電的相互作用を利用して抗体に結合させ、結腸癌のイメージングを行うことを報告している。また、非特許文献 3 では、銀ナノニードルを有するフィルムの表面を CdSe/ZnS 量子ドットでコーティングすると、量子ドットの蛍光が増強されることを報告している。さらに、非特許文献 4 では、突起を有する金ナノ粒子の表面を、抗体を固定化した CdTe 量子ドットでコーティングしたナノ複合体を用いて、抗ネオスポラ抗体を検出できることを報告している。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Du et al., Biosensors and Bioelectronics 25 (2010), 1370 - 1375.

40

【非特許文献 2】Ahmed et al., Journal of Nanobiotechnology 2013, 11, 28 - 36.

【非特許文献 3】Ahmed et al., Nanoscale Research Letters 2012, 7, 438 - 444.

【非特許文献 4】Zhou et al., Sensors and Actuators B 178 (2013), 192 - 199.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

50

より多様な方法で試料中の標的分子を検出又は定量できれば、検出感度の向上、検出精度の向上、従来不可能であった測定が可能となる等の利点が見られる可能性がある。そこで、本発明は、試料中の標的物質を検出又は定量する新たな方法及びキットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、試料中の標的物質を検出する方法であって、試料及び標的物質を含まない陰性対照のそれぞれに、第1のプローブ及び第2のプローブを添加してインキュベーションするインキュベーション工程であって、第1のプローブは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、第2のプローブは、量子ドットに結合されている、工程と、インキュベーション工程後の試料及び陰性対照中の量子ドットの蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、試料中の量子ドットの蛍光強度が、陰性対照中の量子ドットの蛍光強度と比較して強い場合に、試料中に標的物質が存在すると判定する判定工程と、を含み、第1のプローブ及び第2のプローブは、上記標的物質と結合するが互いに結合せず、第1のプローブ及び第2のプローブが上記標的物質と結合することにより、上記金属ナノ粒子及び前記量子ドットが近接し、それにより上記量子ドットの蛍光強度が増強する方法を提供する。

10

【0007】

本発明により、試料中の標的物質を検出する新たな方法を提供することができる。この方法は、金属ナノ粒子及び量子ドットが近接すると、量子ドットの蛍光強度が増強するという現象を利用するものである。試料中の標的物質と、第1のプローブを固定化した金属ナノ粒子及び第2のプローブを固定化した量子ドットとが結合することにより、金属ナノ粒子及び量子ドットが互いに近接し、量子ドットの蛍光強度が増強する。この蛍光強度の増強に基づいて試料中の標的物質を検出することができる。また、本発明の方法によれば、従来のELISA法では必要な工程である洗浄工程を行うことなく、試料中の標的物質を検出することができる。このため、簡便に標的物質を検出することができる。また、洗浄工程による標的物質の検出感度の低下を防止することができる。

20

【0008】

本発明はまた、試料中の標的物質を定量する方法であって、試料及び既知濃度の標的物質を含む複数の標準試料のそれぞれに、第1のプローブ及び第2のプローブを添加してインキュベーションするインキュベーション工程であって、第1のプローブは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、第2のプローブは、量子ドットに結合されている、工程と、インキュベーション工程後の試料及び複数の標準試料中の量子ドットの蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、試料中の量子ドットの蛍光強度を、複数の標準試料中の量子ドットの蛍光強度と比較して、試料中の標的物質を定量する定量工程と、を含み、第1のプローブ及び第2のプローブは、上記標的物質と結合するが互いに結合せず、第1のプローブ及び第2のプローブが上記標的物質と結合することにより、上記金属ナノ粒子及び前記量子ドットが近接し、それにより上記量子ドットの蛍光強度が増強する方法を提供する。

30

【0009】

本発明により、試料中の標的物質を定量する新たな方法を提供することができる。また、本発明の方法によれば、洗浄工程を必要とせずに、試料中の標的物質を定量することができるため、簡便に標的物質を定量することができる。

40

【0010】

本発明はまた、試料中の標的物質の検出又は定量用キットであって、第1のプローブ及び第2のプローブを含み、第1のプローブは、カーボンナノチューブに固定された金属ナノ粒子に結合され、第2のプローブは、量子ドットに結合され、第1のプローブ及び第2のプローブは、標的物質と結合するが互いに結合せず、第1のプローブ及び第2のプローブが標的物質と結合することにより、金属ナノ粒子及び量子ドットが近接し、それにより量子ドットの蛍光強度が増強する、キットを提供する。

50

【0011】

本発明のキットによれば、新たな原理に基づいて、標的物質を簡便に検出することができる。

【0012】

上記金属ナノ粒子は、金平糖状金属ナノ粒子であることが好ましい。

【0013】

金平糖状金属ナノ粒子を用いることにより、標的物質の検出感度を高めることができ、より正確に標的物質を定量することができる。

【0014】

上記金属ナノ粒子は、金ナノ粒子であることが好ましい。金ナノ粒子は、量子ドットの蛍光強度を効率よく増強することができる。

10

【0015】

上記量子ドットは、可視光領域の蛍光を発するものであってもよい。これにより、量子ドットの蛍光強度の増強を、肉眼で確認することができ、標的物質を容易に検出又は定量することができる。

【0016】

第1のプロブ及び第2のプロブは、抗原、抗体、レクチン、糖、レセプター、リガンド、アプタマー又は核酸であることが好ましい。

【0017】

第1のプロブ及び第2のプロブがこのようなものであれば、抗原、抗体、レクチン、糖、レセプター、リガンド、アプタマー又は核酸に結合可能な標的物質を検出又は定量することができる。

20

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、洗浄工程を必要としない、試料中の標的物質を検出又は定量する新たな方法及びキットを提供することができる。

