

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/013378

発行日 平成25年1月7日(2013.1.7)

(43) 国際公開日 平成23年2月3日(2011.2.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532 A	4 G O 6 5
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
BO 1 J 13/00 (2006.01)	BO 1 J 13/00 Z	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

出願番号	特願2011-524664 (P2011-524664)	(71) 出願人	501241645 学校法人 工学院大学 東京都新宿区西新宿 1 丁目 2 4 番 2 号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/004816		
(22) 国際出願日	平成22年7月29日 (2010.7.29)	(71) 出願人	000206956 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地
(31) 優先権主張番号	特願2009-176812 (P2009-176812)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(32) 優先日	平成21年7月29日 (2009.7.29)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合金型金属コロイド

(57) 【要約】

金コロイドやAuコアPtシェル型の複合コロイドよりも視認性が高く一層高感度で、免疫学的測定のような検査用標識剤等として好適な金属コロイドの提供。

金塩及び白金塩を、アミノ酸及びその誘導体、オリゴペプチド及びその誘導体並びにアミノ糖から選択される1種以上の還元剤と共にアルカリの存在下混合し、前記金塩及び白金塩を還元することにより形成される合金型Au/Pt複合コロイド。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

金塩及び白金塩を、アミノ酸及びその誘導体、オリゴペプチド及びその誘導体並びにアミノ糖から選択される 1 種以上の還元剤と共にアルカリの存在下混合し、前記金塩及び白金塩を還元することにより形成される合金型Au/Pt複合コロイド。

【請求項 2】

金塩及び白金塩を、Pt量がAu量の7~25%となるように使用する請求項 1 記載の合金型Au/Pt複合コロイド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の合金型Au/Pt複合コロイドを含有する免疫学的測定用標識剤。

10

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の合金型Au/Pt複合コロイドによって標識された抗体又は抗原。

【請求項 5】

金塩及び白金塩を、アミノ酸及びその誘導体、オリゴペプチド及びその誘導体並びにアミノ糖から選択される 1 種以上の還元剤と共にアルカリの存在下混合し、前記金塩及び白金塩を還元することを特徴とする合金型Au/Pt複合コロイドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検査用標識剤等として好適な合金型金属コロイド及びその製造方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

検査薬の開発では、臨床目的に応じて定量系試薬と定性系試薬が作り分けられている。インフルエンザウイルスのような感染症抗原の検出や心筋マーカー等ではPOCT検査として迅速診断に重きを置かれており、短時間に簡易な抗原検出が可能なイムノクロマト法が採用される。

【0003】

イムノクロマト法においては、目視検出に使用可能な抗体標識用の着色プローブとして、着色ラテックス、金属コロイド、酵素標識等が用いられるが、このうち金属コロイドは比較的扱いが簡単であり、またラテックス粒子に比し目視の強度が高いことから、最も一般的に使用されている。

30

【0004】

金属コロイドの中でも汎用されているのはクエン酸で還元した金(Au)コロイドである。しかし、金コロイド標識を用いたイムノクロマト法の感度は必ずしも十分なものとは云えない。また、金コロイドは赤~赤紫色しか存在しないためラテックスのような2色判定は不可能であるという問題もある。

【0005】

他の金属コロイドとして、白金(Pt)コロイドがあり、このコロイドは黒色を呈することが知られている。イムノクロマト法に用いられているニトロセルロースメンブランが白色であることから、黒色のコロイドを用いることができれば白と黒の高いコントラスト差によって視認性の向上、ひいては高感度化が期待されている。

40

【0006】

従来、白金コロイドの合成は、クエン酸で還元したものや、より強い還元剤を用いる高分子保護のもの他、近年では、低分子保護のものも報告されている(特許文献1、特許文献2)。しかしながら、いずれの合成法によっても製造された白金コロイドの粒子径は小さいため、同じ粒子数では粒子径の大きな金コロイドに比べて視認性が低く、実用性に欠ける。

【0007】

粒子径が大きい白金コロイドについては、金コロイドを核(コア)としてその表面に白

50

金が殻（シェル）として担持されているAuコアPtシェル型の構造をはじめ、PtコアAuシェル型、AuとPtが一体となった合金型等の構造をとる複合コロイドが報告されている（非特許文献1～7）。

また、AuコアPtシェル型の複合コロイドをイムノクロマト法に用いることで測定法の感度が上昇することも報告されているが（特許文献3）、その感度は十分なものとは云えない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2002-239372号公報

10

【特許文献2】国際公開第2005/023468号パンフレット

【特許文献3】特許第3886000号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】R.S.Minor et.al., 7th International Congress on catalysis. Elsevier S.P.Co.1981.

【非特許文献2】P.A. Sermon et.al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl.26(1987) No.9.

【非特許文献3】P.A. Sermon et.al., Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol.1988 Materials Research Society.

【非特許文献4】G.Schmid et.al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl.30(1991) No.7.

20

【非特許文献5】T.Yonezawa et.al., J. Molecular Catalysis 83(1993) 167.

【非特許文献6】T.Yonezawa et.al., J.C.S. Faraday Trans., 1995, 91(22), 4111.

