

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/133306

発行日 平成26年7月28日 (2014. 7. 28)

(43) 国際公開日 平成24年10月4日 (2012. 10. 4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/52 (2006. 01)	GO 1 N 33/52 C	2 G O 4 5
GO 1 N 21/78 (2006. 01)	GO 1 N 21/78 C	2 G O 5 4
GO 1 N 33/58 (2006. 01)	GO 1 N 33/58 A	
GO 1 N 30/88 (2006. 01)	GO 1 N 30/88 D	
	GO 1 N 30/88 2 O 1 R	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

出願番号 特願2013-507559 (P2013-507559)	(71) 出願人 506075584 株式会社T A Sプロジェクト 福岡県福岡市早良区室見五丁目11番20-202号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/057750	
(22) 国際出願日 平成24年3月26日 (2012. 3. 26)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-68146 (P2011-68146)	(74) 代理人 100068618 弁理士 粁 経夫
(32) 優先日 平成23年3月25日 (2011. 3. 25)	(74) 代理人 100104145 弁理士 宮崎 嘉夫
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100104385 弁理士 加藤 勉
	(74) 代理人 100163360 弁理士 伴 知篤
	(72) 発明者 佐々木 茂貴 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水性検体溶液中の8-オキソ2'-デオキシグアノシンを高感度で定量検出する方法

(57) 【要約】

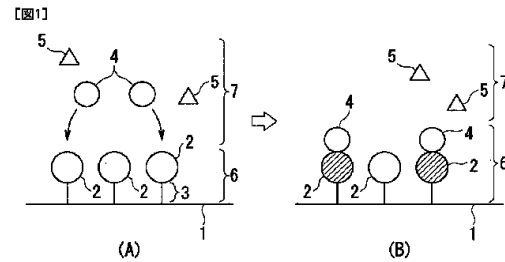
【課題】 水性検体溶液中の8-オキソ2'-デオキシグアノシンを高感度で定量検出する方法を提供する。

【解決手段】 水性検体溶液中の8-オキソ2'-デオキシグアノシンを定量検出する方法であって、

1) 微粒子の表面にスペーサーユニットを介して8-オキソ2'-デオキシグアノシンに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を固定し、該微粒子に前記検体溶液を接触させる工程、及び

2) 前記検体溶液との接触の前と後の前記微粒子における物性変化を測定する工程を含む方法。

【選択図】 なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性検体溶液中の 8 - オキソ 2' - デオキシグアノシンを定量検出する方法であって、
1) 微粒子の表面にスペーサーユニットを介して 8 - オキソ 2' - デオキシグアノシン
に対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を固定し、該微粒子に前記検体溶液を
接触させる工程、及び

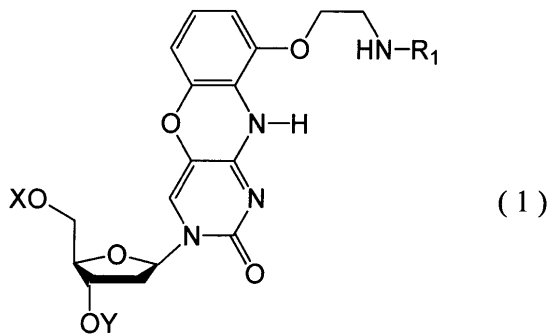
2) 前記検体溶液との接触の前と後の前記微粒子における物性変化を測定する工程を含む
方法。

【請求項 2】

前記 8 - オキソ 2' - デオキシグアノシンに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プロー
ブ分子が、式 (1)

10

【化 1】



20

(式中、 R_1 は、6 - アミノ - 2 - ピリジル基又は $-CO_2(CH_2)_l R_2$ (式中、 R_2 は水
素原子又は炭素原子数 6 ないし 16 のアシル基を表し、 l は、1 ~ 3 の整数を表す。)
を表し、 X 及び Y は、一方が、ヒドロキシ基の保護基を表し、もう一方が、スペーサーユ
ニットを表すものである。) で表される分子である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

X がスペーサーユニット (該スペーサーユニットは、 $(CH_2)_m - NHCO -$ (式中、
 m は 2 ~ 10 の整数を表す。)) を表し、 Y が $-SiR_3R_4R_5$ (式中、 R_3 、 R_4
及び R_5 は、それぞれ独立して、メチル基、第三ブチル基又はフェニル基を表す。)) を表
す請求項 2 記載の方法。

30

【請求項 4】

前記微粒子が、無機粒子又はポリマー樹脂粒子であり、前記物性変化の測定が蛍光強度の
測定により行われる請求項 1 ないし 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記無機粒子が、シリカゲル粒子である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記微粒子をマイクロプレートのウェルに入れて該ウェル内に乾着させ、該ウェル内に前
記水性検体溶液を入れて加温しながら微粒子の蛍光強度を測定することにより前記定量検
出を行う請求項 4 又は 5 記載の方法。

40

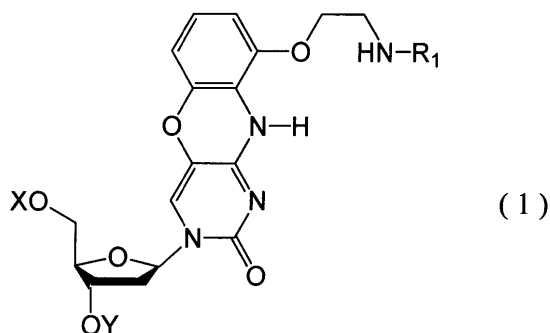
【請求項 7】

前記微粒子をカラムに充填し、該カラムに前記水性検体溶液を流し、充填された微粒子の
蛍光強度を測定することにより前記定量検出を行う請求項 4 又は 5 記載の方法。

【請求項 8】

表面にスペーサーユニットを介して式 (1)

【化 2】



10

(式中、 R_1 は、6-アミノ-2-ピリジル基又は $-CO_2(CH_2)_l R_2$ (式中、 R_2 は水素原子又は炭素原子数6ないし16のアリール基を表し、 l は、1~3の整数を表す。)を表し、 X 及び Y は、一方が、ヒドロキシ基の保護基を表し、もう一方が、スパーサーユニットを表すものである。)で表される分子を固定したシリカゲル粒子。

【請求項 9】

X がスパーサーユニット(該スパーサーユニットは、 $(CH_2)_m - NHCO -$ (式中、 m は2~10の整数を表す。)を表す。)を表し、 Y が $-SiR_3R_4R_5$ (式中、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、メチル基、第三ブチル基又はフェニル基を表す。)を表す請求項8記載のシリカゲル粒子。

20

【請求項 10】

8-オキソ 2'-デオキシグアノシンを分離するための分離カラムであって、請求項8又は9記載のシリカゲル粒子を充填材として使用する分離カラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水性検体溶液中の8-オキソ 2'-デオキシグアノシンを高感度で定量検出する方法に関するものであり、詳細には、水性検体溶液中の8-オキソ 2'-デオキシグアノシンを定量検出する方法であって、

1) 微粒子の表面にスパーサーユニットを介して8-オキソ 2'-デオキシグアノシンに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を固定し、該微粒子に前記検体溶液を接触させる工程、及び

30

2) 前記検体溶液との接触の前と後の前記微粒子における物性変化を測定する工程を含む方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

8-オキソ 2'-デオキシグアノシン(以降、8-oxo-dGとも記載する)は、環境因子や生体内の代謝活動に伴って生成する活性酸素の量を直接反映することから、酸化ストレスマーカーとして注目されている。そのため、生体内・尿中の8-oxo-dGの存在量を正確に計測することは、突然変異や老化、多くの疾患を研究する上で極めて意義がある。これまでに8-oxo-dGの検出法としてHPLCと電気化学検出器を組み合わせたHPLC-ECD法(例えば、非特許文献1参照)、ガスクロマトグラフィーと質量分析計を利用したGC-MS法(例えば、非特許文献2参照)等の機器分析法や、モノクローナル抗体によるELISA法(例えば、非特許文献3参照)等の検出法が開発されている。

40

【0003】

しかし、上記のような検出法では、生きた細胞内で、“リアルタイム”に8-oxo-dGの存在を定量的に観察することは困難であった。

上記を可能とするために、8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブが開発されている(例えば、非特許文献4、5参照)。

この低分子蛍光プローブは有機溶媒中で多点水素結合形成することにより8-oxo-dGを認

50

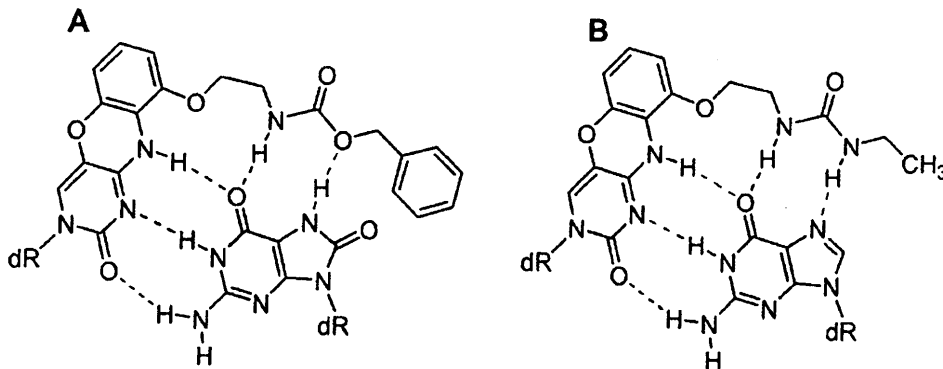
識し、特異的に蛍光消光を示すものであるため、蛍光消光の程度を測定することにより、系中に存在する8-oxo-dGの量を検出できるものである。

また、これらの低分子蛍光プローブの誘導体展開の中から、2'-デオキシグアノシン（以降、dGとも記載する）に対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブも見出されている（例えば、非特許文献6参照）。

以下に、8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブが8-oxo-dGを認識して多点水素結合を形成する様式（A）及びdGに対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブがdGを認識して多点水素結合を形成する様式（B）を示す。

尚、Aで示される8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブの、クロロホルム溶液中における8-oxo-dGとの錯体形成能は、dGとの錯体形成能の10倍であり、Bで示されるdGに対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブの、クロロホルム溶液中におけるdGとの錯体形成能は、8-oxo-dGとの錯体形成能の25倍であると報告されている。

【化1】



しかし、上記の8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す低分子蛍光プローブは、多点水素結合形成によりを精密に認識するものであり、そして、プロトン性極性溶媒である水中においては、水素結合は殆ど機能しないため、水中では多点水素結合形成により8-oxoGを認識することはできないことになり、従って、高水溶性の8-oxo-dGを尿等の水溶液中で直接検出することは困難であった。

更に、尿中の通常の8-oxo-dGの濃度は非常に低い10-20ng/mL（分子量283とすると35-70 nM）程度と報告されているため、低分子蛍光プローブを尿中の8-oxo-dGの検出のために使用するためには、これより低い濃度での検出が可能となるよう感度を向上させる必要があった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Hofer, T., Seo, A. Y., Prudencio, M., Leeuwenburgh, C.; *Biol. Chem.*, 387, p.103-113 (2006)

【非特許文献2】Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H.; *Free Radical Biol. Med.*, 32, p.1102-1105 (2002)

【非特許文献3】Nakae, Y., Stoward, P. J., Bessalov, I. A., Melamed, Wallace, S. S.; *Histochem. Cell Biol.*, 124, p.335-345 (2005)

【非特許文献4】Nakagawa, O., Ono, S., Li, Z., Tsujimoto, A., Sasaki, S.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, p.4500-4503 (2007)

【非特許文献5】Nasr, T., Li, Z., Nakagawa, O., Taniguchi, Y., Sasaki, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, p.727-730 (2009)

【非特許文献6】Li, Z., Nakagawa, O., Koga, Y., Taniguchi, Y., Sasaki, S.; *Bioorg. Med. Chem.*, 18, p.3992-3998 (2010)

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、水性検体溶液中の8-オキソ 2'-デオキシグアノシン(8-oxo-dG)を高感度で定量検出する方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を、スペーサーユニットを介して微粒子表面上に固定すると、該微粒子表面上に微小疎水空間が形成され、それにより、水性検体溶液を用いた場合でも多点水素結合形成により8-oxo-dGを認識でき、結果として8-oxo-dGの定量検出が可能となることを見出し、また、その際、検出感度を飛躍的に向上させることができ、例えば、尿中の8-oxo-dGの定量検出が十分可能となるまで感度を向上させ得ることを見出し、本発明を完成させた。

またこれにより、8-oxo-dGの高感度での定量検出に用いるデバイスの提供も可能となる。

【0007】

即ち、本発明は、

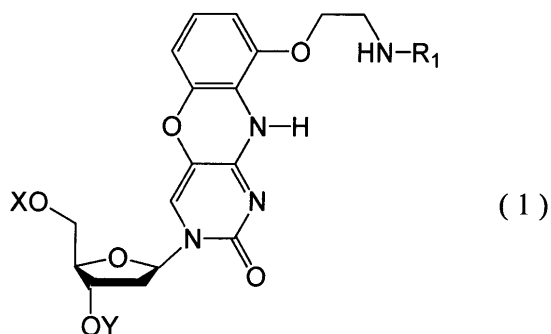
[1] 水性検体溶液中の8-オキソ 2'-デオキシグアノシンを定量検出する方法であって、

1) 微粒子の表面にスペーサーユニットを介して8-オキソ 2'-デオキシグアノシンに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を固定し、該微粒子に前記検体溶液を接触させる工程、及び

2) 前記検体溶液との接触の前と後の前記微粒子における物性変化を測定する工程を含む方法、

[2] 前記8-オキソ 2'-デオキシグアノシンに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子が、式(1)

【化2】



(式中、 R_1 は、6-アミノ-2-ピリジル基又は $-CO_2(CH_2)_l R_2$ (式中、 R_2 は水素原子又は炭素原子数6ないし16のアリール基を表し、 l は、1~3の整数を表す。)を表し、 X 及び Y は、一方が、ヒドロキシ基の保護基を表し、もう一方が、スペーサーユニットを表すものである。)で表される分子である前記[1]記載の方法、

[3] X がスペーサーユニット(該スペーサーユニットは、 $(CH_2)_m - NHCO -$ (式中、 m は2~10の整数を表す。))を表し、 Y が $-SiR_3R_4R_5$ (式中、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、メチル基、第三ブチル基又はフェニル基を表す。)を表す前記[2]記載の方法、

