(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年3月2日(02.03.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/027183 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/032269

(22) 国際出願日： 2022年8月26日(26.08.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-139398 2021年8月27日(27.08.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ Hyogo (JP).

(72) 発明者: 竹内 俊文 (**TAKEUCHI, Toshifumi**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 砂山 博文(**SUNAYAMA, Hirobumi**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). ▲高▼野 恵里 (**TAKANO, Eri**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 堀川 諒(**HORIKAWA, Ryo**); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外 (**YAMAMOTO, Shusaku et al.**); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町３－１ グランフロント大阪 タワーC Osaka (JP).

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

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

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** TECHNIQUE FOR ALIGNING PARTICLES ON SUBSTRATE WITHOUT AGGLOMERATION

(54) 発明の名称： 基板上に粒子を凝集なく並べる技術

(57) **Abstract:** Provided is a novel technique for providing a base material that is useful when an analysis sensor is produced. A base material for producing an analysis sensor provided by the present disclosure has specific characteristics (e.g., is a monodispersion or a monolayer, or has a specific density), thereby making it possible to produce an analysis sensor that is stable and enables high-accuracy analysis. In the present disclosure, it is not necessary to eliminate a surplus due to fine particles being overabundantly arranged on a base material, repeatability of the density of the fine particles anchored to the base material is improved, and monodispersion properties and monolayer properties are also improved.

(57) 要約：分析用センサを作製する際に有利な基材を提供するための新規技術を提供する。 本開示で提供される分析用センサ作製用基材は、特定の特徴（例えば、単分散、単層または特定密度）を有することにより、安定し、高精度の分析を可能とする分析用センサを作製することができる。本開示は、過剰に微粒子を基材上に乗せてから、余分なものを除くことを必要とせず、基材上に固定化される微粒子の密度の再現性が改善され、単分散性および単層性も改善される。

WO 2023/027183 A1

明　細　書

発明の名称 ： 基板上に粒子を凝集なく並べる技術

技術分野

[0001] 本開示は、測定技術に使用される基板上に粒子を凝集なく並べる技術およびその応用に関する。より具体的には、本開示は、足場が配置される、検出対象の分析用センサ作製用基材およびその製造方法、検出対象の分析用センサおよびその製造方法、ならびに検出対象の分析法に関する。

背景技術

[0002] エクソソーム等の小型細胞外小胞（Ｓｍａｌｌ　Ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｖｅｓｉｃｌｅｓ；ｓＥＶｓ）は細胞から放出される小胞体の一つであり、直径２０～２００ｎｍの脂質二重膜小胞である。小型細胞外小胞は、その内部にタンパク質、及びｍｉＲＮＡ、ｍＲＮＡなどの核酸を内包するとともに、その表面にもタンパク質を有している。小型細胞外小胞はこのような物質に特徴づけられているため、小型細胞外小胞の特徴を解析することで、分泌した細胞がどのような細胞であるかを推測できると考えられている。また、小型細胞外小胞は様々な体液中で存在が確認されており、比較的容易に採取することができる。

[0003] 癌細胞から分泌される小型細胞外小胞は腫瘍由来の物質を含んでいる。したがって、体液中の小型細胞外小胞に含まれる物質を解析することで癌の診断を行うことができると期待されている。さらに、小型細胞外小胞は細胞によって能動的に分泌されるものであることから、がんの早期段階であっても何らかの特徴を呈していることが予想されている。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本開示は、分析用センサを作製する際に有利な基材を提供するための新規技術を提供する。より特定すると、本開示で提供される分析用センサ作製用基材は、特定の特徴（例えば、単分散、単層または特定密度）を有すること

により、安定し、高精度の分析を可能とする分析用センサを作製することができる。本開示は、過剰に微粒子を基材上に乗せてから、余分なものを除くことを必要とせず、基材上に固定化される微粒子の密度の再現性が改善され、単分散性および単層性も改善される。本開示は、一つの好ましい実施形態では、基材と粒子の静電的相互作用を利用して固定化することと、単分散および／または単層で粒子を基材上に配置することで、再現的に単分散微粒子固定化基材および／または単層微粒子固定化基材を得ることができる。

[0005] 本開示は、例えば、以下の項目を提供する。

[0006] （項目Ａ１）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体に単分散で配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材。

（項目Ａ２－１）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）粒子を、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材。

（項目Ａ２－２）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）粒子を、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材。

（項目Ａ２－３）

前記粒子は、分析用センサに使用される物質を含む、前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目Ａ３）

前記粒子は、修飾物質が一体化した粒子を含む、前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目Ａ４）

前記基材は、さらにＣ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックス

であって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスを含み、前記粒子は、該凹部に配置される、前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目Ｂ１Ａ）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する凹部を有し、該粒子は、該凹部に配置される、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該粒子に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該粒子に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該粒子部は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置される、凸型分析用センサ。

（項目Ｂ１Ｂ）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する凹部を有し、該粒子は、該凹部に配置される、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該粒子に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該粒子に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該粒子部は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置される、凸型分析用センサ。

（項目Ｂ１Ｃ）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象分子に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該凹部に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該凹部に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子

の結合用基とを含み、ここで、該凹部は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置される、分析用センサ。

（項目Ｂ１Ｄ）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象分子に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該凹部に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該凹部に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該凹部は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置される、分析用センサ。

（項目Ｂ２）

前記凹部が１×１０^{4}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{6}個／ｍｍ^{2}の密度で存在する、前記項目のいずれか一項に記載に記載の分析用センサ。

（項目Ｃ１Ａ）

凸型分析用センサ作製用基材を製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が単分散で基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程とを

包含する、方法。

（項目Ｃ１）

分析用センサ作製用基材を製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に、粒子が単分散で基材本体に配置されるように加える工

程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工程とを

包含する、方法。

（項目Ｃ１－１）

前記単分散で配置されるように加える工程は、粒子を基材１平方ｍｍ当たり１．０×１０^{0}個／μＬから２．５×１０^{8}個／μＬの濃度で、または１．０×１０^{0}個から２．５×１０^{8}個の量を加えることを包含する、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目Ｃ１－２）

前記単分散で配置されるように加える工程は、粒子を基材１平方ｍｍ当たり１．０×１０^{0}個／μＬから１．０×１０^{10}個／μＬの濃度で、または１．０×１０^{0}個から１．０×１０^{10}個の量を加えることを包含する、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目Ｃ２Ａ）

凸型分析用センサを製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が単分散で基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｆ）分析用に必要な物質を前記粒子に結合させる工程とを

包含する、方法。

（項目Ｃ２）

分析用センサを製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が単分散で基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより、凹部を形成する工程

Ｆ）分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程とを

包含する、方法。

（項目Ｃ３Ａ－１）

２．０×１０^{7}個／ｍｍ^{2}以下の密度の凹部を形成することによって、変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサを製造するための方法。

（項目Ｃ３Ａ－２）

１．０×１０^{10}個／ｍｍ^{2}以下の密度の凹部を形成することによって、変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサを製造するための方法。

（項目Ｃ３Ｂ）

基材上の面積占有率が最密充填以下である凹部を形成することによって、変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、前記項目のいずれか一項に記載の分析用センサを製造するための方法。

（項目Ｃ４Ａ）

前記単分散で配置する工程は、基材上に１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}の密度で前記粒子を配置する工程を含む、前記項目のいずれか一項に

記載に記載の方法。

（項目Ｃ４Ｂ）

前記単分散で配置する工程は、基材上に１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で前記粒子を配置する工程を含む、前記項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目Ｃ５Ａ）

前記凹部を形成する工程において、前記単分散した凹部が、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}の密度で存在する、前記項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目Ｃ５Ｂ）

前記凹部を形成する工程において、前記単分散した凹部が、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で存在する、前記項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目Ｃ６）

前記粒子を配置する工程は、スピンコート法、粒子を基材上に滴下する方法、粒子分散液中に基材を浸漬させる方法、粒子分散液中から基材を引き上げる方法、または粒子分散液をスプレーする方法を含む、前記項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目１）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体に単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態で配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材。

（項目２）

前記粒子が、凝集することなく配置されている、先行する項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目１Ａ）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体に凝集することなく配置された粒子とを含む、分析用センサ

作製用基材。

（項目２Ａ）

前記粒子が、単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態である、先行する項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目３）

前記粒子は、修飾物質が一体化した粒子を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目４）

前記基材は、さらにＣ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは前記対象に少なくとも一部、好ましくは分析用センサとして機能するという意味で適合する、凹部を有する、ポリマーマトリックスを含み、前記粒子は、該凹部に配置される、先行する項目のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

（項目５）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは検出対象に少なくとも一部適合する、凹部を有し、該粒子は、該凹部に凝集することなく配置される、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該粒子に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該粒子に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該粒子は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置される、凸型分析用センサ。

（項目６）

Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは検出対象に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該凹部に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該凹部に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該凹部は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に凝集することなく配置される、分析用センサ。

（項目７）

前記凹部が１×１０^{4}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{6}個／ｍｍ^{2}の密度で凝集することなく存在する、先行する項目のいずれか一項に記載に記載の分析用センサ。

（項目８）

凸型分析用センサ作製用基材を製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程とを

包含する、方法。

（項目９）

分析用センサ作製用基材を製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に、粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工

程とを

包含する、方法。

（項目１０）

前記凝集することなく配置されるように加える工程は、粒子を基材に１．０×１０^{0}個／μＬから１．０×１０^{10}個／μＬの濃度で、または基材の表面積当たり１．０×１０^{0}個／ｍｍ^{2}から１．０×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の量を加えることを包含する、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目１１）

凸型分析用センサを製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）分析用に必要な物質を前記粒子に結合させる工程とを

包含する、方法。

（項目１２）

分析用センサを製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより、凹部を形成する

工程

Ｆ）分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程とを

包含する、方法。

（項目１３）

１．０×１０^{10}個／ｍｍ^{2}以下の密度の凹部を形成することによって、標的物質検出における相対的蛍光強度変化の変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、先行する項目のいずれか一項に記載の分析用センサを製造するための方法。

（項目１４）

基材上の面積占有率が最密充填以下である凹部を形成することによって、標的物質検出における相対的蛍光強度変化の変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、先行する項目のいずれか一項に記載の分析用センサを製造するための方法。

（項目１５）

前記凝集することなく配置する工程は、基材上に１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で前記粒子を配置する工程を含む、先行する項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目１６）

前記粒子が、単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態である、先行する項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目１７）

前記凹部を形成する工程において、前記凹部が、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で存在する、先行する項目のいずれか一項に記載に記載の方法。

（項目１８）

前記粒子を配置する工程は、スピンコート法、粒子を基材上に滴下する方法、粒子分散液中に基材を浸漬させる方法、粒子分散液中から基材を引き上げる方法、または粒子分散液をスプレーする方法を含む、先行する項目のい

ずれか一項に記載に記載の方法。

[0007] 本開示において、上記１または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供されうることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

発明の効果

[0008] 本開示に関する技術を利用することで、分子インプリンティング技術を用いた標的分子の空孔を粒子で作製する技術において、単分散または単層な空孔が基材上に形成可能となり、空孔形成の再現性を上昇することができる。本開示の手法は、均一なセンサ基材を作製するために重要な基盤技術と位置付けられる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1-1]図１－１はポリマーＥ２のＮＭＲチャートを示す。

[図1-2]図１－２はポリマーＥ３のＮＭＲチャートを示す。

[図1-3]図１－３はポリマーＥ４のＮＭＲチャートを示す。

[図1-4]図１－４は、シリカ粒子と各ポリマーＥ２からＥ４とが一体化した粒子のＤＬＳ測定結果を示す。

[図1-5]図１－５は、シリカ粒子と各ポリマーＥ２からＥ４とが一体化した粒子のＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定結果を示す。

[図1-6]図１－６は、シリカ粒子とポリマー（Ｅ２－０）とが一体化した粒子のＤＬＳ測定結果およびＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定結果を示す。

[図2-1]図２－１は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。

[図2-2]図２－２は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡でのハイブリッドセルカウント解析結果を示す。

[図3-1]図３－１は、シリカ粒子と各ポリマーＥ４とが一体化した粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。

[図3-2]図３－２は、シリカ粒子と各ポリマーＥ３とが一体化した粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。

[図4]図４は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。（ガラス基材）

[図5-1]図５－１は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。（ポリスチレン粒子）

[図5-2]図５－２は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。（ポリスチレン粒子）

[図5-3]図５－３は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。（ポリスチレン粒子）

[図5-4]図５－４は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡でのハイブリッドセルカウント解析結果を示す。（ポリスチレン粒子）

[図6-1]図６－１は、実施例６の粒子固定化基材の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。

[図6-2]図６－２は、実施例６の基材上へのポリマー層重合後の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。

[図6-3]図６－３は、実施例６の基材のシリカナノ粒子除去後の蛍光顕微鏡での観察画像を示す。

[図6-4]図６－４は、粒子固定化基材の蛍光顕微鏡でのハイブリッドセルカウント解析結果を示す。

[図7]図７は、Ｈｉｓ－Ｔａｇポリマーとシリカナノ粒子の複合体を固定化した基板の蛍光顕微鏡画像を示す。

[図8]図８は、カチオンシリカナノ粒子とアニオンポリマーＥｘ８の複合体を固定化した基板の蛍光顕微鏡画像およびＳＥＭ画像を示す。

[図9]図９は、生分解性ナノ粒子を用いた粒子を固定化した基板の蛍光顕微鏡画像およびＳＥＭ画像を示す。

[図10-1]図１０－１は、シリカナノ粒子と芳香族成分を含むカチオンポリマーＥ２Ｐ２０の複合体を固定化した基板の蛍光顕微鏡画像およびＳＥＭ画像を示す。

[図10-2]図１０－２は、ポリスチレンナノ粒子と芳香族成分を含むカチオン

ポリマーＥ２Ｐ２０の複合体を固定化した基板の蛍光顕微鏡画像を示す。

[図11]図１１は、Ｈｉｓ－ｔａｇとチオール基を導入したシリカナノ粒子の固定化した基板の蛍光顕微鏡画像およびＳＥＭ画像を示す。

[図12]図１２は、粒子を用いずに作製したセンサの基材表面の蛍光強度変化を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に、本開示をさらに詳細に説明する。

[0011] 本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」等）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0012] （定義）

最初に本開示において使用される用語および一般的な技術を説明する。

[0013] 本明細書において「基材」とは、分析用センサの土台となる物質をいう。基材の材料は、例えば、金属、金属酸化物、ガラス、紙（セルロース）、布、二酸化ケイ素、シリコンおよび樹脂ならびにこれらの組合せからなる群から選択される材料であってよい。金属としては、金、銀、銅、アルミニウム、チタン、タングステン、およびモリブデン等が挙げられるが、これらに限定されない。樹脂としては、ポリ（メタ）アクリレート、ポリスチレン、ＡＢＳ（アクリロニトリル－ブタジエン－スチレン共重合体）、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリウレタン、シリコーン樹脂、フッ素樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、および塩化ビニル樹脂等が挙げられるが、

これらに限定されない。

[0014] 本明細書において「単分散」とは、分散系のなかで，分散相が均一な大きさになっているものをいい、分析用センサ作製用基材等の基材についていう場合、基材上に粒子が、実質的な均一に配置されていることをいう。単分散で配置されている場合、凝集することなく配置されており、有利である。単分散を実現するための密度としては、最終的な分析用センサにおいて意図される標的に依拠して変動することができ、好ましくは約10^3個／mm^2～約10^8個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^7個／mm^2、さらに好ましくは約10^4個／mm^2～約10^6個／mm^2である。密度の上限としては、例えば、約1×10^7個／mm^2、約9×10^6個／mm^2、約8×10^6個／mm^2、約7×10^6個／mm^2、約6×10^6個／mm^2、約5×10^6個／mm^2、約4×10^6個／mm^2、約3×10^6個／mm^2、約2×10^6個／mm^2、約1×10^6個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約$1\times$約10^4個／mm^2などを挙げることができるか、または好ましくは約10^3個／mm^2～約10^{10}個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^9個／mm^2、さらに好ましくは約10^4個／mm^2～約10^8個／mm^2である。密度の上限としては、例えば、約1×10^{10}個／mm^2、約9×10^9個／mm^2、約8×10^9個／mm^2、約7×10^9個／mm^2、約6×10^9個／mm^2、約5×10^9個／mm^2、約4×10^9個／mm^2、約3×10^9個／mm^2、約2×10^9個／mm^2、約1×10^9個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約$1\times$約10^4個／mm^2などを挙げることができる。

[0015] 本明細書において「単層」とは、粒子が重ならず一層になっているものをいう。単層で配置されている場合、凝集することなく配置されており、有利である。単層を実現するための密度としては、最終的な分析用センサにおいて意図される標的に依拠して変動することができ、好ましくは約10^3個／mm^2～約10^8個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^7個／mm^2、さらに好ましくは約10^4個／mm^2～約10^6個／mm^2である。密度の上限としては、例えば、約1×10^7個／mm^2、約9×10^6個／mm^2、約8×10^6個／mm^2、約7×10^6個／mm^2、約6×10^6個／mm^2、約5×10^6個／mm^2、約4×10^6個／mm^2、約3×10^6個／mm^2、約2×10^6個／mm^2、約1×10^6個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約$1\times$約10^4個／mm^2などを挙げることができるか、または好ましくは約10^3個／mm^2～約10^{10}個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^9個／mm^2、さらに好ましくは約10^4個／mm^2～約10^8個／mm^2である。密度の上限としては、例えば、約1×10^{10}個／mm^2、約9×10^9個／mm^2、約8×10^9個／mm^2、約7×10^9個／mm^2、約6×10^9個／mm^2、約5×10^9個／mm^2、約4×10^9個／mm^2、約3×10^9個／mm^2、約2×10^9個／mm^2、約1×10^9個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約$1\times$約10^4個／mm^2などを挙げることができる。

[0016] 本明細書において「凝集」とは、粒子についていうとき、複数の粒子が互いの引力によって集合することをいい、「凝集」が「ない」あるいは「凝集

無」とは、そのような凝集状態が実質的に（すなわち、検出限界以下で）存在しない状態で粒子が存在することをいう。凝集がないことは、代表的にはＳＥＭで測定したときに任意の方向に、重なって固定されている部分が、実質的にないことをいい、好ましくは、全体の１０％以下であり、より好ましくは５％以下、４％以下、３％以下、２％以下、１％以下であることをいう。ＳＥＭでの測定方法は以下の通りである：測定対象を真空乾燥後、金スパッタを施し、２０００倍以上の倍率となるように条件設定する。ＳＥＭで判断がつかない場合は、原子間力顕微鏡で観察することができる。本開示の技術を用いると、凝集なしに、粒子を基板に配置することができる。

[0017] 本明細書において「単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）」とは、代表的にはＳＥＭで測定したときに３次元的に重なって固定されている部分が、実質的にないことをいい、好ましくは、全体の１０％以下であり、より好ましくは５％以下、４％以下、３％以下、２％以下、１％以下であることをいう。単層かどうかは、好ましくは、複数地点を対象に行い、好ましくは、ｎ＝５，より好ましくはｎ＝１０またはそれ以上の地点を対象に測定し、それらの平均を計算することで判定する。単層の判断も、測定対象を真空乾燥後、金スパッタを施し、２０００倍以上の倍率となるように条件設定することができ、単層の判断についても、ＳＥＭで判断がつかない場合は、原子間力顕微鏡で観察することができる。本開示の技術を用いると、単層で、粒子を基板に配置することができる。

[0018] 本明細書において「粒子」とは、分析用センサにおいて基材に設けられる凹部の形成のための鋳型となる構造を持つ基本的な物質をいい、生体分子を含む物質であってもよいし、粒子コアを含む物質（例えば、粒子コアと修飾物質を含む物質）であってもよい。個々で粒子は、通常、分析用センサに使用される物質を含む。粒子コアは、分子インプリントにおける鋳型として用いることができる限度において特に限定されず、人工的に製造された無機粒子及び有機粒子が含まれる。サイズがｎｍの範囲にある場合は、粒子コアということがあるが、本開示においては厳密には区別されず、粒子コアといっ

た場合も、特にサイズを限定することを意図して論じることでない限り、より大きなあるいはより小さなコア構造をもつものも除外しないことが理解される。例えば、無機粒子としては、金属、金属の酸化物、窒化物、フッ化物、硫化物、ホウ化物、及びそれらの複合化合物、ならびに、ハイドロキシアパタイト等が挙げられ、好ましくは、二酸化珪素（シリカ）が挙げられる。また、有機粒子としては、ラテックス硬化物、デキストラン、キトサン、ポリ乳酸、ポリ（メタ）アクリル酸、ポリスチレン、ポリエチレンイミン等が挙げられるが、これらに限定されない。また生体分子または粒子コアの表面に結合性官能基が結合した粒子であってもよい。粒子のサイズとしては、最終的な分析用センサにおいて意図される標的に依拠して変動することができ、約１ｎｍ～約１００μｍ、約１ｎｍ～約２０ｎｍ、約２０ｎｍ～約５００ｎｍ、約５０ｎｍ～約２００ｎｍ、約１００ｎｍ～約５００ｎｍ、約１μｍ～約１０μｍ、約１０μｍ～約１００μｍなどを挙げることができるが、これに限定されない。本開示で用いられる粒子は、修飾物質が粒子コアに一体化した粒子でもよい。

[0019] 本明細書において「修飾物質」とは、分析用センサまたは分析用センサ製造用基材において、意図される機能を直接または間接的に付与するための持つ物質であり、そのような機能付与のため、種々の官能基を含みうるか、あるいは構造内に様々な官能基を含むことができるような構造をしている。本開示において、修飾物質は、有利には、粒子コアと相互作用可能な物質であり、好ましくは、基材を損傷しない条件で分離可能な相互作用で粒子コアと一体化することができるか、および／または粒子コアを損傷しない条件で分離可能な相互作用で粒子コアと一体化することができる物質である。修飾物質としては、以下が代表的であり、より詳細には、本明細書の他の場所において詳述されているポリイソプロピルアクリルアミド共重合体、ポリ（メタ）アクリルアミド共重合体、ポリ乳酸誘導体、ポリ（メタ）アクリル酸共重合体、ポリ（メタ）アクリル酸メチル共重合体、ポリヒドトキシエチル（メタ）アクリレート共重合体、キトサン誘導体、およびポリリジン誘導体なら

びにこれらの組合せ等が挙げられるが、これらに限定されない。また１種または複数種の修飾物質が、粒子コアと一体化してもよい。

[0020] 本明細書において「一体化」とは、一般に、物質同士がひとまとまとまりになっていることをいい、修飾物質と粒子コアについて言及するとき、分析用センサまたは分析用センサ製造用基材の製造における環境において、「粒子コアを損傷しない条件で分離可能」および／または「基材を損傷しない条件で分離可能」な条件に供する場合以外に解離しない状態にあればどのような作用によって一体化してもよい。そのような作用として、共有結合または非共有結合を挙げることができる。

[0021] 本明細書において「分析用センサに使用される物質」としては、分析用センサまたはそれを作製する過程において直接または間接に使用される物質であって、標的物質に対する特異的結合性分子の結合用基を含む物質、可逆的連結基を含む物質、シグナル物質の結合用基などを挙げることができるがこれらに限定されない。

[0022] 本明細書において「分析用センサ作製用基材」とは、分析用センサの作製をするための任意の基材を言い、形状および材質は分析用センサに適切な限り任意のものを使用することができる。好ましくは、分析用センサ作製用基は、凹部を有する基材であり、ここで、凹部に特異的結合性分子の結合用基およびシグナル物質の結合用基を修飾することによって、ユーザが、検出対象をより一層感度高く検出可能なセンサへ簡便にカスタマイズできるように構成されていることが有利である。本明細書において「分析用センサ作製用基材」は「測定基材」ともいう。

[0023] 本明細書において「密度」とは、単位面積あたりに存在する物質の個数をいう。例えば、個／ｍｍ^{2}は、１ｍｍ^{2}当たりに存在する物質の個数をいう。密度の測定方法は任意であるが、例えば、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡で表面を観察した結果から測定装置付随の解析ソフトやＩｍａｇｅ　Ｊ（ｈｔｔｐｓ：／／ｉｍａｇｅｊ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｊ／）といったフリー画像解析ソフトの粒子数計測機能を用いて、密度を測定することができる。

[0024] 本明細書において「修飾物質一体化粒子」とは、修飾物質が粒子コアに一体化している粒子を言い、分子インプリント凹部内に結合用基を配置するための基を有する物質が、粒子と一体化している粒子をいう。

[0025] 本明細書において「基」とは、別途指定されない限り、一価基を意味する。一価基でない例としては、アルキレン基（２価）等が挙げられる。また、本明細書において使用される場合、「基」なる用語を省略する場合もある。

[0026] 本明細書において「可逆的連結基」とは、切断（開裂）および結合が可逆的である直接結合又は二価以上の基をいう。具体例としては、下記表１Ａの１－３に示す基が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0027]

[表1A-1]

1－1	1－2	1－3	1－4
結合性官能基	対応する結合性官能基	可逆的連結基	可逆部分の結合の様式
（標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基）	（結合性基）	（可逆的連結基）	
（シグナル物質の結合用基）	（結合性基）		
チオール基、ジスルフィド基、ピリジルジスルフィド基	チオール基、ジスルフィド基、ピリジルジスルフィド基	ジスルフィド基	共有結合
ボロニル基	糖基	ボロン酸環状エステル	共有結合
ボロニル基	cis ジオール基	ボロン酸環状エステル	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	アミノ基	イミノ結合基	共有結合
アミノ基	カルボニル基・アルデヒド基		
カルボキシル基	ヒドロキシル基	カルボン酸エステル基	共有結合
ヒドロキシル基	カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基		
カルボキシル基	チオール基	カルボン酸チオエステル基	共有結合
チオール基	カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基		
アミノオキシ基	カルボキシ基・アルデヒド基	オキシム基	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	アミノオキシ基		
カルボキシ基・アルデヒド基	ヒドロキシル基	アセタール基	共有結合
ヒドロキシル基	カルボキシ基・アルデヒド基		

[0028]

[表1A-2]

金属錯体 (Ni-NTA(ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基)等)	ポリヒスチジン(His)タグ (6×His, 8×His,10×His等)	配位結合	非共有結合
塩基性基 （アミノ基、環状2級アミノ基（たとえば、ピロリジル基）、ピペリジ基、ピリジル基、イミダゾール基、グアニジン基等）、	酸性基 （カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基等）	水素結合	非共有結合
水酸基			
酸性基	塩基性基		非共有結合
（カルボキシル基等）	（アミノ基、環状2級アミノ基 （たとえば、ピロリジル基、ピペリジ基）、 ピリジル基、イミダゾール基、グアニジン基等）、水酸基		
芳香族基 （アミノフェニル基等のフェニル基、アミノナフチル基等のナフチル基、ピリジル基等）	芳香族基 （アミノフェニル基等のフェニル基、アミノナフチル基等のナフチル基、ピリジル基等）	疎水結合	非共有結合
ヒドラジド	カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラゾン結合基	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラジド		
アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)	ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)	アビジン−ビオチン結合	非共有結合
ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)	アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)		
グルタチオン(GSH)	グルタチオン−S−トランスフェラーゼ(GST)	グルタチオン(GSH)−グルタチオン−S−トランス	非共有結合

[0029]

[表1A-3]

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)	グルタチオン(GSH)	フェラーゼ(GST)結合	
Phos-tag	リン酸イオン	配位結合	非共有結合
リン酸イオン	Phos-tag		

[0030] 本明細書において「ポリマーマトリックス」とは、マトリクスを形成するポリマーを言い、通常モノマーが重合してできた物質をいう。有利には、マトリクスは、本開示の分析用センサまたは分析用センサ用基材において配置されるとき、センサに適している形状および構造を有していればどのような形状または構造であってもよい。マトリクスの形状または構造は、例えば薄膜状または球状（粒子状）である。マトリックスの好ましい構成としては、標的以外のものの吸着をできるだけ抑制するため、生体適合性の高いものが主成分である。

[0031] 本明細書において「分子インプリントポリマー」とは、分子インプリント技術に用いられる任意のポリマーを言い（Ｔａｋｅｕｃｈｉ Ｔ．ｅｔ．ａｌ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ，２０１６，３７（２），４３－６４．を参照）、好ましくは、標的物質またはその誘導体と機能性モノマーの複合体を共有結合および／または非共有結合にて形成し，架橋剤とともに重合した後，標的物質を除去することで得られる標的物質に対する結合空間を持つ物質認識材料をいう。

[0032] 本明細書において「対象に…少なくとも一部適合する」とは、分析用センサにおいて用いられる場合に、対象となる分子の検出または分析を実質的に可能とするような形状および／または構造を有することをいい、本開示の分析用センサにおいて用いられる場合、凹部内に対象となる分子が相互作用することができる形状をいう。理論に束縛されることを望まないが、ポリマーマトリックスが形成されているとすれば、理論的には粒子コアの高さの半分以下に対応する膜厚の中に最適なものがあり得る。

[0033] 本明細書において「凹部」とは、本開示の分析用センサにおいて用いられる場合、標的を捕捉するように形成される空隙または空孔を言い、好ましく

は、分析用センサにおいて形成されるポリマーマトリックス上に形成される空孔部をいう。

[0034] 本明細書において「結合用基」とは、物質と結合することができる基をいう。例えば、本明細書において、シグナル物質の結合用基および特異的結合性分子の結合用基等が用いられる。

[0035] 本明細書において「シグナル物質の結合用基」とは、シグナル物質を修飾することができる基をいう。シグナル物質としては、蛍光分子、放射性元素含有物質、磁性物質等が挙げられる。検出容易性等の観点から、シグナル物質としては蛍光物質であることが好ましい。シグナル物質の結合用基は、例えば、表２Ａの２－１に挙げられる結合性官能基があげられる。

[0036] [表2A-1]

2-1	2-2
結合性官能基	対応する結合性官能基
（標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基）	（結合性基）
（シグナル物質の結合用基結合性基）	（結合性基）
アミノ基（１価アミノ基，２価アミノ基等）	カルボン酸活性エステル基（N-ヒドロキシスクシンイミド，ニトロフェノール，ペンタフルオロフェノールなどを用いた活性エステル基；NHS カルバメートなどのカルバミン酸活性エステル基）；カルボキシル基；アルデヒド基；イソシアネート基；イソチオシアネート基；エポキシ基;マレイミド基等
アミノ基	カルボキシル基
カルボキシル基	アミノ基
糖基（cis ジオール基）	ボロニル基
ボロニル基	糖基（cis ジオール基）

[0037]

[表2A-2]

チオール基	マレイミド基、アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ピリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等
マレイミド基、アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ピリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等	チオール基
カルボニル基・アルデヒド基	アミノ基
アミノ基	カルボニル基・アルデヒド基
アミノオキシ基	カルボニル基・アルデヒド基
カルボニル基・アルデヒド基	アミノオキシ基
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドロキシル基
ヒドロキシル基	カルボニル基・アルデヒド基
水酸基、フェノール性水酸基	カルボン酸活性エステル基
金属錯体 (Ni-NTA(ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基)等)	ポリヒスチジン(His)タグ (6×His, 8×His,10×His 等)
ヒドラジド基	カルボニル基・アルデヒド基
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラジド
アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)	ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)
ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)	アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)
グルタチオン(GSH)	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	グルタチオン(GSH)

[0038] 本明細書において「特異的結合性分子の結合用基」とは、標的物質に対して特異的に結合することができる特異的結合性分子を結合することができる基をいう。標的物質に対する特異的結合性分子の結合用基は、例えば、表３Ａの２－１に挙げられる結合性官能基があげられる。

[0039] [表3A-1]

2-1	2-2
結合性官能基	対応する結合性官能基
（標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基）	（結合性基）
（シグナル物質の結合用基結合性基）	（結合性基）
アミノ基（1価アミノ基，2価アミノ基等）	カルボン酸活性エステル基（N-ヒドロキシスクシンイミド，ニトロフェノール，ペンタフルオロフェノールなどを用いた活性エステル基；NHS カルバメートなどのカルバミン酸活性エステル基）；カルボキシル基；アルデヒド基；イソシアネート基；イソチオシアネート基；エポキシ基;マレイミド基等
アミノ基	カルボキシル基
カルボキシル基	アミノ基
糖基（cis ジオール基）	ボロニル基
ボロニル基	糖基（cis ジオール基）
チオール基	マレイミド基，アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ピリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等
マレイミド基，アクリル酸エステル基などの電子不足の不飽和炭素基；ヨードアセトアミド基；チオール基；ピリジルジスルフィド基；ラジカル付加系クリックケミストリーのためのアルケン（ビニルスルホン）・アルキン基；ネイティブ・ケミカル・ライゲーション法のためのチオエステル基等	チオール基

[0040]

[表3A-2]

カルボニル基・アルデヒド基	アミノ基
アミノ基	カルボニル基・アルデヒド基
アミノオキシ基	カルボニル基・アルデヒド基
カルボニル基・アルデヒド基	アミノオキシ基
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドロキシル基
ヒドロキシル基	カルボニル基・アルデヒド基
水酸基，フェノール性水酸基	カルボン酸活性エステル基
金属錯体 (Ni-NTA(ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基)等)	ポリヒスチジン(His)タグ (6×His, 8×His,10×His等)
ヒドラジド基	カルボニル基・アルデヒド基
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラジド
アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)	ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)
ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)	アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)
グルタチオン(GSH)	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	グルタチオン(GSH)

[0041] 本明細書において「ポリマーマトリクスの原料」とは、反応させることによってポリマーマトリックスを形成することができる原料をいう。一般に、ポリマーマトリクスを形成するためには、少なくとも１種のモノマーと少なくとも１種の適切な重合開始剤とを含むことで十分であるが、これら以外にも、例えば、追加のモノマー（一部重合していてもよい）、追加の重合開始剤、架橋剤、ＲＡＦＴ剤、触媒、還元剤または溶媒等を含むことができる。モノマーとしては、スチレン、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド、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が、これらに限定されない。重合開始剤としては、２，２´－アゾビス（イソブチロニトリル）（ＡＩＢＮ）、α－ブロモイソ酪酸エチル等が挙げられるが、これらに限定されない。架橋剤は、メラミン化合物、グアナミン化合物、グリコールウリル化合物、Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド、および（トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ポリ）エチレングリコールジメタクリレート等が挙げ

られるが、これらに限定されない。ＲＡＦＴ剤としては、ベンゾジチオ酸ベンジル、２－シアノ－２－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］プロパン等が挙げられるが、これらに限定されない。触媒としては、$CuBr_2$等が挙げられるが、これらに限定されない。還元剤としては、アスコルビン酸等が挙げられるが、これらに限定されない。溶媒としては、一般的に溶媒として知られているものから特に制限なく選択され、例えば純水、緩衝液、ＭｅＯＨ、ＥｔＯＨ、ＤＭＡおよびＤＭＦ等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0042] 本明細書において「ポリマーマトリクス（の原料）が重合する」とは、ポリマーマトリクスの原料が存在する場合、ポリマーマトリックス（の原料）を重合することをいう。

