

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5383115号
(P5383115)

(45) 発行日 平成26年1月8日 (2014.1.8)

(24) 登録日 平成25年10月11日 (2013.10.11)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/547 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/547

請求項の数 7 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2008-206243 (P2008-206243)	(73) 特許権者	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成20年8月8日 (2008.8.8)	(74) 代理人	100126240 弁理士 阿部 琢磨
(65) 公開番号	特開2009-69141 (P2009-69141A)	(74) 代理人	100124442 弁理士 黒岩 創吾
(43) 公開日	平成21年4月2日 (2009.4.2)	(72) 発明者	南 昌人 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ ヤノン株式会社内
審査請求日	平成23年8月5日 (2011.8.5)	(72) 発明者	藩 和宏 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ ヤノン株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2007-217580 (P2007-217580)	審査官	吉田 将志
(32) 優先日	平成19年8月23日 (2007.8.23)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 構造体、標的物質検出素子および標的物質検出キット

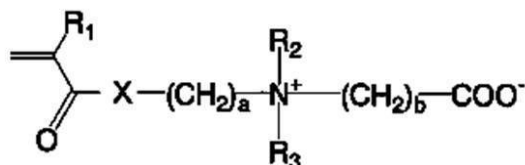
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基体と、該基体の表面に存在する重合体と、該重合体に結合する第一の標的物質捕捉体とを有し、前記重合体が、下記一般式 (1) で示されるカルボキシベタインモノマーの重合体からなり、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの一部に、前記第一の標的物質捕捉体が結合しており、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの前記第一の標的物質捕捉体が結合していないカルボキシル基の少なくとも一部に一般式 (2) に示される化合物が結合していることを特徴とする構造体。

【化 1】

一般式 (1)



(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i so-プロピル基のいずれかから選ばれる基である。X は酸

素原子もしくはNHである。aは1以上5以下の整数である。bは1以上4以下の整数である。)

【化2】

一般式(2)



10

(式中、nは1以上4以下の整数であり、且つn+bは2以上5以下の整数である。Yは、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ のうちのいずれかの基である。また、メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。)

【請求項2】

前記一般式(2)に記載の化合物が、アミノメタンスルホン酸、硫酸モノアミノエチルのいずれかであることを特徴とする請求項1に記載の構造体。

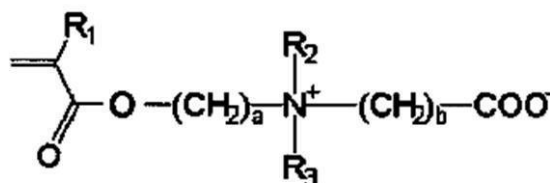
【請求項3】

前記一般式(1)に記載の化合物が、下記一般式(3)に記載の化合物であることを特徴とする請求項1または2に記載の構造体。

【化3】

20

一般式(3)



(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、n-プロピル基、iso-プロピル基のいずれかから選ばれる基である。aは1以上5以下の整数である。bは1以上4以下の整数である。)

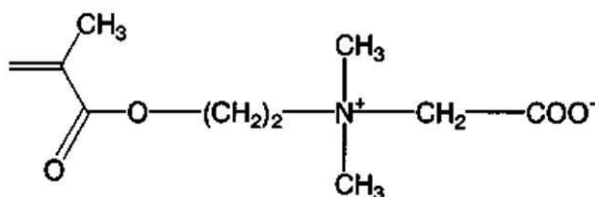
30

【請求項4】

前記一般式(1)に記載の化合物が、下記の化学式(A)に記載の化合物であり、前記一般式(2)に記載の化合物が、アミノメタンスルホン酸、硫酸モノアミノエチルのいずれかであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかに記載の構造体。

【化4】

化学式(A)



40

【請求項5】

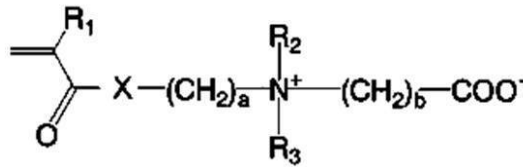
検出領域を有する基体と、該基体の表面に存在する重合体と、該重合体に結合する第一の標的物質捕捉体とを有し、前記重合体が、下記一般式(1)で示されるカルボキシペタインモノマーの重合体からなり、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの一部に、前記第一の標的物質捕捉体が結合しており、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの前

50

記第一の標的物質捕捉体が結合していないカルボキシル基の少なくとも一部に一般式(2)に示される化合物が結合していることを特徴とする標的物質検出素子。

【化5】

一般式(1)



10

(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i so-プロピル基のいずれかから選ばれる基である。 X は酸素原子もしくは NH である。 a は1以上5以下の整数である。 b は1以上4以下の整数である。)

【化6】

一般式(2)



20

(式中、 n は1以上4以下の整数であり、且つ $n + b$ は2以上5以下の整数である。 Y は、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ のうちのいずれかの基である。また、メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。)

【請求項6】

請求項5に記載の標的物質検出素子と、標識物質と第二の標的物質捕捉体とからなる標識材料と、からなることを特徴とする標的物質検出キット。

30

【請求項7】

前記検出領域が、磁性物質を検出することができる検出領域であり、前記標識物質が磁性物質であることを特徴とする請求項6に記載の標的物質検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的物質や夾雑物の非特異吸着を良好に防止することが可能であり、標的物質を高感度に検出する標的物質検出素子、標的物質検出キットおよび標的物質検出素子を構成するための構造体に関するものである。

【背景技術】

40

【0002】

従来から、検体中の標的物質を検出する手段として分子間の相互作用が用いられてきた。相互作用を用いた手段としては、一方の分子を捕捉体として基体表面上に固定し、標的物質を含む検体を接触させることによって反応を行わせる方法が一般的である。

【0003】

固定した捕捉体と相互作用する標的物質を定量的に測定するとき、基体表面の性質もしくは固定方法によっては、前記生体分子と相互作用した標的物質以外に、基体表面に非特異的に吸着した物質も同時に検出してしまう恐れがある。このことが、微量検出を必要とするセンサでは、最小検出感度を低下させる原因となる。そのため、非特異吸着を抑制しつつ、標的物質のみが検出される手法が必要とされている。

50

【 0 0 0 4 】

基体表面への非特異吸着を防止する技術として、非特許文献 1 には、シリコン表面において、MPC (2 - m e t h a c r y l o y l o x y e t h y l p h o s p h o r y l c h o l i n e) をモノマーとして原子移動ラジカル重合により基体表面に MPC ポリマーを高密度に形成し、タンパク質の非特異吸着および細胞の接着を防止する技術が開示されている。

【 0 0 0 5 】

一方、非特許文献 2 には、CBMA (c a r b o x y b e t a i n e m e t h a c r y l a t e) をモノマーとして原子移動ラジカル重合により SPR (S u r f a c e p l a s m o n r e s o n a n c e) センサ表面に CBMA ポリマーを高密度で形成した後、更に CBMA ポリマーの側鎖官能基であるカルボキシル基に標的物質捕捉体を固定し、夾雑物の非特異吸着を防止して標的物質を検出する技術が開示されている。

【非特許文献 1】“ B i o m a c r o m o l e c u l e s ” , 2 0 0 4 , 5 , 2 3 0 8 から 2 3 1 4 頁

【非特許文献 2】“ B i o m a c r o m o l e c u l e s ” , 2 0 0 6 , 7 , 3 3 1 1 から 3 3 1 5

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

しかしながら、非特許文献 1 で使用されている MPC ポリマーは標的物質捕捉体を固定できる構造ではなく、固定する工夫はなされていない。

また、非特許文献 2 においては、CBMA ポリマーに標的物質捕捉体を固定した後、活性エステル基 (スクシンイミド基) をエタノールアミンで失活させていることから、側鎖ベタイン構造のカルボキシル基のマイナス電荷が消失し、側鎖の電荷は中性からプラス電荷に偏ることになる。その結果、マイナス電荷を持つ夾雑物の非特異吸着が発生する可能性があり、更に固定化した標的物質捕捉体の機能が低下する恐れがある。

【 0 0 0 7 】

そこで、本発明は、標的物質や夾雑物の非特異吸着を良好に防止することが可能であり、標的物質を高感度に検出する標的物質検出素子、標的物質検出キットおよび標的物質検出素子を構成する構造体を提供する。

【課題を解決するための手段】

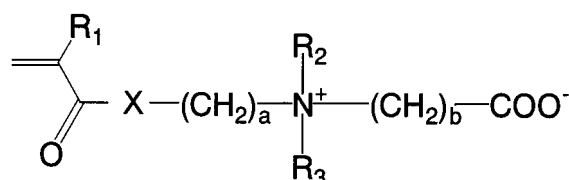
【 0 0 0 8 】

本発明の第一は、基体と、該基体の表面に存在する重合体と、該重合体に結合する第一の標的物質捕捉体とを有し、前記重合体が、下記一般式 (1) で示されるカルボキシベタインモノマーの重合体からなり、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの一部に、前記第一の標的物質捕捉体が結合しており、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの前記第一の標的物質捕捉体が結合していないカルボキシル基の少なくとも一部に一般式 (2) に示される化合物が結合していることを特徴とする構造体である。

【 0 0 0 9 】

【化 1】

一般式 (1)



10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i s o -プロピル基のいずれかから選ばれる基である。 X は酸素原子もしくは NH である。 a は1以上5以下の整数である。 b は1以上4以下の整数である。)

【 0 0 1 1 】

【化2】

一般式 (2)

10



【 0 0 1 2 】

(式中、 n は1以上4以下の整数であり、且つ $n + b$ は2以上5以下の整数である。 Y は、 $-OSO_3H$ 、 $-SO_3H$ のうちのいずれかの基である。また、メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。)

前記一般式 (2) に記載の化合物が、アミノメタンスルホン酸、硫酸モノアミノエチルのいずれかであることが好ましい。

20

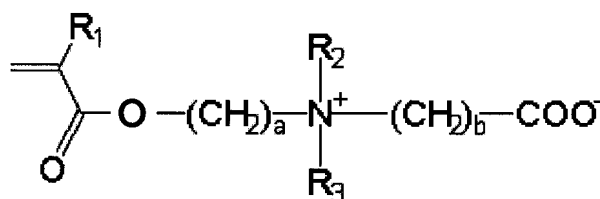
【 0 0 1 3 】

前記一般式 (1) に記載の化合物が、下記一般式 (3) に記載の化合物であることが好ましい。

【 0 0 1 4 】

【化3】

一般式 (3)



30

【 0 0 1 5 】

(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i s o -プロピル基のいずれかから選ばれる基である。 a は1以上5以下の整数である。 b は1以上4以下の整数である。)

【 0 0 1 6 】

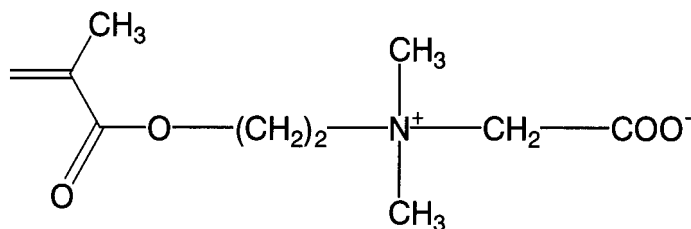
前記一般式 (1) に記載の化合物が、下記の化学式 (A) に記載の化合物であり、前記一般式 (2) に記載の化合物が、アミノメタンスルホン酸、硫酸モノアミノエチルのいずれかであることが好ましい。

