

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/043687

発行日 令和1年8月15日(2019.8.15)

(43) 国際公開日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	2 G O 4 3
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 A	2 G O 5 4
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	4 J O O 2
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2018-537422 (P2018-537422)	(71) 出願人	000002174
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/031499		積水化学工業株式会社
(22) 国際出願日	平成29年8月31日(2017.8.31)		大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(31) 優先権主張番号	特願2016-168791 (P2016-168791)	(71) 出願人	390037327
(32) 優先日	平成28年8月31日(2016.8.31)		積水メディカル株式会社
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号
		(74) 代理人	110000774
			特許業務法人 もえぎ特許事務所
		(72) 発明者	岩本 匡志
			大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	杉本 理
			大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 診断薬用蛍光粒子及びそれを用いた免疫測定試薬

(57) 【要約】

合成高分子と、粒子の全質量基準で10質量%以上の凝集性発光材料と、を含み、アナライトと結合する結合パートナーを表面に有する診断薬用蛍光粒子。毒性がなく、視認性と再現性が向上された、アナライトに対する結合パートナーを担持した診断薬用蛍光粒子が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

合成高分子と、
粒子の全質量基準で10質量%以上の凝集性発光材料と、を含み、
アナライトと結合する結合パートナーを表面に有することを特徴とする診断薬用蛍光粒子。

【請求項 2】

前記粒子のCV値が20%以下であり、平均粒子径が0.05～3.0μmであることを特徴とする請求項1記載の診断用蛍光粒子。

【請求項 3】

前記合成高分子がスチレン及びスチレンー（メタ）アクリル酸共重合体からなる群から選択される少なくとも一種を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の診断用蛍光粒子。

【請求項 4】

前記凝集性発光材料の数平均分子量は、10000以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の診断用蛍光粒子。

【請求項 5】

前記凝集性発光材料が、4つ以上のフェニル基もしくはフェニル基誘導体により置換された、エチレン誘導体もしくはベンゼン誘導体であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の診断用蛍光粒子。

【請求項 6】

前記凝集性発光材料が、テトラフェニルエチレン、1-（4-ブロモフェニル）-1,2,2-トリフェニルエチレン、テトラキス（4-ヒドロキシフェニル）エチレンからなる群から選択される少なくとも一種であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の診断用蛍光粒子。

【請求項 7】

前記凝集性発光材料が、ヘキサフェニルシロール及び／又はヘキサフェニルベンゼンであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の診断用蛍光粒子。

【請求項 8】

請求項1～7のいずれか一項に記載の診断薬用蛍光粒子を用いることを特徴とする免疫測定試薬。

【請求項 9】

合成高分子を含む種粒子を分散させた種粒子分散液を調製する工程と、
凝集性発光材料と有機溶剤を含む乳化液を調製する工程と、
前記種粒子分散液に前記乳化液を加え、前記種粒子に前記凝集性発光材料と前記有機溶剤を吸収させて膨潤粒子液滴分散液を得る工程と、
前記膨潤粒子液滴中の前記有機溶剤を液中乾燥させて凝集発光性材料含有粒子を得る工程と、を有することを特長とする凝集発光性材料含有粒子の製造方法。

【請求項 10】

前記凝集性発光材料質と有機溶剤の量が前記種粒子質量の0.1～64倍となるように、前記種粒子分散液に前記乳化液を加えることを特長とする請求項9に記載の凝集発光性材料含有粒子の製造方法。

【請求項 11】

アナライトを含む可能性がある試料溶液と、前記アナライトとの結合パートナーを有する凝集蛍光材料含有粒子を含む溶液を混合して混合液を調製する工程と、
前記アナライトとの結合パートナーが固定化された検出部を少なくとも1つ有する不溶性担体に、前記混合液を展開させる工程と、
前記検出部において前記凝集蛍光材料含有粒子から発生する蛍光強度を測定する工程と、
アナライト濃度に対する蛍光強度の検量線と前記蛍光強度を対比して、前記蛍光強度と