[0043] 本明細書において「粒子が解離する条件」とは、基材上に配置されていた粒子を基材と粒子との相互作用を切断することにより、基材と粒子を剥離することができる条件をいう。例えば、加温、冷却、ｐＨの調製（酸処理、アルカリ処理）、界面活性剤含有溶液での洗浄、超音波照射、光照射、振盪、および還元処理を挙げることができる。

[0044] 本明細書において「分析用に必要な物質」とは、標的物質を捕捉し、検出することができる物質をいう。例えば、捕捉剤、標識等があげられる。捕捉剤とは、測定対象を捕捉するための任意の薬剤を言い、例えば、抗体、抗体断片、抗体ミメティック、核酸アプタマー（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ペプチド核酸、人工核酸含む）、リン脂質認識タンパク質、およびレクチン挙げることができる。

[0045] 本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（例えば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、ＲＩ（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。本開示において、マーカーまたはそれを捕捉する因子または手段を複数（２以上）、蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。

蛍光発光極大波長の差は、１０ｎｍ以上であることが好ましい。リガンドを標識する場合、機能に影響を与えないものならば何れも用いることができるが、蛍光物質としては、Ａｌｅｘａ™Ｆｌｕｏｒ 、ＢＯＤＩＰＹ、ＡＴＴＯ、量子ドット（ＱＤｏｔ）および蛍光タンパク質（ＧＦＰ， ＹＦＰ，ｍＣｈｅｒｒｙなど）が例示される。Ａｌｅｘａ™Ｆｌｕｏｒは、クマリン、ローダミン、フルオレセイン、シアニンなどを修飾して得られた水溶性の蛍光色素であり、広範囲の蛍光波長に対応したシリーズであり、他の該当波長の蛍光色素に比べ、非常に安定で、明るく、またｐＨ感受性が低い。蛍光極大波長が１０ｎｍ以上ある蛍光色素の組み合わせとしては、Ａｌｅｘａ™５５５とＡｌｅｘａ™６３３の組み合わせ、Ａｌｅｘａ™４８８とＡｌｅｘａ™５５５の組み合わせ等を挙げることができる。核酸を標識する場合は、その塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、ＣｙＤｙｅＴＭシリーズのＣｙ３、Ｃｙ５等）、ローダミン６Ｇ試薬、２－アセチルアミノフルオレン（ＡＡＦ）、ＡＡＩＦ（ＡＡＦのヨウ素誘導体）等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が１０ｎｍ以上である蛍光物質としては、例えば、Ｃｙ５とローダミン６Ｇ試薬との組み合わせ、Ｃｙ３とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン６Ｇ試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本開示では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

[0046] 本明細書において「変動係数がＸＸ以下」とは、本開示の分析用センサの標的物質検出における変動係数が一定の値であることをいう。変動係数は、標準偏差／平均値で測定することができる。本開示では、変動係数が５０％以下、４０％以下、３０％以下、２０％以下あるいは１０％以下であり得、２０％以下が一つの好ましい実施形態であり得る。変動係数は、基板内および／または基板間のものであり得、両方を満たしていてもよい。

[0047] 本明細書において「ＹＹ以上の割合で」とは、ある数値以上の性能を有する本開示の分析用センサが、ＹＹ以上の割合で作製できることをいう。本明細書において性能は、例えば、蛍光検出器付き自動分注装置（システムインスツルメンツ株式会社製）を用いて測定するか、または標的物質検出における変動係数を用いて測定することができる。本開示では、８０％以上の割合で作製できることが好ましい。

[0048] 本明細書において「基材上（の）ＸＸからＹＹ個／ｍｍ^{2}の密度」とは、基材上に配置されている粒子または凹部の密度が、ＸＸからＹＹ個／ｍｍ^{2}の範囲にあることをいう。本明細書において、密度は、蛍光顕微鏡または走査型電子顕微鏡を用いて測定する。

[0049] 本明細書において「スピンコート法」とは、平滑な基材を高速回転させる事により遠心力で薄膜を構成する装置を用いて、粒子を溶媒に分散させた粒子分散液を基板上に添加後、基材ごと回転することにより、粒子を基材上に塗布する方法をいう。

[0050] 本明細書において「粒子を基材上に滴下する方法」とは、粒子を溶媒に分散させた粒子分散液を基板上に滴下することにより、粒子を基材上塗布する方法をいう。

[0051] 本明細書において「粒子分散液中に基材を浸漬させる方法」とは、粒子を溶媒に分散させた粒子分散液に基板上を浸潤させることにより、粒子を基材上塗布する方法をいう。

[0052] 本明細書において「粒子分散液中から基材を引き上げる方法」とは、粒子を溶媒に分散させた粒子分散液から基材を垂直に引き上げることにより、粒子を基材上塗布する方法をいう。

[0053] 本明細書において「粒子分散液をスプレーする方法」とは、粒子を溶媒に分散させた粒子分散液を基材にスプレーすることにより、粒子を基材上塗布する方法をいう。

[0054] 本明細書において「シグナル物質」とは、標的物質を検出することができる物質をいい、「標識」と同義で用いられる。例えば、蛍光分子、放射性元

素含有物質、磁性物質等が挙げられる。検出容易性等の観点から、シグナル物質としては蛍光物質であることが好ましい。

[0055] 本明細書において「特異的」とは、親和性についていう場合、標的分子に対して、それ以外の物質より、高い親和性で、相互作用することを言い、好ましくは、それ以外の物質とは相互作用をしないことをいい、後者は狭義の特異的あるいは選択的に特異的などともいう。特異性は、各種分子間相互作用解析装置を用いて判定することができる。例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）や等温滴定カロリメトリー（ＩＴＣ）、水晶振動子マクロバランス法（ＱＣＭ）を用いた各種分析装置で測定が可能である。

[0056] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0057] ＜分析用センサ作製用基材＞

一つの局面において、本開示は、Ａ）基材と、Ｂ）該基材に単分散で配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材を提供する。この基材は、単分散で配置された粒子を備えた形で基材が製造されることで、安定性、効率、性能、再現性などで優れた性質を示す。

[0058] 一つの局面において、本開示は、Ａ）基材と、Ｂ）該基材に凝集することなく配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材を提供する。この基材は、凝集することなく配置された粒子を備えた形で基材が製造されることで、安定性、効率、性能、再現性などで優れた性質を示す。

[0059] 一つの局面において、本開示は、Ａ）基材と、Ｂ）該基材に単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態で配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材を提供する。この基材は、単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態

で配置された粒子を備えた形で基材が製造されることで、安定性、効率、性能、再現性などで優れた性質を示す。

[0060] 別の局面において、本開示は、Ａ）基材と、Ｂ）粒子を、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{6}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材に配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材を提供する。この基材は、特定の密度で配置された粒子を備えた形で基材が製造されることで、安定性、効率、性能、再現性などで優れた性質を示す。

[0061] 本開示において使用される基材の材料は、例えば、金属、金属酸化物、ガラス、紙（セルロース）、布、二酸化ケイ素、シリコンおよび樹脂ならびにこれらの組合せからなる群から選択される材料であってよい。金属としては、金、銀、銅、アルミニウム、チタン、タングステン、モリブデン等が挙げられる。樹脂としては、ポリ（メタ）アクリレート、ポリスチレン、ＡＢＳ（アクリロニトリル－ブタジエン－スチレン共重合体）、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリウレタン、シリコーン樹脂、フッ素樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂等が挙げられる。

[0062] 本開示において使用される基材は、上述の材料から選ばれる複数の材料が組み合わされて形成されたものであってもよい。例えば、基材は、ガラスまたは樹脂の表面に、金属膜が設けられたものであってもよい。また、基材の形状としては、板状及び粒子状を問わない。好ましい例としては、金基材、ガラス基材、金ナノ粒子、二酸化珪素粒子（シリカ粒子、ガラスビーズ等）等が挙げられる。

[0063] 本開示において使用される粒子としては、生体分子であってもよいし、粒子コアであってもよい。粒子コアは、分子インプリントにおける鋳型として用いることができる限度において特に限定されず、人工的に製造された無機粒子及び有機粒子が挙げられる。無機粒子としては、金属（金、銀、プラチナ、スズドープ酸化インジウム（ＩＴＯ）、アンチモンドープ酸化スズ（ＡＴＯ）など）、金属の酸化物（酸化鉄、酸化アルミニウム、酸化銅、酸化チ

タン、酸化亜鉛、酸化ジルコニウム、酸化セリウム、酸化コバルトなど）、グラフェン、酸化グラフェン、カーボンナノチューブ、ナノダイヤモンド、窒化物、フッ化物、硫化物、ホウ化物、およびそれらの複合化合物、ならびに、ハイドロキシアパタイト等が挙げられ、好ましくは、二酸化珪素（シリカ）が挙げられる。また、有機粒子としては、ラテックス硬化物、デキストラン、キトサン、ポリ乳酸、ポリ（メタ）アクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ＰＬＧＡ（ｐｏｌｙ（ｌａｃｔｉｃ－ｃｏ－ｇｌｙｃｏｌｉｃ ａｃｉｄ）ポリ乳酸・グリコール酸共重合体）、ポリスチレン、ポリエチレンイミン等が挙げられる。また生体分子または粒子コアの表面に結合性官能基が結合した粒子であってもよい。

[0064] 本開示の基材表面上に存在する粒子密度は、粒子を配置する際の、配置する手法、粒子を分散させる溶媒、粒子濃度、粒子分散液の量および粒子分散液の温度等を適宜調製することにより制御可能である。基材表面上に存在する粒子密度を制御することにより、分析センサの凹部の密度も制御することが可能になり、安定性、効率、性能などで優れた性質を示す分析用センサを作製することができる。

[0065] 一つの実施形態において、本開示の粒子は、修飾物質一体化粒子が、好ましくは約10^3個／mm^2～約10^8個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^7個／mm^2、さらに好ましくは約10^4個／mm^2～約10^6個／mm^2の密度で配置される。密度の上限としては、例えば、約1×10^7個／mm^2、約9×10^6個／mm^2、約8×10^6個／mm^2、約7×10^6個／mm^2、約6×10^6個／mm^2、約5×10^6個／mm^2、約4×10^6個／mm^2、約3×10^6個／mm^2、約2×10^6個／mm^2、約1×10^6個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約1×10^4個／mm^2などを挙げることができるか、または好ましくは約10^3個／mm^2～約10^{10}個／m

m^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^9個／mm^2、さらに好ましくは約10^4個／mm^2～約10^8個／mm^2の密度で配置される。密度の上限としては、例えば、約1×10^{10}個／mm^2、約9×10^9個／mm^2、約8×10^9個／mm^2、約7×10^9個／mm^2、約6×10^9個／mm^2、約5×10^9個／mm^2、約4×10^9個／mm^2、約3×10^9個／mm^2、約2×10^9個／mm^2、約1×10^9個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約1×10^4個／mm^2などを挙げることができる。

[0066] １つの実施形態では、本開示に用いられる粒子は、分析用センサに使用される物質を含む。分析用センサに使用される物質は、測定用に必要な物質であることができ、検出することができる物質をいう。例えば、捕捉剤、標識等があげられる。捕捉剤とは、測定対象を捕捉するための任意の薬剤を言い、例えば、抗体、抗体断片、抗体ミメティック、核酸アプタマー（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ペプチド核酸、人工核酸含む）、リン脂質認識タンパク質、およびレクチンを挙げることができる。

[0067] 好ましい実施形態では、粒子は、修飾物質が一体化した粒子を含む。

[0068] 別の局面において、本開示は、前記粒子および基材の他、Ｃ）必要に応じて、該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスを含み、前記粒子は、該凹部に配置される。この分析用センサ作製用基材は、本明細書における他の個所、例えば＜分析用センサ＞＜分析用センサ作製用基材製造法＞などの項に記載される任意の実施形態を採用することができることが理解される。

[0069] ＜分析用センサ＞

別の局面において、本開示は、Ａ）基材本体と、Ｂ）必要に応じて、該基

材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する凹部を有し、該粒子は、該凹部に配置される、ポリマーマトリックスと、C）該粒子に配置されたシグナル物質の結合用基とD）該粒子に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含む分析用センサを提供する。このセンサは、本明細書における他の個所、例えば分析用センサ作製用基材などの項に記載される任意の実施形態を採用することができることが理解される。

[0070] 一つの実施形態では、本開示において使用される粒子は、10^3個／mm^2～10^8個／mm^2の密度で該基材本体に配置されることが好ましい。好ましくは約10^3個／mm^2～約10^7個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^7個／mm^2、さらに好ましくは約10^5個／mm^2～約10^6個／mm^2である。密度の上限としては、例えば、約1×10^7個／mm^2、約9×10^6個／mm^2、約8×10^6個／mm^2、約7×10^6個／mm^2、約6×10^6個／mm^2、約5×10^6個／mm^2、約4×10^6個／mm^2、約3×10^6個／mm^2、約2×10^6個／mm^2、約1×10^6個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10^3個／mm^2、約6×10^3個／mm^2、約7×10^3個／mm^2、約8×10^3個／mm^2、約9×10^3個／mm^2、約1×10^4個／mm^2などを挙げることができるか、または10^{10}個／mm^2の密度で該基材本体に配置されることが好ましい。好ましくは約10^3個／mm^2～約10^9個／mm^2、より好ましくは約10^4個／mm^2～約10^8個／mm^2、さらに好ましくは約10^5個／mm^2～約10^7個／mm^2である。密度の上限としては、例えば、約1×10^{10}個／mm^2、約9×10^9個／mm^2、約8×10^9個／mm^2、約7×10^9個／mm^2、約6×10^9個／mm^2、約5×10^9個／mm^2、約4×10^9個／mm^2、約3×10^9個／mm^2、約2×10^9個／mm^2、約1×10^9個／mm^2などを挙げることができ、下限としては、例えば、約1×10^3個／mm^2、約2×10^3個／mm^2、約3×10^3個／mm^2、約4×10^3個／mm^2、約5×10

^{3}個／ｍｍ^{2}、約６×１０^{3}個／ｍｍ^{2}、約７×１０^{3}個／ｍｍ^{2}、約８×１０^{3}個／ｍｍ^{2}、約９×１０^{3}個／ｍｍ^{2}、約１×１０^{4}個／ｍｍ^{2}などを挙げることができる。密度が範囲より小さい場合、検出対象を検出するのに十分な感度で測定することができず、密度が範囲より大きい場合、粒子が凝集してしまい、再現性良くセンサを作製することができない場合がある。単分散した、または凝集していない凹部の好ましい密度としては１０^{4}個／ｍｍ^{2}～１０^{6}個／ｍｍ^{2}を挙げることができる。

[0071] ＜分析用センサ作製用基材および分析用センサ製造法＞

別の局面において、本開示は、分析用センサ作製用基材を製造するための方法を提供する。この方法は、Ａ）本開示の粒子を提供する工程と、Ｂ）該粒子を基材に粒子が単分散で基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）必要に応じて、該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、Ｄ）必要に応じて、該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工程とを包含する。

[0072] 別の局面において、本開示は、分析用センサ作製用基材を製造するための方法を提供する。この方法は、Ａ）本開示の粒子を提供する工程と、Ｂ）該粒子を基材に粒子が凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）必要に応じて、該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、Ｄ）必要に応じて、該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工程とを包含する。

[0073] 別の局面において、本開示は、分析用センサ作製用基材を製造するための方法を提供する。この方法は、Ａ）本開示の粒子を提供する工程と、Ｂ）該粒子を基材に粒子が単層で基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）必要に応じて、該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を

提供する工程と、Ｄ）必要に応じて、該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工程とを包含する。

[0074] 本開示において、単分散で、および／または、凝集することなく、および／または単層で配置されるように加える工程は、単分散で、および／または、凝集することなく、および／または単層で配置された粒子が、ポリマーマトリクスを重合した後もなおその状態を保っているように加えられることが好ましい。適切な修飾物質を提供し、および／または適切な条件を設定することで、分散性が適切に維持ないし改変されることによって、ポリマーマトリクスを重合した後もなおその状態を保つことができ、当業者は、本明細書中の実施例などに記載される内容に基づいて、適宜実施することができる。

[0075] 具体的には、本開示において、単分散で、および／または、凝集することなく、および／または単層で配置されるように加える工程は、粒子を基材に１０×１０^{0}個／μＬから２．５×１０^{10}個／μＬの濃度で、または基材の表面積当たり１．０×１０^{0}個／ｍｍ^{2}から２．５×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の量を加えることを包含する。濃度の上限としては、例えば、約１×１０^{10}個／μＬ、約９×１０^{9}個／μＬ、約８×１０^{9}個／μＬ、約７×１０^{9}個／μＬ、約６×１０^{9}個／μＬ、約５×１０^{9}個／μＬ、約４×１０^{9}個／μＬ、約３×１０^{9}個／μＬ、約２×１０^{9}個／μＬ、約１×１０^{9}個／μＬ、約９×１０^{8}個／μＬ、約８×１０^{8}個／μＬ、約７×１０^{8}個／μＬ、約６×１０^{8}個／μＬ、約５×１０^{8}個／μＬ、約４×１０^{8}個／μＬ、約３×１０^{8}個／μＬ、約２×１０^{8}個／μＬ、約１×１０^{8}個／μＬ、約１×１０^{8}個／μＬ、約９×１０^{7}個／μＬ、約８×１０^{7}個／μＬ、約７×１０^{7}個／μＬ、約６×１０^{7}個／μＬ、約５×１０^{7}個／μＬ、約４×１０^{7}個／μＬ、約３×１０^{7}個／μＬ、約２×１０^{7}個／μＬ、約１×１０^{7}個／μＬ、約９×１０^{6}個／μＬ、約８×１０^{6}個／μＬ、約７×１０^{6}個／μＬ、約６×１０^{6}個／μＬ、約５×１０^{6}個／μＬ、約４×１０^{6}個／μＬ、約３×１０^{6}個／μＬ、約２×１０^{6}個／μＬ、

約１×１０^{6}個／μＬ、約９×１０^{5}個／μＬ、約８×１０^{5}個／μＬ、約７×１０^{5}個／μＬ、約６×１０^{5}個／μＬ、約５×１０^{5}個／μＬ、約４×１０^{5}個／μＬ、約３×１０^{5}個／μＬ、約２×１０^{5}個／μＬ、約１×１０^{5}個／μＬなどを挙げることができ、下限としては、例えば、約１×１０^{0}個／μＬ、約２×１０^{0}個／μＬ、約３×１０^{0}個／μＬ、約４×１０^{0}個／μＬ、約５×１０^{0}個／μＬ、約６×１０^{0}個／μＬ、約７×１０^{0}個／μＬ、約８×１０^{0}個／μＬ、約９×１０^{0}個／μＬ、約１×１０^{1}個／μＬ、約２×１０^{1}個／μＬ、約３×１０^{1}個／μＬ、約４×１０^{1}個／μＬ、約５×１０^{1}個／μＬ、約６×１０^{1}個／μＬ、約７×１０^{1}個／μＬ、約８×１０^{1}個／μＬ、約９×１０^{1}個／μＬ、約１×１０^{2}個／μＬ、約２×１０^{2}個／μＬ、約３×１０^{2}個／μＬ、約４×１０^{2}個／μＬ、約５×１０^{2}個／μＬ、約６×１０^{2}個／μＬ、約７×１０^{2}個／μＬ、約８×１０^{2}個／μＬ、約９×１０^{2}個／μＬ、約１×１０^{3}個／μＬ、約２×１０^{3}個／μＬ、約３×１０^{3}個／μＬ、約４×１０^{3}個／μＬ、約５×１０^{3}個／μＬ、約６×１０^{3}個／μＬ、約７×１０^{3}個／μＬ、約８×１０^{3}個／μＬ、約９×１０^{3}個／μＬ、約１×１０^{4}個／μＬ、約２×１０^{4}個／μＬ、約３×１０^{4}個／μＬ、約４×１０^{4}個／μＬ、約５×１０^{4}個／μＬ、約６×１０^{4}個／μＬ、約７×１０^{4}個／μＬ、約８×１０^{4}個／μＬ、約９×１０^{4}個／μＬ、約１×１０^{5}個／μＬなどを挙げることができる。単位ｍｍ^{2}の表面積の基材当たりの量の上限としては、例えば、約１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}、約９×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約８×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約７×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約６×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約５×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約４×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約３×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約２×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約１×１０^{9}個／ｍｍ^{2}、約９×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約８×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約７×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約６×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約５×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約４×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約３×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約２×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約１×１０^{8}個／ｍｍ^{2}、約９×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約８×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約７×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約６×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約５×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約４×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約３×１０^{7}個／ｍｍ^{2}、約２×１０^{7}個／ｍｍ

^{2}、約１×１０^{7}個／ｍｍ^2、約９×１０^{6}個／ｍｍ^2、約８×１０^{6}個／ｍｍ^2、約７×１０^{6}個／ｍｍ^2、約６×１０^{6}個／ｍｍ^2、約５×１０^{6}個／ｍｍ^2、約４×１０^{6}個／ｍｍ^2、約３×１０^{6}個／ｍｍ^2、約２×１０^{6}個／ｍｍ^2、約１×１０^{6}個／ｍｍ^2、約９×１０^{5}個／ｍｍ^2、約８×１０^{5}個／ｍｍ^2、約７×１０^{5}個／ｍｍ^2、約６×１０^{5}個／ｍｍ^2、約５×１０^{5}個／ｍｍ^2、約４×１０^{5}個／ｍｍ^2、約３×１０^{5}個／ｍｍ^2、約２×１０^{5}個／ｍｍ^2、約１×１０^{5}個／ｍｍ^{2}などを挙げることができ、下限としては、例えば、約１×１０^{0}個／ｍｍ^2、約２×１０^{0}個／ｍｍ^2、約３×１０^{0}個／ｍｍ^2、約４×１０^{0}個／ｍｍ^2、約５×１０^{0}個／ｍｍ^2、約６×１０^{0}個／ｍｍ^2、約７×１０^{0}個／ｍｍ^2、約８×１０^{0}個／ｍｍ^2、約９×１０^{0}個／ｍｍ^2、約１×１０^{1}個／ｍｍ^2、約２×１０^{1}個／ｍｍ^2、約３×１０^{1}個／ｍｍ^2、約４×１０^{1}個／ｍｍ^2、約５×１０^{1}個／ｍｍ^2、約６×１０^{1}個／ｍｍ^2、約７×１０^{1}個／ｍｍ^2、約８×１０^{1}個／ｍｍ^2、約９×１０^{1}個／ｍｍ^2、約１×１０^{2}個／ｍｍ^2、約２×１０^{2}個／ｍｍ^2、約３×１０^{2}個／ｍｍ^2、約４×１０^{2}個／ｍｍ^2、約５×１０^{2}個／ｍｍ^2、約６×１０^{2}個／ｍｍ^2、約７×１０^{2}個／ｍｍ^2、約８×１０^{2}個／ｍｍ^2、約９×１０^{2}個／ｍｍ^2、約１×１０^{3}個／ｍｍ^2、約２×１０^{3}個／ｍｍ^2、約３×１０^{3}個／ｍｍ^2、約４×１０^{3}個／ｍｍ^2、約５×１０^{3}個／ｍｍ^2、約６×１０^{3}個／ｍｍ^2、約７×１０^{3}個／ｍｍ^2、約８×１０^{3}個／ｍｍ^2、約９×１０^{3}個／ｍｍ^2、約１×１０^{4}個／ｍｍ^2、約２×１０^{4}個／ｍｍ^2、約３×１０^{4}個／ｍｍ^2、約４×１０^{4}個／ｍｍ^2、約５×１０^{4}個／ｍｍ^2、約６×１０^{4}個／ｍｍ^2、約７×１０^{4}個／ｍｍ^2、約８×１０^{4}個／ｍｍ^2、約９×１０^{4}個／ｍｍ^2、約１×１０^{5}個／ｍｍ^{2}などを挙げることができる。一つの実施形態としては、上限：１．０×１０^{10}個／（μＬ・ｍｍ^2）～１．０×１０^{4}個／（μＬ・ｍｍ^2）であり、下限：１．０×１０^{0}個／（μＬ・ｍｍ^2）～１．０×１０^{4}個／（μＬ・ｍｍ^2）であり得る。

[0076] 本開示において、粒子を基材に配置する工程は、任意の方法で実施することができ、例えば、本開示の粒子を溶液中に分散し、基材上に滴下して、静置またはスピンコートすることにより配置する。

[0077] 本開示において、粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程は、任意の方法で実施することができ、例えば、重合性モノマーを加え、粒子または機能性モノマー由来の重合性官能基および重合性モノマーを基質として提供することによって実施することができる。

[0078] 本開示において、ポリマーマトリクスの原料は、意図する分析に適切な材料であれば、どのような物質を使用してもよい。ポリマーマトリクスの原料は、一般に、ポリマーマトリクスを形成するためには、少なくとも１種のモノマーと少なくとも１種の適切な重合開始剤とを含むことで十分であるが、これら以外にも、例えば、追加のモノマー（一部重合していてもよい）、追加の重合開始剤、架橋剤、ＲＡＦＴ剤、触媒、還元剤または溶媒等を含むことができる。モノマーとしては、スチレン、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド、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が、これらに限定されない。重合開始剤としては、２，２´－アゾビス（イソブチロニトリル）（ＡＩＢＮ）、α－ブロモイソ酪酸エチル等が挙げられるが、これらに限定されない。架橋剤は、メラミン化合物、グアナミン化合物、グリコールウリル化合物、Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド、および（トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ポリ）エチレングリコールジメタクリレート等が挙げられるが、これらに限定されない。ＲＡＦＴ剤としては、ベンゾジチオ酸ベンジル、２－シアノ－２－［（ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル］プロパン等が挙げられるが、これらに限定されない。触媒としては、$CuBr_2$等が挙げられるが、これらに限定されない。還元剤としては、アスコルビン酸等が挙げられるが、これらに限定されない。溶媒としては、一般的に溶媒として知られているものから特に制限なく選択され、例えば純水、緩衝液、ＭｅＯＨ、ＥｔＯＨ、ＤＭＡおよびＤＭＦ等が挙げられるが、これらに限定されない。粒子および粒子を基材に単分散で、および／または凝集することなく、および／または単層で配置する工程については、本明細書における他の個所、例えば＜分析用センサ＞＜分析用センサ作製用基材製造法＞などの項に記載される任意の実施形態を採用することが

できることが理解される。

[0079] 本開示において、ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程は、任意の方法で実施することができ、例えば、重合性モノマーを加え、粒子または機能性モノマー由来の重合性官能基および重合性モノマーを基質とし、重合開始性基を重合性開始剤として、本開示の粒子の表面の一部に対する分子インプリントポリマーを合成する。これによって、基材表面に、凹部を有するポリマーマトリクスを形成することができる。

[0080] 本開示において、基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工程は、任意の工程によって実施することができ、例えば、可逆的連結基を開裂させて、本開示の粒子を除去することができる。

本開示の実施例では、以下の表に示される例の数多くの例が実証されている。

[表11A-1]

1－1	1－2	1－3	1－4
結合性官能基	対応する結合性官能基	可逆的連結基	可逆部分の結合の様式
（標的分子に対する特異的結合性分子の結合用基）	（結合性基）	（可逆的連結基）	
（シグナル物質の結合用基）	（結合性基）		
チオール基、ジスルフィド基、ピリジルジスルフィド基	チオール基、ジスルフィド基、ピリジルジスルフィド基	ジスルフィド基	共有結合
ボロニル基	糖基	ボロン酸環状エステル	共有結合
ボロニル基	cis ジオール基	ボロン酸環状エステル	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	アミノ基	イミノ結合基	共有結合
アミノ基	カルボニル基・アルデヒド基		
カルボキシル基	ヒドロキシル基	カルボン酸エステル基	共有結合
ヒドロキシル基	カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基		
カルボキシル基	チオール基	カルボン酸チオエステル基	共有結合
チオール基	カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基		
アミノオキシ基	カルボキシ基・アルデヒド基	オキシム基	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	アミノオキシ基		
カルボキシ基・アルデヒド基	ヒドロキシル基	アセタール基	共有結合
ヒドロキシル基	カルボキシ基・アルデヒド基		

[0081]

[表11A-2]

金属錯体 (Ni-NTA(ニッケル－ニトリロトリ酢酸由来基)等)	ポリヒスチジン(His)タグ (6×His, 8×His,10×His等)	配位結合	非共有結合
塩基性基 （アミノ基、環状2級アミノ基（たとえば、ピロリジル基）、ピペリジ基、ピリジル基、イミダゾール基、グアニジン基等）、	酸性基 （カルボキシル基・カルボン酸活性エステル基等）	水素結合	非共有結合
水酸基			
酸性基	塩基性基		非共有結合
（カルボキシル基等）	（アミノ基、環状2級アミノ基 （たとえば、ピロリジル基、ピペリジ基）、 ピリジル基、イミダゾール基、グアニジン基等）、水酸基		
芳香族基 （アミノフェニル基等のフェニル基、アミノナフチル基等のナフチル基、ピリジル基等）	芳香族基 （アミノフェニル基等のフェニル基、アミノナフチル基等のナフチル基、ピリジル基等）	疎水結合	非共有結合
ヒドラジド	カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラゾン結合基	共有結合
カルボニル基・アルデヒド基	ヒドラジド		
アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)	ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)	アビジン−ビオチン結合	非共有結合
ビオチン(ビオシチン、デスビオチン)	アビジン(ニュートラアビジン、ストレプトアビジン)		
グルタチオン(GSH)	グルタチオン−S−トランスフェラーゼ(GST)	グルタチオン(GSH)−グルタチオン−S−トランス	非共有結合

[0082]

[表11A-3]

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)	グルタチオン(GSH)	フェラーゼ(GST)結合	
Phos-tag	リン酸イオン	配位結合	非共有結合
リン酸イオン	Phos-tag		

[0083] 別の局面において、本開示は、分析用センサを製造するための方法を提供する。この方法はＡ）粒子を提供する工程と、Ｂ）該粒子を基材に粒子が単分散で基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）必要に応じて、該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、Ｄ）必要に応じて、該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより、凹部を形成する工程と、Ｆ）分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程とを包含する。粒子、粒子を基材に単分散で配置する工程、ポリマーマトリクスが重合する条件、および粒子が解離する条件については、本明細書における他の個所、例えば＜分析用センサ＞＜分析用センサ作製用基材＞などの項に記載される任意の実施形態を採用することができることが理解される。

[0084] 別の局面において、本開示は、分析用センサを製造するための方法を提供する。この方法はＡ）粒子を提供する工程と、Ｂ）該粒子を基材に粒子が凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）必要に応じて、該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、Ｄ）必要に応じて、該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより、凹部を形成する工程と、Ｆ）分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程とを包含する。粒子、粒子を基材に凝集することなく配置する工程、ポリマーマトリクスが重合する条件、および粒子が解離する条件については、本明細書における他の個所、例えば＜分析用センサ＞＜分析用センサ作製用基材＞などの項に記載される任意の実施形態を採用することができることが理解され

る。

[0085] 別の局面において、本開示は、分析用センサを製造するための方法を提供する。この方法はＡ）粒子を提供する工程と、Ｂ）該粒子を基材に粒子が単層で基材本体に配置されるように加える工程と、Ｃ）必要に応じて、該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、Ｄ）必要に応じて、該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより、凹部を形成する工程と、Ｆ）分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程とを包含する。粒子、粒子を基材に単層で配置する工程、ポリマーマトリクスが重合する条件、および粒子が解離する条件については、本明細書における他の個所、例えば＜分析用センサ＞＜分析用センサ作製用基材＞などの項に記載される任意の実施形態を採用することができることが理解される。

[0086] 一つの実施形態では、分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程は、任意の方法で実施することができ、例えば、還元により凹部内に生成させた開裂した可逆的連結基に対して、特異的結合性分子の結合用基およびシグナル物質の結合用基を修飾することにより実施することができる。

[0087] 一つの実施形態では、本開示は、２．０×１０^{7}個／ｍｍ^{2}以下の密度の凹部を形成することによって、変動係数が一定の基準値（例えば、２０％）以下の前記分析用センサを作製する、本開示の分析用センサを製造するための方法を提供する。変動係数は、基板内および基板間のものがあるが、少なくともいずれかが２０％以下であればよく、その両方がが２０％以下で作製することが好ましい。

[0088] 単分散で、凝集することなく、および／または単層配置する工程における粒子の密度としては、約１０^{3}個／ｍｍ^{2}～約１０^{8}個／ｍｍ^{2}であり得、好ましくは約１０^{3}個／ｍｍ^{2}～約１０^{7}個／ｍｍ^{2}、より好ましくは約１０^{4}個／ｍｍ^{2}～約１０^{7}個／ｍｍ^{2}であるか、または約１０^{3}個／ｍｍ^{2}～約１０^{10}個／ｍｍ^{2}であり得、好ましくは約１０^{3}個／ｍｍ^{2}～約１０^{9}個／ｍｍ^{2}、より好ま

しくは約10^4個／mm^2～約10^8個／mm^2である。。一つの実施形態では、単分散で、および／または凝集することなく、および／または単層で配置する工程は、基材上に10^3個／mm^2～10^{10}個／mm^2の密度で本開示の粒子を配置する工程を含む。基材上に配置される粒子の好ましい密度としては、10^4個／mm^2～10^7個／mm^2を挙げることができる。ここでの密度は蛍光顕微鏡や走査型電子顕微鏡による表面観察から密度を確認することができる。

[0089] 一つの実施形態では、凹部を形成する工程において、本開示の単分散したまたは凝集していない凹部が、10^3個／mm^2～10^{10}個／mm^2の密度で存在する方法を提供する。基材上に配置される凹部の好ましい密度としては、10^3個／mm^2～10^7個／mm^2を挙げることができる。また、ここでの密度は蛍光顕微鏡や走査型電子顕微鏡による表面観察から密度を確認することができる。

[0090] 一つの実施形態では、単分散で、および／または凝集することなく、および／または単層で配置する工程は、任意の方法で実施することができ、例えば、スピンコート法、基材上に滴下する方法、粒子分散液中に浸漬させる方法、粒子分散液中から基材を引き上げる方法、スプレーで散布（塗布）する方法、またはインクジェットプリンターで印刷する方法で粒子を配置する工程を含む。

