

(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2004-77389

(P2004-77389A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/58	GO 1 N 33/58	A 2GO43
GO 1 N 21/78	GO 1 N 33/58	Z 2GO45
GO 1 N 33/48	GO 1 N 21/78	C 2GO54
GO 1 N 33/533	GO 1 N 33/48	M
// GO 1 N 21/64	GO 1 N 33/48	P

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-240848 (P2002-240848)	(71) 出願人	000233055 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番43
(22) 出願日	平成14年8月21日 (2002.8.21)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100102576 弁理士 渡辺 敏章
		(74) 代理人	100103931 弁理士 関口 鶴彦
		(72) 発明者	佐藤 恵一 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

最終頁に続く

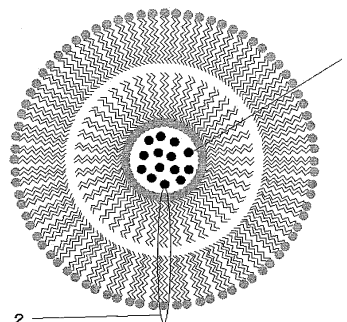
(54) 【発明の名称】 半導体ナノ粒子を含む機能性蛍光試薬

(57) 【要約】

【課題】優れた蛍光特性を有し、生体高分子との融合性を有する半導体ナノ粒子を開発する。

【解決手段】 磷脂質二分子膜2または磷脂質多重層膜により半導体ナノ粒子1を包含することにより半導体ナノ粒子に機能性を付与する。これにより、半導体ナノ粒子の蛍光特性を維持したまま機能性半導体ナノ粒子を製造することが可能となった。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ベシクル内に半導体ナノ粒子を包含し、蛍光特性を有することを特徴とする機能性蛍光物質。

【請求項 2】

1 個のベシクル内に 2 個以上の半導体ナノ粒子を包含することを特徴とする請求項 1 に記載の機能性蛍光物質。

【請求項 3】

前記 2 個以上の半導体ナノ粒子が、異なる蛍光波長を持つ半導体ナノ粒子であることを特徴とする請求項 2 に記載の機能性蛍光物質。

10

【請求項 4】

前記ベシクルが、燐脂質二分子膜からなることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の機能性蛍光物質。

【請求項 5】

前記ベシクルが、燐脂質多重層膜からなることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の機能性蛍光物質。

【請求項 6】

前記ベシクル表面に生体関連物質が固定されることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の機能性蛍光物質。

【請求項 7】

前記生体関連物質が、DNA、タンパク質、抗体、抗原のいずれかであることを特徴とする請求項 6 に記載の機能性蛍光物質。

20

【請求項 8】

前記包含される半導体ナノ粒子の粒径が 10% rms 未満の偏差を示す単分散であることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の機能性蛍光物質。

【請求項 9】

前記包含される半導体ナノ粒子が発する蛍光スペクトルの半値全幅値 (FWHM) が 60 nm 以下であることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれかに記載の機能性蛍光物質。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれかに記載の機能性蛍光物質を細胞・生体組織染色剤として用いることを特徴とする細胞・生体組織染色方法。

30

【請求項 11】

抗原の検出に、その抗原に対する抗体を請求項 1 から 8 のいずれかに記載の機能性蛍光物質で標識したものをを用いることを特徴とする免疫蛍光方法。

【請求項 12】

抗体の検出に、その抗体に対する抗原を請求項 1 から 9 のいずれかに記載の機能性蛍光物質で標識したものをを用いることを特徴とする免疫蛍光方法。

【請求項 13】

フローサイトメトリーにおいて、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の機能性蛍光物質を標識に用いたことを特徴とするバイオアッセイ方法。

40

【請求項 14】

異なる蛍光色素の量比による ID を付与した請求項 1 から 9 のいずれかに記載の機能性蛍光物質と、生体関連物質を反応させ、反応後の前記機能性蛍光物質をフローサイトメトリーにより検出することを特徴とする請求項 13 に記載のバイオアッセイ方法。

