

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年5月23日(23.05.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/097698 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 49/00 (2006.01) *C01B 32/174* (2017.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/041565

(22) 国際出願日: 2017年11月17日(17.11.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

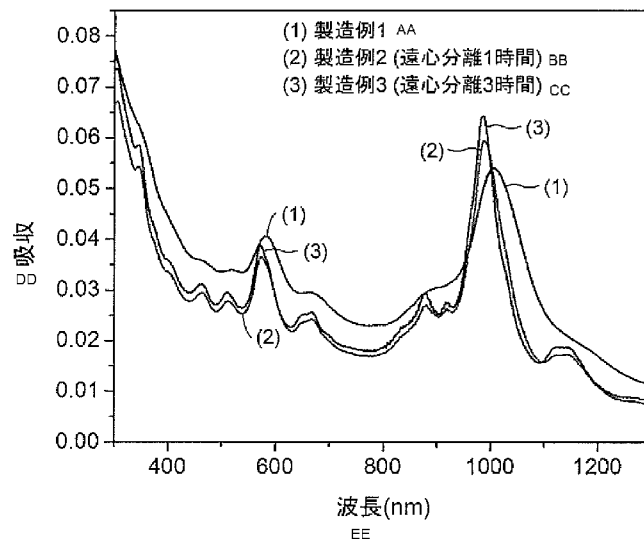
(71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP). 国立研究開発法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)

[JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 竹内 司 (TAKEUCHI Tsukasa); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 岡崎 俊也 (OKAZAKI Toshiya); 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 飯泉 陽子 (IIZUMI Yoko); 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 片浦 弘道 (KATAURA Hiromichi); 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 湯田 雅子 (YUDASAKA Masako); 〒3058565 茨城

(54) Title: SEMICONDUCTOR SWCNT DISPERSION FLUID FOR BIOIMAGING AND INSPECTION METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: 生体イメージング用半導体SWCNT分散液及びその検査方法



AA Production example 1
BB Production example 2 (one hour centrifugation)
CC Production example 3 (three hours centrifugation)
DD Absorption
EE Wavelength (nm)

(57) Abstract: The present invention addresses the issue of providing: an inspection method whereby a dispersion fluid from a lot exhibiting abnormal accumulation can be determined beforehand; and a SWCNT dispersion fluid for bioimaging, that has received said inspection. In order to solve this issue, this inspection method is for semiconductor SWCNT dispersion fluid for bioimaging that includes: semiconductor single-walled carbon nanotubes oxidized by direct ultraviolet irradiation in the atmosphere; and a dispersant comprising an amphiphilic substance that coats the surface of the semi-

県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 5 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー 3 2 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

conductor single-walled carbon nanotubes. The inspection method is characterized by using at least two types of method selected from the group consisting of absorption spectroscopy, photoluminescence, and particle size measurement and confirming that: the average particle diameter of the semiconductor single-walled carbon nanotubes is smaller than 10 nm; that the isolated dispersibility of the semiconductor single-walled carbon nanotubes is high; and/or that the semiconductor single-walled carbon nanotubes have been oxidized.

(57) 要約: 異常な集積を呈するロットの分散液を、事前に判定することができる検査方法、及び当該検査を受けた生体イメージング用 SWCNT 分散液を提供することを目的とする。上記課題を解決するため、本発明は、大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体単層カーボンナノチューブと、前記半導体単層カーボンナノチューブの表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤とを含む生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液の検査方法であって、吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定からなる群から選択される少なくとも 2 種類の方法を用いて、前記半導体単層カーボンナノチューブの平均粒子径が 10 nm より小さいこと、前記半導体単層カーボンナノチューブの孤立分散性が高いこと、及び／又は前記半導体単層カーボンナノチューブが酸化されていることを確認することの特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

生体イメージング用半導体SWCNT分散液及びその検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体イメージング用半導体単層カーボンナノチューブ（SWCNT）分散液及びその検査方法に関する。

背景技術

[0002] カーボンナノチューブ（以下、CNTともいう）は、炭素原子が平面的に六角形状に配置されて構成された炭素シート（いわゆる、グラファイトからなるシート）が円筒状に閉じた構造を有する炭素構造体である。このCNTには、多層のもの及び単層のものがあるが、単層CNT（以下、SWCNTともいう）の電子物性は、その巻き方（直径や螺旋度）に依存して、金属的性質又は半導体的性質を示すことが知られている。

[0003] 半導体SWCNTは、生体透過性の良い近赤外領域（800～2000 nm）で光吸収及び発光することから、細胞や生体の機能を検出する蛍光プローブとして有用なものであると期待されている。特に、1200～1400 nmの波長領域は、最も生体透過性が良い領域である。

[0004] その半導体SWCNTに酸素原子や官能基を導入することによって、発光波長を変化させることができる。例えば、SWCNTを界面活性剤で分散した水溶液にオゾンを追加した水を混合し、光を照射しながら化学反応させることによって、ナノチューブ壁中の炭素を一部酸素原子に置き換える技術が知られている（非特許文献1及び2）。このようにして酸素原子を導入した場合、ほとんどの酸素原子はSWCNTの壁にエーテル結合し、SWCNTの発光エネルギーは元の発光エネルギーよりも約150 meV小さくなる。このような化学修飾には、SWCNTの発光量子収率を増加するという利点もある。

[0005] しかし、非特許文献1及び2で報告されている発光波長の長波長化では、

現在最も研究されているSWCNTの一つであるカイラル指数(6, 5)を有するSWCNTに対して、その発光波長は、近赤外蛍光プローブとして最も好ましいとされている約1300nm~1400nmより短い、約1140nm(約1.088eV)にピークを有するものが主な生成物であった。

[0006] これに対し、特許文献1には、大気中で半導体単層カーボンナノチューブに直接紫外線を照射することにより、オゾンが発生させて半導体単層カーボンナノチューブを酸化処理することを特徴とする近赤外発光する半導体単層カーボンナノチューブの製造方法が開示されている。

[0007] 上記特許文献1によれば、グラム量のSWCNTに対し短時間で簡便に酸素原子を導入することができ、また、その発光波長のピークを980nm(1.265eV)から 1280 ± 13 nm(0.9686 ± 0.01 eV)に変化させることができる。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2016/117633号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ghosh et al., Science, 330, 1656-1659 (2010).

