

## (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  
2013年4月4日(04.04.2013)

(10) 国際公開番号

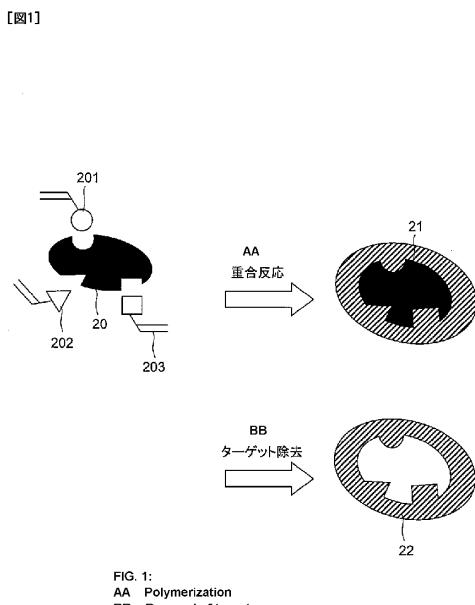
WO 2013/046826 A1

- (51) 國際特許分類:  
*G01N 33/53 (2006.01)*      *G01N 33/543 (2006.01)*  
*G01N 21/27 (2006.01)*
- (21) 國際出願番号: PCT/JP2012/065727
- (22) 國際出願日: 2012年6月20日(20.06.2012)
- (25) 國際出願の言語: 日本語
- (26) 國際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2011-217179 2011年9月30日(30.09.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 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: および  
 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 竹内 俊文 (TAKEUCHI Toshifumi) [JP/JP]; 〒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) [JP/JP]; 〒2440817 神奈川県横浜市戸塚区吉田町292番地 株式会社日立製作所 横浜研究所
- 内 Kanagawa (JP). 赤松 直俊 (AKAMATSU Naotoshi) [JP/JP]; 〒2440817 神奈川県横浜市戸塚区吉田町292番地 株式会社日立製作所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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

[続葉有]

(54) Title: MOLECULAR TEMPLATE AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 分子鋳型及びその製造方法



**(57) Abstract:** A method for detecting a chemical and a detection device whereby a chemical is captured by a scavenger and thus detected, said scavenger being produced by using a molecular template. The present invention provides a chemical sensor which is easy-to-use not only for medical experts (e.g., medical doctors, clinical technologists and nurses) but also for general domestic consumers. In particular, the present invention addresses the problem of highly sensitively detecting a steroid hormone such as cortisol, said hormone closely relating to a stress disorder, and thus diagnosing the stress disorder in early stage on the basis of the sign to thereby contribute to the prevention and prompt therapy thereof. Provided is a molecular template of a steroid hormone, said molecular template comprising a polymer capable of interacting with the steroid hormone. The polymer preferably contains, per polymer unit, at least two functional groups that are capable of interacting with the steroid hormone.

**(57) 要約:** 本発明の化学物質検出方法及び検出装置は、分子鋳型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、看護士)はもちろんのこと、家庭の一般消費者にとって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レ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。ステロイドホルモンの分子鋳型であって、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を提供する。ポリマーは、重合単位に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。

WO 2013/046826 A1

**WO 2013/046826 A1**

ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ 添付公開書類:  
(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, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG). — 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

## 明 細 書

### 発明の名称：分子鋳型及びその製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、分子鋳型及びその製造方法、並びにその分子鋳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、 $p p t$ （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] 一方、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

WO 2013/046826

2

PCT/JP2012/065727

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。

[0006] 本発明者らは、前述の問題を解決するために、分子鑄型技術に着目した。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に、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。

[0007] 本技術分野の背景技術として、特許文献1が挙げられる。この文献には、「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）。この文献で記されているMIPとは、分子鑄型ポリマー（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。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0008] 特許文献1：WO 2009/083975

#### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[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鑄型及びその

製造方法と、その分子鋳型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が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。

[0010] すなわち、本発明の化学物質検出方法及び検出装置は、分子鋳型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、看護士）はもちろんのこと、家庭の一般消費者にとっ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

[0011] 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鋳型ポリマー（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、本発明に係る分子鋳型は、「ステロイドホルモンの分子鋳型であって、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」ことを特徴とする。

[0012] MIP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。よって、上記特許文献1に挙げられるようなMIP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MIPを作製するには、綿密な設計と合成、精製が必要となる。

[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鋳型は、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

WO 2013/046826

4

PCT/JP2012/065727

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。

[0014] 本発明におけるポリマーは、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鋳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つため、分子が剛直であり、かつ水酸基等を持つため、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箇所で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鋳型の合成を図っている。

[0015] また、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って高感度な検出能力を得るものである。

[0016] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-217179号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

## 発明の効果

[0017] 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鋳型によって、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。

[0018] 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

- [0019] [図1]分子鋳型の製造方法を模式的に示す図である。
- [図2]化学物質検出装置の構成を説明するための概念図である。
- [図3]分子鋳型の合成スキームを示す図である。
- [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]競合法を説明するための概念図である。
- [図8]化学物質検出装置の一実施形態を示す図である。
- [図9]コルチゾール濃度の検量線を示すグラフである。
- [図10]コルチゾールの検出結果を示すグラフである。
- [図11]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12]プロゲステロンの分子構造を示す図である。
- [図13]プロゲステロン濃度の検量線を示すグラフである。
- [図14]コルチゾールとプロゲステロンの検出結果を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

- [0020] 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。
- [0021] 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鋳型を含む捕捉体を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。
- [0022] 図1に、本実施形態における分子鋳型（MIP）22の作製原理を示す。

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 を有する分子鋳型 (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。

- [0023] 図 2 は、本実施形態に係る化学物質検出装置の構成を説明するための概念図である。図 2 に示すように、本実施形態の化学物質検出装置 1 は、分子捕捉部 10 と捕捉量計測部 11 と試料注入部 14 と試料搬送部 15 と排出部 16 とを有する。以下、各構成について詳細に説明する。
- [0024] 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 A 171、夾雑物 B 172 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。
- [0025] 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、分子鋳型 103 や、ターゲットを捕捉した分子鋳型 104 が含まれる。また、当該捕捉体 101 は、分子捕捉体 10 の表面に配置され、主に分子鋳型 (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。
- [0026] 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、分子鋳型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。

- [0027] 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。
- [0028] 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。
- [0029] 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鋳型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鋳型等が該当する。
- [0030] 本発明で使用する分子鋳型の製造方法は、センサ分野等で一般に用いられる分子インプリント法に準ずれば良い。例えば、まず、ターゲットとなる化

