

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6354754号
(P6354754)

(45) 発行日 平成30年7月11日(2018.7.11)

(24) 登録日 平成30年6月22日(2018.6.22)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 7 5	
GO 1 N 33/536	(2006.01)	GO 1 N	33/536		D
GO 1 N 33/533	(2006.01)	GO 1 N	33/533		

請求項の数 16 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2015-522629 (P2015-522629)	(73) 特許権者	000001270
(86) (22) 出願日	平成26年4月23日 (2014.4.23)		コニカミノルタ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/061407		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(87) 国際公開番号	W02014/203614	(74) 代理人	110001070
(87) 国際公開日	平成26年12月24日 (2014.12.24)		特許業務法人 S S I N P A T
審査請求日	平成28年9月26日 (2016.9.26)	(72) 発明者	郷田 秀樹
(31) 優先権主張番号	特願2013-128412 (P2013-128412)		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
(32) 優先日	平成25年6月19日 (2013.6.19)		ニカミノルタ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	高橋 優
			東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
			ニカミノルタ株式会社内
		(72) 発明者	高梨 健作
			東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
			ニカミノルタ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子染色用の蛍光ナノ粒子およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体分子を蛍光染色するための蛍光ナノ粒子であって、
 蛍光色素を有する色素樹脂粒子と、
 染色対象の生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子とを備え、
平均粒子径が40nm以上200nmであり、
 pH7.0の水中におけるゼータ電位が-10mV~-60mVであり、
 蛍光色素を有する色素樹脂粒子の表面が、前記ゼータ電位を調節可能な化合物を用いて
 化学修飾されており、

前記色素樹脂粒子に対してアミノ基を有する化合物を用いてアミノ基を導入した後、該
 アミノ基に対してPEGを結合し、さらにこのPEGに生体分子認識分子を結合すること
 により前記化学修飾がなされており、

前記PEGのオキシエチレン単位(-CH₂CH₂-O-)の数が4~24である
 蛍光ナノ粒子。

但し、次に掲げるものは除く。

前記平均粒子径が150nmであり、かつ、

前記pH7.0の水中におけるゼータ電位が-14mVであり、かつ、

前記アミノ基を有する化合物がエタノールアミンであり、かつ、

前記PEGのオキシエチレン単位(-CH₂CH₂-O-)の数が4である

蛍光ナノ粒子。

10

20

【請求項 2】

生体分子を蛍光染色するための蛍光ナノ粒子であって、
 蛍光色素を有する色素樹脂粒子と、
 染色対象の生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子とを備え、
平均粒子径が 40 nm 以上 200 nm であり、
 pH 6.0 ~ 8.0 の緩衝液中におけるゼータ電位が 0 mV ~ - 10 mV の範囲であり

、
 蛍光色素を有する色素樹脂粒子の表面が、前記ゼータ電位を調節可能な化合物を用いて化学修飾されており、

前記色素樹脂粒子に対してアミノ基を有する化合物を用いてアミノ基を導入した後、該アミノ基に対して PEG を結合し、さらにこの PEG に生体分子認識分子を結合することにより前記化学修飾がなされており、

前記 PEG のオキシエチレン単位 (- CH₂CH₂ - O -) の数が 4 ~ 24 である
 蛍光ナノ粒子。

【請求項 3】

前記アミノ基を有する化合物が、前記色素樹脂粒子と結合した状態で、1 個または 2 個以上の遊離のアミノ基を有する、請求項 1 または 2 に記載の蛍光ナノ粒子。

【請求項 4】

前記アミノ基を有する化合物が 1, 2 - ビス (2 - アミノエトキシ) エタン (B A E E) または トリス (2 - アミノエチル) アミン (T A E A) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の蛍光ナノ粒子。

【請求項 5】

前記色素樹脂粒子の樹脂がメラミン樹脂である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の蛍光ナノ粒子。

【請求項 6】

N - succinimidyl - S - acetylthioacetate (S A T A) または 2 - イミノチオランとの反応を経て得られたストレプトアビジンが、前記生体分子認識分子として、前記色素樹脂粒子に結合している、請求項 5 に記載の蛍光ナノ粒子。

【請求項 7】

前記染色が免疫染色である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛍光ナノ粒子。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の蛍光ナノ粒子を緩衝液に分散させる工程を経て得られる、蛍光ナノ粒子の染色液。

【請求項 9】

さらに、タンパク質または界面活性剤の少なくともいずれか 1 方を含む、請求項 8 に記載の染色液。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法であって、

蛍光色素を内包または表面固定した色素樹脂粒子の表面を、前記色素樹脂粒子に対してアミノ基を有する化合物を用いてアミノ基を導入した後、該アミノ基に対して、オキシエチレン単位 (- CH₂CH₂ - O -) の数が 4 ~ 24 である PEG を結合し、さらにこの PEG に生体分子認識分子を結合することにより化学的に修飾することにより、pH 7.0 の水中において蛍光ナノ粒子全体として - 10 mV ~ - 60 mV となるゼータ電位を前記色素樹脂粒子に付与する工程を有する、蛍光ナノ粒子の製造方法。

【請求項 11】

請求項 2 に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法であって、

蛍光色素を内包または表面固定した色素樹脂粒子の表面を、前記色素樹脂粒子に対してアミノ基を有する化合物を用いてアミノ基を導入した後、該アミノ基に対して、オキシエチレン単位 (- CH₂CH₂ - O -) の数が 4 ~ 24 である PEG を結合し、さらにこの PEG に生体分子認識分子を結合することにより化学的に修飾することにより、pH 6.0

10

20

30

40

50

～ 8 . 0 の緩衝液中において蛍光ナノ粒子全体として 0 m V ~ - 1 0 m V となるゼータ電位を前記色素樹脂粒子に付与する工程を有する、蛍光ナノ粒子の製造方法。

【請求項 1 2】

前記アミノ基を有する化合物が、前記色素樹脂粒子と結合した状態で、1個または2個以上の遊離のアミノ基を有する、請求項 1 0 または 1 1 に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法。

【請求項 1 3】

前記アミノ基を有する化合物が 1 , 2 - ビス (2 - アミノエトキシ) エタン (B A E E) または トリス (2 - アミノエチル) アミン (T A E A) である、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法。

10

【請求項 1 4】

前記色素樹脂粒子の樹脂がメラミン樹脂である、請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法。

【請求項 1 5】

N - s u c c i n i m i d y l - S - a c e t y l t h i o a c e t a t e (S A T A) または 2 - イミノチオランとの反応を経て得られたストレプトアビジンが、前記生体分子認識分子として、前記色素樹脂粒子に結合している、請求項 1 4 に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法。

【請求項 1 6】

前記染色が免疫染色である、請求項 1 0 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の蛍光ナノ粒子の製造方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体分子染色用の蛍光ナノ粒子およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

病理診断では、免疫染色と呼ばれる、標本の分子情報の発現を確認するための分子標的染色を施し、遺伝子やタンパクの発現異常といった機能異常を診断する免疫観察が行なわれている。免疫染色には、例えば、酵素を用いた色素染色法 (D A B 染色等) が用いられる。しかしながら、D A B 染色のような酵素標識による染色は、染色濃度が温度・時間などの環境条件により大きく左右されるため、染色濃度から実際の抗体等の量を見積もることが難しいという課題がある。そのため、病理診断における免疫観察では、酵素標識による染色の代わりに、蛍光標識体を用いる蛍光標識法も行なわれている。この方法は D A B 染色と比べて定量性に優れるという特徴がある。蛍光標識法は、蛍光色素が修飾された抗体を用いて対象となる抗原を染色して観察することで抗原量を測るものである。

30

【0003】

蛍光標識に用いるものとして、メラミン樹脂粒子に生体分子認識分子としてのストレプトアビジンを直接的に結合させた蛍光ナノ粒子を含む染色液が知られている (例えば、特許文献 1 , 2 参照) 。この蛍光ナノ粒子は、生体分子の検出に用いられる。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特表 2 0 0 8 - 5 4 3 9 8 2 号公報

【特許文献 2】国際公開 W O 2 0 1 3 / 0 3 5 7 0 3

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、特許文献 1 , 2 の蛍光ナノ粒子を用いて免疫染色を行った場合、組織上の抗原量に拘わらず、蛍光ナノ粒子が細胞核等に非特異的に結合してしまうという問題があった

50

。特に、高感度な免疫染色を行うために蛍光ナノ粒子を高濃度で使用すると、そのような非特異的な結合が起こりやすい。

【0006】

本発明は、染色対象外の生体分子への非特異的な結合を抑制できる生体分子染色用の蛍光ナノ粒子およびその製造方法の提供をすることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した目的のうち少なくとも一つを実現するために、本発明の一側面を反映した蛍光ナノ粒子は、生体分子を染色するための蛍光ナノ粒子であって、蛍光色素を有する色素樹脂粒子と、染色対象の生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子とを備え、pH 7.0の水中におけるゼータ電位が-10 mV ~ -60 mVである、蛍光ナノ粒子である。

10

【0008】

上述した目的のうち少なくとも一つを実現するために、本発明の一側面を反映した別の蛍光ナノ粒子は、生体分子を蛍光染色するための蛍光ナノ粒子であって、蛍光色素を有する色素樹脂粒子と、染色対象の生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子とを備え、pH 6.0 ~ 8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が0 mV ~ -10 mVの範囲の蛍光ナノ粒子である。

【0009】

上述した目的のうち少なくとも一つを実現するために、本発明の一側面を反映した上記蛍光ナノ粒子の製造方法は、蛍光色素を内包または表面固定した色素樹脂粒子の表面を化学的に修飾することにより、pH 7.0の水中において蛍光ナノ粒子全体として-10 mV ~ -60 mVとなるゼータ電位を前記色素樹脂粒子に付与する工程を有する、蛍光ナノ粒子の製造方法である。

20

【0010】

上述した目的のうち少なくとも一つを実現するために、本発明の一側面を反映した上記蛍光ナノ粒子の製造方法は、蛍光色素を内包または表面固定した色素樹脂粒子の表面を化学的に修飾することにより、pH 6.0 ~ 8.0の緩衝液中において蛍光ナノ粒子全体として0 mV ~ -10 mVとなるゼータ電位を前記色素樹脂粒子に付与する工程を有する、蛍光ナノ粒子の製造方法である。

【発明の効果】

30

【0011】

本発明によれば、蛍光ナノ粒子のゼータ電位を特定の範囲の負の値に調節することにより、一般的に負に荷電している生体分子との間に適度な電氣的反発力を生じさせることができる。その結果、蛍光ナノ粒子の生体分子への非特異的な結合が抑制され、前記の電氣的反発力を上回る相互作用でもって蛍光ナノ粒子と染色対象の生体分子とを特異的に結合させ、特定の染色対象の生体分子の視認性を向上させることができる。また、蛍光ナノ粒子同士の間にも適度な電氣的な反発力が生じるため、それらの凝集を抑制し、染色液の分散性を維持することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

40

【図1】(A)は、比較例1の蛍光ナノ粒子を用いた、非特異的結合の評価試験の画像である。多数の輝点が確認され、蛍光ナノ粒子の細胞核への非特異的結合が多量に起きていることが示されている。(B)は、実施例1の蛍光ナノ粒子を用いた、非特異的結合の評価試験の結果を示す画像である。輝点は確認されず、蛍光ナノ粒子の細胞核および組織全体への非特異的結合が抑制されていることが示されている。(C)は、実施例7の蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色画像である。細胞核への非特異的結合を抑制しつつ、蛍光ナノ粒子が目的とする生体分子(HER2)に適切に結合していることが確認できる。(D)は、実施例6の蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色画像である。(C)と同様、細胞核への非特異的結合を抑制しつつ、蛍光ナノ粒子は目的とする生体分子(HER2)に適切に結合していることが確認できるが、その輝点数は(C)よりやや少ない。

50

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明に係る蛍光ナノ粒子は、生体分子を蛍光染色するための蛍光ナノ粒子であって、蛍光色素を有する色素樹脂粒子と、染色対象の生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子とを備え、pH 7.0の水中におけるゼータ電位が -10 mV ~ -60 mVの蛍光ナノ粒子である。