非特許文献2：Miyauchi et al., Nat. Photonics, 7, 715-719 (2013).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] しかし、上記特許文献1に記載の方法によって製造された半導体SWCNTを用いて、生体(マウス)に投与するための生体イメージング用分散液(生体用プローブ)を調製する場合、ロット単位で品質にばらつきを生じ、一定の性能が得られないという問題があった。例えば、ロットによって半導体SWCNTの分散が不十分であると、短時間で特定の部位(特に、肝臓)に集積してしまい、その他の領域での蛍光分布を検出することができず、また、半導体SWCNTが生体内で凝集することにより肺等に詰まり死に至るリ

スクがあるという問題があった。それゆえ、ロット単位での品質のばらつきの程度を、生体への投与前、好ましくは出荷前に判定する必要があった。

[0011] そこで本発明は、上記の状況に鑑み、異常な集積を呈するものや、所定の波長域で発光しない等、一定の性能が得られていないロットの分散液を、事前に判定することができる検査方法、及び当該検査を受けた生体イメージング用SWCNT分散液を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らが鋭意検討を行った結果、生体イメージング用SWCNT分散液を評価する際に、一つの方法でSWCNTの特性を測定しても、肝臓への集積性が認められる分散液を排除できないが、特定の分析方法を複数組み合わせることで、異常な集積を呈するロットの分散液であるか否かを判定可能になることを見出した。すなわち、本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体単層カーボンナノチューブと、前記半導体単層カーボンナノチューブの表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤とを含む半導体SWCNT分散液について、

吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定からなる群から選択される少なくとも2種類の方法を用いて、前記半導体単層カーボンナノチューブの平均粒子径が10nmより小さいこと、前記半導体単層カーボンナノチューブの孤立分散性が高いこと、及び／又は前記半導体単層カーボンナノチューブが酸化されていることが確認された前記半導体SWCNT分散液のみから構成される、生体イメージング用半導体SWCNT分散液。

(2) 前記粒子径測定が、遠心沈降法による測定である上記(1)に記載の生体イメージング用半導体SWCNT分散液。

(3) 大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体単層カーボンナノチューブと、前記半導体単層カーボンナノチューブの表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤とを含む生体イメージング用半

導体SWCNT分散液の検査方法であって、

吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定からなる群から選択される少なくとも2種類の方法を用いて、前記半導体単層カーボンナノチューブの平均粒子径が10nmより小さいこと、前記半導体単層カーボンナノチューブの孤立分散性が高いこと、及び／又は前記半導体単層カーボンナノチューブが酸化されていることを確認する、生体イメージング用半導体SWCNT分散液の検査方法。

(4) 前記粒子径測定が、遠心沈降法による測定である上記(3)に記載の生体イメージング用半導体SWCNT分散液の検査方法。

発明の効果

[0013] 本発明の検査方法によれば、吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定のうち2種以上の方法を用いることで、異常な集積を呈するものや所定の波長領域で発光しない等、一定の性能が得られていないロットの分散液であるか否かを事前に判定することができ、所望の生体イメージング用SWCNT分散液を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]製造例1～3の生体イメージング用半導体SWCNT分散液の吸収スペクトルを示す図である。

[図2]製造例1～3の生体イメージング用半導体SWCNT分散液の発光スペクトルを示す図である。

[図3]製造例1～3の生体イメージング用半導体SWCNT分散液における半導体SWCNTの粒子径分布を示す図である。

[図4]製造例3のin vivoイメージングを示す図である。

[図5]製造例1のin vivoイメージングを示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0016] 本発明に係る方法の検査対象である生体イメージング用半導体SWCNT分散液は、大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体

SWCNTと、その半導体SWCNTの表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤とを含む。

[0017] 大気中で直接紫外線を照射することにより、オゾンが発生させ、半導体SWCNTに酸素原子が導入される。大気中で直接紫外線を照射して得られる半導体SWCNTは、発光エネルギーを $296 \pm 10 \text{ meV}$ 低エネルギー側にシフトすることができ、特に、カイラル指数(6, 5)を持つSWCNTに適用すると、その発光波長のピークは約 980 nm から $1280 \pm 13 \text{ nm}$ へと変化し、近赤外蛍光プローブとして好ましい、生体透過性を有する波長領域に発光波長のピークを有するものとなる。

[0018] 紫外線を照射することによる酸化処理について、上述の非特許文献1及び2等の従来の湿式による方法(SWCNTを水溶液中で反応させる方法)では、ほとんどの酸素はSWCNTとエーテル結合するために 290 meV を超える低エネルギーシフトは困難であった。これに対し、本発明の評価対象である半導体SWCNTでは、大気中で直接紫外線を照射することにより、導入された酸素原子はほとんどがエポキシドとしてSWCNTに導入され、これによってSWCNTの発光エネルギーを $296 \pm 10 \text{ meV}$ 低エネルギー側にシフトさせることが可能となる。