学物質の存在下で、そのターゲット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 : 1.6 ~ 1 : 6.4 (モル比) とすることができる。特に、1 : 3.2 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 (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。

- [0031] 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。
- [0032] 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。
- [0033] 分子捕捉部 10 は、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構成されていても良い。測定環境、又は検体の状態等に応じて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、捕捉体 101 を有する一部のみであっても良い。

- [0034] 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。
- [0035] 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。「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秒間であっても良いし、1分間であっても良い。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。
- [0036] 表面プラズモン共鳴測定法とは、SPR (surface plasmon resonance) 法とも呼ばれ、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、本発明の分子鋳型をすりつぶした粒子状の固体を溶媒（水、有機溶媒）に懸濁させ、金属薄膜上へスピニコートし、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

WO 2013/046826

10

PCT/JP2012/065727

が最小となる時の入射角度（共鳴角度 $\theta$ 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 $\theta$ の変化として捉えることができる。例えば、金属薄膜表面上に担持させた分子鋳型が何も捕捉していない状態の共鳴角度を $\theta_0$ とする時、当該分子鋳型がターゲットを捕捉すると共鳴角度が $\theta_1$ に変化する。この場合、 $\theta_1$ と $\theta_0$ との差である $\Delta\theta$ の値の変化を見ることにより、分子鋳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 $125\text{ }\mu\text{M}$ 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。スピノコートの際には、プラズモン共鳴が伝播する距離以内に製膜することが重要である。具体的には、 $100\text{ nm}$ 以内の厚さで製膜することが好ましい。

[0037] 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、本発明の分子鋳型をすりつぶした粒子状の固体を溶媒（水、有機溶媒）に懸濁させ、水晶振動子のセンサ上へスピノコートし、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、水晶振動子上の製膜厚さは、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。

[0038] 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、本発明の分子鋳型をすりつぶした粒子状の固体を溶媒（水、有機溶媒）に懸濁させ、電極表面上へスピノコートし、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、水晶振動子上の製膜厚さは、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。

WO 2013/046826

11

PCT/JP2012/065727

[0039] 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。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。また、分子錠型の場合には、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内に有する分子錠型等が該当する。例えば、ターゲットが当該分子錠型に捕捉されることで、キャビティ内で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。

[0040] 図3に、分子錠型の合成スキームを示す。重合反応の後、生成したポリマーを粉碎し、その後、ふるいかけ、洗浄工程を経て分子錠型を得ることができる。この手順に従い、ステロイドホルモンの一種であるコルチゾールの分子錠型を、イタコン酸を原料として合成する場合について以下に説明する。

[0041] (コルチゾールの分子錠型の製造)

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錠型を得ることができる。図4Aに、コルチゾールの分子構造を示す。図4Bには、イタコン酸の分子構造を示す。図4A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

WO 2013/046826

12

PCT/JP2012/065727

骨格とすると、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。

[0042] 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。本発明の分子錠型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錠型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、分子錠型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。

[0043] 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。

[0044] 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、分子錠型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錠型合成の手法を用いれば、他のステロイドホルモンの分子錠型を作製できる。図6のAは

WO 2013/046826

13

PCT/JP2012/065727

、コレステロールであり、これを母骨格として、図6 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。

[0045] 上述のように、コルチゾールに対する分子錆型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、分子錆型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錆型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、分子錆型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錆型を製造すれば良い。コルチゾールの分子錆型と同様に、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錆型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=1：1 6～1：6 4(モル比)とすることができる。特に、1：3 2が望ましい。

[0046] 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、分子錆型作製時に、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。

WO 2013/046826

14

PCT/JP2012/065727

- [0047] 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、分子鋳型を形成するモノマーと共に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、分子鋳型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に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。
- [0048] また、ステロイドホルモン分子に導入される、モノマーと共に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、エポキシ基等、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。
- [0049] なお、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。
- [0050] また、競合法を用いた例を図7に基づき説明する。図7に示すように、容

WO 2013/046826

15

PCT/JP2012/065727

器84に、分子鋳型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を競合させて分子鋳型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、ターゲット量が多いほど、蛍光は小さくなり、溶液の色は薄くなる。検体82中のターゲット量の算出には、別途算出した比色や蛍光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 $125\text{ }\mu\text{M}$ 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。

[0051] 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增幅しても良い。当該增幅は、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。

[0052] 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。

[0053] 図8に、本発明の化学物質検出装置の別の実施形態を示す。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鋳型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

WO 2013/046826

16

PCT/JP2012/065727

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、分子鑄型を塗布してある。また、置換法を利用する場合、あらかじめ標識化ステロイドホルモン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、夾雜物A931、夾雜物B932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中の夾雜物の一部又は全部が除去される。その後、捕捉検出部90の分子鑄型により、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 $125\text{ }\mu\text{M}$ 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

[0054] 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。

[0055] (実施例1)

THF(テトラヒドロフラン)を溶媒に用いて、以下に示す方法により分子鑄型の合成を行った。まず、コルチゾール：イタコン酸：スチレン：ジビニルベンゼン(DVB)=1:4:4:20(モル比)の混合物に、重合開始剤であるV-70(2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレニトリル))をモノマー成分に対してモル比で2%添加した。

WO 2013/046826

17

PCT/JP2012/065727

[0056] 具体的には、表1のレシピに従い分子鑄型ポリマー（MIP）の重合を行った。バイアル瓶に、コルチゾールを362.5 mg（1 mmol）、イタコン酸を524 mg（4 mmol）、スチレンを418 mg（4 mmol）、ジビニルベンゼン（DVB）を2604 mg（20 mmol）を加え、THF（20 ml）に溶解させた後、 $\phi 18 \times 180$  mmの試験管に移し、重合開始剤である2, 2' -アゾビス（4-メトキシ-2, 4-ジメチルバレロニトリル）（V-70）（0.56 mmol）を溶解させた。セプタムキャップをして窒素置換し、30°C水浴中で72時間重合を行った。

[0057] 参照実験のため、非分子鑄型ポリマー（NIP：non-imprinted polymer）の重合を行った。表1のレシピに従い、バイアル瓶に、コルチゾールは加えずに、イタコン酸524 mg（4 mmol）、スチレン418 mg（4 mmol）、及びジビニルベンゼン（DVB）2604 mg（20 mmol）をTHF（20 ml）に溶解させた後、 $\phi 18 \times 180$  mmの試験管に移し、重合開始剤である2, 2' -アゾビス（4-メトキシ-2, 4-ジメチルバレロニトリル）（V-70）（0.56 mmol）を溶解させた。セプタムキャップをして窒素置換し、30°C水浴中で72時間重合を行った。

