

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-49207

(P2005-49207A)

(43) 公開日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 21/76

GO 1 N 21/76

2 G O 5 4

GO 1 N 33/533

GO 1 N 33/533

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/543 5 7 5

GO 1 N 33/545

GO 1 N 33/545 A

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号

特願2003-281208 (P2003-281208)

(71) 出願人 000138277

(22) 出願日

平成15年7月28日 (2003.7.28)

株式会社三菱化学ヤトロン

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(72) 発明者 田代 茂

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

株式会社三菱化学ヤトロン内

Fターム(参考) 2G054 CE02 EA01 EA03 GE01 JA00

(54) 【発明の名称】 蛍光性金属錯体封入コア-シェル型粒子の安定化方法及び蛍光分析用組成物

(57) 【要約】

【課題】 高い輝度と蛍光寿命を持つ蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子を安定化させる方法及び高い蛍光強度を安定に保つ蛍光分析用組成物を提供する。

【解決手段】 前記安定化方法では、血清アルブミンを共存させる。前記蛍光分析用組成物は、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子及び血清アルブミンを含む。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、前記コア部分に蛍光性希土類金属錯体が封入されている、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子において、血清アルブミンを共存させることを特徴とする、前記蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子の安定化方法。

【請求項 2】

(A) (1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、前記コア部分に蛍光性希土類金属錯体が封入されている、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子；及び

10

(B) 血清アルブミン

を含む、蛍光分析用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、蛍光性金属錯体封入コア-シェル型粒子（特には前記粒子から生成する蛍光）の安定化方法及び蛍光分析用組成物に関する。本発明の蛍光分析用組成物は、長い蛍光寿命を有する高輝度の蛍光性金属錯体（好ましくは蛍光性ランタノイド錯体）を利用した蛍光分析法（特には蛍光免疫分析法又は時間分解蛍光免疫分析法）に使用することができる。また、本発明の蛍光分析用組成物は、紫外線照射時に発生する蛍光性金属錯体封入コア-シェル型粒子（以下、蛍光性金属錯体封入コア-シェル型高分子ミセルと称することもある）からの蛍光が、保存期間が長さに依存して経時的に減少する現象を回避するのに有用である。

【背景技術】

30

【0002】

蛍光免疫分析法、すなわち、フルオロイムノアッセイ (Fluoroimmunoassay: 以下、FIAと略称する) 法は、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法又は酵素イムノアッセイ (EIA) 法等と並び、高感度で特異性が高い測定法として臨床診断分野をはじめとする多くの領域で利用されている。このうち、RIA法は極めて感度が高いという特徴を有しているが、放射性物質を標識体に用いているため、取り扱いに多大な注意を払う必要があり、むしろ多少感度は低い、分析操作が簡便で安全性の高い非放射性物質を標識体に用いたFIA法やEIA法が主流になりつつある。

【0003】

一方、極めて微量な生理活性物質の分析を目的とした高感化なFIA法や高感化なEIA法の技術開発競争が繰り返されてきたが、EIA法は使用する発色色素の吸光係数の高さに限界があるため、FIA法への支持が強くなる傾向にある。しかし、FIA法は、測定対象である生理活性物質中に含まれる蛍光能を有する構造（発色団）が発する大きなバックグラウンドの蛍光により感度が低下するという欠点があった。

40

【0004】

こうした欠点を解決すべく、高感度な時間分解蛍光免疫分析法 [Time Resolved Fluoroimmunoassay (TR-FIA法)] が開発された（例えば、特許文献1又は特許文献2等参照）。TR-FIA法は、蛍光性ランタノイド錯体に特有の比較的長い蛍光寿命を有する蛍光物質に、連続したパルス光を照射し、励起させ、バックグラウンドの蛍光が消失した後、蛍光性ランタノイド錯体由来の蛍光シグナルのみを

50

測定し、積算することを原理とする方法である。

【0005】

このTR-FIAにおいて、バックグラウンドの低さと生成するシグナルの強さとの両立を目指し、免疫アッセイ用組成物として開発されたコア-シェル型粒子(ナノスフェア)(特許文献3)に、蛍光性ランタノイド錯体を封入し(特許文献4)、蛍光性ランタノイド錯体封入コア-シェル型粒子(高分子ミセル)が開発されたが、生成する蛍光シグナルが経時的に低下する現象が観察された。

【0006】

例えば、蛍光性ランタノイド錯体封入コア-シェル型粒子は、懸濁液の形態で保存され、必要に応じ適切な倍率で希釈された後、蛍光分析法(例えば、TR-FIA法)に供される。この場合、懸濁液状態で保存することにより、蛍光シグナルの低下が観察された。蛍光性ランタノイド錯体封入コア-シェル型粒子を凍結乾燥した形態で保存し、親水性ブロックコポリマーの置換作用を防ぐことも可能であるが、実用性の観点から操作がより簡便な懸濁液のまま、長期保存が可能であることが望まれる。

10

【0007】

蛍光性ランタノイド錯体を安定化させるため、疎水性ブロックコポリマーの先端にカルボキシル基や-ジケトン配位子を導入し、蛍光性ランタノイドと錯体を形成させた後にスチレンと共重合させ、ポリスチレンで錯体を覆い安定化させる試みも行われたが、錯体を完全に包みきれなかったために蛍光シグナルの低下は防止できなかった。