10

20

30

40

50

前記混合液中のアナライト濃度を関連付ける工程と、を備えることを特徴とするアナライト測定法。

【請求項 1 2】

イムノクロマトグラフィー用のテストストリップであって、

(a) アナライトを含む可能性がある試料溶液の供給部と、

(b) 前記アナライトとの結合パートナーを表面に有する凝集蛍光材料含有粒子を含むコンジュゲートパッドと、

(c) 前記アナライトとの結合パートナーが固定化された検出部を少なくとも 1 つ有する不溶性メンブレン担体と、を備え、

前記凝集蛍光材料含有粒子は、

(イ) 合成高分子と、

(ロ) 粒子の全質量基準で 10 質量% 以上の凝集性発光材料と、を含むことを特徴とするイムノクロマトグラフィー用のテストストリップ。

【請求項 1 3】

凝集蛍光材料含有粒子の CV 値が 20 % 以下であり、平均粒子径が 0.05 ~ 3.0 μm であることを特徴とする請求項 1 2 に記載のテストストリップ。

【請求項 1 4】

凝集蛍光材料粒子に含まれる合成高分子が、スチレンモノマー及び（メタ）アクリル酸からなる群から選択される少なくとも一種を含む共重合体であることを特徴とする請求項 1 2 又は 1 3 に記載のテストストリップ。

【請求項 1 5】

凝集蛍光材料粒子に含まれる凝集性発光材料の数平均分子量は、10000 以下であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のテストストリップ。

【請求項 1 6】

凝集蛍光材料粒子に含まれる凝集性発光材料が、4 つ以上のフェニル基もしくはフェニル基誘導体により置換された、エチレン誘導体もしくはベンゼン誘導体であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のテストストリップ。

【請求項 1 7】

凝集蛍光材料粒子に含まれる凝集性発光材料が、テトラフェニルエチレン、1 - (4 - ブロモフェニル) - 1, 2, 2 - トリフェニルエチレン、テトラキス (4 - ヒドロキシフェニル) エチレンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のテストストリップ。

【請求項 1 8】

凝集蛍光材料粒子に含まれる凝集性発光材料が、ヘキサフェニルシロール又はヘキサフェニルベンゼンであることを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のテストストリップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断薬用蛍光粒子及びそれを用いた免疫測定試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、臨床検査薬（以下、診断薬ということがある）においては、アナライトに対する結合パートナー（例えば、抗体など）を担持した担体微粒子を利用するイムノクロマト法による測定試薬が多数実用化されている。そして、アナライトの検出感度向上のために、光を照射することにより発光する蛍光粒子を担体微粒子として用いることが提案されている（例えば、特許文献 1 参照）。

特許文献 1 には、イムノクロマトグラフィーに用いる蛍光粒子として、有機系蛍光物質を含有するシリカ粒子が開示されている。このシリカ粒子は粒子表面が親水性であることより、疎水性相互作用に起因する非特異的反応を抑制できる一方、アナライトに対する結

10

20

30

40

50

合パートナーを担持させる際、物理的吸着法を使用しにくく、化学的結合法を使用する必要があった。

特許文献2には、無機系蛍光微粒子を本態とするコア／シェル型微粒子蛍光体が開示されている。この無機系蛍光微粒子は、抗原－抗体反応等のバイオテクノロジー分野に適する微粒子性と、蛍光観察に適した励起波長とを備えるが、無機系微粒子であるがゆえに毒性を有するという問題があった。また分散性にも問題があった。

また、バイオテクノロジー分野への適用を意図した微粒子ではないものの、特許文献3には有機系蛍光微粒子を本態とする蛍光発光微粒子とその製造方法が開示されている。この有機系蛍光微粒子によれば、上述の毒性の問題は解消されるが、診断薬の材料として用いた場合、発光強度等に課題が残されていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2015-022914号公報

【特許文献2】国際公開第2007-102458号公報

【特許文献3】特開2003-313545号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

以上より、診断薬の材料として用いた場合に、アナライトに対する結合パートナーの担持が容易であり、毒性がなく、アナライトの検出感度（特に視認性）と検出再現性を備えた微粒子が求められていた。