【非特許文献7】A.Henglein J. Phys. Chem. B2000, 104, 2201.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、金コロイドやAuコアPtシェル型の複合コロイドよりも視認性が高く一層高感度で、免疫学的測定のような検査用標識剤等として好適な金属コロイドを提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

30

【0011】

本発明者らは、視認性に優れるAu/Pt複合コロイドについて種々検討した結果、コアとなるコロイドを作らず、あらかじめ金塩と白金塩を、還元剤としてアミノ酸やペプチド等を用いて混合し、コロイドを作製した場合に、安定した合金型のAu/Pt複合コロイド粒子が得られ、当該コロイドは視認性が高く、免疫学的測定用標識剤として使用した場合に、信号強度が高く一層高感度な測定が可能となることを見出した。

【0012】

すなわち、本発明は、以下の1)～4)に係るものである。

1) 金塩及び白金塩を、アミノ酸及びその誘導体、オリゴペプチド及びその誘導体並びにアミノ糖から選択される1種以上の還元剤と共にアルカリの存在下混合し、前記金塩及び白金塩を還元することにより形成される合金型Au/Pt複合コロイド。

40

2) 金塩及び白金塩を、Pt量がAu量の7～25%となるように使用する1)の合金型Au/Pt複合コロイド。

3) 上記1)又は2)の合金型Au/Pt複合コロイドを含有する免疫学的測定用標識剤。

4) 上記1)又は2)の合金型Au/Pt複合コロイドによって標識された抗体又は抗原。

5) 金塩及び白金塩を、アミノ酸及びその誘導体、オリゴペプチド及びその誘導体並びにアミノ糖から選択される1種以上の還元剤と共にアルカリの存在下混合し、前記金塩及び白金塩を還元することを特徴とする合金型Au/Pt複合コロイドの製造方法。

【発明の効果】

【0013】

50

本発明の合金型Au/Pt複合コロイドは、金コロイドやAuコアPtシェル型の複合コロイドよりも視認性が高く一層高感度で、免疫学的測定のような検査用標識剤等として極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】合金型Au/Pt複合コロイドの電子顕微鏡写真（20万倍、1目盛り8nm）。

【図2】合金型Au/Pt複合コロイドを用いたイムノクロマト法の測定結果（判定部分の写真）。C:コントロールライン、T:テストライン

【図3】Pt量を変えて合成した合金型Au/Pt複合コロイドを用いたイムノクロマト法の測定結果（判定部分の写真）。C:コントロールライン、T:テストライン

【図4】Pt量を変えて合成した合金型Au/Pt複合コロイドを用いたイムノクロマト法の測定結果（テストラインの信号強度）。

【図5】Pt量を変えて合成した合金型Au/Pt複合コロイドを用いたイムノクロマト法の測定結果（色調）。

【図6】AuコアPtシェル型Au/Pt複合コロイドを用いたイムノクロマト法の測定結果（判定部分の写真）。C:コントロールライン、T:テストライン

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明において用いられる、「金塩」としては、塩化金酸、シアン化第2金カリウム、シアン化金カリウム、テトラアンミン金硝酸塩、テトラニトрат金アンモニウム塩、ジアクア（1, 10-フェナントロリン）金硝酸塩等が挙げられ、このうち、塩化金酸、が好ましい。

また、「白金塩」としては、ヘキサクロロ白金酸、ジニトロジアンミン白金、ジニトロジアンミン白金硝酸塩、シス-ジアンミンジアクア白金硝酸塩、トランス-ジアンミンジアクア白金硝酸塩、テトラニトロ白金酸、テトラ（オキサラト）白金酸、シスジニトロジアクア白金、テトラアンミン白金水酸塩、ヘキサアンミン白金水酸塩、テトラアンミン白金塩化物、ヘキサアンミン白金塩化物、ヘキサヒドロキシ白金酸、酸化白金、塩化第1白金、塩化第2白金、テトラクロロ白金酸カリウム等が挙げられ、このうち、テトラクロロ白金酸カリウム、ヘキサクロロ白金酸等が好ましい。

【0016】

本発明における還元剤は、アミノ酸、オリゴペプチド、アミノ糖等であり、通常的环境下では還元特性はないが、アルカリ环境下においては金イオン及び白金イオンを還元する還元特性を示すものである。

【0017】

アミノ酸としては、例えばグリシン、アラニン、セリン、バリン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、イソロイシン、ロイシン、リジン、アルギニン、システイン、メチオニン、プロリン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン等のα-アミノ酸が挙げられ、その誘導体としては、カルボン酸エステル誘導体（例えばメチルエステル、エチルエステル等）や、カルボン酸アミド誘導体を挙げるができる。

【0018】

オリゴペプチドとしては、グリシルグリシン、グリシルアラニン、アラニルアラニン等のジペプチドや、グリシルグリシルグリシン、グリシルグリシルアラニン等のトリペプチドが挙げられるが、他のアミノ酸を含むオリゴペプチドでもよい。それらの誘導体としては、カルボン酸エステル誘導体（例えばメチルエステル、エチルエステル等）や、カルボン酸アミド誘導体を挙げるができる。例えば、ジペプチド残基のエステル誘導体としては、アスパルテーム（N-(L-α-アスパルチル)-L-フェニルアラニン 1-メチルエステル）等を例示できる。

【0019】

アミノ糖としては、例えば、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクトサミ

10

20

30

40

50

ン、N - アセチルガラクトサミン等が挙げられる。

【0020】

これらの還元剤のうち、好適なものとして、グリシン、アラニン等のアミノ酸、グリシルグリシン等のオリゴペプチドが挙げられる。

当該還元剤は、アミノ酸、その誘導体、オリゴペプチド、その誘導体、及びアミノ糖をそれぞれ単独で用いる他、複数を組み合わせて用いてもよい。

尚、本発明において還元剤として用いるアミノ酸、オリゴペプチド、アミノ糖等は、これが合金型Au/Pt複合粒子を取り囲み、保護成分としても機能する。従って、本発明のコロイドは、別途保護成分を添加しなくても、形成された合金型Au/Pt複合粒子が沈降せずに分散してコロイドとして安定に存在可能である。但し、より沈降しづらくするために、メチオニンやシステインなどの硫黄を含有するアミノ酸やゼラチンコロイドを添加してもよい。