[4] 前記微粒子が、無機粒子又はポリマー樹脂粒子であり、前記物性変化の測定が蛍光強度の測定により行われる前記[1]ないし[3]の何れか1つに記載の方法、

[5] 前記無機粒子が、シリカゲル粒子である前記[4]記載の方法、

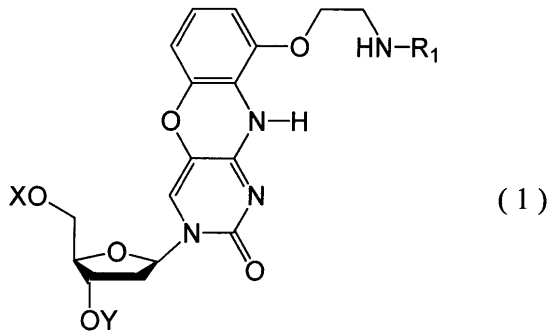
[6] 前記微粒子をマイクロプレートのウェルに入れて該ウェル内に乾着させ、該ウェル内に前記水性検体溶液を入れて加温しながら微粒子の蛍光強度を測定することにより前記

定量検出を行う前記 [4] 又は [5] 記載の方法、

[7] 前記微粒子をカラムに充填し、該カラムに前記水性検体溶液を流し、充填された微粒子の蛍光強度を測定することにより前記定量検出を行う前記 [4] 又は [5] 記載の方法、

[8] 表面にスパーサーユニットを介して式 (1)

【化 3】



10

(式中、 R_1 は、6 - アミノ - 2 - ピリジル基又は $-CO_2(CH_2)_l R_2$ (式中、 R_2 は水素原子又は炭素原子数 6 ないし 16 のアリール基を表し、 l は、1 ~ 3 の整数を表す。) を表し、 X 及び Y は、一方が、ヒドロキシ基の保護基を表し、もう一方が、スパーサーユニットを表すものである。) で表される分子を固定したシリカゲル粒子、

20

[9] X がスパーサーユニット (該スパーサーユニットは、 $(CH_2)_m - NHCO -$ (式中、 m は 2 ~ 10 の整数を表す。) を表す。) を表し、 Y が $-SiR_3R_4R_5$ (式中、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、メチル基、第三ブチル基又はフェニル基を表す。) を表す前記 [8] 記載のシリカゲル粒子、

[10] 8 - オキソ 2' - デオキシグアノシンを分離するための分離カラムであって、前記 [8] 又は [9] 記載のシリカゲル粒子を充填材として使用する分離カラム、に関するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、水性検体溶液中の 8-oxo-dG を高感度で定量検出する方法を提供することができる。

30

本発明の方法は、8-oxo-dG に対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を用いることにより非常に簡便な操作で 8-oxo-dG の高感度の定量検出を達成することができるため非常に優れた方法といえる。

図 1 に本発明の概念図を示した。

図 1 のように、微粒子表面 1 にスパーサーユニット 3 を介して 8-oxo-dG 4 に対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子 2 が固定されると、表面上に微小疎水空間 6 が形成され、水相 7 に存在する dG 5 と 8-oxo-dG 4 のうち 8-oxo-dG 4 だけが、微小疎水空間 6 の中でプローブ分子 2 と多点水素結合を形成し、8-oxo-dG 4 と多点水素結合した蛍光プローブ分子 2 だけが蛍光消光することになる。

40

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図 1】本発明を説明する概念図である。

【図 2】蛍光プローブ分子 (8-oxo-dG 選択的) を導入した微粒子を充填したカラムを用いる態様を説明する模式図である。

【図 3】シリカゲル粒子 (33) ~ (35) の蛍光反応性を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図 4】シリカゲル粒子 (33) における 8-oxo-dG 及び dG の濃度に対する蛍光相対強度のグラフ (左) 及びこの際の 8-oxo-dG 濃度に対する消光率を $h i l l$ プロットに変換したグラフ (右) である。

【図 5】シリカゲル粒子 (34) における 8-oxo-dG 及び dG の濃度に対する蛍光相対強度の

50

グラフ（左）及びこの際の8-oxo-dG濃度に対する消光率をh i l lプロットに変換したグラフ（右）である。

【図6】シリカゲル粒子（35）における8-oxo-dG及びdGの濃度に対する蛍光相対強度のグラフ（左）及びこの際の8-oxo-dG濃度に対する消光率をh i l lプロットに変換したグラフ（右）である。

【図7】8-oxo-dGによるシリカゲル粒子（33）～（35）の蛍光消光に対するdG濃度（8-oxo-dGに対して0-100倍濃度）の影響を示すグラフである。

【図8】シリカゲル粒子（33）をウェル表面に乾着させたマイクロプレートに8-oxo-dGの標準品（濃度：0～500ng/mL）を添加した後、30分～4時間における、8-oxo-dG濃度0～500ng/mLに対する光学濃度値（OD値）の減衰率（添加前と比較した相対強度%）を示すグラフである。

10

【図9】シリカゲル粒子（33）をウェル表面に乾着させたマイクロプレートに8-oxo-dGの標準品（濃度：0～500ng/mL）を添加した後、30分～4時間における、8-oxo-dG濃度0～20ng/mLに対する光学濃度値（OD値）の減衰率（添加前と比較した相対強度%）を示すグラフである。

【図10】シリカゲル粒子（39）をウェル表面に乾着させたマイクロプレートに8-oxo-dGの標準品（濃度：0～500ng/mL）を添加した後、30分～4時間における、8-oxo-dG濃度0～500ng/mLに対する光学濃度値（OD値）の減衰率（添加前と比較した相対強度%）を示すグラフである。

【図11】シリカゲル粒子（39）をウェル表面に乾着させたマイクロプレートに8-oxo-dGの標準品（濃度：0～500ng/mL）を添加した後、30分～4時間における、8-oxo-dG濃度0～20ng/mLに対する光学濃度値（OD値）の減衰率（添加前と比較した相対強度%）を示すグラフである。

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

更に詳細に本発明を説明する。

本発明の水性検体溶液中の8-オキソ 2'-デオキシグアノシンを定量検出する方法は、

1) 微粒子の表面にスパーサーユニットを介して8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子を固定し、該微粒子に前記検体溶液を接触させる工程、及び

30

2) 前記検体溶液との接触の前と後の前記微粒子における物性変化を測定する工程を含む。

【0011】

本発明に使用し得る水性検体溶液としては、8-oxo-dGが含まれている可能性のある水性溶液であれば特に限定されるものではないが、例えば、ヒトを含む動物、植物、細菌又は真菌から採取した生体細胞由来の水性溶液（例えば、血液、尿、その他の体液、組織破碎液、細胞破碎液等）が挙げられ、また、生体内に存在する水性溶液、例えば、細胞内液、細胞外液等も本発明の水性検体溶液の概念に含まれる。

上記に加えて、本発明に使用し得る水性検体溶液としては、天然及び人工化学物質を含む食品、化粧品、医薬品、廃棄物を原材料としたリサイクル商品等の水溶液、土壌及び大気成分の抽出水、環境水等も含まれる。

40

【0012】

本発明に使用し得る定量検出の方法は、蛍光測定を行うことにより達成可能であるが、吸収スペクトル、特に、紫外線の吸収スペクトルの測定することによっても達成可能である。

蛍光測定により定量検出を行なう場合、励起光として、波長が300～400nm、好ましくは、330～380nm、より好ましくは345～365nmの紫外線を照射し、これにより放出される410～520nm、好ましくは、420～470nmの蛍光の強度を測定することにより達成される。

【0013】

50

具体的な蛍光消光による定量検出は、事前に、蛍光プローブ分子を固定した微粒子に、種々の濃度の標準となる8-oxo-dGを添加し、蛍光強度を測定することで検量線を作成し、検体溶液を用いた際に測定された蛍光強度を検量線と照らし合わせるにより、8-oxo-dGの濃度を算出することにより達成される。

また、吸収スペクトルによる定量検出は、事前に、蛍光プローブ分子を固定した微粒子に、種々の濃度の8-oxo-dGを添加し、紫外線等の吸収スペクトルを測定し、吸収スペクトルが最も変化する波長領域における変化量から検量線を作成しておき、検体溶液を用いた際に測定された吸収スペクトルにおける前記波長領域における変化量を検量線と照らし合わせて8-oxo-dGの濃度を算出することにより達成される。

【0014】

10

本発明に使用し得る微粒子としては、無機粒子、ポリマー樹脂粒子の何れでも使用でき、その平均粒径は、例えば、0.001ないし100 μm の範囲が挙げられ、0.1ないし50 μm の範囲、また、1ないし20 μm の範囲が好ましい。

無機粒子の具体例としては、例えば、シリコン粒子（シリカゲル粒子）、石英ガラス粒子、アルミナ粒子、グラファイト粒子、カーボンナノチューブ粒子、グラフェン粒子、グラファイト粒子、フラーレン粒子等が挙げられる。

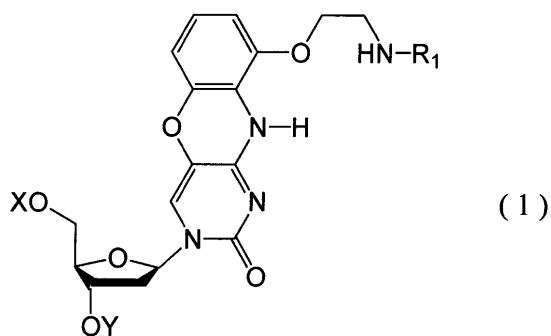
ポリマー樹脂粒子の具体例としては、ポリ-N-ドデシルアクリルアミド（PDAA）、ポリ（フェニルアセチレン）、ポリ（フェニレンブタジイニレン）、ポリピロール、ポリメチルメタクリレート（PMAA）、ポリビニルアルコール、ポリスチレン、セルロース等から構成される粒子が挙げられる。

20

【0015】

上記微粒子の表面に、スペーサーユニットを介して固定される8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子としては、式（1）

【化4】



30

（式中、 R_1 は、6-アミノ-2-ピリジル基又は $-\text{CO}_2(\text{CH}_2)_l R_2$ （式中、 R_2 は水素原子又は炭素原子数6ないし16のアリール基を表し、 l は、1~3の整数を表す。）を表し、 X 及び Y は、一方が、ヒドロキシ基の保護基を表し、もう一方が、スペーサーユニットを表すものである。）で表される分子が挙げられる。

【0016】

40

炭素原子数6ないし16のアリール基としては、フェニル基、ナフチル基、ピフェニル基、アントラセニル基、フェナンスレニル基、ピレニル基等が挙げられる。

ヒドロキシ基の保護基としては、トリメチルシリル基、第3ブチルジメチルシリル基、第3ブチルジエチルシリル基、第3ブチルジフェニルシリル基、メトキシメチル基、エトキシメチル基、エトキシエチル基、メトキシエトキシメチル基、第3ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等が挙げられる。

スペーサーユニットとしては、有機化学に分野で使用されるスペーサーユニットであれば特に限定されないが、具体的には、例えば、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{SCO}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CO}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_j-\text{CS}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_k-$ 、 $-(\text{CH}_2)_k-\text{CO}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_k-\text{OCO}$

50

-、- (CH₂)_k - S C O -、- (CH₂)_k - N H C O - 等が挙げられる。

尚、上記式の j は、1 ないし 10 の整数、好ましくは、1 ないし 4 の整数を表し、k は 2 ないし 30 の整数、好ましくは 2 ないし 12 の整数を表す。

また、スペーサーユニットは、上記微粒子の表面に、炭素原子、硫黄原子、酸素原子、窒素原子等による物理的吸着や共有結合により固定され得る。

【0017】

好ましい 8-oxo-dG に対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子は、X がスペーサーユニット（該スペーサーユニットは、(CH₂)_m - N H C O -（式中、m は 2 ~ 10 の整数を表す。）を表す。）を表し、Y が - S i R₃ R₄ R₅（式中、R₃、R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して、メチル基、第三ブチル基又はフェニル基を表す。）を表す分子である。

10

m が 3 である分子がより好ましい。

【0018】

好ましい水性検体溶液中の 8-oxo-dG を定量検出する方法は、また、微粒子が、無機粒子又はポリマー樹脂粒子であり、定量検出が蛍光消光の程度又は蛍光消光の程度と吸収スペクトルの変化の程度により行われる前記の方法である。

上記無機粒子及びポリマー樹脂粒子の具体例及び粒径並びに蛍光消光の程度又は蛍光消光の程度と吸収スペクトルの変化の程度による定量検出法は、上述の通りである。

微粒子が無機粒子であり、該無機粒子がシリカゲル粒子である上記の方法が好ましい。

【0019】

20

本発明の好ましい態様としては、前記微粒子をマイクロプレートのウェルに入れて該ウェル内に乾着させ、該ウェル内に前記水性検体溶液を入れて加温しながら微粒子の蛍光強度を測定することにより前記定量検出を行う前記の方法が挙げられる。

使用するマイクロプレートは、特に限定されるものではなく、例えば、市販の 96 ウェル、384 ウェル等のマイクロプレートを用いることができる。

この態様は、例えば、ウェル内に蛍光プローブ分子（8-oxo-dG 選択的）が固定された微粒子の水性懸濁液を入れ、加温して水分を蒸発させて該微粒子をウェルの表面に乾着させ、次に水性検体溶液を入れて加温する。

微粒子の使用量は、1 ウェル当り、10 ないし 500 ng、好ましくは、20 ないし 400 ng、40 ないし 200 ng であり、前記水性懸濁液は、例えば、1 μL 当り、前記微粒子 1 ないし 100 ng、好ましくは 5 ないし 60 ng を懸濁させたものであり、水分を蒸発させるための加温温度は、40 ないし 60 の範囲、好ましくは、45 ないし 55、例えば、50 であり、加温時間は 30 分ないし 4 時間の範囲、好ましくは、1 時間ないし 3 時間、例えば、2 時間である。

30

使用する水性検体溶液の量は、1 ウェル当り、2 ないし 10 μL、好ましくは 2 ないし 4 μL であり、加温温度は、40 ないし 60 の範囲、好ましくは、45 ないし 55、例えば、50 であり、加温時間は 30 分ないし 4 時間の範囲、好ましくは、1 時間ないし 2 時間、例えば、1 時間である。

