

(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2014-95025

(P2014-95025A)

(43) 公開日 平成26年5月22日(2014.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C09K 11/00 (2006.01)</b>	C09K 11/00	2G043
<b>G01N 21/64 (2006.01)</b>	G01N 21/64	4G146
<b>G01N 33/553 (2006.01)</b>	G01N 33/553	4H001
<b>B82Y 5/00 (2011.01)</b>	B82Y 5/00	
<b>B82Y 10/00 (2011.01)</b>	B82Y 10/00	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-246538 (P2012-246538)  
 (22) 出願日 平成24年11月8日 (2012.11.8)

(71) 出願人 504176911  
 国立大学法人大阪大学  
 大阪府吹田市山田丘1番1号  
 (74) 代理人 100121441  
 弁理士 西村 電平  
 (74) 代理人 100113468  
 弁理士 佐藤 明子  
 (74) 代理人 100154704  
 弁理士 齊藤 真大  
 (74) 代理人 100182121  
 弁理士 三宅 絃子  
 (72) 発明者 森田 将史  
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法  
 人大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイヤモンド複合粒子

## (57) 【要約】

【課題】長期にわたる化学的・物理的安定性に優れ、生体に無害で非侵襲であり、かつ、複数の分子や細胞等を色分けして同時に観察すること等ができるダイヤモンド複合粒子を提供する。

【解決手段】NVセンターを有する蛍光ナノダイヤモンド粒子と、貴金属ナノ粒子とを含有するダイヤモンド複合粒子を調製した。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

NV センターを有する蛍光ナノダイヤモンド粒子と、貴金属ナノ粒子とを含有することを特徴とするダイヤモンド複合粒子。

**【請求項 2】**

異なる波長領域の蛍光強度が増強された複数種類の複合粒子を含有する請求項 1 記載のダイヤモンド複合粒子。

**【請求項 3】**

蛍光寿命時間が異なる複数種類の複合粒子を含有する請求項 1 記載のダイヤモンド複合粒子。

**【請求項 4】**

金属種が異なる前記貴金属ナノ粒子を含有する請求項 1、2 又は 3 記載のダイヤモンド複合粒子。

**【請求項 5】**

前記貴金属ナノ粒子に、標的物質に対して特異的結合能を有する特異的結合物質が担持されている請求項 1、2、3 又は 4 記載のダイヤモンド複合粒子。

**【請求項 6】**

前記貴金属ナノ粒子に、高分子化合物が結合している請求項 1、2、3、4 又は 5 記載のダイヤモンド複合粒子。

**【請求項 7】**

請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載のダイヤモンド複合粒子を含有することを特徴とする蛍光標識剤。

**【請求項 8】**

請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載のダイヤモンド複合粒子からなることを特徴とする量子計測素子。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

この発明は、長期にわたる化学的・物理的安定性に優れ、生体に無害で非侵襲であり、かつ、複数の分子や細胞等を色分けして同時に観察すること等ができるダイヤモンド複合粒子に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

近時、ライフサイエンスの分野において、蛍光による可視化技術は、必須技術の一つとなっている。これまで、有機色素、蛍光タンパク質、量子ドット、有機色素ドーブシリカビーズ等の様々な蛍光プローブが利用されている。しかしながら、樹状細胞療法等の免疫細胞治療に代表されるような長期間の分子・細胞動態の可視化が必要な分野では、数週間から数か月にわたって、生体毒性がなく、輝度消滅を起こさないような非常に安定な蛍光特性を示す蛍光プローブが求められている。

**【0003】**

ところで、ダイヤモンドは、化学的に安定で生体内での分解が起こりにくいという、物理的にも非常に安定であることが知られている。近時、このように化学的・物理的に安定なナノダイヤモンド粒子 (ND) を、バイオイメージングや、ドラッグデリバリーシステム (DDS) に活用することが検討されている。本発明者は、このようなダイヤモンドに対して、注入量を精密に制御してイオンを注入する方法を開発している (特許文献 1)。

**【0004】**

NV センターはダイヤモンド結晶中の複合欠陥の一種であり、不純物原子である窒素 (N) と空孔 (V) が隣り合った格子点に存在する場合のカラーセンターであるが、退色せず、点滅せず、かつ、消光しないという他の蛍光物質にはない特徴を有する。また、NV センターは、常温で基底状態がゼロ磁場分裂によりスピン分極するため、光検出磁気共鳴

10

20

30

40

50

法（ODMR（Optically Detected Magnetic Resonance））により、その状態を蛍光で検出することが可能である。

【0005】

NVセンターの光安定性により、ナノダイヤモンド粒子の局在化や分布を追跡することができるので、複雑な細胞分裂周期にわたる長期の細胞追跡やエンドサイトーシスの観察等に活用されている（非特許文献1）。

【0006】

また、NVセンターのスピン情報の効率的な読み出しや操作のために、表面プラズモン効果を有するナノ材料との複合体の開発がおこなわれており、例えば、金ナノ粒子や銀シートによる蛍光強度増強効果が報告されている。更に、NVセンターを、量子計測素子として利用することも提案されている。すなわち、NVセンターを利用し、細胞内外の磁場変動を検出したり、NVセンター近傍の核スピン情報をスピン・スピン相互作用等によりセンシングすることで、1分子NMR、ナノMRI技術を確立することである。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2010-13718号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Phys. Status Solidi A 209,1609-1618(2012)

