

(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
2019年1月17日(17.01.2019)



(10) 国際公開番号

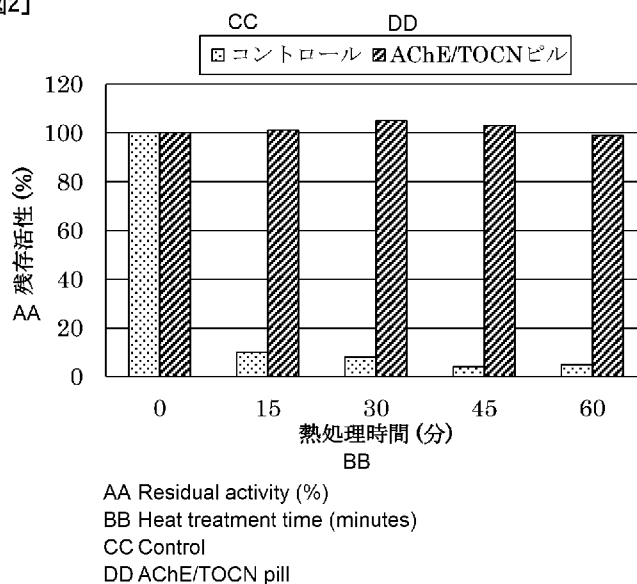
WO 2019/013100 A1

- (51) 国際特許分類:
C08L 1/02 (2006.01) C08J 3/21 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01) C08L 89/00 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01) C12N 11/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/025579
- (22) 国際出願日: 2018年7月5日(05.07.2018)
- (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 2017-136340 2017年7月12日(12.07.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人岐阜大学 (GIFU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 Gifu (JP). 第一工業製薬株式会社 (DAI-ICHI KOGYO SEIYAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6008873 京都府京都市下京区西七条東久保町5番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 寺本 好邦 (TERAMOTO Yoshikuni); 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu (JP). 村瀬 璃奈(MURASE Rina); 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu (JP). 橋本 賀之(HASHIMOTO Masayuki); 〒6008873 京都府京都市下京区西七条東久保町5番地 第一工業製薬株式会社内 Kyoto (JP). 北村 武大(KITAMURA Takeo); 〒6008873 京都府京都市下京区西七条東久保町5番地 第一工業製薬株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 正司 武嗣(SHOSU Takeshi); 〒6018391 京都府京都市南区吉祥院大河原町5番地 Kyoto (JP).

(54) Title: COMPOSITE COMPOSITION, METHOD FOR PRODUCING SAME AND BIOSENSOR

(54) 発明の名称: 複合組成物及びその製造方法、並びにバイオセンサ

【図2】



(57) Abstract: Provided is a composite composition which is capable of stabilizing biomolecules. A composite composition according to one embodiment of the present invention contains biomolecules and anion-modified cellulose nanofibers that have a cellulose I type crystal structure; and this composite composition has a moisture content of 20% by mass or less. This composite composition is able to be obtained by mixing biomolecules and an aqueous dispersion of anion-modified cellulose nanofibers that have a cellulose I type crystal structure and subsequently drying the mixture until the moisture content thereof comes to 20% by mass or less. This composite composition is able to be used, for example, for a biosensor.

(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, 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, 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, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 生体分子を安定化することができる複合組成物を提供する。実施形態に係る複合組成物は、セルロースⅠ型結晶構造を有しアニオン変性されたセルロースナノファイバーと、生体分子と、を含み、含水率が20質量%以下である複合組成物である。該複合組成物は、セルロースⅠ型結晶構造を有しアニオン変性されたセルロースナノファイバーの水分散液と生体分子とを混合し、含水率が20質量%以下になるまで乾燥することにより得られる。該複合組成物は、例えばバイオセンサに用いることができる。

明 細 書

発明の名称：複合組成物及びその製造方法、並びにバイオセンサ 技術分野

[0001] 本発明は、セルロースナノファイバーと生体分子を含む複合組成物、及びそれを用いたバイオセンサに関するものである。

背景技術

[0002] バイオセンシングは、生体分子の認識機構を利用して様々な分子等を検出・計測する技術である。例えば、バイオチップは生体分子の相互作用を活用した診断、検査デバイスであり、疾病のウィルス感染の早期診断、食品や水の微生物や細菌の検査などに用いられている。生体分子としてはタンパク質をはじめとする生理活性物質が用いられ、酵素－基質、抗原－抗体、ホルモーン－レセプターなどの特異的結合や相互作用により検出、計測する。これらのバイオチップは様々な場所、環境、条件で利用されるため、外部環境に影響されない保存や使用が望ましい。タンパク質、酵素、抗体、核酸などの生体分子は加熱により変性や失活を受けやすく、また、非加熱下であっても酸化などにより経時的に活性が低下する。従って、例えばバイオチップなどのバイオセンサにこれらの生体分子を使用する場合、加熱条件下でも安定に保存でき、経時的に活性を失わない保存方法が求められる。

[0003] 生体分子を安定化する技術として、非特許文献1には、プルランを用いたアセチルコリンエステラーゼ（AChE）の保存安定化技術が報告されている。非特許文献1では、プルランとAChEとを組み合わせたタブレットの加熱安定性を評価し、タブレットが安定であることが示されている。しかしながら、プルランは水溶性の多糖類であるため、バイオチップなどの検査デバイスとしての使用を想定する場合、耐水性の課題が発生し得る。

[0004] なお、セルロース繊維とタンパク質を含む組成物として、特許文献1には、セルロースナノファイバーとタンパク質と水からなる食品組成物が記載されている。しかしながら、特許文献1は、多量の水を含有するゲルを対象と