[0091] （分析用センサの製造例）

分析用センサを製造するための工程は、以下のように実施することができる。本開示の粒子を溶液中に分散し、基材上に滴下して、静置またはスピンコートすることにより配置する。重合性モノマーを加え、粒子または機能性モノマー由来の重合性官能基および重合性モノマーを基質として提供する。重合開始性基を重合性開始剤として用い、本開示の粒子の表面の一部に対する分子インプリントポリマーを合成する。これによって、基材表面に、凹部を有するポリマーマトリクスを形成する。粒子コアと修飾物質間の相互作用を弱める（または解離する）ことで、本開示の粒子を除去する。凹部内に存

在（または露出）する、可逆的連結基に対して、特異的結合性分子の結合用基およびシグナル物質の結合用基を修飾する。

[0092] （用途）

本開示の分析用センサは、検出対象のセンシングに用いられる。より具体的な用途としては、特異的結合性基の種類に応じて決定されるが、例えば、腎機能、肝機能、炎症の有無又は程度；腫瘍の有無又は程度等に基づく診断目的又は治療モニタリング等の目的で用いることができる。

[0093] 本開示の分析用センサは、以下の用途で用いることができる。

[0094] 測定対象のｉｎ ｖｉｖｏ／ｉｎ ｖｉｔｒｏイメージングや、治療への応用

人体または環境中のウイルスセンサおよび

食品、農作物、家畜等の分析に利用することができる。

[0095] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0096] 本実施例では、本開示の化合物の製造、用途に関する実施例を説明する。なお、細胞の顕微鏡観察にはＣＫＸ３１ （ＯＬＹＭＰＵＳ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、遠心分離器にはＫＵＢＯＴＡ２８００ （ＫＵＢＯＴＡ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、インキュベーターにはＣＯ２ ＷＡＴＥＲ ＪＡＣＫＥＴＥＤ ＩＮＣＵＢＡＴＯＲ （Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ，ＵＳＡ）、オートクレーブにはＫＳ－２４３ （ＴＯＭＹ ＳＥＩＫＯ Ｃｏ，Ｌｔｄ．，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）、クリーンベンチにはバイオクリーンベンチ（ＯＲＩＥＮＴＡＬ ＧＩＫＥＮ ＩＮＣ，Ｔｏｋｙｏ，

Ｊａｐａｎ）をそれぞれ使用した。エクソソーム濃度測定にはｑＮａｎｏＧｏｌｄ（Ｉｚｏｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．，Ｃｈｒｉｓｔｃｈｕｒｃｈ，Ｎｅｗ Ｚｅａｌａｎｄ）を使用した。また、金基材のＵＶオゾン処理にはＵＶ Ｏｚｏｎｅ Ｃｌｅａｎｅｒ（ＢｉｏＦｏｒｃｅ Ｎａｎｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）、蛍光測定にはＳＩＣ自動分注装置（ＳＹＳＴＥＭ ＩＮＳＴＲＵＭＥＮＴＳ Ｃｏ．，Ｌｔｄ．，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）つき蛍光顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）および分光学ソフトウェアとしてＡｎｄｏｒ ＳＯＬＩＳ（Ａｎｄｏｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｌｔｄ，Ｂｅｌｆａｓｔ，Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｉｒｅｌａｎｄ）を用いた。

[0097] また、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ にはＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ／ＭＳ（ＭＡＬＤＩ－７０９０、島津製作所）を、解析ソフトは（ＭＡＬＤＩ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ、島津製作所）、キャリブレーションはｐｒｏｔｅｉｎ ｃａｌｉｂｒａｔｉｏｎ ｓｔａｎｄａｒｄＩ （ブルカー）を用いた。マトリックスにはシナピン酸を用いた。ＣＤ スペクトルにはＪ－ ７２５ 型円二色性分散計（日本分光，Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ） を用いた。Ｂｕｆｆｅｒ調製のために卓上ｐＨ メーターＦ－５２（ＨＯＲＩＢＡ，Ｋｙｏｔｏ，ＪＡＰＡＮ）によりｐＨ を測定した。蛍光スペクトル測定は、日立ハイテクノロジー製の蛍光分光光度計（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ）Ｆ－２５００ （Ｔｏｋｙｏ，Ｊａｐａｎ）を使用して行った。限外濾過に使用した限外濾過膜はアミコンウルトラ－４（１０ｋＤａ）を使用した。吸収スペクトル測定にはＴｈｅｒｍｏ ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＴＭ Ｎａｎｏ ｄｒｏｐ ＴＭ Ｏｎｅ 超微量紫外可視分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を用いた。作製した粒子の平均粒子径および多分散指数（ＰＤＩ）はＺＥＴＡＳＩＺＥＲ ＮＡＮＯ－ＺＳ ＭＡＬ５００７３５ （Ｍａｌｖｅｒｎ，ＵＫ）にて動的光散乱法（Ｄｙｎａｍｉｃ Ｌｉｇｈｔ Ｓｃａｔｔｅｒｉｎｇ，ＤＬＳ）により測定し、解析ソフトとしてＺｅｔａｓｉｚｅｒ ｓｏｆｔｗａｒｅ を用

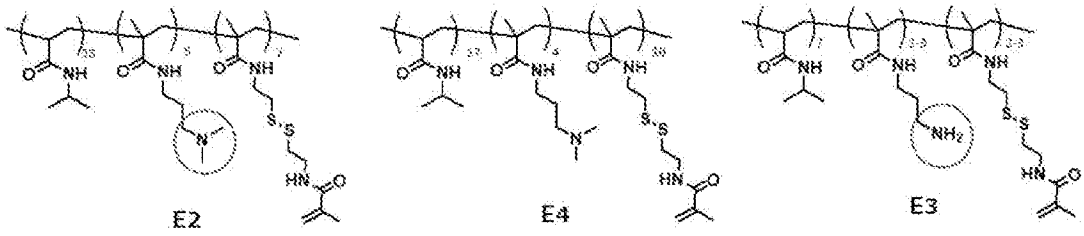
いた。ＴＥＭ解析には透過型電子顕微鏡（ＪＥＭ－１２３０、日本電子製）を用いた。

[0098] （実施例１：修飾物質の合成）

１．実験操作

１－１．ポリマーの合成

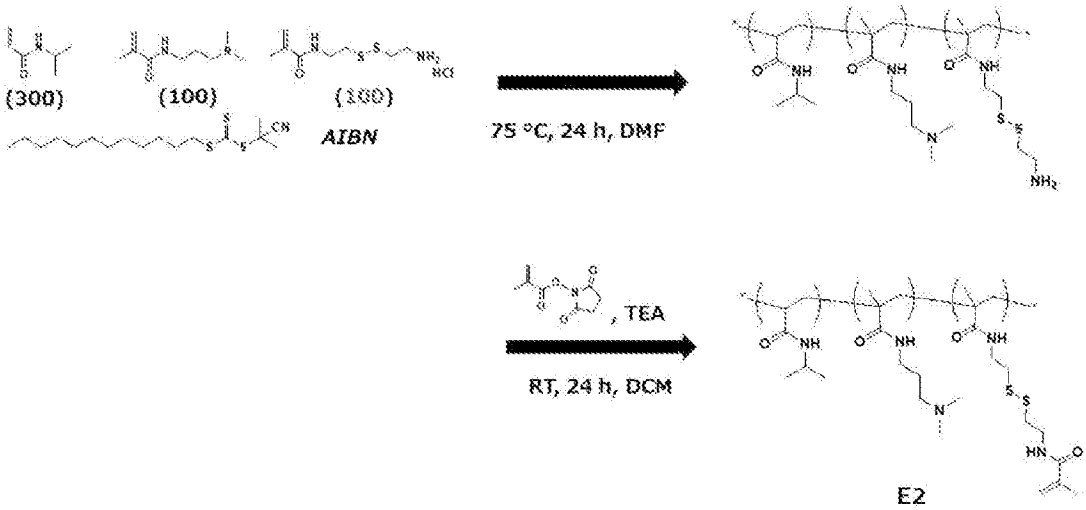
[0099] [化1]



合成した各種カチオン性ポリマー

[0100] １－１－１．ポリマーＥ２の合成

[0101] [化2]



スキーム 1. ポリマー E2 合成スキーム

[0102] 表１－１に示したレシピの試薬をＤＭＦ（２　ｍＬ）に溶解させ脱気アルゴン置換を行った後、オイルバス（７５　℃）中にて２４時間重合反応を行った。反応後の溶液を冷却し、空気に触れさせることで反応を停止させた後

、反応溶液をジエチルエーテル中に滴下させることで沈殿を生じさせ、この沈殿を回収した。この操作を２回繰り返した。回収した沈殿を真空乾燥させることでポリマー（Ｅ２－０）を得た。（収量：１００　ｍｇ）

得られたポリマーの１００　ｍｇをジクロロメタン／ジオキサン＝１／１（ｖ／ｖ）溶液（１０ｍＬ）に分散させ、そこにメタクリル酸　Ｎ－スクシンイミジル９２　ｍｇ　（０．５　ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン　（ＴＥＡ）　１４０μＬ（１．０ｍｍｏｌ）を加え室温で２４時間撹拌した。反応後の溶媒をエバポレーターで減圧留去し、残渣に少量のジクロロメタンを添加し、さらに過剰量のヘキサンを添加することで生じた沈殿を回収した（この操作を２回行った。）。得られた沈殿を真空乾燥させることでポリマーＥ２を得た。（収量：１０１　ｍｇ）

得られたポリマーＥ２については^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｉｎ　ＤＭＳＯ－ｄ６）（ＡＶＡＮＣＥ－５００，　Ｂｒｕｋｅｒ）から組成を推定した。（図１－１）

[0103] [表1-1]

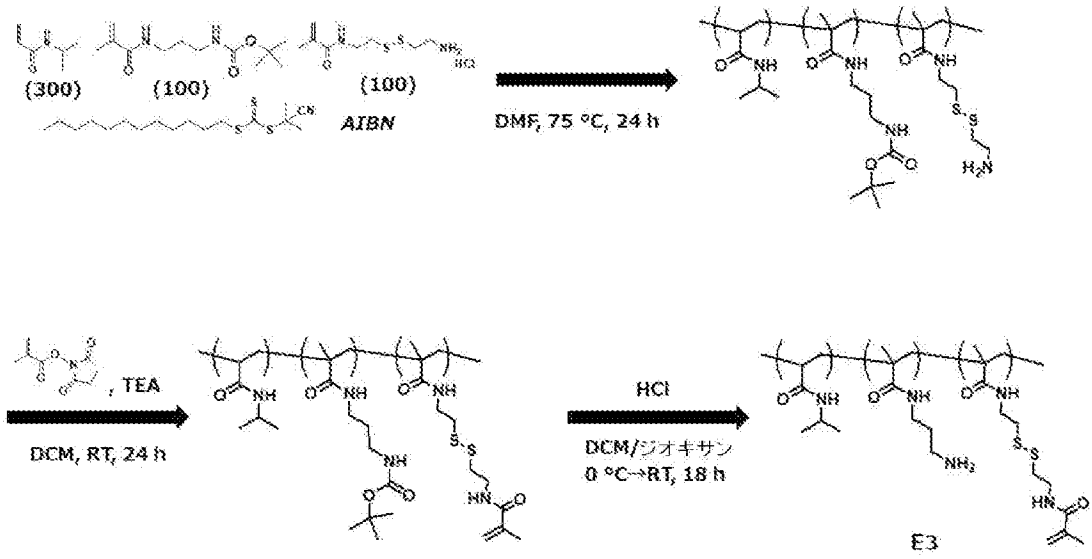
表１－１　ポリマーE2合成レシピ

	試料	濃度
主原料	N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAm）	300 mM
カチオン性部分	N-（3-ジメチルアミノプロピル）メタクリルアミド塩酸塩	100 mM
修飾部位	Cys-メタクリルアミド塩酸塩	100 mM
RAFT 剤	2-シアノ-2-｛［ドデシルスルファニルチオカルボニル］スルファニル｝プロパン	12.5 mM
開始剤	2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）（AIBN）	6.25 mM
溶媒	DMF	2 mL

[0104] １－１－２．　ポリマーＥ３の合成

[0105]

[化3]



スキーム２．ポリマーＥ３合成スキーム

[0106] 表１－２に示したレシピの試薬をＤＭＦ（２　ｍＬ）に溶解させ脱気アルゴン置換を行った後、オイルバス（７５　℃）中にて２４時間重合反応を行った。反応後の溶液を冷却し、空気に触れさせることで反応を停止させた後、反応溶液をジエチルエーテル中に滴下させることで沈殿を生じさせ、この沈殿を回収した。この操作を２回繰り返した。回収した沈殿を真空乾燥させることでポリマーを得た。（収量：１０５　ｍｇ）

このポリマーをジクロロメタン（１０　ｍＬ）中に分散させ、そこにメタクリル酸　Ｎ－スクシンイミジル１１０　ｍｇ　（０．６　ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（ＴＥＡ）　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）を加え室温で２４時間撹拌した。反応後の溶液に過剰量のヘキサンを添加することで生じた沈殿を回収した（この操作を２回行った。）。得られた沈殿を真空乾燥させることでポリマーＥ３を得た。（収量：１１５　ｍｇ）得られたポリマーをジクロロメタン（６　ｍＬ）中に分散させ、そこにジオキサン中４Ｎ　ＨＣｌ　１．０　ｍＬを添加し氷冷下で２時間撹拌した。その後室温でさらに一晩撹拌した。反応後溶液にヘキサンを添加し生じた沈殿を回収した

。回収した沈殿に少量のジクロロメタンを添加し、さらに過剰量のヘキサンを添加し、沈殿を洗浄した。回収した沈殿を真空乾燥させた。（収量：１０５　ｍｇ）

得られたポリマーＥ３については^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｉｎ　ＤＭＳＯ－ｄ６）（ＡＶＡＮＣＥ－５００，　Ｂｒｕｋｅｒ）から組成を推定した。（図１－２）

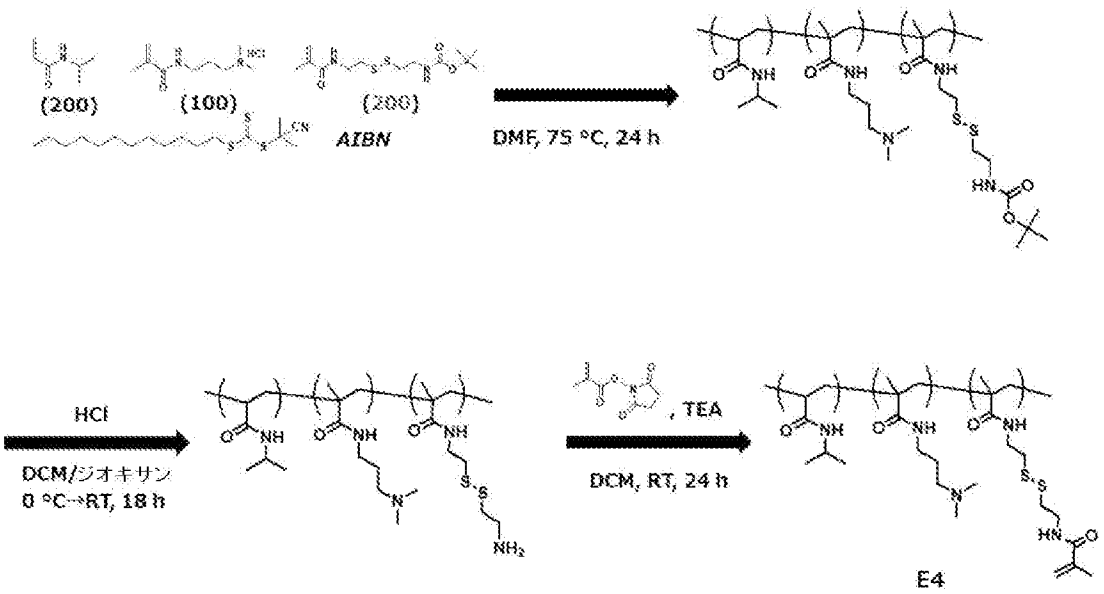
[0107] [表1-2]

表１－２　ポリマーE3 合成レシピ

	試料	濃度
主原料	N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAm）	300 mM
カチオン性部位	N-Boc-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩	100 mM
修飾部位	Cys-メタクリルアミド	100 mM
RAFT 剤	2-シアノ-2-｛[ドデシルスルファニルチオカルボニル]スルファニル｝プロパン	12.5 mM
開始剤	2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）（AIBN）	6.25 mM
溶媒	DMF	2 mL

[0108] １－１－３．　ポリマーＥ４の合成

[0109] [化4]



スキーム３．ポリマーE4 合成スキーム

[0110] 表１－３に示したレシピの試薬をＤＭＦ（２　ｍＬ）に溶解させ脱気アルゴン置換を行った後、オイルバス（７５　℃）中にて２４時間重合反応を行った。反応後の溶液を冷却し、空気に触れさせることで反応を停止させた後、反応溶液をジエチルエーテル中に滴下させることで沈殿を生じさせ、この沈殿を回収した。この操作を２回繰り返した。回収した沈殿を真空乾燥させることでポリマーを得た。（収量：７０　ｍｇ）

[0111] 得られたポリマーをジクロロメタン（１０　ｍＬ）中に分散させ、そこに４Ｎ　ＨＣｌ　ｉｎ　ｄｉｏｘａｎｅ　１．０　ｍＬを添加し氷冷下で２時間撹拌した。その後室温でさらに一晩撹拌した。反応後溶液にヘキサンを添加し生じた沈殿を回収した。回収した沈殿に少量のジクロロメタンを添加し、さらに過剰量のヘキサンを添加し、沈殿を洗浄した。回収した沈殿を真空乾燥させた。その後、このポリマーをジクロロメタン（１０ｍＬ）中に分散させ、そこにメタクリル酸　Ｎ－スクシンイミジル７３ｍｇ（０．４ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（ＴＥＡ）　８４　μＬ（０．６　ｍｍｏｌ）を加え室温で２４時間撹拌した。反応後の溶液に過剰量のヘキサンを添加することで生じた沈殿を回収した（この操作を２回行った。）。得られた沈殿を真空乾燥させることでＥ４を得た。（収量：６２ｍｇ）

得られたＥ４については^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｉｎ　ＤＭＳＯ－ｄ６）（ＡＶＡＮＣＥ－５００，　Ｂｒｕｋｅｒ）から組成を推定した。（図１－３）

[0112] [表1-3]

表１－３　ポリマーE4合成レシピ

	試料	濃度
主原料	N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAm）	200 mM
カチオン性部位	N-［3-ジメチルアミノプロピル］メタクリルアミド塩酸塩	100 mM
修飾部位	Cys-メタクリルアミド塩酸塩	200 mM
RAFT 剤	2-シアノ-2-［［ドデシルスルファニルチオカルボニル］スルファニル］プロパン	12.5 mM
開始剤	2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）（AIBN）	6.25 mM
溶媒	DMF	2 mL

[0113] １－２－１ポリマーＦ１の合成

表１－４に示したレシピの試薬をＤＭＦ（２　ｍＬ）に溶解させ脱気アルゴン置換を行った後、オイルバス（７５℃）中にて２４時間重合反応を行った。反応後の溶液を冷却し、空気に触れさせることで反応を停止させた後、反応溶液をジエチルエーテル中に滴下させることで沈殿を生じさせ、この沈殿を回収した。この操作を２回繰り返した。回収した沈殿を真空乾燥させることでポリマーを得た。（収量：１０５．７ｍｇ）

得られたポリマーをジクロロメタン（５　ｍＬ）中に分散させ、そこにメタクリル酸　Ｎ－スクシンイミジル３４．１　ｍｇ　（０．１９　ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（ＴＥＡ）　３８．９　μＬ　（０．２８　ｍｍｏｌ）を加え室温で２４時間撹拌した。反応後の溶液に過剰量のヘキサンを添加することで生じた沈殿を回収した（この操作を２回行った。）。得られた沈殿を真空乾燥させることでＦ１を得た。（収量：１９．１ｍｇ）

得られたＦ１については^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ｉｎ　ＤＭＳＯ－ｄ６）（ＡＶＡＮＣＥ－５００，　Ｂｒｕｋｅｒ）から組成を推定した。

[0114] [表1-4]

表.1-4　蛍光性ポリマーF1 合成レシピ

	試料	濃度
主原料	N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAm）	275 mM
カチオン性部位	N-（3-ジメチルアミノプロピル）メタクリルアミド塩酸塩	100 mM
修飾部位	Cys-メタクリルアミド塩酸塩	100 mM
蛍光部位	メタクリロキシエチルチオカルバモイルローダミンB	25 mM
RAFT 剤	2-シアノ-2-｛[ドデシルスルファニルチオカルボニル）スルファニル｝プロパン	12.5 mM
開始剤	2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）：V-60	6.25 mM
溶媒	DMF	2 mL

[0115] ポリマー（ＡＮ１）の合成

Ｂｏｃ－ｃｙｓｔａｍｉｎｅ　ｍｅｔａｃｒｙｌａｍｉｄｅ　６４ｍｇ、ｔ－ｂｕｔｙｌ　ａｃｒｙｌａｔｅ　２９　μＬ、ＮＩＰＡｍ　６８ｍｇをＤＭＦ　１．８ｍＬに溶解させ、最後にＲＡＦＴ剤（２－Ｃｙａｎｏ－２－

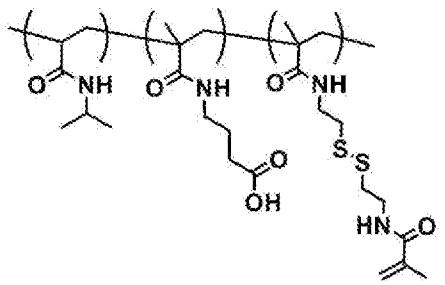
［（ｄｏｄｅｃｙｌｓｕｌｆａｎｙｌｔｈｉｏｃａｒｂｏｎｙｌ）ｓｕｌｆａｎｙｌ］ｐｒｏｐａｎｅ）８．６ｍｇ、開始剤（ＡＩＢＮ）２．１mgが溶解したＤＭＦ　０．２ｍＬを添加し、脱気アルゴン置換を行って溶存酸素を取り除いた。この後７５℃に設定したオイルバス中で重合反応を行った（２４ｈ）。反応後、反応液を過剰量のジエチルエーテル中に滴下し、沈殿を回収した。（収量：５１ｍｇ）

得られたポリマーをジクロロメタン（５ｍＬ）に溶解させ氷冷下で撹拌した。そこにトリフルオロ酢酸１．５　ｍＬを添加し遮光下で一晩撹拌させた。反応後、ジエチルエーテルを添加し生じた沈殿を回収し、得られた沈殿をジエチルエーテルで洗浄した。（収量：　２２　ｍｇ）

得られたポリマーをジクロロメタンに分散させそこにＮ－ｓｕｃｃｕｃｉｎｉｍｙｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　１５ｍｇ（０．０８ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン　１７　μＬ（０．１２　ｍｍｏｌ）を加え、一晩室温撹拌させた。反応液にジエチルエーテルを添加し、生じた沈殿を回収した。この沈殿を少量のジクロロメタンに溶解させ、そこに過剰量のヘキサンを添加することで沈殿させた。この操作を２回繰り返し、真空乾燥させることで目的のポリマー（ＡＮ１）を得た。（収量：１６ｍｇ）

[0116] １－１．　ポリマー（Ｅ１０１）合成

[化5]



ポリマーレシピ：

[表A-1]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
4-[(2-Methyl-1-oxo-2-propen-1-yl)amino]butanoic acid	171.19	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0117] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

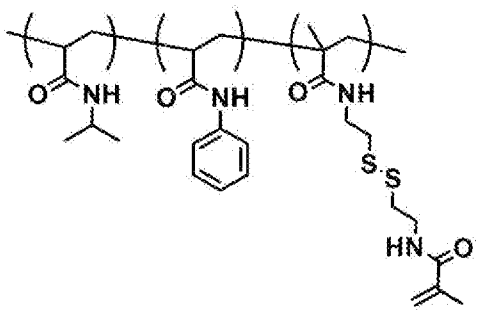
[0118] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０１）を得る。

[0119] １－２．　ポリマー（Ｅ１０１）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０１）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に塩基性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0120] ２－１．　ポリマー（Ｅ１０２）合成

[化6]



ポリマーレシピ：

[表A-2]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
N-Phenyl acrylamide	147.17	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0121] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0122] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０μＬ（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過

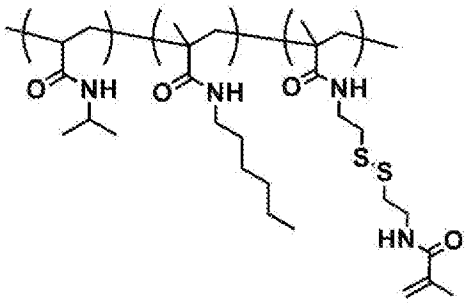
剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０２）を得る。

[0123] ２－２．　ポリマー（Ｅ１０２）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０２）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にベンゼン環等疎水性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールのみ、またはウンデカンチオールとの混合ＳＡＭで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0124] ３－１．　ポリマー（Ｅ１０３）合成

[化7]



ポリマーレシピ：

[表A-3]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
N-Hexylmethacrylamide	169.26	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0125]　上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５

℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

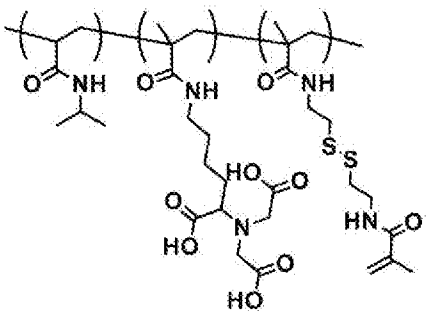
[0126] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０３）を得る。

[0127] ３－２．　ポリマー（Ｅ１０３）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０３）水溶液（２ｍｇ／ｍＬ）と表面にベンゼン環やアルキル鎖など疎水性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールのみ、またはウンデカンチオールとの混合ＳＡＭで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0128] ４－１．　ポリマー（Ｅ１０４）合成

[化8]



ポリマーレシピ：

[表A-4]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
NTA monomer (L-Lysine, N2,N2-bis(carboxymethyl)-N6-(2-methyl-1-oxo-2-propen-1-yl)-)	330.33	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0129] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0130] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ（０．３ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０４）を得る。

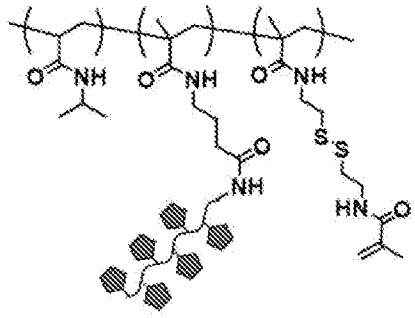
[0131] ４－２．　ポリマー（Ｅ１０４）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０４）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にＨｉｓ－ｔａｇ等配位結合可能な基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板を０．１　Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍ　ＮＨＳが溶解したCH_2

CH_2Cl_2に浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をCH_2Cl_2で洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１０４）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0132] ５－１．　ポリマー（Ｅ１０５）合成

[化9]



ポリマー（Ｅ１０１）　１００　ｍｇ、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）、ＮＨＳ　２２　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０１）－ＮＨＳ（Ｅ１１２）を得る。

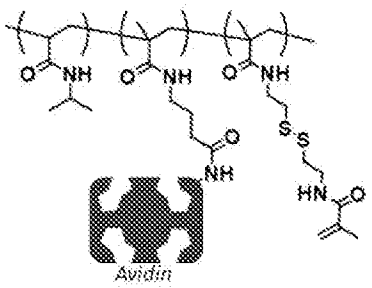
前項で作製したポリマー１０　ｍｇ、ＴＥＡ　２８　μＬをＤＭＦ（１ｍＬ）に溶解させ撹拌する。ここに合成ペプチド（Ｎ末端から６つのヒスチジンが結合し、３つのグリシンが結合し、Ｃ末端にリジンが結合したものにおいてＣ末端のカルボキシル基がアミド化された構造をしているものである。）　３　ｍｇ　を加え更に一晩撹拌する。反応後少量のCH_2Cl_2を添加し、その後過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせる。沈殿を回収し、そこに少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０５）を得る。

[0133] ５－２．　ポリマー（Ｅ１０５）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０５）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にＮＴＡ基など配位結合可能な基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板を１　ｍＭ　Ｎ－［５－（４－Ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｏｂｅｎｚｙｌ）ａｍｉｄｏ－１－ｃａｒｂｏｘｙｐｅｎｔｙｌ］ｉｍｉｎｏｄｉａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄが溶解したＤＭＳＯに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＤＭＳＯ、ＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１０５）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0134] ６－１．　ポリマー（Ｅ１０６）合成

[化10]



[0135] ポリマー（Ｅ１０１）　１００　ｍｇ、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）、ＮＨＳ　２２　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０１）－ＮＨＳ（Ｅ１１２）を得る。

[0136] 前項で作製したポリマー１０　ｍｇを５０　ｍＭ　炭酸緩衝液（ｐＨ　８．５）（１　ｍＬ）に溶解させ撹拌する。ここにＡｖｉｄｉｎ　３　ｍｇを加え更に一晩撹拌する。反応液を１００　ｋＤａ対応の透析膜に入れリン酸

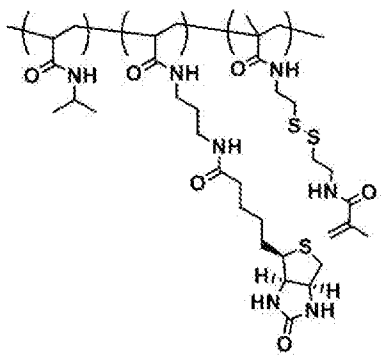
緩衝液（ｐＨ　７．４）中で透析を行う。透析後、限外ろ過で濃縮を行い目的とするポリマー（Ｅ１０６）の溶液を得る。

[0137] ６－２．　ポリマー（Ｅ１０６）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０６）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にビオチンまたはその誘導体を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をリン酸緩衝液で適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板を０．１　Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍビオチンが溶解したＤＭＳＯに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＤＭＳＯ、ＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１０５）－粒子コア混合溶液４０　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をリン酸緩衝液で洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0138] ７－１．　ポリマー（Ｅ１０７）合成

[化11]



ポリマーレシピ：

[表A-5]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (N-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
biotin monomer ((3aS,4S,6aR)-Hexahydro-2-oxo-N-[3-[(1-oxo-2-propen-1-yl)amino]propyl]-1H-thieno[3,4-d]imidazole-4-pentanamide)	354.47	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0139] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0140] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０７）を得る。

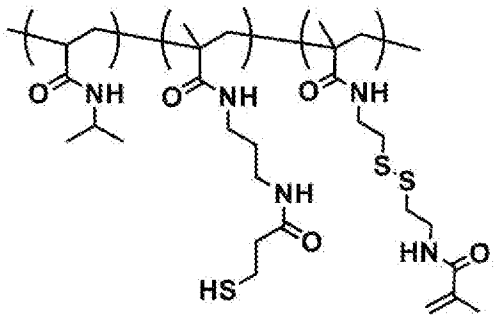
[0141] ７－２．　ポリマー（Ｅ１０７）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０７）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にＡｖｉｄｉｎを修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＰＢＳで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオー

ルとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板を０．１Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍ　ＮＨＳが溶解したCH_2Cl_2に浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をCH_2Cl_2で洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上に１　ｍｇ／ｍＬのＡｖｉｄｉｎ溶液を滴下し、１時間静置する。反応後リン酸緩衝液で基板を洗浄する。この基板上にポリマー（Ｅ１０７）－粒子コア混合溶液を滴下し、１時間静置する。その後基板をリン酸緩衝液で洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0142] ８－１．　ポリマー（Ｅ１０８）合成

[化12]



ポリマー（Ｅ３）　１００　ｍｇ、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）、３－ｍｅｒｃａｐｔｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　２２　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０８）を得る。

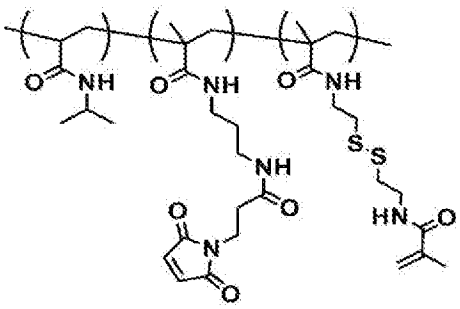
[0143] ８－２．　ポリマー（Ｅ１０６）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０８）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にマレイミド基、ピリジルジスルフィド基等チオール反応活性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカ

ンチオール塩酸塩で修飾された金基板を０．１　Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍ　３－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　または３－（２－ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄが溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１０８）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0144] ９－１．　ポリマー（Ｅ１０９）合成

[化13]



ポリマー（Ｅ３）　１００　ｍｇ、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）、３－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　３４　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１０８）を得る。

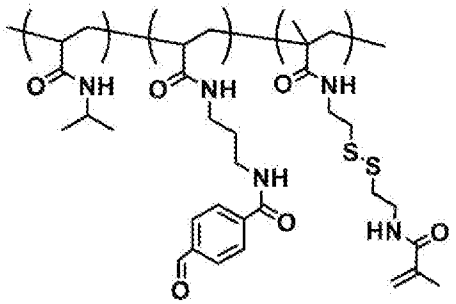
[0145] ９－２．　ポリマー（Ｅ１０９）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１０９）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にチオール基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板を０．１　Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍ　３－ｍｅｒｃａｐｔｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃ

ｉｄ　が溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１０９）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0146] １０－１．　ポリマー（Ｅ１１０）合成

[化14]



ポリマーレシピ：

[表A-6]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
aldehyde monomer (4-Formyl-N-[2-[(1-oxo-2-propen-1-yl)amino]propyl]benzamide)	258.26	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0147]　上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

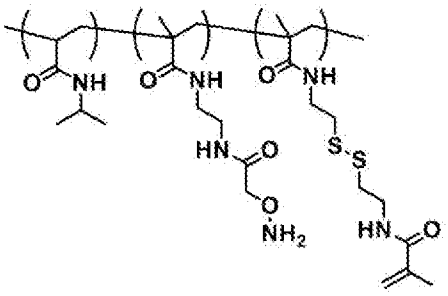
[0148] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１０）を得る。

[0149] １０－２．　ポリマー（Ｅ１１０）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１０）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にアミノ基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上にポリマー（Ｅ１１０）－粒子コア混合溶液を滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0150] １１－１．　ポリマー（Ｅ１１１）合成

[化15]



ポリマーレシピ：

[表A-7]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
Boc-oxime monomer (1,1-Dimethylethyl 11-methyl-5,10-dioxo-3-oxa-2,6,9-triazadodec-11-enoate)	301.34	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0151] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0152] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させる。

[0153] 得られたポリマーをCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこに４Ｎ　ＨＣｌ　ｉｎ　ｄｉｏｘａｎｅを１　ｍＬ添加しさらに一晩撹拌する。反応液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿に少量のCH_2Cl_2を加え、さらに過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を洗浄し、その後真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１１）を得る。

