

(43) 国際公開日
2008 年 6 月 12 日 (12.06.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/069002 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/553 (2006.01) B22F 9/24 (2006.01)
B22F 9/00 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/071987

(22) 国際出願日: 2007 年 11 月 13 日 (13.11.2007)

(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2006-327719 2006 年 12 月 5 日 (05.12.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 田中貴金属工業株式会社 (TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.) [JP/JP]; 〒1006422 東京都千代田区丸の内 2 丁目 7 番 3 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): 中川 裕文 (NAKAGAWA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒2540076 神奈川県平塚

市新町 2 番 7 3 号 田中貴金属工業株式会社 技術開発センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 田中・岡崎アンドアソシエイツ (TANAKA AND OKAZAKI); 〒1130033 東京都文京区本郷 3 丁目 3 0 番 1 0 号 本郷 K & K ビル Tokyo (JP).

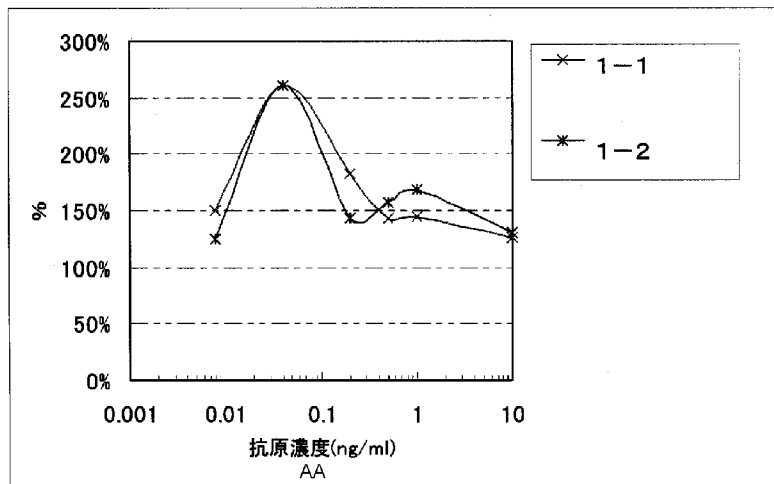
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

[続葉有]

(54) Title: GOLD COLLOID FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC

(54) 発明の名称: 体外診断薬用金コロイド



AA. ANTIGEN CONCENTRATION (ng/ml)

(57) **Abstract:** It is intended to provide a gold colloid for an *in vitro* diagnostic which is a gold colloid suitable as an *in vitro* diagnostic, shows a high color development intensity and reacts even with a small amount of an antigen to thereby show sufficient color development. It is also intended to provide a gold colloid for an *in vitro* diagnostic which shows favorable color development over a broad scope of particle size. Namely, a gold colloid for an *in vitro* diagnostic which comprises a gold colloid and a linker for modifying the gold colloid to thereby immobilize an antibody, wherein the above-described linker comprises compounds represented by Chemical formula 1 and/or Chemical formula 2, namely, two or more kinds of compounds differing from each other in the substituents R₁ and R₂ and/or the carbon atom numbers n₁ and n₂. The gold colloid as described above is suitable as an *in vitro* diagnostic, shows a high color development intensity, enables the detection of an antigen even in a small amount and shows favorable color development over a broad scope of particle size.

[続葉有]



KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 本発明は、体外診断薬として好適な金コロイドであって、発色の強度が大きく、微量の抗原とも反応して十分な発色を示す体外診断用の金コロイドの提供を目的とする。また、本発明は、広範な粒径において、良好な発色を示す体外診断薬用の金コロイドを提供する。本発明は、金コロイドと、前記金コロイドを修飾し抗体を固定するためのリンカーと、を含む体外診断薬用金コロイドであって、前記リンカーは、化1及び／又は化2で示される化合物からなり、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 が異なる2種以上の化合物からなる体外診断薬用金コロイドに関する。本発明の金コロイドは、体外診断薬として好適であり、発色の強度が大きく、微量の抗原であっても検出でき、広範な粒径において発色性が良好なものである。

明 細 書

体外診断薬用金コロイド

技術分野

[0001] 本発明は、体外診断薬として好適な金コロイドに関する。

背景技術

[0002] イムノクロマト法や生体物質の染色等による体外診断において、金コロイドを用いた診断方法が知られている。金コロイドを用いた場合、表面プラズモン共鳴により赤色の強い発色が観察可能となり、視覚による簡易的な診断が行える。また、金コロイドの発色は、時間経過による退色が少なく、生体物質等を固定した場合にも観察可能であるため、体外診断薬として好適である。

[0003] 体外診断薬における金コロイドの具体的な使用方法としては、イムノクロマト法等において、金コロイドに抗体を固定した標識粒子を用いる方法が知られている。イムノクロマト法における使用例としては、抗原が存在する場合、前記標識粒子に抗原が結合した複合体を形成させて、移動層上を展開し、対応する抗体の固定された判定部において複合体を捕捉する方法が知られている。この方法では、判定部において発色が見られるかどうかにより、抗原の有無を確認することができる。

[0004] 前記した標識粒子作成のため、金コロイドに抗体を固定する方法としては、溶媒中に金コロイドと抗体とを分散させ、物理吸着により固定する方法が知られている。しかし、この方法は、金コロイド粒子同士の凝集を生じやすいものであった。また、金コロイドに抗体以外のタンパク質が固定されることもあった。

[0005] そこで、金コロイド粒子同士の凝集を防ぎ、金コロイドに目的の抗体を選択的に固定するため、金コロイドをリンカーで修飾する方法が知られている。リンカーとは、共有結合等の形式で抗体の固定化を可能とする化合物であり、例えば、特許文献1には、SH基を有する非架橋デキストラン又はアミノデキストランからなるリンカーが示されている。また、特許文献2には、アルカンチオール、アルカンチオール誘導体、ジチオール化合物及びトリチオール化合物をリンカーとする金コロイドが示されている。このリンカーを用いることにより、抗体の特異的吸着を促進することができると共に、