するものであって生体分子を安定化させる技術ではなく、実施例に記載されている水の含有量も70質量%以上と高い。

[0005] 特許文献2には、炭水化物ベース基材とタンパク質を含む複合積層材料が記載され、炭水化物ベース基材としてセルロースを用いることが記載されている。しかしながら、特許文献2には、セルロースⅠ型結晶構造を持つセルロースナノファイバーを用いることは記載されておらず、また、それにより生体分子を安定化させることも記載されていない。

[0006] 特許文献3には、セルロース繊維を酵素で処理してから解繊することでセルロースナノファイバーを得ることが記載されている。しかしながら、酵素は解繊に先立って失活させているため、解繊後にはもはや生体分子が存在しているとはいえず、よって生体分子とセルロースナノファイバーを複合させることは記載されていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2016-63757号公報

特許文献2：特開2017-12762号公報

特許文献3：特開2017-2136号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Sana Jahanshahi-Anbuhi, 他9名、” Pullulan Encapsulation of Labile Biomolecules to Give Stable Bioassay Tablets” , Angew. Chem. Int. Ed., 53, 6155-6158 (2014)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の実施形態は、生体分子を安定化することができる複合組成物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

[0010] 本発明の実施形態に係る複合組成物は、セルロースⅠ型結晶構造を有しア

ニオン変性されたセルロースナノファイバーと、生体分子と、を含む複合組成物であって、含水率が20質量%以下である複合組成物である。

[0011] 本発明の実施形態に係る複合組成物の製造方法は、セルロースⅠ型結晶構造を有しアニオン変性されたセルロースナノファイバーの水分散液と生体分子とを混合し、含水率が20質量%以下になるまで乾燥する、複合組成物の製造方法である。

[0012] 本発明の実施形態に係るバイオセンサは、上記複合組成物を含むものである。

発明の効果

[0013] 本発明の実施形態に係る複合組成物であると、セルロースナノファイバーにより生体分子を安定化することができる。そのため、該複合組成物を例えばバイオセンサに用いたときに、生体分子を安定化させて失活を抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施例に係るAChE／TOCNピルの熱重量分析を示すグラフ

[図2]実施例に係るAChE／TOCNピルの熱安定性評価結果を示すグラフ

[図3]参考例に係るTOCN水分散液中AChEの熱安定性評価結果を示すグラフ

[図4]実施例に係るAChE／TOCN紙デバイスの室温安定性評価結果を示すグラフ

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0016] 本実施形態に係る複合組成物は、セルロースⅠ型結晶構造を有するアニオン変性されたセルロースナノファイバーと、生体分子と、を含むものである。セルロースナノファイバーからなる乾燥皮膜は水不溶性繊維からなる非常に緻密な皮膜を形成し、優れた酸素バリア性を示すことから、酸化によって失活しやすい生体分子を安定化することができる。また、生体分子は、セルロースナノファイバーの乾燥皮膜により加熱条件下において安定化される。

さらに、本実施形態の複合組成物の生化学反応場の観点において、アニオン変性されたセルロースナノファイバーは親水性であるため、乾燥状態の該複合組成物に水が付着し、水に膨潤させることにより、生体分子による反応場を再び与え、生体分子の活性発現に寄与し得る。即ち、該セルロースナノファイバーは水不溶性であるため、バイオセンサなどの検査デバイスとしての使用において、水への適度な親和性を発揮して従来技術で課題となっていた耐水性の問題を解消できる可能性がある。更には、該セルロースナノファイバーの水分散液がチキソトロピック性を有することにより、例えばインクジェット印刷による複合組成物の成形も可能となり、製造プロセスの簡略化を図れる可能性もある。

[0017] 本実施形態では、セルロース繊維としてセルロースナノファイバーを用いる。セルロースナノファイバーは、ナノメートルレベルの繊維径を持つセルロース繊維であり、その数平均繊維径は、例えば、3～400nmでもよく、3～150nmでもよく、3～80nmでもよい。

[0018] セルロースナノファイバーの数平均繊維径は、次のようにして測定することができる。すなわち、固形分率で0.05～0.1質量%のセルロースナノファイバーの水分散体を調製し、その水分散体を、親水化処理済みのカーボン膜被覆グリッド上にキャストして、透過型電子顕微鏡（TEM）の観察用試料とする。そして、構成する繊維の大きさに応じて5000倍、10000倍あるいは50000倍のいずれかの倍率で電子顕微鏡画像による観察を行う。その際に、得られた画像内に縦横任意の画像幅の軸を想定し、その軸に対し、20本以上の繊維が交差するよう、試料及び観察条件（倍率等）を調節する。そして、この条件を満たす観察画像を得た後、この画像に対し、1枚の画像当たり縦横2本ずつの無作為な軸を引き、軸に交錯する繊維の繊維径を目視で読み取っていく。このようにして、最低3枚の重複しない表面部分の画像を、電子顕微鏡で撮影し、各々2つの軸に交錯する繊維の繊維径の値を読み取る（したがって、最低20本 $\times$ 2 $\times$ 3＝120本の繊維径の情報が得られる）。このようにして得られた繊維径のデータにより、数平均

繊維径を算出する。

- [0019] セルロースナノファイバーの平均アスペクト比は、例えば、10～1000でもよく、50～1000でもよく、100～1000でもよい。平均アスペクト比は、以下の方法で測定することができる。すなわち、セルロースナノファイバーを親水化処理済みのカーボン膜被覆グリッド上にキャストした後、2%ウラニルアセテートでネガティブ染色したTEM像（倍率：10000倍）から、セルロースナノファイバーの短幅の方の数平均幅、及び、長幅の方の数平均幅を観察し、これらの値を用いて平均アスペクト比を下記式に従い算出する。

