(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
2021年4月22日(22.04.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/075426 A1

(51) 国際特許分類:
C08G 77/442 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 21/82 (2006.01) *G01N 33/545* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/038636

(22) 国際出願日： 2020年10月13日(13.10.2020)

(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 2019-188848 2019年10月15日(15.10.2019) JP

(71) 出願人: キヤノン株式会社 (**CANON KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 金崎 健吾 (**KANAZAKI Kengo**); 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 山内 文生(**YAMAUCHI Fumio**); 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 小林 本和(**KOBAYASHI Motokazu**); 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 掛川 法重(**KAKEGAWA Norishige**); 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 名取 良(**NATORI Ryo**); 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 山本 哲士(**YAMAMOTO Tetsushi**); 〒1468501 東京都大田区下丸子３丁目３０番２号キヤノン株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 岡部 譲, 外 (**OKABE Yuzuru** et al.); 〒1070062 東京都港区南青山１－１－１新青山ビル東館８階 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, 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:** PARTICLES AND METHOD FOR PRODUCING PARTICLES

(54) 発明の名称： 粒子、及び粒子の製造方法

(57) **Abstract:** The present invention provides a method for producing particles that are capable of suppressing non-specific adsorption without using BSA. A method for producing particles, said method comprising: a first step wherein an emulsion is prepared by mixing a radically polymerizable monomer, a radically polymerizable organic silane compound that has a silicon atom to which an alkoxy group is bonded, a radical polymerization initiator, a water-soluble polymer and an aqueous medium; and a second step wherein a specific reactive compound is added after the first step.

(57) 要約： ＢＳＡを用いることなく非特異吸着を抑制できる粒子の製造方法を提供すること。 ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液を調製する第一の工程と、前記第一の工程の後に、特定の反応性化合物を加える第二の工程と、を有する粒子の製造方法。

WO 2021/075426 A1

明　細　書

発明の名称 ： 粒子、及び粒子の製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、粒子、及び粒子の製造方法に関する。

背景技術

[0002]　ポリマー粒子は基礎的な生物学や医療の分野においてその重要性が高まっている。例えばラテックス凝集法を用いた体外検査診断薬への応用に対するニーズが高まっている。

[0003]　原理的には、粒子表面に所望の抗原あるいは抗体を吸着させることができれば、ラテックス凝集反応に用いることができる。しかし、血清などの検体中には多くの夾雑物が存在しており、この夾雑物も粒子表面に吸着（非特異吸着）し、所望の抗原や抗体が粒子表面へ吸着することを阻害する。また、粒子に吸着した夾雑物を介して粒子同士が凝集すると、測定精度の低下がおこる。そこで、粒子に所望の抗体を吸着させた後に、牛血清アルブミン（ＢＳＡ（Ｂｏｖｉｎｅ　ｓｅｒｕｍ　ａｌｂｕｍｉｎ））で粒子表面を被覆することで、粒子表面への夾雑物の吸着（非特異吸着）を抑制する方法がある（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２００４－１５１０００号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　例えば特許文献１に記載されているようなＢＳＡで粒子表面を被覆する方法では、夾雑物の吸着を十分に抑えられるときと抑えられないときがあった。そのため、ラテックス凝集法にＢＳＡで被覆した粒子を用いると、再現性が低下するという問題点があった。

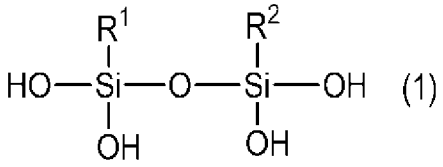
[0006]　そこで本発明は、ＢＳＡを用いることなく非特異吸着を抑制できる粒子及

びその製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明の一態様に係る粒子の製造方法は、ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液を調製する第一の工程と、前記第一の工程の後に、反応性化合物を加える第二の工程と、を有し、前記反応性化合物が、下記式（１）で表される、粒子の製造方法である。

[化1]



(1)

[0008] 式（１）においてR^1及びR^2は、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。

[0009] また、本発明の別の態様に係る粒子は、ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液を調製する第一の工程と、前記第一の工程の後に、反応性化合物を加える第二の工程と、によって製造される粒子であって、前記反応性化合物が、上記式（１）で表される、粒子である。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、ＢＳＡを用いることなく非特異吸着を抑制できる粒子及びその製造方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

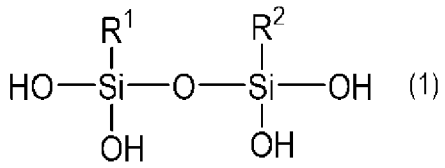
[0011] 以下、本発明の実施形態について、詳細に説明するが、本発明はこれらに

限られない。

（粒子、及び粒子の製造方法）

本実施形態に係る粒子の製造方法は、ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液を調製する第一の工程と、前記第一の工程の後に、反応性化合物を加える第二の工程と、を有し、前記反応性化合物が、下記式（１）で表される。

[化2]



(1)

[0012] 式（１）においてＲ[1]及びＲ[2]はそれぞれ、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。

[0013] なお、本実施形態に係る製造方法によって製造される粒子を以下では、ポリマー微粒子と呼ぶことがある。本実施形態に係る粒子の製造方法によって製造される粒子は、有機シラン化合物に由来するシリカ（シラノール基）の存在により、粒子表面の親水性が高いため、ＢＳＡを用いることなく、非特異吸着を抑制できる。また、ＢＳＡは天然物であるため、ロットごとに親水性と疎水性の程度が異なっていると推測されるが、本実施形態に係る粒子の製造方法によって製造される粒子は、ＢＳＡを用いていないので、粒子毎の非特異吸着の抑制能力の差が小さい。言い換えると、粒子を製造する上で、製造される粒子の非特異吸着の抑制能力の再現性が高い。

[0014] 第一の工程の後に、第二の工程として反応性化合物を加えることで次の利点を有する。まず、第一の工程において調製される粒子のコアの均一性が向上する効果が期待できる。また、第一の工程を経て得られた粒子の表面における、反応性化合物の反応性が向上する効果が期待できる。

[0015] 第二の工程では１つ以上の界面活性剤を添加してもよい。界面活性剤を添加することでポリマー微粒子の分散性を向上させることができる。

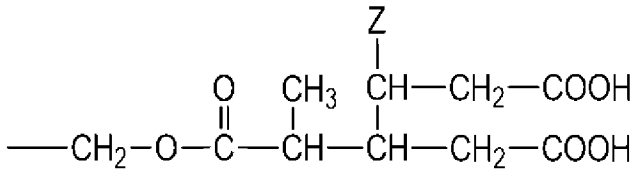
[0016] 前記式（１）におけるR^1及びR^2のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基を有することが好ましい。

[0017] また、本実施形態に係る粒子の製造方法は、前記第一の工程の後に前記乳濁液を加熱する工程をさらに有することが好ましい。

[0018] 第一の工程では、一つの分子内に二重結合を２つ以上有するモノマー、例えばジビニルベンゼンを架橋剤としてさらに用いてもよい。

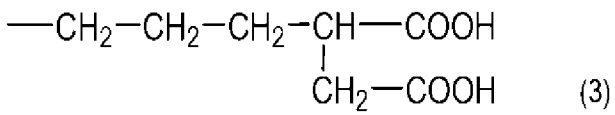
[0019] 前記式（１）におけるR^1及びR^2のうち少なくとも一つは下記式（２）で示される構造または式（３）で示される構造を有することが好ましい。

[化3]



(2)

[化4]



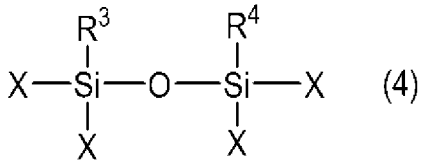
(3)

[0020] 式（２）においてＺは、直鎖または分岐の炭素数１以上１０以下の飽和または不飽和アルキル基を表す。

[0021] また、本実施形態に係る粒子は、ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液（混合液）を調製する第一の工程と、前記第一の工程の後に、反応性化合物を加える第二の工程と、によって製造される粒子であって、前記反応性化合物が、上記式（１）で表される粒子である。

[0022] 本実施形態に係る粒子は、上記の本実施形態に係る粒子の製造方法によって製造される粒子である。すなわち、本実施形態に係る粒子は、下記式（４）で示される構造単位を一つ以上有することが好ましい。

[化5]



[0023] 式（４）においてＸは、Ｏを介した隣り合う式（４）で示される構造が有するＳｉとの結合手、前記乳濁液より調製される前記粒子のコアとの結合手、またはヒドロキシ基を表し、式（４）で示される構造単位の少なくとも一つは、前記コアとの結合を有する。

[0024] Ｒ[3]及びＲ[4]のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。

[0025] また、前記式（４）におけるＲ[3]及びＲ[4]はそれぞれのうち少なくとも一つは上記式（２）で示される構造または上記式（３）で示される構造を有することが好ましく、Ｒ[3]及びＲ[4]はそれぞれのうち少なくとも一つは上記式（３）で示される構造を有することがより好ましい。

[0026] （ラジカル重合性モノマー）

ラジカル重合性モノマーは、ケイ素原子を含まないモノマーであるものを用いることができる。

[0027] また、ラジカル重合性モノマーは、スチレン系モノマー、アクリレート系モノマー、メタクリレート系モノマーからなる群より選択される少なくとも一つを用いることができる。ラジカル重合性モノマーとしては、具体的には、例えば、スチレン、ブタジエン、酢酸ビニル、塩化ビニル、アクリロニトリル、メタクリル酸メチル、メタクリロニトリル、アクリル酸メチルからなる群より選択される少なくとも一つを用いることができる。すなわち、これらの中から、単独であるいは複数種組み合わせて使用できる。

[0028] さらに本実施形態に係るラジカル重合性モノマーは、前記スチレン系モノマー、アクリレート系モノマー、メタクリレート系モノマーのそれぞれと相

溶性が高く、かつ、親水性の高い官能基を有するモノマーを単独であるいは複数種組み合わせて使用できる。例えば、スチレンと相溶性が高く、親水性の高い官能基としてスルホン酸基を有するスチレンスルホン酸系モノマー（パラスチレンスルホン酸ナトリウムなど）を使用することができる。

[0029] 本実施形態に係る粒子の製造方法の前記第一の工程において、さらにパラスチレンスルホン酸塩を混合して前記乳濁液を調製することで、粒子の粒径を小さくし、粒径の均一性を高める効果を得ることができる。これは、ラジカル重合性モノマー及び有機シラン化合物の重合反応時に、パラスチレンスルホン酸も共重合され、粒子の親水性及び分散性が向上することが要因の一つである。

[0030] （有機シラン化合物）

有機シラン化合物としては、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、ｐ－スチリルトリメトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、３－アクリロキシプロピルトリメトキシシランからなる群より選択される少なくとも一つを用いることができる。すなわち、これらの中から、単独であるいは複数種組み合わせて使用してもよい。

[0031] （ラジカル重合開始剤）

ラジカル重合開始剤としては、アゾ化合物、有機過酸化物などから広く使用することができる。具体的には、２，２’－アゾビス（イソブチロニトリル）、２，２’－アゾビス（２，４－ジメチルバレロニトリル）、２，２’－アゾビス（２－メチルブチロニトリル）、４，４’－アゾビス（４－シアノ吉草酸）、２，２’－アゾビス（２－メチルプロピオンアミジン）二塩酸塩、２，２’－アゾビス（２－メチルプロピオン酸）ジメチル、ｔｅｒｔ－ブチルヒドロペルオキシド、過酸化ベンゾイル、過硫酸アンモニウム（ＡＰＳ）、過硫酸ナトリウム（ＮＰＳ）、過硫酸カリウム（ＫＰＳ）などをあげ

ることができる。

[0032] （水溶性ポリマー）

水溶性ポリマーは、ポリマー微粒子の合成時に保護コロイドとして働き、生成されるポリマー微粒子の粒径の制御に寄与する。好ましい水溶性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリビニルピロリドン－ポリアクリル酸共重合体からなる群より選択される少なくとも一つを用いることができる。すなわち、これらの中から１種あるいは複数種組み合わせて用いて構わない。ポリビニルピロリドン－ポリアクリル酸共重合体は、ピロリドン環及びリガンドを結合できる官能基を含有する重合体の一例であり、水溶性ポリマーとしてはピロリドン環及びリガンドを結合できる官能基を含有する共重合体を用いても良い。

[0033] 水溶性ポリマーの分子量は、１００００以上１０００００００以下が好ましく、３００００以上７００００以下がさらに好ましい。分子量が１００００以上であれば保護コロイドとしての効果を高く得られ、分子量が１０００００００以下であれば水系媒体の粘度が上昇し扱いにくくなることがないからである。また、これら水溶性ポリマーは、その一部が合成後の粒子表面に物理吸着、化学吸着などで密着していても構わない。

[0034] 以下、ピロリドン環及びリガンドを結合できる官能基を含有する共重合体を、ＰＶＰ共重合体と略す。ＰＶＰ共重合体における、ピロリドン環を有する部位とリガンドを結合できる官能基を有する部位とのモル比は２：８～９：１程度が好ましい。抗体等のリガンドを結合できる官能基が少なすぎても抗原抗体反応の効率が下がり、多すぎても非特異吸着の抑制性能が下がる。ＰＶＰ共重合体におけるリガンドを結合できる官能基は、抗体、抗原、酵素などを結合できる官能基であれば特に限定はないが、カルボキシ基、アミノ基、チオール基、エポキシ基、マレイミド基、スクシニミジル基、シリコンアルコキシド基などが用いられる。ＰＶＰ共重合体は、ランダムポリマーでもブロックコポリマーでも構わない。

[0035] 粒子の合成時から前記ＰＶＰ共重合体を投入することにより、粒子に非特異吸着抑制能と、リガンド結合能を一度に付与することが可能となる。さらに、有機シランを含むラジカル重合性モノマー（もしくはオリゴマー）を用いて粒子を合成した場合、粒子の表面にシラノール基を付与することができる。シラノール基とＰＶＰとの水素結合により、ＰＶＰまたはＰＶＰ共重合体はより強固に粒子表面に吸着することができる。