本発明は、診断薬の材料として用いた場合に、アナライトに対する結合パートナーの担持が容易であり、毒性がなく、検出感度（特に視認性）と検出再現性が向上された、アナライトに対する結合パートナーを担持した診断薬用蛍光粒子、及び当該蛍光粒子を用いた測定試薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、以下に記載されるものを含む。

(1) 合成高分子と、粒子の全質量基準で10質量%以上の凝集性発光材料と、を含み、アナライトと結合する結合パートナーを表面に有することを特徴とする診断薬用蛍光粒子。

(2) 粒子のCV値が20%以下であり、平均粒子径が0.05～3.0μmである(1)記載の診断用蛍光粒子。

(3) 合成高分子がスチレンモノマー及び(メタ)アクリル酸からなる群から選択される少なくとも一種を含む共重合体である(1)又は(2)に記載の診断用蛍光粒子。

(4) 凝集性発光材料の数平均分子量は、10000以下である(1)～(3)のいずれかに記載の診断用蛍光粒子。

(5) 凝集性発光材料が、4つ以上のフェニル基もしくはフェニル基誘導体により置換された、エチレン誘導体もしくはベンゼン誘導体である(1)～(4)のいずれかに記載の診断用蛍光粒子。

(6) 凝集性発光材料が、テトラフェニルエチレン、1-(4-ブロモフェニル)-1,2,2-トリフェニルエチレン、テトラキス(4-ヒドロキシフェニル)エチレンからなる群から選択される(1)～(4)のいずれかに記載の診断用蛍光粒子。

(7) 凝集性発光材料が、ヘキサフェニルシロール又はヘキサフェニルベンゼンである(1)～(4)のいずれかに記載の診断用蛍光粒子。

(8) (1)～(7)のいずれか一項に記載の診断薬用蛍光粒子を用いる免疫測定試薬。

(9) 合成高分子を含む種粒子を分散させた種粒子分散液を調製する工程と、凝集性発光材料と有機溶剤を含む乳化液を調製する工程と、種粒子分散液に乳化液を加え、種粒子に凝集性発光材料と有機溶剤を吸収させて膨潤粒子液滴分散液を得る工程と、膨潤粒子液滴

10

20

30

40

50

中の有機溶剤を液中乾燥させて凝集発光性材料含有粒子を得る工程と、を有する凝集発光性材料含有粒子の製造方法。

(10) 凝集性発光材料質量が種粒子質量の0.1～64倍となるように、種粒子分散液に乳化液を加える、(9)に記載の凝集発光性材料含有粒子の製造方法。

(11) アナライトを含む可能性がある試料溶液と、アナライトとの結合パートナーを有する凝集発光材料含有粒子を含む溶液を混合して混合液を調製する工程と、アナライトとの結合パートナーが固定化された検出部を少なくとも1つ有する不溶性担体に、混合液を展開させる工程と、検出部において凝集発光材料含有粒子から発生する蛍光強度を測定する工程と、アナライト濃度に対する蛍光強度の検量線と蛍光強度を対比して、蛍光強度と混合液中のアナライト濃度を関連付ける工程と、を備えるアナライト測定法。

10

(12) イムノクロマトグラフィー用のテストストリップであって、

(a) アナライトを含む可能性がある試料溶液の供給部と、(b) アナライトとの結合パートナーを表面に有する凝集発光材料含有粒子を含むコンジュゲートパッドと、(c) アナライトとの結合パートナーが固定化された検出部を少なくとも1つ有する不溶性メンブレン担体と、を備え、

凝集発光材料含有粒子は、(イ) 合成高分子と、(ロ) 粒子の全質量基準で10質量%以上の凝集性発光材料と、を含むイムノクロマトグラフィー用のテストストリップ。

(13) 凝集発光材料含有粒子のCV値が20%以下であり、平均粒子径が0.05～3.0μmである(12)に記載のテストストリップ。

(14) 凝集発光材料粒子に含まれる合成高分子が、スチレンモノマー及び(メタ)アクリル酸からなる群から選択される少なくとも一種を含む共重合体である(12)又は(13)に記載のテストストリップ。