加温しながら微粒子の蛍光強度を、例えば、マイクロプレートリーダー等で測定することにより、微粒子の蛍光消光の程度から微粒子に蓄積された 8-oxo-dG 量が判り、これから検体溶液中の 8-oxo-dG の初期濃度を逆算することができるため、微量の 8-oxo-dG を含む検体溶液の定量において有利である。

40

【0020】

本発明の好ましい別の態様としては、微粒子は、カラムに充填され、該カラムに前記水性検体溶液を流し、充填された微粒子の蛍光消光の程度の程度又は蛍光消光の程度と吸収スペクトルの変化の程度から、8-oxo-dG を定量検出する前記の方法が挙げられる。

この発明の態様の概略図を図 2 に示した。

図 2 に示されるように、蛍光プローブ分子（8-oxo-dG 選択的）が固定された微粒子 16 は、カラム 17 に充填されるものであり、カラム 17 に検体溶液 11 を流した後、微粒子 16 の蛍光消光の程度から検体溶液中の 8-oxo-dG を定量検出するものである。

50

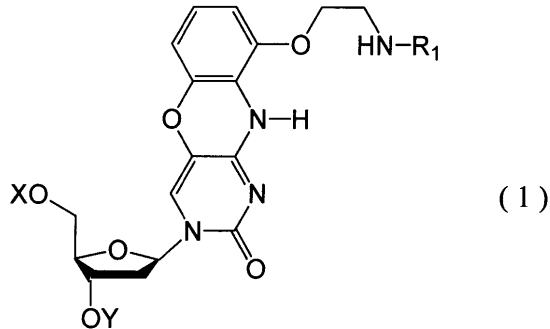
この態様は、検体溶液中の8-oxo-dGの量が極めて微量である場合に、一定量の検体溶液を流して、微粒子16に8-oxo-dGを蓄積させた後に、微粒子16における蛍光消光の程度を測定すれば、微粒子16に蓄積された8-oxo-dG量が判り、これから検体溶液中の8-oxo-dGの初期濃度を逆算することができるため、上記のように極めて微量の8-oxo-dGを含む検体溶液の定量において有利である。

また、図2で示されるような、蛍光プローブ分子(8-oxo-dG選択的)が固定された微粒子16を充填材として使用するカラムは、8-oxo-dGを溶離することができる溶離液を使用することにより、8-oxo-dGを分離するための分離カラムとして使用することもできる。

【0021】

本発明はまた、表面にスペーサーユニットを介して式(1)

【化5】



(式中、 R_1 は、6-アミノ-2-ピリジル基又は $-CO_2(CH_2)_l R_2$ (式中、 R_2 は水素原子又は炭素原子数6ないし16のアリール基を表し、 l は、1~3の整数を表す。)を表し、 X 及び Y は、一方が、ヒドロキシ基の保護基を表し、もう一方が、スペーサーユニットを表すものである。)で表される分子を固定したシリカゲル粒子に関する。

使用するシリカゲル粒子の平均粒径は、例えば、 0.001 ないし $100\mu m$ の範囲が挙げられ、 0.1 ないし $10\mu m$ の範囲(高感度測定用)、また、 10 ないし $100\mu m$ (分離カラム用)の範囲が好ましい。

炭素原子数6ないし16のアリール基としては、フェニル基、ナフチル基、ピフェニル基、アントラセニル基、フェナンスレニル基、ピレニル基等が挙げられる。

ヒドロキシ基の保護基としては、トリメチルシリル基、第3ブチルジメチルシリル基、第3ブチルジエチルシリル基、第3ブチルジフェニルシリル基、メトキシメチル基、エトキシメチル基、エトキシエチル基、メトキシエトキシメチル基、第3ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等が挙げられる。

スペーサーユニットとしては、有機化学に分野で使用されるスペーサーユニットであれば特に限定されないが、具体的には、例えば、 $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2CO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CCH_2CH_2SCO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NHCO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CS-$ 、 $-(CH_2)_k-$ 、 $-(CH_2)_k-CO-$ 、 $-(CH_2)_k-OCO-$ 、 $-(CH_2)_k-SCO-$ 、 $-(CH_2)_k-NHCO-$ 等が挙げられる。

尚、上記式の j は、1ないし10の整数、好ましくは、1ないし4の整数を表し、 k は2ないし30の整数、好ましくは2ないし12の整数を表す。

また、スペーサーユニットは、上記微粒子の表面に、炭素原子、硫黄原子、酸素原子、窒素原子等による物理的吸着や共有結合により固定され得る。

【0022】

好ましくは、 X がスペーサーユニット(該スペーサーユニットは、 $(CH_2)_m-NHCO-$ (式中、 m は2~10の整数を表す。)を表す。)を表し、 Y が $-SiR_3R_4R_5$ (式中、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、メチル基、第三ブチル基又はフェニル基を表す。)を表す前記シリカゲル粒子が挙げられる。

【0023】

10

20

30

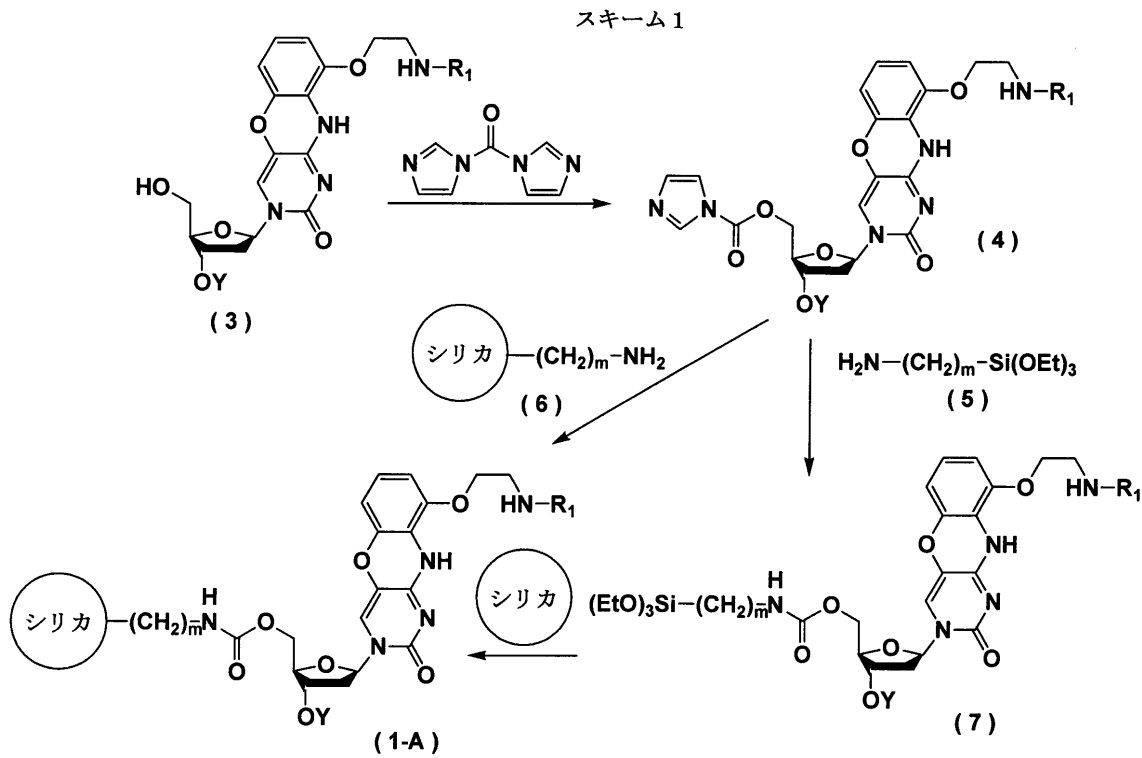
40

50

次に、式(1)で表される分子を固定したシリカゲル粒子の製造方法を説明する。

以下のスキーム1に、スペーサーユニットが $(CH_2)_m - NHCO -$ である式(1)で表される分子を固定したシリカゲル粒子(1-A)の製造方法を示した(尚、式中、 R_1 、 Y 及び m は前記と同じ意味を表す)。

【化6】



即ち、化合物(3)の一級ヒドロキシ基にカルボニルジイミダゾールを反応させて化合物(4)とし、これにアルキルアミノ基で修飾されたシリカゲル粒子(6)を反応させるか又は式(5)で示される試薬を反応させた後、シリカゲルと反応させることにより、シリカゲル粒子(1-A)を製造することができる。

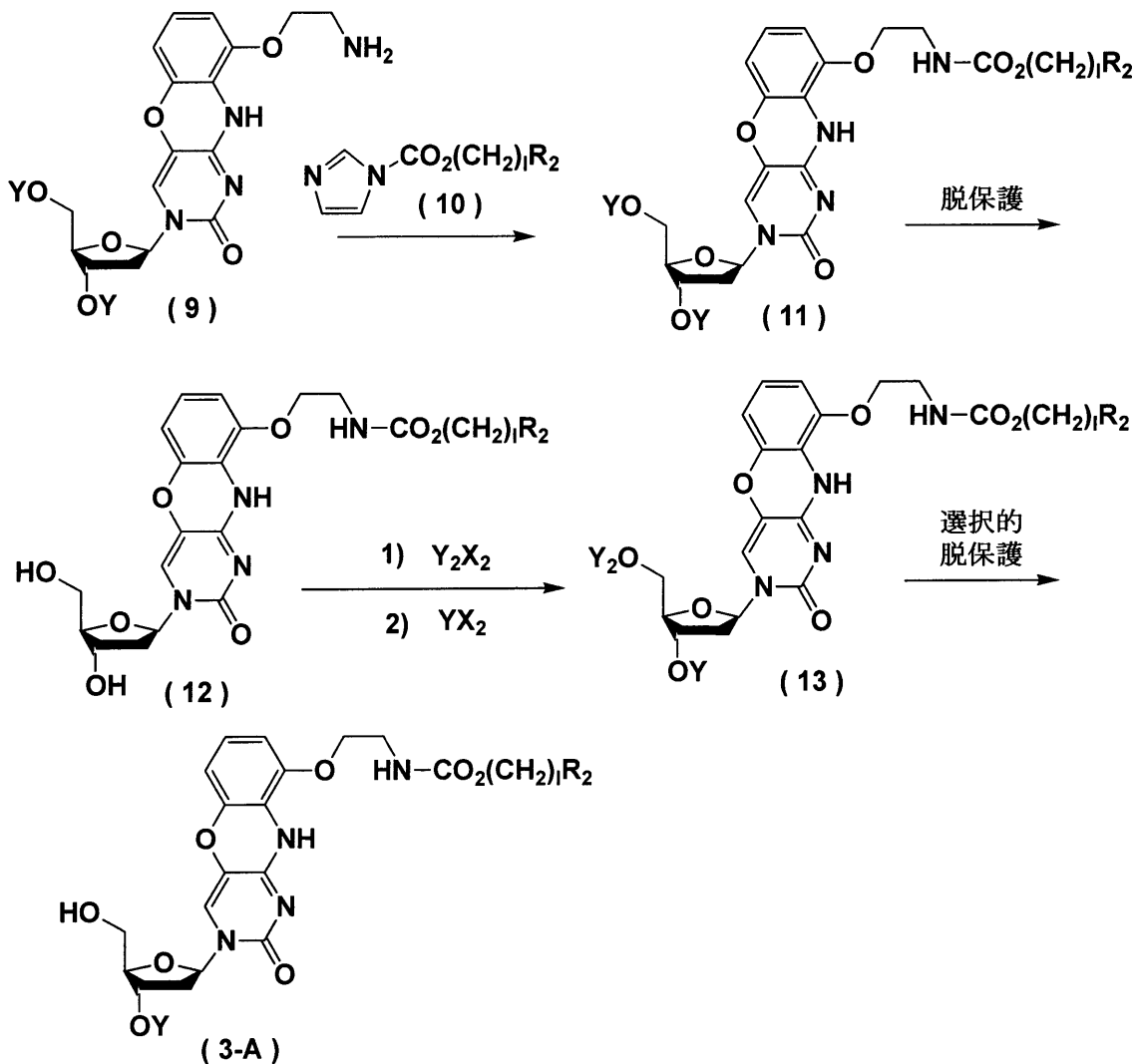
また、上記の方法を利用することにより、種々のスペーサーユニット、例えば、 $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2CO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CCH_2CH_2SCO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CH_2CH_2NHCO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CO-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_j-CS-$ 、 $-(CH_2)_k-$ 、 $-(CH_2)_k-CO-$ 、 $-(CH_2)_k-OCO-$ 、 $-(CH_2)_k-SCO-$ 、 $-(CH_2)_k-NHCO-$ 等(式中、 j 及び k は前記と同じ意味を表す。)を介して、式(1)で表される分子が、例えば、炭素原子、硫黄原子、酸素原子、窒素原子等による物理的吸着や共有結合により固定された他の無機粒子又はポリマー樹脂粒子を製造することができる。

【0024】

上記スキーム1で示される化合物(3)の中で、 R_1 が $-CO_2(CH_2)_lR_2$ である化合物(3-A)の製造方法をスキーム2に示した(尚、式中、 R_2 及び l は前記と同じ意味を表し、 Y_2 は、 Y とは異なる保護基、例えば、4,4'-ジメトキシトリチル基等を意味し、 X_2 は、塩素原子、臭素原子等のハロゲン原子やメタンスルホニル基、パラトルエンスルホニル基等のスルホニル基等の脱離基を意味する。)