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

そこで本発明は、長期にわたる化学的・物理的安定性に優れ、生体に無害で非侵襲であり、かつ、複数の分子や細胞等を色分けして同時に観察すること等ができるダイヤモンド複合粒子を提供すべく図ったものである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、鋭意検討の結果、NVセンターを有する蛍光ナノダイヤモンド粒子に貴金属ナノ粒子を担持させることにより、貴金属ナノ粒子のプラズモン効果によりNVセンターの蛍光特性を制御することに成功し、NVセンターという単一の発光源を用いながら、多色化によるイメージングに道を開いた。更に、本発明者は、当該貴金属ナノ粒子を、蛍光ナノダイヤモンド粒子に機能性物質を結合するための「足場」としても利用して、貴金属ナノ粒子を介して蛍光ナノダイヤモンド粒子に、生体由来の標的物質に特異的に結合する物質を固定して、分子や細胞等に対する特異性を付与することに成功し、分子や細胞等を色分けして標識することを可能とした。本発明はこれらの知見に基づき完成に至ったものである。

30

【0011】

すなわち本発明に係るダイヤモンド複合粒子は、NVセンターを有する蛍光ナノダイヤモンド粒子と、貴金属ナノ粒子とを含有することを特徴とする。

40

【0012】

前記ダイヤモンド複合粒子として、異なる波長領域の蛍光強度が増強された複数種類の複合粒子や、蛍光寿命時間が異なる複数種類の複合粒子を併用することにより、特定波長における蛍光強度や蛍光寿命時間を、光検出磁気共鳴法（ODMR）や蛍光寿命顕微法（FLIM（fluorescence lifetime imaging））で測定し、これを画像処理することにより、蛍光強度や蛍光寿命時間が異なる複合粒子を異なる色で表示する多色化が可能となる。

【0013】

異なる波長領域の蛍光強度が増強された複数種類の複合粒子を得るためには、例えば、金属種が異なる貴金属ナノ粒子を含有するダイヤモンド複合粒子を用意すればよい。また

50

、蛍光寿命時間が異なる複数種類の複合粒子を得るためには、例えば、同一又は異なる金属種の貴金属ナノ粒子を含有するダイヤモンド複合粒子を蛍光寿命時間に基づいて分級すればよい。なお、蛍光寿命時間は、貴金属ナノ粒子の金属種、形状（例えば、アスペクト比の相違）、分布、NVセンターとの距離等により影響されると考えられる。このような複数種類の複合粒子は、混ぜ合わせて用いてもよく、また、それぞれを別個の試薬とし、これら複数種類の試薬からなるキットを構成してもよい。

#### 【0014】

前記貴金属ナノ粒子には、標的物質に対して特異的結合能を有する特異的結合物質が担持されていてもよい。なお、本発明において特異的結合物質とは、標的物質に対して特異的結合能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、抗体とそれに対する抗原、リガンドとそれに対するレセプター、糖とそれに対するレクチン等が挙げられる。

10

#### 【0015】

更に、前記貴金属ナノ粒子には、高分子化合物が結合していてもよく、これにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に血中滞留性や集積可能性等の種々の特性を付与することができる。

#### 【0016】

このような本発明に係るダイヤモンド複合粒子は、例えば、蛍光標識剤や量子計測素子等に利用することができる。このような蛍光標識剤や量子計測素子もまた、本発明の一つである。

#### 【発明の効果】

20

#### 【0017】

NVセンターを有する蛍光ナノダイヤモンド粒子と貴金属ナノ粒子とからなるダイヤモンド複合粒子は、硬いダイヤモンドの内部に蛍光源があるため、環境の影響をほとんど受けない。このため、これまでライフサイエンスの分野で使用されてきた蛍光タンパク質、蛍光色素、量子ドット、有機色素ドーブシリカビーズ等の蛍光プローブにはない、無退色、無点滅、無消光という特徴を有する。

#### 【0018】

また、貴金属ナノ粒子のプラズモン効果により、蛍光寿命を変調したり、特定波長領域での蛍光強度を増強したりすることができるので、蛍光寿命顕微法（FLIM）と光検出磁気共鳴法（ODMR）とを組み合わせたFLIM-ODMRにより、単一の蛍光源でも、“多色化”が可能になる。

30

#### 【0019】

更に、貴金属ナノ粒子は機能性物質を結合するための「足場」としても利用でき、当該貴金属ナノ粒子を介して蛍光ナノダイヤモンド粒子に、生体由来の標的物質に特異的に結合する物質や高分子化合物等を固定し、標的指向性を付与したり、生体内での挙動を制御したりすることができる。この結果、例えば、様々な細胞での分子動態を長期的にわたり色分けして可視化できるようになる。また、金属ナノ粒子の表面増強ラマン効果（SERS（Surface enhanced raman scattering））を利用して、低濃度のアミノ酸、核酸等の生体低分子化合物が検出可能になる。その結果、ODMR法と組み合わせたSERS-ODMRにより、例えば酵素と基質等、2種類以上の分子動態を同時に可視化できる。

40

#### 【0020】

このような無退色、無点滅、無消光といった蛍光特性と容易な表面修飾能とを、生体分子と同程度の10～20nmの大きさで同時に実現した蛍光ナノ粒子は従来知られていない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0021】

【図1】Au/He-NDの電子顕微鏡写真である。

【図2】Au/He-NDの粒子径分布を示す画像（a）及びグラフ（b）である。

【図3】Au/He-NDとHe-NDの蛍光寿命時間の分布を示すグラフである。

【図4】Au/He-ND及びHe-NDをそれぞれ投与したHeLa細胞の蛍光強度マ

50

ップ及び蛍光寿命マップを示す画像である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下に本発明を詳述する。

【0023】

本発明に係るダイヤモンド複合粒子は、NVセンターを有する蛍光ナノダイヤモンド粒子と、貴金属ナノ粒子とを含有するものである。

【0024】

< 蛍光ナノダイヤモンド粒子 >

前記蛍光ナノダイヤモンド粒子は、その結晶中にNVセンターを有するものであり、例えば、マイクロダイヤモンド粒子に電子線(e<sup>-</sup>)を照射して結晶中に多数のNVセンターを形成してから粉碎したり、予め作製されたナノダイヤモンド粒子に所定の元素をイオン注入したりすることにより、その結晶中にNVセンターを形成することができる。

