(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
2005 年11 月17 日 (17.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/108482 A1

(51) 国際特許分類[7]: C08L 3/00, B82B 1/00, C01B 31/02, C08K 3/04 // C08B 37/00, G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/008352

(22) 国際出願日: 2005 年5 月6 日 (06.05.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-138260 2004 年5 月7 日 (07.05.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目１番８号 Saitama (JP).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 水 雅美 (MIZU, Masami) [JP/JP]; 〒5998128 大阪府堺市中茶屋７４－１０ Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新海 征治 (SHINKAI, Seiji) [JP/JP]; 〒8110201 福岡県福岡市東区三苫２－１３－１７ Fukuoka (JP). 長谷川 輝明 (HASEGAWA, Teruaki) [JP/JP]; 〒8110201 福岡県福岡市東区筥松４－６－３５ Fukuoka (JP). 沼田 宗典 (NUMATA, Munenori) [JP/JP]; 〒8130035 福岡県福岡市東区松崎３－１３－７ Fukuoka (JP). 藤沢 友久 (FUJISAWA, Tomohisa) [JP/JP]; 〒8120053 福岡県福岡市東区箱崎３－６－２３ Fukuoka (JP). 櫻井 和朗 (SAKURAI, Kazuo) [JP/JP]; 〒6700033 兵庫県姫路市西新町１１７－７ Hyogo (JP).

(74) 代理人: 筒井 知 (TSUTSUI, Satoru); 〒8120011 福岡県福岡市博多区博多駅前３－３０－１５ライオンズマンション博多１３０８号 Fukuoka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2005/108482 A1

(54) Title: POLYSACCHARIDE/CARBON NANOTUBE COMPOSITE

(54) 発明の名称: 多糖／カーボンナノチューブ複合体

(57) Abstract: Disclosed is a polysaccharide/carbon nanotube composite which is composed of a carbon nanotube and a modified polysaccharide wherein a residue of a monosaccharide or oligosaccharide is introduced into a lateral part of the main chain. As a polysaccharide, β-1,3-glucan is preferably used. This composite is prepared by mixing the modified polysaccharide dissolved in a polar non-protic solvent or strong alkaline solution with an aqueous dispersion of the carbon nanotube, and then incubating the resulting mixture.

(57) 要約: 単糖またはオリゴ糖の残基が主鎖の側部に導入された修飾多糖とカーボンナノチューブとから構成される多糖／カーボンナノチューブ複合体が開示されている。多糖としてはβ－1,3－グルカンが好ましい。該複合体は、非プロトン性極性溶媒または強アルカリ性溶液に溶解した修飾多糖とカーボンナノチューブの分散水溶液とを混合した後、インキュベートすることによって調製される。

# 明 細 書

## 多糖／カーボンナノチューブ複合体

## 技術分野

[0001] 本発明は、生体適合性などの特性を有する新規な多糖/カーボンナノチューブ複合体に関する。

## 背景技術

[0002] これまで用いられてきたリソグラフ法が限界を迎えるにつれ、近年、低分子の自己組織化を基にしてマイクロ電子回路を作成しようとする試みが盛んに行われてきている。たとえば、導電性を有することが明らかにされた核酸二重鎖を分子サイズ導線と考え、相補核酸同士の複合体形成能を利用して組織化することによるマイクロ電子回路作成の試みが行われている。

[0003] この流れの中で、ダイヤモンド、グラファイト、フラーレンに次ぐ第四の炭素同素体としてカーボンナノチューブが注目されている。グラフェンシートが筒状に巻いた構造として定義できるカーボンナノチューブには、その筒の巻き方によって多層カーボンナノチューブと単層カーボンナノチューブに大別されるが、これらカーボンナノチューブ類が、数々の興味ある性質を示すことがわかってきた。

非特許文献1:P. M.Ajayan, Chem. Rev. 1999, 99, 1787

非特許文献2:Y.-P. Sun,K. Fu, Y. Lin, W. Huang, Acc. Chem. Res. 2002, 35, 1096

非特許文献3:S. Niyogi, M. A. Hamon, H. Hu, B. Zhao, P. Bhowmik, R. Sen, M. E.Itkis, R. C. Haddon, Acc. Chem. Res. 2002, 35, 1105.

[0004] たとえば単層カーボンナノチューブはその直径分布が0.8-1.4nm付近に集中しており、量子サイズの非常に細い剛直な直線状分子であるといえるが、このようなごく微細な直径にも関わらず、単層カーボンナノチューブの引っ張り強度は、数十GPa程度と非常に強い。また、どんどん引っ張っていっても破断せずに、ネッキングを起こして最後は両端がつながった一炭素原子列になるという理論予測がなされている。また、曲げ応力に関しても単層カーボンナノチューブが非常に強い物性を示すことがわかってきた。たとえばカーボンファイバーや金属は曲げ応力を加えると、弾性限界を超え

たところで破断するのに対し、単層カーボンナノチューブは圧縮側にうねり構造をとりながら変形していくことが透過電子顕微鏡観察などにより判明した。また変形しても復元することも大きな特徴である。以上のことから単層カーボンナノチューブは破断しにくく、柔軟性に富んでいることが分かる。

[0005] また、単層カーボンナノチューブの密度は1.33～1.40g/cm$^3$という非常に小さい値を示す。これは単層カーボンナノチューブが中空構造をとることに起因しており、現在の軽量・高強度材料の代表格であるアルミニウムの密度が2.7g/cm$^3$であることと比べても圧倒的に軽い。その機械的強度を考慮すると、単層カーボンナノチューブは、軽量・超強度が求められる分野においてかなり理想的な素材といえる。

[0006] このように機械的に優れた特性を有するだけでなく、カーボンナノチューブはπ－電子雲がつながった構造を有することから導電性があることがわかってきた。たとえば単層カーボンナノチューブはその構造の違いによりジグザグ型、カイラル型、アームチェア型の三種の異性体が存在し、微妙な構造の違いによって金属的または半導体的な導電性を示すことが知られている。

[0007] さらに最近、単層カーボンナノチューブの内孔を介して物質の輸送が可能であることや、単層カーボンナノチューブが細胞内への薬物送達キャリアーとなりうることが示されている。

非特許文献4:D.Pantarotto, J. -P. Briand, M. Prato, A. Bianco, Chem. Commun. 2004, 16.

[0008] 以上の諸性質より、カーボンナノチューブには単なる次世代微少電子回路の導電物質としてだけでなく、生物化学を含んだ幅広い分野で応用可能な新規材料としての期待がかかっている。

[0009] たとえば、単層カーボンナノチューブの導電性は周囲の環境、たとえば単層カーボンナノチューブに対する二原子分子やタンパク質の吸着などにより、劇的に変化することが示されており、その現象を利用して目的物質の存在を検出するためのセンサーとしての利用が期待されている。

非特許文献5:S. Santucci, S. Picozzi, F. Di Gregorio, L. Lozzi, C. Cantalini, L.Valentini, J. M. Kenny, B. Delley, J. Chem. Phys. 2003, 119, 10904.

非特許文献6:R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. W. S. Kam, M.Shim, Y. M. Li, , W. Kim, P. J. Utz, H. J. Dai, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100, 4984.

非特許文献7:K. Besteman, J. Lee, F. G. M. Wiertz, H. A. Heering, C. Dekker, Nano Lett. 2003, 3, 727.

[0010] しかしながら、カーボンナノチューブは炭素のみから構成されることから非常に自己凝集性が高く、水や一般有機溶媒を含むあらゆる媒体に不溶である。またカーボンナノチューブには分子認識基が存在しないことから、特定分子種のみとは選択的に相互作用しない。

[0011] カーボンナノチューブの溶媒に対する分散性の向上およびカーボンナノチューブを基にしたセンサーシステム開発のため、カーボンナノチューブの直接化学修飾による分子認識部位の導入に関する研究が盛んに行われてきた。たとえば単層カーボンナノチューブを混酸中超音波処理することでカーボンナノチューブを酸化し、生じたカルボキシル基に対してアミド化を行うことにより、ポリエーテル基やペプチド、糖鎖などが導入されている。

非特許文献8:Matsuura, K. Hayashi, N. Kimizuka, Chem. Lett. 2003, 32, 212.

[0012] また、混酸処理を経ずに環化付加反応を経て直接カーボンナノチューブを修飾する方法も盛んに行われている。

非特許文献9:D. M. Guldi, M. Marcaccio, D. Paolucci, F. Paolucci,N. Tagmatarchis, D. Tasis, E. Vazquez, M. Prato, Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42,4206.

非特許文献10:A. Bianco, M. Prato, Adv. Mater. 2003, 15,1765

[0013] このようにカーボンナノチューブの直接化学修飾法は大きな発展を遂げつつあるものの、化学修飾の際に必然的にカーボンナノチューブのπ－電子系を乱すことから、カーボンナノチューブが本来有していた導電性・剛直性・直線性などの諸性質の低下を招くことが避けられなかった。また、修飾率を高めるほどカーボンナノチューブの導電性が大幅に低下することから、直接化学修飾法による高密度機能性基導入はきわめて困難であった。これらの問題を解決するため、簡便で一般的、かつカーボンナ

ノチューブの電気化学特性を損なわない非破壊的な機能化方法の開発が望まれている。

[0014] 一方、カーボンナノチューブの可溶化の観点から、これまで様々な被覆剤が研究されてきた。たとえばアミノ基を有するピレン系化合物はピレンとカーボンナノチューブとの相互作用によりカーボンナノチューブ表面に吸着し、アミノ基由来のカチオン性によりカーボンナノチューブを水溶化することが報告されている。

非特許文献11:A. B. Artyukhin, O. Bakajin, P. Stroeve, A. Noy, Langmuir 2004, 20, 1442.

[0015] 同様にカチオン性ピレン含有ポリアクリルアミドは、ピレンとカーボンナノチューブとの間の強い相互作用によってカーボンナノチューブに吸着し、ポリマー鎖中の負電荷によりカーボンナノチューブを水溶化する事が示されている。

非特許文献12:P. Petrov, F. Stassin, C. Pagnoulle, R. Jerome, Chem. Commun. 2003, 2904.

[0016] さらに天然多糖であるアミロースも単層カーボンナノチューブと複合化し、それを可溶化することがわかってきた。

非特許文献13:A. Star, D. W. Steuerman, J. R. Heath, J. F. Stoddart,Angew. Chem. Int. ed. 2002, 41, 2508.

非特許文献14:O. -K. Kim, J. Je, J. W. Baldwin, S. Kooi, P. E.Pehrsson, L. J. Buckley, J. Am. Chem.Soc. 2003, 125, 4426.

非特許文献15:C. Lii, L. Stobinski, P. Tomasik, C. Liao, Carbohydr. Polym., 2003, 51, 93.

[0017] しかし、これらの被覆剤とカーボンナノチューブとの相互作用は、カーボンナノチューブの可溶化のみに研究の重点が置かれ、被覆現象を利用してカーボンナノチューブ表面に分子認識能や電子機能を有する機能性基を集積させる試みは全くなされていない。

[0018] 近年本発明者らは天然のβ－1,3－グルカンであるシゾフィランやカードランがらせん状にカーボンナノチューブを被覆する興味ある現象を発見した。シゾフィランが、アミロースなどの他の天然多糖と比べ、より多くのカーボンナノチューブを長時間水溶

媒へ分散できることもわかっており、我々はこのシゾフィラン等のβ-1,3-グルカン類を用いた可溶化方法を新規カーボンナノチューブ可溶化法として特許出願した。無毒の天然多糖でカーボンナノチューブを被覆することでカーボンナノチューブ(特に単層カーボンナノチューブ)の生体内利用への応用が期待できる。

非特許文献16:M. Numata, M. Asai, K. Kaneko, T. Hasegawa, N. Fujita,Y. Kitada, K. Sakurai, S. Shinkai, Chem.Lett. 2004, 33,232.