10

【0021】

アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属の水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属の炭酸塩、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等のアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸マグネシウム、炭酸カルシウム等のアルカリ土類金属の炭酸塩、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、アンモニア等が挙げられ、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属の水酸化物が好ましい。

【0022】

以下に、本発明の合金型Au/Pt複合コロイドの調製について具体的に説明する。

20

1) 合金型Au/Pt複合粒子(コロイド)の形成

溶媒に、金塩、白金塩、および還元剤をアルカリの存在下混合し、反応させることにより、合金型のAu/Pt複合粒子(コロイド)を得ることができる。

ここで、用いられる溶媒は、通常、水が用いられるが、超純水や、イオン交換水を数回蒸留したものを使用することもできる。

尚、金塩、白金塩、還元剤の添加方法は特に限定されないが、例えば、溶媒に金塩を加え、次いで還元剤を添加し、次いで白金塩を加える方法が挙げられる。

【0023】

金塩の添加量は、溶媒全量に対して、好ましくは0.01~0.4w/v%、より好ましくは0.05~0.09w/v%とするのが望ましい。

30

また、生成されたAu/Pt複合コロイドの視認性、特にイムノクロマト用の標識物(着色粒子)として使用する場合、その信号強度(検出感度)を高める観点から、金塩及び白金塩の添加量は、Pt量がAu量の7~25%、より好ましくは12~18%となるように添加するのが望ましい。

【0024】

還元剤の添加量は、その種類によっても異なるが、金塩及び白金塩の1モルに対して、1~12モルが好ましく、更に4~6モルが好ましい。

【0025】

アルカリは、溶液中における濃度が、通常5mmol/L~30mmol/L、好ましくは12mmol/L~14mmol/Lとなる範囲で使用するのが好ましく、また溶液のpHが10以上、好ましくは11~12となるように添加するのがよい。

40

【0026】

反応は、通常90~98℃、好ましくは93~97℃で、10~60分、好ましくは、20~45分、攪拌下に行えばよいが、40~65℃で、5~20分反応後、さらに温度を上げて(93~98℃)、20~60分間反応させるのが好ましい。

斯かる反応により、合金型Au/Pt複合粒子(コロイド)が得られる。

【0027】

2) 未反応物及び脱塩処理

次いで、得られた合金型Au/Pt複合粒子(コロイド)から未反応物や塩を低減するための処理が行われる。

50

斯かる処理としては、例えば、(1)遠心分離器を用いた限外濾過(フィルターは分子量30000のものを用い、2000~5000rpmにて30分遠心する)を行った後、適宜水を加える、(2)浸透膜を用いる、(3)超遠心分離器で分離(6000rpm、10分)し、適宜水を加える、等が挙げられる。

【0028】

3)中和処理

続いて、必要に応じて、溶液のpHが7~9となるように中和処理が行われる。

当該中和処理は、例えば、コロイド溶液を遠心分離して沈降物と上澄みに分離し、上澄みを除去して沈降物を取り出し、水で薄め、pHが6以下とならないように中和する。このとき加える水の量でコロイドの濃度を調節でき、容易に高濃度にできる。

10

【0029】

斯くして得られたコロイドは、黒色に近い黒紫色を呈し、粒子が沈降せずに分散して安定的に存在する、いわゆる分散コロイドである。当該コロイドは、電子顕微鏡による観察では、AuコアPtシェル型ではなくAuとPtが一体となった滑らかな合金型(homogeneous alloy)のAu/Pt複合コロイドであり(図1参照、1目盛り8nm)、Au/Pt複合粒子の平均粒子径は、20nm~100nmである。尚、平均粒子径は、例えば透過型電子顕微鏡写真(TEM)を撮影し、100個の粒子について粒子径を測定し、その平均値として求めることができる。

従って、当該合金型Au/Pt複合コロイドは、イムノクロマト法やその他の各種免疫学的測定法に用いられる標識剤(可視プローブ)として好適に使用できる。

20

【0030】

本発明の合金型Au/Pt複合コロイドを用いた抗原、抗体等のタンパク質の標識は、常法に行うことができる。例えば、合金型Au/Pt複合コロイドに抗体を混合し、20分~24時間攪拌してコロイドに抗体を結合させた後、カゼイン溶液やBSA等を添加してコロイド表面をブロックする。次いで、遠心分離を行って上清を取り除いた後、カゼインを含む緩衝液に懸濁して合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体を得ることができる。

【実施例】

【0031】

実施例1 合金型Au/Pt複合コロイドの合成

253.2mlの水に1%(w/v)塩化金酸18mlを加え、次いで還元剤として1%(w/v)グリシンを18ml、0.5NのKOH8.1mlさらに1%(w/v)塩化白金酸(II)カリウム2.70mL(Pt量15%)を加えた後、50℃の温度で15分間反応させた。さらに98℃の水浴に移して30分間反応させた。300mlの水を加えた後、限外ろ過を行って100mlに濃縮したものをAu/Pt複合コロイドとした。

30

この方法で得られたコロイドは、黒色に近い黒紫色を呈し、電子顕微鏡による観察ではAuコアPtシェル型ではなくAuとPtが一体となった滑らかな合金型(homogeneous alloy)のAu/Pt複合コロイドであった。電子顕微鏡写真を図1に示す。