[0019] 半導体SWCNTの合成方法は特に限定されず、公知の化学気相成長法、アーク放電法、レーザー蒸発法等の方法を用いて適宜合成することができる。特に、触媒の存在下、化学気相成長法によって合成することが好ましい。

[0020] 分散液における半導体SWCNTの平均粒子径は、 10 nm より小さいことが好ましく、好ましくは、 6 nm 以上 10 nm 未満の範囲内である。平均粒子径が 10 nm より小さい微小な半導体SWCNTは、肺の血管等を閉塞することがなく、毒性が低い。ここで、半導体SWCNTの平均粒子径とは、遠心沈降法によって測定される、重量基準の粒度分布における平均径をいう。

[0021] 大気中で直接紫外線を照射してオゾンが発生させる際には、密閉された空間内で行うことが好ましく、例えばUVオゾンクリーナ等の、紫外線を大気

に照射することによってオゾンを発生させる装置が好ましく用いられる。また、紫外線の照射条件は、用いる装置によって異なるが、照射により半導体 SWCNT が破壊されない条件下で行うことが好ましい。

[0022] また、大気中で半導体 SWCNT に直接紫外線を照射するために、予め基材上に半導体 SWCNT を膜状に形成しておくことが好ましく、特に、酸素原子が導入される半導体 SWCNT に均一に化学反応を起こすために、半導体 SWCNT を厚さ 1 μm 程度の薄膜状にした状態で紫外線を照射することが好ましい。

[0023] 半導体 SWCNT の表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤としては、特に限定されるものではなく、生体に対して毒性が小さく、半導体 SWCNT との親和性に優れるものであれば適宜用いることができる。具体的には、疎水性の脂質部位に親水性の PEG が結合してなるポリエチレングリコール脂質誘導体、核酸、ウシ血清アルブミン等を挙げることができる。特に、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) 等のポリエチレングリコール脂質誘導体が好ましく用いられる。

[0024] DSPE-PEG₂₀₀₀等の分散剤によって半導体 SWCNT の表面をコーティングすることにより、半導体 SWCNT の分散状態が維持され、半導体 SWCNT の粒子径が微小であることと相まって、半導体 SWCNT が特定の臓器に集積することなく、また、肺の血管等を閉塞することがない。

[0025] 酸化処理された半導体 SWCNT と、両親媒性物質からなる分散剤との重量割合は、半導体 SWCNT の表面が十分にコーティングされ、分散状態が維持できればよく特に限定されるものではないが、酸化処理された半導体 SWCNT : 分散剤の重量比が、1 : 2 ~ 1 : 20 の範囲内であることが好ましい。

[0026] 以上のような生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液を製造するに際しては、種々の方法を採用することができるが、まず、上述のように大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体 SWCNT を、表

面を分散剤でコーティングする前に、界面活性剤の溶液中に分散させることが好ましい。

[0027] ここで、界面活性剤としては、半導体SWCNTを分散できるものであれば良く、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性イオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤等の公知の各種界面活性剤から適宜選択して用いることができる。

[0028] 陰イオン界面活性剤としては、例えば、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、アルキルスルホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸塩、アルキル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルリン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸塩、コール酸塩、デオキシコール酸塩、グリココール酸塩、タウロコール酸塩、タウロデオキシコール酸塩等を挙げることができる。

[0029] また、陽イオン界面活性剤としては、例えば、テトラアルキルアンモニウム塩、トリアルキルベンジルアンモニウム塩、アルキルピリジウム塩等を挙げることができる。

[0030] 両性イオン界面活性剤としては、例えば、2-メタクロイルオキシホスホリルコリンのポリマーやポリペプチド等の両性イオン高分子、3-(N,N-ジメチルステアリルアンモニオ)-プロパンスルホネート、3-(N,N-ジメチルステアリルアンモニオ)プロパンスルホネート、3-(N,N-ジメチルミリスチルアンモニオ)プロパンスルホネート、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルフォネート(CHAPS)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシプロパンスルホネート(CHAPSO)、n-ドデシル-N,N'-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、n-ヘキサデシル-N,N'-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、n-オクタデシルホスホコリン、n-ドデシルホスホコリン、n-テトラデシルホスホコリン、n-ヘキサデシルホスホコリン、ジメチルアルキルベタイン、パーフルオロアルキルベタイン及びN,N-ビス(3-D-グルコナミドプロピル

）ーコラミド、レシチン等を挙げることができる。

[0031] さらに、非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン多価アルコール脂肪酸部分エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル等を挙げることができる。

[0032] 特に、半導体SWCNTの分散性に優れることから、ラウリルベンゼン硫酸ナトリウム（SDBS）等のアルキルベンゼンスルホン酸塩が好ましく用いられる。

[0033] 半導体SWCNTを、界面活性剤の溶液中に分散させる方法としては、各種ホモジナイザー等を用いて行うことができる。

[0034] 得られた分散液は、必要に応じて、遠心分離を行い、上澄みを回収することにより、半導体SWCNTの孤立分散性を高めることができる。孤立分散の半導体単層SWCNTは、生体に投与した場合に、蛍光量子収率の向上、ステルス性の向上、クリアランスの向上という利点があるため好ましい。

[0035] 続いて、半導体SWCNTを界面活性剤の溶液中に分散させた分散液に、上述のポリエチレングリコール脂質誘導体等の両親媒性物質からなる分散剤を溶解させ、その後、得られた溶液から透析によって界面活性剤を除去することにより、半導体SWCNTの周囲に存在していた界面活性剤をポリエチレングリコール脂質誘導体等の分散剤によって置換し、半導体SWCNTの表面を分散剤によって十分にコーティングすることができる。

