

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5137081号
(P5137081)

(45) 発行日 平成25年2月6日(2013.2.6)

(24) 登録日 平成24年11月22日(2012.11.22)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|---------------|---------------|------------------|-----------------|
| GO 1 N | 21/78 | (2006.01) | GO 1 N 21/78 C |
| CO 7 F | 7/08 | (2006.01) | CO 7 F 7/08 Z |
| GO 1 N | 33/569 | (2006.01) | GO 1 N 33/569 F |
| GO 1 N | 21/77 | (2006.01) | GO 1 N 21/77 D |

請求項の数 11 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2008-283976 (P2008-283976)
 (22) 出願日 平成20年11月5日(2008.11.5)
 (65) 公開番号 特開2010-112777 (P2010-112777A)
 (43) 公開日 平成22年5月20日(2010.5.20)
 審査請求日 平成22年9月7日(2010.9.7)

(73) 特許権者 504190548
 国立大学法人埼玉大学
 埼玉県さいたま市桜区下大久保255
 (74) 代理人 100137512
 弁理士 奥原 康司
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (72) 発明者 幡野 健
 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国立大学法人埼玉大学内
 (72) 発明者 松岡 浩司
 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国立大学法人埼玉大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウィルス、微生物類の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

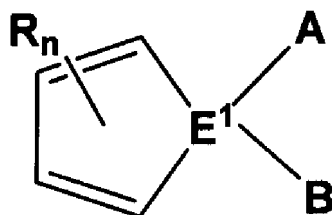
【請求項1】

微生物又は毒素と特異的に結合するデンドリマーとAIE効果を惹起する化合物を結合させた化合物を含む、微生物又は毒素を検出する試薬。

【請求項2】

前記AIE効果を惹起する化合物が以下の式(I)で示されることを特徴とする請求項1に記載の試薬。

【化1】



(I)

(式(I)において、Rは同一でも異なってもよいアリール基であり、E¹は、ケイ素又はゲルマニウムのいずれかであり、A及びBは同一でも異なってもよい炭化水素基、nは1~4の整数)

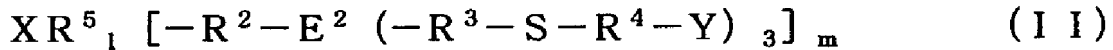
【請求項3】

Rが、p - ((CH₃)₂N)C₆H₄、p - CH₃OC₆H₄、p - CH₃C₆H₄、C₆H₅、p - F₃CC₆H₄、p - (NO₂)C₆H₄、m - CH₃C₆H₄、m - FC₆H₄、m - F₃CC₆H₄、1 - ナフチル、2 - スチリル、ピフェニル、2 - チエニル、ピチエニル、2 - チアゾール、2 - ピリジル、3 - ピリジル、N - メチル - 2 - ピロリル、2, 4, 6 - トリメチルフェニル (Mes)、2, 4, 6 - トリイソプロピルフェニル (Tip) からなる群より選択される請求項 2 に記載の試薬。

【請求項 4】

以下の式 (I I) で示される化合物を含む、請求項 1 に記載の微生物又は毒素を検出する試薬。

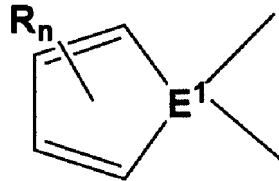
【化 2】



10

[式中 (I I) 中、X は以下の置換基

【化 3】



20

(但し、R は同一でも異なってもよいアリール基であり、E¹ はケイ素又はゲルマニウムのいずれかであり、n は 1 ~ 4 の整数である) であり、R²、R³ 及び R⁴ は酸素、窒素又はカルボニル基を含んでもよい同一又は異なった炭化水素鎖を示し、R⁵ は炭化水素基であり、E² は炭素、ケイ素又はゲルマニウムのいずれかであって E¹ と同一でも異なってもよく、Y は微生物又は毒素と特異的に結合する糖鎖であり、l 及び m は l + m = 2 を満たす整数である]

【請求項 5】

R²、R³ 及び R⁴ が同一又は異なり、アミド結合を含んでもよく、炭素数 1 ~ 6 の直鎖アルキル基、アルキレン基、アルケニレン基又はアルコキシレン基 (オキシアルキレン基) であり、R⁵ がメチル基である請求項 4 に記載の試薬。

30

【請求項 6】

Rが、p - ((CH₃)₂N)C₆H₄、p - CH₃OC₆H₄、p - CH₃C₆H₄、C₆H₅、p - F₃CC₆H₄、p - (NO₂)C₆H₄、m - CH₃C₆H₄、m - FC₆H₄、m - F₃CC₆H₄、1 - ナフチル、2 - スチリル、ピフェニル、2 - チエニル、ピチエニル、2 - チアゾール、2 - ピリジル、3 - ピリジル、N - メチル - 2 - ピロリル、2, 4, 6 - トリメチルフェニル (Mes)、2, 4, 6 - トリイソプロピルフェニル (Tip) からなる群より選択される請求項 4 又は 5 に記載の試薬。

【請求項 7】

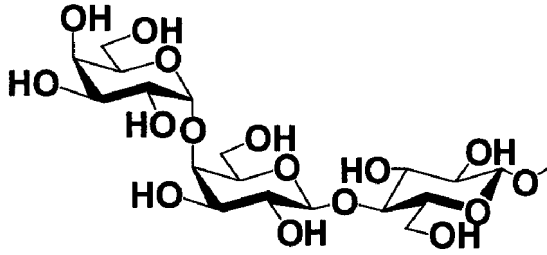
R が C₆H₅ であり、E¹ 及び E² がケイ素である請求項 6 に記載の試薬。

40

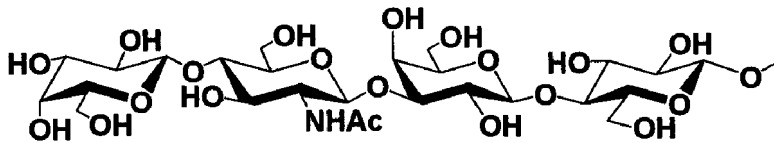
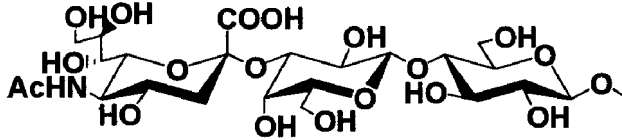
【請求項 8】

