

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-279028

(P2007-279028A)

(43) 公開日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	4 H O 4 5
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 1	
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	
CO 7 K 1/113 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
	CO 7 K 1/113	

審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 57 頁)

(21) 出願番号 特願2007-63398 (P2007-63398)  
 (22) 出願日 平成19年3月13日 (2007.3.13)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-68355 (P2006-68355)  
 (32) 優先日 平成18年3月13日 (2006.3.13)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000005968  
 三菱化学株式会社  
 東京都港区芝4丁目14番1号  
 (74) 代理人 100092978  
 弁理士 真田 有  
 (72) 発明者 花崎 美奈子  
 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内  
 (72) 発明者 五十島 健史  
 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内

最終頁に続く

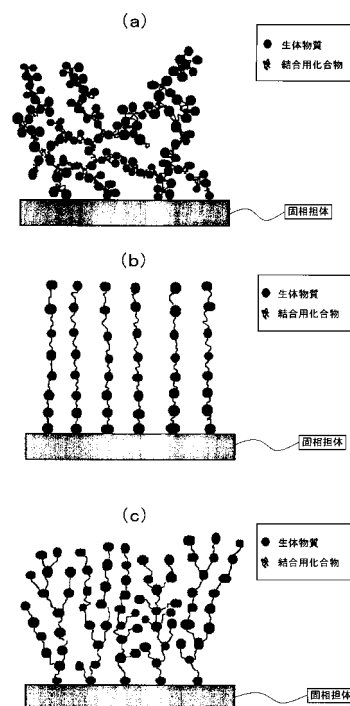
(54) 【発明の名称】 孔を有する生体物質構造体及びその製造方法、並びに、それを用いた生体物質担持体、対象物質の精製方法、アフィニティークロマトグラフィー用容器、分離用チップ、対象物質の解析方法、

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生体物質の反応性を保ったまま、従来よりも多量の生体物質を含有でき、かつ微小な孔を有する生体物質構造体を提供する。

【解決手段】 生体物質、及び、生体物質と結合可能な化合物からなる主鎖により、300nm以上100µm以下の径を有する孔を形成された生体物質構造体を構成する。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体物質、及び、該生体物質と結合可能な化合物からなる主鎖を有し、該主鎖によって 300 nm 以上 100 μm 以下の径を有する孔が形成されていることを特徴とする、生体物質構造体。

## 【請求項 2】

生体物質、該生体物質と結合可能な化合物、並びに、該生体物質及び該化合物に結合せず、300 nm 以上 100 μm 以下の径を有する領域を形成し得る非結合物質を、所定の媒質中に共存させる工程を経て得られる生体物質構造体であって、

該生体物質と該化合物とからなる主鎖が形成されると共に、  
該主鎖によって 300 nm 以上 100 μm 以下の径を有する孔を形成されたことを特徴とする、生体物質構造体。

10

## 【請求項 3】

該生体物質と該化合物とからなり、10 μm 以下の粒径を有する粒子状塊を有することを特徴とする、請求項 1 又は請求項 2 記載の生体物質構造体。

## 【請求項 4】

該生体物質構造体の重量に対する該生体物質の重量の比率が 0.1 以上であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

## 【請求項 5】

乾燥状態において、1 μm 以上の径を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

20

## 【請求項 6】

該化合物の分子量が 1000 以上であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

## 【請求項 7】

該化合物の少なくとも 1 種が、該生体物質と結合可能な官能基を 2 点以上有することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

## 【請求項 8】

該化合物が無電荷であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

30

## 【請求項 9】

該化合物が、水に混和しうると共に、少なくとも 1 種の有機溶媒に混和しうることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

## 【請求項 10】

液体中に混和した状態での該化合物の径が 1 nm 以上であることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

## 【請求項 11】

該生体物質が生体分子であることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

## 【請求項 12】

該生体物質がタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体。

40

## 【請求項 13】

生体物質、及び、前記生体物質と結合可能な化合物からなる主鎖を有する生体物質構造体の製造方法であって、

前記生体物質、前記化合物、並びに、前記生体物質及び前記化合物に結合せず、300 nm 以上 100 μm 以下の径を有する領域を形成し得る非結合物質を、所定の媒質中に共存させる混合工程を有する

ことを特徴とする、生体物質構造体の製造方法。

## 【請求項 14】

50

該混合工程の後、前記非結合物質を除去する除去工程を有することを特徴とする、請求項 1 3 記載の生体物質構造体の製造方法。

【請求項 1 5】

前記非結合物質が、水混和性物質であることを特徴とする、請求項 1 3 又は請求項 1 4 記載の生体物質構造体の製造方法。

【請求項 1 6】

前記非結合物質が、水溶性高分子化合物であることを特徴とする、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体の製造方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれかの 1 項に記載の生体物質構造体が固相担体に固定されてなることを特徴とする、生体物質担持体。

10

【請求項 1 8】

該生体物質構造体の厚みが 5 0 n m 以上であることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の生体物質担持体。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体と、上記生体物質に特異的に吸着しうる対象物質を含む試料液とを接触させ、  
上記生体物質構造体と上記試料液とを分離し、  
上記生体物質構造体に吸着した上記対象物質を遊離させることを特徴とする、対象物質の精製方法。

20

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体を保持した流路に、上記生体物質に特異的に相互作用する対象物質を含む試料液を流通させ、  
上記流路から流出する溶出液のうち、上記対象物質を含む分画を回収することを特徴とする、対象物質の精製方法。

【請求項 2 1】

流体を収納しうる容器本体と、  
該容器本体内に保持された、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体を備えたことを特徴とする、アフィニティークロマトグラフィー用容器。

30

【請求項 2 2】

流路を形成された基板と、  
該流路に保持された、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体を備えたことを特徴とする、分離用チップ。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体であって、特定の構造を有する物質を特異的に吸着させうる生体物質を用いた生体物質構造体と、対象物質を含有する試料液とを接触させ、  
上記生体物質構造体と上記試料液とを分離し、  
上記生体物質に吸着した上記対象物質の量を測定して、上記対象物質の構造を解析することを特徴とする、対象物質の解析方法。

40

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体であって、特定の構造を有する物質と特異的に相互作用しうる生体物質を用いた生体物質構造体を保持した流路に、対象物質を含む試料液を流通させ、  
上記流路から流出する溶出液の分画中の上記対象物質の量を測定して、上記対象物質の構造を解析することを特徴とする、対象物質の解析方法。

50

## 【請求項 25】

流路を形成された基板、及び、該流路に保持され、特定の構造を有する物質と特異的に相互作用しうる生体物質を用いた請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体を備える分離用チップと、

該分離用チップの該流路に、対象物質を含む試料液を流通させる試料液供給部と、

該流路から流出する溶出液の分画中の上記対象物質の量を測定する測定部とを備えることを特徴とする、対象物質の解析用分離装置。

## 【請求項 26】

流路を形成された基板、及び、上記流路に保持され、特定の構造を有する物質と特異的に相互作用しうる生体物質を用いた請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体を備える分離用チップを装着するチップ装着部と、

該チップ装着部に上記分離用チップを装着した場合に、上記流路に、対象物質を含む試料液を流通させる試料液供給部と、

上記流路から流出する溶出液の分画中の上記対象物質の量を測定する測定部とを備えることを特徴とする、対象物質の解析用分離装置。

## 【請求項 27】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の生体物質構造体を備えたことを特徴とする、センサーチップ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、孔を有する生体物質構造体及びその製造方法、並びに、それを用いた生体物質担持体、対象物質の精製方法、アフィニティークロマトグラフィー用容器、分離用チップ、対象物質の解析方法、対象物質の解析用分離装置、及びセンサーチップに関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

医療・診断、遺伝子解析、プロテオミクス、マイクロエレクトロニクス、膜分離等の分野においては、生体物質と、当該生体物質と特異的に相互作用する物質（対象物質）との相互作用を用い、診断、検査、分析、精製等を行なうことがある。そこで、前記の診断、検査、分析、精製等を適切に行なうために、生体物質を含む構造体に関し、様々な技術が開発されている。

## 【0003】

例えば、生体物質を基材に高濃度で固定化または担持し、生体物質固定化物を形成する技術が提案されている。この場合、生体物質固定化物に、当該生体物質と対象物質との相互作用を効果的に行なうことのできる空間を保持した構造を適用できれば、さらに高感度な生体物質固定化物が実現できると考えられる。

## 【0004】

近年、これらを解決する方法として、多孔構造を有する基材に生体物質を固定化しようという試みがなされている。多孔構造を有する基材は、多孔構造を有しない基材に比べて表面積が非常に大きい。このため、当該基材の表面に多くの生体物質を固定化または担持することで、対象物質に対する相互作用の感度を上げることができる。その例として、特許文献 1 に記載のように、タンパク質を固定化する基材として多孔質材料を用いることが提案されている。

## 【0005】

また、特許文献 2 及び特許文献 3 には、発泡剤を用いた生体物質の架橋方法が提案されている。この方法は、系内に発泡剤を組み込むことによって、水溶液を用いるだけで生体物質の架橋構造体中に泡状の構造を形成させることができるという利点を有する。

この他に、非特許文献 1 に記載のように、エレクトロスプレー法を用いた多孔構造を有するタンパク質からなる構造体の作製技術も提案されている。

10

20

30

40

50

また、3次元配線構造の製造を目的とした多孔構造体の製造方法として、特許文献4には、相分離を用いた方法が提案されている。この方法では、相分離構造を構成させた後に、これを形成する少なくとも1種の相を除去することによって多孔構造体が形成される。

【0006】

【特許文献1】特開2004-191341号公報

【特許文献2】国際公開第02/085284 A2号パンフレット

【特許文献3】特表2004-537136号公報

【特許文献4】特開2001-83347号公報

【非特許文献1】J. Colloid and Interface Science  
269 (2004) 336-340

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、従来技術では未だ改良の余地があり、生体物質を含有した微小空間（即ち、生体物質と対象物質との相互作用を効果的に行なうことのできる空間）の作製に関し、更なる技術向上開発が求められていた。例えば、上述した特許文献1等に記載の技術では、製造が多段階的であったり、簡便な方法によって微小構造を作製することができなかつたりしていた。

【0008】

また、特許文献2に記載の技術では、微小構造の制御が困難であった。

20

さらに、非特許文献1等に記載のエレクトロスプレー法では、ファイバーの作製において、粘度などの条件に依存することが多く、高電場の印加により生体物質が変性してしまう可能性があった。

また、特許文献3等に記載の技術では、相分離構造を形成させた後に少なくとも1つ以上の相を除去するために、除去する相のみに親和性のある有機溶媒を用いて選択的に該相を溶解させて除去する必要があった。このため、用いる溶媒が限定されてしまい、また、生体物質を用いて同手法を行なった場合には、洗浄する選択溶媒によって生体物質が変性してしまう可能性があった。

【0009】

本発明は上記の課題に鑑みて創案されたもので、生体物質の反応性を保ったまま、従来よりも多量の生体物質を含有でき、かつ微小な孔を有する生体物質構造体及びその製造方法、並びに、それを有する生体物質担持体を提供し、これにより、高効率で分離が容易な対象物質の精製方法及び対象物質の解析方法、並びに、それに用いるアフィニティークロマトグラフィー用容器、分離用チップ、対象物質の解析用分離装置及びセンサーチップを提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の発明者らは、上記課題を解決するべく鋭意検討した結果、生体物質、及び、当該生体物質と結合可能な化合物を含んで形成された生体物質構造体に対し、所定の径を有する孔を形成することにより、生体物質構造体内部への対象物質の拡散効率を上げることができ、当該生体物質と対象物質との相互作用をより速やかに行なうことが可能な生体物質構造体を実現できるとの見地を得た。また、この生体物質構造体は、前記生体物質及び前記化合物と、前記生体物質及び前記化合物に結合しない非結合物質とを媒質中に共存させ、その後、必要に応じて当該非結合物質を除去することにより製造できるとの見地を得た。本発明は、上記の見地を基に創案されたものである。

40

【0011】

即ち、本発明の要旨は、生体物質、及び、当該生体物質と結合可能な化合物からなる主鎖を有し、該主鎖によって300nm以上100µm以下の径を有する孔を形成されていることを特徴とする、生体物質構造体に存する（請求項1）。

【0012】

50

本発明の別の要旨は、生体物質、該生体物質と結合可能な化合物、並びに、該生体物質及び該化合物に結合せず、300nm以上100 $\mu$ m以下の径を有する領域を形成し得る非結合物質を、所定の媒質中に共存させる工程を経て得られる生体物質構造体であって、該生体物質と該化合物とからなる主鎖が形成されると共に、該主鎖によって300nm以上100 $\mu$ m以下の径を有する孔を形成されたことを特徴とする、生体物質構造体に存する（請求項2）。

【0013】

このとき、生体物質構造体は、該生体物質と該化合物とからなる粒子状塊を有することが好ましい（請求項3）。

また、該生体物質構造体の重量に対する生体物質の重量の比率は、0.1以上であることが好ましい（請求項4）。

さらに、生体物質構造体は、乾燥状態において、1 $\mu$ m以上の径を有することが好ましい（請求項5）。

【0014】

また、該化合物の分子量は、1000以上であることが好ましい（請求項6）。

さらに、該化合物の少なくとも1種が、生体物質と結合可能な官能基を2点以上有することが好ましい（請求項7）。

また、該化合物は、無電荷であることが好ましい（請求項8）。

さらに、該化合物は、水に混和しうると共に、少なくとも1種の有機溶媒に混和しうることが好ましい（請求項9）。

【0015】

また、液体中に混和した状態での該化合物の径は1nm以上であることが好ましい（請求項10）。

さらに、該生体物質は、生体分子であることが好ましく（請求項11）、タンパク質であることがより好ましい（請求項12）。

【0016】

本発明の更に別の要旨は、生体物質、及び、前記生体物質と結合可能な化合物からなる主鎖を有する生体物質構造体の製造方法であって、前記生体物質、前記化合物、並びに、前記生体物質及び前記化合物に結合せず、300nm以上100 $\mu$ m以下の径を有する領域を形成し得る非結合物質を、所定の媒質中に共存させる混合工程を有することを特徴とする、生体物質構造体の製造方法に存する（請求項13）。

【0017】

このとき、本発明の生体物質構造体の製造方法は、該混合工程の後、前記非結合物質を除去する除去工程を有することが好ましい（請求項14）。

また、前記非結合物質は、水混和性物質であることが好ましく（請求項15）、水溶性高分子化合物であることがより好ましい（請求項16）。

【0018】

本発明の更に別の要旨は、前記の生体物質構造体が固相担体に固定されてなることを特徴とする、生体物質担持体に存する（請求項17）。

このとき、生体物質構造体の厚みは、50nm以上であることが好ましい（請求項18）。

【0019】

本発明の更に別の要旨は、前記の生体物質構造体と、上記生体物質に特異的に吸着しうる対象物質を含む試料液とを接触させ、上記生体物質構造体と上記試料液とを分離し、上記生体物質構造体に吸着した上記対象物質を遊離させることを特徴とする、対象物質の精製方法に存する（請求項19）。

【0020】

本発明の更に別の要旨は、前記の生体物質構造体を保持した流路に、上記生体物質に特異的に相互作用する対象物質を含む試料液を流通させ、上記流路から流出する溶出液のうち、上記対象物質を含む分画を回収することを特徴とする、対象物質の精製方法に存する

10

20

30

40

50

(請求項20)。

【0021】

本発明の更に別の要旨は、流体を収納しうる容器本体と、該容器本体内に保持された前記の生体物質構造体とを備えたことを特徴とする、アフィニティークロマトグラフィー用容器に存する(請求項21)。

【0022】

本発明の更に別の要旨は、流路を形成された基板と、該流路に保持された前記の生体物質構造体とを備えたことを特徴とする、分離用チップに存する(請求項22)。

【0023】

本発明の更に別の要旨は、前記の生体物質構造体であって、特定の構造を有する物質を特異的に吸着させうる生体物質を用いた生体物質構造体と、対象物質を含有する試料液とを接触させ、上記生体物質構造体と上記試料液とを分離し、上記生体物質に吸着した上記対象物質の量を測定して、上記対象物質の構造を解析することを特徴とする、対象物質の解析方法に存する(請求項23)。

10

【0024】

本発明の更に別の要旨は、前記の生体物質構造体であって、特定の構造を有する物質と特異的に相互作用しうる生体物質を用いた生体物質構造体を保持した流路に、対象物質を含む試料液を流通させ、上記流路から流出する溶出液の分画中の上記対象物質の量を測定して、上記対象物質の構造を解析することを特徴とする、対象物質の解析方法に存する(請求項24)。

20

【0025】

本発明の更に別の要旨は、流路を形成された基板、及び、該流路に保持され、特定の構造を有する物質と特異的に相互作用しうる生体物質を用いた前記の生体物質構造体を備える分離用チップと、該分離用チップの該流路に、対象物質を含む試料液を流通させる試料液供給部と、該流路から流出する溶出液の分画中の上記対象物質の量を測定する測定部とを備えることを特徴とする、対象物質の解析用分離装置に存する(請求項25)。

【0026】

本発明の更に別の要旨は、流路を形成された基板、及び、上記流路に保持され、特定の構造を有する物質と特異的に相互作用しうる生体物質を用いた前記の生体物質構造体を備える分離用チップを装着するチップ装着部と、該チップ装着部に上記分離用チップを装着した場合に、上記流路に、対象物質を含む試料液を流通させる試料液供給部と、上記流路から流出する溶出液の分画中の上記対象物質の量を測定する測定部とを備えることを特徴とする、対象物質の解析用分離装置に存する(請求項26)。

30

【0027】

本発明の更に別の要旨は、前記の生体物質構造体を備えたことを特徴とする、センサーチップに存する(請求項27)。

【発明の効果】

【0028】

本発明によれば、生体物質の反応性を保ったまま、従来よりも多量の生体物質を含有でき、かつ微小な孔を有する生体物質構造体及びその簡便な製造方法を提供することができる。

40

また、本発明によれば、前記生体物質構造体を有する生体物質担持体を提供することができる。前記生体物質構造体自体が多量の生体物質を含み、孔を有するものであるので、従来のように特殊な多孔構造を有する基板等は通常は不要である。さらに、高効率で分離が容易な対象物質の精製方法及び対象物質の解析方法、並びに、それに用いるアフィニティークロマトグラフィー用容器、分離用チップ、及び、対象物質の解析用分離装置を提供することができる。

さらに、本発明のセンサーチップによれば、非特異的吸着の抑制が可能になると共に分析を高感度に行なうことが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

50

## 【0029】

以下、本発明について詳細に説明するが、本発明は以下に示す実施形態や例示物などに限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において任意に変更して実施することができる。

## 【0030】

## [ I . 生体物質構造体の構成 ]

本発明の生体物質構造体は、生体物質、及び、この生体物質と結合可能な化合物（以下適宜、「結合用化合物」という。）を含んで形成された構造体である。詳しくは、生体物質及び結合用化合物からなる主鎖を有して構成された構造体である。また、本発明の生体物質構造体には、前記の主鎖によって、所定の径を有する孔（以下適宜、「特定孔」という）が形成されている。

10

## 【0031】

## [ I - 1 . 生体物質 ]

生体物質は、本発明の生体物質構造体を構成する要素であり、その目的に応じて、本発明の効果を著しく損なわない限り任意の物質を用いることができる。

中でも、本発明の生体物質構造体を対象物質の精製や解析用途に用いる場合には、通常は、生体物質は、所定の物質（以下適宜、生体物質と相互作用する物質を「作用物質」という）と相互作用しうるものを用いるようにする。

## 【0032】

例えば、本発明の生体物質構造体を対象物質の精製などの用途で用いる場合には、生体物質として作用物質と相互作用できるものを用いるようにし、また、当該作用物質に該当する物質（即ち、生体物質と相互作用しうる物質）を対象物質として用いる。そして、上記の相互作用を利用して、対象物質の分離精製を行なうようにする。

20

## 【0033】

また、例えば、本発明の生体物質構造体を対象物質の解析用途に用いる場合にも、生体物質としては上記の作用物質と相互作用できるものを用いる。そして、対象物質と生体物質とが相互作用するかどうかを試し、対象物質と生体物質とが相互作用を生じるようであれば、上記の対象物質は作用物質のうち1種に該当する。即ち、対象物質が生体物質と相互作用を生じるような特定の構造を有している、と解析することができる。これを利用して、対象物質の構造や、作用物質の構造を解析することが可能である。

30

## 【0034】

ここで、生体物質と作用物質との「相互作用」とは、特に限定されるものではないが、通常は、共有結合、イオン結合、キレート結合、配位結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合、及び静電力による結合のうち少なくとも1つから生じる物質間に働く力による作用を示す。ただし、本明細書に言う「相互作用」との用語は最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。また静電力による結合とは、静電結合の他、電気的反発も含有する。また、上記作用の結果生じる結合反応、合成反応、分解反応も相互作用に含有される。

## 【0035】

さらに、本発明の生体物質構造体を精製や解析用途に用いる場合には、上記の相互作用は精製や解析が可能である限り任意である。その場合の相互作用の具体例としては、抗原と抗体との間の結合及び解離、タンパク質レセプターとリガンドとの間の結合及び解離、接着分子と相手方分子との間の結合及び解離、酵素と基質との間の結合及び解離、アポ酵素と補酵素との間の結合及び解離、核酸とそれに結合する核酸又はタンパク質との間の結合及び解離、情報伝達系におけるタンパク質同士との間の結合及び解離、糖タンパク質とタンパク質との間の結合及び解離、糖鎖とタンパク質との間の結合及び解離、アビジン系タンパク質とビオチンとの結合及び解離、生理活性物質（医薬または医薬候補化合物）とタンパク質等の生体物質との結合及び解離、金属キレート、グルタチオン、マルトース等の糖とアフィニティタグ融合タンパクとの結合及び解離、糖及び糖鎖とウイルスとの結合及び解離、キレート形成基と金属イオンとの結合及び解離などが挙げられる。

40

50



なお、精製や解析の方法によっては、対象物質に対して、相互作用の中でも特に吸着が可能であるものを用いるようにする場合もある。

【0036】

生体物質の具体例を挙げれば、酵素、抗体、レクチン、レセプター、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、アルブミン、糖タンパク質等のタンパク質、ペプチド、アミノ酸、サイトカイン、ホルモン、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸(DNA, RNA, PNA)、糖、オリゴ糖、多糖、シアル酸誘導体、シアル化糖鎖等の糖鎖、脂質、上述以外の生体物質由来の高分子有機物質、低分子化合物、無機物質、若しくはこれらの融合体、または、ウイルス、若しくは細胞を構成する分子などの生体分子などが挙げられる。