特許文献1:特願2003-339569

[0019] β-1,3-グルカンであるシゾフィランとカーボンナノチューブとの複合体が、α-1,4-グルカンであるアミロースをもちいた系に比べ非常に安定であるという点、および、アミロースが体内のグルカナーゼ類に容易に加水分解されることと比べ、人体がシゾフィランを含むβ-1,3-グルカン類を加水分解するための酵素、すなわちβ-1,3-グルカナーゼ類を持たない点において、このシゾフィランを用いた被覆法は生体内および生物化学の分野での利用に適した可溶化系である。

## 発明の開示

## 発明が解決しようとする課題

[0020] 本発明の目的は、カーボンナノチューブが本来有している特性を損うことなく、例えば、特定のタンパク質や細胞と選択的に相互作用するなどの機能を呈することのできる、カーボンナノチューブ由来の新しい有用材料を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

[0021] 本発明は、多糖の側部に細胞またはタンパク質を認識する糖の残基を導入し、この修飾多糖でカーボンナノチューブを被覆(包接)することに基づくものである。

かくして、本発明に従えば、単糖またはオリゴ糖の残基が主鎖の側部に導入された修飾多糖とカーボンナノチューブとから構成されることを特徴とする複合体が提供される。

## 図面の簡単な説明

[0022] [図1]本発明で用いられる修飾多糖の合成スキームを例示する。

[図2]本発明で用いられる修飾多糖の別の合成スキームを例示する。

[図3]ラクトース修飾シゾフィランのUVスペクトル(実線、実施例6)およびフェノール硫酸法による発色処理後のUVスペクトル(破線、実施例6)を示す。

[図4]単層カーボンナノチューブの原子間力顕微鏡写真(実施例8)を示す。

[図5]ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真(実施例8)を示す。

[図6]表面プラズモン共鳴に基づいた(1)単層カーボンナノチューブ、(2)シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体、(3)ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体のレクチン固定化金基盤表面に対する結合挙動(実施例9)を示す。

[図7]表面プラズモン共鳴の基づいたマンノース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体のレクチン固定化金基盤表面に対する結合挙動(実施例9)を示す。

[図8]$RCA_{120}$レクチンとインキュベーションした後の、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真(実施例10)を示す。

[図9]PNAレクチンとインキュベーションした後の、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真(実施例10)を示す。

[図10]ConAレクチンとインキュベーションした後の、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真(実施例10)を示す。

[図11]WGAレクチンとインキュベーションした後の、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真(実施例10)を示す。

[図12]FITC-$RCA_{120}$レクチンとインキュベーションした後の、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真:(左上)蛍光像、(右上)透過光像および(左下)両者の重ね合わせ図(実施例11)を示す。

[図13]FITC-ConAレクチンとインキュベーションした後の、マンノース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の原子間力顕微鏡写真:(左上)蛍光像、(右上)透過光像および(左下)両者の重ね合わせ図(実施例11)を示す。

[図14]本発明に従う複合体の熱質量分析の結果を示す。

## 発明を実施するための最良の形態

[0023] 本発明の複合体を構成する修飾多糖とは、主鎖の側部に外部から単糖またはオリ

ゴ糖の残基が導入された多糖を意味する。

出発物質となる多糖としては、その主鎖の側部に単糖またはオリゴ糖を導入することができ、且つ、カーボンナノチューブと複合体を形成し得るものであれば、基本的にはいずれの多糖も適用可能であり、例えば、β－1,3－キシランやα－1,4－グルカン（例えばアミロース）などが使用できるが、特に好ましい多糖はβ－1,3－グルカンである。

[0024] β－1,3－グルカンは、カーボンナノチューブと、特に安定で溶解性の良好な複合体を形成する。また、β－1,3－グルカンの一つであるシゾフィランは筋肉内注射薬として20年以上の使用実績があり安全性が確認されている。

[0025] β－1,3－グルカンは、よく知られているように、多糖の主鎖がβ1→3グルコシド結合に結合された多糖である。側鎖にグルコース（残基）を有しないカードラン、少量のグルコースを有するパーキマンなどのβ－1,3－グルカンも知られており、これらも本発明に使用できるが、好ましいのは、側鎖に適当な数のグルコースを有するシゾフィラン、レンチナンまたはスクレログルカンであり、特に好ましいのはシゾフィランである。これらは、後述するように、主鎖の側部に外部から単糖またはオリゴ糖を容易に導入することができる点において有利である。β－1,3－グルカンの分子量に関しては、ある程度の長さは必要であるが、2000程度以上あれば充分使用可能である。

[0026] よく知られているように、カーボンナノチューブには、単層カーボンナノチューブと多層カーボンナノチューブがあり、本発明の原理は、それらのカーボンナノチューブの混合物を含むいずれのタイプのカーボンナノチューブにも適用可能であるが、実用的な意義から、本発明の方法は、単層カーボンナノチューブ（本明細書ではSWNTsと略称していることがある）に好ましく適用される。以下の説明も主としてSWNTsに本発明を適用する場合に沿って行なっている。

[0027] 本発明において上述したようにβ－1,3－グルカンに代表される多糖の主鎖の側部に導入される単糖またはオリゴ糖とは、細胞を認識する糖として、前述した文献等に記載されている各種の糖であり、好ましい例として、ガラクトース、Ｎ－アセチルガラクトサミン、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン、グルコース、フコース、シアル酸、ラクトース等より選択された単糖および該単糖を含むオリゴ糖が挙げられるが、これらに

限定されるものではない。

[0028] これらの糖は生体に存在する糖類の主要な構成糖であり、生体内において受精や分化、細胞接着や細胞間情報伝達などの様々な分子認識現象に関わっていることが示されている。また、これら構成糖の多くは毒素やウイルスがそのホスト細胞にとりつくときの、細胞表面における認識部位としても知られている。たとえばインフルエンザウイルスはシアル酸を強く認識し、ヒトの気管支細胞などにとりつく。

[0029] 単糖またはオリゴ糖の残基が導入された修飾多糖と、カーボンナノチューブとから構成される本発明の複合体はきわめて簡単な方法で製造することができる。すなわち、如上の修飾多糖(好ましくはβ－1,3－グルカン)を非プロトン性極性溶媒または強アルカリ性溶液に溶解した溶液とカーボンナノチューブの分散水溶液とを混合した後、インキュベートする(但し、強アルカリ性溶液を用いた場合には、一旦、中和した後、インキュベートする)だけで当該複合体が得られる。非プロトン極性溶媒の好ましい例は、ジメチルスルホキシド(DMSO)であるが、これに限定されるものではない。強アルカリ性溶液の好ましい例は、苛性ソーダ水溶液であるが、これに限定されるものではない。また、インキュベーションは、一般に、50℃前後の温度で2日間程度実施するのが好ましい。

[0030] β－1,3－グルカンは、天然の状態では3重螺旋構造をとっていることは知られている。そして、本発明者らは、非プロトン性極性溶媒(例えば、DMSO)中や強アルカリ性の溶液(例えば、苛性ソーダ水溶液)中では、β－1,3－グルカンは1本鎖に解離されるとともに、それを中性の水中に移すと3重螺旋状態に再び戻り、その際、共存物が存在すると、その共存物へのβ－1,3－グルカンの巻き付き・ラッピングが起こり当該共存物をβ－1,3－グルカンの疎水空間内に取り込み被覆し得ることを見出している。

非特許文献21:M. Numata, T. Hasegawa, T. Fujisawa, K. Sakurai, S.Shinkai, Org.Lett. 6(24), 4447-4450(2004)

非特許文献22:C.Li, M. Numata, Ah-Hyun Bae, K. Sakurai, S. Shinkai, J. Am. Chem.Soc., 127, 4548-4549(2005).

非特許文献23:M. Numata, M. Asai, K.Kaneko, T. Hasegawa, K. Sakurai, S.

Shinkai,J. Am. Chem. Soc., 127(16), 5875-5884(2005)

[0031] 本発明に従う複合体の上記製法は、このような現象に基づくものである。かくして、本発明の修飾多糖／カーボンナノチューブ複合体は、カーボンナノチューブが修飾多糖の内部空間内に取り込まれて該多糖の主鎖と疎水性相互作用を介して結合することにより形成されており、そして、カーボンナノチューブを包接した多糖の外部表面にたんぱく質や細胞を認識し得る単糖やオリゴ糖が存在しているものと理解される。本発明の複合体においては、カーボンナノチューブに直接的な化学修飾は全く行なわれていない。

[0032] 本発明の複合体を構成する修飾多糖を得るために、多糖の主鎖の側部に、所望の単糖またはオリゴ糖を導入するには、既知の種々の反応を利用することができる。図1(図1A～図1E)および図2(図2A～図2E)には、例として単糖またはオリゴ糖としてラクトースまたはガラクトースを導入する場合の反応スキームが示されている。なお、多糖の主鎖に対して、導入される単糖またはオリゴ糖の残基が直接結合している場合は、多糖／カーボンナノチューブ複合体のタンパク質や細胞膜の認識能は比較的弱くなる。したがって、単糖またはオリゴ糖の残基と多糖との間には、つなぎとしてのリンカーが存在するように単糖またはオリゴ糖の残基を導入することが好ましい。図中、Lとして示しているのは、それぞれ、リンカーとなる原子団である。

[0033] 図1は、多糖として、β－1，3－グルカンの1種であるシゾフィランを例に、基体の多糖に元々付いている側鎖のグルコースを利用し、過ヨウ素酸酸化と、その後の還元アミノ化により、単糖またはオリゴ糖を導入する方法を示す。この方法は、主鎖のグルコシド結合に影響を与えず、比較的簡単に単糖やオリゴ糖を導入することができる点において、修飾多糖を調製するのに特に好ましい。例えば、まず、側鎖のグルコースの少なくとも一部を過ヨウ素酸ナトリウムを用いて酸化し、開環してアルデヒドをつくる(図1A、Ib)。それに導入する糖のアミン誘導体(図1B、Ic:アミノエチルラクトシド)を反応させ、水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤を用いて還元アミノ化することにより、糖(ラクトース)含有側鎖を導入できる(実施例2、図1BのId)。別の方法として、過ヨウ素酸酸化後のシゾフィラン(Ib)に対してまずアンモニア水を用いた還元アミノ化を行なってアミノ基を有するシゾフィランに変換した後、ラクトンを有する糖誘導体(図1C

のIe)と反応させることでアミドをリンカーとして有するシゾフィラン誘導体を得ることができる(図1CのIf)。さらに、過ヨウ素酸酸化後のシゾフィラン誘導体とアミノオキシ基を有する糖誘導体(図1DのIg)やヒドラゾン基を有する糖誘導体(図1EのIj)とを反応させることでも糖を側鎖に有するシゾフィラン誘導体(それぞれ、図1DのIi、および図1EのIk)を得ることもできる。

[0034] 図2は、本発明で用いられる修飾多糖を得るための別の方法として、本来的に側鎖を有しない多糖の主鎖のグルコシド結合に直接、単糖またはオリゴ糖の残基を導入する反応スキームを、カードランを例にして示す。この場合は、カードラン(図2AのIIa)のブロモ化およびアジド化によって得られるアジド化カードラン(図2AのIIc)を水素添加することによって得られるアミノ化カードラン(図2AのIId)とラクトンを有する糖誘導体(図2BのIIe)、またはブモロ基を有する糖誘導体(図2CのIIg)と反応させることで糖修飾カードラン(それぞれ、図2BのIIf、および図2CのIIh)を得ることができる。またチオールを有する糖誘導体(図2DのIIi)とブロモカードラン(図2AのIIb)を反応させることによって、糖修飾カードラン(図2DのIIj)を得ることもできる。さらに、チオールを有するカードラン(図2EのIIn)と活性ジスルフィドを有する糖誘導体(図2EのIIo)との反応によっても糖修飾カードラン(図2EのIIp)を得ることができる。

なお、以上のようにして多糖の主鎖の側部に導入される単糖またはオリゴ糖の割合は、多糖の主鎖を構成するグルコースの数(総数)に対して、一般に、2～10%とするのが好ましい。

## 実施例 1

[0035] β-1,3-グルカン(シゾフィラン)の調製

3重螺旋構造のシゾフィランを文献記載の定法に従って製造した。すなわち、ATCC(American Type Culture Collection)から入手したSchizophyllum commune. Fries(ATCC 44200)を、最小培地を用いて7日間静置培養した後、細胞成分および不溶残渣を遠心分離して得られた上清を超音波処理して分子量45万の3重螺旋シゾフィランを得た。

非特許文献17:Gregory G. Martin, Michael F. Richardson, Gordon C. Cannon

andCharles L. McCormick, Am. Chem. Soc.Poly. Prep. 1997, 38, 253.