[0036] 表面が分散剤でコーティングされた半導体SWCNTは、生体イメージング用半導体SWCNT分散液として、生体に投与した場合に、分散状態が維持されるため、半導体SWCNT自体の粒子径が微小であることと相まって、特定の臓器（主に、肝臓）に集積せず、ハレーションを低減することができる。また、肺の血管等を閉塞することがなく、SDBS等の界面活性剤が透析により除去されているため毒性が極めて低い。また、良好に分散することで、凝集性が低下し、発光する蛍光の光量低下を防ぐことができる。

[0037] 以上のような生体イメージング用半導体SWCNT分散液を検査するに際

し、本発明では、吸光分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定からなる群から選択される少なくとも2種類の方法を用いて行う。

[0038] ここで、吸光分光法は、赤外線、可視、紫外線等を用いる方法を採用することができる。これにより、分散液中のSWCNT濃度及び分散状態を評価することができる。

[0039] また、フォトルミネッセンス法（PL法）として、光源、ステージ及び検出器等の測定系はそれぞれ一般的な構成を用いることができるが、半導体SWCNTが酸化され、生体透過性が良い1200～1400nmの波長領域において発光することを確認するため、励起波長は400nm～1000nmの範囲内（例えば980nm）とし、近赤外領域の発光を検出することが好ましい。

[0040] さらに、粒子径測定の方法としては、画像解析法、遠心沈降法、レーザー回折散乱法等の方法を適宜採用することができる。特に、重量基準の粒子径分布が得られる遠心沈降法により粒子径を測定することが好ましい。これにより、半導体SWCNTの平均粒子径が肺の血管等を閉塞しない10μmより小さいか否か、孤立分散性が高いか否か、さらに、半導体SWCNTの粒子径分布のうち10nmより小さいものの割合を評価することができる。

[0041] 生体イメージング用半導体SWCNT分散液は、生体に投与された場合に、凝集せず、特定の臓器以外の領域でも蛍光が観測できること、且つ蛍光の光量が大きいたことが重要である。このような生体イメージング用分散液に特有の性能を評価するためには、吸光分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定のいずれか一つの方法では不適當であり、少なくとも2種類を組み合わせることで総合的に評価する必要がある。好ましくは、粒子径測定と、吸光分光法及び／又はフォトルミネッセンス法とを組み合わせることが好ましい。これにより、生体イメージング用SWCNT分散液を、品質がばらつくことなく良好な性能を維持した状態で提供することができる。

実施例

[0042] 以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら

の実施例に限定されるものではない。

(製造例 1)

カーボンナノチューブ (C o M o C A T SG65 i、平均直径 0.8 nm、以下「半導体 SWCNT」という) 1 mg をエタノール 10 ml に加え、バスソニケーションに 5 分ほどかけて半導体 SWCNT をエタノールに分散させた。続いて、減圧濾過器にオムニポアメンブレン (ϕ 47 mm、5 μ m ポアをセットし、半導体 SWCNT / エタノール分散液を入れてろ過し、フィルター上に半導体 SWCNT を均一に載せた。次に、半導体 SWCNT をフィルターに載せたまま薬包紙で挟み、フィルターが丸まらないよう軽く重石をしながら 60°C で 30 分乾燥させた。そして、フィルターに載せた半導体 SWCNT をフィルターごと 60 ~ 70 秒オゾン処理した (光源は水銀ランプ、半導体 SWCNT 上での紫外線強度は約 19 mW / cm²)。

[0043] オゾン処理を行った後、半導体 SWCNT をフィルターごと 10 ml の 0.3% ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀) 水溶液に入れ、チップ型ホモジナイザーで氷冷しながら 20 分間 (ON : OFF = 1 秒 : 1 秒) 超音波破碎し、半導体 SWCNT を DSPE-PEG₂₀₀₀ 水溶液中に分散させた。続いて、フィルターを取り除いた半導体 SWCNT 分散溶液を超遠心分離機 (104,000 g、3 時間) にかけて、上澄みを回収し、生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液を製造した。

(製造例 2)

カーボンナノチューブ (C o M o C A T SG65 i、平均直径 0.8 nm、以下「半導体 SWCNT」という) 1 mg をエタノール 10 ml に加え、バスソニケーションに 5 分ほどかけて半導体 SWCNT をエタノールに分散させた。続いて、減圧濾過器にオムニポアメンブレン (ϕ 47 mm、5 μ m ポアをセットし、半導体 SWCNT / エタノール分散液を入れてろ過し、フィルター上に半導体 SWCNT を均一に載せた。次に、半導体 SWCNT をフィルターに載せたまま薬包紙で挟み、フィルターが丸まらないよう軽く

重石をしながら60℃で30分乾燥させた。そして、フィルターに載せた半導体SWCNTをフィルターごと60～70秒オゾン処理した（光源は水銀ランプ、半導体SWCNT上での紫外線強度は約19mW/cm²）。

[0044] オゾン処理を行った後、半導体SWCNTをフィルターごと10mlの1%SDBS-H₂Oに入れ、チップ型ホモジナイザーで氷冷しながら20分間（ON:OFF=1秒:1秒）超音波破碎し、半導体SWCNTをSDBS溶液中に分散させた。続いて、フィルターを取り除いた半導体SWCNT分散溶液を超遠心分離機（104,000g、1時間）にかけ、上澄みを回収し、半導体SWCNT孤立分散液を得た。