10

【0037】

また、このほか、例えば、細胞等の生体分子以外の物質を生体物質として用いることもできる。

さらに、イムノグロブリンやその派生物であるF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、レセプターや酵素とその派生物、核酸、天然あるいは人工のペプチド、人工ポリマー、糖質、脂質、無機物質あるいは有機配位子、ウイルス、細胞等も、生体物質の例として挙げられる。

【0038】

また、上記の生体物質の例の中でも、タンパク質としては、タンパク質の全長であっても、結合活性部位を含む部分ペプチドであってもよい。また、アミノ酸配列、及びその機能が既知のタンパク質でも、未知のタンパク質でもよい。これらは、合成されたペプチド鎖、生体より精製されたタンパク質、あるいはcDNAライブラリー等から適当な翻訳系を用いて翻訳し、精製したタンパク質等でも標的物質として用いることができる。また、合成されたペプチド鎖は、これに糖鎖が結合した糖タンパク質であってもよい。これらのうち好ましくは、精製されたタンパク質である。

20

【0039】

タンパク質を使用することにより、本発明の生体物質構造体にタンパク質の特性を利用することができる。具体的には、例えば該生体物質にアルブミンを用いた場合、非特異的吸着を抑制することができる。また別の側面では、該生体物質にアビジンを用いれば、ビオチン化した別の生体物質又はその他の化合物を容易に且つ多量に固定化することが可能となる。さらに別の側面では、該生体物質にプロテインAを用いれば、別の生体物質として抗体を用いた場合、抗体を容易に且つ多量に固定化することが可能となる。

30

【0040】

さらに、上記の生体物質の例の中でも、核酸としては、特に制限はなく、DNA、RNAその他、アプタマー等の核酸塩基、PNA等のペプチド核酸を用いることもできる。また、塩基配列あるいは機能が、既知の核酸でも、未知の核酸でもよい。中でも好ましくは、タンパク質に結合能力を有する、核酸としての機能及び塩基配列が既知のものか、あるいは、ゲノムライブラリー等から制限酵素等を用いて切断単離してきたものを用いることができる。

40

【0041】

また、上記の生体物質の例の中でも、糖鎖としては、その糖配列あるいは機能が、既知の糖鎖でも未知の糖鎖でもよい。好ましくは、既に分離解析され、糖配列あるいは機能が既知の糖鎖が用いられる。

さらに、上記の生体物質の例の中でも、低分子化合物としては、上記の生体物質に要求される条件を満たす(例えば、上記のように相互作用する能力を有する)限り、特に制限はない。機能が未知のものでも、あるいはタンパク質に結合する能力が既に知られているものでも用いることができるが、医薬候補化合物等が好適に用いられる。

【0042】

なお、本発明の生体物質構造体を、アフィニティー精製や解析などのアフィニティー分

50

離技術を利用した分離精製に用いた場合、上記の生体物質が、分離精製対象である対象物質の標的物質となる。さらに、本発明の生体物質構造体を分析に用いた場合には、これら生体物質は、検体中の対象物質と生体物質との相互作用（結合性等）を測定する際の標的物質となる。

また、生体物質は1種を単独で用いてもよく、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用してもよい。

#### 【0043】

##### [I-2. 結合用化合物]

結合用化合物は、上記生体物質と結合しうる化合物であれば、任意の化合物を用いることができる。したがって、結合用化合物としては、上記生体物質と結合可能な官能基（以下適宜、「結合官能基」という）を有する化合物を任意に用いることができる。

ここで、結合とは、通常、共有結合、イオン結合、キレート結合、配位結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合、静電力による結合のうち一つ以上の結合から成り立つものを指す。ここで、好ましくは共有結合である。

#### 【0044】

結合官能基としては、上記の生体物質に結合可能な官能基であれば他に制限はなく、任意の官能基を用いることができる。通常は、生体物質の種類や本発明の生体物質構造体の用途などに応じて適当なものを選択することが好ましい。

なお、結合官能基は、1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で用いても良い。

#### 【0045】

結合官能基は、通常、反応性基として共有結合を介して生体物質と結合するものと、非共有結合を介して生体物質と結合するものとに大別される。

共有結合により結合する場合、結合官能基の具体例としては、スクシンイミド基、エポキシ基、アルデヒド基、マレイミド基、p-ニトロフェニル基等が挙げられる。

#### 【0046】

この場合、結合官能基と共有結合によって結合する生体物質としては、例えば、タンパク質、核酸、糖等が挙げられる。

生体物質がタンパク質である場合、通常は、タンパク質の表層に存在するアミノ基、ヒドロキシル基、チオール基等の基と、結合用化合物の結合官能基とが結合する。また、生体物質が核酸である場合も、通常は、核酸の末端に導入されるアミノ基、ヒドロキシル基、チオール基等の基と、結合用化合物の結合官能基とが結合する。さらに、生体物質が糖である場合も、通常は、糖の側鎖に存在するアミノ基、ヒドロキシル基、チオール基等の基と、結合用化合物の結合官能基とが結合する。

#### 【0047】

この際、例えばアミノ基が結合官能基と結合する場合には、結合官能基の具体例としてはスクシンイミド基、エポキシ基、アルデヒド基、p-ニトロフェニル基等が挙げられる。また、例えばヒドロキシル基が結合官能基と結合する場合には、結合官能基の具体例としてはエポキシ基等が挙げられる。さらに、例えばチオール基が結合官能基と結合する場合には、結合官能基の具体例としてはマレイミド基等が挙げられる。

#### 【0048】

一方、生体物質と結合用化合物とが非共有結合により結合する場合、例えば、錯体形成、生体物質間相互作用などにより結合をさせることができる。

生体物質と結合用化合物とで錯体を形成させて結合させる場合、結合官能基の具体例としては、ボロン酸基等が挙げられる。

また、例えば生体物質間相互作用の中でもアビジン-ビオチン相互作用により結合させる場合には、結合官能基の具体例としては、ビオチン基等が挙げられる。

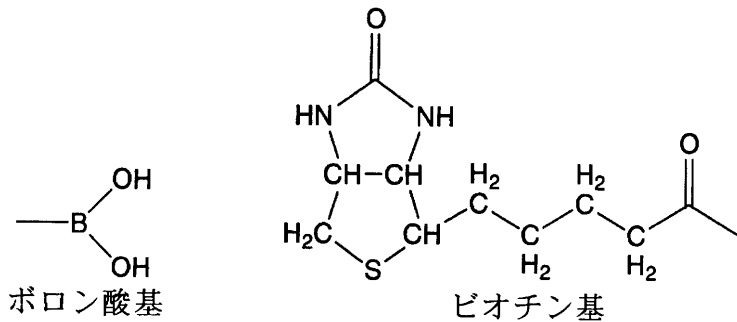
10

20

30

40

## 【化1】



10

## 【0049】

さらに、例えば生体物質としてウイルスを用いる場合、結合官能基の具体例としては糖や多糖が挙げられる。

また、例えば生体物質が疎液領域を有している場合には、疎液相互作用による物理吸着により結合させるようにしても良い。

## 【0050】

また、結合用化合物が結合官能基を有する場合、結合用化合物は、1分子中に通常2点以上、好ましくは3点以上の結合官能基を有しているものを少なくとも1種以上含むことが好ましい。これは、本発明の構造を形成しやすくするためである。具体例を挙げると、1分子中に2点以上の結合官能基を有していれば、容易に生体物質と結合用化合物が結合した粒子状塊を形成させ、さらにそれら粒子状塊同士を結合させることにより、その高次構造である生体物質構造体を形成できるようになる。また、特に、1分子中に2点以上の結合官能基を有していれば、濃縮を行なった場合などに生体物質構造体を容易に形成することができるようになる。

20

## 【0051】

ただし、本発明の生体物質構造体が、後述する粒子状塊を形成させやすくなるためには、結合用化合物同士の結合が無く、生体物質と結合用化合物との結合が主であることが好ましい。結合用化合物同士の結合がある場合、結合用化合物同士の凝集が形成されやすく、粒子状塊の粒径が大きくなる傾向があり、粒子状塊の粒径を制御し難くなるためである。また、結合用化合物同士の結合がある場合、効率よく生体物質を結合させられず、さらに、検体を本発明の生体物質構造体と反応させる際に、望ましい反応効率が得られない可能性があるためである。

30

## 【0052】

また、結合用化合物同士の結合があるときに、高分子を結合用化合物に用いた場合、結合用化合物の内部架橋が起こってしまい、さらに生体物質を固定化しにくくなる。ここで、結合用化合物同士の結合とは、分子間引力、疎液相互作用、電気的相互作用を除く結合を示す。

## 【0053】

このように結合用化合物同士の結合が無い生体物質構造体を形成させるためには、結合用化合物同士が結合しないような結合官能基を選択し、さらに、結合用化合物同士が結合する状況を排除することが望ましい。そのような官能基は具体的には前述したように、スクシンイミド基、エポキシ基、アルデヒド基、マレイミド基、ボロン酸基、ビオチン基などが挙げられる。結合用官能基同士が結合する状況とは、過度の熱を加えることや、強力な紫外線を照射することを示す。

40

## 【0054】

また、生体物質構造体に含まれる結合用化合物同士の結合を調べる方法としては、生体物質構造体中の生体物質を後述の方法で分解した時に、不溶物が形成されることで判断される。若しくは、生体物質構造体を熱分解性ガスクロマトグラフィーで分析することにより、結合用化合物同士の結合を示唆する化合物を検出することで判断される。具体的には、例えば、紫外線照射により生体物質と光反応性基とを有する結合用化合物を結合させる

50

工程において、結合用化合物内の光反応性基（例えば、アジド基）により、結合用化合物同士が結合した場合、光反応性基が関与した結合、若しくは残存光反応性基の存在により、結合用化合物同士の結合を推測することができる（アフィニティークロマトグラフィー：東京化学同人、著者：笠井献一、松本勲武、別府正敏 P 238～参照）。

【0055】

さらに、生体物質の特性を生かすために、生体物質の活性を維持するためには、生体物質が失活しないよう前述した生体物質の官能基及び結合用化合物の官能基を選択することが好ましい。例えば、タンパク質を固定化するとき、タンパク質の活性部分にチオール基を有している場合には、チオール基以外の基（例えば、アミノ基）を生体物質の結合官能基として選択し、このアミノ基と結合するために、結合用化合物の結合官能基は、スクシンイミド基、エポキシ基が選択される。

10

【0056】

さらに、結合用化合物としては、通常は、水と混和しうるものを用いることが望ましい。生体物質構造体の製造時に用いる媒質は任意であるが、通常は、溶媒や分散媒等の媒質として水を用いるためである。詳しくは、生体物質構造体の製造時には、通常、水の存在下で結合用化合物を生体物質と混合し、結合用化合物と生体物質とを結合させて粒子状塊を作製する工程を経ることになるが、そのような場合に生体物質と結合用化合物とを均一に混合し、結合反応をスムーズに行なわせるためである。なお、本明細書においては、混和の形態としては、溶解していても良いし分散していても良い。

【0057】

また、結合用化合物は、少なくとも1種の有機溶媒に混和しうることを好ましい。これにより、結合用化合物の合成時に用いる溶媒の選択の幅を広げることができ、生体物質構造体の構造を様々に設計することができるようになるためである。例えば、結合用化合物が有機溶媒に混和できれば、結合用化合物の合成時に結合官能基を保護することを目的として、合成を有機溶媒中に行なうことができるようになる。

20

【0058】

さらに、結合用化合物は、水と有機溶媒との両方に混和できるものを用いることがより好ましい。即ち、水に混和しうると共に、少なくとも1種の有機溶媒に混和しうるものがより好ましい。結合用化合物が水と有機溶媒との両方に混和できれば、本発明の生体物質構造体を使用する際に何らかの溶媒を用いる場合に、その用いることができる溶媒の種類を増やすことができるため、用途を広げることができる。

30

【0059】

また、結合用化合物は無電荷であることが望ましい。結合用化合物が生体物質と同じ電荷（同符号の電荷）を有していると、静電的反発力により、結合用化合物と生体物質との結合が妨げられる可能性がある。一方、結合用化合物が生体物質と反対の電荷（逆符号の電荷）を有していると、生体物質と結合用化合物内の電荷を有する部分とが静電的引力により結合してしまい、結合用化合物が有している結合官能基に生体物質が効果的に結合することを妨げる可能性がある。また、結合用化合物と生体物質との静電的引力による結合は、本発明の生体物質構造体を分離精製に用いる場合、使用時に用いる溶液のpHや塩などの添加物により、容易に結合が壊れてしまうことがありえるものと予想される。

40

【0060】

さらに、本発明の生体物質構造体を用いて対象物質の分離を行なおうとした時に、対象物質が結合用化合物と同じ電荷を有している場合には、生体物質構造体に含まれる生体物質との特異的な相互作用が妨げられる可能性があり、また、対象物質と結合用化合物とが反対の電荷を有していた場合には、対象物質と結合用化合物とが電気的引力により非特異吸着等の非特異的相互作用を生じることが推測されるためである。

【0061】

また、本発明の生体物質構造体を用いて、選択的生体物質間相互作用を検出しようとする時にも同様に、アナライトである作用物質が結合用化合物と同じ電荷を有している場合には、リガンドである生体物質との特異的な相互作用が妨げられる可能性があり、また、

50

アナライトと結合用化合物とが反対の電荷を有していた場合、アナライトと結合用化合物とが非特異吸着等の非特異的相互作用を生じることが推測されるためである。

【0062】

なお、結合用化合物が無電荷であるとは、少なくとも構造式上、非イオン性もしくは両性イオン性（正及び負の両方の電荷を有しており、お互いの電荷が実質打ち消しあっているもの）であれば、当該結合用化合物は無電荷である。ただし、本発明の生体物質構造体の製造過程において、結合官能基の加水分解等により、結合用化合物が電荷をもったとしても、本発明の効果を損なわない限り、このような結合用化合物は好適に用いることができる。

【0063】

結合用化合物の他の例としては、例えば、有機化合物、無機化合物、有機無機ハイブリッド材料などが挙げられる。

また、結合用化合物は、1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用しても良い。

【0064】

さらに、結合用化合物として用いられる有機化合物は、低分子化合物でも、高分子化合物でもよいが、好ましくは高分子化合物である。

結合用化合物として使用できる低分子化合物の具体例としては、グルタルアルデヒド、ジエポキシブタン、ジエポキシヘキサン、ジエポキシオクタン、ビスマレイミドヘキサン、ビス（スルホスクシミジル）スペライト、ジスクシミジルグルタレート、エチレングリコールビス（スクシミジルスクシネイト）、エチレングリコールビス（スルホスクシミジルスクシネイト）、スクシミジル4-N-マレイミドメチルシクロヘキサン1-カルボキシレート、スルホスクシミジル4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート、スクシミジル4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシニドエステルなどが挙げられる。

【0065】

一方、結合用化合物として高分子化合物を用いる場合、高分子化合物は合成高分子化合物であっても良く、天然高分子化合物であっても良い。

結合用化合物として合成高分子化合物を用いる場合、上記の条件を満たす合成高分子化合物であれば任意のものを用いることができる。ただし、通常は、生体物質と結合することのできるモノマーを有していることが望ましい。また、通常は、合成高分子化合物が水に混和できるようにするために、親水性モノマーを有していることが好ましい。さらに、好ましくは、上記の生体物質と結合することのできるモノマーと親水性モノマーとを重合させた合成高分子化合物を用いることが望ましい。

【0066】

即ち、結合用化合物として使用する合成高分子化合物の合成には、少なくともモノマー種として、生体物質と結合して粒子状塊を形成することができるモノマー（これは、生体物質と反応してできるコンジュゲートを形成することができるモノマーの一種（一部）である）と、粒子状塊同士で結合し、鎖状及び/又は網目状に結合した構造（即ち、生体物質構造体の構造）を構築するための結合官能基を有するモノマー（これは、コンジュゲート間で結合し、鎖状及び/又は網目状に結合した構造を構築するための結合官能基を有するモノマーの一種（一部）である）とを有することが好ましく、さらに、親水性又は両親媒性の官能基を有するモノマーを用いることがより好ましい。これに加えて、合成高分子化合物が溶液中で形成するミセル等の構造体及び広がりを制御する目的で、疎水性モノマーを含有させるようにすることも、好ましい。なお、ここで挙げたモノマーは、それぞれ異なるモノマーであってもよいが、一つのモノマーが上記の機能のうちの2以上を兼ね備えていてもよい。

【0067】

前記の合成高分子化合物を構成するモノマーの具体例を挙げると、ラジカル重合において用いられるモノマーとしては、スチレン、クロルスチレン、 $\alpha$ -メチルスチレン、ジビ

10

20

30

40

50

ニルベンゼン、ビニルトルエン等の重合性不飽和芳香族類；(メタ)アクリル酸、イタコン酸、マレイン酸、フタル酸等の重合性不飽和カルボン酸；スチレンスルホン酸、スチレンスルホン酸ナトリウム等の重合性不飽和スルホン酸；(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸 - n - ブチル、(メタ)アクリル酸 - 2 - ヒドロキシエチル、2 - (メタ)アクリル酸ヒドロキシプロピル、(メタ)アクリル酸グリシジル、N - (メタ)アクリロイルオキシスクシンイミド、エチレングリコール - ジ - (メタ)アクリル酸エステル、(メタ)アクリル酸トリブロモフェニル、(メタ)アクリル酸グリコシロキシエチル、2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、等の重合性カルボン酸エステル；(メタ)アクリロニトリル、(メタ)アクロレイン、(メタ)アクリルアミド、N, N - ジメチルアクリルアミド、N - イソプロピル(メタ)アクリルアミド、N - ビニルホルムアミド、3 - アクリルアミドフェニルボロン酸、N - アクリロイル - N' - ビオチニル - 3, 6 - ジオキサオクタン - 1, 9 - ジアミン、ブタジエン、イソプレン、酢酸ビニル、ビニルピリジン、N - ビニルピロリドン、N - (メタ)アクリロイルモルホリン、塩化ビニル、塩化ビニリデン、臭化ビニル等の不飽和カルボン酸アミド類；重合性不飽和ニトリル類；ハロゲン化ビニル類；共役ジエン類；ポリエチレングリコールモノ(メタ)アクリレート、ポリプロピレングリコールモノ(メタ)アクリレート等のマクロモノマー類、などが挙げられる。

10

## 【0068】

また、結合用化合物として使用しうる合成高分子化合物のモノマーとしては、例えば、付加重合で用いられるようなモノマーも使用できる。この付加重合に用いられるモノマーの具体例としては、ジフェニルメタンジイソシアナート、ナフタレンジイソシアナート、トリレンジイソシアナート、テトラメチルキシレンジイソシアナート、キシレンジイソシアナート、ジシクロヘキサンジイソシアナート、ジシクロヘキシルメタンジイソシアナート、ヘキサメチレンジイソシアナート、イソホロンジイソシアナート等の脂肪族又は芳香族イソシアナート類、ケテン類、エポキシ基含有化合物類、ビニル基含有化合物類などが挙げられる。

20

## 【0069】

また、上記化合物群には、活性化水素を有する官能基を備えたモノマーを反応させることも可能である。その具体例としては水酸基又はアミノ基を有する化合物などが挙げられ、具体的には、エチレングリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、1, 4 - ブタンジオール、1, 6 - ヘキサジオール、グリセリン、トリメチロールプロパン、ペンタエリスリトール、ソルビトール、メチレングリコシド、ショ糖、ビス(ヒドロキシエチル)ベンゼンのようなポリオール類；エチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、N, N' - ジイソプロピルメチレンジアミン、N, N' - ジ - s e c - ブチル - p - フェレンジアミン、1, 3, 5 - トリアミノベンゼン等のポリアミン類；オキシム類などが挙げられる。

30

## 【0070】

さらに、結合用化合物として使用しうる合成高分子化合物には、上述したモノマーの他、架橋剤となりうる官能性化合物を共存させても良い。官能性化合物としては、例えば、N - メチロールアクリルアミド、N - エタノールアクリルアミド、N - プロパノールアクリルアミド、N - メチロールマレイミド、N - エチロールマレイミド、N - メチロールマレインアミド酸、N - メチロールマレインアミド酸エステル、ビニル芳香族酸のN - アルキロールアミド(例えばN - メチロール - p - ビニルベンズアミド等)、N - (イソブトキシメチル)アクリルアミド等が挙げられる。

40

## 【0071】

さらに、上述したモノマーのうち、ジビニルベンゼン、ジビニルナフタレン、ジビニルシクロヘキサン、1, 3 - ジプロペニルベンゼン、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、1, 3 - ブチレングリコール、トリメチロールエタントリ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールテトラ(メタ)アクリレート等の多官能性モノマー類は

50

、架橋剤としても使用することができる。

架橋剤となりうる多官能性化合物をモノマーとして使用することにより、結合用化合物の媒質中での広がりや硬さを制御することができる。

【0072】

また、前述の生体物質と結合しうる結合官能基を有するモノマーとしては、スクシンイミド基、エポキシ基、アルデヒド基、マレイミド基、p-ニトロフェニル基等を有するモノマーの例として、N-(メタ)アクリロイルオキシスクシンイミド、(メタ)アクリル酸グリシジル、アクロレイン、マレイミドアクリレート、p-ニトロフェニルオキシカルボニルポリエチレングリコールメタクリレート、p-ニトロフェニルメタクリレート等が挙げられる。

10

【0073】

また、結合官能基としてボロン酸基を有するモノマーの例としては、3-アクリルアミドフェニルボロン酸等が挙げられる。

さらに、結合官能基としてビオチン基を有するモノマーの例としては、N-アクリロイル-N'-ビオチニル-3,6-ジオキサオクタン-1,9-ジアミン等が挙げられる。

また、結合官能基として糖や多糖を有するモノマーの例としては、(メタ)アクリル酸グリコシロキシエチル等が挙げられる。

【0074】

さらに、親水性モノマーの具体例としては、(メタ)アクリル酸、イタコン酸、(メタ)アクリル酸2-ヒドロキシエチル、(メタ)アクリル酸2-ヒドロキシプロピル、マレイン酸、スチレンスルホン酸、p-スチレンスルホン酸ナトリウム塩、(メタ)アクリルアミド、N,N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-ビニルホルムアミド、(メタ)アクリロニトリル、N-(メタ)アクリロイルモルホリン、N-ビニルピロリドン、N-ビニルアセトアミド、N-ビニル-N-メチルアセトアミド、ポリエチレングリコールモノ-(メタ)アクリレート、(メタ)アクリル酸グリシジル、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等が挙げられる。

