

(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2018-25433

(P2018-25433A)

(43) 公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5 4 G O O 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
BO 1 J 13/18 (2006.01)	BO 1 J 13/18	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2016-156409 (P2016-156409)	(71) 出願人	000001270
(22) 出願日	平成28年8月9日 (2016.8.9)		コニカミノルタ株式会社
			東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(出願人による申告) 平成27年度国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「コファンド事業／フランスB p i f r a n c eとの国際研究開発・実証事業／蛍光ナノイメージングを用いた創薬支援システムの開発」委託研究 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	110001070
			特許業務法人 S S I N P A T
		(72) 発明者	石井 宏則
			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	相宮 拓司
			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】 コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子およびその製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 熱可塑性樹脂合成用モノマーを蛍光色素の存在下で重合させることにより、蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子を作製する工程1と、前記コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する工程2とを含む、免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

【効果】 本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法により、高輝度であり、水中や生理食塩水中、培地中などで色素が溶出することのない蛍光色素含有ナノ粒子を製造することができ、この蛍光色素含有ナノ粒子は、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに有効に利用することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

熱可塑性樹脂合成用モノマーを蛍光色素の存在下で重合させることにより、蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子を作製する工程 1 と、前記コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する工程 2 とを含む、免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

【請求項 2】

前記熱可塑性樹脂は、スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS 樹脂、ASA 樹脂、アルキルメタクリル酸樹脂、(ポリ)アルキルメタクリル酸樹脂、アクリルアミド樹脂、またはスルホン酸基を有するモノマーを重合して形成される樹脂である、請求項 1 に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

10

【請求項 3】

前記熱硬化性樹脂は、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂またはフラン樹脂である、請求項 1 または 2 に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

【請求項 4】

前記蛍光色素は、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、シアニン系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子および芳香族系色素分子から選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 1～3 のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

20

【請求項 5】

前記工程 1 は、蛍光色素および界面活性剤の存在下で熱可塑性樹脂合成用モノマーを乳化重合させる工程である、請求項 1～4 のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

【請求項 6】

前記工程 1 は、熱重合開始剤を添加して重合を行う工程である、請求項 5 に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

30

【請求項 7】

前記工程 1 は、重合開始剤を添加した後、55～75℃で4～24時間激しく攪拌して反応させ、その後、80～90℃で30～60分間激しく攪拌する工程である、請求項 6 に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

【請求項 8】

前記工程 2 は、前記コア粒子の存在下で熱硬化性樹脂合成用モノマーを重合させる工程である、請求項 1～7 のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

【請求項 9】

均一に分散した蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子と、該コア粒子を被覆する、熱硬化性樹脂からなるシェル層とを有する、免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

40

【請求項 10】

前記熱可塑性樹脂は、スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS 樹脂、ASA 樹脂、アルキルメタクリル酸樹脂、(ポリ)アルキルメタクリル酸樹脂、アクリルアミド樹脂、またはスルホン酸基を有するモノマーを重合して形成される樹脂である、請求項 9 に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

【請求項 11】

50

前記熱硬化性樹脂は、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂またはフラン樹脂である、請求項 9 または 10 に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

【請求項 12】

前記蛍光色素は、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、シアニン系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子および芳香族系色素分子から選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 9～11 のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子およびその製造方法に関し、詳しくは、免疫組織化学染色または生細胞イメージングに使用したときに、高輝度であり、かつ色素が生理食塩水や緩衝液に溶出しない、免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫組織化学染色や生細胞イメージングにおいては、蛍光色素を含んだナノ粒子が使用される。免疫組織化学染色とは、免疫反応を利用して蛍光色素含有ナノ粒子をタンパク質等に結合させて、タンパク質等を染色する技術である。生細胞イメージングとは、培養細胞に何らかの標識を行い、特定の物質を可視化することであり、たとえば、蛍光色素含有ナノ粒子で生体分子を標識して、蛍光シグナルを検出することにより、生体分子を間接的に可視化する技術である。このような免疫組織化学染色や生細胞イメージングにおいては、タンパク質や細胞等に結合させた蛍光色素含有ナノ粒子から蛍光色素が分散媒中に溶出するのを防止する必要がある。

20

【0003】

蛍光色素の分散媒中への溶出を防ぐ手段として、たとえば特許文献 1 に、蛍光色素の存在下で熱硬化性樹脂を合成し、蛍光色素を内包した熱硬化性樹脂からなるコア粒子を作製し、このコア粒子を熱硬化性樹脂で被覆することによって得られたコアシェル型粒子が開示されている。免疫組織化学染色において、このコアシェル型粒子に対して生理食塩水に曝すなどの操作を行っても、コアシェル型粒子から蛍光色素が分散媒中に溶出されにくい。使用される熱硬化性樹脂としてはメラミン樹脂、ポリウレア、ポリベンゾグアナミン及びフェノール樹脂等である。しかし、蛍光色素の中には熱硬化性樹脂に内包されにくいものが存在し、熱硬化性樹脂に内包されにくい蛍光色素を使用すると、輝度が低くなるという問題があった。このため、特許文献 1 に開示されたコアシェル型粒子は、熱硬化性樹脂に内包されやすい色素を選択して使用しなければならないという制約があった。

30

【0004】

また、蛍光マーカーやインクジェットインク用蛍光微粒子の分野において、蛍光粒子水分散液の耐光堅牢性を向上させる技術として、特許文献 2 に、疎水性である熱可塑性樹脂粒子に蛍光色素を含浸させ得られた色素含有粒子をコア粒子とし、このコア粒子を熱可塑性樹脂により被覆してなるコアシェル型粒子が開示されている。このようなコアおよびシェルが共に熱可塑性樹脂からなるコアシェル型粒子を生理食塩水などのイオン性の液体や水中に曝した場合、コアシェル型粒子から色素が溶出してしまう問題がある。さらに含浸によって色素を粒子に含有させると、粒子に含有される色素量が少ないので、このようにして得られたコアシェル型粒子は高い輝度が得られず、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに応用することは難しい。

40

【0005】

さらに、蛍光マーカーやインクジェットインク用蛍光微粒子の分野において、蛍光粒子水分散液の耐光堅牢性を向上させる技術として、特許文献 3 に、疎水性である熱可塑性樹脂粒子に蛍光色素を含浸させ得られた色素含有粒子をコア粒子とし、このコア粒子をアミ

50

ノ樹脂により被覆してなるコアシェル型粒子が開示されている。このコアシェル型粒子はシェル層が熱硬化性樹脂により形成されているので、生理食塩水中や水中でも色素の溶出を抑えられるが、含浸によって色素を粒子に含有させているので、前述のとおり輝度が低く、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに応用することは難しい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2015-108572号公報