【0025】

電子線照射するためのマイクロダイヤモンド粒子は、例えば、CVD法、爆発法、高温高压法等を用いて製造することができる。なお、CVD法を用いてマイクロダイヤモンド粒子を製造すると、一部のマイクロダイヤモンド粒子にNVセンターが形成されることがある。

【0026】

前記マイクロダイヤモンド粒子に電子線を照射するには、例えば、直線加速器を用い、1~15MeVのエネルギーの電子線を、 $1 \times 10^{16} \sim 1 \times 10^{20} / \text{cm}^2$ 程度照射すればよい。電子線を照射したマイクロダイヤモンド粒子は、例えば、ボールミル等により、好ましくは2nm~2μm、より好ましくは5~200nmの平均粒子径(体積平均径)に粉碎する。粉碎後の蛍光ナノダイヤモンド粒子の平均粒子径が2μmを超えると、細胞の取り込み効率が低下し、2nm未満であると、製造が困難である。また、200nmを超えると、EPR(Enhanced Permeability and Retention)効果によるがん組織への移行性(透過性)が低下する。前記蛍光ナノダイヤモンド粒子の形状としては特に限定されず、例えば、真球状、板状、針状、紡錘状等が挙げられる。

【0027】

イオン注入するためのナノダイヤモンド粒子も、CVD法、爆発法、爆縮法、高温高压法等を用いて製造することができる。これらの製造方法のうち、CVD法では、合成時にメタンガス中のC(炭素元素)の同位対比(<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C)比率を変えることで<sup>13</sup>Cの混合比の異なるナノダイヤモンド粒子を合成することができる。また、爆発法や爆縮法では、原料となる爆薬のN(窒素元素)の量を変えることで、N含有量の異なるナノダイヤモンド粒子を合成することができる。

【0028】

当該ナノダイヤモンド粒子の平均粒子径・形状は、上述のマイクロダイヤモンド粒子を粉碎して得られた蛍光ナノダイヤモンド粒子と同様であり、イオン注入によってもその平均粒子径はほとんど影響を受けない。

【0029】

前記ナノダイヤモンド粒子にイオン注入する元素としては、例えば、C、N、He、F等が挙げられる。これらの元素は単独で用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。更に、ODMRの計測に用いる場合には、注入するイオンを核スピンの異なる安定同位体に変えてもよい。例えば、Cであれば、<sup>12</sup>Cと<sup>13</sup>C、Nであれば、<sup>14</sup>Nと<sup>15</sup>Nの比率を変えればよい。

【0030】

前記ナノダイヤモンド粒子に前記元素をイオン注入する方法としては特に限定されず、公知の方法を適宜選択して使用することができるが、例えば、Si基板等の平面に塗布したナノダイヤモンド粒子にイオン注入する方法や、粉体のままで攪拌しながら注入を行う粉体注入用の治具を用いて注入する方法等を用いることができる。

10

20

30

40

50

## 【0031】

イオン注入深度は浅いほうが、蛍光強度が高まるため、例えば1～2nm程度が好ましいが、イオン注入エネルギーをそれにあわせると通常のイオン注入のエネルギー（数10～数100keV）よりもはるかに低く（数100～2000eV程度）しなければならないために、イオンビームの発生と輸送が困難となる。したがって、例えば、中間物質をナノダイヤモンド粒子の前段に配置しておき、この中間物質を貫通してエネルギーの小さくなったイオンをナノダイヤモンド粒子に注入することが好ましい。

## 【0032】

このようにイオン注入したナノダイヤモンド粒子を、引き続いて、約700～900でアニールする。アニールすることにより、イオン注入によるダイヤモンドの表面欠陥を是正することができる。

10

## 【0033】

< 貴金属ナノ粒子 >

前記貴金属ナノ粒子としては、例えば、金（Au）、銀（Ag）、白金（Pt）、これら貴金属元素の同位体、これら貴金属の合金等からなるものが挙げられる。これらの貴金属ナノ粒子は、プラズモン吸収効果によりNVセンターの蛍光寿命時間を短縮したり、プラズモン増強効果により特定波長領域の蛍光強度を増強したりする性質がある。例えば、金ナノ粒子を含有するダイヤモンド複合粒子に、金ナノ粒子のプラズモン吸収波長である520nm近傍の光を照射すると、NVセンターの蛍光寿命時間が短くなる。これはNVセンターの励起状態から基底状態への緩和過程が、金のプラズモン吸収効果により、変調された結果と考えられる。また、金ナノ粒子を含有するダイヤモンド複合粒子では、プラズモン増強効果により550nm前後の波長領域で蛍光強度が増強される。

20

## 【0034】

このような蛍光寿命時間短縮効果や蛍光強度増強効果は、貴金属ナノ粒子の金属種や、形状、分布、NVセンターとの距離等に依存して異なる。このため、異なる波長領域の蛍光強度が増強された複数種類の複合粒子を得るためには、例えば、金属種が異なる貴金属ナノ粒子を含有するダイヤモンド複合粒子を用意すればよい。また、前記複合粒子を、蛍光寿命時間に基づいて分級すれば、蛍光寿命時間が異なる複数種類の複合粒子を得ることができる。

## 【0035】

異なる波長領域の蛍光強度が増強された複数種類の複合粒子や、蛍光寿命時間が異なる複数種類の複合粒子を併用し、複合粒子の種類ごとに異なる標的物質に対する特異的結合物質を結合すれば、例えば、FLIMを用いて蛍光寿命時間を観測したり、ODMRを用いて特定波長領域の蛍光強度を計測したりして、これを画像処理することにより、分子や細胞等ごとに色分けして標識することができ、長期間にわたる分子・細胞動態の可視化が可能となる。