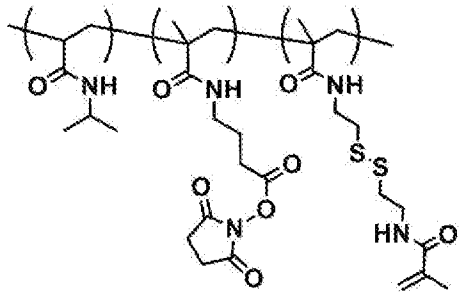
[0154] １１－２．　ポリマー（Ｅ１１１）－粒子コア複合体形成と基板上への固定

化

ポリマー（Ｅ１１１）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にアルデヒド基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上を０．１Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍ　４－ｆｏｒｍｙｌｂｅｎｚｏｉｃ　ａｃｉｄが溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１１１）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0155] １２－１．　ポリマー（Ｅ１１２）合成

[化16]



ポリマー（Ｅ１０１）　１００　ｍｇ、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）、ＮＨＳ　２２　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１２）を得る。

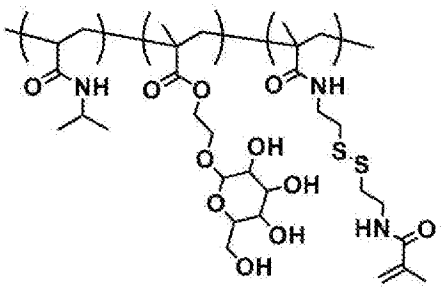
[0156] １２－２．　ポリマー（Ｅ１１２）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１２）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にアミノ基有する

粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液一晩静置した後ＤＭＦで８０倍に希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールと１－Ｄｅｃａｎａｍｉｎｉｕｍ，　１０－ｍｅｒｃａｐｔｏ－Ｎ，Ｎ，Ｎ－ｔｒｉｍｅｔｈｙｌ－，　ｃｈｌｏｒｉｄｅで修飾された金基板上にポリマー（Ｅ１１２）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0157] １３－１．　ポリマー（Ｅ１１３）合成

[化17]



ポリマーレシピ：

[表A-8]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
GEMA	292.28	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0158] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを

加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

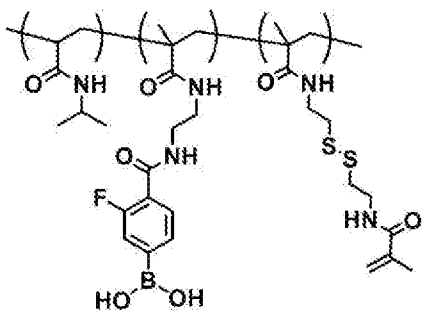
[0159] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　２７　ｍｇ　（０．１５　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１３）を得る。

[0160] １３－２．　ポリマー（Ｅ１１１）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１３）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にフェニルボロン酸基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板を０．１　Ｍ　ＥＤＣ、０．０５　Ｍ　４－ｃａｒｂｏｘｙｐｈｅｎｙｌｂｏｒｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　（または３－ｆｌｕｏｒｏ－４－ｃａｒｂｏｘｙｐｈｎｅｙｌ　ｂｏｒｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）が溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１１３）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0161] １４－１．　ポリマー（Ｅ１１４）合成

[化18]



ポリマーレシピ：

[表A-9]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
4-(2-Methacrylamidoethylcarbamoyl)-3-fluorophenylboronic acid	292.06	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0162] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0163] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　２７　ｍｇ　（０．１５　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１４）を得る。

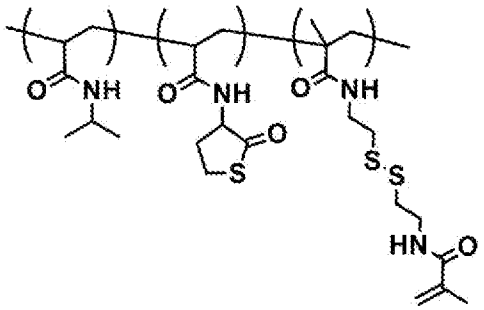
[0164] １４－２．　ポリマー（Ｅ１１４）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１４）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にｃｉｓ－ジオール構造を有する基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ

）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板をＴＥＡ、α－Ｄ－マンノピラノシルフェニルイソチオシアネートが溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１１４）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0165] １５－１．　ポリマー（Ｅ１１５）合成

[化19]



ポリマーレシピ：

[表A-10]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
N-Acryloylhomocysteine thiolactone	171.22	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0166] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収

する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

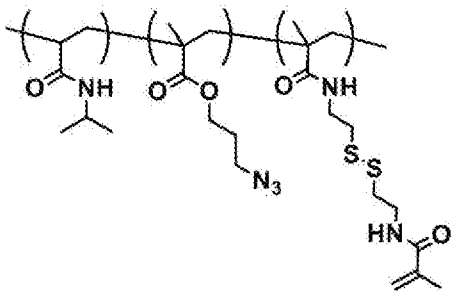
[0167] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　２７　ｍｇ　（０．１５　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１５）を得る。

[0168] １５－２．　ポリマー（Ｅ１１５）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１４）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にアミノ基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板をＥＤＣ、３－（２－ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄが溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１１５）－粒子コア混合溶液４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0169] １６－１．　ポリマー（Ｅ１１６）合成

[化20]



ポリマーレシピ：

[表A-11]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
Cystamine monomer (*N*-[2-[(2-Aminoethyl)dithio]ethyl]-2-methyl-2-propenamide, hydrochloride)	256.82	100	1
3-Azidopropyl methacrylate	169.18	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0170] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　２７　ｍｇ　（０．１５　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１６）を得る。

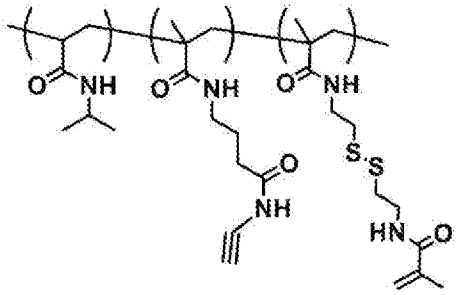
[0171] １６－２．　ポリマー（Ｅ１１６）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１６）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にアルキン基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。そこに硫酸銅、アスコルビン酸ナトリウムを加え１時間撹拌する。反応後、遠心分離で溶液を純水に置換する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブ

チリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸塩で修飾された金基板をＥＤＣ、４－（３－Ｂｕｔｙｎ－１－ｙｌｄｉｔｈｉｏ）ｂｕｔａｎｏｉｃ　ａｃｉｄが溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１１６）－粒子コア混合溶液（硫酸銅およびアスコルビン酸含有）　４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0172] １７－１．　ポリマー（Ｅ１１６）合成

[化21]



ポリマー（Ｅ１１２）、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにプロパルギルアミン１１　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ１１７）を得る。

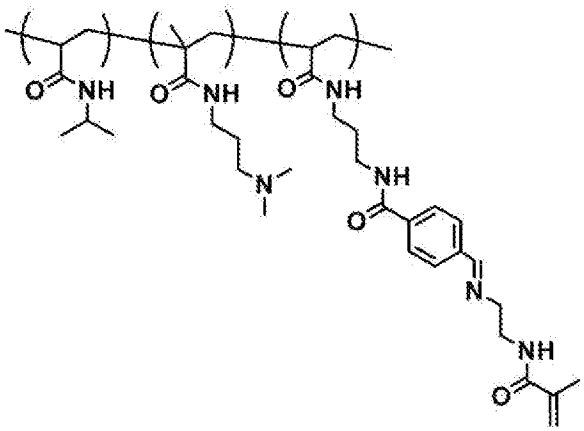
[0173] １７－２．　ポリマー（Ｅ１１７）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ１１７）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面にアジド基を修飾した粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。そこに硫酸銅、アスコルビン酸ナトリウムを加え１時間撹拌する。反応後、遠心分離で溶液を純水に置換する。この溶液をＤＭＦで適宜希釈する。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとアミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール塩酸

塩で修飾された金基板をＥＤＣ、３－［（２－Ａｚｉｄｏｅｔｈｙｌ）ｄｉｔｈｉｏ］ｐｒｏｐａｎｏｉｃ　ａｃｉｄが溶解したＤＭＦに浸漬させ１時間静置する。反応後の基板をＥｔＯＨで洗浄し、窒素ブローで乾燥させる。この基板上にポリマー（Ｅ１１７）－粒子コア混合溶液（硫酸銅およびアスコルビン酸含有）　４　μＬを滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0174] １８－１．　ポリマー（Ｅ２０１）合成

[化22]



ポリマーレシピ：

[表A-12]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
aldehyde monomer (4-Formyl-N-[2-[(1-oxo-2-propen-1-yl)amino]propyl]benzamide)	258.26	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0175]　上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

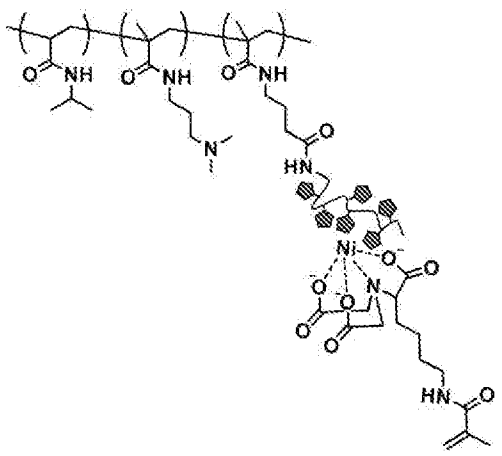
[0176] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－（２－Ａｍｉｎｏｅｔｈｙｌ）ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｍｉｄｅ　２５　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４　ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ２０１）を得る。

[0177] １８－２．　ポリマー（Ｅ２０１）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０１）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0178] １９－１．　ポリマー（Ｅ２０２）合成

[化23]



ポリマーレシピ：

[表A-13]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
4-[(2-Methyl-1-oxo-2-propen-1-yl)amino]butanoic acid	171.19	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0179] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行う（２０　ｈ）。重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0180] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ（０．２　ｍｍｏｌ）、ＮＨＳ　２２　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させる。

[0181] 前項で作製したポリマー１０　ｍｇ、ＴＥＡ　２８　μＬをＤＭＦ（１ｍＬ）に溶解させ撹拌する。ここに合成ペプチド（Ｎ末端から６つのヒスチジンが結合し、３つのグリシンが結合し、Ｃ末端にリジンが結合したものにおいてＣ末端のカルボキシル基がアミド化された構造をしているものである。）３　ｍｇ　を加え更に一晩撹拌する。反応後少量のCH_2Cl_2を添加し、その後過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせる。沈殿を回収

し、そこに少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

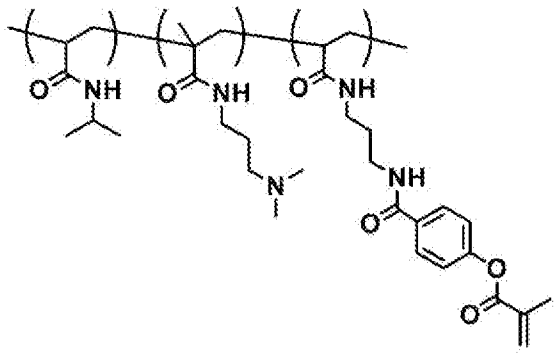
[0182] 前項で作製したポリマーをＭｅＯＨに溶解させ、そこにＮｉ錯体化したＬ－Ｌｙｓｉｎｅ，　Ｎ２，Ｎ２－ｂｉｓ（ｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ）－Ｎ６－（２－ｍｅｔｈｙｌ－１－ｏｘｏ－２－ｐｒｏｐｅｎ－１－ｙｌ）－を加え撹拌する。CH_2Cl_2を添加し析出した沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ２０２）を得る。

[0183] １９－２．　ポリマー（Ｅ２０２）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０２）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0184] ２０－１．　ポリマー（Ｅ２０３）合成

[化24]



ポリマーレシピ：

[表A-14]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
N-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride	178.66	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0185] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５ ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１ ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５ ℃）で重合を行う。（２０ ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0186] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ １４０ μＬ （１．０ ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこに４－Ｍｅｔｈａｃｒｙｌｏｙｌｏｘｙｂｅｎｚｏｉｃ ａｃｉｄ ４０ ｍｇ （０．２ ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４ ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ２０３）を得る。

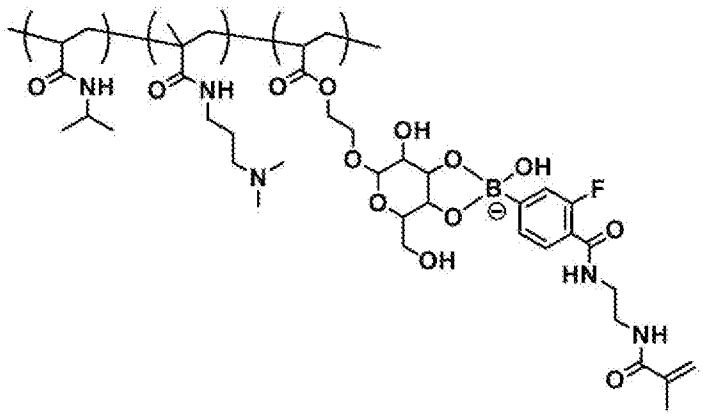
[0187] ２０－２． ポリマー（Ｅ２０３）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０３）水溶液（２ ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１， ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４ μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された

金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0188] ２１－１．　ポリマー（Ｅ２０４）合成

[化25]



ポリマーレシピ：

[表A-15]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
GEMA	292.28	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0189] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）

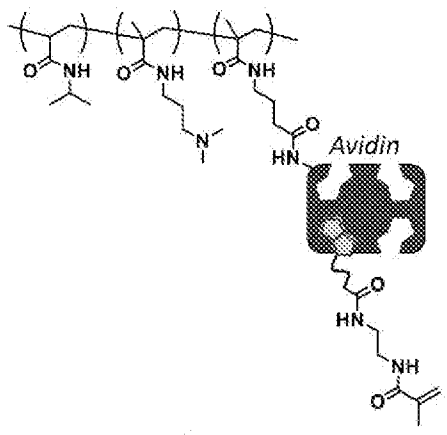
をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこに４－（２－Ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｍｉｄｏｅｔｈｙｌｃａｒｂａｍｏｙｌ）－３－ｆｌｕｏｒｏｐｈｅｎｙｌｂｏｒｏｎｉｃ ａｃｉｄ ５９ ｍｇ （０．２ ｍｍｏｌ）を添加し一晩（１４ ｈ）撹拌させる。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ２０４）を得る。

[0190] ２１－２． ポリマー（Ｅ２０４）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０４）水溶液（２ ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１， ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４ μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0191] ２２－１． ポリマー（Ｅ２０５）合成

[化26]



ポリマーレシピ：

[表A-16]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
4-[(2-Methyl-1-oxo-2-propen-1-yl)amino]butanoic acid	171.19	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0192] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0193] 前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　４０　ｍｇ（０．２　ｍｍｏｌ）、ＮＨＳ　２２　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を加え更に一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させる。

[0194] 前項で作製したポリマー１０　ｍｇを５０　ｍＭ　炭酸緩衝液（ｐＨ　８．５）（１　ｍＬ）に溶解させ撹拌する。ここにＡｖｉｄｉｎ　３　ｍｇを加え更に一晩撹拌する。反応液を１００　ｋＤａ対応の透析膜に入れリン酸緩衝液（ｐＨ　７．４）中で透析を行う。透析後、限外ろ過で濃縮を行う。その後、ｂｉｏｔｉｎ　ｍｏｎｏｍｅｒ　（（３ａＳ，４Ｓ，６ａＲ）－Ｈｅｘａｈｙｄｒｏ－２－ｏｘｏ－Ｎ－［３－［（１－ｏｘｏ－２－ｐｒｏｐｅｎ－１－ｙｌ）ａｍｉｎｏ］ｐｒｏｐｙｌ］－１Ｈ－ｔｈｉｅｎｏ［３，

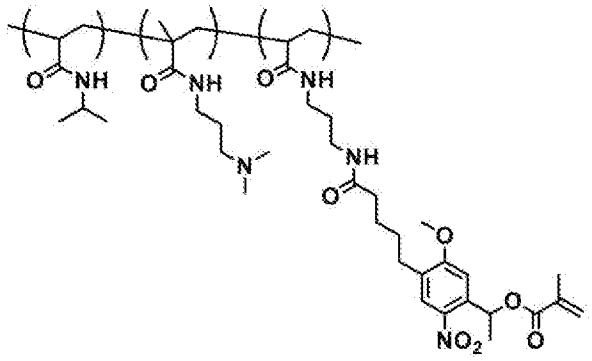
４－ｄ］ｉｍｉｄａｚｏｌｅ－４－ｐｅｎｔａｎａｍｉｄｅ）を結合させることで目的とするポリマー（Ｅ２０５）を得る。

[0195] ２２－２．　ポリマー（Ｅ２０５）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０５）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0196] ２３－１．　ポリマー（Ｅ２０６）合成

[化27]



ポリマーレシピ：

[表A-17]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
N-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride	178.66	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0197]　上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加

し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５℃）で重合を行う。（２０　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

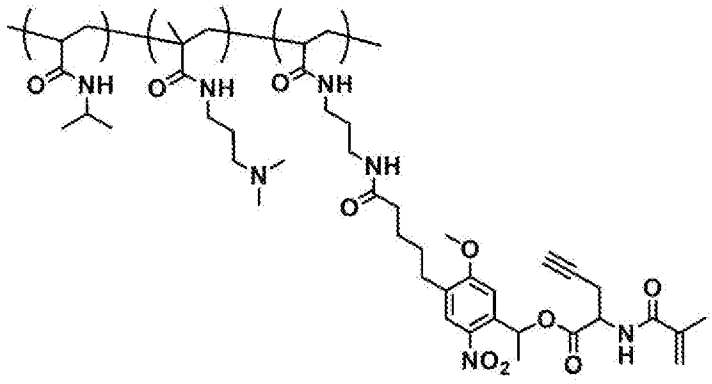
前項で作製したポリマー、ＴＥＡ　１４０　μＬ　（１．０　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ　３８　ｍｇ（０．２　ｍｍｏｌ）、４－［４－［１－（Ｍｅｔｈａｃｒｙｌｏｙｌｏｘｙ）ｅｔｈｙｌ］－２－ｍｅｔｈｏｘｙ－５－ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｏｘｙ］ｂｕｔａｎｏｉｃ　ａｃｉｄ　７３　ｍｇ　（０．２　ｍｍｏｌ）を添加し一晩遮光下で撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ２０６）を得る。

[0198] ２３－２．　ポリマー（Ｅ２０６）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０６）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、遮光下で１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0199] ２４－１．　ポリマー（Ｅ２０７）合成

[化28]



ポリマーレシピ：

[表A-18]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
N-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride	178.66	100	1
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

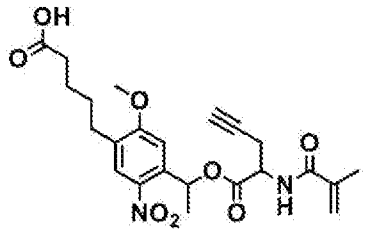
[0200] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５ ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１ ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５ ℃）で重合を行う。（２０ ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

前項で作製したポリマー、ＴＥＡ １４０ μＬ （１．０ ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＥＤＣ ３８ ｍｇ（０．２ ｍｍｏｌ）、化合物Ａ （下図参照） ９２ ｍｇ （０．２ ｍｍｏｌ）を添加し一晩遮光下で撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘ

ａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、ポリマー（Ｅ２０７）を得る。

[化29]



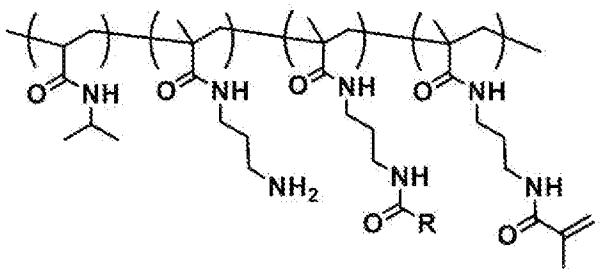
化合物A

[0201] ２４－２．　ポリマー（Ｅ２０７）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ２０７）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、遮光下で１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0202] ２５－１．　ポリマー（Ｅ３０１－Ｅ３１２）合成

[化30]



ポリマーレシピ：

[表A-19]

試料	Mw.	濃度 (mM)	最終液量(mL)
N-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride	178.66	100	1
N-(t-BOC-aminopropyl)methacrylamide	242.31	100	1
NIPAm	113.16	300	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	1
AIBN	164.21	6.25	1

[0203] 上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５ ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１ ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５ ℃）で重合を行う。（２０ ｈ）。重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収する。残渣に少量のCH_2Cl_2を添加し、更に過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加え沈殿を洗浄した後、真空乾燥させる。

[0204] 作製したポリマー、ＴＥＡ １４０ μＬ （１．０ ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ ３６ ｍｇ （０．２ ｍｍｏｌ）を添加し一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させる。

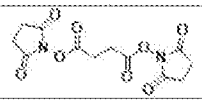
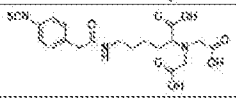
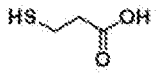
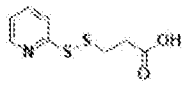
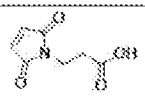
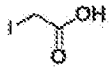
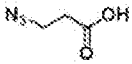
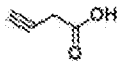
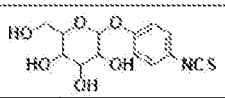
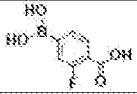
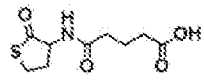
[0205] ポリマーをCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこに４ Ｎ ＨＣｌ ｉｎ ｄｉｏｘａｎｅを１ ｍＬ添加しさらに一晩撹拌する。反応液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿に少量のＣＨ２Ｃｌ２を加え、さらに過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を洗浄し、その後真空乾燥させる。

[0206] ポリマー、ＴＥＡ １４０ μＬ （１．０ ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌する。そこに右の表の化合物のいずれか０．２５

ｍｍｏｌ、＊ＥＤＣ　２０　ｍｇ　（０．１　ｍｍｏｌ）を加え一晩撹拌する。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収する。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ、目的のポリマー（Ｅ３０１－Ｅ３１２）を得る。

＊Ｅ３０４－Ｅ３０９，　Ｅ３１１－Ｅ３１２合成時に使用

[表A-20]

	導入する官能基	化合物例
E301	カルボキシ基	
E302	カルボン酸 活性エステル基	
E303	金属錯体（NTA基）	
E304	チオール基	
E305	ピリジルジスルフィド基	
E306	マレイミド基	
E307	ハロゲン化アセトアミド基	
E308	アジド基	
E309	アルキン基	
E310	cisジオール基(糖基)	
E311	ボロニル基	
E312	チオラクトン基	

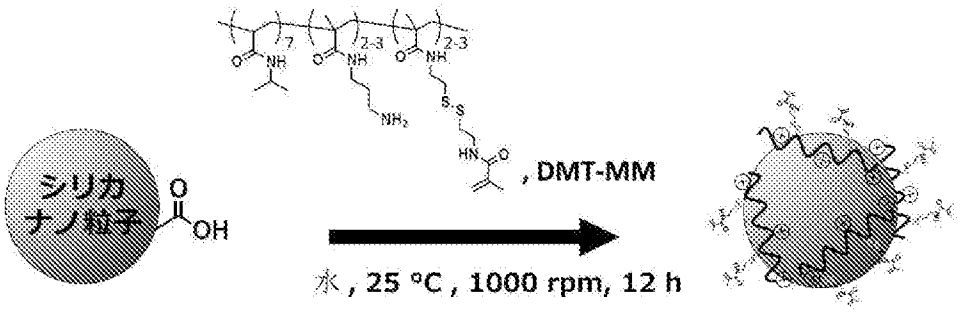
[0207] ２５－２．　ポリマー（Ｅ３０１）－粒子コア複合体形成と基板上への固定化

ポリマー（Ｅ３０１）水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）と表面に酸性性基を有する粒子コア分散液を１／１，　ｖ／ｖで混合する。この溶液をＤＭＦで８０倍に希釈する。この溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置する。その後基板をＥｔＯＨで洗浄し、粒子固定化基板を得る。

[0208]　（実施例１－２：粒子へのポリマーの結合（非共有結合））

１－２－１．　Ｅ３　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｓｉｌｉｃａ　ＮＰｓの合成

[0209] [化31]



スキーム 4. ポリマーE3コンジュゲートシリカNP 合成スキーム

[0210]　シリカナノ粒子分散液（２．０×１０^{12}　個／ｍＬ）　１００　μＬ、ポリマーＥ３水溶液（２．０　ｍｇ／ｍＬ）５００　μＬ、４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド（ＤＭＴ－ＭＭ）水溶液（１２．５　ｍＭ）　４００　μＬを混合しサーモシェーカーで２５　℃、１０００ｒｐｍで１２時間撹拌した。反応後、遠心分離（２５　℃，　１０，０００　ｇ，　１５　ｍｉｎ）×５にて溶液中の反応物を除去した。各上澄み液はＵＶ－ｖｉｓ測定（ＮａｎｏＤｒｏｐ）で確認した。

[0211]　同様の手順に従い、ポリマーＥ２、ポリマーＥ４をシリカ粒子と一体化させた。

[0212]　（結果）

１－２－２．　ＤＬＳおよびＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定

シリカナノ粒子分散液（２．０×１０^{12}　個／ｍＬ）　２０　μＬ、各種カチオン性ポリマー水溶液（２．０　ｍｇ／ｍＬ）　１００　μＬ、純水８０　μＬを混合しｖｏｒｔｅｘでよく撹拌した。この溶液を純水で１００倍に希釈し、ＤＬＳおよびＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定サンプルとした。測定機器にはＺｅｔａｓｉｚｅｒ　ｐｒｏ　（Ｍａｒｖｅｒｎ　Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ，　ＵＫ）を用いた。

[0213] ＤＬＳによる粒径測定の結果（図１－４および表１－５）とＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定の結果（図１－５及び表１－５）から作製したカチオン性ポリマーはシリカナノ粒子状に吸着しその表面特性を負に帯電している状態から正に帯電している状態へ変化させることができることが示された。またこのシリカナノ粒子にポリマーを吸着させる前後で粒径の大きな変化は観察されなかったことから、ポリマー吸着後もシリカナノ粒子破綻分散性を維持していることが示された。

[0214] [表1-5]

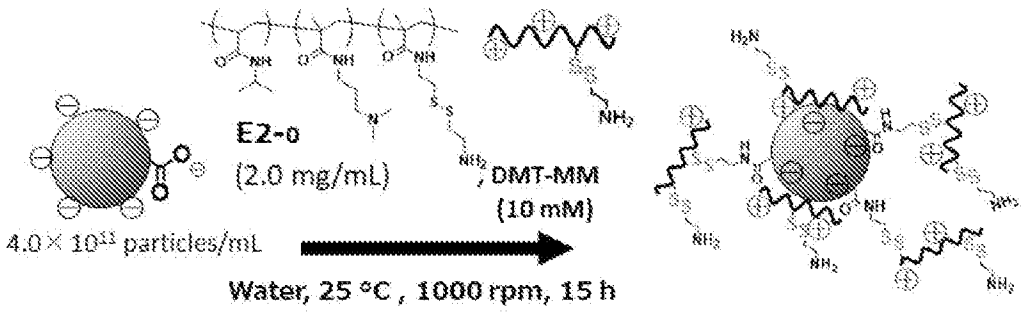
表１－５　各粒子のDLS測定およびZ-電位測定

	平均粒径（nm）	表面電荷（mV）
シリカナノ粒子	208	-53.2
シリカナノ粒子+E2	216	56.2
シリカナノ粒子+E4	237	60.9
シリカナノ粒子+E3	220	40.5

[0215] （実施例１－３：粒子へのポリマーの結合）

ポリマー（Ｅ２－０）－シリカナノ粒子複合体（ＲＭ）の合成

[化32]



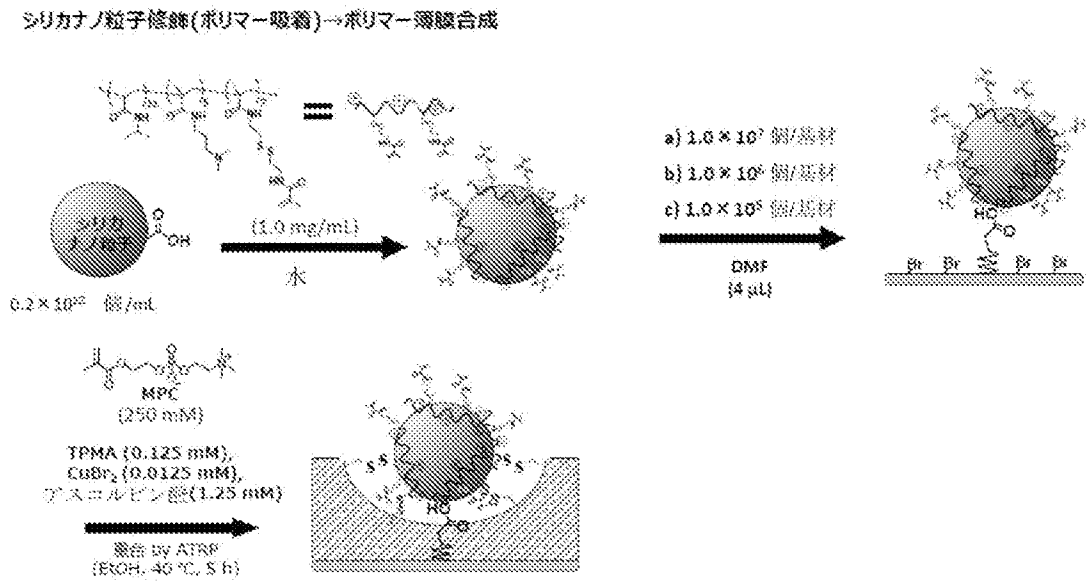
純水（５００　μＬ）中にシリカナノ粒子（２００　ｎｍ，　末端ＣＯＯＨ）　４．０×１０^{11}　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ、Ｅ２－０　２．０　ｍｇ／ｍＬ、ＤＭＴ－ＭＭ　１０　ｍＭとなるように混合し、サーモシェーカーで２５　℃、１，０００　ｒｐｍ、１５時間振盪した。反応後、純水５００　μＬを加え、遠心分離（２５　℃、１，０００　ｒｐｍ、１５　ｍｉｎ）で粒子を沈殿させ、上澄み９００　μＬを除去した。この操作を計５回行い、粒子の精製を行った。得られた粒子の粒径、表面電荷についてＤＬＳ測定を行った結果を図１－６に示す。

平均粒径（Ｚ－Ａｖｅｒａｇｅ）は２３２　ｎｍ　（ｐｄｉ：０．０２２）、表面電荷（Ｚ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ）は＋５５．３　ｍＶであったことから、粒子の単分散性を維持しつつ、表面電荷が大きく正に変化したことからポリマーが修飾されたことを確認した。

[0216]　（実施例２：測定基材の作製）

[0217]

[化33]



[0218] ２－１．実験

２－１－１．金基材の表面修飾

金基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＥｔＯＨでリンスした後、ＵＶ－Ｏ３処理を１５　ｍｉｎ実施し、基材表面のクリーンアップを行った。ＥｔＯＨ溶媒中で２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールを１：１で混合した１　ｍＭ　ＥｔＯＨ溶液を調製し、この溶液に前述の金基材を浸漬させた。３０℃、２０時間静置した後にＥｔＯＨ、純水で基材を洗浄し、金基材表面に自己組織化単分子膜（Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ　Ｍｏｎｏｌａｙｅｒ：ＳＡＭ）を形成させた。

２－１－２．粒子固定化基材の作製

シリカナノ粒子分散液（粒径２００ｎｍ、粒子濃度：２．０×１０^{11}個／ｍＬ）とポリマーＥ２（１．０ｍｇ／ｍＬ）を前述の終濃度にて水中で混合し複合体を形成させた。

[0219] ＤＭＦにて上記の複合体溶液を希釈し、複合体を固定化する基材面積に対して表２－２に示した個数になるように滴下（４μＬ）し、２５℃で１時間

静置した。

ＤＭＦ、ＥｔＯＨ、純水の順で基材を洗浄し、粒子固定化基材を得た。

[0220] 基材の評価は蛍光顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ、ＢＺ－８００）にて実施し、ソフトウェア（ハイブリッドセルカウント）を用いた解析を行った。それぞれの測定条件を表２－１に示す。

[0221] [表2-1]

表２－１ 実験条件表

No.	個数 [個/4 μL]	蛍光顕微鏡測定条件（露光時間）		
		4 倍対物レンズ	22.2 倍対物レンズ	60 倍対物レンズ
1	1×10^7	1.5 sec	0.25 sec	0.02 sec
2	3×10^6	↑	↑	↑
3	1×10^6	↑	↑	↑
4	3×10^5	2 sec	↑	↑
5	1×10^5	↑	0.5 sec	↑

[0222] ２－１－３． 粒子固定化基材上でのシリカナノ粒子インプリントポリマーの合成

表２－２に示す組成にてプレポリマー溶液を作製し、凍結脱気にて溶存酸素を除去した後、グローブボックス内にて２５℃で１８時間重合を行った。重合後の基材は純水で洗浄した。

[0223] 前述の基材を１００ｍＭトリス（２－カルボキシエチル） ホスフィン塩酸塩溶液（メタノール：純水＝１：１）に浸漬し、超音波処理を５ｍｉｎ行うことでシリカナノ粒子を除去し、ポリマー薄膜表層に空孔を形成させた。

[0224] [表2-2]

表２－２ プレポリマー溶液組成

	試料	濃度
主原料	MPC（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）	500 mM
開始剤	EBIB（αブロモイソ酪酸エチル）	1.25 mM
リガンド	TPMA（トリス(2-ピリジルメチル)アミン）	0.125 mM
触媒	$CuBr_2$	0.0125 mM
還元剤	アスコルビン酸	1.25 mM
溶媒	EtOH	270 μL

[0225] ２－２．結果

２－２－１．粒子固定化基材の作製

蛍光顕微鏡での観察結果を図２－１に示す。いずれの条件でも基材上にシリカナノ粒子由来の蛍光を確認できたことから、基材上にシリカナノ粒子（ポリマー複合体）が固定化されていることを確認できた。