[0036] ＰＶＰ重合体の一例であるポリビニルピロリドン－ポリアクリル酸共重合体の例としては、Ｎ－ビニル－２－ピロリドンとアクリル酸のランダム共重合体（ポリマーソース社製）を挙げることができる。Ｎ－ビニル－２－ピロリドンとアクリル酸のランダム共重合体（ポリマーソース社製）としては、分子量６００００、７００００、７９０００などから好適なものを選択できる。また、同様に、Ｎ－ビニル－２－ピロリドンの分子数：アクリル酸の分子数の比は、４：６、３．１：６．９、２：８などから好適なものを選択できる。

[0037] （水系媒体）

水系媒体は、水の含有割合が８０質量％以上１００質量％以下であることが好ましい。水系媒体は、水や、水に可溶な有機溶媒、たとえばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトンを水に混合した溶液が例示される。水以外の有機溶媒を２０質量％より多く含有させると、ポリマー微粒子製造時に重合性モノマーの溶解が生じるおそれがある。

[0038] また上記水系媒体は、ｐＨが６以上９以下であることが好ましい。ｐＨが６以上９以下であれば、有機シラン化合物中のアルコキシド基、シラノール基がポリマー微粒子の形成前に縮重合や他の官能基と反応することが無く、得られる粒子が凝集するおそれがない。本実施形態においては、ポリマー微粒子の形成前にアルコキシドを意図的に縮重合することは行わない。

[0039] 水系媒体のｐＨの調整は、ｐＨ緩衝剤を用いて調整することが好ましいが、酸、塩基で調整しても構わない。

[0040] 水系媒体には、界面活性剤、消泡剤、塩、増粘剤などを水系媒体に対して

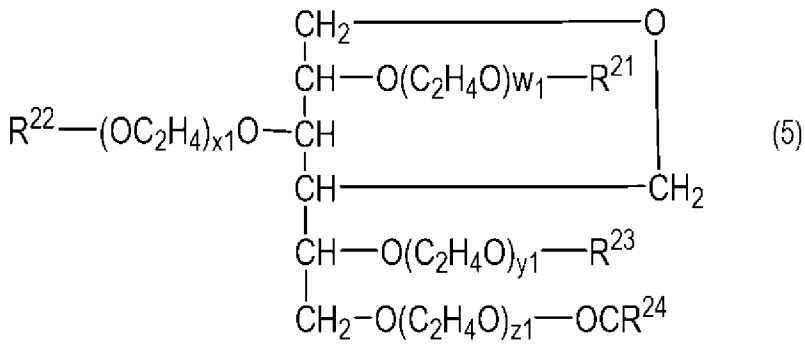
１０質量％以下の割合で添加して用いても構わない。

[0041] （界面活性剤）

第二の工程で添加する界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、高分子界面活性剤またはリン脂質等を使用することができる。これらの界面活性剤は、１種類のみを用いてもよいし、２種類以上を組み合わせて用いてもよい。

[0042] 非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン系脂肪酸エステル（例、式（５）で示される化合物）、Ｂｒｉｊ（登録商標）３５、Ｂｒｉｊ（登録商標）５８、Ｂｒｉｊ（登録商標）７６、Ｂｒｉｊ（登録商標）９８、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１１４、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－３０５、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｎ－１０１、Ｎｏｎｉｄｅｔ（登録商標）Ｐ－４０、ＩＧＥＰＡＬ（登録商標）ＣＯ５３０、ＩＧＥＰＡＬ（登録商標）ＣＯ６３０、ＩＧＥＰＡＬ（登録商標）ＣＯ７２０並びにＩＧＥＰＡＬ（登録商標）ＣＯ７３０等を挙げることができる。

[化6]



(5)

[0043] 式（５）において、Ｒ^{21}～Ｒ^{24}はそれぞれ独立に、－Ｈ、－ＯＣＲ’から選択される。前記Ｒ’は炭素数１以上１８以下の、飽和または不飽和アルキル基である。また、式（５）において、ｗ１、ｘ１、ｙ１、ｚ１は、ｗ１とｘ１とｙ１とｚ１との総和が１０以上３０以下となる整数である。

[0044] 式（５）で示されるポリオキシエチレンソルビタン系脂肪酸エステルとしては、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）４０、Ｔｗｅ

ｅｎ（登録商標）６０、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０及びＴｗｅｅｎ（登録商標）８５等を挙げることができる。

[0045] 上記のアニオン性界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホネート、デシルベンゼンスルホネート、ウンデシルベンゼンスルホネート、トリデシルベンゼンスルホネート、ノニルベンゼンスルホネート並びにこれらのナトリウム、カリウム及びアンモニウム塩等を挙げることができる。

[0046] 上記のカチオン性界面活性剤としては、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、塩化ヘキサデシルピリジニウム、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム及び塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム等を挙げることができる。

[0047] 上記の高分子界面活性剤としては、ポリビニルアルコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール及びゼラチン等を挙げることができる。ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールの市販品としては、プルロニックＦ６８（ＢＡＳＦ社製）、プルロニックＦ１２７（ＢＡＳＦ社製）などが挙げられる。

[0048] （本実施形態に係る粒子の製造方法の詳細）

本実施形態に係る粒子の製造方法において、第一の工程では、まずｐＨが６以上９以下に調整された水系媒体に水溶性ポリマーを溶解する。水溶性ポリマー濃度は水系媒体に対して０．０１質量％以上２０質量％以下、好ましくは、０．０３質量％以上１５質量％以下である。０．０１質量％以上であれば粒径を制御する効果を十分に得られる。また２０質量％以下であれば水系媒体の粘度が上昇せず、撹拌を十分に行うことができる。

[0049] 続いて、ケイ素原子を含まないラジカル重合性モノマー（Ａ）とケイ素原子にアルコキシ基が結合し、さらにラジカル重合性を有する有機シラン化合物（Ｂ）を前記水系媒体中に添加し乳濁液とする。（Ａ）と（Ｂ）の質量比は、４：６から９．７：０．３である。

[0050] （Ａ）の（Ｂ）に対する質量比が４：６以上であれば、粒子全体の比重が

上がり過ぎず、粒子の沈降が顕著となるおそれがない。また、（Ａ）の（Ｂ）に対する質量比が９．７：０．３以下であれば、ケイ素原子の含有量が少なくなり過ぎず、非特異吸着を抑制する能力が低下するおそれがない。

[0051] 水系媒体と（Ａ）、（Ｂ）合計量の質量比は、５：５から９．５：０．５が好ましい。水系媒体の（Ａ）、（Ｂ）合計量に対する質量比が５：５以上であれば、生成されるポリマー微粒子の凝集が顕著となるおそれがない。また、水系媒体の（Ａ）、（Ｂ）合計量に対する質量比が９．５：０．５以下であれば、生成量が少なくなるおそれがない。

[0052] 第二の工程で加える反応性化合物、抗体を固定化するために用いることができる。

反応性化合物は、（Ａ）、（Ｂ）合計の質量に対し、０．０１質量％以上６０質量％以下の割合で用いることができる。

[0053] ラジカル重合開始剤は、水、緩衝剤などに溶解して用いる。（Ａ）、（Ｂ）合計の質量に対するラジカル重合開始剤は、０．１質量％以上１０質量％以下の割合で用いることができる。

[0054] 第一の工程の後に乳濁液を加熱する工程をさらに有する場合、乳濁液を加熱する工程は、乳濁液全体が均一に加熱されればいかなる加熱手段を用いても構わない。加熱する温度は、５０℃から９０℃、加熱時間は２時間から２４時間の間で任意に設定できる。

[0055] 第二の工程では、第一の工程の後に得られたポリマー微粒子と反応性化合物とを混合して液全体を均一に撹拌する。撹拌するときの温度は、４℃から９０℃、撹拌時間は３時間以上であれば任意に設定できる。第二の工程において上記の界面活性剤を添加してもよい。

[0056] 第一の工程では、ケイ素原子を含まないラジカル重合性モノマーと、ケイ素原子にアルコキシ基が結合し、さらにラジカル重合性を有する有機シラン化合物と、水溶性ポリマーのハイブリッド粒子が得られる。このハイブリッド粒子は、コアシェル構造を有する粒子と比較して利点を有する。ここで、例えば、コアシェル構造を有する粒子のコア粒子は、ケイ素原子を含まない

ラジカル重合性モノマーに由来するモノマー単位を含有する重合体である。また、コアシェル構造を有する粒子のシェルは、ケイ素原子にアルコキシ基が結合し、さらにラジカル重合性を有する有機シラン化合物に由来するモノマー単位を含有する重合体である。ハイブリッド粒子がコアシェル構造と比較して有する利点としては次のものが挙げられる。一つには、ハイブリッド粒子の製造においては、原料を一度に投入可能である。すなわち、コアシェル構造の場合は、コアを形成後にシェルを形成する必要があるため製造工程が煩雑になる。別の利点としては、ケイ素原子を含まないラジカル重合性モノマーと、ケイ素原子にアルコキシ基が結合しさらにラジカル重合性を有する有機シラン化合物との反応比（原料の投入比）を変えることが可能である。すなわち、得られるポリマー微粒子の組成比を簡便に制御可能である。これによって得られるポリマー微粒子の性質（比重など）を制御することが可能である。

[0057] 本実施形態に係る粒子の製造法は、第二の工程の後に、リガンドを添加する工程を有していても良い。

[0058] ポリマー微粒子の粒径は、平均粒径が５０ｎｍ以上４００ｎｍ以下であることが好ましく、１００ｎｍ以上４００ｎｍ以下であることがさらに好ましい。また、ポリマー微粒子の粒径の変動係数（ＣＶ値）が５以下であることが好ましい。

[0059] 平均粒径の測定方法は、動的光散乱法（ＤＬＳ）、レーザー回折法（ＬＤ法）、電子顕微鏡での観察などが主な測定手法であるが、本実施形態では、動的光散乱法を好ましく用いることができる。たとえば、動的光散乱法でポリマー微粒子の分散液を測定し、得られる光強度を個数分布に換算し、平均をとった値を粒径とすることができる。平均粒径が５０ｎｍ以上であれば、合成時の洗浄処理に時間を要するおそれがない。また４００ｎｍ以下であれば、保存時の沈降による凝集が顕著となるおそれがない。

[0060] 変動係数（ＣＶ値）は、ポリマー微粒子の画像を電子顕微鏡で撮影し、たとえば粒子１００個以上の直径を求め、統計処理によって変動係数（ＣＶ値

）を求めることができる。変動係数（ＣＶ値）が５以下であれば（粒径の分布幅は広過ぎない）、検体検査用粒子と抗原との反応が不安定となるおそれがない。

[0061] ポリマー微粒子の粒径は、合成時のモノマーと水系媒体の割合、水溶性ポリマーの添加量、反応温度、反応時間で制御が可能となる。

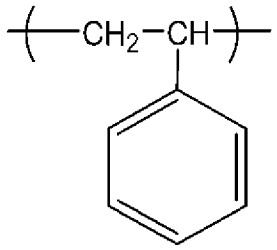
[0062] このようにして製造されたポリマー微粒子の分散液は、濾過、遠心分離によるデカンテーション、限外濾過などによって分級、及び未反応物、凝集物などを除去して精製する。

本発明に係る検査試薬の製造法は、ポリマー微粒子を分散媒に分散する工程を含む。

[0063] （本実施形態に係る粒子の詳細）

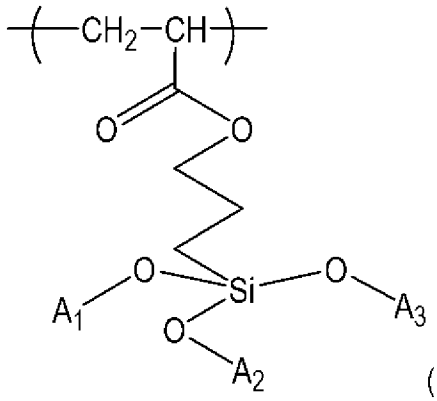
本発明の実施形態に係る粒子は、下記式（Ｉ）で表される繰り返し単位と、下記式（ＩＩ）で表される繰り返し単位とを含む共重合体、及び下記式（ＩＩＩ）で表される構造を有する粒子である。

[化7]



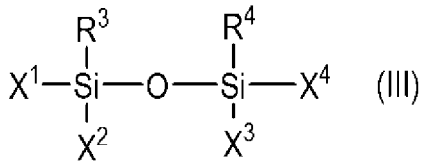
(I)

[化8]



(II)

[化9]



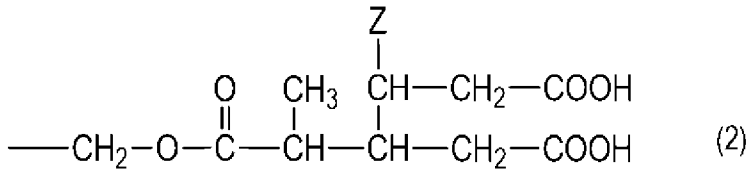
(III)

[0064] 式（ＩＩ）において、Ａ[1]乃至Ａ[3]は各々独立に、－Ｈ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$、－Ｏ－を介して式（ＩＩ）におけるＳｉと結合する結合手のいずれかである。

[0065] 式（ＩＩＩ）において、Ｘ[1]乃至Ｘ[4]は各々独立に、Ｏを介した隣り合う式（ＩＩＩ）で示される構造が有するＳｉとの結合手、式（ＩＩ）におけるＳｉに結合したＯとの結合手、またはヒドロキシ基を表し、式（ＩＩＩ）で示される構造単位の少なくとも一つは、前記共重合体との結合を有し、Ｒ[3]及びＲ[4]のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。