[0045] 半導体SWCNT孤立分散液に、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG2000（DSPE-PEG₂₀₀₀）を3mg/mlになるよう添加し、バスソニケーションに5分ほどかけて、DSPE-PEG₂₀₀₀の粉末を溶解させた。そして、透析膜（Spectrum、G235070）にこの溶液を入れ、2リットルの水で透析を行った。この過程で、SDBSがDSPE-PEG₂₀₀₀に置換される。

[0046] 2時間後、透析外液を分析用に5ml採取した後に捨て、水と交換した。同様に、1晩後、2日後、3日後に水を交換し、それぞれ分析用にとっておいた透析外液の吸収スペクトルを測定して透析率を計算し、95%以上のSDBSの溶出が確認できたところで、透析を終了し、目的の生体イメージング用半導体SWCNT分散液を製造した。

（製造例3）

カーボンナノチューブ（COMOCAT SG65i、平均直径0.8nm、以下「半導体SWCNT」という）1mgをエタノール10mlに加え、バスソニケーションに5分ほどかけて半導体SWCNTをエタノールに分散させた。続いて、減圧濾過器にオムニポアメンブレン（φ47mm、5μmポアをセットし、半導体SWCNT/エタノール分散液を入れてろ過し、フィルター上に半導体SWCNTを均一に載せた。次に、半導体SWCNTをフィルターに載せたまま葉包紙で挟み、フィルターが丸まらないよう軽く

重石をしながら60℃で30分乾燥させた。そして、フィルターに載せた半導体SWCNTをフィルターごと60～70秒オゾン処理した（光源は水銀ランプ、半導体SWCNT上での紫外線強度は約19mW/cm²）。

[0047] オゾン処理を行った後、半導体SWCNTをフィルターごと10mlの1%SDBS-H₂Oに入れ、チップ型ホモジナイザーで氷冷しながら20分間（ON:OFF=1秒:1秒）超音波破碎し、半導体SWCNTをSDBS溶液中に分散させた。続いて、フィルターを取り除いた半導体SWCNT分散溶液を超遠心分離機（104,000g、3時間）にかけ、上澄みを回収し、半導体SWCNT孤立分散液を得た。

[0048] 半導体SWCNT孤立分散液に、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン-PEG2000（DSPE-PEG₂₀₀₀）を3mg/mlになるよう添加し、バスソニケーションに5分ほどかけて、DSPE-PEG₂₀₀₀の粉末を溶解させた。そして、透析膜（Spectrum、G235070）にこの溶液を入れ、2リットルの水で透析を行った。この過程で、SDBSがDSPE-PEG₂₀₀₀に置換される。

[0049] 2時間後、透析外液を分析用に5ml採取した後に捨て、水と交換した。同様に、1晩後、2日後、3日後に水を交換し、それぞれ分析用にとっておいた透析外液の吸収スペクトルを測定して透析率を計算し、95%以上のSDBSの溶出が確認できたところで、透析を終了し、目的の生体イメージング用半導体SWCNT分散液を製造した。

（吸収分光法及びフォトルミネッセンス法による測定）

製造例1～3で得られた生体イメージング用半導体SWCNT分散液について、島津製作所紫外可視近赤外分光光度計UV-3100を用い、吸収スペクトルを測定した。また、980nmを励起波長として、堀場製作所Fluorolog-3-2-iHR320を用いて発光スペクトルを測定した。測定結果をそれぞれ図1及び図2に示す。なお、図1及び図2における吸光度及び発光強度は、分散液の濃度を規格化している。

[0050] 図1に示すように、570nm、980nmに吸収ピークが存在し、遠心

分離を施すことにより線幅が減少していることから孤立分散している SWCNT の割合が大きくなっていることがわかる。また、図 2 の発光スペクトルにおける約 1300 nm のショルダーから、大気中での紫外線の直接照射により半導体単層カーボンナノチューブが酸化処理され、特に、酸素原子がエポキシドとして導入されていることが示唆された。

[0051] また、図 2 に示すように、半導体 SWCNT を界面活性剤 (SDBS) の溶液中に分散させる工程を経た製造例 2 及び 3 の半導体 SWCNT 分散液は、当該工程を経ないで直接 DSPE-PEG₂₀₀₀中に分散させた製造例 1 の半導体 SWCNT 分散液に比べて、高い発光強度が得られた。この結果は、製造例 2 及び 3 では、製造例 1 に比べ半導体 SWCNT の表面が DSPE-PEG₂₀₀₀によって十分にコーティングされ、半導体 SWCNT が凝集せず、より孤立分散性が高まったことによって発光量子効率が向上したためと考えられる。

[0052] なお、図 1 に示すように、製造例 1 に比べて、製造例 2 及び 3 の吸収波長は低波長側にシフトしていた。これは、バンドル状の SWCNT に対し、孤立分散状態である SWCNT の割合が高まったためと推測される。

(粒子径測定)

製造例 1～3 で得られた生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液について、CPS 社製ディスク遠心式粒子径分布測定装置 DC24000UHR を用い、遠心沈降法による粒子径測定を行った。その結果を図 3 に示す。図 3 の結果から、製造例 1～3 の生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液における半導体 SWCNT の平均粒子径はそれぞれ、8 nm、10 nm、及び 6.5 nm であった。また、それぞれの生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液における粒子径が 10 nm より小さいものの割合はそれぞれ 44%、30%、84% であった。遠心分離を 1 時間行った製造例 2 に比べて、遠心分離を 3 時間行った製造例 3 における半導体 SWCNT は、より孤立分散であることが確認された。

(in vivo イメージング)

製造例3及び製造例1で得られた生体イメージング用半導体SWCNT分散液を、SWCNT濃度が $200\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように0.3%のDSPE-PEG2000溶液で調製した後、0.1mlマウスに投与し、0～6時間後の蛍光を島津製作所SAI-1000装置を用いて観察した。その結果を図4（製造例3）及び図5（製造例1）に示す。