【0019】

また、本発明の方法及びキットによれば、カーボンナノチューブに、第1のプロブを固定化した金属ナノ粒子が固定化されており、さらに該金属ナノ粒子は標的物質を介して第2のプロブを固定化した量子ドットと結合することにより、カーボンナノチューブを中心に3次元的に配置された複合体を形成する。該複合体を形成することにより、金属ナノ粒子及び量子ドットが互いにより近接することができ、量子ドットの蛍光強度がさらに増強される。また、カーボンナノチューブの表面において、複数の金属ナノ粒子及び量子ドットが互いに近接することにより、量子ドットの蛍光強度がさらに増強される。すなわち、標的物質の有無の差によって生じる蛍光強度の差がより顕著となり、従来を検出方法よりもさらに簡便かつ高感度で標的物質を検出することが可能となる。

30

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】第1のプロブ固定化カーボンナノチューブの作製方法の一実施形態を示す模式図である。

40

【図2】試料中の標的物質を検出する方法の一実施形態を説明する模式図である。

【図3】実施例1で得られたAuCNT及びカーボンナノチューブの紫外/可視光スペクトルである。

【図4】実施例1で得られたAuCNT及びカーボンナノチューブのX線回折パターンである。

【図5】実施例1で得られたAuCNT（図5B及び図5C）及びカーボンナノチューブ（図5A）の透過型電子顕微鏡像を示す写真である。

【図6】システアミンで処理されたAuCNTの赤外吸収スペクトルである。

【図7】抗HA抗体固定化AuCNT及び抗NA抗体固定化AuCNTのELISA解析の結果を示すグラフである。

50

【図 8】実施例 1 で得られた複合体の共焦点レーザー顕微鏡像（図 8 A）及び微分干渉顕微鏡像（図 8 B）を示す写真であり、図 8 C はこれらの像を重ねた写真である。

【図 9】実施例 1 で得られた抗 H A 抗体固定化 A u C N T 及び抗 H A 抗体固定化 C d T e を用いた複体の蛍光強度を示すグラフである。

【図 10】実施例 2 で得られた抗 N A 抗体固定化 A u C N T 及び抗 H A 抗体固定化 C d T e を用いた複体の蛍光強度を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

（原理）

量子ドットは数十 nm 以下の半導体結晶であり、励起光を照射すると蛍光を発する。本発明の検出方法及び定量方法は、金属ナノ粒子及び量子ドットが近接すると、量子ドットの蛍光強度が増強するという現象を利用するものである。

10

【0022】

本実施形態に係る試料中の標的物質を検出する方法は、試料及び標的物質を含まない陰性対照のそれぞれに、第 1 のプローブ及び量子ドットに固定化した第 2 のプローブを添加してインキュベーションするインキュベーション工程と、インキュベーション工程後の試料及び陰性対照中の量子ドットの蛍光強度を測定する蛍光測定工程と、試料中の量子ドットの蛍光強度が、陰性対照中の量子ドットの蛍光強度と比較して強い場合に、試料中に標的物質が存在すると判定する判定工程とを含む。

20

【0023】

（第 1 のプローブ固定化カーボンナノチューブの作製方法）

図 1 は、カーボンナノチューブに金属ナノ粒子を固定化させ、さらに該金属ナノ粒子に第 1 のプローブを固定化させる方法の一実施形態を示す模式図である。試料中の標的物質を検出する方法の一実施形態を説明する模式図である。本実施形態では、カーボンナノチューブ 10 を金属イオン 20 で処理して、金属イオン処理カーボンナノチューブ 100 を得た後に、還元剤による処理を行うことで、カーボンナノチューブ 10 の表面に金属ナノ粒子 30 を形成し、金属ナノ粒子 30 を固定化したカーボンナノチューブ 200 を得る。さらに、金属ナノ粒子 30 の表面に第 1 のプローブ 40 を固定化し、第 1 のプローブ固定化カーボンナノチューブ 300 を得る。また、同様の操作によって、量子ドット 60 の表面に第 2 のプローブ 61 を固定化する。

30

【0024】

（試料中の標的物質を検出する方法）

図 2 は、試料中の標的物質を検出する方法の一実施形態を説明する模式図である。上記方法によって得られた第 1 のプローブ固定化カーボンナノチューブ 300 及び第 2 のプローブ 61 を固定化した量子ドット 60 を、標的物質 50 を含む試料に添加することにより、第 1 のプローブ 40、標的物質 50 及び第 2 のプローブ 61 の順に結合した複合体 400 を形成させる。上記複合体 400 を形成させることにより、第 1 のプローブ 40 に結合した金属ナノ粒子 30 と、第 2 のプローブ 61 に結合した量子ドット 60 が互いに近接し、量子ドット 60 の蛍光強度が増強される。一方、試料に代えて、標的物質 50 を含まない陰性対照を用いた場合の量子ドット 60 の蛍光強度と比較することにより、試料中の標的物質 50 の存在をより簡便に検出することができる。

40

【0025】

（標的物質及びプローブ）

本実施形態の方法では、標的物質として、抗原 - 抗体、レクチン - 糖、レセプター - リガンド、アプタマー - アプタマーの標的物質、核酸 - 核酸等の、互いに特異的に結合する物質の組の一方を用い、他方をプローブとして用いることができる。より具体的には、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、化学物質、ホルモン、ウイルス、糖等を標的物質又はプローブに用いることができる。