【請求項 15】

フローサイトメトリーにおいて、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の機能性蛍光物質を標識に用いたことを特徴とするバイオアッセイ装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

50

本発明は、生体関連物質の修飾・染色等を行うことが可能な、半導体ナノ粒子を包含する機能性蛍光物質に関する。また、この蛍光物質の蛍光特性を利用するバイオアッセイ等に関する。

【0002】

【従来の技術】

粒径が10nm以下の半導体ナノ粒子は、バルク半導体結晶と分子との遷移領域に位置することから、結晶とも分子のいずれとも異なった物理化学特性を示す。このような領域では、量子サイズ効果の発現により、粒径の減少に伴って半導体ナノ粒子のエネルギーギャップが増大する。さらにこれに付随して、バルク半導体で見られたエネルギーバンドの縮退が解け軌道が離散化し、伝導帯下端が負側に、価電子帯上端が正側にシフトする。

10

【0003】

CdX (XはS、Se、Te)半導体ナノ粒子の製造方法は、CdおよびXの前駆体を等モル量溶解することで簡単に調製することができる。これらは、ZnS、ZnSe、HgS、HgSe、PbS、PbSe等における製造についても同様である。

【0004】

半導体ナノ粒子が注目されている所以は、半値全幅の狭い強い蛍光を発することを特徴とするため、さまざまな蛍光色の創製が可能であり、将来の応用用途がほぼ無限に考えられるためである。しかし、前記のように該前駆体同士を混合することのみにより得られた半導体ナノ粒子は、広い粒径分布を示すため半導体ナノ粒子の特性を十分に利用することができない。このため、調製直後の広い粒径分布を有する半導体ナノ粒子から、化学的手法を用いて粒径分離を精密に行い、特定の粒子サイズの半導体ナノ粒子のみを分離・抽出することで単分散化することが試みられている。これまでに、ナノ粒子の有する表面電荷が粒径によって変化することを利用した電気泳動分離法、粒径による保持時間の差を利用した排除クロマトグラフィー、粒子サイズの違いによる有機溶媒中への分散性の差を利用したサイズ選択沈殿法などが挙げられる。

20

【0005】

以上に、前駆体同士を混合させることにより調整したナノ粒子を、粒径ごとに分類する手法を挙げたが、金属カルコゲナイド半導体が溶存酸素下で光照射により酸化溶解することを利用し粒径の単分散化を行うサイズ選択光エッチング法も報告されている。

【0006】

さらに、粒径の単分散化を、該前駆体同士の混合の段階で制御させることで行う方法もある。この代表的なものとして、逆ミセル法が挙げられる。逆ミセル法は、スルホコハク酸ジソオクチルナトリウム等の両親媒性分子と水をヘプタン等の有機溶媒中に混合し有機溶媒中に逆ミセルを形成させ、逆ミセル中の水相のみで前駆体同士の反応を行う方法である。逆ミセルの大きさは、前記両親媒性分子と水との量比で決定され、比較的大きさを均一に制御することができる。調製される半導体ナノ粒子の大きさは、逆ミセルの大きさに依存するため、比較的粒径のそろった半導体ナノ粒子を調整することが可能となる。

30

【0007】

以上のような方法により得られた半導体ナノ粒子は、比較的狭い粒径分布を示す。しかしながら、これらの方法により調整された半導体ナノ粒子の蛍光特性は、顕著なピークを持たないなだらかな蛍光スペクトルを示す。さらに、前記蛍光スペクトルは、半導体ナノ粒子が発光するべき蛍光の理論値と異なる波長においてピークを示す。すなわち、前記半導体ナノ粒子は、半導体ナノ粒子内部が示すバンドギャップ蛍光のほかに、半導体ナノ粒子内部のエネルギーレベルの禁制帯内に存在するエネルギーレベルから発すると見られる全く別の蛍光を発する。この蛍光を発するエネルギーレベルは、主に半導体ナノ粒子の表面サイトに存在すると考えられている。本来、半導体ナノ粒子の粒径制御による蛍光特性の変化は、バンドギャップ蛍光に現れるため、粒径分布の狭い半導体ナノ粒子の性質を阻害する現象となり、解決すべき課題とされてきた。