【0032】

実施例2 標識抗体の作製

得られた合金型Au/Pt複合コロイド1mL(OD₅₂₀=10)に抗ヒトIgGヤギ抗体を20μg混合し、室温で約6時間攪拌してコロイドに抗体を結合させた。終濃度が1%となるようにカゼイン溶液を添加し、室温にて一夜攪拌してコロイド表面をブロックした。4500g、4℃で10分間遠心分離を行って回収し、1%カゼインを含む緩衝液に懸濁して合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体を作製した。

40

【0033】

試験例1 イムノクロマト法による測定

実施例2で作製した合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体を用いて、下記に示すイムノクロマト法での測定を行って当該コロイドの可視プローブとしての性能を評価した。

1)評価に用いるイムノクロマト法として検体中の抗ヘリコバクター・ピロリ抗体を検出する測定系を利用した。このイムノクロマト法は、ヘリコバクター・ピロリ菌体から抽

50

出した抗原を固相化したニトロセルロースメンブランからなるイムノクロマト用テストストリップに検体を反応させ、メンブラン上の抗原に結合した抗ヘリコバクター・ピロリ抗体をコロイド標識抗ヒトIgG抗体によって検出するものである。材料の調製法及び測定法を下記に示す。

【0034】

2) 抗原固相化メンブランの作製

ニトロセルロースメンブランにヘリコバクター・ピロリ菌体から抽出した抗原を1cm当り3 μ gの量でライン状に塗布した。同時に抗ヒトIgGヤギ抗体を適量ライン状に塗布した。塗布後37 $^{\circ}$ Cで2時間以上乾燥させた後、非特異的な吸着を防ぐためにスキムミルクを含んだ緩衝液にメンブランを浸してブロッキングを行った。その後、十分に乾燥させて抗原固相化メンブランとした。

10

【0035】

3) イムノクロマト用テストストリップの作製

グラスファイバー等からなるサンプルパッド、セルロース等からなる吸収パッドを2)で作製した抗原固相化メンブランに貼り付けた。サンプルパッドは測定検体と接触して抗原固相化メンブラン部分に測定検体を供給する部分として、吸収パッドはメンブラン上に展開する測定検体を吸い上げるために使用する。パッド類を貼り付けたメンブランを4mm幅にカットしてイムノクロマト用テストストリップとした。

【0036】

4) 測定方法

ヘリコバクター・ピロリ陽性者から採取した血清を緩衝液で希釈した陽性管理試料を抗ヘリコバクター・ピロリ抗体陽性検体として、ヘリコバクター・ピロリ陽性者から採取した尿を抗ヘリコバクター・ピロリ抗体弱陽性検体として測定に用いた。加えてヘリコバクター・ピロリ陰性者から採取した尿を抗ヘリコバクター・ピロリ抗体陰性検体として用いた。測定及び判定手順を下記に示す。

20

i) 各検体を測定用緩衝液で希釈して測定容器に滴下する。

ii) 各々の合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体を測定容器に加えて混合する。

iii) 測定容器にイムノクロマト用テストストリップを差し込んで室温で15分間静置する。

iv) 15分後に目視によって有色ライン出現の有無を確認する。

30

なお、テストストリップ上のヘリコバクター・ピロリ抽出抗原を塗布した部分をテストライン部分、抗ヒトIgG抗体を塗布した部分をコントロールライン部分とし、テストライン部分とコントロールライン部分の両方に有色ラインが出現した場合を陽性と判定する。出現する有色ラインがコントロールライン部分のみであった場合は陰性と判定する。

【0037】

5) 測定結果

測定結果を図2に示す。

図2より、コントラスト、信号強度ともに良好であり、イムノクロマトに適した高性能なコロイドであることが判った。本発明の方法により調製された合金型Au/Pt複合コロイドは、イムノクロマト法の高性能な可視プローブとして使用可能であることが分かる。

40

【0038】

実施例3

塩化金酸と混合するPt量を10%、12%、13%、15%、18%、20%としてAu/Pt複合コロイドを合成した。253.2mlの水に1% (w/v) 塩化金酸18mlと1% (w/v) 塩化白金酸(II)カリウムの量をそれぞれ1.80mL (Pt量10%)、2.70mL (Pt量15%)、2.16mL (Pt量12%)、2.34mL (Pt量13%)、2.70mL (Pt量15%)、3.24mL (Pt量18%)、3.60mL (Pt量20%)を加えた。次に0.5NのKOH8.1mlと還元剤として1% (w/v) グリシンを18ml添加した後、50 $^{\circ}$ Cの温度で15分間反応させた。さらに98 $^{\circ}$ Cの水浴に移して30分間反応させた。300mlの水を加えた後、限外ろ過を行って100mlに濃縮したものを、それぞれPt量が10%、12%、13%、15%、18%、20%のAu/Pt複合コロイドとした。

50

得られた各合金型Au/Pt複合コロイドを用いて、実施例2と同様にして、合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体を作製した。

【0039】

試験例2

実施例3で作製した合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体を用いて、試験例1と同様にしてイムノクロマト法での測定(図3)を行って当該コロイドの可視プローブとしての性能を評価した。

1) 信号強度

測定が終了したテストストリップの判定部分の写真を撮影した。写真に写っているテストラインを画像解析ソフトウェア(デンシトグラフ、アトー株式会社)にて解析し、出現したラインの強弱を信号強度として数値化して比較した(図4)。

Pt量を変化させて作製した合金型Au/Pt複合コロイド標識抗体の信号強度は、20%で弱くなったが10~18%の間では大きな差はなく、弱陽性検体もはっきりと確認することができた。