【0014】

また、本発明に係る別の蛍光ナノ粒子は、生体分子を蛍光染色するための蛍光ナノ粒子であって、蛍光色素を有する色素樹脂粒子と、染色対象の生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子とを備え、pH 6.0 ~ 8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が 0 mV ~ -10 mVの範囲の蛍光ナノ粒子である。

10

【0015】

(蛍光ナノ粒子)

本発明で用いられる蛍光ナノ粒子は、上述したように、染色用の蛍光色素を有し表面が化学修飾された色素樹脂粒子と、染色対象である生体分子を分子認識して特異的に結合する生体分子認識分子とを有し、染色環境pH下で、特定の範囲の負のゼータ電位を有する。

【0016】

「生体分子」には、細胞核、リボソーム、ゴルジ体等の細胞内小器官や、細胞内または細胞表面に存在するその他の各種のタンパク質などが含まれる。これらは通常、核酸(ヌクレオチド)が有するリン酸基やアミノ酸の側鎖に含まれる荷電した官能基により、中性pH領域において負に荷電している。そのため、マイナスのゼータ電位を有する蛍光ナノ粒子と、負に荷電した生体分子とは電氣的に反発し合い、非特異的結合が起こりにくくなる。

20

【0017】

一方で、蛍光ナノ粒子は、染色対象とする生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子を備えることにより、上記の電氣的な反発力を凌駕する強い相互作用でもって、染色対象とする生体分子と結合することができる。

【0018】

このことから、pH 7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を特定の負の範囲(-10 mV ~ -60 mV)で調節することにより、蛍光ナノ粒子の生体分子への非特異的な結合を防止しつつ、染色対象とする生体分子に特異的に結合させることが可能となり、蛍光染色の視認性を向上させることができる。また、pH 6.0 ~ pH 8.0の緩衝液中のゼータ電位を特定の負の範囲(0 mV ~ -10 mV)で調節することによっても、蛍光染色の視認性を向上させることができる。

30

【0019】

上述したように「染色環境pH下で、特定の範囲の負のゼータ電位を有する」ものとするため、本発明に用いられる蛍光ナノ粒子のゼータ電位は、中性、すなわちpHが7.0の水中の環境下で-10 mV ~ -60 mVの範囲となるよう設定され、または、pH 6.0 ~ 8.0となるPBS等のpH緩衝液中の環境下では、0 mV ~ -10 mVとなるよう設定される。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、Tris-HCl緩衝液、およびリン酸緩衝液(PBSを除く)からなる群から選択された1種以上が挙げられる。

40

【0020】

上記のような範囲のゼータ電位を有する蛍光ナノ粒子は、生体分子の染色が行われるpH環境下、たとえばpHが6.0 ~ 8.0、好ましくはpHが6.9 ~ 7.6の範囲における使用にとって好適なものとなる。

【0021】

pH 7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位が-10 mVより大きいと、染色対象外の生体分子(たとえば細胞核)との間に働く反発力が弱く、非特異的を十分に防止

50

することができないため、視認性を改善する効果に乏しい。また、蛍光ナノ粒子同士の間で働く電気的な反発力も弱くなるため、試薬の分散性も悪くなる。pH 7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位が -60 mVより小さいと、正に荷電した生体分子への非特異的結合などにより組織全体への吸着（輝点数）が過度になり、やはり視認性を改善する効果に乏しい。

【0022】

一方、pH 6.0～pH 8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位が0 mV～-10 mVの範囲外であると、染色しても十分な輝点を得ることができない。なお、蛍光ナノ粒子のゼータ電位は、一般的なゼータ電位測定装置（たとえば「ゼータサイザーナノ」、Malvern社製）を用いて測定することができる。

10

【0023】

通常、非特異的結合を引き起こすおそれのある染色対象外の生体分子は多種類存在するが、負荷電の程度は生体分子の種類やpH環境により異なり、染色対象（組織切片等）に応じて、非特異的結合を防止し、視認性を向上させる効果が極力高くなるよう、蛍光ナノ粒子のゼータ電位を調節することが適切である。たとえば、蛍光ナノ粒子のゼータ電位を、染色対象外の生体分子の中で非特異的結合が特に問題となる細胞核との関係において、最も非特異的結合が抑制されるように調節することが好ましい。

【0024】

pH 7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH 6.0～pH 8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位は、後述する蛍光ナノ粒子の製造方法の付加工程で示すように、色素樹脂粒子の表面に対して該表面のゼータ電位を調節可能な化合物を付加する化学修飾により、上記の範囲に設定することが好適である。この場合、pH 7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH 6.0～pH 8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位は、色素樹脂粒子および生体分子認識分子に加えて、上記化学修飾のために用いられる試薬、例えばアミノ基導入試薬およびPEG化試薬の、電荷や分子サイズなどによって総合的に調整されることになる。

20

【0025】

ただし、本発明はそのような実施形態に限定されるものではなく、色素樹脂粒子および生体分子認識分子のみによって、pH 7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH 6.0～pH 8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を上記の範囲に設定することが可能であれば、そのような化学修飾を用いる必要はない。

30

一方、pH 6.0～pH 8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位は、緩衝液に対して、タンパク質（BSA等）、界面活性剤（Tween 20（登録商標）等）、防腐剤（アジ化ナトリウム等）などのゼータ電位を調節可能な他の化合物を1種又は2種以上を所定量含有させることによって0 mV～-10 mVの範囲に入るように総合的に調節されていてもよい。ただし、上記ゼータ電位が0 mV～-10 mVの範囲に入るのであれば、そのような化合物を用いる必要はない。

【0026】

<色素樹脂粒子>

本発明の蛍光ナノ粒子を構成する要素の一つである色素樹脂粒子は、蛍光色素を粒子に内包または粒子表面に固定した、直径がナノメートルオーダーの樹脂粒子である。

40

【0027】

色素樹脂粒子を主として構成する樹脂として、次のような熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂を用いることができる。熱可塑性樹脂としては、例えば、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリフラン、または、これに類する樹脂を好適に用いることができる。熱硬化性樹脂としては、例えば、ポリキシレン、ポリ乳酸、グリシジルメタクリレート、ポリメラミン、ポリウレア、ポリベンゾグアナミン、ポリアミド、フェノール樹脂、多糖類またはこれに類する樹脂を好適に用いることができる。熱硬化性樹脂、特にメラミン樹脂は、キシレン等の有機溶媒を用いる脱水、透徹、封入などの処理によっても、色素樹脂に内包させた色素の溶出を抑制することができる点で好ましい。

50

【0028】

色素樹脂粒子は、表面に少なくとも直接的または間接的に生体分子認識分子を結合させるための官能基と、通常はさらにpH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、またはpH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位を調節するための化合物(化学修飾剤)を結合させるための官能基を備える必要がある。

【0029】

このような所定の官能基としては、本発明の属する技術分野において様々な生体分子同士を結合させる場合と同様の官能基を利用することができるが、例えば、エポキシ基およびアミノ基が好ましい。

【0030】

生体分子認識分子を結合させるための官能基と、ゼータ電位を調節するための化合物(化学修飾剤)を結合させるための官能基とは、同じ種類のものであっても、異なる種類のものであってもよい。

【0031】

前記所定の官能基を有する色素樹脂粒子の調製方法は特に限定されるものではないが、例えば、色素樹脂粒子を構成する熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂を合成するためのモノマーとして、前記所定の官能基をあらかじめ側鎖に有する(コ)モノマーを(共)重合させるか、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂の合成後に、それを構成している樹脂モノマー単位が有する官能基を試薬処理して前記所定の官能基に変換する方法を用いることができる。

【0032】

熱可塑性の色素樹脂粒子を製造する場合、スチレンと共にグリシジルメタクリレートモノマーとして用いて共重合させることにより、表面にエポキシ基を有するポリスチレン系樹脂の色素樹脂粒子を製造する実施形態、あるいはスチレンとともにスチレンカルボン酸やスチレンスルホン酸を共重合させて、表面にカルボン酸、スルホン酸を有するポリスチレン系樹脂の色素樹脂粒子を製造する実施形態、あるいはスチレンと共にアミノスルホン酸を共重合させて表面にアミノ基を有するポリスチレン系樹脂の色素樹脂粒子を製造する実施形態が挙げられる。なお、前記グリシジルメタクリレートが有するエポキシ基は、所定の処理によりアミノ基に変換することもできる。

【0033】

一方、熱硬化性の色素樹脂粒子を製造する場合、メラミン樹脂原料(例えば三和ケミカル社製MX035)をモノマーとして用いて共重合させることにより、表面にアミノ基を有するメラミン系樹脂の色素樹脂粒子を製造する実施形態が挙げられる。

【0034】

(蛍光色素)

上記樹脂モノマーを重合して蛍光色素を取り込みつつ色素樹脂粒子を形成する際に、粒子に内包または粒子の表面に固定させる蛍光色素としては、例えば、以下のローダミン系色素分子、BODIPY系色素分子、スクアリリウム系色素分子、芳香族炭化水素系色素分子、または、これらの組合せを用いることができる。

【0035】

ローダミン系色素分子などの蛍光色素は、比較的耐光性が高いため好ましく、なかでも芳香族炭化水素系色素分子に属するペリレン(perylene)やピレン(Pyrene)、ペリレンジイミド(perylene diimide)が好ましい。

【0036】

ローダミン系色素分子の具体例としては、5-カルボキシ-ローダミン、6-カルボキシ-ローダミン、5,6-ジカルボキシ-ローダミン、ローダミン6G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、テキサスレッド、Spectrum Red、LD700 PERCHLORATE、それらの誘導体などが挙げられる。

【0037】

BODIPY系色素分子の具体例としては、BODIPY FL、BODIPY TM

10

20

30

40

50

R、BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665 (以上インビトロジェン社製)、それらの誘導体などが挙げられる。

【0038】

スクアリリウム系色素分子の具体例としては、SRfluor 680 - Carboxylate、1,3-Bis[4-(dimethylamino)-2-hydroxyphenyl]-2,4-dihydroxycyclobutenediylum dihydroxide, bis、1,3-Bis[4-(dimethylamino)phenyl]-2,4-dihydroxycyclobutenediylum dihydroxide, bis、2-(4-(Diethylamino)-2-hydroxyphenyl)-4-(4-(diethyliminio)-2-hydroxycyclohexa-2,5-dienylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、2-(4-(Dibutylamino)-2-hydroxyphenyl)-4-(4-(dibutyliminio)-2-hydroxycyclohexa-2,5-dienylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、2-(8-Hydroxy-1,1,7,7-tetramethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)-4-(8-hydroxy-1,1,7,7-tetramethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-pyrido[3,2,1-ij]quinolinium-9(5H)-ylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、それらの誘導体などが挙げられる。

【0039】

芳香族炭化水素系色素分子の具体例としては、N,N-Bis-(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-(4-tert-butylphenoxy)-perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4,9,10-bis(dicarbimide)、16,N,N'-Bis(2,6-dimethylphenyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide、4,4'-[(8,16-Dihydro-8,16-dioxodibenzo[a,j]perylene-2,10-diyl)dioxy]dibutyric acid、2,10-Dihydroxy-dibenzo[a,j]perylene-8,16-dione、2,10-Bis(3-aminopropoxy)dibenzo[a,j]perylene-8,16-dione、3,3'-[(8,16-Dihydro-8,16-dioxodibenzo[a,j]perylene-2,10-diyl)dioxy]dipropylamine、17-BIS(Octyloxy)Anthra[9,1,2-cde]-Benzo[RST]Pentaphene-5-10-Dione、Octadecanoic acid、5,10-dihydro-5,10-dioxoanthra[9,1,2-cde]benzo[rst]pentaphene-16,17-diylester、Dihydroxydibenzanthrone、Benzenesulfonic acid、4,4',4'',4'''-[[2,9-bis[2,6-bis(1-methylethyl)phenyl]-1,2,3,8,9,10-hexahydro-1,3,8,10-tetraoxoanthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']]diisoquinoline-5,6,12,13-tetrayl]tettrakis(oxy)]tettrakis-, Benzeneethanaminium、4,4',4'',4'''-[[2,9-bis[2,6-bis(1-methylethyl)phenyl]-1,2,3,8,9,10-hexahydro-1,

