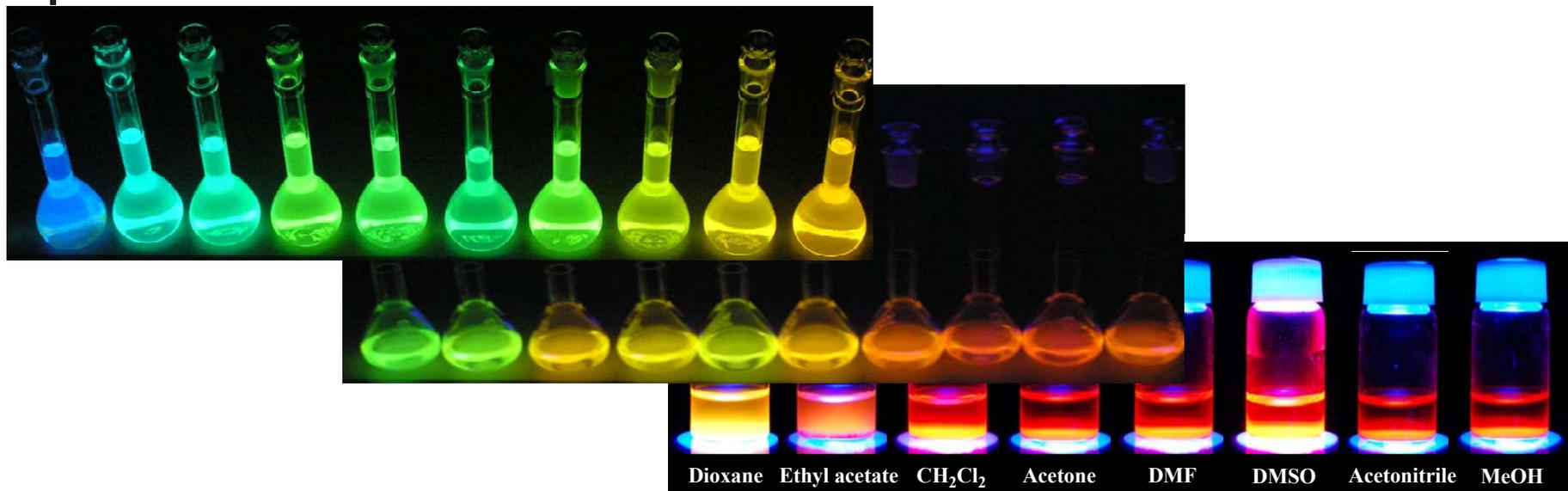


平成21年度 第2回特許ビジネス市 in横浜

「環境によって発光波長が変化する 環境対応型蛍光色素」

特許番号: 特開2008-291210



2009年10月9日

北海道大学大学院地球環境科学研究院准教授: 山田幸司

「環境によって発光波長が変化する環境対応型蛍光色素」

特許情報

1、発明の名称	ケイ光ソルバトクロミック色素及びその使用法			
2、出願	出願番号	特願2008-23492	出願日	2008.02.04
	出願人	国立大学法人北海道大学	審査請求有無	
3、公開・登録情報	公開番号	特開2008-291210	登録番号	
4、権利者	国立大学法人北海道大学			
5、関連特許	特願2008-261343(2008.10. 8) 特願2009-026241 (2009. 2. 6)			

蛍光ソルバトクロミック色素開発の意義

環境によって発光波長が変化するインテリジェントなプローブが求められている。

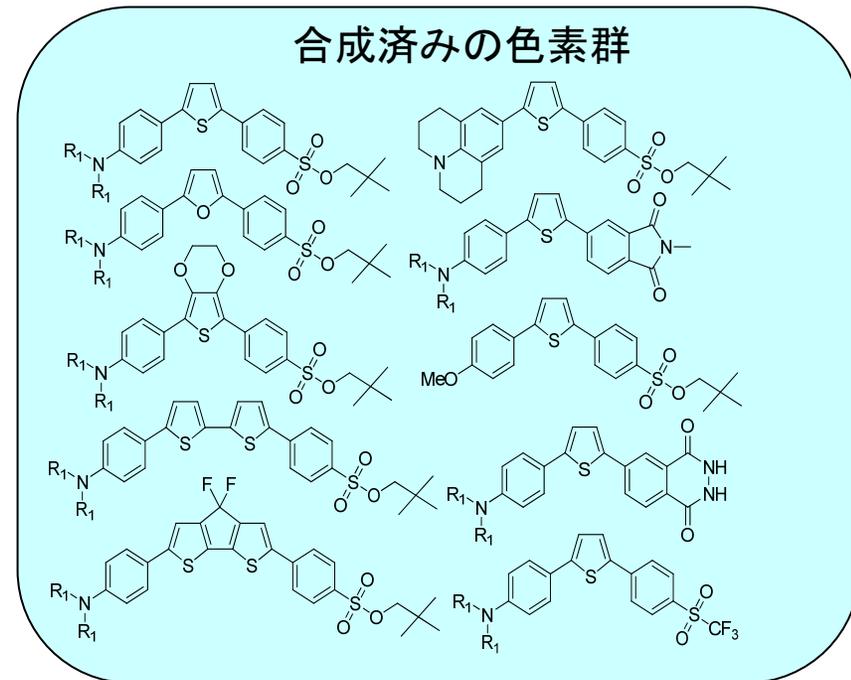
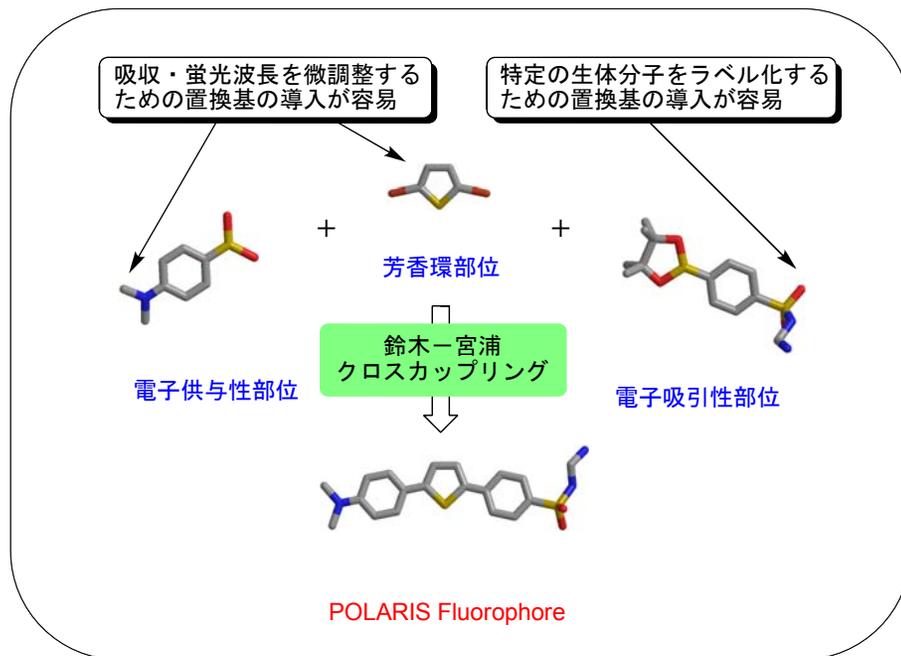
- ・ **特定の生体反応とシグナル変化の相関**が抽出しやすい。
(強度応答は、機器的な理由を含め、さまざまな要因で起こりうる)
- ・ レシオメトリー測定により **高い定量性**が補償できる。
(フォトブリーチングなどの影響を低減させることができる)

蛍光ソルバトクロミック色素は、生体プローブとして有用な特性を数多く有している。

- ・ 分子周囲の **極性変化により蛍光波長応答**する。
(抗原抗体反応・DNAへのインターカレートなど極性変化を伴う対象は数多い)
- ・ 極性が変化しても **吸収波長はほとんど変化しない**。
(単一光源で励起できるため、装置が簡略化できる)
- ・ **分子サイズが小さい**。
(蛍光タンパクなどに比べ、測定対象の生体反応を阻害しにくい)
- ・ 従来色素は **紫外線励起が必要**(=観測対象にダメージを与える)
→ 可視光励起できるよう改良

鈴木－宮浦クロスカップリング法を用いた 蛍光ソルバトクロミック色素の網羅的合成法

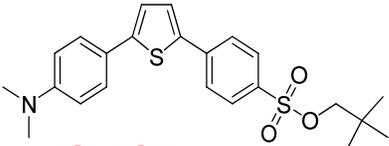
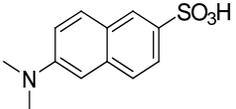
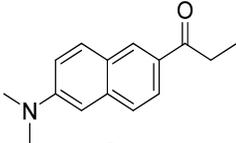
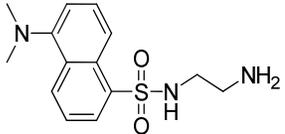
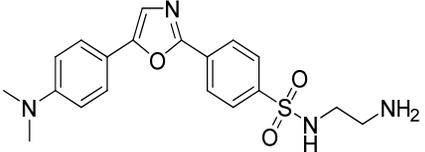
電子供与性部位・芳香環部位・電子吸引性部位を別々に合成し、鈴木－宮浦クロスカップリング法で直結するので、光物性の調整やラベル化部位の導入が容易



全てが**蛍光ソルバトクロミズム特性**を示した。

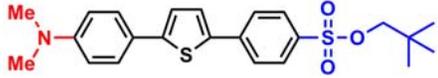
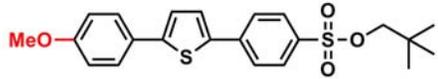
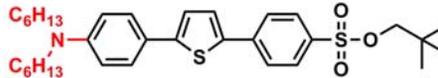
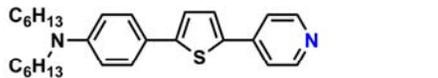
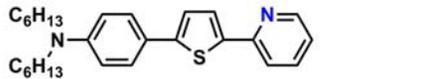
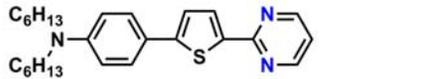
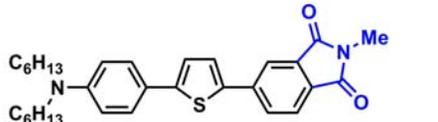
これらのプローブ群をPOLARIS (POLARity Indicator Series) Fluorophoreと命名する。

既存の色素との性能の比較

化合物	吸収極大波長 / nm in toluene	モル吸光係数 / cm ⁻¹ mol ⁻¹ in toluene	発光極大波長 / nm in toluene
 POLARIS Fluorophore	393	27,000	506
 2,6-ANS	319	27,000	410
 PRODAN	361	16,000	440
 Dansyl EDA	335	4,600	499
 Dapoxyl SEDA	373	28,000	509

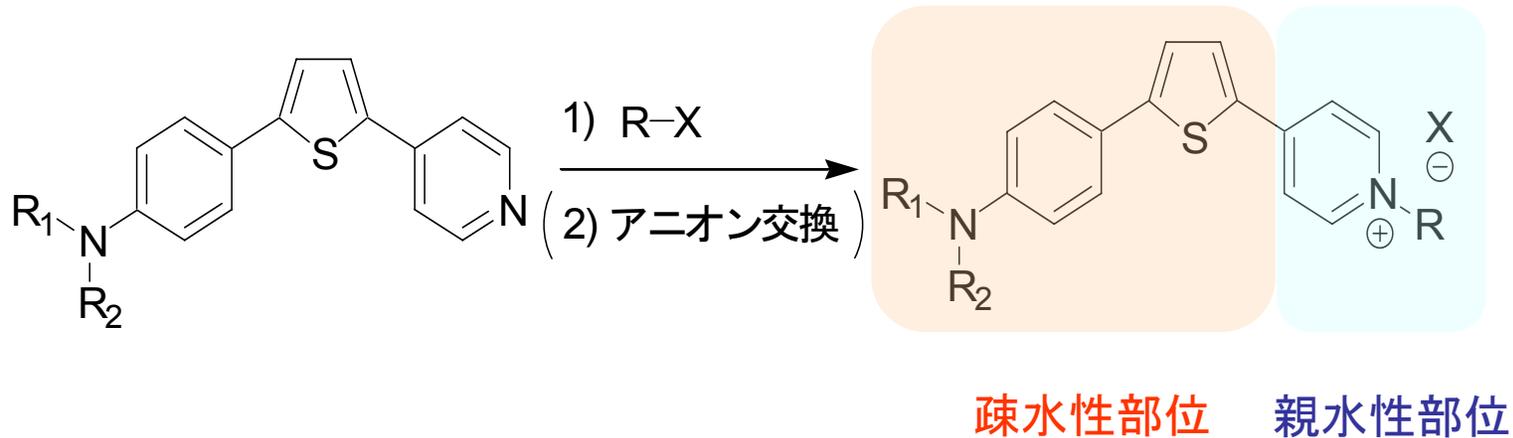
青色ダイオードレーザーで励起できるほど吸収の長波長化に成功した。

POLARIS Fluorophoreの分子構造と光物性の相関

分子構造	λ_{abs} / nm in toluene	ϵ / $\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ in toluene	λ_{em} / nm	
			in toluene	in CH_2Cl_2
	394	27,000	482	517
	358	29,000	434	443
	404	30,000	479	522
	390	31,000	456	508
	387	32,000	451	492
	397	33,000	461	509
	440	24,000	542	595