40

【0008】

この課題の代表的な解決方法として、核となる半導体材料に対し、前記半導体材料よりも

50

より広いバンドギャップを持つ半導体材料、無機材料および有機材料により被覆することにより複層化し、これらの蛍光を抑制する方法が試されている。特に、無機材料の被覆の方法として代表的なものとして、CdSeナノ粒子に対しCdSをコーティングしたもの(J. Phys. Chem. 100: 8927 (1996))、CdSナノ粒子に対しZnSをコーティングしたもの(J. Phys. Chem. 92: 6320 (1988))、CdSeナノ粒子に対しZnSをコーティングしたもの(J. Am. Chem. Soc. 112: 1327 (1990))等が挙げられる。また、CdSeナノ粒子に対しZnSをコーティングしたもの(J. Am. Chem. Soc. 112: 1327 (1990))については、オストワルド熟成現象を利用し、配位溶媒中にて行う製法を採用することで十分な蛍光特性をもつ半導体ナノ粒子を得ることに成功している(J. Phys. Chem. B. 101: 9463 (1997))。以上にあげた複層化半導体ナノ粒子は、半導体ナノ粒子の持つバンドギャップよりも大きいバンドギャップを持った材料でありかつ半導体ナノ粒子の禁制帯内にバンドギャップが存在しない物質で被覆することで、半導体ナノ粒子表面の欠陥サイトを抑制し、半導体ナノ粒子本来の蛍光特性を得ようとするものである。

10

【0009】

以上のような方法により半導体ナノ粒子を表面処理することにより、ある程度欠陥サイトを抑制することができ、十分な蛍光特性を持った半導体ナノ粒子を調製することが可能となった。

【0010】

こうして得られた半導体ナノ粒子は、表面に対して容易にチオール化合物等による修飾を施すことが可能であり、これにより特定の官能基を露出させた半導体ナノ粒子を調整することができる。ところが、半導体ナノ粒子をチオール化合物で修飾した場合、多くの場合、蛍光特性が著しく低下する。また、チオール修飾半導体ナノ粒子の安定性についても研究が進んでいる。例えば、Pengらは、J. Am. Chem. Soc. 123: 8844 (2001)においてメルカプトプロピオン酸修飾CdSeナノ粒子による安定性の検討を行っているが、あまり好ましい結果を示していない。

20

【0011】

一方、磷脂質二分子膜を利用したベシクルに関する研究は、ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)の分野で非常に注目されており、薬剤を局所的に投与することを主な目的とし、急速に進歩している。これは、磷脂質二分子膜にタンパク質および抗体を固定化することで、生体組織の認識等の機能性を付与することが可能となること、また細胞と結合したベシクルが該細胞と融合することで、ベシクル内部の物質を細胞内に取り込むことが可能である性質を応用したものである。例えば、がん治療において適用される場合、がん細胞のみに直接薬剤を投与することが可能となれば、抗がん剤による副作用が大幅に低減されることが考えられ、利用の効果は非常に大きい。

30

【0012】

ベシクルを利用した半導体ナノ粒子の製造は、いくつか行われている。代表的な例として、Korgelらは、Langmuir. 16: 3588 (2000)中において、ベシクル中における半導体ナノ粒子の製造について試みている。しかしながら、本報告中においては、ベシクル中の半導体ナノ粒子はただひとつであり、しかも、半導体ナノ粒子の隔離を目的とするものであって、蛍光特性等の機能性を付与することを目的としていない。この他の報告についても、蛍光特性等の機能性を付与する目的に当てはまるものはない。