20

【0008】

【特許文献1】特公平1-59546号公報

【特許文献2】特開昭61-128168号公報

【特許文献3】特開2001-324507号公報

【特許文献4】国際公開第W002/097436号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、従来技術の前記の欠点を解消し、高い輝度と蛍光寿命を持つ蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子(特には前記粒子から生成する蛍光)を安定化させる方法と、高い蛍光強度を安定に保つ蛍光分析用組成物とを提供し、例えば、TR-FIA法に供することで超高感度な蛍光免疫分析法を実用化することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記課題は、本発明による、(1)水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2)反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、前記コア部分に蛍光性希土類金属錯体が封入されている、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子において、血清アルブミンを共存させることを特徴とする、前記蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子の安定化方法により解決することができる。

40

また、本発明は、(A)(1)水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2)反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、前記コア部分に蛍光性希土類金属錯体が封入されている、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子；及び(B)血清アルブミンを含む、蛍光分析用組成物に関する。

【発明の効果】

【0011】

50

本発明の安定化方法によれば、高い輝度と蛍光寿命を持つ蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子の高い蛍光強度を安定に保つことができる。本発明の蛍光分析用組成物によれば、超高感度な蛍光免疫分析法を実用化することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

(1)水不溶性高分子化合物を主成分とするコア部分と、(2)反応性官能基を有する水溶性高分子化合物を主成分とし、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなるコア-シェル型粒子、すなわち、水不溶性高分子化合物を主成分とするコア部分の表面に、表層に反応性官能基を有する水溶性高分子化合物ブラシを有するコア-シェル型粒子それ自体は、背景技術で先述したように、公知である。また、そのコア部分に蛍光性希土類金属錯体を封入した蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子それ自体も、公知である。

10

【0013】

本発明において、コア部分を形成するのに用いることのできる水不溶性高分子化合物は、水に溶解しない高分子化合物であって、しかも、コア部分を形成した際に、その内部に蛍光性希土類金属錯体を封入することができる高分子化合物である限り、特に限定されるものではない。前記水不溶性高分子化合物としては、例えば、疎水性ポリマー〔例えば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチル、ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)ポリイソブレン、ポリ塩化ビニル、ポリ乳酸、ポリラクトン、又はポリラクタムなど〕、水溶性ポリマー(例えば、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリアリルアミン、又はポリアクリル酸など)の架橋ゲル、あるいは、水不溶性天然高分子化合物(例えば、ゼラチン又は多糖など)などを挙げることができる。

20

【0014】

本発明において、前記のコア部分は、前記の水不溶性高分子化合物1種類のみから実質的に形成されているか、又は前記の水不溶性高分子化合物2種類以上の組み合わせから実質的に形成されていることができる。

【0015】

前記コア部分の形状は特に限定されるものではないが、一般的には大略球状あるいは大略楕球状である。また、前記コア部分の寸法も特に限定されるものではなく、用途に応じて適宜変化させることができるが、大略球状のコア部分の直径は、一般的には5nm~500nm程度である。

30

【0016】

本発明において、シェル部分を形成するのに用いることのできる水溶性高分子化合物は、直鎖状の高分子化合物であり、その一方の末端(結合末端)でコア部分の表面と結合することができると共に、もう一方の末端(自由末端)に反応性官能基を有するか、あるいは、反応性官能基を導入することができるが、しかも、前記コア部分の表面にブラシ状に配置することが可能である限り、特に限定されるものではない。本明細書において、「コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部」とは、シェル部が多数の直鎖状水溶性高分子化合物からなり、それら直鎖状水溶性高分子化合物の各々が一方の結合末端でコア部分の表面と結合し、しかも、もう一方の自由末端が、少なくとも水溶性高分子化合物と導入物(例えば、抗原又は抗体)とを反応させる反応液中において、その反応液の系中に糸状又は棒状に表面から突出していることを意味する。また、これらのブラシ状の水溶性高分子化合物鎖の自由末端には、それぞれ導入物〔例えば、生理活性物質(例えば、抗体、酵素、又はDNA)〕と結合可能な反応性官能基が存在するので、シェル部分の最外殻は、多数の反応性官能基で覆われている。

40

【0017】

前記水溶性高分子化合物としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアミノ酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル、又はポリアリルアミンなどを挙げることができ、PEG又

50

はポリビニルアルコールが好ましい。

【0018】

本発明において、シェル部を構成する水溶性高分子化合物鎖は、各水溶性高分子化合物鎖が前記の水溶性高分子化合物1種類のみから実質的に形成されているか、又は各水溶性高分子化合物鎖が相互に異なる前記の水不溶性高分子化合物2種類以上の組み合わせから実質的に形成されていることができる。また、それぞれの鎖の長さは同じである必要はなく、各水溶性高分子化合物鎖が1種類の水溶性高分子化合物のみから形成されている場合であっても、1種類の長さの鎖のみから実質的に形成されていることもできるし、あるいは、2種類以上の長さの鎖の組み合わせから実質的に形成されていることができる。更に、各水溶性高分子化合物鎖が相互に異なる水不溶性高分子化合物2種類以上の組み合わせから実質的に形成されている場合でも、それぞれ異なる鎖の長さを選択して組み合わせることも可能である。