【化7】

スキーム2



10

20

30

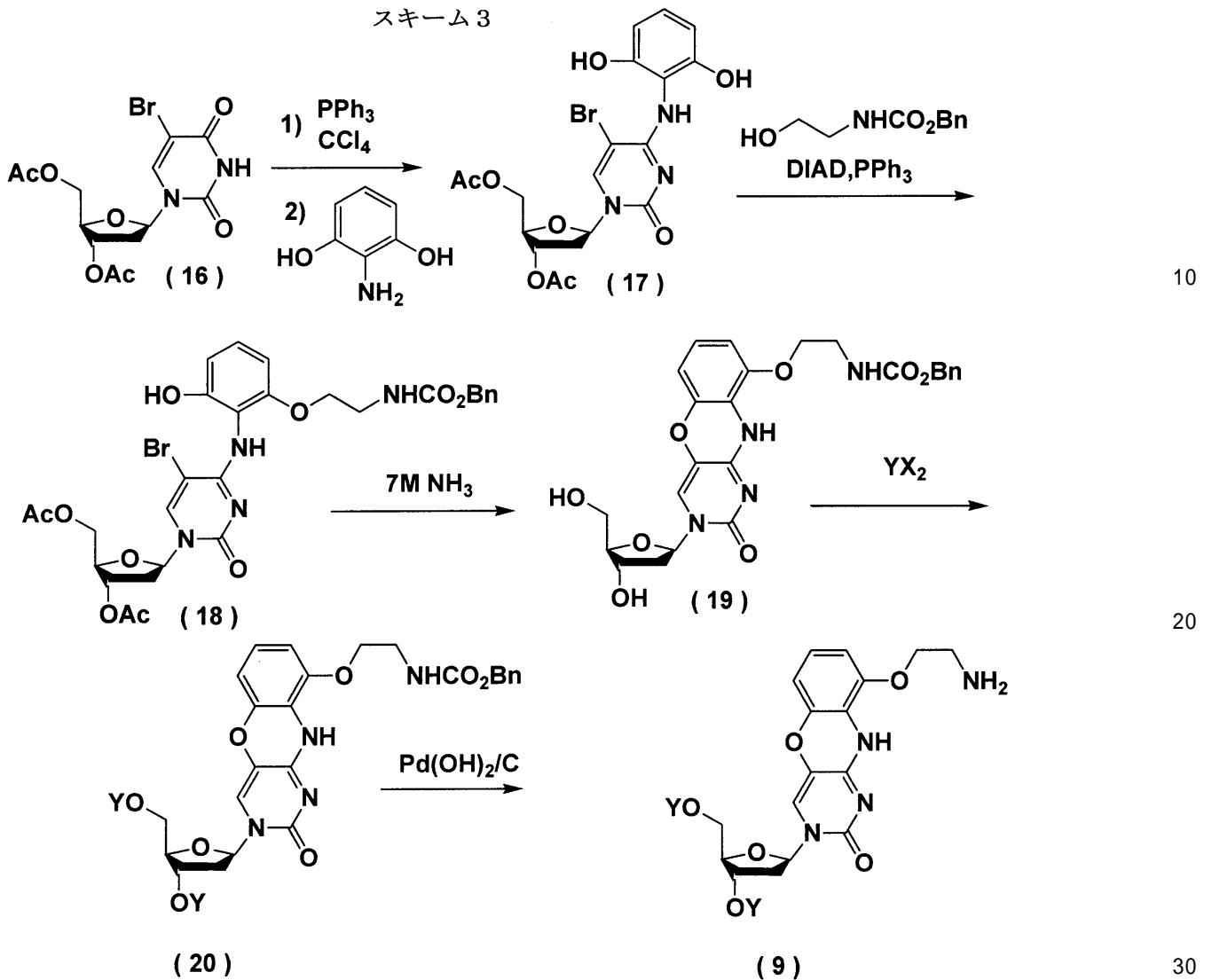
即ち、化合物(9)にイミダゾール化合物(10)を反応させて、基、 $-\text{CO}_2(\text{CH}_2)_l\text{R}_2$ を導入して化合物(11)とし、脱保護によりYを除去してジオール(12)とし、その後、一級ヒドロキシ基をY₂で保護し、続いて2級ヒドロキシ基をYで保護して化合物(13)とし、Y₂のみを選択的に脱保護することにより、化合物(3-A)を製造することができる。

【0025】

スキーム2に示される化合物(9)は、以下のスキーム3で示される方法により製造することができる(尚、式中、Y、Y₂及びX₂は、前記と同じ意味を表し、Acはアセチル基を表し、Bnはベンジル基を表し、DIADはジイソプロピルアゾカルボキシラートを意味する。)

40

【化 8】



即ち、5 - プロモ - 2' - デオキシウリジンのジアセテート (16) と 2 - アミノフェノールを反応させて化合物 (17) とし、これに、(2 - ヒドロキシエチル)カルバミン酸ベンジルエステルを反応させて化合物 (18) とし、これにアンモニアを作用させて環化と同時に脱アセチル化を行って、化合物 (19) とし、これに、 YX_2 を反応させて Y を導入して化合物 (20) とし、化合物 (20) を加水素分解条件下 CO_2Bn を除去することにより、化合物 (9) を製造することができる。

【0026】

尚、上記スキーム 1 で示される化合物 (3) の中で、 R_1 が 6 - アミノ - 2 - ピリジル基である化合物 (3 - B) の製造方法をスキーム 4 に示した (尚、式中、Y、Ac 及び DIAD は前記と同じ意味を表す。)。

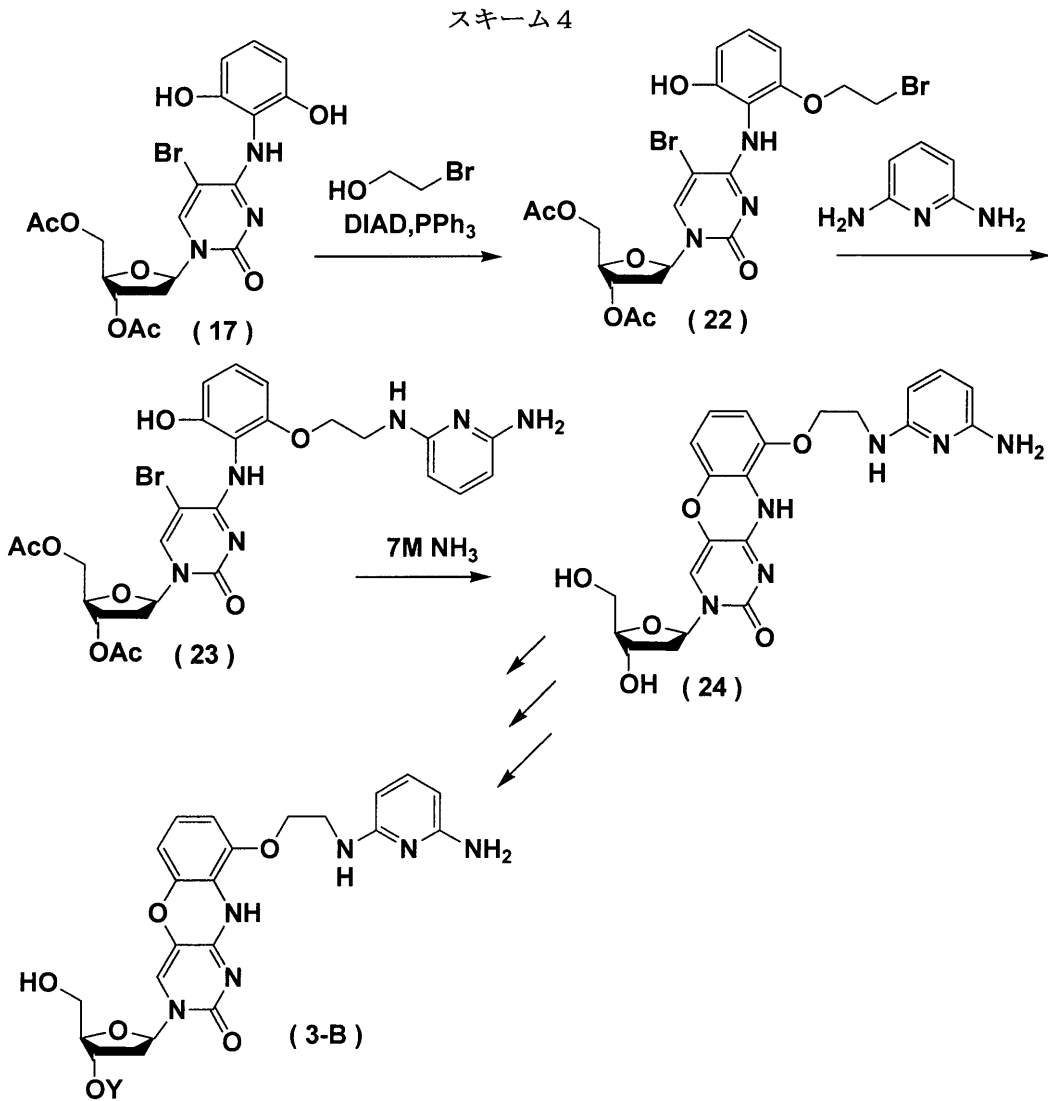
10

20

30

40

【化 9】



10

20

30

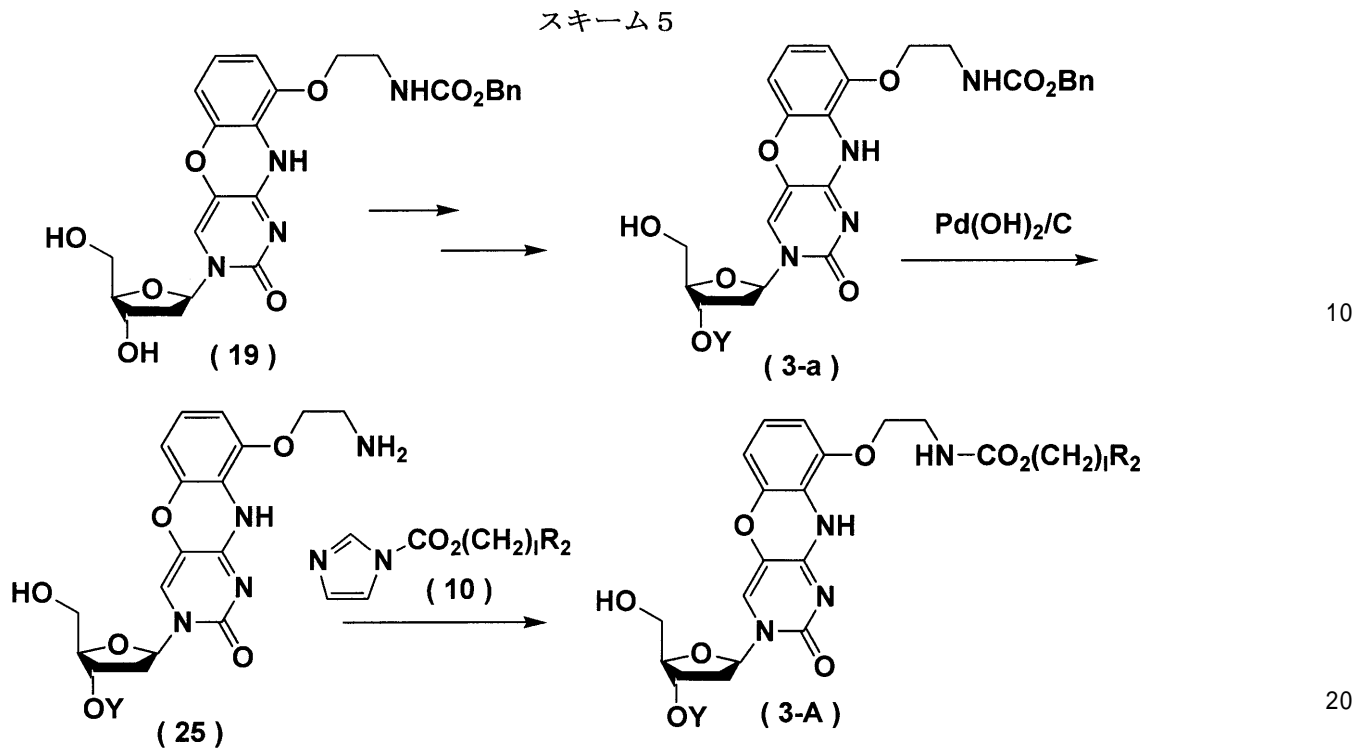
即ち、スキーム 3 に示される化合物 (17) を出発物質とし、これに 2 - プロモエタノールを反応させて化合物 (22) とし、これに 2, 6 - ジアミノピリジンと反応させて化合物 (23) とし、これにアンモニアを作用させて環化と同時に脱アセチル化を行って、化合物 (24) とし、スキーム 2 で示される方法により、2 級ヒドロキシ基のみが Y で保護された化合物 (3 - B) を製造することができる。

【0027】

スキーム 2 に示された化合物 (3 - A) は、以下のスキーム 5 に示されるように、スキーム 3 に記載の化合物 (19) から製造することもできる (尚、式中、Y、 R_2 、1 及び B n は、前記と同じ意味を表す。)。

40

【化10】



即ち、化合物(19)をスキーム2に記載の方法に従って、化合物(3-a)に導き、続いて加水分解条件下 $\text{C O}_2 \text{B n}$ を除去することにより、化合物(25)とし、これにイミダゾール化合物(10)を反応させて、基、 $-\text{C O}_2(\text{C H}_2)_l \text{R}_2$ を導入することにより、化合物(3-A)を製造することができる。

【0028】

前記で製造される式(1)で表される分子を固定したシリカゲル粒子は、プローブ分子をシリカゲル粒子表面上に固定することにより、シリカゲル表面上に微小疎水空間を形成し、それにより、固定されていないプローブ分子では困難であった、水性の検体溶液中の8-oxo-dGの定量検定を可能とするものである。

加えて、プローブ分子をシリカゲル粒子表面上に固定することにより、感度が飛躍的に向上し、例えば、尿中の8-oxo-dGの定量検出が可能となるまで感度を向上させ得ることができる。

そしてこれにより、8-oxo-dGを微量にしか含んでいない検体溶液においても十分な精度で、定量検定が可能となる。

従って、式(1)で表される分子を固定したシリカゲル粒子は、それ自体で定量検定用のデバイスとなり得るものである。

また、式(1)で表される分子を固定したシリカゲル粒子は、分離カラムの充填材として使用することもできる。

上記の式(1)で表される分子を固定したシリカゲル粒子を充填した分離カラムは、8-oxo-dGを溶離することができる溶離液を使用することにより、8-oxo-dGを分離するための分離カラムとして有利に使用することができる。

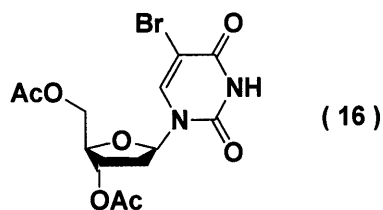
即ち、上記分離カラムは、8-oxo-dGに対して選択的な親和性を有するシリカゲル粒子を使用するものであるため、検体溶液に含まれる成分の中で8-oxo-dGの保持時間のみを変更することができ、これにより、検体溶液に、8-oxo-dGと同じ保持時間を有する成分や8-oxo-dGと極めて近い保持時間を有する成分が含まれ、8-oxo-dGの定量が困難となる場合であっても、8-oxo-dGの保持時間のみを変更し、それにより8-oxo-dGの正確な定量を行うことができる。

【実施例】

【 0 0 2 9 】

製造例 1 : 化合物 (1 6) の製造

【 化 1 1 】



10

アルゴン気流下、5-プロモ-2'-デオキシウリジン (2 g, 6.512 mmol) を無水ピリジン 5 mL に溶解、攪拌。そこに無水酢酸 (1.54 mL, 16.28 mmol) を滴下し、室温にて攪拌。18 時間後、反応液を酢酸エチル 15 mL にて希釈。これを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で清浄。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥後、減圧下溶媒留去。残渣にトルエン 5 mL を加え減圧下溶媒留去。得られた粗精製物を酢酸エチル/ヘキサンにて再結晶。化合物 (1 6) を 2.37 g、収率 93% で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm: 8.46 (1H, s), 7.87 (1H, s), 6.27 (1H, dd, $J = 3.6$ Hz, 5.9 Hz), 5.22-5.21 (1H, m), 4.41-4.10 (3H, m), 2.56-2.50 (1H, m), 2.18-2.13 (1H, m), 2.16 (3H, s), 2.10 (3H, s).