30

## 【0036】

また、上記の各種貴金属ナノ粒子は、生体内での化学的・物理的安定性や、後述する特異的結合物質との結合の安定性等にも優れている。更に、これらの貴金属ナノ粒子は、抗菌作用や表面増強ラマン効果等も有しているので、これらの貴金属ナノ粒子を含有させることにより、目的に応じて蛍光ナノダイヤモンド粒子の機能を強化することが可能になる。

40

## 【0037】

前記貴金属ナノ粒子の平均粒子径は、例えば2～100nm程度であり、好ましくは2～20nm程度である。このような粒子径であれば、プラズモン効果が発現するとともに、蛍光ナノダイヤモンド粒子に良好に担持でき、かつ、蛍光ナノダイヤモンド粒子に機能性物質を結合するための「足場」として十分な表面積が確保できる。なお、当該平均粒子径は電子顕微鏡観察により測定した値である。

## 【0038】

< 蛍光ナノダイヤモンド粒子と貴金属ナノ粒子との複合化 >

50

前記蛍光ナノダイヤモンド粒子と前記貴金属ナノ粒子とを複合化するには、貴金属イオン含有液又は貴金属錯体含有液に、前記蛍光ナノダイヤモンド粒子を分散して、放射線、電子線又は超音波を照射することによる。

【0039】

前記貴金属イオン含有液は、貴金属イオンを含む水溶液又はアルコール溶液であり、溶媒中で貴金属イオンを遊離する化合物を、例えば、水；メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール、*sec*-ブタノール、*t*-ブタノール等のアルコール；含水アルコール；塩酸、硫酸、硝酸等の酸等に溶解させることにより調製することができる。なお、前記酸はアルコール等の有機物を含んでいてもよい。前記溶媒中で貴金属イオンを遊離する化合物としては、貴金属の硝酸塩、塩化物、酢酸塩、クエン酸塩、硫酸塩、炭酸塩、酸化物、水酸化物等が挙げられる。前記貴金属が金である場合は、なかでも  $\text{HAuCl}_4$  が好ましい。

10

【0040】

前記貴金属錯体含有液としては、前記貴金属イオンに適当な配位子が配位した化合物が、水、前記各種アルコール、含水アルコール等に溶解した溶液が挙げられる。前記配位子は、非共有電子対又は負電荷を持っているものであれば特に限定されず、公知のものから適宜選択することができ、例えば、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 等のハロゲン化物イオン、シアン化物イオン、アンモニア、ピリジン等の単座配位子；エチレンジアミン、アセチルアセトンイオン等の二座配位子；エチレンジアミンテトラ酢酸イオン等の六座配位子等が挙げられる。

20

【0041】

前記貴金属イオン含有液又は前記貴金属錯体含有液中の貴金属濃度としては特に限定されないが、 $1\ \mu\text{M} \sim 1\ \text{M}$ 程度であるのが好ましく、より好ましくは $0.1 \sim 10\ \text{mM}$ 程度である。貴金属濃度が高すぎると、得られる貴金属ナノ粒子のサイズが大きくなりすぎたり、貴金属単独の粒子が多量に生成したりすることがある。逆に、貴金属濃度が低すぎると、所望のダイヤモンド複合粒子が得られにくくなる。

【0042】

前記貴金属イオン含有液又は前記貴金属錯体含有液には、更に必要に応じて適宜添加剤を添加してもよい。当該添加剤としては、例えば、ポリビニルアルコール等の水溶性高分子化合物；界面活性剤；アルコール類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル等のエーテル類；アルキレングリコール、ポリアルキレングリコール、これらのモノアルキルエーテル又はジアルキルエーテル、グリセリン等のポリオール類；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グリコール酸等のカルボン酸類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類等の各種の水混和性有機溶媒等が挙げられる。これらの添加剤は、貴金属イオンの還元反応速度を促進し、生成する貴金属ナノ粒子の大きさを調整するのに有効な場合がある。

30

【0043】

前記貴金属イオン含有液又は貴金属錯体含有液中への前記蛍光ナノダイヤモンド粒子の添加量は、例えば $0.001 \sim 1$ 重量%程度である。

【0044】

前記蛍光ナノダイヤモンド粒子を分散させた前記貴金属イオン含有液又は貴金属錯体含有液に、超音波を照射するには、例えば、周波数 $10\ \text{kHz} \sim 10\ \text{MHz}$ 、出力 $1\ \text{W}$ 以上の条件下で照射を行う。当該照射は、例えばアルゴン ( $\text{Ar}$ ) 等の不活性ガス置換雰囲気中で行うことが好ましい。前記貴金属が金である場合、好ましい照射条件は、例えば、周波数 $200\ \text{kHz}$ 、出力 $200\ \text{W}$ 、照射時間 $30$ 分間程度である。

40

【0045】

前記蛍光ナノダイヤモンド粒子を分散させた前記貴金属イオン含有液又は貴金属錯体含有液に照射する電離放射線としては、直接（一次）電離放射線と間接（二次）電離放射線とが挙げられ、直接電離放射線とは電子、陽子、粒子等の荷電粒子線であり、間接電離放射線とは線（電磁波）、 $\text{X}$ 線、中性子線等の非荷電粒子線である。これらの電離放射

50

線の波長は、例えば1 nm未満であり、好ましくは0.1 nm以下、より好ましくは0.01 nm以下である。波長が短いほど、大きさが均一で微細な貴金属ナノ粒子が短時間で生成する傾向がある。

#### 【0046】

前記蛍光ナノダイヤモンド粒子を分散させた前記貴金属イオン含有液又は貴金属錯体含有液に、電離放射線を照射する際の吸収線量は、例えば1 J/kg以上であり、好ましくは1~1,000,000 J/kgである。特に、電離放射線として線を利用する場合、線照射は、線量1 Gy以上の条件で実施するのが好ましい。前記貴金属が金である場合、好ましい線照射条件は、例えば、放射線源としてコバルト60線源(線光子のエネルギー:1.25 MeV)を用いて、線量率約3 kGy/h、照射時間3時間程度である。