20

【0075】

また、結合用化合物は、前述のとおり無電荷のものが好ましい。したがって、結合用化合物として用いる合成高分子化合物を無電荷にする場合、この無電荷の合成高分子化合物に使用するモノマーは無電荷であれば特に限定されないが、具体例を挙げると、(メタ)アクリル酸2-ヒドロキシエチル、(メタ)アクリル酸2-ヒドロキシプロピル、(メタ)アクリルアミド、N,N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-ビニルホルムアミド、(メタ)アクリロニトリル、N-(メタ)アクリロイルモルホリン、N-ビニルピロリドン、N-ビニルアセトアミド、N-ビニル-N-メチルアセトアミド、ポリエチレングリコールモノ-(メタ)アクリレート、(メタ)アクリル酸グリシジル、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン等が挙げられる。

30

【0076】

ところで、モノマーをラジカル重合させて合成高分子化合物を合成する場合、通常はラジカル重合開始剤を混合することにより重合を開始させる。その際に用いるラジカル重合開始剤は本発明の効果を著しく損なわない限り任意のものを用いることができる。使用できるラジカル系重合開始剤の例としては、2,2'-アゾビスイソプロチロニトリル、2,2'-アゾビス-(2-メチルプロパンニトリル)、2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチルペンタンニトリル)、2,2'-アゾビス-(2-メチルブタンニトリル)、1,1'-アゾビス-(シクロヘキサンカルボニトリル)、2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチル-4-メトキシバレロニトリル)、2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス-(2-アミジノプロパン)ヒドロクロリド等のアゾビスタイプの開始剤、過酸化ベンゾイル、クメンヒドロペルオキシド、過酸化水素、過酸化アセチル、過酸化ラウロイル、過硫酸塩(例えば過硫酸アンモニウム)、過酸エステル(例えばt-ブチルペルオクテート、-クミルペルオキシピバレート及びt-ブチルペルオクテート)等の過酸化物タイプの開始剤などが挙げられる。

40

50

## 【0077】

さらにレドックス系開始剤を混合することにより重合を開始させてもよい。レドックス系開始剤も、本発明の効果を著しく損なわない限り任意のものを用いることができ、その例としては、アスコルビン酸/硫酸鉄(II)/ペルオキシ二硫酸ナトリウム、第三ブチルヒドロペルオキシド/二亜硫酸ナトリウム、第三ブチルヒドロペルオキシド/Naヒドロキシメタンスルフィン酸が挙げられる。なお、個々の成分、例えば還元成分は、混合物、例えばヒドロキシメタンスルフィン酸のナトリウム塩と二亜硫酸ナトリウムとの混合物であってもよい。

## 【0078】

また、結合用化合物として合成高分子化合物を用いる場合、この合成高分子化合物は、開環重合等で合成される高分子を使用してもよい。その具体例としては、ポリエチレングリコール等が挙げられる。

さらに、上述した合成高分子化合物は、加水分解等により合成される高分子を使用してもよい。その具体例としては、ポリ酢酸ビニルを加水分解等することにより合成されるポリビニルアルコールなどが挙げられる。

また、上述した合成高分子化合物は、化学修飾により、前述の生体物質と結合する官能基を修飾することにより合成してもよい。

## 【0079】

さらに、この他、結合用化合物として、市販の合成高分子化合物を用いることができる。その具体例を挙げると、日本油脂社製のSUNBRIGHTシリーズ DE-030AS、DE-030CS、DE-030GS、PTE-100GS、PTE-200GS、HGEO-100GS、HGEO-200GSなどが挙げられる。

## 【0080】

一方、結合用化合物として天然高分子化合物を用いる場合、その具体例としては、デキストラン、カルボキシメチル-デキストラン、でんぷん、セルロース等の多糖類、アルブミン、コラーゲン、ゼラチンなどのタンパク質、DNA、RNAなどの核酸等が挙げられる。これらの天然化合物は、そのまま使用しても良いし、また、化学修飾してから使用しても良い。

## 【0081】

なお、合成高分子化合物及び天然高分子化合物などの高分子化合物を結合用化合物として用いる場合、その高分子化合物の形態は任意である。例えば、水溶液中で溶解していても良いし、ミセルやエマルションのような会合体や高分子ラテックスのような微粒子状のものでもかまわない。

## 【0082】

また、結合用化合物として用いられる無機化合物としては、例えば、金コロイド等の金属粒子、シリカ等の無機微粒子などが挙げられる。さらに、これらの無機化合物を化学修飾することによって、生体物質と結合する官能基を有する結合用化合物としても良い。

## 【0083】

さらに、結合用化合物として用いられる有機無機ハイブリッドとしては、例えば、コロイダルシリカに高分子を被覆したもの、金属コロイドを高分子で被覆したもの(例えば、金、銀、白金等の粒子を保護コロイドで被覆したもの)、クレイ等の多孔質基体に高分子を吸着させたものなどが挙げられる。なお、これらの有機無機ハイブリッドは公知の方法で合成することが可能である(ポリマー系ナノコンポジット, 工業調査会, 中條 澄 著などを参照)。

さらに、これらの有機無機ハイブリッドに結合官能基を修飾することによって、結合用化合物として用いることもできる。

## 【0084】

また、結合用化合物の分子量や構造等は特に制限は無く任意である。したがって、結合用化合物として例えば低分子量の化合物を用いても良いが、その場合、固定化しようとする一つの生体物質内で架橋してしまい、効率的に主鎖を形成できなくなって、本発明の生

10

20

30

40

50



体物質構造体を形成できなくなる可能性がある。また、生体物質内で架橋すると、該生体物質の活性が保持されない可能性もある。これを防止する観点からは、結合用化合物の分子量としては、通常1000以上、好ましくは10000以上、また、通常100万以下、好ましくは50万以下が望ましい。なお、結合用化合物として合成又は天然の高分子化合物を用いる場合、重量平均分子量が上記範囲に収まることが好ましい。この範囲を下回ると効果的に粒子状塊が集合した生体物質構造が形成できなくなる可能性があるためである。

なお、これら分子量の測定には種々の方法が使えるが、例えば、GPC（ゲルパーミネーションクロマトグラフィー）、SEC（サイズ排除クロマトグラフィー）、静的光散乱測定、粘度測定など一般的な測定により、調べることができる。

10

#### 【0085】

また、結合用化合物の大きさに制限は無く、本発明の効果を著しく損なわない限り任意である。ただし、効果的に生体物質と結合用化合物とを結合させるためには、溶媒や分散媒などの液体（ここでは、媒質）中に混和した状態において、結合用化合物の径は、通常1nm以上、好ましくは2nm以上、より好ましくは、3nm以上であることが望ましい。なお、この条件を満たすには、本発明の生体物質構造体の製造前に結合用化合物を用意する場合に上記の粒径範囲に収まる結合用化合物を用意し、それを使用して本発明の生体物質構造体を製造するようにすることが望ましい。また、上限に特に制限は無いが、通常5μm以下である。

#### 【0086】

これらの結合用化合物の大きさの測定には、種々の方法が使用できるが、液体に分散している金属コロイド、無機粒子、ポリマー微粒子などを結合用化合物として用いた場合は、静的光散乱測定法、動的光散乱測定法、光回折法などの一般的な手法により、調べることができる。また、これら金コロイド、無機粒子、ポリマー微粒子などが分散した分散液から反応媒等の液体を取り除いたものをSEM（走査型電子顕微鏡）やTEM（透過型電子顕微鏡）などの電子顕微鏡で観察した場合も、液体中での結合用化合物の径として取り扱っても良い。

20

#### 【0087】

一方、溶液に溶解している高分子またはミセルなどの会合体を結合用化合物に用いた場合は、静的光散乱測定法、動的光散乱測定法、光回折法などの一般的な手法により、調べることができる。一般に、溶液に溶解している高分子やミセルなどは、測定手段及び解析方法で粒子径に相違が見られるが、いずれかの手段や方法で得られた測定値により、その粒子径を評価することができる。

30

なお、光学的手法により液中の結合用化合物の径を測定する場合には、結合用化合物の平均粒子径が上記の範囲内に収まるようにすることが、効果的に生体物質と結合用化合物とを結合させるためには望ましい。

#### 【0088】

さらに、結合用化合物が有する結合官能基の量は、特に限定されず、また結合用化合物の種類によって一概には規定できないが、例えば結合用化合物として高分子を用いた場合、結合用化合物に対して、モル%で、通常0.1%以上、好ましくは0.5%以上、より好ましくは1%以上、更に好ましくは5%以上、また、通常90%以下、好ましくは80%以下、より好ましくは70%以下である。この範囲を下回ると結合用化合物が生体物質と効率よく結合できない可能性があり、上回ると溶媒や分散媒などに混和できなくなる可能性があるためである。

40

#### 【0089】

##### [I-3. 生体物質構造体の構造]

##### [I-3-1. 生体物質構造体を構成する主鎖]

本発明の生体物質構造体は、微視的に見た場合、生体物質と結合用化合物とからなる主鎖を有する。そして、この主鎖が、例えば集合したり結合したりすることによって、本発明の生体物質構造体のマトリックス構造（マトリックス）が構成されている。即ち、本発

50

明の生体物質構造体は、図1(a)～図1(c)に模式的に示すように、生体物質と結合用化合物とを含む構造体であり、且つ、その骨格は生体物質と結合用化合物とが結合して構成された主鎖により形成されている。これにより、本発明の生体物質構造体は、当該主鎖が、鎖状及び/又は網目状に結合した構造を有するマトリックスとして構成されているのである。

【0090】

なお、図1(a)～図1(c)は、本発明の生体物質構造体のマトリックス構造を説明するため、固相担体に固定化した本発明の生体物質構造体の一例の表面近傍を拡大して示す模式図である。また、図1(a)～図1(c)において、円形部分が生体物質を表わし、線状部分が結合用化合物を表わす。ただし、図1(a)～図1(c)は生体物質と結合用化合物とからなる主鎖の構成を説明するべく、後述する粒子状塊を構成しているか否かに係わらず主鎖の構造を2次元的に描画したものである。したがって、生体物質構造体が粒子状塊を有する場合には、図1(a)～図1(c)は生体物質構造体の粒子状塊の主鎖を2次元的に広げたものと認識すべきである。

10

【0091】

以下、本発明の生体物質構造体の主鎖及び当該主鎖から構成されるマトリックス構造について説明する。

上述したように、本発明の生体物質構造体は、生体物質及び結合用化合物からなる主鎖を有する構造体である。また、本発明の生体物質構造体の主鎖は、マトリックス構造の骨格を構成するもので、具体的には生体物質と結合用化合物とが互いに結合してなるものである。詳しくは、生体物質に対して結合用化合物が結合官能基によって結合し、その構造の繰り返しによって鎖状及び/又は網目状の構造を形成されたものである。

20

【0092】

よって、本発明の生体物質構造体は、通常、下記式(A)で表わされる部分構造を2以上有する。

【化2】



{上記式(A)において、 $R^1$ は生体物質を表わし、 $R^2$ は結合用化合物を表わす。ただし、生体物質構造体が何らかの固相担体に結合している場合、 $R^2$ は固相担体に直接結合していない結合用化合物を表わす。また、各 $R^1$ 、 $R^2$ はそれぞれ同じであっても異なっても良い。}

30

【0093】

即ち、本発明の生体物質構造体は、上記式(A)のように生体物質と結合用化合物とが結合した部分構造が、直鎖状及び/又は網目状に結合した構造体である。具体的には、上記式(A)の $R^1$ はそれぞれ独立に他の1又は2以上の $R^2$ に結合し、 $R^2$ はそれぞれ独立に他の1又は2以上の $R^1$ に結合している。ただし、本発明の生体物質構造体は、例えば生体物質 $R^1$ 同士や結合用化合物 $R^2$ 同士が結合した部分構造を含んでいてもかまわない。ここで、 $R^1$ 同士や $R^2$ 同士の結合とは、分子間引力、疎液相互作用、電気的相互作用等の物理的相互作用による結合を示す。

40

【0094】

したがって、本発明の生体物質構造体は、結合用化合物同士の間には生体物質が存在し、また、生体物質同士の間には結合用化合物が存在する橋架け構造を少なくとも一部に有している。そして、生体物質及び結合用化合物の両方によって、マトリックス構造の主鎖が構成されている。したがって、本発明の生体物質構造体は、その作製時に系内に生体物質及び結合用化合物の両方が存在する際に形成される。

【0095】

生体物質構造体が生体物質と結合用化合物とからなる主鎖を有していることは、例えば、以下の方法により確認することができる。

本発明の生体物質構造体は、上述したような生体物質と結合用化合物とからなる主鎖を

50

有しているため、その構成要素である生体物質の結合を分解することにより構造が崩壊する。これを利用し、生体物質構造体の生体物質のみを分解するようにすれば、生体物質と結合用化合物とからなる主鎖を確認することができる。例えば、結合用化合物を分解しないようにしながら生体物質を分解した場合、本発明の生体物質構造体では、生体物質構造体が大きく崩壊する。さらに崩壊したものを調べることにより、生体物質構成要素以外の生体物質構造体を構成する化合物を特定することができる。さらに、本発明の生体物質構造体を固相担体に結合させた場合には、例えば、生体物質構造体を何らかの固相担体に固定化した場合には、結合用化合物の少なくとも一部は生体物質を介して固相担体に固定化されているため、結合用化合物を分解しないようにしながら生体物質を分解した場合、本発明の生体物質構造体では、結合用化合物のうち、固相担体に対して生体物質を介して固定化されていた部分は固相担体から脱離する。 10

【0096】

したがって、具体的には、結合用化合物が分解されず生体物質のみが分解を受ける酵素やその他の薬品により生体物質を分解し、この処理により固相担体から脱離した物質を調べること、又は、固相担体表面に残留している物質を調べることにより、生体物質構成要素以外の生体物質構造体を構成する化合物を特定できる。生体物質構造体が生体物質と結合用化合物とからなる主鎖を有していれば、脱離した物質のなかに結合用化合物が検出される。また、固相担体表面には、結合用化合物は検出されないか、検出されたとしてもその量は減少している。

【0097】

一方、生体物質構造体が従来の方法による高分子膜を利用したものであれば、主鎖が高分子鎖であるため、生体物質が分解されても高分子膜（即ち高分子鎖）は全て固相担体に残り、脱離した物質のなかには生体物質構成要素は検出されるが、結合用化合物に相当する高分子鎖は検出されないことになる。この違いにより、生体物質と結合用化合物とからなる主鎖の有無を確認することができ、本発明の生体物質構造体であるか否かを特定することができる。 20

【0098】

上記の方法で用いる、生体物質を分解するための酵素や薬品は、用いた生体物質や結合用化合物の種類に応じて任意のものを適当に用いればよい。その具体例を挙げると、生体物質が核酸である場合、例えば、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ等の核酸分解酵素などが挙げられる。 30

また、生体物質がタンパク質である場合、例えば、微生物プロテアーゼ、トリプシン、キモトリプシン、パイン、レンネット、V8プロテアーゼ等のタンパク質分解酵素、臭化シアン、2-ニトロ-5-チオシアン安息香酸、塩酸、硫酸、水酸化ナトリウム等のタンパク質分解能を有する化学物質などが挙げられる。

【0099】

さらに、生体物質が脂質である場合、例えば、リパーゼ、ホスホリパーゼA2等の脂質分解酵素などが挙げられる。

また、生体物質が糖である場合、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、ブルナーゼ、セルラーゼ等の糖分解酵素などが挙げられる。 40

なお、生体物質を分解するための酵素や薬品は、1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用しても良い。

ただし、例示物の中でも、生体物質だけでなく結合用化合物も分解する可能性があるものは、上記の主鎖の確認が正確に行なえなくなる可能性があるため、使用は避けるべきである。

【0100】

また、生体物質の分解、及び、分解後に固相担体上に残留している物質を確認する場合、その具体的な確認方法は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）、水晶振動子マイクロバランス（QCM）、電子顕微鏡、エリプソメトリーなどによる測定によって確認することができる。 50

さらに、生体物質分解後に固相担体から脱離した物質の分析をする場合、その具体的な分析方法は任意であるが、例えば、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、質量分析(MS)、赤外分光法、核磁気共鳴法(NMR)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、吸光度測定、蛍光測定、元素分析、アミノ酸定量などが挙げられる。また、分析に際しては、各測定手法を単独で用いても良く、2種以上を任意に組み合わせて行なってもよい。

#### 【0101】

##### [I-3-2. 生体物質構造体が有する粒子状塊]

また、前記説明よりも巨視的に見た場合、本発明の生体物質構造体は、通常、生体物質と結合用化合物とからなる粒子状の塊(粒子状塊)を有している。この粒子状塊は、上記の主鎖が単独で丸まったり2以上が集合した後に結合することで形成されたものと推察される。そして、この粒子状塊が互いに結合して、本発明の生体物質構造体の3次元構造が構成されている。

以下、この粒子状塊について説明する。

#### 【0102】

本発明の生体物質構造体は、通常、粒子状塊が単一ユニットとして、図2(a)、(b)に模式的に示すように、互いに鎖状及び/又は網目状に結合した構造体となっている。また、この粒子状塊は、通常、図3(a)に示すような生体物質と結合用化合物とが複数結合して図3(b)のように粒子状になったものであり、必ずしも完全な円形となっているとは限らないが、図2(a)、(b)においては粒子状塊を模式的に円で示してある。

#### 【0103】

粒子状塊は、集合して、粒子状塊同士の引力によって接触しあったり、その炭素鎖が絡まりあったりすることなどにより、互いに結合して生体物質構造体を構成している。例えば、ただ分子間引力により粒子状塊同士が結合して生体物質構造体が形成されたり、粒子状塊が結合用化合物の官能基と生体物質との結合により結合して生体物質構造体を形成したり、或いは、上記の両方の要因が組み合わさって粒子状塊同士が結合して生体物質構造体が形成されたりしている。ここで、結合とは、通常、共有結合、イオン結合、キレート結合、配位結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合、静電力による結合のうち一つ以上の結合から成り立つものを指し、中でも好ましくは共有結合である。この場合、粒子状塊の一部のみが結合しあっている状態でもよいが、できるだけ多くの粒子状塊が結合しあっていることが好ましく、全ての粒子状塊が結合しあって生体物質構造体が構成されることがより好ましい。

なお、通常は、粒子状塊は、絡まりあいや結合など、複数の要因により集合して生体物質構造体を構成しているものと推察される。

#### 【0104】

また、生体物質構造体を構成する粒子状塊の粒径に制限は無いが、通常10 $\mu$ m以下、好ましくは5 $\mu$ m以下、より好ましくは1 $\mu$ m以下である。粒子状塊の粒径が大きいと、分離精製に用いた時、十分な比表面積が得られず、アフィニティー分離などに用いた場合に高効率な分離精製結果が得られない可能性がある。なお、下限は任意であるが、通常1.5nm以上である。

さらに、粒子状塊の粒径を個別に測定する場合には、生体物質構造体中の粒子状塊のうち、少なくとも一部の粒子状塊が上記の範囲の粒径を有していればよいが、できるだけ多くの粒子状塊が上記範囲の粒径を有していることが好ましく、全ての粒子状塊が上記範囲の粒径を有していることがより好ましい。

#### 【0105】

ここで粒子状塊の粒径は、光学顕微鏡、SEMやTEM等の電子顕微鏡、AFM(原子間力顕微鏡)などの顕微鏡で観察することにより測定できる。なお、顕微鏡で観察した場合、粒子状塊の形状は、粒子状のほか、生体物質構造体から房状に張り出した形状として観察される場合もあるが、この房状の塊部分(房状塊)は生体物質構造体から粒子状塊が張り出して形成されたものと推察されるため、この房状の塊部分の径(通常は、短径)が

10

20

30

40

50

上記の範囲内であればよい。

【0106】

粒子状塊の存在を調べる一つの方法として、AFMにより測定した画像から、Power Spectral Density (パワースペクトル密度) を調べることが挙げられる。パワースペクトルを用いた解析は、物体表面の微小な凸凹を評価するのに用いられ、凹凸に起因する変化量 (例えば、高さ、深さ等) を波形に分解してフーリエ変換を行なうことに基づく解析法の一つである。

【0107】

例えば、 $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ の視野で測定した場合に、得られるAFM像からPower Spectral Density (PSD) 解析を行ない、2D isotropic PSDの値が $100(\text{nm}^4)$ 以上でかつ、波長 $100\text{nm}$ 未満の値を除いたパワースペクトルの和 ( $I_c$ ) とトータルパワースペクトル ( $I_t$ ) との割合  $I_c / I_t$  が、通常30%以上、好ましくは50%以上、特に好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上であることで、サブミクロンオーダーの粒子状塊の存在を示すことができる。パワースペクトルは、物体の表面の凹凸を表わすものであり、その比率  $I_c / I_t$  が上記範囲であれば、粒子状塊の構造に起因する凹凸が生体物質構造体の表面に確認できるからである。

【0108】

この時、市販のAFM装置を使用することができるが、好ましくは、Digital Instruments社製品のNanoScope IIIaが好ましい。また、プローブは先端半径Rが $5\text{nm}$ 以下のものが好ましく、具体的には、東陽テクニカ社製のSSS-NCHが好ましい。さらに、測定は試料表面を傷つけないよう、タッピングモードで測定することが望ましい。測定は、大気中でも液中でもかまわないが、良い像を得るためには、好ましくは大気中で、さらに好ましくは乾燥した状態で行なう。

【0109】

また、Power Spectral Density 解析に用いるアルゴリズムは、表面形状の解析用としてASTM E42.14 STM/AFM分科委員会勧告に準じるものが好ましく、特に好ましいのは、Digital Instruments社製のNanoScope IIIaに付属のPower Spectral Density機能を用いることである (参照文献: NanoScopeコマンドリファレンスマニュアル)。

【0110】

また、粒子状塊の粒径は、光散乱、X線、中性子散乱等の分光学的手法により確認することもできる。この場合、測定される平均粒径が上記の範囲内であればよい。粒子状塊の平均粒径が上記範囲内にある場合も、粒径が上記範囲内にある場合と同様の利点を得ることができる。

ここで、光散乱測定法による粒子状塊の確認の方法の一例を示す。この例は、生体物質構造体の前方散乱光強度測定による粒子状塊の確認の方法の一例である。生体物質構造体の前方散乱光強度を測定することにより、相関長を求めることで、粒子状塊を評価することができる。この方法は、生体物質構造体を透過した光を、検光子を通して散乱強度の散乱角依存性を測定し、デバイ-ビュージェ (Debye-Bueche) の理論に基づき、 $(\text{光の強度})^{-1/2}$  を波数の2乗 ( $= \{ (4\pi n / \text{光の波長}) \times \sin(\text{散乱角度} / 2) \}^2$ ) に対してプロットした傾きを求め、 $(\text{傾き} / \text{切片})^2$  から相関長を求める。ここで、 $n$  は媒体の屈折率である。