【特許文献2】特開2002-338856号公報

【特許文献3】特開2004-189900号公報

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに利用することができ、高輝度であり、水中や生理食塩水中、培地中などで色素が溶出することのない蛍光色素含有ナノ粒子およびその製造方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、コア粒子を、蛍光色素の存在下で熱可塑性樹脂合成用モノマーを重合させることにより作製し、このコア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆することにより前記課題を解決した。すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔12〕に関する。

20

〔1〕熱可塑性樹脂合成用モノマーを蛍光色素の存在下で重合させることにより、蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子を作製する工程1と、前記コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する工程2を含む、免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

〔2〕前記熱可塑性樹脂は、スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS樹脂、ASA樹脂、アルキルメタクリル酸樹脂、(ポリ)アルキルメタクリル酸樹脂、アクリルアミド樹脂、またはスルホン酸基を有するモノマーを重合して形成される樹脂である、前記〔1〕に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

30

〔3〕前記熱硬化性樹脂は、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂またはフラン樹脂である、前記〔1〕または〔2〕に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

〔4〕前記蛍光色素は、ローダミン系色素分子、BODIPY系色素分子、スクアリウム系色素分子、シアニン系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子および芳香族系色素分子から選ばれる少なくとも1種である、前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

〔5〕前記工程1は、蛍光色素および界面活性剤の存在下で熱可塑性樹脂合成用モノマーを乳化重合させる工程である、前記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

40

〔6〕前記工程1は、熱重合開始剤を添加して重合を行う工程である、前記〔5〕に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

〔7〕前記工程1は、重合開始剤を添加した後、55～75℃で4～24時間激しく攪拌して反応させ、その後、80～90℃で30～60分間激しく攪拌する工程である、前記〔6〕に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

〔8〕前記工程2は、前記コア粒子の存在下で熱硬化性樹脂合成用モノマーを重合させる

50

工程である、前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法。

〔９〕均一に分散した蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子と、該コア粒子を被覆する、熱硬化性樹脂からなるシェル層とを有する、免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

〔１０〕前記熱可塑性樹脂は、スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、ＡＳ樹脂、ＡＳＡ樹脂、アルキルメタクリル酸樹脂、（ポリ）アルキルメタクリル酸樹脂、アクリルアミド樹脂、またはスルホン酸基を有するモノマーを重合して形成される樹脂である、前記〔９〕に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

10

〔１１〕前記熱硬化性樹脂は、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂またはフラン樹脂である、前記〔９〕または〔１０〕に記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

〔１２〕前記蛍光色素は、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、シアニン系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子および芳香族系色素分子から選ばれる少なくとも１種である、前記〔９〕～〔１１〕のいずれかに記載の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子。

20

【発明の効果】

【０００９】

本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法により、高輝度であり、水中や生理食塩水中、培地中などで色素が溶出することのない蛍光色素含有ナノ粒子を製造することができ、この蛍光色素含有ナノ粒子は、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに有効に利用することができる。

【００１０】

本発明の蛍光色素含有ナノ粒子は高い輝度を有するので、免疫組織化学染色において、低発現のタンパク質でも定量することが可能である。また、本発明の蛍光色素含有ナノ粒子は、含有する蛍光色素が多いので、耐光性が向上し、長時間露光に耐えることができ、蛍光顕微鏡での観察が容易になる。さらに、染色の操作において生理食塩水や緩衝液に曝されても蛍光色素が溶出しない。

30

【００１１】

本発明の蛍光色素含有ナノ粒子は、高い輝度を有するので、生細胞イメージングにおいても１粒子のシグナルを検出することが可能である。また、本発明の蛍光色素含有ナノ粒子は、耐光性が高く、蛍光色素が培地中に溶出することがないので、数時間から数日に及ぶ長時間の観察においても観察が容易である。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

本発明の免疫組織化学染色または生細胞イメージング用コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法は、熱可塑性樹脂合成用モノマーを蛍光色素の存在下で重合させることにより、蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子を作製する工程１と、前記コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する工程２とを含む。

40

【００１３】

本製造方法によって製造される蛍光色素含有ナノ粒子は、その中央部を占めるコア粒子と、そのコア部を被覆するシェル層とからなるコアシェル型である。

本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法は、コア粒子を、蛍光色素の存在下で熱可塑性樹脂合成用モノマーを重合させることにより作製し、そのコア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆した点に特徴を有する。

【００１４】

モノマーを蛍光色素の存在下で重合させると、生成したポリマーは蛍光色素を包み込み

50

ながら成長する。従来法のように、熱硬化性樹脂を蛍光色素の存在下で合成してコア粒子を作製した場合、熱硬化性樹脂は三次元的な密な網目構造を有するので、これに包み込まれた蛍光色素は樹脂粒子に強固に拘束され、樹脂粒子から離脱しにくいという利点を有する。しかし、その一方で、蛍光色素の中には熱硬化性樹脂との親和性が低い色素が多数存在し、そのような熱硬化性樹脂との親和性が低い蛍光色素を使用した場合には、熱硬化性樹脂の合成時に蛍光色素は熱硬化性樹脂ポリマーに包み込まれにくく、作製されたコア粒子には少量の蛍光色素しか含有されない。そのようなコア粒子をシェル層で被覆して得られたコアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子は、輝度が低く、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに有効に利用することはできない。このため、熱硬化性樹脂を蛍光色素の存在下で合成してコア粒子を作製する従来法においては、電気的性質や疎水的性質などに基づく相互作用により熱硬化性樹脂に対して高い親和性を有する蛍光色素を選択して使用しなければならないという制約があった。

10

【0015】

これに対し、熱可塑性樹脂合成用モノマーを蛍光色素の存在下で重合させることによりコア粒子を作製する本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法においては、蛍光色素は総じて、熱硬化性樹脂に比較して熱可塑性樹脂に対して高い親和力を有するので、特定の蛍光色素を選択して使用しなければならないという制約が小さく、幅広い蛍光色素を使用することができ、さらに、熱可塑性樹脂は熱可塑性樹脂に比較して柔軟性に富む構造を有するので、多量の蛍光色素を含有したコア粒子を作製することができる。その一方、熱可塑性樹脂合は、熱硬化性樹脂に比較して疎な構造を有するので、蛍光色素は一旦熱可塑性樹脂合ポリマーに包み込まれてコア粒子内に含有されても、コア粒子から離脱しやすい。そこで、本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法においては、蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する。熱硬化性樹脂は、前述のとおり三次元的な密な網目構造を有するので、コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆すれば、たとえ蛍光色素がコア粒子から離脱しても、その蛍光色素はシェル層に阻まれ、コアシェル型ナノ粒子内に保持される。このため、本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法によって製造されたコアシェル型ナノ粒子は、多量の蛍光色素を保持できるので、輝度が高い。

