【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第６部門第１区分
【発行日】令和7年2月21日(2025.2.21)

【国際公開番号】WO2023/243490
【出願番号】特願2024-528746(P2024-528746)
【国際特許分類】
G01N 33/553(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/545(2006.01)
C09K 11/06(2006.01)
C09K 11/08(2006.01)
【FI】
G01N 33/553
G01N 33/54325C
G01N 33/54395
G01N 33/54375
G01N 33/545 A
C09K 11/06 660
C09K 11/08 GZNM
C09K 11/08 A

【手続補正書】
【提出日】令和6年12月11日(2024.12.11)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
金属ナノ粒子と、
該金属ナノ粒子の表面を被覆する高分子膜と、
検体中の被験物質と特異的に結合する特異結合物質と、
前記高分子膜の表面または前記特異結合物質に標識された蛍光物質と
を含んで成るナノ粒子体であって、
前記蛍光物質は、２以上の前記ナノ粒子体が前記被験物質を介して結合する複合体におけるプラズモン共鳴の発光波長の光により励起される、ナノ粒子体。
【請求項２】
前記複合体におけるプラズモン共鳴は、外部から照射された光によって誘起される、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項３】
前記複合体におけるプラズモン共鳴は、前記蛍光物質が放射する蛍光によって誘起される、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項４】
前記蛍光物質の吸収波長域が、前記プラズモン共鳴の第１発光波長域と重なる、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項５】
前記プラズモン共鳴の第１発光波長域は、単粒子の前記金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴の第２発光波長域に比べ長波長側に位置する、請求項１に記載のナノ粒

子体。
【請求項６】
前記第１発光波長域と前記蛍光物質の吸収波長域とが重なる第１領域が、前記第２発光波長域と前記蛍光物質の前記吸収波長域とが重なる第２領域に比べ大きくなるように、前記蛍光物質が選択される、請求項５に記載のナノ粒子体。
【請求項７】
前記第１発光波長域における前記蛍光物質の最大吸収波長が、５００～７００ｎｍに位置する、請求項５に記載のナノ粒子体。
【請求項８】
前記第１発光波長域における前記蛍光物質の最大蛍光波長が、５００～７００ｎｍに位置する、請求項５に記載のナノ粒子体。
【請求項９】
前記複合体において誘起されるプラズモン共鳴が多重極子共鳴である、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１０】
前記単粒子の前記金属ナノ粒子において誘起されるプラズモン共鳴は、双極子共鳴である、請求項５に記載のナノ粒子体。
【請求項１１】
前記高分子膜が、前記金属ナノ粒子の表面との間に硫黄原子を介した結合部位、正帯電性基、および疎水性基からなる群より選択される少なくとも１つを含む、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１２】
前記高分子膜が、前記高分子膜を構成する高分子の側鎖に前記正帯電性基を少なくとも含み、
前記正帯電性基は、第１級アンモニウム基、第２級アンモニウム基、第３級アンモニウム基、第４級アンモニウム基、およびグアニジル基（－ＮＨＣ（＝NH_2^+）NH_2）からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１１に記載のナノ粒子体。
【請求項１３】
前記高分子膜が、前記高分子膜を構成する高分子の側鎖に前記疎水性基を少なくとも含み、
前記疎水性基は、芳香族環状基、脂肪族環状基、および脂肪族鎖状基からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１１に記載のナノ粒子体。
【請求項１４】
前記高分子膜の膜厚は、１ｎｍ～１０ｎｍである、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１５】
プラズモン励起蛍光分析に用いるナノ粒子体である、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１６】
前記特異結合物質がナノ抗体である、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１７】
前記特異結合物質がＶＨＨ抗体である、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１８】
前記金属ナノ粒子が金または銀を含んで成る、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項１９】
前記金属ナノ粒子の粒子径は、５～１００ｎｍである、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項２０】
前記ナノ粒子体として第１ナノ粒子体と第２ナノ粒子体とが含まれ、
前記第１ナノ粒子体と前記第２ナノ粒子体とが前記被験物質を介して結合された複合体を形成する、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項２１】
前記被験物質が、血液、血漿、尿、または唾液である前記検体に由来する被験物質であ