測定に用いる光散乱装置は市販のものを使用することができるが、好ましくはDYNA3000である。生体物質構造体は、乾燥状態でも液体中で膨潤させても良いが、好ましくは液体中での測定である。

【0111】

[ I - 3 - 3 . 生体物質構造体のゲル状構造 ]

また、生成過程の面から見た場合、本発明の生体物質構造体は、通常、生体物質と結合

用化合物とが結合したコンジュゲートが多数結合して構成されたものであり、生体物質と結合用化合物とが鎖状及び／又は網目状に結合したゲル状構造体である（図1，4参照）。このコンジュゲートは、生体物質と結合用化合物とが結合したもので、生体物質と結合用化合物とを溶媒や分散媒等の媒質中で混合し、互いの分子を接触させるだけで作製することができる。

【0112】

[I-3-4. 生体物質構造体の主鎖、粒子状塊及びゲル状構造による利点]

本発明の生体物質構造体は、生体物質及び化合物の両方によって形成されたマトリックス骨格を有しているため、又は、生体物質及び結合用化合物の両方によって形成された粒子状塊が集合及び／または結合することによって形成する構造を有しているため、生体物質の比率を高めることが可能である。したがって、本発明の生体物質構造体では、従来よりも多量の生体物質を保持することができる。なお、従来の生体物質を固相担体等に固定する技術では、アフィニティー精製などに用いられる場合、樹脂微粒子などの固相担体の表面に結合させるために、生体物質の固定化量は所定の上限値で制限され（通常、タンパク質の単層吸着は、せいぜい $0.3 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）、多量の生体物質を保持することができなかつた。

10

【0113】

また、多量の生体物質を保持できるようになるため、本発明の生体物質構造体によれば、結合用化合物（及び、後述する固相担体等）が生じる非特異的な相互作用を抑制できるという利点を得ることができる。即ち、生体物質として上記の非特異的な相互作用を生じないものを用いれば、非特異的な相互作用を生じうる結合用化合物等を多量の生体物質で覆うことができる。この際、生体物質構造体では生体物質が多量に存在するため、非特異的な相互作用を効果的に抑制することが可能となる。したがって、非特異的な相互作用の影響を排除しながら、生体物質と作用物質との相互作用を用いた分析やアフィニティー分離を実施することができるようになる。

20

【0114】

さらに、本発明の生体物質構造体の内部には、空間（空隙）が形成されている。この空隙は、通常は、粒子状塊同士の間形成されたものである。即ち、粒子状塊同士は完全に密着せず、各粒子状塊同士の間空間（空隙）が形成されているのである。また、本発明の生体物質構造体が粒子状塊を有さない場合であっても、前記の主鎖の間には空間が形成される。

30

【0115】

この空間は、生体物質構造体を用いてアフィニティー分離などを行なう際に、生体物質と相互作用させる対象物質が侵入することが可能な程度の大きさに形成されている。したがって、アフィニティー分離等を行なう際には、通常は、この空間において生体物質と対象物質との相互作用が生じることになる。このため、本発明の生体物質構造体は、3次元的な構造を有するにもかかわらず、その中（内部）に含まれる生体物質は対象物質等と相互作用することが可能である。

【0116】

即ち、本発明の生体物質構造体は、3次元的に多くの生体物質を備えることができるにもかかわらず、その生体物質は活性を失わず相互作用をすることが可能となっている。このため、本発明の生体物質構造体は、生体物質の反応性を保ったまま、従来よりも多量の生体物質を含有させることが可能なのである。

40

【0117】

本発明の生体物質構造体が、粒子状塊同士の間空間を有しているかを調べる方法に制限はないが、例えば、光学顕微鏡、SEMやTEM等の電子顕微鏡、AFMなどの顕微鏡によって確認することができる。また、このほか、光散乱、X線、中性子散乱等の分光学的手法によっても確認することができる。

【0118】

さらに、本発明の生体物質構造体を乾燥状態における体積と、液体を含ませた時の体積

50

とを比較して、その体積が増加した場合には、上記の空間に液体が侵入したことにより体積が増加したものとして、本発明の生体物質構造体が空間を有していると認識してもよい。なお、これらの体積変化はいかなる方法で確認しても良いが、例えば生体物質構造体が膜状に形成されている場合、乾燥状態の膜厚とそれを液体に浸した時の膜厚とをそれぞれ A F M 等で測定し、両者を比較して確認することができる。

#### 【0119】

##### [ I - 3 - 5 . 生体物質構造体に形成された孔 ]

本発明の生体物質構造体には、所定の大きさの径を有する特定孔が形成されている。この特定孔は、前記の主鎖によって形成されたものである。即ち、主鎖が所定の領域を避けて存在することにより、当該避けられた空間が結果的に、主鎖が存在しない空間領域（即ち、特定孔）を形成しているのである。

10

特定孔の径は、粒子状塊より大きく、生体物質構造体より小さいものであるが、該生体物質構造体の構造を維持できる限り、いかなるものでもよい。通常 300 nm 以上、好ましくは 500 nm 以上、より好ましくは 1000 nm 以上、また、通常 100 μm 以下、好ましくは 50 μm 以下、より好ましくは 30 μm 以下である。

#### 【0120】

特定孔を有しているため、本発明の生体物質構造体は、アフィニティー分離などを行なう際に、より効率的に分離を行なうことが可能となる。その理由は、以下のように推察される。

即ち、生体物質構造体を用いてアフィニティー分離などを行なう際には、生体物質と相互作用させる対象物質が、生体物質構造体内に形成された前記の空間に進入することになる。この際、対象物質の進入速度は比較的低い。これは、生体物質構造体内の空間への対象物質の侵入が、分子が拡散のように緩やかに進行する現象であるためである。

20

これに対し、特定孔は、通常、前記空間よりも大きい。したがって、特定孔には、流体状の物質が進入することが可能である。即ち、試料液等の流体が特定孔に流れ込むことが可能である。このため、生体物質構造体の内部への対象物質の進入が、前記空間に対する進入よりも速やかに行なわれるので、生体物質と対象物質との相互作用をより速やかに行なうことが可能になったものと推察される。

また、特定孔を形成したために、生体物質構造体の比表面積が大きくなったことも、効率が向上した一因であると考えられる。

30

#### 【0121】

特定孔の径は、乾燥状態の生体物質構造体に対し、TEM、SEM、AFM またはレーザー顕微鏡などの顕微鏡を用いて観察を行なうことにより測定することができる。また、ここでいう特定孔の径とは、特定孔の開口において、最も長い径のことを指すものとする。

#### 【0122】

また、特定孔は、形状、深さ、数等に制限は無い。例えば、特定孔は、本発明の生体物質構造体の表面近傍にのみ形成されていても良く、生体物質構造体の内部にまで延在して形成されていてもよい。また、多数の孔が形成されていてもよく、1つの孔が形成されていてもよい。孔の数には制限はなく、該生体物質構造体の構造が維持されていればよい。

40

#### 【0123】

##### [ I - 3 - 5 . 生体物質構造体の構造のその他の特徴 ]

また、本発明の生体物質構造体の大きさに制限は無く任意である。ただし、何らかの固相担体に結合していない場合には、生体物質構造体が乾燥した状態において、生体物質構造体の径は、通常 1 μm 以上、好ましくは 5 μm 以上、より好ましくは 10 μm 以上である。また、上限に特に制限は無いが、通常は 10 cm 以下である。ここで、生体物質構造体の径は、SEM、TEM 等の電子顕微鏡、AFM などの顕微鏡により測定することができる。生体物質構造体の大きさが小さすぎると、アフィニティー分離等に用いた場合に精製分離において生体物質構造体を遠心分離操作等で回収しにくくなるなどの可能性がある。

50

## 【 0 1 2 4 】

## [ I - 4 . 生体物質構造体の組成 ]

## [ I - 4 - 1 . 生体物質の含有比率 ]

本発明の生体物質構造体において、含有される生体物質の比率に制限は無いが、通常は、より多量の生体物質が含有されていることが望ましい。具体的には、「(生体物質の重量) / (生体物質構造体の重量)」で表される生体物質構造体の重量に対する生体物質の重量の比率が、通常0.1以上、好ましくは0.3以上、より好ましくは0.5以上、更に好ましくは0.7以上、特に好ましくは0.9以上が望ましい。また、上限に特に制限は無いが、通常0.999以下である。生体物質の比率がこの範囲を下回る場合、構成される生体物質構造体中の結合用化合物を十分に生体物質で覆うことができなくなり、結合用化合物への非特異吸着を起こす可能性がある。また、この生体物質構造体を用いて分離精製を行なう場合に、その分離精製の効率が低下する可能性もある。

10

## 【 0 1 2 5 】

## [ I - 4 - 2 . 生体物質の含有比率の測定法 ]

上記の生体物質の比率を測定する方法は特に限定されないが、例えば、本発明の生体物質構造体に含まれる生体物質を酵素や薬品等を用いて分解し、生体物質及び結合用化合物由来の物質をそれぞれ各種の方法で定量すればよい。

以下、この方法により生体物質の含有比率を測定する方法を説明する。

## 【 0 1 2 6 】

## ( 1 ) 生体物質の分解方法

この方法により生体物質の比率を測定する場合には、生体物質を分解するための酵素や薬品等は、用いた生体物質や結合用化合物の種類に応じて任意のものを適当に用いればよい。その具体例を挙げると、生体物質と結合用化合物とからなる主鎖の有無を確認する方法において用いる生体物質を分解するための酵素や薬品として例示したものと同様のものが挙げられる。

20

なお、生体物質を分解するための上記の酵素や薬品等は、1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用しても良い。

## 【 0 1 2 7 】

## ( 2 ) 生体物質および結合用化合物由来の物質の定量方法

生体物質構造体の分解後、生体物質及び結合用化合物由来の物質を定量する方法に制限は無く任意であるが、具体的な手法としては、例えば、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、質量分析(MS)、赤外分光法、核磁気共鳴法( $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR、 $^{29}\text{Si}$ -NMR)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、吸光度測定、蛍光測定、元素分析、アミノ酸定量などが挙げられる。また、分析に際しては、各測定手法を単独で用いても良く、2種以上を任意に組み合わせを行なってもよい。

30

## 【 0 1 2 8 】

## [ I - 4 - 3 . 生体物質の反応数比率 ]

本発明の生体物質構造体においては、生体物質構造体中の生体物質の大部分は活性を失っていない。具体的には、生体物質構造体に、生体物質に対して特異的に相互作用することができる作用物質を含む溶液を接触させたときに、生体物質構造体中の生体物質の数に対する、生体物質と相互作用した上記作用物質の数の比(以下適宜、「反応数比率」という)は、通常0.05以上、好ましくは0.1以上、更に好ましくは0.2以上である。また、上限に特に制限は無いが、通常1.0以下である。上述したように、本発明の生体物質構造体は空隙を有しながら多くの生体物質を含有することができるため、反応数比率を前記範囲のように高くすることができる。これにより、生体物質を有効に用いることができる。なお、前記の反応数比率は常に得られるとは限らず、生体物質及び作用物質の種類や量、並びに、測定時の条件等により上記の範囲から外れる場合がある。しかし、条件等を適切に設定した場合に前記のように優れた反応数比率を得られる点は、本発明の生体物質構造体の優れた利点の一つである。

40

50



この反応数比率は、生体物質及び作用物質がそれぞれ生体分子及び作用分子等の分子である場合、それぞれの分子数の比として求めることができる。また、反応数比率は、例えばSPR（表面プラズモン共鳴）法あるいはQCM（水晶発振子マイクロバランス）法などにより測定することができる。

なお、この利点は、生体物質構造体を固相担体に固定化し、生体物質担持体を形成した場合であっても同様に得られる。

【0129】

[II. 生体物質構造体の製造方法]

本発明の生体物質構造体は、通常、生体物質、結合用化合物、並びに、非結合物質を、所定の媒質（反応媒）中に共存させる工程（以下適宜、「混合工程」という）を経て製造される。この混合工程においては、生体物質及び結合用化合物は、媒質中において混合され、同一系内に共存するようになることによって結合し、本発明の生体物質構造体が形成されるのである。さらに、混合工程においては、非結合物質がテンプレートとして機能することにより、特定孔が形成されることになる。

また、適宜、混合工程の後、媒質を除去する濃縮工程や乾燥工程、さらには非結合物質を除去する工程などを行なうようにしても良い。

さらに、生体物質構造体の製造工程のいずれかの工程において、適宜、添加剤を系内に共存させるようにしてもよい。

【0130】

[II-1. 混合工程]

混合工程では、所定の媒質中において、生体物質と結合用化合物と非結合物質とを共存させる。

【0131】

[II-1-1. 生体物質]

生体物質は、上述したとおりである。なお、生体物質を用意する際、通常は何らかの溶媒に生体物質を溶解又は分散させた溶液や分散液として生体物質を用意する。この場合に生体物質を希釈させる溶媒や分散媒は、生体物質の活性や構造の安定性等を考慮して調製することが好ましい。

【0132】

[II-1-2. 結合用化合物]

結合用化合物は、上述したとおりである。

【0133】

[II-1-3. 非結合物質]

非結合物質としては、生体物質及び結合用化合物に結合せず、300nm以上100µm以下の径を有する領域を形成し得る物質を用いる。

【0134】

生体物質及び結合用化合物に結合しないものを非結合物質として用いることにより、生体物質構造体のマトリックス構造や粒子状塊を、より確実に作製することができる。即ち、非結合物質として生体物質及び結合用化合物に結合するものを使用すると、主鎖又は粒子状塊の形成が阻害されたり、非結合物質を後で除去することができず、特定孔を形成できなくなったりする可能性がある。また、非結合物質が生体物質や結合用化合物に結合する場合には、非結合物質が生体物質構造体に取り込まれることにより、アフィニティー分離等を行なう場合に非結合物質に起因する非特異的相互作用が生じて分離性能が低下する可能性がある。

【0135】

また、非結合物質は、本発明の生体物質構造体の製造時に、本発明の生体物質構造体の内部もしくは表面に、特定孔と同様の大きさ（通常は、300nm以上100µm以下）の径を有する領域（相）を形成し得るものである。この領域（相）は、のちに生体物質構造体の内部もしくは表面において、特定孔を形成するものである。

【0136】

10

20

30

40

50

ここで「領域（相）」とは、生体物質と結合用化合物とが形成する主鎖もしくは粒子状塊が連なった構造によって区切られた、非結合物質より成る相を意味し、この領域（相）を除去することによって、本発明に係る特定孔が形成されるものを意味する。

領域（相）の形成には、特定孔と同様の大きさ（通常は、300nm以上100μm以下）の径を有する領域を形成し得る限りいかなる手法でも用い得る。例えば、生体物質、結合用化合物及び非結合物質を媒質中で混和させた後に濃縮または該媒質を蒸発させ、生体物質構造体を形成させる過程において、非結合物質の凝集、析出、沈殿、二液相分離などにより非結合物質の集合領域（相）が形成される現象を利用できる。本明細書においては、これらの非結合物質の集合領域が生体物質構造体の内部もしくは表面に形成されることを「相分離」と称する。この相の形成は、所定の媒質の存在下でもよく、媒質が完全に乾燥した状態で行われても構わないが、媒質を除去する蒸発などの工程によって、非結合物質の相が形成されることが望ましい（相分離）。

10

#### 【0137】

また、別の手法として、高分子スフェアなどの微粒子を非結合物質として用いて微粒子含有生体物質構造体を形成し、その後、この微粒子を除去することによって孔を形成しても良い。この場合には、該微粒子を非結合物質により形成された領域（相）と考えることができる。

さらには、生体物質と結合用化合物との結合を疎外し、該生体物質構造体の形成後、巨視的に結合できなかった生体物質及び結合用化合物、並びに、非結合物質（これらを相とする）を除去することによっても、特定孔を形成することもできる。

20

#### 【0138】

これらのうちでも、本発明の生体物質構造体における孔の形成は、相分離によって形成される領域（相）を除去する方法により行われることが特に好ましい。すなわち、生体物質構造体の製造時に、濃縮または用いる媒質の蒸発等によって生体物質構造体を形成させる過程において、生体物質及び結合用化合物と相分離し得る物質を非結合物質として用いることが好ましい。この方法によれば、非結合物質が除去しやすく、工程が非常に簡便である。さらに、このような方法に用い得る非結合物質の選択肢が多いので、生体物質の性質に応じて非結合物質を選ぶことが出来るためである。生体物質は変性等が起りやすく、従来用いられていた化合物を有機溶媒で選択的に溶解する方法等は用い得ない。このため、生体物質に影響を与えない媒質を用いることのできる非結合物質等を任意に選択できることは非常に有用である。

30

#### 【0139】

上記のとおり、非結合物質は、好ましくは、生体物質構造体を形成させる工程において生体物質及び結合用化合物と相分離しうる物質である。生体物質構造体を形成させる工程において生体物質及び結合用化合物と相分離しうるものを非結合物質として用いることにより、相分離により形成される非結合物質の領域（相）を、特定孔を成型するためのテンプレートとして機能させることができる。即ち、非結合物質が生体物質及び結合用化合物と相分離するようにすれば、非結合物質が存在する部分では生体物質構造体の主鎖が形成されない。このため、主鎖の形成後に非結合物質を除去すれば、非結合物質があった部分には特定孔が形成されることになるのである。

40

#### 【0140】

ただし、非結合物質が生体物質及び結合用化合物に結合しない程度、及び、非結合物質が生体物質及び結合用化合物と相分離する程度は、本発明の生体物質構造体を得ることができる範囲であればよい。したがって、例えば、生体物質及び結合用化合物に全く結合せず、且つ、非結合物質が生体物質及び結合用化合物と完全に相分離する物質が無かったり入手困難であったりする場合には、所望の構造を有する生体物質構造体を得ることが可能な程度に生体物質及び結合用化合物に結合したり、所望の構造を有する生体物質構造体を得ることが可能な程度に生体物質又は結合用化合物と相溶したりする物質を、非結合物質として用いることは可能である。

#### 【0141】

50

また、非結合物質は、媒質に対して混和しうるものが好ましく、常温で液体のものでも構わない。これにより、生体物質と結合用化合物とを媒質中で混合する際に、非結合物質を前記媒質中に共存させることが可能となる。また、非結合物質の分子量や使用量を変化させることによって、特定孔の寸法を変化させることができる。したがって、所望の径を有する特定孔を、より安定して形成させることが可能となる。

【0142】

なお、非結合物質が媒質に溶解する場合には、その溶解度は任意であるが、非結合物質の媒質に対する溶解度は、通常0.001重量%以上、好ましくは0.01重量%以上、より好ましくは0.1重量%以上である。また、非結合物質の媒質に対する溶解度に上限はなく、任意の比率で混合できるものである。

10

【0143】

さらに、非結合物質としては、生体物質と結合用化合物とが結合して主鎖が形成された後で、除去が可能なものを用いることが好ましい。非結合物質はどのような手段で除去できるものであってもよい。ただし、通常は洗浄溶媒（後述する）による洗浄により非結合物質を除去するため、所定の洗浄溶媒に可溶性物質を用いることが望ましい。

【0144】

具体的な非結合物質の種類は、生体物質、結合用化合物、媒質、洗浄溶媒等に応じて任意に選択すればよい。ただし、通常は媒質として水を用いるため、非結合物質としては水混和性物質が用いられ、中でも水溶性物質を使用することが好ましく、特に水溶性高分子化合物を用いることが好ましい。また、非結合物質は、無電荷であることが好ましい。なお、非結合物質が無電荷であるとは、少なくとも構造式上、非イオン性もしくは両性イオン性（正及び負の両方の電荷を有しており、お互いの電荷が実質打ち消しあっているもの）であれば、当該非結合物質は無電荷である。

20

相分離の機構により相を形成させる場合、非結合物質として水溶性高分子化合物を用いる場合には、合成高分子化合物でもよく、天然高分子化合物でもよい。当該水溶性高分子化合物のモノマーは、前述の結合用化合物の合成で用いられる結合官能基を持たない親水性モノマーを用いることができ、好ましくは、無電荷のモノマーを用いることができる。さらに好ましくは、非結合物質がポリエチレングリコールである。また、天然高分子を用いる場合は、前述の結合用化合物で用いられる天然高分子化合物を用いることができる。その他には、例えば、グリセリン、塩化ナトリウム等の塩類、ショ糖、脂質等の水溶性低分子化合物等を相分離に使用することができる。

30

【0145】

また、前記の通り、相分離以外の機構を利用した領域の形成方法には、高分子スフェア、ミセルなどの会合体や、金、銀などの金属ナノ粒子などを用いることができる。これらの物質は、生体物質構造体を形成した後に、生体物質構造体から除去することができるものであればよい。例えば、生体物質構造体が形成された後に、生体物質構造体を媒質によって膨潤させ、生体物質構造体を形成する主鎖の間隔を広げることにより、流出等により除去されてもよいし、会合体の分解により生体物質構造体の内部から除去されてもよい。

【0146】

また、その他、非結合物質としては、例えば、グリセリン、塩化ナトリウム等の塩類、ショ糖、脂質等の水溶性低分子化合物等を使用することができる。

40

なお、非結合物質は1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用しても良い。

【0147】

また、非結合物質として高分子化合物を使用する場合、その分子量に制限は無いが、通常100以上、好ましくは300以上、より好ましくは500以上、また、通常100万以下、好ましくは50万以下、より好ましくは10万以下である。分子量が小さすぎると生体物質及び結合用化合物と相溶し所定の大きさ（通常300nm）以上の孔を形成しにくい可能性があり、大きすぎると水に混和しにくくなる可能性がある。

【0148】

50

## [ II - 1 - 4 . 媒質 ]

混合工程においては、生体物質と結合用化合物と非結合物質とを、所定の媒質中に共存させる。なお、上記の通り、生体物質と結合用化合物とは必ずしも化学反応を生じて結合するわけではないが、本明細書においては、生体物質と結合用化合物とが結合する際の場を形成する物質を「媒質」と広義に呼ぶものとする。

## 【 0 1 4 9 】

媒質としては、本発明の生体物質構造体の製造が可能な限り任意のものを用いることができるが、通常は、生体物質、結合用化合物及び非結合物質並びに適宜用いられる添加剤が混和しうるものを用いることが望ましい。この際、生体物質、結合用化合物、非結合物質及び添加剤の混和状態は任意であり、溶解状態であっても分散状態であってもよいが、生体物質と結合用化合物とを安定して結合させるためには、生体物質及び結合用化合物が媒質中において溶解状態で存在していることが好ましい。