平均アスペクト比＝長幅の方の数平均幅（nm）／短幅の方の数平均幅（nm）

- [0020] セルロースナノファイバーは、解繊処理を行うことにより得られる。解繊処理は、後述するアニオン基を導入してから実施してもよく、導入前に実施してもよい。解繊処理としては、例えば、高速回転下でのホモキサー、高圧ホモジナイザー、超音波分散処理機、ビーター、ディスク型レファイナー、コニカル型レファイナー、ダブルディスク型レファイナー、グラインダー等を用いて、セルロース繊維の水分散液を処理することにより行うことができ、セルロースナノファイバーの水分散液を得ることができる。

- [0021] 本実施形態では、セルロースナノファイバーとして、水不溶性の観点から、セルロースⅠ型結晶構造を有するものが用いられる。セルロースナノファイバーを構成するセルロースがⅠ型結晶構造を有することは、例えば、広角X線回折像測定により得られる回折プロファイルにおいて、 $2\theta = 14^\circ \sim 17^\circ$ 付近と、 $2\theta = 22^\circ \sim 23^\circ$ 付近の2つの位置に典型的なピークをもつことから同定することができる。

- [0022] セルロースナノファイバーとしては、セルロース分子中のグルコースユニットにアニオン基が導入されたアニオン変性セルロースナノファイバーが用いられる。アニオン基としては、例えば、カルボキシル基、リン酸基、スルホン酸基、及び硫酸基からなる群から選択される少なくとも1種が挙げられ

る。本明細書において、カルボキシル基は、酸型（ $-\text{COOH}$ ）だけでなく、塩型、即ちカルボン酸塩基（ $-\text{COOX}$ 、ここでXはカルボン酸と塩を形成する陽イオン）も含む概念である。リン酸基、スルホン酸基及び硫酸基についても、同様に、酸型だけでなく、塩型も含む概念である。

[0023] 一実施形態において、アニオン基としてはカルボキシル基が好ましい。カルボキシル基を含有するセルロースナノファイバーとしては、例えば、セルロース分子中のグルコースユニットの水酸基を酸化してなる酸化セルロースナノファイバーや、セルロース分子中のグルコースユニットの水酸基をカルボキシメチル化してなるカルボキシメチル化セルロースナノファイバーが挙げられる。

[0024] 好ましい実施形態に係る酸化セルロースナノファイバーとしては、セルロース分子中のグルコースユニットのC 6 位の水酸基が選択的に酸化されてカルボキシル基に変性されたものが挙げられる。酸化セルロースナノファイバーは、木材パルプなどの天然セルロースをN-オキシラジカル化合物の存在下、共酸化剤を用いて酸化させ、解繊（微細化）処理することにより得られる。N-オキシラジカル化合物としては、一般に酸化触媒として用いられるニトロキシラジカルを有する化合物が用いられ、例えばピペリジニオキシラジカルであり、特に2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジニオキシラジカル（TEMPO）または4-アセトアミド-TEMPOが好ましい。TEMPOで酸化されたセルロースナノファイバーは、一般にTEMPO酸化セルロースナノファイバーと称されており、本実施形態でも使用することができる。なお、酸化セルロースナノファイバーは、カルボキシル基とともに、アルデヒド基又はケトン基を有していてもよいが、アルデヒド基及びケトン基を実質的に有していないことが好ましい。

[0025] セルロースナノファイバーにおけるアニオン基の量は、特に限定されず、例えば、 $0.05 \sim 3.0 \text{ mmol/g}$ でもよく、 $0.5 \sim 2.5 \text{ mmol/g}$ でもよい。アニオン基の量は、例えば、カルボキシル基の場合、乾燥質量を精秤したセルロース試料から $0.5 \sim 1$ 質量%スラリーを60 mL調製

し、0.1 Mの塩酸水溶液によってpHを約2.5とした後、0.05 Mの水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、電気伝導度測定を行い、pHが約11になるまで続け、電気伝導度の変化が緩やかな弱酸の中和段階において消費された水酸化ナトリウム量（V）から、下記式に従い求めることができる。リン酸基についても、同様の電気伝導度測定により測定することができる。その他のアニオン基についても公知の方法で測定すればよい。

アニオン基量(mmol/g) = V (mL) × [0.05 / セルロース試料質量(g)]

[0026] 本実施形態において生体分子としては、例えば、タンパク質、核酸、脂質、ビタミン、ホルモン、糖及び糖鎖などの各種生体高分子が挙げられる。より詳細には、酵素－基質、抗原－抗体、ホルモナーレセプター、糖鎖－レクチンなどの特異的結合や相互作用等の反応に関与する物質である生理活性物質が挙げられ、このような活性を持つ生体分子が好ましく用いられる。生体分子としては、例えば、酵素、抗体タンパク質、レセプタータンパク質、ホルモン、サイトカイン、レクチン、及び、核酸からなる群から選択される少なくとも一種が挙げられる。本実施形態では、セルロースナノファイバーにより酸化や加熱に対する安定化効果が得られるため、酸化及び／又は熱により失活し得る生体分子が好ましく用いられる。なお、ここでいうタンパク質には、オリゴペプチドやポリペプチドも含まれる。

[0027] 一実施形態に係る生体分子である酵素としては、特に限定されず、加水分解酵素、酸化還元酵素、転移酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどが挙げられる。一実施形態に係る加水分解酵素として、コリンエステラーゼ（例えば、アセチルコリンエステラーゼ、ブチリルコリンエステラーゼなど）、プロテアーゼ、アミラーゼなどを用いてもよい。抗体タンパク質としては、免疫グロブリンが用いられる。核酸としては、1本鎖であっても2本鎖であってもよく、人工及び天然を問わず、RNA、DNA、DNA／RNAハイブリッドなどが挙げられる。