【0026】

ここで、第 1 のプローブ及び第 2 のプローブは、標的物質と結合するが互いに結合しな

50

いものを選択する。第1のプローブと第2のプローブが直接結合してしまうと、標的物質の存在の有無に関係なく金属ナノ粒子と量子ドットが近接してしまい、誤検出や誤判定の原因となる。例えば、標的物質がある抗原に特異的に結合する抗体である場合、第1のプローブ及び第2のプローブとしては、例えば、標的物質（抗体）が結合する抗原、及び、標的物質（抗体）に結合する2次抗体を組み合わせて使用することができる。これらは、いずれが第1のプローブであっても第2のプローブであってもよい。また、例えば、標的物質が抗原である場合、第1のプローブ及び第2のプローブとしては、標的物質（抗原）上のそれぞれ異なるエピトープに結合する2種類の抗体を使用してもよい。また、例えば、標的物質が抗原であり、抗原が近接して複数存在する場合、第1のプローブ及び第2のプローブとしては、標的物質（抗原）上の同一のエピトープに結合する抗体を使用してもよい。ここで、抗原が近接して複数存在する場合とは、例えば、抗原が多量体を形成している場合や、標的物質がウイルス、微生物、細胞等の表面に複数存在する抗原である場合が挙げられる。つまり、標的物質、第1のプローブ及び第2のプローブが結合することにより、金属ナノ粒子と量子ドットが近接することができる限り、第1のプローブ及び第2のプローブの組み合わせに制限はない。

10

【0027】

検出対象となる標的物質は、液体中に存在していてもよく、固体、粉末、流動体、気体等の試料中に存在していてもよい。本実施形態に係る、試料中の標的物質を検出する方法は、液体中で実施することが好ましい。このため、試料が液体以外である場合には、適切なバッファー等に試料を溶解又は懸濁し、液体にすることが好ましい。

20

【0028】

(カーボンナノチューブ)

本発明の第1のプローブは、カーボンナノチューブに固定化された金属ナノ粒子の表面に固定化される。本発明に用いるカーボンナノチューブには、単層カーボンナノチューブ、二層カーボンナノチューブ、多層(Multi-walled)カーボンナノチューブ等を用いることができる。カーボンナノチューブに金属ナノ粒子を固定化することにより、カーボンナノチューブを構成するベンゼン環に存在する電子の効果により、蛍光がより増強される。

【0029】

(金属ナノ粒子)

金属ナノ粒子としては、ナノオーダーの粒径を有する金、銀等のプラズモン現象を有する金属の粒子が挙げられる。なかでも、量子ドットの蛍光を増強させる効果が大きいことから、金属ナノ粒子は、金の粒子であることが好ましい。プラズモン現象とは、金属中の自由電子が集団的に振動して擬似的な粒子として振る舞う現象を意味する。

30

【0030】

金属ナノ粒子の調製方法は特に制限されない。例えば、金ナノ粒子は、塩化金酸(HAuCl_4)をクエン酸とタンニン酸で還元して調製することができ、塩化金酸(HAuCl_4)を没食子酸(Gallic acid)とイソフラボンで還元して調製することもできる。また、銀ナノ粒子は、硝酸銀水溶液をクエン酸等で還元することにより調製することができる。

40

【0031】

(金平糖状金属ナノ粒子)

金平糖状金属ナノ粒子とは、表面に金平糖状の凹凸を有する金属ナノ粒子であり、海胆状(urchin-like)金属ナノ粒子ともいう。表面に凹凸を有するか否かは、例えば、透過型電子顕微鏡(TEM)で観察することにより確認することができる。通常金属ナノ粒子(表面が滑らかな金属ナノ粒子)がほぼ球状であるのに対し、金平糖状金属ナノ粒子は、金平糖又は海胆のような形状である。金平糖状金属ナノ粒子は、例えば、10mLの10mM HEPES緩衝液(pH7.4)に250 μ Lの20mM塩化金酸溶液を添加した後、溶液の色が黄色から濁った青に変わるまで室温で30分間静置することにより調製することができる。

50

【0032】

(量子ドット)

量子ドットとは、直径が2～10nm程度の量子井戸構造を有するナノ結晶である。量子ドットには、コア構造のみのもものと、コア/シェル構造のものが知られている。前者の例としては、CdS、CdSe、CdTe、CdSeTe等のCd系量子ドット；PbS、PbSe等のPb系量子ドット；ZnSe、ZnTe等のZn系量子ドット等が知られている。後者の例としてはCdSe/ZnS、CdSe/CdS/ZnS、CdSe/ZnSe/ZnS、GaAs/AlGaAs等の量子ドットが知られている。本実施形態においては、これらのいずれの量子ドットも使用することができる。

【0033】

量子ドットの蛍光波長は、量子ドットの粒径に依存する。例えば、CdSe量子ドットでは、粒径を3～5nmに変化させることによって青緑から赤まで(波長500～650nm)の蛍光を発生させることができる。一般に、量子ドットの粒径は、合成反応の反応時間、合成に用いる有機金属化合物の熱分解反応の温度等により制御することができる。

【0034】

また、量子ドットの蛍光波長は、量子ドットの材料の半導体の種類にも依存する。ZnSe、CdS、CdSe、CdSeTe、PbS、PbSe等の半導体により、可視から近赤外(波長400～2000nm)の蛍光を発する量子ドットを合成することができる。

【0035】

量子ドットの合成法には、主にトップダウン法とボトムアップ法の2種類が存在する。トップダウン法においては、半導体基板に電子ビームリソグラフィーや分子線エピタキシー法等を用いて量子ドットを合成する。ボトムアップ法においては、液相で化学合成する。また、液相での化学合成には、主に水溶液中で合成するものと有機溶媒中で合成する方法の2種類が存在する。

【0036】

水溶液中での合成では、例えば、チオール系化合物を保護剤として、カドミウム塩の水溶液にテルル化水素ナトリウム等を反応させることによってCdTe量子ドットを合成することができる。

【0037】

有機溶媒中での合成では、例えば、配位性有機化合物であるトリオクチルフォスフィン(TOP)やトリオクチルフォスフィンオキシド(TOPO)を溶媒として、ジメチルカドミウム及びS、Se、TeのTOP錯体あるいは有機金属化合物を約300℃で熱分解し、量子ドットを合成することができる。