非特許文献18:Kengo Tabata, Wataru Ito, Takemasa Kojima, Shozo Kawabata and Akira Misaki, Carbohydrate Res. 1981, 89, 121.

実施例 2

[0036] 糖修飾シゾフィランの合成

糖修飾シゾフィランは図1に示す反応スキームに従って合成した。例としてアミノエチルラクトシドを用いたラクトース修飾シゾフィランの合成法を示しているが、同様の合成法はすべての糖類(単糖、オリゴ糖)のアミノエチル体に適用することが可能である。以下にラクトース修飾シゾフィランについての具体的な合成法を述べる。まず実施例1にて調製された分子量45万のシゾフィラン234mgを蒸留水234mlに溶解させた。過ヨウ素酸ナトリウム23.7mg(側鎖グルコースに対して0.3当量)を少量の蒸留水に溶解させ、4℃にて冷却攪拌しながらゆっくりと加えた。反応溶液を透析膜(排除限界:8000)で透析後、反応溶液にアミノエチルラクトシド0.64gを加え、2日間室温で攪拌した。反応溶液をそのまま凍結乾燥させ、得られた白色固体をジメチルスルホキシド35mlに溶解させた。反応溶液にさらにアミノエチルラクトシド(合成法についてはSunらの方法参照)0.45g、少量の炭酸カリウムを加え、2日間攪拌した。水素化ホウ素ナトリウムを加え、2日間攪拌後、反応溶液をエタノール500mlにて再沈殿操作を行った。生成した沈殿を濾別し、メタノールとアセトンで洗浄を繰り返した。沈殿を蒸留水に懸濁させた後、不溶物を濾別した。溶液を透析膜(排除限界:8000)で透析した後、凍結乾燥し、ラクトース修飾シゾフィランを得た。

非特許文献19:Sun, Xue-Long;Faucher, Keith M.; Houston, Michelle; Grande, Daniel; Chaikof, Elliot L. J. Am.Chem. Soc. 2002, 124, 7258.

実施例 3

[0037] 糖修飾シゾフィランのキャラクタリゼーション 実施例2にて得られた糖修飾シゾフィランをゲル排除クロマトグラフィー(カラム:TSKgel－α－4000、溶離液:[LiBr]＝20mM/DMF)により分子量を測定したところ、糖修飾シゾフィランのサンプルは、化学修飾前のシゾフィランとほぼ同じ分子量を示し、化学修飾にともなって主鎖切断等がほとんど起こっていないことが認められた。また、各糖修飾シゾフィランの糖の導入率

(n)は元素分析における窒素含有率(X)から算出され、以下の式に基づき糖導入率(n)はいずれも0.14であることが明らかとなった。

なお、シゾフィランにおいて主鎖のグルコース3個ごとに1個存在する側鎖のグルコースがどれだけの割合で修飾糖に置換されたかの割合を示す糖の導入率(n)と窒素含有率(X)の関係は、実施例2の場合、次式で表される。式中のN, C, HおよびOは窒素、炭素、水素および酸素の原子量を示す。また、n値は図1Bの化合物Idにおけるnに相当する。

$X=2\times N\times n/\{(24\times C+40\times H+20\times O)(1-n)+(52\times C+92\times H+2\times N+40\times O)n\}$

この式をnで解いた式に整理し、得られた糖修飾シゾフィランのサンプルの元素分析による窒素含有率(X:質量分率)および原子量の値を代入することによって、糖の導入率(n)は0.14(14mol%)であることが計算された。

$n=-(24\times C+40\times H+20\times O)\times X/(28\times C\times X+52\times H\times X-2\times N\times X-2\times N+20\times O\times X)$

$=-(24\times 12.01+40\times 1.008+20\times 16.00)\times 0.005218569/(28\times 12.01\times 0.005218569+52\times 1.008\times 0.005218569-2\times 14.01\times 0.005218569-2\times 14.01+20\times 16.00\times 0.005218569)$

$=0.138(\text{ca. } 0.14)$

シゾフィランにおいては、主鎖のグルコース3個ごとに1個のグルコース側鎖が存在し、該側鎖の13.8%にラクトースが導入されたので、多糖の主鎖を構成するグルコースの総数に対するラクトースの導入率は13.8/3%、すなわち、4.6%となる。

## 実施例 4

[0038] 糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の調製

使用したカーボンナノチューブは次のように前処理した:Carbon Nanotechnologies Inc.(Texas, USA)製の単層ナノチューブ(SWNTs)10mgに50mlの混酸(硝酸:硫酸=1:3(v/v))を加え、超音波(50kHz)を2~3時間照射した。この液をろ過し、残さに10mM水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和後、ろ液が中性になるまで蒸留水で十分に洗浄した。乾燥しきらないうちに残さを回収し、10mlの蒸留水に分散させた。この分散液

を、20℃で1時間、遠心分離(13900回転／分)し、上澄み液を除いた。沈殿物に蒸留水10mlを加え再び遠心分離操作を行った。得られたナノチューブを、さらに水10mlに分散させ、今度は2780回転／分で10分間、遠心操作にかけて、分散しないナノチューブを沈殿物として取り除いた。その上層液をカーボンナノチューブの分散液として次の実験に用いた。なお、分散液中のナノチューブは、UV/visスペクトルにより約0.1mg/mlの濃度であること、また、顕微鏡観察により1－3μmの長さであることが認められた。

以上のように前処理した単層カーボンナノチューブ分散水溶液(0.1mg/ml、250μl)を糖修飾シゾフィランのジメチルスルホキシド溶液(5mg/ml、50μl)と混合し、そのまま50℃にて2日間インキュベートした。この際、糖修飾シゾフィランが単層カーボンナノチューブに対して大過剰であることが重要である。二日後、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を遠心分離(7000r.p.m.、60min)によって黒色沈殿として回収し、上澄みに含まれる余剰の糖修飾シゾフィランを取り除いた。同様の操作を三回繰り返し、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を精製した。

実施例 5

[0039] UV-visスペクトルによる糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体形成の確認

実施例4の遠心分離により得られた黒色沈殿を脱イオン水(3500ml)に溶解させ、UV-visスペクトルを測定した。測定波長全域(700-200nm)でカーボンナノチューブに由来する散乱光が観察されると共に、短波長領域(280nm)にカーボンナノチューブの芳香環に由来する吸収帯が確認でき、えられた黒色沈殿中にカーボンナノチューブが含まれていることが明らかとなった。実際に得られたスペクトルとして、ラクトース修飾シゾフィラン/カーボンナノチューブ複合体について図3中に実線として示す。

実施例 6

[0040] フェノール硫酸法による糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体形成の確認

実施例4の遠心分離により得られた黒色沈殿を脱イオン水(500μl)に分散させた。5%フェノール水溶液(500μl)および濃硫酸(2500μl)を順次加えたのち、室温にて

20分以上静置し、糖鎖部分を発色させた。得られた溶液のUVスペクトルを測定したところ、490nm付近に特徴的な鋭い吸収帯が確認された。この490nmの吸収帯は糖成分がフェノール硫酸法によって発色した際に観察される特徴的な吸収帯であることから、得られた黒色沈殿中に糖鎖由来の成分が含まれていることが明らかとなった。実施例5の結果と併せて考えると、黒色沈殿が糖鎖とカーボンナノチューブ両者から構成されていることがわかった。実際に得られたスペクトルとして、ラクトース修飾シゾフィラン/カーボンナノチューブ複合体について図3中に破線として示す。

非特許文献20:Hodge, J. E. andHofreiter, B. T., Method in Carbohydrate Chemistry, 1, 338 (1962)

実施例 7

[0041] 熱質量分析による複合体形成の確認

実施例4の遠心分離により得られた黒色沈殿を熱質量分析により分析したところ、糖鎖成分に由来した質量減少とカーボンナノチューブ成分に由来した質量減少がともに確認でき、得られた黒色沈殿が糖鎖とカーボンナノチューブ両者から構成されていることが再度確認できた。

DTA／TG分析の結果を図14に示す。昇温速度は5℃／分とした。1段目の減量(273℃付近)が修飾シゾフィランの分解に由来し、2段目の減量(371℃付近から始まる緩和な減少)がカーボンナノチューブの分解に由来するものである。

実施例 8

[0042] 原子間力顕微鏡による複合体形成の確認

実施例4の遠心分離により得られた黒色沈殿の水溶液を石英基盤にキャストし、原子間力顕微鏡による直接観察をおこなった。まず、遊離のカーボンナノチューブを観察したところその表面は非常に平滑であり、特徴的な構造体は何一つ観察できなかった(図4)。その一方でラクトース修飾シゾフィラン/カーボンナノチューブ複合体を観察したところ、カーボンナノチューブ表面にカーボンナノチューブの長軸に対して横向きに走る特徴的な筋状模様が観察された(図5)。なお、図5については、理解を容易にするため、顕微鏡写真の像を手でなぞった図を併せて示している。この筋状模様は未修飾のシゾフィランを用いたカーボンナノチューブ可溶化系でも観察されて

おり(特許文献1)、カーボンナノチューブをシゾフィラン誘導体がらせん状にラッピングしていることを示す結果である。同様の筋状模様はマンノース修飾シゾフィランを用いたカーボンナノチューブ被覆の際にも確認できた。

実施例 9

[0043] 表面プラズモン共鳴法による糖修飾シゾフィラン/カーボンナノチューブ-レクチン間の特異的相互作用評価

糖修飾シゾフィラン/カーボンナノチューブとレクチン類との相互作用を、レクチン修飾金基盤を用いた表面プラズモン共鳴法(SPR)により評価した。市販のSPR用チップ(Sensor

Chip SA、BIACORE)をBIACORE biosensorにセットし、トリス塩酸緩衝液(1mM、pH7.2)をもちいて数分間洗浄した。このセンサーチップ表面にはカルボキシメチルデキストランを介してアビジンが固定化されている。流路にビオチンでラベルした各種レクチンのトリス塩酸緩衝溶液を流し、これらのレクチンを強固なアビジン-ビオチン相互作用を介してセンサーチップ表面に固定化した。これらのレクチン修飾金基盤を用いて、後述の結合試験をおこなった。今回、レクチンとして$RCA_{120}$(β-ガラクトシド選択的)、WGA(β-N-アセチルグルコサミニド選択的)、ConA(α-マンノシド、α-グルコシド選択的)、LCA(α-マンノシド、α-グルコシド選択的)、DBA(N-アセチルガラクトサミニド選択的)、PHA-E4(N-アセチルガラクトサミニド選択的)、UAE-I(α-フコシド選択的)の7種を用いた。