10

## 【 0 1 5 0 】

媒質としては、通常は液体を用いる。この際、媒質は、生体物質と結合用化合物とが結合する場を形成することになり、生体物質や結合用化合物等の活性や構造の安定性などに影響を与えることがあるため、その影響を考慮して選択することが好ましい。通常は、媒質として水を用いる。

## 【 0 1 5 1 】

また、媒質としては水以外の液体を用いても良く、例えば、有機溶媒を用いることができる。さらに、有機溶媒の中でも、両親媒性溶媒、即ち、水に混和しうる有機溶媒が好ましい。水以外の媒質の具体例としては、メタノール、エタノール、1-ブタノールなどのアルコール系溶媒の他に、THF（テトラヒドロフラン）、DMF（N,N-ジメチルホルムアミド）、NMP（N-メチルピロリドン）、DMSO（ジメチルスルホオキシド）、ジオキサン、アセトニトリル、ピリジン、アセトン、グリセリンなどが挙げられる。

20

## 【 0 1 5 2 】

また、これらの媒質として液体を用いる際には、この媒質に塩を加えても良い。塩の種類は本発明の効果を著しく損なわない限り任意であるが、具体例としては、NaCl、KCl、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸アンモニウムなどが挙げられる。また、用いる塩の量に制限は無く、用途に応じて任意の量の塩を用いることができる。

30

## 【 0 1 5 3 】

さらに、媒質として水を用いている場合、水としては、純水のほか、生体物質や結合用化合物以外の溶質を溶解した水溶液を用いることもできる。その例としては、各種緩衝液を挙げることができ、その具体例としては、炭酸バッファー、リン酸バッファー、酢酸バッファー、HEPESバッファー、TRISバッファーなどが挙げられる。

## 【 0 1 5 4 】

なお、媒質は、1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用しても良い。

## 【 0 1 5 5 】

## [ II - 1 - 5 . 添加剤 ]

生体物質構造体の製造工程のいずれかの工程においては、生体物質、結合用化合物、非結合物質及び媒質、並びに、これらを混合した混合物などに対して、本発明の効果を著しく妨げない限り、任意の添加剤を共存させてもよい。添加剤の例としては、上記の塩の他、酸、塩基、バッファー、グリセリン、ポリエチレングリコール、糖類等の保湿剤、生体物質の安定剤としての亜鉛等の金属イオン、消泡剤、変性剤、アジ化ナトリウム等の防腐剤などを挙げることができる。

40

また、添加剤は1種を単独で用いてもよく、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用してもよい。

## 【 0 1 5 6 】

## [ II - 1 - 6 . 混合工程の操作 ]

50

本発明の生体物質構造体を製造する際には、媒質の存在下、前記の生体物質と結合用化合物と非結合物質とを混合する。この際、通常は攪拌操作を行なう。これにより、媒質中に少なくとも生体物質と結合用化合物と非結合物質とが共存する混合物が得られる。この混合物中において、生体物質と結合用化合物とが結合して主鎖が形成されるが、非結合物質が存在する部分には主鎖は形成されないため、特定孔を形成された生体物質構造体を得られる。

#### 【0157】

混合に際し、生体物質、結合用化合物、非結合物質、媒質、添加剤等は、本発明の生体物質構造体の製造が可能である限りどのような状態で用意をしてもよい。ただし、生体物質に関しては、通常は、何らかの溶媒や分散媒に生体物質を溶解又は分散させた溶液や分散液として用意する。この場合、生体物質を希釈させる溶媒や分散媒は、生体物質の活性や構造の安定性等を考慮して調整することが好ましく、例えば、混合に用いる上記の媒質と同様のものを溶媒や分散媒として用いることができる。

10

#### 【0158】

用意した生体物質、結合用化合物、媒質、添加剤等を混合する際の具体的な操作は任意である。また、これらを混合する順番も任意である。さらに、後述する固相担体に本発明の生体物質構造体を固定する目的で、固相担体上でこの混合物を調製することも可能である。

#### 【0159】

##### [11-1-7. 混合工程の組成]

混合工程において使用する生体物質、結合用化合物、非結合物質、媒質、添加剤等の混合比率は、本発明の生体物質構造体を得ることができる限り任意である。ただし、「(生体物質の重量) / {(生体物質の重量) + (結合用化合物の重量)}」で表される混合比率の値は、通常0.1以上、好ましくは0.3以上、より好ましくは0.5以上、更に好ましくは0.7以上、特に好ましくは0.9以上が望ましい。また、上限に特に制限は無いが、通常0.999以下である。これを下回る混合比率では、形成される生体物質構造体中の生体物質の組成が低くなり、十分に結合用化合物を生体物質で覆うことができなくなって、非特異吸着を引き起こす可能性がある。

20

#### 【0160】

即ち、生体物質の混合比率が高い場合、図1(a)に示したような結合用化合物が結合点となった主鎖を有する生体物質構造体が形成され、逆に、結合用化合物の混合比率が高い場合には、図4に示すように、生体物質が結合点となった主鎖を有する生体物質構造体が形成される。したがって、この際、生体物質の比率を上記範囲のように大きくすることにより、結合用化合物への非特異吸着を抑制することが可能となる。なお、図4は、本発明の生体物質構造体の構造を説明するため、固相担体に固定化した本発明の生体物質構造体の一例の表面近傍を拡大して示す模式図である。また、図4において、円形部分が生体物質を表わし、線状部分が結合用化合物を表わす。ただし、図4は生体物質と結合用化合物とからなる主鎖の構成を説明するべく、粒子状塊を構成しているか否かに係わらず主鎖の構造を2次元的に描画したものである。したがって、生体物質構造体が粒子状塊を有する場合には、図4は生体物質構造体の粒子状塊の主鎖を2次元的に広げたものと認識すべきである。

30

40

#### 【0161】

また、媒質中における生体物質及び結合用化合物の割合(濃度)も本発明の生体物質構造体を得ることができる限り任意であるが、生体物質及び結合用化合物の合計濃度が、通常0.1g/L以上、好ましくは1g/L以上、より好ましくは10g/L以上とすることが望ましい。この範囲を下回ると、粒子状塊及び生体物質構造体が生成しにくくなる可能性があるためである。

#### 【0162】

さらに、「(非結合物質の重量) / {(生体物質の重量) + (結合用化合物の重量) + (非結合物質の重量)}」で表される混合比率の値は、通常0.001以上、好ましくは

50

0.01以上、より好ましくは0.1以上が望ましい。また、上限に特に制限は無いが、通常0.95以下、好ましくは0.7以下、より好ましくは0.5以下である。この混合比率が小さすぎると特定孔を形成しにくくなる可能性があり、大きすぎると生体物質構造体を形成しにくくなる可能性がある。

#### 【0163】

##### [11-1-8. 生体物質構造体の形成メカニズム]

本発明の生体物質構造体の形成過程は明らかではないが、以下のように推測できる。即ち、混合物を調製すると、混合物中において生体物質と結合用化合物とが結合し、コンジュゲートが生成される。このコンジュゲートは、生体物質と結合用化合物とが結合した主鎖を有するもので、生体物質と結合用化合物とを溶媒中で混合し、互いの分子を接触させるだけで作製することができる。したがって、混合物内には、通常、コンジュゲートが存在している。

10

#### 【0164】

コンジュゲートは、コンジュゲート同士が集合し、互いが有する生体物質及び結合用化合物が結合することにより、鎖状及び/又は網目状に結合した構造を有するマトリックスを構成する。

また、生体物質と結合用化合物とが粒子状塊を形成するものである場合には、混合物中において生体物質と結合用化合物とが結合し(図3(a)参照)、図3(b)に示すような粒子状塊が生成される。このような生体物質構造体が形成される過程での粒子状塊の確認は、動的光散乱測定などによって、確認することができる。例えば、10nm程度のタンパク質と10nm程度の結合用化合物とを溶液中で混合した場合、サブミクロンオーダーの粒子状塊が確認されることがある。この粒子状塊は、さらに粒子状塊同士が集合することによって、図2(a)、(b)に示すように、粒子状塊が鎖状及び/又は網目状に結合した構造を有する生体物質構造体を形成するものと推測される。

20

#### 【0165】

また、この際には、結合する粒子状塊は、互いに有する生体物質及び結合用化合物が結合することによって、粒子状塊同士が互いに結合して生体物質構造体を形成することもあるものと推測される。この場合、生体物質構造体はより安定になるため、広い環境や用途への適用が可能となり、好ましい。

#### 【0166】

なお、前記のコンジュゲートと粒子状塊との関係について言えば、粒子状塊とは、コンジュゲートの一形態であると推察される。よって、粒子状塊同士が集合し、互いが有する生体物質及び結合用化合物が結合することにより、鎖状及び/又は網目状に結合した構造を有する、より大きなマトリックス構造の生体物質構造体を構成することができる。この時、本発明の生体物質構造体は、通常、粒子状塊が結合したマトリックスとなる。

30

#### 【0167】

また、非結合物質は、図5に模式的に示すように、生体物質構造体中に、領域(相)を形成する。

媒質中において、生体物質及び結合用化合物から生体物質構造体が形成される過程で、非結合物質はこれらと結合しない。このため、非結合物質は単独又は2以上が集合して、生体物質構造体中に領域(相)を形成する。この領域(相)には、生体物質構造体が形成されないことによって、この領域(相)をテンプレートとして、機能させることができる。よって、該領域(相)が後に特定孔を形成することになると考えられる。

40

ここで、当該領域(相)の形成に相分離の機構を利用する場合には、後述する濃縮工程及び/又は乾燥工程を行なうことが好ましい。

なお、図5は、生体物質、結合用化合物及び非結合物質を共存させた混合物中の様子を模式的に表わす図である。ただし、図5における各部の寸法及び形状は模式的なものであり、実際の様子と必ずしも一致するわけではない。

#### 【0168】

##### [11-2. 濃縮工程及び乾燥工程]

50

混合工程の最中や混合工程の後において、適宜、上記の混合物から媒質を除去する濃縮工程や乾燥工程を行なうようにしても良い。

【0169】

上記の混合物中の溶媒の量が多い場合などにおいては、混合物中にコンジュゲート又は生体物質構造体が生成しにくい場合や、生成しない場合がある。これらの場合には、混合物を濃縮することで、コンジュゲートを効率的に形成させ、生体物質構造体を効率的に製造することができる。

さらに、上記の混合物がコンジュゲート又は生体物質構造体の断片を含んでいる場合においても、濃縮により、コンジュゲート又は生体物質構造体を更に形成させることができる。したがって、このようなコンジュゲートや生体物質構造体の成長のために、濃縮を行なってもよい。

10

【0170】

ただし、均一な生体物質構造体を形成するためには、混合物調製の初期の段階においては、媒質中で生体物質と結合用化合物とを均一に混合することが好ましい。したがって、一旦比較的大量の媒質中に生体物質及び結合用化合物を共存させ、それを濃縮することにより粒子状塊を生成させて、生体物質構造体を製造することが好ましい。

また、前述の非結合物質による領域（相）の形成に相分離の機構を用いる場合には、相分離を効率的に進行させるために、濃縮工程を利用することが好ましい。通常、混合工程において、生体物質、結合用化合物、及び非結合物質は媒質に混和しているが、濃縮工程によって生体物質構造体の形成が促進され、さらに、共溶媒として働いている媒質が失われ

20

【0171】

また、生体物質構造体の形成後、媒質を乾燥除去してもよい。なお、通常は、混合物を乾燥させる過程において混合物は濃縮されるので、濃縮と乾燥とは一連の操作として行なうことができる。

混合物を乾燥、濃縮する方法は任意であるが、例えば、限外濾過、減圧乾燥などが挙げられる。また、このほか、単に常圧下での蒸発により乾燥や濃縮を行なうようにしてもかまわない。

【0172】

上記混合物を乾燥、濃縮する際の温度条件は任意であるが、生体物質の変性等を避ける観点から、通常25以下、好ましくは10以下で行なうことが望ましい。

30

また、混合物を乾燥、濃縮する際の圧力条件も任意であるが、通常は、常圧以下に減圧して行なうことが望ましい。

【0173】

さらに、混合物の濃縮は、生体物質と結合用化合物とが接触する確率を上げてコンジュゲートを形成させやすくすること、または、それらコンジュゲート同士又は粒子状塊同士が接触する確率を上げて本発明の生体物質構造体を構成させやすくすることを目的とする。そのため、濃縮の前、最中又は後において、遠心分離によって混合物を沈殿させたり、貧溶媒を混合したり、硫酸アンモニウム等の添加物を加えたりして、コンジュゲート及び生体物質構造体を沈殿させるようにしてもよい。

40

【0174】

前述の通り、濃縮工程や乾燥工程を行なった場合、非結合物質による領域（相）がより形成されやすくなる。この領域（相）には生体物質構造体は形成されないのので、図6に模式的に示すように、非結合物質からなる領域（相）を避けるようにして生体物質構造体が形成される（テンプレートとして機能する）ものと考えられる。

なお、図6は、濃縮工程又は乾燥工程後の生体物質構造体の様子を模式的に表わす図である。ただし、図6における各部の寸法及び形状は模式的なものであり、実際の様子と必ずしも一致するわけではない。

【0175】

[11-3. 除去工程]

50

混合工程の後、好ましくは、濃縮工程や乾燥工程を経て、通常は、生体物質構造体から非結合物質を除去する除去工程を行なう。これにより、図7に示すように、非結合物質からなる領域(相)が存在していた部分が特定孔となる。

なお、図7は、除去工程後の生体物質構造体の様子を模式的に表わす図である。ただし、図7における各部の寸法及び形状は模式的なものであり、実際の様子と必ずしも一致するわけではない。

#### 【0176】

非結合物質を除去する方法に制限は無い。例えば、非結合物質を含有する生体物質構造体を洗浄溶媒で洗浄し、非結合物質を除去しても良い。

ここで、洗浄溶媒としては、生体物質構造体を溶解もしくは分解させないか、生体物質構造体が難溶性の溶媒を用いる。具体的には、洗浄溶媒に対する生体物質及び結合用化合物の溶解度が、通常60重量%以下、好ましくは40重量%以下、より好ましくは20重量%以下の溶媒を用いる。なお、下限は理論的には0重量%である。

#### 【0177】

また、洗浄溶媒に対する非結合物質の溶解度は、生体物質構造体から非結合物質を除去できる限り任意であるが、通常1重量%以上、好ましくは3重量%以上、より好ましくは5重量%以上である。ただし、非結合物質の溶解度が低い場合でも大量の洗浄溶媒を用いることによって、非結合物質の除去が可能となる。

#### 【0178】

さらに、洗浄溶媒は、生体物質及び結合用化合物を変質させないものが好ましい。生体物質及び結合用化合物の活性を維持するためである。

洗浄溶媒の具体例を挙げると、水、エタノール、2-プロパノール、DMSO、DMF等の水溶性有機溶媒などが挙げられる。中でも、水が好ましい。

なお、洗浄溶媒は、1種を単独で用いても良く、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用しても良い。

#### 【0179】

また、洗浄溶媒には、緩衝物質や界面活性剤などの物質を含有させてもよい。例えば、生体物質の変性を防ぐ目的で、リン酸水素ナトリウム、リン酸2水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸、クエン酸ナトリウム、HEPES等の緩衝作用を示す物質を含有させてもよい。さらに例えば、生体物質間の静電相互作用を遮蔽し、非結合物質を洗浄する目的で、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム等の塩類を含有させてもよい。また、洗浄効果を高める目的で、tween20、SDS等の界面活性剤を含有させてもよい。

#### 【0180】

また、特定孔に非結合物質が存在したままの生体物質構造体を製造する場合には、除去工程は必須の工程ではない。例えば、製造者が特定孔に非結合物質が存在したままの生体物質構造体を製造し、使用者が使用前に非結合物質を除去する場合には、製造者は必ずしも除去工程を行なわなくても構わない。ただし、製造者が除去工程を行ない、特定孔から非結合物質が除去された状態(即ち、特定孔が空(カラ)になった状態)の生体物質構造体を製造することが、使用時の手間が省けるため、好ましい。

#### 【0181】

#### [11-4. その他の工程]

また、本発明の生体物質構造体の製造方法においては、上述した以外の工程を行なっても良い。

例えば、生体物質構造体の製造後、その生体物質構造体中の生体物質に対して、所望の官能基を修飾するようにしてもよい。これを利用すれば、生体物質担持体の製造後、生体物質構造体中の生体物質に特定の結合するように修飾した別の生体物質又はその他の化合物を後から結合させ、結果として、固相担体に上記の別の生体物質又はその他の化合物を高密度に固定化することができる。具体例を挙げると、生体物質としてアビジンを用いて、このアビジンと結合用化合物とを結合させて生体物質構造体を形成し、生体物質担持

10

20

30

40

50



体を製造する。その後、ビオチンで修飾した別の生体物質又はビオチンで修飾したその他の化合物を用いて、アビジン - ビオチン相互作用により上記の別の生体物質又はその他の化合物を固定化することができる。また、同様にヒスチジントグもしくはグルタチオン - S - トランスフェラーゼを介して、生体物質を固定することも可能である。

#### 【0182】

具体的な例として、本発明の生体物質構造体に結合させる化合物として、生理活性物質（医薬）であるFK506を用いて、生体物質構造体に含まれる生体物質に結合させる場合について説明する。アビジン - ビオチン相互作用を用いて、生体物質に結合させる場合、生体物質として、アビジン類（例えばストレプトアビジン）を用いる。この時、FK506に親水性リンカーとして、エチレンオキサイド鎖を結合させ、その末端にビオチンを導入し、ビオチン化FK506を得る（参考文献 *Chemistry & Biology* Vol. 9 691 - 698 (2002)）。この時、生体物質（ストレプトアビジン）と結合用化合物とビオチン化FK506とを一度に共存させ結合させても良いが、好ましくは、生体物質構造体を作製した後に、ビオチン化FK506を接触させるほうが好ましい。

10

また、例えば、本発明の生体物質構造体を何らかの固相担体に固定させ、生体物質担持体（生体物質が固定された固相担体）を作製するようにしてもよい。

#### 【0183】

##### [III. 生体物質担持体]

本発明の生体物質構造体は、固相担体に固定して、アフィニティー精製や医薬機能解析ツール、又は、センサーチップとして用いることもでき、さらに、DDS（ドラッグデリバリーシステム）のための薬剤の表面処理、再生医療担体の表面処理、人工臓器の表面処理、カテーテルなどの表面処理等に適用可能である。これら表面処理などに本発明の生体物質構造体を使用する場合、所望の固相担体に、任意の手法によって本発明の生体物質構造体を固定した生体物質担持体を形成し、それを用いることになる。

20

#### 【0184】

以下、生体物質担持体について説明する。

本発明の生体物質担持体は、固相担体に本発明の生体物質構造体が固定されてなるものである。即ち、固相担体表面に、本発明の生体物質構造体を有するものである。

#### 【0185】

##### [III-1. 生体物質担持体が有する生体物質構造体]

本発明の生体物質担持体が有する生体物質構造体、及び、その構成要素である生体物質及び結合用化合物については、上述したものと同様である。

上述した通り、本発明の生体物質構造体は、生体物質及び結合用化合物の両方によって形成された主鎖からなるマトリックス骨格を有しているため、生体物質の比率を高めることが可能である。このため、本発明の生体物質担持体でも、従来よりも多量の生体物質を固定化することができる。即ち、固相担体に対して大きい濃度（固相担体の単位表面当たりの固定量； *surface concentration*）で生体物質を固定化することができる。なお、従来技術による高分子膜では、予め固相担体上に形成された高分子鎖によって主鎖が形成されていて、その主鎖に対して生体物質が枝状（グラフト状）に結合した構造となっている。したがって、従来は、生体物質の固定化量は所定の上限値で制限され、多量の生体物質の固定化を行なうことはできなかった。

40

#### 【0186】

また、生体物質構造体の厚さ（膜厚）は任意であるが、生体物質構造体が乾燥した状態において、通常50nm以上、好ましくは100nm以上、より好ましくは500nm以上、さらに好ましくは1μm以上である。なお、上限に特に制限は無いが、通常10cm以下である。膜厚が小さすぎると、生体物質構造体が剥がれやすくなる可能性があると共に、生体物質構造体の膜厚を均一にすることが難しく、さらに、さらに再現性良く生体物質の固定化を行なうことが困難になる場合があり、十分に皮膜形成できない可能性がある。なお、上記の厚さは、SEM、TEM、AFMなどで測定することができる。

50

## 【 0 1 8 7 】

## [ III - 2 . 生体物質担持体が有する固相担体 ]

固相担体は、表面に本発明の生体物質構造体を形成するための基体となるものである。本発明で用いる固相担体に制限は無く、本発明の生体物質構造体を形成する対象となるものであれば、任意の材質、形状、寸法のものを用いることができる。

## 【 0 1 8 8 】

固相担体の材質の例を挙げると、ポリオレフィン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、アクリル系樹脂等の各種樹脂材料、ガラス、アルミナ、炭素、金属等の無機材料などが挙げられる。なお、固相担体の材質は1種を単独で用いたものでもよく、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用したものであっても良い。

10

## 【 0 1 8 9 】

また、固相担体の形状の例を挙げると、平板状、粒子状、繊維状、膜状、シート状などが挙げられる。具体例としては、多数の生体物質を配列させることができるチップ（基板）、スライドガラス、ファイバースライド、マイクロタイタープレート等の平板状部材や、クロマトグラフィー担体やラテックス診断薬としてのビーズ、分離膜として利用されている中空系繊維や多孔質膜などが挙げられる。中でも、流路を有するチップを固相担体として用いる場合には、流路の形状や寸法なども用途に応じて任意に形成することができる。ただし、生体物質構造体を基板等に固定化する場合は別段不要であるが、単に流路内に生体物質構造体を充填して保持させるようにした場合などにおいては、流路内から生体物質構造体が流出することを防止するべく、流路にフィルタ等の流出防止手段を設けること

20

## 【 0 1 9 0 】

さらに、上記固相担体は、そのまま使用してもよいが、何らかの表面処理を施してから表面に生体物質構造体を形成するようにしても良い。例えば、金属や金属酸化物などの被覆材料で表面を被覆してから生体物質構造体を形成するようにしても良い。

このような被覆処理を行なってもよい固相担体の具体例としては、金属被覆チップ、スライドガラス、ファイバースライド、シート、ピン、マイクロタイタープレート、キャピラリーチューブ、ビーズ等が挙げられる。

## 【 0 1 9 1 】

また、例えば、固相担体と生体物質構造体とを結合させるために、表面処理として官能基を固相担体に導入しても良い。その官能基は任意であるが、例えば、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基、アルデヒド基、ヒドラジド基、カルボニル基、エポキシ基、ビニル基、アミノ基、スクシンイミド基、p - ニトロフェニル基等の、化学結合により固相担体と生体物質構造とを結合させる官能基が挙げられる。