ESI-MS (m/z): 413.02 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺

20

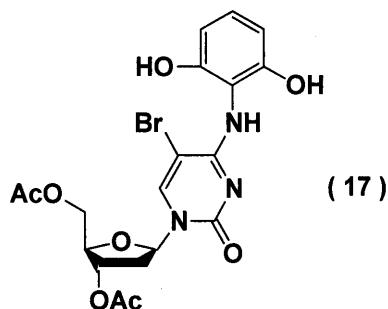
IR (cm^{-1}): 3013, 2824, 1744, 1710, 1687

m.p. : 151.8 - 152.8

【 0 0 3 0 】

製造例 2 : 化合物 (1 7) の製造

【 化 1 2 】



30

アルゴン気流下、化合物 (1 6) (3.0 g, 7.69 mmol)、トリフェニルホスフィン (3.05 g, 11.6 mmol) を無水アセトニトリル-無水ジクロロメタン (20 mL-5 mL) にて 3 回、無水ジクロロメタン (20 mL) で 1 回共沸。そこに無水四塩化炭素-ジクロロメタン (15 mL-15 mL) を加え加熱還流。2.5 時間後、反応液を室温に戻し、ジアザピシクロウンデセン (2.53 mL, 16.9 mmol)、2-アミノレゾルシノール (1.92 g, 15.4 mmol) を加えて攪拌。反応液を減圧下溶媒留去。残渣にジクロロメタン-ヘキサン (16 mL-16 mL) を加えて室温にて激しく攪拌。そこに 5% クエン酸水溶液 85 mL を加え、析出物を吸引濾過。ろ取物を水、ジクロロメタン、アセトニトリルにて清浄。化合物 (1 7) を 3.1 g、収率 81% で得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) ppm: 8.01 (1H, s), 6.90 (1H, t, $J = 8.1$ Hz), 6.35 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.12 (1H, t, $J = 6.7$ Hz), 5.18-5.17 (1H, m), 4.27-4.20 (1H, t, $J = 5.8$ Hz), 5.19 (1H, m), 4.37 (3H, m), 2.43-2.32 (2H, m), 2.08 (3H, s), 2.05 (3H, s).

ESI-MS (m/z): 4.98.04 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

IR (cm^{-1}): 3390, 3301

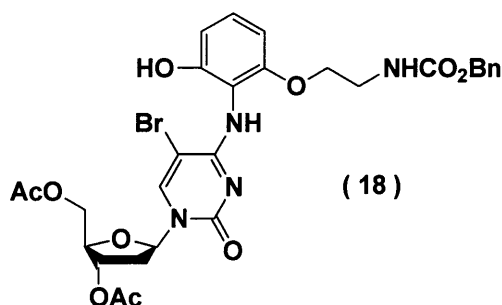
m.p. : 249.6 - 250.0

50

【 0 0 3 1 】

製造例 3 : 化合物 (1 8) の製造

【 化 1 3 】



10

アルゴン気流下、化合物 (1 7) (2.60 g, 5.21 mmol)、2-ヒドロキシエチルカルバミン酸ベンジルエステル (1.33 g, 6.8 mmol)、トリフェニルホスフィン (2.23 g, 8.5 mmol) を無水アセトニトリル (40 mL) にて3回、無水ジクロロメタン (32 mL) にて共沸。残渣に無水ジクロロメタン (36 mL) を加え氷冷上で攪拌。そこにジイソプロピルアゾジカルボキシレート (4.47 mL, 8.5 mmol) を滴下し、室温に戻し攪拌。21時間後、反応液を水、飽和食塩水で清浄。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、減圧下溶媒留去。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (関東化学60N; 酢酸エチル: クロロホルム = 1:2 酢酸エチル) にて精製。化合物 (1 8) を1.39 g、収率39%で得た。

20

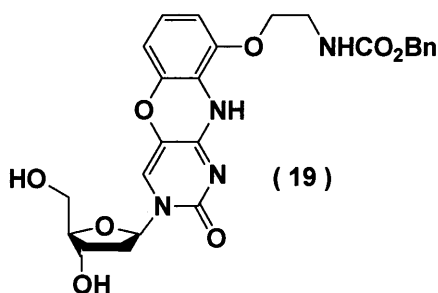
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm: 7.92 (1H, s), 7.33 (5H, m), 7.05 (1H, t, $J = 8.2$ Hz), 6.71 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.42 (1H, t, $J = 8.2$ Hz), 6.24 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 5.20 (1H, m), 5.10 (2H, s), 4.36 (2H, m), 4.31 (1H, m), 4.13 (2H, m), 3.66 (2H, m), 2.69 (1H, m), 2.12 (3H, s), 2.09 (4H, m).

ESI-MS (m/z): 675.68 ($\text{M}+\text{H}$)⁺IR (cm^{-1}): 3339, 1741, 1671, 1230, 1093

【 0 0 3 2 】

製造例 4 : 化合物 (1 9) の製造

【 化 1 4 】



30

アルゴン気流下、化合物 (1 8) (1.55 g, 2.29 mmol) に7Mアンモニア-メタノール (80 mL, 3.66 mmol) を加え室温にて攪拌。72時間後、反応液を減圧下溶媒留去。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (関東化学60N; クロロホルム: メタノール = 15:1 9:1) にて精製。化合物 (1 9) を650 mg、収率55%で得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) ppm: 7.70 (1H, s), 7.29 (5H, m), 6.81 (1H, t, $J = 8.2$ Hz), 6.58 (1H, t, $J = 7.9$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 5.11 (2H, s), 4.37 (1H, m), 4.05 (2H, m), 3.92 (1H, m), 3.81 (1H, dd, $J = 3.1$ Hz, 12.0 Hz), 3.73 (1H, dd, $J = 3.7$ Hz, 12.0 Hz), 3.53 (2H, m), 2.33 (1H, m), 2.12 (1H, m).

ESI-MS: 511.29 [$\text{M}+\text{H}$]⁺IR (cm^{-1}): 3408, 3199, 1722, 1681, 776

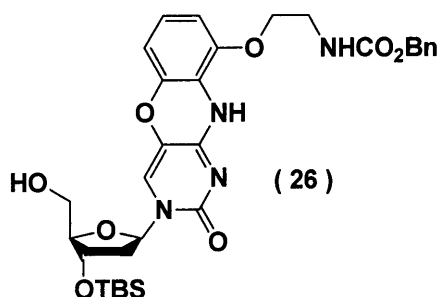
m.p. : 131.2 - 132.0

50

【 0 0 3 3 】

製造例 5 : 化合物 (2 6) の製造

【 化 1 5 】



10

(式中、 T B S は第 3 ブチルジメチルシリル基を意味する。)

無水ピリジンにて共沸した化合物 (1 9) (655 mg, 1.28 mmol) の無水ピリジン (11.5 mL) の溶液に、アルゴン気流下、ジメトキシトリチルクロライド (652 mg, 1.92 mmol) を加え、室温にて攪拌した。1.5時間後、反応液をCHCl₃ (30 mL) にて希釈し、飽和重曹水で清浄、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧下溶媒を留去、得られた粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学60N ; クロロホルム / クロロホルム : メタノール = 50 : 1 (メタノール)) にて精製した。得られた褐色固体の無水N,N-ジメチルホルムアミド (3.7 mL) 溶液に、イミダゾール (206 mg, 3.023 mmol)、第 3 (tert-) ブチルジメチルシランクロライド (373 mg, 2.015 mmol) を加え、室温にて攪拌した。3時間後、反応液をクロロホルム (20 mL) にて希釈し、飽和重曹水で清浄、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧下溶媒を留去、得られた粗精製物に3%トリクロロ酢酸 (30 mL) を加え、室温にて攪拌した。1時間後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) にて希釈し、酢酸エチルにて抽出、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥した。減圧下溶媒留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学60N ; クロロホルム / メタノール = 50 / 1) にて精製し、化合物 (2 6) を 540 mg、収率73%で得た。

20

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) ppm:7.42 (1H, s), 7.27 (5H, m), 6.77 (1H, t, J = 8 Hz), 6.36 (2H, m), 6.12 (1H, t, J = 6 Hz), 5.08 (2H, m), 4.45 (1H, m), 3.97 (2H, m), 3.91 (2H, m), 3.73 (1H, m), 3.56 (1H, Br), 2.30 (2H, m), 0.86 (9H, s), 0.06 (3H, s), 0.05 (3H, s).

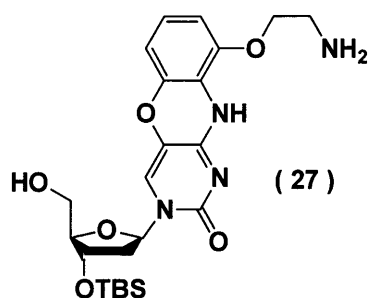
30

ESI-MS:625.3524 [M+H]⁺

【 0 0 3 4 】

製造例 6 : 化合物 (2 7) の製造

【 化 1 6 】



40

化合物 (2 6) (100 mg, 0.16 mmol) のメタノール溶液 (2 mL) に水酸化パラジウム-炭素 (100 mg), シクロヘキセン (1 mL) を加えて、加熱還流。1.5時間後、反応溶液をろ過して、ろ液を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学60N ; クロロホルム、メタノール : クロロホルム : トリエチルアミン = 5 : 95 : 1) にて精製。化合物 (2 7) を黄色固体として53 mg、収率68%で得た。

50

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) ppm: 7.67 (1H, s), 6.83 (1H, t, $J = 8$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.43 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.20 (1H, t, $J = 6$ Hz), 4.49 (1H, m), 4.07 (2H, t, $J = 5$ Hz), 3.90 (1H, m), 3.79 (1H, dd, $J = 3$ Hz, 12 Hz), 3.70 (1H, dd, $J = 3$ Hz, 12 Hz), 3.09 (2H, t, $J = 5$ Hz), 2.28 (1H, m), 2.13 (1H, m), 0.92 (9H, s), 0.12 (6H, s).

IR ν_{max} (film): 3275, 1672, 1563, 1261.

ESI-MS (m/z): 491.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

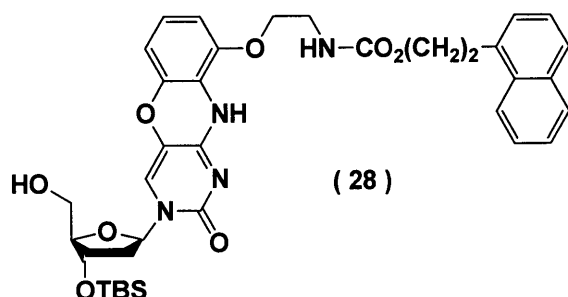
Yellow carame

【 0 0 3 5 】

製造例 7 : 化合物 (2 8) の製造

10

【 化 1 7 】



20

化合物 (2 7) (50 mg, 0.10 mmol) の無水ピリジン (2 mL) 溶液に、氷浴下にてクロロトリメチルシラン (33 μL , 0.26 mmol) を滴下し、室温にて攪拌した。30分後、1 H - イミダゾール - 1 - カルボン酸 2 - (2 - ナフチル) エチルエステル (100 mg) を加え、引き続き室温にて攪拌した。21時間後、28%アンモニア水を加え、反応を止め、クロロホルムにて抽出、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去した。得られた粗精製物をシリカゲルクロマトグラフィー (関東化学60N ; クロロホルム : メタノール = 5 0 : 1) にて精製し、化合物 (2 8) を29 mg、収率43%で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) ppm: 8.07 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.89 (1H, s), 7.79 (1H, d, $J = 8$ Hz), 7.67 (1H, m), 7.45 (2H, m), 7.33 (2H, m), 7.15 (1H, Br), 6.89 (1H, t, $J = 8$ Hz), 6.46 (1H, d, $J = 9$ Hz), 6.33 (1H, d, $J = 8$ Hz), 6.17 (1H, t, $J = 6$ Hz), 4.50 (1H, m), 4.38 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.96 (4H, m), 3.79 (1H, m), 3.61 (2H, m), 3.41 (2H, t, $J = 8$ Hz), 2.35 (1H, m), 2.18 (1H, m), 0.88 (9H, s), 0.07 (6H, s)

30

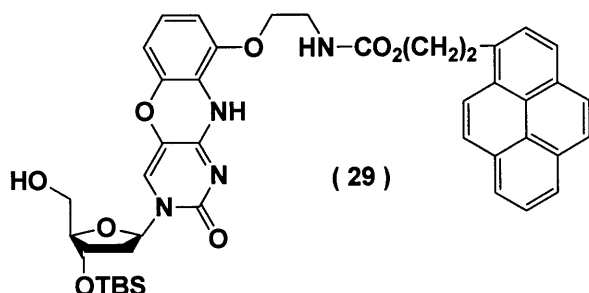
IR ν_{max} (film): 3275, 1709, 1473, 1087.