Y が以下の置換基

【化4】



10



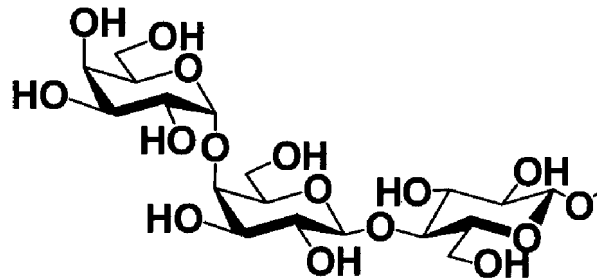
20

の何れかである請求項4乃至7のいずれかに記載の試薬。

【請求項9】

lが0、mが2、nが4、 R^2 及び R^3 が $-C_3H_6-$ 、 R^4 が $-C_4H_8-$ であり、Yが以下の置換基である請求項8に記載の試薬。

【化5】



30

【請求項10】

請求項1乃至9のいずれかに記載の試薬を含む、微生物又は毒素を検出するためのキット。

40

【請求項11】

請求項1乃至10のいずれかに記載の試薬又はキットを使用した微生物又は毒素を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルス及び微生物類の検出方法、並びに該検出方法のための試薬又はキットに関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

多くのウイルスや細菌による感染症は、重篤な病態を引き起こすことも少なくないため、感染予防や感染後の治療は、常に重要な臨床的課題となっている。感染病原体の中でも、とりわけ危険度の高いインフルエンザウイルス、特にここ数年世界規模での蔓延が危惧されている高病原性トリインフルエンザ、SARSに対する予防及び治療上の対策は、早急に対応すべき重要な問題の一つである。さらに、近年の地球温暖化に伴い、熱帯地方特有の感染症（例えば、デング出血熱）が感染地域を拡大してきており、今後の対策が不可欠である。

【 0 0 0 3 】

ウイルスや細菌などの微生物による生体への感染経路は、各微生物によって異なるが、感染標的細胞への侵入の際には、標的細胞表層に存在する受容体上の糖鎖構造を認識し、結合することが、多くの場合において知られている。このような感染時の現象に着目して、発明者らは、ウイルスや細菌感染によって生じる疾患の予防及び治療法の開発を行ってきた。発明者らは、例えば、カルボシランデンドリマーあるいはポリマー上に糖鎖を集積させ、病原性大腸菌O-157の産生するペロ毒素に対して動物レベルでも強い阻害活性を示す糖鎖クラスター化合物の創製（非特許文献1及び特許文献1）、デングウイルス（非特許文献2及び特許文献2）、インフルエンザウイルスの引き起こす感染症に対し効果を示す糖鎖クラスター化合物の創製（非特許文献3、特許文献3、特許文献4及び特許文献5）など、精力的に研究を行ってきた。

このように、ウイルス又は細菌感染時の標的細胞上の糖鎖構造の認識機構は、感染症の予防又は治療方法の開発において有益な手掛かりを与えてきた。

【 0 0 0 4 】

感染症自体を予防又は治療することは、当然、重要なことであるが、その一方で、どのような微生物感染が生じているのかを早急に突き止めることも、早期治療を行う上では非常に重要なことである。現在、主として行われている感染病原体の検査は、検査対象の病原体に特異的な抗原タンパク質を検出する方法、特定の遺伝子領域を増幅して検出する方法、あるいは、感染病原体を顕微鏡下で直接観察する方法などが行われている。これらの方法のうち、抗原タンパク質や特定遺伝子を同定する方法は、検出感度及び精度の点において優れてはいるものの、やや操作が煩雑であり、迅速な検査結果の取得の点に若干の問題がある。また、顕微鏡を用いて形態学的に感染病原体を特定する方法においては、観察対象の病原体の数がある程度高濃度でなければ検出が難しく、そのための感染病原体の増殖等に多くの時間が必要とされ、検査の迅速性に問題があった。

【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】J. Infect. Dis., 2005, 191: 2097-2105

【非特許文献2】Carbohydr. Res., 2006, 341: 467-473

【非特許文献3】Tetrahedron Lett., 2001, 42: 3327-3330

【非特許文献4】J. Korean Phys. Soc., 2004, 45: 329

【非特許文献5】J. Am. Chem. Soc., 2005, 127: 11661

【非特許文献6】Syn. Met., 2005, 152: 249

【非特許文献7】Tetrahedron Lett., 2007, 48: 4365-4368

【特許文献1】特開2005-289907

【特許文献2】特開2005-306766

【特許文献3】特開2008-50283

【特許文献4】特開2008-81411

【特許文献5】特開2005-77276

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

10

20

30

40

50

上記状況の中、感染症の原因病原体の検出及び同定をさらに迅速かつ正確に行うために、従来方法とは異なる方法論に基づいた新たな手法の開発に期待が寄せられている。

そこで、本発明は、感染病原体を迅速かつ正確に検出及び同定する方法、及び該方法に使用される試薬又はキットの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

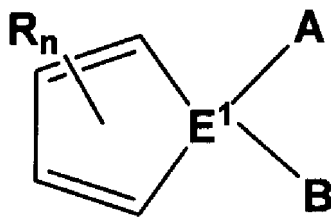
本発明者らは、病原体に特異的に結合する糖鎖を担持したカルボシラン dendrimer による AIE (aggregation-induced emission) 効果を利用して本発明を完成させた。AIE 効果とは、2, 3, 4, 5-テトラフェニルシロール (以下、シロールと略記) など、中心の環の周りを囲むように複数のアリール基 (例えば、フェニル基) が結合した分子が、液体中で互いに凝集し合い、紫外線照射により高効率発光を行う現象のことである (非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6 及び非特許文献7)。発明者らは、シロールと上記カルボシラン dendrimer を結合させた化合物によって引き起こされる AIE 効果が、該カルボシラン dendrimer が担持する糖鎖と病原体 (例えば、インフルエンザウィルスなど) 又は病原体が分泌する毒素 (例えば、ペロ毒素など) との結合によって消失すること初めて見出した。これまでにも、発光分子を利用して病原微生物を検出する試みが行われてはいたが、発光分子と病原微生物との結合の前後において、発光量又は色調の変化を明瞭に現出させる有効な方法が見出されていなかったため、いずれの試みも実用化には程遠い状態にあった。本発明は、AIE 効果を利用することで、シンプルかつ迅速な微生物検出を提供する点において、特別顕著な効果を有している。

【0008】

すなわち、本発明は、微生物又は毒素と特異的に結合する dendrimer と AIE 効果を惹起する化合物を結合させた化合物を含む、微生物又は毒素を検出する試薬及びキット、並びに該試薬又はキットを使用した微生物又は毒素を検出する方法である。

より具体的には、本発明は、AIE 効果を惹起する化合物が以下の式 (I) で示されることを特徴とする微生物又は毒素を検出する試薬及びキット、並びに該試薬又はキットを使用した微生物又は毒素を検出する方法である。