10

20

30

40

50

3,8,10-tetraoxoanthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinoline-5,6,12,13-tetrayl]tetrakis(oxy)]tetrakis[N,N,N-trimethyl-]、それらの誘導体などが挙げられる。

【0040】

(色素樹脂粒子の平均粒径)

色素樹脂粒子の平均粒径は、汎用の蛍光顕微鏡でも好適に輝点の観察が可能となる点で、好ましくは30~300nmであり、より好ましくは40nm~200nmである。平均粒径が300nmを超える場合、染色後の観察の際に細胞1個当たりの輝点数が減って輝点観察がしにくくなり、逆に平均粒径が30nm未満の場合、細胞1個当たりの輝点数が増えて輝点観察がしにくくなるからである。

10

【0041】

(化学修飾剤)

色素樹脂粒子の表面の化学修飾に用いられる化学修飾剤としては、下記のようなアミノ基導入試薬およびPEG化試薬を用いることができる。このような化学修飾剤は、pH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、またはpH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位を調節するとともに、生体分子認識分子を色素樹脂粒子に結合させる機能を果たすことができる。

【0042】

(アミノ基導入試薬)

アミノ基導入試薬としては、色素樹脂粒子の種類に応じて適切にアミノ基を導入することができる公知の各種の試薬を用いることが可能である。例えば、エタノールアミン、アミノアルキル基を有するトリエトキシシラン類(3-アミノプロピルトリエトキシシラン:APS等)、アミノアルキル基を有する2級または3級アミン(トリス(2-アミノエチル)アミン:TAEE等)、アミノアルコキシ基で2以上置換されたアルカン(1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン:BAEE、1,11-Diamino-3,6,9-trioxaundecan、2,2'-oxybis(ethylamine))等を好適に用いることができる。

20

【0043】

熱硬化性樹脂の色素樹脂粒子の場合、アミノ基導入試薬のシラノール基またはアミノ基が、色素樹脂粒子の水酸基やエーテルと、脱水、脱アルコール反応をしてアミノ基が導入される。一方、熱可塑性樹脂の色素樹脂粒子の場合には、グリシジルメタクリレートのエポキシ基とアンモニアや多官能性アミンとの反応やカルボキシル基やスルホン基と多官能性アミンとの反応によりアミノ基が導入される。

30

【0044】

(PEG化試薬)

PEG化試薬としては、色素樹脂粒子および/または前記アミノ基導入試薬の種類に応じて適切にPEG鎖を付加することができる、公知の各種の試薬を用いることが可能である。

【0045】

PEGの長さについては、オキシエチレン単位(-CH₂CH₂-O-)の数が4~24であるPEGが、蛍光ナノ粒子のpH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を-10mV~-60mVの範囲に調節しやすい点、pH6.0~pH8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を0mV~-10mVに調節しやすい点で好ましい。オキシエチレン単位(-CH₂CH₂-O-)の数が4未満であると蛍光ナノ粒子のゼータ電位を低下させにくく、逆に24を超えるとpH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位またはpH6.0~pH8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位が過度に低下するおそれがある。

40

【0046】

また、上記のような適切な長さのPEGを介して生体分子認識分子を色素樹脂粒子に結合させることにより、PEGを介さずに(直接的に)生体分子認識分子を色素樹脂粒子に

50

結合させた場合よりも、染色対象の生体分子への結合性を高め、染色精度を向上させることが可能になる。

【0047】

色素樹脂粒子のアミノ基（アミノ基導入試薬によって導入されたものでもよい。）に対してPEG鎖を結合させる場合、PEGのスクシンイミドエステル基を有するPEG化試薬が好適に用いられる。この場合、スクシンイミドエステル基が、色素樹脂粒子のアミノ基と反応して、色素樹脂粒子にPEGが付加される。

【0048】

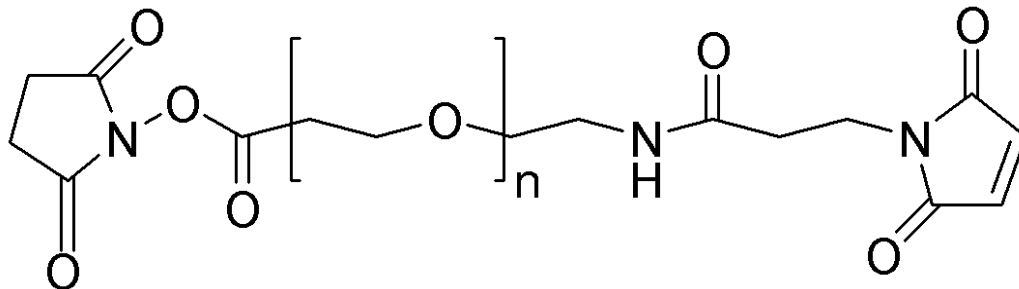
色素樹脂粒子のスルフヒドリル基（SH基）に対してPEG鎖を結合させる場合、マレイミド基を有するPEG化試薬が好適に用いられる。この場合、PEGのマレイミド基が、色素樹脂粒子のSH基と反応して、色素樹脂粒子にPEGが付加される。このようなSH基としては、色素樹脂粒子のアミノ基を、Sメルカプトエチルアミン塩酸塩やS-アセチルチオグリコール酸-N-スクシンイミジル（SATA）や2-IminothiolaneによりSH基に変換した場合のSH基が該当する。

【0049】

なお、PEGを介して後述する生体分子認識分子を色素樹脂粒子に結合させる場合には、PEGの一端側に色素樹脂粒子および/またはアミノ基導入試薬と連結可能な反応基を有するとともに、他端側にも生体分子認識分子と連結可能な反応基（マレイミド基等）を有する化合物（PEGリンカー）を、PEG化試薬として用いることが望ましい。このようなPEGリンカーとしては、たとえば、下記[化1]に示すようなSM(PEG)_n（ $n = 2 \sim 24$ 、サーモサイエンティフィック社製）等が挙げられる。

【0050】

【化1】



【0051】

（生体分子認識分子）

本発明の蛍光ナノ粒子を構成するもう一つの要素である生体分子認識分子は、染色対象とする生体分子に特異的に結合する分子であり、上述したような色素樹脂粒子に結合させて用いられる。「特定の生体分子」およびそれに特異的に結合する「生体分子認識分子」の組み合わせとしては、例えば、ビオチン-（ストレプト）アビジン、抗原-抗体、糖鎖-レクチンの組み合わせが挙げられる。「特異的に結合する」は、このような組み合わせに応じて、本発明の属する技術分野における一般的な用語として解釈することが可能であるが、結合定数（ K_A ）またはその逆数である解離定数（ K_D ）によって定義することも可能である（下記表1参照）。

【0052】

すなわち、本発明で用いられる生体分子認識分子は、染色対象となる生体分子との間の結合定数（ K_A ）が $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ の範囲にある生体分子として定義することができる。結合定数（ K_A ）が当該範囲内にある場合は、その生体分子は染色対象となる生体分子と「特異的に結合する」生体分子認識分子として取り扱うことができ、逆に当該範囲内でない（ 1×10^5 未満である）場合は、その生体分子は生体分子と「特異的に結合する」とはいえず、本発明における生体分子認識分子として取り扱うことができない。同様に、本発明で用いられる生体分子認識分子は、染色対象となる生体分子との間の解離定数（ K_D ）が $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-12}$ の範囲にある生体分子として定義することもできる。

【 0 0 5 3 】

【表 1】

	解離定数 K_D	結合定数 K_A
定義	$\frac{(A)(B)}{(AB)} = \frac{K_d}{K_a}$	$\frac{(AB)}{(A)(B)} = \frac{K_a}{K_d}$
単位	[M]	[M ⁻¹]
説明	K_D が高いほど 低アフィニティー	K_A が高いほど 高アフィニティー
基準範囲	$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$

10

20

(GEヘルスケアジャパンのHPより引用)

【 0 0 5 4 】

この条件を満たす生体分子 - 生体分子認識分子の結合例としては、結合定数 (K_A) = 1×10^9 である細胞内の抗原と抗体との結合や、結合定数 (K_A) = 1×10^{12} で結合をするビオチンとストレプトアビジンとの結合が挙げられるが、これら以外にも、上記と同程度の結合定数 (K_A) を有して結合する生体分子 - 生体分子認識分子の組み合わせが選択可能である。なお、ある抗原に対して一般的な手法 (免疫法) によって作製することのできる抗体、好適には市販されている抗体は通常、上記の範囲の結合定数 (K_A) を有し、当該抗原を染色対象の生体分子とする実施形態における生体分子認識分子として利用することができる。結合定数 (K_A) は公知の手法により測定することができる。

30

【 0 0 5 5 】

上述したような強い結合定数 (K_A) を有する生体分子認識分子は、必要に応じてPEG鎖を介して色素樹脂粒子に結合させることにより、蛍光ナノ粒子が有する特定の範囲の負のゼータ電位によって生じる反発力を上回る結合力をもって、染色対象となる生体分子に結合することができる。

【 0 0 5 6 】

生体分子認識分子として抗体を用いる場合、抗体医薬を構成するものを含めた各種抗体を用いることができる。ここで、本発明において、「抗体」という用語は、任意の抗体断片または誘導体を含む意味で用いられ、Fab、Fab'2、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体 (ScFv) などの各種抗体を含む。

40

【 0 0 5 7 】

代表的な生体分子認識分子として、各種のがんの投薬選定に関係する、がん細胞の増殖制御因子受容体および転移制御因子受容体に対する抗体が挙げられる。例えば、細胞表面に存在するHER2 (human epidermal growth factor receptor type 2) は、乳癌の投薬選定のための免疫染色対象として重要なタンパク質であり、それに特異的に結合する抗HER2抗体は、色素樹脂粒子に結合させる生体分子認識分子として好適である。また、細胞骨格を形成するアクチンに特異的に結合する抗アクチン抗体なども、生体分子認識分子として挙げられる。その他、特定の生体

50

分子に対して前述したような高い結合力を有する生体分子認識分子を用いることも可能である。

【0058】

逆に言えば、前述したような高い結合力を有する生体分子認識分子が存在する限り、多様な生体分子を染色対象とすることが可能である。例えば、生体分子認識分子の代表例である抗体を作製することのできる、抗原となる各種の生体分子が挙げられる。「抗原」は、一般的にはタンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む。）であるが、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）、糖類（オリゴ糖、多糖類、糖鎖等）、脂質、

10

【0059】

前述したHER2のようながんに関連する抗原以外にも、TNF-（Tumor Necrosis Factor）、IL-6（Interleukin-6）受容体などの炎症性サイトカイン、RSVF蛋白質等のウィルス関連分子なども、染色対象の生体分子となりうる。目的に応じて、染色対象とする生体分子およびそれに特異的に結合する生体分子認識分子の組み合わせを選定することができる。

【0060】

ただし、本発明において、「染色対象である生体分子」は、上述したがんの投薬選定に關係する受容体のような、検出対象たるタンパク質そのものに限定されるものではなく、検出対象たるタンパク質に間接的に蛍光ナノ粒子を結合させることのできる生体分子も、染色対象である生体分子として取り扱うことができる。例えば、検出対象たるタンパク質に、当該タンパク質を抗原として認識する抗体（一次抗体）を結合させるような実施形態の免疫染色法においては、この一次抗体が「染色対象である生体分子」に相当し、蛍光ナノ粒子はこの一次抗体を抗原として認識する抗体（二次抗体）を生体分子認識分子として有することができる。あるいは、上記と同様、検出対象たるタンパク質に、当該タンパク質を抗原として認識する抗体（一次抗体）をまず結合させ、続いてこの一次抗体を抗原として認識する抗体（二次抗体）とビオチンとの複合体を結合させるような実施形態の免疫染色法においては、このビオチンが「染色対象である生体分子」に相当し、蛍光ナノ粒子はこのビオチンに特異的に結合するストレプトアビジンを生体分子認識分子として有する