40

【 0 0 1 7 】

【化 4】

化学式 (A)



10

【0018】

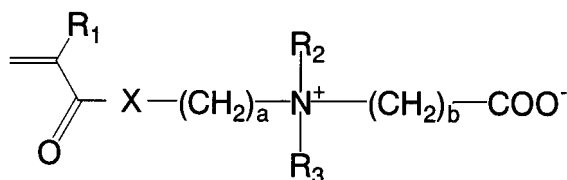
また、別の本発明は、検出領域を有する基体と、該基体の表面に存在する重合体と、該重合体に結合する第一の標的物質捕捉体とを有し、前記重合体が、下記一般式(1)で示されるカルボキシベタインモノマーの重合体からなり、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの一部に、前記第一の標的物質捕捉体が結合しており、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの前記第一の標的物質捕捉体が結合していないカルボキシル基の少なくとも一部に一般式(2)に示される化合物が結合していることを特徴とする標的物質検出素子である。

20

【0019】

【化 5】

一般式 (1)



30

【0020】

(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*iso*-プロピル基のいずれかから選ばれる基である。 X は酸素原子もしくは NH である。 a は 1 以上 5 以下の整数である。 b は 1 以上 4 以下の整数である。)

【0021】

【化 6】

40

一般式 (2)



【0022】

(式中、 n は 1 以上 4 以下の整数であり、且つ $n + b$ は 2 以上 5 以下の整数である。 Y は、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ のうちのいずれかの基である。また、メチレン基の水素原子

50

は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。)

【0023】

また、別の本発明は、前記の標的物質検出素子と、標識物質と第二の標的物質捕捉体とからなる標識材料と、からなることを特徴とする標的物質検出キットである。

【0024】

また、前記検出領域が、磁性物質を検出することができる検出領域であり、前記標識物質が磁性物質であることが好ましい。

【発明の効果】

【0025】

本発明は、標的物質や夾雑物の非特異吸着を良好に防止することが可能であり、標的物質を高感度に検出する標的物質検出素子、標的物質検出キットおよび標的物質検出素子を構成するための構造体を提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

まず、本発明の第一の構造体について図1を用いて説明する。

本発明の第一の構造体は、図1(A)に示すように、基体1と、基体表面に存在する重合体2と、重合体2に結合する第一の標的物質捕捉体(第一の捕捉分子)5と、保護分子4からなる。

以下、各部分について説明する。

【0027】

(基体)

基体1は、構造体の支持体として機能するものであり、かつ表面に重合体2を形成可能なものである。

【0028】

基体1の材質は、本発明の構造体の支持体として機能するものであれば、いかなる材質でもよいが、好ましくは、アミノ基もしくはチオール基が結合可能である金、銀、銅、白金、アルミニウム等の金属、CdS、ZnS等の半導体、酸化チタン、酸化アルミニウム等の金属酸化物、もしくは、シラノール基が結合可能なガラス、シリコン、酸化チタン、セラミック、もしくは、カルボキシル基が結合可能なセラミック、カーボンが好適である。酸素プラズマ処理、UV処理等により表面を酸化することによりカルボキシル基を提示することが可能なプラスチックでもよい。

【0029】

基体1の形状は、平板もしくは粒子、微小構造体などいかなる形状でもよい。また、基体1の形状は、平板、曲板、粒子、微小構造体、あるいはマイクロタイタープレートなどいかなる形状でもよい。

【0030】

(重合体)

重合体2は、一般式(1)で示されるカルボキシペタインモノマーの重合体からなる。

【0031】

一般式(1)で示されるカルボキシペタインモノマーの重合体は、一方の末端が基体1に固定されており、重合体の側鎖には生体分子の非特異吸着を防止する分子内塩構造(両性イオン)が存在する。即ち、一般式(1)のモノマーの重合体の側鎖はカルボキシペタイン構造、言い換えれば、一分子中に四級アンモニウムのカチオンとカルボキシル基のアニオンを有する分子内塩構造であり、このような分子内塩構造は、検体中の夾雑物等の非特異吸着を防止するのに優れた機能を有している。なお、以下の記載では、基体1の表面に高密度に形成された重合体2の膜を非特異吸着防止膜14と称する。

【0032】

10

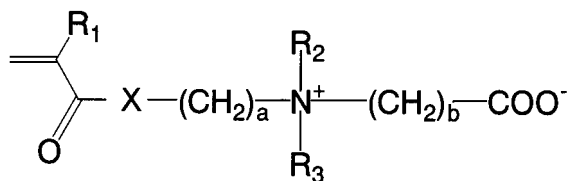
20

30

40

【化 7】

一般式 (1)



10

【0033】

(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、 n -プロピル基、*iso*-プロピル基のいずれかから選ばれる基である。 X は酸素原子もしくは NH である。 a は 1 以上 5 以下の整数である。 b は 1 以上 4 以下の整数である。)

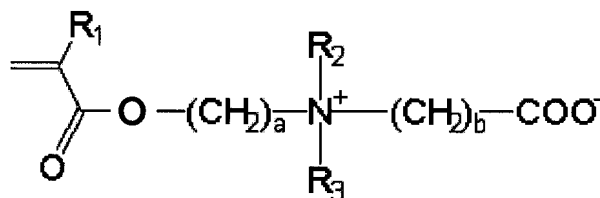
言い換えると、一般式 (1) に示される化合物は、下記一般式 (3) もしくは下記一般式 (4) に示される化合物である。

【0034】

【化 8】

20

一般式 (3)



【0035】

30

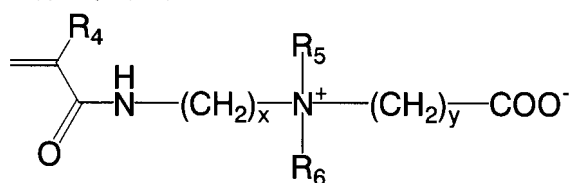
(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 、 R_3 はメチル基、エチル基、 n -プロピル基、*iso*-プロピル基のいずれかである。 a は 1 以上 5 以下の整数である。 b は 1 以上 4 以下の整数である。)

もしくは

【0036】

【化 9】

一般式 (4)



40

【0037】

(式中、 R_4 は水素原子又はメチル基である。 R_5 、 R_6 はメチル基、エチル基、 n -プロピル基、*iso*-プロピル基のいずれかである。 x は 1 以上 5 以下の整数である。 y は 1 以上 4 以下の整数である。)

【0038】

前記基体 1 上における重合体 2 の数平均分子量は 5000 以上 1000000 以下であ

50

り、好ましくは10000以上100000以下である。分子量分布は1以上2未満が好ましい。また、前記重合体の密度は0.1分子/nm²以上が好ましい。

【0039】

重合体2の一方の末端を基体1へ固定化する方法として、既に合成された重合体2を基体1の表面に接触させて固定させても良いが、好ましくは重合によって合成されるものであり、より好ましくは、重合がリビングラジカル重合であるものである。リビングラジカル重合については後に説明する。

【0040】

また、非特異吸着防止膜14に含まれるカルボキシル基3のうちの一部に第一の標的物質捕捉体5が固定されており、他のカルボキシル基3の少なくとも一部に一般式(2)で示される化合物が結合している。なお、図(B)には、重合体2が側鎖に有するカルボキシル基3に保護分子4が結合した状態を示している。なお、第一の標的物質捕捉体の固定方法、及び一般式(2)の化合物の固定方法については後に説明する。

【0041】

(リビングラジカル重合)

一般式(1)で示されるカルボキシベタインモノマーの合成に関しては、一般式(1)のbが1の場合、Gaofenzhi Cailiao Kexue Yungongcheng(2000), 16(6), 44から46.を参考にして合成することができる。即ち、(メタ)アクリル酸エステル又は(メタ)アクリルアミドをクロロ酢酸ナトリウムと反応させることによって、目的とするカルボキシベタインモノマーを得ることができる。

【0042】

一方、一般式(1)のbが2以上の場合、J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 1997, 35, 3527から3536を参考にして合成することができる。即ち、(メタ)アクリル酸エステル又は(メタ)アクリルアミドをラクトンと反応させることによって、目的とするカルボキシベタインモノマーを得ることができる。

【0043】

一般的に、リビングラジカル重合は、合成されるポリマーの分子量分布が狭く、かつ基体上に高密度にポリマー層をグラフト化できる。よって、本発明においては、一般式(1)又は(2)で示されるカルボキシベタインモノマーを重合すれば、基体上に高密度に重合体が形成されたからなる非特異吸着防止膜を設けることが可能であり、その非特異吸着防止膜が有するカルボキシル基の少なくとも一部に第一の標的物質捕捉体を固定することが可能である。リビングラジカル重合法としては、有機ハロゲン化物などを開始剤とし、遷移金属錯体を触媒とする原子移動ラジカル重合(Atom Transfer Radical Polymerization: ATRP)、ニトロキシド化合物などのラジカル捕捉剤を用いるニトロキシド媒介重合(Nitroxide Mediated Polymerization: NMP)や、ジチオカルバメイトなどのラジカル捕捉剤を用いる光イニシエーター重合などが挙げられる。本発明においてはいずれの方法により前記構造体を製造してもよいが、制御の容易さなどから原子移動ラジカル重合を利用するのが好ましい。

【0044】

基体表面への重合体の形成方法を説明する。

(原子移動ラジカル重合)

リビングラジカル重合が原子移動ラジカル重合の場合、化学式1から3に示すような有機ハロゲン化物、又は化学式4に示すようなハロゲン化スルホニル化合物を重合開始剤として用いることができる。

【0045】

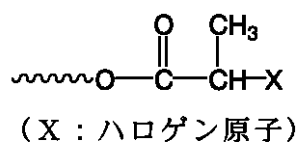
【化 10】

(化学式 1)

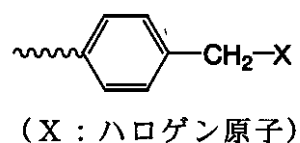


10

(化学式 2)

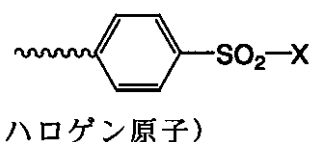


(化学式 3)



20

(化学式 4)



30

【0046】

原子移動ラジカル重合開始剤が導入された基体を反応溶媒に加えた後、重合することによって非特異吸着防止膜となる一般式(1)で示されるカルボキシベタインモノマー、遷移金属錯体を添加し、反応系を不活性ガスで置換して原子移動ラジカル重合を行う。これによって、グラフト密度を一定に保持しながら重合を進行させることができる。つまり、重合をリビング的に進行させ、全ての重合体を基体上にほぼ均等に成長させることができる。

【0047】

反応溶媒としては、特に限定されないが、例えば、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ピリジン、水、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、シクロヘキサノール、メチルセロソルブ、エチルセロソルブ、イソプロピルセロソルブ、ブチルセロソルブ、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン、シクロヘキサノン、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、トリオキサン、テトラヒドロフラン等を使用することができる。これらは単独で使用しても良いし、又は2種以上を併用しても良い。