[0028] 一実施形態に係る複合組成物において、生体分子は、上記セルロースナノファイバーにより包まれており、これにより安定化されている。すなわち、

一実施形態に係る複合組成物は、上記セルロースナノファイバーと、該セルロースナノファイバー中にカプセル化、即ち埋め込まれた生体分子とを含む複合体である。生体分子は、失活していない状態でセルロースナノファイバー中に保持されており、セルロースナノファイバーにより包まれることで、酸化及び／又は熱による失活が抑制され、即ち安定化されている。

[0029] 実施形態に係る複合組成物において、セルロースナノファイバーと生体分子の含有比は特に限定されず、例えばセルロースナノファイバー100質量部に対して、生体分子が0.001～30質量部でもよく、0.01～5質量部でもよい。

[0030] 実施形態に係る複合組成物において、セルロースナノファイバーの含有量は、特に限定されず、75～95質量%でもよく、80～90質量%でもよい。

[0031] 実施形態に係る複合組成物は、含水率が20質量%以下である。このように水の含有量が少ないことにより、セルロースナノファイバーが酸素バリア性を発現し、酸化により失活しやすい生体分子を安定化でき、また、生体分子の熱による安定化効果を高めることができる。複合組成物の含水率は、5～20質量%であることが好ましく、より好ましくは10～15質量%である。なお、複合組成物の含水率は、後述するように紙などの支持体に複合組成物を一体化した状態で形成する場合でも、当該支持体を除く複合組成物自体での含水率である。

[0032] 実施形態に係る複合組成物には、上述したセルロースナノファイバー、生体分子及び水の外、本発明の効果を阻害しない範囲において、例えば、無機系及び／又は有機系のフィラー類、粘土鉱物類、色素などの着色剤、塩類、pH調整剤、油剤、水溶性高分子、界面活性剤、乾燥塗膜の造膜性を改良する目的で添加される親水性の溶剤類の乾燥残留物を含んでいても良い。例えば、造膜性を改良する親水性の溶剤としてはアルコール類、セロソルブ類、カルピトール類、グリコール類、グリコールモノフェニルエーテル類、フェニルアルコール類、フェニルカルボン酸エステル類、オキシカルボン酸フェ

ニルエステル類等を含んでもよい。その他、耐光剤、酸化防止剤、防腐剤、無機物等を含んでもよい。

[0033] 実施形態に係る複合組成物は、加熱条件下において生体分子が安定であることが好ましい。具体的には、加熱条件下とは、複合組成物に外部から熱を加えている状態を指すが、本実施形態においては、i) 初期温度 T_1 から昇温して温度 T_2 に至る昇温加熱条件、及び、ii) 初期温度 T_1 から昇温して温度 T_3 に至った後、温度 T_3 を所定時間維持する恒温加熱条件の2つがある。本実施形態において、想定される取り扱い条件は次の通りである。

[0034] 一般に冷凍温度と称される -15°C 以下乃至は -20°C 以下の温度、即ち、通常、生体分子を凍結或いは冷凍した状態から、氷の融解温度(0°C)に至る操作がある。更には、氷の溶融温度を超えて常温(20°C 乃至は 25°C)に至る操作がある。更には、意図的、非意図的を問わず、更に高温で取り扱われる操作が考えられる。高温で取り扱われる操作として、具体的には、意図的、非意図的を問わず、夏期屋内、夏期屋外、屋外車中、直射日光照射、冷凍庫、冷蔵庫又はエアコンディショナーの稼働が停止している状態での取り扱いが想定される。また、停電時、災害時、戦地使用なども想定される。

[0035] なお、起点としての初期温度 T_1 から昇温され温度 T_2 に至る温度変化は ΔT と定義される。例えば、本実施形態において、生体分子を -20°C から 0°C に昇温した場合、 $\Delta T = 20^{\circ}\text{C}$ である。また、同じく -20°C から 25°C に昇温した場合、 $\Delta T = 45^{\circ}\text{C}$ である。更に、 40°C から 80°C に昇温した場合、 $\Delta T = 40^{\circ}\text{C}$ である。

[0036] 複合組成物における生体分子の熱安定性については、複合組成物に対する熱処理を 80°C 、60分間として、熱処理していない複合組成物における生体分子の活性を100%としたときの熱処理後における比活性が70%以上であることが好ましく、より好ましくは80%以上である。

[0037] 本実施形態に係る複合組成物を製造するに際しては、上記セルロースナノファイバーの水分散液と生体分子とを混合し、含水率が20質量%以下にな

るまで乾燥すればよい。

[0038] セルロースナノファイバーの水分散液は、上記のように、天然セルロースにアニオン基を導入してから解繊処理を実施し、又は、天然セルロースを解繊してからアニオン基を導入することにより作製することができる。当該水分散液中におけるセルロースナノファイバーの濃度は、特に限定されず、例えば0.01～5質量%でもよく、0.05～3質量%でもよく、0.1～1質量%でもよい。

[0039] セルロースナノファイバーの水分散液に、生体分子を添加し混合する。生体分子は、セルロースナノファイバーの水分散液に対して、そのまま添加してもよく、あるいは、予め緩衝液に溶解させた生体分子溶液を添加してもよい。

[0040] セルロースナノファイバーの水分散液と生体分子の混合後に、混合液を乾燥させることにより、実施形態に係る複合組成物が得られる。

[0041] 複合組成物は、混合液をフッ素樹脂シートなどの離型性基体上に付与し乾燥して、乾燥物を離型性基体から取り出すことにより、それ単独で形成されてもよい。その形態は特に限定されず、シート状でもよく、タブレットやピルなどの錠剤状でもよい。