ESI-MS (m/z): 689.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【 0 0 3 6 】

製造例 8 : 化合物 (2 9) の製造

【 化 1 8 】



40

化合物 (2 7) (50 mg, 0.10 mmol) の無水ピリジン (2 mL) 溶液に、氷浴下にてクロロトリメチルシラン (33 μL , 0.26 mmol) を滴下し、室温にて攪拌した。30分後、1 H - イミダゾール - 1 - カルボン酸 2 - (1 - ピレニル) エチルエステル (100 mg) を加え

50

、引き続き室温にて攪拌した。21時間後、28%アンモニア水を加え、反応を止め、クロロホルムにて抽出、有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下留去した。得られた粗精製物をシリカゲルクロマトグラフィー（関東化学60N；クロロホルム：メタノール = 50:1）にて精製し、化合物（29）を18 mg、収率24%で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) (ppm): 8.24 (1H, d $J = 9$ Hz,), 7.96 (8H, m), 7.54 (1H, s), 6.77 (1H, Br), 6.61 (1H, m), 6.20 (1H, d $J = 8$ Hz,), 6.13 (1H, d, $J = 9$ Hz), 6.07 (1H, m), 4.50 (3H, m), 3.92 (2H, m), 3.79 (3H, m), 3.63 (2H, m), 3.53 (2H, m), 2.24 (1H, m), 2.17 (1H, m), 0.87 (9H, s), 0.07 (6H, s).

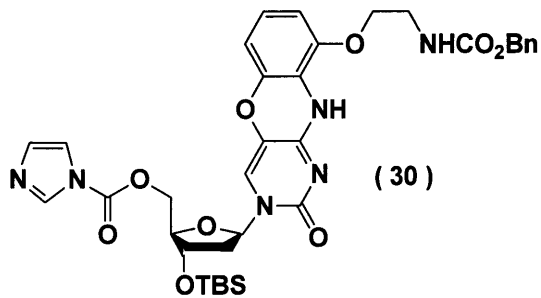
IR ν_{max} (film): 3230, 1710, 1473, 1088.

ESI-MS (m/z): 763.4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

【0037】

製造例9：化合物（30）の製造

【化19】



アルゴン気流下、化合物（26）(35 mg, 0.06 mmol) の無水ジクロロメタン (1 mL) 溶液に、室温にて、 N,N' -カルボニルジイミダゾール (18 mg, 0.11 mmol) を加え、攪拌した。2.5時間後、反応液を減圧下溶媒留去。化合物（30）を39 mg、収率98%で得た。

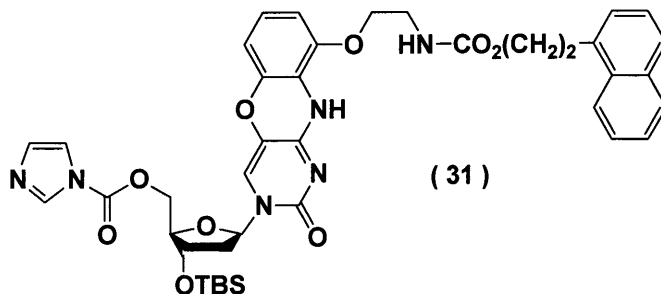
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) (ppm): 8.19 (1H, s), 7.44 (1H, s), 7.28 (1H, s), 7.08 (1H, s), 6.78 (1H, t, $J = 7.9$ Hz), 6.44 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 6.40 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 6.14 (1H, t, $J = 6.1$ Hz), 5.92 (1H, Br), 5.08 (2H, s), 4.67 (1H, dd, $J = 3.1$ Hz, 12.5 Hz), 4.57 (1H, dd, $J = 11.6$ Hz), 4.33 (1H, m), 4.11 (1H, m), 4.04 (2H, m), 3.58 (2H, m), 2.42 (1H, m), 2.23 (1H, m), 0.87 (9H, s), 0.06 (6H, s).

ESI-MS (m/z): 719.40 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

【0038】

製造例10：化合物（31）の製造

【化20】



アルゴン気流下、化合物（28）(29 mg, 0.04 mmol) の無水ジクロロメタン (3 mL) 溶液に、室温にて、 N,N' -カルボニルジイミダゾール (14 mg, 0.08 mmol) を加え、攪拌した。2.5時間後、反応液を減圧下溶媒留去。化合物（31）を32 mg、収率91%で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) (ppm): 9.21 (1H, Br), 8.19 (1H, s), 8.00 (1H, d, $J = 8$ Hz,), 7.79 (1H, m), 7.67 (1H, m), 7.41 (7H, m), 6.78 (1H, t, $J = 8$ Hz), 6.40 (1H, t, $J = 9$ Hz), 6.29 (1H, m), 6.15 (1H, m), 4.66 (1H, dd, $J = 12$ Hz), 4.57 (1H, m), 4.39 (1H, m), 4.31 (2H, m), 4.12 (1H, m), 3.97 (1H, m), 3.53 (2H, m), 3.37

10

20

30

40

50

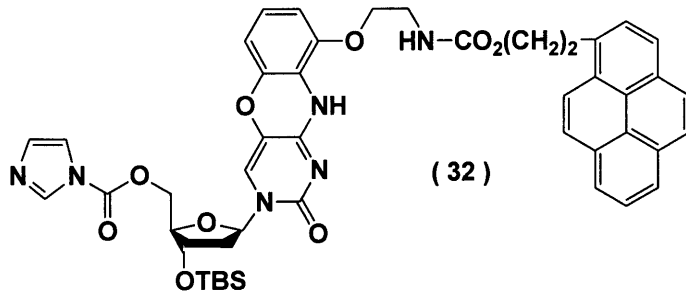
(1H, m), 3.31 (2H, t, J = 7 Hz), 2.42 (1H, m), 2.22 (1H, m), 0.86 (9H, s), 0.05 (6H, s).

ESI-MS (m/z): 783.40 (M+H)⁺.

【0039】

製造例 11: 化合物(32)の製造

【化21】



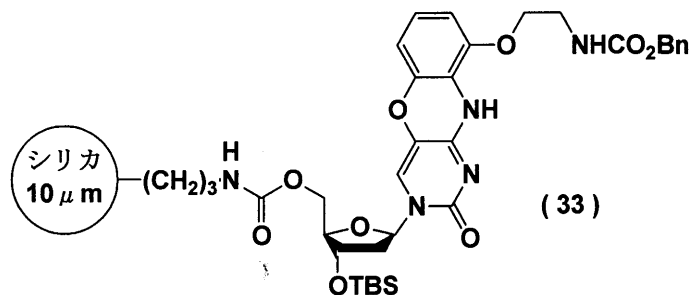
10

アルゴン気流下、化合物(29) (25 mg, 0.03 mmol) の無水ジクロロメタン (3 mL) 溶液に、室温にて、N,N'-カルボニルジイミダゾール (11 mg, 0.06 mmol) を加え、攪拌した。2.5時間後、反応液を減圧下溶媒留去。化合物(32) を28 mg、収率96%で得た。

【0040】

実施例 1: シリカゲル粒子(33) (平均粒径 10 μm) の製造

【化22】



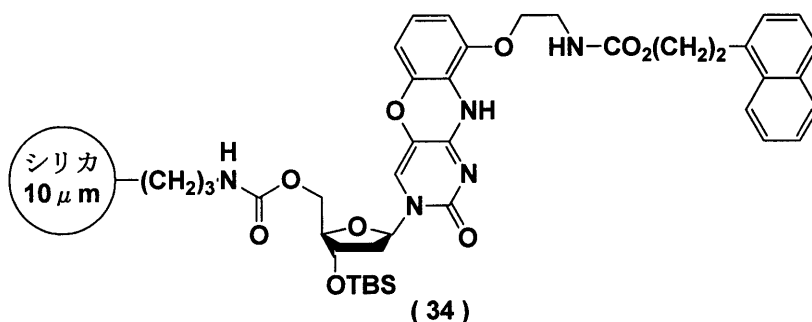
30

化合物(30) (0.04 mmol) の無水ジクロロメタン (1 mL) 溶液にアミノ処理シリカゲル NH SMB 100-10 (富士シリシア化学株式会社製: 平均粒子径: 9.2 μm, 細孔容積: 0.57 mL/g, 炭素含有量: 4.0 wt.%) (100 mg)、イミダゾール (11 mg, 0.16 mmol) を加え、室温にて振盪 (300 rpm) した。3日後、濾過によって分離し、クロロホルム、メタノールにて十分に洗浄することにより、表題のシリカゲル粒子(33) を得た。

【0041】

実施例 2: シリカゲル粒子(34) (平均粒径 10 μm) の製造

【化23】



40

化合物(31) (0.04 mmol) の無水ジクロロメタン (1 mL) 溶液にアミノ処理シリカゲル NH SMB 100-10 (富士シリシア化学株式会社製: 平均粒子径: 9.2 μm,

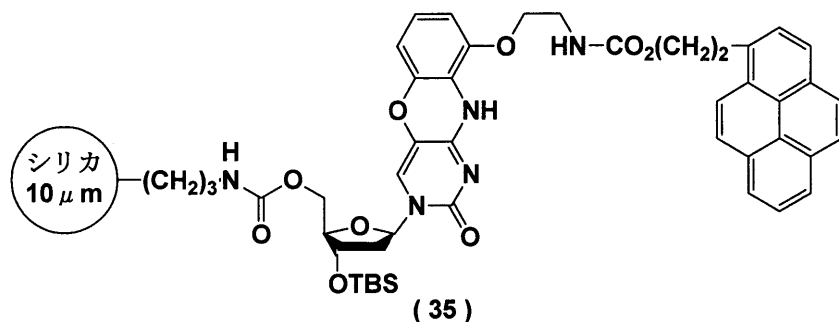
50

細孔容積：0.57 mL/g, 炭素含有量：4.0 wt.%) (100 mg)、イミダゾール (11 mg, 0.16 mol) を加え、室温にて振盪 (300 rpm) した。3日後、濾過によって分離し、クロロホルム、メタノールにて十分に洗浄することにより、表題のシリカゲル粒子 (34) を得た。

【0042】

実施例3：シリカゲル粒子 (35) (平均粒径 10 μm) の製造

【化24】



10

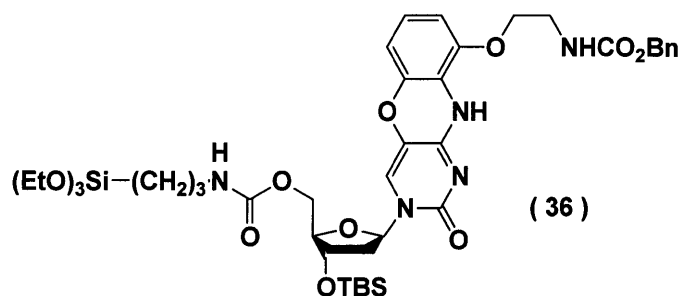
化合物 (32) (0.04 mmol) の無水ジクロロメタン (1 mL) 溶液にアミノ処理シリカゲル NH-SMB-100-10 (富士シリシア化学株式会社製：平均粒子径：9.2 μm, 細孔容積：0.57 mL/g, 炭素含有量：4.0 wt.%) (100 mg)、イミダゾール (11 mg, 0.16 mol) を加え、室温にて振盪 (300 rpm) した。3日後、濾過によって分離し、クロロホルム、メタノールにて十分に洗浄することにより、表題のシリカゲル粒子 (35) を得た。

20

【0043】

製造例12：化合物 (36) の製造

【化25】



30

化合物 (30) (28 mg, 0.04 mmol) の無水THF (2 mL) 溶液に、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (50 μL, 0.24 mmol) を加え、室温にて攪拌した。18時間後、減圧下溶媒留去、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL-60D；ジクロロメタン) にて精製し、化合物 (36) を15 mg、収率43%で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) (ppm): 7.29 (6H, m), 6.76 (1H, t, $J = 7.9, 8.2$ Hz), 6.44 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 6.39 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.19 (1H, m), 5.79 (1H, Br), 5.19 (1H, Br), 5.10 (2H, s), 4.25 (3H, m), 3.78 (6H, q, $J = 7.0$ Hz), 3.58 (2H, m), 3.20 (2H, m), 2.39 (1H, m), 2.12 (1H, m), 1.19 (9H, t, $J = 7.0$ Hz), 0.95 (2H, m), 0.86 (9H, s), 0.62 (2H, m), 0.04 (6H, s).

40

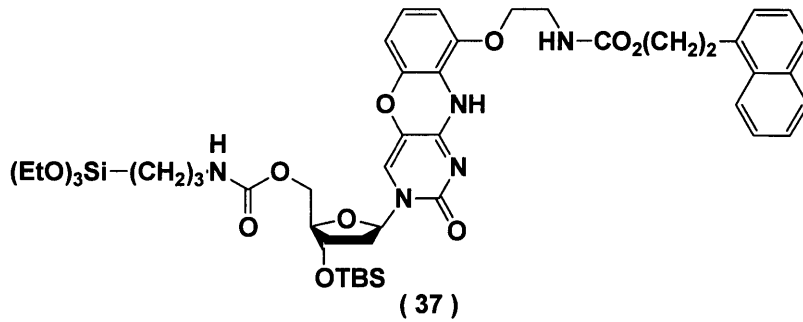
ESI-MS(m/z): 827.7957($M+H$) $^+$

IR(cm^{-1}): 3326, 2930, 1698, 1474, 1102

【0044】

製造例13：化合物 (37) の製造

【化 2 6】



10

化合物 (3 1) (30 mg, 0.04 mmol) の無水THF (1 mL) 溶液に、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (30 μ L, 0.14 mmol) を加え、室温にて攪拌した。18時間後、減圧下溶媒留去、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL-60D ; ジクロロメタン) にて精製し、化合物 (3 7) を14 mg、収率38%で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) ppm: 9.28 (1H, s), 8.00 (1H, d, $J = 8$ Hz,), 7.80 (1H, m), 7.69 (1H, m), 7.39 (5H, m), 6.78 (1H, m), 6.40 (2H, m), 6.16 (1H, m), 4.45 (1H, m), 4.26 (4H, m), 4.01 (2H, m), 3.79 (6H, m), 3.58 (1H, m), 3.43 (2H, m), 3.34 (2H, m), 3.21 (2H, m), 2.41 (1H, m), 1.97 (1H, m), 1.63 (2H, m), 1.18 (9H, m), 0.87 (9H, s), 0.62 (2H, s), 0.06 (3H, s).