40

【0048】

不活性ガスとして、窒素ガスやアルゴンガスを使用することができる。

使用する遷移金属錯体はハロゲン化金属とリガンドからなる。ハロゲン化金属の金属種としては、原子番号22番のTiから30番のZnまでの遷移金属が好ましく、特にFe、Co、Ni、Cuが好ましい。その中でも、塩化第一銅、臭化第一銅が好ましい。

50

【 0 0 4 9 】

リガンドとしては、ハロゲン化金属に配位可能であれば特に限定されないが、例えば、2, 2' - ビピリジル、4, 4' - ジ - (n - ヘプチル) - 2, 2' - ビピリジル、2 - (N - ペンチルイミノメチル) ピリジン、(-) - スパルテイン、トリス (2 - ジメチルアミノエチル) アミン、エチレンジアミン、ジメチルグリオキシム、1, 4, 8, 11 - テトラメチル - 1, 4, 8, 11 - テトラアザシクロテトラデカン、1, 10 - フェナントロリン、N, N, N', N', N' - ペンタメチルジエチレントリアミン、ヘキサメチル (2 - アミノエチル) アミン等を使用することができる。

【 0 0 5 0 】

遷移金属錯体の添加量は、非特異吸着防止膜となるカルボキシベタインモノマーに対して、0.001重量%から10重量%、好ましくは0.05重量%から5重量%である。

10

重合温度は、10 から100 の範囲であり、好ましくは20 から80 の範囲である。

【 0 0 5 1 】

また、重合を行う際、基体に固定されていないフリーな重合開始剤を添加しても良い。フリーな重合開始剤から生成するフリーポリマーは、基体にグラフト化された重合体の分子量及び分子量分布の指標とすることができる。

【 0 0 5 2 】

フリーな重合開始剤としては、基体に固定している原子移動ラジカル重合開始剤と同種のものを選択することが好ましい。したがって、化学式1 (X = Br) の重合開始剤に対しては、フリーな重合開始剤として2 - プロモイソ酪酸エチルを用いることが好ましい。また、化学式2 (X = Br) の重合開始剤に対しては、フリーな重合開始剤として2 - プロモプロピオン酸エチルを用いることが好ましい。

20

【 0 0 5 3 】

重合終了後、基体を前記した反応溶媒で十分に洗浄して、重合体がグラフト化し、非特異吸着防止膜が形成された基体を得ることができる。

【 0 0 5 4 】

(ニトロキシド媒介重合)

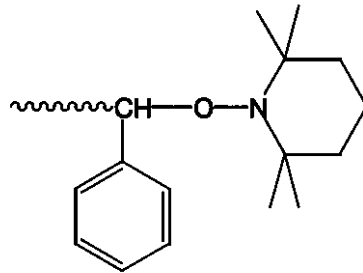
リビングラジカル重合がニトロキシド媒介重合である場合、化学式5から7に示すようなニトロキシド化合物を重合開始剤として用いることができる。

30

【 0 0 5 5 】

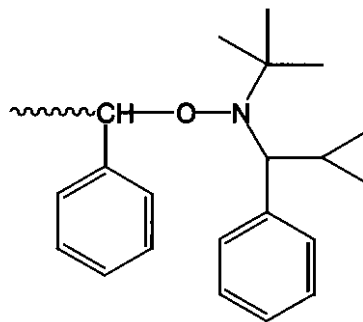
【化 1 1】

(化学式 5)



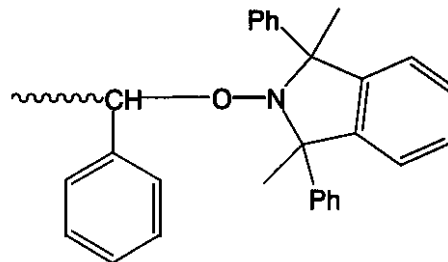
10

(化学式 6)



20

(化学式 7)



30

【0056】

ニトロキシド媒介重合開始剤が導入された基体を反応溶媒に加えた後、非特異吸着防止膜となる一般式(1)で示されるカルボキシベタインモノマーを添加し、反応系を不活性ガスで置換してニトロキシド媒介重合を行う。これによって、グラフト密度を一定に保持しながら重合を進行させることができる。つまり、重合をリビング的に進行させ、全ての重合体を基体上にほぼ均等に成長させることができる。

40

【0057】

反応溶媒としては特に限定されないが、前記した同様の溶媒を使用することができる。また、それらを単独で使用しても良いし、又は2種以上を併用しても良い。

不活性ガスとして、窒素ガスやアルゴンガスを使用することができる。

【0058】

重合温度は、10 から120 の範囲であり、好ましくは、20 から100 の範囲である。重合温度が10 未満では、形成される非特異吸着防止膜が低分子量であったり、あるいは重合が進行し難いので好ましくない。

【0059】

50

また、重合を行う際、基体に固定されていないフリーな重合開始剤を添加しても良い。フリーな重合開始剤から生成するフリーポリマーは、基体にグラフト化された重合体の分子量及び分子量分布の指標とすることができる。

【 0 0 6 0 】

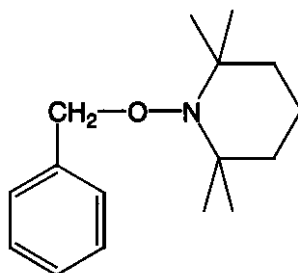
フリーな重合開始剤としては、基体に固定しているニトロキシド媒介重合開始剤と同種のものを選択することが好ましい。したがって、化学式 5 の重合開始剤に対しては、フリーな重合開始剤として化学式 8 に示されるニトロキシド化合物を用いることが好ましい。

【 0 0 6 1 】

【 化 1 2 】

10

(化学式 8)



20

【 0 0 6 2 】

重合終了後、基体を前記した反応溶媒で十分に洗浄して、重合体がグラフト化された基体を得ることができる。

【 0 0 6 3 】

(光イニシエーター重合)

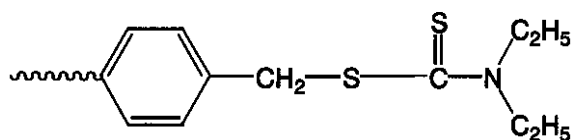
リビングラジカル重合が光イニシエーター重合である場合、化学式 9 に示すような N , N - ジチオカルバミン系化合物を重合開始剤として用いることができる。

【 0 0 6 4 】

【 化 1 3 】

30

(化学式 9)



40

【 0 0 6 5 】

光イニシエーター重合開始剤が導入された基体を反応溶媒に加えた後、非特異吸着防止膜となる一般式 (1) で示されるカルボキシベタインモノマーを添加し、反応系を不活性ガスで置換して光照射することによって光イニシエーター重合を行う。これによって、グラフト密度を一定に保持しながら重合を進行させることができる。つまり、重合をリビング的に進行させ、全ての重合体を基体上にほぼ均等に成長させることができる。

【 0 0 6 6 】

反応溶媒としては特に限定されないが、前記した同様の溶媒を使用することができる。また、それらを単独で使用しても良いし、又は 2 種以上を併用しても良い。

50

不活性ガスとして、窒素ガスやアルゴンガスを使用することができる。

【0067】

照射する光の波長は、使用する光イニシエーター重合開始剤の種類によって異なる。化学式9に例示する光イニシエーター重合開始剤を有する基体表面に重合体をグラフト化する場合、反応系に300nmから600nmの波長を示す光を照射することによって光イニシエーター重合が良好に進行する。

【0068】

重合温度は、副反応を抑制するため、室温あるいはそれ以下の温度であることが好ましい。但し、同様の効果が得られる範囲においてこの温度領域に限定されるわけではない。

また、重合を行う際、基体に固定されていないフリーな重合開始剤を添加しても良い。フリーな重合開始剤から生成するフリーポリマーは、基体にグラフト化された重合体の分子量及び分子量分布の指標とすることができる。

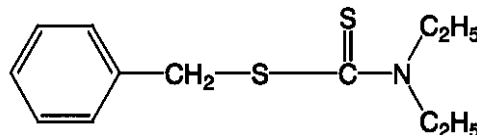
【0069】

フリーな重合開始剤としては、基体に固定している光イニシエーター重合開始剤と同種のものを選択することが好ましい。したがって、化学式9の重合開始剤に対しては、フリーな重合開始剤として化学式10に示されるジチオカルバメイト系化合物を用いることが好ましい。

【0070】

【化14】

(化学式10)



【0071】

重合終了後、基体を前記した反応溶媒で十分に洗浄して、重合体がグラフト化された基体を得ることができる。

基体表面に重合開始剤を固定する方法は特に限定されるものではないが、基体が金属であれば、チオール化合物を含む重合開始剤を基体表面に結合するか、又は、前記基体をチオール化合物で前処理した後、続いて重合開始剤を結合する方法が好ましい。

【0072】

基体が酸化膜を有する金属であれば、シランカップリング剤を含む重合開始剤を結合するか、又は、前記基体をシランカップリング剤で前処理した後、続いて重合開始剤を結合する方法が好ましい。

【0073】

基体がプラスチックであれば、酸素プラズマ処理、UV処理等により表面を酸化してカルボキシル基を発現させた後、アミノ化合物を含む重合開始剤を結合するか、又はアミノ化合物で前処理した後、続いて重合開始剤を結合する方法が好ましい。

【0074】

(第一の標的物質捕捉体)

標的物質捕捉体5は、標的物質と相互作用することにより捕捉、あるいは変換を行う分子である。このような標的物質捕捉体5としては、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質及びそれらの複合体などが挙げられる。より具体的には、DNA、RNA、アプタマー、遺伝子、染色体、細胞膜、ウイルス、抗原、抗体、抗体フラグメント、レクチン、ハプテン、ホルモン、レセプター、酵素、ペプチド、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴ脂質などが挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されるものではない。これらのうちでも、生体物質を捕捉、あるいは変換することができる抗体、抗体フラグメント、あるいは酵素であることが好ましい。

【 0 0 7 5 】

第一の標的物質捕捉体を基体 1 に固定する方法としては、重合体 2 が有する側鎖のカルボキシル基 3 の少なくとも一部に第一の標的物質捕捉体 5 を共有結合させる方法を使用することができる。