30

## 【 0 1 9 2 】

また、本発明の生体物質担持体の製造時に溶媒や分散媒等の媒質として水を用いる場合には、アルキル基、フェニル基等の疎液相互作用による物理吸着によって固相担体と生体物質構造体とを結合させる官能基を用いることもできる。

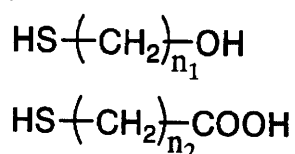
なお、導入する官能基は1種であってもよく、2種以上を任意の組み合わせ及び比率で併用してもよい。

40

## 【 0 1 9 3 】

表面処理の具体例を挙げると、例えば、固相担体表面に対して、金で被覆する表面処理を行なった場合には、

## 【 化 3 】



などを金表面に固定する処理が挙げられる。ただし、上記の構造式において、 $n_1$ 、 $n_2$ は

50

それぞれ独立に2以上の整数を表わす。

【0194】

[ III - 3 . 生体物質担持体の製造方法 ]

本発明の生体物質担持体の製造方法は任意である。例えば、あらかじめ生体物質構造体を用意して、それを固相担体と結合させてもよいが、通常は、本発明の生体物質担持体は、媒質の存在下、生体物質と結合用化合物と非結合物質とを共存させた混合物を固相担体に供給し、上記固相担体表面に、上記生体物質及び上記結合用化合物からなる主鎖を有する生体物質構造体を形成させる工程を経て製造される。以下、この方法について説明する。

【0195】

[ III - 3 - 1 . 生体物質担持体の製造に用いる生体物質、結合用化合物及び非結合物質など ]

生体物質、結合用化合物、非結合物質などは、生体物質構造体の製造方法の説明において上述したものと同様である。また、本発明の生体物質担持体の製造時には、生体物質、結合用化合物、非結合物質に、適宜添加剤を共存させてもよい。

【0196】

[ III - 3 - 2 . 生体物質担持体の製造に用いる媒質 ]

本発明の生体物質担持体を製造する際に使用する媒質は、生体物質構造体の製造方法の説明において上述した媒質と同様である。したがって、媒質としては、生体物質及び結合用化合物の活性や構造の安定性、非結合物質の性質などを考慮して選択することが好ましい。

生体物質構造体の製造時と同様、本発明の生体物質担持体を製造する際にも、通常は、媒質として水を用いる。ここで、媒質として水を使用できること、即ち、水中で上述した生体物質と結合用化合物と非結合物質とを共存させた混合物を固相担体に供給し、生体物質担持体を製造できることは、本発明の優れた利点の一つである。

【0197】

[ III - 3 - 3 . 生体物質担持体の製造に用いる混合物 ]

生体物質担持体の製造に用いる混合物は、媒質の存在下、少なくとも、生体物質、結合用化合物及び非結合物質を共存させたものである。この混合物は、生体物質構造体の製造時に調製される混合物と同様のものである。

【0198】

[ III - 3 - 4 . 固相担体への混合物の供給 ]

本発明の生体物質担持体を製造する際には、上述した混合物を、固相担体に供給する。即ち、上述した混合物を固相担体に接触した状態にさせる。その具体的な操作は任意であるが、例えば、あらかじめ混合物を用意してその混合物を固相担体に接触させてもよいし、混合物の各成分を別々に用意し、固相担体上でそれらを混合させて混合物を調製し、固相担体に混合物を接触させるようにしてもよい。具体的には、例えば、生体物質を含む溶液（水溶液等）と結合用化合物を含む溶液（水溶液等）と非結合物質を含む溶液（水溶液等）とを固相担体上に各々供給した後に、固相担体上で各溶液を混合することにより行なうことができる。また、予め混合物を用意しておく場合、供給前の混合物中で前述したコンジュゲート（その一形態である粒子状塊を含む）又は生体物質構造体を作製しておき、その後、混合物を固相担体に供給するようにしても良い。

【0199】

[ III - 3 - 5 . 固相担体表面への生体物質構造体の形成 ]

次いで、固相担体表面に、生体物質及び結合用化合物からなる主鎖を有する生体物質構造体を形成する。混合物中には、上記のようにコンジュゲート、粒子状塊又は生体物質構造体などが含まれているので、混合物を固相担体に接触させることにより、例えば混合物中のコンジュゲート、粒子状塊又は生体物質構造体が固相担体表面に集積されたり、混合物中でコンジュゲートや粒子状塊同士が結合して生成した生体物質構造体が固相担体に結合したり、混合物中の生体物質及び結合用化合物が固相担体表面に結合することにより生

10

20

30

40

50

体物質構造体が生成したりすることで、固相担体表面に生体物質構造体を形成することができる。

【0200】

生体物質構造体を固相担体に結合させる際の条件は任意であるが、生体物質の変性等を避ける観点から、温度条件は、通常25以下、好ましくは10以下で行なうことが望ましい。

また、固相担体への固定後の混合物を乾燥、濃縮する場合、その際の圧力条件も任意であるが、通常は、常圧以下が望ましい。

【0201】

さらに、生体物質構造体を固相担体に固定するには、混合物の供給後、所定の時間だけ固相担体を静置することが望ましい。静置の時間は任意であるが、通常24時間以下、好ましくは12時間以下が望ましい。

また、適宜、生体物質構造体の製造時と同様に、濃縮工程又は乾燥工程を行なうようにしてもよい。さらに、通常は、固相担体への混合物の供給後、除去工程を行なうことにより、生体物質構造体から非結合物質を除去する。

【0202】

[III-4. 従来技術と比較した生体物質担持体の利点]

以上のように、上記の方法は、媒質（通常は溶媒）中に生体物質と結合用化合物と非結合物質とが共存した混合物を固相担体に接触させるだけで、固相担体表面に、特定孔を有する生体物質構造体を形成させることができ、これにより、本発明の生体物質担持体を製造することができる、即ち、固相担体上に生体物質を固定化することができるという、非常に簡便な方法である。

【0203】

本発明の生体物質担持体を用いれば、生体物質を従来よりも多量に固定化することができる。例えば従来は、固相担体表面に形成された高分子膜（ポリマー膜）に生体物質を結合させていた。しかし、この場合、ポリマー鎖で形成された主鎖に対して、生体物質が高分子鎖の先端に結合したり高分子鎖にグラフト状に結合したりすることで、生体物質を固相担体に結合させていたため、主鎖としてポリマー鎖を形成させる必要があり、固定化する生体物質に対して一定以上のポリマーを使用しなくてはならず、生体物質の固定化量に限界があった。

【0204】

これに対し、本発明においては、生体物質と結合用化合物（高分子に相当）との両方によって形成された生体物質構造体骨格（主鎖）を有する生体物質構造体を形成させ、この生体物質構造体を利用して固相担体に生体物質を固定化できるため、生体物質構造体中における生体物質の比率を高めることができる（即ち、結合用化合物の比率を小さくすることができる）。したがって、生体物質を固定化するに際して、従来のような限界は無く、生体物質を従来よりも多く、即ち、固相担体表面に対して高密度に固定化することが可能である。

さらに、特定孔を形成することが可能であるために、アフィニティー分離などを行なう際に、より効率的に分離を行なうことが可能となる。

【0205】

また、本発明の生体物質担持体は、簡単な方法で製造できることも利点のひとつである。従来の方法では、生体物質を高密度に固定化するためには多くの手間を要していた。具体的には、従来は、固相担体上にあらかじめ高分子膜を形成し、その高分子膜に生体物質を固定化して固相担体上にリガンドを含んだ生体物質構造体を構築していた。しかし、これらの方法では、固相上に高分子膜を作製する際に、高分子の分子量や固相担体への導入密度を適切にコントロールする必要があり、操作が非常に煩雑であり再現性良く固定化を行なうことが困難であった。

【0206】

これに対し、本発明の生体物質担持体は、媒質（通常は溶媒）中に生体物質と結合用化

合物および非結合物質とが共存した混合物を固相担体に接触させるだけで、固相担体上に特定孔を有する生体物質構造体を形成させること、即ち、生体物質を固定化することができる、非常に簡単に製造可能なものである。また、生体物質担持体の製造に用いる溶媒を有機溶媒に限定されず、それにより使用できる生体物質を制限されることがないため、固定化する生体物質の選択範囲を広げることが可能となる。

【0207】

さらに、本発明の生体物質担持体に形成された特定孔を有する生体物質構造体では、生体物質を固相担体上に三次元的にほぼ均一な状態で固定することができる。したがって、生体物質と、それと特異的に相互作用する作用物質との相互作用等に最適な反応場を構築することができる。これにより、例えば本発明の生体物質担持体を上記の相互作用を利用したセンサに用いた場合、そのセンサの検出感度を高めることができる。

10

【0208】

上記の最適な反応場を構築することができる理由は、本発明の発明者らから推察するところ、以下のとおりである。即ち、従来の高分子膜で表面処理した固相担体に後から生体物質を固定化する方法では、膜の表面に生体物質が偏ってしまい、高分子膜中に作用物質が進入できる空隙がなくなってしまう。さらに、主鎖が親水性ポリマーのみで構築される従来の技術では、親水性ポリマー鎖が排除体積効果及びポリマー鎖の運動により、生体物質への作用物質の接近を妨げることが推測される（生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法 - B I A C O R E を中心に、編集 永田和宏・半田宏、発行所 シュプリングー・フェアーク東京株式会社、第258頁、医療用高分子材料の開発と応用、シーエムシー、第19頁）。

20

【0209】

しかしながら、本発明の生体物質担持体に形成された生体物質構造体では、生体物質を固相担体上に三次元的にほぼ均一な状態で固定することができる。さらに、本発明の技術を用いることにより、生体物質構造体の構造は高分子膜中で作用物質が充分反応できる空隙が形成される。また、本発明の生体物質構造体には、生体物質構造体の内部への作用物質の進入を容易とする特定孔が形成されている。これらのことから、最適な反応場を構築できるようになっていると考えられる。

【0210】

また、本発明の生体物質担持体に形成された生体物質構造体は、膜厚を任意に制御することができる。従来技術では、通常は、生体物質構造体の膜厚をサブミクロンレベルから数ミクロンレベルまで、任意にコントロールすることが難しかった。しかし、本発明によれば生体物質構造体の膜厚を上記のような精密なレベルで制御することが可能であり、生体物質構造体構造の設計の自由度を高めることができる。

30

【0211】

例えば、SPRによる相互作用観察を行なう場合には、観察対象を固定するために用いる膜の膜厚は200nm～300nm程度が最適であると考えられる。また、例えば、医療用器具、再生医療担体の表面処理を行なう場合、十分な強度及び被覆を実現させるためには、その表面処理に用いる膜にはマイクロオーダーの膜厚が要求される。さらに、例えばDDS（ドラッグデリバリーシステム）のための薬剤の表面処理を行なう場合には、ドラッグリリースの制御のためには、その表面処理に用いる膜を任意に膜厚を制御することが要求される。このように、生体物質の固定化に何らかの膜を利用する場合には、その膜厚制御が重要な点のひとつであったが、従来は膜厚制御が困難であった。しかし、本発明によれば、その用途に応じた膜厚を、混合物の濃度、量、反応条件（温度や時間等）などを調製することにより、任意に制御することができる。

40

【0212】

さらに、本発明の生体物質担持体では、生体物質と作用物質とを相互作用させるべく本発明の生体物質担持体を使用した場合に、生体物質以外の生体物質構造体構成要素に起因する非特異的相互作用を抑制することができる。生体物質構造体中における生体物質の比率を高め、非特異的相互作用の要因となる生体物質以外の物質の比率を抑制することがで

50

きるからである。

【0213】

また、特に、結合用化合物として無電荷のものを用いた場合には、電荷により生じる非特異的相互作用をより一層抑制することも可能となる。即ち、例えば、「ナノテクノロジー基礎シリーズ バイオナノテクノロジー 堀池靖浩・片岡一則（共編）第186頁」の記載によれば、ある従来技術を使用した場合、高分子膜が電荷を有しているために、用いる緩衝溶液のpHやイオン強度が生体物質の反応に大きく影響し、さらに、電荷を有するタンパク質は静電氣的相互作用による非特異吸着を避けられなかった。しかし、結合用化合物として無電荷のものを用いれば、そのようなことはなく、特定の相互作用を選択的に生じさせることが可能となる。

10

【0214】

[ III - 5 . 生体物質担持体の用途 ]

本発明の生体物質担持体は、例えば、生体物質と相互作用する作用物質を検出するバイオセンサーとして好適に使用できる。上記のバイオセンサーは、例えば、いわゆるDNAアレイ若しくはDNAチップ、または、プロテインアレイ若しくはプロテインチップ等と呼ばれる、DNAまたはタンパク質を固定化したセンサーチップを用いて、相互作用を解析するものである。例えば、本発明の生体物質担持体は、このセンサーチップに適用することができる。即ち、センサーチップに生体物質を固定化する場合に、上述した方法によりセンサーチップ本体に生体物質構造体を形成して、センサーチップを本発明の生体物質担持体として用いることができる。

20

【0215】

このようなバイオセンサーの具体例としては、蛍光法、ELISA法、化学発光法、RI法、SPR（表面プラズモン共鳴）法、QCM（水晶発振子マイクロバランス）法、ピエゾ方式カンチレバー法、レーザー方式カンチレバー法、質量分析法、電気化学的方法、電極法、電界効果トランジスタ（FET）法、カーボンナノチューブを利用したFET及び/又は単一電子トランジスタ法によるセンサなどが挙げられる。この中でも、SPR法およびQCM法による検出は、簡便に検体を無標識で分析することができるため、好適に用いられる。

【0216】

SPR法は、表面プラズモン波を誘起させるために、センサーチップの表面は、金属で被覆されているのが好ましい。金属としては、表面プラズモン波を誘起しうるものであればよく、金、銀、銅、アルミニウムおよびこれらを含む合金などが挙げられる。なかでも、感度や安価な点では銀が好ましく、安定性の面では金が好ましい。金属層は、蒸着、スパッタリング、メッキ、その他のコーティングなどによって形成され、その厚さは、通常20nm以上、好ましくは30nm以上、また、通常300nm以下、好ましくは160nm以下程度である。

30

【0217】

これらSPR法やQCM法に本発明の生体物質担持体を適用する場合、センサーチップ本体の表面に生体物質構造体を強固に結合するためには、センサーチップ本体の表面が官能基を有していることが好ましい。

40

さらに、本発明は、DDS（ドラッグデリバリーシステム）のための薬剤の表面処理、再生医療担体の表面処理、人工臓器の表面処理、カテーテルなどの表面処理等に適用可能である。

【0218】

[ III - 6 . 生体物質固定化キット ]

上述した生体物質担持体を製造するため、生体物質を固相担体に固定化するために用いるもの、即ち、上述した結合用化合物及び非結合物質、並びに、生体物質及び結合用化合物を混和させうる溶媒や分散媒等の媒質を、キット化した生体物質固定化キットを用いても良い。即ち、生体物質担持体を製造するため、結合用化合物と、非結合物質と、生体物質及び結合用化合物を混和させうる媒質とを備える生体物質固定化キットを用意するよう

50

にしてもよい。生体物質固定化キットを用いれば、生体物質担持体を簡単に製造できる、即ち、固相担体上に上記生体物質構造体を簡単に作製できるため、生体物質を固相担体上へ簡単且つ大量に固定化することが可能となる。

【0219】

生体物質固定化キットに備えられる結合用化合物及び非結合物質は、上述したものと同様である。また、生体物質固定化キットにおいて、結合用化合物及び非結合物質はどのような状態で備えられていても良く、例えば、任意の溶媒に溶解した溶液、任意の分散媒に分散した分散液、粉末状や塊状の固体など、その存在状態は任意である。

【0220】

また、生体物質固定化キットに備えられる媒質も、生体物質担持体の製造に用いる媒質として上述した媒質と同様である。さらに、生体物質固定化キットにおいて、この媒質は、上記結合用化合物及び非結合物質と別に備えられていても良く、結合用化合物及び/又は非結合物質の溶媒や分散媒等として結合用化合物及び/又は非結合物質と一体に備えられていても良い。

10

【0221】

さらに、生体物質固定化キットには、必要に応じて他の要素が備えられていても良い。

例えば、生体物質構造体の製造を促進する試薬などをさらに備えていても良い。具体例としては、結合用化合物としてポリアクリル酸を用いる場合には、ポリアクリル酸のカルボキシル基を活性させるために1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(略称:EDC)を試薬として備えるようにしてもよい。

20

【0222】

[IV. アフィニティー分離の説明]

本発明の生体物質構造体及び生体物質担持体は、アフィニティー分離に用いて好適である。したがって、本発明の生体物質構造体及び生体物質担持体は、例えば、アフィニティー精製や医薬機能解析ツールとして用いることができる。

【0223】

具体的には、例えば、生体物質として生理活性物質を用いて、アフィニティー精製や医薬作用機構解析ツールを目的とした場合、血清などの中に含まれる微量なタンパク質などの生体物質が精製すべき対象物質となり、生体物質と対象物質との相互作用により、それを夾雑物の中から得ることができる。また、例えば生体物質構造体に含まれる生体物質に対する医薬候補化合物の作用機構の分析を目的とした場合、生体物質としてレセプターなどの疾患に寄与するタンパク質を用いることにより、複数の医薬候補化合物が分析すべき対象物質となり、それを生体物質構造体に接触させ、特異的に吸着した医薬候補化合物を分析することにより、その医薬候補化合物の選抜もしくは作用機構の解明を行なうことができる。

30

【0224】

上記のようにアフィニティー分離を行なう場合には、生体物質構造体に含まれる生体物質と対象物質との上述した特異的な相互作用を用いることにより、分離精製、構造や機能の解析などを行なう。このとき、まず、生体物質構造体に対象物質を含む試料液(検体)を接触させ、試料液中の対象物質とその他の物質とを分離させることになる。

40

【0225】

[IV-1. 分離精製の対象となる対象物質]

分離精製の対象となる対象物質とは、生体物質と特異的に相互作用する(アフィニティー結合する)作用物質を示す。このような対象物質の例としては、上述の生体物質構造体が有している生体物質と同様のものが使用できる。

具体例としては、医薬の候補となりうる物質(医薬候補物質)を分離する場合には、生体物質として当該医薬候補物質に生じさせたい所望の相互作用を生じうるものを用い、医薬候補物質を含有する可能性がある検体から、上記の医薬候補物質となりうる化合物を対象物質として分離するようにすることができる。

【0226】

50

さらに、診断用解析ツールを目的とした場合、血液、血清、血漿、骨髄、尿、糞便、鼻汁、唾液などの体液、細胞、組織やそれらの抽出液に含まれる、生体物質である抗体などに特異的に結合する物質が対象物質となり、その対象物質の量もしくは存在の有無を分析することにより、疾患を診断することが可能となる。

また、生体物質としてタンパク質、DNA、RNAなどの核酸を用いた場合、作用物質として、タンパク質-核酸連結分子を用いたタンパク質のスクリーニング方法及び機能改変方法を提供することができる。この方法は本発明の生体物質構造体を用いて、酵母ツハイブリッド、TAP、ファージディスプレイ、IVV (in vitro virus)、mRNAディスプレイ、STABLE、リポゾーム・ディスプレイなどの公知の解析技術を用いることができる(例えば、柳川ら、「蛋白 核酸 酵素」、Vol. 48 No. 11 P 1474 (2003)等参照)。

#### 【0227】

##### [IV-2. 対象物質を含む試料液]

対象物質は、通常は、組成物である検体中に、他の物質と共に共存している。また、検体は気体であることもあるが、通常は、液体として用意される。この際、検体は、何らかの溶媒中对象物質が含有された溶液や分散液となっていることが多い。なお、以下適宜、溶液や分散液として存在する液体状の検体を「試料液」という。

#### 【0228】

試料液の溶媒や分散媒としては、本発明の効果を著しく損なわない限り任意であるが、例えば、生体物質構造体製造時の媒質として上述したものをを用いることができる。

また、試料液中の対象物質の濃度も任意であるが、通常 $1\mu\text{g}/\text{L}$ 以上、好ましくは $5\mu\text{g}/\text{L}$ 以上、より好ましくは $10\mu\text{g}/\text{L}$ 以上が望ましい。この範囲を下回る濃度であると、精製の効率が低下し、本発明の利点を十分に発揮できなくなる可能性がある。

#### 【0229】

さらに、対象物質以外の物質は、試料液中の濃度として、通常50重量%以下、好ましくは40重量%以下、さらに好ましくは30重量%以下が望ましい。この範囲を上回ると試料液の粘度が高くなりすぎ、生体物質構造体の内部まで十分に対象物質が侵入して生体物質と接触することができなくなる可能性がある。

#### 【0230】

##### [IV-3. 生体物質構造体と試料液との接触方法]

本発明の生体物質構造体に対象物質を含む試料液を接触させる方法は、特に限定されないが、例えば、生体物質構造体を充填したカラムの中に、対象物質を含む試料液を移動相とともに流すことにより接触させる方法が挙げられる。この時、生体物質構造体は乾燥した状態でもかまわないが、試料液を接触させる前に、移動相となる液体で湿潤させることが好ましい。

#### 【0231】

また、別の方法では、例えば、対象物質を含む試料液をマイクロチューブなどの容器に入れ、その中に生体物質構造体を加えることによって接触させたり、逆に、生体物質構造体を入れた容器に対象物質を含む試料液を加えることによって接触させたりすることも可能である。

#### 【0232】

さらに、本発明の生体物質構造体を固相担体に固定化することにより、さらに分離精製の効率を向上させることも可能である。例えば、微小流路の表面に本発明の生体物質構造体を固定化し、その流路に対象物質を含む試料液を送り込むことにより、小型で高効率な分離精製装置を構成することができる。

#### 【0233】

また、生体物質構造体に対象物質を含む試料液を接触させるときは、適宜、如何なる条件に設定するようにしてもよいが、このましくは25以下、さらに好ましくは10以下で行なうことが望ましい。

さらに、接触させる前、最中、後に適宜、試料液を乾燥、濃縮することも可能である。

10

20

30

40

50



その際の圧力条件も任意であるが、通常常圧以下が望ましい。

【0234】

[IV-4. 対象物質の分離]

本発明の生体物質構造体と試料液との接触後にどのようにして対象物質の分離を行なうかは、生体物質や対象物質の種類などに応じて任意である。

例えば、生体物質と対象物質とが特異的に相互作用することにより、対象物質とその他の物質との間でリテンションタイム（保持時間）に違いが生じる場合には、このリテンションタイムの違いを利用して、分画精製し、対象物質をその他の物質から分離することができる（アフィニティークロマトグラフィー）。