[0058] [表1]

原料	MIP	NIP
コルチゾール	362.5 mg (1 mmol)	なし
イタコン酸	524 mg (4 mmol)	524 mg (4 mmol)
スチレン	418 mg (4 mmol)	418 mg (4 mmol)
DVB	2604 mg (20 mmol)	2604 mg (20 mmol)
V-70	172.7 mg (0.56 mmol)	172.7 mg (0.56 mmol)
THF	20 ml	20 ml

[0059] 重合後のポリマーは減圧乾燥して乳鉢ですりつぶした後、ソックスレーを

WO 2013/046826

18

PCT/JP2012/065727

用いてアセトン、メタノール／酢酸（9／1、体積／体積）、メタノールの順に洗浄し、溶媒中からターゲットであるコルチゾールが検出できなくなるまで洗浄を行った。ターゲットの入っていない非分子錠型ポリマー（NIP）も同様にして重合・洗浄を行った。

[0060] ・コルチゾール分子錠型ポリマーの評価

洗浄後のポリマーを用いて吸着実験を行った。0、125、250、500及び1000 μMに調整したコルチゾールのアセトニトリル溶液を用意し、それぞれ1 mLをピペットではかりマイクロチューブに入れた。そこにMIPあるいはNIPを5 mgずつはかり取って加え、キャップをし、25°C、800 rpmで攪拌して40時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、フィルトレーションしてポリマーを取り除き、溶液中のコルチゾールをHPLCにて定量した。フィルトレーションに用いた膜は、50 μm以下の固体を通す。定量の結果より、各濃度における分子錠型ポリマーへの吸着量を求めた。

[0061] HPLC条件は、カラムにMerck社製CHROMOLITH（登録商標）RP-18e 100-4.6を用い、溶離液にアセトニトリル/H<sub>2</sub>O（70/30、体積/体積）を用い、流速を1 mL/分として、検出にはUV光（241 nm）を用いた。

[0062] まず、吸着量を求める前に、HPLCの検量線を作成した。作成した検量線を図9に示す。グラフの横軸はコルチゾール濃度（μM）で、縦軸はHPLCから求めたピーク面積の10<sup>6</sup>分の1を示す。コルチゾール濃度は、0、62.5、125、250、500及び1000 μMの試料を用いて、各濃度に対するピーク面積のプロットを行った。このプロットへの近似曲線は、Y = 7589.7Xとなり、相関2乗係数（R<sup>2</sup>）は0.99と求められた。この検量線を用いて、MIP及びNIPへの吸着量を算出した。

[0063] ポリマー除去した上清中の濃度を定量し、そこから分子錠型ポリマーへの吸着量を求めた。吸着挙動結果を表2と図10に示す。図10の横軸にはコルチゾール濃度（μM）、縦軸には検量線から求めた3回平均の結合量（μ

WO 2013/046826

19

PCT/JP2012/065727

$\text{m mol/g}$  を示す。測定結果で 0 以下となっている場合は、ほぼ全てのコルチゾールが上澄み液に回収されており、MIP 又は NIP への結合量が小さかったと考えられる。

[0064] [表2]

コルチゾール濃度 ( $\mu\text{M}$ )	結合量 ( $\mu\text{mol/g}$ )	
	MIP	NIP
0	0	0
125	0.55	0.44
250	0.54	0 以下 (-0.15)
500	2.61	0 以下 (-0.1)
1000	3.37	0 以下 (-0.2)

[0065] NIP では、濃度によらずほとんど吸着していないのに対し、MIP では濃度が上がるにつれ吸着量の増加が見られた。このことから、上記に示す素材と方法により作成した分子錠型ポリマーは、コルチゾールを特異的に認識できることが示された。したがって、コルチゾール等のステロイドホルモンに対して高い認識能を有する分子錠型を提供することができた。

[0066] (実施例 2)

- ・コルチゾールのメタクリロイル化

上記実施例 1 では、イタコン酸等の、分子錠型の原料とテンプレート分子であるコルチゾールとの間の水素結合を利用した MIP 合成の例について述べた。次に、原料とテンプレート分子との間の共有結合を利用した MIP 合成の例について述べる。この実施例 2において作製される MIP を MIP 1 と称する。まず、MIP 1 の合成にあたり、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た。

[0067] 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°C で 1 時間、その後室温で 4 時間攪拌した。

WO 2013/046826

20

PCT/JP2012/065727

[0068] 続いて、反応液に酢酸エチルを加え、分液ロート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。

[0069] 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C－200、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11に示す。

[0070] なお、この図11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（2.5mmol、907mg）及びジメチルアミノピリジン（0.25mmol、30.5mg）を乾燥THF（40mL）に溶解し、氷冷した。続いて、トリエチルアミン（30mmol、4.2mL）及びメタクリル酸無水物（7.5mmol、1.2mL）を徐々に滴下し、0°C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、分液ロートで有機相を純水で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C－200、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%）。

[0071] ·MIP1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3に示す原料組成に従ってMIP1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3に示す添加モノマーと共に重合可能である。その結果、分子錠型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錠型を作製することができる。

[0072] 具体的には、表3のレシピに従い分子錠型ポリマー（MIP1）の重合を行った。まず、バイアル瓶に、メタクリロイル化コルチゾールを215.3

WO 2013/046826

21

PCT/JP2012/065727

mg (0.5 mmol)、イタコン酸を262 mg (2 mmol)、スチレンを209 mg (2 mmol) 及びジビニルベンゼン (DVB) を1304 mg (10 mmol) 加え、THF (10 mL) に溶解させた後、Φ18×180 mmの試験管に移し、重合開始剤である2, 2' -アゾビス (4-メトキシ-2, 4-ジメチルバレロニトリル) (V-70) (0.28 mmol) を溶解させた。セプタムキャップをして窒素置換し、30 °C水浴中で72時間重合を行った。得られたポリマーを真空乾燥させ、乳鉢ですりつぶした後、50 mLの2 M水酸化ナトリウム水溶液／メタノール=1：1で48時間加水分解し、その後、1 M塩酸／メタノール=1：1、純水／メタノール=1：1で洗浄した後、6時間メタノールでソクスレー抽出した。加水分解することで、コルチゾール誘導体をMIP1から除去することができる。

## [0073] [表3]

原料	MIP	NIP
メタクリロイル化コルチゾール	215.3 mg (0.5 mmol)	なし
イタコン酸	262mg (2 mmol)	262mg (2 mmol)
スチレン	209 mg (4 mmol)	209 mg (4 mmol)
DVB	1304 mg (10 mmol)	1304 mg (10 mmol)
V-70	86.4 mg (0.28 mmol)	86.4 mg (0.28 mmol)
THF	10 mL	10 mL