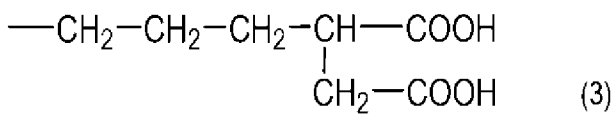
[0066] また、前記Ｒ[3]，Ｒ[4]のうち少なくとも一つは下記式（２）で示される構造または下記式（３）で示される構造を有することが好ましく、Ｒ[3]及びＲ[4]はそれぞれのうち少なくとも一つは下記式（３）で示される構造を有することがより好ましい。

[化10]



(2)

[化11]

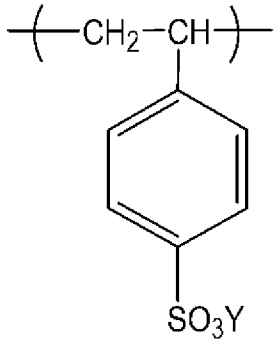


(3)

[0067] なお、上記式（Ｉ）で表される繰り返し単位と上記式（ＩＩ）で表される

繰り返し単位とを含む共重合体が、下記式（ＩＶ）で表される繰り返し単位をさらに含んでもよい。

[化12]



(IV)

[0068] 式（ＩＶ）におけるＹは、Ｈ、Ｎａ、Ｋのいずれかである。

[0069] ＜検体検査用粒子＞

ポリマー微粒子は、検体検査用の前駆体粒子である。この前駆体粒子に抗体を固定化し検体検査用の粒子として用いることができる。

[0070] 固定化の方法は、ポリマー微粒子の官能基を利用し、化学結合、物理吸着などで固定化する。本発明ではその方法は限定されない。

[0071] 抗体をポリマー微粒子に固定化した検体検査用粒子は、検体中に抗原が存在すると抗原を介して検体検査用の粒子同士が凝集し、この凝集を観察することで、抗原を検出することができる。検体中に目的の抗原が含まれていない場合、凝集は生じにくい。

[0072] （アフィニティー粒子）

本実施形態では、本実施形態に係る粒子と、反応性化合物に結合したリガンドとを有するアフィニティー粒子を提供できる。本実施形態において、リガンドとは、特定の標的物質が有する受容体に特異的に結合する化合物のことである。リガンドが標的物質と結合する部位は決まっており、選択的または特異的に高い親和性を有する。例えば、抗原と抗体、酵素タンパク質とその基質、ホルモンや神経伝達物質などのシグナル物質とその受容体、核酸などが例示されるが、本実施形態におけるリガンドはこれらに限定されない。核酸としてはデオキシリボ核酸等が挙げられる。本実施形態におけるアフィ

ニティー粒子とは、標的物質に対して選択的または特異的に高い親和性（アフィニティー）を有する。本実施形態におけるリガンドが、抗体、抗原、及び核酸のいずれかであることが好ましい。

[0073] 本実施形態において、本実施形態に係る粒子が有する反応性官能基とリガンドとを化学結合する化学反応の方法は、本発明の目的を達成可能な範囲において、従来公知の方法を適用することができる。また、リガンドをアミド結合させる場合は、１－［３－（ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド］等の触媒を適宜用いることができる。

[0074] 本実施形態におけるアフィニティー粒子が、リガンドとして抗体（抗原）、標的物質として抗原（抗体）を用いる場合、臨床検査、生化学研究等の領域において広く活用されている免疫ラテックス凝集測定法に好ましく適用できる。

[0075] （体外診断用の検査試薬）

本実施形態における体外診断用の検査試薬、すなわち体外診断による検体中の標的物質の検出に用いるための検査試薬は、本実施形態に係るアフィニティー粒子と、アフィニティー粒子を分散させる分散媒と、を有する。本実施形態における試薬中に含有される本実施形態に係るアフィニティー粒子の量は、０．００１質量％以上２０質量％以下が好ましく、０．０１質量％以上１０質量％以下がより好ましい。

[0076] 本実施形態に係る試薬は、本発明の目的を達成可能な範囲において、本実施形態に係るアフィニティー粒子の他に、溶剤やブロッキング剤などの第三物質を含んでも良い。溶剤やブロッキング剤などの第三物質は２種類以上を組み合わせて含んでも良い。

[0077] 本実施形態において用いる溶剤の例としては、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、グッド緩衝液、トリス緩衝液、アンモニア緩衝液などの各種緩衝液が例示されるが、本実施形態における試薬に含まれる溶剤はこれらに限定されない。

[0078] ラテックス凝集法による検体中の抗原または抗体の検出に用いる場合は、

リガンドは、抗体または抗原を用いることができる。

[0079] （体外診断用の検査キット）

本実施形態における体外診断による検体中の標的物質の検出に用いるための検査キットは、上記検査試薬と、上記検査試薬を内包する筐体とを有する。

[0080] 本実施形態に係るキットとしては、ラテックス凝集測定用増感剤を含有させても良い。ラテックス凝集測定用増感剤として、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアルギン酸等が挙げられるが、本発明はこれらに限定されない。

[0081] また、本実施形態に係るキットは、陽性コントロール、陰性コントロール、血清希釈液等を備えていても良い。陽性コントロール、陰性コントロールの媒体として、測定しうる標的物質が含まれていない血清、生理食塩水の他、溶剤を用いても良い。

[0082] 本実施形態に係るキットは、通常の体外診断による検体中の標的物質の検出に用いるためのキットと同様にして、本実施形態に係る標的物質の検出方法に使用できる。また、従来公知の方法によって標的物質の濃度も測定することができ、凝集法、特に、ラテックス凝集法による検体中の標的物質の検出に用いることが好適である。

[0083] （検出方法）

本実施形態における体外診断による検体中の標的物質の検出方法は、本実施形態に係る検査試薬に、標的物質を含む可能性のある検体を混合する工程を有する。

[0084] 本実施形態に係る検査試薬と検体との混合は、ｐＨ３．０からｐＨ１１．０の範囲で行われることが好ましい。また、混合温度は２０℃から５０℃の範囲であり、混合時間は１分から２０分の範囲である。また、本検出方法は、溶剤を使用することが好ましい。また、本実施形態に係る検出方法における本実施形態に係るアフィニティー粒子の濃度は、反応系中、好ましくは０．００１質量％以上５質量％以下、より好ましくは０．０１質量％以上１質

量％以下である。

[0085] 本実施形態に係る検出方法は、本実施形態に係るアフィニティー粒子と検体との混合の結果として生じる凝集反応を光学的に検出すること、すなわちラテックス凝集法により検体中の標的物質を検出することが好ましい。具体的には、本実施形態に係る検査試薬に、検体を混合して混合液を得る工程と、混合液に、光を照射する工程と、混合液に照射された光の、透過光または散乱光の少なくともいずれかを検出する工程を有することが好ましい。

[0086] 混合液において生じる上記凝集反応を光学的に検出することで、検体中の標的物質が検出され、さらに標的物質の濃度も測定することができる。前記凝集反応を光学的に検出する方法としては、散乱光強度、透過光強度、吸光度等を検出可能な光学機器を用いて、これらの値の変化量を測定すれば良い。

実施例

[0087] 以下、実施例、比較例及び参考例を用いて本発明をより具体的に説明する。

ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0088] （ＰＳＳ－１の調製）

２００ｍＬのフラスコにリン酸塩緩衝液（キシダ化学社製、ｐＨ７．４）を９０ｇ入れ、これにポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）０．９ｇを溶かした。次に３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（商品名：ＬＳ－３３８０、信越化学工業社製）３．０ｇ、スチレン（キシダ化学社製）９．０ｇを添加し、室温で窒素を吹き込みながら撹拌を１０分間行った。その後オイルバスでフラスコ内の乳濁液を７０℃に加熱した。ペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）０．３ｇをリン酸塩緩衝液（キシダ化学社製、ｐＨ７．４）１５ｍＬに溶かした溶液を、前記７０℃に加熱した乳濁液中に添加した。７０℃のまま７時間撹拌した後、室温に戻し、ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の分散液を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－１とした。

[0089] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳ－１の平均粒径を評価したところ、２５３ｎｍであった。また、ＰＳＳ－１の粒径の変動係数は１．５であった。

[0090] 得られたＰＳＳ－１をエポキシ樹脂に分散させて硬化させた後、ミクロトームにて薄片化し透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）観察及び走査透過型電子顕微鏡－エネルギー分散型Ｘ線分析（ＳＴＥＭ－ＥＤＳ元素分析）を実施した。薄片化した粒子の断面について、粒子外側と中心部の元素分析を実施した結果、炭素、酸素、ケイ素が検出された。炭素に対するケイ素の検出量に大きな違いはなかったことから、粒子内におけるケイ素の分布に大きな偏りはないと考えられた。

[0091] さらに、ＰＳＳ－１の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳ－１を回収し、上澄みは捨てた。回収したＰＳＳ－１は、イオン交換水中に再分散した後、再度遠心分離器にかけた。遠心分離器によるＰＳＳ－１の回収とイオン交換水による再分散を４回繰り返した。

[0092] このようにして得られたＰＳＳ－１の分散液を、粒子の濃度が０．５質量％、粒子分散液の体積２００ｍＬとなるよう調整した。

[0093] （ＰＳＳ－２の調製）

５０ｍＭの２－モルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ、東京化成工業社製）緩衝液（ｐＨ７．０）を１５７ｇと、ポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）を１．３ｇとを混合した。次に３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（信越化学工業社製　ＬＳ－３３８０）を４ｇ、スチレン（キシダ化学社製）を１３ｇ添加し、室温で窒素を吹き込みながら撹拌を１０分間行った。その後オイルバスでフラスコ内の乳濁液を７０℃に加熱した。０．５ｇのペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）をイオン交換水に溶かし、得られた溶液を、前記７０℃に加熱した乳濁液中に添加した。７０℃のまま７時間撹拌した後、加温を停止して一晩撹拌し、ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の分散液を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－２とした。

[0094] さらに、ＰＳＳ－２の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳ－２を回収し、

上澄みは捨てた。回収したＰＳＳ－２を、イオン交換水中に再分散した後、遠心分離器にかける操作を複数回繰り返すことで洗浄した。

[0095] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、このようにして得られたＰＳＳ－２の平均粒径を評価したところ、２０３ｎｍであった。

[0096] （ＰＳＳ－３の調製）

以下の材料を混合した。

・５０ｍＭリン酸塩緩衝液（キシダ化学社製、ｐＨ７．４）：１５７ｇ

・ポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）：０．４３ｇ

・Ｎ－ビニル－２－ピロリドンとアクリル酸のランダム共重合体（ポリマーソース社製、分子量６００００、Ｎ－ビニル－２－ピロリドンの分子数：アクリル酸の分子数の比＝４：６、以下ＰＶＰ－ＰＡＡと略す）：０．８７ｇ

[0097] 次に３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（商品名：ＬＳ－３３８０、信越化学工業社製）を４ｇ、及びスチレン（キシダ化学社製）１３ｇを添加し、室温で窒素を吹き込みながら撹拌を１０分間行った。その後オイルバスでフラスコ内の乳濁液を７０℃に加熱した。０．５ｇのペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）をイオン交換水に溶かし、得られた溶液を、前記７０℃に加熱した乳濁液中に添加した。７０℃のまま７時間撹拌した後、加温を停止して一晩撹拌し、ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の分散液を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－３とした。

[0098] さらに、ＰＳＳ－３の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳ－３を回収し、上澄みは捨てた。回収したＰＳＳ－３を、イオン交換水中に再分散した後、遠心分離器にかける操作を複数回繰り返すことで洗浄した。

[0099] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、このようにして得られたＰＳＳ－３の平均粒径を評価したところ、３０１ｎｍであった。

[0100] （ＰＳＳ－４の調製）

以下の材料を混合した。

・２５ｍＭ ２－モルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ、東京化成工業社製）緩衝液（ｐＨ７．０）：１５７ｇ

・ポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）：１．３ｇ

・パラスチレンスルホン酸ナトリウム（ＮａＰＳＳ）：０．０５ｇ

[0101] 次に３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（商品名：ＬＳ－３３８０、信越化学工業社製）を４ｇ、及びスチレン（キシダ化学社製）を１３ｇ添加し、室温で窒素を吹き込みながら撹拌を１０分間行った。その後オイルバスでフラスコ内の乳濁液を７０℃に加熱した。０．５ｇのペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）をイオン交換水に溶かし、得られた溶液を、前記７０℃に加熱した乳濁液中に添加した。７０℃のまま７時間撹拌した後、加温を停止して一晩撹拌し、ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の分散液を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－４とした。

[0102] さらに、ＰＳＳ－４の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳ－４を回収し、上澄みは捨てた。回収したＰＳＳ－４を、イオン交換水中に再分散した後、遠心分離器にかける操作を複数回繰り返すことで洗浄した。

[0103] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、このようにして得られたＰＳＳ－４の平均粒径を評価したところ、１５３ｎｍであった。

[0104] （ＰＳＳ－５の調製）

ＰＳＳ－４の調製において、用いたＮａＰＳＳの量を０．３ｇに変更した。それ以外はＰＳＳ－４の調製と同様にして、ＰＳＳ－５を調製した。

[0105] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、得られたＰＳＳ－５の平均粒径を評価したところ、９３ｎｍであった。

[0106] （実施例１）

ＰＳＳ－１分散液に界面活性剤としてＴｗｅｅｎ２０（東京化成工業社製）を２ｇ添加し、さらにカルボキシ基を有するシランカップリング剤であるＸ－１２－１１３５（信越化学工業社製）０．１ｍＬ添加して１４時間室温で撹拌した。これにより得られた粒子をＰＳＳＸ－１とした。

[0107] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＸ－１の平均粒径を評価したところ、２５０ｎｍであった。また、ＰＳＳＸ－１の粒径の変動係数は１．４であった。

[0108] さらに、ＰＳＳＸ－１の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳＸ－１を回収し、上澄みは捨てた。ＰＳＳＸ－１をイオン交換水中に分散し、粒子固形分濃度として１．０質量％となるよう調整した。