【0038】

本実施形態においては、これらのいずれの方法で合成された量子ドットも使用することができる。

【0039】

(金属ナノ粒子及び量子ドットへのプローブの固定方法)

金属ナノ粒子及び量子ドットへのプローブの固定方法は特に限定されないが、例えば、金属ナノ粒子又は量子ドットの表面にアミノ基、カルボキシ基、チオール基等の官能基を導入し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)等の化学架橋剤を用いてプローブを固定することができる。金属ナノ粒子又は量子ドットの表面に官能基を導入する方法としては、例えば、金属ナノ粒子又は量子ドットを、8-メルカプトオクタン酸、システアミン等の両親媒性のチオール化合物と反応させる方法等が挙げられる。金属ナノ粒子又は量子ドットの表面に官能基を導入する際、8-メルカプトオクタン酸を用いるとカルボキシ基を導入することができ、システアミンを用いるとアミノ基を導入することができる。本発明に使用するプローブの種類に基づいて、カルボキシ基、アミノ基、チオ

10

20

30

40

50

ール基等の官能基を適宜選択することができる。

【0040】

(インキュベーション工程)

インキュベーション工程では、試料及び標的物質を含まない陰性対照のそれぞれに、第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300及び第2のプローブ61を固定化した量子ドット60を添加してインキュベーションする。この工程により、試料中に標的物質が存在する場合には、標的物質、第1のプローブ及び第2のプローブが結合し、金属ナノ粒子及び量子ドットが近接する。金属ナノ粒子及び量子ドットの量は適宜設定すればよい。インキュベーション温度は、標的物質やプローブに応じて適宜選択できる。インキュベーション時間は、標的物質、第1のプローブ及び第2のプローブの結合が平衡に達するのに要する時間に設定すればよく、例えば1時間である。

10

【0041】

(蛍光測定工程)

蛍光測定工程では、インキュベーション工程後の試料及び陰性対照中の量子ドットの蛍光強度を測定する。測定には、分光蛍光光度計等の一般的な蛍光測定機器を用いることができる。より具体的には、インキュベーション工程後の試料及び陰性対照に対して、量子ドットの励起光を照射し、発生する蛍光強度を測定すればよい。

【0042】

例えば、量子ドットとして可視光領域の蛍光を発するものを使用した場合、励起光照射装置があれば、蛍光測定機器を使わなくても、肉眼で観察することにより、蛍光を検出することも可能である。これにより、標的物質の検出が必要な現場において、標的物質の存在をその場で検出することが容易になる。

20

【0043】

(判定工程)

判定工程では、蛍光測定工程において測定された蛍光強度に基づいて、試料中に標的物質が存在するか否かを判定する。具体的には、試料中の量子ドットの蛍光強度が、陰性対照中の量子ドットの蛍光強度と比較して強い場合に、試料中に標的物質が存在すると判定する。また、上記したように、量子ドットとして可視光領域の蛍光を発するものを使用した場合には、蛍光測定機器を使わなくても肉眼で観察することにより、蛍光を検出することも可能である。そして、肉眼で蛍光強度の増強に基づいて、標的物質の存在又は不存在を判定することができる。

30

【0044】

(試料中の標的物質を定量する方法)

試料中の標的物質を定量する方法は、基本的には試料中の標的物質50を検出する方法と同様であり、試料と共に既知濃度の標的物質50を含む複数の標準試料を用いる点異なる。具体的には、試料及び既知濃度の標的物質50を含む複数の標準試料のそれぞれに第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300及び第2のプローブ61を固定化した量子ドット60を添加して、上記と同様のインキュベーション工程及び蛍光測定工程を行う。続いて、次に説明する定量工程を行う。

【0045】

(定量工程)

定量工程では、試料中の量子ドットの蛍光強度を、複数の標準試料中の量子ドットの蛍光強度と比較することにより、試料中の標的物質の存在量を求める。例えば、複数の標準試料中の量子ドットの蛍光強度をもとに検量線を作成し、試料中の量子ドットの蛍光強度をこの検量線に当てはめることにより、試料中の標的物質の濃度を求めることができる。

40

【0046】

(キット)

一実施形態において、試料中の標的物質の検出又は定量用キットは、第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300、及び、第2のプローブ61を固定化した量子ドット60を含む。上記第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300、及び、上記第2のプ

50

ローブ61を固定化した量子ドット60は、溶液又は懸濁液の状態で供給されてもよいし、乾燥状態で供給され、使用時にバッファーに溶解又は懸濁させるものであってもよい。上記第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300及び上記第2のプローブ61を固定化した量子ドット60を用いて、上記のインキュベーション工程、蛍光検出工程、判定工程及び定量工程を実施することにより、試料中の標的物質を検出又は定量することができる。

【0047】

別の実施形態に係る、試料中の標的物質の検出又は定量用キットにおいて、上記第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300、及び、第2のプローブ61を固定化した量子ドット60は、例えば、ろ紙などの媒体中に染みこませた状態で供給されてもよい。媒体は、使用に適した形状及びサイズに適宜調整されてよく、例えば短冊状であってよい。キットの使用時には、試料及び標的物質を含まない陰性対照を、第1のプローブ固定化カーボンナノチューブ300及び第2のプローブ61を固定化した量子ドット60が存在する媒体に滴下する。これにより、試料中に標的物質50が存在する場合には、媒体中で標的物質、第1のプローブ及び第2のプローブが結合し、金属ナノ粒子及び量子ドットが近接する。蛍光検出工程において、媒体に励起光を照射することにより、量子ドットから蛍光が発生する。本実施形態のキットは、特に、標的物質の迅速な検出が必要な現場での簡易検出に適している。