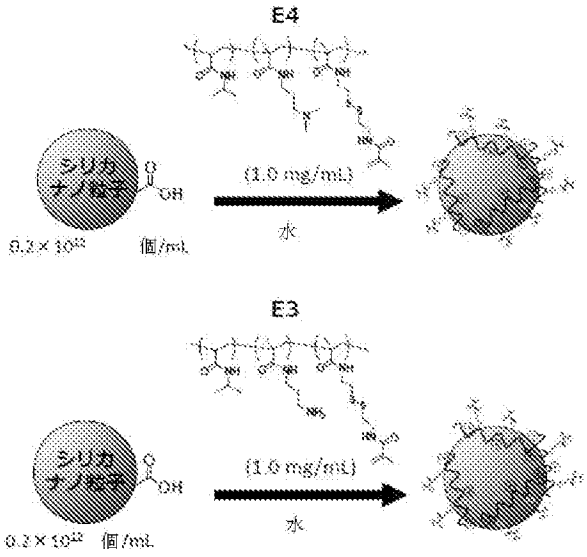
また６０倍対物レンズでの蛍光観察とハイブリッドセルカウントを用いて解析を行った結果を図２－２に示す。図２－２より、滴下個数の増大と共に基材上のシリカナノ粒子個数が増加する傾向にあることが分かった。また画像から明らかに単分散で、凝集しておらず、単層であると判断できる図Ｎｏ．４・Ｎｏ．５において、輝点の面積が２μｍ^{2}を上回るものはほとんど存在しなかったため

、これを超える輝点面積を有するものは凝集体であると判断できる。この数値を境界値とすることで、境界値２μｍ^{2}を超える輝点が発生するＮｏ．４（３×１０^{6}個／４μＬ）以上で凝集が発生し、Ｎｏ．５（１×１０^{6}個／４μＬ）以下では凝集が発生していないということを数値で客観的に表現可能であり、また基材に滴下する個数によって基材上の粒子様態を制御可能であった。

[0226] （実施例３：測定基材の作製（カチオンポリマー））

３．シリカ粒子を用いた検討（カチオンポリマー組成の影響）

[化34]



[0227] ３－１．実験

３－１－１．金基材の表面修飾

金基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＥｔＯＨでリンスした後、ＵＶ－Ｏ３処理を１５　ｍｉｎ実施し、基材表面のクリーンアップを行った。

[0228] ＥｔＯＨ溶媒中で２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールを１：１で混合した１　ｍＭＥｔＯＨ溶液を調製し、この溶液に前述の金基材を浸漬させた。３０℃、２０時間静置した後にＥｔＯＨ、純水で基材を洗浄し、金基材表面に自己組織化単分子膜（Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ　Ｍｏｎｏｌａｙｅｒ：ＳＡＭ）を形成させた。

３－１－２．粒子固定化基材の作製

シリカナノ粒子分散液（粒径２００ｎｍ、粒子濃度：２．０×10^{11}個／ｍＬ）とポリマーＥ４、Ｅ３（１．０ｍｇ／ｍＬ）を前述の終濃度にて水中でそれぞれ混合し複合体を形成させた。

[0229] ＤＭＦにて上記の複合体溶液を希釈し、複合体を固定化する基材面積に対して表３－１または表３－２となるように基材に溶液を滴下（４μＬ）し、２５℃で１時間静置した。

[0230] ＤＭＦ、ＥｔＯＨ、純水の順で基材を洗浄し、粒子固定化基材を得た。

[0231] 基材の評価は蛍光顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ、ＢＺ－８００）にて実施し、ソフトウェア（ハイブリッドセルカウント）を用いた解析を行った。それぞれの測定条件を表３－１と表３－２に示す。

[0232]

[表3-1]

表 3-1　実験条件表（ポリマーE4）

No.	個数 [個/4μL]	蛍光顕微鏡測定条件（露光時間）		
		4倍対物レンズ	22.2倍対物レンズ	60倍対物レンズ
1	1×10^{7}	1.5 sec	0.25 sec	0.02 sec
2	3×10^{6}	↑	↑	↑
3	1×10^{6}	↑	↑	↑
4	3×10^{5}	2 sec	↑	↑
5	1×10^{5}	↑	0.5 sec	↑

[0233] [表3-2]

表 3-2　実験条件表（ポリマーE3）

No.	個数 [個/4μL]	蛍光顕微鏡測定条件（露光時間）		
		4倍対物レンズ	22.2倍対物レンズ	60倍対物レンズ
1	1×10^{7}	1.5 sec	0.25 sec	0.02 sec
2	3×10^{6}	↑	↑	↑
3	1×10^{6}	↑	↑	↑
4	3×10^{5}	↑	0.5 sec	↑
5	1×10^{5}	↑	↑	↑

[0234] ３－２．結果

３－２－１．粒子固定化基材の作製

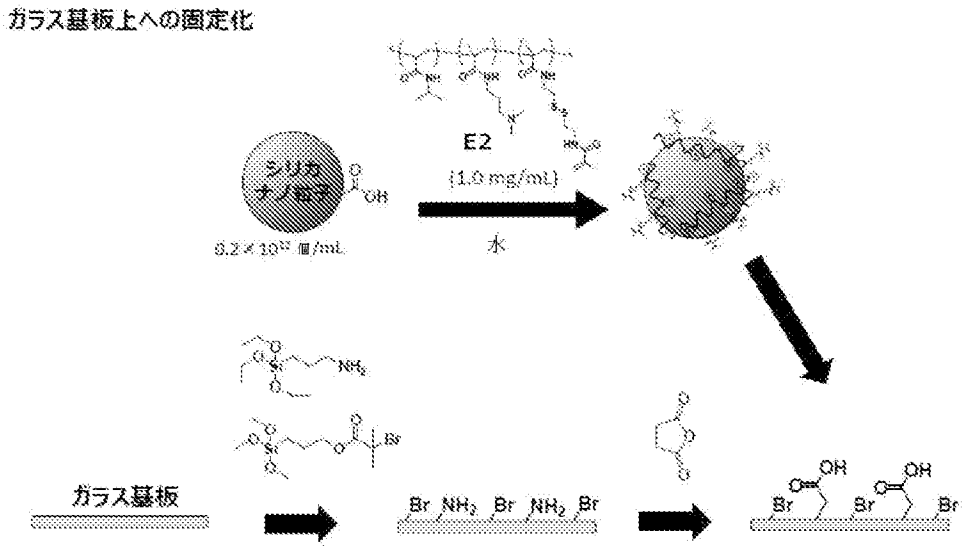
蛍光顕微鏡での観察結果を図３－１と図３－２に示す。この結果より、異なるポリマー組成であっても基材に滴下する個数によって基材上の粒子様態を制御可能であることが分かった。

[0235] （実施例４：測定基材の作製（ガラス基材））

４．シリカ粒子を用いた検討（基材の影響）

[0236]

[化35]



[0237] ４－１－１．ガラス基材の表面修飾

ガラス基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＥｔＯＨでリンスした後、ＵＶ－Ｏ３処理を１５　ｍｉｎ実施し、基材表面のクリーンアップを行った。

[0238] ＥｔＯＨ溶媒（１％純水）中で３－アミノプロピルトリエトキシシラン（ＡＴＰＥＳ）と３－（トリメトキシシリル）プロピル２－ブロモ－２－メチルプロパノエートを１　ｖｏｌ％ずつ混合し、この溶液に前述のガラス基材を浸漬させた。２５℃、１時間静置した後にＥｔＯＨで洗浄し、オーブンにて９０℃で２時間乾燥させることで、ガラス基材表面にアミノ基とＡＴＲＰ開始基を導入した。

[0239] ５ｍｇ／ｍＬ　無水コハク酸溶液（溶媒＝ＴＨＦ：ＴＥＡ＝９５：５）を調製し、前述の基材を浸漬させた。２５℃、４時間静置した後に純水で洗浄し、ガラス基材表面のアミノ基の位置をカルボキシル基とした。

[0240] １　ｍＭ　２－ブロモイソブタン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液（溶媒＝ＤＭＦ）に基材を浸漬し、２５℃で１時間反応させた後にＥｔＯＨで洗浄した。これにより表面にＡＴＲＰ開始基とカルボキシル基を有するガラス基材を得た。

４－１－２．粒子固定化基材の作製

シリカナノ粒子分散液（粒径２００ｎｍ、粒子濃度：２．０×１０^{11}個／ｍＬ）とポリマーＥ２（１．０ｍｇ／ｍＬ）を前述の終濃度にて水中でそれぞれ混合し複合体を形成させた。

[0241] ＤＭＦにて上記の複合体溶液を希釈し、複合体を固定化する基材面積に対して表４－１となるように基材に溶液を滴下（４μＬ）し、２５℃で１時間静置した。

[0242] ＤＭＦ、ＥｔＯＨ、純水の順で基材を洗浄し、粒子固定化基材を得た。

[0243] 基材の評価は蛍光顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ、ＢＺ－８００）にて実施し、ソフトウェア（ハイブリッドセルカウント）を用いた解析を行った。それぞれの測定条件を表４－１に示す。

表 4-1 実験条件表

No.	個数 [個/4μL]	蛍光顕微鏡測定条件（露光時間） 60 倍対物レンズ
1	3×10^{7}	?
2	1×10^{7}	↑
3	3×10^{6}	↑
4	1×10^{6}	↑
5	3×10^{5}	↑
6	1×10^{5}	↑
7	3×10^{4}	↑
8	1×10^{4}	↑

[0244] ４－２．結果

４－２－１．粒子固定化基材の作製

蛍光顕微鏡での観察結果を図４に示す。この結果より、異なる基材であっても基材に滴下する個数によって基材上の粒子様態を制御可能であることが分かった。

[0245] （実施例５：測定基材の作製（ポリスチレン粒子））

５．ポリスチレン粒子を用いた検討

５－１．実験

５－１－１．金基材の表面修飾

金基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＥｔＯＨでリンスした後、ＵＶ－Ｏ３処理を１５　ｍｉｎ実施し、基材表面のクリーンアップを行った。

[0246] ＥｔＯＨ溶媒中で２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールを１：１で混合した１　ｍＭＥｔＯＨ溶液を調製し、この溶液に前述の金基材を浸漬させた。３０℃、２０時間静置した後にＥｔＯＨ、純水で基材を洗浄し、金基材表面に自己組織化単分子膜（Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ　Ｍｏｎｏｌａｙｅｒ：ＳＡＭ）を形成させた。

５－１－２．粒子固定化基材の作製

ポリスチレン粒子分散液（粒径２５０ｎｍ、粒子濃度：２．０×10^{11}個／ｍＬ）とポリマーＥ２（１．０ｍｇ／ｍＬ）を前述の終濃度にて水中で混合し複合体を形成させた。

[0247] ＤＭＦにて上記の複合体溶液を希釈し、複合体を固定化する基材面積に対して表５－１となるように滴下（４μＬ）し、２５℃で１時間静置した。

[0248] ＤＭＦ、ＥｔＯＨ、純水の順で基材を洗浄し、粒子固定化基材を得た。

[0249] 基材の評価は蛍光顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ、ＢＺ－８００）にて実施し、ソフトウェア（ハイブリッドセルカウント）を用いた解析を行った。それぞれの測定条件を表５－１に示す。

[0250] [表5-1]

表 5-1 実験条件表

No.	個数 [個/4μL]	蛍光顕微鏡測定条件（露光時間）		
		4 倍対物レンズ	22.2 倍対物レンズ	60 倍対物レンズ
1	1×10^{8}	0.2 sec	0.05 sec	-
2	3×10^{7}	〃	〃	-
3	1×10^{7}	〃	〃	0.005 sec
4	3×10^{6}	1 sec	0.2 sec	〃
5	1×10^{6}	〃	〃	〃
6	3×10^{5}	〃	〃	〃
7	1×10^{5}	〃	〃	〃
8	3×10^{4}	〃	〃	-
9	1×10^{4}	〃	〃	-

[0251] ５－２．結果

５－２－１．粒子固定化基材の作製

蛍光顕微鏡での観察結果を図５－１と図５－２に示す。いずれの条件でも基材上にポリスチレン粒子由来の蛍光を確認できたことから、基材上にポリスチレン粒子（ポリマー複合体）が固定化されていることを確認できた。

また得られた蛍光顕微鏡画像をソフトウェア（ハイブリッドセルカウント）を用いて解析を行った結果を表５－２に示す。解析の結果、滴下する粒子個数の増加と共に基材上のポリスチレン粒子個数が増加する傾向にあり、特に滴下個数が多い条件（Ｎｏ．１、Ｎｏ．２）では輝点数がＮｏ．３に比べて減少したことから、凝集体の個数が増加したことが分かった。

さらに、Ｎｏ．１（１×１０^{8}個／４μＬ）とＮｏ．２（３×１０^{7}個／４μＬ）においては基材上で粒子の凝集度合いが大きく、均一性に乏しい一方でＮｏ．８（３×１０^{4}個／４μＬ）とＮｏ．９（１×１０^{4}個／４μＬ）ではポリスチレン粒子の固定化量が極めて少ない。そのため、Ｎｏ．３（１×１０^{7}個／４μＬ）～Ｎｏ．７（１×１０^{5}個／４μＬ）にて詳細な検討を行うべく、６０倍対物レンズでの蛍光観察とハイブリッドセルカウントを用いて解析を行った結果をそれぞれ図５－３と図５－４に示す。

図５－３より、滴下個数の増大と共に最大輝点面積が増大しており、凝集の規模が大きくなっていることが分かった。また画像から明らかに単分散で、凝集しておらず、単層であると判断できるＮｏ．６・Ｎｏ．７において、輝点の面積は２μｍ^{2}程度であったため、これを超える輝点面積を有するものは凝集体であると判断できる。この数値を境界値とし、２μｍ^{2}・４μｍ^{2}・１０μｍ^{2}と定めた際の境界値以上の輝点数を図５－４に示した。この結果より、境界値２μｍ^{2}を超える輝点が発生するＮｏ．４（３×１０^{6}個／４μＬ）以上で凝集が発生し、Ｎｏ．５（１×１０^{6}個／４μＬ）以下では凝集が発生しておらず、基材に滴下する個数によって基材上の粒子様態を制御可能であった。

[0252]

[表5-2]

表.5-2　22.2倍対物レンズでの撮影画像を用いたハイブリッドセルカウント解析

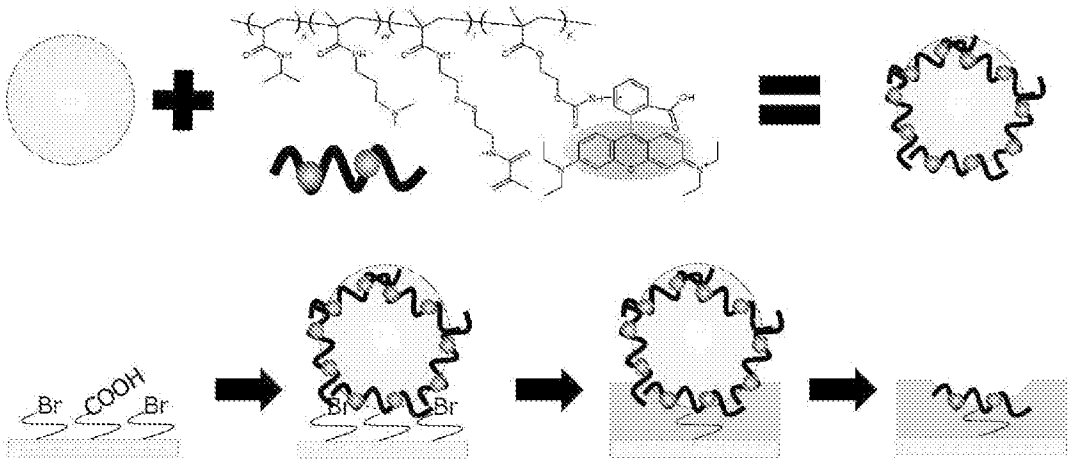
滴下濃度	総輝点数	単分散輝点数 (≦10μm²)	凝集体輝点数 (>10μm²)	最大輝点面積 [μm²]	総輝点面積 [μm²]
1×10⁸	4059	3716	343	454.911	12072.21
3×10⁷	9152	7648	1504	223	29613
1×10⁷	16441	14889	1552	423	33967
3×10⁶	8472	7364	1108	150	20317
1×10⁶	4289	3377	912	39.029	20715.15
3×10⁵	258	181	77	57	1145
1×10⁵	61	37	24	20.412	191.914
3×10⁴	30	26	4	15	89
1×10⁴	12	9	3	22	66

[0253]　（実施例６：性能試験（基材上の粒子密度評価））

６Ａ基材上の凹部密度

蛍光性カチオンポリマーを用いた検討

[0254] [化36]



[0255] ６－１．実験

６－１－１．金基材の表面修飾

金基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＥｔＯＨでリンスした後、ＵＶ－Ｏ３処理を１５　ｍｉｎ実施し、基材表面のクリーンアップを行った。

[0256] ＥｔＯＨ溶媒中で２－（２ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールを１：１で混合した１　ｍＭＥｔＯＨ溶液を調製し、この溶液に前述の金基材を浸漬させた。３０℃、２０時間静置した後にＥｔＯＨ、純水で基材を洗浄し、金基材表面に自己組織化単分子膜（Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ　Ｍｏｎｏｌａｙｅｒ：ＳＡＭ）を形成させた。

６－１－２．粒子固定化基材の作製

シリカナノ粒子分散液（粒径２００ｎｍ、粒子濃度：２．０×１０^{11}個／ｍＬ）とポリマーＦ１（１．０ｍｇ／ｍＬ）を前述の終濃度にて水中で混合し複合体を形成させた。

[0257] ＤＭＦにて上記の複合体溶液を希釈し、複合体を固定化する基材面積に対して表６－１となるように滴下（４μＬ）し、２５℃で１時間静置した。

[0258] ＤＭＦ、ＥｔＯＨ、純水の順で基材を洗浄し、粒子固定化基材を得た。

[0259] 基材の評価は蛍光顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ、ＢＺ－８００）にて実施し、ソフトウェア（ハイブリッドセルカウント）を用いた解析を行った。それぞれの測定条件を表６－１に示す。

[0260] [表6-1]

表6-1　実験条件表（ポリマーF1）

No.	個数[個/4μL]	蛍光顕微鏡測定条件（露光時間）					
		緑			赤		
		粒子固定化後	重合後	鋳型除去後	粒子固定化後	重合後	鋳型除去後
1	1×10^{7}	0.1 sec	0.1 sec	0.2 sec	0.01 sec	0.01 sec	0.02 sec
2	3×10^{6}	↑	↑	↑	↑	↑	↑
3	1×10^{6}	↑	↑	0.5 sec	↑	↑	0.05 sec

[0261] ６－１－３．　粒子固定化基材上でのシリカナノ粒子インプリントポリマーの合成

表６－２に示す組成にてプレポリマー溶液を作製し、凍結脱気にて溶存酸素を除去した後、グローブボックス内にて２５℃で１８時間重合を行った。

重合後の基材は純水で洗浄した。

[0262] 前述の基材をメタノール：純水＝１：１の溶液に浸漬し、超音波処理を０．５　ｍｉｎ行うことでシリカナノ粒子を除去し、ポリマー薄膜表層に空孔を形成させた。

[0263] [表6-2]

表6-2　プレポリマー溶液組成

	資料	濃度
主原料	MPC（2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）	500 mM
開始剤	EBIB（α－ブロモイソ酪酸エチル）	1.25 mM
リガンド	TPMA（トリス(2-ピリジルメチル)アミン）	0.125 mM
触媒	$CuBr_2$	0.0125 mM
還元剤	アスコルビン酸	1.25 mM
溶媒	EtOH	270 μL

[0264] ６－２．結果

６－２－１．粒子固定化基材の作製

シリカナノ粒子と蛍光性カチオンポリマーＦ１の複合体について、Ｚｅｔａ　Ｓｉｚｅｒによる粒径

・表面Ｚ電位測定を実施した結果を表．６－３に示す。複合体の形成前後において表面Ｚ電位がネガティブからポジティブになっていることから、シリカナノ粒子と蛍光性カチオンポリマーＦ１が複合体を形成していることが確認でき、また粒径とＰＤＩから粒子は凝集しておらず、分散性を損なっていないことが確認できた。

[0265] [表6-3]

表 6-3　Zeta Sizer による粒径・表面 Z 電位測定結果

測定物	粒径	PDI	表面 Z 電位
シリカナノ粒子	201.2 nm	0.01824	−29.97 mV
シリカナノ粒子+P1 複合体	225.8 nm	0.1005	57.94 mV

[0266] また蛍光顕微鏡での観察結果を図６－１に示す。いずれのサンプルでもシリカナノ粒子由来の緑色蛍光と蛍光性カチオンポリマー由来の赤色蛍光が確

認できたことから、シリカナノ粒子－蛍光性カチオンポリマー複合体が基材上に固定化されたことを確認できた。

[0267] ６－２－２．シリカナノ粒子除去後の蛍光性カチオンポリマーＦ１確認

シリカナノ粒子－蛍光性カチオンポリマー複合体の固定化後の基材上へのポリマー層重合後の蛍光顕微鏡での観察結果と重合後のシリカナノ粒子除去後の蛍光顕微鏡での観察結果をそれぞれ図６－２と図６－３に示す。

図６－２より、重合後も基材上にシリカナノ粒子と蛍光性カチオンポリマー由来の蛍光を確認できていたが、シリカナノ粒子除去後の図６－３からはシリカナノ粒子由来の緑色蛍光が確認できなくなった一方で蛍光性カチオンポリマー由来の赤色蛍光が確認できた。このことから、実験操作によってシリカナノ粒子を除去した後も蛍光性カチオンポリマーが基材上に作製したポリマー層（シリカナノ粒子除去後の空孔内）に残存していることが確認できた。

[0268] またシリカ粒子除去後に基板上に残存する赤色蛍光はシリカ粒子除去後の空孔内に存在するカチオンポリマーに由来することから、この赤色蛍光の輝点数＝空孔数として基板上の空孔密度を算出した。この結果、本実験条件において基板上に形成された空孔密度は基材に滴下するシリカ粒子の個数と相関し、10^3～10^6個／mm^2の範囲となった。このことから、基材に滴下する個数によって基材上の粒子様態に加えて、シリカ粒子除去後の空孔密も制御可能であることが分かった。

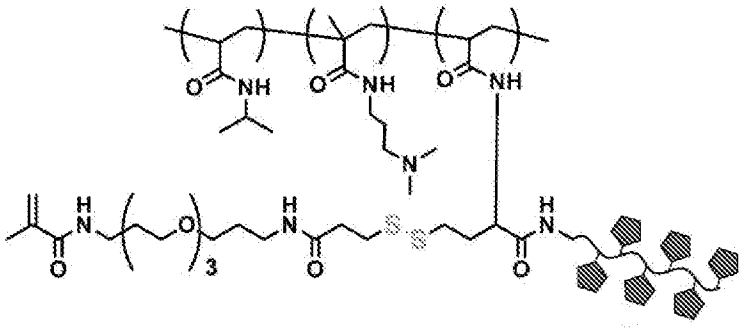
[0269] ６．Ｂ基材上の粒子密度

実施例２，３および５で得られた測定基材上の粒子を６０倍対物レンズでの蛍光観察とハイブリッドセルカウントを用いて解析を行った結果である図３－１、図３－２および図５－１より、滴下個数の増大と共に基材上のシリカナノ粒子個数が増加する傾向にあることが分かった。また画像から明らかに単分散で、凝集することなく、単層であると判断できるＮｏ．４・Ｎｏ．５において、輝点の面積が２μm^2を上回るものはほとんど存在しなかったため、これを超える輝点面積を有するものは凝集体であると判断できる。この

数値を境界値とすることで、境界値２μｍ^{2}を超える輝点が発生するＮｏ．４（３×１０^{6}個／４μＬ）以上で凝集が発生し、Ｎｏ．５（１×１０^{6}個／４μＬ）以下では凝集が発生していないということを数値で客観的に表現可能であり、また基材に滴下する個数によって基材上の粒子様態を制御可能であった。測定基材上に存在する粒子を解析した結果を図６－４にまとめた。凝集が発生しないＮｏ．５（１×１０^{6}個／４μＬ）以下の濃度で粒子をまいた場合、基材上に１×１０^{5}個／ｍｍ^{2}以下の粒子密度で存在する場合、基材上に単分散で、凝集しておらず、単層で粒子が配置されていた。

[0270] （実施例７：Ｈｉｓ－Ｔａｇポリマーとシリカナノ粒子の複合化）

[化37]



E11His の構造

[表B]

試料	Mw.	濃度. (mM)	最終液量 (mL)	重量 (mg)
N-アクリロイルホモシステイン チオラクトン	171.22	100	1	17
N-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)メタクリルアミド	170.25	200	1	35
NIPAm	113.16	700	1	79
2-シアノ-2-[(ドデシルスルファニルチオカルボニル) スルファニル] プロパン	345.63	10	1	3.5
AIBN	164.21	5	1	0.8

上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加した。撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７

０　℃）で重合を行った（１７　ｈ）。（撹拌速度は３００　ｒｐｍ）

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させた。反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収した。沈殿をｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒで洗浄し真空乾燥させた。

得られたポリマー　５　ｍｇ、Ｈｉｓ－ｔａｇ　（Ｎ末端から６つのヒスチジンが結合し、３つのグリシンが結合し、Ｃ末端にリジンが結合したものにおいてＣ末端のカルボキシル基がアミド化された構造をしているものである。）

４　ｍｇ、ｐｙｒｉｄｙｌｄｉｔｈｉｏｅｔｈｙｌ－ＰＥＧ３－ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｍｉｄｅ　３．５　ｍｇ、ＴＥＡ　２．８　μＬをＤＭＦ　（０．３　ｍＬ）に溶解させ９時間撹拌した。反応液にCH_2Cl_2、ｎ－ｈｅｘａｎｅを加え生じた沈殿を回収し、真空乾燥させポリマー（Ｅ１１Ｈｉｓ）を得た。

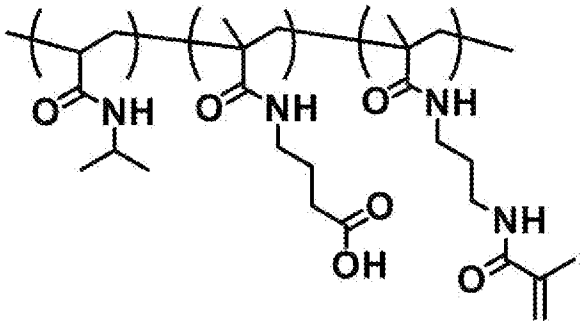
ｉｉｉ）　Ｅ１１Ｈｉｓ

２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとＮＴＡ－ＳＡＭ　ｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｒｅｇｅｎｔで修飾された金基板上に、４ｍＭ$NiCl_2$水溶液を滴下し静置（室温，１５ｍｉｎ）後、基板を純水で洗浄した。シリカナノ粒子（２００　ｎｍ，　ＣＯＯＨ末端）とＥ１１Ｈｉｓ水溶液との混合溶液（シリカ濃度２．０×10^{11}　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ、ポリマー濃度　１　ｍｇ／ｍＬ）をＤＭＦで４、４００倍に希釈した。これらの溶液４　μＬを$NiCl_2$と反応後の金基板上に滴下し、１時間静置した。その後表面をＥｔＯＨで洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図７に示す。

[0271]　（実施例８：カチオンシリカナノ粒子＋アニオンポリマーＥｘ８）

１．アニオンポリマーＥｘ８の合成方法

[化38]



表のレシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させた（最終液量：１　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加し、撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７０℃）で重合を行った。（１６　ｈ）。

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させ、反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収した。回収した沈殿をｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒで洗浄した後、真空乾燥させポリマーを得た。

得られたポリマー、ＴＥＡ　７０　μＬ　（０．５　ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2に溶解させ、氷冷下で撹拌し、そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ　５４　ｍｇ　（０．３　ｍｍｏｌ）を添加し一晩撹拌した。その後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収した。この沈殿を少量のCH_2Cl_2に再溶解させ過剰量のｎ－ｈｅｘａｎｅを加えて沈殿を生じさせ、この沈殿を回収し、真空乾燥させ目的のポリマー（Ｅｘ８）を得た。

収量：１２０　ｍｇ

[表C]

試料	Mw.	濃度.(mM)	最終液量(mL)
N-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride	178.66	100	1
4-[(2-Methyl-1-oxo-2-propen-1-yl)amino]butanoic acid	171.19	200	1
Isopropylacrylamide (NIPAm)	113.16	700	1
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl) sulfanyl]propane	345.63	10	1
AIBN	164.21	5	1

２．シリカナノ粒子とポリマーの複合

シリカ（Ｒｅｄ－ｐｌａｎｅ、２００　ｎｍ、５０　ｍｇ／ｍＬ）　１．９８　ｍｇ　（３９．６μＬ）と純水　６０．４μＬ　（ｔｏｔａｌ　１００　ｕＬ）を混合し、１．５　ｍＬエッペンに入れておいたＥｔＯＨ　８００　ｕＬ中に添加後、さらに２Ｍ　ＨＣｌ　１００　ｕＬ　、ＡＰＴＥＳ　１５　ｕＬ　を入れ、２５℃　サーモシェーカー　１０００ｒｐｍ　２０ｈで反応させた。反応後、エタノールにて遠心洗浄（５０００ｒｐｍ　１０ｍｉｎ×３）した。

作製したシリカナノ粒子分散液（NH_2末端，　２００ｎｍ、４．０×10^{11}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ、５０ｍＭ炭酸バッファー（ｐＨ８．０））２０μＬと、Ｅｘ８炭酸バッファー溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）　２０μＬを混合し、２５℃で１５分静置した。

３．ＤＬＳ測定

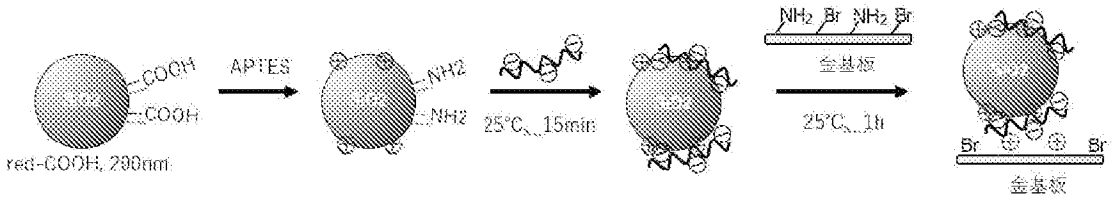
２の複合体を純水で１００倍希釈し、ＤＬＳを用いて粒子径およびＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌを測定した。

４．基板への固定化

２の複合体をＤＭＦで８０倍に希釈した。２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオール：アミノ－ＥＧ６ウンデカンチオール（１：１ｖｏｌ）で修飾した金基板上に４μＬ滴下し、２５℃で１ｈ静置した。その

後表面をＥｔＯＨで洗浄し、蛍光顕微鏡およびＳＥＭで表面を観察した（図８）。

[化39]



ＤＬＳによる粒子径測定の結果と、Ｚ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定の結果から、アニオン性ポリマーがシリカナノ粒子に吸着し、表面が正に帯電している状態から負に帯電している状態へと変化したことが示唆された。また、粒子径に大きな変化がないことから、ポリマー吸着後も分散性を保っていることが示された。

[表D]

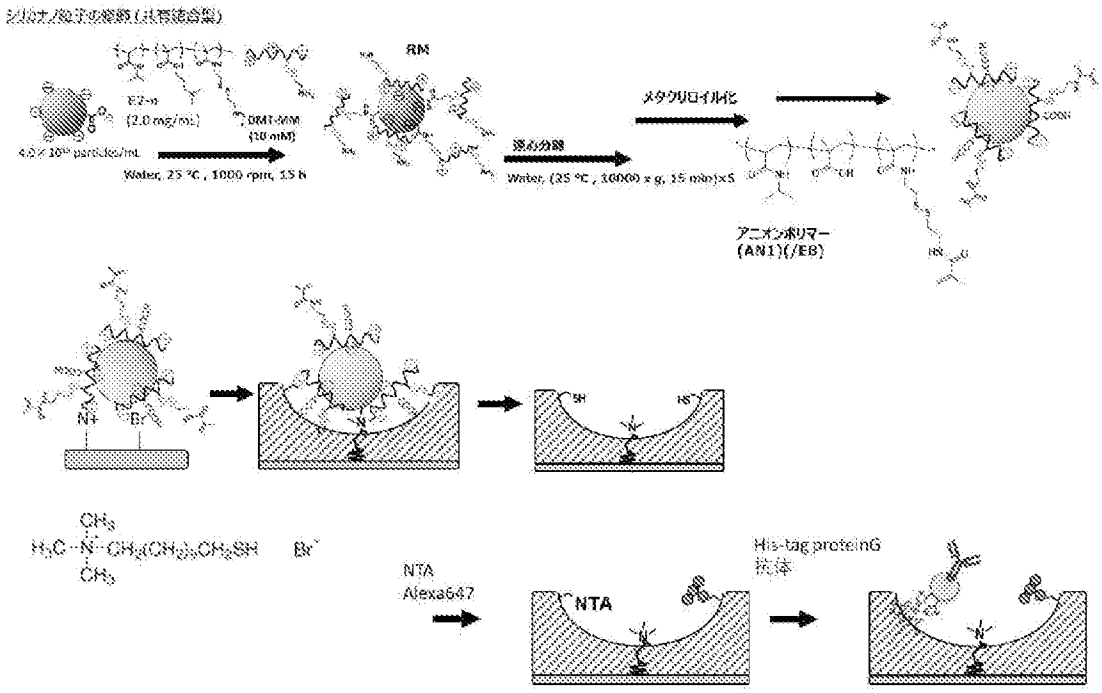
	シリカナノ粒子	Ex8 複合後
size(nm)	221.5	251.7
zeta(mV)	34.4	-14.4

[0272] （結果）

図８の観察結果より、シリカナノ粒子に由来する蛍光輝点が単分散で、凝集しておらず、単層に分布していることが観察された。このことからアニオンポリマーＥｘ８とカチオンシリカナノ粒子を複合しても、カチオンポリマーＥｘ８とアニオンシリカナノ粒子の場合と同様、単分散で、凝集しておらず、単層に基板へ粒子を固定できることが示された。

[0273] （実施例９：カチオン性ナノ粒子＋アニオンポリマー）

[化40]



[0274] （使用したシリカナノ粒子）

・ Ｅ２－０ ｃｏｎｊｕ ｒｅｄ－ＣＯＯＨ ｓｉｌｉｃａ （ＲＭ）２００ ｎｍ

４．０ｘ１０^{11} 個／ｍｌ

[0275] （ポリマー溶液）

・ポリマー終濃度 ０．８７ ｍｇ／ｍＬ （１０ｍＭ ＰＢ， ｐＨ７．４７）

[0276] （アニオンシリカ）

・シリカナノ粒子分散液とポリマーＡＮ－１を混合し複合体を形成させた。（シリカ終濃度１．０ｘ１０^{11}個／ｍｌ、ポリマー終濃度０．４３５ｍｇ／ｍＬ（５ｍＭ ＰＢ））