光源や検出器に合わせて吸収・発光波長が調整できるほど知見が得られた。

カチオン型 POLARIS Fluorophore の創製

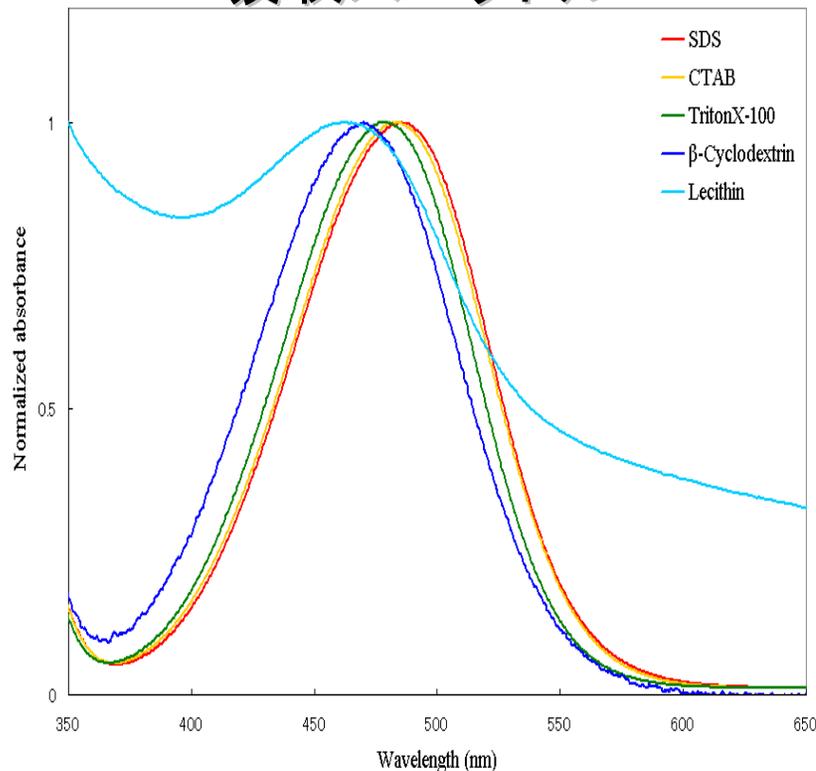


これまでの中性型 POLARIS Fluorophore に比べて数多くの利点がある。

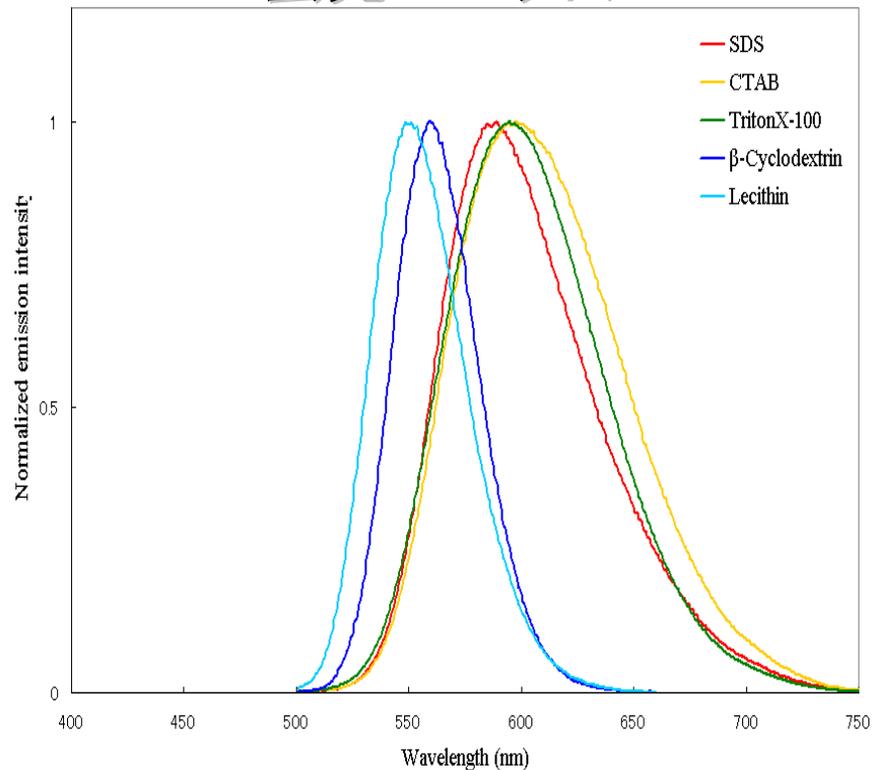
- (1) Arレーザー(488nm)で効率的な励起が可能。
- (2) 一段階で容易に認識部位・ラベル化部位をRに導入することができる。
- (3) アニオン(X⁻)を交換することで、溶解性の調整ができる。
- (4) 生体膜中での配向が揃い、表面電荷の情報を敏感に検出できると考えられる。
- (5) 水溶性の向上が容易。

カチオン型POLARIS Fluorophoreの水中のスペクトル

吸収スペクトル



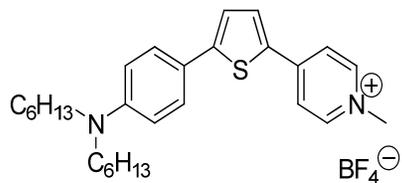
蛍光スペクトル



・大過剰に包摂もしくは界面活性機能を持つ分子を加えると、水に溶解し、シャープなスペクトル形状を示すようになった。

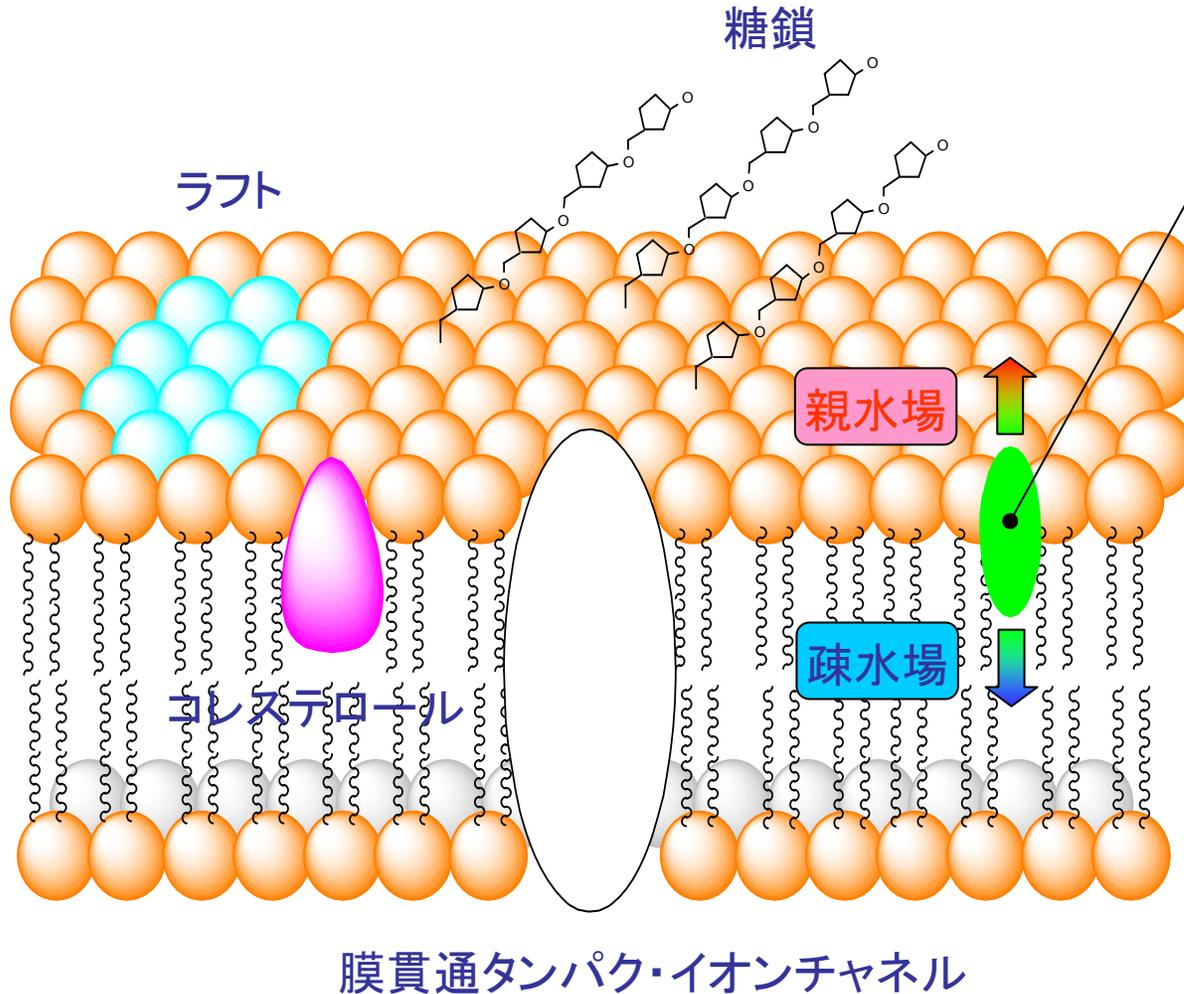
・電荷を持つ界面活性剤の系で、蛍光の大幅な長波長シフトが見られた。

均一な溶媒中よりも不均一な界面の方がPOLARIS Fluorophoreの性能が十分に生かせる。



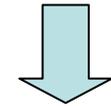
POLARIS Fluorophoreの細胞膜観測用プローブへの利用

非常に狭い範囲に親水基と疎水基が局在している脂質二分子膜はPOLARIS Fluorophoreを使った観測対象として魅力的



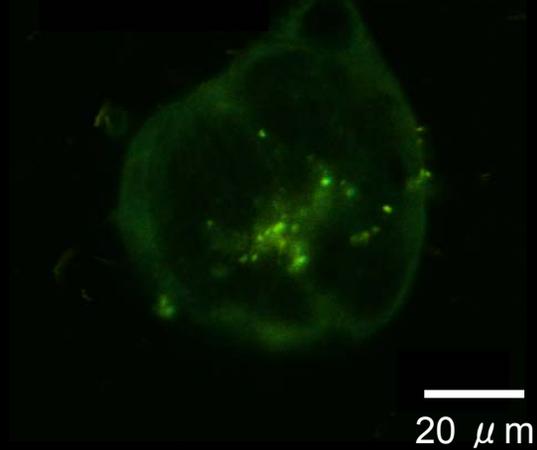
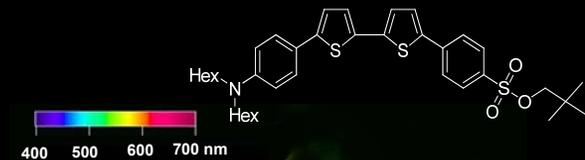
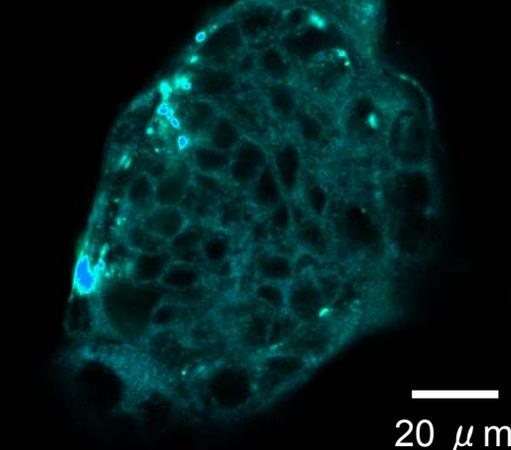
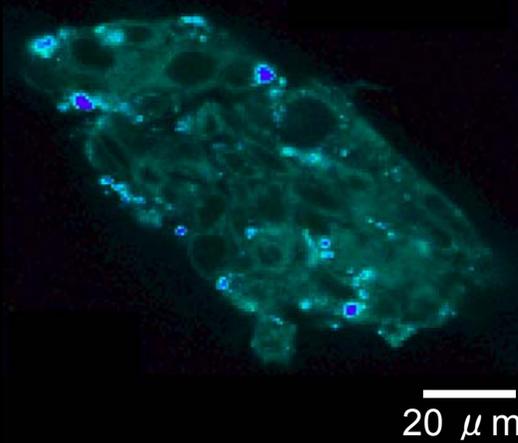
POLARIS Fluorophore