金コロイド同士の凝集も防ぐことができる。

特許文献1:特表2003-536074号公報

特許文献2:特開平6-116602号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 上述した体外診断薬では、診断の精度向上や早期発見が望まれており、明確な発色により目的とする抗原等の有無を確認できること、抗原等が微量の場合にも検出可能であること等が求められている。従って、体外診断薬に用いる金コロイドとしては、発色の強度が大きく、微量の抗原とも反応して十分な発色を示すものが好適である。また、体外診断においては、目的の抗原等の種類によって、様々な粒径の金コロイドを必要とする場合があるため、広範な粒径において良好な発色を示す金コロイドは、体外診断薬としての利用性が高い。

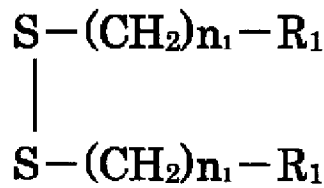
[0007] 従って、金コロイドは、上記した特性を満たしている場合に、体外診断薬として、より好適なものとなる。一方、前記した特許文献1や特許文献2に記載の金コロイドによれば、金コロイドの凝集を防ぎ、目的とする抗体を特異的に固定することは可能となるが、体外診断薬として特に好適な金コロイドとするための上記特性を、全て満たしているものではなかった。

[0008] そこで、本発明は、体外診断薬として好適な金コロイドであって、発色の強度が大きく、微量の抗原とも反応して十分な発色を示す体外診断用の金コロイドの提供を目的とする。また、本発明は、広範な粒径において、良好な発色を示す体外診断薬用の金コロイドを提供する。

課題を解決するための手段

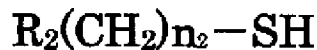
[0009] 本発明者等は、鋭意検討を行い、上記課題を解決可能とする化合物を含むリンカーを見出し、本発明に想到した。すなわち、本発明は、金コロイドと、前記金コロイドを修飾し抗体を固定するためのリンカーと、を含む体外診断薬用金コロイドであって、前記リンカーは、化1及び／又は化2で示される化合物からなり、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 の異なる2種以上の化合物からなることを特徴とする体外診断薬用金コロイドに関する。

[化1]



$(n_1=2\sim 10, \text{R}_1=\text{COOH}, \text{OH}, \text{CHO}, \text{NH}_2)$

[化2]



$(n_2=2\sim 10, \text{R}_2=\text{COOH}, \text{OH}, \text{CHO}, \text{NH}_2)$

[0010] 本発明における、化1又は化2で示される化合物は、アルキル基の末端にジスルフィド基又はチオール基を有し、アルキル基の他の端部に置換基 R_1 又は R_2 を有する。ジスルフィド基とチオール基は、金コロイドを修飾する際に作用する置換基であり、置換基 R_1 、 R_2 は、抗体を固定する際に作用する置換基である。

[0011] また、本発明の金コロイドは、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 の異なる2種以上の化合物からなるリンカーを含むことにより、発色の強度が大きく、微量の抗原とも反応して良好な発色を示す体外診断薬とすることができる。このような効果が得られるのは、本発明のリンカーであれば、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 を選択することにより、金コロイド1粒子あたりに固定される抗体数を調整でき、金コロイド1粒子当たりの発色強度を効率的に利用できるものと考えられる。

[0012] 尚、本発明の化1、化2で示される化合物は、置換基 R_1 、 R_2 が、カルボキシル基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、アミノ基のいずれかであり、炭素数 n_1 、 n_2 が2～10の範囲内のものである。上記した置換基は、それぞれ抗体と結合する反応性が異なるものであり、これら反応性の異なる置換基を含む化合物を2種以上用いることで、金コロイドに結合する抗体数を調整できるものと考えられる。また、炭素数 n_1 、 n_2 が2～10で異なる2種以上の化合物を用いることも、同様に、金コロイドと抗体との反応性の違い

を利用するためである。

[0013] また、本発明のリンカーとしては、化1、化2で示される化合物を両方含むものを利用できる。化1で示される化合物と、化2で示される化合物とは、アルキル基の一端にジスルフィド基を有するか、チオール基を有するかという相違点を有しているが、ジスルフィド基は還元によって容易にチオール基となり、チオール基は酸化によってジスルフィド基となる関係にある。従って、化1で示される化合物と、化2で示される化合物とは、相溶性が高いため、混合して用いることができるものと考えられる。

[0014] 上記したように、化1で示される化合物と化2で示される化合物とは、混合して用いることもできるが、本発明で適用するリンカーは、化1又は化2で示される化合物のいずれかのみからなることが好ましい。ジスルフィド基と、チオール基とは、抗体との反応性に違いがあるため、目標とする反応性に調整し難くなるためである。すなわち、化1で示される化合物と、化2で示される化合物とを混合して用いると、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 の異なる2種以上の化合物を含むことにより抗体との反応性を調整した場合であっても、これとは別にジスルフィド基とチオール基との反応性の相違による影響を考慮しなければならなくなり、目標とする反応性に調整しにくくなると考えられる。