[0044] まず遊離のカーボンナノチューブ(SWNT)をトリス塩酸緩衝液に懸濁させて流路に流した場合(図6(1))、用いたすべてのレクチン修飾金基盤に対して非特異的に単層カーボンナノチューブの結合が見られた。結合した単層カーボンナノチューブのレクチン固定化金基盤表面からの脱離実験を行ったところ、酸性・塩基性緩衝液や、塩酸グアニジン含有緩衝液を流しても単層カーボンナノチューブの脱離は観察できなかった。しかし界面活性剤を含む緩衝液を流した場合に限って単層カーボンナノチューブの脱離が確認され、このレクチンへの非特異結合が疎水性相互作用によるものであることが確認できた。単層カーボンナノチューブは非常に疎水性が高く、レクチンの疎水性部位と相互作用したものと結論づけられる。

[0045] 次に、シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体(SPG/SWNT)の場合(図6(2))、すべてのレクチンに対しほとんど結合は確認されなかった。シゾフィランによるポリマーラッピングにより単層カーボンナノチューブの疎水性表面が被覆され、疎水性相互作用による非特異吸着が完全にブロックされたものと考えることができる。このようなタンパク質の非特異吸着の抑制は、今後単層カーボンナノチューブの生体内利用を図る上で非常に重要である。

[0046] 最後に、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体(SPG-Lac/SWNT)の場合(図6(3))、$RCA_{120}$修飾金基盤に対してのみ強固な結合が確認され、そのほかのレクチンには全く結合しなかった。$RCA_{120}$はラクトース残基と選択的に相互作用するレクチンであることからラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブは複合体内のラクトース残基と$RCA_{120}$との間の特異的な相互作用により、金基盤表面に結合することが明らかとなった。つまりラクトース修飾シゾフィランでポリマーラッピングすることで、本来レクチン認識能をもたない単層カーボンナノチューブに、特定レクチンのみと選択的に結合する能力を付与できたと結論づけられる。同様にマンノース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の場合、特異的レクチンであるConAのみと選択的に相互作用し、$RCA_{120}$とは相互作用しなかった(図7)。

[0047] 以上の結果から、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を用いることによって、その糖鎖を認識するレクチンがカーボンナノチューブ複合体に選択的に結合することが示された。近年カーボンナノチューブをセンサー素子に用いようとする試みが盛んになされており、たとえばカーボンナノチューブで電極間を架橋したセンサー素子は、カーボンナノチューブの電気抵抗値がカーボンナノチューブへの物質吸着(NOなど)によって大きく変化することが報告されている(非特許文献5)。今回得られたカーボンナノチューブ複合体の特異的なタンパク質認識能を利用すれば、糖認識性のタンパク質やウイルス、毒素などを特異的に検出するセンサーの構築が期待できる。

実施例 10

[0048] 原子間力顕微鏡を用いたラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複

合体とレクチンとの相互作用の直接観察

糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体とレクチンとの相互作用の様子を、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて直接観察した。Tris-HCl緩衝液中(1mM、pH7.2、[$CaCl_2$]
and [$MnCl_2$]=10μM)、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を様々なレクチンとインキュベーション(室温、15min)させた。遠心分離(7000r.p.m.、2times)により結合していないレクチンを除去し、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体のみを回収した。以下にラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体について具体例を示す。回収したラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を原子間力顕微鏡(AFM)によって観察したところ、$RCA_{120}$やPNAといったラクトース認識レクチンを用いたときのみ、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体表面に小さな球状物体が密集している様子が観察された(図8および9)。これらラクトース認識レクチンがラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体表面のラクトース残基を認識して複合体表面に高密度に結合した結果、本来ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体が有していた縞状模様が隠されたと考えるのが妥当である。ラクトース認識性ではないConAやWGAを用いたときではこのようなタンパク質の密集は確認できず(図10および11)、$RCA_{120}$やPNAで見られたレクチンの結合が、確かに選択的な糖鎖-レクチン相互作用に基づいていることが確認できた。なお、図10および図11については、理解を容易にするため顕微鏡写真の像を手でなぞった図を併せて示している。

実施例 11

[0049] 共焦点レーザー顕微鏡を用いた糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体と蛍光ラベル化レクチンとの相互作用の直接観察

共焦点レーザー顕微鏡観察によっても、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体の特異的なレクチン認識能を確認することができた。前述のAFM用サンプル作成と同条件でフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識レクチン類と相互作用させ、遠心分離により糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体のみを回収した。以下にラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体

について具体例を示す。共焦点レーザー顕微鏡をもちいてえられたラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を観察した結果、レクチンとしてFITC-RCA120を用いたとき、透過光像(図12右上)で確認できたラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体と蛍光像(図12左上)で確認できたFITC-RCA120の存在位置が両者の重ね合わせ図(図12左下)で完全に重なり、ラクトース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体とFITC-RCA120が結合していることが示された。FITC-ConAを用いたときでは蛍光像自体がほとんど観察されず、SPG-Lac/SWNTs複合体とも全く重ならなかった。マンノース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体を用いたときは透過光像で確認できたマンノース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体と蛍光像で確認できたFITC-ConAの存在位置が完全に重なり、マンノース修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体とFITC-ConAが選択的に相互作用していることが示された(図13)。

実施例 12

[0050] 共焦点レーザー顕微鏡を用いたローダミン修飾シゾフィラン/糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ三元複合体とレクチン修飾アガロースゲルビーズとの相互作用の直接観察

糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ複合体が細胞表面に存在するタンパク質との相互作用によって細胞を認識するか否かを、レクチン修飾アガロースゲルビーズを用いて評価した。レクチン修飾アガロースゲルビーズは細胞と同様のサイズを持ち特定の糖認識タンパク質をその表面に有することから、近年細胞ミミックとして分子認識アッセイに多用されている人工細胞である。本アッセイにおいてはローダミン修飾シゾフィラン/糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ三元複合体を用いてアッセイを行った。本複合体は糖修飾シゾフィランに基づくレクチン認識能とローダミン修飾シゾフィランに基づく蛍光を有するカーボンナノチューブ複合体である。

RCA120レクチン修飾アガロースゲルビーズと三元複合体をトリス緩衝液中で相互作用させ、その後RCA120レクチン修飾アガロースゲルビーズを繰り返しトリス緩衝液中で洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡観察によって、RCA120レクチン修飾アガロースゲルビーズ表面に粒子状の蛍光体が確認でき、三元複合体がRCA120レクチン修

飾アガロースゲルビーズ表面に結合することが示された。ConA修飾アガロースゲルビーズを用いた同様の実験ではゲルビーズ表面に蛍光体は確認できず、三元複合体が特異的な糖-レクチン相互作用によってゲル表面に結合することが分かった。これの人工細胞を用いたアッセイにより、糖修飾シゾフィラン/単層カーボンナノチューブ三元複合体が細胞表面の糖認識タンパク質と特異的に相互作用することによって特定細胞を認識する可能性が強く示唆された。

## 産業上の利用可能性

[0051] 本発明によれば、カーボンナノチューブの特性を損なうことなく、多糖とカーボンナノチューブとから構成される多糖／カーボンナノチューブ複合体が得られる。本発明の複合体は、多糖に基づく生体適合性を有するとともに特定のタンパク質や細胞との選択的な結合能を有するものとして、例えば、レクチンのようなタンパク質や毒素（O157産出毒素であるベロトキシンやコレラ菌の産出するコレラトキシンなど）やインフルエンザウイルスなどを検出するセンサー素子への利用などが期待される。

# 請求の範囲

[1] 単糖またはオリゴ糖の残基が主鎖の側部に導入された修飾多糖と、カーボンナノチューブとから構成されることを特徴とする複合体。

[2] 多糖がβ-1,3-グルカンであることを特徴とする請求項1に記載の複合体。

[3] β-1,3-グルカンがシゾフィラン、レンチナンまたはスクレログルカンから選ばれたものであることを特徴とする請求項2記載の複合体。

[4] カーボンナノチューブが単層カーボンナノチューブであることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の複合体。

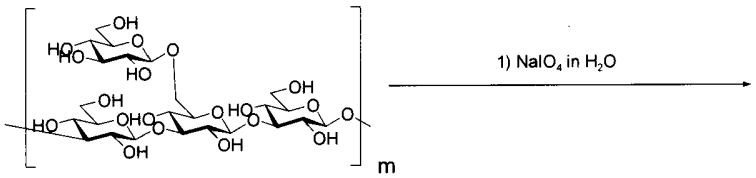
[5] 単糖またはオリゴ糖が、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース、グルコース、フコース、シアル酸およびラクトースより選ばれたものであることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の複合体。

[6] 細胞またはタンパク質を認識するセンサー素子として使用されることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の複合体。

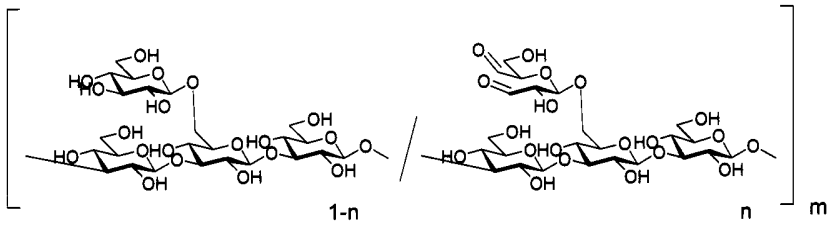
[7] タンパク質がレクチンであることを特徴とする請求項6に記載の複合体。

[8] 単糖またはオリゴ糖の残基が主鎖の側部に導入された修飾多糖と、カーボンナノチューブとから構成される複合体を製造する方法であって、非プロトン性極性溶媒または強アルカリ性溶液に溶解した修飾多糖とカーボンナノチューブの分散水溶液とを混合した後、インキュベートする工程を含むことを特徴とする方法。

[図1A]

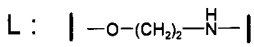



Ia

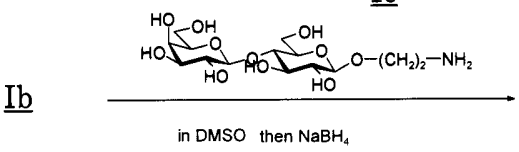


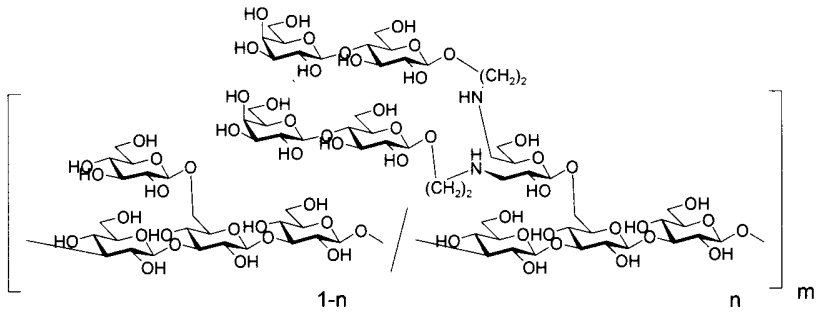

Ib

[図1B]

L : 