2) 色調

1)で陽性検体の測定結果を撮影した写真について、画像ソフトウェア(photoshop(登録商標)、adobe社)を用いて明るさ・コントラスト等を調整した結果、Pt量が12~18%の複合コロイドの色調は黒に近い色調であったが、Pt量が10%の複合コロイドについては赤色が強い色調であった(図5)。白いニトロセルロースメンブランに対しては、赤色より黒色に近い色調の方が高いコントラストを期待できることから、Pt量が12~18%の合金型Au/Pt複合コロイドが可視プローブとして好ましい。

【0040】

比較例

特許文献3(特許第3886000号公報)に記載の方法でAuコアPtシェル型Au/Pt複合コロイドを合成し、試験例1と同様にしてイムノクロマト法での測定を行って、当該コロイドの可視プローブとしての性能を評価した。

(1) コロイドの合成

390mlの超純水をフラスコに入れて沸騰させ、この沸騰水に塩化金酸水溶液(水溶液1リットル当たり金として1g)30mlを加え、その後、1重量%クエン酸ナトリウム水溶液60mlを加えた。6分45秒後に、塩化白金酸水溶液(水溶液1リットル当たり白金として1g)30mlを加えた。塩化白金酸水溶液添加から5分後に1重量%クエン酸ナトリウム水溶液60mlを加え、4時間還流を行ってコロイドを得た。得られたコロイド1mlを13800xgで25分間遠心分離を行った後、上清を除き、残った沈殿に超純水を0.5ml加え、攪拌後、超音波で沈殿を再懸濁せしめ、この懸濁液を200mM炭酸カリウム水溶液でpH9.0に調整した。これに超純水を加えて全量を100mlとしてAu/Pt複合コロイドを得た。このコロイドは、AuコロイドからなるコアをPtが完全あるいは部分的に被膜するAuコアPtシェル型の構造となるとされている。

【0041】

(2) 標識抗体の作製

このコロイドのイムノクロマト法での性能を確認するため、得られたコロイド1ml($OD_{520}=3.4$)に抗ヒトIgGヤギ抗体を6.8 μ g混合し、最適な標識条件を得るためにpHを7~10として室温で約6時間攪拌してコロイドに抗体を結合させた。終濃度が1%となるようにカゼイン溶液を添加し、室温にて一夜攪拌してコロイド表面をブロックした。4500g、4で40分間遠心分離を行って回収し、1%カゼインを含む緩衝液に懸濁してAu/Pt複合コロイド標識抗体を作製した。