20

30

【0061】

（生体分子認識分子の色素樹脂粒子への結合）

生体分子認識分子を色素樹脂粒子に結合させる態様は特に限定されるものではないが、色素樹脂粒子に直接的に結合させるよりも、上述したようなPEGリンカーを介して色素樹脂粒子に間接的に結合させる方が好ましい。生体分子認識分子の結合には、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着及び化学吸着等を用いることができるが、結合の安定性から共有結合などの結合力の強い結合が好ましい。

【0062】

生体分子認識分子と色素樹脂粒子とをPEGを介して結合させる場合は、例えば、色素樹脂粒子に付加したPEGリンカーのマレイミド基と生体分子認識分子のチオール基とを反応させることにより、これらを共有結合で結合させることができる。

40

【0063】

生体分子認識分子を色素樹脂粒子に結合させる際には、色素樹脂粒子側の反応基を他の反応基に変換し、生体分子認識分子が本来有する反応基を他の反応基に極力変換しないようにすることが望ましい。例えば、生体分子認識分子が抗体等のタンパク質である場合、抗体が有するSH基等の反応基が変換されることで、分子の立体構造が変化して生体分子認識分子本来の結合能が損なわれるおそれがあるからである。

【0064】

例えば、色素樹脂粒子の反応基を上記のようにアミノ基導入試薬によりアミノ基に変化

50

させ、このアミノ基にPEGリンカーを付加した後、該PEGリンカーの遊離のマレイミド基に対して生体分子認識分子のSH基を結合させる反応により行う例が挙げられる。

【0065】

生体分子認識分子がタンパク質の場合、SH基は通常ジスルフィド基(S-S)となっており、SH基として存在する一部のものは、金属イオンと結合した構造をとり、反応の中心となっている等、タンパク質機能に大きく影響するので上記結合に使用できない。生体分子認識分子のSH基を上記結合に用いるには、(1)ジスルフィド構造(S-S)を還元してSH基として結合に使用するが、(2)SH基を導入して結合に使用する必要がある。

【0066】

ジスルフィドの還元には、メルカプトエチルアミン塩酸塩(MEA)、 γ -メルカプトエタノール(γ -ME)やジチオスレイトール等が使用される。タンパク質中のジスルフィドを全て還元してチオール基(-SH)とすると、タンパク質機能が失われてしまう可能性があるため、還元剤の濃度を調整してジスルフィドの一部をSH基に還元して用いる必要がある。一方、SH基を導入する試薬としては、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオ酢酸(SATA)、2-Iminothiolane等が挙げられ、SH基への還元やSH基の導入自体は公知の方法で行うことができる。

【0067】

<蛍光ナノ粒子の製造方法>

本発明に係る蛍光ナノ粒子は、蛍光色素を内包または表面固定した色素樹脂粒子の表面を化学的に修飾することにより、pH7.0の水中で蛍光ナノ粒子全体として-10mV~-60mVとなるゼータ電位、またはpH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が0mV~-10mVとなるゼータ電位を前記色素樹脂粒子に付与する工程を有する製造方法により製造することができる。この工程は、前記色素樹脂粒子に対してアミノ基を有する化合物を結合させて前記色素樹脂粒子にアミノ基を付与した後、該アミノ基に対してPEGおよび生体分子認識分子を結合するという化学的な修飾を含むことが好ましい。このような蛍光ナノ粒子の製造方法は、具体的には例えば、以下の各工程：(1)混合工程、(2)重合工程、(3)洗浄工程、および(4)付加工程を含む実施形態とすることができる。このうち(4)の付加工程が、上記のような化学的な修飾に関する工程となる。

【0068】

(1)原料調製・混合工程

混合工程は、前述したような蛍光色素と、色素樹脂粒子形成用のモノマーまたはオリゴマーの1種または2種以上とを混合する工程である。この混合させる物として、任意にプロトン供給剤や重合反応促進剤を含めることができる。

【0069】

蛍光色素と樹脂モノマーとを事前に混合させることで、蛍光色素とモノマーまたはオリゴマーの1種または2種以上と結合させて、色素樹脂粒子内に蛍光色素を取り込みやすくすることができる。この結合は、蛍光色素と樹脂モノマーとが反対の電荷を持つ置換基ないし化学的単位によって相互にイオン結合していてもよいし、置換基ないし化学的単位を介した共有結合で結合していてもよい。

【0070】

イオン結合の具体例として、樹脂がメラミン樹脂、蛍光色素がスルホローダミンの場合、当該樹脂中の正に荷電した窒素原子(=NH⁺-等)と、当該蛍光色素が有するスルホ基(SO₃⁻)とのイオン結合を介して結合する例が挙げられる。また、共有結合の具体例として、4-アミノスチレンとスルホローダミン101酸クロリドを反応させ、共有結合(-NH₂-SO₂-)を形成させる(この反応物をスチレン系ナノ粒子のコモノマーとして用いる)例が挙げられる。

【0071】

上記結合方法は特に限定されず、樹脂原料であるモノマーに蛍光色素を結合させた後に

10

20

30

40

50

モノマーを重合させる方法の他にも、重合体に蛍光色素を結合させる方法、その他、合目的な方法を用いればよい。

【 0 0 7 2 】

(プロトン供給剤)

樹脂モノマーと蛍光色素とをイオン結合させる場合、プラス電荷となる樹脂モノマー(メラミン等)の置換基(NH_2 等)や蛍光色素の置換基に H^+ を積極的に供給してプラス電荷とするプロトン供給剤を用いる事もできる。例えば、ギ酸や酢酸、パラトルエンスルホン酸等、これらに類するものが挙げられる。

【 0 0 7 3 】

蛍光色素に付いている置換基がカルボン酸やスルホン酸等の酸の場合、解離したプロトンが蛍光色素の置換基(NH_2 等)に付与されプラスに荷電させるため、これらの酸がプロトン供給剤として機能する事もできる。逆に樹脂モノマーのマイナス電荷となる置換基や蛍光色素の置換基から H^+ を積極的に抜き取るプロトン受容剤を用いる事もできる。例えば、水酸化ナトリウム等の塩基の場合、これがプロトン受容剤として機能する。

【 0 0 7 4 】

(重合反応促進剤)

熱可塑性樹脂の反応促進剤として、例えば金属等の公知の重合触媒を用いる事ができる。一方、熱硬化性樹脂の反応促進剤として、例えば酸を用いる事ができる。メラミン樹脂や尿素樹脂、キシレン樹脂、フェノール樹脂は、いずれも酸触媒により反応が促進される事が知られている。酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、硫酸、塩酸、硝酸、パラトルエンスルホン酸、ドデシルベンゼンスルホン酸、等が知られている。熱硬化性樹脂の反応は加温のみでも進行するが、反応促進剤を加えるとより低温で進行するので、反応や性能を制御できる範囲で添加することができる。

【 0 0 7 5 】

(2)重合工程

重合工程は、蛍光色素と電気的もしくは共有結合した樹脂モノマーまたはオリゴマーを熱硬化やラジカル重合させるか、蛍光色素を取り込みながら熱硬化やラジカル重合させることにより、色素樹脂粒子を形成する工程である。重合工程の反応条件(温度、時間)は、重合させるモノマーまたはオリゴマーの組成から決定され、公知の方法に則して行うことができる。

【 0 0 7 6 】

例えば、蛍光有機色素を内包したポリスチレン系のナノ粒子は、米国特許第4326008号(1982)に記載されている重合性官能基をもつ有機色素を用いた共重合や、米国特許第5326692号(1992)に記載されているポリスチレンナノ粒子への蛍光有機色素の含浸法等により重合することができる。

【 0 0 7 7 】

(3)洗浄工程

洗浄工程は、得られた色素樹脂粒子の分散液から、余剰の樹脂原料や蛍光色素、乳化剤等の不純物を除く工程である。例えば、反応液から樹脂成分を遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再度分散させることで洗浄を行う。遠心分離、上澄み除去、超純水への再分散の一連の洗浄操作は、上澄みに樹脂や色素に由来する吸光・蛍光が見られなくなるまで、複数回繰り返し行うことが好ましい。

【 0 0 7 8 】

(4)付加工程

付加工程は、洗浄工程(3)からの色素樹脂粒子の表面に対して適切な化学修飾を施し、 $\text{pH}7.0$ の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$ に調節するか、または、 $\text{pH}6.0 \sim 8.0$ の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$ に調整する工程である。例えば、前記色素樹脂粒子に対して前述したSATA, TAEA等のアミノ基を有する化合物を結合させて前記色素樹脂粒子にアミノ基を付与した後、該アミノ基に対してPEGを結合し、さらにこのPEGに生体分子認識分

10

20

30

40

50

子を結合することにより行われる。

【0079】

(アミノ基導入)

前述したようなアミノ基導入試薬を用いて、公知の手段により色素樹脂粒子にアミノ基を導入することができる。

【0080】

具体的には、重合工程で得られた色素樹脂粒子を純水中に分散させ、これに前述したアミノ基導入試薬を反応させる。反応終了後、遠心分離又はろ過により表面にアミノ基が導入された蛍光ナノ粒子を得ることができる。

【0081】

使用するアミノ基導入試薬の種類や添加量、反応温度および反応時間等の条件は、色素樹脂粒子の性状などを考慮しながら、最終的にpH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が所定の条件を満たす蛍光ナノ粒子が得られるよう、適切な範囲で調整すればよい。

【0082】

(PEG付加)

前述したPEG化試薬を用いて、公知の手段により色素樹脂粒子にPEGを導入することができる。例えば、PEG化試薬のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル基を色素樹脂粒子に導入した上記アミノ基と反応させて付加する。具体的には、PEG化試薬のsuccinimidy-[N-maleomidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]ester(サーモサイエンティフィック社製「SM(PEG)₁₂」(商標))を、EDTAを2mM(モル濃度)含有したPBSに最終濃度10mMとなるよう調整、3nMに調整した粒子と室温で30分反応させることで、PEGを導入することができる。

【0083】

使用するPEG化試薬の種類や添加量、反応温度および反応時間等の条件は、色素樹脂粒子および/またはアミノ基導入試薬や生体分子認識分子の性状などを考慮しながら、最終的にpH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が所定の条件を満たす蛍光ナノ粒子が得られるよう、適切な範囲で調整すればよい。

【0084】

(生体分子認識分子の付加)

例えば、色素樹脂粒子に付加したPEGのマレイミド基と生体分子認識分子に付加したチオール基とを反応して結合させるか、色素樹脂粒子に導入したアミノ基、または、色素樹脂粒子中の蛍光色素や樹脂モノマー単位が本来有するアミノ基と、生体分子認識分子中のカルボキシル基とを公知の方法で反応して結合させることで、抗体を蛍光ナノ粒子と結合させることができる。具体例としては、ストレプトアビジンを、2-IminothiolaneやSATAを用いてチオール基付加処理を行い、ゲルろ過カラムにより過剰の反応試薬を除去することによりシリカ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得る。上記で得られたPEGを付加した色素樹脂粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2mM含有したPBS中で混合し、1時間反応させることで色素樹脂粒子とストレプトアビジンとを結合することができる。

【0085】

使用する生体分子認識分子の種類や添加量、反応温度および反応時間等の条件は、色素樹脂粒子および/またはアミノ基導入試薬の性状や蛍光ナノ粒子の用途などを考慮しながら、pH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が所定の条件を満たし、かつ染色対象とする生体分子に十分に結合することができる蛍光ナノ粒子が得られるよう、適切な範囲で調整すればよい。

【0086】

pH6.0~pH8.0の緩衝液中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を外的に調節す

10

20

30

40

50

る場合、緩衝液のpHを調整するか、任意に、タンパク質、界面活性剤、防腐剤などのゼータ電位を調節可能な他の化合物を1種又は2種以上を所定量含有させるによって上記ゼータ電位が0 mV ~ - 10 mVの範囲に入るように総合的に調節してもよい。

【0087】

タンパク質としては、上記ゼータ電位を調節できるものであれば特に制限なく用いることができるが、例えば、BSA等の一般的にブロッキング剤として知られているタンパク質やCaseinなどが挙げられる。タンパク質は、緩衝液全体に対して10重量%以下(例えば1~10重量%の範囲)で含めることが望ましい。