20

【0016】

以上のとおり、本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法によれば、蛍光色素の制約が小さく、幅広い蛍光色素を利用でき、高い輝度を有するが蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子を製造することができる。このため、本発明の製造方法によって製造された蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子は、免疫組織化学染色や生細胞イメージングに有効に利用することができる。

30

【0017】

本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法における工程1は、コア粒子を作製する工程である。工程1においては、熱可塑性樹脂合成用モノマーを蛍光色素の存在下で重合させる。これにより、蛍光色素を含有する熱可塑性樹脂からなるコア粒子が形成される。

【0018】

前記熱可塑性樹脂としては、特に制限はないが、スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS樹脂、ASA樹脂、アルキルメタクリル酸樹脂、(ポリ)アルキルメタクリル酸樹脂、アクリルアミド樹脂、およびスルホン酸基を有するモノマーを重合して形成される樹脂等を好適に用いることができる。これらの中でも、スチレン樹脂およびアクリロニトリル樹脂を用いると、蛍光色素の溶出をより効果的に抑制することができ、輝度が高い蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子を得ることができるので好ましい。

40

【0019】

前述のとおり、蛍光色素は総じて熱可塑性樹脂に対して高い親和力を有するので、前記蛍光色素として幅広い色素を使用することができる。蛍光色素の中でも、たとえば、Texas Red系色素分子など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、シアニン系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系

50

色素分子およびクマリン系色素分子などの芳香族系色素分子等から選ばれる少なくとも1種を好適に使用することができる。

【0020】

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 6 G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、テキサスレッド、スペクトラムレッド、LD700パークロレート、スルホローダミン101等が挙げられる。

【0021】

BODIPY系色素分子の具体例としては、BODIPY FL、BODIPY TMR、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）等が挙げられる。

10

【0022】

スクアリリウム系色素分子の具体例としては、SR fluor, 680-carboxylate、1, 3-ビス[4-(ジメチルアミノ)-2-ヒドロキシフェニル]-2, 4-ジヒドロキシシクロブテンジイリウムジヒドロキシド、ビス-1, 3-ビス[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-2, 4-ジヒドロキシシクロブテンジイリウムジヒドロキシド、ビス-2-(4-(ジエチルアミノ)-2-ヒドロキシフェニル)-4-(4-(ジエチルイミノ)-2-ヒドロキシシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン)-3-オキソシクロブテ-1-エノレート、2-(4-(ジブチルアミノ)-2-ヒドロキシフェニル)-4-(4-(ジブチルイミノ)-2-ヒドロキシシクロヘキサ-2, 5-ジエニリデン)-3-オキソシクロブテ-1-エノレート、2-(8-ヒドロキシ-1, 1, 7, 7-テトラメチル-1, 2, 3, 5, 6, 7-ヘキサヒドロピリド[3, 2, 1-ij]キノリン-9-イル)-4-(8-ヒドロキシ-1, 1, 7, 7-テトラメチル-2, 3, 6, 7-テトラヒドロ-1H-ピリド[3, 2, 1-ij]キノリニウム-9(5H)-イリデン)-3-オキソシクロブテ-1-エノレート等が挙げられる。

20

【0023】

シアニン系色素分子の具体例としては、1-ブチル-2-[5-(1-ブチル-1, 3-ジヒドロ-3, 3-ジメチル-2H-インドール-2-イリデン)-ペンタ-1, 3-ジエニル]-3, 3-ジメチル-3H-インドリウムヘキサフルオロホスフェート、1-ブチル-2-[5-(1-ブチル-3, 3-ジメチル-1, 3-ジヒドロ-インドール-2-イリデン)-3-クロロペンタ-1, 3-ジエニル]-3, 3-ジメチル-3H-インドリウムヘキサフルオロホスフェート、3-エチル-2-[5-(3-エチル-3H-ベンゾチオアゾール-2-イリデン)-ペンタ-1, 3-ジエニル]-ベンゾチオアゾール-3-イウム-アイオダイド等が挙げられる。

30

【0024】

オキサジン系色素分子の具体例としては、Cresyl violet、Oxazine 170、EVOblue 30、Nile Blue等が挙げられる。

カルボピロニン系色素分子の具体例としては、CARBOPYRONIN 149等が挙げられる。

【0025】

芳香環系色素分子であるクマリン系色素分子の具体例としては、クマリン7、クマリン30、Basic Yellow 40、7-ジエチルアミノ-クマリン、7-ジエチルアミノ-4-メチル-クマリン、7-ジエチルアミノ-4-トリフルオロメチル-クマリン、7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸、7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸エチルエステル、7-ジエチルアミノ-3-(4-ピリジニル)-クマリン、7-ジエチルアミノ-3-(2-チオフェン)-クマリン、7-ジエチルアミノ-4-カルボニトリル-クマリン、1,1,6,6,8-ペンタメチル-2,3,5,6-テトラヒドロ-1H,4H-11-オキサ-3a-アザ-ベンゾ[de]アントラセン-10-オン、1,1,6,6-テトラメチル-8-トリフルオロ-2,3,5,6-テトラヒドロ-1H,4H-11-オキサ-3a-アザ-ベンゾ[de]アントラセン-10-オン、クマリン504T、7-ジエチルアミノ-3-カルボアルデヒド-クマリン、1,1,6,6-テトラメチル-10-オキソ-2,3,5,6-テトラヒドロ-1H、4H、10H-11-オキ

40

50

サ-3a-アザ-ベンゾ[de]アントラセン-9-カルボニトリル、9-(1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-1,1,6,6-テトラメチル-2,3,5,6-テトラヒドロ-1H、4H-11-オキサ-3a-アザ-ベンゾ[de]アントラセン-10-オン、3-ジエチルアミノ-7-イミノ-7H-[1]ベンゾピラノ[3',2':3,4]ピリド[1,2-a]ベンズイミダゾール-6-カルボニトリル、10,11,14,15-テトラヒドロ-6-イミノ-9,9,15,15-テトラメチル-6H,9H-ベンズイミダゾ[1'',2'':1':2']ピリド[4'3':2,3][1]ベンゾピラノ[6,7,8-ij]キノリジン-7-カルボニトリル、クマリン6、クマリン153、クマリン102、クマリン343、クマリン334、クマリン545、クマリン504T、クマリン545T、7-(ジエチルアミノ)-3-フェニルクマリン等が挙げられる。