【0042】

(3) イムノクロマト法による測定

作製したAu/Pt複合コロイド標識抗体を、実施例1と同様のイムノクロマト法での測定を行った。

【0043】

(4) 測定結果

10

20

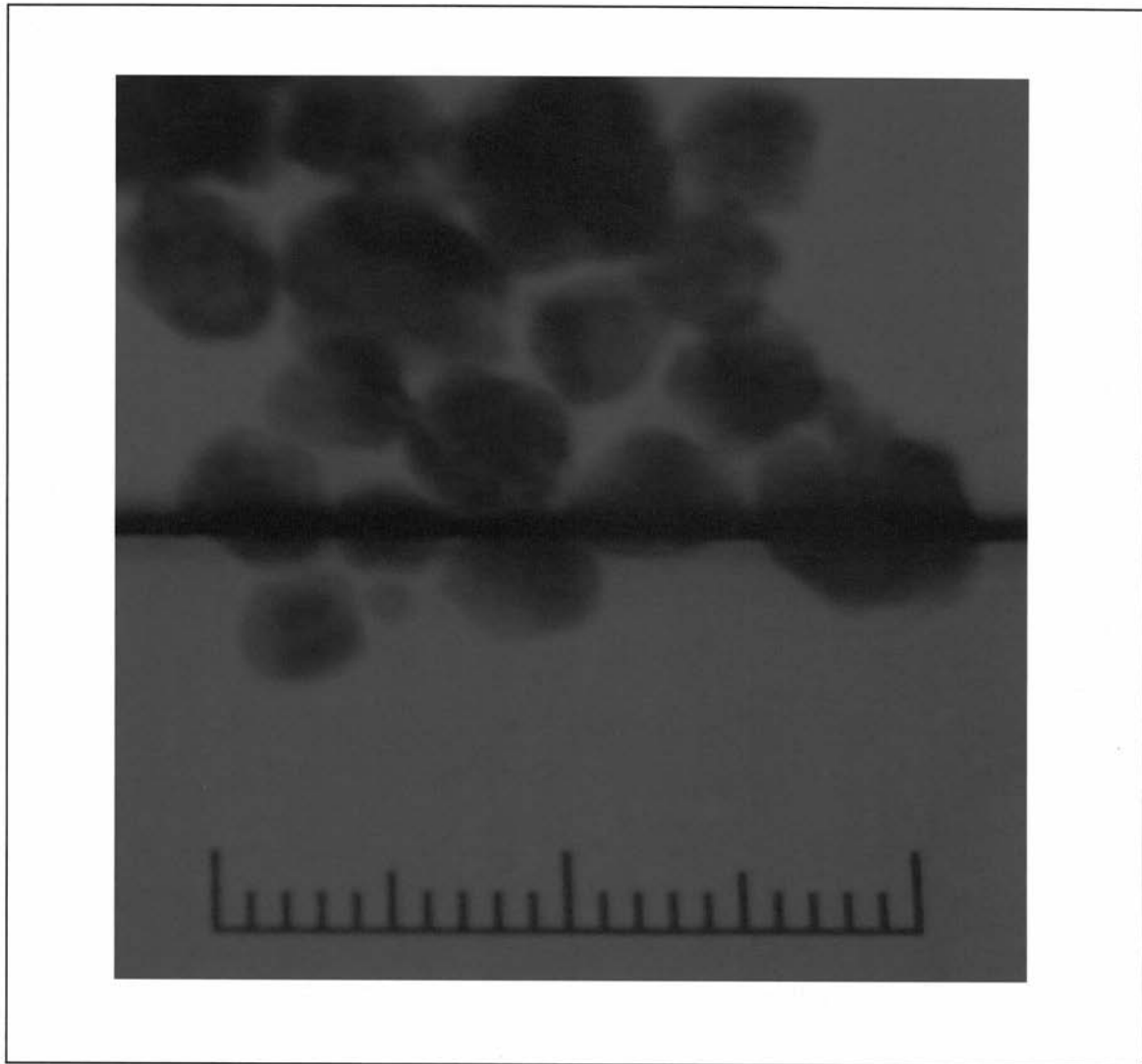
30

40

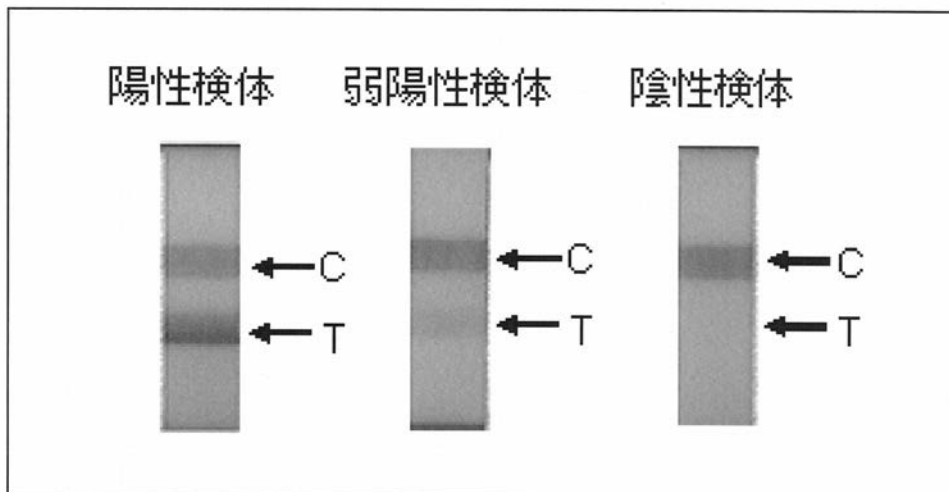
50

測定の結果、いずれの標識抗体においても陽性検体測定時に出現するテストラインは非常に弱かった。さらに、弱陽性検体測定時にはテストラインを確認することができず、イムノクロマト法における性能としては十分ではなかった。イムノクロマト法の測定結果（テストストリップ上のコントロールラインとテストラインが出現する判定部分の写真）を図6に示す。