40

【0013】

一方、ポリスチレンビーズを用いたフローメトリーによるバイオアッセイについては、Luminex社により製品が開発されており、すでに市販されている。これは、ポリスチレンビーズ内に、異なる蛍光色素の量比によりIDを付与し、ポリスチレンビーズ表面に特定の生体高分子および抗体を固定化させた前記ビーズ表面上にて蛍光修飾させたサンプルとの反応を行い、反応後のビーズおよびビーズ表面をフローメトリーにより一つずつ同時に読み取ることにより、サンプルとビーズ表面に固定した生体高分子および抗体との結

50

含量を測定するものである。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

上記の通り、半導体ナノ粒子表面へ機能性を付与するためには、半導体ナノ粒子表面への修飾が必要であるが、直接的な表面修飾を行うことは、前記ナノ粒子の蛍光特性を維持する上で好ましくないものであった。

そこで、本発明は、優れた蛍光特性を有し、生体高分子との融合性を有する半導体ナノ粒子を開発することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者は鋭意研究した結果、半導体ナノ粒子の蛍光特性と蛍光物質としての機能性を持たせる手段として、燐脂質二分子膜等から成るベシクルにて構成されたカプセル中に半導体ナノ粒子を封じ込めることにより、半導体ナノ粒子の表面状態は維持され、発光特性を持った機能性蛍光物質としての半導体ナノ粒子の利用を行うことができることを見出し本発明に到達した。

即ち、第1に本発明は、ベシクル内に半導体ナノ粒子を包含し、蛍光特性を有することを特徴とする機能性蛍光物質である。

【0016】

ベシクル (vesicle) とは、リポソーム (liposome) とも呼ばれる人工膜の一種である。燐脂質を緩衝液に懸濁し、その相転移温度以上に放置するとき形成される、自動的に二分子層膜からなる閉鎖小胞のことである。ベシクルを機械的な振動を与えて作製すると、直径は $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ と不均一で、多重の同心円状の小胞ができる。これを多重層ベシクル (多重層リポソーム) またはマルチラメラリポソーム (multilamellar liposome) と呼ぶ。さらに超音波処理を行うと直径 $20 \sim 50 \text{ nm}$ の比較的サイズの均一な1枚の脂質二分子層からなるベシクル (リポソーム) ができる。これを脂質二分子膜ベシクル (一枚膜リポソーム、single compartment liposome) またはユニラメラリポソーム (unilamellar liposome) と呼ぶ。より大きい脂質二分子膜ベシクルの調製は、燐脂質を有機溶媒 (エーテルなど) に溶解し、それに緩衝液を加え、水流ポンプで有機溶媒を除いて得られる。この場合、直径は $200 \sim 500 \text{ nm}$ 程度となる。ベシクルにはコレステロール・糖脂質・アシルグリセロールなどを加えたり、さらに膜タンパク質を組み込ませることも可能であり、生体膜の構造や機能の研究に用いられている。このほか脂質分子の運動、相転移、相分離などが研究されている。ベシクルは内部に水を含んだ閉鎖小胞であるため、水溶性のイオン・低分子物質・タンパク質などを小胞内に保持させることが可能であり、例えばアドリアマイシンなどの抗癌剤をリポソーム中に封入し、特定の患部だけに薬剤を運ぶキャリアー (DDS) としても用いられている。また、このようなベシクルは、それを細胞膜と融合させることによって、細胞膜を通過できない高分子物質やプラスミドなどの細胞内導入を行うのに役立つ。