10

【0019】

前記シェル部分を構成する水溶性高分子化合物鎖は、前記のコア部分の全表面を実質的に完全に覆っているのが好ましい。また、前記シェル部分を構成する各水溶性高分子化合物鎖は、それぞれ、実質的に同じ長さである必要はないが、各水溶性高分子化合物鎖の自由末端によって大略球状又は大略楕球状のシェル部分外殻表面が形成されるのが好ましい。

【0020】

前記コア部分の直径と前記シェル部分の厚さとの比率は、用途に応じて適宜変化させることができる。例えば、コア部分の直径を、例えば、5 nm ~ 500 nmとすることができ、また、シェル部分の厚さを、例えば、5 nm ~ 500 nmとすることができ、

20

【0021】

前記水溶性高分子化合物鎖の自由末端に存在する反応性官能基は、前記水溶性高分子化合物の一方の末端（結合末端）をコア部分表面に結合させる前からもう一方の末端（自由末端）に存在するか、あるいは、前記水溶性高分子化合物の一方の末端（結合末端）をコア部分表面に結合させた後からもう一方の末端（自由末端）に導入することができる。これらの反応性官能基は、いずれも水（又は水系溶媒）中で安定であり、しかも、本発明の蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子を標識物質として使用する際の導入物〔例えば、生理活性物質（例えば、抗体、酵素、又はDNA）〕と反応可能な官能基である限り、特に限定されるものではなく、例えば、アルデヒド基、カルボキシル基、メルカプト基、アミノ基、マレイミド基、ビニルスルホン基、又はメタンスルホニル基などを挙げることができ、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、又はマレイミド基が好ましい。

30

【0022】

また、本発明の蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子を標識物質として使用する際の導入物〔例えば、生理活性物質（例えば、抗体、酵素、又はDNA）〕の導入量を調節するために、自由末端に存在する反応性官能基を持たない水溶性高分子化合物鎖（例えば、水素原子、メチレン基、又は水酸基などを自由末端に有する水溶性高分子化合物鎖）を任意の割合で混合することも可能である。この場合、導入物と自由末端に存在する官能基の反応に干渉させないために、反応性官能基を持たない水溶性高分子化合物鎖の長さを、反応性官能基を持つ水溶性高分子化合物鎖より短くすることが望ましい。

40

【0023】

水不溶性高分子化合物を主成分とするコア部分の表面に、表層に反応性官能基を有する水溶性高分子化合物ブラシを有するコア-シェル型粒子を調製する方法としては、これまで報告されている様々な公知方法が適用可能である。前記公知方法としては、例えば、（1）（a）反応性官能基を有する親水性セグメントと疎水性セグメントとを結合したブロック共重合体（親-疎水型ブロック共重合体）と、（b）疎水性ポリマーとを混合して粒子を調製するエマルジョン法；（2）反応性官能基を有する水溶性高分子マクロモノマーを分散剤として、疎水性モノマーを重合させる分散重合法；又は

50

(3) ハイドロゲル粒子表面に水溶性高分子化合物ブラシを導入する方法などを挙げることができる。

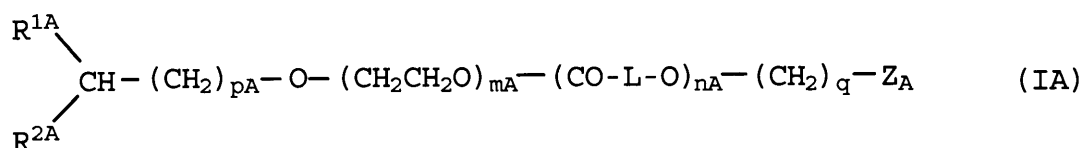
【0024】

前記のエマルジョン法(1)で用いる親-疎水型ブロック共重合体の合成方法、及び前記の分散重合法(2)で用いる反応官能基を有する水溶性高分子マクロモノマーの合成方法としては、例えば、既に本発明者及びその共同研究者が開発した方法(例えば、WO96/33233号公報、WO99/571743号公報、特開平11-322917号公報、又は特開2001-324507号公報)を用いることができる。

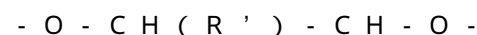
【0025】

前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、WO96/33233号公報に記載の式(IA)：

【化1】



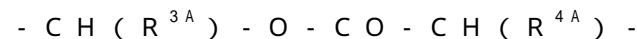
[式中、 R^{1A} 及び R^{2A} は、独立して、炭素数1~10のアルコキシ基、アリアルオキシ基、又はアリアル-(炭素数1~3のアルキルオキシ)基であるか、あるいは、 R^{1A} 及び R^{2A} は、一緒になって、炭素数1~6のアルキル基で置換されていてもよい式：



(ここで R' は水素原子又は炭素数1~6のアルキル基である)