[0109] （実施例２）

実施例１におけるＸ－１２－１１３５（信越化学工業社製）の使用量を０．０１ｍＬに変更した。それ以外は実施例１と同様に実施し、得られた粒子をＰＳＳＸ－２とした。ＰＳＳＸ－２をイオン交換水中に分散し、粒子固形分濃度として１．０質量％となる分散液を得た。

[0110] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＸ－２の平均粒径を評価したところ、２５４ｎｍであった。また、ＰＳＳＸ－２の粒径の変動係数は１．５であった。

[0111] （実施例３）

実施例１におけるＸ－１２－１１３５（信越化学工業社製）をアミノ基を有するシランカップリング剤であるＫＢＰ－９０（信越化学工業社製）に変更し、使用量を０．０１ｍＬとした。それ以外は実施例１と同様に実施した。得られたポリマー微粒子をイオン交換水中に分散し、粒子固形分濃度として１．０質量％となる分散液を得た。

[0112] 次に、得られたポリマー微粒子分散液に、ジメチルスルホキシドに溶解した無水コハク酸を分散液に対して０．１質量％の割合で投入し、１４時間室温にて撹拌を行い、ポリマー微粒子の表面をカルボキシ基で修飾した。得ら

れた粒子をＰＳＳＸ－３とした。

[0113] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＸ－３の平均粒径を評価したところ、２５５ｎｍであった。また、ＰＳＳＸ－３の粒径の変動係数は１．４であった。

[0114] （実施例４）

実施例１におけるＸ－１２－１１３５（信越化学工業社製）を、エチレンジアミンを有するシランカップリング剤であるＫＢＰ－６４（信越化学工業社製）に変更し、使用量を０．０１ｍＬとした。それ以外は実施例１と同様に実施し、得られたポリマー微粒子をイオン交換水中に分散し、粒子固形分濃度として１．０質量％となる分散液を得た。

[0115] 次に、実施例３におけるポリマー微粒子へのカルボキシ基による修飾と同様に処理し、ＰＳＳＸ－４の表面をカルボキシ基で修飾した。得られた粒子をＰＳＳＸ－４とした。

[0116] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＸ－４の平均粒径を評価したところ、２５５ｎｍであった。また、ＰＳＳＸ－４の粒径の変動係数は１．４であった。

[0117] （実施例５～１６）

ＰＳＳ－２～ＰＳＳ－５をそれぞれ元粒子とし、０．５Ｍの２－モルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ、東京化成工業社製）緩衝液（ｐＨ７．０）、界面活性剤としてのＴｗｅｅｎ（登録商標）２０（東京化成工業社製）、及び、イオン交換水と混合した。この混合液を室温で１５分間撹拌した後、カルボキシ基を有するシランカップリング剤であるＸ－１２－１１３５（信越化学工業社製）を添加し一晩室温で撹拌した。なお、各材料は表１に示す量、あるいは表１に示す終濃度となる量で用いた。

[0118] 続いて、この分散液を遠心分離機にかけ、上澄みは捨てた。回収した粒子を、イオン交換水中に再分散した後、遠心分離器にかける操作を複数回繰り返すことで洗浄した。得られた実施例５～１６に係る粒子をそれぞれＰＳＳＸ－５～ＰＳＳＸ－１６とした。

[0119] [表1]

表１

実施例	粒子	元粒子	元粒子使用量	MES緩衝液使用量	界面活性剤終濃度	イオン交換水使用量	シランカップリング剤使用量
実施例５	PSSX-5	PSS-2	0.4g	0mL	1wt%	40mL	0.04mL
実施例６	PSSX-6	PSS-2	0.4g	0mL	1wt%	120mL	0.4mL
実施例７	PSSX-7	PSS-2	0.4g	0mL	1wt%	40mL	0.4mL
実施例８	PSSX-8	PSS-3	0.3g	0mL	0wt%	30mL	0.03mL
実施例９	PSSX-9	PSS-3	0.3g	0mL	0wt%	30mL	0.06mL
実施例１０	PSSX-10	PSS-3	0.3g	0mL	0wt%	30mL	0.09mL
実施例１１	PSSX-11	PSS-4	1g	0mL	1wt%	300mL	0.67mL
実施例１２	PSSX-12	PSS-4	1g	0mL	1wt%	300mL	1.33mL
実施例１３	PSSX-13	PSS-4	1g	0mL	1wt%	300mL	2mL
実施例１４	PSSX-14	PSS-5	1g	0mL	1wt%	300mL	2mL
実施例１５	PSSX-15	PSS-5	1g	0.6mL	1wt%	300mL	2mL
実施例１６	PSSX-16	PSS-5	1g	3mL	1wt%	300mL	2mL

[0120] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により平均粒径を評価した。その結果、ＰＳＳＸ－１１の平均粒径は１６５ｎｍ、ＰＳＳＸ－１２の平均粒径は１７１ｎｍ、ＰＳＳＸ－１３の平均粒径は１７６ｎｍであった。

[0121] （比較例１）

ＩＭＭＵＴＥＸ 免疫診断用ポリマー粒子Ｐ０１１３（ＪＳＲ社製、粒径０．１８７μｍのポリスチレン粒子にカルボキシ基を結合したポリマー粒子、以下単にＰ０１１３と記す）を、比較例１に係る粒子として用いた。Ｐ０１１３の濃度を、イオン交換水を用いて１．０質量％に調製した。

[0122] 電子顕微鏡での観察により、Ｐ０１１３の平均粒径を評価したところ、１９０ｎｍであった。また、Ｐ０１１３の粒径の変動係数は２．１であった。

[0123] （比較例２）

ＩＭＭＵＴＥＸ 免疫診断用ポリマー粒子Ｐ０３０７（ＪＳＲ社製、粒径０．３５１μｍのポリスチレン粒子にカルボキシ基を結合したポリマー粒子、以下単にＰ０３０７と記す）を、比較例２に係る粒子として用いた。Ｐ０３０７の濃度を、イオン交換水を用いて１．０質量％に調製した。

[0124] 電子顕微鏡での観察により、Ｐ０３０７の平均粒径を評価したところ、３５５ｎｍであった。また、Ｐ０３０７の粒径の変動係数は２．８であった。

[0125] （参考例１）

２００ｍＬのフラスコにリン酸塩緩衝液（キシダ化学社製、ｐＨ６．４）９０ｇ添加し、ポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）０．９ｇを溶かした。次に３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（信越化学工業社製　ＬＳ－３３８０）０．４ｇ、スチレン（キシダ化学社製）１１．６ｇを添加し、室温で窒素を吹き込みながら撹拌を１０分間行った。その後オイルバスでフラスコ内の乳濁液を７５℃に加熱した。ペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）０．３ｇを水１５ｍＬに溶かした溶液を、前記７５℃に加熱した乳濁液中に添加した。７５℃のまま６時間撹拌した後、室温に戻し、ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の分散液を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－７とした。

[0126] さらに、ＰＳＳ－７の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳ－７を回収し、上澄みは捨てた。回収したＰＳＳ－７は、イオン交換水中に再分散した後、再度遠心分離器にかけた。遠心分離器によるＰＳＳ－７の回収とイオン交換水による再分散を４回繰り返した。

このようにして得られたＰＳＳ－７の分散液を、濃度が１．０質量％となるよう調整した。

[0127] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳ－７の平均粒径を評価したところ、１４０ｎｍであった。また、ＰＳＳ－７の粒径の変動係数は２．０であった。

[0128] （参考例２）

２００ｍＬのフラスコにリン酸塩緩衝液（キシダ化学社製、ｐＨ９．０）９０ｇ添加し、ポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）０．４ｇを溶かした。次に３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（信越化学工業社製　ＬＳ－３３８０）７．２ｇ、スチレン（キシダ化学社製）４．８ｇを添加し、室温で窒素を吹き込みながら撹拌を１０分間行った。その後オイルバスでフラスコ内の乳濁液を８０℃に加熱した。ペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）０．３ｇを水１５ｍＬに溶かした溶液を、前記８０℃に加熱した乳濁液中に添加した。８０℃のまま

４時間撹拌した後、室温に戻し、ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の分散液を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－８とした。

[0129] さらに、ＰＳＳ－８の分散液を遠心分離器にかけ、ＰＳＳ－８を回収し、上澄みは捨てた。回収したＰＳＳ－８は、イオン交換水中に再分散した後、再度遠心分離器にかけた。遠心分離器によるＰＳＳ－８の回収とイオン交換水による再分散を４回繰り返した。

[0130] このようにして得られたＰＳＳ－８の分散液を、濃度が１．０質量％となるよう調整した。

[0131] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳ－８の平均粒径を評価したところ、２９５ｎｍであった。また、ＰＳＳ－８の粒径の変動係数は３．０であった。

[0132] （参考例３）

ＰＳＳ－１分散液を０．１質量％に希釈し、アミノプロピルトリメトキシシランを分散液に対して０．０５質量％の割合で投入し、１４時間室温にて撹拌を行い、ＰＳＳ－１の表面をアミノ基で修飾した。これにより得られた粒子をＰＳＳＺ－１とした。

[0133] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＺ－１の平均粒径を評価したところ、２５５ｎｍであった。また、ＰＳＳＺ－１の粒径の変動係数は１．５であった。

[0134] （参考例４）

ＰＳＳ－１分散液を０．１質量％に希釈し、２８質量％のアンモニア水を２質量％、メルカプトプロピルトリメトキシシランを分散液に対して０．０５質量％の割合で投入した。そして、１４時間室温にて撹拌を行い、ＰＳＳ－１の表面をチオール基で修飾した。これにより得られた粒子をＰＳＳＺ－２とした。

[0135] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＺ－２の平均粒径を評価したところ、２６２ｎｍであった。また、ＰＳＳＺ－２の粒径の変動係数は１．７であった。

[0136] （参考例５）

ＰＳＳ－１分散液を０．１質量％に希釈し、アミノプロピルトリメトキシシランを分散液に対して０．０５質量％の割合で投入し、１４時間室温にて撹拌を行い、ＰＳＳ－１の表面をアミノ基で修飾した。さらに、実施例３におけるポリマー微粒子へのカルボキシ基による修飾と同様に処理し、粒子の表面をカルボキシ基で修飾した。これにより得られた粒子をＰＳＳＺ－３とした。

[0137] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＺ－３の平均粒径を評価したところ、２５５ｎｍであった。また、ＰＳＳＺ－３の粒径の変動係数は１．５であった。

[0138] （参考例６）

ＰＳＳ－１分散液を０．１質量％に希釈し、Ｓｉ－ｔａｇ融合プロテインＡ（有限会社シリコンバイオ社製、抗体結合タンパク質（プロテインＡ）と、シラノール基に結合するペプチドとの融合タンパク質）を添加した。そして、ＰＳＳ－１表面にＳｉ－ｔａｇ融合プロテインＡを固定化した。これにより得られた粒子をＰＳＳＺ－４とした。

[0139] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＺ－４の平均粒径を評価したところ、２５３ｎｍであった。また、ＰＳＳＺ－４の粒径の変動係数は１．５であった。

[0140] （参考例７）

ＰＳＳ－１分散液に、３－グリシジルオキシプロピルトリメトキシシランを分散液に対して０．５質量％、グリシンを０．５質量％、２８質量％のアンモニア水を２質量％、の割合で投入し、１４時間室温にて撹拌を行った。そして、ポリマー微粒子の表面をグリシジル基で修飾した。これにより得られた粒子をＰＳＳＺ－５とした。

[0141] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＺ－５の平均粒径を評価したところ、２６０ｎｍであった。また、ＰＳＳＺ－５の粒径の変動係数は２．１であった。

[0142] （参考例８）

ＰＳＳ－１分散液に、トリメトキシプロピルコハク酸無水物のジメチルスルホキシド溶液を分散液に対して０．４質量％の割合で添加し、１４時間室温にて撹拌を行い、ＰＳＳ－１の表面をジカルボキシ基で修飾した。これにより得られた粒子をＰＳＳＺ－６とした。

[0143] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＺ－３の平均粒径を評価したところ、２６５ｎｍであった。また、ＰＳＳＺ－３の粒径の変動係数は１．８であった。

[0144] （参考例９）

実施例１におけるＸ－１２－１１３５（信越化学工業社製）を、無水コハク酸を有するシランカップリング剤であるＸ－１２－９６７Ｃ（信越化学工業社製）に変更し、使用量を０．０１ｍＬとした。それ以外は実施例１と同様に実施し、得られた粒子をＰＳＳＸ－１７とした。ＰＳＳＸ－１７をイオン交換水中に分散し、粒子固形分濃度として１．０質量％となる分散液を得た。

[0145] 電子顕微鏡での観察により、ＰＳＳＸ－１７の平均粒径を評価したところ、２５２ｎｍであった。また、ＰＳＳＸ－１７の粒径の変動係数は１．５であった。

[0146] （参考例１０）

ＰＳＳ－２の調製におけるＭＥＳ緩衝液の濃度及び各材料の使用量を表１に示すように変更した。それ以外はＰＳＳ－２の調製と同様にしてポリスチレンシリカハイブリッド微粒子を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をそれぞれＰＳＳ－９～１７とした。

[0147] また、粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、得られたＰＳＳ－９～１７の平均粒径を評価した結果を表２に示す。

[0148]

[表2]

表２

粒子	MES緩衝液		PVP K-30 使用量	スチレン 使用量	3-メタクリル オキシプロピル トリメトキシシラン 使用量	ペルオキソ二 硫酸カリウム 使用量	粒径
	濃度	使用量					
PSS-2	50mM	157g	1.3g	13g	4g	0.5g	203nm
PSS-9	40mM	157g	1.3g	13g	4g	0.5g	205nm
PSS-10	25mM	157g	1.3g	13g	4g	0.3g	217nm
PSS-11	25mM	157g	1.3g	17g	5.3g	0.3g	242nm
PSS-12	15mM	157g	1.3g	13g	4g	0.2g	249nm
PSS-13	15mM	157g	1.3g	11g	6g	0.2g	235nm
PSS-14	15mM	157g	1.3g	9g	8g	0.2g	255nm
PSS-15	15mM	157g	1.3g	15g	2g	0.2g	237nm
PSS-16	8mM	157g	1.3g	13g	4g	0.1g	291nm
PSS-17	4mM	157g	1.3g	13g	4g	0.05g	385nm