[0015] 化1又は化2で示される化合物のいずれかのみからなる場合、リンカーは、置換基 R_1 又は R_2 がカルボキシル基である第1の化合物と、置換基 R_1 又は R_2 がカルボキシル基以外の置換基である第2の化合物とを含むことが好ましい。抗体との反応性が異なる置換基を含む化合物を用いることにより、金コロイド1粒子あたりに固定される抗体の数を調整できると考えられる。また、上記した第2の化合物の置換基 R_1 又は R_2 は、ヒドロキシル基であることが好ましい。カルボキシル基は、タンパク質中のアミノ基との結合性が高い置換基の1つとして知られており、ヒドロキシル基は、タンパク質中のアミノ基ともカルボキシル基とも、あまり反応しない置換基として知られている。このため、抗体との反応性が高いカルボキシル基と、反応性の低いヒドロキシル基を含むリンカーを用いれば、金コロイドに固定される抗体の数を、より正確に調整できると考えられる。

[0016] また、カルボキシル基を有する第1の化合物と、カルボキシル基以外の置換基を有

する第2の化合物とをリンカーとする場合、第1の化合物の炭素数と第2の化合物の炭素数との差が、2以上であることが好ましい。炭素数の差によっても、抗体との反応性に相違が生じることから、置換基の種類による抗体との反応性調整効果と併用することで、金コロイドに固定される抗体の数を、より正確に調整できる。さらに、第1の化合物は、炭素数 n_1 又は n_2 が4～10の化合物であり、第2の化合物は、炭素数 n_1 又は n_2 が2～8の化合物であることが好ましい。金コロイドを体外診断薬として用いた場合に、発色強度の大きなものとし、微量の抗原とも反応して発色を示すものとすることができる。

[0017] 更に、カルボキシル基を有する第1の化合物と、カルボキシル基以外の置換基を有する第2の化合物とをリンカーとする場合、両化合物の混合比率は、モル比で1:1～0.1:9.9とするのが好ましく、1:1～1:9がさらに好ましい。1:1～0.1:9.9の割合であれば、体外診断薬として良好な発色を示す金コロイドとなり、1:1～1:9であれば、より発色強度の大きいものとすることができる。特に、金コロイドの粒径が大きい場合には、第2の化合物の割合を多くすることで、抗体との反応性を低くして、金コロイド1粒子当たりに固定される抗体数が過剰とならないように調整することが好ましいと考えられる。金コロイドの粒径が大きいと、金コロイド1粒子当たりに固定される抗体数が多くなりやすく、固定される抗体数が多いと、体外診断薬として用いる場合、診断に必要な量よりも過剰の抗原が必要になると考えられる。

[0018] 尚、本発明の金コロイドは、粒径が10nm～150nmであることが好ましく、40～100nmであることがさらに好ましい。粒径が10nm～150nmの金コロイドは、体外診断薬として利用可能であり、粒径40～100nmであれば、十分な発光強度を示すものとすることができる。

[0019] 以上で説明した本発明の金コロイドは、イムノクロマトグラフ法による診断に使用できる。具体的には、イムノクロマトグラフ法では、試料を展開するための移動層と、前記移動層の一端に設けられ、抗原に対応する抗体が固定された金コロイドと、前記移動層の他方の端部に含まれる抗原の有無を判定するための部分と、を備えるイムノクロマトグラフィー用診断キットが用いられるが、この金コロイドとして本発明の体外診断薬用金コロイドを用いることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]第1実施形態の発色強度のグラフ。

[図2]第2実施形態の発色強度のグラフ。

[図3]第3実施形態の発色強度のグラフ。

[図4]第4実施形態の発色強度のグラフ。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 以下、本発明における最良の実施形態について説明する。

[0022] 金コロイドを形成させて、リンカーを修飾した後、抗体を固定して体外診断薬用の金コロイド(以下、抗体固定金コロイドという。)を作成した。そして、イムノクロマトグラフィーに用いるテストストリップを作成した後、抗体固定金コロイドと、抗原とを用いて、イムノクロマトグラフィーを行い、金コロイドによる発色の強度を測定した。

[0023] [金コロイドの形成]

以下の方法により、平均粒径40nmの金コロイドを形成させた。塩化金酸四水和物0.17gと、クエン酸三ナトリウム二水和物0.49gとを、それぞれ超純水25mlと100mlに溶解させて、塩化金酸溶液とクエン酸溶液を調製した。次に、500mlの三口フラスコ内に、塩化金酸溶液6mlと純水200mlとを投入して、30分間加熱還流させた。液温が安定した後、クエン酸溶液50mlを混合して、15分間加熱還流した。その後、加熱を停止して室温で放冷し、核コロイドを形成させた。この核コロイド26mlを、500mlの三口フラスコに入れ、液温が30℃になるまで恒温層内で攪拌した。液温が安定したら、塩化金酸四水和物0.076gを溶解させた塩化金酸溶液252mlと、L-アスコルビン酸ナトリウム0.092gを溶解させたL-アスコルビン酸溶液256mlとを同時に滴下して、1時間攪拌しながら反応させて、平均粒径40nmの金コロイドを形成させた。

[0024] また、平均粒径80nmの金コロイドは、上記により得られた平均粒径40nmの金コロイドを用いて形成させた。平均粒径40nmの金コロイド33.3mlを500mlの三口フラスコに入れ、液温が30℃になるまで恒温層内で攪拌した。液温が安定したら、塩化金酸四水和物0.039gを溶解させた塩化金酸溶液118mlと、L-アスコルビン酸ナトリウム0.043gを溶解させたL-アスコルビン酸溶液120mlとを同時に滴下して、1

時間攪拌しながら反応させた。

[0025] 100nmの金コロイドは、平均粒径40nmの金コロイド33.4mlに対し、塩化金酸四水和物0.079gを溶解させた塩化金酸溶液247mlと、L-アスコルビン酸ナトリウム0.092gを溶解させたL-アスコルビン酸溶液251mlとを滴下したこと以外は、平均粒径80nmの金コロイドと同様の方法によって形成させた。

[0026] [リンカーの修飾]