で表されるエチレンジオキシであるか、あるいは、 R^{1A} 及び R^{2A} は、一緒になって、オキシ(=O)であり、

Lは、式：



又は



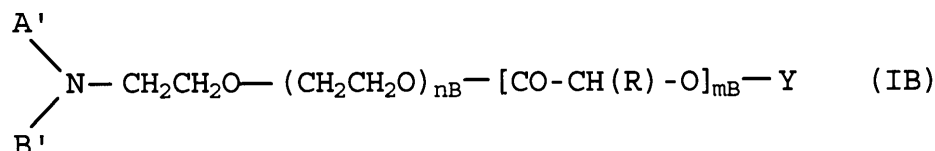
で表される2価の基であり、ここで、 R^{3A} 及び R^{4A} は、独立して、水素原子、炭素数1~10のアルキル基、アリアル基、又はアリアル-(炭素数1~3のアルキルオキシ)基であり、 r は2~5の整数であり、 m_A は2~10,000の整数であり、 n_A は2~10,000の整数であり、 p_A は1~5の整数であり、 q は0又は1~20の整数であり、そして、 Z_A は、 q が0であるとき、水素原子、アルカリ金属、アセチル基、アクリロイル基、メタクリロイル基、シンナモイル基、 p -トルエンスルホン基、2-メルカプトプロピオニル基、2-アミノプロピオニル基、アリル基、又はビニルベンジル基であり、 q が1~20の整数であるとき、炭素数1~6のアルコキシカルボニル基、カルボキシルメルカプト基、又はアミノ基である]

で表されるヘトロテレリックブロックコポリマーを挙げることができる。前記の式(IA)で表されるヘトロテレリックブロックコポリマーは、例えば、WO96/33233号公報に記載の製造方法により調製することができる。

【0026】

また、前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、WO99/571743号公報に記載の式(IB)：

【化2】



10

20

30

40

50

(式中、A'及びB'は、相互に独立して、有機シリル型のアミノ保護基を表すか、あるいは、それらが結合する窒素原子と一緒にあって、4～7員のジシラ-アザシクロヘテロ環式環を形成することのできる有機シリル型のアミノ保護基であり、

Yは、水素原子、アルカリ金属、又は適当な反応によりアルカリ金属に代えて導入可能な有機基であり、

Rは水素原子又は炭素数1～6のアルキル基であり、

n_B は1～20,000の整数であり、そして、

m_B は0～20,000の整数である)

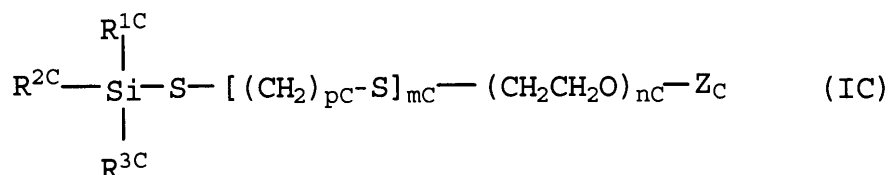
で表されるポリオキシエチレン誘導体を挙げることができる。前記の式(IB)で表されるポリオキシエチレン誘導体は、例えば、WO99/571743号公報に記載の製造方法により調製することができる。

10

【0027】

また、前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、特開平11-322917号公報に記載の式(IC)：

【化3】



20

(式中、 R^{1C} 、 R^{2C} 、及び R^{3C} は、相互に独立して、直鎖若しくは分岐のアルキル基又はアラルキル基を表し、

Z_C は、水素原子、アクリロイル基、メタクリロイル基、ビニルベンジル基、アリル基、パラトルエンスルホニル基、モノ-若しくはジ-低級アルキル置換アミノ基、カルボキシル基若しくはそのエステル基を有するアルキル基、アルデヒド基若しくはそのアセタール基を有するアルキル基、及びアルカリ金属からなる群より選ばれ、

m_C は0又は1であり、

n_C は0～20,000の整数であり、そして、

p_C は正数2又は3であるが、

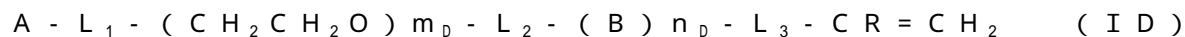
30

但し、 m_C と n_C は同時に0とならない)

で表される有機シリルスルフィド基含有化合物又はポリオキシエチレン誘導体を挙げることができる。前記の式(IC)で表される有機シリルスルフィド基含有化合物又はポリオキシエチレン誘導体は、例えば、特開平11-322917号公報に記載の製造方法により調製することができる。

【0028】

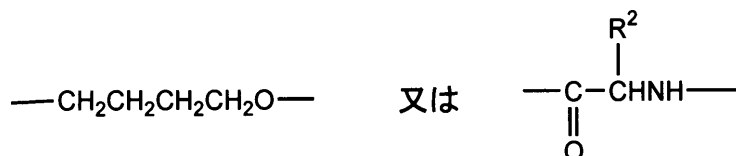
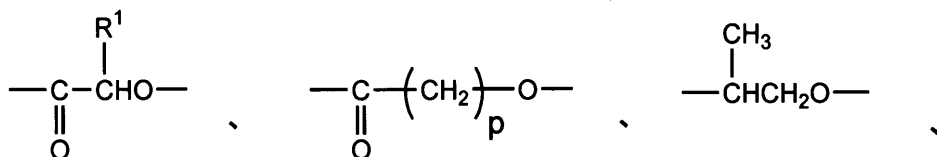
更に、前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、特開2001-324507号公報に記載の式(ID)：



40

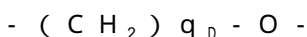
[式中、Aは官能基を表し、Bは、

【化4】



10

のユニットを表し、 R^1 は、水素原子又は低級アルキル基であり、 R^2 は、水素原子、メチル基、1-メチルエチル基、1-メチルプロピル基、2-メチルプロピル基、2-ベンジルオキシカルボニルエチル基、又はベンジルオキシカルボニルメチル基であり、 L_1 は、式：



