

(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
2014年11月13日 (3.11.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/181662 A1

- (51) 国際特許分類 :
G01N 33/53 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/27 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/41 (2006.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP20 14/06 105 1
- (22) 国際出願日 : 2014年4月18日 (18.04.2014)
- (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 2013-100417 2013年5月10日 (10.05.2013) JP
- (71) 出願人 : 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.)
[JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目
6番6号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者 : 竹内 俊文 (AKEUCHI 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). 谷口 伸一
(TANIGUCHI Shinichi); 〒1008280 東京都千代田区
丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内
Tokyo (JP).
- (74) 代理人 : 青稜特許業務法人 (SEIRYO I.P.C.); 〒
1040032 東京都中央区八丁堀二丁目7番1号
Tokyo (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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).

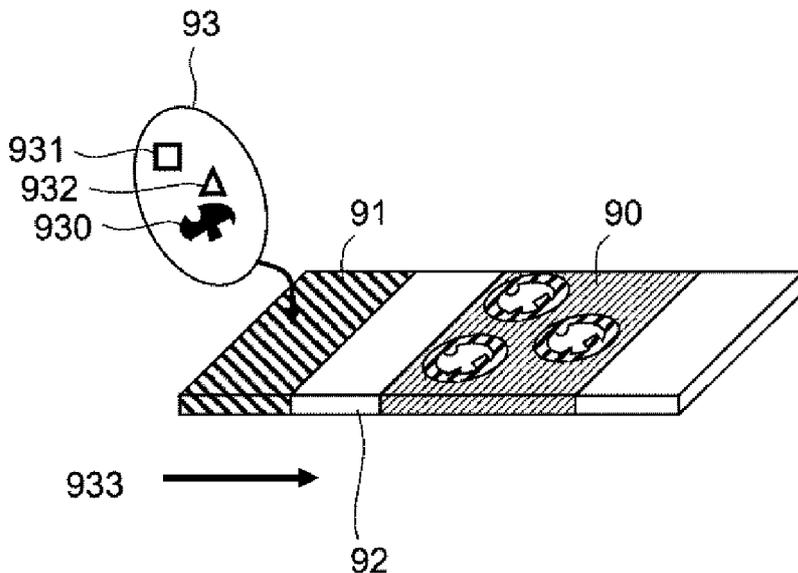
添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: MOLECULAR TEMPLATE AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称 : 分子鋳型及びその製造方法

図8



(57) ADstract: Molecular-template polymer particles for a steroid hormone, said molecular-template polymer particles comprising a polymer that interacts with said steroid hormone. The polymerization unit of said polymer preferably contains at least two functional groups that interact with the aforementioned steroid hormone.

(57) 要約 : ステロイドホルモンの分子鋳型ポリマー微粒子であって、前記ステロイドホルモンと相互作用するポリマーからなる分子鋳型ポリマー微粒子。前記ポリマーは、重合単位に前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基を2つ以上有する含むことが好ましい。

W 2014/181662 A1

明 細 書

発明の名称 : 分子鏡型及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、分子鏡型及びその製造方法、並びにその分子鏡型を用いた化学物質検出装置及び化学物質検出方法に関する。

背景技術

[0002] 臨床検査、環境、衛生、防災等の分野で管理すべき化学物質は非常に多岐に渡り、その種類も極めて多い。例えば、ストレス疾患マーカーであるホルモン分子や、環境ホルモン問題における内分泌攪乱物質、工場跡地の土壤汚染物質、建築資材から発生するアスベスト、食品や容器、もしくはそれらの製造装置から発生する異臭や異味の原因となる化学物質等が挙げられる。そのような化学物質の多くは低分子であり、通常測定物中に極めて微量しか含まれていない。しかしながら、それらの化学物質を迅速に、また高感度に検出することは各分野での安全性等を確保する上で極めて重要な作業である。

[0003] 現在の測定技術は、高度に洗練された分離技術、濃縮技術、分析手法の選択と組み合わせ等によって、ppt（1兆分の1）レベル以下であっても様々な化学物質の分析が可能となっている。そのように微量なレベルの分析の場合には、通常、検出対象物に合わせた最適な分離、濃縮、定性分析、及び定量分析等の各工程を経なければならない。必然的にそれは、多大な労力と多くの時間、そして高い分析コストを必要とすることになる。したがって、このような複雑多数の工程を必要とする分析手法は研究室内での測定手法として特化したものであり、測定現場における手法としては適していない。

[0004] 測定現場で要求されるのは化学物質をその場で検出できる測定手法である。センサ技術は、そのようなニーズに基づいて分析技術とは異なる技術を発展させてきた。センサ手法では、化学物質の簡易かつ迅速な検出やモニタリングが可能であり、加えて測定装置の小型化も容易である。

[0005] 本技術分野の背景技術として、特許文献1及び特許文献2が挙げられる。

この特許文献 1 には、液体サンプル中の小分子、ポリペプチド、タンパク質、細胞及び感染症作用物質を含む標的分子の高速で簡易な定量用のデバイス、方法及びキットは、流体サンプル中のこれらの実体の実時間計測が可能であり、高い選択性、高い感度、簡単な操作性、低コスト及び携帯可能である。デバイス、方法及びキットはまた、少なくとも幾つかの実施例で、貫流又は側流デバイスで MIP の使用を提供する」と記載されている (要約参照)。この特許文献 1 で記されている MIP とは、分子錶型ポリマー (molecularly imprinted polymer) のことであり、捕捉したい化学物質に応じて合成する手法は広く知られている。特許文献 2 にも、MIP の作成に関する記載がある。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献 1 : WO 2009 / 083975 A 2

特許文献 2 : WO 2013 / 046826 A 1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 現在のセンサ技術は、分析技術のように高感度で分子の組成解析を行うことができるまでには至っていない。しかし、前述の各分野で検出対象となる化学物質は、測定物中に存在することすら不明の状態から出発することが一般的である。また、たとえ存在しても通常その量は極めて微量である。したがって、濃縮や分離を組み合わせることが測定上必須となるが、そのような工程を経る測定手法は、研究室内での分析手法に他ならず、前述のように測定現場での手法としては馴染まない。また、前述のように現在のセンサ技術の分析能力では、技術的に対応できないという問題があった。

[0008] 本発明者らは、前述の問題を解決するために、分子錶型技術に着目した。すなわち、化学物質を選択的に捕捉することにより、濃縮や分離の工程を必要とせず、目的の化学物質を検出するセンサ技術を開発するというもので

ある。

[0009] 本発明の課題は、検出対象の化学物質を捕捉するための分子錶型ポリマー及びその製造方法と、その分子錶型ポリマーを用いて当該化学物質を迅速に、高感度で、且つ低コストで識別する化学物質検出方法及び検出装置を提供することである。本発明の他の課題は、前記検出対象の化学物質を超高感度で検出することのできる化学物質検出方法及び検出装置を提供することである。

[001 0] すなわち、本発明の化学物質検出方法及び検出装置は、分子錶型ポリマーを利用して作製された捕捉体により化学物質を捕捉することで検出を行うものである。本発明は、医療関係者（医者、臨床検査技師、看護師）はもちろんのこと、家庭の一般消費者にとつても使い勝手の良いケミカルセンサを提供する。特に、ストレス疾患と密接に関わるコルチゾール等のステロイドホルモンを高感度に検出することで、ストレス疾患の予兆を早期に診断し、予防と早期治療に貢献することを目的とする。

課題を解決するための手段

[001 1] 本発明は、コルチゾール等のステロイドホルモンを迅速、安価、高感度に検出するために、ステロイドホルモンに応じた分子錶型ポリマー（MIP）を合成することで、上記課題を解決する。具体的には、例えば請求の範囲に記載の構成を採用する。本願は上記課題を解決する手段を複数含んでいるが、その一例を挙げるならば、本発明に係る分子錶型ポリマーは、「ステロイドホルモンの分子錶型ポリマーであつて、前記ステロイドホルモンと相互作用するポリマーからなる」ことを特徴とする。

[001 2] ポリマーの合成原理は1950年代頃から知られているものの、捕捉したい化学物質（ターゲット）に応じた合成原料、合成経路、反応時間、反応温度を綿密に検討する必要がある。よつて、上記特許文献1に挙げられるようなポリマーを利用したデバイス構造は、原理としては提案できるが、実際にターゲットを高感度に捕捉するポリマーを作製するには、綿密な設計と合成、精製が必要となる。

また、上記特許文献2では、コルチゾールに対する分子錶型ポリマーについて言及があるが、その製造方法は、コルチゾールと、原料モノマーによる重合反応である。

[0013] モレキュラーインプリンティングによって作製される分子錶型ポリマーは、様々なマトリクスを用いて構築することができる。本発明者らは、ストレス疾患に密接に関わるコルチゾール又はその誘導体等のステロイドホルモン分子に対するモレキュラーインプリンティングにおいて用いられるポリマーを見出した。

本発明は、コアとなる微粒子と、変換したコルチゾール、及び原料モノマーを用いて、重合反応させた。よって、積極的に真球状の分子錶型ポリマーを作製したところに特徴がある。

[0014] 本発明における分子錶型ポリマーは、網目構造が適度な柔軟性を持ち、溶媒や環境に応じて膨潤・収縮する点で、ステロイドホルモンのインプリンティングに用いるマトリクスとして適している。すなわち、テンプレート分子によって形成される分子錶型ポリマー内の認識部位は、テンプレート分子に近い大きさである必要がある。その一方で、重合後にテンプレート分子を除去したり、あるいは化学物質（ターゲット）が認識部位に再結合するためには、分子が網目構造内を移動できるよう、ある程度大きな空間が必要となる。このような相反する条件を満たすポリマー材料とその合成条件を見出した。特に、コルチゾール等のステロイドホルモンはステロイド骨格を持ったため、分子が剛直であり、かつ水酸基等を持ったため、モレキュラーインプリンティングの際に必要な、原料モノマーとの相互作用を形成することができる。特に本発明では、原料モノマーの一部にコルチゾール等と2箇所相互作用できるジカルボン酸誘導体を使用することで、高効率な捕捉を可能にする分子錶型ポリマーの合成を図っている。

また、本発明では、分子錶型ポリマーの合成時に、ターゲットとなるコルチゾールの代わりに、コルチゾール分子の一部を変換して重合性置換基であるメタクリロイル化したコルチゾール誘導体を用いることで、分子錶型ポリ

マーの原料となるモノマー分子と共有結合させることで、高効率な捕捉を可能にする分子錶型ポリマーの合成を図っている。

- [00 15] よって本発明の化学物質検出方法は、捕捉したステロイドホルモンの検出感度を増強するように構成することによつて高感度な検出能力を得るものである。

発明の効果

- [00 16] 本発明の化学物質検出方法及び検出装置によれば、特定のポリマーからなる分子錶型によつて、濃縮工程や分離工程を必要とすることなく検出すべきステロイドホルモンを選択的に検出することができる。

- [00 17] また、本発明の化学物質検出装置によれば、最も重要なセンサ部分に相当する分子捕捉部が小型化可能であることから、可搬性のある化学物質検出装置を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [00 18] [図1] 分子錶型ポリマーの代表的な製造方法を模式的に示す図である。
- [図2] 本発明の第1の実施形態に係る、化学物質検出装置の概念を説明するための縦端面図である。
- [図3A] 第1の実施形態による分子錶型ポリマーの合成スキームを示す図である。
- [図3B] 分子錶型ポリマー微粒子の製造方法を模式的に示す図である。
- [図4A] コルチゾールの分子構造を示す図である。
- [図4B] イタコン酸の分子構造を示す図である。
- [図5] コルチゾールとイタコン酸の相互作用を模式的に示す図である。
- [図6] 種々のステロイドホルモンの分子構造を示す図である。
- [図7] 本発明の第2の実施形態に係る、競合法を説明するための概念図である。
- [図8] 本発明の第3の実施形態に係る、化学物質検出装置の一実施形態を示す斜視図である。
- [図9] 実施例1に係るメタクリロイル化コルチゾールの分子構造を示す図であ

る。

[図 10A] 実施例 2 に係るコルチゾール誘導体の分子構造を示す図である。

[図 10B] 実施例 2 に係るコルチゾール誘導体の分子構造を示す図である。

[図 11A] 実施例 2 のコルチゾールの検出結果を示すグラフである。

[図 11B] 実施例 2 のコルチゾールの検出結果を示すグラフである。

[図 12] 実施例 3 に係るコルチゾールの検出結果を示すグラフである。

[図 13A] 実施例 4 に係る分子構造を示す図である。

[図 13B] 実施例 4 に係るコルチゾール誘導体の分子構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下に、本発明を実施するための形態について説明する。なお、本発明はこれらの実施の形態に何ら限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において、種々の態様で実施しうる。

[0020] 本発明の化学物質検出装置の一実施形態は、特定の化学物質を利用して形成した分子錶型ポリマーを含む捕捉体とその表面に有する分子捕捉部と、当該分子捕捉部で捕捉された化学物質を定量する捕捉量計測部とから構成されている。前記捕捉体は、検体中の前記特定の化学物質（ターゲット）をその化学物質が有する特定分子構造に依存して捕捉することができる。本実施形態の化学物質検出装置は、この技術を基本として化学物質の分子認識を行うことを特徴とする。