20

(15) 凝集発光材料粒子に含まれる凝集性発光材料の数平均分子量は、10000以下である(12)～(14)のいずれかに記載のテストストリップ。

(16) 凝集発光材料粒子に含まれる凝集性発光材料が、4つ以上のフェニル基もしくはフェニル基誘導体により置換された、エチレン誘導体もしくはベンゼン誘導体である(12)～(15)のいずれかに記載のテストストリップ。

(17) 凝集発光材料粒子に含まれる凝集性発光材料が、テトラフェニルエチレン、1-(4-プロモフェニル)-1,2,2-トリフェニルエチレン、テトラキス(4-ヒドロキシフェニル)エチレンからなる群から選択される(12)～(16)のいずれかに記載のテストストリップ。

30

(18) 凝集発光材料粒子に含まれる凝集性発光材料が、ヘキサフェニルシロール又はヘキサフェニルベンゼンである(12)～(17)のいずれかに記載のテストストリップ。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、毒性がなく、アナライトの検出感度(特に視認性)と検出再現性が向上された、アナライトに対する結合パートナーを担持した診断薬用蛍光粒子が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

40

【図1】図1は、本発明の凝集性発光材料含有粒子表面のSEM写真である。

【図2】図2は、本発明の凝集性発光材料含有粒子に波長365nmの紫外線(UV)を照射した際の凝集発光の様子を示す写真である。

【図3】図3は、図2の一部拡大図である。

【図4】図4は、比較例1の凝集発光性材料含有粒子に波長365nmの紫外線(UV)を照射した際の凝集発光の様子を示す写真である。

【図5】図5は、図4の一部拡大図である。

【図6】図6は、イムノクロマトグラフィー用のテストストリップの概念図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

50

以下に、実施形態を挙げて本発明の説明を行うが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0009】

〔診断薬用蛍光粒子〕

本発明者等は、上述の課題を解決するために研究を重ねた結果、溶液に分散した状態ではほとんど発光しないにもかかわらず、凝集させることにより高い発光性を示す蛍光材料（以下、「凝集発光性材料」ともいう。）をポリマー微粒子に高含有させることにより、高い発光強度を有する蛍光粒子が得られることを見出した。即ち本発明は、合成高分子と、粒子の全質量基準で10%質量以上の凝集性発光材料と、を含み、アナライトに対する結合パートナーを担持した診断薬用蛍光粒子に関する。なお、本明細書において、アナライトに対する結合パートナーを粒子に「担持」させることを、「結合」と表現することがある。

10

【0010】

診断薬用蛍光粒子を構成する合成高分子としては特に限定はないが、例えば、ポリスチレン、スチレンースチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、イタコン酸重合体、スチレンー親水性カルボキシルモノマー共重合体；例えば、スチレンーメタクリル酸共重合体、スチレンーアクリル酸共重合体、スチレンーイタコン酸共重合体等が挙げられる。その中で、好ましくはスチレンーメタクリル酸共重合体、スチレンーイタコン酸共重合体、スチレンおよびスチレンースチレンスルホン酸塩共重合体である。特に好ましくは、スチレン及びスチレンー（メタ）アクリル酸共重合体である。

20

【0011】

スチレンスルホン酸塩の塩としては、特に限定されず、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩等が挙げられる。これらは単独で用いられてもよく、2種以上が併用されてもよい。なかでも、スチレンスルホン酸ナトリウムが好ましく用いられる。本発明に使用される親水性カルボキシルモノマーとしては、メタクリル酸、アクリル酸、イタコン酸、マレイン酸、フマル酸などを用いることができる。好ましくは、メタクリル酸、アクリル酸を用いることができる。

【0012】

親水性カルボキシルモノマーを用いる際には、重合後の合成高分子が有するカルボキシ基量が蛍光粒子の発光強度に影響するので、粒子表面におけるカルボキシ基量を0.001~0.6 meq/gとすると、蛍光粒子はカルボキシ基量依存的に強い発光を示す。粒子表面におけるカルボキシ基量は、好ましくは0.1~0.6 meq/g、より好ましくは0.2~0.6 meq/gである。粒子表面のカルボキシル基量は、通常の測定方法により測定できる。例えば、電位差自動滴定装置を用いて測定できる。