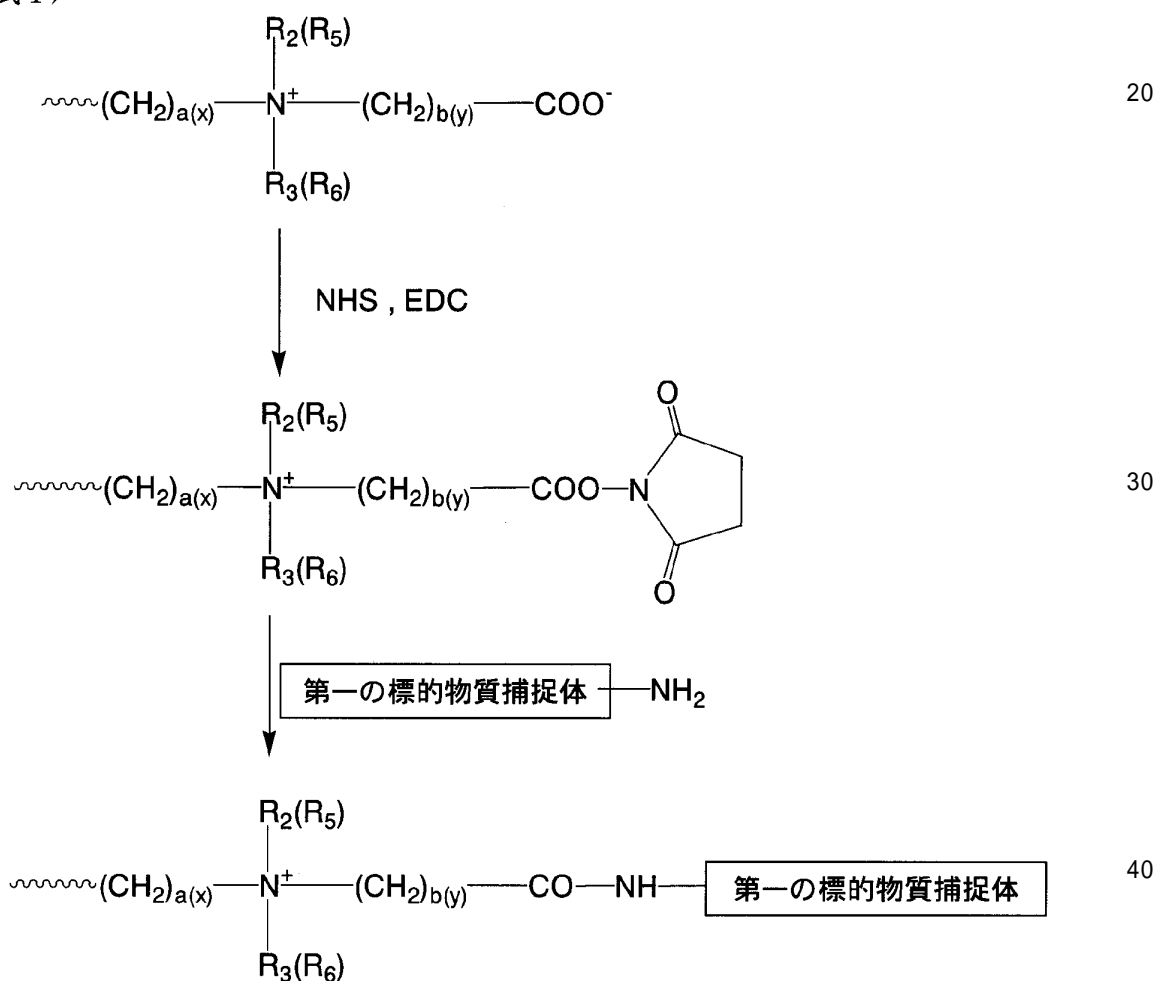
【 0 0 7 6 】

具体的には、反応式 1 に示すように、一般式 (1) のカルボキシペタインモノマーの重合体を形成した後に、側鎖のカルボキシル基に、N - ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) や 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 等を使用して、重合体が有する側鎖のカルボキシル基をスクシンイミド基に置換して活性エステル化する。このスクシンイミド基 (活性エステル基) に第一の標的物質捕捉体のアミノ基を反応させて、重合体の側鎖に第一の標的物質捕捉体を固定することができる。

【 0 0 7 7 】

【 化 1 5 】

(反応式 1)



【 0 0 7 8 】

(スクシンイミド基の失活)

次に、第一の標的物質捕捉体を重合体に固定した後で、重合体の未反応のスクシンイミド基 (活性エステル基) を、一般式 (2) の化合物 4 と反応させてスクシンイミド基 (活性エステル基) を失活させる。

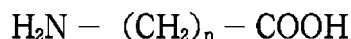
【 0 0 7 9 】

なお、一般式 (2) で示される化合物 4 は、言い換えると、以下の一般式 (5) ~ (9) のいずれかに示される化合物である。これらのうち、一般式 (5)、(8)、(9) で示される化合物は参考例である。

【 0 0 8 0 】

【 化 1 6 】

一般式 (5)



10

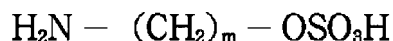
【 0 0 8 1 】

一般式 (5) の n は 1 以上 4 以下の整数であり、かつ一般式 (1) の b によって限定され、 $n + b$ は 2 以上 5 以下の整数である。メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。

【 0 0 8 2 】

【 化 1 7 】

一般式 (6)



20

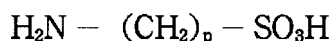
【 0 0 8 3 】

一般式 (6) の m は 1 以上 4 以下の整数であり、かつ一般式 (1) の b によって限定され、 $m + b$ は 2 以上 5 以下の整数である。メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い

【 0 0 8 4 】

【 化 1 8 】

一般式 (7)



30

【 0 0 8 5 】

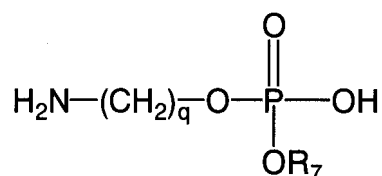
一般式 (7) の p は 1 以上 4 以下の整数であり、かつ一般式 (1) の b によって限定され、 $p + b$ は 2 以上 5 以下の整数である。メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。

40

【 0 0 8 6 】

【 化 1 9 】

一般式 (8)



50

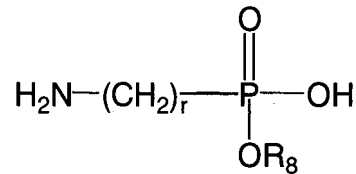
【 0 0 8 7 】

一般式 (8) の R_7 はメチル基又はエチル基である。一般式 (8) の q は 1 以上 4 以下の整数であり、かつ一般式 (1) の b によって限定され、 $q + b$ は 2 以上 5 以下の整数である。メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。

【 0 0 8 8 】

【 化 2 0 】

一般式 (9)



10

【 0 0 8 9 】

一般式 (9) の R_8 はメチル基又はエチル基である。一般式 (9) の r は 1 以上 4 以下の整数であり、かつ一般式 (1) の b によって限定され、 $r + b$ はいずれも 2 以上 5 以下の整数である。メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。

20

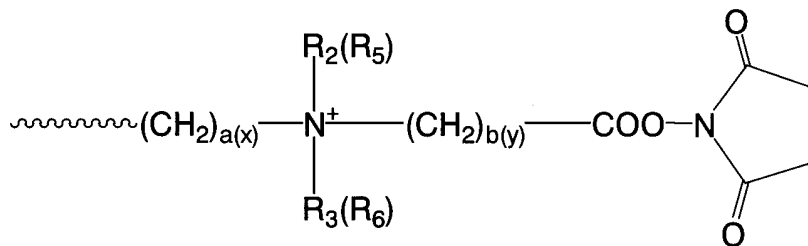
【 0 0 9 0 】

したがって、重合体の未反応のスクシンイミド基 (活性エステル基) は、反応式 2 ~ 6 の反応で、一般式 (5) ~ (9) の化合物と反応させてスクシンイミド基 (活性エステル基) を失活させることができる。

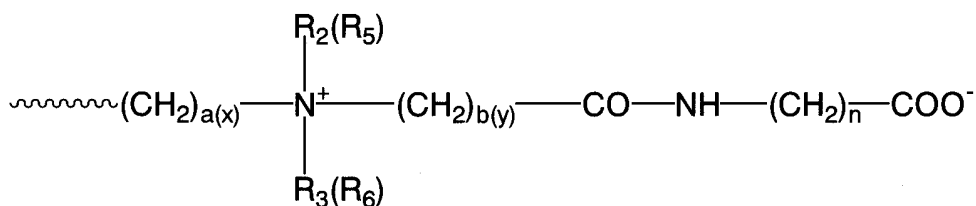
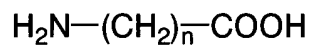
【 0 0 9 1 】

【 化 2 1 】

(反応式 2)



30



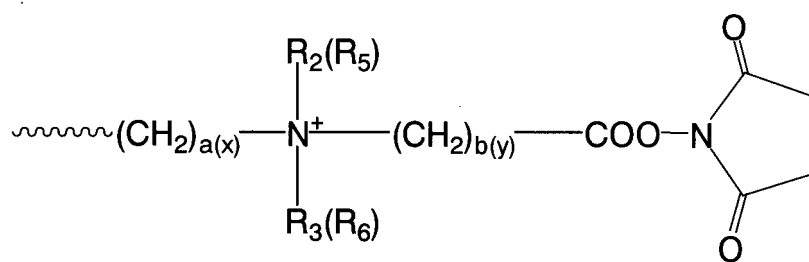
40

【 0 0 9 2 】

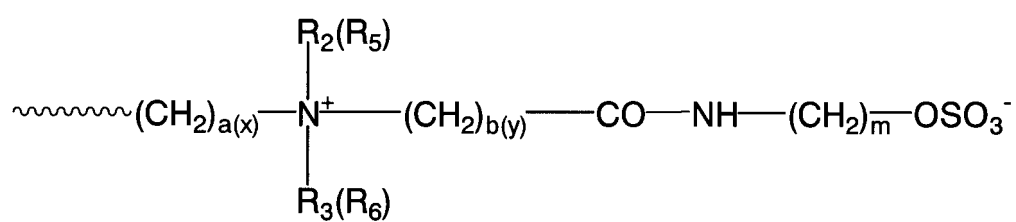
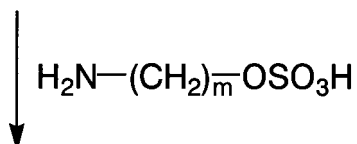
50

【化 2 2】

(反応式 3)



10

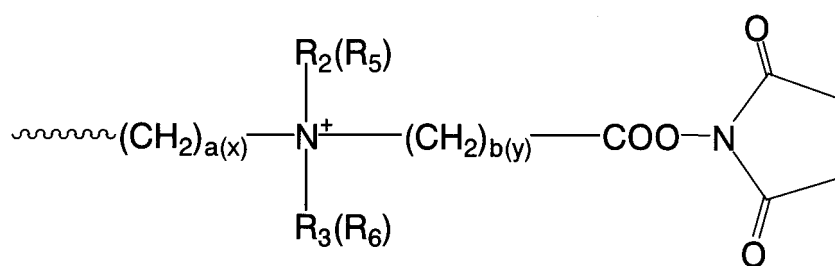


20

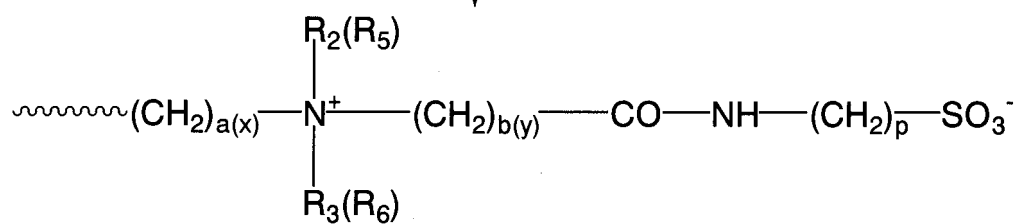
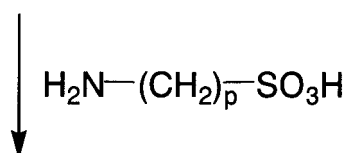
【 0 0 9 3】