[0021] 図 1 に、本実施形態に適用される、分子錶型ポリマー 22 の代表的な作製原理を示す。まず、捕捉したいターゲット 20 と、このターゲット 20 に相互作用するモノマー原料 A 201、モノマー原料 B 202、及びモノマー原料 C 203 との混合物中で重合反応を行い、ターゲット 20 の認識部位 21 を形成させる。その後、ターゲット 20 を洗浄等により除去することで、認識部位 21 を有する分子錶型ポリマー (MIP) 22 を作製することができる。ここでは、認識部位 21 を形成するためのテンプレート分子としてターゲット 20 を使用した例を示したが、ターゲット 20 の代わりに、ターゲット 20 の誘導体や類似体を用いても良い。

実施形態 1

- [0022] 図2は、本発明の第1の実施形態に係る、化学物質検出装置の概念を説明するための縦端面図である。図2に示すように、本実施形態の化学物質検出装置1は、1個又は複数個の試料チャンバ6と、試料注入部14と試料搬送部15と排出部16とを有する。試料チャンバ6は、液体流路部7と、この液体流路部7を流入ポート8及び流出ポート9を介して試料搬送部15に接続する着脱部、液体流路部7の下方でこれに連通する分子捕捉部10及び捕捉量計測部11を備えている。化学物質検出装置1に、複数個の試料チャンバ6が設置される場合には、例えば、試料搬送部15が複数に分岐した構造となっている。そして、各試料チャンバ6の各々を個別に分岐した試料搬送部15に接続可能にするために、各着脱部は、流入ポート8及び流出ポート9に対応した弁を備えている。以下、各構成について詳細に説明する。
- [0023] 試料注入部14には、検体17を注入する。検体17は、検出する対象であるターゲット170、夾雑物A171、夾雑物B172等が含まれる。当然のことであるが、検体によっては、ターゲット170を含まない場合や、より多くの種類の夾雑物を含むことがある。検体17は、矢印111や矢印112の方向に搬送される。
- [0024] 分子捕捉部10は、捕捉体101と支持体102とから構成されている。捕捉体101には、ターゲットを捕捉する前の分子錶型ポリマー103や、ターゲットを捕捉した分子錶型ポリマー104が含まれる。また、当該捕捉体101は、分子捕捉部10の表面に配置され、主に分子錶型ポリマー(MIP)から構成されている。支持体102は、捕捉体101を担持し、分子捕捉部10の主たる形状を構成する固体である。支持体102の材質は、一定の形状を保持できるものであれば特には限定されない。具体的には、プラスチック、金属、ガラス、合成ゴム、セラミックス、耐水処理や強化処理を施した紙、又はそれらの組み合わせ等が挙げられる。分子捕捉部10において捕捉体101を有する表面は、分子捕捉部10の全部を覆う面であっても良いし、一部の表面であっても良い。

- [0025] 分子捕捉部 10 は、別個、独立に作製された捕捉体 101 と支持体 102 とを結合して作製することができる。支持体 102 は、異なる構成成分からなる多層構造で構成されていても良い。例えば、ガラス基板と、金 (Au) の薄膜との二層からなる場合が該当する。捕捉体 101 と支持体 102 との結合方法は、ターゲットの捕捉情報を後述する捕捉量計測部 11 へ出力可能なように構成されていれば特に限定されない。例えば、捕捉体 101 と支持体 102 とは互いに直接結合していても良いし、両者を連結する一種以上の他の連結物質を介して結合していても良い。また、分子捕捉部 10 は、同一素材からなる捕捉体 101 と支持体 102 とを一体化して構成されていても良い。例えば、分子錶型ポリマーを有する高分子ポリマーそれ自身が支持体を兼ねる場合等が該当する。
- [0026] 分子捕捉部 10 は、少なくとも捕捉体 101 を有する表面が検体 17 に直接接触できるように構成されている。これは、捕捉体 101 が検出すべきターゲット 170 を捕捉できるようにするためである。ここで、「検体」とは、測定の対象となる液体又は固体をいう。
- [0027] 捕捉とは、結合や相互作用によって捉えることをいう。当該捕捉は、直接的捕捉、間接的捕捉のいずれも含む概念である。例えば、分子捕捉部 10 の捕捉体 101 による、検出すべきターゲット 170 の直接的な捕捉であっても良いし、分子捕捉部に固定された第二捕捉体を介して、検出すべきターゲットを間接的に捕捉しても良い。
- [0028] 捕捉体 101 とは、特定のテンプレート分子を利用して形成した分子錶型ポリマーを含むものであって、ターゲットとなる化学物質をそのターゲットが有する特定分子構造に依存して捕捉できるものである。当該捕捉体 101 の材質は、特定分子構造に依存してターゲットを捕捉する機能を有するものであれば特に限定されない。例えば、タンパク質であっても良いし、ポリマーであっても良いし、また金属であっても良い。具体的には抗体や分子錶型ポリマー等が該当する。
- [0029] 本発明で使用する分子錶型ポリマーの製造方法は、以下の通りである。例

例えば、まず、ターゲット又はターゲット類似の化学物質の存在下で、そのターゲット又はターゲット類似とイオン結合や水素結合によって相互作用する機能性モノマーを必要に応じて用いる他のモノマー成分と共に重合させ、ターゲット又はターゲット類似をポリマー内に固定する。その際、機能性モノマーと他のモノマー成分との共重合比は、各モノマー成分の種類等によって異なり特に限定されるものではないが、例えば機能性モノマー : 他のモノマー成分 = 1 : 16 ~ 1 : 64 (モル比) とすることができる。特に、1 : 32 が望ましい。その後、洗浄によってポリマーから当該ターゲットを除去する。ポリマー中に残ったキャビティー (空間) はターゲットの形状を記憶すると共に、キャビティー内に固定されている機能性モノマーによって化学的認識能も備えている。

[0030] ターゲットとしては、本実施形態ではステロイドホルモンの例について説明するが、これに限定されず、常温常圧下で気化した状態、又は液体状態 (溶媒中に溶解した場合等を含む) で存在する種々の物質が含まれる。例えば、揮発性化学物質、電解質、酸、塩基、糖質、脂質、タンパク質等が該当する。また、当該ターゲットには、常温常圧下では固体状態でのみ存在可能な物質であって、気体中もしくは液体中で微粒子として存在できる化学物質も含むものとする。分子捕捉部に対して腐蝕効果、溶解効果、変性効果等を有するターゲットは不適である。

[0031] ターゲットの分子量は、捕捉体 10¹ が捕捉可能な分子量であれば特に限定はされないが、低分子化学物質の検出を主たる目的とする本発明においては、数十から数百程度の低分子であることが好ましい。

[0032] 分子捕捉部 10 は、前記したように、着脱部によって化学物質検出装置 1 から着脱可能なように構成されていても良い。これは、測定環境、又は検体の状態等に応じて複数個の分子捕捉部 10 の中で最適な分子捕捉部を選択可能にするため、又は一度使用した分子捕捉部の洗浄の手間を省くため、さらに、連続使用によるコンタミネーションの危険性を排除するためである。当該着脱部によって着脱される分子捕捉部は、必ずしも全部である必要はなく

、例えば、試料チャンバ6が複数個の捕捉体101を備えその一部のみ着脱するものであっても良い。また、試料チャンバ6の分子捕捉部10及び捕捉量計測部11は、各々対をなすようにして設けても良く、あるいはまた、1個又は複数個の分子捕捉部と、1個又は複数個の捕捉量計測部とを独立に備え、それらの組み合わせを任意に変更して、最適な計測ができるようにしても良い。

[0033] 着脱部は、例えば、分子捕捉部10を化学物質検出装置1に固定する固定部材や、分子捕捉部10との情報の授受を行うための端子等を有していても良い。また、1つの化学物質検出装置1が複数の分子捕捉部10を有する場合には、当該着脱部も複数あっても良い。

[0034] 捕捉量計測部11は、分子捕捉部10で捕捉された化学物質を定量可能なように構成されている。例えば、計測用の金属薄膜を備えている。「化学物質を定量」とは、分子捕捉部10に対して検体17を所定の時間曝露したときに、ターゲットとなる化学物質の分子がどれほど捕捉体101に捕捉されたかを計測することである。ここで、「所定の時間」とは、定量前に予め決められた任意の一定時間をいう。例えば、1秒間であつても良いし、1分間であつても良い。また、当該定量は、捕捉体101が検体17中に存在するターゲット170を捕捉した際の当該捕捉体101の動的な変化を電気信号に変換し、その強度等によって捕捉したターゲットを計測することができる。捕捉体101の動的な変化を電気信号に変換できれば、当該定量の方法は特に限定されない。例えば、表面プラズモン共鳴測定法、水晶振動子マイクロバランス測定法、電気化学インピーダンス法、比色法、もしくは蛍光法等を採用することができる。これらの方法による定量は、いずれも100ms(0.1秒)以下で測定が可能である。

[0035] 表面プラズモン共鳴測定法とは、SPR (surface plasmon resonance) ^{3/4}とも呼ばれ、金属薄膜へのレーザー光の入射角度の変化に伴って反射光強度が減衰するという表面プラズモン共鳴現象を利用して、当該金属薄膜上への微量の捕捉物を高感度に測定する方法である。具体的には、本発明の分子録

型ポリマーを溶媒（水、有機溶媒）に懸濁させ、試料チャンバ6の支持体102の金属薄膜上へ捕捉体101をスピコートし、乾燥させて測定を行う。測定においては、金属薄膜表面側に表面プラズモンが発生する。エバネッセント波と表面プラズモンの波数が一致すると、共鳴によって光子エネルギーが表面プラズモンを励起するために使用されることから反射光が減衰する現象が生じる。これは、レーザーの入射角度を変化させたとき、それに伴う反射光強度の減衰として捉えることができる。入射光強度に対する反射光強度の比率である反射光強度比が最小となる時の入射角度（共鳴角度 θ とする）は、金属表面で生じる物質間の相互作用によって影響される。したがって、物質の相互作用を、その前後の共鳴角度 θ の変化として捉えることができる。例えば、支持体102の金属薄膜表面に担持させた分子錶型ポリマーが何も捕捉していない状態の共鳴角度を θ_0 とする時、当該分子錶型ポリマーがターゲットを捕捉すると共鳴角度が θ_1 に変化する。この場合、 θ_1 と θ_0 との差である $\Delta\theta$ の値の変化を見ることにより、分子錶型がターゲットをどれほど捕捉したかについて定量することが可能となる。これにより、例えば検体中に125斗Mの濃度で含まれているコルチゾールを定量することができる。スピコートの際には、プラズモン共鳴が伝播する距離以内に捕捉体101を製膜することが重要である。具体的には、100nm以内の厚さで捕捉体101を製膜することが好ましい。

[0036] 水晶振動子マイクロバランス測定法とは、QCM (quartz crystal microbalance) 法とも呼ばれ、水晶振動子表面への物質の付着による水晶振動子の共振周波数の変化量に基づいて極微量な付着物を定量的にとらえる質量測定方法である。具体的には、本発明の分子錶型ポリマーを溶媒（水、有機溶媒）に懸濁させ、水晶振動子のセンサ上へ捕捉体101をスピコートし、乾燥させて測定を行う。測定方法は公知の確立された方法であり、従来技術に準じて行えば良いので、ここでは詳細な説明を省略する。測定再現性を得るために、水晶振動子上の捕捉体101の製膜厚さは、1 μ m以下とすることが好ましい。

[0037] 電気化学インピーダンス法とは、表面分極制御法とも呼ばれ、金属の表面分極を電極電位によって制御することで、電極表面と当該電極表面に付着した物質との相互作用を変化させ、付着した物質に関する情報を引き出す方法である。具体的には、本発明の分子錶型ポリマー粒子を溶媒（水、有機溶媒）に懸濁させ、電極表面上へ捕捉体 101 をスピンコートし、乾燥させて測定を行う。測定方法は公知の確立された方法であり、従来技術に準じて行えば良いので、ここでは詳細な説明を省略する。測定再現性を得るために、水晶振動子上の捕捉体 101 の製膜厚さは、 $1\mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。

[0038] 比色法及び蛍光法は、検出に用いる基質の性質が異なるだけで、その原理はほとんど同じである。すなわち、基質が発色物質を生じる場合には比色法、また蛍光物質を生じる場合には蛍光法と呼ぶ。いずれの方法も、検出用プローブとしての基質等を、捕捉体、もしくは介在物質等に担持させておき、当該基質に基づく発色濃度や蛍光強度を吸光光度計やルミノメータ等により測定することにより、ターゲットとの結合を定量する方法である。

[0039] これらの方法は、捕捉体が抗体の場合には、ELISA法等が対応する。ELISA法は、酵素免疫吸着分析法とも呼ばれる。その原理は、ターゲットと結合した一次抗体を、酵素標識された介在物質である二次抗体等を介して、当該酵素の作用により発色物質、もしくは蛍光物質を生じさせ、その発色濃度や蛍光強度に基づきターゲットを定量するものである。

[0040] また、分子錶型ポリマーの場合には、基質プローブ等を担持した機能性モノマーをキャビティー内に有する分子錶型ポリマー等が該当する。例えば、ターゲットが当該分子錶型ポリマーに捕捉されることで、キャビティー内の基質プローブの状態が変化して発色、もしくは蛍光を発し、その発色濃度や蛍光強度によってターゲットを定量することができる。

[0041] 図3Aに、分子錶型ポリマー微粒子の合成スキームを示す。本発明では、まず微粒子の合成を行い、その合成した微粒子の存在下で、ターゲットと重合性のビニルモノマーを重合反応させ、分子錶型ポリマーの微粒子を作製す