【0235】

また、相互作用の中でも特に、対象物質が生体物質に特異的な相互作用によって吸着する場合には、生体物質に対象物質を吸着させ、その状態で試料液を生体物質構造体から分離し、その後対象物質を生体物質から遊離させて回収することにより、対象物質をその他の物質から分離することもできる。対象物質を生体物質から遊離させる方法は特に限定されないが、例えば、添加塩、pH、昇温等のほか、生体物質構造体に分離精製対象物よりも吸着力の強い既知の化学物質や、同等もしくは弱い吸着力だとしても高濃度の化学物質を添加することなどによって、対象物質を生体物質構造体から遊離させ、回収することができる。

【0236】

これら、分離させた対象物質は、目的に応じて、希釈もしくは濃縮することが可能である。例えば、希釈する場合は目的に応じた溶媒と混合すればよく、濃縮する場合は減圧もしくは加温またはその両方を用いて溶媒を蒸発させたり、限外ろ過フィルタを用いたり、凍結乾燥法を用いて溶媒を完全に除去したりするようによればよい。

【0237】

また、本発明の生体物質構造体によって分離された対象物質を分析する場合、その方法は限定されないが、一般的には、例えば、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、質量分析（MS）、赤外分光法、核磁気共鳴法（ $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR、 $^{29}\text{Si}$ -NMR）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、吸光度測定、蛍光測定などが挙げられる。また、分析に際しては、各測定手法を単独で用いても良く、2種以上を任意に組み合わせて行なってもよい。後述する第2実施形態で生体物質に吸着した対象物質の量を測定したり、第4実施形態で測定部21による分画中の対象物質の量の測定を行なったりする場合には、ここで例示した方法を用いる測定機器を用いることが可能である。

【0238】

[IV-5. 生体物質構造体を用いたアフィニティー分離の利点]

従来技術によるアフィニティー分離では、その分離に用いるアフィニティークロマトグラフィー用担体の表面に生体物質を固定するため、生体物質の導入量は制限されていた（通常、タンパク質の単層吸着は、 $0.3 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）。したがって、従来は、アフィニティークロマトグラフィー用担体では、生体物質と対象物質とを相互作用させる場合に、単位体積における相互作用可能な対象物質の量が少なかった。

【0239】

さらに、従来はそのアフィニティークロマトグラフィー用担体を完全に生体物質で覆うことができなかつたため、アフィニティークロマトグラフィー用担体への非特異的な相互作用が生じやすく、分離精製効率が低かった。そのため、精製純度を高めるためには、複数回の精製を必要とし、分離精製に時間と手間がかかっていた。

【0240】

これに対して、本発明の生体物質構造体では、生体物質構造体に導入された生体物質の反応性を保つことができる。また、生体物質構造体中の生体物質の比率を高めることにより、生体物質構造体の単位体積における生体物質と特異的に相互作用する対象物質の量を高めることが可能である。さらに、生体物質構造体中に占める生体物質の比率を高めるこ

10

20

30

40

50

とにより、結合用化合物の比率を低く抑えることが可能であるため、結合用化合物に基づく非特異吸着を抑制することができる。これらにより、従来よりも、非特異吸着が抑制でき、さらに生体物質構造体が特定孔を有することにより、分離精製にかかる所要時間を短縮することが可能となる。

【0241】

また、本発明の生体物質構造体は、任意の固相単体の表面に形成することができ、近年盛んに研究が進められているマイクロチップおよびマイクロ流路等への応用が可能である。したがって、広範な用途へ適用しうることも、本発明の生体物質構造体を用いた場合の利点の一つである。

【0242】

[IV-6. 実施形態]

以下、生体物質構造体を用いて、試料液から対象物質を分離する実施形態について説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0243】

[IV-6-1. 第1実施形態]

本実施形態は、液中に、対象物質（分離対象物質）と、その他の物質とが共存する試料液から、対象物質を分離精製するものである。

また、図8は、本実施形態に用いるアフィニティークロマトグラフィー用容器を模式的に示す断面図である。

【0244】

この実施形態においては、図8に示すような、容器本体1内に生体物質構造体2を保持したアフィニティークロマトグラフィー用容器（以下適宜、「アフィニティー用容器」という）3を用いる。ここで、容器本体1の形状に制限は無く、試料液等の流体を収納するものであれば任意である。

【0245】

また、本実施形態のアフィニティー用容器3では、容器本体1の内部表面に生体物質構造体2を固定してあり、これにより、容器本体1の外部に生体物質構造体2が出ないように、容器本体1内に保持されている。ただし、生体物質構造体2は容器本体1に固定せず、単に容器本体1内に収納するのみであっても構わない。

さらに、本実施形態に用いる生体物質構造体2の生体物質と、精製の対象である対象物質とは、特異的に相互作用することにより、対象物質は生体物質に特異的に吸着できるようになっているものとする。

【0246】

このアフィニティー用容器3を用いて試料液から対象物質を分離する場合、まず、アフィニティー容器3内に試料液を注入する。これにより、生体物質構造体2が試料液と接触し、生体物質に対象物質が吸着する。

次に、試料液と生体物質構造体2とを分離すべく、試料液をアフィニティー用容器3の外へ排出する。これにより、試料液内に含まれていた対象物質以外の成分は排出される。一方、対象物質は生体物質構造体2の生体物質に吸着することにより、アフィニティー用容器3内に保持される。

そして、例えば対象物質と生体物質との相互作用を弱めうる所定のpHに調整した回収用溶液をアフィニティー用容器3に注入することなどにより対象物質を生体物質構造体2から遊離させ、遊離した対象物質を上記の回収用溶液と共に回収する。

【0247】

以上のようにすれば、試料液中の対象物質を分離精製することができる。また、この際、生体物質として対象物質と特異的に相互作用するものを用いており、しかも、本発明の生体物質構造体は活性を保った生体物質を非常に多量に含有するものであるために、非特異的吸着を抑制して、高効率な分離精製を容易に行なうことが可能である。

【0248】

さらに、これを利用して、ある所定の相互作用を上記の生体物質との間に生じさせる作

10

20

30

40

50

用物質が不明である場合に、どのような物質が上記生体物質と相互作用するかをスクリーニングする場合にも、本実施形態の技術を適用することができる。即ち、例えば、上記実施形態において、何らかの相互作用を生じせしめる物質を含有した試料液を用いるようにすれば、試料液中の他の物質とは分離精製して得られた物質（対象物質）は上記の相互作用を生じさせる作用物質であるから、上記のスクリーニングを適切に行なうことができる。

なお、本実施形態の構成において生体物質構造体 2 を容器本体 1 に固定していない場合には、試料液の排出前に遠心分離機を用いて生体物質構造体 2 を集めておくと、作業効率や回収効率が向上するため、好ましい。

【0249】

10

[IV-6-2. 第2実施形態]

本実施形態は、液中に対象物質（解析対象物質）を含有する試料液において、その対象物質を分離精製することにより、対象物質の解析を行なうものである。

なお、本実施形態も第1実施形態と同様に図8を用いて説明するが、本実施形態において、第1実施形態と同様の部位は、同様の符号を用いて示す。

【0250】

この実施形態において用いるアフィニティー用容器3は、生体物質構造体2が有する生体物質として、ある特定の構造（分子構造）を有する物質（作用物質）と特異的に相互作用することにより、当該物質を特異的に吸着させるものを用いているものとする。

また、これ以外の構成は、第1実施形態と同様である。

20

【0251】

このアフィニティー用容器3を用いて試料液中の対象物質の解析を行なう場合、第1実施形態と同様に、アフィニティー容器3内に試料液を注入して生体物質構造体と試料液とを接触させ、次いで、生体物質構造体2と試料液とを分離すべく試料液をアフィニティー用容器3の外へ排出する。これにより、対象物質が、生体物質と特異的に相互作用しうる特定の構造を有している場合には、対象物質は生体物質構造体2の生体物質に吸着されることにより、アフィニティー用容器3内に保持される。また、逆に、対象物質が上記の特定の構造を有していない場合には、対象物質は試料液とともにアフィニティー容器3の外に排出される。

【0252】

30

したがって、生体物質に対象物質が吸着しているか否か、即ち、アフィニティー用容器3内に対象物質が残留しているか否かを調べることにより、対象物質が上記の特定の構造を有しているか否かが判明する。

上記の生体物質に対象物質が吸着しているか否かという点を調べるには、具体的には、生体物質に吸着している対象物質の量を測定すればよい。例えば、第1実施形態と同様に、対象物質と生体物質との相互作用を弱めうる所定のpHに調製した回収用溶液をアフィニティー用容器3に注入することなどにより対象物質を生体物質構造体2から遊離させ、その回収用溶液を回収し、回収した回収用溶液中に含まれる対象物質の量を上述した測定法等により測定すればよい。

【0253】

40

以上のようにすれば、試料液中の対象物質が、少なくとも生体物質に対応した特定の構造を有しているか否か、という解析を行なうことが可能である。

さらに、これを利用して、生体物質と相互作用をするために作用物質が有しているべき分子構造を調べる場合にも、本実施形態の技術を適用することができる。即ち、例えば、生体物質と相互作用することにより、ある一群の物質（対象物質）が他の物質から分離された場合には、当該一群の物質が共通の分子構造を有していれば、その分子構造が生体物質との相互作用をするために作用物質が有しているべき分子構造であると推測することができる。

【0254】

また、本発明の生体物質構造体は、第1実施形態と同様に、非特異的吸着を抑制して高

50

効率的な分離精製を容易に行なうことが可能なものであるために、対象物質の解析を正確に且つ高感度に行なうことが可能である。

なお、本実施形態は、第1実施形態と同様に変形することも可能である。

【0255】

[IV-6-3. 第3実施形態]

本実施形態は、液中に、対象物質（精製対象物質）と、その他の物質とが共存する試料液から、対象物質を分離精製するものである。

また、図9は、本実施形態に用いるアフィニティークロマトグラフィー装置の概要を模式的に示す図である。

【0256】

この実施形態においては、図9に示すようなアフィニティークロマトグラフィー装置（以下適宜、「アフィニティークロマト装置」という）10を用いる。このアフィニティークロマト装置10は、タンク11と、ポンプ12と、オートインジェクタ13と、生体物質担持体であるアフィニティー分離用チップ14と、流路切替弁15と、回収瓶16, 17と、制御部18とを備えている。

【0257】

タンク11は、移動相となるキャリア液を貯蔵してあるものである。

また、ポンプ12は、制御部18の制御にしたがって、タンク11に貯蔵されたキャリア液を所定の流速で流すためのものである。

さらに、オートインジェクタ13は、制御部18の制御にしたがって、試料液をキャリア液の流れに注入するものである。

したがって、タンク11に貯蔵されたキャリア液は、ポンプ12によってオートインジェクタ13を経てアフィニティー分離用チップ14へと所定の速度で供給され、また、このキャリア液には、オートインジェクタ13によって試料液が注入されるようになっている。よって、タンク11、ポンプ12及びオートインジェクタ13によって、試料液をアフィニティー分離用チップ14の流路14Bに流通させる試料液供給部19が構成されていることになる。

【0258】

また、アフィニティー分離用チップ14は、基板14Aに流路14Bが形成されたものであり、この流路14Bには、生体物質構造体（図示省略）が充填されている。ここで、本実施形態で用いる生体物質構造体の生体物質と、精製の対象である対象物質とは、特異的に相互作用することにより、流路14Bを流通する対象物質のリテンションタイムを変化しているものとする。なお、流路14Bの下流端部には生体物質構造体の流出を防止するためのフィルタ（図示省略）が形成されていて、これにより、生体物質構造体は流路14B内に確実に保持されるようになっている。

【0259】

したがって、供給されたキャリア液（試料液を注入されたものを含む）は、生体物質構造体が充填された流路14Bを流通するようになっている。また、この流路14Bから溶出したキャリア液（以下適宜、流路14Bから流出する液体は「溶出液」という）は、下流の流路切替弁15へと送られるようになっている。

【0260】

ところで、本実施形態では、アフィニティー分離用チップ14はアフィニティークロマト装置10に対して着脱可能になっているものとする。具体的には、アフィニティークロマト装置10がアフィニティー分離用チップ14を装着するチップ装着部14Cを備えていて、使用時にはチップ装着部14Cにアフィニティー分離用チップ14を装着して、分離を行なうようになっている。

【0261】

流路切替弁15は、制御部18の制御にしたがって流路を切り替えて、アフィニティー分離用チップ14から送られてきた溶出液を、回収瓶16及び回収瓶17のいずれに回収させるか切り替えるものである。したがって、アフィニティー分離用チップ14の流路1

10

20

30

40

50

4 Bからの溶出液は、流路切替弁15により分画されて、回収瓶16, 17のいずれかに回収されるようになっている。

また、本実施形態では、対象物質を含むキャリア液は回収瓶16に回収し、含まないキャリア液は回収瓶17に回収されるようになっているものとする。

【0262】

また、制御部18は、ポンプ12、オートインジェクタ13及び流路切替弁15の制御を行なうものであり、本実施形態においては、コンピュータに制御用のプログラムを読み込ませて構成されている。

さらに、この制御部18には、本実施形態で用いた生体物質構造体が有する生体物質と対象物質との相互作用によるリテンションタイムの情報が記録されていて、この情報に基づいて、オートインジェクタ13から試料液を注入した後の、供給したキャリア液の量や、経過した時間などに応じて、流路切替弁15の切替時機を制御するようになっている。

なお、図9において、制御部18による制御は、一点鎖線の矢印で示す。

【0263】

このアフィニティークロマト装置10を用いて試料液から対象物質を分離する場合、まず、チップ装着部14Cにアフィニティー分離用チップ14を装着し、そして、制御部18がポンプ12を稼働させる。ただし、流路切替弁15は、当初は溶出液を回収瓶17に回収するように切り替えてあるものとする。この場合、タンク11内のキャリア液は下流に向けて流れ出し、オートインジェクタ13、アフィニティー分離用チップ14の流路14B、及び、流路切替弁15を通り、回収瓶17に回収される。

その後、制御部18は、オートインジェクタ13を制御して、オートインジェクタ13に試料液をキャリア液中に注入させる。また、制御部18は、注入と同時に時間のカウントを開始する。

【0264】

注入された試料液は、流路14Bに流入し、流路14Bを流通する。この際、試料液は、流路14B内の生体物質構造体と接触し、生体物質と対象物質とが相互作用して、対象物質の流通速度が低下する。したがって、試料液中の対象物質以外の成分はキャリア液と共にそのまま流路14Bを流通するが、対象物質は相互作用によるリテンションタイムの変化分だけ遅れて流路14Bから流出する。このため、流路14Bから流出する溶出液のうち、対象物質以外の成分が流路切替弁15を通過する時刻よりも後の、対象物質のリテンションタイムに対応した分画には、キャリア液と、対象物質とが含まれ、分離の対象としないその他の成分は含まれない。

【0265】

そこで、制御部18は、カウントしている時間によって、対象物質以外の成分が流路切替弁15を通過する時刻よりも上記の相互作用によるリテンションタイムの変化分だけ後に、流路切替弁15を切り替えて対象物質を含有する分画を回収瓶16に回収するようにする。

【0266】

その後、連続して分離精製を行なう場合には、制御部18は、対象物質を含有しない溶出液の分画を回収瓶17に回収させるように流路切替弁15を再度切り替え、上記と同様の操作を行なう。また、分離精製を停止する場合には、制御部18はポンプ12を停止させ、キャリア液の供給を止める。

【0267】

以上のようにすれば、試料液中の対象物質を分離精製することができる。また、この際、生体物質として対象物質と特異的に相互作用するものを用いており、しかも、本発明の生体物質構造体は活性を保った生体物質を非常に多量に含有するものであるために、非特異的相互作用を抑制して、高効率な分離精製を容易に行なうことが可能である。

【0268】

さらに、これを利用して、第1実施形態と同様に、ある所定の相互作用を上記の生体物質との間に生じさせる作用物質が不明である場合に、どのような物質が上記生体物質と相

10

20

30

40

50

相互作用するかをスクリーニングすることもできる。

なお、本実施形態の構成においても、第1実施形態のようにアフィニティー分離用チップ14に生体物質構造体を固定するようにしてもよい。

【0269】

また、上記のアフィニティークロマト装置10においては、アフィニティー分離用チップ14をアフィニティークロマト装置10に対して着脱可能に構成したが、適宜、アフィニティー分離用チップ14をアフィニティークロマト装置10と一体に組み込んで構成するようにしてもよい。

【0270】

[IV-6-4. 第4実施形態]

本実施形態は、液中に対象物質（解析対象物質）を含有する試料液において、その対象物質を分離精製することにより、対象物質の解析を行なうものである。

また、図10は、本実施形態に用いるアフィニティークロマトグラフィー装置の概要を模式的に示す図である。ただし、図10において、図9と同様の部位は、図9と同様の符号で示す。

【0271】

この実施形態においては、図10に示すようなアフィニティークロマト装置20を用いる。このアフィニティークロマト装置20は、タンク11と、ポンプ12と、オートインジェクタ13と、アフィニティー分離用チップ14と、制御部18と、測定部21とを備えている。

【0272】

試料液供給部19、即ち、タンク11、ポンプ12及びオートインジェクタ13は、それぞれ第3実施形態と同様である。

また、アフィニティー分離用チップ14は、生体物質構造体が有する生体物質として、ある特定の構造（分子構造）を有する物質（作用物質）と特異的に相互作用することにより、流路14Bを流通する対象物質のリテンションタイムを変化させるものを用いている以外は、第3実施形態と同様である。

さらに、制御部18は、本実施形態のアフィニティークロマト装置20が切替弁を有していないために、切替弁の制御を行なわない以外は、第3実施形態と同様である。

【0273】

さらに、アフィニティークロマト装置20は、アフィニティー分離用チップ14の下流に、流路14Bからの溶出液の分画中の対象物質の量を測定する測定部21を備えている。具体的には、この測定部21は、溶出液中の対象物質の量を時間を追って測定することにより、各時刻において測定部21へ流入する溶出液をそれぞれ分画として、各分画に含まれる対象物質の量を測定するようになっている。なお、測定部21の具体例としては、上述したものと同様のものが挙げられる。

【0274】

このアフィニティークロマト装置20を用いて試料液中の対象物質の解析を行なう場合、第3実施形態と同様に、チップ装着部14Cにアフィニティー分離用チップ14を装着し、そして、制御部18がポンプ12を稼働させてタンク11内のキャリア液を流れさせる。この際、測定部21も、溶出液中の対象物質の測定を始める。

その後、制御部18は、第3実施形態と同様、オートインジェクタ13に試料液をキャリア液中へ注入させる。注入された試料液は、キャリア液と共に流路14Bに流入し、流路14Bを流通する。この際、試料液は、流路14B内の生体物質構造体と接触する。

そして、流路14Bから流出する溶出液は、測定部21に流入する。そして、測定部21において、溶出液の各時刻の分画に含まれる対象物質の量が測定される。

【0275】

ここで、生体物質構造体と試料液とが接触した場合、対象物質が上記の特定の構造を有していれば、流路14B内において対象物質のリテンションタイムは変化し、これに伴い、流路14Bから対象物質が流出する時刻は遅れることになる。一方、対象物質が上記の

10

20

30

40

50

特定の構造を有していなければ、対象物質のリテンションタイムは変化しない。

【0276】

したがって、溶出液の分画のうち、どの分画で対象物質がどれだけの量だけ検出されたかによって、対象物質が特定の構造を有しているか否か、及び、その量がどれだけあるかを解析することができる。

即ち、リテンションタイムに変化が生じない場合に観測されるべき時刻の分画において対象物質が測定されれば、対象物質は上記の特定の構造を有していないものと判定することができる。

【0277】

また、リテンションタイムに変化が生じない場合に観測されるべき時刻よりも後の分画において対象物質が測定されれば、対象物質は上記の特定の構造を有しているものと判定することができる。さらに、リテンションタイムの変化がどれだけ大きかったか（即ち、どれだけ後になって測定されたか）を測定することにより、上記の相互作用の大きさを感知し、対象物質が有する上記の特定の構造の数も解析可能である。これに加えて、対象物質が2以上の種類のものを含む場合、分画毎に含まれる対象物質の量を測定すれば、どの対象物質がどれだけの特定の構造を有しているかを判定することも可能となる。

【0278】

以上のように、本実施形態のアフィニティークロマト装置20によれば、試料液中の対象物質が、生体物質に対応した特定の構造を有しているか否か、という解析を行なうことが可能である。また、本発明の生体物質構造体は、第3実施形態と同様に、非特異的相互作用を抑制して高効率な分離精製を容易に行なうことが可能なものであるために、対象物質の解析を正確に且つ高感度に行なうことが可能である。

さらに、これを利用して、第2実施形態と同様に、生体物質と相互作用をするために作用物質が有しているべき分子構造を調べることも可能である。

【0279】

また、上記の測定部21の測定結果を、上記の解析を行なう解析部に出力し、当該解析部において対象物質の解析を行なわせることも可能である。例えば、測定部21から出力された測定結果を解析部が読み込み、解析部が、上述したような、リテンションタイムに変化が生じない場合に観測されるべき時刻の分画において対象物質が測定されたか否かによって対象物質が特定の構造を有しているか否か判定するように構成することが可能である。ただし、この場合、解析部には生体物質構造体の種類、それに対応した特定の構造、並びに判定に用いるリテンションタイムの情報などを記憶した記憶部を設けることが好ましい。なお、解析部は、ハードウェアとしては、例えば、コンピュータに当該コンピュータを解析部として機能させるプログラムを読み込ませることなどによって構成することができる。

なお、本実施形態は、第3実施形態と同様に変形することも可能である。

【実施例】

【0280】

以下、実施例を示して本発明について具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、任意に変形して実施することができる。

【0281】

[実施例1：アルブミンを用いた生体物質構造体]

(1) 結合用化合物(ポリマーA)の合成

モノマーであるN-アクリロイルモルホリン(NAM、KOHJIN社製)2.82重量部及びN-アクリロイルオキシスクシンイミド(ACROS ORGANICS社製N-ACRYLOXY SUCCINIMIDE(NAS))0.84重量部と、溶媒である脱水ジオキサン(和光純薬工業株式会社製)20.87重量部とをよく混合し、50mLの四つ口フラスコにそそぎ入れ、室温で30分間窒素にて脱気を行ない、モノマー溶液を調製した。

10

20

30

40

50

## 【0282】

このモノマー溶液をオイルバスにて70 に昇温し、重合開始剤アゾビスイソブチロニトリル(AIBN、キシダ化学株式会社製)0.0124重量部を脱水ジオキサン0.50重量部に溶かした溶液を入れることにより、重合を開始した。重合は窒素雰囲気下、8時間行なった。