【0026】

芳香環系色素分子のクマリン系色素分子以外の具体例としては、N、N-ビス-(2,6-ジイソプロピルフェニル)-1,6,7,12-(4-tert-ブチルフェノキシ)-ペリレン-3,4,9,10-テトラカルボン酸ジイミド、N,N'-ビス-(2,6-ジイソプロピルフェニル)-1,6,7,12-テトラフェノキシペリレン-3,4:9,10-テトラカルボキシジイミド、N、N'-ビス-(2,6-ジイソプロピルフェニル)ペリレン-3,4,9,10-ビス(ジカルボイミド)、16N,N'-ビス(2,6-ジメチルフェニル)ペリレン-3,4,9,10-テトラカルボン酸ジイミド、4,4'-[(8,16-ジヒドロ-8,16-ジオキソジベンゾ[a,j]ペリレン-2,10-ジイル)ジオキシ]ジブチル酸、2,10-ジヒドロキシジベンゾ[a,j]ペリレン-8,16-ジオン、2,10-ビス(3-アミノプロポキシ)ジベンゾ[a,j]ペリレン-8,16-ジオン、3,3'-[(8,16-ジヒドロ-8,16-ジオキソジベンゾ[a,j]ペリレン-2,10-ジイル)ジオキシ]ジプロピルアミン、17-ビス(オクチルオキシ)アントラ[9,1,2-cde]-ベンゾ[rst]ペンタフェン-5-10-ジオン、オクタデカン酸、5,10-ジヒドロ-5,10-ジオキソアントラ[9,1,2-cde]ベンゾ[rst]ペンタフェン-16,17-ジイルエステル、ジヒドロキシジベンゾアントロン、ベンゼンスルホン酸、4,4',4'',4'''-[[2,9-ビス[2,6-ビス(1-メチルエチル)フェニル]-1,2,3,8,9,10-ヘキサヒドロ-1,3,8,10-テトラオキソアントラ[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']]ジイソキノリン-5,6,12,13-テトライル]テトラキス(オキシ)]テトラキス-、ベンゼンエタンアミニウム、4,4',4'',4'''-[[2,9-ビス[2,6-ビス(1-メチルエチル)フェニル]-1,2,3,8,9,10-ヘキサヒドロ-1,3,8,10-テトラオキソアントラ[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']]ジイソキノリン-5,6,12,13-テトライル]テトラキス(オキシ)]テトラキス[N,N,N-トリメチル-]、スピロピラン、アゾベンゼン、スピロペリミジン、ジアリールエテン、ピラニン等が挙げられる。

【0027】

前記コア粒子は、色素の存在下に熱可塑性樹脂合成用モノマーを重合させることにより作製される。熱可塑性樹脂合成用モノマーの重合は、界面活性剤を添加して乳化重合することが好ましい。たとえば、蛍光色素および界面活性剤を含有する水溶液に熱可塑性樹脂合成用モノマーを添加し、通常55~75℃、好ましくは68~72℃で、10分間程度、好ましくは10~15分間激しく攪拌する。その後、重合開始剤を添加して、55~75℃、好ましくは68~72℃で、4~24時間、好ましくは4~5時間激しく攪拌して、反応させる。さらに、液温を80~90℃、好ましくは80~82℃に上げ、30~60分間、好ましくは30~40分間激しく攪拌する。反応液は、通常、凝集塊と上清である粒子分散液とに分かれる。反応液から粒子分散液を回収する。この粒子分散液を遠心分離し、上清である分散媒を除いた後、沈殿に超純水を加え、超音波分散する。遠心分離、沈殿への超純水添加および超音波分散の工程をさらに2回程度繰り返す。これにより、コア粒子の水分散液が得られる。

【0028】

前記熱可塑性樹脂合成用モノマーとしては、重合により目的とする熱可塑性樹脂が得られるようなモノマーを適宜選択して使用する。

蛍光色素の添加量は、熱可塑性樹脂合成用モノマー 1 g に対し、通常 1 ～ 50 mg、好ましくは 4 ～ 20 mg である。

【0029】

前記界面活性剤には特に制限はなく、通常の乳化重合反応に使用される界面活性剤を用いることができる。前記界面活性剤としては、アニオン系、ノニオン系およびカチオン系の全ての界面活性剤を用いることができる。アニオン系の界面活性剤としては、例えば、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等が挙げられる。ノニオン系の界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等が挙げられる。カチオン系の界面活性剤としては、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド等が挙げられる。界面活性剤は、1 種類単独で使用しても、2 種類以上を併用してもよい。

10

【0030】

市販の界面活性剤としては、例えば、「エマルゲン」（登録商標、花王（株）製）や「ネオペレックス」（登録商標、花王（株）製）を好適に用いることができる。エマルゲンの有効成分はポリオキシエチレンアルキルエーテルであり、ネオペレックスの有効成分はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムである。

界面活性剤の添加量は、熱可塑性樹脂合成用モノマー 1 g に対し、通常 1 ～ 3 mg、好ましくは 1 ～ 2 mg である。

【0031】

前記重合開始剤としては、熱によりラジカルを発生するアゾ化合物および過酸化物などの熱重合開始剤が挙げられ、アゾ化合物として好ましくは V-50 (2, 2'-Azobisis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) が挙げられ、過酸化物として好ましくは過硫酸アンモニウムが挙げられる。重合開始剤はレドックス重合開始剤であってもよい。

20

【0032】

重合開始剤の添加量は、熱可塑性樹脂合成用モノマー 1 g に対し、通常 0.1 ～ 1.5 mg、好ましくは 0.3 ～ 0.45 mg である。

上記のようにして作製されたコア粒子は、平均粒径が通常 20 ～ 300 nm、好ましくは 50 ～ 200 nm である。コア粒子の平均粒径が 300 nm を超えると染色性に問題が生じる場合があり、コア粒子の平均粒径が 20 nm 未満であると、視認性に問題が生じる場合がある。上記コア粒子の平均粒径は、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて電子顕微鏡写真を撮影し、蛍光色素含有ナノ粒子の断面積を計測し、その計測値を面積として有する円の直径 (面積円相当径) として算出された数値である。このような平均粒径の測定方法は、後述の蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子についても同様である。