[0042] あるいは、複合組成物は、混合液を紙などの支持体上に付与し乾燥することにより、支持体に一体化された状態で形成されてもよい。支持体に付与する方法としては、特に限定されないが、セルロースナノファイバー水分散液の持つチキソトロピック性を利用して、例えばインクジェット印刷により複合組成物を支持体上に形成してもよい。

[0043] 乾燥方法は、例えば、加熱乾燥方式、減圧乾燥方式、送風乾燥方式、マイクロ波乾燥方式、赤外線乾燥方式、凍結乾燥方式、ろ過脱水方式等が用いられる。複数の方式を組み合わせで乾燥してもよい。乾燥温度は、特に限定されないが、加熱乾燥方式の場合を例示するならば、生体分子の失活を抑制するために、40℃以下であることが好ましく、より好ましくは5～35℃である。また、乾燥時間は特に限定されず、加熱温度は常に一定でもよく、段

階的に上昇させても良い。

[0044] 実施形態に係る複合組成物は、例えばバイオセンサに用いることができる。バイオセンサは、生体分子の認識機構を利用して様々な分子等を検出・計測するセンシングデバイスであり、その構成要素として該複合組成物を用いることができる。バイオセンサの好適な一例として、生体分子を基板（即ち、支持体）上に多数固定したバイオチップが挙げられ、該生体分子として上記複合組成物を基板上に多数固定することにより、一実施形態に係るバイオチップを構成することができる。また、上記のようにインクジェット印刷が可能であることから、マイクロ流体ペーパー分析デバイス（ μ PAD）に利用することもできる。

実施例

[0045] 以下、実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0046] （１）試薬

- ・TOCN：セルロースⅠ型結晶構造を有するTEMPO酸化セルロースナノファイバー、1.1質量%水分散液、第一工業製薬（株）製「レオクリスタ」、数平均繊維径＝4 nm、平均アスペクト比＝280、アニオン基量＝1.9 mmol/g

- ・Tris：トリスヒドロキシメチルアミノメタン、SIGMA-ALDRICH製

- ・IDA：酢酸インドキシル、SIGMA-ALDRICH製

- ・AChE：アセチルコリンエステラーゼ、デンキウナギ由来、200-1000Unit/mg protein、SIGMA-ALDRICH製

- ・メタノール：関東化学（株）製

- ・1M NaOH：水酸化ナトリウム水溶液（1M、和光純薬工業（株）製）

- ・6M HCl：濃塩酸（6M、和光純薬工業（株）製）

- ・塩化ナトリウム：ナカライテスク（株）製

これらは特に精製せずに使用した。

[0047] (2) 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) の調製

Tris を 6.057 g ビーカーに計り取り、Milli Q 水 400 mL を添加し、マグネチックスターラーを用いて Tris を溶解させた。ここに 6 M HCl を一滴ずつ滴下し、pH が 8.0 となるよう調製した。溶液を 500 mL メスフラスコに移し、Milli Q 水で希釈して 100 mM Tris-HCl バッファーを調製した。pH が大きくずれた場合は、1 M NaOH および 6 M HCl を滴下し再調製した。

[0048] (3) 酵素反応用溶液の調製

IDA 溶液は使用する当日に作製した。IDA をエッペンチューブ中で 80 mM となるようそれぞれメタノールを加え、ボルテックスミキサーで混合した。AChE は -20℃ で保管したものを使用した。-20℃ で保管した AChE は、室温で、エッペンチューブ中で 250 U/mL となるよう計量し、100 mM Tris-HCl バッファーを加え、ボルテックスミキサーで混合し、冷凍保存した。

[0049] (4) AChE/TOCN ピルの調製

ピル 1 つあたり、0.5 質量% の TOCN 水分散液 400 μ L と 250 U/mL の AChE 溶液 1 μ L を遠沈管に取り、ボルテックスミキサーで混合した。これをマイクロピペットで 401 μ L ずつ、テフロン（登録商標）シート上に吐出して、室温で 2 日間自然乾燥させて、実施例に係る複合組成物として AChE/TOCN ピルを調製した。得られたピルはサンプル管に入れ、室温で保存した。AChE/TOCN ピルは、TOCN 100 質量部に対して AChE を 0.06 質量部含有するものであった。

[0050] (5) AChE/TOCN ピルの熱重量分析

上記 (4) で調製した AChE/TOCN ピルについて、熱重量分析装置（セイコーインスツル（株）製、TGDTA6300）を用いて熱重量分析を行った。AChE/TOCN ピルの TG（熱重量曲線）及び DTG（微分熱重量曲線）は図 1 に示す通りであり、AChE/TOCN ピルの含水率は 1.3 質量% であった。

[0051] (6) TOCNピル中のAChEの熱安定性評価

実施例に係る室温乾燥2日後のAChE／TOCNピルを用いた。熱処理は、AChE／TOCNピルを室温から80℃に昇温して行ない、80℃で15, 30, 45, 60分間熱処理した。熱処理が0分間のAChE／TOCNピルは、室温乾燥2日後のAChE／TOCNピル（室温から80℃に昇温する前のAChE／TOCNピル）を用いた。コントロールとして、250U／mLのAChE溶液1μLを100mMTri s-HClバッファ-195μLに溶解させ、同様の熱処理を行った。熱処理後のAChE／TOCNピルおよびコントロールのAChE溶液をウェルプレートにそれぞれ入れ、酵素反応（IDAを基質とする加水分解反応）を行った。詳細には、AChE／TOCNピルには100mMTri s-HClバッファ-195μLと80mMIDA溶液を5μL加え、コントロールには80mMIDA溶液を5μL加え、30秒間振盪し、1時間酵素反応を行った。このウェルプレートをマイクロプレートリーダー（Tecan製、Spark 10M）に入れ、インディゴの吸収ピーク位置（605nm）における吸光度を測定した。熱処理を行っていない試料の活性を100%とし、熱処理後のAChEの比活性を算出した。測定は3連で行った。