本研究で開発されるプローブは、細胞膜の海に浮かぶうきのようになり、浮かぶと赤っぽい色に、沈むと青っぽい色に光る。

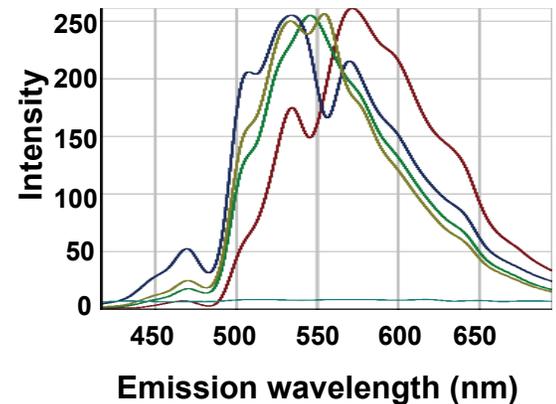
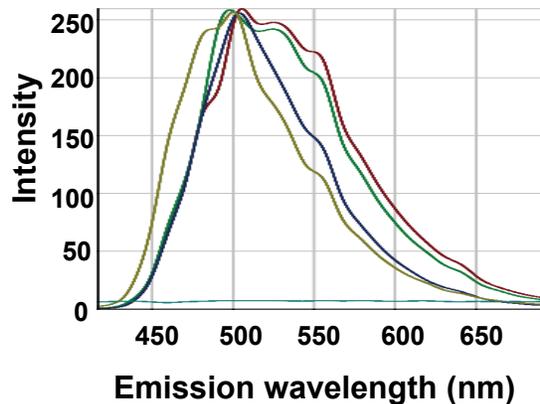
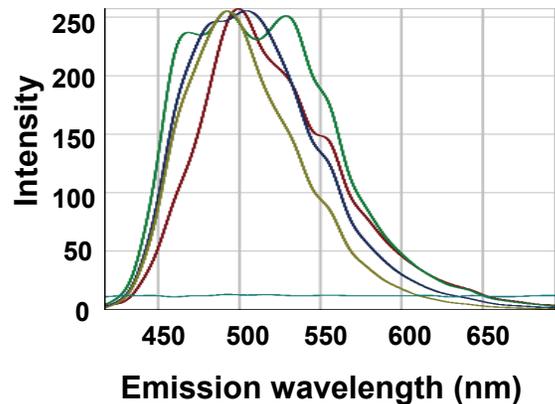


細胞膜を介したさまざまな生命現象を蛍光色の変化で、高感度・リアルタイムに観測する。

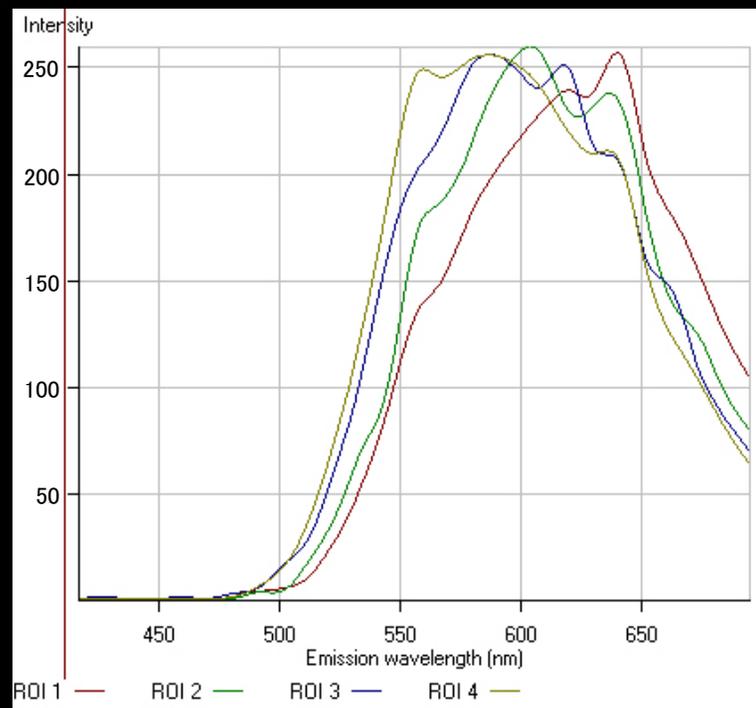
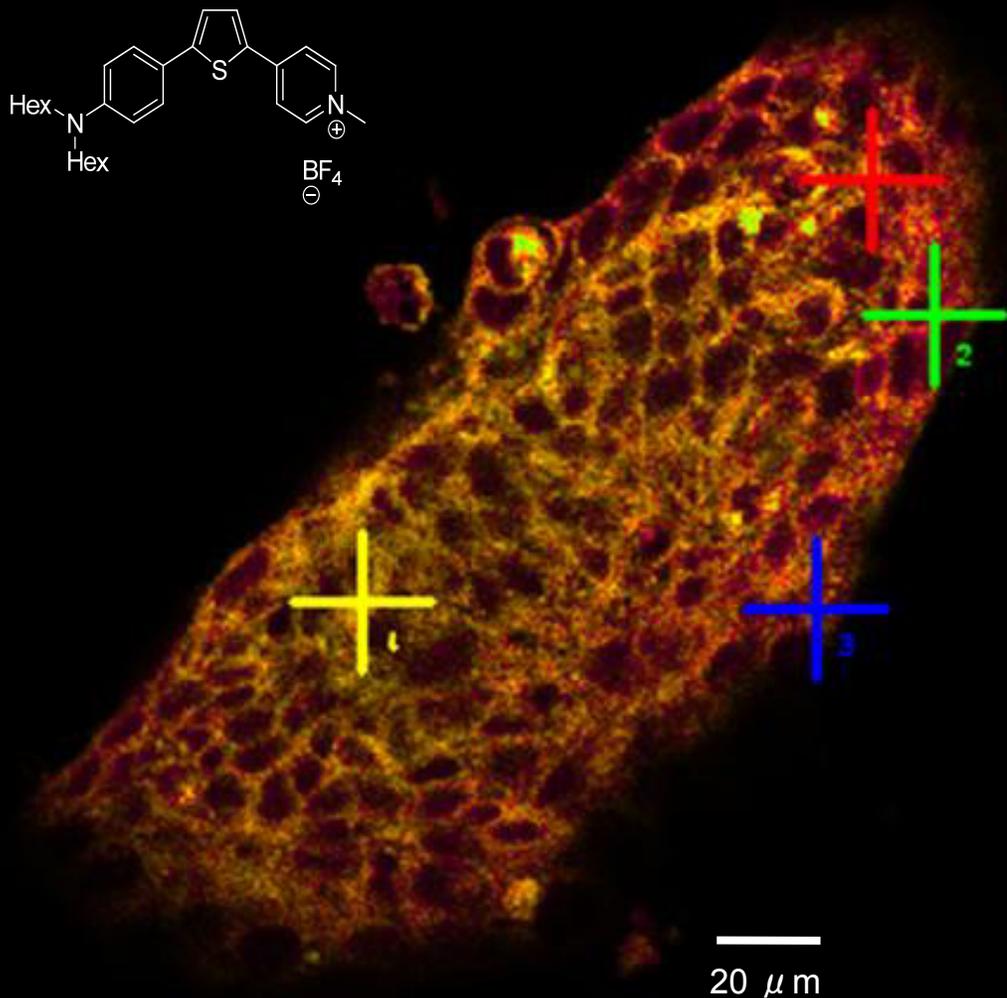
中性型色素プローブを導入したT84



蛍光波長解析



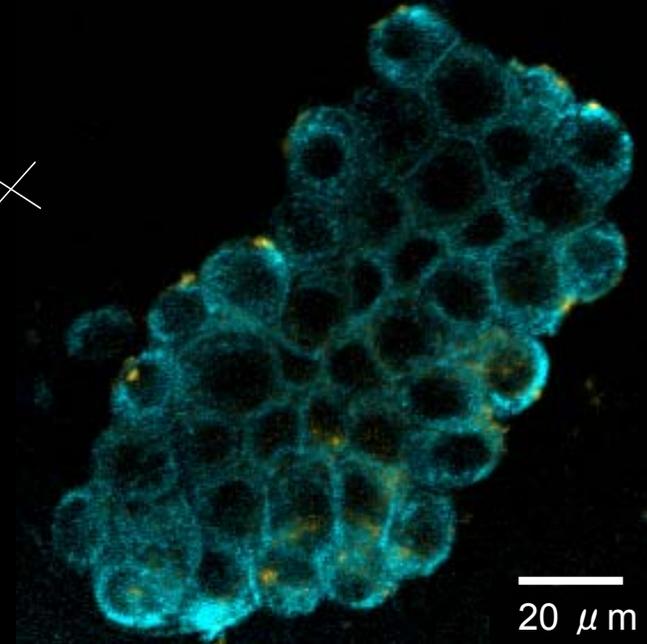
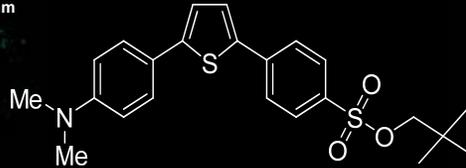
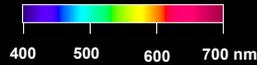
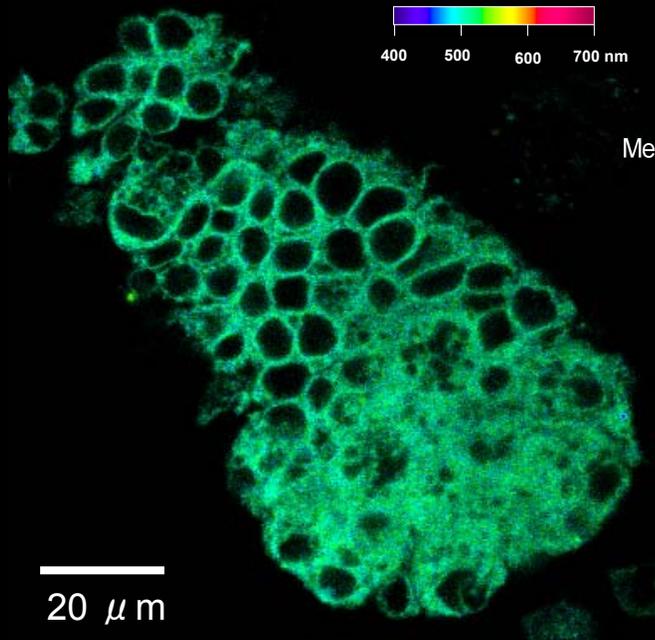
カチオン型色素プローブを導入したT84