【化6】

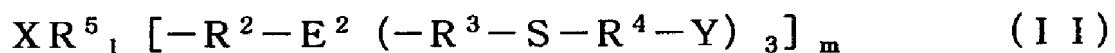


(I)

(式 (I) において、R は同一でも異なってもよいアリール基であり、E¹ は、ケイ素又はゲルマニウムのいずれかであり、A 及び B は同一でも異なってもよい炭化水素基、n は 1 ~ 4 の整数)

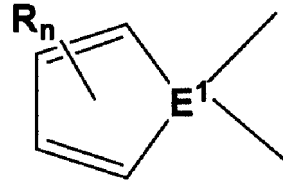
あるいは、本発明は、以下の式 (II) で示される化合物を含む、微生物又は毒素を検出する試薬及びキット、並びに該試薬又はキットを使用した微生物又は毒素を検出する方法である。

【化7】



[式中 (II) 中、X は以下の置換基

【化 8】



(但し、Rは同一でも異なってもよいアリール基であり、 E^1 はケイ素又はゲルマニウムのいずれかであり、nは1～4の整数である)であり、 R^2 、 R^3 及び R^4 は酸素、窒素又はカルボニル基を含んでもよい同一又は異なった炭化水素鎖を示し、 R^5 は炭化水素基

10

【発明の効果】

【0009】

本発明の微生物検出方法は、検出対象の微生物を簡便かつ迅速に、高精度で定性的及び定量的な検出を行うことができる。

【0010】

特に、本発明は、微生物等の存在による蛍光強度の変化が明瞭であるため、検出目的微生物等の存在を視覚的に捉えることが可能である。

20

【0011】

本発明の微生物検出試薬又はキットは、煩雑な操作を必要とせず、また、微量に存在する微生物の検出にも適しているため、感染症の危険を迅速に感知することができるため、早急な感染症治療を可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明は、微生物又は毒素と特異的に結合するデンドリマーと、AIE効果を惹起、あるいは、発現する化合物を結合させた化合物を含む、微生物又は毒素を検出する試薬又はキット、及び該試薬又はキットを使用した微生物又は毒素を検出する方法に関するものである。ここで、「デンドリマー」とは、ギリシャ語の「dendron」（樹木）を語源とする規則正しく分岐した樹状高分子化合物の総称である。デンドリマーの形態としては、例えば、ダンベル型、ファン型、ボール型などが知られているが（図1を参照のこと）、本発明においては、AIE効果を惹起する化合物と作用可能（即ち、AIE効果を訴外することなく）に結合できる形態であればいずれの形態を使用することも可能であり、デンドリマーの形態の選択は、当業者であれば容易に行うことができる。本発明に使用されるデンドリマーは、微生物又は毒素と特異的に結合するものである。例えば、カルボシランデンドリマーのコア骨格に、微生物又は毒素と特異的に結合する糖鎖を結合させたデンドリマーなどを使用することができる。微生物又は毒素と特異的に結合する糖鎖としては、限定はしないが、例えば、腸管出血性大腸菌O-157が産生するペロ毒素と特異的に結合するグロボ3糖（G_b3、Gal 1-4 Gal 1-4 Glc 1-）、インフルエンザウィルス等のウィルス表面に存在するヘマグルチニンと特異的に結合するシアリルラクトース、デング熱ウィルスのスパイク糖タンパク質と特異的に結合するラクトネオテトラオースなど、本発明で使用可能な糖鎖はこれまでに数多く同定されており、検出対象の微生物又は毒素に適した糖鎖を選択することは当業者であれば容易に行うことができる。本発明で使用可能な糖鎖と該糖鎖が認識する微生物の組合せの一例を表1～5に示す。

30

40

【0013】

【表 1】

| 生物 | 糖結合特異性 | 形態 ^a |
|---|--|-----------------|
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | GalβGalNAc | GP |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ^b | Fuca2Galβ4GlcNAc | GP |
| 1 型大腸菌 | Manα3(Manα6)Man | GP |
| P 型 | Galα4Gal | GSL |
| S 型 | Neu5Acα2,3Galβ3GalNAc | GSL |
| CFA/1 型 | Nue5Acα2,8- | GP |
| K1 型 | GlcNAcβ4GlcNAc | GP |
| K99 型 | Nue5Acα2,3Galβ4Glc | GSL |
| ヘモフィルス・インフルエンザ菌 (<i>Haemophilus influenzae</i>) | (Neu5Acα2,3) _{0,1} Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc | GSL |
| ヘリコバクター・ピロリ菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) | Neu5Acα2,3Galβ4Glc(NAc) ; Fuca2Galβ3(Fuca4)Gal | GP |
| 肺炎桿菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) | Man | GP |
| マイコプラズマ肺炎菌 (<i>Mycoplasma pneumoniae</i>) | Neu5Acα2,3Galβ4Glc(NAc) | GP |
| 髄膜炎菌 (<i>Neisseria meningitidis</i>) | (Neu5Acα2,3) _{0,1} Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc | GSL |
| ネズミチフス菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) | Man | GP |
| 肺炎連鎖球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) | (Neu5Acα2,3) _{0,1} Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAc | GSL |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | Neu5Acα2,3Galβ3GalNAc | GP |
| <i>Streptococcus suis</i> | Galα4Galβ | GSL |

10

20

^a 細胞上のリガンドの形態, GP: 糖タンパク質, GSL: グリコスフィンゴ脂質. 特に明記しない限り文献は, Roussel & Lamblin, 1996; Sharon, N. & Ofek, 2000 を参照されたい.

^b Ruiz-Palacios et al., 2003

【表 2】

| 菌体 | 付着組織 | レセプター糖鎖構造 |
|---|------|---|
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | | |
| 1 型アドヘシン | 泌尿器 | Manα- |
| P-アドヘシン | " | Galα1→4Gal β- |
| G-アドヘシン | " | GlcNAc β- |
| S-アドヘシン | " | NeuAcα2→3Gal |
| K99-アドヘシン | 腸管 | NeuGcα2→3Galβ1→4Glcβ- |
| 肺炎双球菌 (<i>Diplococcus pneumoniae</i>) | 呼吸器 | GlcNAcβ1→3Gal |
| ブドウ状球菌 (<i>Staphylococcus saprophytilis</i>) | 泌尿器 | Galβ1→4GlcNAc |
| 緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) | 呼吸器 | GalNAcβ1→4Gal |
| 淋菌 (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>) | 生殖器 | Galβ1→4Glcβ-, NeuAcα1→3Galβ1→4GlcNAc |