[0052] 熱安定性評価の結果を図2に示す。コントロールでは、80℃の加熱処理でAChEが失活したのに対し、実施例に係るTOCNピル中のAChEは、1時間加熱した後も酵素活性を維持していた。これにより、高温下においてもAChE／TOCNピルを安定的に貯蔵・輸送できると考えられる。

[0053] (7) TOCN水分散液中のAChEの熱安定性評価（参考例）

0.5質量%のTOCN水分散液400μLと250U／mLのAChE溶液1μLをエッペンチューブに取り、ボルテックスミキサーで混合した（0.5%TOCN／AChE）。また、1質量%のTOCN水分散液400μLと250U／mLのAChE溶液1μLをエッペンチューブに取り、ボルテックスミキサーで混合した（1%TOCN／AChE）。更に、コントロールとして、100mMTri s-HClバッファ-400μLと250

U/mLのAChE溶液1 μ Lをエッペンチューブに取り、ボルテックスミキサーで混合した。

[0054] これら3種の混合液について60℃で0, 5, 10, 15分間熱処理を行い、熱処理後の混合液をウェルプレートにそれぞれ入れ、80mMIDA溶液を5 μ L加えて、上記(6)の熱安定性評価と同様に、酵素反応を行って吸光度を測定した。熱処理を行っていない試料の活性を100%とし、熱処理後のAChEの比活性を算出した。測定は3連で行った。

[0055] 結果は図3に示す通りである。TOCN分散液中では、AChEは熱処理により容易に失活した。これは、TOCN濃度を上げても同様であった。よって、TOCNによる失活抑制効果は、含水率の低い乾燥状態で発現されると考えられる。

[0056] (8) TOCNピル中のAChEの室温安定性評価

上記(4)で調製した実施例に係るAChE/TOCNピルを室温にてサンプル管中で1ヶ月保存し、1ヶ月経過後におけるAChEの酵素活性を上記(6)と同様に調べた。その結果、TOCNピル中のAChEの活性は室温で少なくとも1ヶ月間保持されていた。TOCNで複合化していないAChEを空气中・室温で放置すると数時間で酵素活性が失活し、バッファー溶液中でも通常約3日で活性を失うことに鑑みると、TOCNによりカプセル化することで不安定な生体分子の酸化による失活を効果的に抑制できることが分かる。

[0057] (9) AChE/TOCN紙デバイスの調製

0.5質量%のTOCN水分散液400 μ Lと250U/mLのAChE溶液1 μ Lを遠沈管に取り、ボルテックスミキサーで混合した。これをマイクロピペットで401 μ Lずつ、濾紙上に滴下し、室温で2日間自然乾燥させて、実施例に係るAChE/TOCN紙デバイスを調製した。得られた紙デバイスはチャック付きポリ袋に入れ、室温で保存した。この紙デバイスについて、上記(5)と同様に熱重量分析を行ったところ、支持体である濾紙を除いた複合組成物中における含水率は18質量%であった。

[0058] (10) TOCN紙デバイス中のAChEの室温安定性評価

実施例に係るAChE／TOCN紙デバイスを室温で28日間保存して室温での安定性を評価した。コントロールとして、250U／mLのAChE溶液1μLのみを濾紙上に滴下し、自然乾燥して紙デバイスを調製し、これをチャック付きポリ袋に入れて室温で保存し、同様に室温での安定性を評価した。

[0059] 酵素活性は、AChE／TOCN紙デバイス及びコントロールの紙デバイスともに、100mMTri s-HClバッファーを195μLと80mMIDA溶液を5μL加え、酵素反応を行った。1時間以上乾燥させた後、紙デバイスの画像をスキャナ(24bitカラー、解像度800dpi)でパソコンに取り込み、生成したインディゴの青色強度を画像処理ソフト(ImageJ)で測定することにより、室温保存前の試料の活性を100%とし、保存後のAChEの比活性を算出した。

[0060] 結果は図4に示す通りであり、コントロールの紙デバイスでは、28日間の保存で比活性が約15%まで大きく低下したのに対し、実施例に係るAChE／TOCN紙デバイスでは比活性が90%程度保持されていた。従って、紙上でも、TOCNにより不安定分子の失活を抑制できた。

[0061] (11) インクジェット印刷による複合組成物の形成

0.5質量%のTOCN水分散液949.76μLに対し、250U／mLのAChE溶液50μLを添加混合し、得られたAChE／TOCN水分散液に、表面張力の調整剤として非イオン界面活性剤(オクチルフェノールエトキシレート、トリトンX-100)0.24μLを添加し、インクジェット用インクを調製した。比較として、250U／mLのAChE溶液50μLに100mMのTri s-HClバッファー950μLを添加したAChEインクも調製した。これをインクジェット装置((株)マイクロジェット製「Labojet-1000」)に充填し、濾紙上に岐阜大学のロゴマーク(タテ約5mm×ヨコ約15mm)を印刷し、乾燥させることにより、濾紙上に実施例に係る複合組成物をロゴマーク状に形成した。乾燥後、印字

部上に適量の100mMTriS-HClバッファーと80mMIDA溶液を滴下し、インディゴが生成して呈色する様子を観察した。TOCNを含まないインクについても同様にインクジェット印刷を行い、酵素反応後の外観を比較した。