## [0074] ・コルチゾール吸着実験

ポリマー (MIP1) を5 mgはかりとり、1000、500、250、125及び62.5 μmol/Lに調整したコルチゾールのクロロホルム／ヘキサン=4/1溶液をそれぞれ1 mL加え、25 °C、800 rpmで48時間インキュベートした。インキュベーション後の溶液をシリンジフィルターでろ過し、そのうち0.5 mLを採取し、真空乾燥させた後、0.5 mL

WO 2013/046826

22

PCT/JP2012/065727

のアセトニトリルに再溶解し、LCにて定量した。また、MIP1を加えていない溶液のみのものについて同様の操作を行い、これを対照の検量線として用いて結合量を求めた。フィルトレーションに用いた膜は、50 μm以下の固体を通す。定量の結果から、各濃度における分子錫型ポリマーMIP1へのコレチゾール吸着量を求めた。

[0075] HPLC条件は、カラムにMerck社製CHROMOLITH(登録商標) RP-18e 100-4.6を用い、溶離液にアセトニトリル/H<sub>2</sub>O(70/30、体積/体積)を用い、流速を1mL/分として、検出にはUV光(241nm)を用いた。

[0076] ・プロゲステロン吸着実験

MIP1を5mgはかりとり、1000、500、250、125及び62.5 μmol/Lに調整したプロゲステロンのクロロホルム/ヘキサン=4/1溶液をそれぞれ1mL加え、25°C、800rpmで48時間インキュベートした。プロゲステロンの化学構造を図12に示す。インキュベーション後の溶液をシリジンフィルターでろ過し、そのうち0.5mLを採取し、真空乾燥させた後、0.5mLのアセトニトリルに再溶解し、LCにて定量した。また、MIP1を加えていない溶液のみのものについて同様の操作を行い、これを対照の検量線として用いて結合量を求めた。フィルトレーションに用いた膜は、50 μm以下の固体を通す。定量の結果から、各濃度における分子錫型ポリマーMIP1へのプロゲステロン吸着量を求めた。

[0077] HPLC条件は、カラムにMerck社製CHROMOLITH(登録商標) RP-18e 100-4.6を用い、溶離液にアセトニトリル/H<sub>2</sub>O(70/30、体積/体積)を用い、流速を1mL/分として、検出にはUV光(241nm)を用いた。

[0078] なお、吸着量を求める前に、プロゲステロンに関してHPLCの検量線を作成した。作成した検量線を図13に示す。グラフの横軸はプロゲステロン濃度(μM)で、縦軸はHPLCから求めたピーク面積を示す。プロゲステロン濃度は、62.5、125、250、500及び1000 μMの試料を

WO 2013/046826

23

PCT/JP2012/065727

用いて、各濃度に対するピーク面積のプロットを行った。このプロットへの近似曲線は、 $Y = 2818.7X$ となり、相関2乗係数 ( $R^2$ ) は0.9999と求められた。この検量線を用いて、MIP1への吸着量を算出した。なお、コルチゾールに関するHPLCの検量線は、上述の図6を活用した。

[0079] ポリマー除去した上清中の濃度を定量し、その定量結果に基づいて分子錫型ポリマーMIP1への吸着量を求めた。吸着挙動結果を表4及び図14に示す。図14の横軸にはステロイドホルモン（コルチゾール及びプロゲステロン）の濃度 ( $\mu M$ )、縦軸には検量線から求めた3回平均の結合量 ( $\mu mol/g$ ) を示す。

[0080] その結果、ステロイドホルモンの濃度が62.5  $\mu M$ の時に、MIP1への吸着量は、コルチゾールが2.9 ( $\mu mol/g$ ) であるのに対して、プロゲステロンが1.5 ( $\mu mol/g$ ) であり、有意な差が得られた。したがって、唾液中に2種のステロイドホルモンが存在する場合に、このMIP1は高い選択性でコルチゾールを捕捉することができる。同様に、ステロイドホルモンの濃度が125  $\mu M$ の時に、MIP1への吸着量は、コルチゾールが13.7 ( $\mu mol/g$ ) であるのに対して、プロゲステロンが1.0 ( $\mu mol/g$ ) であり、有意な差が見られた。ステロイドホルモンの濃度が250  $\mu M$ の時に、MIP1への吸着量は、コルチゾールが19.0 ( $\mu mol/g$ ) であるのに対して、プロゲステロンが1.3 ( $\mu mol/g$ ) であり、有意な差が見られた。ステロイドホルモンの濃度が500  $\mu M$ の時に、MIP1への吸着量は、コルチゾールが28.2 ( $\mu mol/g$ ) であるのに対して、プロゲステロンが5.2 ( $\mu mol/g$ ) であり、有意な差が見られた。ステロイドホルモンの濃度が1000  $\mu M$ の時にも、MIP1への吸着量は、コルチゾールが32.7 ( $\mu mol/g$ ) であるのに対して、プロゲステロンが6.0 ( $\mu mol/g$ ) であり、有意な差が見られた。

[0081]

[表4]

ステロイドホルモン濃度 (μM)	MIP1 への結合量 (μmol/g)	
	コルチゾール	プロゲスチン
62.5	2.9	1.5
125	13.7	1.0
250	19.0	1.3
500	28.2	5.2
1000	32.7	6.0

- [0082] また、表2と表4の比較から明らかなように、同じコルチゾール濃度のときに、実施例1におけるMIPへの吸着量よりも実施例2におけるMIP1への吸着量の方が高かった。すなわち、MIP1は、いずれのコルチゾール濃度においても実施例1のMIPに比べてコルチゾールの捕捉量が多かった。したがって、テンプレート分子であるコルチゾールをメタクリロイル化し、分子錠型MIP1を作製した方が高感度化により有利である。
- [0083] 以上、本発明を実施するための形態について説明した。MIP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、看護士）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。
- [0084] 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