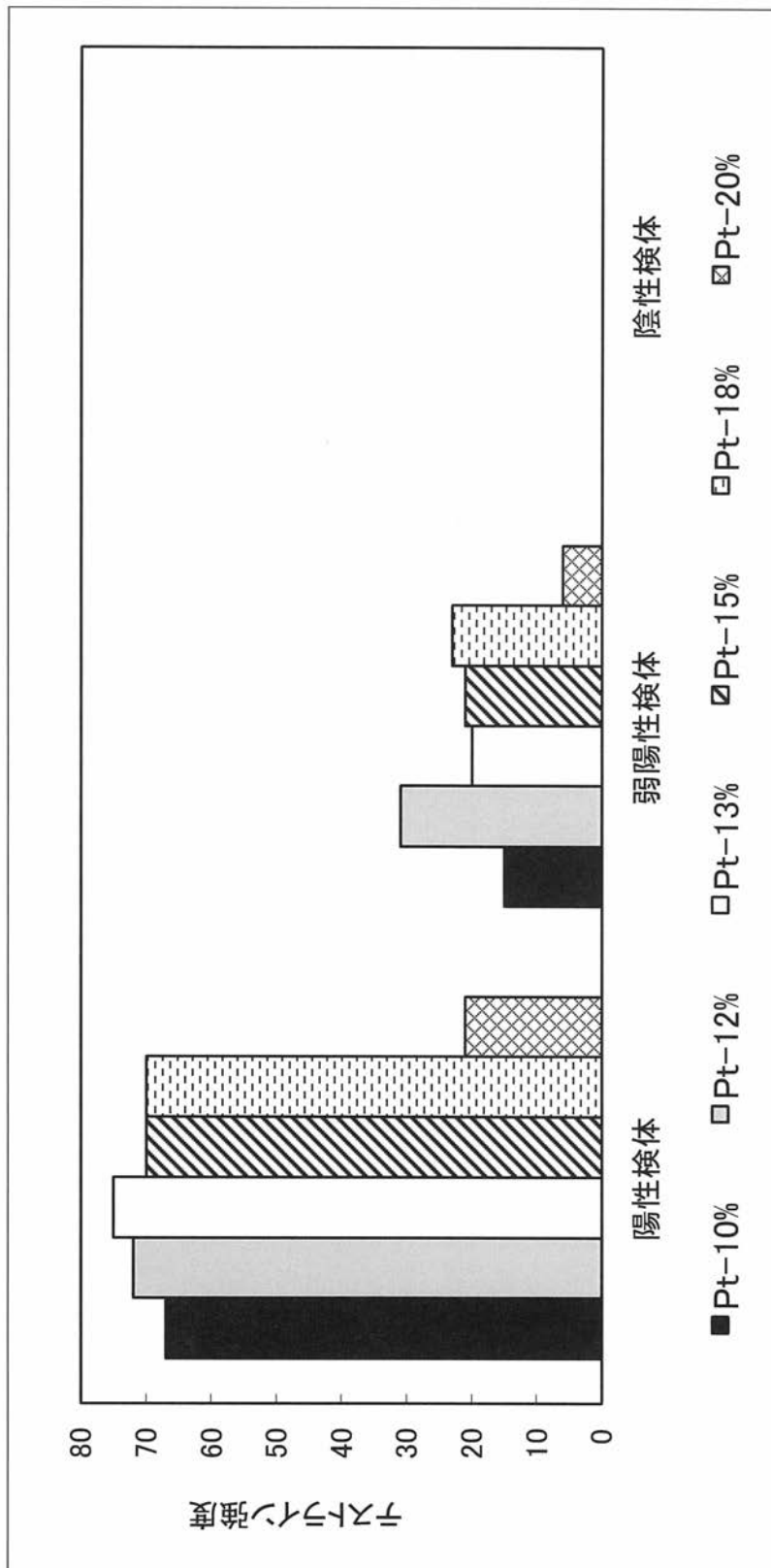
【 図 1 】



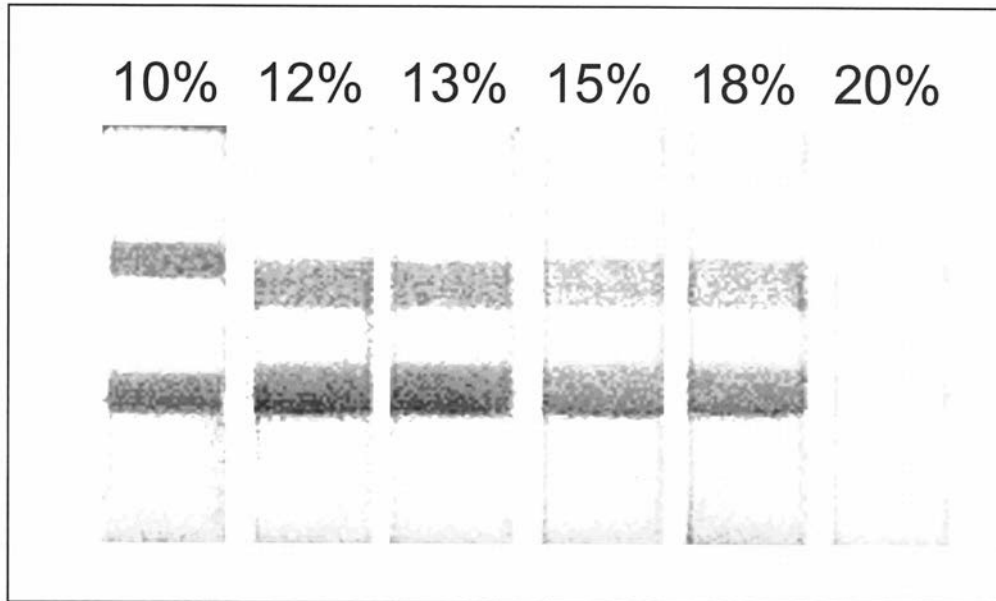
【 図 2 】



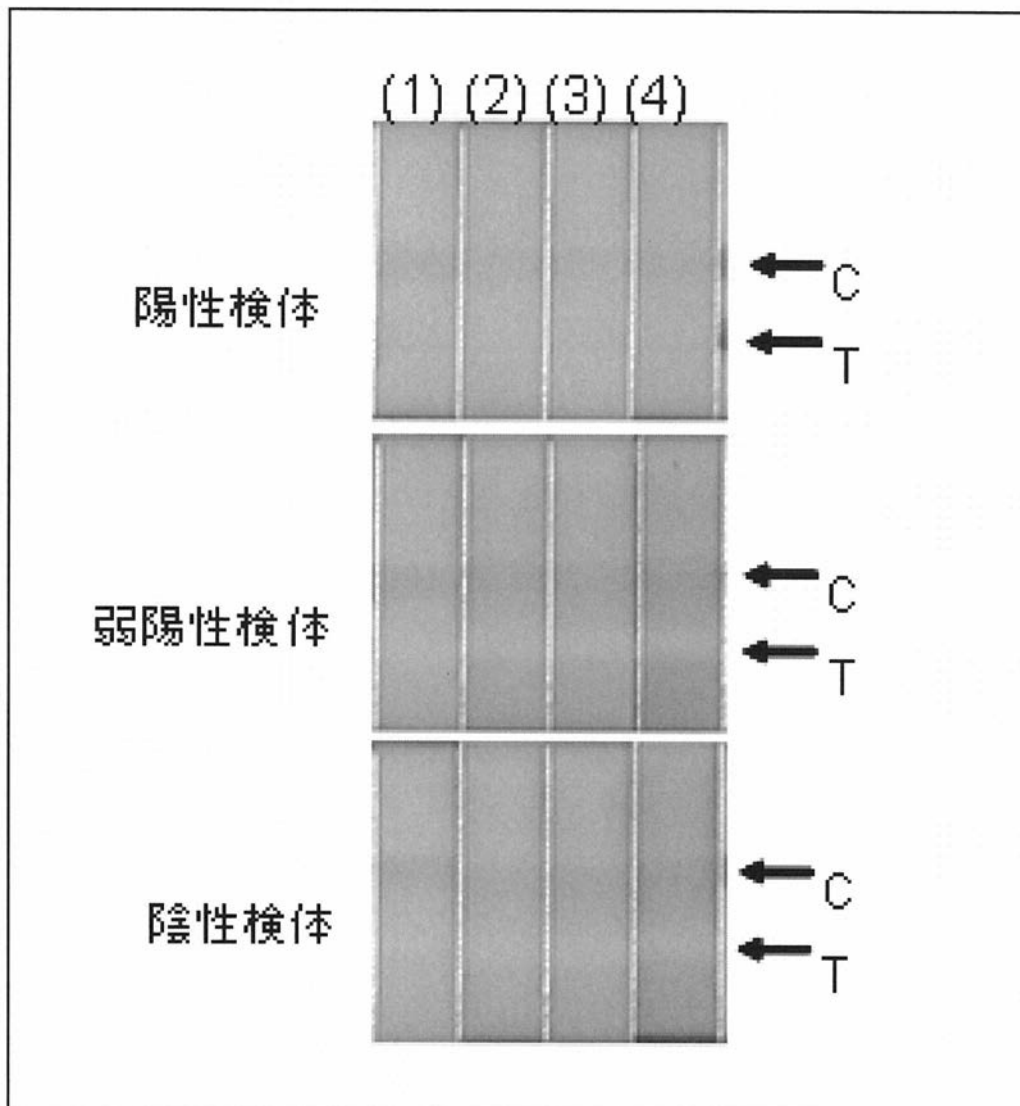
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/004816
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N33/532(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) G01N33/543, G01N33/532		
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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
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 2009-144250 A (M Technique Co., Ltd.), 02 July 2009 (02.07.2009), paragraphs [0152], [0156], [0172] & WO 2009/08390 A1 & EP 2177294 A1	1, 2, 5/3, 4
Y	JP 10-73592 A (Becton Dickinson and Co.), 17 March 1998 (17.03.1998), paragraph [0037] & US 5591645 A & EP 0284232 A1	3, 4
Y	JP 2009-85700 A (Fujifilm Corp.), 23 April 2009 (23.04.2009), paragraph [0019] (Family: none)	3, 4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 25 October, 2010 (25.10.10)		Date of mailing of the international search report 09 November, 2010 (09.11.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/004816									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/532(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. G01N33/543, G01N33/532											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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) CA/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
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/Y	JP 2009-144250 A (エム・テック株式会社) 2009.07.02, 【0152】【0156】【0172】 & WO 2009/08390 A1 & EP 2177294 A1	1, 2, 5/3, 4									
Y	JP 10-73592 A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) 1998.03.17, 【0037】 & US 5591645 A & EP 0284232 A1	3, 4									
Y	JP 2009-85700 A (富士フイルム株式会社) 2009.04.23, 【0019】 (ファミリーなし)	3, 4									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 25.10.2010		国際調査報告の発送日 09.11.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 浅野 美奈	2J 4636								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, RO, RS, RU, 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