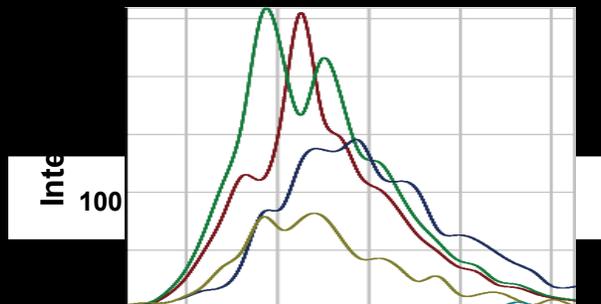
中性型色素プローブを導入したcrypt

溶媒: DMSO

溶媒: DMF



蛍光波長解析



POLARIS Chemiluminophoreの化学発光スペクトル

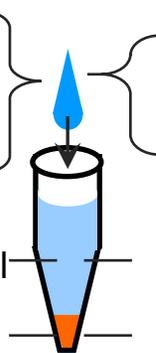
0.06% NaOH 水溶液

0.15% $K_3[Fe(CN)_6]$ 水溶液

0.15% H_2O_2 水溶液



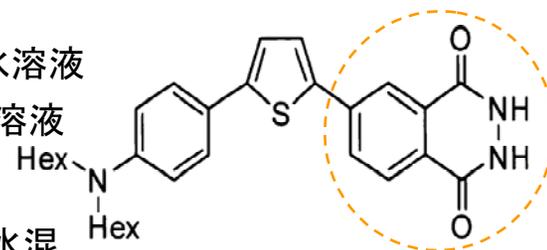
有機溶媒 0.17ml
色素
20 μ g



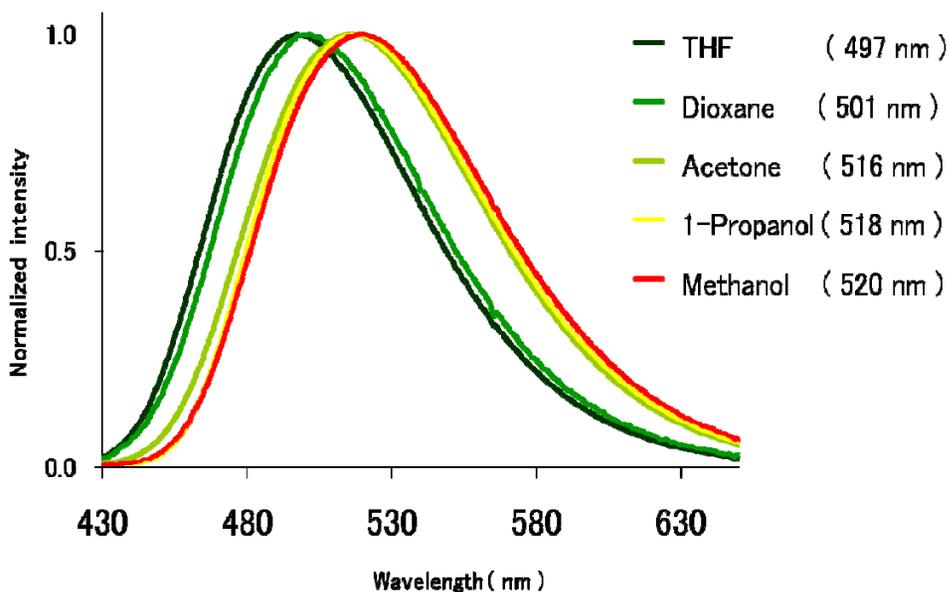
0.06% NaOH 水溶液

0.15% H_2O_2 水溶液

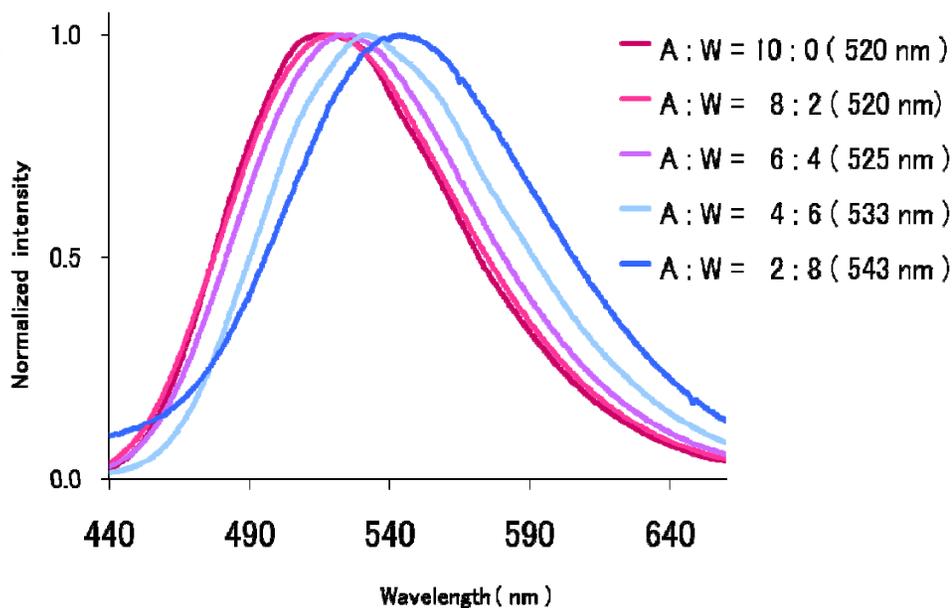
アセトニトリル-水混
合溶媒 0.18ml
色素
10 μ g



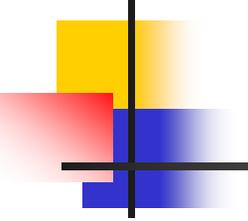
異なる有機溶媒中での化学発光スペクトル



アセトニトリル-水中での化学発光スペクトル



溶媒の極性によって化学発光波長もシフトすることを実験的に確認した



対象とする市場

○分子イメージング用環境応答型蛍光色素プローブ

生命・医療系の研究者・技術者に向けて、生体機能解明のための機能性蛍光色素プローブを提供する。

○医療診断・食品検査・環境計測用センサーデバイス

病院・公的研究機関に向けて、農薬、重金属、水分、洗剤、溶剤、細菌等をオンサイト検出するセンサーデバイスを共同研究開発する。

○有機薄膜・光情報記録媒体などへの応用

光や化学反応(酸・塩基・酸化・還元・ラジカル)に非常に安定な特性を生かして、適切な高分子に導入することで、物理的な刺激に波長応答するセンサーデバイスや有機エレクトロニック材料を共同研究開発する。

ビジネスプラン

➤ ジェネリック蛍光色素プローブの販売

- 現在市販されており特許権の消尽した蛍光色素プローブ(ボロンジピロメテン色素など)について、鈴木ー宮浦クロスカップリングによる大幅な合成工程短縮による製造コストの削減で、市販品よりも格安で販売する。

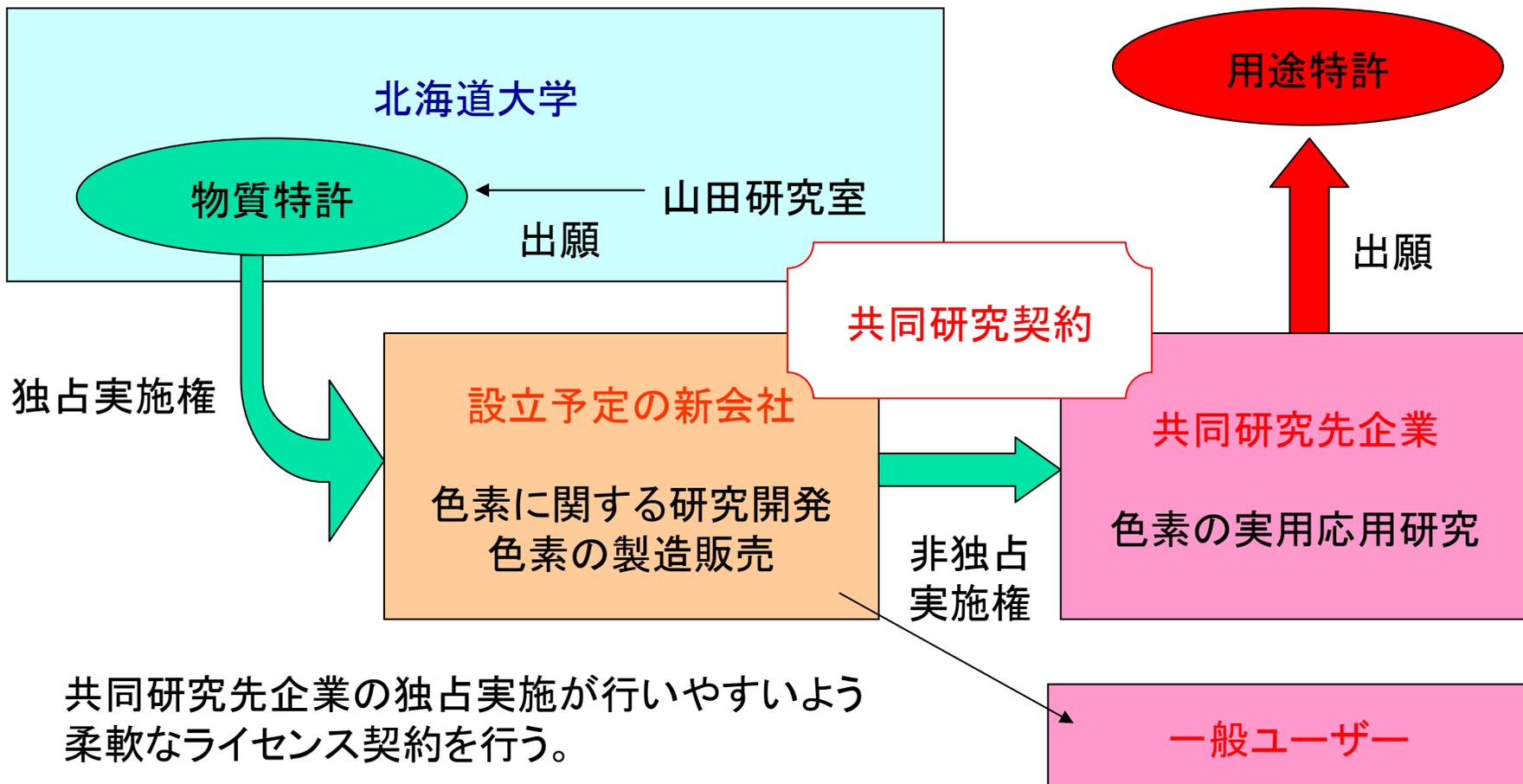
➤ 蛍光ソルバトクロミック色素関連商品の販売

- 蛍光ソルバトクロミック色素プローブについて、特定の生体分子にラベル化可能な色素分子の販売のほか、毒性の低さを生かして、染色用溶液や染色済みの細胞などの販売も検討する。

➤ 研究開発用蛍光プローブの受託合成販売

- 合成的に容易に波長の微調整やラベル化部位の導入ができる特性を生かして、依頼元の研究者の要望に沿った光特性・ラベル化部位を持った蛍光色素プローブの受託合成販売という新しい販売方法も検討している。在庫管理のコストが圧縮できるメリットが新会社にもあると想定している。