【0088】

界面活性剤としては、上記ゼータ電位を調節できるものであれば特に制限なく用いることができるが、例えば、Tween 20(登録商標)等が挙げられる。界面活性剤は緩衝液全体に対して0.1重量%以下の範囲で含めることが望ましい。

10

【0089】

防腐剤としては、上記ゼータ電位を調節できるものであれば特に制限なく用いることができるが、例えば、アジ化ナトリウム(NaN_3)が挙げられる。防腐剤は、緩衝液中に0.015N以下で含めることが望ましい。

【0090】

〔生体分子を染色および観察する方法〕

以下、生体分子を染色および観察する方法について述べる。

生体分子の染色方法は、上述した蛍光ナノ粒子を用いて生体分子を染色および観察する方法であり、具体的には、(a)蛍光ナノ粒子を用いて細胞を染色する工程、(b)染色した細胞の蛍光色素から発した蛍光を同一視野で撮像する工程、および(c)工程(b)で得られた画像で検出された画素のみを有効な輝点と認識する工程を含む。

20

【0091】

1. 工程(a)について

工程(a)は、生体分子認識分子を有する蛍光ナノ粒子を細胞の生体分子と反応させ、蛍光ナノ粒子の生体分子認識分子と生体分子との間の特異的な結合(抗原抗体反応やストレプトアビジン-ビオチン結合等)を通じて、染色対象の生体分子を染色する工程である。上記染色方法や組織切片の作製は特に限定されず、公知の方法により行うことができる。

30

例えば、病理切片として汎用されているパラフィン包埋切片を組織細胞として用いる場合は、次のような手順で工程(a)を行えばよい。

【0092】

(1) 脱パラフィン処理工程

キシレンを入れた容器に、病理組織細胞の切片を浸漬させ、パラフィンを除去する。このときの温度は特に限定されず、例えば室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でキシレンを交換してもよい。

【0093】

ついで、エタノールを入れた容器に切片を浸漬させてキシレンを除去する。このときの温度は特に限定されず、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

40

【0094】

水を入れた容器に、切片を浸漬させ、エタノール除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

【0095】

(2) 賦活化処理工程

公知の方法にならい、染色対象の生体分子の賦活化処理を行う。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)、1mMEDTA

50

溶液 (pH 8.0)、5%尿素、0.1Mトリス塩酸緩衝液などを用いることができる。加熱機器はオートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバスなどを用いることができる。温度は50~130、時間は5~30分で行うことができる。

【0096】

ついで、PBSを入れた容器に賦活化処理後の切片を浸漬させて洗浄を行う。温度は特に限定されず室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

【0097】

(3) 蛍光ナノ粒子を用いた染色

上述のように調製した蛍光ナノ粒子のPBS分散液(染色液)を病理切片に載せて検出対象とする生体分子と反応させる。このときの温度は特に限定されず室温で行うことができる。反応時間は、30分以上24時間以下であることが好ましい。

【0098】

蛍光ナノ粒子の分散液の濃度は、通常1~0.005nM、好ましくは0.5~0.02nMとすることができる。本発明の蛍光ナノ粒子は、比較的高濃度で用いても、細胞核または組織中のその他の部位への非特異的結合や、蛍光ナノ粒子同士の凝集を抑制することができる。

【0099】

ついで、PBSを入れた容器に、染色後の切片を浸漬させ、未反応の蛍光ナノ粒子の除去を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。なお、組織の形態観察のため、ヘマトキシリン-エオジン染色を行ってもよい。そして、カバーガラスを切片に載せ、封入する。必要に応じて市販封入剤を使用してもよい。

【0100】

2. 工程(b)について

(b)工程(a)で染色した細胞の蛍光色素から発した蛍光を同一視野で撮像する工程が行われる。共焦点の蛍光顕微鏡を用いて三次元情報を含む画像の形で取得することができる。撮影する際、用いた蛍光物質の吸収極大波長および蛍光波長に対応した励起光源および蛍光検出用光学フィルターを選択する。

【0101】

3. 工程(c)について

工程(c)は、工程(b)で得られた画像で検出された画素のみを有効な輝点と認識する工程である。具体的には、(i)工程(b)の撮影画像中のピクセル数、発光輝度を計測し、(ii)発光と認められる発光輝度以上の画像中のピクセルのみを輝点としてカウントして演算処理して輝点データを得る工程が行われる。輝点数または発光輝度から、染色対象の生体分子の発現レベルを計測することができる。輝点数または発光輝度の計測は、市販画像解析ソフト、例えば株式会社ジーオングストローム社製全輝点自動計測ソフト「g-Count」を用いて行うことができる。

【0102】

以下、本発明に係る蛍光ナノ粒子の作用、効果について説明する。

(1) pH 7.0において-10mV~-60mVとなるゼータ電位、または、pH 6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位が0mV~-10mVとなるゼータ電位を有する蛍光ナノ粒子であれば、細胞(細胞内のpHは中性)を染色する時に生体分子と蛍光ナノ粒子とが電氣的に反発して、蛍光ナノ粒子と生体分子との非特異的結合が起こりにくくなる。そして、蛍光ナノ粒子は、染色対象とする生体分子と特異的に結合する生体分子認識分子を備えているので、上記の電氣的な反発力を凌駕する強い相互作用でもって、染色対象とする生体分子と結合することができる。

【0103】

(2) 蛍光色素を有する色素樹脂粒子の表面が、ゼータ電位を調節可能な化合物を用い

10

20

30

40

50

て化学修飾されていれば、例えば生体分子認識分子と色素樹脂粒子とを結合するための化合物を利用してpH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位を上記範囲に調節することができる。

【0104】

(3)前記色素樹脂粒子に対してアミノ基を導入した後、該アミノ基に対してPEGを結合し、このPEGに対して生体分子認識分子を結合することにより前記化学修飾がなされていれば、前記化合物の種類とPEGの種類(PEGの鎖長)との組合せにより、pH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位を調節しやすい。

【0105】

(4)前記アミノ基を有する化合物が色素樹脂粒子と結合した状態で、1個の遊離のアミノ基を有するものであれば、PEGを付加する足場を付加させることができる。また、2個以上の遊離のアミノ基を有するものであれば、PEGを付加する足場を増加させることが可能であり、細胞1個あたりの輝点数を増加させることができる。また、分岐鎖状にPEGを付加できることから、pH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位を調節しやすい。

【0106】

(5)前記PEGのオキシエチレン単位(-CH₂CH₂-O-)の数が4~24であれば、pH7.0の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を-10mV~-60mVの範囲に調節しやすいものとなり、または、pH6.0~8.0の緩衝液中におけるゼータ電位を0mV~-10mVの範囲に調節しやすいものとなる。

【0107】

(6)前記アミノ基を有する化合物が1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE)であれば、オキシエチレン単位(-CH₂CH₂-O-)を有するためにPEGと同様にゼータ電位の調節に寄与させることができる。また、前記アミノ基を有する化合物がトリス(2-アミノエチル)アミン(TAEA)であれば、分岐した3つの末端にそれぞれアミノ基を有し、このうち1つのアミノ基を介してTAEAが色素樹脂粒子に付加されるので、PEG付加の足場の数を2倍にして細胞1個あたりの輝点数を増加することが可能である。

【0108】

(7)前記色素樹脂粒子が熱硬化性樹脂、特にメラミン樹脂であれば、当該熱硬化性樹脂のモノマーと蛍光色素とを用いた重合により色素樹脂粒子を形成する際に、形成される熱硬化性樹脂の網目構造の中に蛍光色素が閉じ込められることから、有機溶媒を用いた系でも蛍光色素の溶出が発生せず、染色する組織切片の脱水・透徹・封入が可能となる。

【0109】

(8)N-succinimidyl-S-acetylthioacetate(SATA)または2-イミノチオランとの反応を経て得られたストレプトアビジンが、前記生体分子認識分子として、前記色素樹脂粒子に結合している蛍光ナノ粒子であれば、生体分子認識分子がアミノ基やSH基で修飾されるため、この修飾によっても蛍光ナノ粒子のゼータ電位を調節することができる。

【0110】

(9)前記緩衝液が、さらに、タンパク質または界面活性剤の少なくともいずれか一方を含むものであれば、タンパク質や界面活性剤の量や種類により、染色液中の蛍光ナノ粒子のゼータ電位を調節しやすい。

【0111】

(10)前記染色が免疫染色であれば、抗原抗体反応以上の非常に高い結合力により生体分子と蛍光ナノ粒子とが結合することになるため、該結合力を下回る広い範囲で生体分子と蛍光ナノ粒子とのゼータ電位による電気的な反発をさせることが可能となる。この結果、蛍光ナノ粒子の製造時に各粒子間でゼータ電位のバラツキが生じても、より確実に蛍光ナノ粒子が染色対象の生体分子との特異的な結合がなされ、精度の高い免疫染色を行う

10

20

30

40

50

ことができる。

【0112】

(11) 蛍光ナノ粒子の平均粒径が300nmを超える場合、染色後の観察の際に細胞1個当たりの輝点数が減って輝点観察がしにくく、逆に、蛍光ナノ粒子の平均粒径が30nm未満の場合、細胞1個当たりの輝点数が増えて輝点観察がしにくい。よって、蛍光ナノ粒子の平均粒径が30~300nmであれば、汎用の蛍光顕微鏡でも好適に輝点観察が可能となる。さらに、蛍光ナノ粒子の平均粒径が40~200nmであれば、より好適に輝点観察が可能となる。

【実施例】

【0113】

以下、本発明に係る実施例とその比較例について図面を参照しながら説明する。

以下の方法により、実施例及び比較例に係る蛍光ナノ粒子の下記表2の項目について計測または評価を行った。

【0114】

(ゼータ電位の測定)

pH7.0の水における蛍光ナノ粒子のゼータ電位については、蛍光ナノ粒子を2mg/mLの濃度で含む水分散液(pH7.0)を調製し、ゼータ電位測定装置(「ゼータサイザーナノ」、Malvern社製)により、そのゼータ電位を測定した。

pH6.0~8.0の緩衝液中の蛍光ナノ粒子のゼータ電位については、蛍光ナノ粒子を2mg/mLの濃度で含むpH6.0~pH8.0の各緩衝液(PBS, Tris-HCl, リン酸緩衝液(PBSを除く))を調製し、ゼータ電位測定装置(「ゼータサイザーナノ」、Malvern社製)により、そのゼータ電位を測定した。

【0115】

(蛍光ナノ粒子の試薬分散性の評価方法)

製造した蛍光ナノ粒子を1% BSAを含有するPBS(リン酸緩衝液生理的食塩水)に最終濃度0.1nMで分散させた溶液を1.5mL調製し、この溶液の580nm励起での発光を蛍光光度測定装置(「F-7000」、日立社製)により計測した。さらに、該溶液を4で1日静置した後、上記同様に吸光度を計測した。計測結果から、以下の式により蛍光ナノ粒子の試薬分散維持率を算出し、試薬分散維持率が95%以上の蛍光ナノ粒子を「○」とし、95%未満の蛍光ナノ粒子を「×」と評価した(表1参照)。

試薬分散維持率 = 1日放置後の吸光度 / 分散直後の吸光度 (×100%)

【0116】

(蛍光ナノ粒子の細胞核への非特異的吸着の評価方法)

ビオチンを付加した抗体による細胞抗原(染色対象の生体分子)に対する抗原抗体反応を行っていない組織アレイスライドに対して、ストレプトアビジンを有する蛍光ナノ粒子の分散液(0.2nM, 0.005nM)を用いてそれぞれ染色した後、これを観察する際に、任意に選択した60個の細胞について、細胞核に存在する輝点の数をImageJ FindMaxima法により計測し、細胞核1個当たりの平均輝点数(=観察した細胞核の輝点数/観察した細胞核の数)を算出して、該値が1個以上であるか否かを基準に評価した。なお、表2において、該値を評価項目「細胞核への吸着」として1個以上のものは「×」、1個未満のものを「○」と表記している。

【0117】

(蛍光ナノ粒子の組織全体への非特異的結合の評価方法)