るところに特徴がある。その後、遠心分離工程、加水分解工程、洗浄工程を経て分子錶型ポリマーの微粒子を得ることができる。この合成スキームにのっとり、合成される分子錶型ポリマー微粒子ができる様子を模式的に示したのが図3 Bである。真球状の微粒子25は、分子錶型ポリマーの原料(モノマー)および錶型となるターゲットまたはターゲット誘導体などにより、分子錶型ポリマー26により被覆される。被覆された真球状の分子錶型ポリマーは、ターゲット認識部位261を有している。真球状の分子錶型ポリマー26により被覆された微粒子の断面図を示すと、確かに微粒子27とそれを被覆する分子錶型ポリマー28が存在する。核(コア)を有する2層構造の微粒子であることから、本発明の分子錶型ポリマー微粒子はコアシェル型を形成している。

[0042] 得られた分子錶型のポリマー微粒子は、サブミクロンサイズであり、かつ粒径が均一であるため、カラム状や平板に分子錶型ポリマー微粒子を並べた際に、密に詰まるためターゲットに対する認識力が高い。

[0043] 上記の手順に従い、ステロイドホルモンの一種であるコルチゾールの分子錶型ポリマー微粒子を合成する場合について以下に説明する。なお、以下に示す方法は、コルチゾールとそれを囲む分子錶型ポリマー微粒子を一部で共有結合させ、よりコルチゾールとの認識力が高い分子錶型ポリマーの作成法を示す。しかし、微粒子の存在下で分子錶型ポリマーを作成するのであれば、コルチゾールとまわりのビニルモノマーとの相互作用は、共有結合に限らず、イオン結合、水素結合、ファンデルワールスカ、疎水-疎水結合などの一部または組み合わせを利用してよい。

(コルチゾールの分子錶型ポリマー微粒子の製造)

コアとなる微粒子とターゲットとなるコルチゾールの存在下で、コルチゾールと相互作用する機能性モノマーの重合を行い、重合反応によって得られたポリマーを洗浄することにより、内部にコルチゾールを特異的に認識する分子錶型を得ることができる。図4 Aに、コルチゾールの分子構造を示す。図4 Bには、イタコン酸の分子構造を示す。図4 Aに示す通り、コルチゾー

ルの骨格のうち、末端5員環の炭素をC4と名づけると、その隣のカルボニル基の炭素をC3、その隣のメチレン基の炭素をC2、その隣の水酸基の酸素をO1と名づけられる。O1までを骨格と考えると、ステロイド骨格の末端から、炭素を2つ介して、酸素まで結合が形成されている。

[0044] 一方、イタコン酸は、図4Bに示すように、図左側のカルボキシル基の炭素をC1'と名づけると、隣のメチレン基の炭素はC2'、その隣のビニル基の炭素はC3'、その隣のカルボキシル基の炭素はC4'と名づけられる。

[0045] 本発明の分子錶型ポリマーの製造において重要な点は、ターゲットと重合性モノマーとの相互作用力の強さである。コルチゾールの分子錶型ポリマーの原料にイタコン酸を用いるのは、イタコン酸の分子の両末端にカルボキシル基が存在し、かつその距離が適切であるため、コルチゾールの一部と相互作用しやすいと考えられるためである。図5に、コルチゾールとイタコン酸の相互作用について模式的に示す。点線501と点線502で示すように、イタコン酸を用いることで、複数箇所でコルチゾールと相互作用することができる。このように、コルチゾール等のステロイドホルモンと相互作用する官能基を2つ以上有するモノマーを重合単位に含むことによって、ステロイドホルモンとモノマーとのフィッティング性が向上し、分子錶型ポリマーとしての有意な性質をもたらすことができると考えられる。

[0046] ここで、「官能基」とは、ある化学物質の集団に共通して含まれ、かつ当該集団において共通した化学的物性や反応性を示す原子団をいう。例えば、ヒドロキシル基、アルデヒド基、カルボキシル基、カルボニル基、ニトロ基、アミノ基、スルホン基、アゾ基等が挙げられる。上記ステロイドホルモンと相互作用するモノマーが2つ以上の官能基を有する場合、その官能基としては、特にカルボキシル基が好ましい。

[0047] コルチゾール以外のステロイドホルモンに対しても、好ましくは複数点で相互作用する重合性モノマーを利用することによって、分子錶型ポリマーを合成することができる。天然のステロイドホルモンは、一般に生殖腺や副腎

においてコレステロールから合成される。図6は、コレステロールと代表的なステロイドホルモンの分子構造を示す。上述のコルチゾールの分子錶型ポリマー微粒子合成の手法を用いれば、他のステロイドホルモンの分子錶型ポリマー微粒子を作製できる。図6の(A)は、コレステロールであり、これを母骨格として、図6の(B)のアルドステロン、(C)のエストラジオール、(D)のテストステロンが代謝合成される。

[0048] 上述のように、コルチゾールに対する分子錶型ポリマーの原料には好ましくはイタコン酸が用いられるが、これは多点で水素結合させることを狙って原料を選定したものである。これと同様に、平面性の高いステロイド骨格を有するステロイドホルモンに適したモノマー構造を選定することができる。図6の(B)のアルドステロンに対しては、末端にカルボニル基及びメチレン基を介して存在する水酸基(OH)と、骨格に直接結合するアルデヒド基(CHO)の2つに着目して、分子錶型ポリマーのモノマー原料を選定することができる。上記のような複数の官能基に対して、同時に相互作用できるような長さのモノマー分子を分子錶型ポリマーの原料に用いれば良い。すなわち、ビニルモノマーであって、骨格にカルボキシル基を2つ有し、分子錶型ポリマーのターゲットにフィッティングする適切な距離(メチレン基で2又は3)を有するモノマーを重合単位として分子錶型ポリマーを製造すれば良い。コルチゾールの分子錶型ポリマーと同様に、ターゲットとするステロイドホルモンの存在下で、上記ビニルモノマーと、必要に応じてスチレンやジビニルベンゼン等の他のモノマー成分とを、重合開始剤とともに共重合させることによって分子錶型ポリマーを得ることができる。共重合する以外に、相互作用するビニルモノマーを単独重合させても良い。上記ビニルモノマーと他のモノマー成分とを共重合させる場合、その共重合比は、各モノマー成分やステロイドホルモンの種類等によって異なり特に限定されるものではないが、例えば、ステロイドホルモンと相互作用するビニルモノマー : 他のモノマー成分 = 1 : 16 ~ 1 : 64 (モル比) とすることができる。特に、1 : 32 が望ましい。

[0049] 図6の(C)のエストラジオールや(D)のテストステロンは官能基が離れているので、分子錶型ポリマーを作製時に、一つのモノマーに対し同時に複数点で相互作用する必要はなく、それぞれの官能基を認識する複数の重合性モノマーを用いて、ターゲットの存在下、スチレンやジビニルベンゼン、重合開始剤等とともに共重合させれば良い。

[0050] 上記の例では、ステロイドホルモンとモノマーとの間に水素結合等による相互作用を形成させる場合について説明したが、別の実施形態として、テンプレート分子とするステロイドホルモンを誘導体化し、分子錶型ポリマーを形成するモノマーと共重合反応する官能基を導入しても良い。ステロイドホルモンとモノマーとの間に共重合反応による共有結合を形成することによって、両者の相互作用がより強固となり、ステロイドホルモンとモノマーとのフィッティング性が向上し、分子錶型ポリマーとしての有利な性質をもたらすことができる。このようなステロイドホルモンと共重合させるモノマーとしては、上記と同様に、官能基を2つ以上有するイタコン酸等のモノマーや、複数種のモノマーを組み合わせて用いることができる。

[0051] また、ステロイドホルモン分子に導入される、モノマーと共重合反応する官能基としては、例えば、アクリロイル基、メタクリロイル基、ビニル基、エポキシ基、など重合性の置換基等が挙げられ、特に、メタクリロイル基が好ましい。

実施形態2

[0052] 本発明の第2の実施形態として、化学物質検出装置の分子捕捉部は、競合法又は置換法によってステロイドホルモンの検出感度を増強するように構成されていても良い。

「置換法」は、捕捉体に予め捕捉させた特定分子構造を有する化学物質と、検体中の検出すべきターゲットとの間で生じる捕捉体に対する競合を利用する方法である。例えば、捕捉体が抗体である場合には、当該抗体を支持体に固定しておき、特定分子構造を有する複合体抗原を当該抗体に捕捉させておく。この状態で検出すべきターゲットを含む検体を分子捕捉部に曝露させ

ると、結合力の差により複合体抗原が抗体から解離し、代わって検体中の検出すべきターゲットが抗体に捕捉される。この置換反応による変化を定量することにより高感度でターゲットを定量することができる。例えば、表面プラズモン共鳴測定法を用いる場合であれば、置換反応による共鳴角度 θ の変化を捉えれば良い。当該置換法による検出感度の増強により、pptレベルの濃度のターゲットであっても検出可能となる。

[0053] また、競合法を用いた検出法の例を、図7に基づき説明する。図7に示すように、容器84に、分子錶型ポリマー80の懸濁水溶液を入れておき、そこに検体82と標識化ターゲット83の固体又は水溶液を入れる。検体82は、ターゲット820や、夾雑物A821及び夾雑物B822等を含んでいる。無論、ターゲット820が存在しない場合や夾雑物が多種存在する場合もあり得る。標識化ターゲット83は、ターゲット部分832と標識部分831からなる。ターゲット820及び標識化ターゲット83を競合させて分子錶型ポリマー80と1時間室温で反応させた後、標識部分831の比色量や蛍光量を測定することで、検体82中のターゲット量を算出することができる。すなわち、容器84内のターゲット量が多いほど、比色量や蛍光量は小さくなる。検体82中のターゲット量の算出には、別途算出した比色量や蛍光量の検量線を用いれば良い。この測定により、例えば、検体中に125 μ M以下の濃度で含まれているコルチゾールを優位に定量することができる。

[0054] また、上記実施形態において、捕捉量計測部で取得される電気信号は通常微弱であることが多いため、取得された電気信号を必要に応じて増幅しても良い。当該増幅は、増幅器を捕捉量計測部に設置する等の手段により行うことができる。また、取得された電気信号がアナログ信号である場合には、当該アナログ信号を必要に応じてAD変換しても良い。AD変換はコンパレータ等のAD変換器を捕捉量計測部に設置する等の手段により行うことができる。

[0055] さらに、捕捉量計測部は、計測結果を出力可能なように構成されている。

測定結果の出力先は特に限定されない。例えば、当該計測結果を、モニタ等の外部表示部に出力しても良い。出力する際の出力形式についても特に限定されるものではない。直接配線を介した出力でも良いし、USB端子等の接続端子を設けてケーブルを介した出力でも良い。また、無線によって送出しても良い。

実施形態 3

[0056] 図 8 に、本発明の第 3 の実施形態に係る化学物質検出装置の斜視図を示す。図 8 の化学物質検出装置は、主に樹脂やガラス、シリカゲル、紙、金属等の素材に分子錶型ポリマーを塗布したものである。検出装置は、大きく 3 つの部分から構成され、すなわち試料注入部 91、捕捉検出部 90、及び前処理層 92 からなる。前処理層 92 には、唾液中のタンパク質や脂質等を吸着する不織布を固定している。そのため、コルチゾール等のステロイドホルモンの検出の妨げとなるタンパク質や脂質等を捕捉検出部 90 に進入させないようにしている。なお、この前処理層 92 に用いる素材は、不織布に限定されず、樹脂やガラス、シリカゲル、紙等でも良い。捕捉検出部 90 には、分子錶型ポリマーを塗布してある。また、置換法を利用する場合、あらかじめ標識化ターゲットの一定量を固定化していても良い。次に、試料注入部 91 に、検体 93 を塗布する。検体 93 には、ターゲット 930、夾雑物 A 931、夾雑物 B 932 等が含まれている。競合法を利用する場合には、検体 93 に標識化ターゲットを混合させ、試料注入部 91 に塗布する。その後、矢印 933 の方向に検体 93 及び標識化ターゲットは進行し、前処理層 92 では、検体 93 中の夾雑物の一部又は全部が除去される。その後、捕捉検出部 90 の分子錶型ポリマーにより、検体 93 中のターゲット 930 及び標識化ターゲットが捕捉される。検出には、蛍光顕微鏡や目視確認、光学顕微鏡等を用いることで、発色する色を判定する等により行うことができる。このチップ形態の化学物質検出装置を用いることにより、例えば検体中における 50 μM 以下の濃度のターゲットを検出することができる。

実施例

[0057] 次に、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明する。ただし、以下の実施例は単に例示するのみであり、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0058] 原料とターゲット分子との間の共有結合を利用した分子鋳型ポリマー微粒子合成とターゲット捕捉試験の例について述べる。

(コルチゾールのメタクリロイル化)

まず、合成にあたり、テンプレート分子であるコルチゾールを以下の手順に従って変換し、コルチゾール誘導体を合成した。

[0059] まず、窒素雰囲気下、コルチゾール (2.5 mmol、907 mg) を乾燥 THF (40 mL) に溶解し、トリエチルアミン (30 mmol、4.2 mL) を加え氷冷した。これに、塩化メタクリロイル (15 mmol、1.5 mL) を溶解した乾燥 THF (40 mL) を徐々に滴下し、0℃で1時間、その後室温で4時間攪拌した。続いて、反応液に酢酸エチルを加え、分液漏斗で有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、クエン酸、及び塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。その後、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた。次に、溶媒をエバポレーターで留去し、抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル C₂₀₀、展開溶媒 : 酢酸エチル / ヘキサン = 1 : 1) で分離精製し、白色固体を得た (収率 65%)。これにより得られたメタクリロイル化コルチゾールの分子構造を図9に示す。