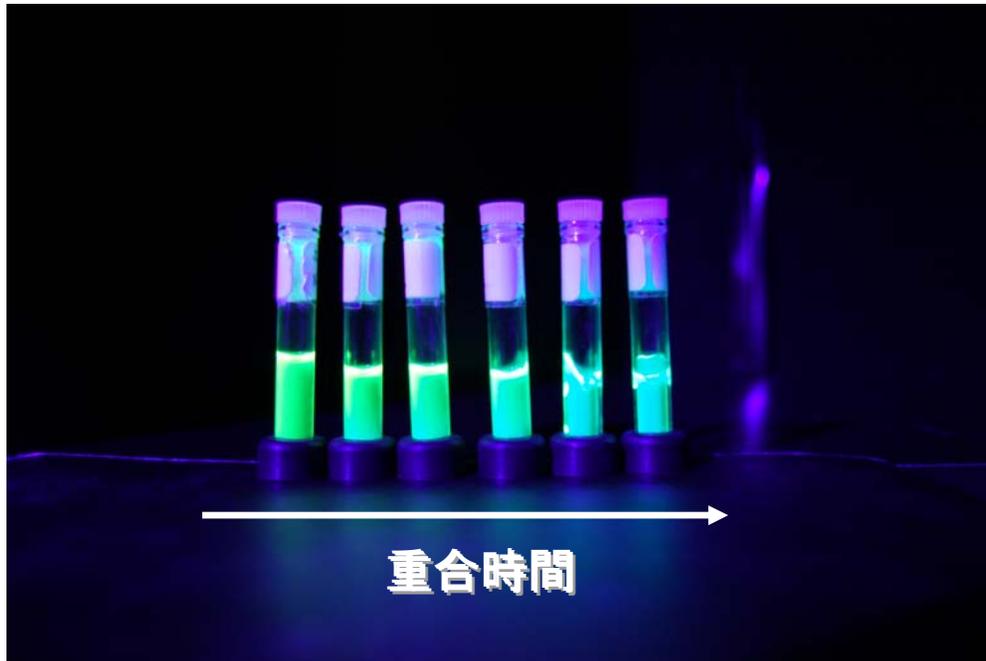
ライセンスプラン



POLARIS Fluorophoreの光学材料としての可能性

POLARIS Fluorophore は光だけでなく、さまざまな化学反応(酸・塩基・酸化・還元・ラジカル反応)に対しても極めて優れた耐久性を示す。

モノマー溶液にPOLARIS Fluorophoreとラジカル開始剤を加えて熱重合したときの経時変化



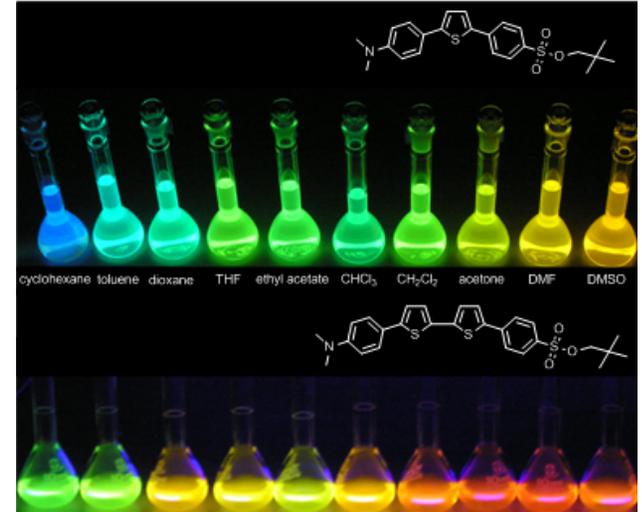
新しい合成法を利用して、POLARIS Fluorophoreに重合部位を組み込むことも可能なので、適切なポリマー材料と組み合わせることで、材料の均質性や耐久性の評価法や記録材料としての可能性も考えられる。

本特許の特徴・効果

- 本特許は、溶媒の極性、粘度、pHなどの外部因子で発光(色)特性が変化する蛍光化合物(環境応答型蛍光化合物)である。二波長の蛍光強度比から、光退色などの影響を取り除いて精度高く定量することが可能である。
- 従来の技術では、色素合成の段階数が多く、波長の微調整やラベル化部位の導入が非常に困難だった。本特許の蛍光色素は、新たな反応製法により測定機器や観測対象に最適化された蛍光プローブの創成が容易である。
- 本技術は、極性変化を伴う生体反応、例えば、抗原-抗体反応、DNAのハイブリダイゼーション、生体膜ダイナミクスなどに原理的に応用が可能なので、さまざまなバイオセンサーの領域に貢献することができる。

本技術の特徴と優位性

- ① 本製品は、蛍光ソルバトクロミック色素であり、溶媒の極性により発光波長が変わるため、時間・空間分解能が高い。
- ② また、色素分子周囲の環境を変える事により発光色が変わり、波長変換が可能である。
- ③ 溶媒に対する溶解性が改良されて精製が容易なため純度の高い蛍光色素を多量に生産可能になった。
- ④ 従来の色素よりも励起波長が長波長であるため、細胞や生体分子の光損傷を極力防ぐことが出来る。
例えば細菌が生きたまま挙動観測が可能になる。
- ⑤ また、蛍光は励起光の強度を上げることで信号強度を大きく出来る、シグナルを蓄積すれば高感度の測定が可能、発光を伴うためどんな小さな物体でも観察が可能など、吸光測定にはないメリットがある。



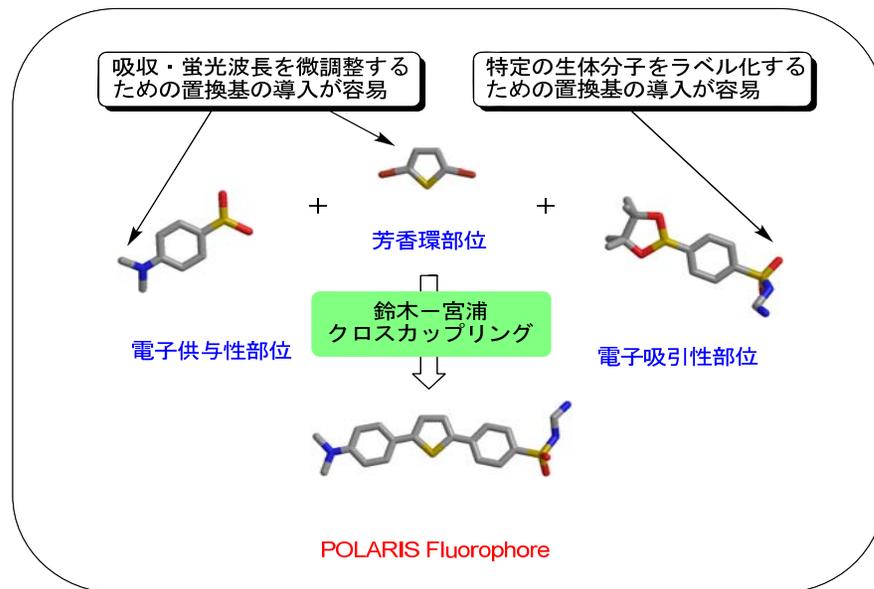
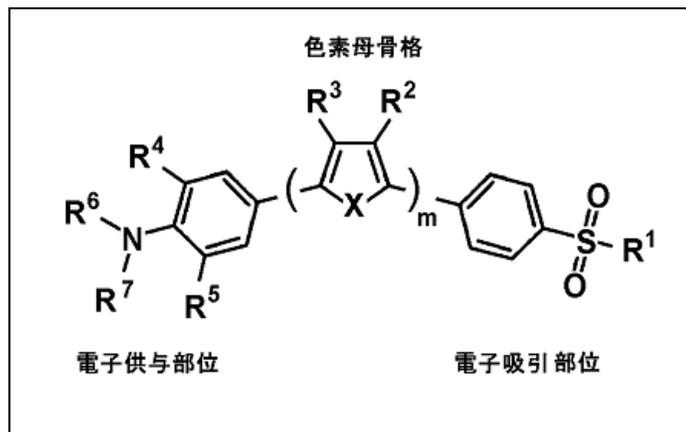
溶媒極性による蛍光色変化

技術内容(1)

➤ 蛍光ソルバトクロミック色素の構造

- 本商品は、分子配向を持った色素母骨格をベースに、極性反応する部位の電子供与部と電子吸引部を持った機能化学構造を持つ化合物色素。
- この色素は、3つの構成部位を鈴木-宮浦クロスカップリングによって直結する新規合成法を採用しているため、一部部位を改変することで波長の微調整やラベル化部位の導入が容易である。

蛍光ソルバトクロミック色素の構造



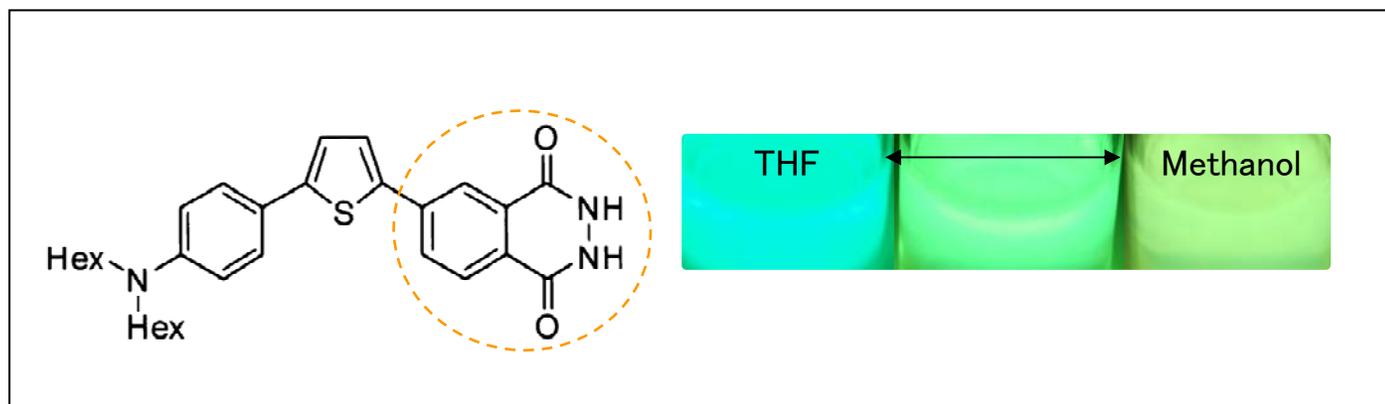
技術内容(2)

➤ 蛍光ソルバトクロミック色素と生体分子の複合体工法

- 蛍光色素は、生体分子(タンパク質等)内で凝集し、自己消光により蛍光シグナルが大幅に減衰することがある。本特許は、新工法(鈴木一宮浦クロスカップリング法)採用により、ラベル化部位や溶解性調整が容易となり、複合体中で色素が単分散して、迅速に波長応答できる。

➤ 化学発光特性の付与

- 電子吸引部位として、化学発光特性を併せ持つルミノール誘導体を導入することで、化学発光ソルバトクロミズムを示す新規色素を創製できた。



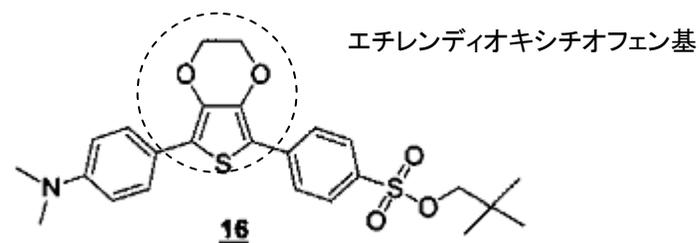
化学発光ソルバトクロミック色素の分子構造と異なる溶媒中での化学発光色

蛍光色素の誘導体の構造例

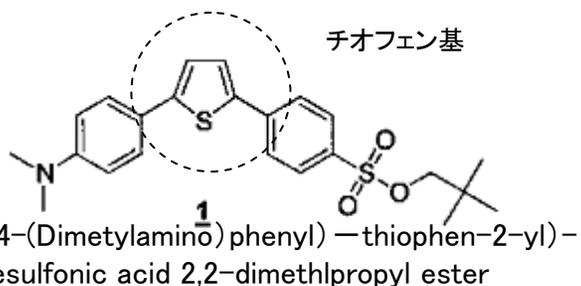
“チオフエン誘導体・フラン誘導体の色素”

本特許で合成された蛍光ソルバトクロミック色素

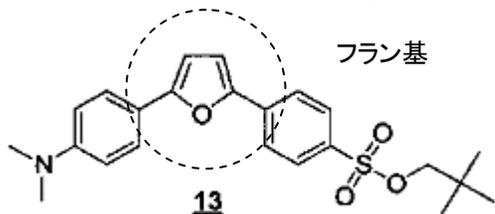
・本商品は、技術検証としてつくられた、複素環のチオフエン環又はフラン環を母骨格にジメチルアミノフェニルの電子供与部とベンゼンスルホン酸ジメチルプロピルエステル誘導体の電子吸引部を直結した構造式の一覧を示す。