【0017】

本発明で言う半導体ナノ粒子とは、直径がナノメートルオーダーの化合物半導体粒子である。化合物半導体粒子としては、一般式 MX_n で表される。ここで、Mは金属原子であり、Zn、Cd、Hg、In、Ga、Ti、W、Pb等から選ばれる。Xは、O、S、Se、Te、P、As、N等から選ばれる。具体的には、 ZnO 、 ZnS 、 ZnSe 、 ZnTe 、 CdO 、 CdS 、 CdSe 、 CdTe 、 HgS 、 HgSe 、 HgTe 、 InP 、 InAs 、 GaN 、 GaP 、 GaAs 、 TiO_2 、 WO_3 、 PbS 、 PbSe 等が例示される。また、安定化のために半導体ナノ粒子表面に水酸基を有するものも好ましく用いられる。

【0018】

本発明の半導体ナノ粒子は、それ自体が顕著な蛍光特性を有するが、特に半導体ナノ粒子の粒径が単分散の場合において蛍光特性が強く発現される。具体的には、半導体ナノ粒子

10

20

30

40

50

の粒径が、直径において10% rms未満の偏差を示す単分散であることが好ましい。半導体ナノ粒子の粒径を単分散化させる方法は限定されず、従来知られた電気泳動分離法、排除クロマトグラフィー、サイズ選択沈殿法、サイズ選択光エッチング法、逆ミセル法等が挙げられる。

【0019】

本発明の半導体ナノ粒子が発する蛍光は鋭い蛍光強度ピークを有するものであり、半値全幅値(FWHM)で60nm以下の狭いスペクトル範囲で光を放出することも可能である。好ましくは半値全幅値(FWHM)で40nm以下、更に好ましくは半値全幅値(FWHM)で30nm以下である。

【0020】

本発明において、1個のベシクル内に含まれる半導体ナノ粒子の個数は制限されず、ベシクルの大きさに応じて1個から数万個以上まで包含可能である。図1は本発明の機能性蛍光試薬の模式図である。図1において、半導体ナノ粒子1を磷脂質二分子膜2により形成されたベシクルにより包含している。1個のベシクル内に、特に2個以上の半導体ナノ粒子を包含することができる。前記2個以上の半導体ナノ粒子が、異なる蛍光波長を持つ半導体ナノ粒子である場合には、後述するようにサイトメトリー等の蛍光標識物質として用いる際に極めて効果的である。

上記のように、ベシクルには、磷脂質二分子膜からなるものと、磷脂質多重層膜からなるものがあるが、本発明ではどちらかに制限されない。

【0021】

ベシクルを構成する磷脂質分子は、生体高分子との親和性が高い。そこで、本発明の機能性蛍光物質には、ベシクル表面に生体関連物質が固定されたものも含まれる。ここで、固定される生体関連物質としては特に制限されないが、DNA、タンパク質、抗体、抗原等が好ましく例示される。

【0022】

本発明は、上記半導体ナノ粒子の蛍光特性を利用する蛍光試薬であり、この蛍光試薬は、バイオ・医療の分野での検査試薬として、また各種波長での発光を利用して発光素子として用いることができる。その他、従来知られた蛍光試薬が用いられている分野に適用することが可能である。

【0023】

第2に本発明は、上記の機能性蛍光物質を細胞・生体組織染色剤として用いることを特徴とする細胞・生体組織染色方法である。例えば、細胞・生体組織内の蛍光性物質に紫外線などの励起光をあてて発する蛍光を観察する蛍光顕微鏡や、生体組織への造影剤等に応用できる。

【0024】

第3に本発明は、免疫蛍光方法であり、抗原の検出に、その抗原に対する抗体を上記の機能性蛍光物質で標識したものをを用いる場合、および抗体の検出に、その抗体に対する抗原を上記の機能性蛍光物質で標識したものをを用いる場合の両者を含む。