30

【0013】

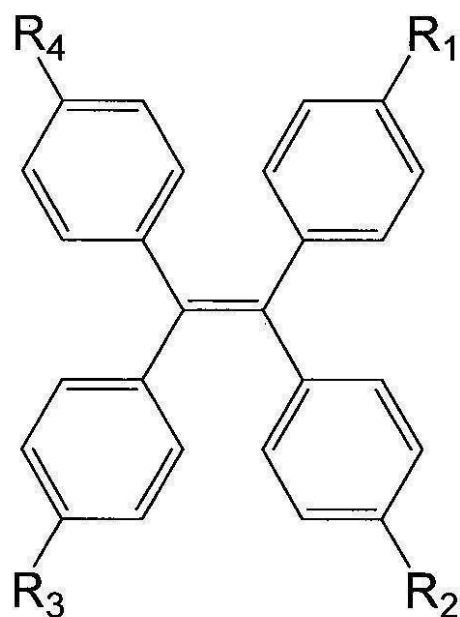
診断薬用蛍光粒子を構成する凝集発光性材料としては特に限定はないが、例えば、ケトイミンホウ素錯体誘導体、ジイミンホウ素錯体誘導体、テトラフェニルエチレン誘導体、アミノマレイミド誘導体、アミノベンゾピロキサンテン誘導体、トリフェニルアミン誘導体、ヘキサフェニルベンゼン誘導体、ヘキサフェニルシロール誘導体等が挙げられる。上述の誘導体の中でも、合成が簡便であり、市販もされていることからテトラフェニルエチレン誘導体が好ましい。

40

【0014】

テトラフェニルエチレン誘導体としては、例えば、4つ以上のフェニル基もしくはフェニル基誘導体により置換されたエチレン誘導体が挙げられる。具体的には、次式（1）で示されるようなエチレン誘導体が挙げられる。

【化 1】



(1)

10

(式中、 R_1 は水素原子、臭素原子、水酸基のいずれかを表し、 R_2 、 R_3 、 R_4 のそれぞれは水素原子又は水酸基を表す。)

20

より具体的には、テトラフェニルエチレン、1-(4-プロモフェニル)-1,2,2-トリフェニルエチレン、テトラキス(4-ヒドロキシフェニル)エチレンが挙げられる。

【0015】

ヘキサフェニルベンゼン誘導体としては、例えば4つ以上のフェニル基もしくはフェニル基誘導体により置換されたベンゼン誘導体が挙げられる。具体的には、ヘキサフェニルシロール又はヘキサフェニルベンゼンが挙げられる。

トリフェニルアミン誘導体としては、例えば4-(ジ-p-トリアミノ)ベンズアルデヒドが挙げられる。

【0016】

30

凝集性発光材料の数平均分子量は、10000以下であることが好ましい。上記上限を超えると凝集発光性材料が溶解しづらくなり粒子形態に加工できなくなったり、含有量が低下する傾向があるからである。

【0017】

上述の各誘導体は、それ自体が診断薬用蛍光粒子内に含まれる他にも、ポリマーの主鎖や側鎖に組み込まれた形態として診断薬用蛍光粒子内に含まれても構わない。しかしポリマー鎖に導入した場合には含有量が低下する、あるいは粒子合成に他段階のプロセスを要する等の理由から各誘導体自体が診断薬用蛍光粒子内に含まれることが好ましい。

【0018】

粒子の全質量基準での凝集性発光材料の割合は、視認性向上の観点より、10質量%以上であり、30質量%以上であることが好ましく、95質量%以下であることが好ましい。95質量%を超えると、粒子のCV値が大きくなり、測定試薬の再現性が低下することがある。

40

【0019】

診断薬用蛍光粒子の平均粒子径に特に限定はなく、診断薬用着色ラテックス粒子診断薬用蛍光粒子として使用できればいかなる平均粒子径でもよい。なかでもクロマトグラフィーで展開され得る平均粒子径であれば特段問題はないが、小径な粒子を使用すると、十分な検出感度が得られないことがあるため、より好ましくは300nm以上1000nm以下の粒子である。

