

(19)日本国特許庁(J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

**特開2003 - 329686**

(P2003 - 329686A)

(43)公開日 平成15年11月19日(2003.11.19)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/553		G 0 1 N 33/553	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/76		C 0 7 K 14/76	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	U
33/543	525	33/543	525 U

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 7 数)

(21)出願番号 特願2002 - 134676(P2002 - 134676)

(22)出願日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(71)出願人 502166880  
花木 賢一  
東京都新宿区西早稲田1 - 11 - 4 - 1001

(71)出願人 502165942  
山本 健二  
東京都文京区西方1 - 8 - 18

(71)出願人 502165953  
山口 由岐夫  
東京都文京区本郷7 - 3 - 1

(72)発明者 花木 賢一  
東京都新宿区西早稲田1 - 11 - 4 - 1001

(74)代理人 100086586  
弁理士 安富 康男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 発光性微粒子

(57)【要約】

【課題】 生体関連物質、環境関連物質等の標的物質の高感度測定法に用いる分子認識発光性マ-カ-物質として好適であり、高塩又は酸性溶液をはじめ、生物溶媒で分散安定性に優れる発光性微粒子を提供する。

【解決手段】 極性官能基を有する高分子が表面に物理的及び/又は化学的に接合している発光性微粒子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 極性官能基を有する高分子が表面に物理的及び/又は化学的に接合していることを特徴とする発光性微粒子。

【請求項2】 極性官能基を有する高分子は、酸性条件下及び/又は塩基性条件下でイオン化する官能基を有することを特徴とする請求項1記載の発光性微粒子。

【請求項3】 極性官能基を有する高分子は、天然高分子であることを特徴とする請求項1又は2記載の発光性微粒子。

【請求項4】 極性官能基を有する高分子は、タンパク質であることを特徴とする請求項1、2又は3記載の発光性微粒子。

【請求項5】 タンパク質は、免疫反応不活性タンパク質であることを特徴とする請求項4記載の発光性微粒子。

【請求項6】 タンパク質は、アルブミンであることを特徴とする請求項4又は5記載の発光性微粒子。

【請求項7】 請求項1、2、3、4、5又は6記載の発光性微粒子に分子認識物質を吸着又は結合してなることを特徴とする分子認識発光性微粒子。

【請求項8】 発光性微粒子と分子認識物質とがピオチン及びアビジンを介して結合してなることを特徴とする請求項7記載の分子認識発光性微粒子。

【請求項9】 請求項7又は8記載の分子認識発光性微粒子を用いることを特徴とする標的物質の検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体関連物質、環境関連物質等の標的物質の高感度測定法に用いる分子認識発光性マーカー物質として好適であり、高塩又は酸性溶液をはじめ、生物溶媒で分散安定性に優れる発光性微粒子に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、生体内に含まれるタンパク質、ウイルス、核酸等の生体関連物質や、ダイオキシン、金属イオン等の環境関連物質を高感度に測定する方法として、分子認識物質を蛍光体等のマーカー物質に結合した分子認識体を用いる方法が多用されている。しかし、従来用いられていた蛍光体等のマーカー物質は、発光効率が低く感度の点で必ずしも満足できず、また、一定の波長の光しか発することができないことから、一時に複数の検体を検出する等の複雑な測定に用いることは困難であった。

【0003】近年、マーカー物質となる分子認識発光性微粒子として、半導体超微粒子(以下、半導体ナノ粒子ともいう)が注目されている。半導体ナノ粒子はバルク結晶における励起子ボア半径と同等の粒子径を有する半導体の超微粒子(超微結晶)であり、量子閉じ込め効果の発現によって光学スペクトル、すなわち吸収スペク

トル及び蛍光スペクトルを粒子径によって調節することが可能である。すなわち、粒子径によって異なる波長の光を発し得る。

【0004】半導体ナノ粒子は、通常、粒径が0.5~100nm、好ましくは0.5~50nm、より好ましくは1~10nmである超微粒子である。またこの半導体ナノ粒子の種類としては、例えば、CuCl等のI-VII族化合物半導体、CdS、CdSe等のII-VI族、InAs等のIII-V族化合物半導体、IV族半導体等の半導体結晶等が挙げられる。このような半導体ナノ粒子はコロイド化学的合成法により合成され、その表面は一般に界面活性剤及び/又は表面修飾剤で被覆され、安定化されている。