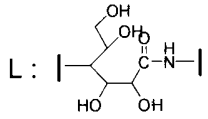
Ic

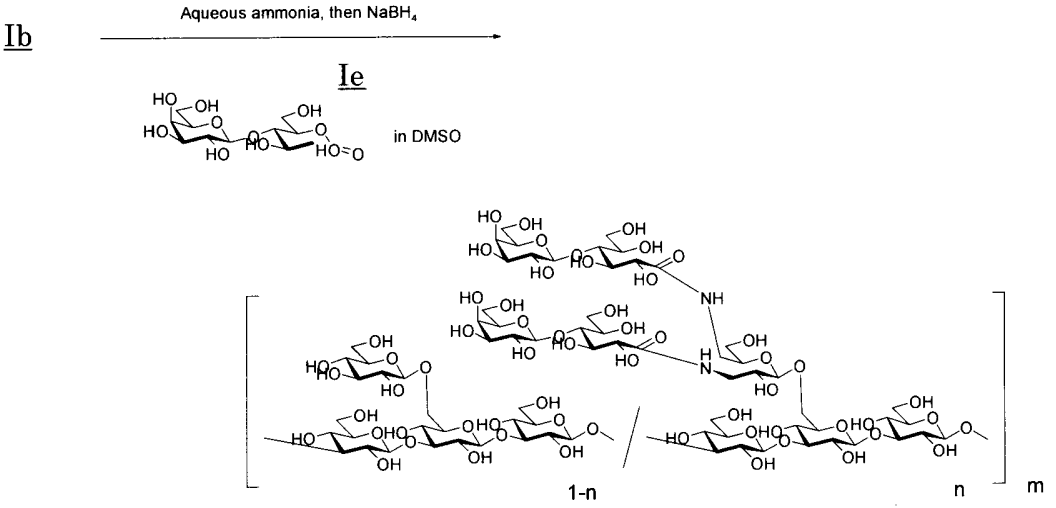



Id

[図1C]

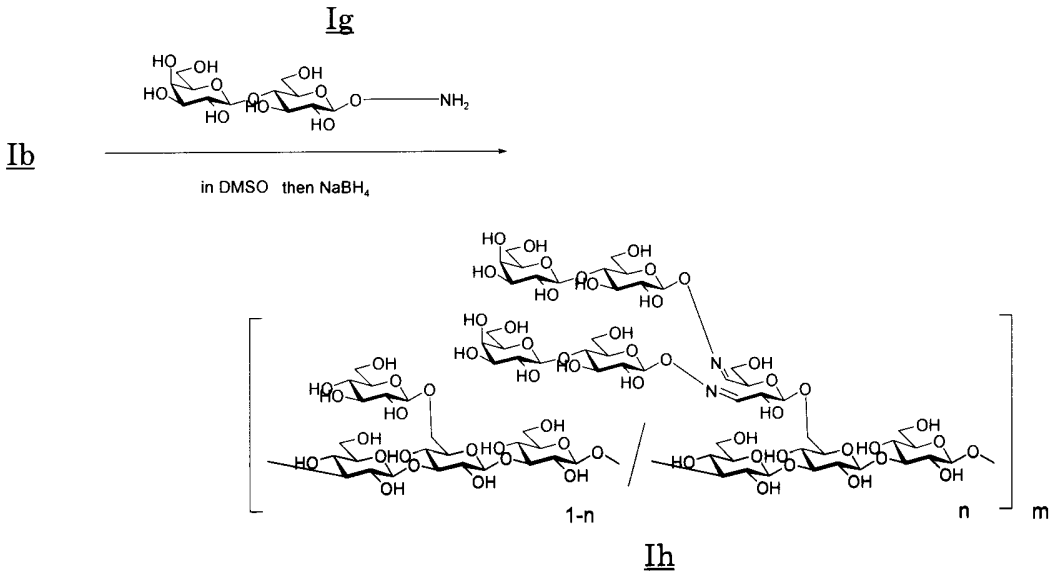

L :
OH
OH
O
C
H
N
HO
OH

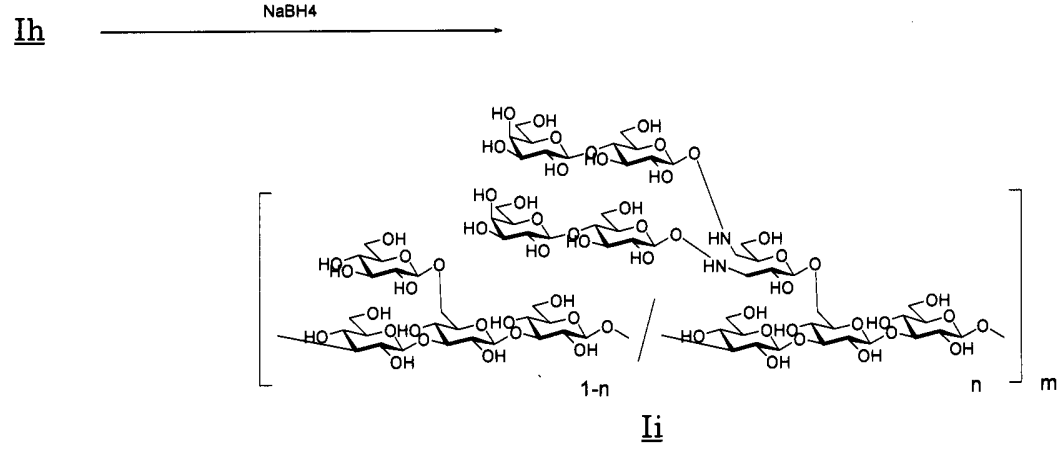

Ib
Aqueous ammonia, then NaBH4
Ie
in DMSO
NH
1-n
n
m

If

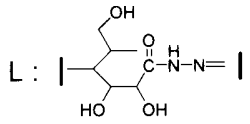
[図1D]

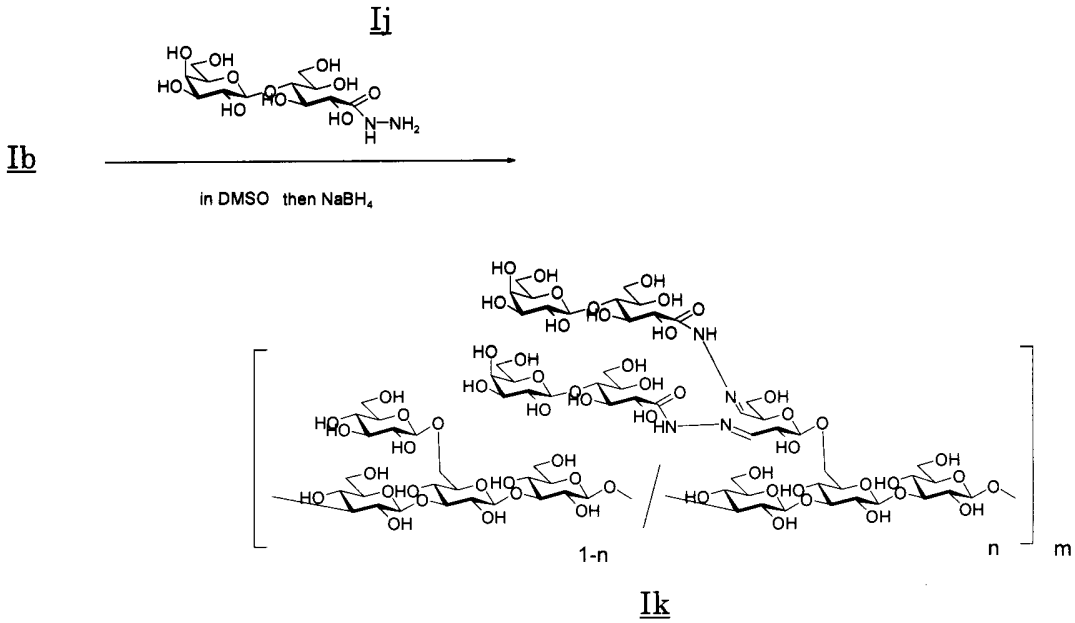
L : | —O-N= |



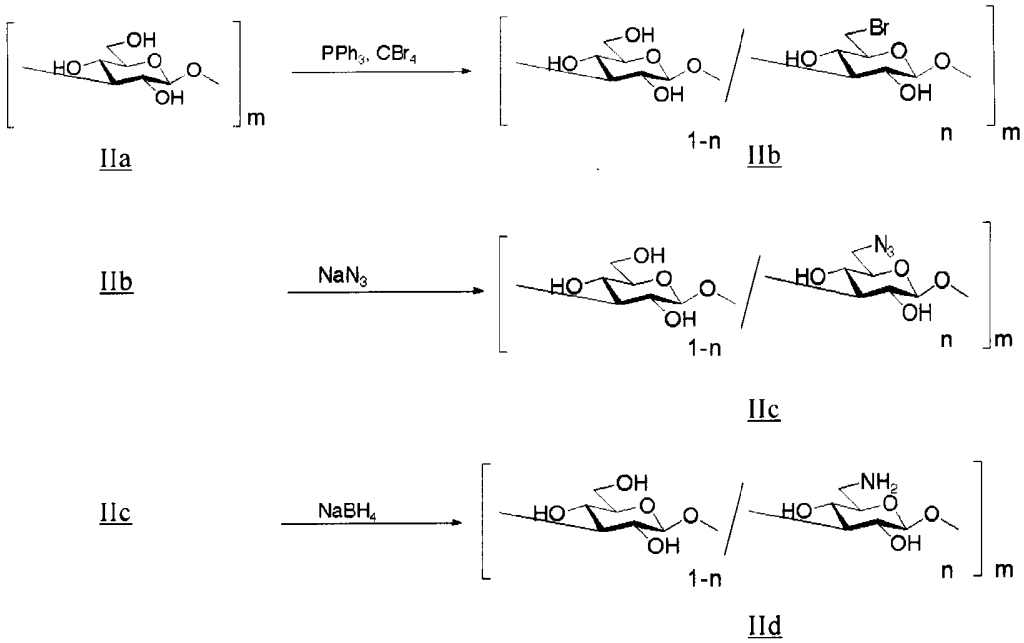



[図1E]