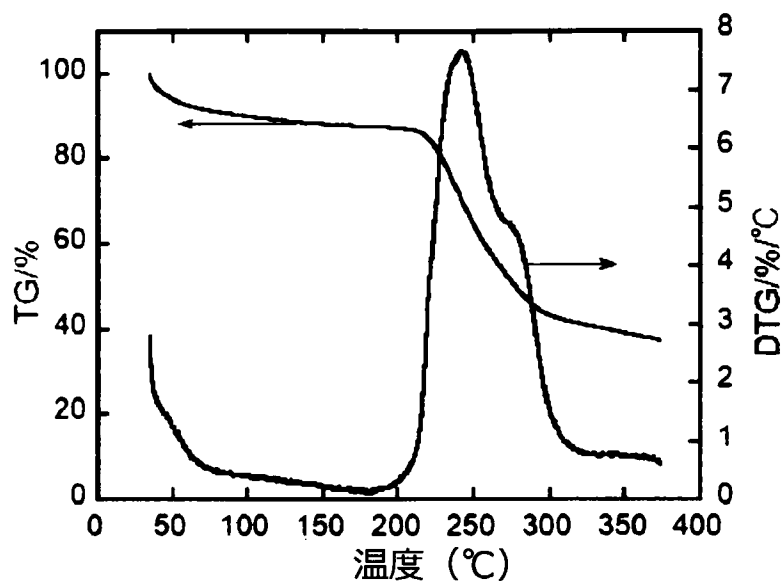
[0062] その結果、TOCNを含むインクを用いて印刷したもの（実施例）では、インクが良好に吐出され、微細なロゴマークが形成されていた。また、TOCNを含まないインクでは、インディゴが滲み、通水によって酵素が容易に流出したのに対し、実施例に係るTOCN含有インクで印字したものでは、インディゴがロゴマーク状に生成していた。TOCNの乾燥固化物は、ナノファイバー間に水素結合を形成するため、水を添加しても再分散しにくいという特徴がある。そのため、通水時にTOCN層は膨潤し、徐々に反応液が浸透することで酵素反応場となることが考えられる。このことから、通水してもTOCN層は流れず、酵素が主にTOCN層内に保持されていることが示された。マイクロ流体ペーパー分析デバイスにおいては、反応に関与する分子を検出部位に固定化することが重要である。上記結果から、TOCNは生体分子を安定貯蔵するばかりでなく、検出部位からの生体分子の流出を抑制する機能も併せ持つことから、マイクロ流体ペーパー分析デバイスに好適であることが分かった。

[0063] 以上、本発明のいくつかの実施形態を説明したが、これら実施形態は、例として提示したものであり、発明の範囲を限定することは意図していない。これら実施形態は、その他の様々な形態で実施されることが可能であり、発明の要旨を逸脱しない範囲で、種々の省略、置き換え、変更を行うことができる。これら実施形態やその省略、置き換え、変更などは、発明の範囲や要旨に含まれると同様に、特許請求の範囲に記載された発明とその均等の範囲に含まれるものである。

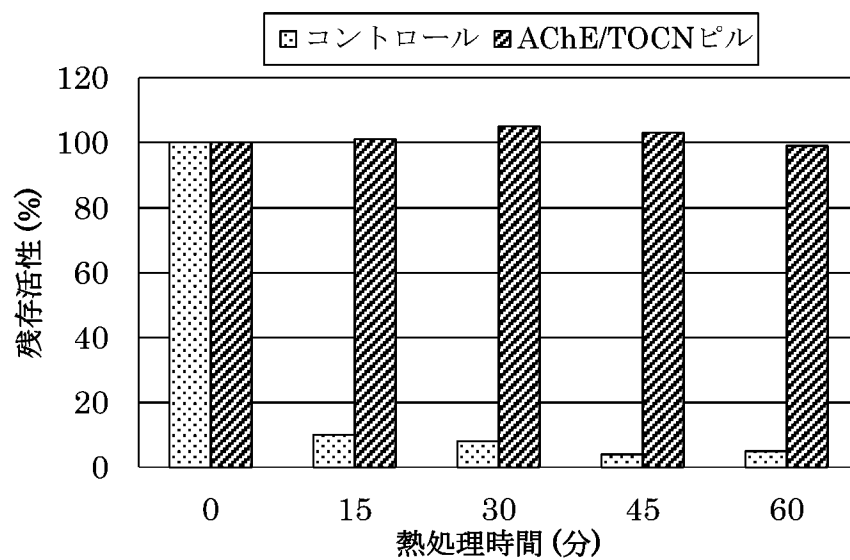
請求の範囲

- [請求項1] セルロースⅠ型結晶構造を有しアニオン変性されたセルロースナノファイバーと、生体分子と、を含む複合組成物であって、含水率が20質量%以下である複合組成物。
- [請求項2] 前記生体分子が前記セルロースナノファイバーにより包まれている、請求項1に記載の複合組成物。
- [請求項3] 前記セルロースナノファイバーがアニオン基としてカルボキシル基を含有する、請求項1又は2に記載の複合組成物。
- [請求項4] 前記セルロースナノファイバーは、セルロース分子中のグルコースユニットのC6位の水酸基が選択的に酸化されてカルボキシル基に変性されたものである、請求項3に記載の複合組成物。
- [請求項5] 前記生体分子がタンパク質である、請求項1～4のいずれか1項に記載の複合組成物。
- [請求項6] 前記タンパク質が酵素であることを特徴とする請求項5に記載の複合組成物。
- [請求項7] セルロースⅠ型結晶構造を有しアニオン変性されたセルロースナノファイバーの水分散液と生体分子とを混合し、含水率が20質量%以下になるまで乾燥する、複合組成物の製造方法。
- [請求項8] 請求項1～6のいずれか1項に記載の複合組成物を含むバイオセンサ。