WO 2013/046826

25

PCT/JP2012/065727

## [0085] 1 化学物質検出装置

1 0 分子捕捉部

1 0 1 捕捉体

1 0 2 支持体

1 0 3 分子鑄型

1 0 4 分子鑄型

1 1 捕捉量計測部

1 1 1 矢印

1 1 2 矢印

1 4 試料注入部

1 5 試料搬送部

1 6 排出部

1 7 検体

1 7 0 ターゲット

1 7 1 夾雜物A

1 7 2 夾雜物B

2 0 ターゲット

2 0 1 モノマー原料A

2 0 2 モノマー原料B

2 0 3 モノマー原料C

2 1 認識部位

2 2 分子鑄型

5 0 1 矢印

5 0 2 矢印

8 0 分子鑄型

8 2 検体

8 3 標識化ターゲット

8 2 0 ターゲット

**WO 2013/046826**

26

**PCT/JP2012/065727**

- 8 2 1 夾雜物A
- 8 2 2 夾雜物B
- 8 3 2 ターゲット部分
- 8 3 1 標識部分
- 8 4 容器
- 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 夾雜物A
- 9 3 2 夾雜物B
- 9 3 3 矢印

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錠型であって、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錠型。
- [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に記載の分子錠型。
- [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に記載の分子錠型。
- [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に記載の分子錠型。
- [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ステロイドホルモン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、前記ポリマーからステロイドホルモンを除去する工程と、  
を含む分子錠型の製造方法。
- [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に記載の分子錠型の製造方法。
- [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に記載の分子錠型の製造方法。
- [請求項8] 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、前記モノマーが、イタコン酸である請求項7に記載の分子錠型の製造方法。
- [請求項9] 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に記載の分子錠型の製造方法。

WO 2013/046826

28

PCT/JP2012/065727

- [請求項10] 前記ステロイドホルモンが、前記モノマーと共に重合反応する官能基を有する請求項5に記載の分子錠型の製造方法。
- [請求項11] 前記官能基が、メタクリロイル基である請求項10に記載の分子錠型の製造方法。
- [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を2つ以上有するモノマーを含む請求項10又は11に記載の分子錠型の製造方法。
- [請求項13] 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12に記載の分子錠型の製造方法。
- [請求項14] 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10に記載の分子錠型の製造方法。
- [請求項15] 請求項1～4のいずれかに記載の分子錠型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分子錠型を含む捕捉体を有する分子捕捉部に、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、

**WO 2013/046826**

29

**PCT/JP2012/065727**

前記分子捕捉部に捕捉された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。

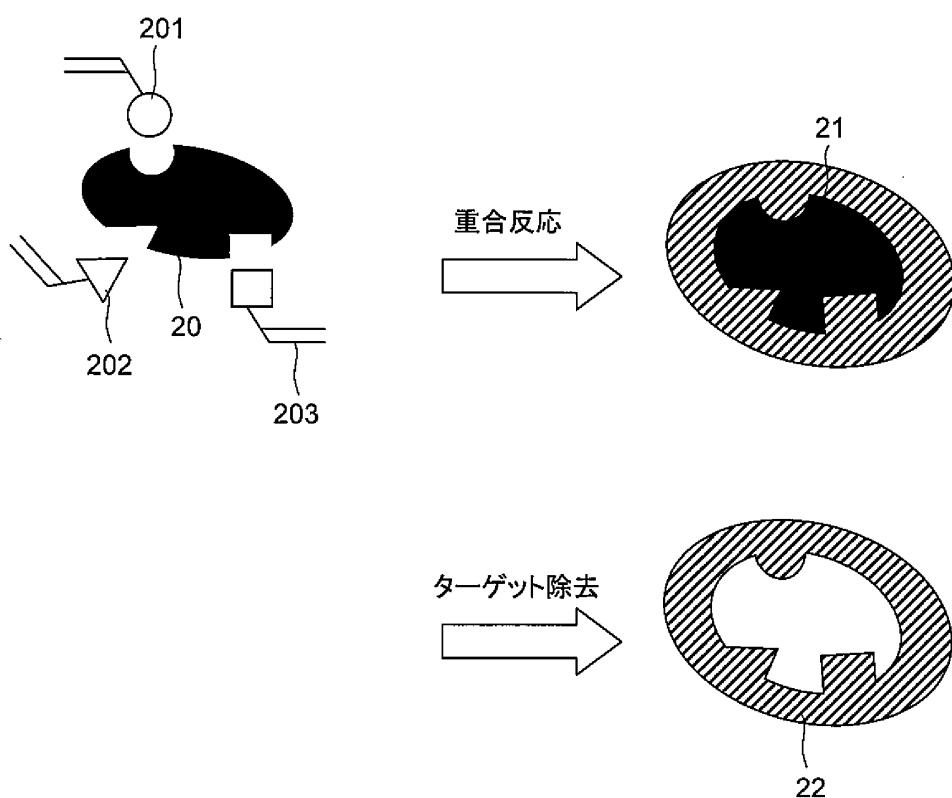
1/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図1]

## 図 1



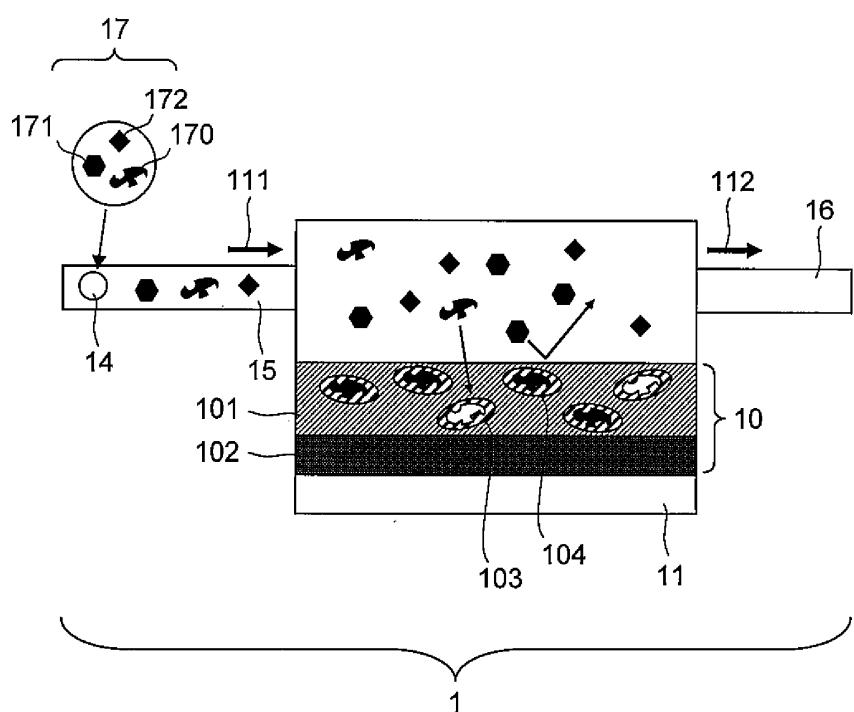
2/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図2]