[0060] なお、この図9に示すメタクリロイル化コルチゾールは、以下の方法でも得ることができた。すなわち、窒素雰囲気下、二口フラスコ中で、コルチゾール (2.5 mmol、907 mg) 及びジメチルアミノピリジン (0.25 mmol、30.5 mg) を乾燥 THF (40 mL) に溶解し、氷冷した。続いて、トリエチルアミン (30 mmol、4.2 mL) 及びメタクリル酸無水物 (7.5 mmol、1.2 mL) を徐々に滴下し、0℃で1時間、その後室温で2日間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、分液漏斗で有機相を純水で3回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒をエバポレー

ターで留去し、抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル C₂₀₀、展開溶媒：酢酸エチル／ヘキサン＝1：1）で分離精製し、白色固体を得た（収率89％）。

（コアとなる微粒子の合成）

表1のレシピに従ってニロフラスコに、スチレン760mg（7.3mmol）、DVB（ジビニルベンゼン）40mg（0.31mmol）、水79.2g、V-50（2,2'-Azobis（2-methylpropionamide）dihydrochloride）41.3mg（0.15mmol）を量りとり、窒素置換後、80℃で48時間反応させた。その後、溶液を氷浴により急冷し、酸素封入により反応を停止した。その反応過程では、反応数時間後から反応溶液が白濁し始め、48時間後には白濁したエマルションが得られた。電子顕微鏡観察の結果、粒子の粒径は125nmであり、粒径の均一性が高い。

[0061] [表1]

微粒子の合成原料

譲	微粒子
スチレン	760mg (7.3mmol)
DVB	40mg (0.31mmol)
水	79.2g
V-50	41.3mg (0.15mmol)

[0062] （分子錶型ポリマー微粒子の合成）

上記のいずれかの方法で調製したメタクリロイル基を導入したコルチゾール誘導体をテンプレート分子として、以下の表2に示す原料組成に従って分子錶型ポリマー微粒子を合成した。メタクリロイル基はエチレン性不飽和基を有し、重合反応性であるため、メタクリロイル基を導入したコルチゾールは、表2に示す添加モノマーと共重合可能である。その結果、分子錶型ポリマーの原料とコルチゾール誘導体は強く結合、認識できるため、コルチゾールを高い選択性で捕捉可能な分子錶型ポリマーを作製することができる。

[0063] 具体的には、表2のレシピに従い分子錶型ポリマーとして、nano_MIP1とNano_MIP2の重合を行った。

(Nano-MIP1の合成法)

バイアル瓶に、表1に従い合成したポリスチレン懸濁液(3重量%、20g/水)を入れ、そこに、メタクリロイル化コルチゾールを3.9mg(9 μ mol)、イタコン酸を4.7mg(36 μ mol)、メチレンビスアクリルアミドを69.0mg(447.5 μ mol)を加え、懸濁液(THF)に溶解させた後、 ϕ 18×180mmの試験管に移し、重合開始剤であるV-50(2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride) 2.7mg(9.85 μ mol)を溶解させた。セプタムキャップをして窒素置換し、80 $^{\circ}$ Cで24時間、800rpmの条件で重合反応を行った。重合液を回収し、遠心分離機にかけ、上澄み溶液を除去した後、50mlの2M水酸化ナトリウム水溶液/メタノール=1:1で24時間加水分解した。その後、50mlの1M塩酸/メタノール=1:1、50mlの純水/メタノール=1:1で数時間洗浄した。この加水分解と洗浄工程により、分子錶型ポリマー内部に取り込まれていたコルチゾール誘導体を分子錶型ポリマーから除去することができる。

(Nano-MIP2の合成法)

バイアル瓶に、表1に従い合成したポリスチレン懸濁液(3重量%、20g/水)を入れ、そこに、メタクリロイル化コルチゾールを3.9mg(9 μ mol)、イタコン酸を4.7mg(36 μ mol)、ジビニルベンゼン(DVB)を59.5mg(457 μ mol)、スチレン9.5mg(91.2 μ mol)を加え、重合開始剤であるV-50(2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride)を3.2mg(11.8 μ mol)を溶解させた。セプタムキャップをして窒素置換し、80 $^{\circ}$ Cで24時間、800rpmの条件で重合反応を行った。重合液を回収し、遠心分離機にかけ、上澄み溶液を除去した後、50mlの2M水酸化ナトリウム水溶液/メタノール=1:1で24時間加水分解した。その後、50mlの1M塩酸/メタノール=1:1、50

m l の純水/ メタノール = 1 : 1 で数時間洗浄した。この加水分解と洗浄工程により、分子錶型ポリマー内部に取り込まれていたコルチゾール誘導体を分子錶型ポリマーから除去することができる。上記の方法により、ステロイドホルモンの分子錶型ポリマー微粒子であって、前記ステロイドホルモンと相互作用するポリマーからなる分子錶型ポリマーが微粒子の周りを被覆する構造を有するコアシェル型分子錶型ポリマー微粒子を作製できた。

[0064] [表2]

分子練蠶ポリマー微粒子2種の合成原料

原料	Nano-MIP1	Nano-MIP2
ポリメタクリレート粒子懸濁液mm	20 g	20 g
メタクロイル化コルチゾール	3.9 mg (9 μmol)	3.9 mg (9 μmol)
イタコン酸	4.7 mg (36 μmol)	4.7 mg (36 μmol)
メチレンビスアクリルアミド	89.0 mg (44.5 μmol)	なし
スチレン	なし	9.5 mg (9.5 μmol)
DVB	なし	50.5 mg (457 μmol)
V-50	2.7 mg (85 μmol)	3.2 mg (11.8 μmol)

実施例 2

[0065] (コルチゾールの蛍光ラベル化 : ダンシル基の導入)

コルチゾールを高感度に検出するために、蛍光標識化コルチゾールの利用を考え、合成した。以下で合成した分子の分子構造は、図10Aの(E) ~ (G)、図10Bの(I) ~ (J)に示す。

反応(1) : 不飽和結合のエポキシ化とアミノ基の導入

窒素置換した二口フラスコにコルチゾール 1.82 g (5 mmol) を量りとり、メタノール 65 ml、エタノール 25 ml に部分溶解した。氷浴にて 0℃ にした後、10% 水酸化ナトリウム水溶液 5 ml と 30% 過酸化水素水 (H₂O₂) 5 ml をシリンジで加え、0℃ にて 3 時間反応後、室温で一晩反応させ、中間体としてコルチゾール誘導体 (E) を得た。その後、2- (Boc-amino) ethanethiol を 1 ml 加え、6 時間室温で

反応させた後、反応溶液を希塩酸で中和した。飽和食塩水 30 ml を加え、酢酸エチルで 3 回抽出し、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒をエバポレーターで留去した。粗生成物を THF、クロロホルムで溶媒分別後、濾液をカラムクロマトグラフィー（展開層：Silicagel C₂₀₀、展開溶媒：クロロホルム/メタノール/トリエチルアミン=20/1/0.2）で分離精製したところ、黄白色固体（コルチゾール誘導体 F）が得られた（収率 20%）。

反応（2）：Boc 基の脱保護

コルチゾール誘導体 F（54 mg、0.1 mmol）に 0.5 M 塩酸/メタノール溶液 1 ml を加えた。遮光しながら、室温で 4 時間反応させた後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。飽和食塩水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去したところ、黄褐色固体のコルチゾール誘導体 G が得られた（粗収率：90%）。

反応（3）：ダンシル化

窒素雰囲気下、コルチゾール誘導体 G（30 mg、0.069 mmol）にジメチルアミノピリジン（10 mg）を加え、蒸留した THF 3 ml に溶解した。その後、トリエチルアミン（0.1 ml）と蒸留 THF 2 ml に溶解した。蛍光分子であるダンシルクロライド（20 mg、1.1 等量）を加え、一晩室温で反応させた。溶媒をエバポレーターで留去し、飽和食塩水を加え、ジクロロメタンで 3 回抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去したところ、黄色の粘調固体得られた。粗生成物を THF に溶解させ、分取 TLC（展開層：Silicagel C₂₀₀、展開溶媒：クロロホルム/メタノール/トリエチルアミン=20/1/0.2）で分離精製したところ、黄白色固体（コルチゾール誘導体 H）が得られた。

（蛍光ラベル化されたコルチゾール誘導体（H）の蛍光測定）

蛍光ラベル化されたコルチゾール誘導体（H）をクロロホルムに溶解し、蛍光分光光度計にて蛍光スペクトルを測定した。励起波長（375 nm）にて励起させた際の蛍光スペクトルを確認したところ、450 nm 付近に蛍光

極大ピークが確認された。したがって、蛍光ラベル化されたコルチゾール誘導体 (H) を使い、分子錶型ポリマー微粒子 (Nano_MIP1、Nano_MIP2) のコルチゾールに対する検出力を評価した。

[コルチゾール検出実験]

上述の方法で作製したNano-MIP1とNano-MIP2のコルチゾール吸着力を評価した。Nano_MIP1とNano_MIP2の懸濁液を遠心分離し、溶媒を除去した後、クロロホルム/ヘキサン=4/1で3回置換した。Nano_MIP1はクロロホルム/ヘキサン=4/1中で凝集しており、蛍光測定不可能であったため、以下の滴定実験にはNano-MIP2のみを使用した。

[0066] 蛍光ラベル化されたコルチゾール誘導体 (H) 溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4/1) 50 μ M を蛍光セルに3 ml 量りとり、攪拌しながら10分ごとにNano_MIP2を100 μ l ずつ滴下し、励起波長 (375 nm) で蛍光測定した。滴下量が400 μ l になるまで滴下、測定を繰り返した。参照実験として、溶媒 (クロロホルム/ヘキサン=4/1) のみを100 μ l ずつ滴下し、励起波長 (375 nm) で蛍光測定した。

[0067] その結果、Nano_MIP2懸濁液を滴下した場合、溶媒のみを滴下した場合に比べて、最大蛍光波長が大きく長波長側にシフトし、蛍光強度が大きく減少した。その結果を図11A、図11Bと表3に示す。図11Aのグラフの横軸は波長 (nm)、縦軸は蛍光強度 (任意単位) である。図11Aのグラフ中の実線950は、分子錶型ポリマー微粒子を添加前のスペクトルである。破線951は、分子錶型ポリマー微粒子を400 μ l 添加後のスペクトルである。波長450 nmでの蛍光強度 (任意単位) を示す。

[0068] また、図11Bのグラフの横軸は波長 (nm)、縦軸は蛍光強度 (任意単位) である。図11Bのグラフ中の実線960は、分子錶型ポリマー微粒子を添加前のスペクトルである。破線962は、溶媒のみを400 μ l 添加後のスペクトルである。波長450 nmでの蛍光強度 (任意単位) を示す。

[0069] 表3には、上記の添加液による蛍光強度の変化を蛍光強度 (任意単位) で

示したものである。蛍光強度は、添加量 $0 \mu\text{l}$ (添加前) では、Nano_MIP2 添加と溶媒のみ添加とも、180であった。Nano_MIP2 添加では、添加量 $100 \mu\text{l}$ で蛍光強度が160になり、添加量 $200 \mu\text{l}$ で蛍光強度が150になり、添加量 $300 \mu\text{l}$ で蛍光強度が135になり、添加量 $400 \mu\text{l}$ で蛍光強度が125と大幅に減少した。

[0070] 一方、溶媒のみを添加した場合、添加量 $100 \mu\text{l}$ で蛍光強度が175になり、添加量 $200 \mu\text{l}$ で蛍光強度が170になり、添加量 $300 \mu\text{l}$ で蛍光強度が165になり、添加量 $400 \mu\text{l}$ で蛍光強度が160と減少した。

[0071] 以上のことから、Nano_MIP2 を添加した場合、溶媒のみを添加した単なる希釈に比べ大幅に蛍光強度が減少していることがわかった。したがって、分子錶型ポリマー微粒子の内部に、蛍光ラベルしたコルチゾールが取り込まれ、分子間の相互作用の影響で、蛍光強度が大幅に減少したと考える。今回、蛍光ラベルしたコルチゾールの濃度が $50 \mu\text{M}$ であったことから、本発明は少なくとも $50 \mu\text{M}$ のコルチゾールを検出できる。なお、この検出方法は直接蛍光強度を測定したものであるが、上述した競合法や置換法を用いても良い。

[0072] [表3]

添加量による蛍光強度の変化 (波長: 450 nm)

添加量	蛍光強度 (任意単位)	
	Nano-MIP2 添加	溶媒のみ添加
$0 \mu\text{l}$ (添加前)	180	180
$100 \mu\text{l}$	160	175
$200 \mu\text{l}$	150	170
$300 \mu\text{l}$	135	165
$400 \mu\text{l}$	125	160

実施例 3

[0073] [コルチゾールの蛍光ラベル : ピレノの導入]

コルチゾールを高感度を検出するために、蛍光標識化コルチゾールの利用を考え、合成することとした。上記では、ダンシル基を導入したコルチゾールによる検出例を示した。続いて、ピレノを導入したコルチゾールによる検