[0149] （参考例１１）

ＰＳＳ－３の調製における各材料の使用量を次のように変更した。

・５０ｍＭリン酸塩緩衝液（キシダ化学社製、ｐＨ７．４）：３９ｇ

・ポリビニルピロリドンＫ－３０（キシダ化学社製、分子量４００００）：０ｇ（使用しなかった）

・Ｎ－ビニル－２－ピロリドンとアクリル酸のランダム共重合体（ポリマーソース社製、分子量６００００、Ｎ－ビニル－２－ピロリドンの分子数：アクリル酸の分子数の比＝４：６、以下ＰＶＰ－ＰＡＡと略す）：０．３３ｇ

・３－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（商品名：ＬＳ－３３８０、信越化学工業社製）：１ｇ

・スチレン（キシダ化学社製）：３ｇ

・ペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業社製）：０．１２５ｇ

[0150] それ以外はＰＳＳ－３の調製と同様にしてポリスチレンシリカハイブリッド微粒子を得た。得られたポリスチレンシリカハイブリッド微粒子をＰＳＳ－１８とした。

[0151] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、このようにして得られたＰＳＳ－１８の

平均粒径を評価したところ、２０３ｎｍであった。

[0152] （参考例１２）

ＰＳＳ－４の調製において、用いたＭＥＳ緩衝液の濃度を５０ｍＭに変更した。それ以外はＰＳＳ－４の調製と同様にして、ＰＳＳ－１９を調製した。

[0153] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、得られたＰＳＳ－１９の平均粒径を評価したところ、１３８ｎｍであった。

[0154] （参考例１３）

ＰＳＳ－４の調製において、用いたＮａＰＳＳの量を０．１ｇに変更した。それ以外はＰＳＳ－４の調製と同様にして、ＰＳＳ－２０を調製した。

[0155] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、得られたＰＳＳ－２０の平均粒径を評価したところ、１２６ｎｍであった。

[0156] ＰＳＳ－４粒子（粒径１５３ｎｍ）と比較して、ＰＳＳＸ－１１（平均粒径１６５ｎｍ）、ＰＳＳＸ－１２（平均粒径１７１ｎｍ）及びＰＳＳＸ－１３（平均粒径１７６ｎｍ）はいずれも粒径が大きかった。また、シランカップリング剤添加量が増加するに従い、粒径が大きくなる傾向が示された。すなわち、シランカップリング剤の量を調節することによって粒子を被覆する層の厚さを調節することが可能である。

[0157] 粒子溶液の電気伝導度を測定しながら酸塩基滴定することで、その滴定曲線から粒子のカルボキシ基の量を算出することができる。この方法に従い、ＰＳＳＸ－５粒子、ＰＳＳＸ－６粒子、ＰＳＳＸ－７粒子、ＰＳＳＸ－１１粒子、ＰＳＳＸ－１２粒子、ＰＳＳＸ－１３粒子について評価した。結果を表３に示す。

[0158]

[表3]

表３

粒子	カルボキシ基含有量 (nmol/mg)
ＰＳＳＸ－５	24
ＰＳＳＸ－６	68
ＰＳＳＸ－７	110
ＰＳＳＸ－１１	29
ＰＳＳＸ－１２	61
ＰＳＳＸ－１３	132

[0159] 表３に示す結果より、シランカップリング剤の量を調節することによって粒子のカルボキシ基の量を調節することが可能であることが分かる。

[0160] ＜抗体の結合例１＞

ＰＳＳＸ－１、ＰＳＳＸ－２、ＰＳＳＺ－３、ＰＳＳＺ－５、ＰＳＳＺ－６、ＰＳＳＸ－１７、ＰＳＳ－２に、抗Ｃ反応性蛋白（以後ＣＲＰと略す）抗体を以下の通り結合した。

[0161] まず、各粒子分散液を、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）、１５分間、遠心分離して粒子を沈殿させた。上清を除去した後、粒子のペレットを、ＭＥＳ緩衝液で再分散させ、これに水溶性カルボジイミド（ＷＳＣ）を加えた。さらにＮ－ヒドロキシスクシンイミドを加えた。粒子分散液を、室温で３０分間撹拌した後、遠心分離によって、粒子を回収した。回収した粒子をＭＥＳ緩衝液で洗浄した後、ＭＥＳ緩衝液に再分散させて、抗ＣＲＰ抗体を終濃度１００μｇ／ｍＬとなるように加えた。室温で１８０分間撹拌した後、遠心分離によって、粒子を回収した。回収した粒子を、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン（Ｔｒｉｓ）緩衝液で十分に洗浄し、抗ＣＲＰ抗体が結合した粒子を得た。得られたＣＲＰ抗体が結合した粒子をそれぞれＰＳＳＸ－１－Ａｂ、ＰＳＳＸ－２－Ａｂ、ＰＳＳＺ－３－Ａｂ、ＰＳＳＺ－５－Ａｂ、ＰＳＳＺ－６－Ａｂ、ＰＳＳＸ－１７－Ａｂ、ＰＳＳ－２－Ａｂとした。

[0162] 得られた各粒子に抗体が結合していることは、抗体を加えた緩衝液中の抗体の濃度が減少したことをＢＣＡアッセイによる測定で確かめることにより

確認した。粒子１個あたり、抗体が約１００から５００個結合していることが分かった。得られた各粒子はいずれも、緩衝液中で安定に分散しており、ＢＳＡでポストコートする必要はなかった。

[0163] ＜抗体の結合例２＞

ＰＳＳＸ－６、ＰＳＳＸ－７、ＰＳＳＸ－１１、ＰＳＳＸ－１２、及びＰＳＳＸ－１３それぞれの分散液（濃度１．０質量％溶液、１０ｍｇ／ｍＬ）を０．１ｍＬ（粒子１ｍｇ）、それぞれマイクロチューブ（容量１．５ｍＬ）に移し取った。これらに、０．１２ｍＬの活性化緩衝液（２５ｍＭ ＭＥＳ緩衝液、ｐＨ６．０）を添加して、４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間遠心分離した。遠心分離後、上清をピペッタで廃棄した。続いて、活性化緩衝液０．１２ｍＬを添加して、超音波洗浄器（商品名：ＭＯＤＥＬ ＶＳ－１００ＩＩＩ アズワン３周波超音波洗浄器、アズワン社製、２８ｋＨｚ）を用いて超音波により分散させた。次に、４℃で１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）、２０分間遠心分離した。上清をピペッタで廃棄し、活性化緩衝液０．１２ｍＬを添加して、超音波にて分散させた。続いて４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間遠心分離し、上清をピペッタで廃棄した。続いてＷＳＣ溶液（ＷＳＣ５０ｍｇを活性化緩衝液１ｍＬに溶解させたもの）及びＮ－ヒドロキシスルホコハク酸イミド（Ｓｕｌｆｏ ＮＨＳ）溶液（Ｓｕｌｆｏ ＮＨＳ５０ｍｇを活性化緩衝液１ｍＬに溶解させたもの）をそれぞれ６０μＬ添加した。添加後、超音波にて分散させた。さらに室温で３０分間撹拌することで、粒子のカルボキシ基を活性エステルに変換させた。

[0164] 次に、分散液を４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間遠心分離し、上清をピペッタで廃棄した。固定化緩衝液（２５ｍＭ ＭＥＳ緩衝液、ｐＨ５．０）０．２ｍＬを添加して、超音波にて分散させた。４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間遠心分離し、上清をピペッタで廃棄した。固定化緩衝液を粒子１ｍｇあたり５０μＬ添加して、カルボキシ基が活性化された粒子を超音波にて分散させた。

[0165] 抗ヒトＣＲＰ抗体（ポリクローナル抗体）を濃度が２５μｇ／５０μＬ、５０μｇ／５０μＬ、１００μｇ／５０μＬ、２００μｇ／５０μＬ、となるように固定化緩衝液で希釈した（抗体溶液と記載する）。カルボキシ基が活性化された粒子の溶液５０μＬ（粒子１ｍｇを含む）に各濃度の抗体溶液５０μＬを添加して、超音波にて粒子を分散させた。結合に供した抗体量は、表４に示した通り、粒子１ｍｇあたりそれぞれ、２５、５０、１００、２００μｇとなる。室温、６０分間、チューブを撹拌して、抗体を粒子のカルボキシ基に固定させた。次いで、４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間遠心分離し、上清をピペッタで廃棄した。

[0166] トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン（Ｔｒｉｓ）を含む活性エステル不活化緩衝液（１Ｍ　Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ　８．０に０．１％のＴｗｅｅｎ（登録商標）２０を含むもの）０．２４ｍＬを添加して、超音波にて分散させた。室温で１時間撹拌し、残存している活性化エステルにＴｒｉｓを結合させた後、４℃で一晩、静置した。

[0167] 次に、４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間遠心分離し、上清をピペッタで廃棄した。洗浄・保存緩衝液（１０ｍＭ　２－［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル］－エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）緩衝液、ｐＨ７．９）０．２ｍＬを添加して、超音波にて分散させた。洗浄・保存緩衝液０．２ｍＬによる洗浄操作を２回繰り返した後、洗浄・保存緩衝液１．０ｍＬを添加して、超音波にて分散させた。上記の工程で、粒子のロスがほとんど見られないので、最終的に抗体感作粒子濃度は０．１質量％（１ｍｇ／ｍＬ）となった。冷蔵庫で保存し、使用時には超音波にて再分散させた。

[0168] 粒子径分析装置（商品名：ゼータサイザー、マルバーン・パナリティカル社製）を用い、動的光散乱により、得られた抗体感作粒子の平均粒径を評価した。得られた抗体感作粒子の種類及び平均粒径を表４に示す。

[0169] （抗体感作効率の測定）

抗体の結合例２で作製した抗体感作粒子に、抗体が感作（固定）している

ことをタンパク定量により確認した。

[0170] 具体的には、抗体感作粒子とＢＣＡ試薬を反応させた。まず、各抗体感作粒子の分散液（０．１質量%溶液）を２５μＬ（粒子量２５μｇ）分取した。プロテインアッセイＢＣＡキット（和光純薬社製）のＡ液を７ｍＬと、Ｂ液を１４０μＬとを混合して、ＡＢ液とした。分散液２５μＬに対して、ＡＢ液２００μＬを加え、６０℃で３０分間静置した。静置後の溶液を４℃、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で５分間遠心分離し、上清２００μＬをピペッタで回収した。回収した溶液について、マルチモードマイクロプレートリーダー（商品名：ＳｙｎｅｒｇｙＭＸ，ＢｉｏＴｅｋ社製）を用いて波長５６２ｎｍの光に対する吸光度を測定した。別途に抗体を１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳで０～２００μｇ／ｍＬの範囲の濃度となるように溶解して調製した複数の標準サンプルを用意した。用意した標準サンプルとＢＣＡ試薬とを反応させた溶液についても同様に波長５６２ｎｍの光に対する吸光度を測定して標準曲線を作製した。得られた標準曲線を用い、抗体感作粒子に結合している抗体量を求めた。

[0171] 抗体感作粒子への抗体感作量（抗体感作粒子単位質量あたりの抗体固定量（μｇ／ｍｇ））は、上記で求めた抗体量を、測定に用いた抗体感作粒子の質量で割ることで求めた。さらに、抗体感作効率を、結合に供した抗体量と、抗体感作量とから求めた。

[0172] 結果を表４に示す。

抗体感作効率の測定結果より、シランカップリング剤の使用量が多くなるに従い、抗体感作効率が高くなることが分かった。この理由の一つとして、シランカップリング剤の使用量が多くなるに従い、粒子表面でのカルボキシ基の量が増加し、抗体を固定化する点が増加することが挙げられる。

[0173]

[表4]

表４

抗体感作粒子	原料粒子	原料粒子に対する抗体使用割合	抗体感作効率	抗体感作粒子の粒径
PSSX-6-Ab50	PSSX-6	50μg/mg	96%	200nm
PSSX-6-Ab100	PSSX-6	100μg/mg	88%	203nm
PSSX-6-Ab200	PSSX-6	200μg/mg	57%	206nm
PSSX-7-Ab50	PSSX-7	50μg/mg	100%	202nm
PSSX-7-Ab100	PSSX-7	100μg/mg	100%	200nm
PSSX-7-Ab200	PSSX-7	200μg/mg	74%	206nm
PSSX-11-Ab25	PSSX-11	25μg/mg	25%	161nm
PSSX-11-Ab50	PSSX-11	50μg/mg	21%	160nm
PSSX-11-Ab100	PSSX-11	100μg/mg	14%	163nm
PSSX-12-Ab25	PSSX-12	25μg/mg	56%	161nm
PSSX-12-Ab50	PSSX-12	50μg/mg	61%	161nm
PSSX-12-Ab100	PSSX-12	100μg/mg	49%	164nm
PSSX-13-Ab25	PSSX-13	25μg/mg	91%	164nm
PSSX-13-Ab50	PSSX-13	50μg/mg	99%	164nm
PSSX-13-Ab100	PSSX-13	100μg/mg	85%	165nm

[0174] ＜抗体の結合例３＞

実施例８～１０で作製したＰＳＳＸ－８、ＰＳＳＸ－９及びＰＳＳＸ－１０、ＰＳＳ－３及び参考例１１で作製したＰＳＳ－１８に対して抗体を結合させた。

[0175] 抗体の結合例２における抗ヒトＣＲＰ抗体（ポリクローナル抗体）を、２種類の抗ヒト前立腺特異抗原（以下、ＰＳＡと呼ぶ）抗体（モノクローナル抗体）に変更した。それ以外は抗体の結合例２と同様に実施し、それぞれの抗体を有する２種類の抗体感作粒子を得た。