## 図 2

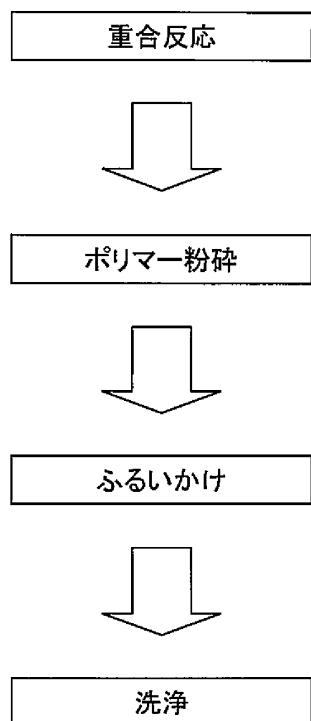


3/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図3]

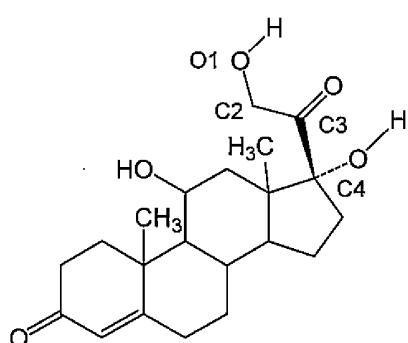
**図 3**

4/13

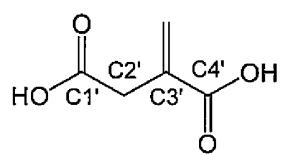
WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図4A]

**図 4 A**

[図4B]

**図 4 B**

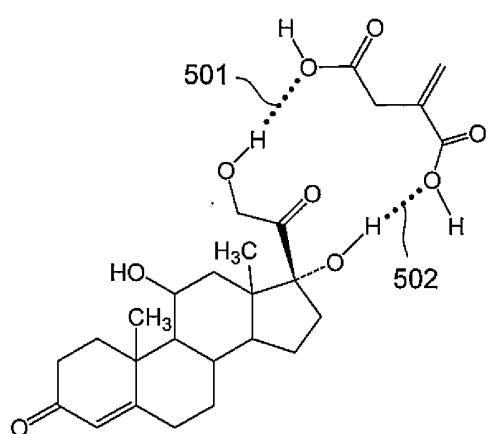
5/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図5]

図 5



6/13

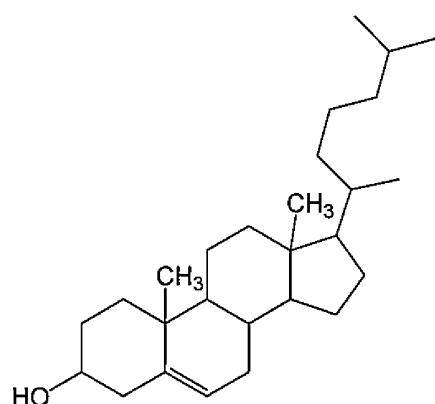
WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

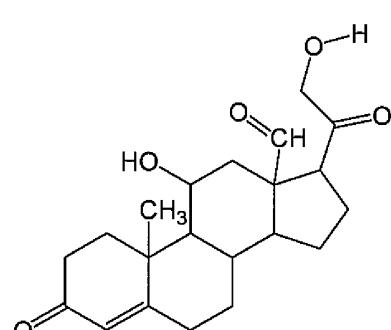
[図6]

## 図 6

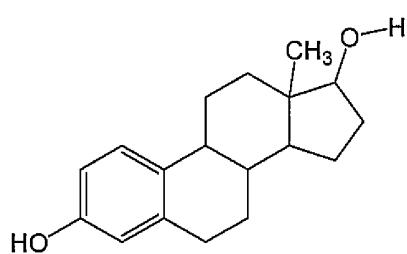
A



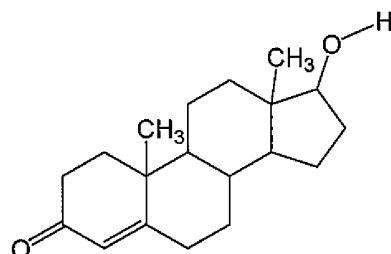
B



C



D



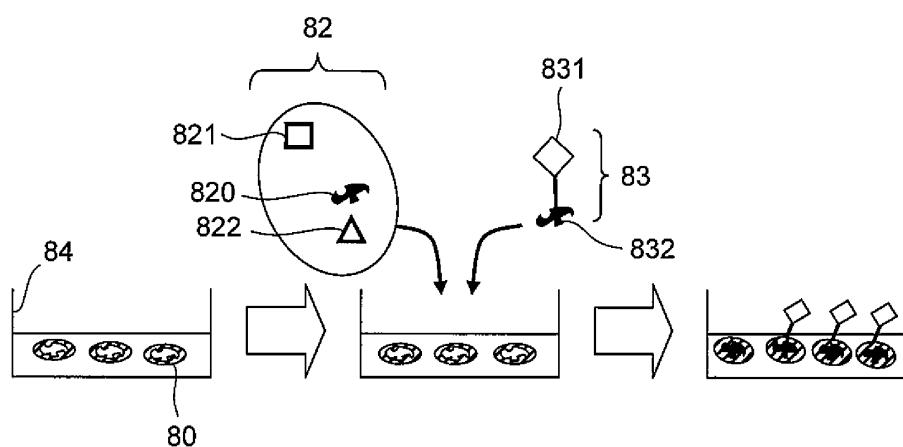
7/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図7]

## 図 7



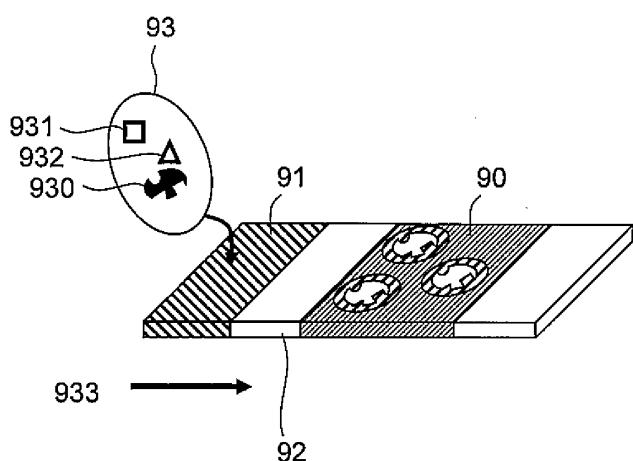
8/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図8]