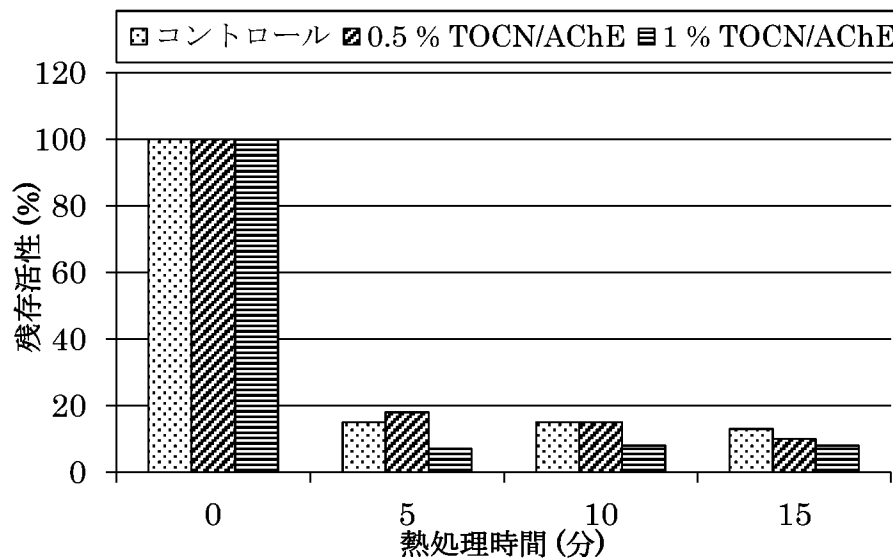
[図1]



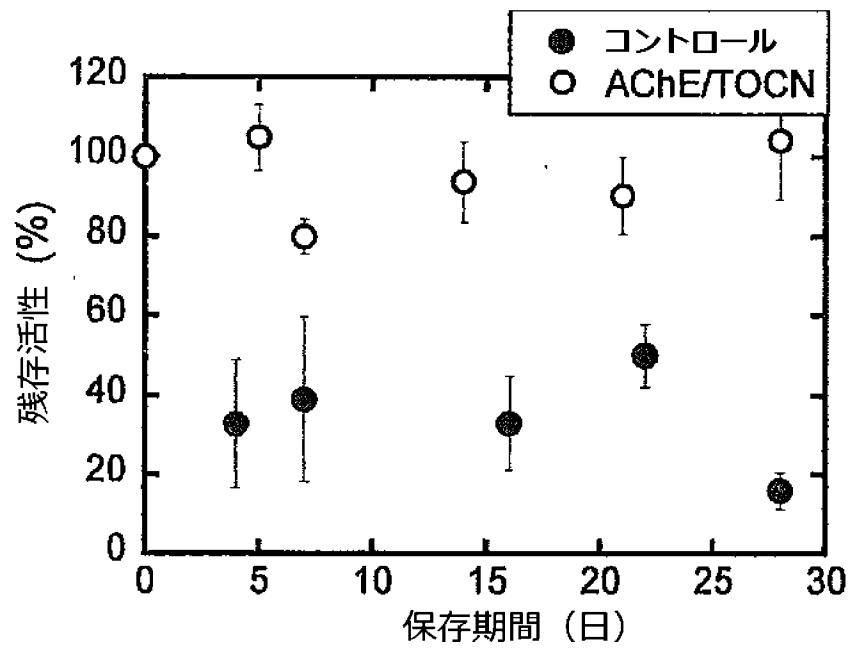
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/025579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C08L1/02 (2006.01)i, B82Y5/00 (2011.01)i, B82Y40/00 (2011.01)i,
C08J3/21 (2006.01)i, C08L89/00 (2006.01)i, C12N11/12 (2006.01)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)

Int.Cl. C08L1/02, B82Y5/00, B82Y40/00, C08J3/21, C08L89/00, C12N11/12

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 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 3-131636 A (AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 05 June 1991, page 2, upper left column, lines 13-15, page 2, upper left column, lines 19-20, page 2, lower left column, lines 10-14, page 2, lower right column, line 19 to page 3, upper left column, line 5 (Family: none)	1-3, 5, 7 4, 6, 8
A	JP 11-253115 A (ASAHI KASEI INDUSTRY CO., LTD.) 21 September 1999, claim 5 & US 6495190 B1, claim 5 & TW 408153 B & CN 1287564 A & KR 10-0368780 B	1-8
A	JP 52-139781 A (NIPPI, INC.) 21 November 1977, page 11, upper left column, line 5 to upper right column, line 20 (Family: none)	1-8

☐ 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

31 August 2018 (31.08.2018)

Date of mailing of the international search report

11 September 2018 (11.09.2018)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C08L1/02(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, B82Y40/00(2011.01)i, C08J3/21(2006.01)i, C08L89/00(2006.01)i, C12N11/12(2006.01)i

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))

Int.Cl. C08L1/02, B82Y5/00, B82Y40/00, C08J3/21, C08L89/00, C12N11/12

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 3-131636 A (工業技術院長) 1991.06.05, p2 左上欄 13~15 行, p2 左上欄 19~20 行, p2 左下欄 10~14 行, p2 右下欄 19 行~p3 左上欄 5 行 (ファミリーなし)	1-3, 5, 7 4, 6, 8
A	JP 11-253115 A (旭化成工業株式会社) 1999.09.21, 請求項 5 & US 6495190 B1, claim5 & TW 408153 B & CN 1287564 A & KR 10-0368780 B	1-8

☑ 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
「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

31.08.2018

国際調査報告の発送日

11.09.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

楠 祐一郎

4 J

6289

電話番号 03-3581-1101 内線 3457

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	JP 52-139781 A (株式会社ニッピ) 1977. 11. 21, p11 左上欄 5 行～右上欄 20 行 (ファミリーなし)	1-8