30

【0033】

このコア粒子は、蛍光色素の存在下に熱可塑性樹脂合成用モノマーを重合させることにより作製されているので、多量の蛍光色素を均一に分散した状態で含有することができる。このため、本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法における工程 1 によって作製されたコア粒子を用いて製造された蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子は、高輝度を有し得る。これに対し、まず熱可塑性樹脂合成用モノマーを重合させて粒子を作製し、その後、その粒子に蛍光色素を含浸させてコア粒子を作製した場合には、コア粒子の表面部にしか色素が含有されず、コア粒子に含有される色素の量も少ない。このため、このような方法によって作製されたコア粒子を用いて製造された蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子は、高輝度を有し得ない。

40

【0034】

本発明の蛍光色素含有ナノ粒子の製造方法における工程 2 は、前記コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する工程である。工程 2 により、コア粒子と、コア粒子を被覆する、熱硬化性樹脂からなるシェル層とを有するコアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子が形成される。

【0035】

前記熱硬化性樹脂としては、前述のようなシェル層を形成できる限り特に制限はないが

50

、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂またはフラン樹脂等を好適に挙げることができる。

【0036】

コア粒子を熱硬化性樹脂からなるシェル層で被覆する方法としては、コア粒子から蛍光色素が抜け出すのを防げるように熱硬化性樹脂でコア粒子を被覆できれば特に制限はないが、コア粒子の存在下で熱硬化性樹脂合成用モノマーを重合させる方法が簡便であり、好適である。

【0037】

たとえば、コア粒子を0.1～2 mg/mL、好ましくは0.3～0.7 mg/mLの濃度で含む、コア粒子の水分散液に、界面活性剤および熱硬化性樹脂合成用モノマーを添加し、混合液を約70～80℃、好ましくは75～78℃で、10分間程度、好ましくは10～15分間加熱しながら激しく攪拌する。その後、酸触媒を添加し、酸触媒を添加してから50分間程度、好ましくは45～50分間、約70℃、好ましくは75～78℃で加熱しながら攪拌を続ける。その後、混合液を約90℃、好ましくは85～90℃に昇温して、20分間程度、好ましくは15～20分間加熱しながら激しく攪拌する。この反応液を遠心分離して、上清を除く。沈殿に超純水を加え、超音波分散する。遠心分離、沈殿への超純水添加および超音波分散の工程をさらに2回程度繰り返す。これにより、コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の水分散液が得られる。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子の粒径がコア粒子の粒径よりも大きくなっていることを確認することができる。

【0038】

前記熱硬化性樹脂合成用モノマーとしては、重合により目的とする熱硬化性樹脂が得られるようなモノマーを適宜選択して使用する。

前記酸触媒としては、ドデシルベンゼンスルホン酸、スルファミン酸、ギ酸、酢酸、硫酸、塩酸、硝酸、パラトルエンスルホン酸等が挙げられる。

【0039】

酸触媒の添加量は、コア粒子1 mgに対し、通常30～80 mg、好ましくは40～50 mgである。

前記シェル層の厚みは、15～30 nmであることが好ましく、20～30 nmであることがより好ましい。

【0040】

上記のようにして作製されたコアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子は、平均粒径が通常40～500 nm、好ましくは50～200 nmである。コア粒子の平均粒径が500 nmを超えると染色性に問題が生じる場合があり、コア粒子の平均粒径が40 nm未満であると、視認性に問題が生じる場合がある。

【実施例】

【0041】

[実施例1]

[コア粒子の作製]

6 mLスクリー管に、超純水1960 μ L、0.5 M EDTA水溶液 9.6 μ L、10 mg/mLのBasic Yellow 40水溶液300 μ L、10 w/v %ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液300 μ L、10 w/v %ノニルフェニルポリ(20)オキシエチレン300 μ Lを入れた。この混合液に、熱可塑性樹脂合成用モノマーとして、スチレン 300 μ L、ポリプロピレングリコールモノメタクリル酸 60 μ L、50質量% 2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム塩水溶液 30 μ Lを加えた。このスクリー管に長さ10 mmの攪拌子を入れて、ホットスターラー上で62℃、15000 rpmで10分間攪拌した。この混合液に、10 w/v % V-50水溶液 50 μ Lを加えて重合を開始した。62℃、15000 rpmで4時間攪拌した。その後、85℃、15000 rpmで1時間攪拌した。

【0042】

反応液から凝集塊を除去して、粒子分散液を回収した。この粒子分散液を、4℃、15000rpmで、60分間遠心分離して、上清を除いた。着色した沈殿物に1mLの超純水を加えて超音波分散した。遠心分離と超純水による分散を2回繰り返して、蛍光色素を含有した熱可塑性樹脂からなるコア粒子（1）の水分散液を得た。得られたコア粒子（1）の粒径は100nmであった。

【0043】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子（1）を50mg/mLの濃度で含むコア粒子水分散液（1）250μL、5質量％エマルゲン430（ポリオキシエチレンオレイルエーテル、花王（株）製）水溶液160μL、50質量％ニカラックMX-035（メチル化メラミン樹脂 日本カーバイド工業（株）製）水溶液120μLを6mLスクリュウ管に入れた。このスクリュウ管に10mm撹拌子を入れて、ホットスターラー上で15分間、70℃、15000rpmで撹拌した。酸触媒として100μLの5質量％ドデシルベンゼンスルホン酸水溶液を添加した。60分間、70℃、15000rpmで撹拌した後、30分間、90℃、15000rpmで撹拌した。4℃、15000rpmで、20分間遠心分離して上清を除いた。着色した沈殿物に1mLの超純水を加えて超音波分散した。遠心分離と超純水による分散を2回繰り返して、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（1）の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子（1）の粒径がコア粒子（1）の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子（1）の粒径は115nmであった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（1）の濃度は16.4mg/mLであった。

【0044】

（輝度の評価）

得られた水分散液を、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（1）の濃度が10pmol/Lになるように超純水で希釈した。この希釈された水分散液に対し、分光蛍光光度計（F-7000日立ハイテクノロジーズ社製）にて蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度により蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（1）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0045】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

得られた水分散液を、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（1）の濃度が0.1nmol/Lになるようにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈した。希釈された水分散液を3時間、37℃でインキュベートした後、4℃、15000rpmで、60分間遠心分離し、上清を回収した。上清の蛍光強度を分光蛍光強度計（F-7000日立ハイテクノロジーズ社製）にて測定し、上清中の蛍光色素の濃度を求めた。上清中の蛍光色素の濃度により、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（1）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0046】

〔実施例2〕

〔コア粒子の作製〕

熱可塑性樹脂合成用モノマーとして、スチレン200μL、アクリロニトリル100μL、ヒドロキシプロピルモノメタクリル酸60μL、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム塩30μLを使用したこと以外は実施例1と同様に行い、コア粒子（2）の水分散液を得た。得られたコア粒子（2）の粒径は100nmであった。