ＤＭＦにて上記の複合体溶液を４，４０，４００，４０００倍希釈し、複合体を固定化する基材に対して４μＬ滴下し、２５℃で１時間静置した。エタノールで基材を洗浄し、粒子固定化基材を得た。

[0277] （ポリマーマトリックス合成）

ＡＴＲＰによって薄膜を形成（２５℃，　２０　ｈ）

[0278]（粒子コアの除去元）

５０％　酢酸／ＭｅＯＨを１．５ｍＬチューブに３００μＬ入れ、基板１枚ずつ浸漬させ、超音波処理を８分行った後、純水で洗浄した。

[0279]（Ｓ－Ｓ還元切断）

５０　ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）　ホスフィン塩酸塩　５０％ＭｅＯＨ水溶液中に入れ４０℃　、１ｈ反応させた。反応後の基材は純水で洗浄した。

[0280]（蛍光色素の導入）

５０　μＭ　Ａｌｅｘａ６４７－Ｃ２－Ｍａｌｅｉｍｉｄｅ　、５０　μＭ　Ｍａｌｅｉｍｉｄｏ－Ｃ３－ＮＴＡ　（５％　ＤＭＳＯ　１０ｍＭ　ＰＢ（７．４））溶液を基板に３０　μＬ滴下２５℃、１ｈ静置して反応後、純水で洗浄した。

深江化成製の扁平型ピペットチップ内に装着し、蛍光顕微鏡付き自動分注装置にて基材表面の蛍光強度変化を測定した。

シーケンス

１．　チップ取付／　ＰＢＳ吸引（１５０μＬ）し、抗体固定化前の画像取得

２．　Ｎｉ錯体形成

４　ｍＭ　$NiCl_2$　（水溶液）吸引１００μＬ　，　反応５　ｍｉｎ（２５℃）

Ｗａｓｈ　純水　ｘ４回　１５０　μＬを吸引して吐出

３．　ｐｒｏｔｅｉｎＧ固定化

１μＭ　Ｈｉｓ－ｐｒｏｔｅｉｎＧ　（ＰＢＳ，　ａｂｃａｍ）吸引１００μＬ　，　反応１０　ｍｉｎ（２５℃）

Ｗａｓｈ

０．０１％　ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０　ＰＢＳ　ｘ２回、　ＰＢＳ　ｘ２回

１５０　μＬを吸引して吐出

４．　抗体固定化

１００　ｎＭ　Ａｎｔｉ－ＣＤ９　（市販品）（ＰＢＳ）吸引１００μＬ，　反応１０　ｍｉｎ（２５℃）

Ｗａｓｈ

０．０１％　ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０　ＰＢＳ　ｘ２回、　ＰＢＳ　ｘ２回

１５０　μＬを吸引して吐出

５．バックグラウンド（Ｆ０：　０．１％　ＢＳＡ，　１００ｍＭ　ＰＢ（ｐＨ７．０），　０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）　５回測定

６．　Ｅｘｏｓｏｍｅ吸着

０，　３，　３０，　３００，　１０００　ｆＭに調整したＳＫＢＲ３培養上清エクソソーム　（０．１％　ＢＳＡ，　１００ｍＭ　ＰＢ（ｐＨ７．０），　０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）

サンプル（ＳＫＢＲ３由来エクソソーム）吸引１００μＬ、反応５　ｍｉｎ（２５℃）

画像取得

蛍光顕微鏡

カメラ：　Ｚｙｌａ４．２

フィルタ：　　Ｃｙ５

（励起波長６０４－６４４　ｎｍ，　蛍光波長６７２－７１２　ｎｍ）

対物レンズ：　×５

露光時間：　０．５　ｓｅｃ

光量：　１２％

光源：　水銀ランプ

０．０１％　ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０　　ＰＢＳ　１５０　μＬを吸引して吐出

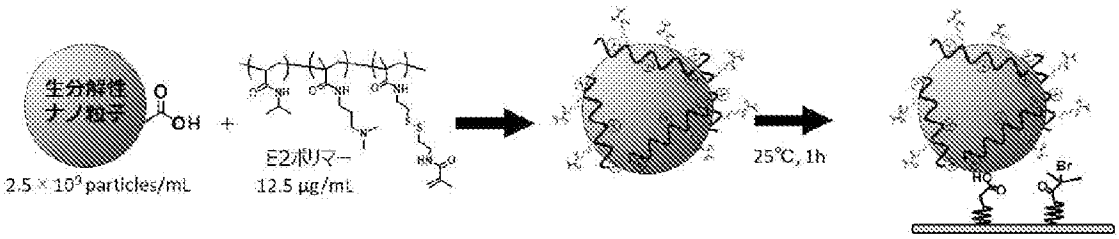
１～６繰り返し

[0281] （結果）

カチオン表面の基材にアニオンポリマー修飾シリカ粒子を用いて作製したセンシングチップについても、　１０ｆＭのＳＫ－ＢＲ３細胞株由来のエクソソーム添加により、約５％の相対蛍光強度変化が確認できた。

[0282] （実施例１０：生分解性ナノ粒子：ポリ乳酸／グリコール酸共重合体（ＰＧＬＡ））

[化41]



[0283] （基板上にＳＡＭ形成）

０．５　ｍＭ　２－（２－ｂｒｏｍｏｉｓｏｂｕｔｙｒｙｌｏｘｙ）　ｕｎｄｅｃｙｌ　ｔｈｉｏｌ，　０．５　ｍＭ　Ｃａｒｂｏｘｙ－ＥＧ６　ｕｎｄｅｃａｎｅ　ｔｈｉｏｌ　ＥｔＯＨ溶液に金基板を浸漬しＳＡＭを形成する　（３０℃，　２０　ｈ）

[0284] （粒子の調製）

蛍光性カルボキシ化ＰＧＬＡ　ナノ粒子（２００　ｎｍ）　水懸濁液を超音波（Ｌｖ２）１ｍｉｎ後、ナノ粒子とＥ２ポリマー水溶液の終濃度が２×１０^{11}　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬと１　ｍｇ／ｍＬになるように混合し、ＥｔＯＨで８０倍希釈した溶液４　μＬを基板に滴下（１．０×１０^{7}　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／４　μＬ）　（２５℃，　１ｈ）　静置後ＥｔＯＨで３回洗浄した。

[0285] （ＳＥＭ観察・蛍光観察）

Ｅ２ポリマー水溶液が１　ｍｇ／ｍＬになるように混合した後、ＥｔＯＨで希釈し４　μＬを基板に滴下（１．０×１０^{7}　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／４　μＬ）　（２５℃，　１ｈ）　静置後ＥｔＯＨで３回洗浄。

ＥｔＯＨ中で基板上の蛍光観察を行った（キーエンスＢＺ－Ｘ８００、励起

波長４７０±２０　ｎｍ／蛍光波長５２５±２５　ｎｍ）。その後、真空乾燥して、金スパッタ後、走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）像を観察した。（図９）

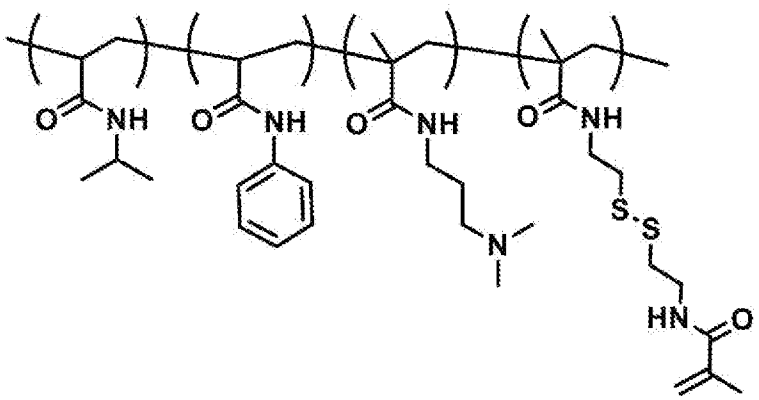
[0286]（結果）

シリカナノ粒子やポリスチレンナノ粒子と遜色ない様態を示し、この方法が、あらゆるコア粒子に適用可能であることが分かった。

[0287]（実施例１１：シリカナノ粒子＋芳香族成分を含むカチオンポリマーＥ２Ｐ２０）

１．　Ｅ２Ｐ２０合成方法

[化42]



芳香族成分（フェニル基）を含むカチオンポリマーＥ２Ｐ２０は、以下のように合成した。

上記レシピの化合物をシュレンクフラスコ（２５　ｍＬ）に入れＤＭＦに溶解させる（最終液量：２　ｍＬ）。ＲＡＦＴ剤および開始剤は最後に添加した。撹拌子を入れた後、脱気アルゴン置換し、オイルバス（設定温度：７５　℃）で重合を行った（２４　ｈ）。（撹拌速度は３００　ｒｐｍ）

重合後、シュレンクフラスコを氷冷、空気を入れることで反応を停止させた。反応溶液を多量のｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒに添加し、生じた沈殿を回収した。沈殿をｄｉｅｔｈｙｌ　ｅｔｈｅｒで洗浄し真空乾燥させた。

前項で作製したポリマー，　ＴＥＡ　４２　μＬをCH_2Cl_2に溶解（または分散）させ、撹拌した。そこにＮ－ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｍｅｔ

ｈａｃｒｙｌａｔｅ　３７　ｍｇ　を添加し一晩撹拌した。反応後、反応溶液にｎ－ｈｅｘａｎｅを添加し生じた沈殿を回収した。沈殿にＭｅＯＨ、CH_2Cl_2、ｎ－ｈｅｘａｎｅを加え生じた沈殿を回収し、真空乾燥させ目的のポリマー（Ｅ２Ｐ２０）を得た。

収量：１１０　ｍｇ

[表E]

試料	Mw.	濃度(mM)	最終液量(mL)	重量(mg)	液量(μL)
Cys metacrylamide	256.82	100	2	51.364	-
N-(3-(Dimethylamino)propyl)methacrylamide	170.25	100	2	34.050	36.223
N-Phenylacrylamide	147.18	100	2	29.436	
N-isopropylacrylamide(NIPAm)	113.16	200	2	45.264	-
2-Cyano-2-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]propane	345.63	12.5	2	8.641	-
AIBN	164.21	6.25	2	2.053	-

[0288] ２．シリカナノ粒子とポリマーの複合

シリカナノ粒子水分散液（ＣＯＯＨ末端，　２００ｎｍ，　Ｌｏｔ．０９２１９４０－０３、４．０×10^{11}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ）　４０μＬと　、

Ｅ２Ｐ２０水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）　４０μＬを混合し、２５℃で１５分静置して、シリカナノ粒子とＥ２Ｐ２０　の複合体を形成した。

[0289] ３．ＤＬＳ測定

シリカナノ粒子とＥ２Ｐ２０　の複合体を純水で１００倍希釈し、ＤＬＳを用いて粒子径およびＺ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌを測定した。

[0290] ４．基板への固定化

シリカナノ粒子とＥ２Ｐ２０　の複合体をＤＭＦで８０倍に希釈し、　２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオール：カルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオール（１：１）で修飾した金基板上に４μＬ滴下し、２

５℃で１ｈ静置した。その後表面をＥｔＯＨで洗浄し、蛍光顕微鏡およびＳＥＭで表面を観察した。

ＤＬＳによる粒子径測定の結果と、Ｚ－ｐｏｔｅｎｔｉａｌ測定の結果から、カチオン性ポリマーがシリカナノ粒子に吸着し、表面が負に帯電している状態から正に帯電している状態へと変化したことが示唆された。また、粒子径に大きな変化がないことから、ポリマー吸着後も分散性を保っていることが示された。

[表F]

	シリカナノ粒子	E2P20 複合後
size(nm)	210.1	223.2
zeta(mV)	-41.2	45.8

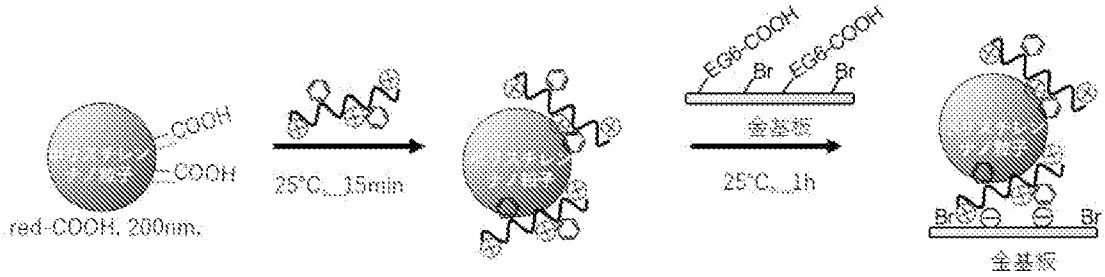
[0291] （結果）

図１０－１に示す観察結果より、シリカナノ粒子に由来する蛍光輝点が単分散で、凝集しておらず、単層に分布していることが観察された。このことからＥ２に芳香族成分（フェニル基）を導入したＥ２Ｐ２０は、Ｅ２の場合と同様、シリカナノ粒子と複合化して基板上に固定化した際、単分散で、凝集しておらず、単層に基板へ固定できることが示された。

[0292] （実施例１２：ポリスチレンナノ粒子＋芳香族成分を含むカチオンポリマーＥ２Ｐ２０）

実施例１１におけるシリカナノ粒子の代わりにポリスチレンナノ粒子を用いて芳香族成分を含むカチオンポリマーＥ２Ｐ２０を複合化した。

[化43]



ポリスチレン（ＰＳ）ナノ粒子（２５０　ｎｍ，　ＣＯＯＨ末端，　２．０×１０^{12}　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ）　２０　μＬとＥ２Ｐ２０水溶液（２　ｍｇ／ｍＬ）　２０　μＬと混合し、この溶液をＤＭＦで４０、４００、４０００、４００００倍に希釈した。これらの溶液４　μＬを２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ$_6$ウンデカンチオールで修飾された金基板上に滴下し、１時間静置した。その後表面をＥｔＯＨで洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。（図１０－２）

[0293]（結果）

シリカナノ粒子の場合と同様、ポリスチレンナノ粒子をもちいても、滴下する粒子数に依らず、蛍光輝点が単分散で、凝集しておらず、単層に分布していることが観察された。このことからカチオンポリマーに芳香族成分を導入しても単分散で、凝集しておらず、単層に粒子を固定できることが示された。

[0294]　（実施例１３：性能試験（センサ感度）、再現性の確認）

１３－１．実験

１３－１－１．金基材の表面修飾

金基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＥｔＯＨ洗浄後、ＵＶ－Ｏ３処理を１５　ｍｉｎ実施し、基材表面の洗浄を行う。

ＥｔＯＨ溶媒中で２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ$_6$ウンデカンチオールを１：１で混合した１　ｍＭ　ＥｔＯＨ溶液を調製し、この溶液に前述の金基材を浸漬させる。３０　℃、２０時間静置した後にＥｔＯＨ、純水で基材を洗浄し、金基材表面に自己組織

化単分子膜（Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ　Ｍｏｎｏｌａｙｅｒ：ＳＡＭ）を形成させる。

１３－１－２．粒子固定化基材の作製

シリカナノ粒子水中分散液（末端官能基：ＣＯＯＨ、粒径２００ｎｍ、粒子濃度：４．０×10^{11}個／ｍＬ）とポリマーＥ２水溶液（２．０　ｍｇ／ｍＬ）を１／１　（ｖ／ｖ）で混合し複合体を形成させる。

[0295] ＤＭＦにて上記の複合体溶液を希釈し、複合体を固定化する基材に対して１×10^{8}、１×10^{7}、１×10^{6}、１×10^{5}個になるように滴下（４　μＬ）し、２５　℃で１時間静置する。ＤＭＦ、ＥｔＯＨの順で基材を洗浄し、粒子固定化基材を得る。各添加条件について各１０枚ずつ基材を作製する。

１３－１－３．　粒子固定化基材上でのポリマーマトリックス及び分析センサの合成

表７に示す組成にてプレポリマー溶液を調製し、凍結脱気にて溶存酸素を除去した後、Ａｒガス置換したグローブボックス内にて２５　℃で２０時間重合を行う。重合後の基材を大量の純水で洗浄を行う。

[0296] 重合後の基材をＡｃＯＨ／ＭｅＯＨ　（１／１，　ｖ／ｖ）液中に浸漬させ超音波照射を行う（５　ｍｉｎ）。その後基材をＭｅＯＨ、純水で洗浄しシリカナノ粒子を除去しポリマー薄膜に凹部を形成させる。

その後基材を５０　ｍＭ　Ｔｒｉｓ（２－ｃａｒｂｏｘｙｅｔｈｙｌ）ｐｈｏｓｐｈｉｎｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ）溶液（メタノール／純水＝１／１，　ｖ／ｖ）に浸漬し、超音波処理を５　ｍｉｎ行うことでＥ２ポリマーを除去し、チオール基を露出させる。

[0297]

[表7]

表７　プレポリマー溶液組成

	試料	濃度
主原料	MPC（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）	500 mM
開始剤	EBIB（α-ブロモイソ酪酸エチル）	1.25 mM
リガンド	TPMA（トリス(2-ピリジルメチル)アミン）	0.125 mM
触媒	$CuBr_2$	0.0125 mM
還元剤	アスコルビン酸	1.25 mM
溶媒	EtOH	270 μL

[0298] 前述の基材上に５０　μＭ　ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（Ｒ）６４７　Ｃ２　ｍａｌｅｉｍｉｄｅおよび５０　μＭ　ｍａｌｅｉｍｉｄｅ　Ｃ３　ＮＴＡ　ＰＢＳ溶液（３０　μＬ）を滴下し、２５　℃で１時間静置し、凹部内に蛍光分子及びＮＴＡ基を導入する。反応後の基材をＭｅＯＨ、純水で洗浄する。

[0299] 前述の基材上に４　ｍＭ　$NiCl_2$水溶液（３０　μＬ）を滴下し、２５　℃で３０分静置しＮｉ－ＮＴＡ錯体を形成させる。反応後の基材を純水で洗浄する。その後１　μＭ　Ｈｉｓタグ修飾プロテインＧ　ＰＢＳ溶液（３０　μＬ）を滴下し２５　℃で１時間静置して、Ｎｉ－ＮＴＡとＨｉｓタグの複合体形成を利用してプロテインＧを導入する。最後に０．３　μＭ　ａｎｔｉ－ＣＤ９抗体ＰＢＳ溶液（３０　μＬ）を滴下し、２５　℃で１時間静置し、分析センサを構築する。

１３－１．４．吸着実験

自動分注装置つき蛍光顕微鏡（システムインスツルメンツ株式会社製）を用いて前立線がん細胞（ＰＣ－３）エクソソーム捕捉実験を行う。ＰＣ－３エクソソームＰＢＳ（１０　ｍＭ　ｐｈｏｓｐｈａｔｅ，１４０　ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）溶液の濃度は０、１．０　ｆＭとする。蛍光顕微鏡の測定条件は、フィルタはＣｙ５（励起波長６０４－６４４　ｎｍ，蛍光波長６７２－７１２　ｎｍ）、対物レンズは５倍、露光時間は０．２　ｓｅｃ、光量は１２　％、光源は水銀ランプである。基材中心部の範囲で測定する。

自動分注装置のシーケンスは、１．チップ取り付け、２．サンプル吸引（１００　μＬ）、３．反応（１　ｍｉｎ，２５℃）、４．全吐出、５．１０ｍＭ　ＰＢＳ（１４０　ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）吸引　１５０μＬ、６．測定位置ｋｅｅｐ（以降　２→６　の繰り返し）である。

固定化した粒子の数が1×10^{8}、1×10^{7}、1×10^{6}、1×10^{5}個である基材を用いて作製した分析センサ各１０枚の初期蛍光強度（F_0）及びエクソソーム添加時の相対的蛍光強度変化を測定する。各分析センサの相対的蛍光強度変化の平均値と標準偏差から変動係数（＝標準偏差／平均値　[％]）を算出し、固定化した粒子の数と作製された分析センサの変動係数の間の相関をみることで、固定化した粒子の数が再現性に及ぼす影響を検討する。

[0300]　（比較例１：国際公開第２０１８／２２１２７１号およびＴｏｓｈｉｆｕｍｉ　Ｔａｋｅｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ａｍ．　Ｃｈｅｍ．　Ｓｏｃ．，２０２０年０３月１０日，Ｖｏｌ．１４２，Ｐａｇｅ．６６１７－６６２４の条件でのシリカナノ粒子凝集固定化）

１．シリカナノ粒子へのＨｉｓ－ｔａｇとチオール基の導入

蛍光性シリカナノ粒子（ｒｅｄ－ＣＯＯＨ，　２００ｎｍ，　Ｌｏｔ．０４４２２４０－０１）を２５ｍｇ／ｍＬ（３．０×10^{12}ｐａｒｔ．／ｍＬ）になるよう水で調整した。シリカナノ粒子水懸濁液１ｍＬへ、５０ｍＭ　Ｈｉｓ－ｔａｇ　（Ｎ末端から６つのヒスチジンが結合し、３つのグリシンが結合し、Ｃ末端にリジンが結合したものにおいてＣ末端のカルボキシル基がアミド化された構造をしているものである。）水溶液１０μＬと　５０ｍＭ　２－ａｍｉｎｏｅｔｈａｎｔｈｉｏｌ－ＨＣｌ水溶液１０μＬ，　５０ｍＭ　ＤＭＴ－ＭＭ水溶液１０μＬを添加し、サーモシェーカーを用いて２５℃において１０００ｒｐｍで１９時間反応させて、シリカナノ粒子にＨｉｓ－ｔａｇとチオール基を導入した。

２．　基板の作製

０．５　ｍＭ　２－（２－ｂｒｏｍｏｉｓｏｂｕｔｙｒｙｌｏｘｙ）　ｕ

ｎｄｅｃｙｌ　ｔｈｉｏｌ，　０．５　ｍＭ　Ａｍｉｎｏ－ＥＧ６　ｕｎｄｅｃａｎｅ　ｔｈｉｏｌのＥｔＯＨ溶液に金基板を浸漬し、基板表面にアミノ基とブロモ基を導入する　（３０℃，　２０　ｈ）

３．基板上にＮＴＡを導入し、ニッケル錯体を形成

アミノ基とブロモ基を導入した基板へ５ｍＭ　Ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎｏｂｅｎｚｙｌ－ＮＴＡのＤＭＳＯ溶液を８０μＬを滴下し、２５℃、２時間静置した。ＤＭＳＯで２回、純水で２回ずつ洗浄し、N_2ドライした。４ｍＭ　$NiCl_2$水溶液３０μＬを滴下し、２５℃で１５分静置し、純水で３回洗浄してＮＴＡのＮｉ錯体を形成した。

４．　Ｈｉｓ－ｔａｇとチオール基を導入したシリカナノ粒子の固定化

Ｈｉｓ－ｔａｇとチオール基を導入したシリカナノ粒子を、溶媒をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）として、表の通りの濃度で，上記基板に５０　μＬ滴下し、２５℃で１時間静置した。ＰＢＳで３回ずつ基板を洗浄し、蛍光顕微鏡（Ｋｅｙｅｎｃｅ　ＢＺ－８００）およびＳＥＭで基板表面を観察した。（図１１）

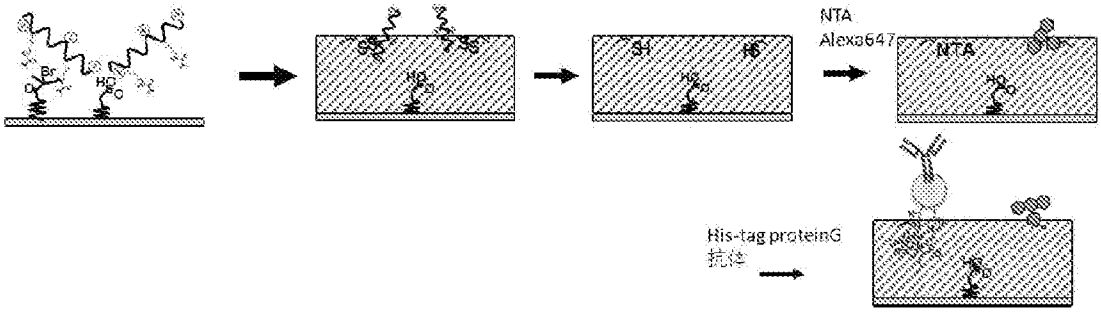
[表G]

RUN	粒子濃度 (mg/mL)	溶媒種	滴下量(μL)	滴下粒子数
1.0-PBS	1.0	PBS	50	6.0×10^{8}part. /50μL
5.1-PBS	5.1	PBS	50	3.1×10^{10}part. /50μL

図１１の観察結果より、部分的に単体のシリカ粒子もみられるが、大部分が凝集している様子が観察された。このことからシリカナノ粒子へＨｉｓｔａｇを修飾し基板へ固定化すると、単分散で、凝集しておらず、単層に固定化できないことが示された。

[0301]　（比較例２：粒子を用いずに作製したセンサの感度）

[化44]



（基板上にＳＡＭ形成）

金基材（９．８　ｍｍ×４．３　ｍｍ）をＵＶ－Ｏ３処理２０ｍｉｎ実施し、基材表面のクリーンアップを行った。ＥｔＯＨ溶媒中で２－（２－ブロモイソブチリルオキシ）ウンデシルチオールとカルボキシ－ＥＧ６ウンデカンチオールを１：１で混合した１ｍＭ　ＥｔＯＨ溶液を調製し、この溶液に前述の金基材を浸漬させた。３０℃、２０時間静置した後にＥｔＯＨで基材を洗浄し、金基材表面に自己組織化単分子膜（Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ　Ｍｏｎｏｌａｙｅｒ：ＳＡＭ）を形成させた。　ポリマーＥ２水溶液（１ｍｇ／ｍＬ）をＤＭＦにて８０倍希釈し、ＳＡＭを形成させた基材に対して４μＬ滴下し、２５℃で１時間静置した。エタノールで基材を洗浄した。

[0302] （ポリマーマトリックス合成）

プレポリマー溶液とアスコルビン酸溶液を作製し、凍結脱気にて溶存酸素を除去した後、グローブボックス内にて混合し、２５℃で２０時間重合を行った。重合後の基材は純水で洗浄した。

[表H]

ATRP レシピ	
MPC	500 mM
Ethyl α-bromoisobutyrate	1.25 mM
TPMA	0.125 mM
$CuBr_2$	0.0125 mM
L-Ascorbic Acid	1.25 mM
EtOH	270 μL

[0303]（酢酸処理）

５０％　ＭｅＯＨ，　５０％　酢酸溶液中に入れ、超音波処理を５　ｍｉｎ行った後、純水で洗浄した。

[0304]（Ｓ－Ｓ還元切断）

０．５　ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）　ホスフィン塩酸塩）水溶液をサーモシェーカー中に入れ４０℃　、５ｍｉｎ予熱後、酢酸処理後の基材をいれ４０℃　、　１ｍｉｎ反応させた。反応後の基材は純水で洗浄した。

[0305]（蛍光、ＮＴＡ導入）

５０μＭ　Ｍａｌｅｉｍｉｄｏ－Ｃ３－ＮＴＡ，　５０μＭ　Ａｌｅｘａ６４７－Ｃ２－ｍａｌｅｉｍｉｄｅ　の２０％ＤＭＳＯ含有１０ｍＭＰＢ（ｐＨ７．４）　溶液を３０μＬ滴下し２５℃、１ｈ静置して反応後、ＤＭＳＯと純水で洗浄した。

[0306]（Ｈｉｓ－ｔａｇプロテインＧ、抗体導入）

４　ｍＭ　$NiCl_2$水溶液３０　μＬを基材上に滴下し静置（２５℃，１５ｍｉｎ）した。反応後の基材は純水で洗浄した。１　μＭ　Ｈｉｓ－ｔａｇｇｅｄプロテイン　Ｇ　（Ｈｉｓ－Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ）　のＰＢＳ溶液を３０　μＬ滴下し２５℃で１時間静置することでＨｉｓ－Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇを固定化した　。　Ｈｉｓ－Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ固定化後の基材はＰＢＳ洗浄した。

０．１　μＭ　Ａｎｔｉ－ＣＤ９のＰＢＳ溶液を３０　μＬ滴下し２５℃で１時間静置することで基材に抗体を導入した。抗体導入後の基材はＰＢＳ洗浄した。

深江化成製の扁平型ピペットチップ内に装着し、蛍光顕微鏡付き自動分注装置にて基材表面の蛍光強度変化を測定した。

ＰＣ３エクソソーム粒子ＰＢＳ溶液の濃度は０．０３、０．３、３、３０ｆＭとした。

１．　チップ取付

２．　１５０　μＬ　ＰＢＳを吸引してＦ０測定ｘ５

３．　サンプル（ＰＣ３由来エクソソーム）吸引１００μＬ

４．　反応５　ｍｉｎ（２５℃）

５．　全吐出

６．　１０　ｍＭ　ＰＢＳ（１４０　ｍＭ　ＮａＣｌ，　ｐＨ７．４）吸引　１５０μＬ

７．　自動測定

蛍光顕微鏡

カメラ：　Ｚｙｌａ４．２

フィルタ：　　Ｃｙ５

（励起波長６０４－６４４　ｎｍ，　蛍光波長６７２－７１２　ｎｍ）

対物レンズ：　×５

露光時間：　０．５　ｓｅｃ

光量：　１２％

光源：　水銀ランプ

８．　３～７の繰り返し

[0307]（結果）

結果を図１２に示す。シリカ粒子コアを用いない空孔未形成の基材において、エクソソームに対する応答はなかった。

[0308]（実施例１４：動物実験）

本実施例では、動物実験による実証例を示す。

犬や猫の血液中のエクソソームを測定する。これは、獣医が確定診断したがんや内臓疾患の犬や猫の血液を採取して、エクソソームを測定する。完治後に、再度エクソソームを測定して、その違いを観察することで、犬や猫のがんや内臓疾患が検出可能か検討する。

[0309]　そのほか以下の使用が想定され得る。

人以外の使用

１．愛玩動物（ネコ、イヌ、鳥類など）の動物のがんを含む疾病の検査

２．家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリなど）の保有する感染症原因ウイルスや感染性タ

ンパク質（プリオンなど）、その他の病原性／感染性因子の検出

３．有害動物（鳥類、コウモリ、キツネ、マングース、アライグマ等）の保有する感染症

原因ウイルスや感染性タンパク質（プリオンなど）、その他の病原性／感染性因子の検出

４．水産物の品質や鮮度チェック

５．農産物の品質や鮮度チェック

６．植物や樹木などの病原菌・ウイルスチェック

（実施例１５：臨床応用）

本実施例では、以下のようにがんの診断での応用を実証する。

[0310] 臨床実験実施病院の臨床研究審査委員会の承認を得た臨床研究にて、患者様の同意に下、がん検出の有無は全摘手術前後のセンサの応答の違いを観察することで、本センサにより、がんの検出が可能かどうか検討する。継続的に観察して、がんの転移や再発のチェックが可能かどうか検討する。薬物療法の治療効果は、投薬前後でのセンサ応答の違いで評価できるかどうか検討する。生活習慣病は、摂取食物とセンサ応答の関係から診断可能かどうか検討する。また、センサ応答から、がん細胞表面抗原の存在を推定し、コンパニオン診断が可能かどうか検討する。さらに、細胞を用いる治療における細胞の品質管理をセンサ応答から可能かどうか検討する。

[0311] 上記の他、本開示の技術は以下の応用が想定される。

がんの検査

がんの手術の際の摘出残しチェック

がんの転移や再発のチェック

薬物療法の治療効果

生活習慣病の検査

投薬のためのコンパニオン診断

細胞工学における細胞の品質管理

（注記）

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

[0312] 本開示で提供される技術は、検査分析技術を利用するあらゆる分野（診断を含む）において利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体に単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態で配置された粒子とを含む、分析用センサ作製用基材。

[請求項2] 前記粒子が、凝集することなく配置されている、請求項１に記載の分析用センサ作製用基材。

[請求項3] 前記粒子は、修飾物質が一体化した粒子を含む、請求項１または２に記載の分析用センサ作製用基材。

[請求項4] 前記基材は、さらにＣ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは前記対象に少なくとも一部適合する、凹部を有する、ポリマーマトリックスを含み、前記粒子は、該凹部に配置される、請求項１～３のいずれか一項に記載の分析用センサ作製用基材。

[請求項5] Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは検出対象に少なくとも一部適合する、凹部を有し、該粒子は、該凹部に凝集することなく配置される、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該粒子に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該粒子に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該粒子は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に配置される、凸型分析用センサ。

[請求項6] Ａ）基材本体と、

Ｂ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは検出対象に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスと、

Ｃ）該凹部に配置されたシグナル物質の結合用基と

Ｄ）該凹部に配置された、検出対象となる分子に結合する特異的結合性分子の結合用基とを含み、ここで、該凹部は、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で該基材本体に凝集することなく配置される、分析用センサ。

[請求項7] 前記凹部が１×１０^{4}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{6}個／ｍｍ^{2}の密度で凝集することなく存在する、請求項６に記載に記載の分析用センサ。

[請求項8] 凸型分析用センサ作製用基材を製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程とを包含する、方法。

[請求項9] 分析用センサ作製用基材を製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に、粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより凹部を形成する工程とを

包含する、方法。

[請求項10] 前記凝集することなく配置されるように加える工程は、粒子を基材に１．０×１０^{0}個／μＬから１．０×１０^{10}個／μＬの濃度で、また

は基材の表面積当たり１．０×１０^{0}個／ｍｍ^{2}から１．０×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の量を加えることを包含する、請求項８または９に記載の方法。

[請求項11] 凸型分析用センサを製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）分析用に必要な物質を前記粒子に結合させる工程とを

包含する、方法。

[請求項12] 分析用センサを製造するための方法であって、

Ａ）粒子を提供する工程と

Ｂ）該粒子を基材に粒子が、凝集することなく基材本体に配置されるように加える工程と、

Ｃ）該粒子が固定された該基材に、ポリマーマトリクスの原料を提供する工程と、

Ｄ）該ポリマーマトリクスが重合する条件に該基材を供することによって、該ポリマーマトリックスが配置された基材を形成する工程と、

Ｅ）該基材から該粒子が解離する条件に供することにより、凹部を形成する工程

Ｆ）分析用に必要な物質を前記凹部に結合させる工程とを

包含する、方法。

[請求項13] １×１０^{10}個／ｍｍ^{2}以下の密度の凹部を形成することによって、標的物質検出における相対的蛍光強度変化の変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、請求項１２に記載

の分析用センサを製造するための方法。

[請求項14] 基材上の面積占有率が最密充填以下である凹部を形成することによって、標的物質検出における相対的蛍光強度変化の変動係数が２０％以下の前記分析用センサを８０％以上の割合で作製する、請求項１２に記載の分析用センサを製造するための方法。