【0005】高い量子効率を有し、かつ、粒子径分布が狭い半導体ナノ粒子を得るための合成法は限定されており、これらの方法によれば得られるナノ粒子の表面は疎水性となる場合が多い。しかし、表面が疎水性では、標的となるタンパク質、ウイルス、核酸等の生体関連物質との反応性が低下し高い感度で検出することが困難となる。また、半導体ナノ粒子は、ファンデルワールス力により粒子同士が凝集しやすく、測定中にも凝集が起こってしまうことから、凝集が起こる前に測定を終了しなくてはならないという問題もあった。

【0006】そこで、生体内へ導入して用いる場合には半導体ナノ粒子の表面を親水化すると同時に、半導体ナノ粒子同士が凝集することを防ぐ必要があった。半導体ナノ粒子表面の親水化としては、例えば、WO00/17656「WATER-SOLUBLE THIOL-CAPPED NANOCRYSTALS」に記載されているような方法が報告されている。この方法は、半導体ナノ粒子の表面にカルボキシル基等の極性を有する官能基をグラフトすることにより、官能基の有するイオンの電荷同士の反発により粒子の凝集を防ぐというものである。

【0007】しかしながら、この方法では試験条件を厳密にコントロールできるin vitro試験であっても長期間の分散性は不安定であり、更に、in vivo試験では、高塩濃度の生体内であることから、生体内に存在するイオンによって粒子表面にグラフトされた官能基の電荷が打ち消されてしまい、凝集を防ぐことはできなかった。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記現状に鑑み、生体関連物質、環境関連物質等の標的物質の高感度測定法に用いる分子認識発光性微粒子のマーカー物質として好適であり、高塩又は酸性溶液をはじめ、生物溶媒で分散安定性に優れる発光性微粒子を提供することを目的とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、極性官能基を

有する高分子が表面に物理的及び/又は化学的に接合している半導体ナノ粒子からなる発光性微粒子である。以下に本発明を詳述する。

【0010】本発明の発光性微粒子は、極性官能基を有する高分子が表面に物理的及び/又は化学的に接合していることを特徴とする半導体ナノ粒子からなる。上記半導体ナノ粒子としては特に限定されず、例えば、CuCl等のI-VII族化合物半導体、CdS、CdSe等のII-VI族、InAs等のIII-V族化合物半導体、IV族半導体等の半導体結晶、TiO<sub>2</sub>等の金属酸化物、フタロシアニン、アゾ化合物等の有機化合物からなるもの、またはそれらの複合材料等が挙げられる。かかる複合材料としては、例えば、CdSをコア-CdSeをシェル、CdSeをコア-CdSをシェル、CdSをコア-ZnSをシェル、CdSeをコア-ZnSをシェル、CdSeのナノ結晶をコア-ZnSをシェル、CdSeのナノ結晶をコア-ZnSeをシェル、Siをコア-SiO<sub>2</sub>をシェルとするコア-シェル構造を有するもの等が挙げられる。

【0011】なお、上記半導体ナノ粒子としては、本発明の目的を損なわない範囲であれば、表面を化学的又は物理的に修飾されたものであってもよく、また、界面活性剤、分散安定剤又は酸化防止剤等の添加剤を加えたものであってもよい。このような半導体ナノ粒子は、コロイド化学的方法、例えば、逆ミセル法(Liano *s*, P. *et al.*, Chem. Phys. Lett., 125, 299 (1986))やホットソープ法(Peng, X. *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 119, 7019 (1997))等によって合成することができる。

【0012】上記半導体ナノ粒子の粒子径の好ましい下限は0.5nm、上限は100nmである。0.5nm未満であると原子又は分子そのものとなってしまう、100nmを超えると、バルクの性質となってしまうことがある。より好ましい下限は0.5nm、上限は50nm、更に好ましい下限は1nm、上限は10nmである。上記半導体ナノ粒子の形状としては特に限定されず、例えば、球状、棒状、板状、薄膜状、繊維状、チューブ状等が挙げられる。なかでも球状が好ましい。

【0013】本発明の発光性微粒子では、上記半導体ナノ粒子の表面に極性官能基を有する高分子が物理的及び/又は化学的に接合している。極性官能基を有する高分子を物理的及び/又は化学的に接合させることにより、高分子の有する極性官能基同士の電気的な反発により粒子の凝集を防ぐことができる。上記極性官能基を有する高分子は、酸性条件下及び/又は塩基性条件下でイオン化する官能基を有することが好ましい。一般に生体内は、部位により酸性条件にも塩基性条件にもなり得るが、酸性条件下でイオン化する官能基と塩基性条件下でイオン化する官能基とを両方同時に有することにより、