【0047】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子水分散液（1）に替えて、コア粒子（2）を50mg/mLの濃度で含むコア粒子水分散液（2）を使用したこと以外は実施例1と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（2）の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子（2）の粒径がコア粒子（2）の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子（2）の粒径は115nmであった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ

粒子（２）の濃度は 20 mg/mL であった。

【0048】

（輝度の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（２）の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0049】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（２）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0050】

〔実施例 3〕

〔コア粒子の作製〕

熱可塑性樹脂合成用モノマーとして、スチレン 200 μ L、アクリロニトリル 100 μ L、ポリプロピレングリコールモノメタクリル酸 60 μ L、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム塩 30 μ L を使用したこと以外は実施例 1 と同様に行い、コア粒子（３）の水分散液を得た。得られたコア粒子（３）の粒径は 100 nm であった。

【0051】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子水分散液（１）に替えて、コア粒子（３）を 50 mg/mL の濃度で含むコア粒子水分散液（３）を使用したこと以外は実施例 1 と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（３）の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子（３）の粒径がコア粒子（３）の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子（３）の粒径は 115 nm であった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（３）の濃度は 18 mg/mL であった。

【0052】

（輝度の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（３）の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0053】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（３）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0054】

〔実施例 4〕

〔コア粒子の作製〕

実施例 3 と同様に行い、コア粒子（３）の水分散液を得た。得られたコア粒子（３）の粒径は 100 nm であった。

【0055】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

50 質量％ニカラック MX-035（メチル化メラミン樹脂 日本カーバイド工業（株）製）水溶液 120 μ L および 5 質量％ドデシルベンゼンスルホン酸 100 μ L に替えて、それぞれ 50 質量％尿素（東京化成工業（株））100 μ L および 10 質量％ホルマリン（東京化成工業（株））150 μ L を使用したこと以外は実施例 3 と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（４）の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子（４）の粒径がコア粒子（３）の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子（４）の粒径は 115 nm であった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（４）の濃度は 15.4 mg/mL であった。

【0056】

（輝度の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（4）の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0057】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（4）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0058】

〔実施例 5〕

〔コア粒子の作製〕

実施例 3 と同様に行い、コア粒子（3）の水分散液を得た。得られたコア粒子（3）の粒径は 100 nm であった。

【0059】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

50 質量%ニカラック MX-035（メチル化メラミン樹脂 日本カーバイド工業（株）製）水溶液 120 μ L および 5 質量%ドデシルベンゼンスルホン酸 100 μ L に替えて、それぞれ 50 質量%ベンゾグアナミン水溶液（東京化成工業（株））120 μ L および 10 質量%ホルマリン（東京化成工業（株））150 μ L を使用したこと以外は実施例 3 と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（5）の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子（5）の粒径がコア粒子（3）の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子（5）の粒径は 115 nm であった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（5）の濃度は 10.3 mg/mL であった。

【0060】

（輝度の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（5）の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0061】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（5）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0062】

〔実施例 6〕

〔コア粒子の作製〕

10 mg/mL の Basic Yellow 40 水溶液 300 μ L に替えて、10 mg/mL のスルホローダミン 101 水溶液 300 μ L を使用したこと以外は、実施例 3 と同様に行い、コア粒子（4）の水分散液を得た。得られたコア粒子（4）の粒径は 100 nm であった。

【0063】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子水分散液（1）に替えて、コア粒子（4）を 50 mg/mL の濃度で含むコア粒子水分散液（4）を使用したこと以外は実施例 1 と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（6）の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子（6）の粒径がコア粒子（4）の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子（6）の粒径は 115 nm であった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（6）の濃度は 20 mg/mL であった。

【0064】

（輝度の評価）

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（6）の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0065】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (6) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0066】

[実施例 7]

[コア粒子の作製]

10 mg/mL の Basic Yellow 40 水溶液 300 μ L に替えて、10 mg/mL のクマリン 30 水溶液 300 μ L を使用したこと以外は、実施例 3 と同様に行い、コア粒子 (5) の水分散液を得た。得られたコア粒子 (5) の粒径は 100 nm であった。

【0067】

[蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造]

コア粒子水分散液 (1) に替えて、コア粒子 (5) を 50 mg/mL の濃度で含むコア粒子水分散液 (5) を使用したこと以外は実施例 1 と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (7) の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子 (7) の粒径がコア粒子 (5) の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子 (7) の粒径は 115 nm であった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子 (7) の濃度は 16.8 mg/mL であった。

【0068】

(輝度の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (7) の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0069】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (7) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0070】

[実施例 8]

[コア粒子の作製]

10 mg/mL の Basic Yellow 40 水溶液 300 μ L に替えて、10 mg/mL のクマリン 7 水溶液 300 μ L を使用したこと以外は、実施例 3 と同様に行い、コア粒子 (6) の水分散液を得た。得られたコア粒子 (6) の粒径は 100 nm であった。

【0071】

[蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造]

コア粒子水分散液 (1) に替えて、コア粒子 (6) を 50 mg/mL の濃度で含むコア粒子水分散液 (6) を使用したこと以外は実施例 1 と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (8) の水分散液を得た。走査型電子顕微鏡を用いて、コアシェル型ナノ粒子 (8) の粒径がコア粒子 (6) の粒径よりも大きいことを確認した。コアシェル型ナノ粒子 (8) の粒径は 115 nm であった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子 (8) の濃度は 15.6 mg/mL であった。

【0072】

(輝度の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (8) の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0073】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (8) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0074】

[比較例 1]

実施例 3 における「コア粒子の作製」と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱可塑

10

20

30

40

50

性樹脂粒子（１）の水分散液を得た。得られた熱可塑性樹脂粒子（１）の粒径は１００nmであった。

【００７５】

（輝度の評価）

実施例１と同様に、熱可塑性樹脂粒子（１）の輝度を評価した。結果を表１に示す。

【００７６】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例１と同様に、熱可塑性樹脂粒子（１）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表１に示す。

【００７７】

〔比較例２〕

スルホローダミン１０１に替えてBasic Yellow 40を使用したこと以外は、特開２０１５－１０８５７２号公報に記載された実施例１０と同様の手法により、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（９）を製造した。

【００７８】

（輝度の評価）

実施例１と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（９）の輝度を評価した。結果を表１に示す。

【００７９】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例１と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（９）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表１に示す。

【００８０】

〔比較例３〕

スルホローダミン１０１に替えてBasic Yellow 40を使用したこと以外は、特開２０１５－１０８５７２号公報に記載された調製例１と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱硬化性樹脂粒子（１）を製造した。