出例を示す。

反応 (5) ピレン活性エステルの合成

窒素雰囲気下、1-Pyrene Acetic Acid (260.3 mg、1 mmol) を蒸留したTHF (5 mL) に溶解した。そこへ、蒸留したTHF (1 mL) で希釈した1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC) (212 μl、1.2 mL) と蒸留したTHF (5 mL) に溶解したN-Hydroxy Succinimide (138.1 mg、1.2 mmol) を加え、遮光しながら室温で一晩攪拌した。反応終了後、反応液をエバポレーターで留去し、純水を加え、塩化メチレンで3回抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒をエバポレーターで留去したところ、茶褐色の固体が得られた。得られた固体を酢酸エチルでデカンテーションした後、上澄み溶液をカラムクロマトグラフィー (展開層 : C-200、展開溶媒 : 酢酸エチル/ヘキサン = 1 : 1) で分離精製したところ、黄色の固体 (ピレン誘導体、図10Bの分子構造I) が得られた (収率 : 83%)。

反応 (6) ピレンラベル化コルチゾールの合成

窒素雰囲気下、コルチゾール誘導体G (61 mg、0.14 mmol) を塩化メチレン (3 mL) に溶解し、塩化メチレン (1 mL) に溶解したN,N-Dimethyl-4-aminopyridine (DMA P) (17.2 mg、0.14 mmol) を加えた。続いて塩化メチレン (3 mL) に溶解したピレン誘導体 (I : 上述の1. で合成) (50 mg、0.14 mmol) を加え、遮光しながら室温で一晩反応させた。反応終了後、純水を加え、塩化メチレンで3回抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させた後、エバポレーターで溶媒を留去したところ、茶褐色の粘調固体が得られた。酢酸エチルでデカンテーションした後、上澄み溶液をカラムクロマトグラフィー (展開層 : C-200、展開溶媒 : 酢酸エチル/ヘキサン = 1 : 4) で分離精製したところ、黄色の固体 (図10Bの分子構造J) が得られた (収率 : 64%)。

[コルチゾール検出実験]

上述で合成したピレン導入したコルチゾール (J) をクロロホルムに溶解し、励起波長 (350 nm) で蛍光スペクトルを測定した。その結果、400 nm付近に蛍光極大ピークが確認された。

[0074] 続いて、分子錶型ポリマーとの相互作用を確認した。1 μmol / l の誘導体 (J) 溶液 (クロロホルム/ヘキサン=4 / 1) を調整し、3 ml を蛍光セルに量りつつた。続いて、攪拌しながら10分毎に0、100、200、300、400、500 μl となるようにNano-MIP2を順次滴下し、励起波長 (350 nm) で測定した。なお、Nano-MIP2ポリマー懸濁液の固形分濃度は約1 mg / mL となるように調整したものを使用した。

[0075] 得られた蛍光スペクトルを図12に示す。図12のグラフの横軸は波長 (nm)、縦軸は蛍光強度 (任意単位) である。添加前 (0 μl) は、灰色実線で示す。その後、Nano-MIP2ポリマー懸濁液を100 μl 添加後で、黒色長鎖線で示すとおり、各波長での蛍光強度が増す。また、その際に、波長範囲380~600 nmで、蛍光強度のピークが最大になる波長が短波長側にシフトした。その後、Nano-MIP2ポリマー懸濁液を更に100 μl 添加した後 (総添加量200 μl) の蛍光スペクトルは、灰色破線で示す。同様に、最大ピークを与える波長が短波長シフトした。以下、同様に、Nano-MIP2ポリマー懸濁液を更に100 μl 添加した後 (総添加量300 μl) の蛍光スペクトルは、黒色角点線で示す。同様に、Nano-MIP2ポリマー懸濁液を更に100 μl 添加した後 (総添加量400 μl) の蛍光スペクトルは、灰色丸点線で示す。同様に、Nano-MIP2ポリマー懸濁液を更に100 μl 添加した後 (総添加量500 μl) の蛍光スペクトルは、黒色実線で示す。

[0076] 以上で得られた蛍光スペクトルのうち、波長範囲380 nmから600 nmで、各添加量後の蛍光強度が最大になる波長とその蛍光強度を表4に示す。

[0077] [表4]

各添加量後の蛍光強度が最大になる波長とその蛍光強度（波長範囲：380 nmから600 nm）

総添加量	波長 (nm)	蛍光強度 (任意単位)
0 μ L (添加前)	409.5	48.33
100 μ l	404.0	49.11
200 μ l	401.0	52.29
300 μ l	399.0	55.67
400 μ l	402.0	60.15
500 μ l	398.0	61.61

[0078] 以上の結果から、蛍光スペクトルの変化から、本発明のMIPが、1 μ m o l / l のコルチゾールを検出できることを確認した。また、10 μ m o l / l のコルチゾールに対して同様に検出できることを確認した。

実施例 4

[0079] 原料とターゲット分子との間の2箇所での共有結合を利用した分子錶型ポリマー微粒子合成とターゲット捕捉試験の例について述べる。

(2つの重合性置換基を有するコルチゾール誘導体の合成)

反応 (7) : 合成中間体の合成

50 mL ナスフラスコに N-hydroxyphthalimide (図13Aの分子構造K) (163 mg、1 mmol) と、CuCl(I) (99 mg、1 mmol)、活性化4 Å molecular sieves (200 mg)、4-vinylphenylboronic acid (図13Aの分子構造L) (296 mg、2 mmol)、スターラーバーを入れ、そこに1、2-dichloroethane (5 mL) を加え溶解、懸濁させた。4 Å molecular sieves は150 °C 真空化で一晩活性化したものを使用した。そこにpyridine (90 μ L) を加え攪拌したところ茶色の懸濁液となった。その後、反応溶液は緑色に変色した。反応終了後、反応溶液をシリカゲルに吸着させそのまま溶媒を減圧留去し、酢酸エチルで各スポットを溶出させた。その後オートカラムを用いて、合成中間体分子M (図13A) の分離を試みた。分離条件は以下の通りである。ヘキサンのみで12分通液し、最終的にヘキサン 酢酸エチル = 9 : 1 となるようグラジェン

トを11分かけて行い、その後、9 : 1で20分間通液した。得られた合成中間体分子Mの収量は137 mg (0.51 mmol)であり、収率 :52%であった。

反応 (8) :機能性モノマー (分子N) の合成

50 mL のナスフラスコに合成中間体分子M (82.6 mg、0.324 mmol)、10% MeOH となるように調製したCHCl₃ (5 mL)、hydrazine monohydrate (47.5 μL、0.972 mmol)を入れ室温条件下で一昼夜攪拌した。反応開始直後から白色の沈殿物が析出した。一昼夜攪拌した。その後、沈殿物ごとシリカゲルに吸着させ30%酢酸エチルのヘキサン溶液で5 gのシリカゲルに通して洗浄した。その際未反応のヒドラジンを除去できた。機能性モノマー (分子N) を含む残留物は粗精製のまま次の反応に用いた。

反応 (9) :2つの重合性置換基を有するコルチゾール誘導体の合成

機能性モノマー (分子N) を合成後、粗精製のまま以下の反応を行った。粗精製の溶液の溶媒を減圧留去し、その機能性モノマー (分子N) 入りの混合物 (0.63 mmol 反応 (8) の合成中間体の仕込み量)、メタクリロイル化コルチゾール (167.2 mg、0.342 mol)、NaOAc (0.68 mmol)を、MeOH 10 mL に溶解させ室温遮光下で48時間反応させた。反応終了後、反応溶液は茶褐色になっていた。その後溶媒を減圧留去し、そこにCH₂Cl₂を加えNaOAcを析出させろ過した。その後その溶液を、オートカラムを用いて分離した。分離した溶液を減圧留去し、¹H-NMR、MALDI-TOF-MSで同定した。その結果、分子Oが得られ、収量は8 mgであり収率は4%であった。

[0080] 以上で合成した2置換コルチゾール誘導体を用いて、実施例1〜実施例3の方法で、分子錶型ポリマーを合成し、またラベル化コルチゾールを利用し、コルチゾールの検出を実施した。蛍光スペクトルの変化から、本実施例4を利用したM10が、1 μmol/Lのコルチゾールを検出できることを確認した。また、10 μmol/Lのコルチゾールに対して同様に検出できる

ことを確認した。

[0081] 以上、本発明を実施するための形態について説明した。分子錶型ポリマーは、生体高分子である抗体のような選択性、捕捉性を有しながら、非天然合成物であるため、環境耐性や温度耐性に優れている。したがって、ユーザが保管等に神経質にならずとも使える長所がある。したがって、ユーザとして想定される、医療関係者（医者、臨床検査技師、看護師）をはじめ、家庭の一般消費者においても使い勝手の良いケミカルセンサを提供できる。特に、ストレス疾患と密接に関わるコルチゾール等のステロイドホルモンを高感度に検出することで、ストレス疾患の予兆を早期に診断し、予防と早期治療に貢献することができる。

[0082] なお、本発明は上記した実施形態に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、ある実施形態の構成の一部を他の実施形態の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実施形態の構成に他の実施形態の構成を加えることが可能である。また、各実施形態の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

符号の説明

- [0083] 1 化学物質検出装置
- 10 分子捕捉部
 - 101 捕捉体
 - 102 支持体
 - 103 分子錶型ポリマー
 - 104 分子錶型ポリマー
 - 11 捕捉量計測部
 - 111 矢印
 - 112 矢印
 - 14 試料注入部
 - 15 試料搬送部
 - 16 排出部

- 17 検体
- 170 ターゲット
- 171 夾雑物 A
- 172 夾雑物 B
- 20 ターゲット
- 201 モノマー原料 A
- 202 モノマー原料 B
- 203 モノマー原料 C
- 21 認識部位
- 22 分子錶型ポリマー
- 25 微粒子
- 26 分子錶型ポリマー
- 261 認識部位
- 27 微粒子
- 28 分子錶型ポリマー
- 501 点線
- 502 点線
- 6 試料チャンバ
- 7 液体流路部
- 8 流入ポート
- 80 分子錶型ポリマー
- 82 検体
- 83 標識化ターゲット
- 820 ターゲット
- 821 夾雑物 A
- 822 夾雑物 B
- 832 ターゲット部分
- 831 標識部分

- 8 4 容器
- 9 流出ポート9
- 9 0 捕捉検出部
- 9 1 試料注入部
- 9 2 前処理層
- 9 3 検体
- 9 3 0 ターゲット
- 9 3 1 夾雑物 A
- 9 3 2 夾雑物 B
- 9 3 3 矢印
- 9 5 0 実線
- 9 5 1 破線
- 9 6 0 実線
- 9 6 1 破線

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] ステロイドホルモンの分子錶型ポリマー微粒子であって、前記ステロイドホルモンと相互作用するポリマーからなる分子錶型ポリマー微粒子。
- [請求項2] 前記ポリマーが、重合単位内に前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基を2つ以上有する請求項1に記載の分子錶型ポリマー微粒子。
- [請求項3] 前記重合単位内に、前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基として2つ以上のカルボキシル基を有する請求項2に記載の分子錶型ポリマー微粒子。
- [請求項4] 前記ステロイドホルモンが、コルチゾール又はその誘導体であり、前記ポリマーが、イタコン酸を重合単位として含む請求項3に記載の分子錶型ポリマー微粒子。
- [請求項5] ステロイドホルモンと相互作用するモノマーの重合反応を前記ステロイドホルモンと微粒子の存在下で行う工程と、
前記重合反応によって得られたポリマーを洗浄して、前記ポリマーから前記ステロイドホルモンを除去する工程と、
を含む分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。
- [請求項6] 前記モノマーが、前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基を2つ以上有するモノマーを含む請求項5に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。
- [請求項7] 前記モノマーが、前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基として2つ以上のカルボキシル基を有する請求項6に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。
- [請求項8] 前記モノマーが、前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基を有する2種類以上のモノマーを含む請求項5に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。
- [請求項9] 前記ステロイドホルモンが、前記モノマーと共重合反応する官能基

を有する請求項 5 に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。

[請求項10] 前記官能基が、メタクリロイル基である請求項 9 に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。

[請求項11] 前記モノマーが、前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基を 2 つ以上有するモノマーを含む請求項 9 又は 10 に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。

[請求項12] 前記モノマーが、前記ステロイドホルモンと相互作用する官能基として 2 つ以上のカルボキシル基を有する請求項 11 に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。

[請求項13] 前記ステロイドホルモンが、メタクリロイル化コルチゾールであり、前記モノマーが、イタコン酸である請求項 9 に記載の分子錶型ポリマー微粒子の製造方法。

[請求項14] 前記ステロイドホルモンが、コルチゾール又はその誘導体であり、前記ポリマーが、ポリスチレンを被覆する請求項 1 に記載の前記分子錶型ポリマー微粒子であつて、微粒子が真球状でかつその粒径が均一な分子錶型ポリマー微粒子。