20

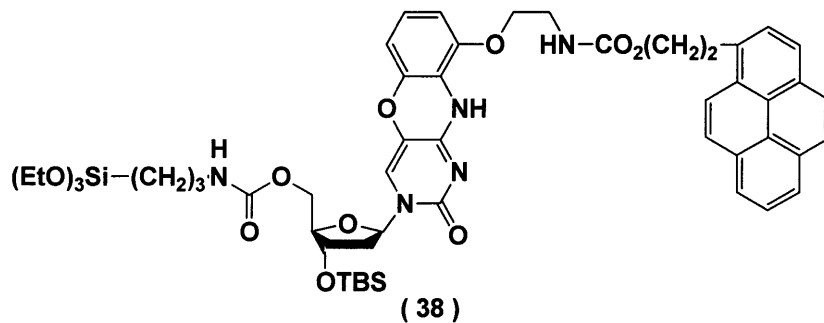
IR ν_{max} (film): 3320, 1704, 1473, 1102.

ESI-MS (m/z): 937.34 (M+H)⁺ .

【 0 0 4 5 】

製造例 1 4 : 化合物 (3 8) の製造

【化 2 7】



30

化合物 (3 2) (40 mg, 0.05 mmol) の無水THF (1.5 mL) 溶液に、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (40 μ L, 0.19 mmol) を加え、室温にて攪拌した。24時間後、減圧下溶媒留去、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (FL-60D ; ジクロロメタン) にて精製し、化合物 (3 8) を18 mg、収率36%で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) ppm: 8.10 (9H, m), 7.50 (1H, s), 6.73 (1H, m), 6.32 (2H, m), 6.14 (1H, t, $J = 5.8$ Hz), 4.43 (1H, m), 4.30 (2H, m), 4.25 (2H, m), 4.03 (1H, m), 4.30 (2H, m), 4.25 (2H, m), 4.03 (1H, m), 3.92 (2H, m), 3.78 (6H, m), 3.57 (2H, m), 3.49 (2H, m), 3.21 (2H, m), 2.34 (1H, m), 2.00 (1H, m), 1.64 (2H, m), 1.21 (9H, m), 0.87 (9H, s), 0.61 (2H, s), 0.05 (6H, s).

40

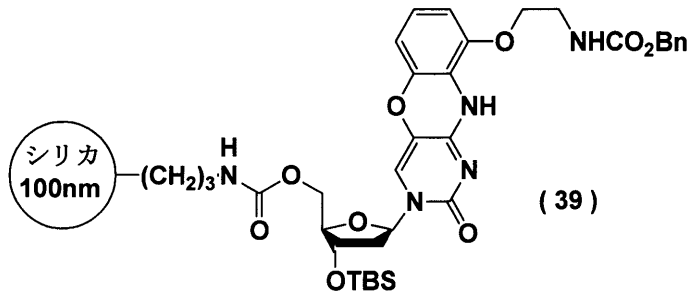
IR ν_{max} (film): 3132, 1704, 1473, 1063.

ESI-MS (m/z): 1011.53 (M+H)⁺ .

【 0 0 4 6 】

実施例 4 : シリカゲル粒子 (3 9) (平均粒径 1 0 0 nm) の製造

【化 2 8】



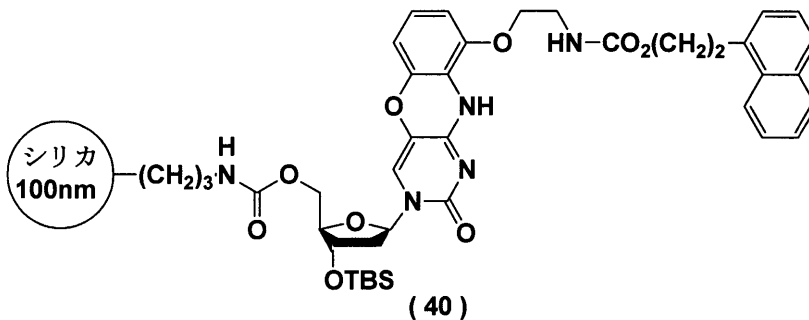
10

マイクロシリカ (Hydro 2000G, 平均粒子径 : 0.1 μm , Elkem Materials社製) 100 mgの精製水 (5 mL), エタノール (5 mL), 酢酸 (5 mL) の懸濁液に化合物 (36) (0.01 mmol) を加え、80 $^{\circ}\text{C}$ にて還流した。36時間後、減圧下エタノールを留去、酢酸溶液を飽和炭酸水素ナトリウムにて中和した。濾過によって分離し、精製水、アセトンにて十分に洗浄することにより、表題のシリカゲル粒子 (39) を得た。

【0047】

実施例 5 : シリカゲル粒子 (40) (平均粒径 100 nm) の製造

【化 2 9】



20

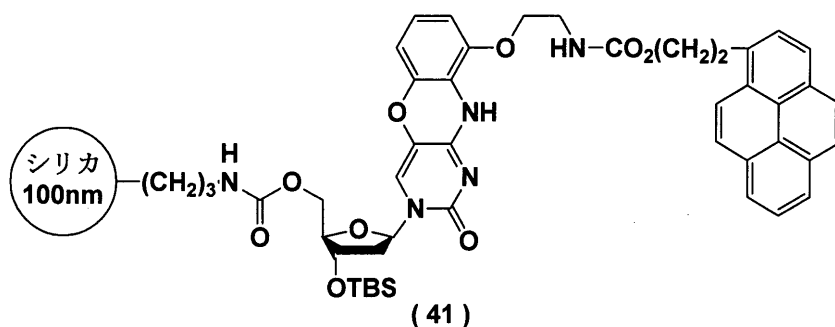
マイクロシリカ (Hydro 2000G, 平均粒子径 : 0.1 μm , Elkem Materials社製) 100 mgの精製水 (5 mL), エタノール (5 mL), 酢酸 (5 mL) の懸濁液に化合物 (37) (0.01 mmol) を加え、80 $^{\circ}\text{C}$ にて還流した。36時間後、減圧下エタノールを留去、酢酸溶液を飽和炭酸水素ナトリウムにて中和した。濾過によって分離し、精製水、アセトンにて十分に洗浄することにより、表題のシリカゲル粒子 (40) を得た。

30

【0048】

実施例 6 : シリカゲル粒子 (41) (平均粒径 100 nm) の製造

【化 3 0】



40

マイクロシリカ (Hydro 2000G, 平均粒子径 : 0.1 μm , Elkem Materials社製) 100 mgの精製水 (5 mL), エタノール (5 mL), 酢酸 (5 mL) の懸濁液に化合物 (38) (0.01 mmol) を加え、80 $^{\circ}\text{C}$ にて還流した。36時間後、減圧下エタノールを留去、酢酸溶液を飽和炭酸水素ナトリウムにて中和した。濾過によって分離し、精製水、アセトンにて十分に洗浄す

50

ることにより、表題のシリカゲル粒子(41)を得た。

【0049】

試験例1：元素分析

シリカゲル粒子(33)～(35)及び(39)～(41)を元素分析に付し、得られた窒素含有%から、各粒子に含まれるプローブ分子の含有量を算出し、表1に纏めた。

【表1】

表1

シリカゲル粒子	窒素含有 (%)	プローブ分子含有量 ($\mu\text{mol}/100\text{mg}$)
シリカ(NH SMB 100-10)	1.33	0
シリカゲル粒子(33)	1.83	8.91
シリカゲル粒子(34)	1.78	8.05
シリカゲル粒子(35)	2.26	16.61
シリカ(Hydro 2000G)	0	0
シリカゲル粒子(39)	0.2	2.85
シリカゲル粒子(40)	0.4	5.72
シリカゲル粒子(41)	0.2	2.09

10

20

表1から明らかなように、シリカゲル粒子(35)～(37)及び(39)～(41)には、何れもプローブ分子が含有されていることが判った。

【0050】

試験例2：蛍光顕微鏡による観察

25 μM の8-oxo-dG水溶液2 μL をシリカゲル粒子(33)～(35)に添加し、室温にて水を蒸発させた試料及び25 μM のdG水溶液2 μL をシリカゲル粒子(33)～(35)に添加し、室温にて水を蒸発させた試料において蛍光反応性がどのように変化するかを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

尚、励起波長345 nm、蛍光波長455 nmで測定した。

観察の結果得られた写真を図3に示した。

30

写真から明らかなように、8-oxo-dG水溶液を添加した試料は、何れも、対照(水)と比較して明らかな蛍光消光が観察されたのに対して、dG水溶液を添加した試料では、このような蛍光消光は観察されなかった。

【0051】

試験例3：8-oxo-dG認識能の評価

上記で製造したシリカゲル粒子(33)～(35)における8-oxo-dGの認識能の評価を以下の操作で行った。

測定プレートはポリスチレン製のブラックプレートを用いた。近紫外落射光源(365 nm)、Y515フィルタ(Y515-Di)を用いて評価した。測定に用いた核酸塩基(8-oxoG、G)の10 mMの精製水溶液を調整し、これを希釈して5 mMのストック溶液を準備し、各シリカゲル粒子上に μL 単位で添加していった。自然乾燥後、富士フィルム株式会社製の冷却CCDカメラシステム LAS 4000を用いてシリカゲル粒子の蛍光強度を測定した。

40

検出手法...Fluorescence DAPI、光源...UV (365 nm EPI)、フィルタ...Y515-Di、感度...Standard、露出タイプ...Precision、露光時間...AUTO、トレイ位置...NO.1

シリカゲル粒子(33)における8-oxo-dG及びdGの濃度に対する蛍光相対強度のグラフを図4の左に示し、この際の8-oxo-dG濃度に対する消光率をh i l lプロットに変換したグラフを図4の右に示し、シリカゲル粒子(34)における8-oxo-dG及びdGの濃度に対する蛍光相対強度のグラフを図5の左に示し、この際の8-oxo-dG濃度に対する消光率をh i l lプロットに変換したグラフを図5の右に示し、シリカゲル粒子(35)における8-oxo-dG及びdGの濃度に対する蛍光相対強度のグラフを図6の左に示し、この際の8-oxo-dG濃

50

度に対する消光率を $h i l l$ プロットに変換したグラフを図 6 の右に示した。

図 10 ~ 12 の左図から、シリカゲル粒子 (33) ~ (35) は、何れも 8-oxo-dG の濃度が高くなるに従って、蛍光強度が減少し、一方、dG の濃度は、蛍光強度に殆ど影響しないことが判った。

また、シリカゲル粒子 (33) ~ (35) における 8-oxo-dG 濃度対蛍光消光率の $h i l l$ プロットを示す図 4 ~ 6 の右図は、何れも良好な直線性を示しており、8-oxo-dG に対して濃度依存的に蛍光消光することが実証された。

また、このことからグラフにおける 8-oxo-dG の最低濃度である 25 nM 以上であれば定量検定できることが判り、そのため、シリカゲル粒子 (33) ~ (35) は、一般に、8-oxo-dG の濃度が 10 - 20 ng/mL (35 - 70 nM) 程度と報告されている尿の定量検定においても十分に使用可能であることが判った。

【0052】

試験例 4 : 8-oxo-dG と dG の競合試験

上記で製造したシリカゲル粒子 (33) ~ (35) に、2.5 pmol の 8-oxo-dG と種々の異なる濃度 (0、2.5、5、12、5、25、50、125、250 pmol) の dG の両方を添加して、その際の蛍光強度を測定し、8-oxo-dG による蛍光消光に対する dG の影響を評価した。

結果として得られたグラフを図 7 に示した。

図 7 から明らかなように、シリカゲル粒子 (33) ~ (35) における、8-oxo-dG による蛍光消光は、dG の影響を殆ど受けないことが判った。

このことから、シリカゲル粒子 (33) ~ (35) は、8-oxo-dG と dG の両方を含む水性の検体溶液から、dG の濃度に殆ど影響されることなく、8-oxo-dG を高感度で定量検定し得ることが明らかとなった。

【0053】

試験例 5 : マルチプレートリーダーを使った濃度依存的な輝度減衰率の確認試験

1) 実験操作

平均粒径 10 μ m であるシリカゲル粒子 (33) 40 ng の水性懸濁液 4 μ L を、384 ウェルタイプのマイクロプレート (コーニング社製) の各ウェルに添加した。

その後、50 の乾熱オープン (EYELA NDO-601SD) 内に 2 時間静置し、水分を蒸散させることでシリカゲル粒子をウェル表面に乾着させた。

次に、水性の検体溶液 (8-oxo-dG の標準品 (和光純薬) の水溶液) 2 μ L (8-oxo-dG 濃度: 0 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、各濃度 4 ウェル) を添加し、50 の乾熱オープン内に静置した。

検体溶液添加前の光学濃度 (OD) の平均値 (N = 4) を基準として、添加後 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間における OD の平均値 (N = 4) から各時間の輝度の減衰率を導きだした。

2) 測定条件

装置: マイクロプレートリーダー MTP-880 Lab (コロナ電気株式会社)

励起波長: 365nm

測定波長: 450nm

フラッシュ回数: 100

測定感度: x1

ミキシング: 5秒、直線

8-oxo-dG 濃度 0 ~ 500 ng/mL での各時間における測定結果のグラフを図 8 に示し、8-oxo-dG 濃度 0 ~ 20 ng/mL での各時間における測定結果のグラフを図 9 に示した。

また、平均粒径 10 μ m であるシリカゲル粒子 (33) 40 ng の水性懸濁液 4 μ L に代えて平均粒径 100 nm であるシリカゲル粒子 (39) 160 ng の水性懸濁液 4 μ L を用いた以外は上記と同様の操作を行い、その際の、8-oxo-dG 濃度 0 ~ 500 ng/mL

での各時間における測定結果のグラフを図10に示し、8-oxo-dG濃度0～20 ng/mLでの各時間における測定結果のグラフを図11に示した。

3) 結果

平均粒径10 μmであるシリカゲル粒子(33)を用いた場合、検体溶液添加後1時間で、8-oxo-dG濃度0～500 ng/mLにおいて、また、8-oxo-dG濃度0～20 ng/mLにおいても、輝度の減衰率と相関する(8-oxo-dG濃度が高くなるほどOD値が減少する)ことが判った(図8及び図9参照)。

このように、検体溶液添加後1時間でのOD値を測定することにより、例えば、8-oxo-dG濃度0～20 ng/mLという非常に低濃度の検体溶液においても、正確に8-oxo-dGを定量検出できることが判った。