10

#### 【0047】

前記蛍光ナノダイヤモンド粒子を分散させた前記貴金属イオン含有液又は貴金属錯体含有液に、電子線を照射するには、直線加速器によることが好ましい。前記貴金属が金である場合、好ましい電子線照射条件は、例えば、電子線加速器による電子線(エネルギー10 MeV)を、1 MGy/hで1~10秒程度の照射とすればよい。

#### 【0048】

なお、電離放射線や電子線の照射は、蛍光ナノダイヤモンド粒子の分散状態を維持するために、溶液を攪拌しながら行うのが好ましいが、超音波照射の場合には、超音波の照射自体が攪拌効果を有するので、攪拌操作は不要である。本発明では電離放射線や電子線の照射と超音波照射とを併用してもよく、併用により、超音波照射の攪拌効果によって良好な分散状態を有するダイヤモンド複合粒子を得やすくなる。

20

#### 【0049】

本発明に係るダイヤモンド複合粒子における前記貴金属ナノ粒子の含有量は、例えば、蛍光ナノダイヤモンド粒子の粒子径が100 nm以下である場合は、蛍光ナノダイヤモンド粒子に対する貴金属ナノ粒子の重量比(貴金属ナノ粒子:蛍光ナノダイヤモンド粒子)で、1:1~10:1程度であることが好ましい。このような含有量であれば、貴金属ナノ粒子を蛍光ナノダイヤモンド粒子に機能性物質を結合するための「足場」としても機能でき、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に血中滞留性(生体内ステルス性)や、集積可能性、分子や細胞等に対する特異性等を付与することができる。前記蛍光ナノダイヤモンド粒子と前記貴金属ナノ粒子との複合化状態は、前記蛍光ナノダイヤモンド粒子上に前記貴金属ナノ粒子が、貴金属ナノ粒子間に隙間があるように分散して担持されていてもよく、また、コアシェル型の複合粒子が形成されるように密に担持されていてもよい。

30

#### 【0050】

##### <特異的結合物質>

本発明に係るダイヤモンド複合粒子は、前記貴金属ナノ粒子を介して、所定の標的物質に対する特異的結合物質を担持させることも可能である。前記特異的結合物質としては特に限定されず、例えば、所定の抗原と特異的に結合する抗体、所定の糖に特異的に結合するレクチン、所定のレセプターに特異的に結合するリガンド等が挙げられる。このような特異的結合物質が貴金属ナノ粒子に担持されていることにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に、分子や細胞等に対する特異性を付与することができる。

40

#### 【0051】

前記特異的結合物質としてより具体的には、例えば、観察対象の細胞が肝臓細胞であれば、LDL受容体等が挙げられ、観察対象の細胞ががん細胞であれば、RGDペプチド、各種がん特異的抗体、アプタマー分子等が挙げられる。

#### 【0052】

前記貴金属ナノ粒子に前記特異的結合物質を担持するには、前記貴金属ナノ粒子と前記特異的結合物質との物理的吸着力、化学的吸着力、化学結合力等を利用して直接的に結合させてもよいが、リンカーを介して間接的に結合させてもよい。リンカーを介して間接的に結合させる場合、前記リンカーとしては上記の各種高分子化合物を用いることができる

50

。なお、分散性の観点からは、PEG等の親水性ポリマーからなるリンカーを介して結合していることが好ましい。また、この際、リンカーと特異的結合物質との結合は、上記の水溶液中で酸性、塩基性又は中性を呈する官能基を介して行われてもよい。

#### 【0053】

<高分子化合物>

本発明に係るダイヤモンド複合粒子に、前記貴金属ナノ粒子を介して高分子化合物を結合させることにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に血中滞留性や集積可能性等を付与することができる。前記高分子化合物として疎水性ポリマーを用いることにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に、脂肪組織等への親和性を付与することができ、一方、前記高分子化合物として親水性ポリマーを用いることにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に、水溶液や血液中における良好な分散性を付与することができる。また、前記高分子化合物として、親水性セグメントと疎水性セグメントとからなるブロック共重合体を用いてもよい。更に、前記高分子化合物として、チオール基を持った高分子化合物を用いることにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子を、2次元的、3次元的に集積化させることができる。

10

#### 【0054】

前記親水性ポリマーとしては特に限定されないが、例えば、ポリメチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等のポリアルキレングリコール；ポリビニルアルコール；ポリビニルピロリドン；ポリメタクリル酸等が挙げられる。なかでも、生体適合性が良好である点から、ポリエチレングリコール（以下、PEGともいう。）が好適に用いられる。これらポリアルキレングリコールが結合したダイヤモンド複合粒子は、高イオン濃度や高濃度タンパク質の水溶液中でも塩析・凝集しない優れた分散性を発現することができる。

20

#### 【0055】

前記ポリアルキレングリコールの分子量は、例えば2000～30万程度であり、好ましくは2000～20万程度、より好ましくは5000～15万程度である。このような分子量であれば、本発明に係るダイヤモンド複合粒子の二次粒子径を、肝臓、脾臓、腎臓、マクロファージ等に取り込まれにくい50～100nmにすることができるので、優れた血中滞留性を付与することができる。このため、所期の細胞・組織への取り込み効率を向上することもできる。

30

#### 【0056】

前記高分子化合物は、水溶液中で酸性、塩基性又は中性を呈する官能基を有していてもよい。このようなものであれば、血液中では正若しくは負に帯電する又は帯電しないことにより、本発明に係るダイヤモンド複合粒子に分子や細胞ごとに異なる親和性を付与することができ、所望の細胞・組織に選択的に取り込ませることが可能となる。

#### 【0057】

前記酸性を呈する官能基としては、例えば、カルボキシル基、ヒドロキシル基、スルホン酸基等が挙げられる。

#### 【0058】

前記塩基性を呈する官能基としては、例えば、アミノ基等が挙げられる。

40

#### 【0059】

前記中性を呈する官能基としては、例えば、NHS基（N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基）、チオール基、アセチル基、シアノメチル基、シアノ基等が挙げられる。