ビオチンを付加した抗体による細胞抗原(染色対象の生体分子)に対する抗原抗体反応を行っていない組織アレイスライドに対して、ストレプトアビジンを有する蛍光ナノ粒子の分散液(0.2nM)を用いて染色した後、これを観察する際に、任意に選択した60個の細胞について、細胞全体に存在する輝点の数をImageJ FindMaxima法により計測し、細胞1個当たりの平均輝点数(=観察した細胞の輝点数/観察した細胞の数)を算出して、該値が1個以上であるか否かを基準に評価した。なお、表2において、該値を評価項目「組織への吸着」として1個以上のものは「×」、1個未満のものを「○」

10

20

30

40

50

」と表記している。

【0118】

(蛍光ナノ粒子からの色素溶出の評価方法)

ビオチンを付加した抗体による組織アレイスライドの細胞抗原(染色対象の生体分子)に対する抗原抗体反応を行い、該反応後の組織アレイスライドに対して、ストレプトアビジンを有する蛍光ナノ粒子の分散液(0.2 nM)を用いて染色(免疫染色)をした後、これを観察し、蛍光色素の滲みの有無を評価した。表2において、「」は、蛍光色素の滲みが無いことを示し、「x」は蛍光色素の滲みにより輝点を確認できないことを示す。

【0119】

(細胞1個当たりの輝点数(平均細胞輝点数))

10

ビオチンを付加した抗体による組織アレイスライドの細胞抗原(染色対象の生体分子)に対する抗原抗体反応を行い、反応後の組織アレイスライドに対して、ストレプトアビジンを有する蛍光ナノ粒子の分散液(0.2 nM)を用いて染色(免疫染色)した後、これを観察した際に60個の細胞についての輝点数を調べて、細胞1個当たりの平均輝点数(平均細胞輝点数)を算出した。

【0120】

(蛍光ナノ粒子の平均粒径の計測方法)

走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて蛍光ナノ粒子を撮像し、十分な数の粒子について断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときの直径を粒径として求めたものである。本願においては、1000個の粒子の粒径の算術平均を平均粒径とした。

20

【0121】

[実施例1]

以下、本発明に係るメラミン系粒子を製造(調製)した例を説明する。なお、「メラミン系粒子」は、メラミンを主として含む樹脂粒子を意味する。

【0122】

(1)原料調製・混合工程

蛍光色素のスルホローダミン101(「Sulforhodamine 101」、シグマアルドリッチ社製、Texas Red色素)2.5 mgを純水22.5 mLに溶解した。この溶液をホットスターラーで70 に維持しながら20分間攪拌した。次に、水溶性メラミン樹脂「ニカラックMX-035」(日本カーバイド工業社製)1.5 gを前記溶液に加えて、同条件でさらに5分間加熱攪拌した。

30

【0123】

(2)重合工程

加熱攪拌した溶液にギ酸100 μLを加えて、溶液温度を60 に維持しつつ20分間さらに加熱攪拌した。その後、該溶液を放置して室温まで冷却した。

【0124】

(3)洗浄工程

冷却した溶液を遠心用チューブに移して、遠心分離機で12000 rpm、20分間遠心分離した。遠心分離した溶液の上澄みを除去して沈降物のみを回収した。回収した沈降物に対してエタノールを用いてリンスする洗浄をした後、水を用いて同様に洗浄した。

40

【0125】

(4)付加工程

以下に示すように、メラミン系粒子の表面を化学修飾してゼータ電位を調節した。

まず、上記洗浄後の1 nMに調整したメラミン系粒子(色素樹脂粒子)1 mLをエタノールアミン20 μLと混合し、温度70 で1時間反応させた。すなわち、メラミン系粒子へアミノ基を導入した。得られたメラミン系粒子を、2 mMでEDTA(エチレンジアミン四酢酸)を含有するPBS(リン酸緩衝液生理的食塩水)を用いて3 nMに調整した。

【0126】

このメラミン系粒子の溶液に、最終濃度10 mMとなるようにSM(PEG)₄(サー

50

モサイエンティフィック社製、Succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-tetraethyleneglycol]ester)を混合して、室温で1時間反応した。すなわち、上記のようにしてメラミン系粒子に導入したアミノ基に対して、SM(PEG)₄の一端側にあるスクシンイミドエステル基を反応させ、これにより上記メラミン系粒子にSM(PEG)₄を結合させた。

【0127】

この反応液を10000Gで20分間、遠心分離を行い、上澄みを除去して沈降物のみを回収した。その後、EDTAを2mM含有するPBSを加えて沈降物を分散させた。そして、再度、10000Gで20分間、遠心分離を行って上澄みを除去して沈降物のみを回収した。沈降物の分散処理から遠心分離までの一連の操作によるメラミン系粒子の洗浄をさらに3回行った。そして、上記SM(PEG)₄の他端側にあるマレイミド基が粒子表面に存在し、かつ、TexasRed色素を内包したメラミン系粒子を得た。また、該メラミン系粒子の平均粒径について電子顕微鏡を用いて上述した方法により計測したところ、平均粒径が150nmであった。

10

【0128】

一方、該メラミン系粒子に結合可能なストレプトアビジンを以下のように調製した。

まず、1mg/mLに調整したストレプトアビジン(和光純薬工業社製)40μLに対して、64mg/mLに調整した2-Iminothiolane(pierce社製)70μLを室温で1時間より反応させた。すなわち、ストレプトアビジンのアミノ基に対して保護されたチオール基(-NH-CO-CH₂-S-CO-CH₃)を導入した。

20

【0129】

その後、公知のヒドロキシルアミン処理により、保護されたチオール基から遊離のチオール基(-SH)を生成して、ストレプトアビジンにチオール基(-SH)を付加する処理を行った。

【0130】

このストレプトアビジン溶液をゲルろ過カラム(Zaba Spin Desalting Columns:フナコシ)により脱塩し、上記メラミン系粒子に結合可能なストレプトアビジンを得た。

【0131】

このストレプトアビジン全量とEDTAを2mM含有したPBSを用いて上記1nMに調整したメラミン系粒子1mLとを混合し、室温で1時間、両分子を結合する反応を行った。その後EDTAを2mM含有したPBSを用いて遠心、洗浄を行いストレプトアビジンが結合したメラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)のみを回収した。

30

回収した蛍光ナノ粒子のpH7.0の水におけるゼータ電位を測定したところ、-14mVであった。

【0132】

(非特異的結合の確認)

このメラミン系粒子をPBS緩衝液(pH7.4に0.2nMまたは0.005nMとなるように分散させ、組織アレイスライドに塗布し、室温で2時間静置した後、PBS緩衝液により洗浄した。その後、免疫染色も形態観察染色もしていない組織アレイスライドに対してスルホローダミン101の励起光を照射して蛍光色素を発光させた。その状態の組織アレイスライドを蛍光顕微鏡(BX-53,オリンパス社製)により観察および撮像を行い、メラミン系粒子の生体分子への非特異的吸着に起因した蛍光が殆ど観察されないことを確認した。また、輝点計測は、ImageJ FindMaxima法により計測した(表2-実施例1「細胞核への吸着」,「組織全体への吸着」および図1(B)参照)。

40

【0133】

(免疫染色)

上記メラミン系粒子を用いて、ヒト乳房組織の免疫染色と形態観察染色を以下のように行った。染色用の組織切片として、組織アレイスライド(CB-A712のシリーズ,コ

50

スモバイオ社製)を用いた。この組織アレイスライドを脱パラフィン処理した後、水に置換する洗浄を行った。洗浄した組織アレイスライドを10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中で121、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活性化処理を行った。

【0134】

賦活性化処理後の組織アレイスライドを、PBS緩衝液を用いて洗浄した後、湿潤箱中で1時間1%BSA含有PBS緩衝液を用いてブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、1%BSA含有PBS緩衝液で0.05nMに希釈した抗HER2ウサギモノクローナル抗体(4B5)(ペンタナ社製)を組織切片と2時間反応させた。これをPBS緩衝液で洗浄後、1%BSA含有PBS緩衝液で2μg/mLに希釈した4B5に結合する

10

【0135】

(形態観察染色)

免疫染色後、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を行った。免疫染色した切片をマイヤーヘマトキシリン液で5分間染色してヘマトキシリン染色を行った。その後、該切片を45の流水で3分間洗浄した。次に、1%エオジン液で5分間染色してエオジン染色を行った。その後、純エタノールに5分間漬ける操作4回行い、洗浄・脱水を行った

20

【0136】

(観察)

上述したように、前述のメラミン系粒子をPBS緩衝液(pH7.4)に0.2nMとなるように分散させて染色液を製造し、この染色液を組織アレイスライドに塗布し、室温で2時間静置した後、PBS緩衝液により洗浄した。その後、免疫染色および形態観察染色した組織切片に対して所定の励起光を照射して蛍光を発光させた。その状態の組織切片を蛍光顕微鏡(BX-53,オリンパス社製)により観察および撮像を行った。また、輝点計測は、ImageJFindMaxima法により計測した。

30

【0137】

上記励起光は、光学フィルターに通すことで575~600nmに設定した。また、観察する蛍光の波長(nm)の範囲についても、光学フィルターに通すことで612~682nmに設定した。

【0138】

顕微鏡観察、画像取得時の励起波長条件は、580nmの励起では視野中心部付近の照射エネルギーが900W/cm²となるようにした。画像取得時の露光時間は画像の輝度が飽和しないように任意に設定(例えば4000μ秒に設定)して撮像した。そして、上述したように、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

40

【0139】

[実施例2]

以下、本発明に係るポリスチレン系粒子を製造した例を説明する。なお、「ポリスチレン系粒子」は、ポリスチレンを主として含む樹脂粒子を意味する。

【0140】

アルゴンバブリングした純水中5mLにグリシジルメタクリレート(メタクリル酸グリシジル)(東京化成工業社製)0.18g、ジビニルベンゼン0.05g、蛍光色素Sulforhodamine 101(シグマアルドリッチ製、Texas Red色素)0.002gおよび4-アミノスチレン(東京化成工業社製)0.05gを加えた。攪拌

50

しながら70 に昇温し、水溶性アゾ重合開始剤であるV-50（和光純薬社性）を0.012g加え、12時間反応させた。反応液を10000Gで20分遠心分離し、粒子を回収した。回収した粒子を純水に分散し再度遠心分離で回収する事で精製を行なった。得られた粒子を過剰のアンモニア水に加え、粒子末端（グリシジルメタクリレート由来）のエポキシ基をアミノ基へと変換し、末端にアミノ基を持つTexas Red色素を結合したポリスチレンナノ粒子を得た。

【0141】

得られた色素結合ナノ粒子を、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3nMに調整し、この溶液に最終濃度10mMとなるようSM(PEG)₄（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]ester）を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を3回行うことで、末端にマレイミド基が付いた色素内包ナノを得た。

10

【0142】

一方、該ポリスチレン系粒子に結合可能なストレプトアビジンを実施例1と同様にして得た。このストレプトアビジン全量とEDTAを2mM含有したPBSを用いて上記1nMに調整した粒子1mLとを混合し、室温で1時間、両分子を結合する反応を行った。その後EDTAを2mM含有したPBSを用いて遠心、洗浄を行いストレプトアビジンが結合したポリスチレン系粒子（蛍光ナノ粒子）のみを回収した。回収したポリスチレン系粒子のpH7.0の水におけるゼータ電位を、ゼータ電位測定装置（「ゼータサイザーナノ」、Malvern社製）により測定したところ、-22mVであった。

20

【0143】

（免疫染色，形態観察染色，観察）

実施例1のメラミン系粒子の代わりに本実施例2で製造したポリスチレン系粒子を用いたこと以外は、実施例1と同様に免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

30

【0144】

[実施例3]

実施例1において、エタノールアミンの代わりに1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE, 関東化学社製)20μLを用いてメラミン系粒子（蛍光ナノ粒子）を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

【0145】

[実施例4]

実施例1において、エタノールアミンの代わりにトリス(2-アミノエチル)アミン(TAEA, 関東化学社製)20μLを用いてメラミン系粒子（蛍光ナノ粒子）を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

40

【0146】

[実施例5]

実施例1において、エタノールアミンの代わりに1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE, 関東化学社製)20μLを用い、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₁₂を16mg使用してメラミン系粒子（蛍光ナノ粒子）を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す