[0176] 得られた２種類の抗体感作粒子について、それぞれ抗体感作効率を前述の方法に従って測定した。また、それぞれの抗体を有する２種類の抗体感作粒子を等量ずつ混合した。得られた抗体感作粒子と、抗体感作効率の測定結果を表５に示す。

いずれの粒子も高い抗体感作効率で抗体を感作することが可能であった。

[0177]

[表5]

表５

抗体感作粒子	原料粒子	原料粒子に対する抗体使用割合	抗体感作効率(抗PSA抗体1)	抗体感作効率(抗PSA抗体2)
PSSX-8-Ab200	PSSX-8	200μg/1mg粒子	86%	79%
PSSX-9-Ab200	PSSX-9	200μg/1mg粒子	96%	72%
PSSX-10-Ab200	PSSX-10	200μg/1mg粒子	89%	77%
PSS-3-Ab200	PSS-3	200μg/1mg粒子	63%	70%
PSS-18-Ab200	PSS-18	200μg/1mg粒子	70%	71%

[0178] ＜抗体の結合例４＞

比較例１に係る粒子及び比較例２に係る粒子に抗ＣＲＰ抗体を結合した。比較例１及び２で作製したそれぞれの分散液を、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）で２０分間、遠心分離して粒子を沈殿させた。上清を除去した後、粒子のペレットを、ＭＥＳ緩衝液で再分散させ、これにＷＳＣ溶液を加えた。さらに抗ＣＲＰ抗体を終濃度が１００μｇ／ｍＬとなるように加えた。室温で１８０分間撹拌した後、ＢＳＡ溶液を加えた。その後、遠心分離によって、ＢＳＡでコートされた粒子を回収した。回収した粒子をリン酸緩衝液で洗浄し、ＢＳＡでコートされた抗ＣＲＰ抗体が結合した粒子を得た。

[0179] 得られた粒子に抗体が結合していることは、抗体を加えた緩衝液中の抗体濃度の減少量をＢＣＡアッセイで測定することで確認した。粒子１個あたり、抗体が約５００個結合していることが分かった。

[0180] 抗体を粒子に結合させた直後に、粒子が凝集して沈殿するのが目視で確認された。抗体を結合させた粒子は凝集して沈殿したため、ラテックス凝集反応の評価に用いることはできなかった。

[0181] ＜抗体の結合例５＞

参考例４で作製したＰＳＳＺ－２に抗ＣＲＰ抗体を結合した。チオール反応性の抗体を得るために、抗ＣＲＰ抗体溶液にＥＭＣＳ（６－マレイミドヘキサン酸Ｎ－スクシンイミジル）を加えて、抗体にマレイミド基を導入した

。ＰＳＳＺ－２分散液を、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）、１５分間、遠心分離してＰＳＳＺ－２を沈殿させた。上清を除去した後、ＰＳＳＺ－２のペレットをリン酸緩衝液で再分散させ、これにあらかじめマレイミド化した抗ＣＲＰ抗体を加えた。室温で１８０分間撹拌した後、遠心分離によって、粒子を回収した。回収した粒子をリン酸緩衝液で十分に洗浄し、抗ＣＲＰ抗体が結合した微粒子を得た。得られたＣＲＰ抗体が結合した粒子をＰＳＳＺ－２－Ａｂとした。

[0182] ＰＳＳＺ－２－Ａｂに抗体が結合していることは、抗体を加えた緩衝液中の抗体の濃度が減少したことをＢＣＡアッセイによる測定で確かめることにより確認した。粒子１個あたり、抗体が約１００から５００個結合していることが分かった。ＰＳＳＺ－２－Ａｂは、緩衝液中で安定に分散しており、ＢＳＡでポストコートする必要はなかった。

[0183] ＜抗体の結合例６＞

参考例６で作製したＰＳＳＺ－４に抗ＣＲＰ抗体を結合した。ＰＳＳＺ－４分散液を、１５０００ｒｐｍ（２０４００ｇ）、２０分間、遠心分離してＰＳＳＺ－４を沈殿させた。上清を除去した後、ＰＳＳＺ－４のペレットを、Ｔｒｉｓ緩衝液で再分散させ、これに抗ＣＲＰ抗体を終濃度２００μｇ／ｍＬとなるように加えた。４℃で、１６時間撹拌した後、遠心分離によって、粒子を回収した。回収した粒子をＴｒｉｓ緩衝液で十分に洗浄し、抗ＣＲＰ抗体が結合した粒子を得た。得られたＣＲＰ抗体が結合した粒子をＰＳＳＺ－４－Ａｂとした。

[0184] ＰＳＳＺ－４－Ａｂに抗体が結合していることは、抗体を加えた緩衝液中の抗体の濃度が減少したことをＢＣＡアッセイによる測定で確かめることにより確認した。粒子１個あたり、抗体が約５００個結合していることが分かった。ＰＳＳＺ－４－Ａｂは、緩衝液中で安定に分散しており、ＢＳＡでポストコートする必要はなかった。

[0185] ＜非特異凝集抑制評価＞

濃度を１．０質量％となるよう調整したＰＳＳ－１粒子分散液３０μＬ及

び実施例１～４、比較例１、２及び参考例１～９で作製した各粒子分散液３０μＬそれぞれに、緩衝液６０μＬ、ヒト血清溶液４μＬを添加し３７℃で５分保温した。保温の前後で波長５７２ｎｍの光に対する吸光度を測定し、前後での吸光度の変化量を３回測定し、平均の値を算出した。吸光度の変化量が０．１未満を非特異凝集が抑制されているとし、０．１以上を非特異凝集が起こっていると評価した。結果を表６に示す。

[0186] また、表６からわかるように、実施例１～４、参考例１～９で作製した粒子は、ヒト血清中において、凝集せず、安定に分散できることが分かった。一方、比較例１ならびに２に係る粒子では、人血清との反応で凝集反応（非特異凝集）が生じた。これは微粒子表面にタンパク質が非特異に吸着することで、吸着タンパク質を介した粒子間の架橋によるものと考えられる。比較例１ならびに２に係る粒子をあらかじめＢＳＡでポストコートした場合、ヒト血清中において、凝集せず、安定に分散できた。これはポリスチレン粒子表面にアルブミンが吸着することで、ヒト血清由来のタンパク質が吸着できなくなったためと考えられる。

[0187] さらに、ＰＳＳ－２、３、９～１８の分散液についても同様の非特異凝集抑制評価を実施した。その結果、いずれのポリマー微粒子分散液においても吸光度の変化量は０．１未満であり、非特異凝集は生じなかった。

[0188]

[表6]

表６

	粒子	非特異凝集抑制評価	
		吸光度の変化	非特異凝集の有無
実施例１	PSSX-1	0.04	無し
実施例２	PSSX-2	0.06	無し
実施例３	PSSX-3	0.04	無し
実施例４	PSSX-4	0.05	無し
-	PSS-1	0.03	無し
参考例１	PSS-7	0.01	無し
参考例２	PSS-8	0.06	無し
参考例３	PSSZ-1	0.08	無し
参考例４	PSSZ-2	0.09	無し
参考例５	PSSZ-3	0.03	無し
参考例６	PSSZ-4	0.03	無し
参考例７	PSSZ-5	0.05	無し
参考例８	PSSZ-6	0.05	無し
参考例９	PSSX-17	0.03	無し
比較例１	P0113	5000以上	有り
比較例２	P0307	5000以上	有り

[0189] ＜ラテックス凝集反応の評価１　抗体感作粒子のＣＲＰに対する抗原認識能評価＞

抗体の結合例１、５、６で作製した抗体感作粒子ＰＳＳＸ－１－Ａｂ、ＰＳＳＸ－２－Ａｂ、ＰＳＳＺ－２－Ａｂ～ＰＳＳＺ－６－Ａｂ、ＰＳＳＸ－１７－Ａｂの０．１質量％分散液を調製し、ラテックス凝集反応を行った。

[0190] ヒト血清由来ＣＲＰ（シグマアルドリッチ製）と各抗体感作粒子分散液とを混合し、混合前後での波長５７２ｎｍの光に対する吸光度を測定した。吸光度の測定には、紫外可視分光光度計（商品名：ＧｅｎｅＱｕａｎｔ　１３００、ＧＥヘルスケア社製）を用い、試料はプラスチックセルに注入し光路長１０ｍｍにて測定した。抗体感作粒子上の抗ＣＲＰ抗体が抗原であるＣＲＰを捕捉できれば、ＣＲＰを介した微粒子同士の凝集反応が起こる。この時、透過率の減少が生じる結果、吸光度の上昇が観測される。

[0191] まず、３２ｍｇ／ＬのＣＲＰ１μＬとリン酸系緩衝液５０μＬとを混合してＣＲＰ溶液を調製した。続いて、抗体感作粒子分散液５０μＬにＣＲＰ溶

液５１μＬを添加した反応溶液、ならびに抗体感作粒子分散液５０μＬにＣＲＰ溶液の代わりに緩衝液５１μＬを添加した反応溶液について、温度３７℃で５分間処理した。各反応溶液について処理の前後での吸光度の変化率（％）を３回測定し、平均の値を算出した。結果を表７に示す。

[0192] 表７に示す結果より、ＣＲＰ添加時に抗原抗体反応により凝集反応が起こり、ＣＲＰ溶液の代わりに緩衝液を添加したとき（ＣＲＰ無し）の変化率と比較し明らかに差異の確認を認識できた。

[0193] 表７からわかるように、本評価に供した抗体感作粒子は、ＣＲＰを認識し、粒子同士が凝集することがラテックス凝集反応の評価により確認できた。すなわち、本実施例１及び２、参考例４～９で作製した粒子は、ＢＳＡを用いずとも抗体を結合させることが可能であり、その結合した抗体は、抗原認識能を有していることが分かった。

[0194] 表６及び表７に示す結果より、抗体等のリガンドを結合できる足場を有しながらも、ＢＳＡを用いなくても血清タンパクの非特異吸着を抑制された粒子を得られたことがわかった。

[0195] [表7]

表７

粒子	吸光度の変化率	
	CRP溶液添加時	緩衝液添加時(CRP無し)
PSSX-1-Ab	40.0%	0.5%
PSSX-2-Ab	43.2%	0.8%
PSSZ-2-Ab	7.5%	-0.2%
PSSZ-3-Ab	7.6%	-1.1%
PSSZ-4-Ab	37.5%	1.6%
PSSZ-5-Ab	7.4%	0.6%
PSSZ-6-Ab	10.3%	-0.5%
PSSX-17-Ab	38.7%	1.2%

[0196] ＜ラテックス凝集反応の評価２　抗体感作粒子のＣＲＰに対する感度評価＞

抗体の結合例２で作製した抗体感作粒子の感度をラテックス免疫凝集法により評価した。具体的には、抗原に抗体感作粒子を反応させ、免疫複合体の凝集物を形成させ、その凝集物に光を照射して、散乱による照射光の減衰（

吸光度）を吸光度計で計測した。検体に含まれる抗原量に依存して凝集物の割合が増加して、吸光度が増加する。感度の評価では、既定の濃度のＣＲＰを含む溶液を用いたときの吸光度の増加量（ΔＯＤ×１００００で記載）が大きいことが望ましい。吸光度の測定には、紫外可視分光光度計（商品名：ＧｅｎｅＱｕａｎｔ　１３００、ＧＥヘルスケア社製）を用い、試料はプラスチックセルに注入し光路長１０ｍｍにて測定した。以下に、具体的に測定方法を示す。

[0197] ＣＲＰ標準溶液（ＣＲＰ濃度５～１６０μｇ／ｍＬ）１μＬとＲ１緩衝液（リン酸系緩衝液）５０μＬをプラスチックセル内で混和し、３７℃で５分間加温した。抗体感作粒子の分散溶液（粒子濃度０．１質量％、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．９、０．０１質量％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）５０μＬを、ＣＲＰ標準溶液を含むＲ１緩衝液５１μＬに添加した。その後、気泡が入らないよう注意しながら素早くピペッティングし、測定用のサンプルとした。波長５７２ｎｍの光に対するサンプルの吸光度を読み取り、Ａｂｓ１とした。サンプルを３７℃で５分間加温した後、波長５７２ｎｍの光に対するサンプルの吸光度を読み取り、Ａｂｓ２とした。Ａｂｓ２からＡｂｓ１を引いた値を求め、１００００倍したものを、ΔＯＤ×１００００値とした。非特異反応を評価するため、ＣＲＰを含まない血清溶液（ＣＲＰ濃度０μｇ／ｍＬ）１μＬとＲ１緩衝液５０μＬを混和して得た溶液と、抗体感作粒子の分散溶液とを用いて調製したサンプルについても同様にΔＯＤ×１００００値を求めた。

[0198] 結果を表８に示す。本評価に供したいずれの抗体感作粒子についても、ＣＲＰの濃度の増加に伴いΔＯＤ×１００００の増加が認められた。これは、抗原であるＣＲＰに抗体感作粒子が結合し、粒子凝集体を形成した結果であり、ラテックス免疫凝集法に用いるための粒子として機能することがわかった。また、本評価に供した抗体感作粒子は、ＣＲＰ濃度０μｇ／ｍＬのときのΔＯＤ×１００００が１００以下であり、非特異凝集が起こっていないことが分かった。さらに、本評価に供した抗体感作粒子は、粒子に感作させる

抗体の量を増加させることで、ΔＯＤ×１００００の値を増加させることが示された。

[0199] [表8]