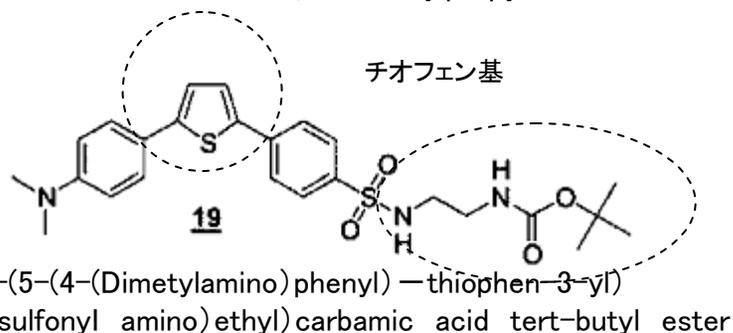
(4-(5-(4-(Dimethylamino) phenyl) -3,4-ethylenedioxythiophen-2-yl)benzenesulfonic acid 2,2-dimethylpropyl ester



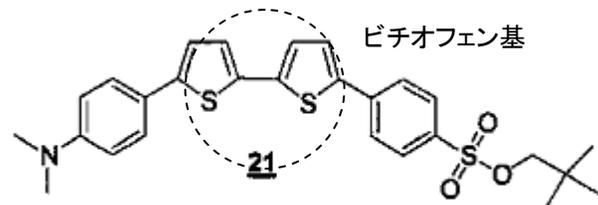
(4-(5-(4-(Dimethylamino) phenyl) -thiophen-2-yl)-benzenesulfonic acid 2,2-dimethylpropyl ester



(4-(5-(4-(Dimethylamino) phenyl) -furan-2-yl)-benzenesulfonic acid 2,2-dimethylpropyl ester



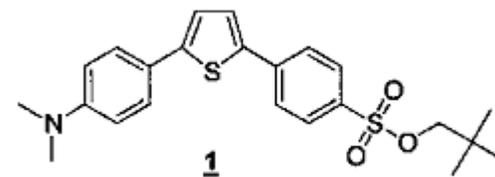
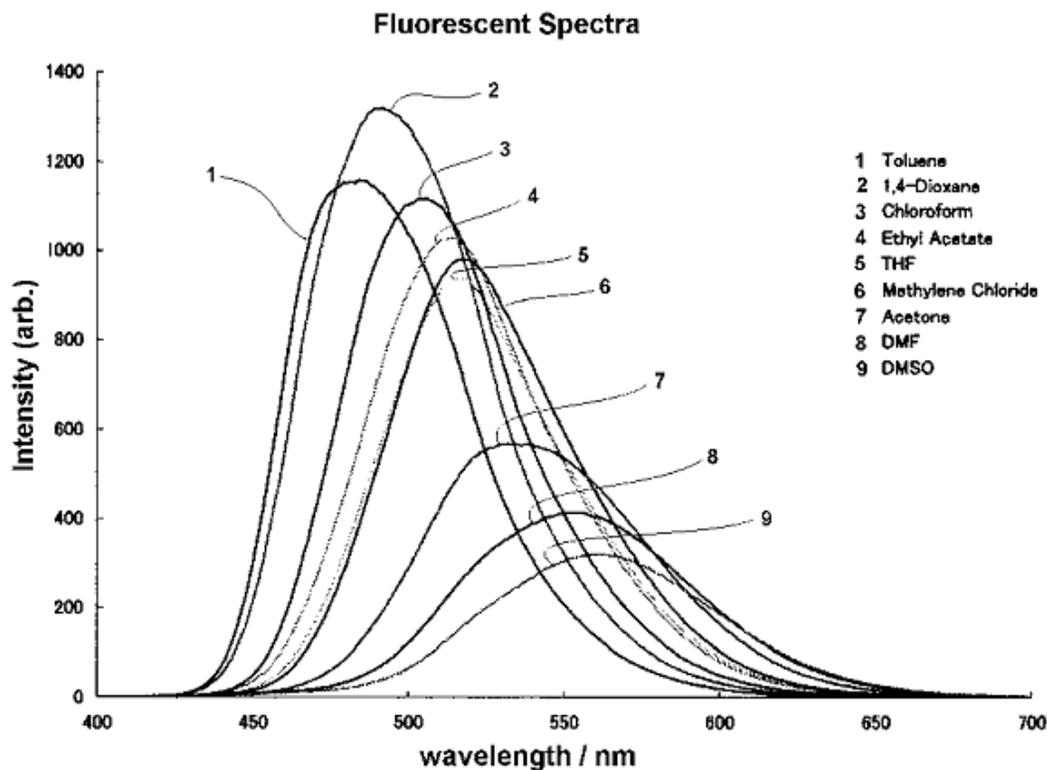
((2-(4-(5-(4-(Dimethylamino) phenyl) -thiophen-3-yl)benzenesulfonyl amino)ethyl)carbamic acid tert-butyl ester



(4-(5-(4-(Dimethylamino) phenyl) -2,2'-Bithiophen -5-yl)benzenesulfonic acid 2,2-dimethylpropyl ester

蛍光色素の溶媒影響と蛍光スペクトル

色素(チオフェンタイプ)の蛍光スペクトルと各種溶媒



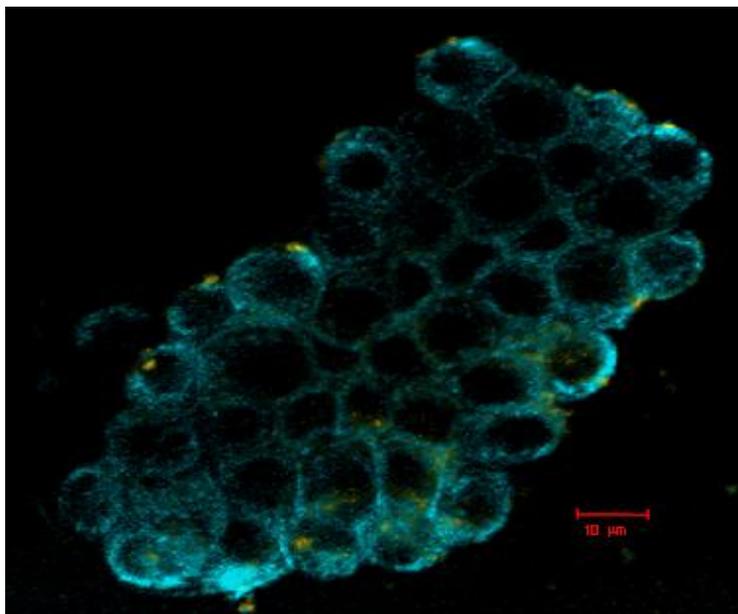
(4-(5-(4-(Dimethylamino)phenyl)-thiophen-2-yl)-benzenesulfonic acid 2,2-dimethylpropyl ester

- 蛍光発光の波長は、溶媒の極性が上がるほど、長波長にシフトし、目視で識別できる

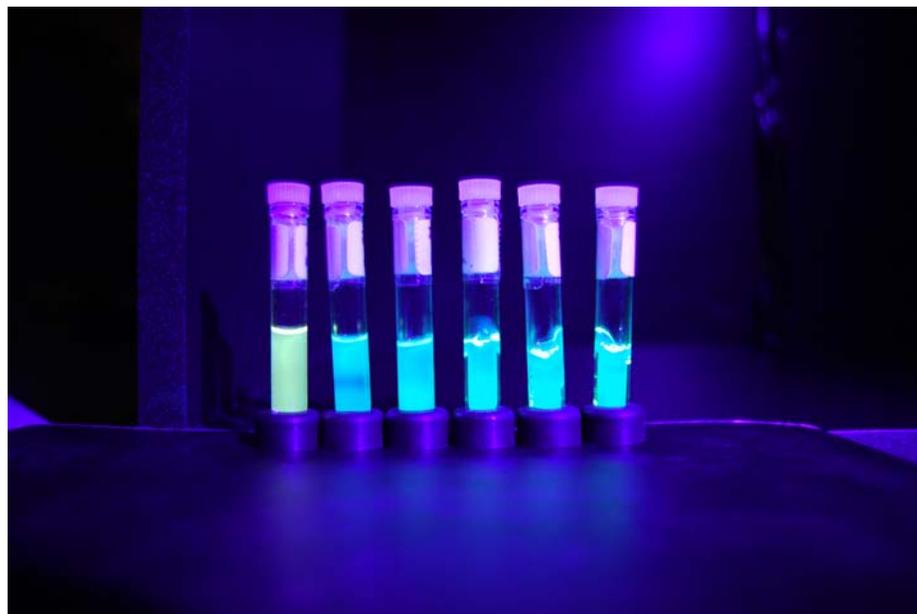
波長(nm)	380~430	430~460	460~500	500~570	570~590	590~610	610~780
色相	紫	藍	青	緑	黄	橙	赤



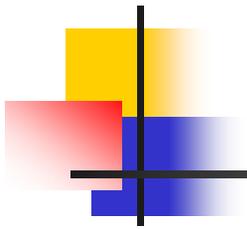
蛍光色素の利用例



細胞膜の蛍光標識:
細胞膜を選択的に蛍光標識し、部位特異的に異なるシグナルを発する。



色素含有ポリマー:
ラジカル重合反応の進行度によって、蛍光色が見た目で分かるほど変化する。



製品・サービスの概要・特徴

○様々な種類の色素の大量合成および精製が容易
光物性の調整やラベル化部位の導入が容易であり、目的に応じた
様々なタイプの色素を簡単な工程で生産できる。

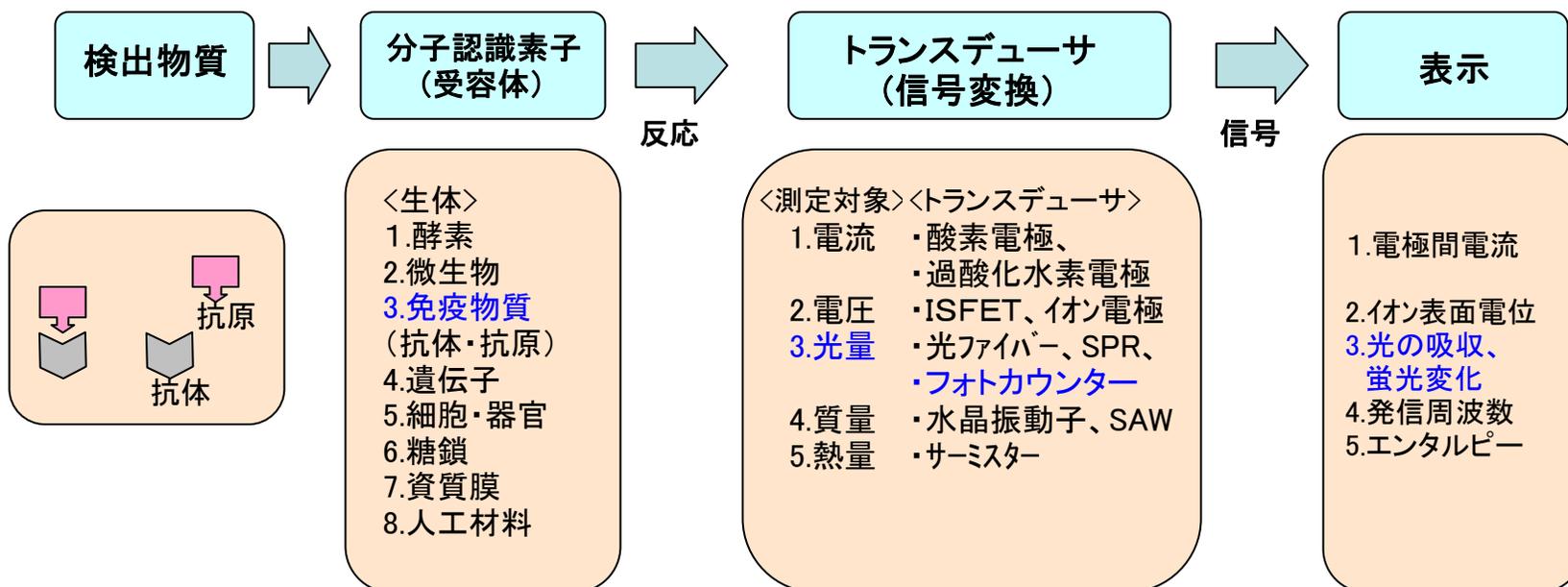
○高感度ケイ光ソルバトクロミック色素

- ・分子サイズが小さい。
- ・化学発光特性の付与も可能で、蛍光と比べ非常に感度が高い。
- ・従来色素は紫外線励起が必要であったが、本技術色素は可視光で励起できるため、細胞や生体分子の光損傷を防ぐことができる。
- ・脂溶性が高く、細胞膜を選択的に蛍光標識し、分子周囲のわずかな極性の変化に応答してケイ光色が変わる。極性が変わっても吸収波長はほとんど変化せず、単一波長励起が可能である。