10

【実施例】

【0048】

以下、実施例を用いて、本発明について説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

20

【0049】

実施例では、本発明の方法の一例として、金ナノ粒子で表面処理したカーボンナノチューブ(AuCNT)とCdTe蛍光量子ドット(CdTe)を用いて、標的物質であるインフルエンザウイルスを検出する方法について説明する。

【0050】

(AuCNTの作製)

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.01mmol、Sigma-Aldrich社製)と酸処理した多層カーボンナノチューブ(2mg、Sigma-Aldrich社製)を蒸留水(30mL)に入れ、30分間超音波処理によって分散し、CNT溶液を得た。得られたCNT溶液(600 μL)を、没食子酸(0.01M、Sigma-Aldrich社製)とイソフラボン(10mg、韓国産豆から直接抽出したもの)の混合液(10mL)に入れて1時間激しく攪拌した。攪拌後、13,000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄みを除去し、粉末状態のAuCNTを得た。

30

【0051】

(実施例1)

1. 抗HA抗体固定化AuCNTの作製

得られたAuCNT(1mg)を蒸留水(10mL)に入れ、5分間超音波処理によって分散し、AuCNT溶液を得た。金ナノ粒子の表面にアミノ基を導入するため、システムアミン(0.01M、1mL)をAuCNT溶液に添加し、30分間攪拌してから13,000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄みを除去し、アミン処理したAuCNTを得た。一方、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC; 100 μL 、10mM、Sigma-Aldrich社製)とN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS; 100 μL 、10mM、Sigma-Aldrich社製)に、抗ヘマグルチニン(HA)抗体(1 μL 、Ab66189、Abcam社製)を入れ、30分間反応し、抗体溶液を得た。得られた抗体溶液にアミン処理したAuCNT(1mg/mL、30 μL)を混合し、3時間反応を行った。

40

【0052】

2. 抗HA抗体固定化CdTeの作製

50

抗HA抗体固定化AuCNTの作製と同様の操作によって、CdTeの表面に抗HA抗体(Ab66189、Abcam社製)を固定化させた。

【0053】

3. 抗原-抗体反応によるインフルエンザウイルスの検出

抗HA抗体固定化AuCNT及び抗HA抗体固定化CdTeを混合した後、96ウエルプレートに加え、インフルエンザウイルス(A/Beijing/262/95、H1N1型、Sino Biological Inc社製)を添加後、1時間反応を行った。励起波長380nm、発光波長518nmで蛍光強度を測定した。

【0054】

(実施例2)

1. 抗NA抗体固定化AuCNTの作製

得られたAuCNT(1mg)を蒸留水(10mL)に入れ、5分間超音波処理によって分散し、AuCNT溶液を得た。金ナノ粒子の表面にアミノ基を導入するため、システアミン(0.01M、1mL)をAuCNT溶液に添加し、30分間攪拌してから13,000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄みを除去し、アミン処理したAuCNTを得た。一方、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC; 100 μ L、10mM、Sigma-Aldrich社製)とN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS; 100 μ L、10mM、Sigma-Aldrich社製)に、抗ノイラミニダーゼ(NA)抗体(1 μ L、A/New Caledonia/20/1999、H1N1型、Cosmo bio社製)を入れ、30分間反応し、抗体溶液を得た。得られた抗体溶液にアミン処理したAuCNT(1mg/mL、30 μ L)を混合し、3時間反応を行った。

【0055】

2. 抗HA抗体固定化CdTeの作製

抗NA抗体固定化AuCNTの作製と同様の操作によって、CdTeの表面に抗HA抗体(Ab66189、Abcam社製)を固定化させた。

【0056】

3. 抗原-抗体反応によるインフルエンザウイルスの検出

抗NA抗体固定化AuCNT及び抗HA抗体固定化CdTeを混合した後、96ウエルプレートに加え、インフルエンザウイルス(A/New Caledonia/20/99 IvR116、H1N1型、Sino Biological Inc社製)を添加後、1時間反応を行った。励起波長380nm、発光波長518nmで蛍光強度を測定した。

【0057】

(紫外可視光スペクトル解析)

紫外可視分光光度計(infinite F500、TECAN社製)を用いて、AuCNTの吸光度を測定した結果を図3に示す。なお、図3において、横軸は波長(nm)を示し、縦軸は吸光度を示す。図3に示すように、実施例1で得られたAuCNTは、約550nmの波長において金ナノ粒子表面プラズモン共鳴による吸光ピークが観測された。また、カーボンナノチューブ(CNT)を用いて同様に吸光度を測定すると、約550nmの波長における吸光ピークは観測されなかった。

【0058】

(粉末X線回折パターン)

粉末X線回折装置(RINT ULTIMA、Rigaku社製)を用いて、AuCNTのX線回折パターンを測定した結果を図4に示す。なお、図4において、横軸は2 θ を示し、縦軸は強度を示す。図4に示すように、カーボンナノチューブ(CNT)では、(002)面だけのパターンが観測されたが、実施例1で得られたAuCNTでは、金ナノ粒子による多様な回折パターンが観測された。特に、炭素は金に比べて結晶性が低いので、回折パターンの強度が弱いことが確認できた。

【0059】

10

20

30

40

50

(透過型電子顕微鏡による観察)

透過型電子顕微鏡(JEM-2100F、JEOL社製)を用いて、カーボンナノチューブ(CNT)及びAuCNTを観察した結果を図5A、図5B及び図5Cに示す。カーボンナノチューブの場合は、図5Aに示すように、直径180~200nm、長さ数マイクロメートルの透明なチューブ構造を示す像が得られた。一方、AuCNTの場合は、図5B及び図5Cに示すように、透明なチューブに直径10~100nmの黒色の粒子が固定されている像が得られた。さらに高い拡大倍率の像によれば、図5Bに示された黒色の粒子は、複数の金ナノ粒子の凝集体であり、個々の金ナノ粒子の粒子径は10~20nmであった。図5Cに示すAuCNTでは、図5Bに示すAuCNTと比較して、より小さな金ナノ粒子がカーボンナノチューブに数多く固定化されていた。