[請求項15] 請求項 1～4 のいずれかに記載の前記分子錶型ポリマー微粒子を含む捕捉体を有する分子捕捉部と、

前記分子捕捉部に捕捉された前記ステロイドホルモンを定量する捕捉量計測部と、

を含む化学物質検出装置。

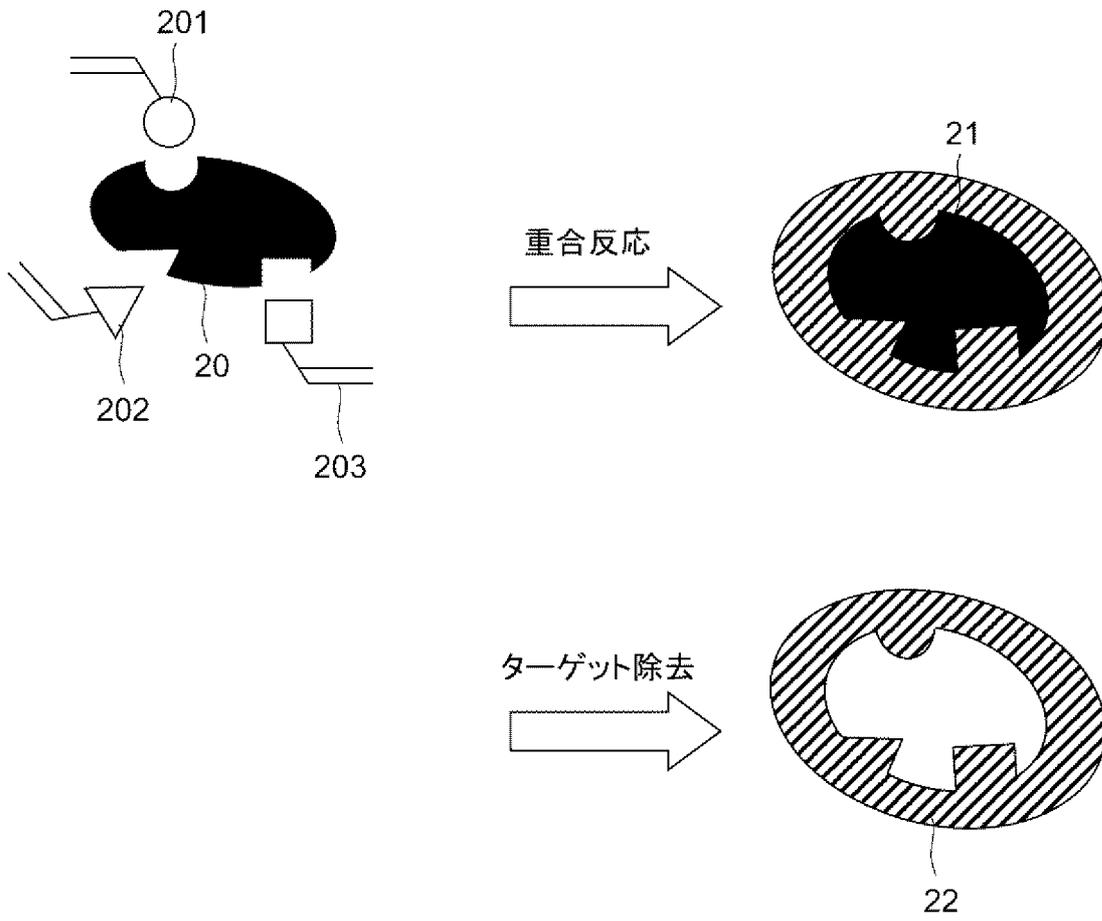
[請求項16] 前記分子捕捉部は、競合法又は置換法によって前記ステロイドホルモンの検出感度を増強するように構成されている請求項 15 に記載の化学物質検出装置。

[請求項17] 前記捕捉量計測部では、表面プラズモン共鳴測定法、水晶振動子マイクロバランス測定法、電気化学インピーダンス法、比色法又は蛍光法を用いて前記ステロイドホルモンを定量する請求項 15 又は 16 に記載の化学物質検出装置。

- [請求項 18] 請求項 1～4 のいずれかに記載の前記分子錶型ポリマー微粒子を含む捕捉体を有する分子捕捉部に、前記ステロイドホルモンを含む検体を接触させ、前記分子捕捉部に前記ステロイドホルモンを捕捉させる工程と、
- 前記分子捕捉部に捕捉された前記ステロイドホルモンを定量する工程と、
- を含む化学物質検出方法。
- [請求項 19] 前記分子捕捉部は、競合法又は置換法によって前記ステロイドホルモンの検出感度を増強するように構成されている請求項 18 に記載の化学物質検出方法。
- [請求項 20] ステロイドホルモンの分子錶型ポリマー微粒子であって、前記ステロイドホルモンと相互作用するポリマーからなる分子錶型ポリマーが微粒子の周りを被覆する構造を有するコアシェル型分子錶型ポリマー微粒子。
- [請求項 21] 蛍光分子を導入したコルチゾール誘導体及びその製造方法。
- [請求項 22] ダンシル基を導入したコルチゾール誘導体及びその製造方法。
- [請求項 23] ピレンを導入したコルチゾール誘導体及びその製造方法。
- [請求項 24] アミンを介して蛍光分子を導入したコルチゾール誘導体及びその製造方法。
- [請求項 25] 硫黄原子を介して蛍光分子を導入したコルチゾール誘導体及びその製造方法。

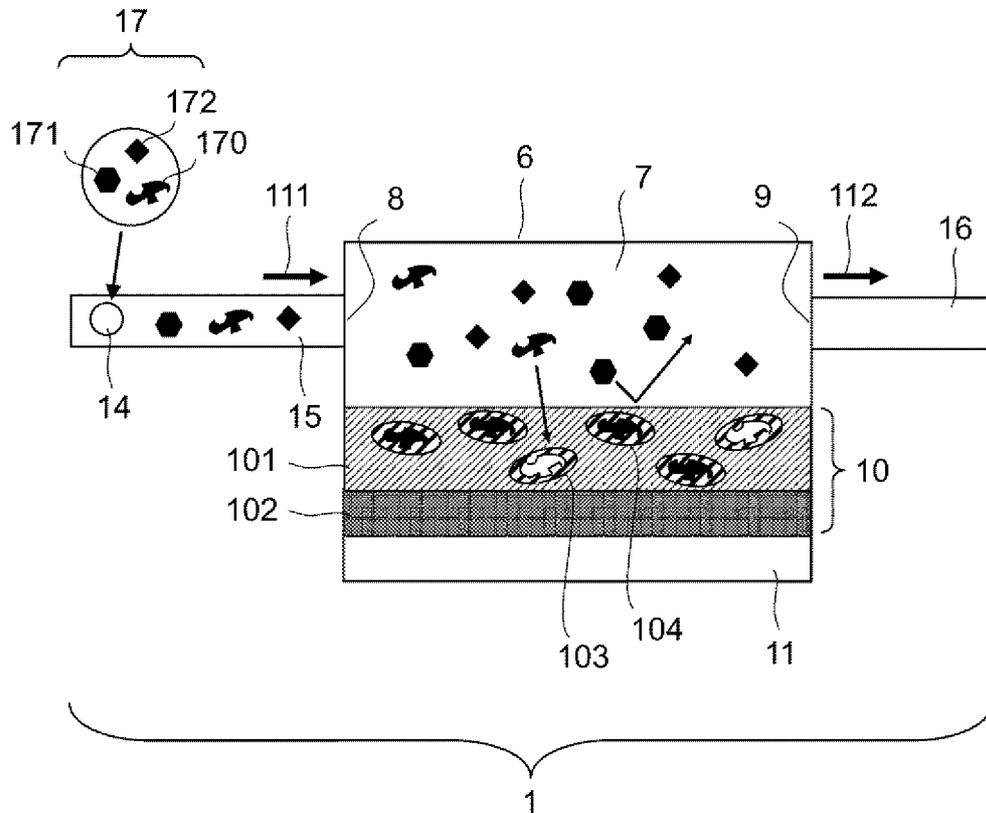
[図1]

図 1



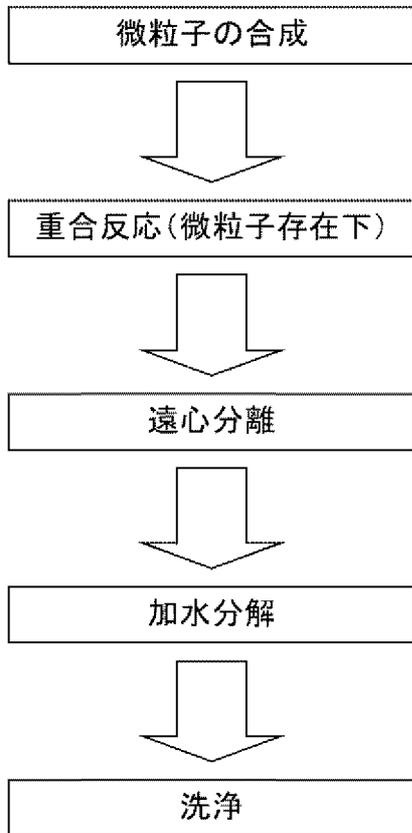
[図2]

図 2



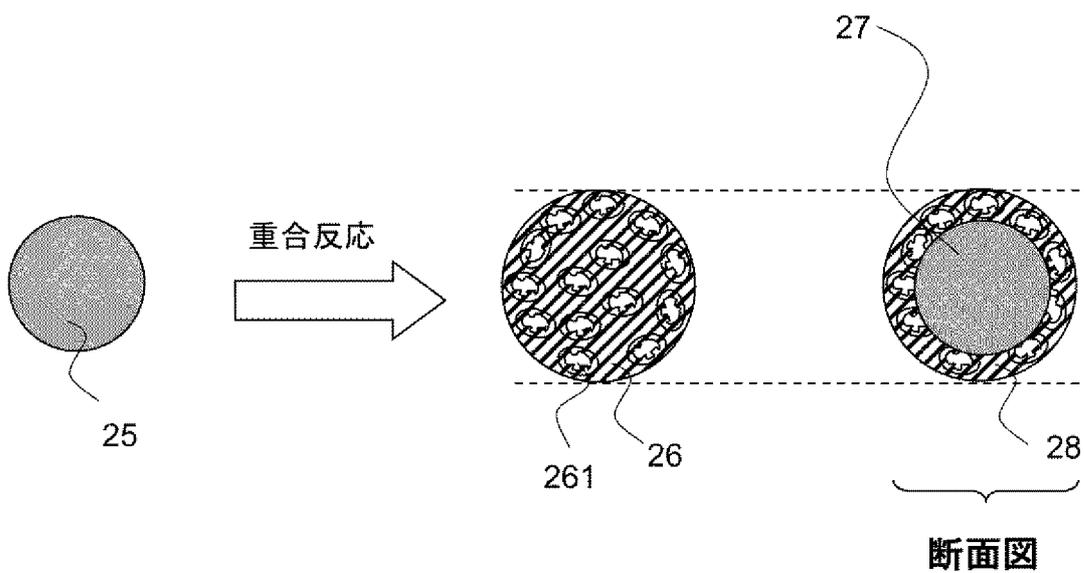
[図3A]

図3A



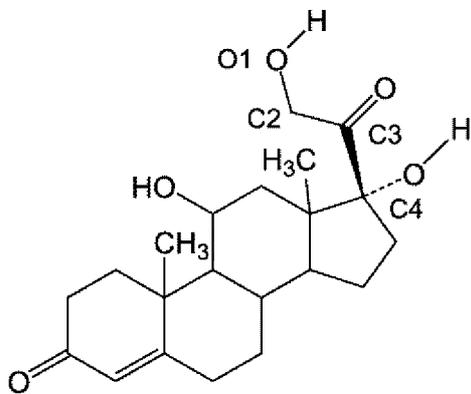
[図3B]

図3B



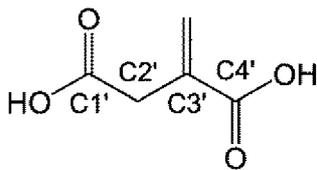
[図4A]

図 4 A



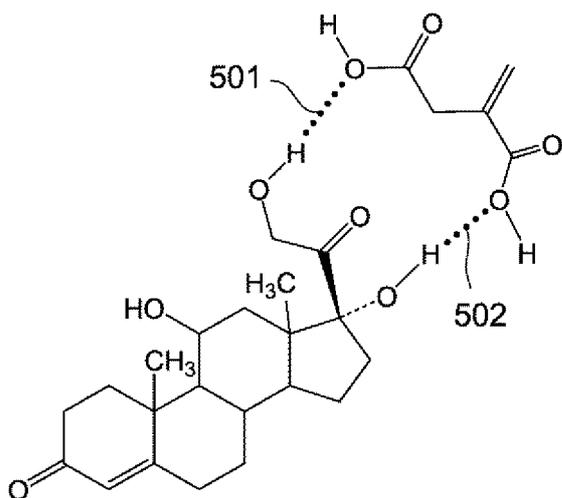
[図4B]

図 4 B



[図5]

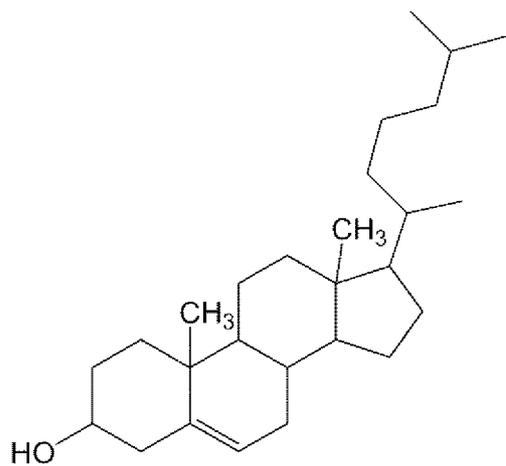
図 5



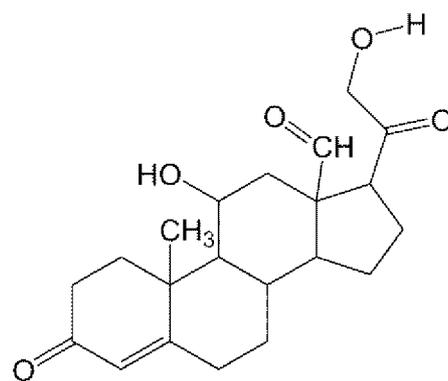
[図6]