【化 2 3】

(反応式 4)



30

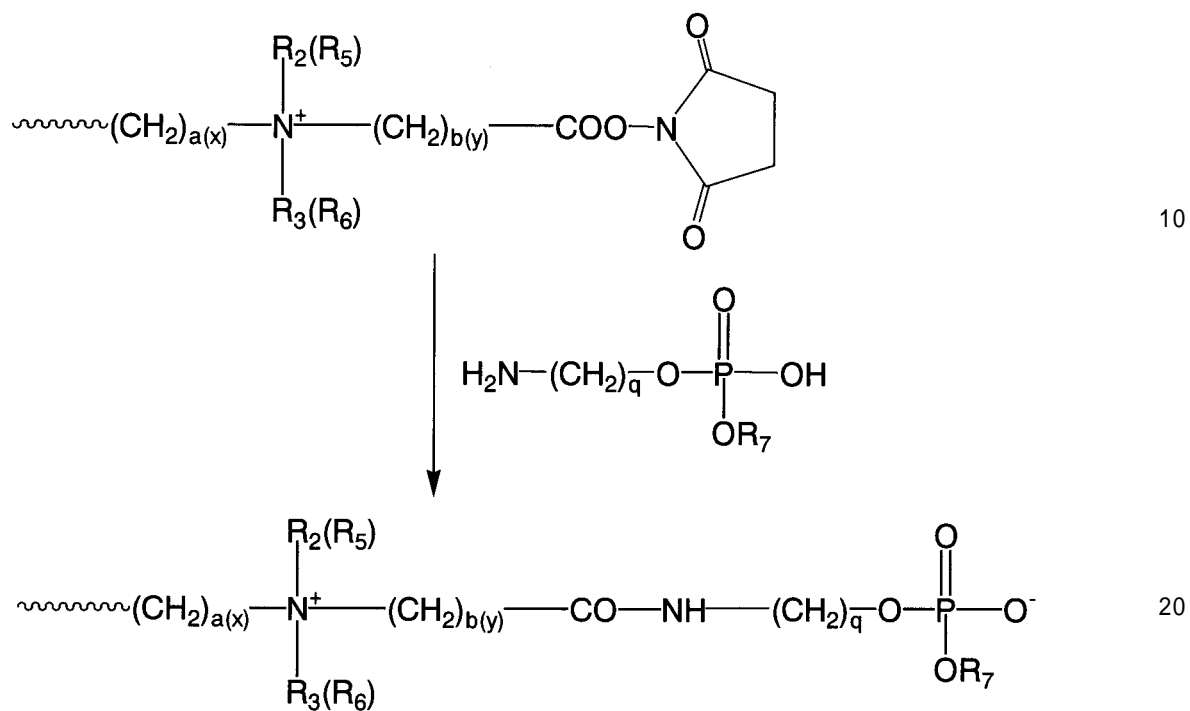


40

【 0 0 9 4】

【化 2 4】

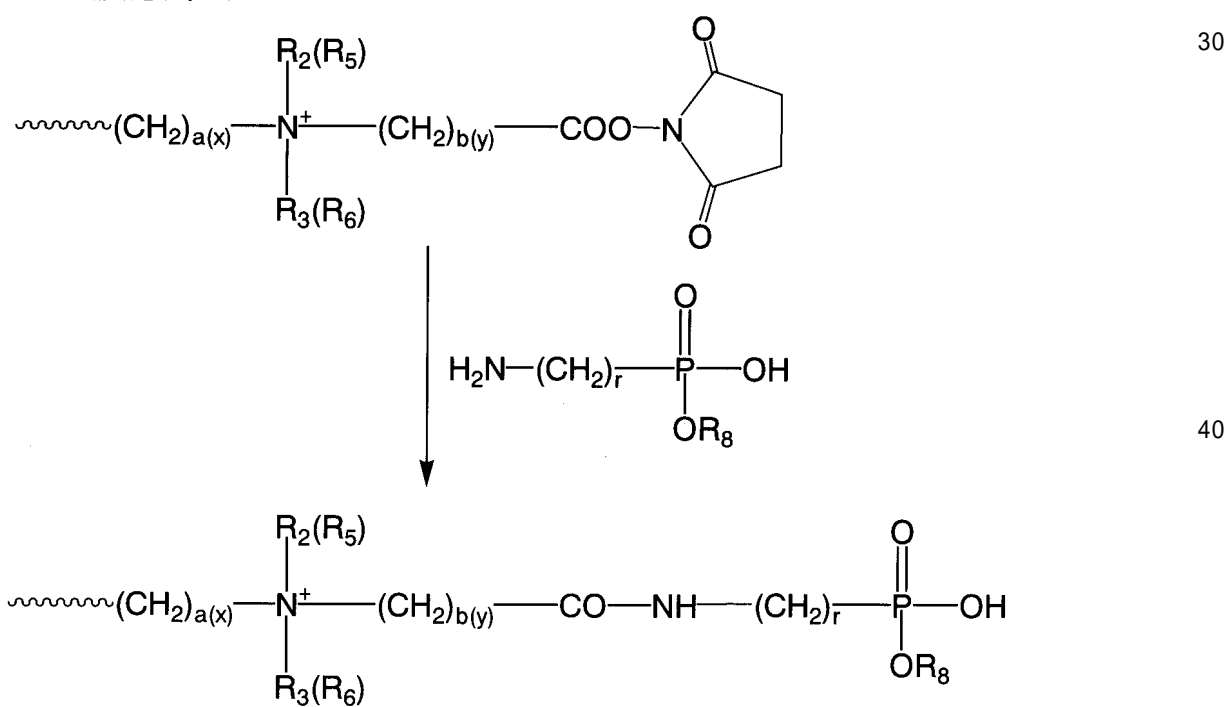
(反応式 5)



【 0 0 9 5】

【化 2 5】

(反応式 6)



【 0 0 9 6】

50

(標的物質検出素子)

次に、本発明の第二について説明する。

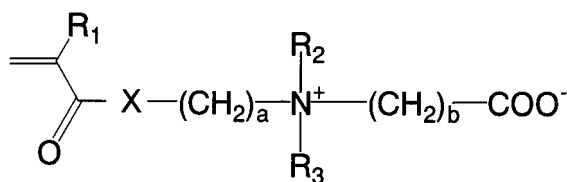
本発明の第二は、検出領域を有する基体と、該基体の表面に存在する重合体と、該重合体に結合する第一の標的物質捕捉体とを有し、前記重合体が、下記一般式 (1) で示されるカルボキシベタインモノマーの重合体からなり、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの一部に、前記第一の標的物質捕捉体が結合しており、前記重合体が有するカルボキシル基のうちの前記第一の標的物質捕捉体が結合していないカルボキシル基のうちの少なくとも一部に一般式 (2) に示される化合物が結合していることを特徴とする標的物質検出素子である。

【 0 0 9 7 】

【 化 2 6 】

10

一般式 (1)



20

【 0 0 9 8 】

(式中、 R_1 は水素原子又はメチル基である。 R_2 および R_3 は各々独立にメチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i s o -プロピル基のいずれかから選ばれる基である。 X は酸素原子もしくは NH である。 a は 1 から 5 の整数である。 b は 1 以上 4 以下の整数である。)

【 0 0 9 9 】

【 化 2 7 】

30

一般式 (2)



【 0 1 0 0 】

(式中、 n は 1 以上 4 以下の整数であり、且つ $n + b$ は 2 以上 5 以下の整数である。 Y は、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ のうちのいずれかの基である。また、メチレン基の水素原子は、水酸基、メチル基、ヒドロキシメチル基で置換されていても良い。)

【 0 1 0 1 】

図 2 は、本発明の第二の標的物質検出素子 1 2 を示す模式図である。
基体 1 は検出領域 6 を有する。

【 0 1 0 2 】

検出領域 6 は、捕捉した標的物質を検出する領域である。検出領域 6 には、捕捉した標的物質に由来する信号を伝達する材質で構成される。例えば、検出方法が表面プラズモン共鳴 (S P R) あるいは局在プラズモン共鳴 (L S P R) であれば、表面プラズモンを発生する材質を表面に含む。検出方法が水晶発振子マイクロバランス (Q C M) であれば、吸着した物質の重さに比例して振動数が変化する材質を含む。検出方法が電界効果トランジスタ (F E T) であれば、電流を通し、微細加工が可能な材質で構成する。検出方法が

50

磁気検出方法であれば、軟磁性体のように比較的簡単に磁極が消えたり反転したりする材質を含む。検出方法が電気化学であれば、電気化学反応を阻害しない広い電位領域を有する材質で表面を形成することが好ましい。検出方法が吸光検出であれば、検出する波長光を透過する材質でできていることが好ましい。検出方法が蛍光検出あるいは発光検出であれば、検出する波長光を吸収しない材質でできていることが好ましい。

【0103】

検出領域6の材質としては、金、銀、銅、白金、水晶、シリコン、ゲルマニウム、酸化亜鉛、酸化チタン、酸化シリコン、酸化インジウム、硫化カドミウム、セレン化カドミウム、ガリウム砒素、パーマロイ(Ni-Fe合金)、Co-Fe-B合金、水銀、カーボン、ダイヤモンド、ガラス、あるいはプラスチックなどが挙げられるが、以上に限定されない。

10

【0104】

これら検出領域6の材質は、標的物質の検出方法によって使い分けられることが多い。検出方法としてSPRを用いる場合は、検出領域6の材質が金、銀、銅、あるいは白金などの金属であることが好ましい。好ましくは金である。検出方法としてQCMを用いる場合は、検出領域6の材質が水晶であることが好ましい。検出方法としてFETを用いる場合は、検出領域6の材質として、シリコン、ゲルマニウム、酸化亜鉛、酸化チタン、酸化シリコン、酸化インジウム、硫化カドミウム、セレン化カドミウム、ガリウム砒素などが挙げられる。以上のように、検出方法として、SPR、QCMあるいはFETを使用すれば、標的物質を非標識で検出することができる。

20

【0105】

また、検出方法として磁気検出方法を用いる場合は、検出領域6の材質がパーマロイ(Ni-Fe合金)あるいはCo-Fe-B合金に代表される軟磁性体であることが好ましい。検出方法として電気化学を用いる場合は、検出領域6の材質が金、白金、水銀、カーボン、あるいはダイヤモンドであることが好ましい。検出方法として吸光検出、蛍光検出あるいは発光検出を用いる場合は、検出領域6の材質がガラスあるいはプラスチックであることが好ましい。

【0106】

検出領域6は、基体1の表面に存在していても良いし、基体1の内部に存在していても良い。例えば、検出領域6が基体1の表面に存在するケースとして、SPR、電気化学が挙げられる。SPRであれば、表面プラズモンを発生する金属薄膜を基体の表面に形成する。電気化学であれば、金属を作用電極の少なくとも表面に形成する。