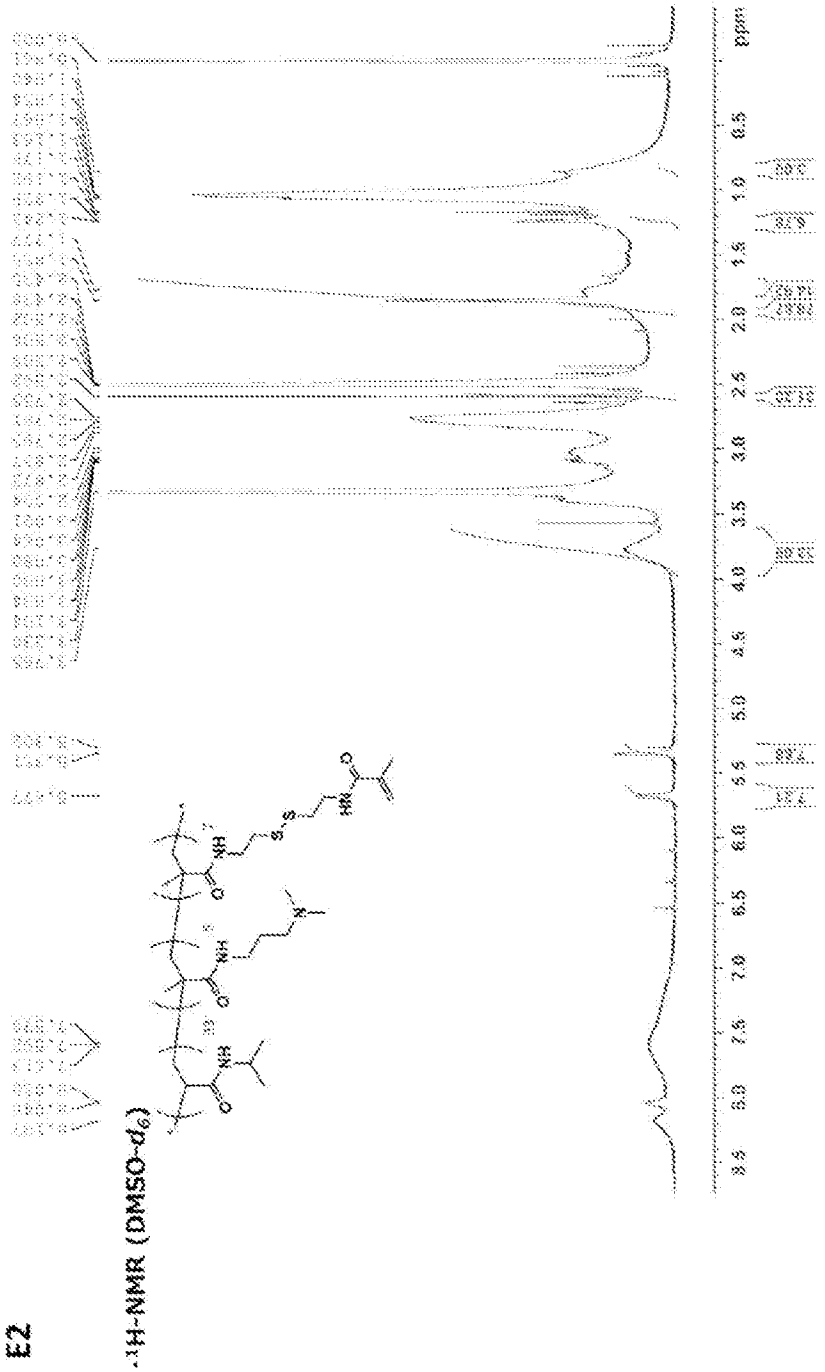
[請求項15] 前記凝集することなく配置する工程は、基材上に１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で前記粒子を配置する工程を含む、請求項８から１４のいずれか一項に記載に記載の方法。

[請求項16] 前記粒子が、単層（Ｓｉｎｇｌｅ　Ｌａｙｅｒ）の状態である、請求項８から１５のいずれか一項に記載に記載の方法。

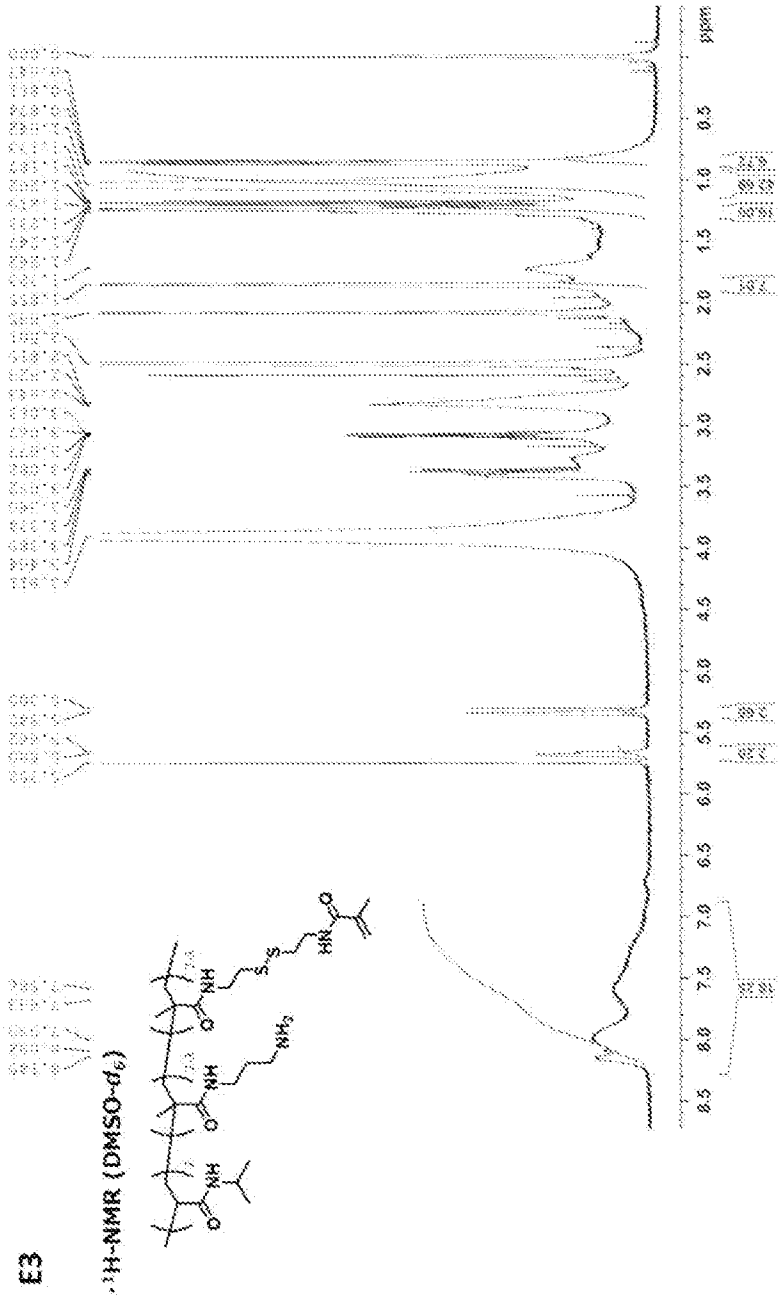
[請求項17] 前記凹部を形成する工程において、前記凹部が、１×１０^{3}個／ｍｍ^{2}～１×１０^{10}個／ｍｍ^{2}の密度で存在する、請求項９、１２から１４のいずれか一項に記載に記載の方法。

[請求項18] 前記粒子を配置する工程は、スピンコート法、粒子を基材上に滴下する方法、粒子分散液中に基材を浸漬させる方法、粒子分散液中から基材を引き上げる方法、または粒子分散液をスプレーする方法を含む、請求項８から１７のいずれか一項に記載に記載の方法。

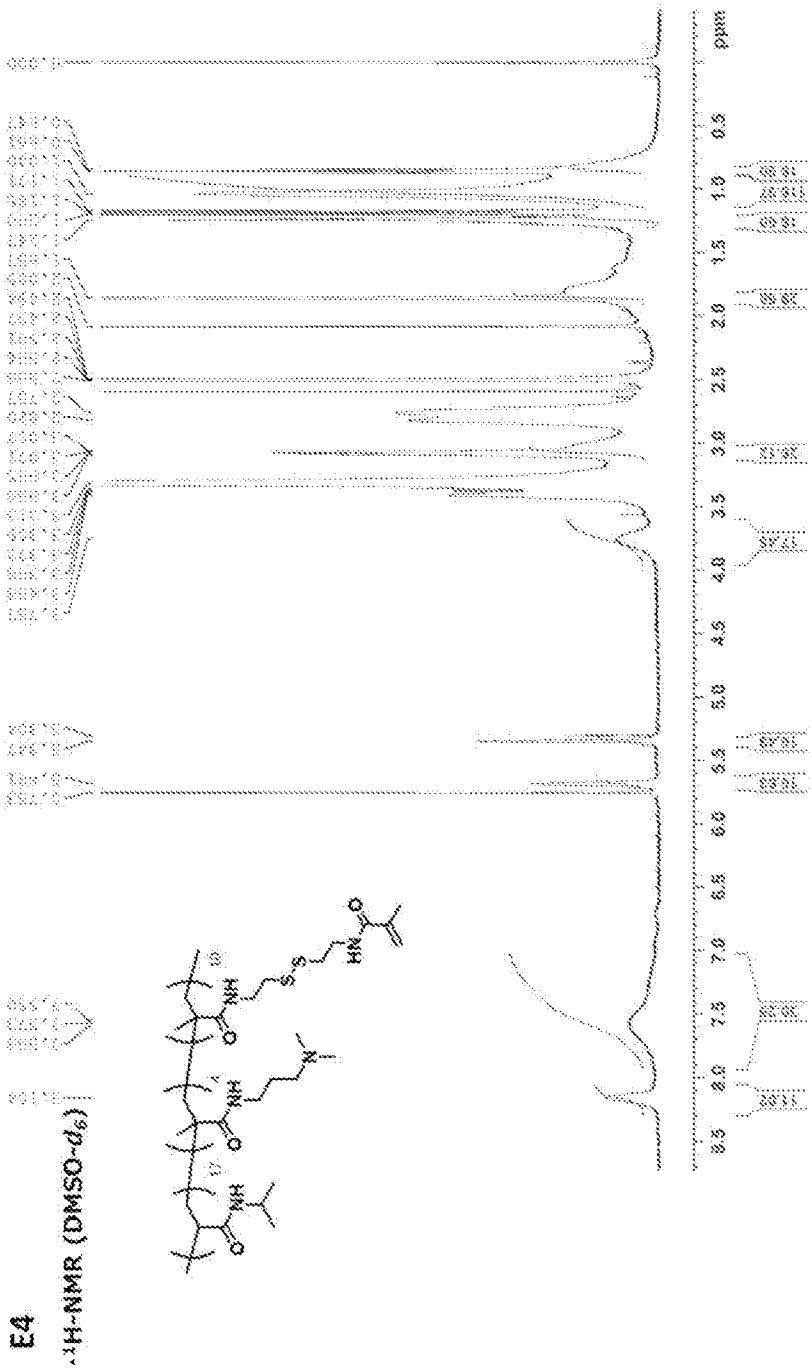
[図1-1]



[図1-2]



[図1-3]



[図1-4]

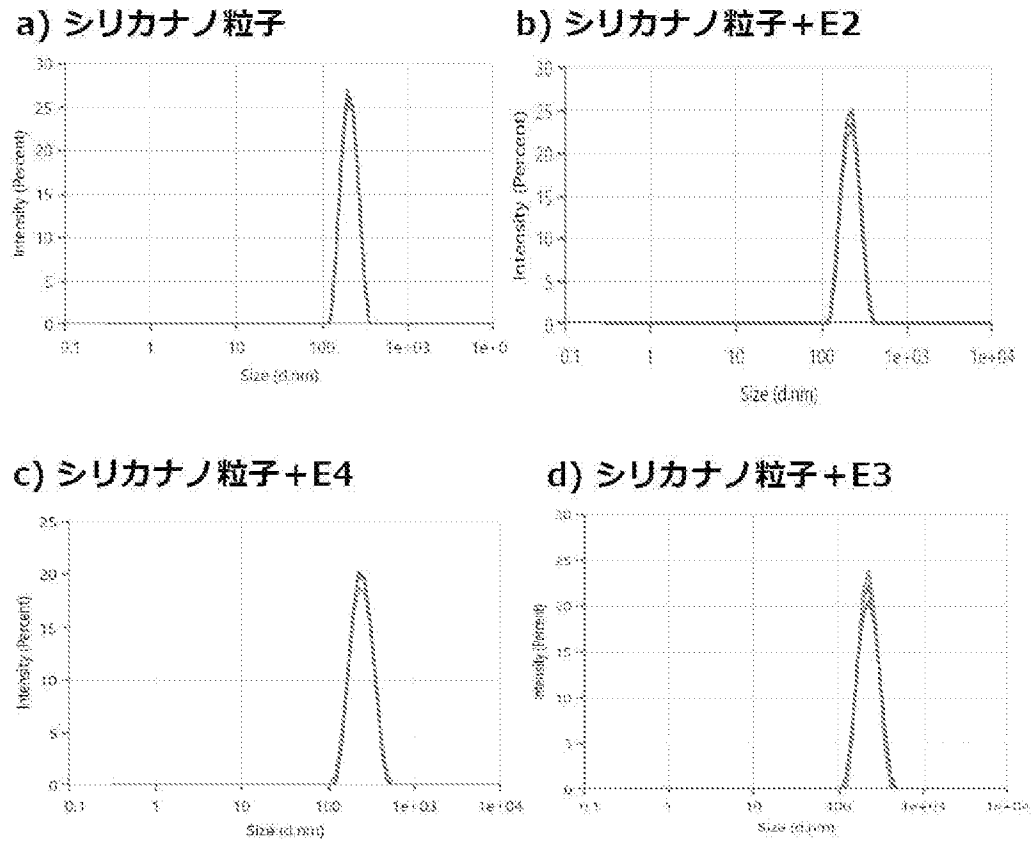


図１―４．各粒子のDLS測定結果

[図1-5]

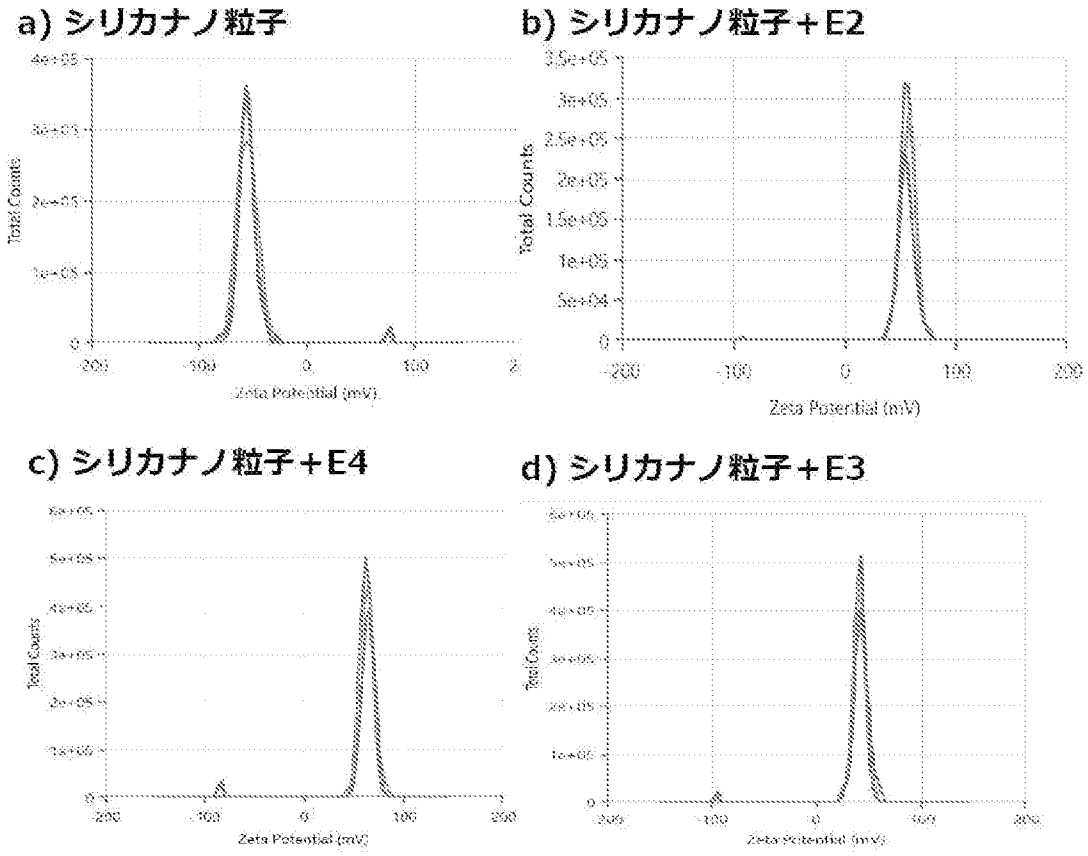
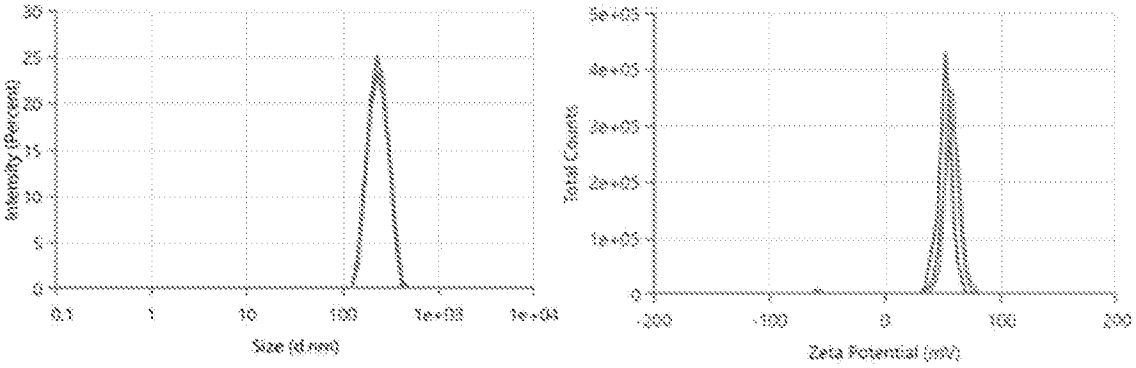


図１―５．各粒子のZ-potential測定結果

[図1-6]



[図2-1]

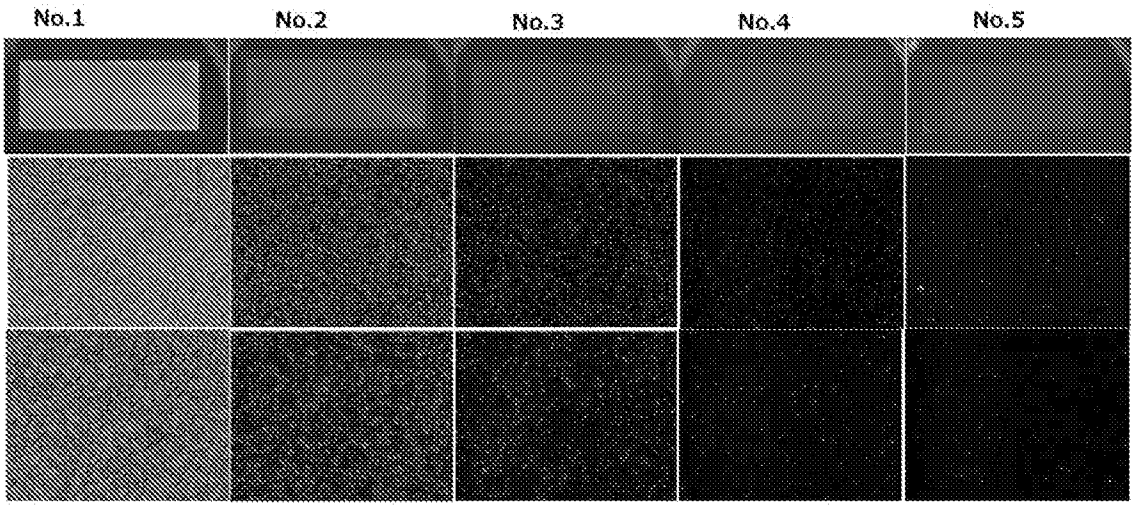


図 2-1　蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像
（上段：4倍対物レンズ、中段：22.2倍対物レンズ、下段：60倍対物レンズ）

[図2-2]

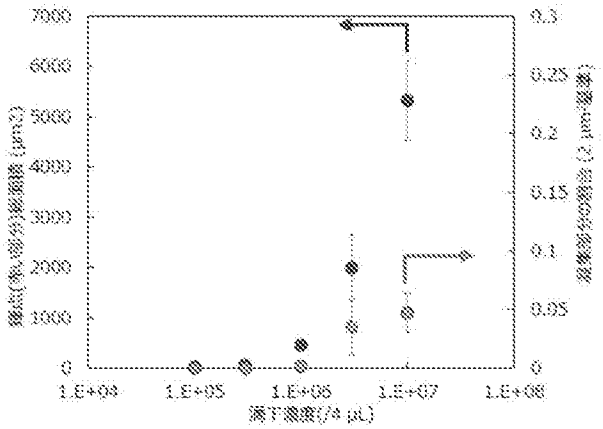


図.2-2　60 倍対物レンズでの蛍光観察結果を用いたハイブリッドセルカウント解析結果

[図3-1]

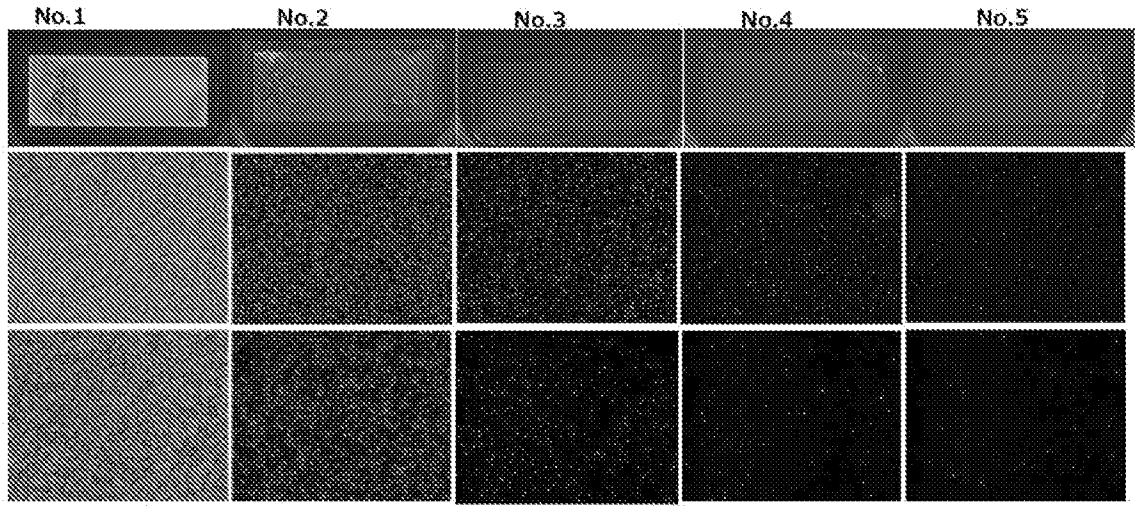


図3-1 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像
（上段：4倍対物レンズ、中段：22.2倍対物レンズ、下段：60倍対物レンズ）

[図3-2]

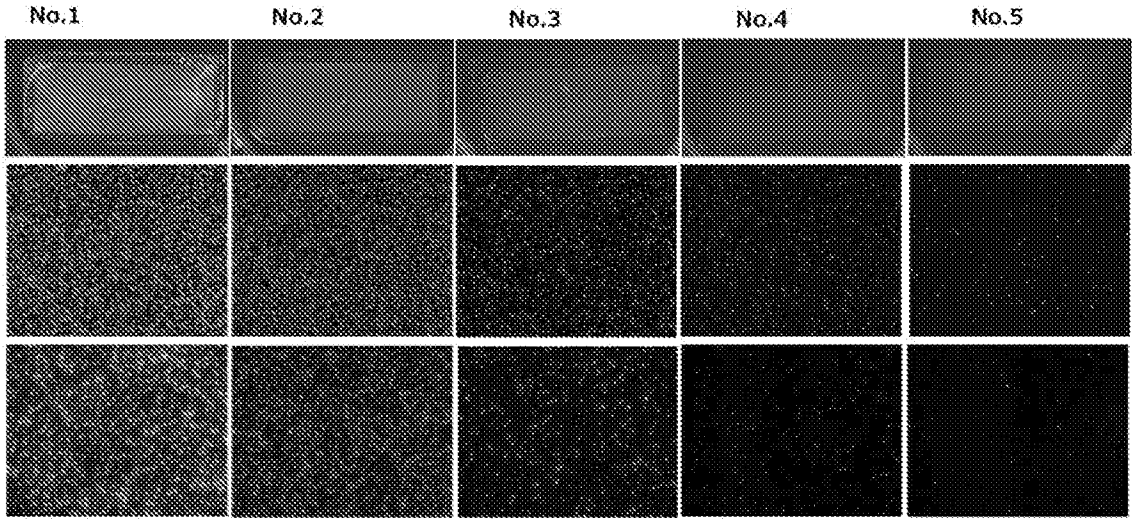


図3-2 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像
（上段：4倍対物レンズ、中段：22.2倍対物レンズ、下段：60倍対物レンズ）

[図4]

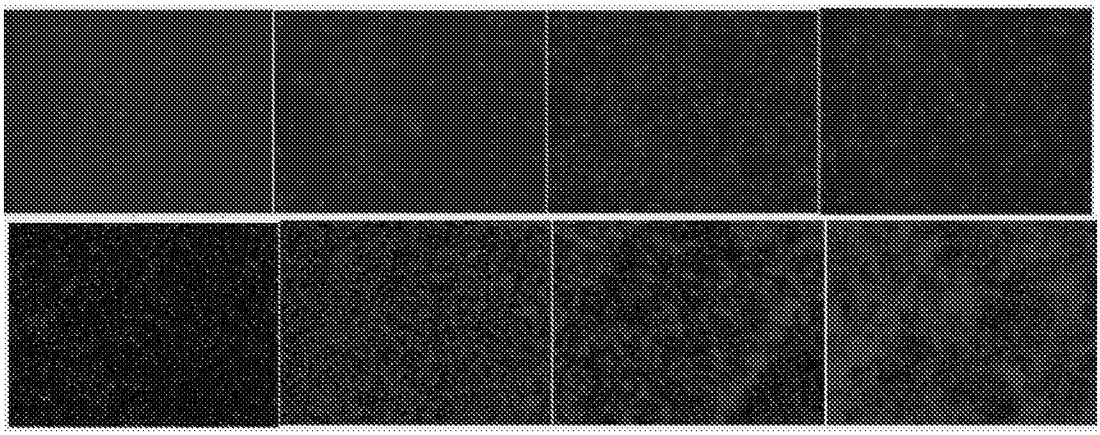


図4 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（60倍対物レンズ）

[図5-1]

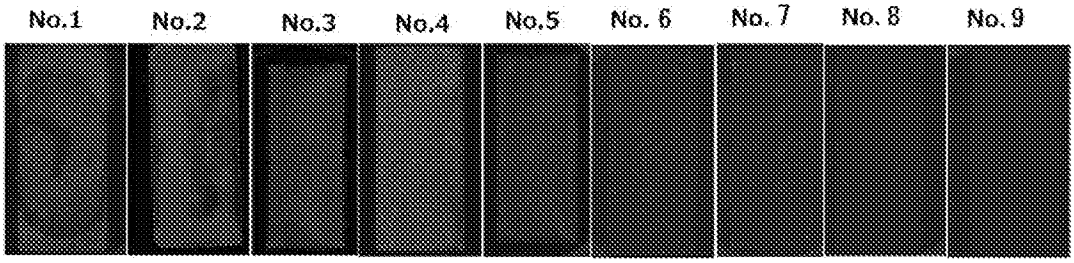


図 5-1 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（4 倍）対物レンズ）

[図5-2]

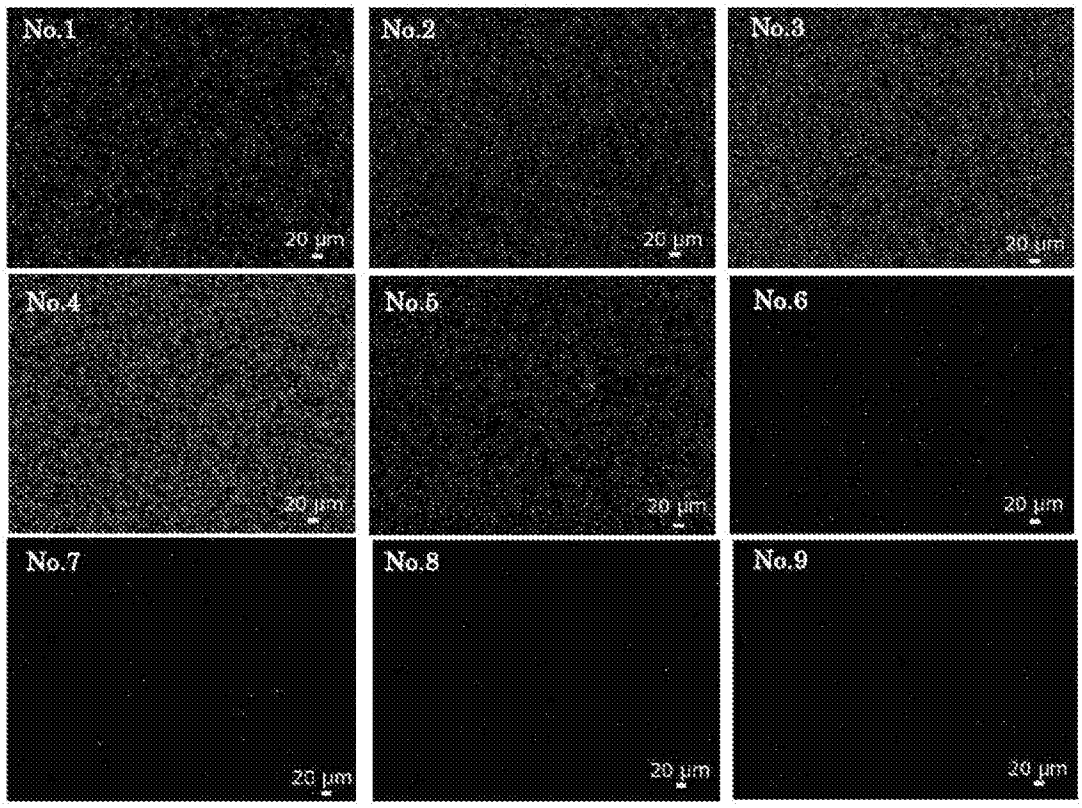


図 5-2 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（22.2 倍対物レンズ）

[図5-3]

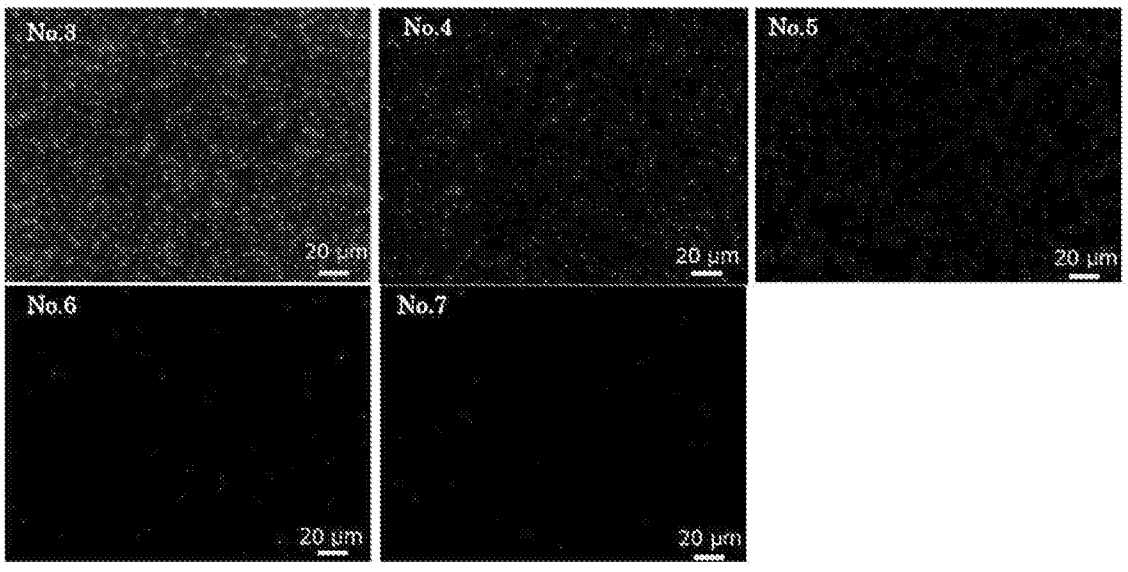


図 5-3 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（60 倍対物レンズ）

[図5-4]