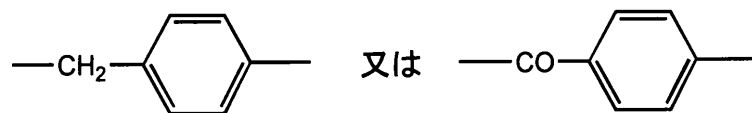
(ここで、 q_0 は1~6の整数である)の連結基を表し、 L_2 は、原子価結合又は式：



20

の連結基を表し、 L_3 は、カルボニル基、メチレン基、

【化5】



の基を表し、 R は、水素原子又はメチル基を表し、 m_0 は10~20,000の整数であり、そして、 n_0 は0~10,000の整数である]

で表されるホモポリマー又はブロックコポリマーを挙げることができる。なお、官能基Aは、特に限定されるものではないが、例えば、アルデヒド基(-CHO)、アミノ基(-NH₂)、メルカプト基(-SH)、水酸基(-OH)、カルボキシル基(-COOH)を挙げることができる。前記の式(ID)で表されるホモポリマー又はブロックコポリマーは、例えば、特開2001-324507号公報に記載の製造方法により調製することができる。

30

【0029】

コア-シェル型粒子の前記エマルジョン法(1)によれば、前記の式(IA)、式(IB)、式(IC)、又は式(ID)で表される各化合物(すなわち、親-疎水型ブロック共重合体)と、疎水性ポリマーとを混合することにより、コア-シェル型粒子(すなわち、蛍光性希土類金属錯体を封入する前の粒子)を調製することができる。

【0030】

また、コア-シェル型粒子の前記分散重合法(2)によれば、前記の式(IA)、式(IB)、式(IC)、又は式(ID)で表される各化合物(すなわち、水溶性高分子マクロモノマー)を分散剤として、疎水性モノマーを重合させることにより、コア-シェル型粒子(すなわち、蛍光性希土類金属錯体を封入する前の粒子)を調製することができる。

40

【0031】

また、コア-シェル型粒子の前記分散重合法(2)によれば、水溶性高分子マクロモノマーを分散剤として、蛍光性希土類金属錯体と疎水性モノマーを懸濁させた後に重合させることにより、蛍光性希土類金属錯体の封入とコア-シェル型粒子の調製を同時に行うことができる。更に、例えば、前記の式(IA)における基 Z_A 、式(IB)における基 Y 、又は式(IC)における基 Z_C として、蛍光性希土類金属と錯体を形成できる官能基で

50

あるカルボキシル基、 β -ジケトン配位子、又はフェロイン系配位子を導入し、蛍光性希土類金属錯体を安定化した蛍光性希土類金属錯体の封入とコア-シェル型粒子を調製することも可能である。

【0032】

本発明において使用することのできる蛍光性希土類金属錯体は、コア-シェル型粒子のコア部分に封入した状態でも、そのシグナルをコア-シェル型粒子の外側から分析（検出及び測定を含む）することのできる物質である限り、特に限定されるものではなく、例えば、ランタノイド（例えば、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、トリウム、イッテルビウム、又はルテチウム）、イットリウム、又はスカンジウム等の各錯体を挙げることができ、ランタノイド錯体が好ましく、ユーロピウム、サマリウム、テルビウム、又はジスプロシウムの各錯体がより好ましい。

10

【0033】

蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子の直径も、用途に応じて適宜変化させることができるが、大略球状の粒子の場合、10 nm ~ 1 mm程度であることができる。

【0034】

本発明で用いることのできる蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子は、例えば、公知の製造方法（例えば、国際公開第WO02/097436号パンフレットに記載の製造方法）により調製することができる。

【0035】

例えば、国際公開第WO02/097436号パンフレットに記載の製造方法では、例えば、先に説明した種々の公知方法により調製したコア-シェル型粒子（すなわち、蛍光性希土類金属錯体を封入する前の粒子）に、蛍光性希土類金属錯体を封入するのに、まず、コア-シェル型粒子のコア部分を形成する水不溶性高分子化合物を膨潤させる有機溶媒（例えば、アセトン又はトルエン等）が一定比率で含まれる溶液中に、前記コア-シェル型粒子及び蛍光性希土類金属錯体を浸漬させる。前記浸漬により、前記水不溶性高分子化合物は膨潤し、その膨潤に伴って蛍光性希土類金属錯体がコア部分に取り込まれる。続いて、この混合物から、有機溶媒を除去すると、前記水不溶性高分子化合物は収縮するが、疎水的な蛍光性希土類金属錯体はコア部分から外に出ることができず、コア部分に封入される。所望により、コア部分に取り込まれなかった蛍光性希土類金属錯体を除去することにより、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子を得ることができる。

20

30

【0036】

前記製造方法において、前記混合物から有機溶媒を除去する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、エバポレートなどにより有機溶媒を蒸発乾固する方法、あるいは、非溶媒中で収縮させる方法（例えば、有機溶媒を含有する溶液を、前記有機溶媒を含有しない溶液に置換する方法）などを挙げることができる。

【0037】

また、コア部分を膨潤するのに用いる前記有機溶媒含有溶液における有機溶媒の割合は、蛍光性希土類金属錯体が水不溶性高分子化合物に取り込まれる程度まで、前記水不溶性高分子化合物を膨潤させることができる割合である限り、特に限定されるものではないが、例えば、40 ~ 60 (vol/vol) %であることができる。