バイオセンサー技術の構成と市場展望

- バイオセンサーは、酵素・微生物・抗体などの生体物質が持つ特異な分子認識能を分子機能素子として利用したセンサーである。その構成は、物質の受容・変換を行う分子認識材料(受容体)とこの情報を電気信号への変換を行う各種トランスデューサーから構成される。

図-9 発光色素(バイオセンサー)の技術構成内容



⇒ 蛍光ソルバトクロミック色素は、バイオセンサーの一部として認識されている。バイオセンサーの技術構成を他の機能と並べて比較すると用途と応用が見えてくる。

バイオセンサーとしての応用市場

図-10 バイオセンサーの市場環境と測定検出可能な販売見込み分野

医療市場環境

- 免疫物質検出 (抗体・抗原)
- 酵素検出
- 遺伝子検査
- 血糖値計測
- 尿酸検出測定
- ウイルス感染検査
- ピロリ菌検出
- インターフェロン
- 超微量生体検査

食品市場環境

- 醗酵プロセス管理
- 遺伝子組み換え管理
- 残留農薬の検出
- 微生物汚染検出・測定管理 (O-157)
- BSEの検出

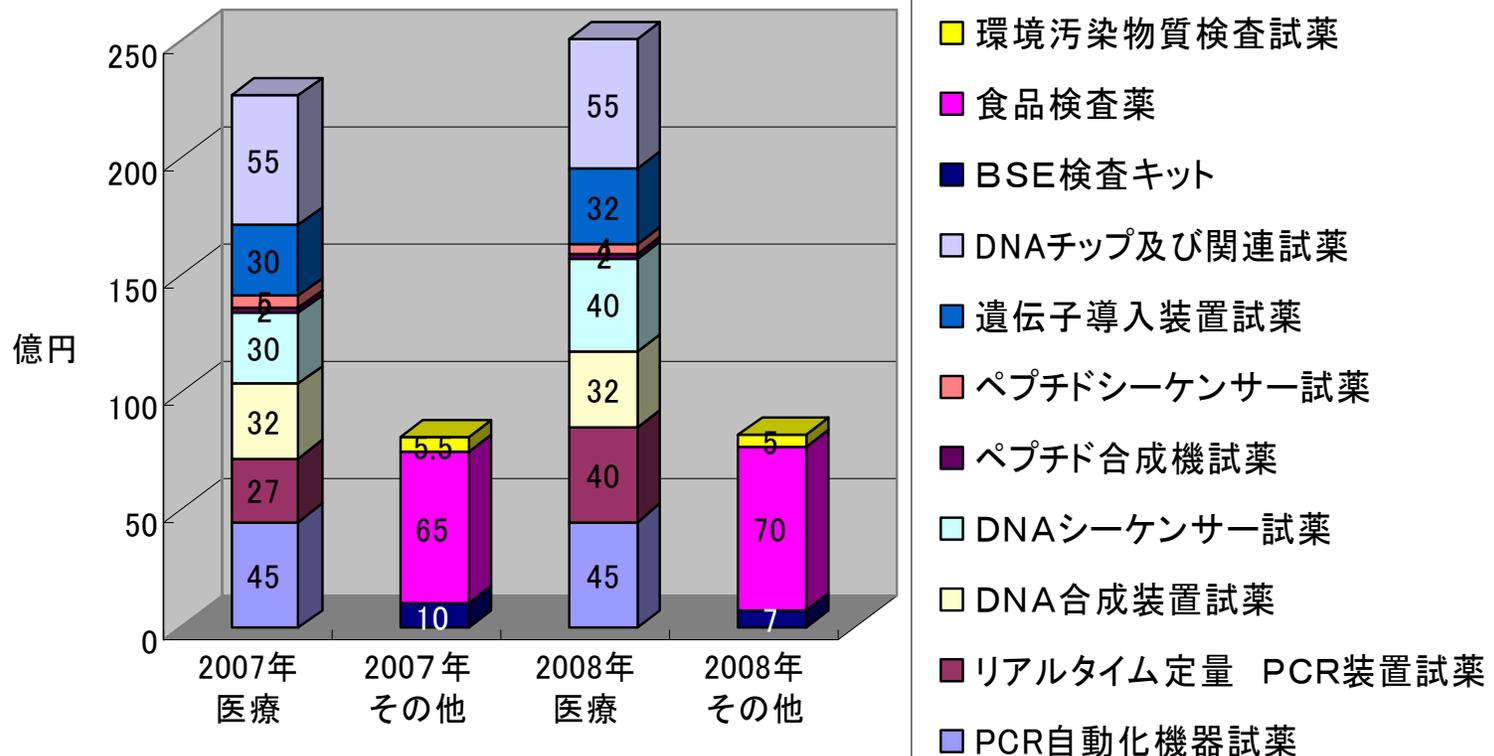
他の市場環境

- 微量有害物質計測
- 水質のBOD (溶存酸素) 測定
- ダイオキシン類の検出
- 土地等の農薬検査

健康と環境保全を守る

国内の検査試薬市場（医療・食品・環境）

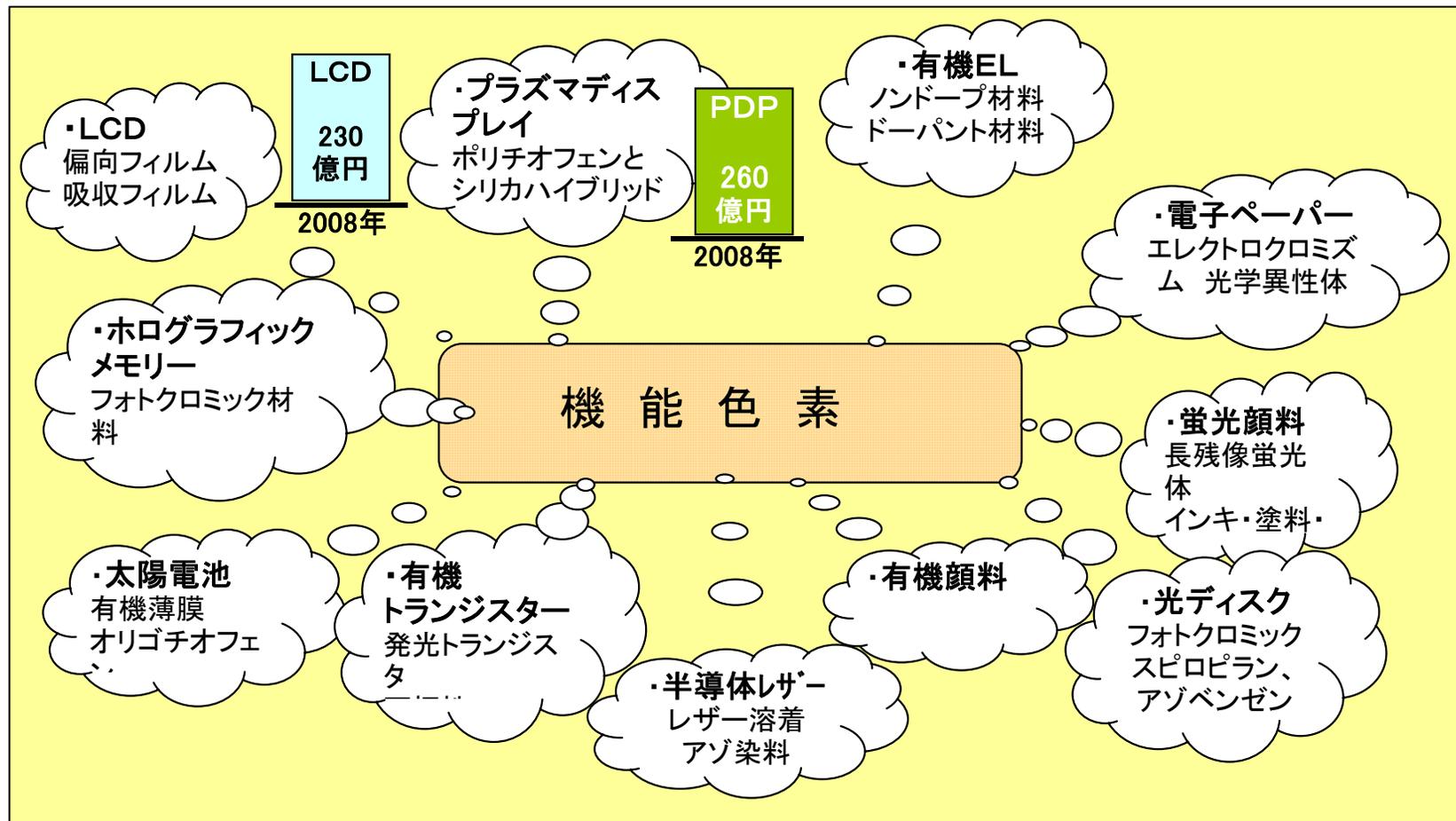
表-1 '07～'08年 バイオ関連検査試薬市場（国内）



出典：日経バイオ年鑑2009

発光素子材料の用途市場（周辺の機能色素）

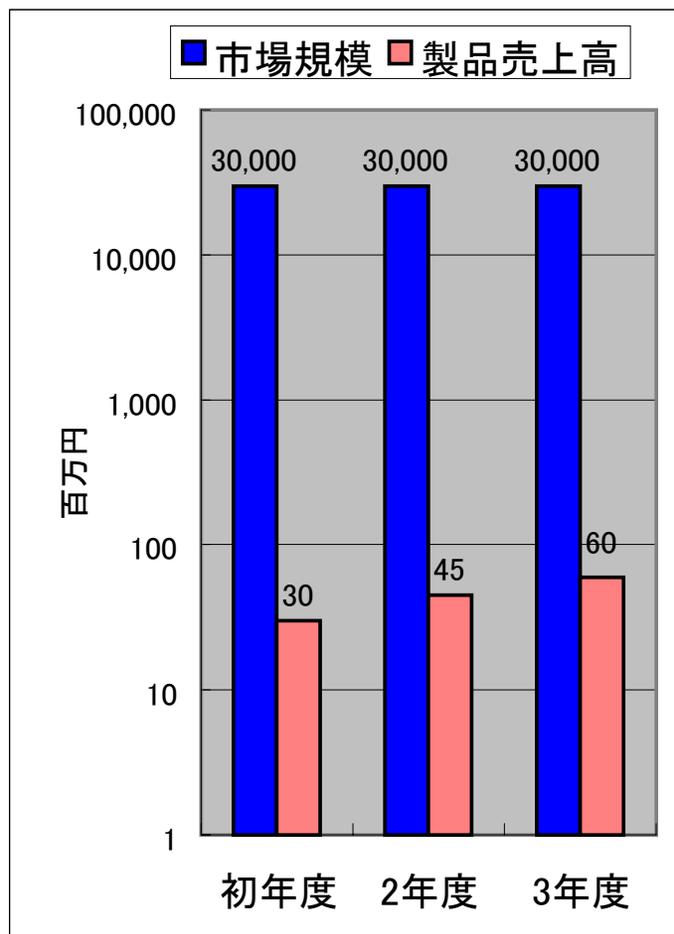
図-11 発光素子材料の用途市場（周辺の機能色素）



出典：(株)技術情報協会：最新の機能色素系大全集より抜粋

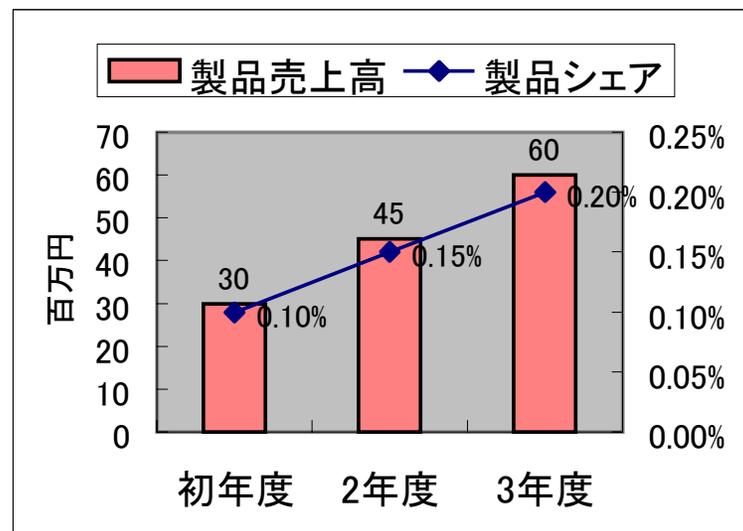
事業計画

蛍光ソルバトクロミック色素の販売事業計画



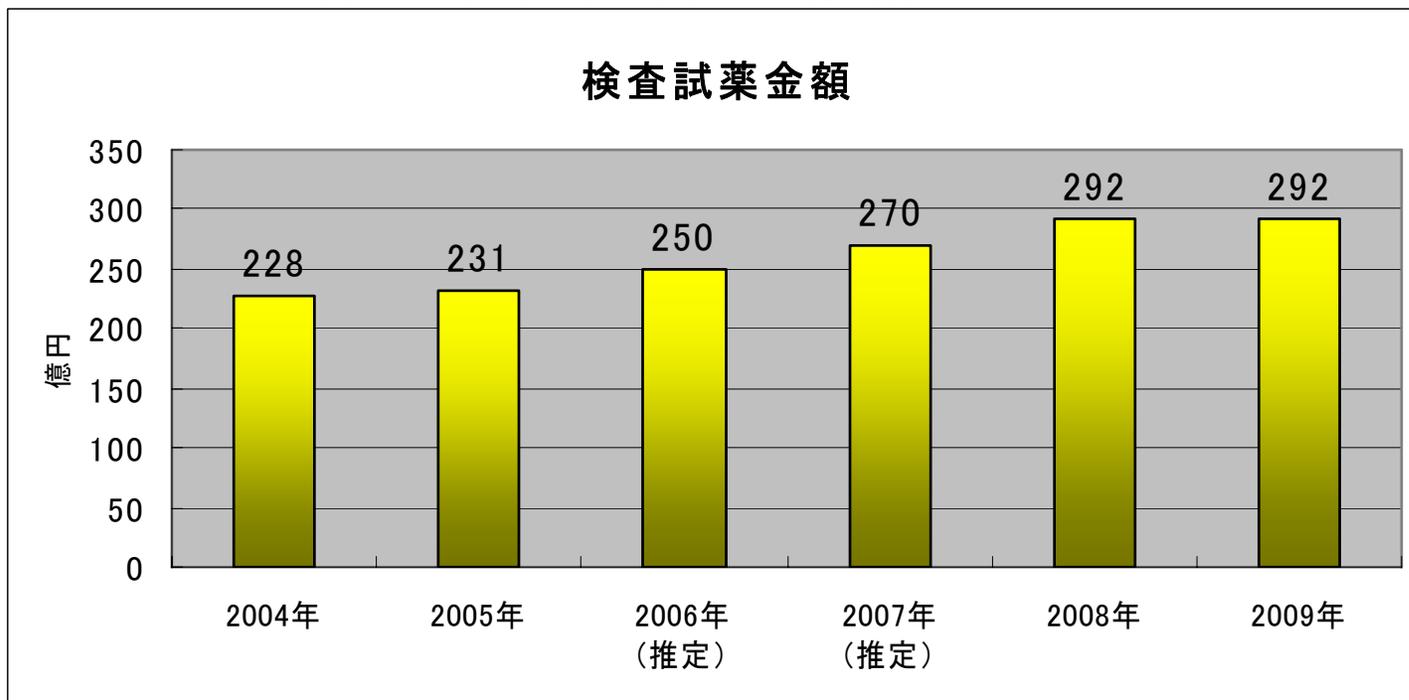
(単位:百万円)

	第1期 初年度	第2期 2年度	第3期 3年度
市場規模	30,000	30,000	30,000
製品売上高	30	45	60
製品シェア	0.10%	0.15%	0.20%



医療用検査試薬金額推移(国内)

表-3 医療用検査試薬の市場金額