50

。

【0147】

[実施例6]

実施例1において、エタノールアミンの代わりにトリス(2-アミノエチル)アミン(TAEA, 関東化学社製) 20 μ Lを用いて、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₂₄を32 mg使用してメラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。また、非特異的結合を調べた観察時の写真を図1(D)に示す。

【0148】

[実施例7]

実施例1において、エタノールアミンの代わりに1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE, 関東化学社製) 20 μ Lを用い、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₁₂を16 mg使用してメラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。また、非特異的結合を調べた観察時の写真を図1(C)に示す。

【0149】

[実施例8]

実施例1において、エタノールアミンの代わりに1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE, 関東化学社製) 20 μ Lを用い、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₂を3 mg使用してメラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

【0150】

[実施例9]

実施例1において、エタノールアミンの代わりに1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン(BAEE, 関東化学社製) 20 μ Lを用い、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₄₄を59 mg使用してメラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)を製造したこと以外は、実施例1と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

【0151】

[実施例10]

実施例1において、エタノールアミンの代わりにトリス(2-アミノエチル)アミン(TAEA, 関東化学社製) 20 μ Lを用いて、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₂₄を32 mg使用してメラミン系粒子を平均粒径28 nmに製造したこと以外は、実施例1と同様にして、メラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)の製造、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

【0152】

[実施例11]

実施例1において、エタノールアミンの代わりにトリス(2-アミノエチル)アミン(TAEA, 関東化学社製) 20 μ Lを用いて、かつ、SM(PEG)₄の代わりにSM(PEG)₂₄を32 mg使用してメラミン系粒子を平均粒径310 nmに製造したこと以外は、実施例1と同様にして、メラミン系粒子(蛍光ナノ粒子)の製造、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価をそれぞれ行なった。この結果を表2に示す。

【0153】

[比較例1]

10

20

30

40

50

実施例 1 において、エタノールアミンによるアミノ基導入および $SM(PEG)_4$ による PEG 付加を行わず、色素樹脂粒子にストレプトアビジンを直接的に結合させてメラミン系粒子を製造したこと以外は、実施例 1 と同様にして、免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価をそれぞれ行なった。この結果を表 2 に示す。また、非特異的結合を調べた観察時の写真を図 1 (A) に示す。

【0154】

なお、重合直後のメラミン系粒子に対してストレプトアビジンを直接結合する方法については、以下のように行った。

1 mL の懸濁液として 10% のメラミン粒子群を含むもの (= 100 mg の固体) をエッペンドルフキャップに計量して入れ、1 mL の 50 mM MES バッファ (2 - モルホリンエタンスルホン酸 (Merck) pH 5.5) に懸濁せしめ、続いて超遠心器によって 60,000 rpm にて遠心分離する。上清を廃棄し、洗浄操作を繰り返す。次に粒子群を 1 mL の MES バッファ中に再懸濁せしめ、密封可能なガラス管に移す。100 μ L の EDC/NHS 溶液 (100 mg/mL の EDC、16 mg/mL の N - ヒドロキシスクシンイミド (Merck) が MES バッファ中に存在する) を添加する。メラミン粒子群の懸濁状態を、室温にて 1 時間回転させて保つ。この間に NHS が粒子表面上のカルボキシル基とカップリングする。サンプルを再遠心し、上清を廃棄する。混合物の洗浄を、1 mL の MES バッファを用いて再度行う。粒子群を 1 mL のタンパク質 (ストレプトアビジン) 溶液中に再懸濁せしめ、室温にて一晩回転する。対応するサンプルを 1 mL の MES バッファ (EDC/NHS およびタンパク質溶液を添加しない) 中に再懸濁せしめ、室温にて一晩回転する。サンプルを遠心分離にかけ、1 mL のエタノールアミン溶液を添加した後、サンプルをさらに 1 時間回転し、再遠心に付する。エタノールアミンが残存している活性化エステルと反応し、アミドを生成する。次に混合物の洗浄を、1 mL の PBS バッファを都度用いて 3 回行う。最後に粒子群を PBS バッファに再懸濁せしめ、冷蔵庫中に 4 週間にて保存可能にする。

【0155】

[比較例 2]

実施例 1 において、エタノールアミンの代わりに 3 - アミノプロピルトリエトキシラン (APS) 20 μ L を用いてアミノ基の付加をしたこと、および、 $SM(PEG)_4$ の代わりに $SM(PEG)_{12}$ を 16 mg 使用したこと以外は、実施例 1 と同様に免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価等をそれぞれ行なった。この結果を表 2 に示す。

【0156】

なお、APS ($H_2N - C_3H_6 - Si(OC_2H_5)_3$) は、メラミン系粒子のゼータ電位を下げるために用いられ、APS 分子のエトキシ基が加水分解されて生じた反応性シラノール基 ($-SiOH$) がメラミン系粒子のアミノ基と反応して APS 分子がメラミン系粒子に付加される。

【0157】

[比較例 3]

実施例 1 において、エタノールアミンの代わりに 3 - アミノプロピルトリエトキシラン (APS) 20 μ L と、テトラエトキシシラン (TEOS) 4 μ L を付加したこと、および、 $SM(PEG)_4$ の代わりに $SM(PEG)_{12}$ 16 mg とを使用したこと以外は、実施例 1 と同様に免疫染色、形態観察染色および観察を行い、試薬分散性、核への吸着および組織全体への吸着の評価をそれぞれ行なった。この結果を表 2 に示す。

【0158】

なお、上記 APS に加えて TEOS ($Si(OC_2H_5)_4$) は、メラミン系粒子のゼータ電位を下げるために用いられ、APS 分子のエトキシ基が加水分解されて生じた反応性シラノール基 ($-SiOH$) がメラミン系粒子のアミノ基と反応して TEOS 分子がメラミン系粒子に付加される。

【 0 1 5 9 】

(考 察)

免疫染色時の環境 pH である中性の pH 環境 (pH 6 . 9 ~ 7 . 4) において、樹脂粒子の表面を化学修飾するエタノールアミン、TAEA, およびBAEE等のアミノ基を導入する化合物の選択や、同じく化学修飾するPEGの鎖長を変更して、メラミン系粒子またはポリスチレン系の pH 7 . 0 の水中における蛍光ナノ粒子のゼータ電位を - 1 4 m V ~ - 6 0 m v に設定し、さらに pH 7 . 4 の緩衝液に分散させて染色液として用いることにより、上記細胞内の生体分子への蛍光ナノ粒子の非特異的結合を抑制しつつ、ストレプトアビジンとビオチンの特異的結合 (生体分子認識) のみを起こさせることができた (表 1、図 1 参照)。この結果、染色対象とする細胞内の生体分子のみを特異的に染色することができた (図 1 の実施例 6 または 7 と比較例 1 とを対比して参照)。

10

【 0 1 6 0 】

【 表 2 】

	粒子構成 (*1)	ゼータ電位	試薬の分散性 (*2)	細胞核への吸着 (*3)		組織全体への吸着 (*4)	色素の溶出 (*5)	平均細胞輝点数 (評価) *6
				粒子濃度 (nM) 0.2	0.005			
比較例 1	メラミン系粒子 (150nm)+SA	28 mV	○	×	×	○	○	吸着が多く輝点を分離できず計測不可
比較例 2	メラミン系粒子 (150nm)+PEG12 (APS)+SA	-6 mV	×	×	○	○	○	吸着が多く輝点を分離できず計測不可
比較例 3	メラミン系粒子 (150nm)+PEG12 (APS+TEOS)+SA	-66 mV	○	○	○	×	○	吸着が多く輝点を分離できず計測不可
実施例 1	メラミン系粒子 (150nm)+PEG4 (エタノールアミン)+SA	-14 mV	○	○	○	○	○	14 (Δ)
実施例 2	ポリスチレン系粒子 (100nm)+PEG4 (BAEE)+SA	-22 mV	○	○	○	○	×	34 (○*7)
実施例 3	メラミン系粒子 (150nm)+PEG4 (BAEE)+SA	-23 mV	○	○	○	○	○	38 (○)
実施例 4	メラミン系粒子 (150nm)+PEG4 (TAEA)+SA	-22 mV	○	○	○	○	○	36 (○)
実施例 5	メラミン系粒子 (150nm)+PEG24 (BAEE)+SA	-33 mV	○	○	○	○	○	39 (○)
実施例 6	メラミン系粒子 (150nm)+PEG24 (TAEA)+SA	-38 mV	○	○	○	○	○	34 (○)
実施例 7	メラミン系粒子 (150nm)+PEG12 (BAEE)+SA	-48 mV	○	○	○	○	○	42 (○)
実施例 8	メラミン系粒子 (150nm)+PEG2 (BAEE)+SA	-28 mV	○	○	○	○	○	13 (Δ)
実施例 9	メラミン系粒子 (150nm)+PEG44 (BAEE)+SA	-58 mV	○	○	○	○	○	18 (Δ)
実施例 10	メラミン系粒子 (28nm)+PEG24 (TAEA)+SA	-23 mV	○	○	○	○	○	計測不可、輝度のみ計測可 (Δ)
実施例 11	メラミン系粒子 (310nm)+PEG24 (TAEA)+SA	-28 mV	○	○	○	○	○	9 (Δ)

20

30

40

APS:3-アミノプロピルトリエトキシラン, PEG:ポリエチレン glycol, TEOS:テトラエトキシラン,

BAEE:1,2-ビス(2-アミノエチル)エタン, SA:ストレプトアビジン, TAEA:トリス(2-アミノエチル)アミン

*1: 粒子構成の括弧内に示す長さは、蛍光ナノ粒子の平均粒径を示す。

*2: 1日保存後の沈殿: あり「×」、なし「○」

*3: 1細胞核当たりの平均輝点数: 「×」=1個以上、「○」=1個未満

*4: 1細胞当たりの平均輝点数: 「×」=1個以上、「○」=1個未満

*5: 観察時の蛍光色素の滲み: 「×」=あり、「○」=なし

*6: 60個の細胞についての細胞1個当たりの平均輝点数

*7: 但し、観察は水系封入剤で行う

【 0 1 6 1 】

[実施例 1 3]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を PBS (pH 7 . 4) に 2 m g / m L となるよう

50

に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -6.7 mV であった。そして、この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ調製し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

【0162】

[実施例14]

実施例7で調製したメラミン系粒子をDako希釈液(ダコ・ジャパン社製「Antibody Diluent, Background Reducing」、製品番号S3022)($\text{pH}7.8$)に 2 mg/mL となるように分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -7.8 mV であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

10

【0163】

[実施例15]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを1重量%含有するPBS($\text{pH}7.2$)に 2 mg/mL となるように分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -7.3 mV であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

【0164】

[実施例16]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを5重量%含有するPBS($\text{pH}7.1$)に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -7.0 mV であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

20

【0165】

[実施例17]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを10重量%含有するPBS($\text{pH}7.0$)に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -6.6 mV であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

30

【0166】

[実施例18]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを20重量%で含有するPBS($\text{pH}7.0$)に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -4.6 mV であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

40

【0167】

[実施例19]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、1重量%のBSA、0.1重量%のTween 20(登録商標)及び 0.015 N のアジ化ナトリウム(NaN_3)を組成として有するPBS($\text{pH}7.3$)に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、 -2.4 mV であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0.2 nM 、 0.005 nM に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

【0168】

[実施例20]

50

実施例7で調製したメラミン系粒子を、5重量%のBSA、0.1%のTween 20（登録商標）及び0.015Nの NaN_3 を組成として有するPBS（pH7.2）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-2.0mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

【0169】

[実施例21]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、10重量%のBSA、0.1重量%のTween 20（登録商標）及び0.015Nの NaN_3 を組成として有するPBS（pH7.2）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-2.2mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

10

【0170】

[実施例22]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを10重量%で含有する50mMのTris-HCl（pH7.5）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-9.6mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

20

【0171】

[実施例23]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを10重量%で含有する50mMのTris-HCl（pH7.5）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-9.6mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

【0172】

[実施例24]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを1重量%含有する50mMのリン酸緩衝液（pH6.2）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-6.9mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