酸性条件下でも塩基性条件下でも表面の極性官能基がイオン化し得るので、静電反発力により粒子の凝集を防ぐことができる。かかる官能基としては、例えば、カルボキシル基、スルホニル基、リン酸基、アンモニウム基等が挙げられる。更に、生体内での測定に供することから、上記極性官能基を有する高分子としては天然物であることが好ましい。

【0014】このような種々の要件を満たしうる高分子としては特にタンパク質が好適である。タンパク質と半導体ナノ粒子とを結合させることにより、本発明の発光性微粒子は生体内でも安定した分散安定性を示すとともに、該タンパク質の本来有する機能をも発現することができ、生体内の生体関連物質、環境関連物質等の標的物質の測定に利用することができる。例えば、タンパク質として、細胞膜透過性を有するタンパク質を用いれば、細胞を破壊することなく細胞内に存在する標的物質の分析にも用いることができる。また、上記タンパク質としては免疫反応不活性タンパク質であることが好ましい。免疫反応不活性タンパク質であれば、生体内に用いても、生体の免疫機構によって排除されることなく測定を行うことができる。

【0015】かかるタンパク質としては、具体的には例えば、アルブミン、ミオグロビン、カゼイン等が挙げられる。なかでもアルブミンは、後述の分子認識物質との結合の面でも優れており好適である。

【0016】上記半導体ナノ粒子と上記極性官能基を有する高分子とは、物理的及び/又は化学的に接合されている。上記結合の態様としては特に限定されず、化学吸着、物理吸着、配位、水素結合、イオン結合、共有結合等が挙げられる。結合の安定性から、結合力の強い結合様式により結合されていることが好ましい。なお、本発明の目的を損なわない範囲で、直接的接合のほかに間接的接合、すなわち該半導体ナノ粒子表面と該高分子との間に接合を媒介する他の有機分子が存在していてもよい。また、上記極性官能基を有する高分子は、上記半導体ナノ粒子表面を取り囲むようにして複数結合していることが好ましい。極性官能基を有する高分子の半導体ナノ粒子表面の被覆率が高まることにより、本発明の発光性微粒子の分散安定性がより向上する。

【0017】本発明の発光性微粒子を作製する方法としては特に限定されず、例えば、上記半導体ナノ粒子を、アルブミン溶液に浸漬する方法等が挙げられる。この方法により、半導体ナノ粒子の表面にアルブミンが物理吸着される。

【0018】本発明の発光性微粒子は、表面に物理的及び/又は化学的に極性官能基を有する高分子が接合していることから、高分子の有する極性官能基同士の電気的反発により粒子の凝集を防ぐことができる。特に極性官能基を有する高分子としてタンパク質を用いる場合には、生体内でも安定した分散状態を保ち、かつ、細胞膜

を通過して細胞を破壊することなく細胞内に侵入させること等が可能となる。また、本発明の発光性微粒子は、半導体ナノ粒子を用いることから、励起光照射によって高輝度の蛍光（フォトルミネッセンス）を発生し、微量成分の高感度測定に好適に用いることができる。また、粒子径の異なる半導体ナノ粒子からなる本発明の発光性微粒子を目的に応じて使い分けることにより、発光スペクトルを任意に調節・設計可能であり、より精密な測定への応用を図ることができる。

【0019】本発明の発光性微粒子に分子認識物質を吸着及び/又は結合してなる分子認識発光性微粒子は、生体関連物質、環境関連物質等の標的物質の高感度測定法に好適に用いることができる。かかる分子認識発光性微粒子もまた、本発明の1つである。

【0020】上記分子認識物質とは、標的物質に特異的に反応するものであれば特に限定されないが抗原、抗体等のタンパク質、DNA、シクロデキストリン、クラウンエーテル等の環状化合物等が挙げられる。

【0021】本発明の分子認識発光性微粒子を作製する方法としては特に限定されず、例えば、物理的吸着法や化学的結合法等が挙げられる。例えば、分子認識物質がタンパク質である場合には、発光性微粒子をアミノシラン誘導体等で処理することにより、直接又は縮合試薬により、タンパク質のアミノ基と発光性微粒子が結合される。また、分子認識物質がDNAのPCR産物である場合には、発光性微粒子をポリ-L-リシンでコートすることにより静電的に結合可能である。分子認識物質がオリゴヌクレオチドである場合には、予めアルキルアミノアシランでコートした発光性微粒子を光感受性保護基を有するリンカーで保護し、光照射による脱保護、合成の繰り返しによりオリゴヌクレオチド鎖を合成する方法が挙げられる。