30

40

【表 3】

| ウイルス | ウイルスタンパク質 | レセプター糖鎖構造 | |
|-------------------------------|---|---|----|
| インフルエンザ A型ウイルス | HA タンパク質 (赤血球凝集素) | Neu5Acα2→3Galβ1→4(3)GlcAcβ1→ または Neu5Acα2→6Galβ1→4(3)GlcAcβ1→ Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAcβ1→ または Neu5Acα2→6Galβ1→3GalNAcβ1→ Neu5Acα2→3Galβ1→6(4)GlcNAcβ1→ | 10 |
| B型ウイルス | HA タンパク質 (赤血球凝集素) | | |
| C型ウイルス | HE 糖タンパク質 (ヘマグルチニン エステラーゼ) | Neu5,9Acα2→3Galβ1→ Neu5,9Acα2→8NeuAcα2→ | |
| コロナウイルス センダイウイルス (HCoV) | S タンパク質 HN タンパク質 (ヘマグルチニン-シアル酸 9-O-アセチルエステラーゼ) | Neu5,9Acα2→3Galβ1→ Neu5Acα2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→ Neu5Gcα2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→ | 20 |
| ニューカッスル病ウイルス (NDV) | HN タンパク質 (ヘマグルチニン ノラミニダーゼ) | NeuAcα2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→ NeuAcα2→3Galβ1→4GlcNAcβ1→ NeuAcα2→3Galβ1→4Glcβ1→ NeuAcα2→3Galβ1→4Glcβ1→ | |
| レオウイルス タイプ 1 タイプ 3 | ヘマグルチニン ヘマグルチニン | シアル酸(フェツイン) シアル酸(フェツイン, 顎下線ムチン) | |
| エイズウイルス (HIV-1) | gp120(糖タンパク質) | HO ₃ S→3Galβ1-Cer(スルファチド) Galβ1-Cer 硫酸化ガングリオシド | 30 |
| 単純ヘルペスウイルス 1型(HSV-1) | ヘマグルチニン, グリコプロ テイン C | ヘパラン硫酸 | |

【表4】

| 細菌 | 毒素名 | 標的臓器 | 受容体の糖脂質構造 | 略号 |
|--|-----------------------------|---------|---|------------------|
| コレラ菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) | コレラ毒素 | 小腸 | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glc- 3 ↑ 2αNeu5Ac | GM1 |
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | 大腸菌易熱性毒素 | 小腸 | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glc- 3 ↑ 2αNeu5Ac | GM1 |
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | ペロ毒素 (VT1) (志賀毒素様毒素) | 小腸 | Galα1→4Gal- Galα1→4Galβ1→4Glc- | Ga2Cer Gb3Cer |
| 破傷風菌 (<i>Clostridium tetani</i>) | 破傷風毒素 | 神経シナプス膜 | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glc- 3 ↑ 2αNeu5Ac8←2αNeu5Ac | GD1b |
| ボツリヌス菌 (<i>Clostridium botulinum</i>) | ボツリヌス毒素 A型, E型(H鎖) | 神経シナプス膜 | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glc- 3 3 ↑ ↑ 2αNeuAc8←2αNeuAc 2αNeu5Ac8←2αNeu5Ac | GQ1b |
| | ボツリヌス毒素 B型, C型, F型, (H鎖) | 神経シナプス膜 | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glc- 3 3 ↑ ↑ 2αNeuAc 2αNeu5Ac8←2αNeu5Ac | GT1b |
| 腸炎ビブリオ (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>) | 腸炎ビブリオ耐熱性 溶血毒 | ヒト赤血球 | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glc- 3 3 ↑ ↑ 2αNeuAc 2αNeu5Ac8←2αNeu5Ac | |
| ウェルシュ菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) | クロストリジウム 毒素 | 細胞(融解) | GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ- 3 ↑ 2αNeuAc | |

10

20

30

【表5】

| 菌体 | レセプターとして認識される糖鎖の内部配列 (イソレセプター) |
|--|---|
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ— GalNAcα1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ— Fucα1→2Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ— NeuAcα2→3(6)Galβ1→3GalNAcβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glcβ— |
| (<i>E. Coli K99</i>) | GalNAcβ1→4(NeuGcα2→3)Galβ1→4Glcβ— |
| シュウドモナス属菌 (<i>Pseudomonas sp.</i>) | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ— |
| 放線菌 (<i>Actinomyces Naeslundii</i>) | Galβ1→3GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ— Galβ1→3(NeuGcα2→6)GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ— |
| プロピオン酸菌 (<i>Propionibacterium granulosum</i>) | GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ— GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ— Galα1→3Galβ1→4Glcβ— Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ— |

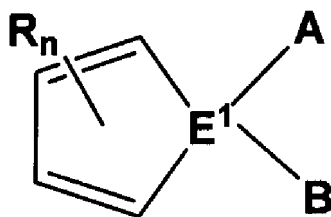
10

20

【0014】

本明細書に記載される「AIE効果」とは、発光性化合物が互いに凝集し合い、特定の波長（例えば、紫外線など）の照射により高効率発光を惹起する現象（AIE: aggregation-induced emission）（非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6及び非特許文献7）のことである。本発明で使用可能な、「AIE効果を惹起する化合物」は、当業者によって選択可能な化合物であればいかなるものであっても使用可能であるが、限定はしないが、例えば、下記の式（I）で示される化合物などを使用することができる。

【化9】



(I)

式（I）中、Rは同一でも異なってもよいアリール基であり、E¹は、ケイ素又はゲルマニウムのいずれかであり、A及びBは同一でも異なってもよい炭化水素基、nは1～4の整数である。特に限定はしないが、例えば、Rはp-(CH₃)₂N-C₆H₄、p-CH₃OC₆H₄、p-CH₃C₆H₄、C₆H₅、p-F₃CC₆H₄、p-(NO₂)C₆H₄、m-CH₃C₆H₄、m-FC₆H₄、m-F₃CC₆H₄、1-ナフチル、2-スチリル、ピフェニル、2-チエニル、ピチエニル、2-チアゾール、2-ピリジル、3-ピリジル、N-メチル-2-ピロリル、2,4,6-トリメチルフェニル(Mes)、2,4,6-トリイソプロピルフェニル(Tip)であり、特にC₆H₅（フェニル基）の場合は、nは4、A及びBがメチル基である2,3,4,5-テトラフェニルシロールなどを好適に使用することができる。

40

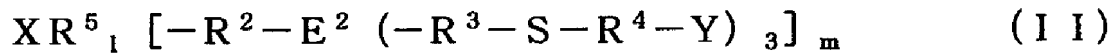
【0015】

本発明のある実施形態は、以下の式（II）で示される化合物を含む、微生物又は毒素

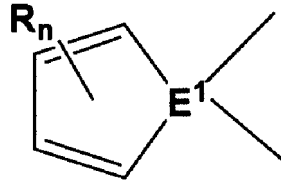
50

を検出する試薬である。式 (I I) で示される化合物は、「微生物又は毒素と特異的に結合する dendrimer と、AIE 効果を惹起、あるいは、発現する化合物を結合させた化合物」の 1 例の一般式である。