表８

抗体感作粒子	感度（ΔODx10000）				
	CRP濃度 0μg/mL	CRP濃度 5μg/mL	CRP濃度 20μg/mL	CRP濃度 40μg/mL	CRP濃度 160μg/mL
PSSX-6-Ab50	20	440	2210	3430	4540
PSSX-6-Ab100	20	1120	6360	11520	15340
PSSX-6-Ab200	-70	1800	10060	15340	14740
PSSX-7-Ab50	-10	290	1590	2470	2760
PSSX-7-Ab100	-30	930	4740	8100	12920
PSSX-7-Ab200	10	2080	11400	14730	14050
PSSX-11-Ab25	40	170	160	100	170
PSSX-11-Ab50	80	280	590	620	530
PSSX-11-Ab100	0	330	940	1120	930
PSSX-12-Ab25	20	420	1270	1610	1470
PSSX-12-Ab50	-160	600	3010	4800	6900
PSSX-12-Ab100	-20	780	5250	11030	16230
PSSX-13-Ab25	-30	480	1630	2120	1970
PSSX-13-Ab50	-50	710	3630	6200	8520
PSSX-13-Ab100	0	950	6840	14720	15710

[0200] ＜ラテックス凝集反応の評価３　抗体感作粒子のヒトＰＳＡに対する感度評価＞

抗体の結合例３で作製した抗体感作粒子に関して、ラテックス凝集反応の評価２に記載の方法にならってＰＳＡに対する感度評価を行った。

[0201] 具体的には、ＰＳＡ標準溶液（ＰＳＡ濃度９１．７ｎｇ／ｍＬ）１６μＬとＲ１緩衝液６０μＬをプラスチックセル内で混和し、３７℃で５分間加温した。抗体感作粒子の分散溶液（粒子濃度０．２質量％）３０μＬを、ＰＳＡ標準溶液を含むＲ１緩衝液（７６μＬ）に添加し、気泡が入らないよう注意しながら素早くピペッティングし、測定用のサンプルとした。波長５７２ｎｍの光に対するサンプルの吸光度を読み取り、Ａｂｓ３とした。サンプルを３７℃で５分間加温した後、波長５７２ｎｍの光に対するサンプルの吸光度を読み取り、Ａｂｓ４とした。Ａｂｓ４からＡｂｓ３を引いた値を求め、１００００倍したものを、ΔＯＤ×１００００値とした。非特異反応を評価

するため、ＰＳＡを含まない血清溶液（ＰＳＡ濃度０ｎｇ／ｍＬ）１μＬとＲ１緩衝液５０μＬを混和して得た溶液と、抗体感作粒子の分散溶液とを用いて調製したサンプルについても同様にΔＯＤ×１００００値を求めた。

[0202] 結果を表９に示す。本評価に供したいずれの抗体感作粒子についても、ＰＳＡの存在下でΔＯＤ×１００００の増加が認められた。これは、抗原であるＰＳＡに抗体感作粒子が結合し、粒子凝集体を形成した結果であり、ラテックス免疫凝集法に用いるための粒子として機能することがわかった。また、本評価に供した抗体感作粒子は、ＰＳＡ濃度０ｎｇ／ｍＬのときのΔＯＤ×１００００が１００以下であり、非特異凝集が起こっていないことが分かった。

[0203] [表9]

表９

抗体感作粒子	ΔODx10000	
	PSA濃度 91.7ng/mL	PSA濃度 0ng/mL
PSSX-8-Ab200	4900	-110
PSSX-9-Ab200	5290	-130
PSSX-10-Ab200	4750	70
PSS-3-Ab200	3290	-60
PSS-18-Ab200	3920	30

[0204] （実施例１７）ＰＳＳＸ－１のアルブミンに対する非特異凝集の抑制性能評価

実施例１で得られたＰＳＳＸ－１の非特異凝集の抑制性能評価として、アルブミンに対する非特異凝集性を確認した。まず、ＰＳＳＸ－１の０．１質量％水分散液５０μＬと０．０５％、または０．５％ウシ血清アルブミン溶液（リン酸緩衝生理食塩水にウシ血清アルブミンを溶かしたもの）５０μＬとを混合し、３７℃で５分保温した。保温の前後で５７２ｎｍの吸光度を測定し、前後での吸光度の変化量を測定した。アルブミンに対する非特異凝集が起こる場合は、吸光度の変化量×１００００の数値は１０００以上になる。

吸光度の変化量×１００００の数値を以下に示す。

０．０５％アルブミン溶液：２０

０．５％アルブミン溶液：８０

以上の結果より、ＰＳＳＸ－１はアルブミンによって凝集しないことが明らかとなった。

[0205] （実施例１８）ＰＳＳＸ－１のヒト血清グロブリン分画に対する非特異凝集の抑制性能評価

実施例１で得られたＰＳＳＸ－１の非特異凝集の抑制性能評価として、ヒト血清グロブリン分画に対する非特異凝集性を確認した。まず、グロブリン濃度０．４８ｍｇ／ｍＬあるいは４８ｍｇ／ｍＬのグロブリン溶液１６μＬを、リン酸緩衝液６０μＬに加え、５分間３７℃でインキュベートした。その後、 ＰＳＳＸ－１の０．１質量％水分散液３０μＬをこれに加え、３７℃で５分保温した。保温の前後で５７２ｎｍの吸光度を測定し、前後での吸光度の変化量を測定した。ヒト血清グロブリン分画に対する非特異凝集が起こる場合は、吸光度の変化量×１００００の数値は１０００以上になる。

吸光度の変化量×１００００の値を以下に示す。

グロブリン濃度０．４８ｍｇ／ｍＬ：０

グロブリン濃度４８ｍｇ／ｍＬ：６０

以上の結果より、ＰＳＳＸ－１はヒト血清グロブリン分画によって凝集しないことが明らかとなった。

[0206] （実施例１９）ＰＳＳＸ－１のヒト血清フィブリンに対する非特異凝集の抑制性能評価

実施例１で得られたＰＳＳＸ－１の非特異凝集の抑制性能評価として、ヒト血清フィブリンに対する非特異凝集性を確認した。まず、ＰＳＳＸ－１の０．１質量％水分散液５０μＬとヒト血清フィブリン溶液（用事調製したもの）５０μＬとを混合し、３７℃で５分保温した。保温後、目視による粒子の凝集を観察した結果、粒子凝集は認められなかった。

以上の結果より、ＰＳＳＸ－１はヒト血清フィブリンによって凝集しないことが明らかとなった。

[0207] （実施例２０）粒子径の異なる粒子の合成と評価

ＰＳＳ－２、ＰＳＳ－４の調製における各材料の使用量を表１０に示すように変更して、それ以外はＰＳＳ－２、ＰＳＳ－４と同様にしてポリスチレンシリカハイブリッド微粒子を得た。得られた粒子を、ＰＳＳＸ－１８～ＰＳＳＸ－３３とした。表１０に粒子の粒径と分散性を示す。処方を変えることで、９３．１ｎｍ～４２３．２ｎｍの範囲の粒子径が制御可能であった。粒子径が３４０ｎｍを超えると、粒子の水中における分散性が悪くなる傾向が見られた。

[0208] [表10]

表１０

	ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子の調製条件								シランカップリング剤との反応条件						粒子の物性値	
粒子	スチレン使用量(g)	3－メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン使用量(g)	ペルオキソ二硫酸カリウム使用量(g)	パラスチレンスルホン酸ナトリウム使用量(g)	PVP K-30使用量(g)	緩衝液使用量(g)		微粒径の粒子径(nm)	ポリスチレンシリカハイブリッド微粒子使用量(g)	X-12-1135シランカップリング剤使用量(mL)	10% Tween20使用量(mL)	イオン交換水使用量(g)	緩衝液使用量(mL)		粒径(nm)	分散性
PSSX-18	12.9	4.1	0.50	0.3	1.3	25 mM MES (pH7.0)	157.5	92.8	1	2	30	256.8	500 mM MES (pH7.0)	0.6	93.1	良好
PSSX-19	6.4	2.0	0.50	0.1	2.0	50 mM MES (pH7.0)	157.5	97.1	1	2	30	251.6	未使用	未使用	112.8	良好
PSSX-20									0.5	1	15	120.3	未使用	未使用	102.1	良好
PSSX-21									0.5	2	15	119.3	未使用	未使用	99.1	良好
PSSX-22	12.9	4.1	0.03	0	1.3	5 mM MES (pH7.0)	157.5	318.5	0.5	2	15	129.6	未使用	未使用	423.2	軟凝集あり
PSSX-23									0.5	0.1	15	131.5	未使用	未使用	314.5	良好
PSSX-24									0.5	0.5	15	131.1	未使用	未使用	353.4	良好
PSSX-25									0.5	1	15	130.6	未使用	未使用	384.2	軟凝集あり
PSSX-26	3.2	1.0	0.50	0	1.3	100 mM MES (pH7.0)	157.5	113.0	0.36	0.36	10.9	91.1	未使用	未使用	120.5	良好
PSSX-27	3.2	1.0	0.50	0	1.3	100 mM MES (pH7.0)	157.5	115.9	0.5	0.1	15	125.3	未使用	未使用	110.0	良好
PSSX-28									0.5	0.25	15	125.2	未使用	未使用	120.0	良好
PSSX-29									0.5	0.5	15	126.5	未使用	未使用	118.0	良好
PSSX-30	12.9	4.1	0.40	0	1.3	50 mM MES (pH7.0)	157.5	177.9	0.5	0.0465	15	128.4	未使用	未使用	206.6	良好
PSSX-31	12.9	4.1	0.03	0	1.3	5 mM MES (pH7.0)	157.5	285.5	0.5	0.034875	15	129.8	未使用	未使用	280.3	良好
PSSX-32									0.5	0.06975	15	129.7	未使用	未使用	287.5	良好
PSSX-33									0.5	0.16275	15	129.6	未使用	未使用	343.0	軟凝集あり

[0209] （実施例２１）粒子のＣＯＯＨ量の測定と非特異反応抑制評価

実施例８で得られたＰＳＳＸ－２３、ＰＳＳＸ－２４、ＰＳＳＸ－２６～ＰＳＳＸ－３３の粒子表面ＣＯＯＨ量と粒子の非特異反応抑制能を評価した。結果を表１１に示す。処方を変えることで、１８ｎｍｏｌ／ｍｇから３３４ｎｍｏｌ／ｍｇまでのＣＯＯＨ量が制御可能であった。これらの粒子溶液に対してヒト血清を添加した結果、非特異反応の無いことの指標となる吸光度変化量１０００未満であったことから、ヒト血清に対する非特異反応は見られなかった。

[0210]

[表11]

表１１

粒子	粒子の物性値		粒子の非特異反応抑制能
	粒径 (nm)	COOH量 (nmol/mg)	吸光度変化量 (ΔODx10000)
PSSX-23	314.5	33	-20
PSSX-24	353.4	180	-190
PSSX-26	120.5	334	80
PSSX-27	110.0	47	20
PSSX-28	120.0	72	100
PSSX-29	118.0	253	30
PSSX-30	206.6	18	20
PSSX-31	280.3	25	-10
PSSX-32	287.5	63	90
PSSX-33	343.0	153	140

[0211] 本発明は上記実施の形態に制限されるものではなく、本発明の精神及び範囲から離脱することなく、様々な変更及び変形が可能である。従って、本発明の範囲を公にするために以下の請求項を添付する。

[0212] 本願は、２０１９年１０月１５日提出の日本国特許出願特願２０１９－１８８８４８を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てをここに援用する。

請求の範囲

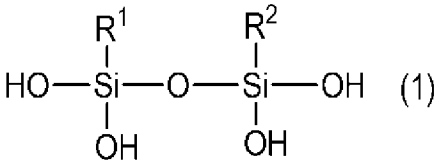
[請求項1] ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液を調製する第一の工程と、

前記第一の工程の後に、反応性化合物を加える第二の工程と、

を有し、

前記反応性化合物が、下記式（１）で表される粒子の製造方法。

[化1]



(1)

（式（１）においてＲ[1]及びＲ[2]はそれぞれ、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。）

[請求項2] 前記式（１）におけるＲ[1]及びＲ[2]のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基を有する請求項１に記載の粒子の製造方法。

[請求項3] 前記第一の工程の後に前記乳濁液を加熱する工程をさらに有する請求項１または２に記載の粒子の製造方法。

[請求項4] 前記ラジカル重合性モノマーは、ケイ素原子を含まないモノマーである請求項１～３のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項5] 前記ラジカル重合性モノマーは、スチレン系モノマー、アクリレート系モノマー、メタクリレート系モノマーからなる群より選択される少なくとも一つである請求項１～４のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項6] 前記ラジカル重合性モノマーは、スチレン、ブタジエン、酢酸ビニ

ル、塩化ビニル、アクリロニトリル、メタクリル酸メチル、メタクリロニトリル、アクリル酸メチルからなる群より選択される少なくとも一つである請求項１～５のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項7] 前記第一の工程において、さらにパラスチレンスルホン酸塩を混合して前記乳濁液を調製する、請求項１～６のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

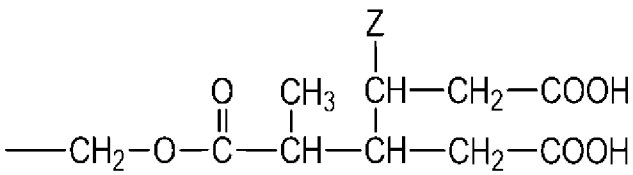
[請求項8] 前記水溶性ポリマーは、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、及びポリビニルピロリドン、ポリビニルピロリドン－ポリアクリル酸共重合体からなる群より選択される少なくとも一つである請求項１～７のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項9] 前記有機シラン化合物は、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、ｐ－スチリルトリメトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、３－メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、３－アクリロキシプロピルトリメトキシシランからなる群より選択される少なくとも一つである請求項１～８のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項10] 前記水系媒体は、ｐＨが６以上９以下である請求項１～９のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項11] 前記式（１）におけるR^1及びR^2のうち少なくとも一つは下記式（２）で示される構造を有する請求項１～１０のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[化2]