[0053] 図4及び図5に示すように、製造例1の半導体SWCNT分散液は肝臓への集積が認められたが、製造例3の半導体SWCNT分散液は、投与後の時間が経過しても肝臓への集積は認められず、ハレーションを低減できることが明らかとなった。製造例2（図示せず）も製造例1と同様の傾向を示した。これは、製造例1では、半導体SWCNTを界面活性剤（SDBS）の溶液中に分散させる工程を経ないため、孤立分散性が低く、DSPE-PEG₂₀₀₀によるコーティングが不十分であり、半導体SWCNTが良好に分散せず一部凝集したためと考えられる。

[0054] 製造例3の分散液は、吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定の方法で測定した結果、いずれも、（1）半導体SWCNTの平均粒子径が10nmより小さいと判定され、（2）半導体SWCNTの孤立分散性が高いと判定され、且つ、（3）半導体SWCNTが酸化されているものと判定された。

[0055] 一方、製造例1の場合は、上記（1）～（3）がいずれも満たされなかった。

[0056] 以上から、本発明に係る検査方法が、異常な集積を呈し、所望の波長領域で発光しない製造例（ロット）の分散剤であるかどうかを判定する方法として有効であるといえる。

[0057] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体単層カーボンナノチューブと、前記半導体単層カーボンナノチューブの表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤とを含む半導体 SWCNT 分散液について、

吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定からなる群から選択される少なくとも2種類の方法を用いて、前記半導体単層カーボンナノチューブの平均粒子径が10nmより小さいこと、前記半導体単層カーボンナノチューブの孤立分散性が高いこと、及び／又は前記半導体単層カーボンナノチューブが酸化されていることが確認された前記半導体 SWCNT 分散液のみから構成される、生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液。

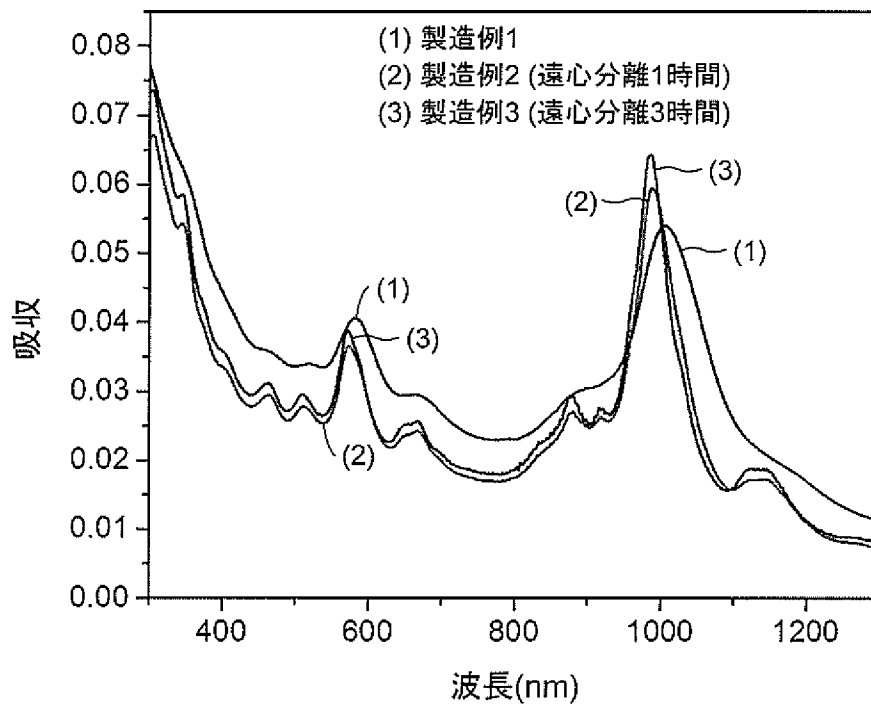
[請求項2] 前記粒子径測定が、遠心沈降法による測定である請求項1に記載の生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液。

[請求項3] 大気中で直接紫外線を照射することにより酸化処理された半導体単層カーボンナノチューブと、前記半導体単層カーボンナノチューブの表面をコーティングする両親媒性物質からなる分散剤とを含む生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液の検査方法であって、