【化 1 0】



式中 (I I) 中、X は、例えば、以下の置換基
【化 1 1】



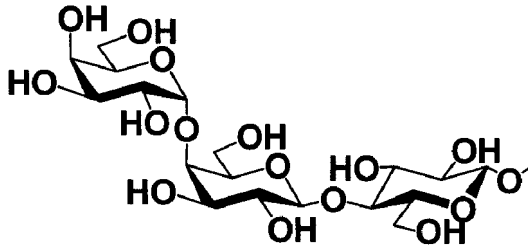
(但し、R は同一でも異なってもよいアリール基であり、例えば、p - ((C H ₃) ₂ N) C ₆ H ₄、p - C H ₃ O C ₆ H ₄、p - C H ₃ C ₆ H ₄、C ₆ H ₅、p - F ₃ C C ₆ H ₄、p - (N O ₂) C ₆ H ₄、m - C H ₃ C ₆ H ₄、m - F C ₆ H ₄、m - F ₃ C C ₆ H ₄、1 - ナフチル、2 - スチリル、ピフェニル、2 - チエニル、ピチエニル、2 - チアゾール、2 - ピリジル、3 - ピリジル、N - メチル - 2 - ピロリル、2, 4, 6 - トリメチルフェニル (M e s)、2, 4, 6 - トリイソプロピルフェニル (T i p) であって、特に C ₆ H ₅ (フェニル基) などを好適に使用することができ、E ¹ は、ケイ素又はゲルマニウムのいずれかであり、特にケイ素が好ましく、n は 1 ~ 4 の整数である) が好ましい。また、R ²、R ³ 及び R ⁴ は酸素、窒素又はカルボニル基を含んでもよい同一又は異なった炭化水素鎖を示し、アミド結合を含んでもよく、例えば、炭素数 1 ~ 6 の直鎖アルキル基、アルキレン基、アルケニレン基又はアルコキシレン基 (オキシアルキレン基) などが好ましく、R ⁵ は炭化水素基を示し、メチル基などが好ましい。E ² は、炭素、ケイ素、ゲルマニウムであり、E ¹ と同一でも異なってもよく、特に、ケイ素が好ましい。また、l 及び m は l + m = 2 を満たす整数である。

【0 0 1 6】

Y は検出対象の微生物又は毒素と特異的に結合する糖鎖であり、検出対象の微生物又は毒素に応じて選択することができ、かかる選択は当業者であれば容易に行うことができる。特に限定はしないが、例えば、一般式 (I I) で示される化合物は、Y が以下の式 (I I I) の糖鎖の場合、ペロ毒素を、式 (I V) の糖鎖の場合、インフルエンザウィルスを、式 (V) の糖鎖の場合、デング熱ウィルスの検出に使用することができる。

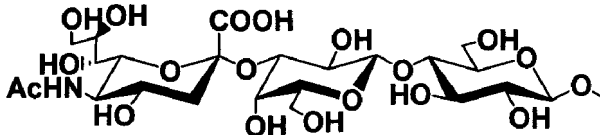
【0 0 1 7】

【化 1 2】

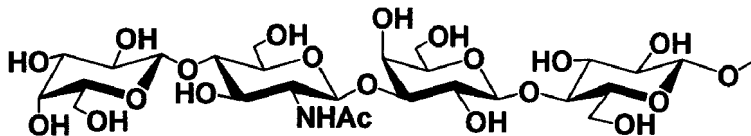


(III)

10



(IV)



(V)

20

【0018】

また、検出対象がインフルエンザウィルスの場合、トリインフルエンザウィルスのヘマグルチニンが認識する糖鎖構造であるシアリル (2-3) ラクトース (又はガラクトース) などを本発明の糖鎖として使用すればトリインフルエンザウィルスを特異的に検出することができ (例えば、WO 02 / 002588 を参照のこと)、ヒトインフルエンザウィルスのヘマグルチニンが認識する糖鎖構造であるシアリル (2-6) ラクトース (又はガラクトース) などを本発明の糖鎖として使用すればヒトインフルエンザウィルスを特異的に検出することができる (例えば、特開 2008 - 31156 を参照のこと)。

30

【0019】

一般式 (I I) 中の Y は、1 分子中の全ての Y の位置が微生物又は毒素と特異的に結合する糖鎖であることが望ましいが、必ずしも、全ての Y が上記置換基である必要はなく、例えば、水素、C=C 二重結合、水酸基などであってもよく、当該技術分野における通常の合成方法により、Y の位置に結合し得ると当業者が予測可能な如何なる置換基であってもよい。

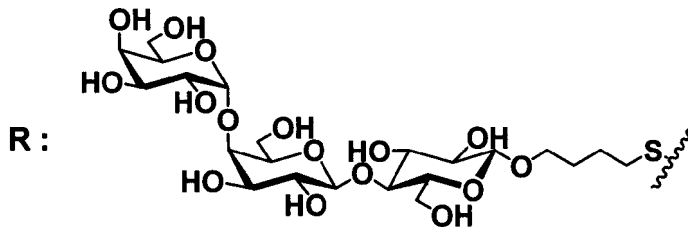
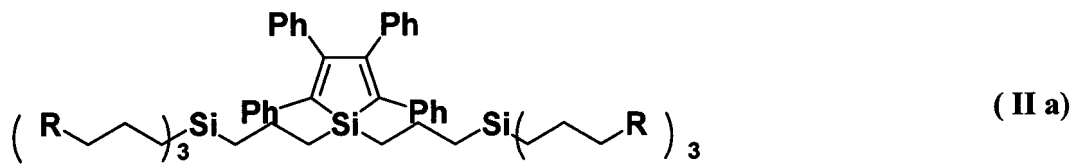
なお、ここで使用される「微生物」にはウィルスを含むものとする。

【0020】

本発明で使用される一般式 (I I) で示される化合物として、例えば、以下に示す化合物 (I I a) (シロール - ダンベル (1) 6 - G b₃) を使用することができる (合成方法の詳細については、例えば、非特許文献 7 などを参照のこと)。

40

【化 1 3】



10

【 0 0 2 1】

本発明の試薬は、本発明の「微生物又は毒素と特異的に結合する dendリマーと A I E 効果を惹起する化合物を結合させた化合物」以外にも、当業者において微生物又は毒素の検出において必要と思われる物質、又は、当該検出に対し効果的に作用する物質など、他の添加物質を含んでもよい。このような添加物質としては、限定はしないが、例えば、界面活性剤、安定化剤、防腐剤、キレート剤などを使用することができる。また、本発明の検出試薬は、本発明の「微生物又は毒素と特異的に結合する dendリマーと A I E 効果を惹起する化合物を結合させた化合物」を適当な溶媒、例えば、水溶液、有機溶媒等に溶解させた状態で提供することもできる。適切な溶媒は、当業者において容易に選択可能である。