40

【0038】

本発明においては、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子の表面に存在する反応性官能基に、更に、前記反応性官能基と反応可能な導入物（例えば、生理活性物質）を結合させることができる。

【0039】

前記導入物は、蛍光性希土類金属錯体封入コア-シェル型粒子の表面に存在する反応性官能基と反応可能である限り、特に限定されるものではないが、生理活性物質、例えば、タンパク質（例えば、抗体又は酵素）若しくは核酸（例えば、DNA又はRNA）、又は細胞などを挙げることができる。

50

【0040】

導入物と、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の表面に存在する反応性官能基とを結合させる方法は、公知の結合方法の中から、前記導入物及び反応性官能基の種類に応じて適宜選択することができる。

【0041】

例えば、反応性官能基がアルデヒド基である場合には、生理活性物質 [例えば、タンパク質 (例えば、抗原、抗体、又はレセプター等)、ペプチド、低分子ホルモン、又はDNA等] のアミノ基とシッフベースを形成させることにより、結合することができる。

【0042】

また、反応性官能基がカルボキシル基である場合には、生理活性物質のアミノ基との間を、縮合剤 (例えば、カルボジイミドなど) を用いて結合することができる。あるいは、予めカルボキシ基をスクシンイミド又はマレイミド等で活性化しておいて、その状態のまま、生理活性物質と混合することにより結合させることもできる。

【0043】

蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子は、常法に従って、例えば、標識物質として蛍光分析法に使用することができる。例えば、蛍光性ランタノイド錯体封入コア - シェル型粒子をTR - FIA法に適用する方法の例としては、例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロプレートに測定対象となる生理活性物質 (例えば、血清タンパク質) と反応する抗体を固相化し、非特異吸着を防ぐための操作 (例えば、ウシ血清アルブミンのコティング) を行った後、この生理活性物質を含む試料を分注し、固相化した前記抗体と反応させ、洗浄操作の後、蛍光性ランタノイド錯体封入コア - シェル型粒子で標識したこの生理活性物質と反応する抗体を反応させ、再度、洗浄操作を実施した後、時間分解蛍光の測定を行うことができる。

【0044】

本発明の安定化方法では、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子に、血清アルブミンを共存させることにより、前記蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子を安定化させることができる。通常、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子を保存する場合には、凍結乾燥した形態で長期間保存することが可能であるが、適当な溶媒に懸濁し、懸濁液の形態とした場合には、その状態のまま保存し、必要に応じて適切な倍率で希釈した後、分析に用いることが多い。本発明の安定化方法では、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の懸濁液中に、血清アルブミンを共存させることにより、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子を安定化することができる。

【0045】

本発明で用いる血清アルブミンとしては、各種動物由来の血清アルブミンを使用することができ、例えば、哺乳動物由来の血清アルブミン、例えば、ウシ、ヒト、ウサギ、ブタ、ヒツジ、又はヤギ等に由来する血清アルブミンを用いることができる。本発明では、これらの血清アルブミンの1種類を単独で、あるいは、2種類以上を組み合わせで使用することができる。

【0046】

本発明の安定化方法において、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の懸濁液中に添加する血清アルブミンの濃度は、0.001%以上であることが好ましく、0.01%以上であることがより好ましく、0.1%以上であることが更に好ましい。0.001%未満であると、安定化の効果が認められない場合がある。また、血清アルブミンの上限は、血清アルブミンが溶解可能であり、且つ安定化の効果が十分に認められる限り、特に限定されるものではなく、例えば、使用する蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子若しくは溶媒の種類、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の濃度、又は使用する血清アルブミンの種類などに応じて適宜決定することができるが、例えば、溶液として調製可能な50%以下であることが好ましく、40%以下であることがより好ましく、30%以下であることが更に好ましく、20%以下であることが更に好ましく、10%以下であることが特に好ましい。なお、前記百分率は、蛍光性希土類金属錯体封入コア -

シェル型粒子の懸濁液中における血清アルブミンの重量%である。

【0047】

本発明の蛍光分析用組成物は、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子及び血清アルブミンを含む。本発明の蛍光分析用組成物は、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子と血清アルブミンとを混合することにより調製することができる。

【0048】

本発明の蛍光分析用組成物の形態は特に限定されるものではなく、例えば、液状又は固体状（例えば、粉末状）であることができる。

前記液状の本発明の蛍光分析用組成物としては、例えば、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の懸濁液中に血清アルブミンを共存させた液状組成物などを挙げることができる。前記液状組成物は、例えば、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の懸濁液に血清アルブミンを添加することにより、あるいは、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の懸濁液と血清アルブミン溶液とを混合することにより、適当な溶媒に蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子及び血清アルブミンを添加することにより、調製することができる。

10

【0049】

また、前記固体状の本発明の蛍光分析用組成物としては、例えば、前記液状組成物の乾燥品（例えば、凍結乾燥品）、あるいは、蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子の乾燥品（例えば、凍結乾燥品）と血清アルブミンの乾燥品（例えば、凍結乾燥品）との混合物などを挙げることができる。本発明の固体状の蛍光分析用組成物は、予め血清アルブミンを含有するため、適当な溶媒に懸濁して液状の蛍光分析用組成物とした場合にも、高い蛍光強度を安定に保つことができる。