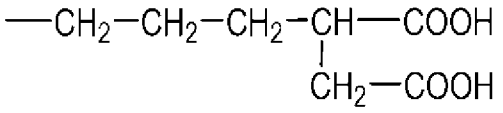


(2)

（前記式（２）においてＺは、直鎖または分岐の炭素数１以上１０以下の飽和または不飽和アルキル基を表す。）

[請求項12] 前記式（１）におけるR^1及びR^2のうち少なくとも一つは下記式（３）で示される請求項１～１０のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[化3]



(3)

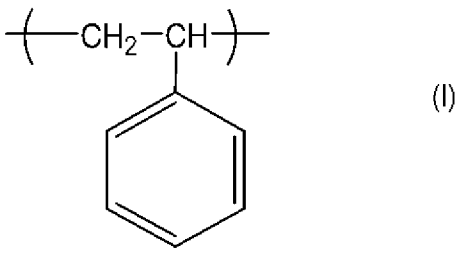
[請求項13] 前記第二の工程の後に、リガンドを添加する工程を有する、請求項１～１２のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項14] 請求項１～１３のいずれか１項に記載の製造方法により製造される粒子の平均粒径は１００ｎｍ以上４００ｎｍ以下であり、前記粒子の粒径の変動係数は５以下である請求項１～１２のいずれか１項に記載の粒子の製造方法。

[請求項15] 請求項１～１４のいずれか１項に記載の製造方法により製造される粒子を分散媒に分散する工程を含む、検査試薬の製造方法。

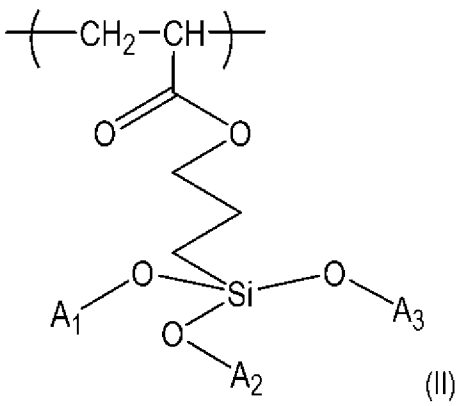
[請求項16] 下記式（Ｉ）で表される繰り返し単位と、下記式（ＩＩ）で表される繰り返し単位とを含む共重合体、及び下記式（ＩＩＩ）で表される構造を有する粒子。

[化4]



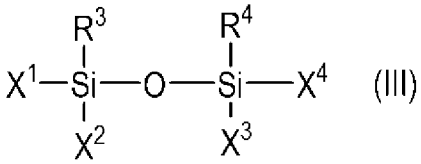
(I)

[化5]



(II)

[化6]



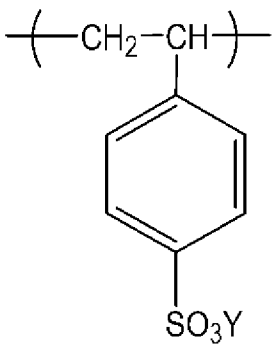
(III)

（式（ＩＩ）において、Ａ[1]乃至Ａ[3]は各々独立に、－Ｈ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$、－Ｏ－を介して式（ＩＩ）におけるＳｉと結合する結合手のいずれかであり、

式（ＩＩＩ）において、Ｘ[1]乃至Ｘ[4]は各々独立に、Ｏを介した隣り合う式（ＩＩＩ）で示される構造が有するＳｉとの結合手、式（ＩＩ）におけるＳｉに結合したＯとの結合手、またはヒドロキシ基を表し、式（ＩＩＩ）で示される構造単位の少なくとも一つは、前記共重合体との結合を有し、Ｒ[3]及びＲ[4]のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。）

[請求項17] 前記共重合体が、下記式（ＩＶ）で表される繰り返し単位をさらに含む請求項１６に記載の粒子。

[化7]

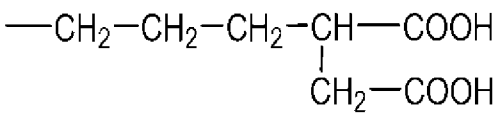


(IV)

（式（ＩＶ）においてＹは，Ｈ，Ｎａ，Ｋのいずれかである。）

[請求項18] 前記式（ＩＩＩ）におけるＲ[3]及びＲ[4]のうち少なくとも一つは下記式（３）で示される請求項１５～１７のいずれか１項に記載の粒子。

[化8]



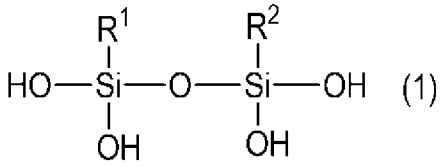
(3)

[請求項19] ラジカル重合性モノマー、アルコキシ基が結合したケイ素原子を有し、ラジカル重合性を有する有機シラン化合物、ラジカル重合開始剤、水溶性ポリマー、及び水系媒体を混合して乳濁液を調製する第一の工程と、

前記第一の工程の後に、反応性化合物を加える第二の工程と、によって製造される粒子であって、

前記反応性化合物が、下記式（１）で表される粒子。

[化9]



(1)

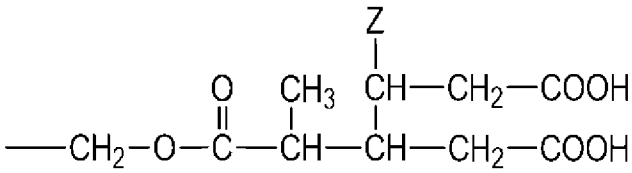
（前記式（１）においてＲ[1]及びＲ[2]はそれぞれ、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭

素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。）

[請求項20] 前記式（１）におけるR^1及びR^2のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基を有する請求項１９に記載の粒子。

[請求項21] 前記式（１）におけるR^1及びR^2のうち少なくとも一つは下記式（２）で示される構造を有する請求項１９または２０に記載の粒子。

[化10]

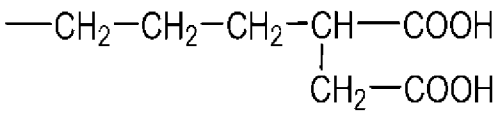


(2)

（前記式（２）においてＺは、直鎖または分岐の炭素数１以上１０以下の飽和または不飽和アルキル基を表す。）

[請求項22] 前記式（４）におけるR^3及びR^4はそれぞれのうち少なくとも一つは下記式（３）で示される構造を有する請求項１９または２０に記載の粒子。

[化11]



(3)

[請求項23] 前記ラジカル重合性モノマーは、ケイ素原子を含まないモノマーである請求項１９～２２のいずれか１項に記載の粒子。

[請求項24] 前記ラジカル重合性モノマーは、スチレン系モノマー、アクリレート系モノマー、及びメタクリレート系モノマーからなる群より選択される少なくとも一つである請求項１９～２３のいずれか１項に記載の粒子。

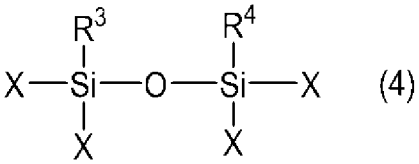
[請求項25] 前記ラジカル重合性モノマーは、スチレン、ブタジエン、酢酸ビニル、塩化ビニル、アクリロニトリル、メタクリル酸メチル、メタクリロニトリル、アクリル酸メチルからなる群より選択される少なくとも一つである請求項１９～２４のいずれか１項に記載の粒子。

[請求項26] 前記第一の工程において、さらにパラスチレンスルホン酸塩を混合して前記乳濁液を調製する、請求項１９～２５のいずれか１項に記載の粒子。

[請求項27] 前記水溶性ポリマーは、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、及びポリビニルピロリドン、ポリビニルピロリドン－ポリアクリル酸共重合体からなる群より選択される少なくとも一つである請求項１９～２６のいずれか１項に記載の粒子。

[請求項28] 下記式（４）で示される構造単位を一つ以上有する請求項１９～２７のいずれか１項に記載の粒子。

[化12]



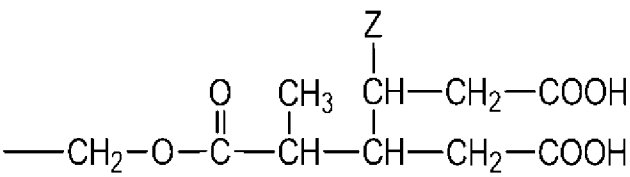
(4)

（式（４）においてＸはそれぞれ独立に、Ｏを介した隣り合う式（３）で示される構造が有するＳｉとの結合手、前記乳濁液より調製される前記粒子のコアとの結合手、またはヒドロキシ基を表し、式（４）で示される構造単位の少なくとも一つは、前記コアとの結合を有する。

Ｒ^{3}及びＲ^{4}のうち少なくともいずれか１つは、少なくとも一つのカルボキシ基、または少なくとも一つのアミノ基で置換された、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＯ－を含んでも良い炭素数１以上３０以下の直鎖または分岐アルキル基を表す。）

[請求項29] 前記式（４）におけるＲ^{3}及びＲ^{4}はそれぞれのうち少なくとも一つは下記式（２）で示される構造を有する請求項２８に記載の粒子。

[化13]

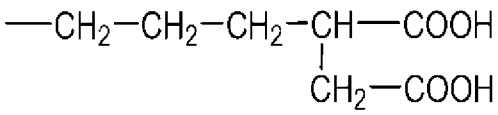


(2)

（式（２）においてＺは、直鎖または分岐の炭素数１以上１０以下の飽和または不飽和アルキル基を表す。）

[請求項30] 前記式（４）におけるＲ[3]及びＲ[4]はそれぞれのうち少なくとも一つは下記式（３）で示される構造を有する請求項２８に記載の粒子。

[化14]



(3)

[請求項31] 請求項１９～３０のいずれか１項に記載の粒子と、前記反応性化合物に結合したリガンドと、を有するアフィニティー粒子。

[請求項32] 前記リガンドが、抗体、抗原、及び核酸のいずれかである請求項３１に記載のアフィニティー粒子。

[請求項33] 請求項３１または３２に記載のアフィニティー粒子と、前記アフィニティー粒子を分散させる分散媒と、を有する体外診断用の検査試薬。

[請求項34] 前記リガンドが抗体または抗原であり、凝集法による検体中の抗原または抗体の検出に用いられる請求項３３に記載の検査試薬。

[請求項35] 請求項３３または３４に記載の検査試薬と、前記検査試薬を内包する筐体とを有する体外診断用の検査キット。

[請求項36] 検体中の標的物質の検出方法であって、

請求項３３または３４に記載の検査試薬に、検体を混合する工程を有する検出方法。

[請求項37] 凝集法による検体中の標的物質の検出方法であって、

請求項３３または３４に記載の検査試薬に、検体を混合して混合液を得る工程と、

前記混合液に、光を照射する工程と、

前記混合液に照射された光の、透過光または散乱光の少なくともいずれかを検出する工程と、を有する検出方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/038636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C08G 77/442(2006.01)i; G01N 21/82(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/545(2006.01)i
FI: C08G77/442; G01N21/82; G01N33/545 B; G01N33/543 581G
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)
C08G77/00-77/62; C08F2/00-299/08; G01N21/00-21/958; G01N33/00-33/98

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-330488 A (FUJIKURA KASEI CO., LTD.) 15 December 1998 (1998-12-15)	1-37
A	JP 9-31343 A (NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.) 04 February 1997 (1997-02-04)	1-37
P, A	WO 2019/208669 A1 (CANON INC.) 31 October 2019 (2019-10-31)	1-37
P, A	WO 2019/208672 A1 (CANON INC.) 31 October 2019 (2019-10-31)	1-37
P, A	WO 2019/208711 A1 (CANON INC.) 31 October 2019 (2019-10-31)	1-37
P, A	WO 2019/208670 A1 (CANON INC.) 31 October 2019 (2019-10-31)	1-37

☐ 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
24 December 2020 (24.12.2020)	12 January 2021 (12.01.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/038636

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 10-330488 A	15 Dec. 1998	(Family: none)	
JP 9-31343 A	04 Feb. 1997	(Family: none)	
WO 2019/208669 A1	31 Oct. 2019	JP 2019-189825 A	
WO 2019/208672 A1	31 Oct. 2019	(Family: none)	
WO 2019/208711 A1	31 Oct. 2019	(Family: none)	
WO 2019/208670 A1	31 Oct. 2019	JP 2019-191120 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/038636

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C08G 77/442(2006.01)i; G01N 21/82(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/545(2006.01)i
FI: C08G77/442; G01N21/82; G01N33/545 B; G01N33/543 581G

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））

C08G77/00-77/62; C08F2/00-299/08; G01N21/00-21/958; G01N33/00-33/98

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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）

CAplus/REGISTRY (STN)

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 10-330488 A (藤倉化成株式会社) 15.12.1998 (1998-12-15)	1-37
A	JP 9-31343 A (株式会社日本触媒) 04.02.1997 (1997-02-04)	1-37
P, A	WO 2019/208669 A1 (キヤノン株式会社) 31.10.2019 (2019-10-31)	1-37
P, A	WO 2019/208672 A1 (キヤノン株式会社) 31.10.2019 (2019-10-31)	1-37
P, A	WO 2019/208711 A1 (キヤノン株式会社) 31.10.2019 (2019-10-31)	1-37
P, A	WO 2019/208670 A1 (キヤノン株式会社) 31.10.2019 (2019-10-31)	1-37

☐ 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
24.12.2020	12.01.2021

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）
前田　孝泰 4J 9456
電話番号 03-3581-1101 内線 3457

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/JP2020/038636

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 10-330488 A	15.12.1998	（ファミリーなし）	
JP 9-31343 A	04.02.1997	（ファミリーなし）	
WO 2019/208669 A1	31.10.2019	JP 2019-189825 A	
WO 2019/208672 A1	31.10.2019	（ファミリーなし）	
WO 2019/208711 A1	31.10.2019	（ファミリーなし）	
WO 2019/208670 A1	31.10.2019	JP 2019-191120 A	