10

【0060】

(赤外吸収スペクトル解析)

実施例1で得られたアミン処理したAuCNTについて、赤外吸収スペクトルを測定した結果を図6に示す。なお、図6において、横軸は吸収率(%)を示し、縦軸は波数(cm^{-1})を示す。図6に示すように、波数1450~1580 cm^{-1} 付近において、カーボンナノチューブを構成するベンゼン環(C_6H_6)の炭素-炭素二重結合の伸縮振動エネルギーを示す赤外吸収ピークが観測された。また、波数3400~3500 cm^{-1} 付近において、NH振動エネルギーを示す赤外吸収ピークが観測された。なお、実施例1では、金ナノ粒子を固定化したカーボンナノチューブとシステアミンとの反応により、システアミンのチオール基が金ナノ粒子表面に結合し、カーボンナノチューブに金ナノ粒子を介してアミノ基が導入される。

20

【0061】

(ELISA解析)

実施例1で得られた抗HA抗体固定化AuCNTと抗HA抗体を固定化していないAuCNTとを用いて、それぞれELISA解析を行った。結果を図7Aに示す。抗HA抗体固定化AuCNT(HA Ab/AuCNT)の吸光度は、抗HA抗体を固定化していないAuCNTの吸光度と比較して約4倍であり、抗HA抗体の抗原特異性が確認できた。また、抗原を添加しない場合、吸光度は検出できなかった。また、実施例2で得られた抗NA抗体固定化AuCNTを用いて、同様にELISA解析を行った。結果を図7Bに示す。抗NA抗体固定化AuCNTの場合(NA Ab/AuCNT)も、抗NA抗体の抗原特異性が確認できた。

30

【0062】

また、実施例1で得られた抗HA抗体固定化AuCNT及び抗HA抗体固定化CdTeに、標的物質としてインフルエンザウイルス(A/Beijing/262/95、H1N1型、Sino Biological Inc社製)を添加して振盪させた後に、共焦点レーザー顕微鏡(LSM700、Carl Zeiss マイクロスコピー GmbH社製)及び微分干渉顕微鏡(DIC)を用いて抗HA抗体固定化AuCNTを観察した。共焦点レーザー顕微鏡で得られた像を図8Aに、微分干渉顕微鏡で得られた像を図8Bに示し、これらの像を重ねたものを図8Cに示す。図8Cに示すように、AuCNTに固定化された抗HA抗体とインフルエンザウイルスの抗原-抗体反応、及び、CdTeに固定化された抗HA抗体とインフルエンザウイルスの抗原-抗体反応が進行することにより、CdTeがAuCNTの表面に集積し、CdTeが蛍光を呈していた。

40

【0063】

次に、上記方法にしたがい、インフルエンザウイルス(A/Beijing/262/95、H1N1型、Sino Biological Inc社製)の最終濃度(ウイルス濃度)を 10^{-3} ng/mL (1 pg/mL) ~ 10^3 ng/mL ($1 \text{ }\mu\text{g/mL}$)の範囲で変化させ、実施例1で得られた複合体のCdTeの蛍光強度(PL強度)を測定した。横軸にウイルス濃度、縦軸に蛍光強度をプロットすると、図9に示すように、インフルエンザウイルスの濃度が 1 ng/mL ~ $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ の範囲では、ウイルス濃度の増加に伴いCdTeの蛍光強度が上昇した。なお、このときの蛍光の検出限界(下限値)は1

50

ng/mLであった。

【0064】

さらに、実施例2で得られた抗NA抗体固定化AuCNT及び抗HA抗体固定化CdTeと、標的物質としてインフルエンザウイルス(A/New Caledonia/20/99IVR116、H1N1型、Sino Biological Inc社製)とを用いて、同様に、ウイルス濃度を 10^{-4} ng/mL (0.1 pg/mL) ~ 10 ng/mLの範囲で変化させ、実施例2で得られた複合体のCdTeの蛍光強度(PL強度)を測定した。横軸にウイルス濃度、縦軸に蛍光強度をプロットすると、図10に示すように、相関係数0.98以上の検量線が得られた。実施例2は、AuCNTに固定化した抗体とCdTeに固定化した抗体とが異なるため、さらに高感度でウイルスを検出できた。なお、このときの蛍光の検出限界(下限値)は0.1 pg/mLであった。

10

【0065】

したがって、本発明の検出方法によれば、標的物質の検出を簡便かつ非常に高感度に行うことができる。また、標的物質の濃度依存的に量子ドットの蛍光強度が上昇し、標的物質の濃度が0.1 pg/mLであっても、標的物質を検出することが可能である。さらに、従来の金属膜で行う検出方法と比較して、本発明の検出方法は、カーボンナノチューブを中心とした複合体を形成することによって、標的物質の有無による蛍光強度の差が大きくなり、標的物質の有無を判定することが極めて容易である。