20

【 0 0 2 2】

本発明の試薬は、「微生物又は毒素と特異的に結合する dendリマーと A I E 効果を惹起する化合物を結合させた化合物」をキットの形態で、適当な容器又はパック中に使用説明書と共に含めて提供することもできる。本発明に係る試薬がキットとして供給される場合、該試薬の構成成分を、活性構成成分の機能を低下することを回避するなどの必要に応じて、各構成成分を別々に包装してもよい。キット中に含まれる試薬は、構成成分が活性を長期間有効に持続し、構成成分を吸着せず、また、変質させない材質の容器中に供給される。また、キットに使用説明書が添付される場合、その使用説明は、紙又は他の材質上に印刷されて供給されてもよく、及び/又はフロッピー（登録商標）ディスク、C D - R O M、D V D - R O M、Z i p ディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的又は電磁的に読み取り可能な媒体として供給されてもよい。あるいは、キットの製造者によって指定され又は電子メール等で通知されるウェブサイトに掲載されていてもよい。

30

【 0 0 2 3】

本発明の他の実施形態は、「微生物又は毒素と特異的に結合する dendリマーと A I E 効果を惹起する化合物を結合させた化合物」（以下、「本発明の検出化合物」と記載する）を含んだ試薬又はキットを使用した、微生物又は毒素の検出方法である。

40

本発明の検出化合物による A I E 効果の発現は、該化合物の構造に適した溶媒環境において、発光強度が異なってくる。従って、使用する本発明の化合物の構造に応じた溶媒環境において微生物又は毒素の検出を行うことが望ましい。このような、検出環境に最も適する溶媒環境の選択は、当業者において通常の試行錯誤の範囲内の予備実験等で容易に設定することができる。例えば、本発明の検出化合物が式 (I I a) で示される化合物の場合、測定を行う溶媒中の有機溶媒に対する水の比率が約 2 0 % 以下又は約 7 0 % 以上になると、発光効率が上昇する（図 2 を参照のこと）。よって、式 (I I a) の化合物の発光

50

効率は、例えば、有機溶媒中（例えば、アセトンなど）あるいは水中において発光効率が最大になる。また、測定に使用される測定環境は、検出対象の微生物又は毒素の安定性も考慮して、塩濃度、pHなど至適な条件を選択することが望ましく、かかる選択は当業者にとって容易に行うことができる。

【0024】

式(IIa)の化合物は、適当な測定溶媒（例えば、水）中において紫外線を照射すると強く青色発光を発する。この状態に、検出対象微生物又は毒素（例えば、式(IIa)の化合物の場合には、ペロ毒素）を添加すると、式(IIa)の化合物とペロ毒素が結合することによって、式(IIa)の化合物の凝集が崩壊することでAIE効果が阻害され、青色発光が消失する。これに対し、ペロ毒素以外の式(IIa)の化合物に担持される糖鎖とは結合しない微生物又は毒素を添加した場合には、AIE効果の阻害は起こらず、青色発光には影響を与えない。従って、式(IIa)に示す化合物を本発明の検出化合物として使用する場合には、検出対象であるペロ毒素を検出環境中に添加した場合にのみ、青色発光が消失するため、ペロ毒素の存在を確認することができる。

10

以上のことは、式(IIa)以外の本発明の化合物を用いた場合にも同様に起こる現象であることから、ペロ毒素以外の微生物又は毒素を検出対象にする場合には、該検出対象に特異的に結合する糖鎖を担持した本発明の化合物を使用すれば、ペロ毒素以外の微生物又は毒素を容易に検出することができる。

本発明の化合物による発光強度は、検出対象の微生物又は毒素の量に依存して変動するため、検出対象微生物又は毒素を定量的に測定することも可能である。

20

【0025】

以下の実施例は、あくまでも例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

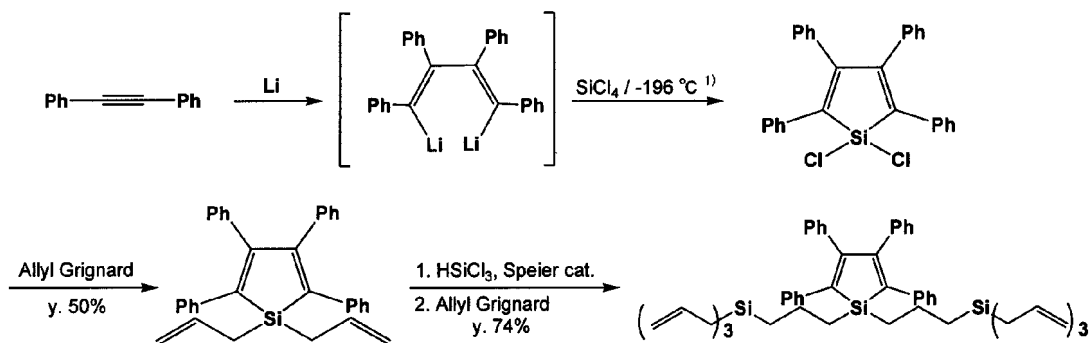
【実施例1】

【0026】

1. シロール-ダンベル(1)6-Gb₃(化合物(IIa))の合成

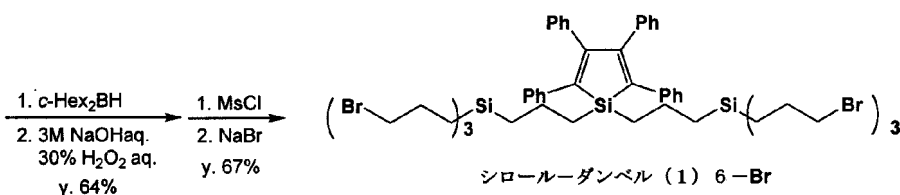
本発明の化合物の1例であるシロール-ダンベル(1)6-Gb₃の合成を下記のスキームに示す。