•蛍光色素は、医療の検査試薬として使われおり、蛍光色素試薬は、検査試薬全体の中の1つとしてとらえ、官公庁資料には統計資料存在しないのでマーケット調査会社の富士経済社の資料を利用するが、部分欠落あり、筆者が一部推定と予測を加えてまとめた。2004年から順調に伸びてきたが2009年は、リーマンショックの影響もあり横ばいの予測される。

添付参考資料2:

'07～'08検査試薬用途別一覧

表-4 `07～'08 バイオ関連検査試薬市場(国内)

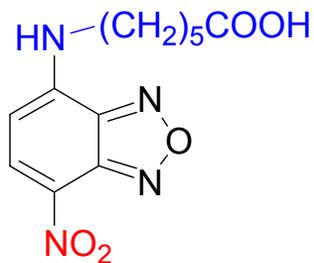
(単位:億円)

分野	項目	2007年 医療	2007年 その他	2008年 医療	2008年 その他
医療	PCR自動化機器試薬	45.0		45.0	
医療	リアルタイム定量 PCR装置試薬	27.0		40.0	
医療	DNA合成装置試薬	32.0		32.0	
医療	DNAシーケンサー試薬	30.0		40.0	
医療	ペプチド合成機試薬	2.0		2.0	
医療	ペプチドシーケンサー試薬	5.0		4.0	
医療	遺伝子導入装置試薬	30.0		32.0	
医療	DNAチップ及び関連試薬	55.0		55.0	
その他	BSE検査キット		10.0		7.0
その他	食品検査薬(PCR、EIA)		65.0		70.0
その他	環境汚染物質検査試薬		5.5		5.0
	計	226.0	80.5	250.0	82.0

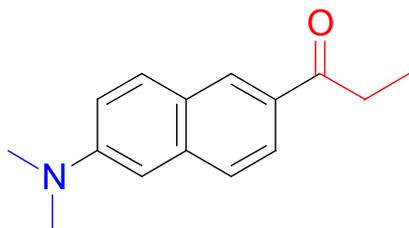
出典:日経バイオ年鑑2009

従来の蛍光ソルバトクロミック色素の構造

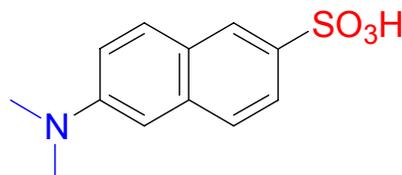
ジメチルアミノ基やアミノ基などの電子供与基とアセチル基やスルホニル基・ニトロ基などの電子吸引基を適切な芳香環の適切な位置に直結することで、溶媒極性により蛍光発光波長が変化する色素が合成できる。



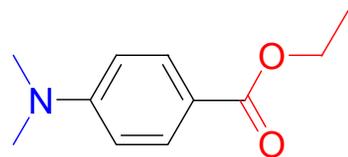
NBD-X



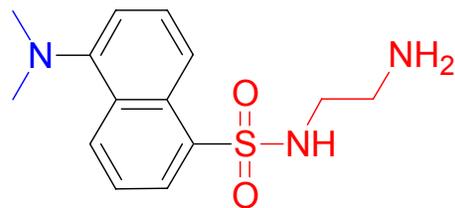
Prodan



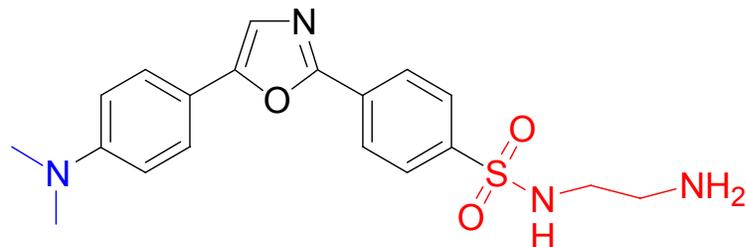
2,6-ANS



EDMAB



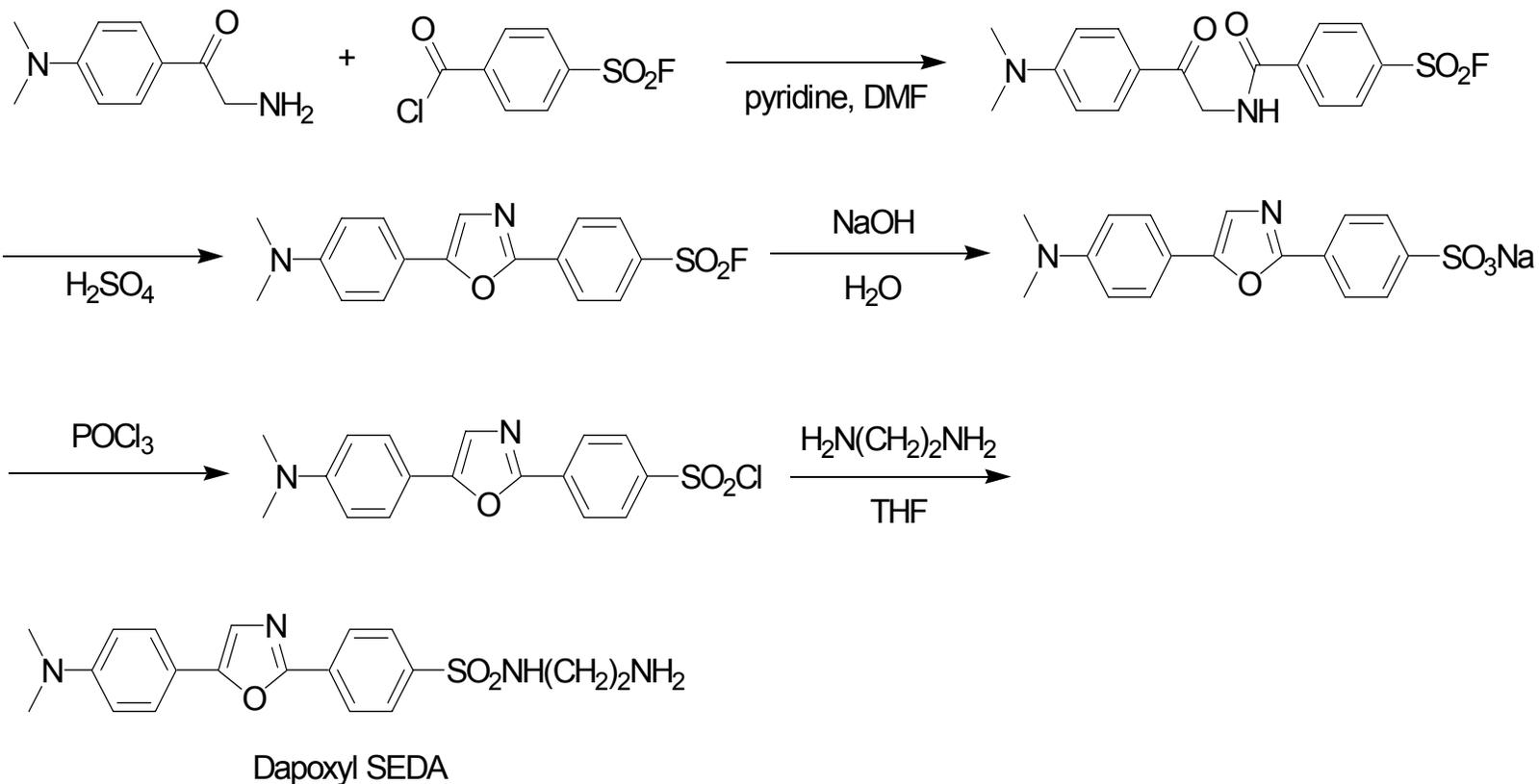
Dansyl EDA



Dapoxyl SEDA

市販されている主な蛍光ソルバトクロミック色素

Dapoxyl SEDAの合成法



電子供与分子の反応性置換基と電子吸引分子の反応性置換基縮環して芳香環母骨格を形成するため、性能向上のための分子改良が難しい。