上記方法により形成した粒径が40、80、100nmの金コロイドに、炭素数 n_1 、 n_2 や、置換基 R_1 、 R_2 の異なる第1の化合物及び第2の化合物を含むリンカーを修飾させた。第1実施形態～第4実施形態のそれぞれについて、金コロイドの粒径、リンカーとして用いた第1の化合物及び第2の化合物の種類、第1の化合物と第2の化合物とを含む割合のモル比を、表1に示す。

[0027] 第1実施形態は、粒径80nmの金コロイドに、化1の化合物(ジスルフィド基を有する)のみを含むリンカーを修飾させたものと、化2の化合物(チオール基を有する)のみを含むリンカーを修飾させたものとした。第2実施形態は、炭素数 n_1 が3、5、7、10である第1の化合物を含むリンカーを修飾させたものとした。第3実施形態では、金コロイドの粒径が40nm、80nm、100nmである場合において、第1の化合物と第2の化合物とのモル比を10:0、5:5、1:9としたリンカーを修飾させた。第4実施形態は、第1の化合物のみを含むリンカーを金コロイドに修飾させたものであり、炭素数 n_1 が10である第1の化合物と、炭素数 n_1 が3、5、7、10である第1の化合物とを、モル比で1:9の割合で含むリンカーを用いた。

[0028] [表1]

		金コロイド 粒径	第1の化合物(A)		第2の化合物(B)		モル比 (A:B)
第1実施形態	1-1	80nm	HOOC(CH) ₁₀ -S HOOC(CH) ₁₀ -S		OH(CH) ₂ -S OH(CH) ₂ -S		1:9
	1-2		HOOC(CH) ₁₀ -SH		OH(CH) ₂ -SH		
第2実施形態	2-1	80nm	HOOC(CH) _n -S HOOC(CH) _n -S	n=10	OH(CH) ₂ -S OH(CH) ₂ -S	1:9	
	2-2			n=7			
	2-3			n=5			
	2-4			n=3			
第3実施形態	3-1	40nm	HOOC(CH) ₁₀ -S HOOC(CH) ₁₀ -S	OH(CH) ₂ -S OH(CH) ₂ -S	10:0		
	3-2				5:5		
	3-3				1:9		
	3-4	80nm	HOOC(CH) ₁₀ -S HOOC(CH) ₁₀ -S	OH(CH) ₂ -S OH(CH) ₂ -S	10:0		
	3-5				5:5		
	3-6				1:9		
	3-7	100nm	HOOC(CH) ₁₀ -S HOOC(CH) ₁₀ -S	OH(CH) ₂ -S OH(CH) ₂ -S	10:0		
	3-8				5:5		
	3-9				1:9		

		金コロイド 粒径	第1の化合物(A)		第1の化合物(B)		モル比 (A:B)
第4実施形態	4-1	80nm	HOOC(CH) ₁₀ -S HOOC(CH) ₁₀ -S	HOOC(CH) _n -S HOOC(CH) _n -S	n=10	1:9	
	4-2				n=7		
	4-3				n=5		
	4-4				n=3		

[0029] 具体的なリンカーの修飾方法について、第3実施形態におけるモル比5:5の金コロイドを例として説明する。上記方法により得られた金コロイド100mlに、リンカーである第1の化合物のメタノール溶液5ml(濃度10 μ M)と、第2の化合物のメタノール溶液5ml(濃度10 μ M)とを添加し、室温で24時間反応させた。その後、10mM ホウ酸緩衝液(pH 8.1)1Lを用いて、5時間の透析を3回行って、未反応の溶液を取り除き、リンカーを修飾した金コロイドを得た。その他の実施形態についても、それぞれ上記と同様の方法によりリンカーの修飾を行った。

[0030] [抗体の固定]

上記方法により、粒径及びリンカーが異なるそれぞれの金コロイドについて、抗体を固定させた。抗体には、妊娠の成立を診断するために用いる絨毛性性腺刺激ホルモ

ン抗体を用いた。リンカーを修飾した金コロイド900 μ lに、0.04mM 1-エチルー3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボキシルイミド塩酸塩100mlを加えて10分間反応させて、100 μ g/ml絨毛性性腺刺激ホルモン抗体(抗ヒトモノクローナル抗体 clone5008、Biochemica社製)100 μ lを加え、3時間室温で反応させた。尚、カルボキシルイミド塩酸塩と、絨毛性性腺刺激ホルモン抗体には、緩衝液として10mM ホウ酸緩衝液(pH8.1)を使用した。

[0031] その後、1% ポリエチレングリコール20000(50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を使用した。)を50 μ lと、10% ウシ血清アルブミン(以下、BSAという。:50mM リン酸カリウム緩衝液(pH9.0)を使用した。)100 μ lを加え、さらに10分間反応させた。その後、4°Cにおいて、15分間遠心分離を行い、上澄みの9割程度を除去して、沈降した抗体固定金コロイドを採取した。採取した沈殿は、超音波分散させた後、保存液(1.0% BSA、0.05% ポリエチレングリコール20000、0.1% NaN_3 、150mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.2))900 μ lを加えた。この遠心分離による洗浄を、3回繰り返し行った。尚、遠心分離は、金コロイドの粒径が40nmの場合3000×g、80nm及び100nmの場合1500×gの条件で行った。洗浄後の抗体固定金コロイドは、分光光度計で吸光度を測定し、波長520～600nmの間における吸光度の最大値が6となるよう、保存液を用いて調整を行った。

[0032] 比較として、リンカーを修飾していない金コロイドについて、抗体固定金コロイドを作成した。平均粒径40nm、80nm、100nmの金コロイドを用いて、50mM KH_2PO_4 (pH7.5)100 μ lと、100 μ g/ml絨毛性性腺刺激ホルモン抗体(5mM KH_2PO_4 (pH7.5))100 μ lとを添加して10分間反応させた以外は、上記と同様の方法により、抗体固定金コロイドを作成した。