## 図 8



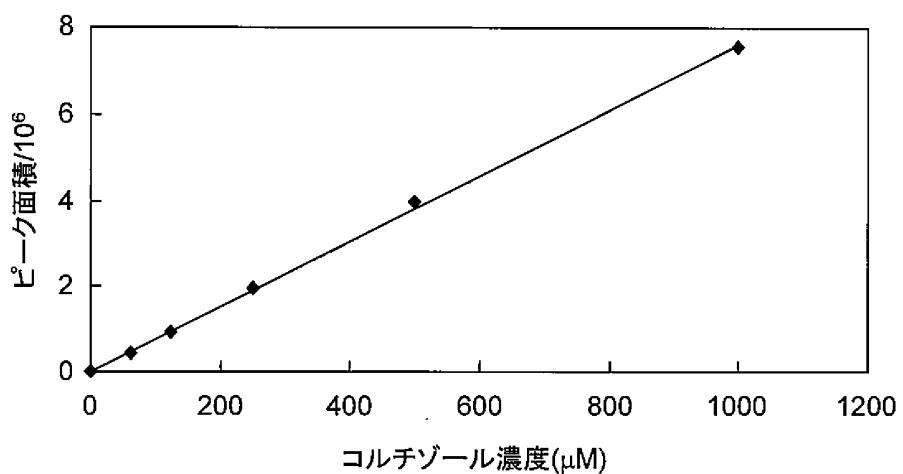
9/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図9]

図 9



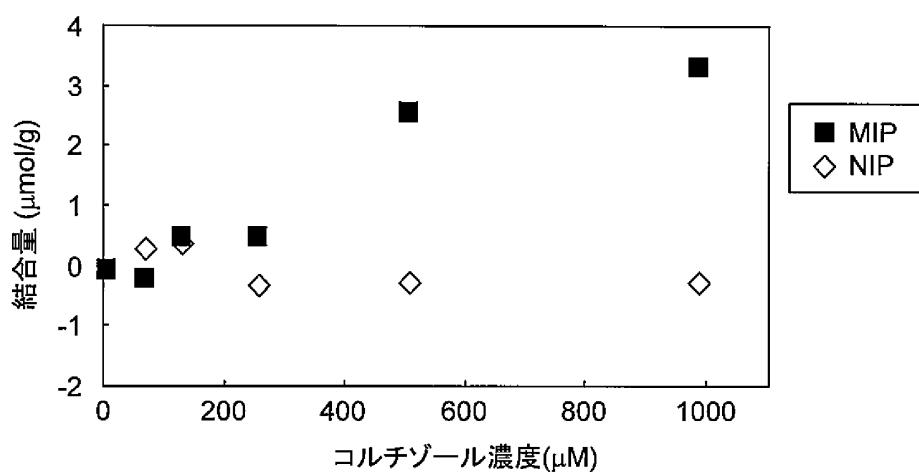
10/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図10]

## 図 10



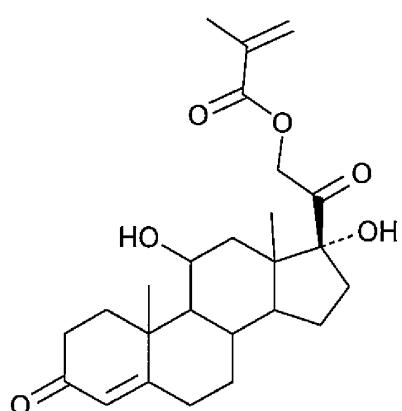
11/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

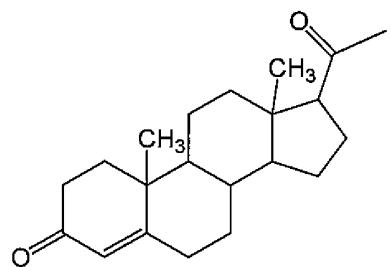
[図11]

図 1 1



[図12]

図 1 2



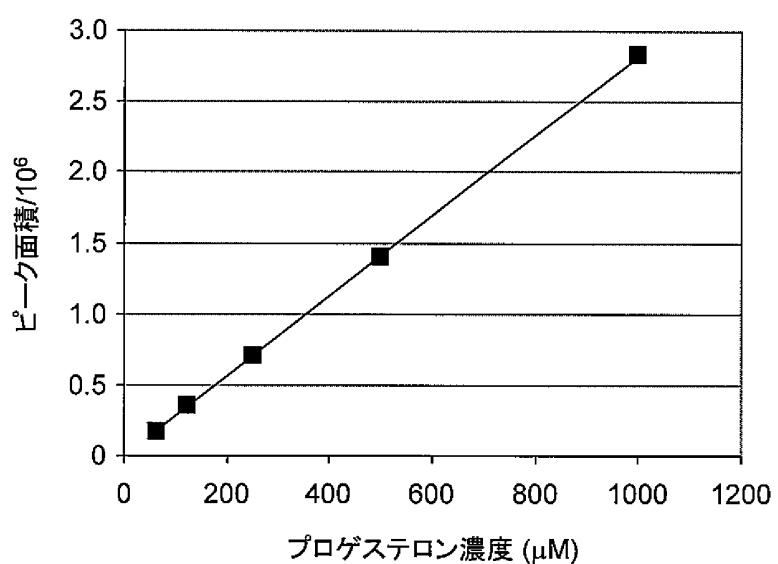
12/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図13]

図 1 3



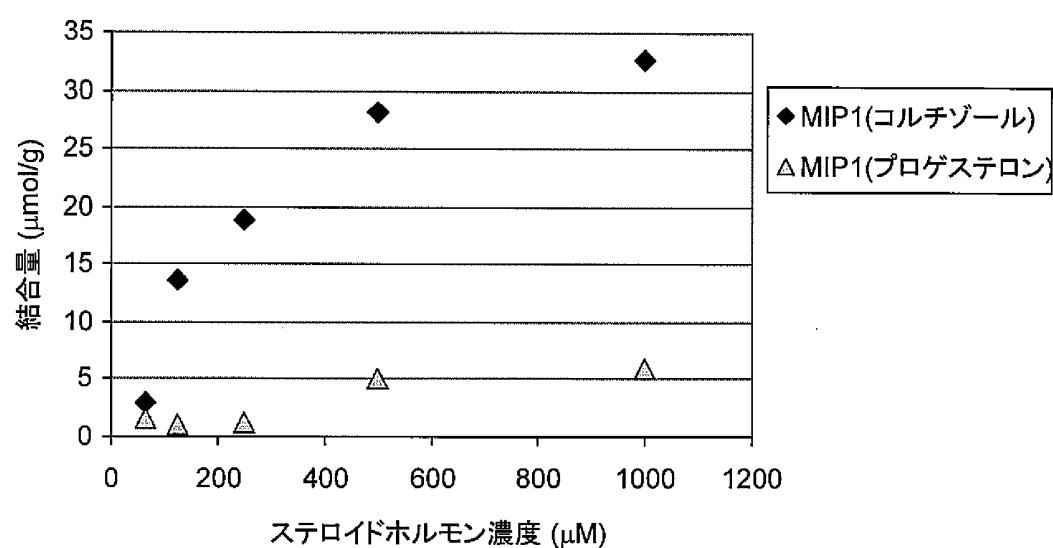
13/13

WO 2013/046826

PCT/JP2012/065727

[図14]