重合後、ポリマーが生成した溶液は、0.5Lのエタノール(純正化学株式会社製)に滴下することにより再沈殿させた後、溶媒を除去することにより粉末化し、結合用化合物ポリマーAを得た。

## 【0283】

得られたポリマーAについて、標準ポリスチレンで校正されたSEC(Size Exclusion Chromatography)測定を行なった結果、ポリマーAの重量平均分子量(Mw)が約59500と見積もられた。

また、得られたポリマーAに含まれるNASとNAMとのモル比(NAS/NAM)は、<sup>1</sup>H-NMR測定からNAS/NAM=23/77と見積もられた。

## 【0284】

## (2) 金チップ表面への生体物質構造体の形成

## (2-1) 金チップの表面処理

大きさが縦2.5cm×横2.5cm×厚さ1.2mmの平板状樹脂製の基板表面に厚さ約80nmで金を蒸着したチップを、10mMの16-メルカプトヘキサデカン酸(16-MERCAPTOHEXADECANOIC ACID:ALDRICH社製)エタノール溶液に浸漬させ、室温で12時間反応させ、表面処理を行なった。反応終了後、金チップをエタノールで洗浄した。この表面処理は、金-硫黄結合を介して金チップの表面にカルボキシル基を導入するための処理である。

## 【0285】

次に、0.1MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS、和光純薬工業社製)水溶液1mLと0.4Mの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC、同仁化学研究所製)水溶液1mLとを混合し、さらに脱塩水18gで希釈した溶液に、上記のカルボキシル基を導入した基板(金チップ)を浸漬させ、15分間反応させた。これは、基板表面に、基板と生体物質構造体とを結合させることができるスクシンイミド基を導入するためである。

## 【0286】

## (2-2) 生体物質構造体の形成

次に47.4mg/mLのアルブミン(SIGMA社製)および47.6mg/mLのポリエチレングリコール600(和光純薬工業株式会社製;以下適宜「PEG」という)を含む水溶液(炭酸バッファー110mM、pH9.4)とポリマーAとを重量混合比10:1(生体物質:結合用化合物)で混合した混合物を、金チップの表面に5μLスポットティングした。これを室温にて乾燥した後、未反応の活性エステル基をブロックする目的で、1Mのエタノールアミン-HCl水溶液(pH8.5)3mLに30分間浸漬した。これにより、金チップの表面にアルブミンとポリマーAとポリエチレングリコール600とをそれぞれ生体物質及び結合用化合物及び非結合物質とする生体物質構造体が形成された。

その後、金チップを、ポリエチレングリコールを除去する目的で脱塩水を用いてよく洗浄し、室温で乾燥して、表面に生体物質構造体を担持した生体物質構造体金チップを得た。

## 【0287】

## (3) 生体物質構造体の構造の観察

このチップの表面をAFM(原子間力顕微鏡、Digital Instruments社製Nanoscope IIIa Multimode)によって観察した。10μm×10μm視野での観察結果を表わす図面代用写真を図11に示す。図11から分かるように、チップ表面に、直径約1μmの孔が確認された。また、より高倍率視野(500



nm × 500 nm 視野)における観察結果を表わす図面代用写真を図12に示す。この図12において、より小さな空間が観察され、粒子状塊の形成が示唆された。

【0288】

[実施例2：ストレプトアビジンを用いた生体物質構造体]

(1) 96ウェルプレート表面への生体物質構造体の形成

(1-1) 96ウェルプレートの表面処理

0.1MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS、和光純薬工業社製)水溶液1mLと0.4Mの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC、同仁化学研究所製)水溶液1mLとを混合し、さらに脱塩水18gで希釈した溶液を、カルボキシル基が導入された96ウェルプレート(スミロン(登録商標)ELISA製品・カルボタイプ、住友ベークライト社製)に300μL/well添加し、15分間反応させた。これは、ウェル内の表面に、ウェルと生体物質構造体とを結合させることができるスクシンイミド基を導入するためである。

10

【0289】

(1-2) 生体物質構造体の形成

次に30mg/mLのストレプトアビジン(SIGMA社製)及び30mg/mLのポリエチレングリコール600を含む水溶液(炭酸バッファー11mM、pH9.4)とポリマーAとを重量混合比10:1(生体物質:結合用化合物)で混合した混合物を、96ウェルプレートのウェル内に5μLスポッティングした。これを室温にて乾燥した後、未反応の活性エステル基をブロックする目的で、1ウェル内に1Mのエタノールアミン-HCl水溶液(pH8.5)300μLを室温して30分浸漬した。これにより、プレートのウェル表面にストレプトアビジンとポリマーAとポリエチレングリコール600とをそれぞれ生体物質及び結合用化合物及び非結合物質とする生体物質構造体が形成された。

20

その後、ウェル内を、ポリエチレングリコール600を除去する目的で脱塩水を用いてよく洗浄し、室温で乾燥して、表面に生体物質構造体を担持した生体物質構造体プレートを得た。

【0290】

(2) ELISA法による評価

上記サンプルの性能をELISAで分析した。上記の生体物質構造体プレートを1重量%BSAを含むPBS(-)200μL/ウェルにて37℃で1時間ブロックした。溶液を除去し、室温で1μg/mLのピオチン化西洋わさびペルオキシダーゼ(PIERCER社製)および1%BSAを含むPBS(-)を100μLずつウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。溶液を除去した後、0.05%Tween20を含むPBS(-)を用いて十分に洗浄を行なった。0.4mg/mLオルトフェニレンジアミン(OPD、Sigma社製)および約0.014%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を添加して室温にて反応させ、発色を行なった。5分あるいは30分後1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を添加して反応を止め、さらに0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液で2倍希釈した後に、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行なった。

30

結果を図13に示す。図13において、本実施例は、比較例2及び3(後述する)と比較してより高い吸光度(OD)を示した。このことから、生体物質構造体中に孔を形成することで、基質もしくは生成物の拡散がよりスムーズになり、酵素反応がより起りやすくなったと推察され、本法が有効であることが示唆された。

40

【0291】

[比較例1]

金で被覆されたチップの表面に、実施例1の「(2-1)金チップの表面処理」と同様にしてスクシンイミド基を導入した。

次に50.4mg/mLのアルブミン(SIGMA社製)水溶液(炭酸バッファー110mM、pH9.4)とポリマーAとを重量混合比10:1(生体物質:結合用化合物)で混合した混合物を、金チップの表面に5μLスポッティングした。これを室温にて乾燥

50

した後、未反応の活性エステル基をブロッキングする目的で、1 Mのエタノールアミン - HCl 水溶液 (pH 8.5) 3 mL に 15 分間浸漬した。これにより、金チップの表面にアルブミンとポリマー A とをそれぞれ生体物質及び結合用化合物とする生体物質構造体が形成された。

#### 【0292】

その後、金チップを、脱塩水でよく洗浄し、室温で乾燥して、表面に生体物質構造体を担持した生体物質構造体金チップを得た。

実施例 1 と同様にして、上記金チップの AFM 表面観察を行なった。10  $\mu$ m  $\times$  10  $\mu$ m での観察結果を表わす図面代用写真を図 14 に示し、500 nm  $\times$  500 nm 視野での観察結果を表わす図面代用写真を図 15 に示す。図 15 から分かるように、本比較例で作製した生体物質構造体は空間は有しているものの、図 14 に示すように、特定孔は形成されていない。

10

#### 【0293】

##### [比較例 2]

96 ウェルプレートのウェル内の表面に、実施例 1 の「(2-1) プレートの表面処理」と同様にしてスクシンイミド基を導入した。

次に 30 mg/mL のストレプトアビジン (PIERCE 社製) 水溶液 (炭酸バッファ 11 mM, pH 9.4) とポリマー A とを重量混合比 10 : 1 (生体物質 : 結合用化合物) で混合した混合物を、96 ウェルプレートの表面に 5  $\mu$ L スポットングした。これを室温にて乾燥した後、未反応の活性エステル基をブロッキングする目的で、1 Mのエタノールアミン - HCl 水溶液 (pH 8.5) 300  $\mu$ L / ウェルに 30 分間浸漬した。これにより、96 ウェルプレートのウェル表面にストレプトアビジンとポリマー A とをそれぞれ生体物質及び結合用化合物とする生体物質構造体が形成された。

20

#### 【0294】

その後、プレートのウェル内を、脱塩水でよく洗浄し、室温で乾燥して、表面に生体物質構造体を担持した生体物質構造体プレートを得た。

このプレートを用いて、実施例 2 の「(2) ELISA 法による評価」と同様にして、ELISA 分析を行なった。結果を図 13 に示す。

#### 【0295】

##### [比較例 3]

96 ウェルプレートのウェル内の表面に、実施例 1 の「(2-1) プレートの表面処理」と同様にしてスクシンイミド基を導入した。

次に、27.2 mg/mL のストレプトアビジン (PIERCE 社製) 水溶液 (炭酸バッファ 10 mM, pH 9.4) を、96 ウェルプレートの表面に 5  $\mu$ L スポットングした。これを室温にて乾燥した後、1 Mのエタノールアミン - HCl 水溶液 (pH 8.5) 300  $\mu$ L / ウェルに 30 分間浸漬した。これにより、96 ウェルプレートのウェル表面にストレプトアビジンを 2 次元的に固定化した。

30

#### 【0296】

その後、プレートのウェル内を、脱塩水でよく洗浄し、室温で乾燥して、表面に生体物質構造体を担持したプレートを得た。

このプレートを用いて、実施例 2 の「(2) ELISA 法による評価」と同様にして、ELISA 分析を行なった。結果を図 13 に示す。

40

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0297】

本発明は、産業上の広い範囲において用いることが可能である。具体的な用途に制限は無く、任意の用途に用いることができるが、通常は、生体物質と、その生体物質と特異的に相互作用する作用物質との「相互作用」を利用した用途に用いて好適である。

例えば、本発明は、生体物質間相互作用解析用センサーチップ、生体適合性が求められる医療材料の表面処理、バイオセンサー、診断デバイスなどに好適に用いられる。また、例えば、医療、診断、食品分析、生体分析などの分野に用いて好適である。具体例として

50

は、少量のサンプルで非特異的吸着を抑制したアフィニティー精製もしくは医薬作用等の解析ツールに用いることができる。さらに、例えば、生体物質担持体として、流路などの表面に生体物質構造体を形成したものを、この流路に分離精製したい混合溶液を流すことにより、自動化されたアフィニティー精製装置もしくは医薬作用等の解析装置を簡単に作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0298】

【図1】(a)～(c)はいずれも、固相担体に固定化した本発明の生体物質構造体の一例の表面近傍を拡大して示す模式図である。

【図2】(a), (b)は共に、本発明の一実施形態について説明するため、生体物質構造体の構造の例を模式的に示す図である。 10

【図3】(a), (b)は共に、本発明の一実施形態について説明するための図で、(a)は生体物質及び結合用化合物を模式的に示す図、(b)は粒子状塊を模式的に示す図である。

【図4】固相担体に固定化した本発明の生体物質構造体の一例の表面近傍を拡大して示す模式図である。

【図5】本発明の生体物質構造体の製造方法の混合工程における、生体物質、結合用化合物及び非結合物質を共存させた混合物中の様子を模式的に表わす図である。

【図6】本発明の生体物質構造体の製造方法の濃縮工程又は乾燥工程後の生体物質構造体の様子を模式的に表わす図である。 20

【図7】本発明の生体物質構造体の製造方法の除去工程後の生体物質構造体の様子を模式的に表わす図である。

【図8】図8は、本発明の一実施形態としてのアフィニティークロマトグラフィー用容器を模式的に示す断面図である。

【図9】図9は、本発明の一実施形態としてのアフィニティークロマトグラフィー装置の概要を模式的に示す図である。

【図10】図10は、本発明の一実施形態としてのアフィニティークロマトグラフィー装置の概要を模式的に示す図である。

【図11】本発明の実施例1において生体物質構造体を観察した結果を表わす図面代用写真である。 30

【図12】本発明の実施例1において生体物質構造体を観察した結果を表わす図面代用写真である。

【図13】本発明の実施例2及び比較例2, 3におけるELISA分析の結果を表わすグラフである。

【図14】比較例1において生体物質構造体を観察した結果を表わす図面代用写真である。

【図15】比較例1において生体物質構造体を観察した結果を表わす図面代用写真である。

【符号の説明】

【0299】

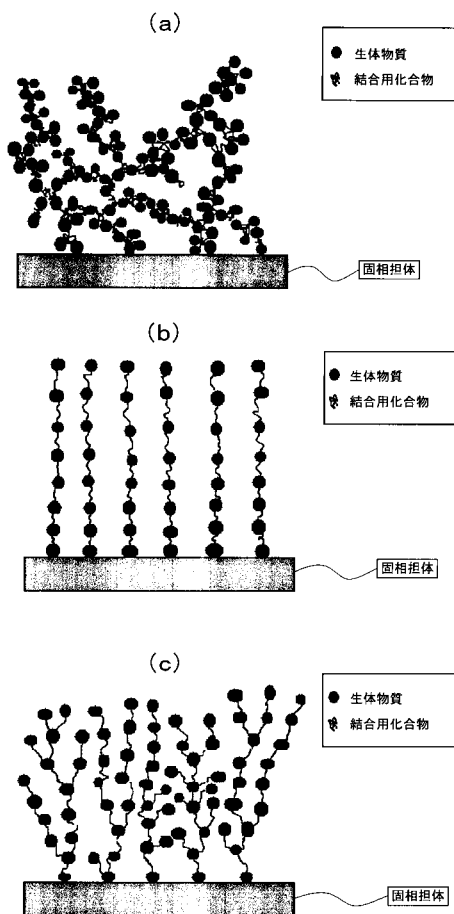
- 1 容器本体
- 2 生体物質構造体
- 3 アフィニティークロマトグラフィー用容器
- 10, 20 アフィニティークロマトグラフィー装置
- 11 タンク
- 12 ポンプ
- 13 オートインジェクタ
- 14 アフィニティー分離用チップ
- 14A 基板
- 14B 流路

40

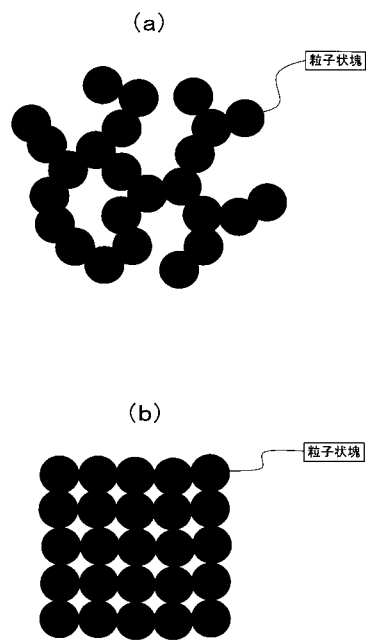
50

- 1 4 C チップ装着部
- 1 5 流路切替弁
- 1 6 , 1 7 回収瓶
- 1 8 制御部
- 1 9 試料液供給部
- 2 1 測定部

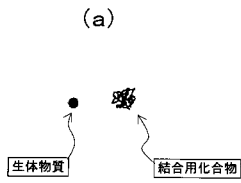
【 図 1 】



【 図 2 】



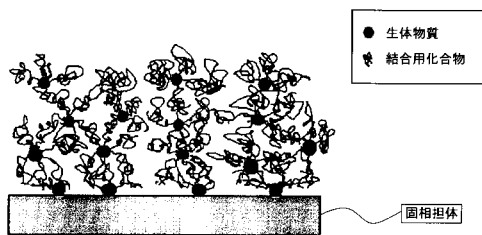
【 図 3 】



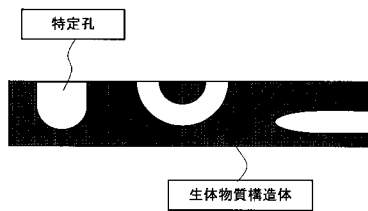
(b)



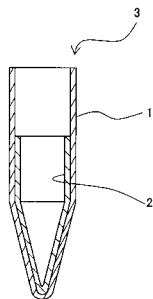
【 図 4 】



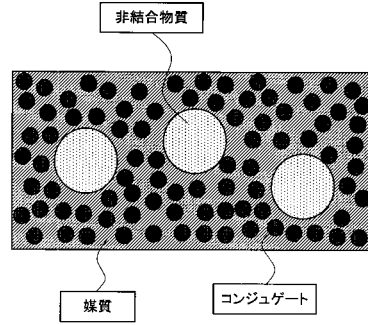
【 図 7 】



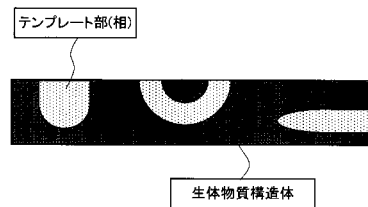
【 図 8 】



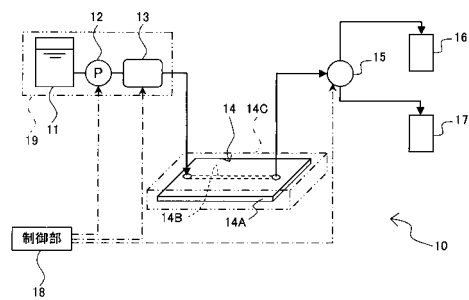
【 図 5 】



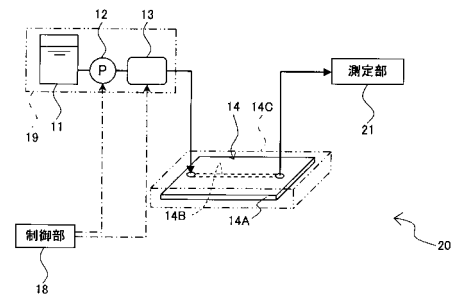
【 図 6 】



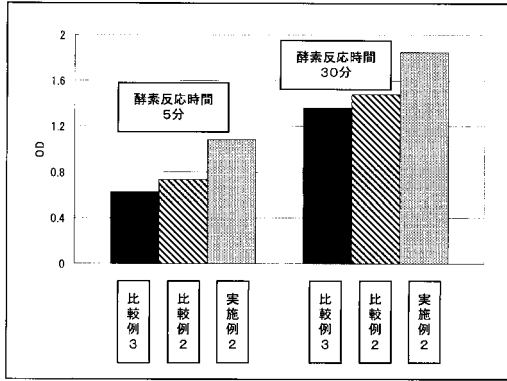
【 図 9 】



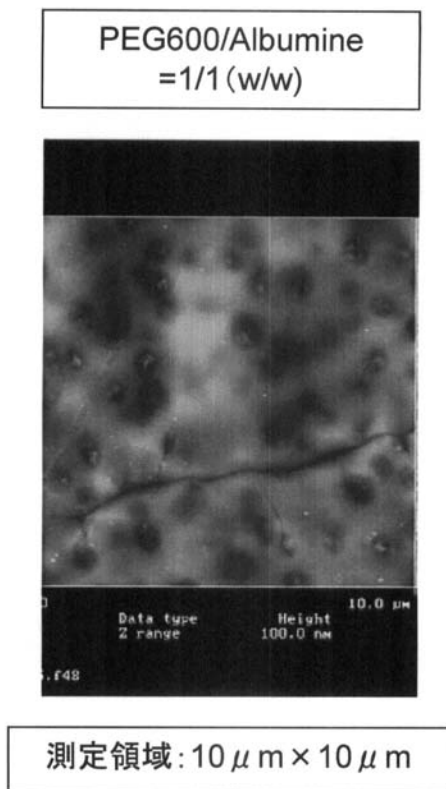
【 図 10 】



【 図 1 3 】

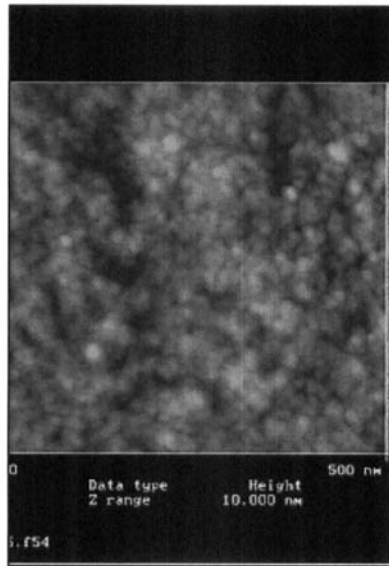


【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

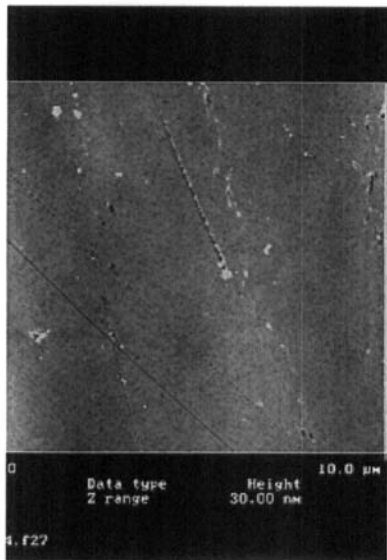
PEG600/Albumine  
=1/1 (w/w)



測定領域: 500nm × 500nm

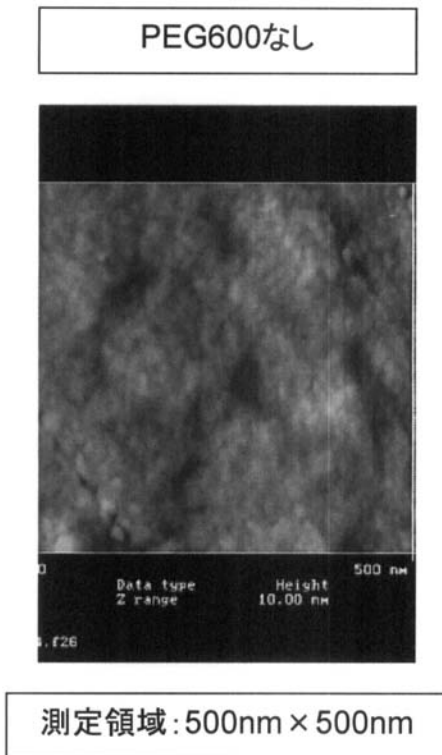
【 図 1 4 】

PEG600なし



測定領域: 10 μm × 10 μm

【 図 1 5 】





---

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 裕之  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 白谷 俊史  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 竹内 久雄  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA56 BA60 BA62 BA63 CA11 CA40  
EA50 EA61 EA65 FA65 FA80 FA81

- (54)【発明の名称】孔を有する生体物質構造体及びその製造方法、並びに、それを用いた生体物質担持体、対象物質の精製方法、アフィニティークロマトグラフィー用容器、分離用チップ、対象物質の解析方法、対象物質の解析用分離装置、及びセンサーチップ