【化 1 4】

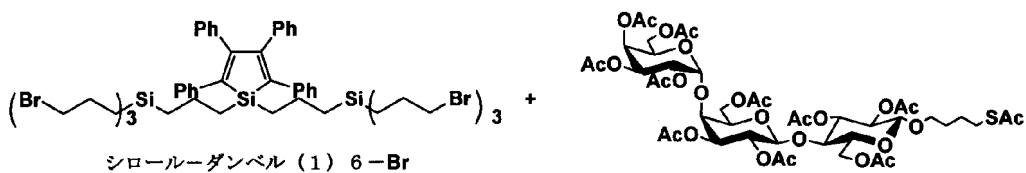


10

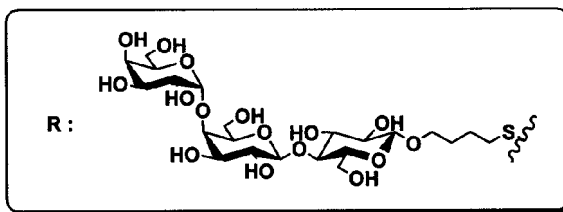
シロール-ダンベル (1) 6-オレフィン



シロール-ダンベル (1) 6-Br



シロール-ダンベル (1) 6-Gb3



J. Organomet. Chem., 1990, 391: 27を参考に、1, 1-ジクロロ-2, 3, 4, 5-テトラフェニルシロールをジフェニルアセチレン(もしくはトラン)のリチウムの還元、それによるテトラクロロシランとの環化反応により合成した。その後のカルボシランデンドリマーの世代拡張反応、末端官能基化反応、糖鎖導入反応はいずれも特許文献1と全て同じ反応条件により合成することができる。

40

このように合成したシロール-ダンベル(1) 6-Gb3がAIE効果を示すことを確認した。

【0027】

2. シロール-ダンベル(1) 6-Gb3(化合物(IIa))とペロ毒素のStx1及びStx2との接着能

ペロ毒素にはStx1とStx2の2種類の毒素があり、それぞれに対し結合親和性の測定

50

を2種類 (K_D 及び RU_{max}) ずつ行なった。いずれも、それらの値が小さいほどペロ毒素に対する接着能が高いことを示している。これによると、シロールダンベル(1)6-Gb₃の値は、ダンベル(1)6-Gb₃やボール(1)12-Gb₃のそれに比べるとやや大きな数値 (K_D 値で一桁) を示すが、ファン(0)3-Gb₃より遥かに低い値を示した。このことから、シロールダンベル(1)6-Gb₃はペロ毒素に対する接着能を有していることが分かる。

【表6】

| デンドリマー | Stx1 B-サブユニット | | Stx2 B-サブユニット | |
|------------------------------|------------------|------------|------------------|------------|
| | K_D (μ M) | RU_{max} | K_D (μ M) | RU_{max} |
| ファン(0)3-Gb ₃ | 195 | 1040 | 280 | 1070 |
| ダンベル(1)6-Gb ₃ | 0.69 | 790 | 1.3 | 1240 |
| ボール(1)12-Gb ₃ | 0.29 | 800 | 1.0 | 820 |
| シロールダンベル(1)6-Gb ₃ | 3.2 | 748 | 1 | 1697 |

【実施例2】

【0028】

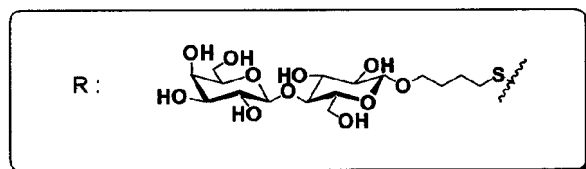
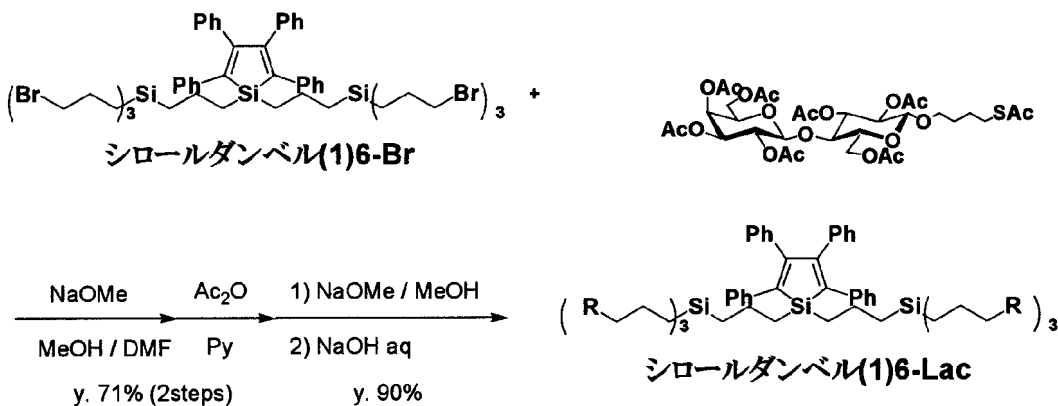
本実施例は、シロール-ダンベル(1)6-Gb₃によるAIE効果がペロ毒素の存在によって消失することを示す目的で行われたものである。安全性の面を考慮して、ペロ毒素の代わりにここではピーナツレクチン(PNAと標記する)を使用し、シロール-ダンベル(1)6-Gb₃の代わりにPNAと特異的に結合するシロール-ダンベル(1)6-Lacを使用した。なお、当該技術分野においては、糖鎖とウイルス又は毒素との相互作用を確認するにあたり、安全性の面を考慮して、その代替的実験として糖鎖とレクチンの相互作用に関し検討することは、技術常識として周知のことである。

【0029】

1. シロール-ダンベル(1)6-Lacの合成

シロール-ダンベル(1)6-Lacは、以下に示すスキームのように合成を行った。

【化15】



【0030】

10

20

30

40

50

2. シロール - ダンベル (1) 6 - L a c の A I E 効果のピーナッツレクチン (P N A) による消失 (図 3)

シロール - ダンベル (1) 6 - L a c (0 . 4 m g , $1 . 2 \times 10^{-4}$ m o l) を水 (2 m l) に溶解する。そこから 1 0 0 μ l を測り取り、水で 1 0 m l にメスアップし 1 0 0 倍希釈を行った。そのうち 3 m l を測定用セルへ入れる。そこへ P N A 溶液を 1 0 μ l 単位で加え、蛍光強度の減少がなくなるまで滴下した。滴下した P N A 溶液は P N A (0 . 7 m g , $6 . 4 \times 10^{-6}$ m o l) を水 (0 . 3 m l) に溶解したものをを用いた。測定は 5 で行った。測定時のシロール - ダンベル (1) 6 - L a c 溶液の濃度は、 $0 . 6 \times 10^{-6}$ m o l / l 、 P N A 溶液の濃度は、 $2 . 0 \times 10^{-5}$ m o l / l であった。

セル中の溶液の 4 8 0 n m 波長における蛍光強度を測定したところ、滴下する P N A 溶液の量依存的に蛍光強度が低下し (図 4 A) 、また、視覚的にも蛍光強度の低下を確認することができた (図 4 B) 。