[0033] [テストストリップの作成]

イムノクロマトグラフィーによる診断のための、テストストリップを作成した。移動層であるメンブレン上に、抗原の有無を判定するためのテストラインと、金コロイドが、メンブレン上で正常に発色しているかどうかの目安となるコントロールラインとを作成した。テストラインには、抗原と複合体を形成した抗体固定金コロイドのみを捕捉する抗体を塗布し、コントロールラインには、抗原を含まない抗体固定金コロイドを捕捉する抗

体を塗布した。

- [0034] テストラインは、抗体として抗h α S抗体を用いた溶液(表2)を調整し、この溶液0.75 μ lを、定量分注装置(Biojet Quanti 3000、BioDot社製)により、50mm/秒、20.83nL/dot、0.28mmピッチの条件で、メンブレンに塗布して作成した。尚、メンブレンとしては、ニトロセルロース製で、幅25mm、長さ30cmのものを使用した。

- [0035] [表2]

抗h α S抗体 [*] (濃度 1mg/mL)	650 μ l
20% スクロース	250 μ l
イソプロパノール	50 μ l
50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)	50 μ l

※抗ヒト卵胞刺激ホルモン(LH)モノクローナル抗体(α サブユニット、クローン6601)

- [0036] コントロールラインは、抗体として抗マウス抗体を用いた溶液(表3)を調整し、テストラインと同様の塗布条件で、メンブレン上に作成した。

- [0037] [表3]

抗マウス抗体 Dako Z0109(濃度8.6g/L)	40 μ l
イソプロパノール	60 μ l
50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)	1100 μ l

- [0038] テストライン及びコントロールラインを形成したメンブレンは、インキュベータで、42℃において1時間乾燥させた後、室温でさらに2時間乾燥させた。その後、メンブレンを、抗体固定金コロイドがニトロセルロース膜へ吸着することを防ぐためのブロッキング溶液に浸漬した。ブロッキング溶液は、0.5%カゼイン(50mM ホウ酸緩衝液(pH8.5))とし、メンブレンのテストライン側を先に浸漬し、その後に全体を浸漬して、室温で30分静置した。その後、ブロッキング溶液からメンブレンを取り出し、余分な試薬を除いた後、洗浄液である0.01% ドデシル硫酸ナトリウム(5mM リン酸緩衝液(pH7.5))に、前記と同様に浸漬し、30分静置した。洗浄液からメンブレンを取り出し、24時間静置した後、吸収パッドを貼り付けて、4mm幅に切断した。

- [0039] [イムノクロマトグラフィー]

マイクロプレートに、抗原であるリコンビナントhCG(1%BSA、50mM リン酸緩衝液(pH7.4))を40 μ lと、抗体固定金コロイド4 μ lとを投入して混合した後、テストスト

リップを差し込み展開させた。

[0040] [発色強度の測定]

イムノクロマトグラフィーを行った後、メンブレン上のテストラインにおいて、金コロイドの発色強度を測定した。測定には、反応ライン自動読み取り機器(Quad Scan:Bio Dot社製)を用いた。第1実施形態～第4実施形態のリンカーを修飾した金コロイドの発色強度について、リンカーを修飾しなかった金コロイドの発色強度に対する比率を算出した結果を図1～4のグラフに示す。

[0041] 図1より、第1の化合物と第2の化合物とを、モル比で1:9の割合で含むリンカーを用いた金コロイドによれば、化1のみを用いた場合であっても、化2のみを用いた場合であっても、リンカーを修飾しなかった金コロイドに対する発色強度の比率が100%以上となり、十分な発色を示す金コロイドとなることが分かった。また、図2より、第1の化合物の炭素数 n_1 が5、7、10である場合には、 n_1 が3の場合に比べて発色強度の高いものとなることが分かった。

[0042] 図3より、粒径40、80、100nmのいずれの金コロイドを用いたにも、リンカーを修飾しなかった金コロイドに対する発色強度の比率が100%以上となり、良好な発色が示される金コロイドとなることが分かった。また、第1の化合物と第2の化合物との割合のモル比は、粒径40nmの場合は5:5(すなわち1:1)、粒径80nm及び100nmの場合には1:9であると、金コロイドの発色強度がより高いものとなることが分かった。

[0043] そして、図4より、第1の化合物のみを用いた場合の金コロイドは、リンカーを修飾しなかった金コロイドに対する発色強度の比率が100%程度であり、発色強度は高くなりにくい傾向であったが、リンカーの炭素数 n が大きくなるほど発色強度が大きくなる関係となり、発色強度を調整しやすいことが分かった。

産業上の利用可能性

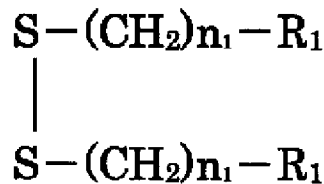
[0044] 以上で説明したように、本発明の金コロイドは、体外診断薬として好適な金コロイドとなる。また、発色の強度が大きく、微量の抗原であっても検出可能であり、広範な粒径において発色性が良好なものとなる。

請求の範囲

- [1] 金コロイドと、前記金コロイドを修飾し抗体を固定するためのリンカーと、を含む体外診断薬用金コロイドであって、

前記リンカーは、化1及び／又は化2で示される化合物からなり、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 が異なる2種以上の化合物からなる体外診断薬用金コロイド。

[化1]



($n_1=2\sim 10$, $R_1=\text{COOH}$, OH , CHO , NH_2)

[化2]