30

【0107】

一方、検出領域6が基体1の内部に存在してもよいケースとして、QCM、FET、あるいは磁気センサが挙げられる。QCMでは、水晶の表面に形成された金薄膜上に非特異吸着防止膜を形成することで、標的物質検出素子を作製することができる。FETでは、電流を通す材質からなる構造体の表面に非特異吸着防止膜を形成することで、本発明の標的物質検出素子を作製することができる。磁気センサでは、パーマロイ(Ni-Fe合金)あるいはCo-Fe-B合金を含む複数層の表面に形成された層上に非特異吸着防止膜を形成することで、標的物質検出素子を作製することができる。

40

【0108】

なお、図2では、基体1の表面が検出領域6である例として、基体1が複数の層からなり、該層のうちの基体1の表面を含む層が検出領域6である場合を例に挙げて記載している。しかしながら、基体1は、前記例に限られず、複数の層のうちの表面を含まない層であっても良いし、基体1が一つの層で形成されており、基体1全体が検出領域6となる構成であっても良い。

なお、非特異吸着防止膜14および第一の標的物質捕捉体5は、本発明の第一における非特異吸着防止膜および第一の標的物質捕捉体と同様である。

【0109】

(標的物質検出キット)

50

次に、本発明の第三について説明する。

本発明の第三は、標的物質検出キットであって、本発明の第二の標的物質検出素子と、標識物質と該標識物質の表面に存在する第二の標的物質捕捉体とからなる標識材料と、からなることを特徴とする標的物質検出キットである。

【0110】

図3に本発明の第三の標的物質検出キットの一例を示す。

標的物質検出キットは、標的物質検出素子12と、標識材料9とからなる。

標的物質検出素子12は、本発明の第二の標的物質検出素子と同様であるが、標的物質検出素子12が有する検出領域6は標識材料9が有する標識物質7を感知することができる検出領域である。なお、11は夾雑物である。

10

【0111】

標識材料9は、標識物質7と、第二の標的物質捕捉体8と、からなる。

第二の標的物質捕捉体8は、標識物質7と結合していても良いし、標識物質7の表面に存在していても良い。第二の標的物質捕捉体8が標識物質7と結合している場合、第二の標的物質捕捉体8と標識物質7との間の結合は、共有結合、配位結合、ファンデルワールス結合であることが好ましく、より好ましくは共有結合あるいは配位結合である。

【0112】

標識物質7としては、金コロイド、ラテックスビーズ、ルミノール、ルテニウム、酵素、放射性物質、蛍光物質、および磁性物質などが挙げられる。蛍光物質の具体例としては、量子ドット、蛍光タンパク質（例えば、GFPおよびその誘導体）、Cy3、Cy5、Texas Red、フルオレセイン、およびAlexa色素（例えば、Alexa568）が挙げられる。酵素の具体例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。磁性物質の例としては、フェライトが挙げられる。フェライトは、生理活性条件下で十分な磁性を有し、溶媒中で酸化等の劣化が起こりにくいことから好ましい。フェライトは、マグネタイト(Fe_3O_4)、マグヘマイト($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、及びこれらのFeの一部を他の原子で置換した複合体から選択される。他の原子としては、Li、Mg、Al、Si、Ca、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、Zr、Nb、Mo、Cd、In、Sn、Ta、Wの少なくともいずれかが挙げられる。また、標識物質は、以上に挙げた材料の複合体であっても構わない。

20

30

【0113】

標識物質7の形状としては、粒子形状、柱状、星状などが挙げられるが、粒子形状であることが好ましい。粒子形状である場合、平均粒径は、1nmから100 μm が好ましく、更に3nmから10 μm が好ましい。尚、標識物質が粒子形状である場合は、平均粒径は動的光散乱法で測定できる。

【0114】

磁性物質としては、例えば、Dyna1社から市販されているダイナビーズ、micromod社から市販されているmicromer-M、nanomag-D、メルク社から市販されているエスタポール等を使用することができる。

【0115】

40

第二の標的物質捕捉体8は、第一の標的物質捕捉体5と同様、標的物質10を捕捉する機能を有する。したがって、第二の標的物質捕捉体8の例としては、第一の標的物質捕捉体5の例として挙げたものと同様である。なお、第二の標的物質捕捉体8と第一の標的物質捕捉体5とは、標的物質10の異なる部分を捕捉する必要がある。その場合、第二の標的物質捕捉体8と第一の標的物質捕捉体5とで標的物質10をサンドイッチした形態の複合体が形成される。また、例えば、第二の標的物質捕捉体8と第一の標的物質捕捉体5がモノクローナル抗体であれば、異なる種類のもでなければならない。しかし、ポリクローナル抗体であれば、同一の種類であっても良いし、異なる種類であっても良い。2つの標的物質捕捉体のうち、一方をモノクローナル抗体とし、他方をポリクローナル抗体とする場合もある。

50

【0116】

具体的には、標的物質検出素子12の表面に配置された第一の標的物質捕捉体5に標的物質10が捕捉され、第一の標的物質捕捉体5に捕捉された標的物質10を、更に、標識材料9が有する第二の標的物質捕捉体8が捕捉する。すなわち、第一の標的物質捕捉体5 - 標的物質10 - 第二の標的物質捕捉体8の複合体が形成され、標識材料9が標的物質検出素子12の検出領域6の近傍に配置される。検出領域6の近傍に配置された標識材料9が有する標識物質7は検出領域6で検知され、検出領域6における標識物質7の検知は標的物質検出素子12の電気的もしくは物理的なシグナルの変化として現れる。この標的物質検出素子12のシグナルの変化を利用して、標的物質の有無もしくは数が検知される。

【0117】

10

なお、ここでは、第一の標的物質捕捉体5により、標的物質10が捕捉された後に、標的物質10が第二の標的物質捕捉体8により捕捉される場合を想定して記載している。しかしながら、第二の標的物質捕捉体8によって標的物質10が捕捉された後に、第二の標的物質捕捉体8によって捕捉された標的物質10が第一の標的物質捕捉体5によって捕捉されても良い。

【0118】

このような標的物質検出素子12と標識物質7との組み合わせとしては、次のようなものが挙げられる。例えば、標的物質検出素子12が磁気センサ素子であれば、標識物質7は磁性物質であることが好ましい。標的物質検出素子12が電極であれば、標識物質7は酵素であることが好ましい。標的物質検出素子12がマイクロタイタプレートであれば、標識物質7は金コロイド、ラテックスビーズ、ルミノール、ルテニウム、酵素、放射性物質、あるいは蛍光物質であることが好ましい。

20

【0119】

なお、前述したように、標的物質検出素子12が磁気センサ素子である場合、磁気センサ素子は、検出領域6の近傍に位置する磁性物質の有無、数を検知することができる。このような場合、標的物質検出素子12としては、磁性の変化を検出する検出領域を有するものであり、例えば、磁気抵抗効果素子、ホール効果素子、超電導量子干渉計素子などを好適に用いることができる。

【0120】

磁性物質の例としては、フェライトを使用することができる。フェライトは、生理活性条件下で十分な磁性を有し、溶媒中で酸化等の劣化が起こりにくいことから好ましい。フェライトは、マグネタイト(Fe_3O_4)、マグヘマイト($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、及びこれらのFeの一部を他の原子で置換した複合体から選択される。他の原子としては、Li、Mg、Al、Si、Ca、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、Zr、Nb、Mo、Cd、In、Sn、Ta、Wの少なくともいずれかが挙げられる。

30

【実施例】

【0121】

以下、実施例を用いて更に詳細に本発明を説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではなく、材料、組成条件、反応条件等、同様な機能、効果を有する磁気バイオセンサが得られる範囲で自由に変えることができる。

40

【0122】

実施例1

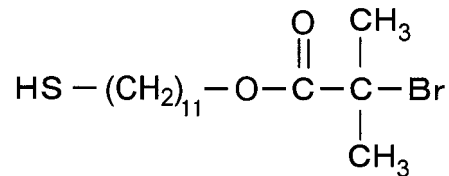
(1) SPR基板の調整

SIA Kit Au (BIA CORE製) の金膜チップに、化学式33で示される原子移動ラジカル重合開始剤を含むエタノール溶液にAu膜を侵漬し、前記開始剤とAu膜を反応させて、Au膜表面に原子移動ラジカル重合開始剤を導入した。

【0123】

【化 2 8】

化学式(33)



10

【 0 1 2 4】

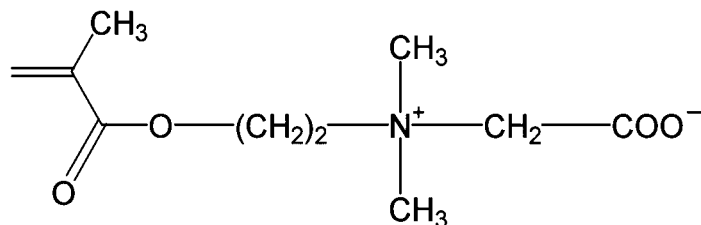
次に、原子移動ラジカル重合開始剤を導入した金膜チップをメタノールに浸漬させた後、CuBr、2,2'-ビピリジルを加えた。凍結真空脱気により反応系内の酸素を除去した後、窒素で置換し、化学式34で示されるカルボキシベタインモノマーを原子移動ラジカル重合により所定時間反応させた。反応後、表面にグラフト化されたポリマーの膜厚を分光エリプソメーター（J. A. Woolam製、M-2000）で測定したところ、 $17.6 \pm 0.6 \text{ nm}$ ($n = 4$)であった。

【 0 1 2 5】

【化 2 9】

20

化学式(34)



30

【 0 1 2 6】

(2) SPRによる非特異吸着防止能の評価

前記(1)で調整した金膜チップを付属のセンサーチップ支持体に貼り付け、表面プラズモン共鳴（SPR）装置BIAcore-X（BIAcore製）のセンサーチップポートにセットし、センサーチップをドッキングした。N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS、0.1 mM）と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、0.4 mM）との混合液をSPR装置のコネクターブロックのサンプル添加ポジションからオートピペットを用いて注入し、流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で7分間インジェクトした。このようにして、非特異吸着防止膜に含まれるカルボキシル基にスクシンイミド基を導入した。その後、スクシンイミド基を失活させるための試薬を流速 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で7分間インジェクトし、非特異吸着防止膜に含まれるスクシンイミド基を失活させた。スクシンイミド基を失活させるための試薬としては、図4に示すように、1) グリシン、2) -アラニン、3) アミノメタンスルホン酸、4) 硫酸モノアミノエチル、および従来技術による比較例1として、5) エタノールアミンの水溶液を個別の流路に用いた。

40

【 0 1 2 7】

センサーグラムのベースが落ち着いたことを確認した後、1% Bovine-IgG溶液（PBS、pH 7.4）を流速 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ で2分間インジェクトし、インジェク

50

ト終了から5分後の共鳴シグナル変化量(RU)を測定した。

【0128】

本SPR装置において、タンパク吸着による変化量 $1\text{RU} = 1\text{pg/mm}^2$ とすることができるため、この測定結果をIgGの非特異吸着量として図5のように示した。図5の結果から、本発明である化学式34から化学式37(ただし、化学式34、35は参考例)の非特異吸着防止膜におけるIgGの非特異吸着量は、従来技術である化学式38の非特異吸着防止膜のそれと比較すると少ないことから、非特異吸着防止能が向上していることが確認された。