#### 【0060】

前記貴金属ナノ粒子に高分子化合物を結合させる方法としては特に限定されないが、例えば、高分子化合物に貴金属に配位可能な官能基を導入し、当該官能基を有する前記高分子化合物を、本発明に係るダイヤモンド複合粒子を含有する溶液に対して過剰量添加し、これらを室温でインキュベーションすることにより、前記貴金属ナノ粒子に高分子化合物を結合させることができる。なお、本発明に係るダイヤモンド複合粒子を含有する溶液としては、放射線等を照射した溶液をそのまま使用してもよいし、得られたダイヤモンド複

50

合粒子を分離してから、蒸留水等に再懸濁させた溶液であってもよい。

【0061】

前記貴金属ナノ粒子が金ナノ粒子である場合、前記インキュベーションの条件は、16～25程度で1時間程度が好ましい。このような条件下であれば反応が十分に進行し目的のダイヤモンド複合粒子の収量も充分となる。

【0062】

前記貴金属に配位可能な官能基としては、例えば、メルカプト基、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、イミノ基、エーテル結合(エーテル基)、カルボン酸残基(カルボキシラート)、リン酸残基、スルフィド残基等が挙げられる。これらのなかでも、金と強い結合を形成することができることより、メルカプト基が好適である。

10

【0063】

前記貴金属に配位可能な官能基は、前記高分子化合物の末端又は内部にあれば、その部位や数は特に限定されないが、末端に結合していることが好ましい。一方、前記貴金属に配位可能な官能基が前記高分子化合物の内部に1個以上存在している場合は、前記高分子化合物は分子が折れ曲がった状態で本発明に係るダイヤモンド複合粒子に結合するため、当該ダイヤモンド複合粒子から伸びる前記高分子化合物の鎖の本数が多くなる。そしてこの場合、前記高分子化合物を、後述する特異的結合物質のリンカーとして用いれば、より多くの特異的結合物質を本発明に係るダイヤモンド複合粒子に担持させることができる。

【0064】

前記高分子化合物として親水性ポリマーが結合している本発明に係るダイヤモンド複合粒子の一次粒子の平均粒子径は、10～150nm程度が好ましい。更に分子・細胞ラベリング剤として用いる場合は、10～20nm程度がより好ましい。一方、血中で用いる場合は、30～150nm程度がより好ましく、30～80nm程度が更に好ましい。また、前記高分子化合物が結合した本発明に係るダイヤモンド複合粒子は凝集している場合もあるが、その二次粒子の平均粒子径は、分子・細胞ラベリング剤として用いる場合は、10～100nm程度が好ましく、10～50nm程度がより好ましく、10～30nm程度が更に好ましい。一方、血中で用いる場合は、50～150nm程度が好ましく、50～100nm程度がより好ましく、50～80nm程度が更に好ましい。ここで、一次粒子とは1粒の蛍光ナノダイヤモンド粒子と1粒の貴金属ナノ粒子とを含有するダイヤモンド複合粒子のことを意味し、二次粒子とは当該一次粒子が複数個、凝集したものを意味する。このような粒子径であれば、分子・細胞ラベリング剤としては、内在性の生物学的現象を阻害する可能性が低くなる。一方、肝臓、脾臓、マクロファージ等に取り込まれにくい、優れた血中滞留性を発現することができ、このため、所期の細胞・組織への取り込み効率を向上することもできる。なお、これら粒子径は動的光散乱法又は電子顕微鏡観察により測定した値である。

20

30

【0065】

< 蛍光標識剤 >

本発明に係るダイヤモンド複合粒子を、例えば、緩衝液や生理食塩水等に懸濁させることにより蛍光標識剤を調製することができる。この際の溶液中の複合粒子の濃度は、例えば1～50重量%程度である。本発明に係るダイヤモンド複合粒子に親水性ポリマーが結合している場合、分散剤を配合しなくても、高い分散性が得られる。

40

【0066】

本発明に係る蛍光標識剤を人体へ投与する場合は、そのまま、又はブドウ糖注射液等に用時混合して静脈注射可能な塩濃度に調整した上で、静脈注射や点滴等により投与すればよい。

【0067】

< 量子計測素子 >

本発明に係るダイヤモンド複合粒子を量子計測素子として用いる場合は、金属ナノ粒子表面に、チオール基を持った高分子化合物を結合させることで、生理環境下での安定な単一複合粒子として、細胞内、又は、生体内で機能させればよい。また、チオール基を2つ

50

以上持つ高分子化合物をリンカーとして用い、ダイヤモンド複合粒子を2次元的、3次元的に集積化させてもよい。当該チオール基を持った高分子化合物としては、例えば、チオール基を持った核酸、ポリエチレングリコール、 dendrimer 等が挙げられる。なお、チオール基の数は、1つ以上あればよい。また、DNAオリガミ等の安定核酸構造体上の任意の位置に、チオール基を持つ核酸を配置することで、本発明に係るダイヤモンド複合粒子を非対称的に集積化することも可能になる。そして、これらのダイヤモンド複合粒子とDNAオリガミの集積化産物を細胞培養用のガラス上に配置して、その表面に細胞を生育させると、細胞膜上の細胞活動に伴うイオンの流れや細胞内のラジカル種、又は、スピラベルした核酸、蛋白質を2次元的に検出することができる。更に、本発明に係るダイヤモンド複合粒子を、2次元的、3次元的に集積化したものは、量子コンピュータの演算素子としても利用できる。