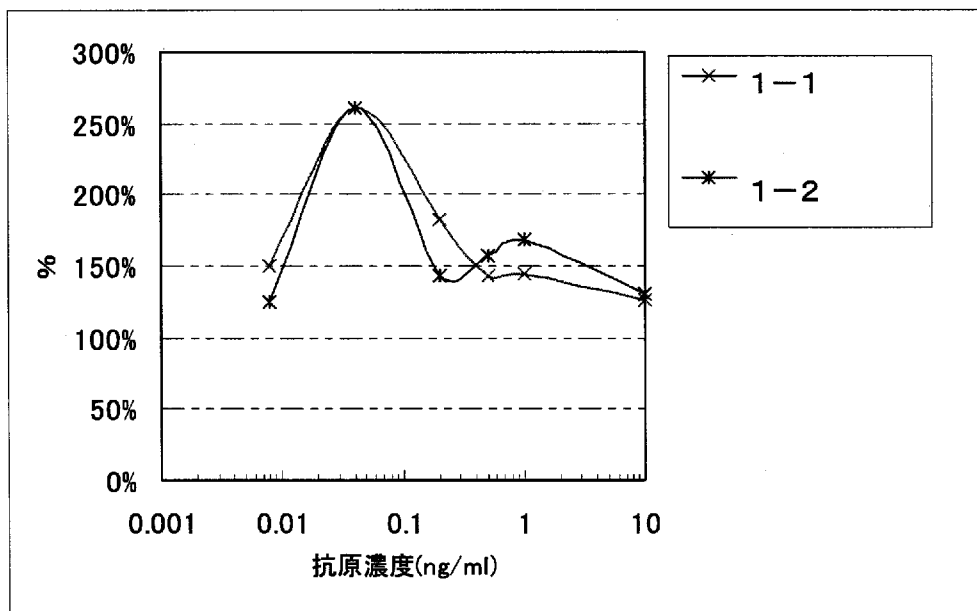
($n_2=2\sim 10$, $R_2=\text{COOH}$, OH , CHO , NH_2)

- [2] リンカーは、化1又は化2で示される化合物のいずれかであって、置換基 R_1 、 R_2 及び／又は炭素数 n_1 、 n_2 が異なる2種以上の化合物からなる請求項1に記載の体外診断薬用金コロイド。
- [3] リンカーは、置換基 R_1 又は R_2 がカルボキシル基である第1の化合物と、置換基 R_1 又は R_2 がカルボキシル基以外の置換基である第2の化合物とを含む請求項1又は請求項2に記載の体外診断薬用金コロイド。
- [4] 第2の化合物の置換基 R_1 又は R_2 は、ヒドロキシル基である請求項3に記載の体外診断薬用金コロイド。
- [5] 第1の化合物の炭素数 n_1 又は n_2 と、第2の化合物の炭素数 n_1 又は n_2 との差が2以上である請求項3又は4に記載の体外診断薬用金コロイド。
- [6] 第1の化合物は、炭素数 n_1 又は n_2 が4～10の化合物であり、第2の化合物は、炭素

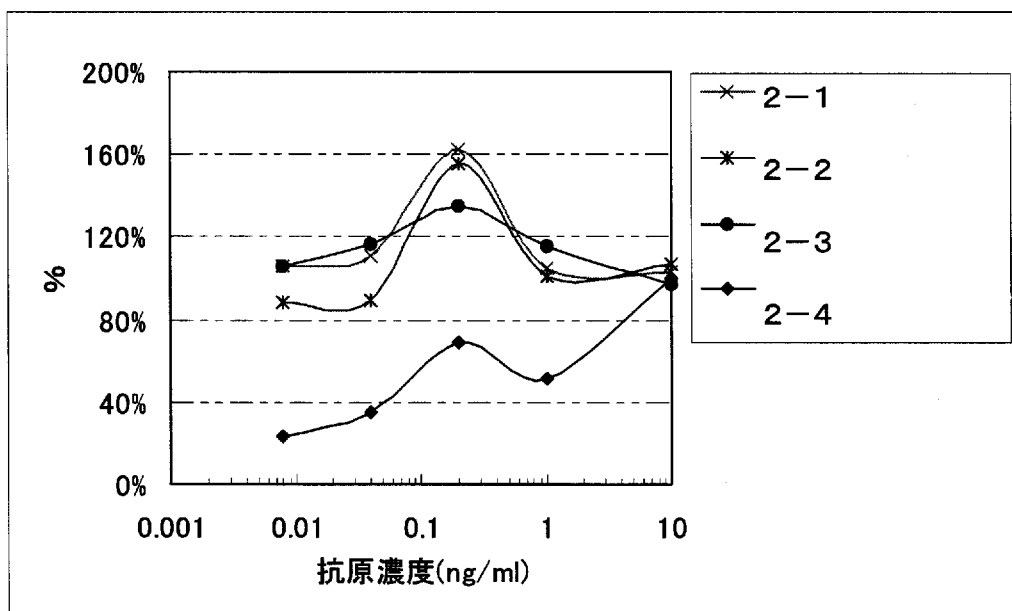
数 n_1 又は n_2 が2～8の化合物である請求項3～請求項5のいずれかに記載の体外診断薬用金コロイド。

- [7] リンカーは、第1の化合物と第2の化合物とを、モル比で1:1～0.1:9.9の割合で含むものである請求項3～請求項6のいずれかに記載の体外診断薬用金コロイド。
- [8] 金コロイドの粒径は、10nm～150nmである請求項1～7のいずれかに記載の体外診断薬用金コロイド。
- [9] 試料を展開するための移動層と、
前記移動層の一端に設けられ、抗原に対応する抗体が固定された金コロイドと、
前記移動層の他方の端部に含まれる抗原の有無を判定するための部分と、を備えるイムノクロマトグラフィー用診断キットであって、
前記金コロイドは、請求項1～8のいずれかに記載の金コロイドであるイムノクロマトグラフィー用診断キット。