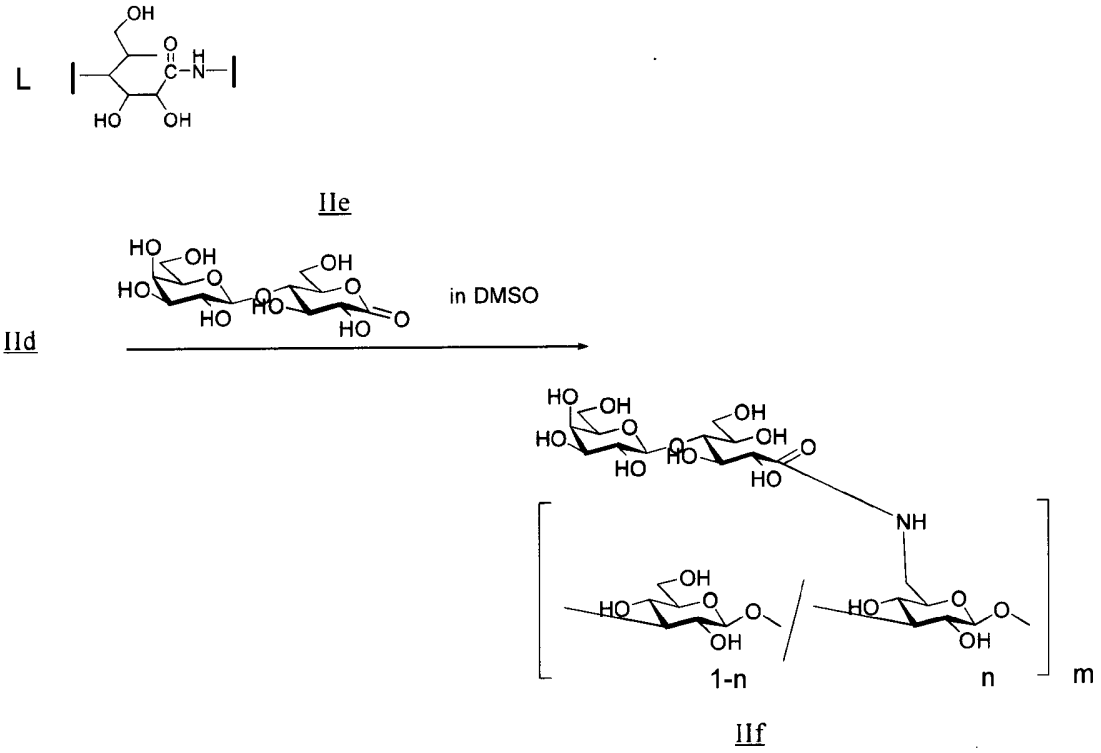



Ij
Ib
in DMSO then NaBH4
1-n
n
m
Ik

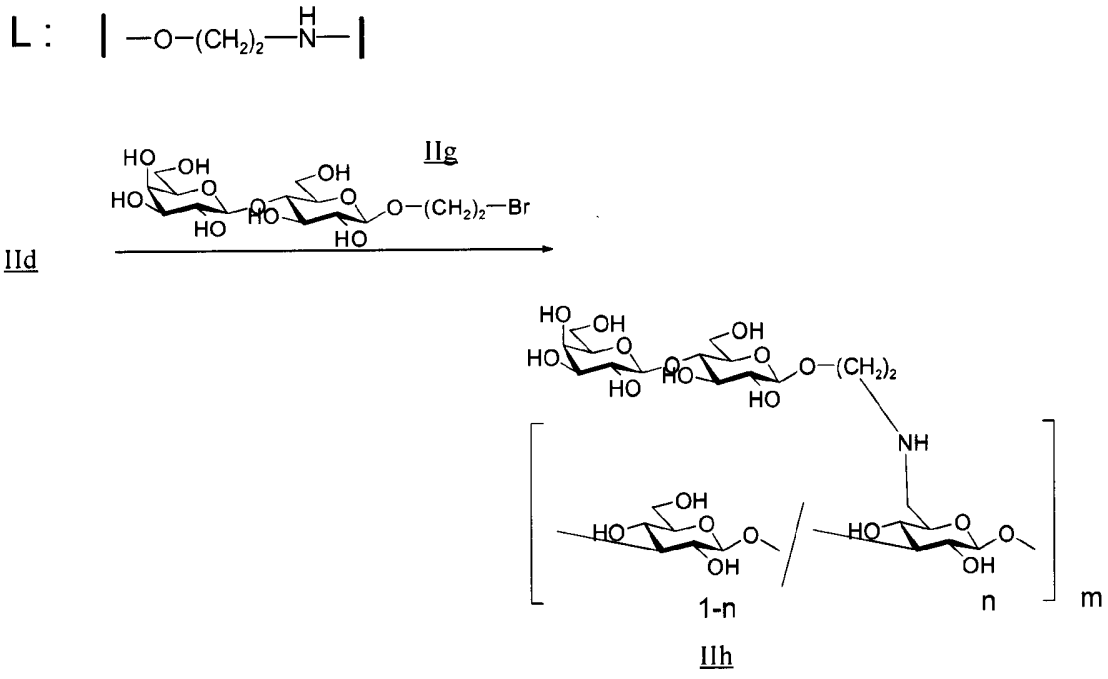
[図2A]


PPh3, CBr4
IIa
1-n
IIb
NaN3
IIc
NaBH4
IIc
IId

[図2B]

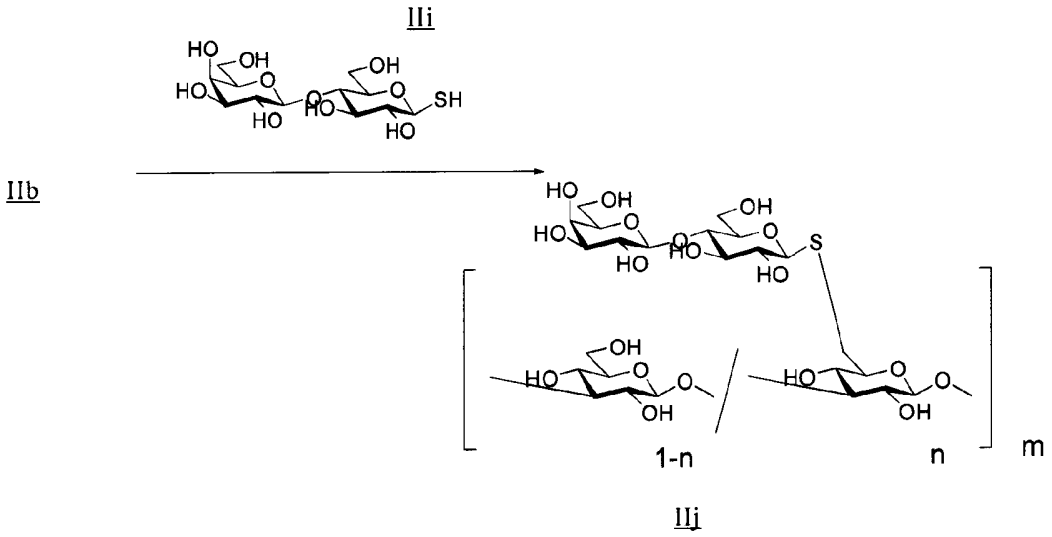



[図2C]



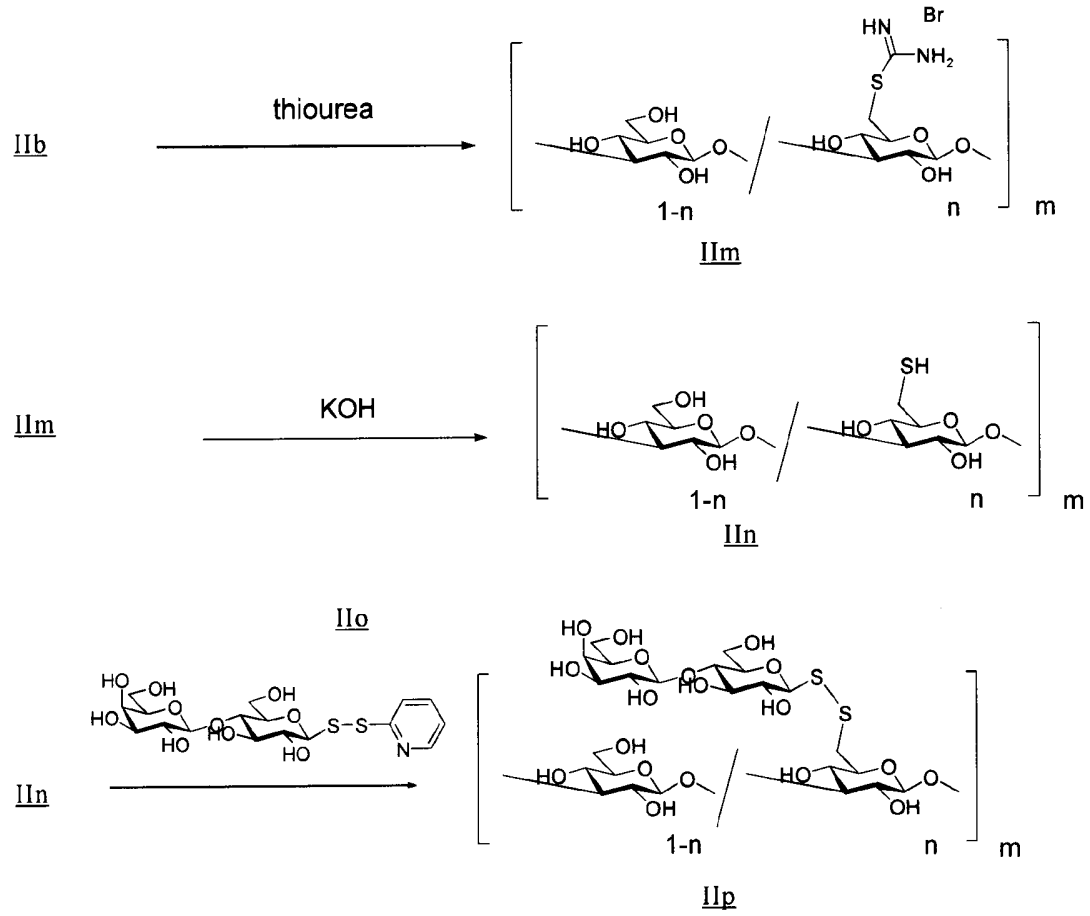
[図2D]

L : | —S—|

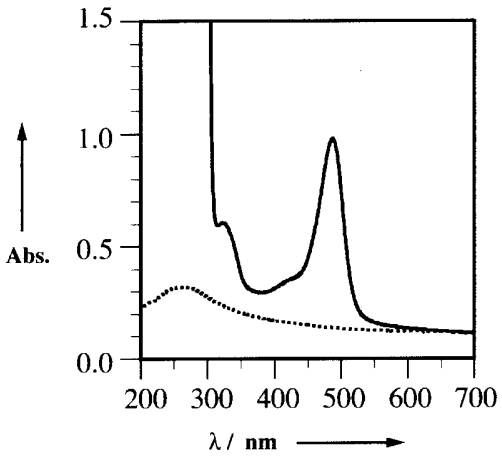



[図2E]