【0022】また、本発明の発光性微粒子に用いる極性官能基を有する高分子としてアルブミンを用いる場合には、ビオチンとアビジンとを用いて本発明の分子認識発光性微粒子を作製する方法が好適である。すなわち、ビオチンはアルブミンとの結合性に優れることから、本発明の発光性微粒子が極性官能基を有する高分子としてアルブミンを用いている場合には、そのアルブミン上に容易にビオチンを結合させることができる。一方、ビオチンは、分子認識物質として用いられる抗原、抗体等のタンパク質やDNA等にも容易に結合させることができる。表面にビオチンを有する本発明の発光性微粒子と、表面にビオチンを有する抗原、抗体等のタンパク質やDNA等の分子認識物質とは、アビジンを介して容易に結合することができる。このように、本発明の発光性微粒子に用いる極性官能基を有する高分子としてアルブミンを用い、ビオチンとアビジンとを介して発光性微粒子と分子認識物質とが結合した分子認識発光性微粒子(Avidin-Biotin-Albumin-Quant

um Dots:以下、ABA-QDsともいう)は、作製が容易であり応用範囲が広く好適である。かかる本発明の分子認識発光性微粒子の1実施態様を図1及び図2に示した。

【0023】本発明の分子認識発光性微粒子は、分子認識物質を選択することにより種々の生体関連物質、環境関連物質等を標的物質とすることができる。本発明の分子認識発光性微粒子による測定対象となる標的物質としては、抗体又はレセプターを作製できるものであれば特に限定されず、例えば、抗原・抗体や異常型プリオン等のタンパク質、ダイオキシン類等の内分泌攪乱物質、エイズウイルス等のウイルス、ペプチド、核酸、金属イオン等が挙げられる。

【0024】本発明の分子認識発光性微粒子は、本発明の発光性微粒子からなることにより分散安定性に極めて優れる。このため、ELISA法によるタンパク質の検出や、免疫スクリーニング法、ハイブリッド形成法によるDNA、RNAの検出等のin vitro法に用いると、凝集が起こりにくく、長時間安定した試験を行うことができる。また、生体内での分散安定性に優れることから、生体内における標的物質を高感度に測定ことができ、薬物や生体成分の追尾、薬物の作用機構の解析等のin vivo試験にも応用することができる。更に、アフィニティークロマトグラフィーの担体等に用いることにより、標的物質の分離や濃縮にも応用できる。本発明の分子認識発光性微粒子を用いる標的物質の検出キットもまた、本発明の1つである。

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0025】(実施例1) 11-メルカプトウンデカン酸ナトリウム塩表面修飾発光性微粒子(MUA-QD) 1mgとウシ血清アルブミン(シグマ社製:BSA) 10mgとを予め0.1mLの蒸留水に溶解し、0.1M 2-[N-モルフォリノ]エタンスルホン酸(MES)バッファー(pH4.8) 3.4mLを加えて十分に混合した。次いで、蒸留水で溶解した10mg/mL 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(ピアス社製,EDC)溶液0.5mLを加え、室温2時間攪拌しながら反応させた。未反応のBSAは反応液をマイクロコンYM-100(ミリポア社製)で15000×gで5分間遠心することで除去した。遠心後、PBSバッファー(pH7.2)で2回洗浄した後、0.5mLのPBSバッファーで溶解することにより、半導体素子の表面にウシ血清アルブミンが接合した発光性微粒子(BSA結合MUA-QD)を得た。

【0026】得られたBSA結合MUA-QDを0、0.25、0.5、1、2、4Mの濃度の塩化ナトリウムを含む10mMリン酸バッファー(pH7.2)で溶

解し、室温で3日間静置した。十分に攪拌した後、10 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で作製した0.5%アガロースゲルで135 V、50分間電気泳動を行った。対照としてABSが接合していないMUA-QDについても同様にして電気泳動を行った。得られた電気泳動像を図3に示した。図3より、BSA結合MUA-QDでは、4 Mの塩化ナトリウムで処理してもブロードな電気泳動像が観察され、十分に分散していることがわかった。一方、MUA-QDでは0.25 Mの塩化ナトリウム処理でも全く泳動されず、凝集していることがわ