20

【0050】

本発明の蛍光分析用組成物に含有される血清アルブミンの量は、前記組成物の形態が懸濁液状態である場合には、0.001%以上であることが好ましく、0.01%以上であることがより好ましく、0.1%以上であることが更に好ましく、また、その上限は、50%以下であることが好ましく、40%以下であることがより好ましく、30%以下であることが更に好ましく、20%以下であることが更に好ましく、10%以下であることが特に好ましい。また、本発明の蛍光分析用組成物の形態が乾燥品である場合には、適当な溶媒を加えて懸濁液とした際に、懸濁液中の血清アルブミンの濃度が前記濃度範囲になる

30

【0051】

本発明において、血清アルブミンを共存させることにより蛍光性希土類金属錯体封入コア - シェル型粒子を安定化させることができるメカニズムについて、本発明者は、以下の仮説を想定している。但し、本発明が以下の仮説に限定されるものではない。蛍光性希土類金属錯体をコア - シェル型粒子に封入する方法として、例えば、蛍光性希土類金属錯体をアセトンに溶解し、コア - シェル型粒子と混合後にアセトンを除去する方法（例えば、国際公開第W002/097436号パンフレットに記載の製造方法）、あるいは、コア - シェル型粒子のコアを形成する際に、蛍光性希土類金属錯体とスチレンモノマーを懸濁後、スチレンを重合させる方法（例えば、水溶性高分子マクロモノマーを分散剤として、

蛍光性希土類金属錯体と疎水性モノマーを懸濁させた後に重合させる分散重合法）等があるが、いずれの方法でも親水性ブロックコポリマー中や重合したポリスチレンのコア表面に蛍光性希土類金属錯体が残るため、親水性ブロックコポリマー（例えば、ポリオキシエチレン鎖又はポリエチレンイミン鎖中の酸素原子又は窒素原子）の置換作用により、希土類金属錯体由来の蛍光が減少していくと考えられる。すなわち、親水性ブロックコポリマー（例えば、ポリオキシエチレン鎖又はポリエチレンイミン鎖中の酸素原子又は窒素原子）が、蛍光性希土類金属錯体に作用し、金属イオンに配位している官能基や配位子と置換することで蛍光量が低下するものと考えられた。本発明では、血清アルブミンを添加することで、蛍光性希土類金属錯体と複合体を形成させ、親水性ブロックコポリマーが直接作用することがないため、蛍光量の低下を抑制することができるものと考えている。

40

50

【 0 0 5 2 】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 5 3 】

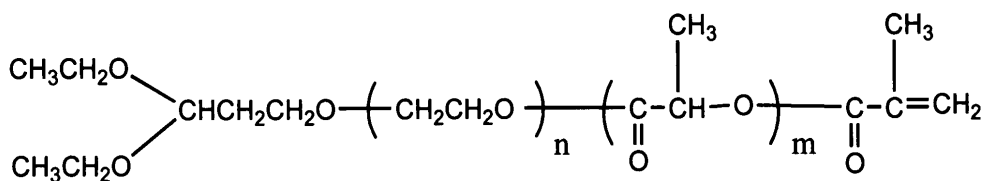
《ユーロピウム錯体封入コア - シェル型粒子の調製》

蛍光性ユーロピウム錯体封入コア - シェル型高分子ミセルの調製は、以下の方法で行った。すなわち、市販のコア - シェル型高分子ミセル（粒径 = 約 60 nm ; ナノキャリア製）を用いて、国際公開第 W O 0 2 / 0 9 7 4 3 6 号パンフレットの実施例 1 (3) に記載のアセトン法に準じて蛍光性ユーロピウム錯体を封入した後、国際公開第 W O 0 2 / 0 9 6 9 7 7 号パンフレットの実施例 2 (1) に記載の方法に準じて、高分子末端にウサギ正常 I g G (シグマ製) を導入した。

10

なお、前記の市販のコア - シェル型高分子ミセル（ナノスフェアー）は、特開 2 0 0 1 - 3 2 4 5 0 号公報の製造例 1 及び製造例 2 に記載の製造方法に準じて、式 (11) :

【 化 6 】



20

で表される - アセタールポリエチレングリコール / - メタアクリロイルポリラクティックアシドの末端のエチレン性不飽和二重結合を介して、スチレンポリマーとミセル内で固化され、コアを形成したナノスフェアーである。

【 実施例 2 】

【 0 0 5 4 】

《ユーロピウム錯体封入コア - シェル型粒子の安定化に対する各種タンパク質効果の評価》

実施例 1 で調製したウサギ正常 I g G 導入蛍光性ユーロピウム錯体封入コア - シェル型高分子ミセルから生成する時間分解蛍光の経時変化を観察するための準備として、時間分解蛍光測定装置（1 2 3 4 デルフィア フルオロメーター ; ワラック製）を用いて 0 . 2 ~ 0 . 6 ミリ秒間の蛍光量を測定した際のカウントが約 1 5 万カウントになるように、0 . 1 5 m o l / L の N a C l を含む 5 0 m m o l / L のトリス緩衝液（pH 7 . 8）を用いて前記ミセルを希釈した。