10

#### 【実施例】

##### 【0068】

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

##### 【0069】

###### < 蛍光ナノダイヤモンド粒子の作製 >

高温高圧法を用いて製造した平均粒子径15nmのナノダイヤモンド粒子に、イオン注入装置を用いてヘリウムイオン注入を行った。ここでは、ナノダイヤモンド粒子にエネルギー40keVのHeイオンを $1.0 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ 注入した。イオン注入後、アルゴン雰囲気下で、ナノダイヤモンド粒子を約800で所定時間加熱してアニーリングを行った後、500で所定時間空気酸化を行い、蛍光ナノダイヤモンド粒子を作製した。

20

##### 【0070】

###### < Au / 蛍光NDの作製 >

得られた蛍光ナノダイヤモンド粒子(以下、He-NDという。)を、反応バッファー(0.5mM HAuCl<sub>4</sub>、4.125mM 2-プロパノール、10g/L ポリビニルアルコール(PVA))中に0.1g/Lになるように懸濁し、ガラスバイアルへ移した。その後、バイアルに対し、加速器電子線からの電子線(加速電圧4.8MeV)を表面線量6kGyとなるよう照射し、He-ND表面に金ナノ粒子を析出させて、Au/He-NDを作製した。

30

##### 【0071】

作製したAu/He-NDを超遠心装置で精製した後、室温でJEOL JEM-1010(日本電子社製)による電子顕微鏡観察を行った。得られた電子顕微鏡写真を図1に示す。図1より、He-NDとAuとが複合化していることが確認された。

##### 【0072】

###### < Au / He-NDの分散性の適性評価 >

作製したAu/He-NDを、ガラス上にスピンコーターで分散させ、AFM(Asyrum社製)による観察を行い、粒子径分布について評価した。得られた画像(a)及び分布グラフ(b)を図2に示す。

40

##### 【0073】

###### < Au / He-NDの蛍光寿命時間の評価1 >

作製したAu/He-NDとHe-NDの蛍光寿命時間を評価した。計測は、単一粒子蛍光寿命測定装置(PicoQuant社製)を用いて行った。得られた蛍光寿命時間の分布グラフを図3に示す。黒は、Au/He-NDの分布、白は、He-NDの分布を示している。図3より、He-NDとAuとが複合化することによって、蛍光寿命時間が短縮していることが確認された。

##### 【0074】

###### < Au / He-NDの蛍光寿命時間の評価2 >

ガラス上で培養したHeLa細胞に、Au/He-ND及びHe-NDをそれぞれ投与した。投与後、約20時間後に顕微鏡下での蛍光寿命測定装置(PicoQuant社製

50

)による観察を行い、蛍光強度マップ及び蛍光寿命マップを評価した。得られた画像を図4に示す。蛍光強度マップでは、2つの粒子を識別できないが、蛍光寿命マップでは、2つの粒子の分布を識別できた。

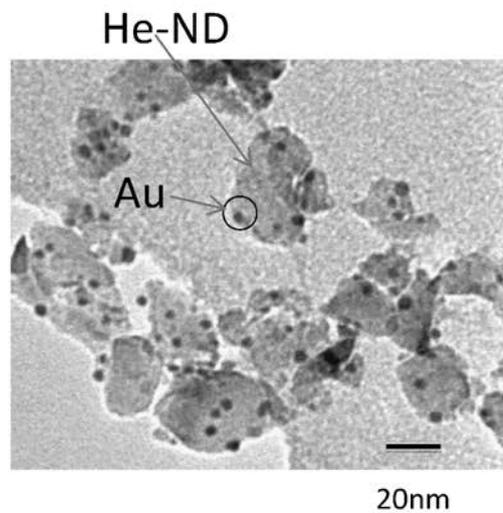
【産業上の利用可能性】

【0075】

本発明は、例えば、免疫療法における樹状細胞の可視化、ワクチンアジュバントの長期間トラッキング、免疫応答に関与する分子の高感度検出等に適用可能である。更に本発明は、試薬分野だけでなく、今後大きな技術になると見込まれる細胞治療分野での利用が見込まれ、テーラーメイド医療で重要になると注目されているセラノスティクス（治療方法を決定するための臨床的価値の高い診断）分野や量子コンピュータの分野にも応用可能である。