かった。  
 【0027】また、BSA結合MUA-QDとMUA-QDとを10 mM MESバッファー (pH 4.0及びpH 5.5) 及び10 mMリン酸バッファー (pH 7.4) で溶解し、室温で12時間静置した。十分に攪拌した後、10 mMリン酸バッファー (pH 7.4) で作製した0.5%アガロースゲルで135 V、50分間電気泳動を行った。得られた電気泳動像を図4に示した。図4より、BSA結合MUA-QDでは、pH 4であって

20  
 もpH 7.4の場合と同様の移動度を示したことから、酸性下でも十分に分散していることがわかった。一方、MUA-QDでは、pH 5.5では泳動されるもののpH 7.4の場合に比べて移動度が劣り若干の凝集が認められ、更にpH 4では完全に凝集していることがわかった。

\*【0028】

【発明の効果】本発明によれば、生体関連物質、環境関連物質等の標的物質の高感度測定法に用いる分子認識発光性微粒子のマーカー物質として好適であり、特に生体内での分散安定性に優れた発光性微粒子を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の分子認識発光性微粒子の1実施態様を示す模式図である。

【図2】本発明の分子認識発光性微粒子の1実施態様を示す模式図である。

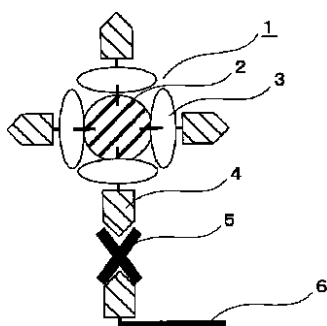
【図3】実施例で作製したBSA結合MUA-QDとMUA-QDとを異なる濃度の塩化ナトリウムで処理した後の電気泳動像である。

【図4】実施例で作製したBSA結合MUA-QDとMUA-QDとを異なるpHで処理した後の電気泳動像である。

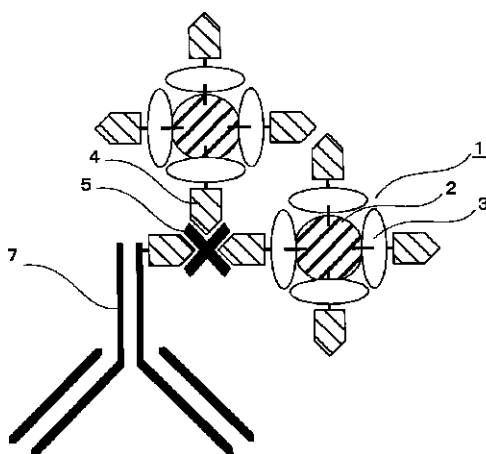
【符号の説明】

- 1 発光性微粒子
- 2 半導体ナノ粒子
- 3 アルブミン
- 4 ビオチン
- 5 アビジン
- 6 分子認識物質 (オリゴDNA)
- 7 分子認識物質 (IgG抗体)