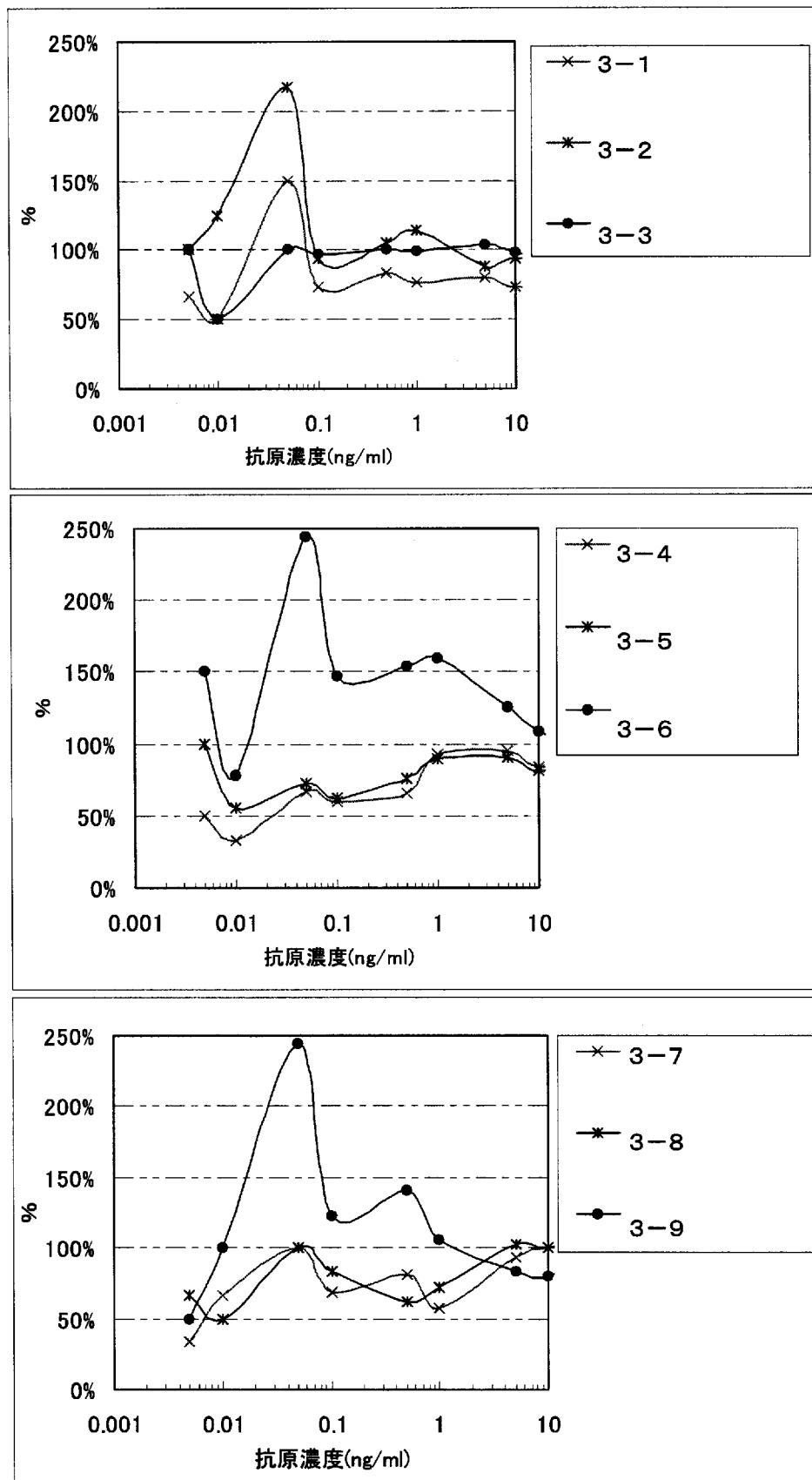
[図1]



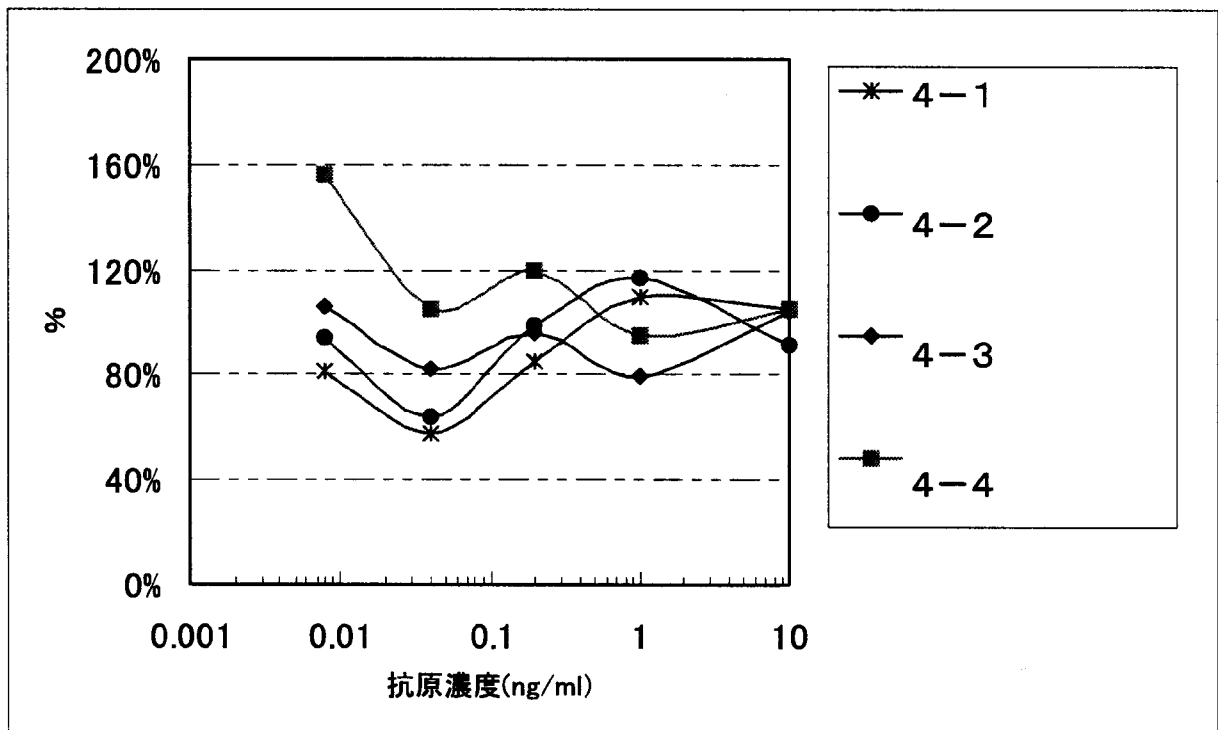
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/553(2006.01)i, B22F9/00(2006.01)i, B22F9/24(2006.01)i, G01N33/543(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)