【0025】

第4に本発明は、フローサイトメトリーにおいて、上記の機能性蛍光物質を標識に用いたことを特徴とするバイオアッセイ方法である。蛍光を用いるフローサイトメトリー(flow cytometry)は、液体中に懸濁する細胞、個体およびその他の生物粒子の粒子数、個々の物理的・化学的・生物学的性状を計測する技術である。サンプルを順次、測定部位に流し、蛍光から同一粒子について多項目同時測定、例えばDNAのハイブリダイゼーション、細胞の形、大きさ、異なる蛍光色素で標識された数種類のモノクローナル抗体による分子の発現の解析などが可能である。さらに、培養細胞・リンパ系臓器や血流中の特定の細胞群、プランクトンをはじめとした天然の水中粒子、さらに特定の染色体の分離など広く用いられる。

特に本発明では、異なる蛍光色素の量比によるIDを付与した上記の機能性蛍光物質と、生体関連物質を反応させ、反応後の前記機能性蛍光物質をフローサイトメトリーにより検

10

20

30

40

50

出ることバイオアッセイ方法が好ましく例示される。

【0026】

第5に本発明は、フローサイトメトリーにおいて、上記の機能性蛍光物質を標識に用いたことを特徴とするバイオアッセイ装置である。

【0027】

【実施例】

[半導体ナノ粒子の調製]

半導体ナノ粒子の調製は、次のように行った。まず、ヘキサメタリン酸ナトリウム(0.1 mmol)と過塩素酸カドミウム(0.2 mmol)の水溶液を1000 ml作成し、pH 10.3に調整する。その後、溶液中を窒素ガスでバブリングを行い、硫化水素ガス(0.2 mmol)を激しく攪拌させながら溶液中に注入する。その後、しばらく攪拌を行う。このとき溶液の色は、光学的に透明な無色から光学的に透明な黄色へ変化する。

10

【0028】

このときすでにヘキサメタリン酸により安定化された半導体ナノ粒子が溶液中に存在しているが、前記半導体ナノ粒子は、広い粒径分布を持ち、その標準偏差は平均粒径の15%以上にまでおよぶ。また、この状態における半導体ナノ粒子の全体的な蛍光強度は、非常に弱い。

【0029】

[半導体ナノ粒子の単分散化]

ここで、サイズ選択光エッチング法について述べる。半導体ナノ粒子の物理化学特性は、量子サイズ効果により粒径に依存して現れる。したがって、この状態では物性が平均化されてしまい、半導体ナノ粒子の特性を十分に発揮することができない。このため、調製直後の広い粒径分布を有する半導体ナノ粒子から、化学的手法を用いて粒径分離を精密に行い、特定の粒子サイズの半導体ナノ粒子のみを分離・抽出することで単分散化する必要がある。以上の作業を行う方法のひとつとして、サイズ選択光エッチング法が挙げられる。サイズ選択光エッチング法は、半導体ナノ粒子が量子サイズ効果により粒径減少に伴ってエネルギーギャップが増大すること、および金属カルコゲナイド半導体が溶存酸素下で光照射により酸化溶解することを利用しており、広い粒径分布を有する半導体ナノ粒子に、その吸収端の波長よりも短い波長の単色光を照射することで、粒径の大きな半導体ナノ粒子のみを選択的に光励起し溶解させ、より小さな半導体ナノ粒子へと粒径をそろえていく方法である。

20

30

【0030】

まず、前記のように得られたヘキサメタリン酸により安定化された広い粒径分布を持つ半導体ナノ粒子溶液に、窒素ガスでバブリングを行い、さらに10分間酸素によるバブリングを行う。その後、メチルピオロゲンを溶液中に50 μmol/lになるように加え、攪拌を行いながらレーザーを当てる。本発明における単色光照射は、半導体ナノ粒子を光溶解させるためのものであり、単色光の波長は、450 nmとした。この単色光の波長を変化させることにより、半導体ナノ粒子の蛍光スペクトルにおけるピーク時の蛍光波長を制御することが可能となる。

【0031】

ここで得られた半導体ナノ粒子は、波長476.5 nmの波長の光を照射した場合、平均粒径3.2 nm、標準偏差0.19 nmであり、標準偏差が平均粒径の約6%と非常に狭い粒径分布を示す。すなわち、きわめて単分散に近い半導体ナノ粒子溶液を得ることができる。