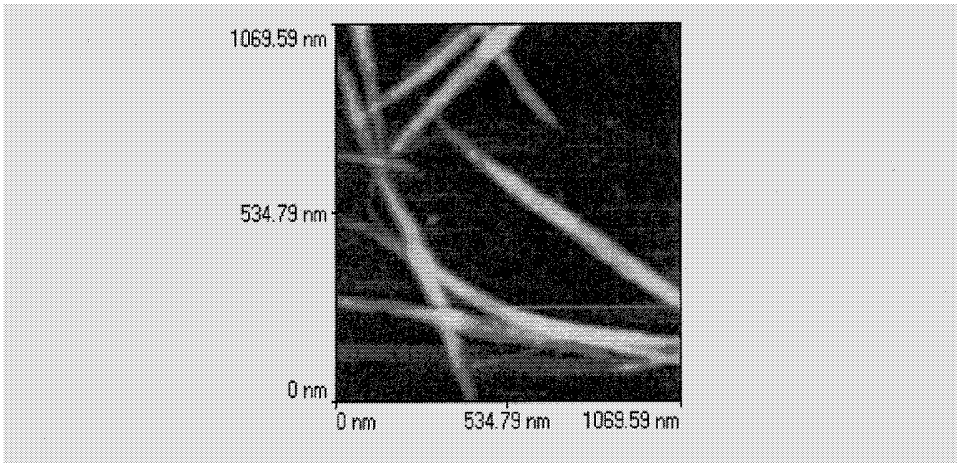
L : | —S-S— |



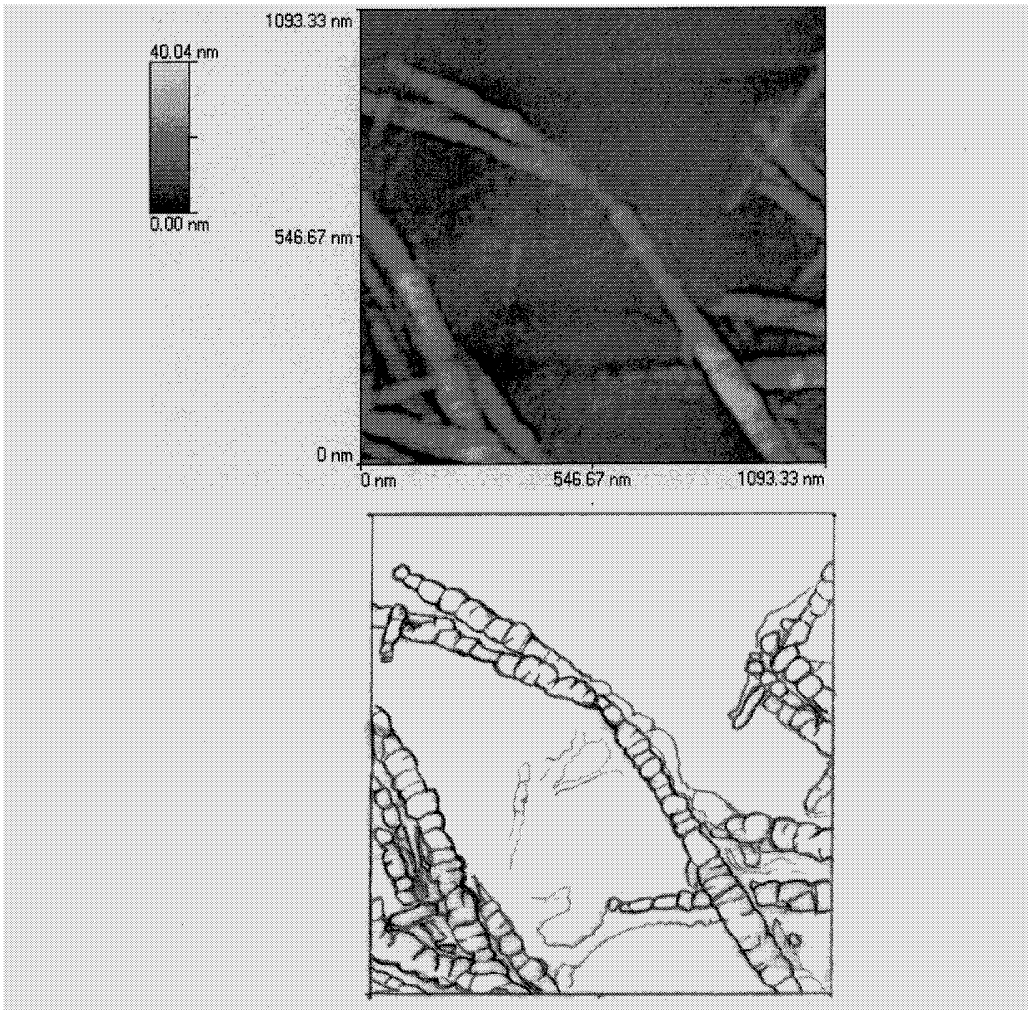
[図3]


1.5
1.0
0.5
0.0
Abs.
200 300 400 500 600 700
λ / nm

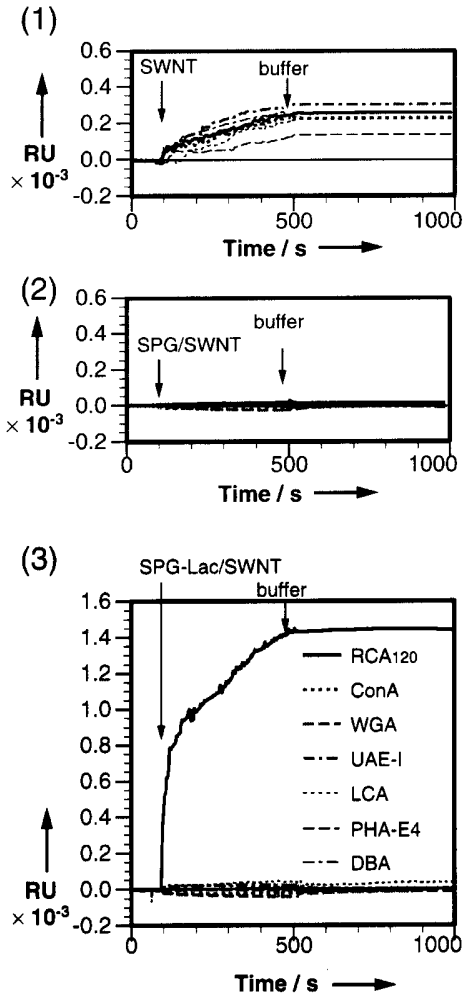
[図4]


1069.59 nm
534.79 nm
0 nm
0 nm
534.79 nm
1069.59 nm

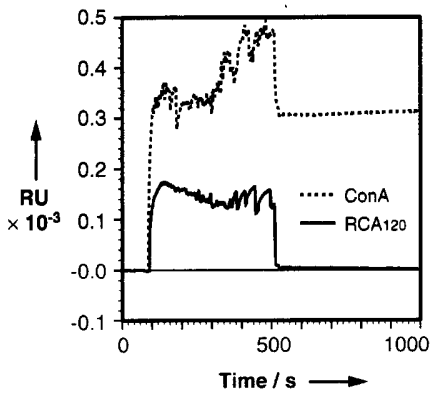
[図5]



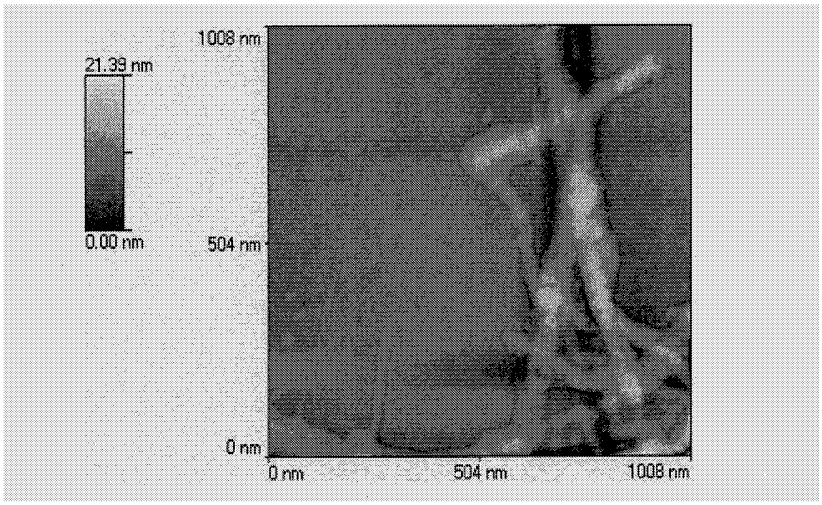
[図6]


(1)
SWNT
buffer
RU
× 10-3
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0
500
1000
Time / s
(2)
SPG/SWNT
buffer
(3)
SPG-Lac/SWNT
buffer
RCA120
ConA
WGA
UAE-I
LCA
PHA-E4
DBA
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8

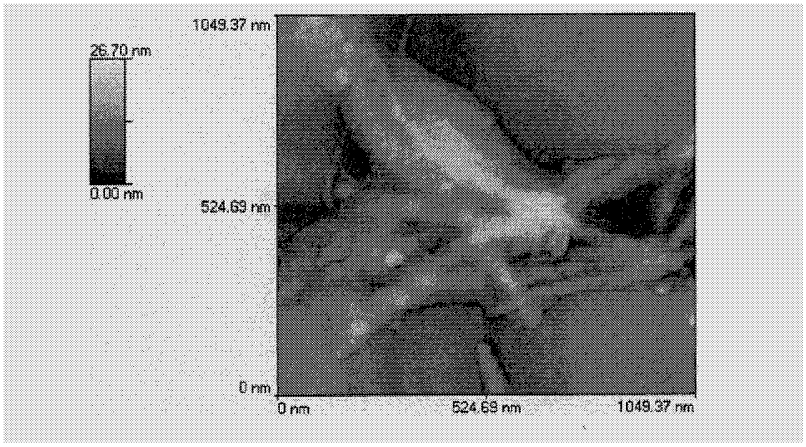
[図7]


RU
× 10-3
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
-0.0
-0.1
ConA
RCA120
0
500
1000
Time / s

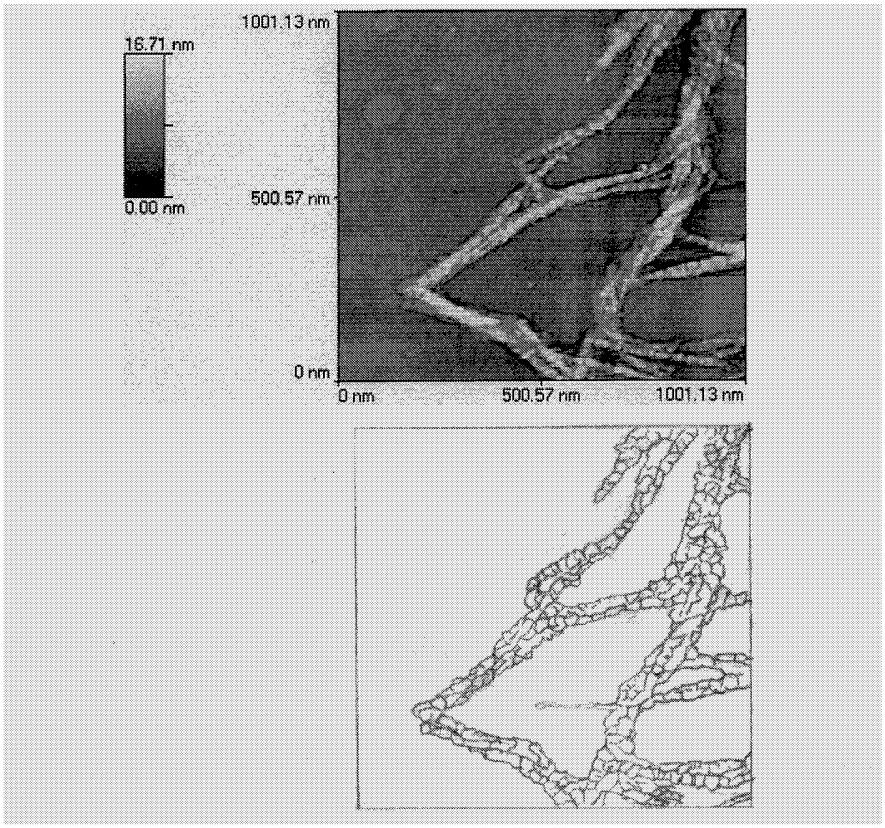
[図8]