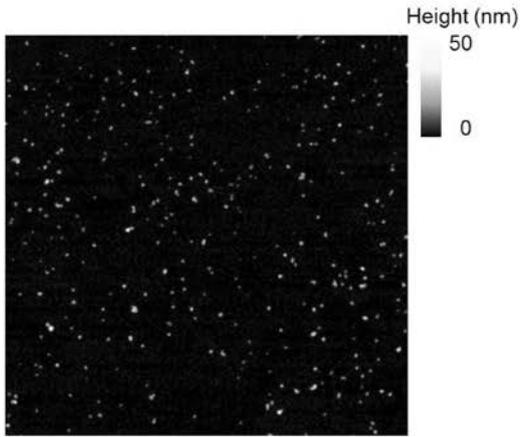
10

【図1】

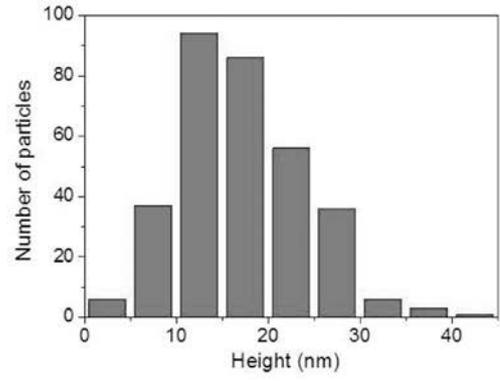


【 図 2 】

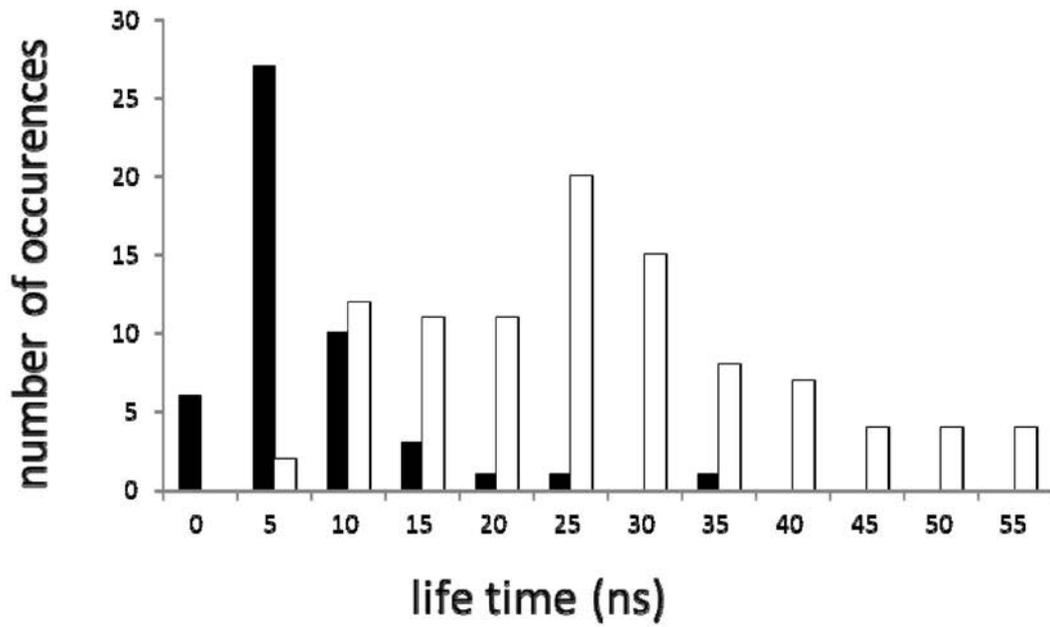
(a)



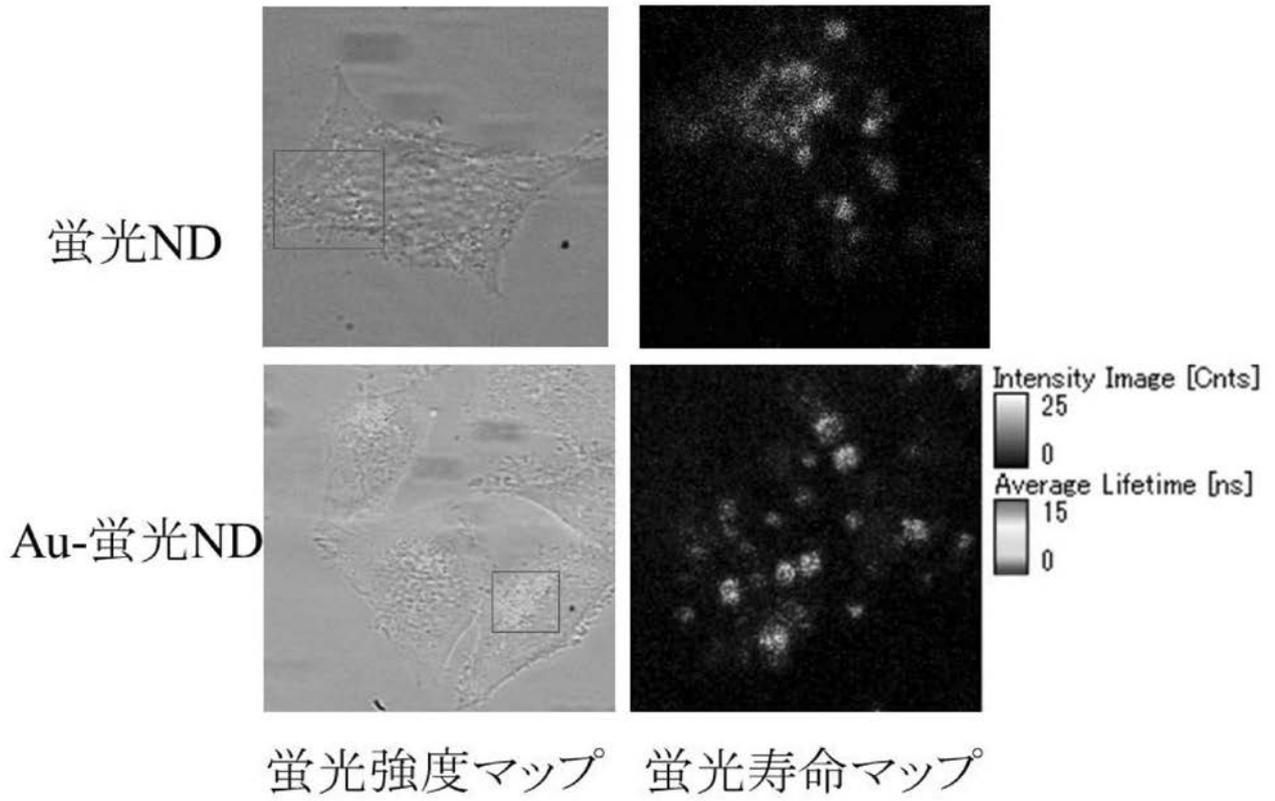
(b)



【 図 3 】



【 図 4 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>B 8 2 Y 15/00 (2011.01)</b>		B 8 2 Y 15/00		
<b>C 0 1 B 31/06 (2006.01)</b>		C 0 1 B 31/06	A	

(72)発明者 清野 智史  
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 立川 貴士  
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 真嶋 哲朗  
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 吉岡 芳親  
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

F ターム(参考) 2G043 BA16 EA01 FA01 FA02 FA03 FA06 GA07 GB02 GB05 GB16  
4G146 AA04 AA15 AA16 AB04 AC02B AC19B AD15 AD40 BC11 CB11  
CB13 CB16 CB23 CB32  
4H001 CA01 CA02 XA06 YA02