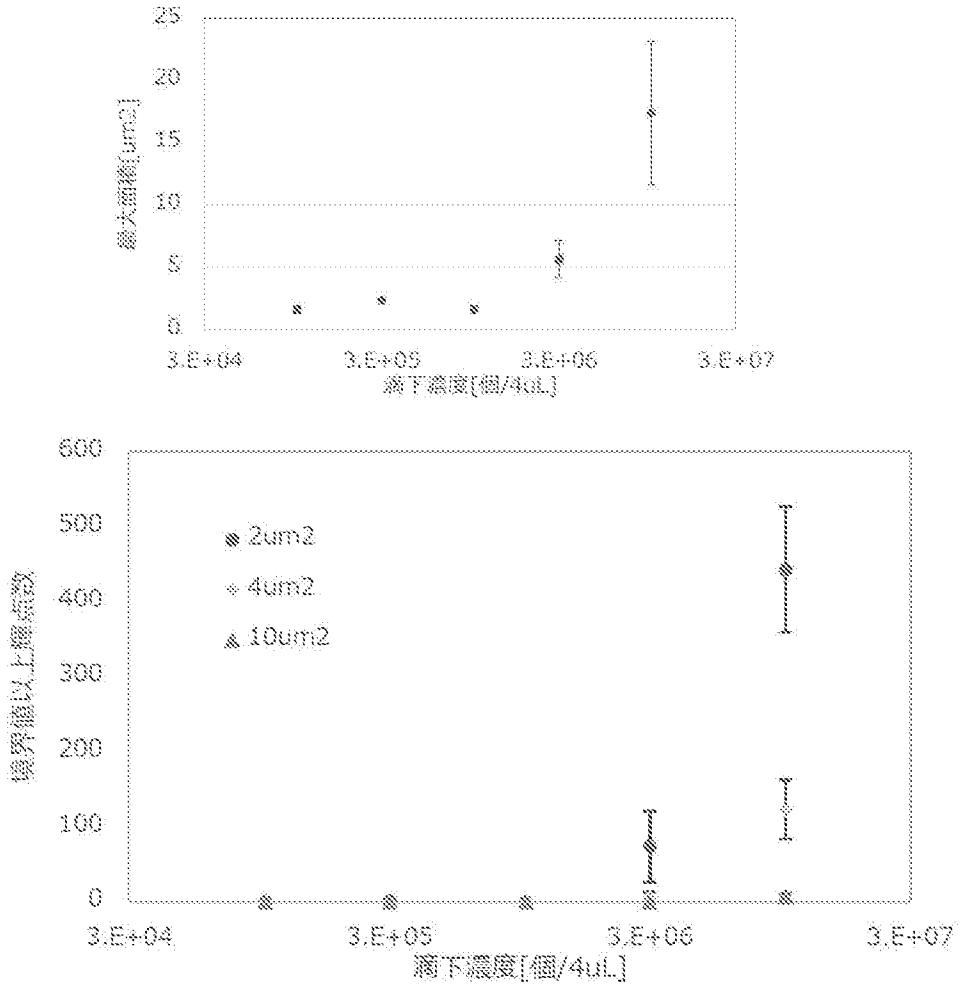


図 5-4　60 倍対物レンズでの蛍光観察結果を用いたハイブリッドセルカウント解析結果
（上　：　蛍光画像内の最大輝点面積の変化、　下　：　境界値による凝集輝点数の変化）

[図6-1]

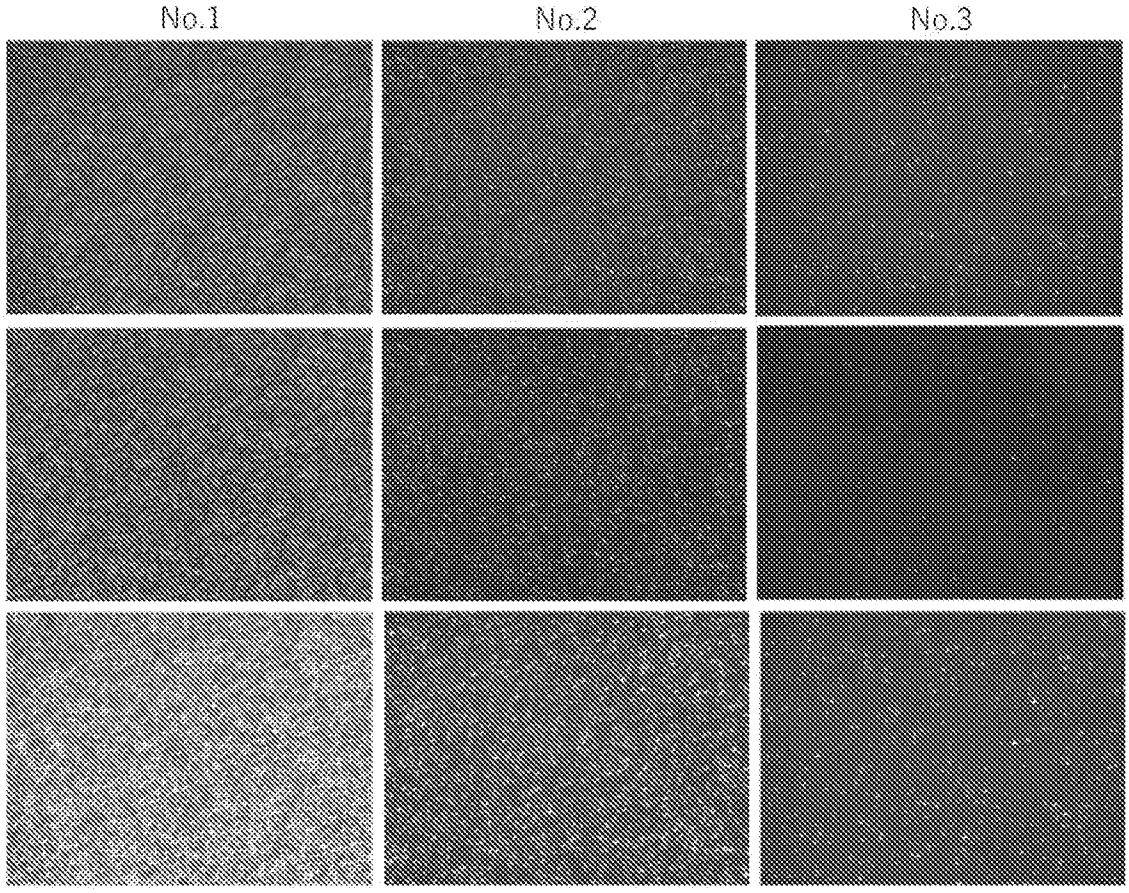


図6-1 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（60倍対物レンズ）
（上段：シリカナノ粒子（緑）、中段：蛍光性カチオンポリマー（赤）、下段：重ね合わせ）

[図6-2]

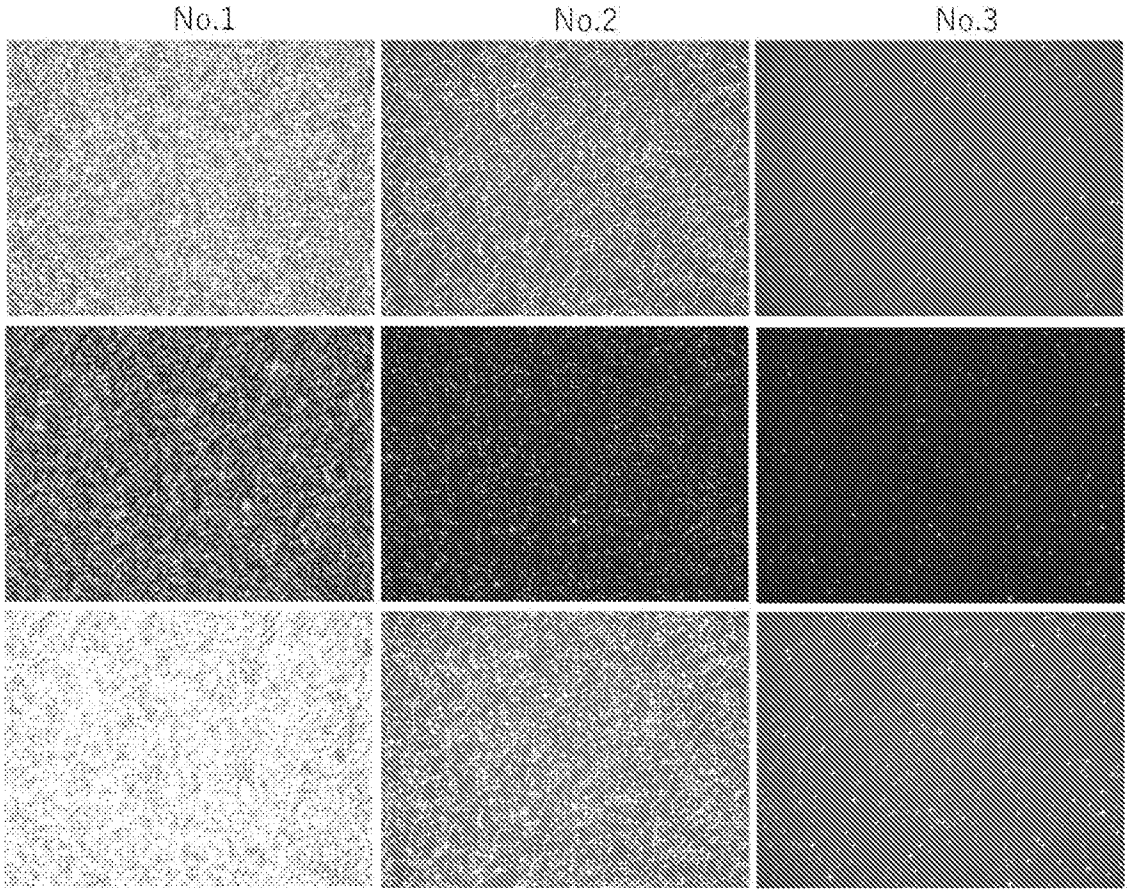


図6-2 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（ポリマー重合後）
（上段：シリカナノ粒子（緑）、中段：蛍光性カチオンポリマー（赤）、下段：重ね合わせ）

[図6-3]

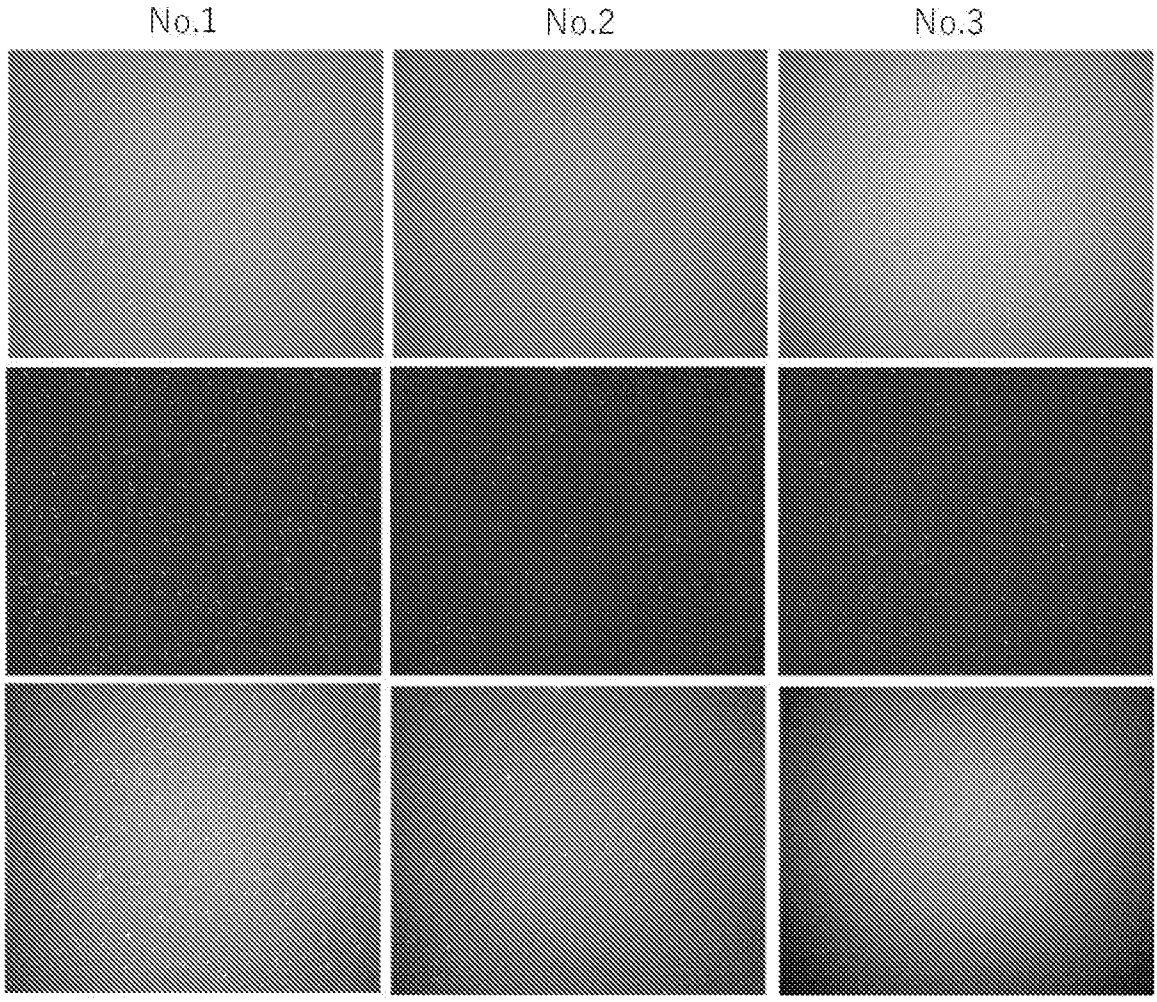
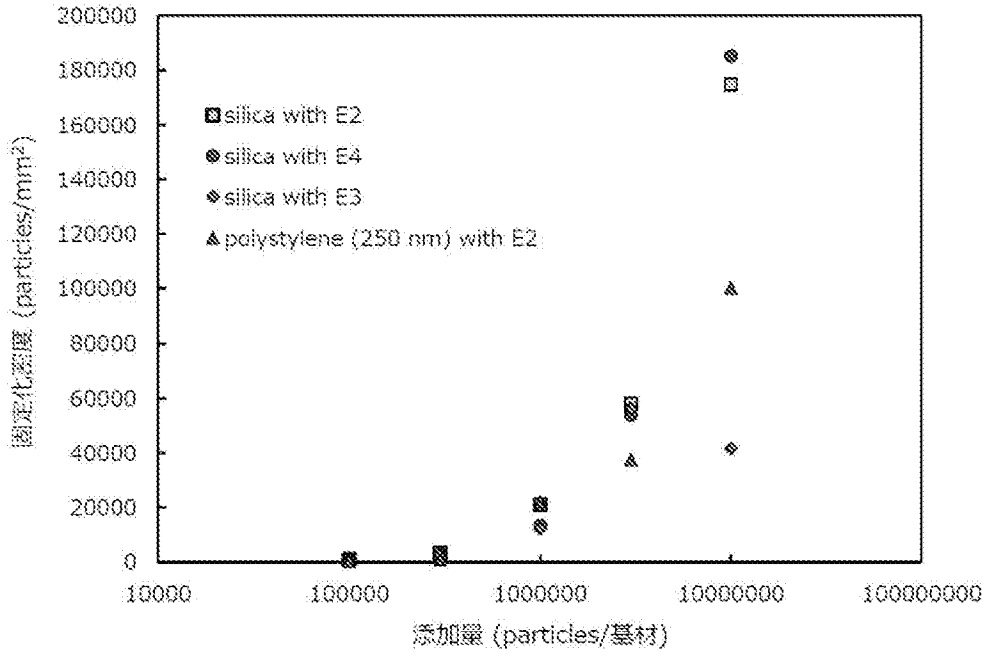
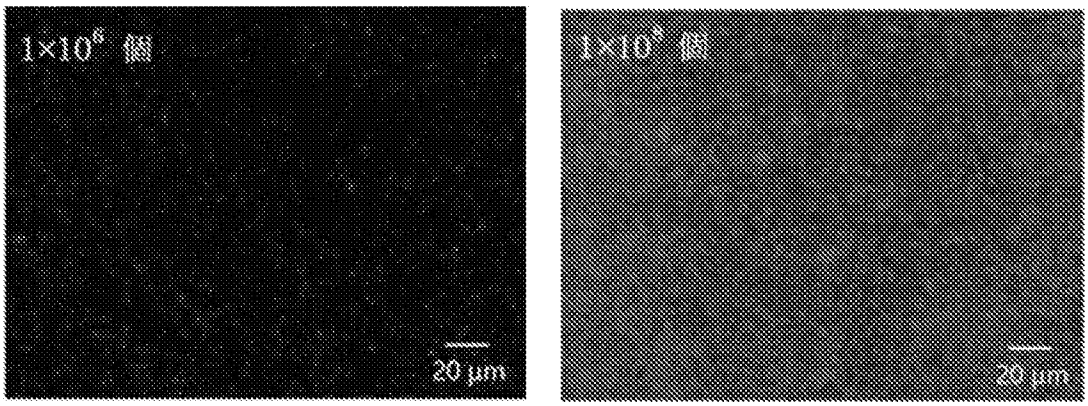


図6-3 蛍光顕微鏡（KEYENCE、BZ-800）での観察画像（鋳型粒子除去後）
（上段：シリカナノ粒子（緑）、中段：蛍光性カチオンポリマー（赤）、下段：重ね合わせ）

[図6-4]



[図7]



EV HRs 複合粒子固定化表面の蛍光顕微鏡画像

測定条件

測定装置：Keyence BZ-800

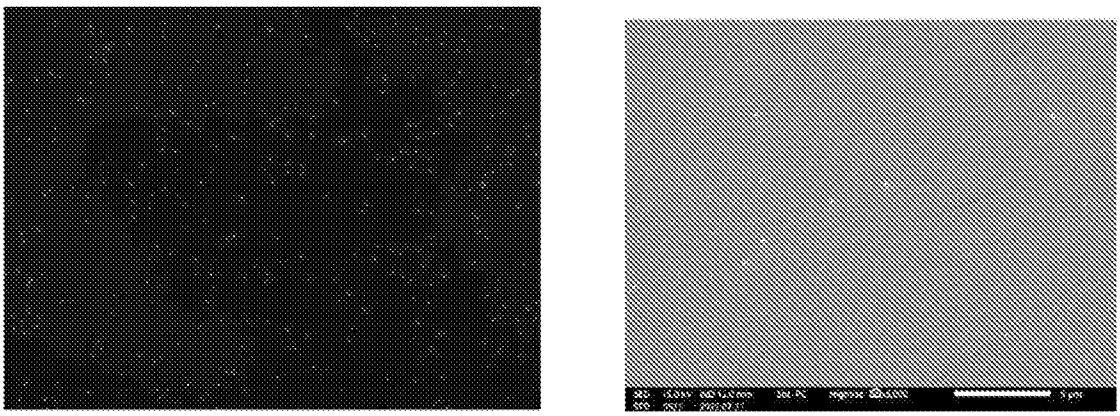
フィルター：励起波長 470±20 nm/蛍光波長 525±25 nm

レンズ：60x

モード：高感度

露光時間：0.02s

[図8]



測定条件

測定装置：Keyence BZ-800

フィルター：励起波長470±20 nm/蛍光波長525±25 nm

レンズ：60x

モード：高感度

露光時間：0.17s

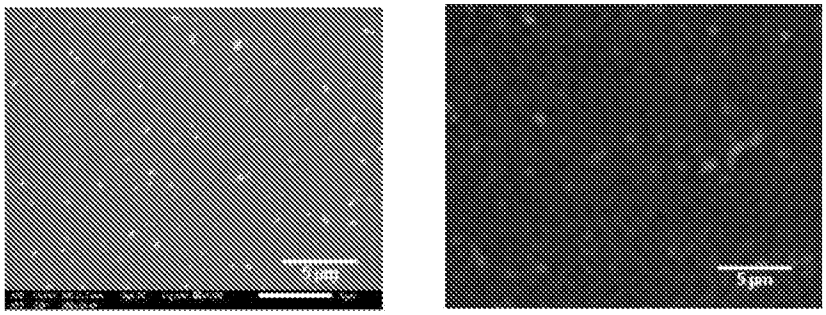
測定条件

SEM

モード：SEC

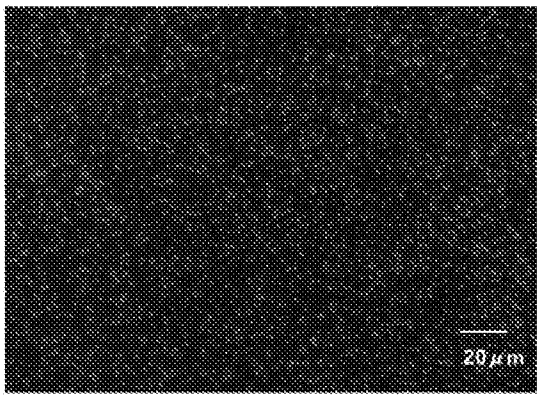
5000x、15kV、HighVac

[図9]

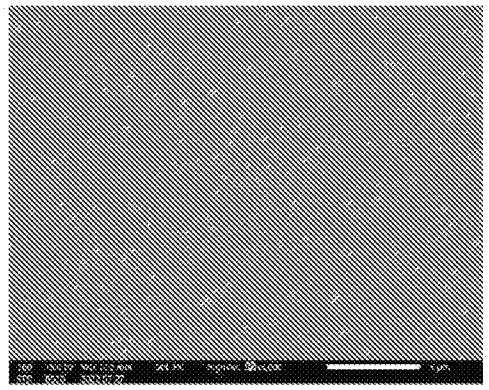


SEM像　　蛍光像

[図10-1]

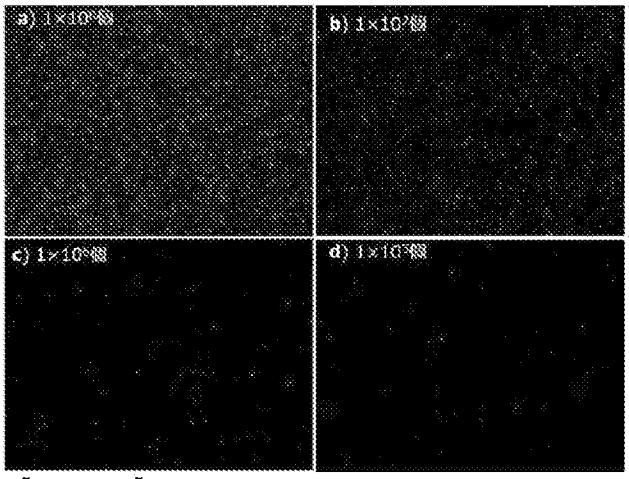


測定条件
測定装置：Keyence BZ-800
フィルター：励起波長470±20 nm/蛍光波長525±25 nm
レンズ：60x
モード：高感度
露光時間：0.003s



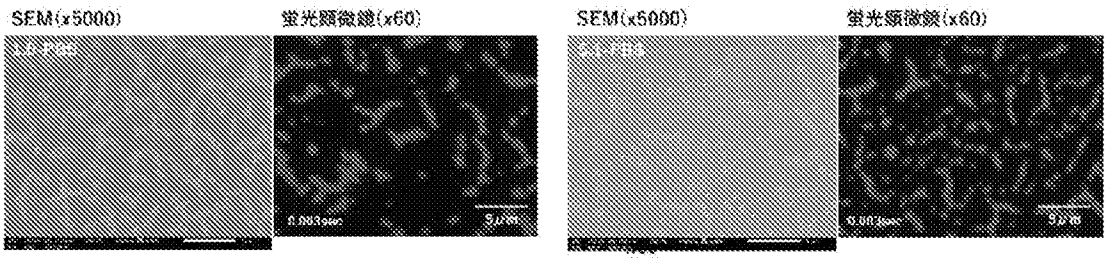
測定条件
SEM
モード：SEC
5000x、5kV、HighVac

[図10-2]



測定条件
測定装置：Keyence BZ-800
フィルター：励起波長470±20 nm/蛍光波長525±25 nm
レンズ：60x
モード：高感度
露光時間：0.003s

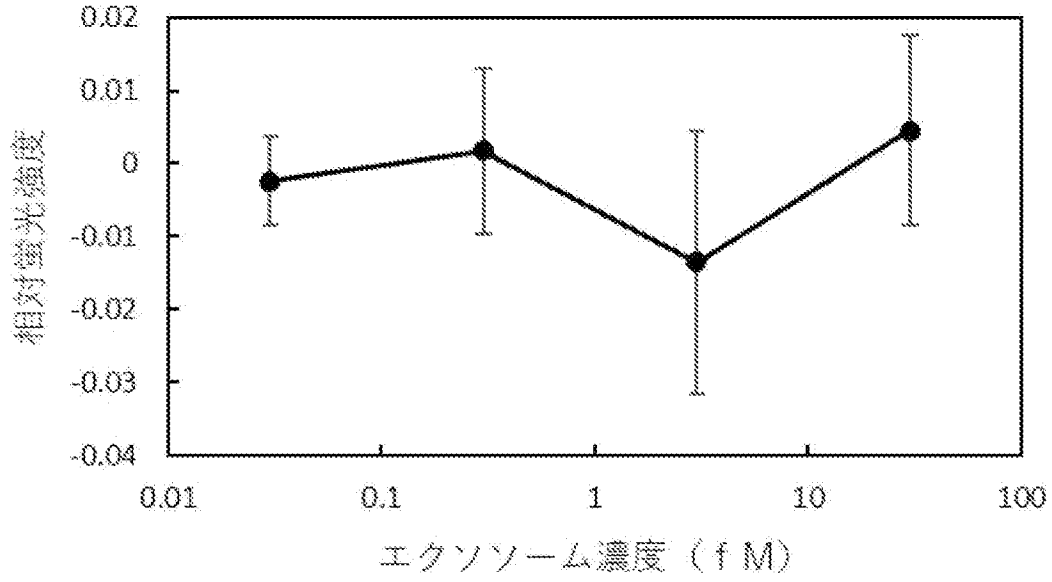
[図11]



蛍光測定条件
測定装置：Keyence BZ-800
フィルター：励起波長470±20 nm/蛍光波長525±25 nm
レンズ：60x
モード：高感度
露光時間：0.003s

SEM測定条件
モード：SEC
5000x、5kV、HighVac

[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/032269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543(2006.01)i; ***C12M 1/34***(2006.01)i; ***C12N 15/11***(2006.01)i
FI: G01N33/543 525W; G01N33/543 525U; G01N33/543 525E; C12M1/34 E; C12N15/11 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2012-191874 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP) 11 October 2012 (2012-10-11) claims, paragraphs [0042]-[0048], fig. 1	1-3
A		4-18
X	WO 2018/154814 A1 (CONSONAL BIOTECHNOLOGIES CO LTD) 30 August 2018 (2018-08-30) claims, paragraphs [0001], [0079], fig. 8	1-3
A		4-18
X	WO 2018/221271 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 06 December 2018 (2018-12-06) claims, paragraphs [0073]-[0093], [0096], [0120]-[0137], fig. 8-12, 19	6
Y		6-7
A		1-5, 8-18

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 October 2022	**01 November 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-49297 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY) 24 February 2005 (2005-02-24) claims, paragraph [0019], fig. 2	6-7
A		1-5, 8-18
A	JP 2010-112872 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 20 May 2010 (2010-05-20) entire text, all drawings	1-18
A	JP 2009-47507 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 05 March 2009 (2009-03-05) entire text, all drawings	1-18
A	WO 2006/070841 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 06 July 2006 (2006-07-06) entire text, all drawings	1-18
A	US 2008/0266555 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA) 30 October 2008 (2008-10-30) entire text, all drawings	1-18
A	US 2013/0165350 A1 (AFFYMETRIX, INC.) 27 June 2013 (2013-06-27) entire text, all drawings	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/032269

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-4

Claims 1-3 lack novelty in light of document 1, and thus do not have a special technical feature.

Claim 4 dependent on claim 1 has the special technical feature in that a substrate also includes c) a polymer matrix disposed on the substrate main body, wherein the polymer matrix has a recessed part at least partially suitable for an object, and the particles are disposed in the recessed part.

Therefore, claims 1-4 are classified as invention 1.

(Invention 2) Claim 5, 8, and 11 and claim 10 dependent on claim 8, and claims 15-16 and 18 dependent on claim 8 or 11

Claims 5, 8, and 11 share, with claim 4 classified as invention 1, the common technical feature of a substrate including a substrate main body and a polymer matrix disposed on the substrate main body, wherein the polymer matrix has a recessed part at least partially suitable for an object, and the particles are disposed in the recessed part.

However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 2, and thus cannot be said to be a special technical feature. Furthermore, there are no other same or corresponding special technical features between these inventions.

Furthermore, claims 5, 8, and 11 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claims 5, 8, and 11 and claim 10 dependent on claim 8, and claims 15-16 and 18 dependent on claim 8 or 11 cannot be classified as invention 1.

(Invention 3) Claims 6-7, 9, and 12-14, claim 10 dependent on claim 9, and claims 15-18 dependent on any of claims 9, and 12-14

Claims 6, 9, and 12 share, with claim 4 classified as invention 1 or claim 5 classified as invention 2, the common technical feature of a substrate including a substrate main body and a polymer matrix disposed on the substrate main body, wherein the polymer matrix has a recessed part at least partially suitable for an object to be detected.

However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 3, and thus cannot be said to be a special technical feature. Furthermore, there are no other same or corresponding special technical features between these inventions.

In addition, claims 6, 9, and 12 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Thus, claims 6, 9 and 12 cannot be classified as either invention 1 or invention 2.

Document 1: JP 2012-191874 A (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP) 11 October 2012 (2012-10-11) claims, paragraphs [0042]-[0048], fig. 1 & US 2013/0338041 A1, claims, paragraphs [0051]-[0057], fig. 1 & WO 2012/124377 A1

Document 3: WO 2018/221271 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 06 December 2018 (2018-12-06) claims, paragraphs [0073]-[0093], [0096], [0120]-[0137], fig. 8-12 & US 2020/0110084 A1, claims, paragraphs [0146]-[0166], [0169], [0199]-[0219], fig. 8-12 & EP 3647786 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/032269

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☑ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/032269

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2012-191874 A	11 October 2012	US 2013/0338041 A1 claims, paragraphs [0051]-[0057], fig. 1 WO 2012/124377 A1	
WO 2018/154814 A1	30 August 2018	US 2020/0025754 A1 claims, paragraphs [0001], [0099], fig. 8 EP 3588087 A1 CN 110325858 A JP 2017-167129 A	
WO 2018/221271 A1	06 December 2018	US 2020/0110084 A1 claims, paragraphs [0146]-[0166], [0169], [0199]-[0219], fig. 8-12, 19 EP 3647786 A1	
JP 2005-49297 A	24 February 2005	(Family: none)	
JP 2010-112872 A	20 May 2010	(Family: none)	
JP 2009-47507 A	05 March 2009	(Family: none)	
WO 2006/070841 A1	06 July 2006	US 2008/0020214 A1 whole document	
US 2008/0266555 A1	30 October 2008	WO 2006/065762 A2 whole document EP 1825269 A2	
US 2013/0165350 A1	27 June 2013	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/032269

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/543(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i
FI: G01N33/543 525W; G01N33/543 525U; G01N33/543 525E; C12M1/34 E; C12N15/11 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2012-191874 A (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 11.10.2012 (2012-10-11) [特許請求の範囲]，［００４２］－［００４８］，［図１］	1-3
A		4-18
X	WO 2018/154814 A1 (株式会社コンソナルバイオテクノロジーズ) 30.08.2018 (2018-08-30) 請求の範囲，［０００１］，［００７９］，［図８］	1-3
A		4-18
X	WO 2018/221271 A1 (国立大学法人神戸大学) 06.12.2018 (2018-12-06) 請求の範囲，［００７３］－［００９３］，［００９６］，［０１２０］－［０１３７］，［図８］－［図１２］，［図１９］	6
Y		6-7
A		1-5,8-18
Y	JP 2005-49297 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 24.02.2005 (2005-02-24) [特許請求の範囲]，［００１９］，［図２］	6-7
A		1-5,8-18

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
17.10.2022	01.11.2022

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

倉持　俊輔 2J 3209

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2010-112872 A (国立大学法人神戸大学) 20.05.2010 (2010-05-20) 全文, 全図	1-18
A	JP 2009-47507 A (国立大学法人神戸大学) 05.03.2009 (2009-03-05) 全文, 全図	1-18
A	WO 2006/070841 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 06.07.2006 (2006-07-06) 全文, 全図	1-18
A	US 2008/0266555 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA) 30.10.2008 (2008-10-30) 全文, 全図	1-18
A	US 2013/0165350 A1 (AFFYMETRIX, INC.) 27.06.2013 (2013-06-27) 全文, 全図	1-18

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/032269

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明１）請求項１－４
請求項１－３は、文献１により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。
請求項１の従属請求項である請求項４は、基材は、さらにｃ）該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する、凹部を有する、ポリマーマトリックスを含み、前記粒子は、該凹部に配置される、という特別な技術的特徴を有している。
したがって、請求項１－４を発明１に区分する。

（発明２）請求項５，８及び１１、請求項８に従属する請求項１０、並びに請求項８又は１１に従属する請求項１５－１６及び１８
請求項５，８，１１は、発明１に区分された請求項４と、基材本体と、該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは対象に少なくとも一部適合する、凹部を有し、粒子は、該凹部に配置される、ポリマーマトリックスとを含む、基材という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴は、文献２の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
さらに、請求項５，８，１１は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項５，８，１１、請求項８に従属する請求項１０、並びに請求項８又は１１に従属する請求項１５－１６，１８は発明１に区分できない。

（発明３）請求項６－７，９，１２－１４、請求項９に従属する請求項１０、並びに請求項９，１２－１４に従属する請求項１５－１８
請求項６，９，１２は、発明１に区分された請求項４又は発明２に区分された請求項５と、基材本体と、該基材本体上に配置されたポリマーマトリックスであって、該ポリマーマトリックスは検出対象に少なくとも一部適合する凹部を有する、ポリマーマトリックスとを含む、基材という共通の技術的特徴を有している。
しかしながら、当該技術的特徴はいずれも、文献３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
さらに、請求項６，９，１２は、発明１又は発明２に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項６，９，１２は発明１及び発明２のいずれにも区分できない。

文献１：JP 2012-191874 A（株式会社日立ハイテクノロジーズ）11.10.2012(2012-10-11)
［特許請求の範囲］，［００４２］－［００４８］，［図１］
& US 2013/0338041 A1, Claims, [0051]-[0057], Fig.1
& WO 2012/124377 A1
文献３：WO 2018/221271 A1（国立大学法人神戸大学）06.12.2018(2018-12-06)
請求の範囲，［００７３］－［００９３］，［００９６］，
［０１２０］－［０１３７］，［図８］－［図１２］
& US 2020/0110084 A1, Claims, [0146]-[0166], [0169], [0199]-[0219], FIGs.8-12
& EP 3647786 A1

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/032269

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

1. ☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☑ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/032269

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2012-191874 A	11.10.2012	US 2013/0338041 A1 Claims, [0051]-[0057], Fig.1 WO 2012/124377 A1	
WO 2018/154814 A1	30.08.2018	US 2020/0025754 A1 Claims, [0001], [0099], FIG.8 EP 3588087 A1 CN 110325858 A JP 2017-167129 A	
WO 2018/221271 A1	06.12.2018	US 2020/0110084 A1 Claims, [0146]-[0166], [0169], [0199]-[0219], FIGs.8-12,19 EP 3647786 A1	
JP 2005-49297 A	24.02.2005	（ファミリーなし）	
JP 2010-112872 A	20.05.2010	（ファミリーなし）	
JP 2009-47507 A	05.03.2009	（ファミリーなし）	
WO 2006/070841 A1	06.07.2006	US 2008/0020214 A1 Whole Document	
US 2008/0266555 A1	30.10.2008	WO 2006/065762 A2 Whole Document EP 1825269 A2	
US 2013/0165350 A1	27.06.2013	（ファミリーなし）	