【００８１】

（輝度の評価）

実施例１と同様に、熱硬化性樹脂粒子（１）の輝度を評価した。結果を表１に示す。

【００８２】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例１と同様に、熱硬化性樹脂粒子（１）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表１に示す。

【００８３】

〔比較例４〕

〔コア粒子の作製〕

実施例３と同様に行い、コア粒子（３）の水分散液を得た。得られたコア粒子（３）の粒径は１００nmであった。

【００８４】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

６mLスクリー管に、超純水１９６０μL、０．５M EDTA水溶液 ９．６μL、１０w/v %ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム水溶液３００μL、１０w/v %ニルフェニルポリ（２０）オキシエチレン３００μL、コア粒子（３）５０μLを入れた。この混合液に、熱可塑性樹脂合成用モノマーとしてスチレン（東京化成工業（株））２００μLを加えた。このスクリー管に長さ１０mmの撹拌子を入れて、ホットスターラー上で６２℃、１５０００rpmで１０分間撹拌した。この混合液に、１０w/v % V-50水溶液 ５０μLを加えて重合を開始した。６２℃、１５０００rpmで４時間撹拌した。その後、８５℃、１５０００rpmで１時間撹拌した。

【００８５】

反応液から凝集塊を除去して、粒子分散液を回収した。この粒子分散液を、4℃、15000rpmで、60分間遠心分離して、上清を除いた。着色した沈殿物に1mLの超純水を加えて超音波分散した。遠心分離と超純水による分散を2回繰り返して、コアシェル型ナノ粒子（10）の水分散液を得た。得られたコアシェル型ナノ粒子（10）の粒径は120nmであった。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（10）の濃度は9.5mg/mLであった。

【0086】

（輝度の評価）

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（10）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

10

【0087】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（10）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0088】

〔比較例5〕

10mg/mLのBasicYellow40水溶液300μLに替えて、10mg/mLのスルホローダミン101水溶液300μLを使用したこと以外は、実施例3における「コア粒子の作製」と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱可塑性樹脂粒子（2）の水分散液を得た。得られた熱可塑性樹脂粒子（2）の粒径は100nmであった。

20

【0089】

（輝度の評価）

実施例1と同様に、熱可塑性樹脂粒子（2）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例1と同様に、熱可塑性樹脂粒子（2）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0090】

〔比較例6〕

10mg/mLのBasicYellow40水溶液300μLに替えて、10mg/mLのクマリン30水溶液300μLを使用したこと以外は、実施例1における「コア粒子の作製」と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱可塑性樹脂粒子（3）の水分散液を得た。得られた熱可塑性樹脂粒子（3）の粒径は100nmであった。

30

【0091】

（輝度の評価）

実施例1と同様に、熱可塑性樹脂粒子（3）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例1と同様に、熱可塑性樹脂粒子（3）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0092】

〔比較例7〕

10mg/mLのBasicYellow40水溶液300μLに替えて、10mg/mLのクマリン7水溶液300μLを使用したこと以外は、実施例1における「コア粒子の作製」と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱可塑性樹脂粒子（4）の水分散液を得た。得られた熱可塑性樹脂粒子（4）の粒径は100nmであった。

40

【0093】

（輝度の評価）

実施例1と同様に、熱可塑性樹脂粒子（4）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0094】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例1と同様に、熱可塑性樹脂粒子（4）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評

50

価した。結果を表 1 に示す。

【0095】

[比較例 8]

特開 2015-108572 号公報に記載された実施例 10 と同様の手法により、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (11) を製造した。

【0096】

(輝度の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (11) の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0097】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (11) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0098】

[比較例 9]

スルホローダミン 101 に替えてクマリン 30 を使用したこと以外は、特開 2015-108572 号公報に記載された実施例 10 と同様の手法により、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (12) を製造した。

【0099】

(輝度の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (12) の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0100】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (12) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0101】

[比較例 10]

スルホローダミン 101 に替えてクマリン 7 を使用したこと以外は、特開 2015-108572 号公報に記載された実施例 10 と同様の手法により、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (13) を製造した。

【0102】

(輝度の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (13) の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0103】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子 (13) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

【0104】

[比較例 11]

特開 2015-108572 号公報に記載された調製例 1 と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱硬化性樹脂粒子 (2) を製造した。

【0105】

(輝度の評価)

実施例 1 と同様に、熱硬化性樹脂粒子 (2) の輝度を評価した。結果を表 1 に示す。

【0106】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例 1 と同様に、熱硬化性樹脂粒子 (2) から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表 1 に示す。

10

20

30

40

50

【0107】

〔比較例12〕

スルホローダミン101に替えてクマリン30を使用したこと以外は、特開2015-108572号公報に記載された調製例1と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱硬化性樹脂粒子(3)を製造した。

【0108】

(輝度の評価)

実施例1と同様に、熱硬化性樹脂粒子(3)の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0109】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例1と同様に、熱硬化性樹脂粒子(3)から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0110】

〔比較例13〕

スルホローダミン101に替えてクマリン7を使用したこと以外は、特開2015-108572号公報に記載された調製例1と同様の手法により、蛍光色素を含有した熱硬化性樹脂粒子(4)を製造した。

【0111】

(輝度の評価)

実施例1と同様に、熱硬化性樹脂粒子(4)の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0112】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例1と同様に、熱硬化性樹脂粒子(4)から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0113】

〔比較例14〕

〔コア粒子の作製〕

10 mg/mLのBasic Yellow 40水溶液300 μ Lに替えて、10 mg/mLのスルホローダミン101水溶液300 μ Lを使用したこと以外は、実施例3と同様に行い、コア粒子(7)の水分散液を得た。得られたコア粒子(7)の粒径は100 nmであった。

【0114】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子(3)の代わりにコア粒子(7)を使用したこと以外は比較例3と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子(13)の水分散液を得た。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子(13)の濃度は9.2 mg/mLであった。

【0115】

(輝度の評価)

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子(13)の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0116】

(蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価)

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子(13)から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0117】

〔比較例15〕

〔コア粒子の作製〕

10 mg/mLのBasic Yellow 40水溶液300 μ Lに替えて、10 mg/mLのクマリン30水溶液300 μ Lを使用したこと以外は、実施例3と同様に行い、コア粒子(8)の水分散液を得た。得られたコア粒子(8)の粒径は100 nmであった。

【0118】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子（3）の代わりにコア粒子（8）を使用したこと以外は比較例3と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（14）の水分散液を得た。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（14）の濃度は9.1 mg/mLであった。