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 渡部 正利

東京都八王子市犬目町2 4 6 - 4

(72)発明者 織田 哲弥

大阪府大阪市中央区道修町1 - 7 - 1 大塚製薬株式会社内

(72)発明者 赤松 優

大阪府大阪市中央区道修町1 - 7 - 1 大塚製薬株式会社内

Fターム(参考) 4G065 AA07 AB06X AB06Y AB11Y AB17X AB17Y AB19X BA20 BB06 CA01
DA02 EA01 FA03

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	合金型金属胶体		
公开(公告)号	JPWO2011013378A1	公开(公告)日	2013-01-07
申请号	JP2011524664	申请日	2010-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人工学院		
申请(专利权)人(译)	学校法人工学院 大冢制药有限公司		
[标]发明人	渡部正利 織田哲弥 赤松優		
发明人	渡部 正利 織田 哲弥 赤松 優		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/553 B01J13/00 G01N33/543		
CPC分类号	B01J13/0043 G01N33/532		
FI分类号	G01N33/532.A G01N33/553 B01J13/00.Z G01N33/543.541.Z		
F-TERM分类号	4G065/AA07 4G065/AB06X 4G065/AB06Y 4G065/AB11Y 4G065/AB17X 4G065/AB17Y 4G065/AB19X 4G065/BA20 4G065/BB06 4G065/CA01 4G065/DA02 4G065/EA01 4G065/FA03		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2009176812 2009-07-29 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供比金胶体和金核铂壳型复合胶体具有更高可见度和灵敏度的金属胶体，并适合作为免疫分析等测试的标记剂。通过在碱的存在下将金盐和铂盐与一种或多种选自氨基酸及其衍生物，寡肽及其衍生物和氨基糖的还原剂混合以还原金盐和铂盐而形成。合金型Au / Pt复合胶体。

(19) 日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2011/013378
発行日 平成25年1月7日(2013.1.7)	(43) 国際公開日 平成23年2月3日(2011.2.3)	
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考) 4G065
GO1N 33/532 (2006.01)	GO1N 33/532 A	
GO1N 33/553 (2006.01)	GO1N 33/553	
BO1J 13/00 (2006.01)	BO1J 13/00 Z	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 541Z	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全16頁)	
出願番号 特願2011-524664(P2011-524664)	(71) 出願人 501241645	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2010/004816	学校法人 工学院大学	
(22) 国際出願日 平成22年7月29日(2010.7.29)	東京都新宿区西新宿1丁目2番2号	
(31) 優先権主張番号 特願2009-176812(P2009-176812)	(71) 出願人 000206956	
(32) 優先日 平成21年7月29日(2009.7.29)	大塚製薬株式会社	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	東京都千代田区神田司町2丁目9番地	
	110000084	
	(74) 代理人 100077562	
	特許業務法人アルガ特許事務所	
	(74) 代理人 100077562	
	弁理士 高野 登志雄	
	(74) 代理人 100096736	
	弁理士 中崎 俊夫	
	(74) 代理人 100117156	
	弁理士 村田 正樹	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 合金型金属コロイド