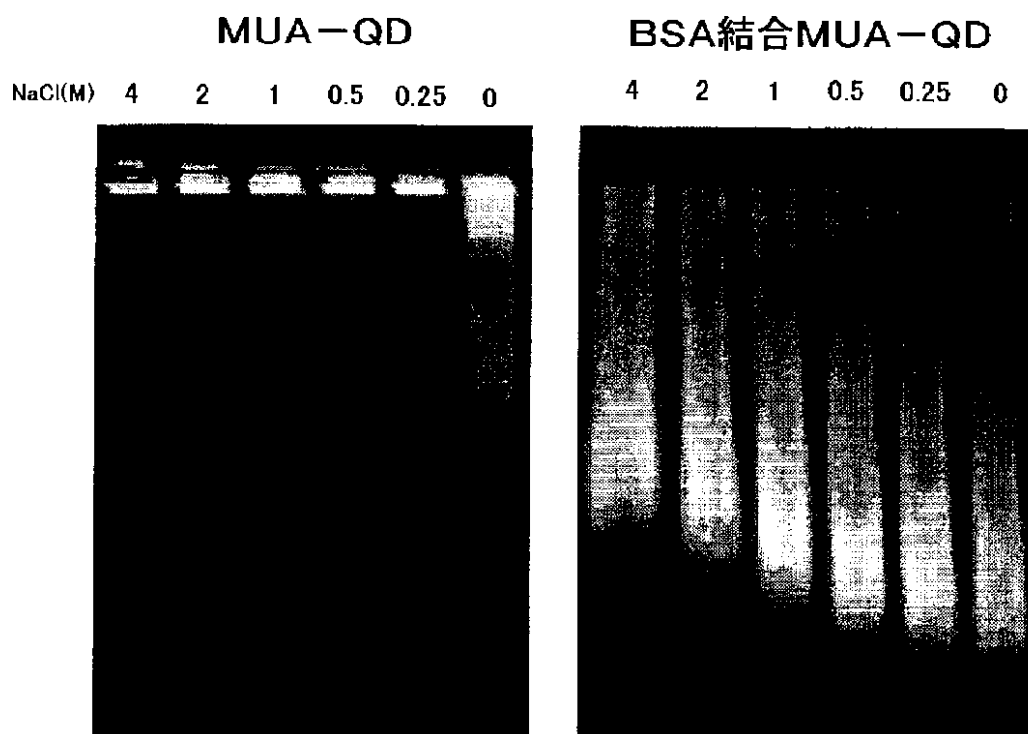
【図1】



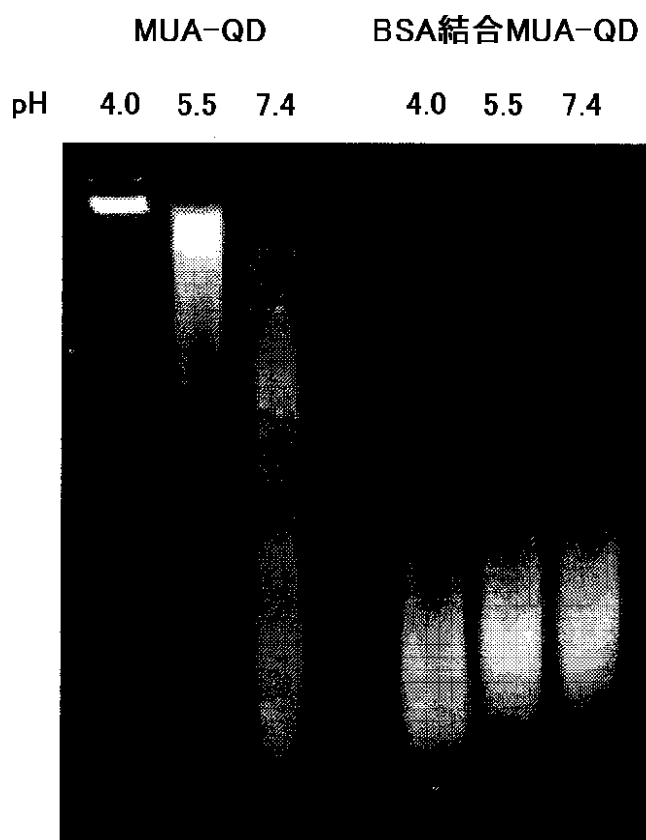
【図2】



【図3】



【図4】



## フロントページの続き

- (71)出願人 502166891  
前之園 信也  
東京都文京区本郷7-3-1
- (71)出願人 000002174  
積水化学工業株式会社  
大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
- (72)発明者 花木 賢一  
東京都新宿区西早稲田1-11-4-1001
- (72)発明者 山本 健二  
東京都文京区西方1-8-18
- (72)発明者 山口 由岐夫  
東京都文京区本郷7-3-1
- (72)発明者 前之園 信也  
東京都文京区本郷7-3-1
- (72)発明者 小森 陽一郎  
大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
積水化学工業株式会社内
- Fターム(参考) 4H045 AA10 BA70 CA40 DA70 EA20  
EA50 EA61 FA50

专利名称(译)	发光性微粒子		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003329686A</a>	公开(公告)日	2003-11-19
申请号	JP2002134676	申请日	2002-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	山本健二 山口 由岐夫 积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	花木健一 山本健二 山口 由岐夫 前之园 信也 积水化学工业株式会社		
[标]发明人	花木賢一 山本健二 山口由岐夫 前之園信也 小森陽一朗		
发明人	花木 賢一 山本 健二 山口 由岐夫 前之園 信也 小森 陽一朗		
IPC分类号	G01N33/553 C07K14/76 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/553 C07K14/76 G01N33/53.U G01N33/543.525.U B82Y15/00 B82Y30/00		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA70 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA61 4H045/FA50		
其他公开文献	JP4107873B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种发光物质，该发光物质适合作为目标识别物如生物物质和与环境有关的物质的高灵敏度测量方法中使用的分子识别发光标记物，并且在包括高盐或酸性溶液的生物溶剂中具有优异的分散稳定性。提供细颗粒。解决方案：发光的微粒，其中具有极性官能团的聚合物物理和/或化学键合到表面上。

【图 1】