なお、以下の方法によって、構造体および磁気バイオセンサを得ることもできる。

【0129】

10

実施例2(参考例)

本実施例は、第一の標的物質捕捉体としてPSA(前立腺特異抗原)を捕捉する一次抗体を含む非特異吸着防止膜が検出領域に形成された磁気バイオセンサと、第二の標的物質捕捉体としてPSAを捕捉する二次抗体を備えたマグネタイトからなる標識材料(磁性標識)を作製し、磁気バイオセンサとしてPSAを検出する例である。尚、磁気バイオセンサの検出方式としては、磁気抵抗効果素子を使用する。

【0130】

(1)磁気マーカーの作製

まず、第二の標的物質捕捉体としてPSAを捕捉する二次抗体を有する標識材料を作製する。

20

【0131】

マグネタイト粒子(平均粒径 100nm)を乾燥室素雰囲気下、加熱処理した後、無水トルエンに分散させる。このマグネタイト粒子/トルエン分散液に、シランカップリング剤であるアミノプロピルトリメトキシシランを添加し、マグネタイト粒子表面にアミノ基を導入する。次に、第二の標的物質捕捉体としてPSAを捕捉する二次抗体を固定化するためにグルタルアルデヒド架橋剤を用いて、前記アミノ基と二次抗体のアミノ基を共有結合させ、第二の標的物質捕捉体をマグネタイト粒子表面に固定化することができる。

以上の操作を経ることで、第二の標的物質捕捉体を備えた標識材料を得ることができる。

【0132】

30

(2)磁気バイオセンサの作製

次に、第一の標的物質捕捉体としてPSAを捕捉する一次抗体を含み、重合体の側鎖の電荷が中性に保持された非特異吸着防止膜が検出領域に形成された磁気バイオセンサを作製する。

【0133】

まず、図6のように、磁気検出領域6上面にAu膜13を形成する。本実施例では、検出方式としては、磁気抵抗効果素子を使用するため、前記検出領域は磁気抵抗効果膜を意味する。

【0134】

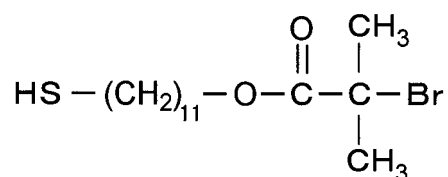
次に、検出領域であるAu表面に非特異吸着防止膜を形成する。まず、化学式33で示される原子移動ラジカル重合開始剤を含むエタノール溶液にAu膜を侵漬し、前記開始剤とAu膜を反応させて、Au膜表面に原子移動ラジカル重合開始剤を導入することができる。

40

【0135】

【化 3 0】

化学式(33)



10

【0 1 3 6】

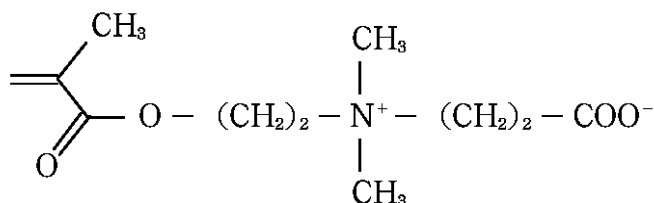
次に、原子移動ラジカル重合開始剤を導入した検出領域をメタノールに浸漬させた後、フリーな重合開始剤として2-ブロモイソ酪酸エチルを加え、CuBr、2,2'-ビピリジルを加える。凍結真空脱気により反応系内の酸素を除去した後、窒素で置換し、化学式11で示されるカルボキシベタインモノマーを原子移動ラジカル重合により所定時間反応させる。また、フリーな重合開始種として加えておいた2-ブロモイソ酪酸エチルから生成したポリマーの分子量と分子量分布を測定すると、数平均分子量が97000で、分子量分布が1.15である。このことから、検出領域にグラフト化されたグラフトポリマーは鎖長の揃ったポリマーであることを確認できる。

20

【0 1 3 7】

【化 3 1】

化学式 (11)



30

【0 1 3 8】

検出領域に形成された非特異吸着防止膜の膜厚と重量を測定することによって、重合体のグラフト密度は、0.65分子/nm²であることを確認できる。

【0 1 3 9】

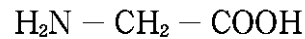
次に、検出領域に形成された非特異吸着防止膜に含まれるカルボキシル基の少なくとも一部に第一の標的物質捕捉体としてPSAを捕捉する一次抗体を固定化する。まず、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド水溶液と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩水溶液を同様に塗布する。これらの操作により、非特異吸着防止膜に含まれるカルボキシル基がスクシンイミド基(活性エステル基)に変換することになる。前記スクシンイミド基と一次抗体のアミノ基を反応させ、第一の標的物質捕捉体としてPSAを捕捉する一次抗体を固定化することができる。その後、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基は、化学式12で示される化合物によって失活させて、化学式13に示すような分子内塩構造に変換することができる。

40

【0 1 4 0】

【化 3 2】

化学式 (12)

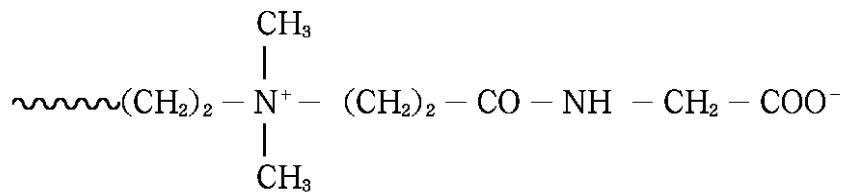


【 0 1 4 1】

【化 3 3】

10

化学式 (13)



20

【 0 1 4 2】

以上の操作により、第一の標的物質捕捉体として P S A を捕捉する一次抗体を含み、重合体の側鎖の電荷が中性に保持された非特異吸着防止膜を備えた検出領域を有する磁気バイオセンサを作製することができる。

【 0 1 4 3】

(3) P S A の検出

上述の (1)、(2) において作製される磁気マーカーと磁気バイオセンサを用い、以下の操作を行うことで、前立腺癌のマーカーとして知られている P S A の検出を試みることができる。

【 0 1 4 4】

30

1) 標的物質 (抗原) である P S A、及び夾雑物である B S A と I g G を含むリン酸緩衝液に上記磁気バイオセンサの検出領域を浸す。

2) 未反応の P S A と夾雑物をリン酸緩衝液で洗浄する。

3) 磁気マーカーを含むリン酸緩衝液に工程 1) 及び 2) が終了した上記磁気バイオセンサの検出領域を浸し、5 分間インキュベートする。

4) 未反応の磁気マーカーをリン酸緩衝液で洗浄する。

【 0 1 4 5】

上記操作によって、抗原が一次抗体、二次抗体により捕捉され、磁気マーカーが図 2 に示すように磁気バイオセンサの検出領域に固定化される。つまり、検体中に抗原が存在しない場合には、磁気マーカーは磁気バイオセンサの検出領域上に固定化されない。よって、磁気マーカーの有無を検出することにより、抗原の検出が可能である。また、固定化された磁気マーカーの数を検出することによって、検体中に含まれる抗原の量を間接的に知ることが可能である。本実施例の磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

40

【 0 1 4 6】

実施例 3

実施例 2 の化学式 1 2 の化合物を化学式 1 4 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 1 5 に示すような分子内塩構造に変

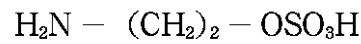
50

換する。その後、実施例 2 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

【 0 1 4 7 】

【 化 3 4 】

化学式 (14)

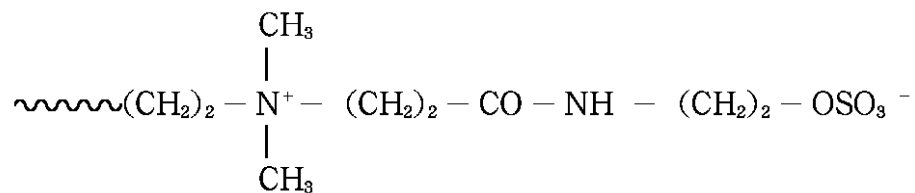


10

【 0 1 4 8 】

【 化 3 5 】

化学式 (15)



20

【 0 1 4 9 】

実施例 4

実施例 2 の化学式 1 2 の化合物を化学式 1 6 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 1 7 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 2 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

30

【 0 1 5 0 】

【 化 3 6 】

化学式 (16)

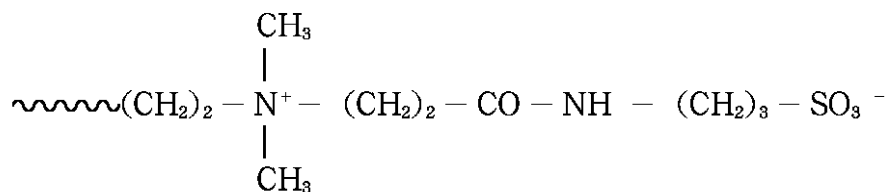


40

【 0 1 5 1 】

【化 3 7】

化学式 (17)



10

【 0 1 5 2 】

実施例 5 (参考例)

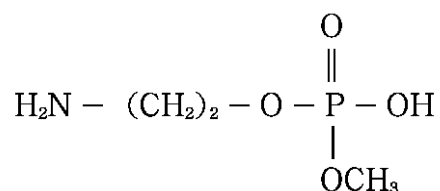
実施例 2 の化学式 1 2 の化合物を化学式 1 8 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 1 9 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 2 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

【 0 1 5 3 】

20

【化 3 8】

化学式 (18)

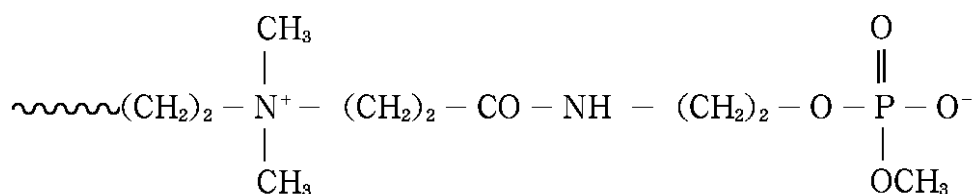


30

【 0 1 5 4 】

【化 3 9】

化学式 (19)



40

【 0 1 5 5 】

実施例 6 (参考例)

実施例 2 の化学式 1 2 の化合物を化学式 2 0 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 2 1 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 2 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を

50

【 0 1 5 6 】

【化 4 0】

化学式 (20)



【 0 1 5 7 】

【化 4 1】

化学式 (21)



【 0 1 5 8 】

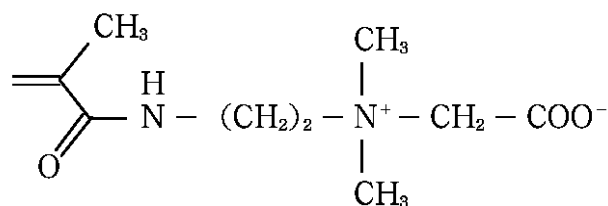
实施例 7（参考例）

30

【 0 1 5 9 】

【化 4 2】

化学式 (22)

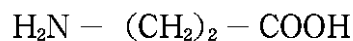


40

【 0 1 6 0 】

【化 4 3】

化学式 (23)