る、請求項１に記載のナノ粒子体。
【請求項２２】
前記複合体において、前記第１ナノ粒子体と前記第２ナノ粒子体との間に蛍光物質が位置づけられている、請求項２０に記載のナノ粒子体。
【請求項２３】
請求項１～２２のいずれか１項に記載のナノ粒子体を２以上含んで成り、前記２以上のナノ粒子体が第１ナノ粒子体と第２ナノ粒子体とを含み、前記第１ナノ粒子体と前記第２ナノ粒子体とは前記被験物質を介して結合されている、複合体。
【請求項２４】
２つの前記ナノ粒子体が１つの前記被験物質を介して結合している結合ポイントを複数含む、請求項２３に記載の複合体。
あ
【請求項２５】
請求項１に記載の前記ナノ粒子体の前記高分子膜の形成方法であって、
ジスルフィド結合を側鎖に有する高分子を金属ナノ粒子に接触させて、前記高分子が前記金属ナノ粒子の表面に硫黄原子を介して結合した高分子膜を形成する工程を含んで成る、高分子膜の形成方法。
【請求項２６】
前記高分子は、前記ジスルフィド結合を介して結合する正帯電性基および疎水性基からなる群より選択される少なくとも一方の基を含み、
前記工程は、前記高分子膜の形成とともに、前記正帯電性基および前記疎水性基からなる群より選択される少なくとも一方の基を前記金属ナノ粒子の表面に結合させる、請求項２５に記載の高分子膜の形成方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５３】
特異結合物質４は、高分子膜３に直接結合してもよく、架橋剤（より具体的には、ＮＨＳ－マレイミド基架橋剤等）に由来するリンカー部（より具体的には、ＳＭ（ＰＥＧ）６等）を介して間接的に高分子膜３に結合してもよい。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００９９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００９９】
（２－１．高分子被膜銀ナノ粒子への架橋剤の結合）
作製した高分子被膜銀ナノ粒子の分散液１ｍＬに、さらに架橋剤ＳＭ（ＰＥＧ）６(ＰＥＧｙｌａｔｅｄ，ｌｏｎｇ－ｃｈａｉｎ ＳＭＣＣ ｃｒｏｓｓｌｉｎｋｅｒ)（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ社製「２２１０５」）およびヘパリンナトリウム（富士フイルム和光純薬株式会社製「０８１－００１３６」）を添加し、室温および１時間の条件で、小型回転培養機（タイテック株式会社製「ＲＴ－３０ｍｉｎｉ」）を用いて攪拌し、混合した。その結果、高分子膜３に架橋剤ＳＭ（ＰＥＧ）６が結合した銀ナノ粒子（以下、ＳＭ（ＰＥＧ）６リンカーが結合した高分子被膜銀ナノ粒子とも称する）の分散液を得た。高分子被膜銀ナノ粒子に結合するＳＭ（ＰＥＧ）６リンカーは、マレイミド基を有していた。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０１０５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０５】
［４．評価方法］
（４－１．イムノクロマトグラフィー法による被験物質の検出）
図１７は、イムノクロマトグラフィーストリップ（以下、単に「ストリップ」とも称する）を示す模式図である。このストリップ３００は、短冊状であって、その一方の端部に配置され、測定試料を滴下するサンプルパッド３０１と、中央に配置された判定ライン３０３とを備える。判定ライン３０３には、被験物質３０としてのＣＲＰ抗原が固定されている。測定試料をサンプルパッド３０１に滴下すると、毛細管現象により測定試料中の複合体４０が判定ライン３０３側へ（方向３０５に沿って）移動する。複合体４０が判定ライン３０３に到達すると、ＣＲＰ抗原と抗原抗体反応に起こし、複合体４０が捕捉される。

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１０６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１０６】
ストリップ３００のサンプルパッド３０１に測定試料を滴下して所定の時間静置した。静置したストリップ３００を蛍光光度計（ＰＨＣ株式会社製「社内実験用蛍光光度計」）にセットした。励起光（波長：４１５～４５５ｎｍ）を判定ライン３０３に照射して、蛍光光量（検出波長５７３ｎｍまたは６１３ｎｍ）を測定した。得られた測定値からブランクの測定値を差し引き、蛍光物質由来の蛍光光量の有無を判定した。その結果、測定試料の調製において、ＣＲＰ抗原の濃度が４２ｐＭ（単位：×１０$^{-12}$ｍｏｌ／Ｌ）以上で蛍光が検出された。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２２】
（４－１．イムノクロマトグラフィー法による被験物質の検出）
実施例１と同様に、イムノクロマトグラフィー法による被験物質の検出を行った。判定ライン３０３に照射した励起光の波長は、６００ｎｍであった。蛍光光量を測定した結果、測定試料の調製においてＣＲＰ抗原の濃度が４２ｐＭ以上で蛍光が検出された。反射光を測定した結果、測定試料の調製においてＣＲＰ抗原の濃度が６７０ｐＭ以上で反射光が検出された。イムノグラフィー法によって被験物質であるＣＲＰ抗原が検出された。これにより、測定試料において、複合体４０が形成されていること、判定ラインに複合体４０が存在することが裏付けられた。