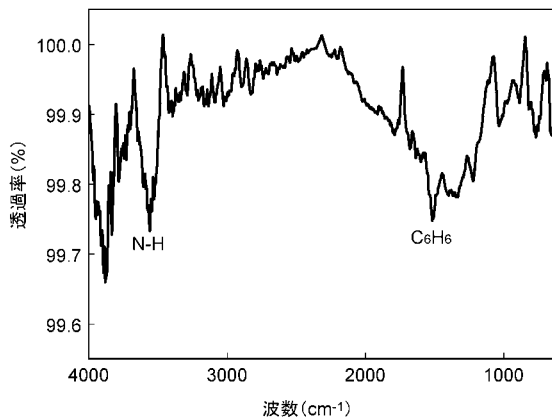
【符号の説明】

【0066】

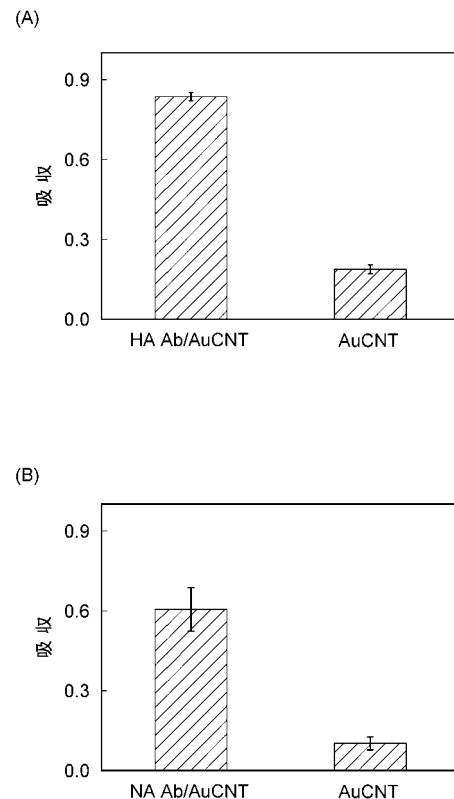
10...カーボンナノチューブ、20...金属イオン、30...金属ナノ粒子、40...第1のプロープ、50...標的物質、60...量子ドット、61...第2のプロープ、100...金属イオン処理カーボンナノチューブ、200...金属ナノ粒子を固定化したカーボンナノチューブ、300...第1のプロープ固定化カーボンナノチューブ、400...複合体。