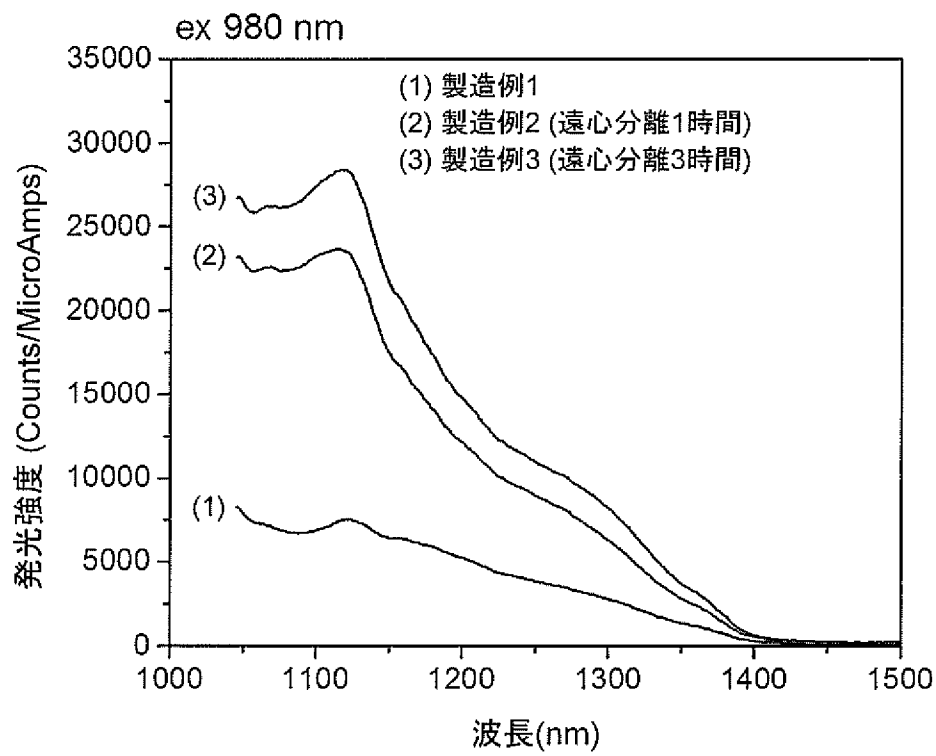
吸収分光法、フォトルミネッセンス法及び粒子径測定からなる群から選択される少なくとも2種類の方法を用いて、前記半導体単層カーボンナノチューブの平均粒子径が10nmより小さいこと、前記半導体単層カーボンナノチューブの孤立分散性が高いこと、及び／又は前記半導体単層カーボンナノチューブが酸化されていることを確認する、生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液の検査方法。

[請求項4] 前記粒子径測定が、遠心沈降法による測定である請求項3に記載の生体イメージング用半導体 SWCNT 分散液の検査方法。

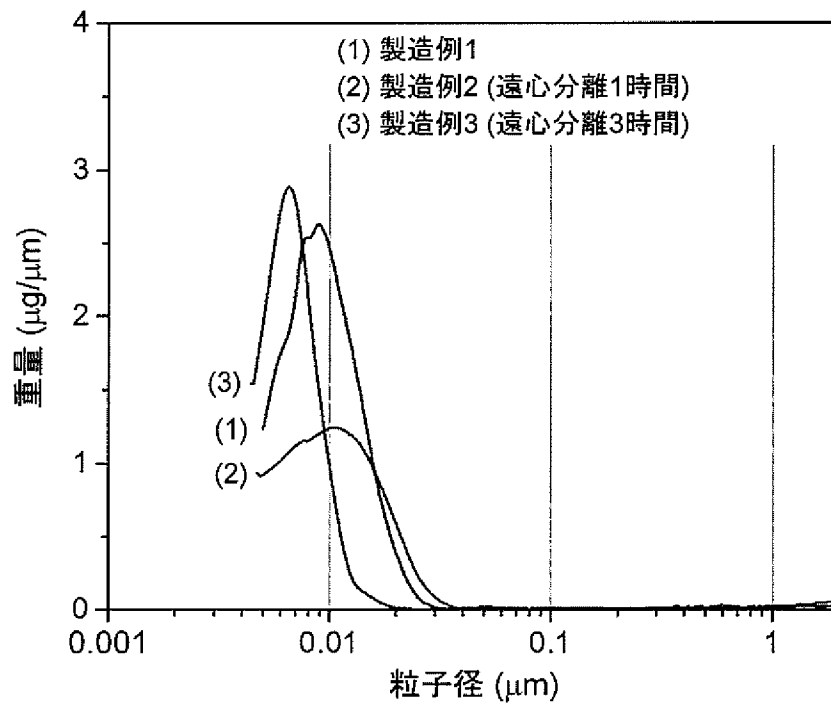
[図1]



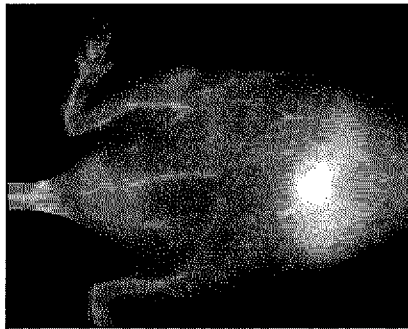
[図2]



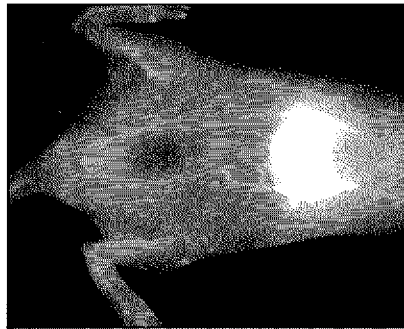
[図3]



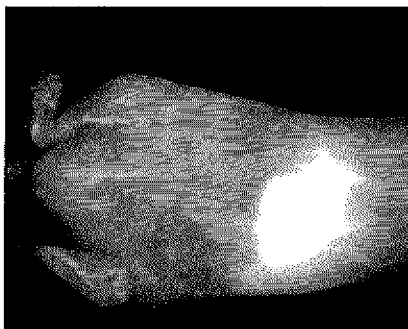
[図4]