40

【0032】

[半導体ナノ粒子の安定化]

前記方法により得られたヘキサメタリン酸により安定化された単分散半導体ナノ粒子をさらに精製するために、300 μlのメルカプトプロピオン酸(MPA)を加え数時間攪拌させることにより、表面修飾を行った。さらに、これらに対して限外ろ過をおこない、水溶液中のメチルピオロゲン、ヘキサメタリン酸、未反応チオール化合物、光エッチングの

50

際に溶解したイオン等を取り除き、純粋なチオール化合物による安定化半導体ナノ粒子溶液を得た。

【0033】

[半導体ナノ粒子のベシクルへの包含]

以上のように得られた半導体ナノ粒子は、蛍光特性を持っている。この蛍光特性を持った状態のナノ粒子に対して、半導体ナノ粒子表面に直接修飾を行うことで機能性を付与する方法もあるが、前述した理由により、直接半導体ナノ粒子表面に対し機能性を付与するための修飾を行うことは好ましくない。そこで本発明は、半導体ナノ粒子をベシクル中に包含し、ベシクル表面に機能性を付与することで、半導体ナノ粒子蛍光体への機能性を付与させることとした。以下に、半導体ナノ粒子をベシクル中に包含する方法について例示する。

10

【0034】

ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC) 0.036 g (0.045 mmol)を共栓つき試験管に入れた。これに対し、クロロホルムを約2 ml加えてDSPCを完全に溶解させ、ロータリーエバポレーターを用いてクロロホルムを除去すると、試験管内壁に薄膜ができた。その後、完全にクロロホルムを除去するため、数時間真空乾燥を行った。さらに前記薄膜に対し、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)と吸光度0.1となるような濃度の半導体ナノ粒子溶液からなる緩衝液を4.5 ml加え、70℃に加熱して薄膜を試験管内壁からはがし、約70℃の湯浴中で25 Wプローブ型ソニケターを用いて5分間超音波照射をした。得られた分散液を、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)と100 mM NaClからなる緩衝液を溶離液に用いたゲルろ過カラム(Sephadex G50 2.0 g)によりゲルろ過を行い、ベシクルにより包含した半導体ナノ粒子を単離した。

20

【0035】

以上のようにして、ベシクルにより包含した半導体ナノ粒子を得ることができた。前記半導体ナノ粒子は、表面にDNA、タンパク質、脂質、抗体等の生体高分子を固定化することが可能となり、前記生体高分子が固定化された半導体ナノ粒子を利用することで、特異的な細胞のみを染色することが可能となる。また、細胞融合能を持ったベシクルを適用した場合、細胞を直接染色することが可能となる。さらに、半導体ナノ粒子は、前述したように、一般的な色素と比較し非常に耐久性が高く、今後普及するであろうリアルタイムバイオイメージング、あるいはリアルタイムな医療および診断への応用が期待される。

30

【0036】

[異なる蛍光波長を有する半導体ナノ粒子の包含]

本発明では、ベシクル中に蛍光波長の異なる半導体ナノ粒子を混合して包含し、ベシクルにIDの付与を行うことも可能となる。図2に1個のベシクル内に異なる蛍光波長を有する半導体ナノ粒子を包含する場合の模式図を示。図2において、二種類の蛍光波長を持つナノ粒子により前記IDの付与を行う場合、第一半導体ナノ粒子3と第二半導体ナノ粒子4を磷脂質二分子膜5により形成されたベシクルにより包含することで、前述のポリスチレンビーズを用いたフローメトリーによるバイオアッセイのポリスチレンビーズと同等の機能を持たせることが可能であり、異なる蛍光波長を持った第一半導体ナノ粒子3と第二半導体ナノ粒子4の量比によってIDが決定される。このとき異なる半導体ナノ粒子の種類数はいくつでもよい。