【0119】

（輝度の評価）

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（14）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0120】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（14）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0121】

〔比較例16〕

〔コア粒子の作製〕

10 mg/mLのBasic Yellow 40水溶液300 μ Lに替えて、10 mg/mLのクマリン7水溶液300 μ Lを使用したこと以外は、実施例3と同様に行い、コア粒子（9）の水分散液を得た。得られたコア粒子（9）の粒径は100 nmであった。

【0122】

〔蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子の製造〕

コア粒子（3）の代わりにコア粒子（9）を使用したこと以外は比較例3と同様に行い、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（15）の水分散液を得た。得られた水分散液に含まれるコアシェル型ナノ粒子（15）の濃度は8.9 mg/mLであった。

【0123】

（輝度の評価）

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（15）の輝度を評価した。結果を表1に示す。

【0124】

（蛍光色素の分散媒中への溶出量の評価）

実施例1と同様に、蛍光色素含有コアシェル型ナノ粒子（15）から分散媒中へ溶出した蛍光色素の量を評価した。結果を表1に示す。

【0125】

10

20

30

【表 1】

	コア粒子 ⁽¹⁾ を 構成する樹脂	シェル層を 構成する樹脂	蛍光色素	輝度	色素の溶出
				蛍光強度 (%)	色素濃度 (ug/mL)
実施例 1	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	Basic Yellow 40	70	検出されず
実施例 2	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	Basic Yellow 40	85	検出されず
実施例 3	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	Basic Yellow 40	100	検出されず
実施例 4	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	Basic Yellow 40	98	検出されず
実施例 5	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	Basic Yellow 40	98	検出されず
実施例 6	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	スルホローダ ミン 101	80	検出されず
実施例 7	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	クマリン 30	85	検出されず
実施例 8	熱可塑性樹脂	熱硬化性樹脂	クマリン 7	82	検出されず
比較例 1	熱可塑性樹脂	なし	Basic Yellow 40	85	1.5
比較例 2	熱硬化性樹脂	熱硬化性樹脂	Basic Yellow 40	72	検出されず
比較例 3	熱硬化性樹脂	なし	Basic Yellow 40	75	0.12
比較例 4	熱可塑性樹脂	熱可塑性樹脂	Basic Yellow 40	84	1.3
比較例 5	熱可塑性樹脂	なし	スルホローダ ミン 101	86	2.0
比較例 6	熱可塑性樹脂	なし	クマリン 30	90	1.5
比較例 7	熱可塑性樹脂	なし	クマリン 7	92	1.2
比較例 8	熱硬化性樹脂	熱硬化性樹脂	スルホローダ ミン 101	72	検出されず
比較例 9	熱硬化性樹脂	熱硬化性樹脂	クマリン 30	65	検出されず
比較例 10	熱硬化性樹脂	熱硬化性樹脂	クマリン 7	67	検出されず
比較例 11	熱硬化性樹脂	なし	スルホローダ ミン 101	95	0.15
比較例 12	熱硬化性樹脂	なし	クマリン 30	75	0.13
比較例 13	熱硬化性樹脂	なし	クマリン 7	77	0.15
比較例 14	熱可塑性樹脂	熱可塑性樹脂	スルホローダ ミン 101	90	1.8
比較例 15	熱可塑性樹脂	熱可塑性樹脂	クマリン 30	92	1.3
比較例 16	熱可塑性樹脂	熱可塑性樹脂	クマリン 7	90	1.2

(1) シェル層がない場合は、全体の粒子を意味する。

10

20

30

フロントページの続き

(72)発明者 中山 慎

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

Fターム(参考) 4G005 AA02 AB15 BA03 DB27X DD12X DD15X DD15Z DD16Z DD23Z DD32Z
DD34Z DD35Z DD52X DD53X DD58X DD65X DD66X DE08X EA03

专利名称(译)	含核壳型荧光染料的纳米粒子及其制备方法		
公开(公告)号	JP2018025433A	公开(公告)日	2018-02-15
申请号	JP2016156409	申请日	2016-08-09
[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		
[标]发明人	石井宏則 相宮拓司 高梨健作 中山慎		
发明人	石井 宏則 相宮 拓司 高梨 健作 中山 慎		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 B01J13/18		
CPC分类号	C08F2/22 C09B67/0005 C09B67/0013 C09B67/0097 C08F2/44 G01N33/582 G01N33/587 C08F212/08 C08F220/287 C08J7/0427 C08J2325/14 C08J2461/24 C08J2461/26 C08J2461/28 G01N33/54346 C08F220/44 C08F220/20		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/53.Y B01J13/18 G01N33/48.P G01N33/533		
F-TERM分类号	4G005/AA02 4G005/AB15 4G005/BA03 4G005/DB27X 4G005/DD12X 4G005/DD15X 4G005/DD15Z 4G005/DD16Z 4G005/DD23Z 4G005/DD32Z 4G005/DD34Z 4G005/DD35Z 4G005/DD52X 4G005/DD53X 4G005/DD58X 4G005/DD65X 4G005/DD66X 4G005/DE08X 4G005/EA03		
其他公开文献	JP6620699B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在步骤1中，通过在荧光染料存在下聚合用于热塑性树脂合成的单体来制备由含有荧光染料的热塑性树脂制成的芯颗粒， - 制备由热固性树脂制成的芯颗粒的步骤1壳牌2含荧光染料的纳米粒子用于免疫组织化学染色或活细胞成像生产方法。 根据本发明的含有荧光色素的纳米粒子的制造方法，能够制造辉度高且不会在水，生理盐水，介质等介质中溶出的含有荧光色素的纳米粒子。这种含荧光染料的纳米颗粒可以有效地用于免疫组织化学染色和活细胞成像。 【选型图】无

(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2018-25433 (P2018-25433A)	
				(43) 公開日 平成30年2月15日 (2018. 2. 15)	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
G O 1 N 33/543 (2006.01)		G O 1 N 33/543		5 7 5	
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N 33/53		Y	
B O 1 J 13/18 (2006.01)		B O 1 J 13/18			
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 21 頁)					
(21) 出願番号 特願2016-156409 (P2016-156409)		(71) 出願人 000001270			
(22) 出願日 平成28年8月9日 (2016. 8. 9)		コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号			
(出願人による申告) 平成27年度国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「コフランド事業」フランスBpifranceとの国際研究開発・実証事業/蛍光ナノイメージングを用いた創薬支援システムの開発/委託研究 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人 110001070 特許事務法人 S S I N P A T 石井 宏則 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 相宮 拓司 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】 コアシェル型蛍光色素含有ナノ粒子およびその製造方法					