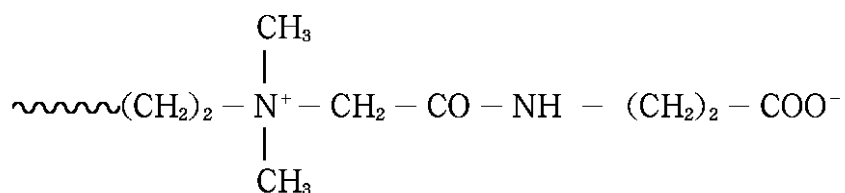


【 0 1 6 1 】

【化 4 4】

10

化学式 (24)



20

【 0 1 6 2 】

実施例 8

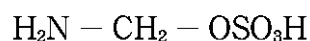
実施例 7 の化学式 2 3 の化合物を化学式 2 5 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 2 6 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 7 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

【 0 1 6 3 】

【化 4 5】

30

化学式 (25)

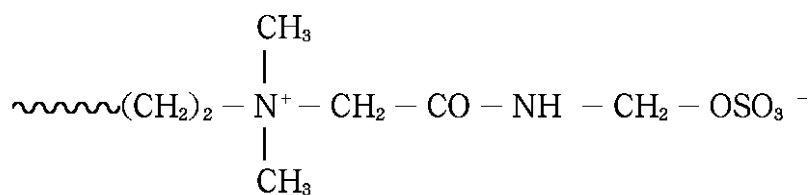


【 0 1 6 4 】

【化 4 6】

40

化学式 (26)



【 0 1 6 5 】

50

実施例 9

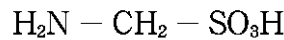
実施例 7 の化学式 23 の化合物を化学式 27 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 28 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 7 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

【 0 1 6 6 】

【化 4 7 】

10

化学式 (27)

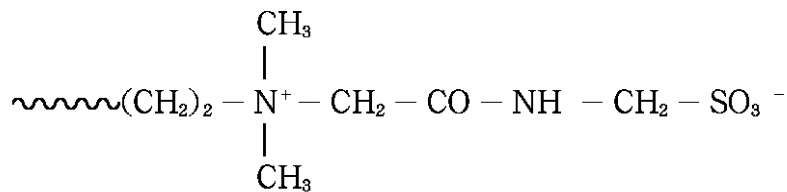


【 0 1 6 7 】

【化 4 8 】

20

化学式 (28)



【 0 1 6 8 】

実施例 10 (参考例)

30

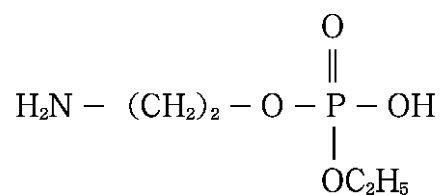
実施例 7 の化学式 23 の化合物を化学式 29 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 30 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 7 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

【 0 1 6 9 】

【化 4 9 】

40

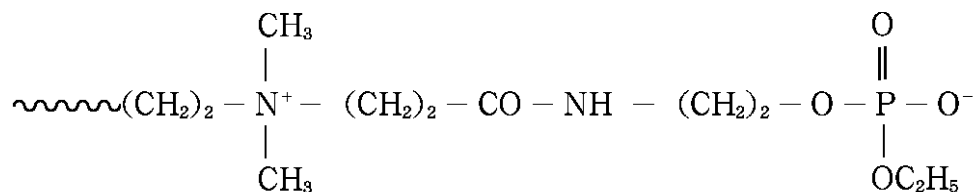
化学式 (29)



【 0 1 7 0 】

【化 5 0】

化学式 (30)



10

【 0 1 7 1】

実施例 1 1 (参考例)

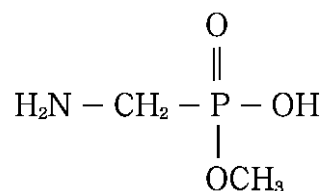
実施例 7 の化学式 2 3 の化合物を化学式 3 1 の化合物に替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させて、化学式 3 2 に示すような分子内塩構造に変換する。その後、実施例 7 と同様に P S A の検出を行うと、磁気バイオセンサにおける検出領域の非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷が中性に保持されている。このことから、検体に含まれる夾雑物や標的物質の非特異吸着を防止することができ、標的物質を高感度に検出することができる。

【 0 1 7 2】

20

【化 5 1】

化学式 (31)

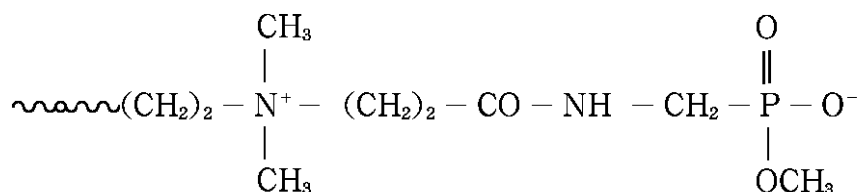


30

【 0 1 7 3】

【化 5 2】

化学式 (32)



40

【 0 1 7 4】

比較例 2

実施例 2 の化学式 1 2 の化合物をエタノールアミンに替え、非特異吸着防止膜に含まれる未反応のスクシンイミド基を失活させる。その後、実施例 2 と同様に P S A の検出を行うと、非特異吸着防止膜では、重合体の側鎖の電荷がプラス電荷に偏っていることによって夾雑物が付着し、実施例 2 から 1 1 のいずれの感度よりも劣ることが確認される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 1 7 5 】

【図 1】本発明の構造体の一例を示す概略図である。

【図 2】本発明の標的物質検出素子の一例を示す概略図である。

【図 3】本発明の標的物質検出キットの一例を示す概略図である。

【図 4】本発明の非特吸着異防止膜に含まれるスクシンイミド基の失活方法を示す反応式である。

【図 5】実施例 1 の非特吸着異防止膜に対する I g G の非特異吸着量を示すグラフである。

【図 6】磁気センサの一例を示す概略図である。

【符号の説明】

10

【 0 1 7 6 】

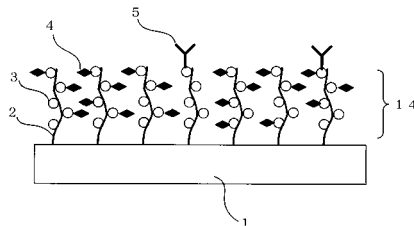
- 1 基体
- 2 重合体
- 3 カルボキシル基
- 4 保護分子
- 5 第一の標的物質捕捉体
- 6 検出領域
- 7 標識物質
- 8 第二の標的物質捕捉体
- 9 標識材料
- 10 標的物質
- 11 夾雑物
- 12 標的物質検出素子
- 13 金薄膜
- 14 非特異吸着防止膜

20

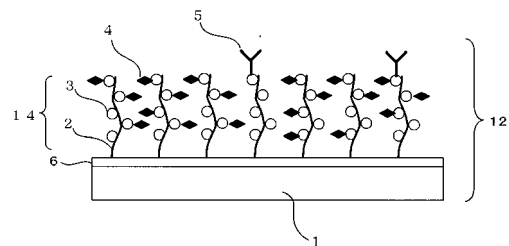
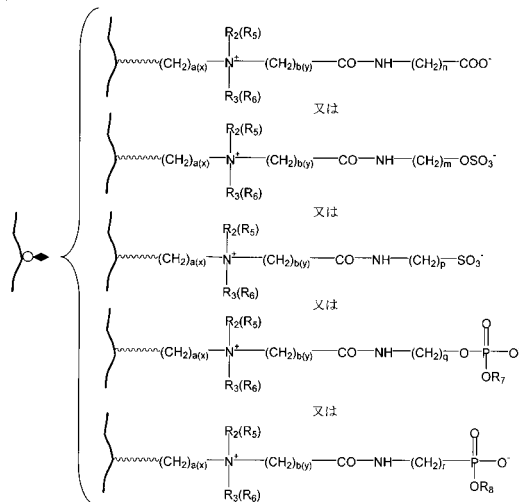
【図 1】

【図 2】

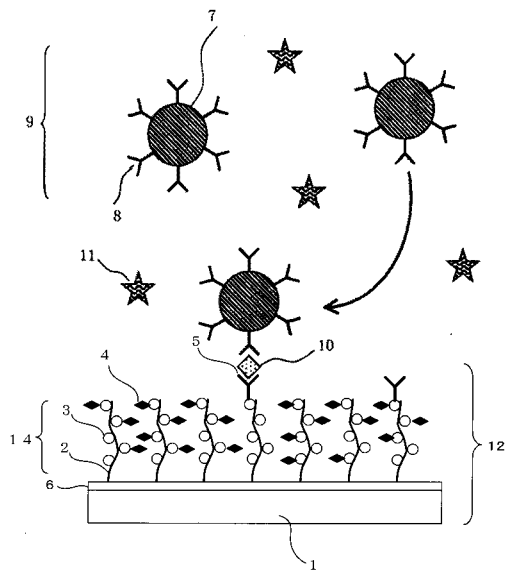
(A)



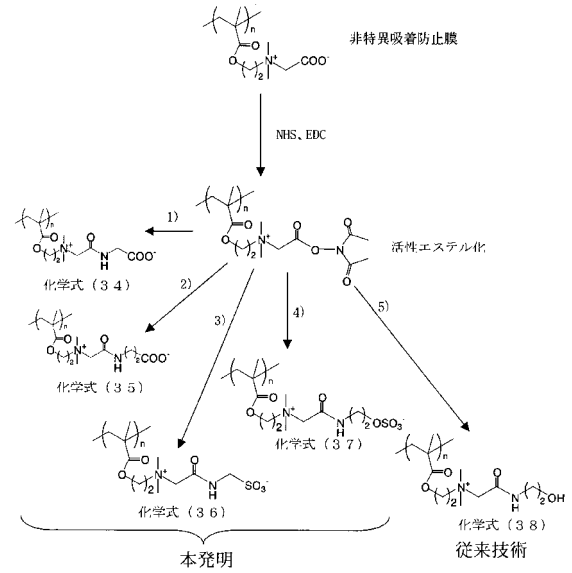
(B)



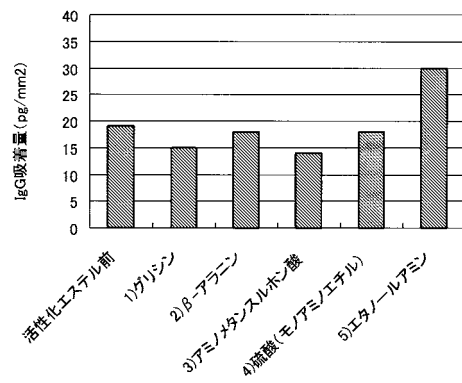
【図 3】



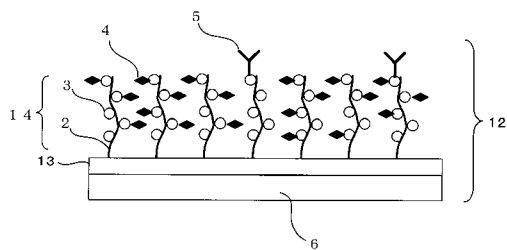
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2006/027582(WO, A1)
国際公開第2005/113620(WO, A1)
特開2007-163240(JP, A)
国際公開第2007/049269(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-98