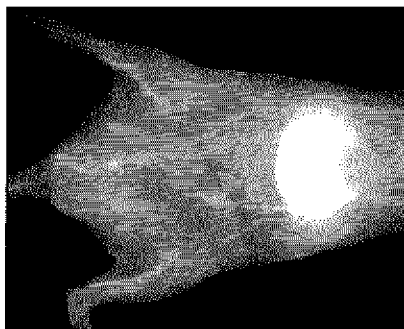
0時間



1時間



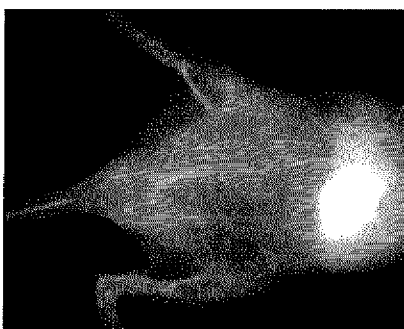
2時間



3時間



4時間

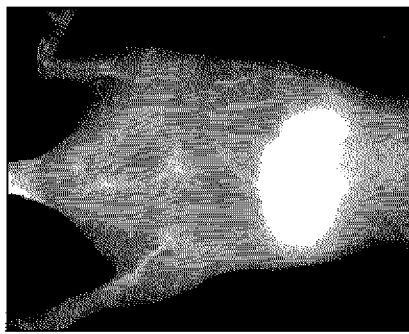


5時間

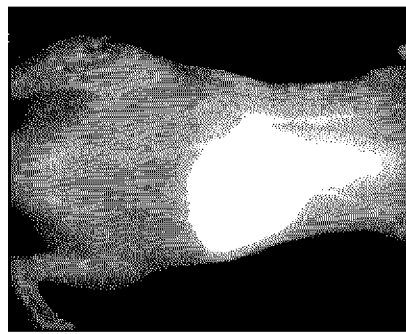


6時間

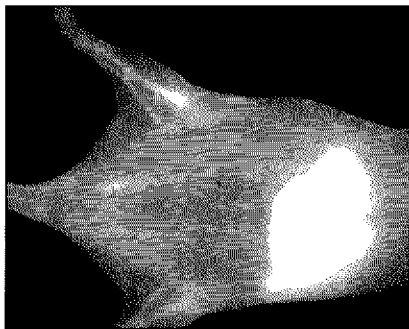
[図5]



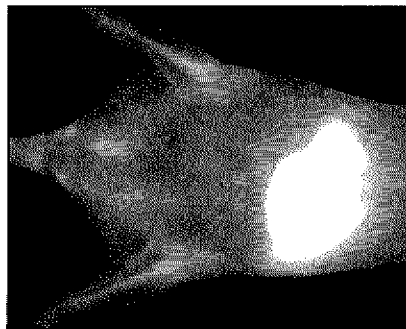
0時間



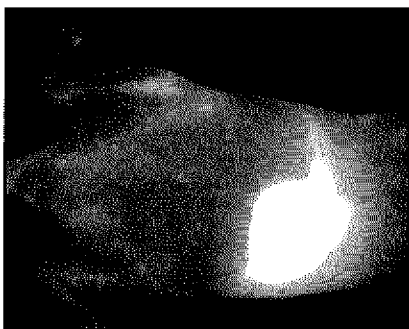
1時間



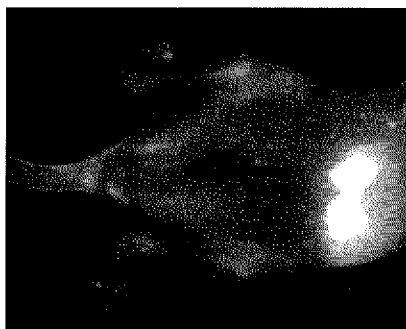
2時間



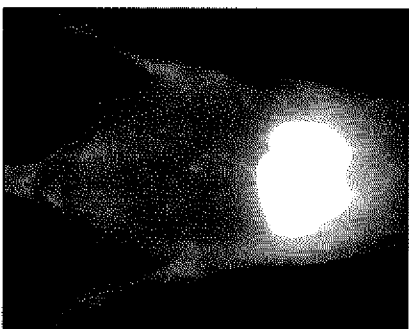
3時間



4時間



5時間



6時間

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/041565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A61K49/00 (2006.01) i, B82Y5/00 (2011.01) i, C01B32/174 (2017.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. A61K49/00, B82Y5/00, C01B32/174

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2017

Registered utility model specifications of Japan 1996-2017

Published registered utility model applications of Japan 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	梅澤雅和他, カーボンナノチューブの近赤外蛍光を用いたマウス気	1-4
Y	道イメージング, バイオイメージング, 2016, vol. 25, no. 2, page 123, entire text, entire text, non-official translation (UMEZAWA, Masakazu et al. Mouse Windpipe Imaging Using Carbon Nanotube Near-infrared Fluorescence. Bioimaging,)	1-4
Y	JP 2006-182657 A (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 13 July 2006, claims, paragraph [0027] & US 2008/0152593 A1, claims, paragraph [0032] & WO 2006/068294 A1	1-4
A	JP 2016-537644 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 01 December 2016 & US 2015/0133752 A1 & WO 2015/039121 A1 & EP 3039410 A1 & CN 106415246	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21.12.2017Date of mailing of the international search report
09.01.2018Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/041565

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2017-066098 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 April 2017 (Family: none)	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K49/00(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, C01B32/174(2017.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K49/00, B82Y5/00, C01B32/174

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	梅澤雅和他, カーボンナノチューブの近赤外蛍光を用いたマウス気	1-4
Y	道イメージング, バイオイメージング, 2016, 第25巻第2号, 1	1-4
	23ページ, 全文	
Y	JP 2006-182657 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2006.07.13, 特許請求の範囲、【0027】 & US 2008/0152593 A1, クレーム, [0032] & WO 2006/068294 A1	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.12.2017

国際調査報告の発送日

09.01.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

4U

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2016-537644 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 2016.12.01, & US 2015/0133752 A1 & WO 2015/039121 A1 & EP 3039410 A1 & CN 106415246 A	1 - 4
A	JP 2017-066098 A (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 2017.04.06, (ファミリーなし)	1 - 4