図 6

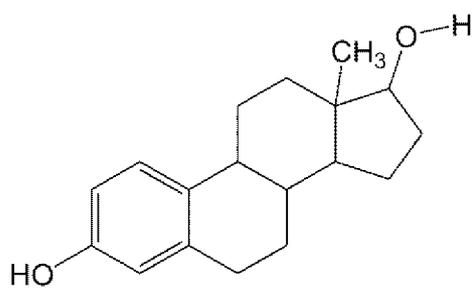
(A)



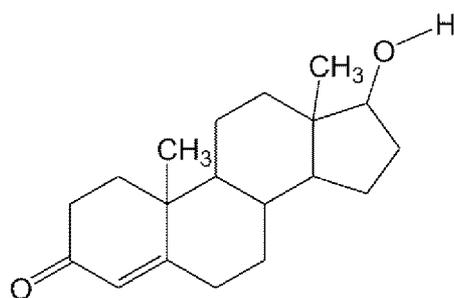
(B)



(C)

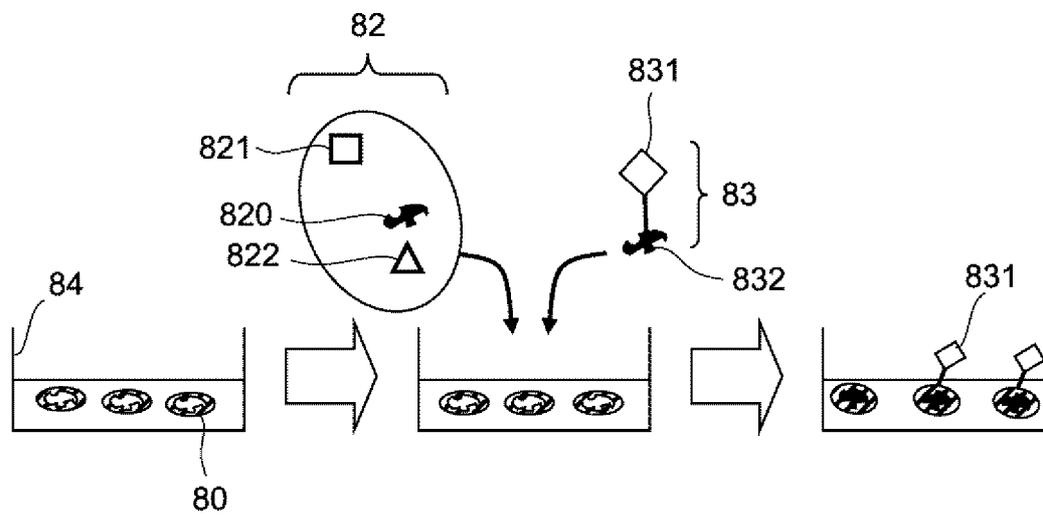


(D)



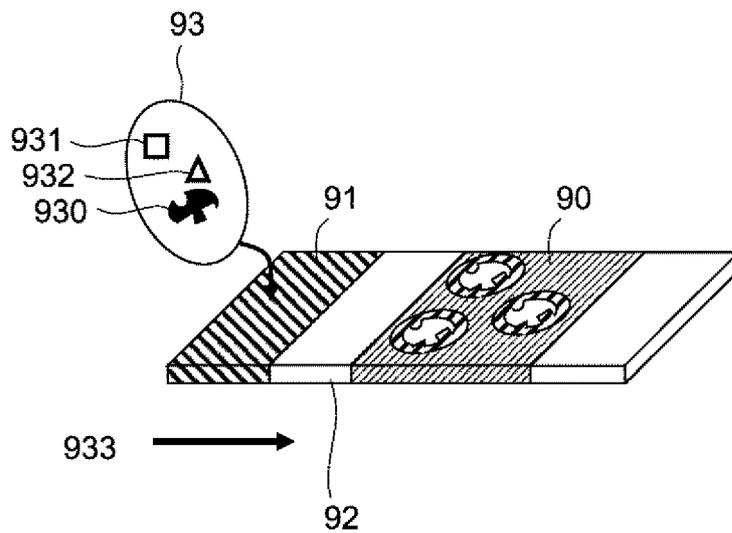
[図7]

図 7



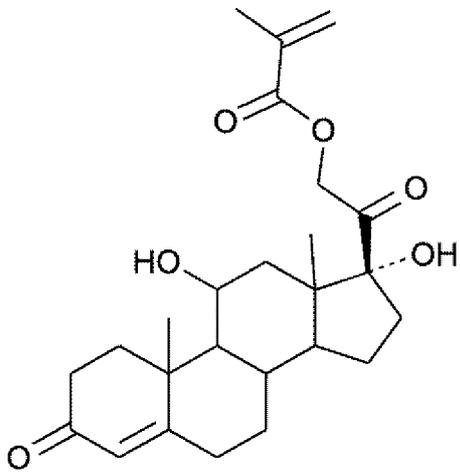
[図8]

図 8



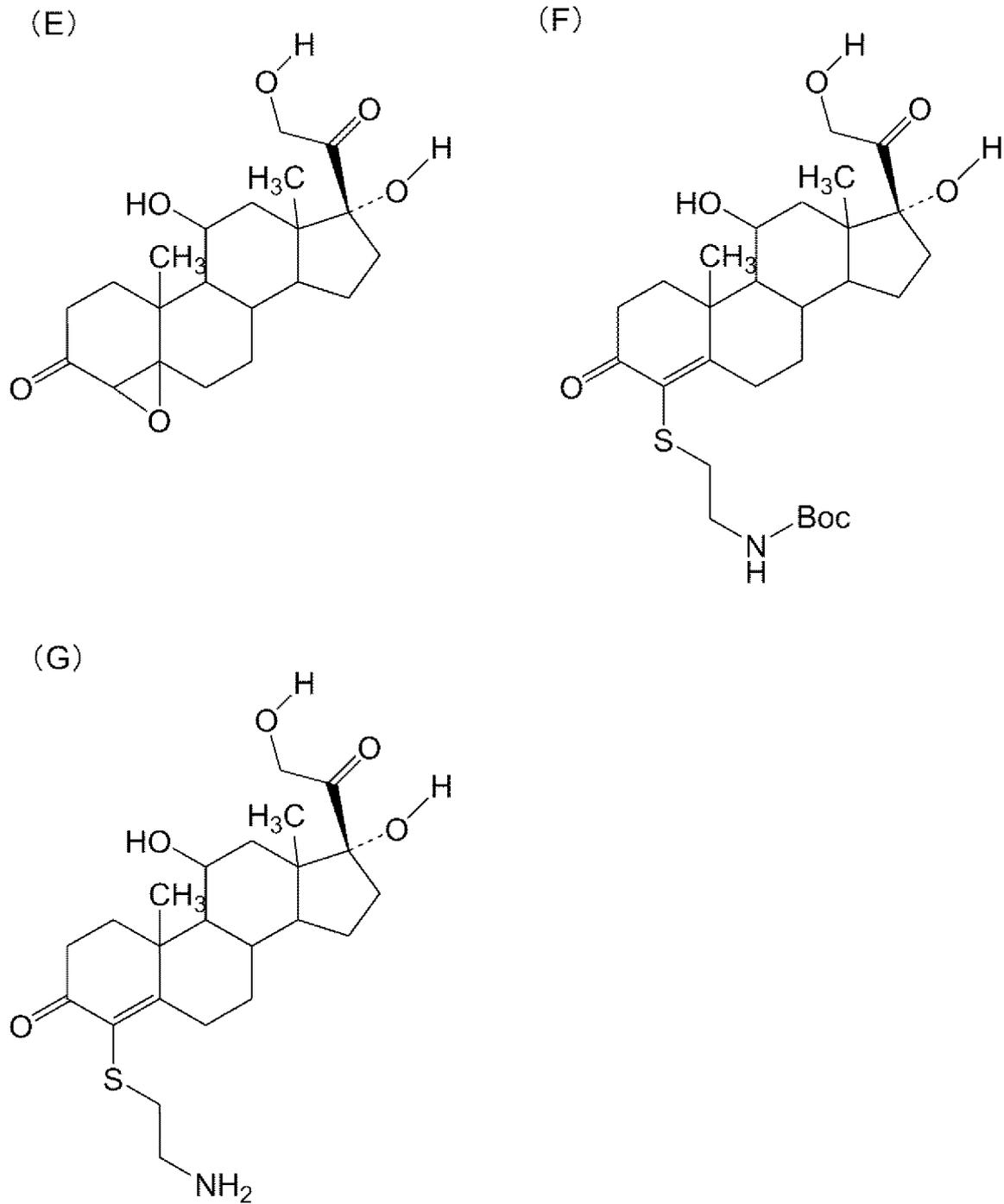
[図9]

図 9



[図10A]

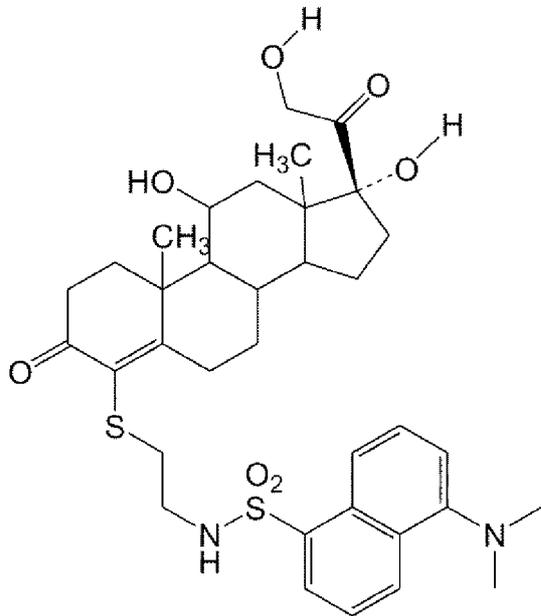
図 10 A



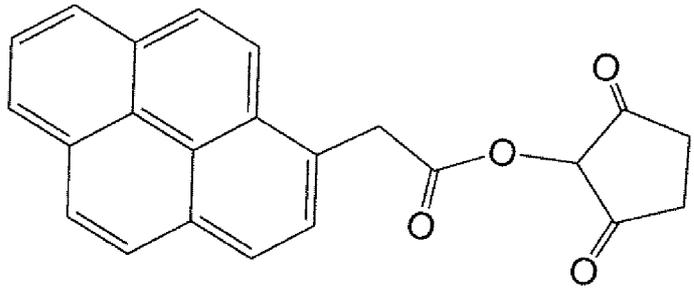
[図10B]

図 10 B

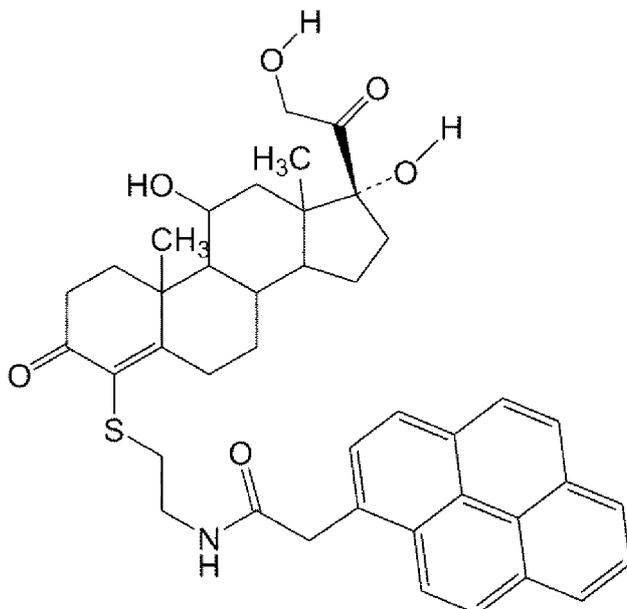
(H)



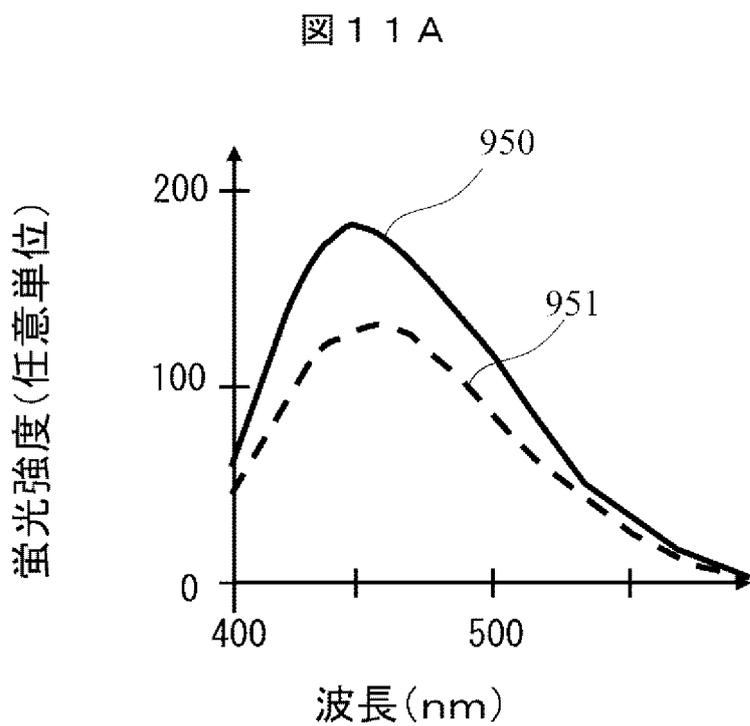
(I)