20

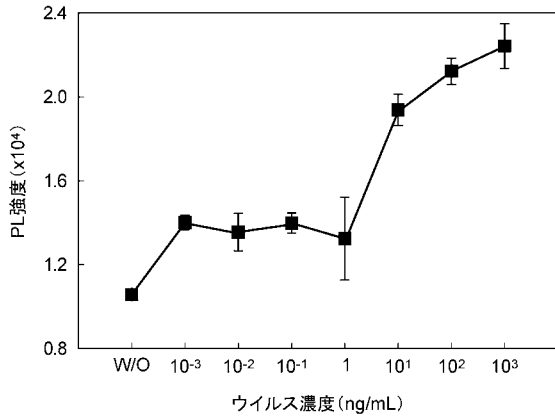
【図6】



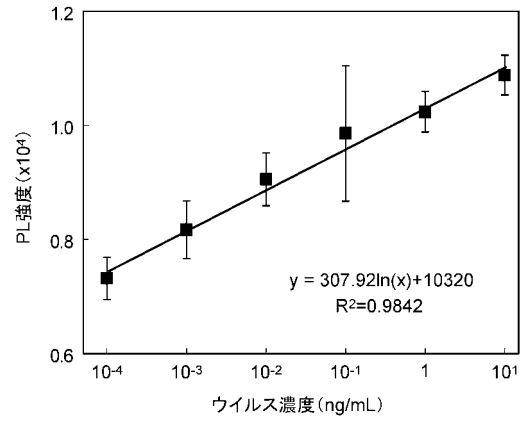
【図7】



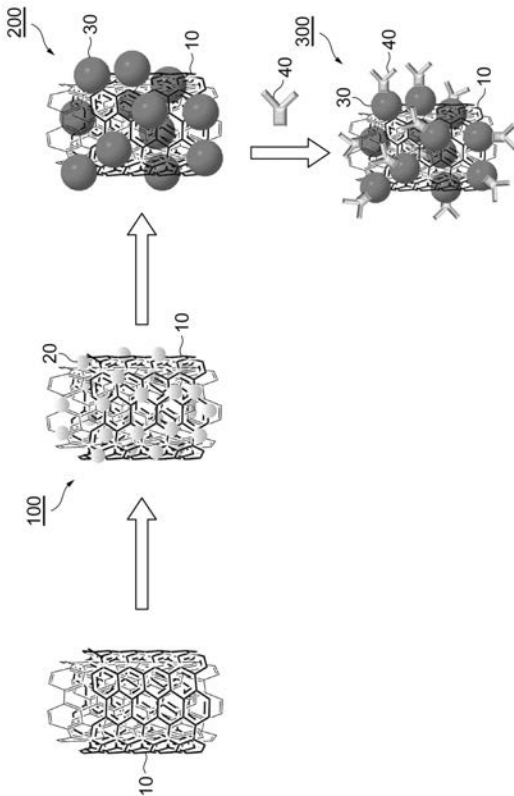
【 図 9 】



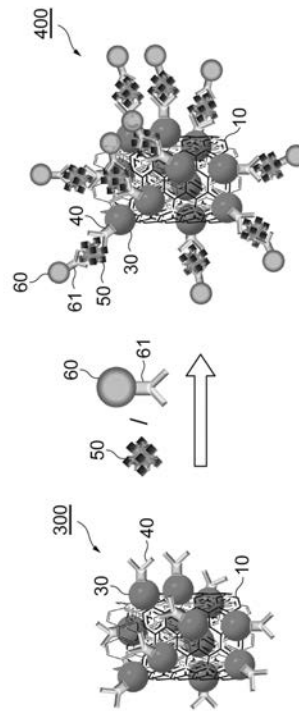
【 図 10 】



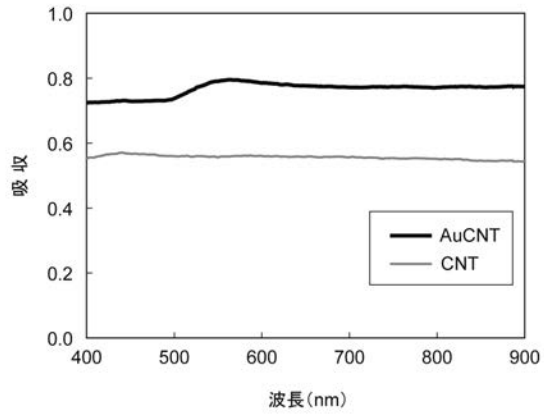
【 図 1 】



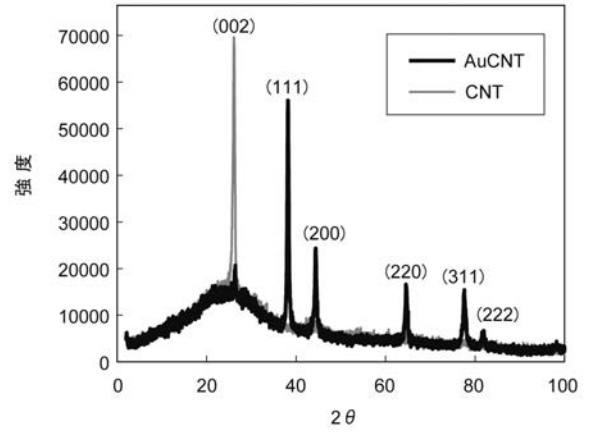
【 図 2 】



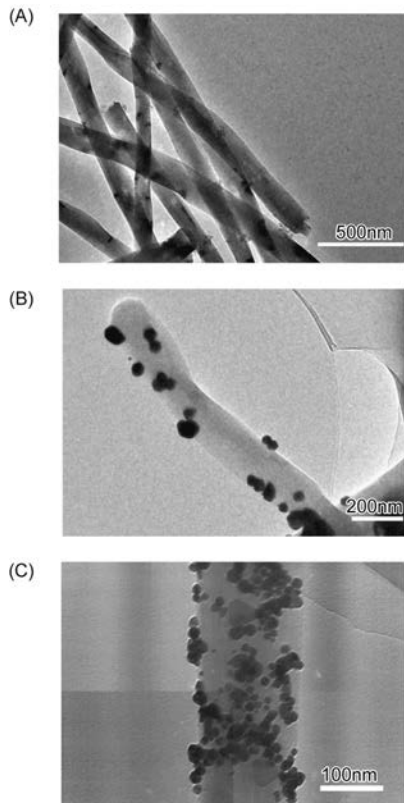
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/053572
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/553(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, G01N21/64, G01N33/553 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-21016 A (National University Corporation Shizuoka University), 03 February 2014 (03.02.2014), claims & WO 2014/014309 A1	1-11
A	JP 2007-234962 A (Fujitsu Ltd.), 13 September 2007 (13.09.2007), claim 1; paragraph [0032], fig. 6 (Family: none)	1-11
A	JP 2003-322653 A (Toshiba Corp.), 14 November 2003 (14.11.2003), claims 1, 4, 6, 7 (Family: none)	1-11
<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 "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 22 April 2015 (22.04.15)		Date of mailing of the international search report 12 May 2015 (12.05.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/053572

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0178640 A1 (Strano et al.), 12 July 2012 (12.07.2012), fig. 1, 3 & WO 2012/030961 A2	1-11
A	US 2009/0004117 A1 (Rao et al.), 01 January 2009 (01.01.2009), scheme 1 & WO 2007/081716 A2 & EP 1969374 A1 & CA 2635747 A1	1-11
A	Du, D., Covalent coupling of organophosphorus hydrolase loaded quantum dots to carbon nanotube/Au nanocomposite for enhanced detection of methyl parathion, Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25, 1370-1375	1-11
A	Guifen Jie, Electrochemiluminescence immunosensor based on nanocomposite film of CdS quantum dots-carbon nanotubes combined with gold nanoparticles-chitosan, Electrochemistry Communications, 2010, 12, 22-26	1-11
P,X	Lee, J., A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus, Biosensors and Bioelectronics, 64, 2014.09.16, 311-317	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 3 5 7 2	
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, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/553(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, G01N21/64, 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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
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	
A	JP 2014-21016 A (国立大学法人静岡大学) 2014.02.03, 特許請求の範囲 & WO 2014/014309 A1	1-11	
A	JP 2007-234962 A (富士通株式会社) 2007.09.13, 請求項 1, [0032]図 6 (ファミリーなし)	1-11	
A	JP 2003-322653 A (株式会社東芝) 2003.11.14, 請求項 1, 4, 6, 7 (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 「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		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 22.04.2015		国際調査報告の発送日 12.05.2015	
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) 伊藤 裕美	2 J 9 5 1 5
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 3 5 7 2
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	US 2012/0178640 A1 (Strano et al.) 2012.07.12, Fig.1,3 & WO 2012/030961 A2	1-11
A	US 2009/0004117 A1 (Rao et al.) 2009.01.01, Scheme 1 & WO 2007/081716 A2 & EP 1969374 A1 & CA 2635747 A1	1-11
A	Du, D., Covalent coupling of organophosphorus hydrolase loaded quantum dots to carbon nanotube/Au nanocomposite for enhanced detection of methyl parathion, Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25, 1370-1375	1-11
A	Guifen Jie, Electrochemiluminescence immunosensor based on nanocomposite film of CdS quantum dots-carbon nanotubes combined with gold nanoparticles-chitosan, Electrochemistry Communications, 2010, 12, 22-26	1-11
P, X	Lee, J., A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus, Biosensors and Bioelectronics, 64, 2014.09.16, 311-317	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 朴 龍洙

静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学グリーン科学技術研究所内

(72)発明者 李 在郁

静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学グリーン科学技術研究所内

(72)発明者 李 在範

大韓民国, キョンギド, ファソンシ, ドンタンゴンウォンロ 2 1 - 4 0

(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。