1008 nm
21.39 nm
0.00 nm
504 nm
0 nm
0 nm
504 nm
1008 nm

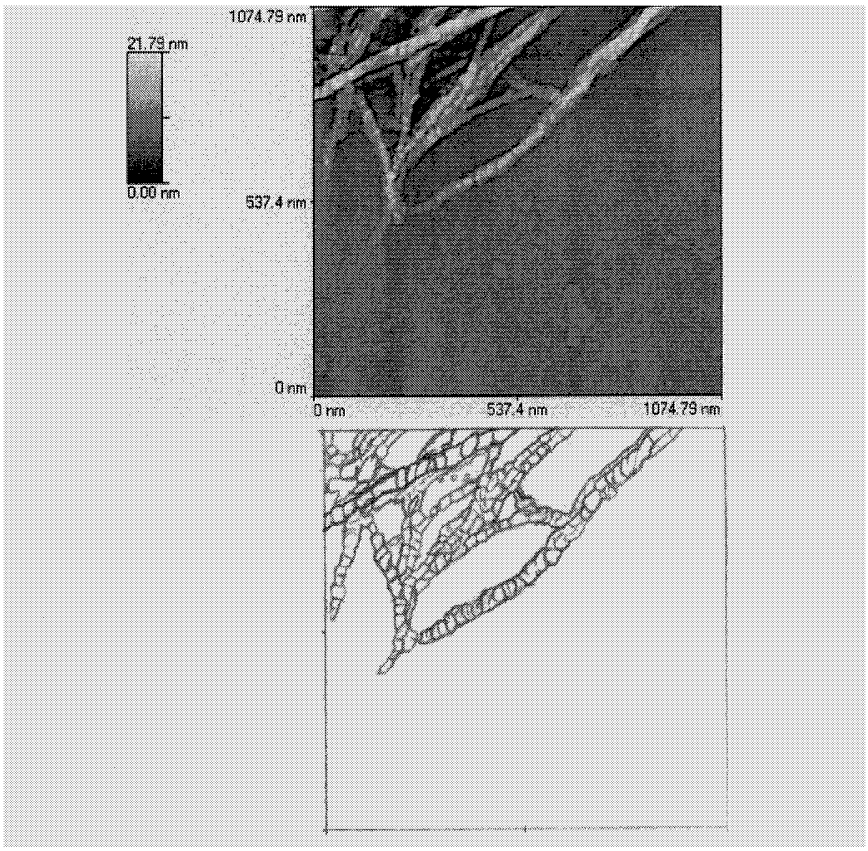
[図9]


1049.37 nm
26.70 nm
0.00 nm
524.69 nm
0 nm
0 nm
524.69 nm
1049.37 nm

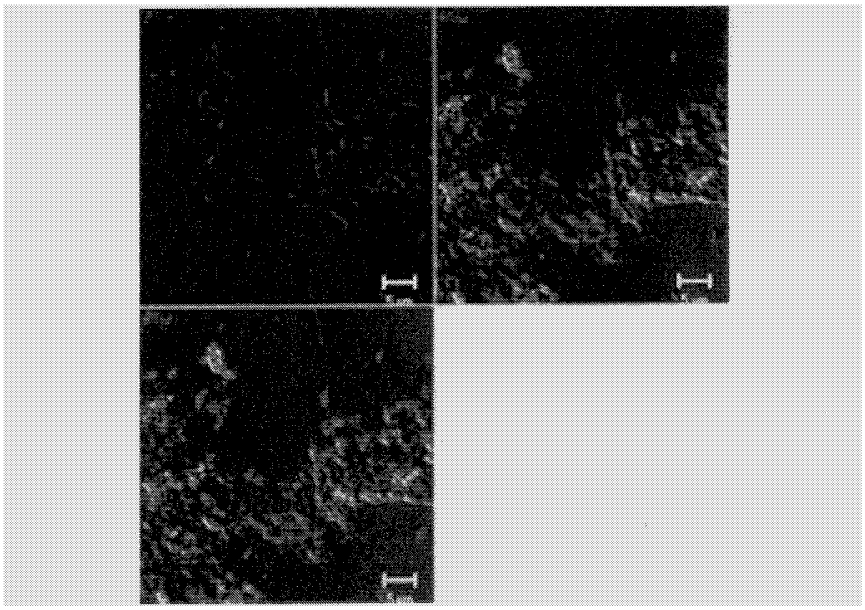
[図10]


1001.13 nm
16.71 nm
0.00 nm
500.57 nm
0 nm
0 nm
500.57 nm
1001.13 nm

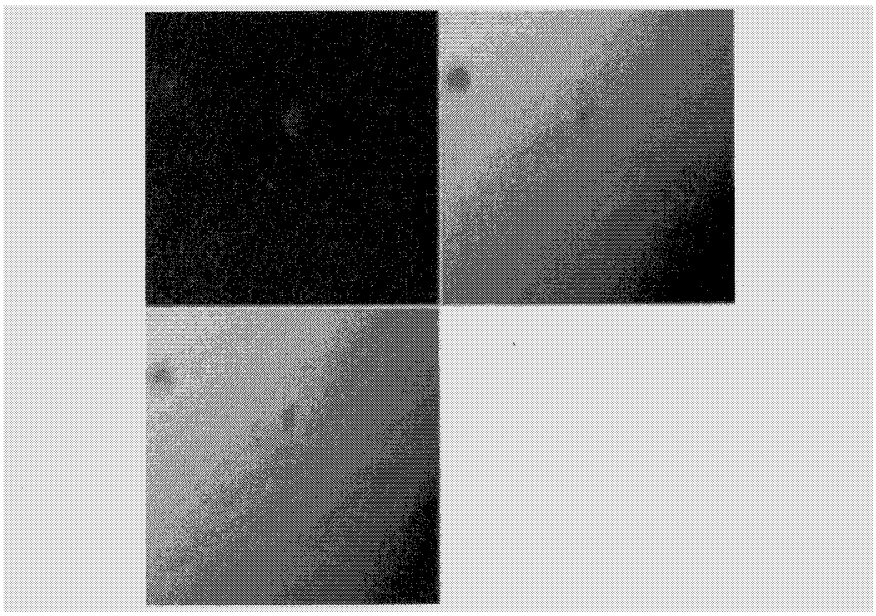
[図11]



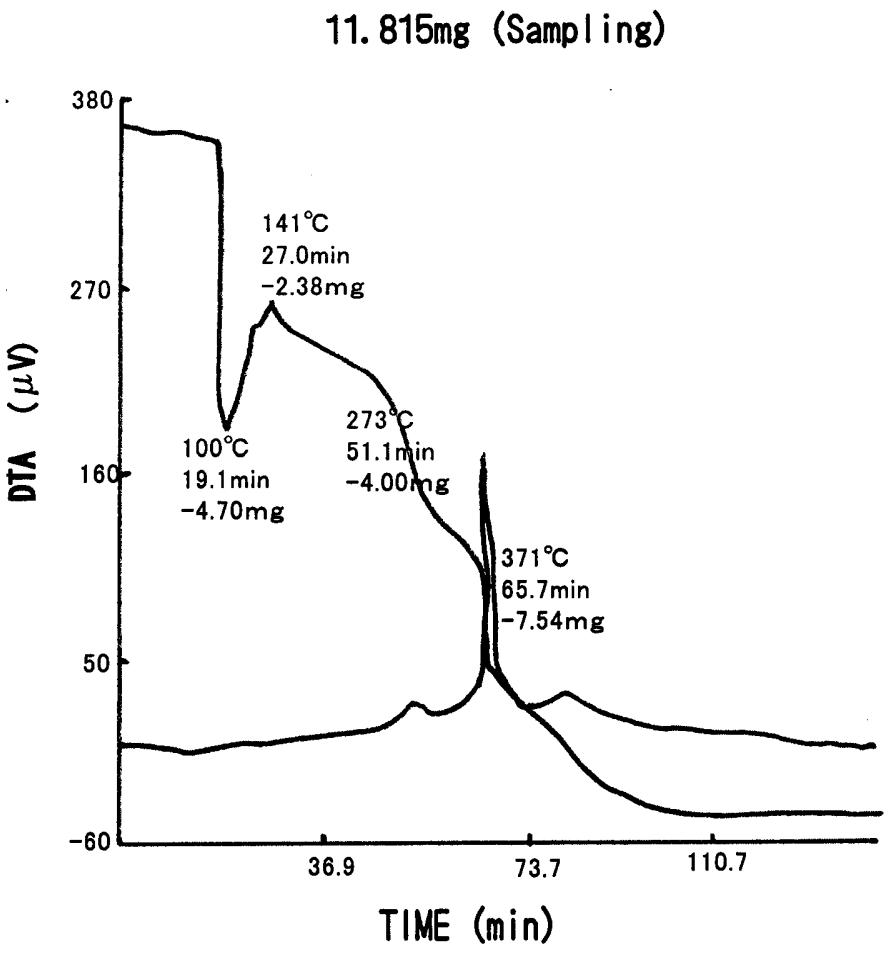

[図12]



[図13]



[図14]


11.815mg (Sampling)
380
270
160
50
-60
DTA (μV)
141℃
27.0min
-2.38mg
100℃
19.1min
-4.70mg
273℃
51.1min
-4.00mg
371℃
65.7min
-7.54mg
36.9
73.7
110.7
TIME (min)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/008352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C08L3/00, B82B1/00, C01B31/02, C08K3/04//C08B37/00, G01N33/53

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[7] C08L1/00-5/16, B82B1/00, C01B31/02, C08K3/04//C08B37/00, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP 2003-249122 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 05 September, 2003 (05.09.03), Claims; Par. Nos. [0020] to [0021], [0039], [0044], [0047] (Family: none) | 1-8 |
| A | JP 2004-121154 A (Japanese Research Soc. for Cancer), 22 April, 2004 (22.04.04), Claims; Par. Nos. [0019] to [0020] & WO 2004/031381 A1 | 1-8 |
| A | JP 2004-43258 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) 12 February, 2004 (12.02.04), Claims; Par. No. [0018] (Family: none) | 1-8 |

[X] 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 22 July, 2005 (22.07.05) | 09 August, 2005 (09.08.05) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office<br>Facsimile No. | Authorized officer<br>Telephone No. |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/008352

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| P,X<br>P,A | JP 2005-104762 A (Japan Science and Technology Agency, Masami MIZU), 21 April, 2005 (21.04.05), Claims; Par. Nos. [0012] to [0013], [0015] to [0016] (Family: none) | 1-6,8<br>7 |
| P,A | JP 2004-230545 A (Sanyo Electric Co., Ltd.), 19 August, 2004 (19.08.04), Claims; Par. Nos. [0015], [0046] & US 2004142172 A1 | 1-8 |

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００５／００８３５２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.[7]
C08L3/00, B82B1/00, C01B31/02, C08K3/04 // C08B37/00, G01N33/53

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.[7]
C08L1/00-5/16, B82B1/00, C01B31/02, C08K3/04, C08B37/00, G01N33/53

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 | １９７１－２００５年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２００５年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２００５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）

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 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| Ａ | ＪＰ　２００３－２４９１２２　Ａ（富士写真フィルム株式会社）２００３．０９．０５，特許請求の範囲，【００２０】～【００２１】，【００３９】，【００４４】，【００４７】　（ファミリーなし） | １－８ |
| Ａ | ＪＰ　２００４－１２１１５４　Ａ（財団法人癌研究会）２００４．０４．２２，特許請求の範囲，【００１９】～【００２０】＆　ＷＯ　２００４／０３１３８１　Ａ１ | １－８ |

☑ 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<br>２２．０７．２００５ | 国際調査報告の発送日<br>09.08.2005 |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）<br>郵便番号１００－８９１５<br>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）　４Ｊ　９５５３<br>内田　靖恵<br>電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５７ |

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００４年１月）

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 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| Ａ | ＪＰ　２００４－４３２５８　Ａ（独立行政法人産業技術総合研究所）２００４．０２．１２，特許請求の範囲，【０００８】（ファミリーなし） | １－８ |
| ＰＸ<br>ＰＡ | ＪＰ　２００５－１０４７６２　Ａ（独立行政法人科学技術振興機構，水　雅美）２００５．０４．２１，特許請求の範囲，【００１２】～【００１３】，【００１５】～【００１６】　（ファミリーなし） | １－６，８<br>７ |
| ＰＡ | ＪＰ　２００４－２３０５４５　Ａ（三洋電機株式会社）２００４．０８．１９，特許請求の範囲，【００１５】，【００４６】＆ ＵＳ　２００４１４２１７２　Ａ１ | １－８ |