図 1 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/065727
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>G01N33/53(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>G01N33/53, G01N21/27, G01N33/543</i>		
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 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/38015 A1 (IGEN, INC.), 16 October 1997 (16.10.1997), abstract; claims 6, 8, 12, 19 & US 6255461 B1 & AU 2721797 A	1-9, 15-19 10-14
Y	WANG Yongjian et al., Specific binding of cholic acid by cross-linked polymers prepared by the hybrid imprinting method, Polymer, 2007, Vol.48, No.19, Page.5565-5571, Scheme 1	10-14
A	MCNIVEN S J et al., Applications of Molecular Imprinting to the Recognition and Detection of Bioactive Molecules, ACS Symp Ser (Am Chem Soc), 1998, No.703, Page.90-108, Abstract	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* 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 </p>		<p>“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  “&amp;” document member of the same patent family </p>
Date of the actual completion of the international search 19 July, 2012 (19.07.12)		Date of mailing of the international search report 31 July, 2012 (31.07.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2012/065727

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAUPT K et al., Plastic antibodies: developments and applications, Trends Biotechnol, 1998, Vol.16, No.11, Page.468-475, Abstract, Figure1	1-19
A	KANDIMALLA V B et al., Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry, Anal Bioanal Chem, 2004, Vol.380, No.4, Page.587-605, Abstract. Fig.1	1-19
A	WO 2010/026308 A1 (UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE - UTC), 11 March 2010 (11.03.2010), entire text & FR 2935705 A & EP 2342247 A	1-19
A	BAGGIANI Claudio et al., Molecularly imprinted polymers for corticosteroids: Analysis of binding selectivity, Biosensors Bioelectron, 2010, Vol.26, No.2, Page.590-595, Abstract, Fig.1, Table1, Table2	1-19
A	SREENIVASAN K, Effect of the Type of Monomers of Molecularly Imprinted Polymers on the Interaction with Steroids, J Appl Polym Sci, 1998, Vol.68, No.11, Page.1863-1866, Abstract	1-19
A	YE L et al., Towards the development of molecularly imprinted artificial receptors for the screening of estrogenic chemicals, Analyst, 2001, Vol.126, No.6, Page.760-765, Fig.1	1-19

国際調査報告	国際出願番号 P C T / J P 2 0 1 2 / 0 6 5 7 2 7											
<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, G01N21/27(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, G01N21/27, 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> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;">日本国実用新案公報</td> <td style="width: 25%;">1 9 2 2 - 1 9 9 6 年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1 9 7 1 - 2 0 1 2 年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1 9 9 6 - 2 0 1 2 年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1 9 9 4 - 2 0 1 2 年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年	日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年	日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年	日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年	
日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年											
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年											
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年											
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年											
<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>CA/BIOSIS/MEDLINE(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width: 70%;">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 style="width: 15%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 97/38015 A1 (IGEN, INC.) 1997.10.16, Abstract, Claim6, Claim8, Claim12, Claim19 &amp; US 6255461 B1 &amp; AU 2721797 A</td> <td>1-9, 15-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WANG Yongjian et al., Specific binding of cholic acid by cross-linked polymers prepared by the hybrid imprinting method, Polymer, 2007, Vol. 48, No. 19, Page. 5565-5571, Scheme 1</td> <td>10-14</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	X	WO 97/38015 A1 (IGEN, INC.) 1997.10.16, Abstract, Claim6, Claim8, Claim12, Claim19 & US 6255461 B1 & AU 2721797 A	1-9, 15-19	Y	WANG Yongjian et al., Specific binding of cholic acid by cross-linked polymers prepared by the hybrid imprinting method, Polymer, 2007, Vol. 48, No. 19, Page. 5565-5571, Scheme 1	10-14
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	WO 97/38015 A1 (IGEN, INC.) 1997.10.16, Abstract, Claim6, Claim8, Claim12, Claim19 & US 6255461 B1 & AU 2721797 A	1-9, 15-19										
Y	WANG Yongjian et al., Specific binding of cholic acid by cross-linked polymers prepared by the hybrid imprinting method, Polymer, 2007, Vol. 48, No. 19, Page. 5565-5571, Scheme 1	10-14										
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。										
<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>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</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>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>												
国際調査を完了した日 1 9 . 0 7 . 2 0 1 2		国際調査報告の発送日 3 1 . 0 7 . 2 0 1 2										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 ( I S A / J P ) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 三木 隆	2 J      3 3 1 2									
		電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2										

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/065727

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	MCNIVEN S J et al., Applications of Molecular Imprinting to the Recognition and Detection of Bioactive Molecules, ACS Symp Ser (Am Chem Soc), 1998, No. 703, Page. 90-108, Abstract	1-19
A	HAUPT K et al., Plastic antibodies: developments and applications, Trends Biotechnol, 1998, Vol. 16, No. 11, Page. 468-475, Abstract, Figure1	1-19
A	KANDIMALLA V B et al., Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry, Anal Bioanal Chem, 2004, Vol. 380, No. 4, Page. 587-605, Abstract. Fig. 1	1-19
A	WO 2010/026308 A1 (UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE - UTC) 2010.03.11, 全文 & FR 2935705 A & EP 2342247 A	1-19
A	BAGGIANI Claudio et al., Molecularly imprinted polymers for corticosteroids: Analysis of binding selectivity, Biosensors Bioelectron, 2010, Vol. 26, No. 2, Page. 590-595, Abstract, Fig. 1, Table1, Table2	1-19
A	SREENIVASAN K, Effect of the Type of Monomers of Molecularly Imprinted Polymers on the Interaction with Steroids, J Appl Polym Sci, 1998, Vol. 68, No. 11, Page. 1863-1866, Abstract	1-19
A	YE L et al., Towards the development of molecularly imprinted artificial receptors for the screening of estrogenic chemicals, Analyst, 2001, Vol. 126, No. 6, Page. 760-765, Fig. 1	1-19