平均粒径100 nmであるシリカゲル粒子(39)を用いた場合、8-oxo-dG濃度100～500 ng/mLにおいては、輝度の減衰率と相関する(8-oxo-dG濃度が高くなるほどOD値が減少する)ことが判った(検体溶液添加後30分～4時間)ものの、8-oxo-dG濃度20～500 ng/mLにおいては、輝度の減衰率と相関するというデータは得られなかった(図10及び図11参照)。

しかし、8-oxo-dG濃度0～20 ng/mLにおけるOD値の変化を示す図11から、1～4 ng/mLという低濃度においてそれぞれ異なる時間に発光する(OD値が100%を超える)という現象が観察され、即ち、1 ng/mLでは1時間後に発光し、2 ng/mLでは2時間後に発光し、4 ng/mLでは、3時間後に発光するという現象が観察された。

従って、例えば、1～4 ng/mLという非常に低い濃度の検体溶液においても、発光時間を測定することにより、非常に高い感度で8-oxo-dGを定量検出できる可能性が示唆された。

4) まとめ

8-oxo-dGの認識分子を担持したシリカゲル粒子の輝度減衰は、標準8-oxo-dGの濃度と乾燥時間に依存して合理的に変化した。また、平均粒径が10 μmであるシリカゲル粒子よりも平均粒径が100 nmであるシリカゲル粒子の方が、高感度の測定に適する可能性が示唆された。

【0054】

試験例6：HPLC用分離カラムとしての実用性(8-oxo-dGの保持能の検討)

1) 実験操作

HPLCのプレカラムに平均粒径10 μmであるシリカゲル粒子(33)10 mgを充填し、HPLCにて8-oxo-dGの分離同定をした。

2) 測定条件

機器： HTEC-500(エイコム社)(8-oxo-dGは電気化学的に検出)

ODSカラム： CA-50DS, 2.1 x 150mm

プレカラム： 分離用のODS粒子(5 μm)100 mgに加え、シリカゲル粒子(33)10 mgを充填

移動相： リン酸緩衝液(pH6.5-6.8)、メタノール2%、SDS 90mg/L

試薬： 8-oxo-dG(和光純薬)、500ng/mLの10 μLを注入

3) 結果

8-oxo-dGの保持時間は、プレカラムにシリカゲル粒子(33)を使用しない場合には28.09分であったものが、プレカラムにシリカゲル粒子(33)を充填した場合には29.00分となり、3.2%遅延される(遅延率：3.2%)ことが判った。

また、8-oxo-dGのピーク値は、プレカラムにシリカゲル粒子(33)を使用しない場合には43.96 mVであり、プレカラムにシリカゲル粒子(33)を使用した場合にも44.22 mVであり、ピーク減衰は観察されなかった。

4) まとめ

8-oxo-dGの認識分子を化学的に担持させたシリカゲル粒子(33)をHPLCの流路中に配置することで、8-oxo-dGのピーク出現は遅延するが、ピーク値の減衰はなかった。H

10

20

30

40

50

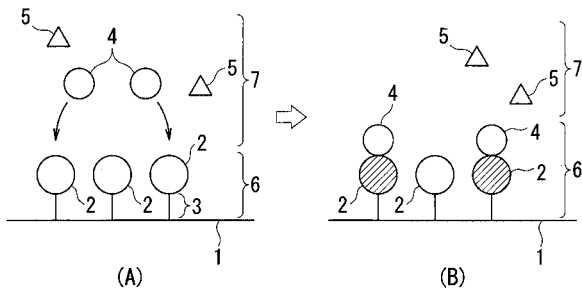
PLC + ECD (電気化学検出)で8-oxo-dGを検出する場合、移動相として今回使用したようなメタノール添加のリン酸緩衝液が一般的であるが、シリカゲル粒子(33)は、同緩衝液中の8-oxo-dGに対しても一定の親和性を示し、分離カラム用の充填剤としての有用性が示された。

【符号の説明】

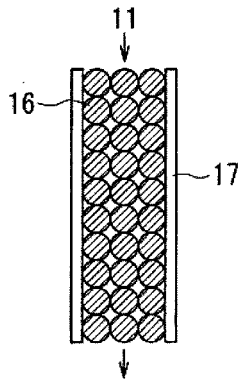
【0055】

- 1 : 微粒子表面
- 2 : 8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子
- 3 : スペースユニット
- 4 : 8-oxo-dG
- 5 : dG
- 6 : 微小疎水空間
- 7 : 水相
- 11 : 水性の検体溶液
- 16 : 8-oxo-dGに対して特異的な蛍光応答を示す蛍光プローブ分子が固定された微粒子
- 17 : カラム

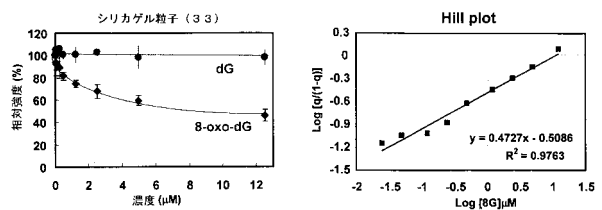
【図1】



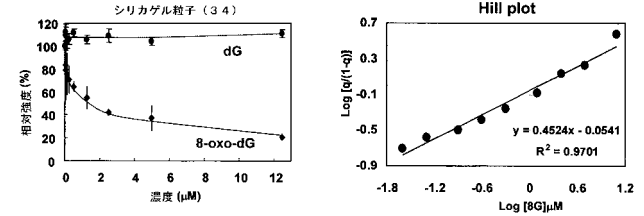
【図2】



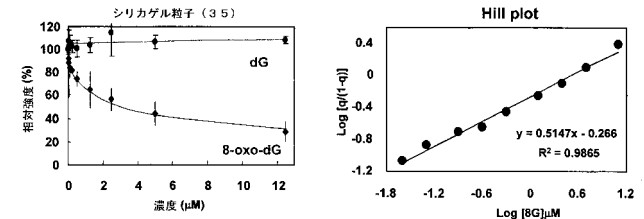
【図4】



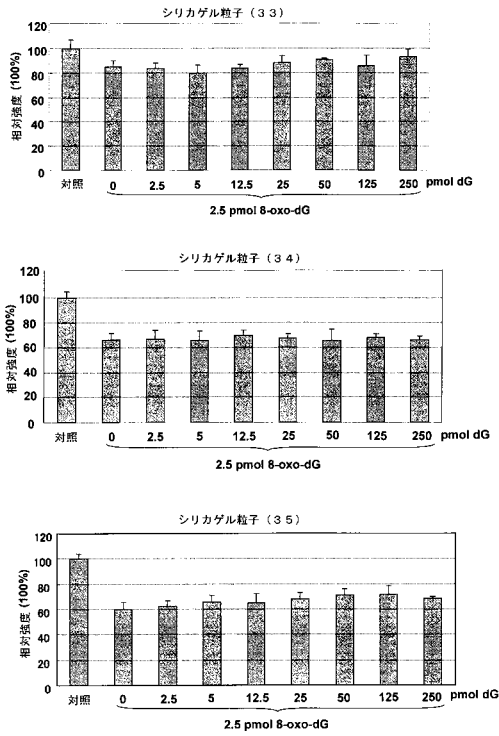
【図5】



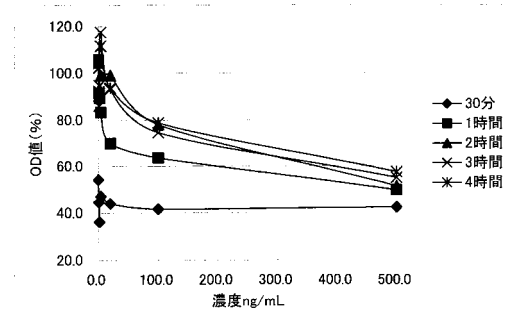
【図6】



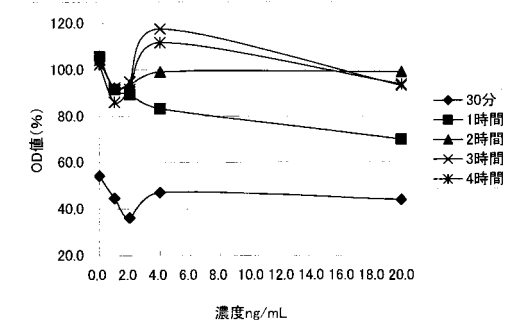
【 図 7 】



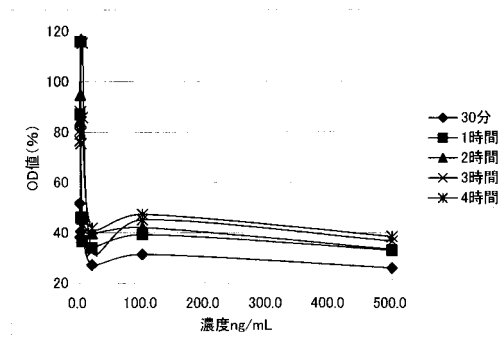
【 図 8 】



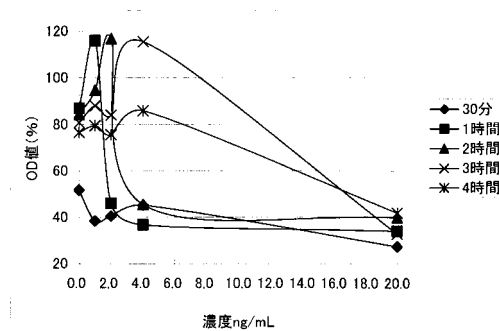
【 図 9 】



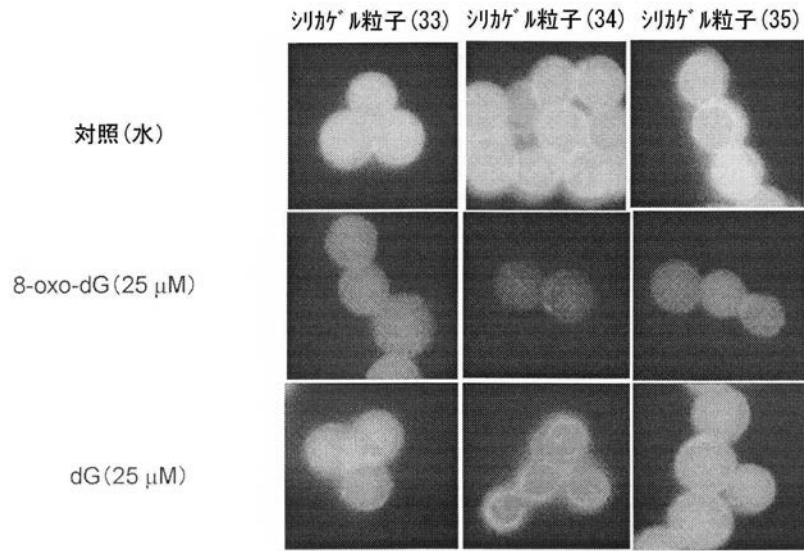
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 3 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/057750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N21/78(2006.01)i, G01N5/02(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)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) G01N21/62-21/83, G01N5/02, G01N21/27, G01N33/53, G01N33/543		
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 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Nakagawa, O., Specific Fluorescent Probe for 8-Oxoguanosine, Angew.Chem., 2007, 119, 4584-4587	1-6, 8, 9 7, 10
Y A	Nasr, T., Selective fluorescence quenching of the 8-oxoG-clamp by 8-oxodeoxyguanosine in ODN, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19, 727-730	1-6, 8, 9 7, 10
Y A	WO 2007/074722 A1 (The Furukawa Electric Co., Ltd.), 05 July 2007 (05.07.2007), claims; paragraph [0053] & JP 2010-112957 A & US 2008/0293584 A1	1-6, 8, 9 7, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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	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
		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
		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 08 May, 2012 (08.05.12)	Date of mailing of the international search report 22 May, 2012 (22.05.12)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/057750

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2002-253232 A (Hitachi, Ltd.), 10 September 2002 (10.09.2002), claims & US 2002/0123155 A1 & EP 1239286 A2	1-6, 8, 9 7, 10
Y A	JP 2004-354164 A (Olympus Corp.), 16 December 2004 (16.12.2004), claims (Family: none)	1-6, 8, 9 7, 10
A	JP 6-65280 A (Merck Patent GmbH), 08 March 1994 (08.03.1994), entire text & EP 567841 A2 & DE 4213703 A1	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 7 7 5 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N21/78(2006.01)i, G01N5/02(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)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. G01N21/62-21/83, G01N5/02, G01N21/27, G01N33/53, G01N33/543			
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 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012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 (JDreamII)			
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	
Y A	Nakagawa, O., Specific Fluorescent Probe for 8-Oxoguanosine, Angew. Chem., 2007, 119, 4584-4587	1-6, 8, 9 7, 10	
Y A	Nasr, T., Selective fluorescence quenching of the 8-oxoG-clamp by 8-oxodeoxyguanosine in ODN, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19, 727-730	1-6, 8, 9 7, 10	
Y A	WO 2007/074722 A1 (古河電気工業株式会社) 2007.07.05, 請求の範囲, [0053] & JP 2010-112957 A & US 2008/0293584 A1	1-6, 8, 9 7, 10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 08.05.2012		国際調査報告の発送日 22.05.2012	
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) 伊藤 裕美	2W 9515
		電話番号 03-3581-1101	内線 3292

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 7 7 5 0
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
Y A	JP 2002-253232 A (株式会社日立製作所) 2002.09.10, 特許請求の範囲 & US 2002/0123155 A1 & EP 1239286 A2	1-6, 8, 9 7, 10
Y A	JP 2004-354164 A (オリンパス株式会社) 2004.12.16, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6, 8, 9 7, 10
A	JP 6-65280 A (メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレ ンクテル ハフトング) 1994.03.08, 全文 & EP 567841 A2 & DE 4213703 A1	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(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, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

(72)発明者 中川 治
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 李 志春
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 高木 厚司
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 齋藤 幸代
福岡県福岡市早良区室見五丁目11番20-202号 株式会社TASプロジェクト内

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA28 AA40 CA26 CB01 CB03 CB21 CB30 DA13
FA29 FB06 FB12 GC15
2G054 AA07 BB13 CE02 EA03 EA04 FA06 GA03 GA04 GB01 JA06

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。