G01N33/553, B22F9/00, B22F9/24, G01N33/543

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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/Y	JP 6-116602 A (Akzo Nobel N.V.), 26 April, 1994 (26.04.94)	1-4, 7, 8/5, 6, 9
Y	JP 2006-266832 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 05 October, 2006 (05.10.06), (Family: none)	5, 6
Y	JP 2003-536074 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 02 December, 2003 (02.12.03)	9
A	JP 2003-248001 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 05 September, 2003 (05.09.03), (Family: none)	1-9

☒ 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
06 December, 2007 (06.12.07)

Date of mailing of the international search report
18 December, 2007 (18.12.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-170367 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 17 June, 2004 (17.06.04), (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2007/071987

JP 6-116602 A	1994.04.26	US 5294369 A1	1994.03.15
		EP 489465 A2	1992.06.10
		DE 69121849 T	1997.02.06
		FI 915727 A	1992.06.06
		DK 489465 T	1997.01.20
		GR 3021262 T	1997.01.31
		AT 142341 T	1996.09.15
		CA 2056843 A	1992.06.06
		ES 2095291 T	1997.02.16
		IE 914180 A	1992.06.17
		KR 163790 B	1999.03.30
		ZA 9109526 A	1992.11.25
JP 2003-536074 A	2003.12.02	US 2004/0038431 A1	2004.02.26
		EP 1309866 A	2003.05.14
		WO 2001/094947 A1	2001.12.13
		DE 10027776 A	2002.02.14
		AT 309537 T	2005.11.15
		ES 2251502 T	2006.05.01

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/071987

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As the results of the search, it has been clarified that the invention as set forth in claim 1 is not novel because of having been disclosed in document JP 6-116602 A (AKZO NOBEL N.V.) 26 April, 1994 (26.04.94).

Since the invention as set forth in claim 1 has no special technical feature making a contribution over prior art, the inventions as set forth in claims 2 to 9 have no special technical feature in common.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 9 do not comply with the requirement of unity of invention.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/553 (2006.01) i, B22F9/00 (2006.01) i, B22F9/24 (2006.01) i, G01N33/543 (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 (I P C))

Int.Cl. G01N33/553, B22F9/00, B22F9/24, G01N33/543

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	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 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 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 請求の範囲の番号
X/ Y	JP 6-116602 A (アクゾ ノーベル ナムローゼ フェンノートシャ ップ) 1994. 04. 26	1-4, 7, 8/ 5, 6, 9
Y	JP 2006-266832 A (富士写真フイルム株式会社) 2006. 10. 05, (ファ ミリーなし)	5, 6
Y	JP 2003-536074 A (エフ. ホフマン・ラ ロシュ アーゲー) 2003. 12. 02	9

☒ 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

0 6 . 1 2 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 8 . 1 2 . 2 0 0 7

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)

吉田 佳代子

2 J

9 5 1 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

C (続き). 関連すると認められる文献

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に記載された発明は、調査の結果、文献JP 6-116602 A（アクゾ ノーベル ナムローゼ フェンノートシャップ）1994.04.26 に開示されており、新規でないことが明らかになった。

したがって、請求の範囲1に記載された発明は、先行技術に対して貢献する特別な技術的特徴がないため、請求の範囲2－9に記載された発明は、共通する特別な技術的特徴を有していない。

よって、請求の範囲1－9に記載された発明は、発明の単一性を満たさない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

JP 6-116602 A	1994. 04. 26	US 5294369 A1	1994. 03. 15
		EP 489465 A2	1992. 06. 10
		DE 69121849 T	1997. 02. 06
		FI 915727 A	1992. 06. 06
		DK 489465 T	1997. 01. 20
		GR 3021262 T	1997. 01. 31
		AT 142341 T	1996. 09. 15
		CA 2056843 A	1992. 06. 06
		ES 2095291 T	1997. 02. 16
		IE 914180 A	1992. 06. 17
		KR 163790 B	1999. 03. 30
		ZA 9109526 A	1992. 11. 25
JP 2003-536074 A	2003. 12. 02	US 2004/0038431 A1	2004. 02. 26
		EP 1309866 A	2003. 05. 14
		WO 2001/094947 A1	2001. 12. 13
		DE 10027776 A	2002. 02. 14
		AT 309537 T	2005. 11. 15
		ES 2251502 T	2006. 05. 01