30

【0173】

[実施例25]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを5重量%で含有する50mMのリン酸緩衝液（pH6.1）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-6.6mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

40

【0174】

[実施例26]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを10重量%で含有する50mMのリン酸緩衝液（pH6.0）に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-6.5mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表3に示す。

【0175】

50

【表3】

例	粒子構成 (*1)	緩衝液	添加剤	緩衝液中の蛍光ナノ粒子のゼータ電位	試薬分散性 (*2)	細胞核への吸着 (*3)		組織全体への吸着 (*4)	緩衝液のpH	色素の溶出 (*5)	輝点の有無 (○=あり、×=なし)
						0.2	0.005				
実施例 13	メラミン系粒子 (150nm) +PEG12 (BAE E) +SA	PBS	-	-6.7mV	○	○	○	○	7.4	○	○
実施例 14		Dako希釈液	-	-7.8mV	○	○	○	○	7.8	○	○
実施例 15		PBS	1%BSA	-7.3mV	○	○	○	○	7.2	○	○
実施例 16		PBS	5%BSA	-7.0mV	○	○	○	○	7.1	○	○
実施例 17		PBS	10%BSA	-6.6mV	○	○	○	○	7.0	○	○
実施例 18		PBS	20%BSA	-4.6mV	○	○	○	○	7.0	○	○
実施例 19		PBS	1%BSA 0.1%Tween20 0.015N ₃	-2.4mV	○	○	○	○	7.3	○	○
実施例 20		PBS	5%BSA 0.1%Tween20 0.015N ₃	-2.0mV	○	○	○	○	7.2	○	○
実施例 21		PBS	10%BSA 0.1%Tween20 0.015N ₃	-2.2mV	○	○	○	○	7.2	○	○
実施例 22		Tris-HCl	10%BSA	-9.6mV	○	○	○	○	7.5	○	○
実施例 23		Tris-HCl	10%BSA 0.1%Tween20 0.015N ₃	-7.6mV	○	○	○	○	7.1	○	○
実施例 24		リン酸	1%BSA	-6.9mV	○	○	○	○	6.2	○	○
実施例 25		リン酸	5%BSA	-6.6mV	○	○	○	○	6.1	○	○
実施例 26		リン酸	10%BSA	-6.5mV	○	○	○	○	6.0	○	○

10

20

30

【0176】

[比較例4]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、50mMのTris-HCl (pH7.8)に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-12.2mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表4に示す。

40

【0177】

[比較例5]

実施例7で調製したメラミン系粒子を、BSAを1重量%で含む50mMのTris-HCl (pH7.8)に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、-12.6mVであった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を0.2nM、0.005nMに調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例1と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表4に示す。

【0178】

50

[比較例 6]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を、B S A を 5 重量 % で含む 5 0 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 6) に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、- 1 1 . 9 m V であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0 . 2 n M 、 0 . 0 0 5 n M に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例 1 と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表 4 に示す。

【 0 1 7 9 】

[比較例 7]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を、1 重量 % の B S A 、 0 . 1 重量 % の T w e e n 2 0 (登録商標) 、 0 . 0 1 5 N の N a N ₃ を組成として含む 5 0 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 5) に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、- 1 4 . 0 m V であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0 . 2 n M 、 0 . 0 0 5 n M に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例 1 と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表 4 に示す。

【 0 1 8 0 】

[比較例 8]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を、5 重量 % の B S A 、 0 . 1 重量 % の T w e e n 2 0 (登録商標) 、 0 . 0 1 5 N の N a N ₃ を組成として含む 5 0 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 2) に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、- 1 0 . 1 m V であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0 . 2 n M 、 0 . 0 0 5 n M に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例 1 と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表 4 に示す。

【 0 1 8 1 】

[比較例 9]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を、T w e e n 2 0 (登録商標) を 0 . 1 重量 % 含む 5 0 m M の T r i s - H C l (p H 5 . 2) に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、- 2 8 . 2 m V であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0 . 2 n M 、 0 . 0 0 5 n M に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例 1 と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表 4 に示す。

【 0 1 8 2 】

[比較例 1 0]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を、0 . 1 重量 % で D I S P E R B Y K - 2 0 1 0 (登録商標) (ビックケミー・ジャパン社製) を含有する 5 0 m M の T r i s - H C l 緩衝液 (p H 5 . 8) に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、- 3 2 . 2 m V であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0 . 2 n M 、 0 . 0 0 5 n M に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例 1 と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表 4 に示す。

【 0 1 8 3 】

[比較例 1 1]

実施例 7 で調製したメラミン系粒子を、0 . 1 重量 % で D I S P E R B Y K - 2 0 1 5 (登録商標) (ビックケミー・ジャパン社製) を含有する 5 0 m M の T r i s - H C l 緩衝液 (p H 5 . 4) に分散させた状態で該メラミン系粒子のゼータ電位を測定したところ、- 2 7 . 7 m V であった。この分散液中の上記メラミン系粒子の濃度を 0 . 2 n M 、 0 . 0 0 5 n M に調整して染色液をそれぞれ製造し、実施例 1 と同様に、非特異的結合の確認、免疫染色、形態観察染色、および観察等を行なった。この結果を表 4 に示す。

【 0 1 8 4 】

10

20

30

40

【表4】

例	粒子構成	緩衝液	添加剤	緩衝液中の蛍光ナノ粒子のゼータ電位	試薬分散性(*2)	細胞核への吸着(*3)		組織全体への吸着(*4)	緩衝液のpH	色素の溶出(*5)	輝点の有無(○=あり、×=なし)
						粒子濃度(nM)					
						0.2	0.005				
比較例4	メラミン系粒子(150nm)+PEG12(BAEE)+SA	Tris-HCl	-	-12.2mV	○	○	○	○	7.8	○	×
比較例5		Tris-HCl	1%BSA	-12.6mV	○	○	○	○	7.8	○	×
比較例6		Tris-HCl	5%BSA	-11.9mV	○	○	○	○	7.6	○	×
比較例7		Tris-HCl	1%BSA 0.1%Tween20 0.015N ₃	-14.0mV	○	○	○	○	7.5	○	×
比較例8		Tris-HCl	5%BSA 0.1%Tween20 0.015N ₃	-10.1mV	○	○	○	○	7.2	○	×
比較例9		Tris-HCl	0.1%Tween20	-28.2mV	○	○	○	○	5.2	○	×
比較例10		Tris-HCl	0.1%DISPERBYK-2010	-32.2mV	○	○	○	○	5.8	○	×
比較例11		Tris-HCl	0.1%DISPERBYK-2015	-27.7mV	○	○	○	○	5.4	○	×

10

20

【0185】

(結果・考察)

実施例7で調製したメラミン系粒子を、pH6.0~8.0のPBS緩衝液に分散させて、当該pH緩衝液中におけるゼータ電位を0mV~-10mVとすることで、メラミン系粒子の試薬分散性に優れ、細胞核や組織全体への非特異的吸着が抑制されるとともに、平均細胞輝点数の評価は全て「 \square 」となった(実施例13)。上記ゼータ電位の値に影響を与えるBSAやTween20(登録商標)等を組成分として加えても、緩衝液中のメラミン系粒子のゼータ電位が上記範囲内であれば、同様の効果が得られた(実施例15~21)。さらに、PBS緩衝液をDako希釈液、Tris-HCl、またはリン酸緩衝液に変更しても緩衝液中のメラミン系粒子のゼータ電位が上記範囲内であれば、同様の効果が得られた(実施例14、22~26)。

30

さらに、緩衝能を有するTris-HClを用いた場合、緩衝液中のメラミン系粒子のゼータ電位が0mV~-10mVに入らない場合には、輝点が得られなかった(比較例4~11)。

これらの結果から、染色液として、(1)pH6.0~8.0の緩衝液にメラミン系粒子を分散させて、当該緩衝液中におけるメラミン系粒子のゼータ電位が0mV~-10mVであることが輝点を得るのに必要と考えられる。また、前述したように、実施例7と粒子構成が異なる実施例1-6、8-11のメラミン系粒子(表2参照)についても、実施例13と同様にPBS緩衝液(pH7.4)に分散させて得られる染色液を用いた染色により輝点が得られていることから上記のことが理解できる(表2参照)。

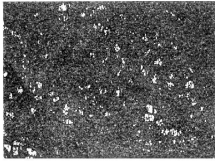
40

【0186】

以上、本発明に係る実施の形態および実施例を、図面を参照しながら説明してきたが、本発明はこれら実施の形態および実施例に限定されず、その要旨を逸脱しない限り、設計変更等は許容される。

【 1】

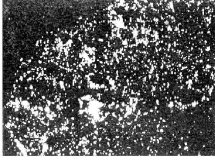
(A)



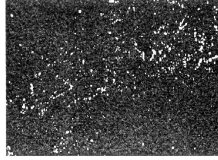
(B)



(C)



(D)



フロントページの続き

(出願人による申告)平成25年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発/超早期高精度診断システムの研究開発:病理画像等認識技術の研究開発/病理画像等認識自動化システムの研究開発(1粒子蛍光ナノイメージングによる超高精度がん組織診断システム)」共同研究産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 岡田 文徳
東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内

審査官 吉田 将志

(56)参考文献 国際公開第2013/059528(WO, A1)
米国特許出願公開第2012/0190049(US, A1)
国際公開第2010/082681(WO, A1)
国際公開第2013/035703(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/533、536、543
B82Y 5/00
30/00
40/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
MEDLINE(STN)

专利名称(译)	用于生物分子染色的荧光纳米颗粒及其制备方法		
公开(公告)号	JP6354754B2	公开(公告)日	2018-07-11
申请号	JP2015522629	申请日	2014-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	郷田秀樹 高橋優 高梨健作 岡田文徳		
发明人	郷田 秀樹 高橋 優 高梨 健作 岡田 文徳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/536 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/54346 B82Y5/00 B82Y15/00 B82Y30/00 B82Y40/00 C09B67/0013 C09B68/41 C09B68/444		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/536.D G01N33/533		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	2013128412 2013-06-19 JP		
其他公开文献	JPWO2014203614A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在pH 7.0下具有-10mV至-60mV的ζ电位的荧光纳米颗粒或在0mV至-10mV的范围内在pH6.0至8.0的缓冲液中具有ζ电位的荧光纳米颗粒通常是在带负电的生物分子和荧光纳米颗粒之间可以产生适度的电排斥力。结果，荧光纳米颗粒和生物分子之间的非特异性结合被抑制，并且待染色的荧光纳米颗粒和生物分子被超过电排斥力的相互作用特异性结合，并且特异性地结合。可以提高待染色的生物分子的可见度。另外，在荧光纳米颗粒之间产生适度的电排斥力，从而可以抑制其聚集并且还可以保持染色液的分散性。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6354754号 (P6354754)
(45) 発行日 平成30年7月11日 (2018. 7. 11)	(24) 登録日 平成30年6月22日 (2018. 6. 22)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 33/536 (2006. 01)	GO 1 N 33/536 D	
GO 1 N 33/533 (2006. 01)	GO 1 N 33/533	
請求項の数 16 (全 33 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-522629 (P2015-522629)	(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社	
(86) (22) 出願日 平成26年4月23日 (2014. 4. 23)	東京部千代田区丸の内二丁目7番2号	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/061407	110001070	
(87) 国際公開番号 W02014/203614	特許業務法人 S S I N P A T	
(87) 国際公開日 平成26年12月24日 (2014. 12. 24)	郷田 秀樹	
審査請求日 平成28年9月26日 (2016. 9. 26)	(72) 発明者 郷田 秀樹 東京部千代田区丸の内二丁目7番2号 コ	
(31) 優先権主張番号 特願2013-128412 (P2013-128412)	ニカミノルタ株式会社内	
(32) 優先日 平成25年6月19日 (2013. 6. 19)	(72) 発明者 高橋 優 東京部千代田区丸の内二丁目7番2号 コ	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	ニカミノルタ株式会社内	
	(72) 発明者 高梨 健作 東京部千代田区丸の内二丁目7番2号 コ	
	ニカミノルタ株式会社内	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 生体分子染色用の蛍光ナノ粒子およびその製造方法