40

上記実施例におけるベシクルは、単層膜ベシクルについて例示したが、多層膜ベシクルについても同様である。

【0037】

[発明の効果]

蛍光体としての耐久性の高い半導体ナノ粒子と、結合能および認識能をもつ両親媒性の磷脂質二分子膜または磷脂質多重層膜を組み合わせることにより、非常に高機能な蛍光体を得ることが可能となった。また、半導体ナノ粒子への直接的な表面修飾を行うことを必要としないため、蛍光特性を維持したまま半導体ナノ粒子に機能性を付与することが可能と

50

なった。

【0038】

本発明の半導体ナノ粒子の蛍光特性を利用する蛍光試薬は、バイオ・医療の分野での検査試薬として、また各種波長での発光を利用して発光素子として用いることができる。その他、従来知られた蛍光試薬が用いられている分野に適用することが可能である。

【図面の簡単な説明】

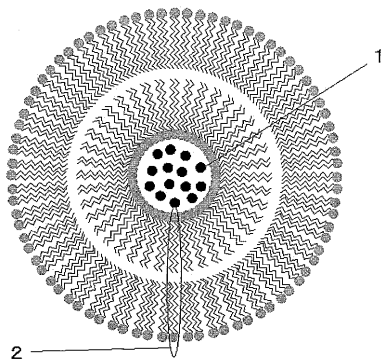
【図1】本発明の機能性蛍光試薬の模式図である。

【図2】1個のベシクル内に異なる蛍光波長を有する半導体ナノ粒子を包含する場合の模式図である。

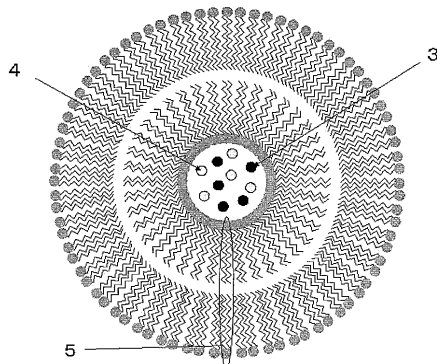
【符号の説明】

- 1 ... 半導体ナノ粒子
- 2 ... 燐脂質二分子膜
- 3 ... 第一半導体ナノ粒子
- 4 ... 第二半導体ナノ粒子
- 5 ... 燐脂質二分子膜

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 21/64

F

(72)発明者 桑畑 進

大阪府吹田市山田丘 2 - 1 大阪大学大学院工学研究科内

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA04 DA02 EA01 GA07 GB21 KA02 LA01

2G045 BB24 CB01 DA13 FA29 FB03 FB12 GC15 JA01

2G054 AA08 CA22 CA30 CE02 EA03 GA04 JA01

专利名称(译)	功能荧光试剂含有半导体纳米粒		
公开(公告)号	JP2004077389A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2002240848	申请日	2002-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	日立软件工程株式会社		
申请(专利权)人(译)	日立软件工程有限公司		
[标]发明人	佐藤 惠一 桑畑 進		
发明人	佐藤 惠一 桑畑 進		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/64 G01N21/78 G01N33/48 G01N33/533 G01N33/58		
CPC分类号	B82Y15/00 C12Q1/6816 G01N21/6428 G01N33/586 G01N33/588		
FI分类号	G01N33/58.A G01N33/58.Z G01N21/78.C G01N33/48.M G01N33/48.P G01N33/533 G01N21/64.F B82Y15/00		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB21 2G043/KA02 2G043/LA01 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/JA01		
代理人(译)	渡边 敏章		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：开发具有优异荧光特性和与生物聚合物的可熔性的半导体纳米颗粒。解决方案：通过用磷脂双分子膜2或磷脂多层膜（半导体纳米颗粒）封闭半导体纳米颗粒1来赋予半导体纳米颗粒1功能。由此，可以在保持半导体纳米颗粒的荧光特性的同时制造功能性半导体纳米颗粒。之