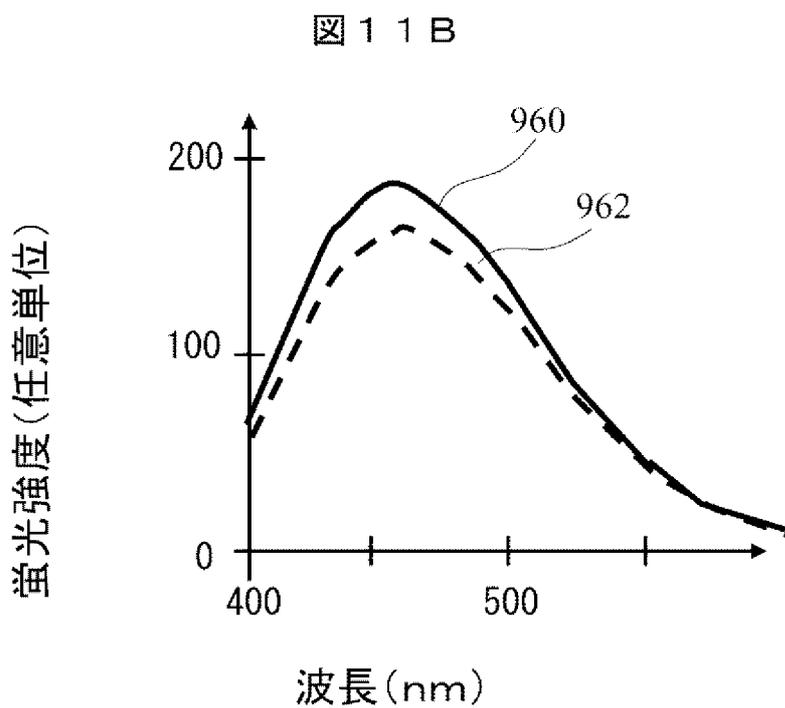
(J)



[圖11A]

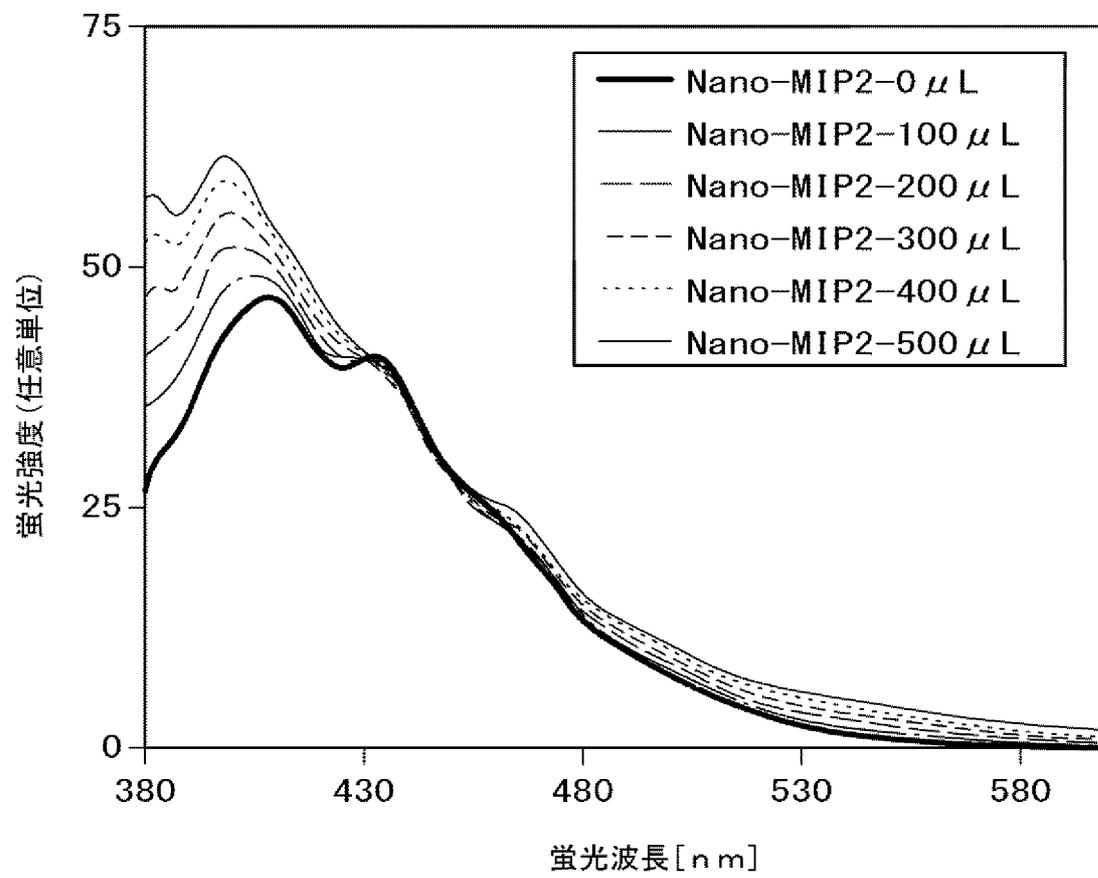


[圖11B]



[図12]

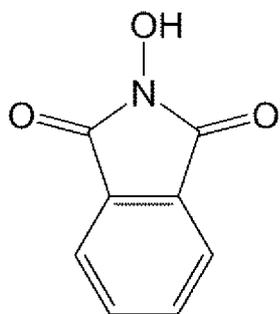
図 1 2



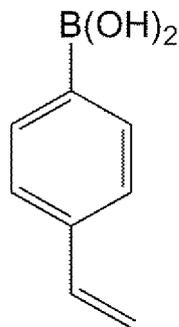
[図13A]

図 13 A

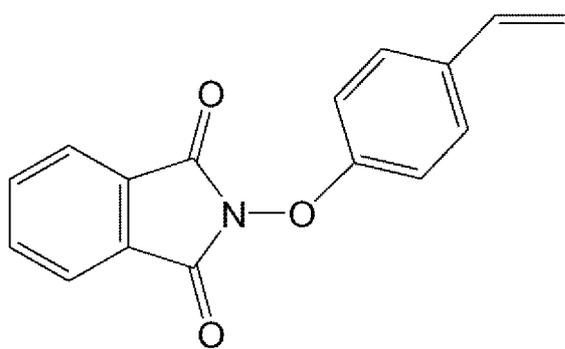
(K)



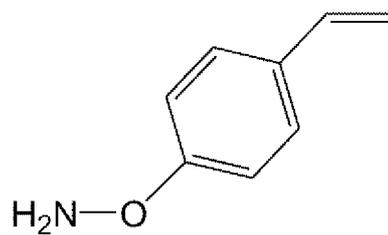
(L)



(M)



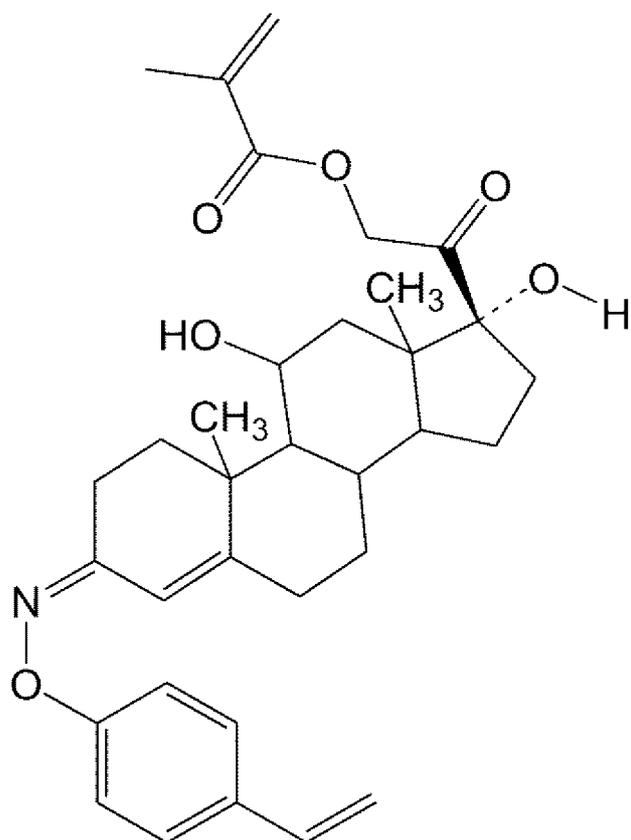
(N)



[図13B]

図 13 B

(O)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 014 / 061051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2 0 0 6 . 0 1) i , G 0 1 N 2 1 / 2 7 (2 0 0 6 . 0 1) i , G 0 1 N 2 1 / 4 1 (2 0 0 6 . 0 1) i , G 0 1 N 2 1 / 6 4 (2 0 0 6 . 0 1) i , G 0 1 N 3 3 / 5 4 3 (2 0 0 6 . 0 1) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G 0 1 N 3 3 / 5 3 , G 0 1 N 2 1 / 2 7 , G 0 1 N 2 1 / 4 1 , G 0 1 N 2 1 / 6 4 , G 0 1 N 3 3 / 5 4 3

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

Jitsuyo	Shinan	Koho	1922-1996	Jitsuyo	Shinan	Toroku	Koho	1996-2014
Kokai	Jitsuyo	Shinan	1971-2014	Toroku	Jitsuyo	Shinan	Koho	1994-2014

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

JST Plus / JMEDPlus / JST 7580 (JDreaml I I)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y / A	J P 2 0 0 9 - 0 4 7 5 0 7 A (Kobe University), 0 5 March 2 0 0 9 (0 5 . 0 3 . 2 0 0 9) , paragraph [0 0 0 1] ; example 1 (Family : none)	1-20, 22-25 / 21
XY	W O 2 0 1 3 / 0 4 6 8 2 6 A I (Hitachi , Ltd -) , 0 4 April 2 0 1 3 (0 4 . 0 4 . 2 0 1 3) , claims ; paragraph [0 0 5 1] ; fig . 7 (Family : none)	21/1-20, 22-25
A	Yuki TAGUCHI et al. , " Imprint Nano Ryushio Mochita Bisphenol A no Sensing " , CSJ : The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu , 12 March 2 0 0 8 (1 2 . 0 3 . 2 0 0 8) , vol - 8 8 t h , no . 2 , page 1 5 1 9	1-25

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

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

0 8 July , 2 0 1 4 (0 8 . 0 7 . 1 4)

Date of mailing of the international search report

2 2 July , 2 0 1 4 (2 2 . 0 7 . 1 4)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 014 / 061051

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Eri TAKANO et al., "Kaga ku Shusho kuki Nano Ryushi o Mochi ita Bunshi Imprint Nano Ryushi no Bunshi Ninshi ki Kyodo no SPR Kai seki", Polymer Preprint s, Japan, 05 September 2012 (05.09.2012), vol.61, no.2, page s 2631 to 2632	1-25

<p>A . 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. G01N33/53 (2006. 01) i, G01N2 1/27 (2006. 01) i, G01N21/41 (2006. 01) i, G01N2 1/64 (2006. 01) i, G01N33/543 (2006. 01) i</p>														
<p>B . 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. G01N33/53, G01N2 1/27, G01N2 1/41, G01N21/64, G01N33/543</p>														
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1 9 2 2 -</p> <p>日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2</p> <p>日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 -</p> <p>日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2</p>														
<p>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)</p> <p>.TSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamHI) 年</p>														
<p>C . 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y/A</td> <td>JP 2009-047507 A (国立大学法人神戸大学) 2009. 03. 05, 【0001】、実施例1 (ファミリーなし)</td> <td>1-20, 22-25 /21</td> </tr> <tr> <td>X/Y</td> <td>W0 2013/046826 A1 (株式会社日立製作所) 2013. 04. 04, 特許請求の範囲、【0051】、図7 (ファミリーなし)</td> <td>21 /1-20, 22-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>田口由紀ほか, インプリントナノ粒子を用いたビスフェノールAの センシング, 日本化学会講演予稿集, 2008. 03. 12, Vol. 88th, No. 2, P. 1519</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y/A	JP 2009-047507 A (国立大学法人神戸大学) 2009. 03. 05, 【0001】、実施例1 (ファミリーなし)	1-20, 22-25 /21	X/Y	W0 2013/046826 A1 (株式会社日立製作所) 2013. 04. 04, 特許請求の範囲、【0051】、図7 (ファミリーなし)	21 /1-20, 22-25	A	田口由紀ほか, インプリントナノ粒子を用いたビスフェノールAの センシング, 日本化学会講演予稿集, 2008. 03. 12, Vol. 88th, No. 2, P. 1519	1-25
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
Y/A	JP 2009-047507 A (国立大学法人神戸大学) 2009. 03. 05, 【0001】、実施例1 (ファミリーなし)	1-20, 22-25 /21												
X/Y	W0 2013/046826 A1 (株式会社日立製作所) 2013. 04. 04, 特許請求の範囲、【0051】、図7 (ファミリーなし)	21 /1-20, 22-25												
A	田口由紀ほか, インプリントナノ粒子を用いたビスフェノールAの センシング, 日本化学会講演予稿集, 2008. 03. 12, Vol. 88th, No. 2, P. 1519	1-25												
<p><input checked="" type="checkbox"/> c 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「B」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「F」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「R」同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>0 8 . 0 7 . 2 0 1 4</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>2 2 . 0 7 . 2 0 1 4</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA / JP)</p> <p>郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>海野 佳子</p> <p>電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2</p>	<p>2 J</p> <p>3 9 0 6</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	高野恵里ほか，化学修飾金ナノ粒子を用いた分子インプリントナノ粒子の分子認識挙動のSPR解析，高分子学会予稿集，2012. 09. 05, Vol. 61, No. 2, P. 2631-2632	1-25