【 0 0 3 1 】

3. シロール - ダンベル (1) 6 - L a c の A I E 効果に対する小麦胚芽レクチン (W G A) の影響

次に、シロール - ダンベル (1) 6 - L a c とは結合しない小麦胚芽レクチン (W G A) を添加した場合に、シロール - ダンベル (1) 6 - L a c による A I E 効果が影響を受けるかどうか調べた。

シロール - ダンベル (1) 6 - L a c (0 . 3 m g , $8 . 7 \times 10^{-5}$ m o l) を水 (2 m l) に溶解する。そこから 1 0 0 μ l を測り取り、水で 1 0 m l にメスアップし 1 0 0 倍希釈を行った。そのうち 3 m l を測定用セルへ入れる。そこへ W G A 溶液を 1 0 μ l 単位で加え 2 4 0 μ l まで滴下した。滴下した W G A 溶液は W G A (0 . 8 m g , $3 . 3 \times 10^{-5}$ m o l) を水 (0 . 3 m l) に溶解したものをを用いた。測定は 5 で行った。測定時のシロール - ダンベル (1) 6 - L a c 溶液の濃度は、 $0 . 4 \times 10^{-6}$ m o l / l 、 W G A 溶液の濃度は、 $1 . 1 \times 10^{-4}$ m o l / l であった。

W G A と滴下した場合には、蛍光強度の低下はほとんど見られなかった (図 5) 。

さらに、P N A 及び W G A のいずれも含まない緩衝液を滴下したところ、4 0 0 μ l 添加した時点で、ほとんど蛍光強度の減少は見られなかった (図 6) 。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 3 2 】

本発明は、病原性の微生物や毒素を迅速かつ簡便に検出することを可能にするものであり、病原菌又は病毒素等の検出技術の向上に貢献するものである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 】 デンドリマーの基本的な骨格を模式的に示した図である。

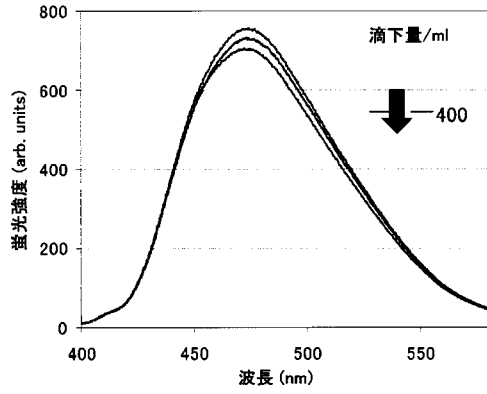
【 図 2 】 式 (I I a) で示される化合物の蛍光強度に対する溶媒の影響。有機溶媒 (アセトン) に対する水の比率を変動させて、励起波長 3 6 0 n m に対する化合物からの蛍光強度を測定した。

【 図 3 】 シロール - デンドリマーの A I E 効果に対するピーナッツレクチンの影響を測定する手順を示す。

【 図 4 】 シロール - デンドリマーの A I E 効果に対するピーナッツレクチン (P N A) の影響を測定した。A は、シロール - デンドリマー ($0 . 4 \times 10^{-6}$ m o l / l) に対し、P N A ($2 . 0 \times 10^{-5}$ m o l / l) を 0 μ l 、 1 0 μ l 、 2 0 μ l 、 3 0 μ l 及び 4 0 μ l 添加し、励起波長 3 6 0 n m で測定した蛍光強度の変化を示す。B は、シロール - デンドリマーの A I E 効果 (「 無 」 を参照) が、P N A を添加することによって消失した結果 (「 有 」 を参照) を示す。

【 図 5 】 シロール - デンドリマーの A I E 効果に対する小麦胚芽レクチン (W G A) の影響を測定した。シロール - デンドリマー ($0 . 6 \times 10^{-6}$ m o l / l) に対し、W G A ($3 . 2 \times 10^{-4}$ m o l / l) を 2 4 0 μ l まで添加し、励起波長 3 6 0 n m で測定した蛍光強度の変化を示す。

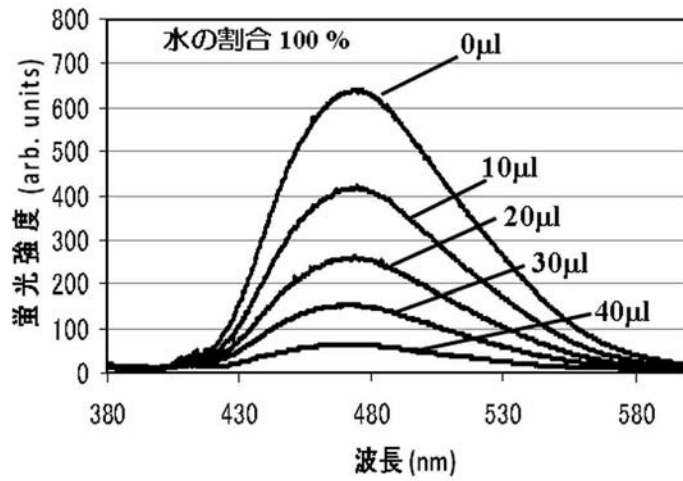
【 図 6 】



デンドリマー濃度: 0.7×10^{-6} mol/l; 励起波長: 360 nm

【 図 4 】

A



B



PNA
無 有

デンドリマー濃度: 0.4×10^{-6} mol/l; PNA 濃度: 2.0×10^{-5} mol/l; 励起波長: 360 nm

フロントページの続き

(72)発明者 照沼 大陽

埼玉県さいたま市桜区下大久保2 5 5 国立大学法人埼玉大学内

審査官 谷垣 圭二

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 6 / 0 2 4 0 5 6 5 (U S , A 1)

Ming Wang et al. , Fluorescence turn-on detection of DNA and label-free fluorescence nuclease assay based on the aggregation-induced emission of silole , Analytical Chemistry , 2 0 0 8 年 7 月 , Vol.80, No.16 , 6443-6448

Hui Tong et al. , Protein Detection and Quantitation by Tetraphenylethene-Based Fluorescent Probes with Aggregation-Induced Emission Characteristics , The Journal of Physical Chemistry B , 2 0 0 7 年 , Vol.111, No.40 , 11817-11823

Hui Tong et al. , Fluorescent "light-up" bioprobes based on tetraphenylethylene derivatives with aggregation-induced emission characteristics , Chemical Communications , 2 0 0 6 年 , 3705-3707

Jingdong Luo et al. , Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole , Chemical Communications , 2 0 0 1 年 , 1740-1741

Cangel Pui-yee Chan et al. , Silolenanocrystals as novel biolabels , Journal of immunological Methods , 2 0 0 4 年 1 2 月 , Vol.295 , 111-118

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 2 1 / 7 8

C 0 7 F 7 / 0 8

G 0 1 N 2 1 / 7 7

G 0 1 N 3 3 / 5 6 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)