30

希釈済みの前記ミセルに、ゼラチン（ディフコ製）、ウサギ正常 I g G（シグマ製）、ウシ血清アルブミン（シグマ製）、ポリリジン（シグマ製）、又はポリアスパラギン酸（特開昭 5 9 - 1 1 2 2 6 0 号公報に記載の方法で調製）をそれぞれ終濃度が 0 . 1 % になるように添加したものと、対照として無添加のものを準備した。

【 0 0 5 5 】

経時変化を観察するために、タンパク質を添加又は無添加の前記ミセルをそれぞれ 5 0 μ L サンプルングし、マイクロプレート（フルオロヌンク ; ヌンク製）に分注後、前記時間分解蛍光測定装置で初日の時間分解蛍光量を測定した。

40

前記ミセルの保存後の時間分解蛍光量の測定は、タンパク質を添加又は無添加の前記ミセルをそれぞれ 1 m L サンプルングし、プラスチック製チューブに密閉した後、3 7 °C で一夜静置したサンプルを用意し、前記時間分解蛍光測定装置で時間分解蛍光量を測定した。

【 0 0 5 6 】

時間分解蛍光の残存率を求めるために、それぞれのサンプルの保存後のカウント数を初日のカウント数で除した後、百分率を求めた。結果を表 1 に示す。表 1 に示すように、ウシ血清アルブミンを添加した場合の残存率が最も高かった。

50

本実施例では、タンパク質として分子量及び等電点の異なる、ゼラチン（分子量は会合により約5万～15万と推定）、ウサギ正常IgG（分子量約15万）、ウシ血清アルブミン（分子量約7万）、ポリリジン（分子量約1.6万）、又はポリアスパラギン酸（分子量約1.3万）をそれぞれ0.1%になるように添加した結果、いずれのタンパク質であっても安定化効果が確認できたが、ウシ血清アルブミンが最も効果が高かった。等電点や親水性と疎水性のバランス等の性質も関与するであろうが、ポリオキシエチレン鎖をすり抜け、蛍光性希土類金属錯体と安定な複合体を形成するために適切な分子量の大きさが重要な要素である可能性がある。

【0057】

【表1】

タンパク質	残存率 (%)
なし	17.3
ポリアスパラギン酸	20.7
ポリリジン	41.8
ウシ血清アルブミン	100.4
ウサギ正常IgG	84.6
ゼラチン	75.8

10

20

【実施例3】

【0058】

《ユーロピウム錯体封入コア-シェル型粒子の安定化に対する種々の動物種に由来する血清アルブミン効果の比較》

前記ミセルに添加する血清アルブミンとして、ウシ血清アルブミン（シグマ製）を対照にし、ヒト血清アルブミン（シグマ製）、ウサギ血清アルブミン（シグマ製）、ブタ血清アルブミン（シグマ製）、ヒツジ血清アルブミン（シグマ製）、又はヤギ血清アルブミン（シグマ製）を用いて、実施例2と同様に時間分解蛍光の残存率を求めた。結果を表2に示す。表2に示すように、由来動物を変えた場合でも、ウシと同様に安定化の効果が得られた。

30

【0059】

【表2】

タンパク質	残存率 (%)
ウシ血清アルブミン	98.4
ヒト血清アルブミン	99.6
ウサギ血清アルブミン	103.8
ブタ血清アルブミン	108.4
ヒツジ血清アルブミン	94.5
ヤギ血清アルブミン	91.8

40

【実施例4】

【0060】

《血清アルブミン効果における濃度の確認》

前記ミセルに添加する血清アルブミンとして、ウシ血清アルブミン（シグマ製）の濃度を0%、0.001%、0.1%、1%、又は10%に調整し、実施例2と同様に時間分解蛍光の残存率を求めた。結果を表3に示す。表3に示すように、添加するウシ血清アル

50

ブミンの濃度は0.01%以上であることが望ましかった。

【0061】

【表3】

ウシ血清アルブミンの濃度	残存率 (%)
0%	27.8
0.001%	35.4
0.01%	77.8
0.1%	104.6
1%	99.2
10%	96.7

10

【産業上の利用可能性】

【0062】

本発明の蛍光性金属錯体封入コア-シェル型粒子の安定化方法及び蛍光分析用組成物は、長い蛍光寿命を有する高輝度の蛍光性金属錯体（好ましくは蛍光性ランタノイド錯体）を利用した蛍光分析法（特には蛍光免疫分析法又は時間分解蛍光免疫分析法）に適用することができる。

20

专利名称(译)	荧光金属络合物包封的核 - 壳型颗粒稳定方法和用于荧光分析的组合物		
公开(公告)号	JP2005049207A	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2003281208	申请日	2003-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三菱化学药得论		
申请(专利权)人(译)	三菱化学Yatoron		
[标]发明人	田代茂		
发明人	田代茂		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/76 G01N33/543 G01N33/545		
FI分类号	G01N21/76 G01N33/533 G01N33/543.575 G01N33/545.A		
F-TERM分类号	2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/GE01 2G054/JA00		
代理人(译)	森田健一		
其他公开文献	JP4414694B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种稳定包含具有高亮度和长寿命荧光的核 - 壳颗粒的荧光稀土金属络合物的方法，以及用于稳定保持高荧光强度的荧光分析组合物。ŽSOLUTION：血清白蛋白在稳定方法中共存。荧光分析组合物含有包围核 - 壳颗粒和血清白蛋白的荧光稀土金属配合物。Ž

【化 4】