【0020】

50

尚、本願における「平均粒子径」は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて1視野に約100個の凝集性発光材料含有粒子を観察できる倍率で粒子を観察し、任意に選択した50個の凝集発光性材料含有粒子の最長径をノギスで測定し、この値の数平均値を求め、これを平均粒子径とした。

【0021】

上記粒子の粒子径の変動係数（CV値）は、20%以下であることが好ましい。20%を超えると、試薬調製時のロット再現性が悪く、測定試薬の再現性が低下することがある。より好ましくは15%以下である。尚、上記粒子径の変動係数は、次の式により算出される。

粒子径の変動係数（CV値）＝粒子径の標準偏差／平均粒子径

10

【0022】

診断薬用蛍光粒子を調製する方法としては特に限定されず、公知の方法を用いることができるが、均一粒径の粒子を得られることから、シード膨潤法を用いることが好ましい。上記シード膨潤法とは、あらかじめ合成された均一粒径のスチレンポリマー粒子等を凝集発光性材料を溶解した溶液で膨潤させる方法である。これにより、凝集発光性材料を含有した均一液滴が調製され、適時乾燥させることにより、目的とする蛍光粒子が得られる。

【0023】

例えば、スチレンおよびスチレンスルホン酸ナトリウム、親水性カルボキシルモノマーとしてメタクリル酸を用いた場合は、得られた粒子は均一な粒度分布、優れた分散安定性を有し、分散安定性は、各々の診断薬用蛍光粒子の表面に存在するスチレンスルホン酸由来のスルホン酸基同士の静電的な反発力によるものである。また、粒子表面にカルボキシ基が存在する場合には、分散安定性に寄与する一方で、抗体との化学結合部位として利用することもできるので好ましい。

20

【0024】

〔診断薬用蛍光粒子の製造方法〕

診断薬用蛍光粒子の製造方法としては特に限定はされず、一例としては以下の方法（シード膨潤法）が挙げられる。

（イ）まず種粒子を構成する合成高分子を調製する。合成高分子を調製する方法としては特に限定されず、公知の方法を用いることができるが、乳化剤（界面活性剤）を使用しないソープフリー乳化重合法が好ましい。この乳化重合法に用いられる重合開始剤としては過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウムなどが挙げられるが、好ましくは過硫酸カリウムが良い。本発明では、反応容器にイオン交換水、例えば、モノマー、重合開始剤を仕込み、攪拌しながら反応容器内を窒素置換した後、65℃～80℃で12～42時間反応を行うことにより製造することができる。得られた粒子は低いCV値、優れた分散安定性を有する。合成高分子としては、上述の合成高分子を用いることができる。その際、診断薬用蛍光粒子の分散度を高め、視認性評価の制限性を高める観点より、合成高分子からなる種粒子は、平均粒子径を0.05～3.0μm、CV値を1～20%とすることが好ましい。

30

（ロ）次に、得られた種粒子を溶媒に分散させた種粒子分散液を調製する。溶媒としては特に制限はないが、水を用いることができる。

（ハ）凝集性発光材料を有機溶剤に溶解した溶液を含む乳化液を調製する。例えば、凝集性発光材料であるテトラフェニルエチレンを酢酸エチルに溶解し、得られたテトラフェニルエチレン溶液を、スチレンスルホン酸ナトリウムを水に溶解した水溶液に添加することにより乳化液を調製することができる。

40

（ニ）種粒子分散液に乳化液を攪拌しながら加えて膨潤粒子液滴分散液を得る。その後、種粒子分散液に乳化液を加えた溶液を1分～36時間程度、好ましくは1時間～30時間程度、より好ましくは12時間～24時間程度、さらに好ましくは20時間～24時間程度攪拌し続けることにより、種粒子に凝集性発光材料と有機溶剤を吸収させることができる。膨潤粒子液滴の分散液を得る際に、凝集性発光材料質量が種粒子質量の0.1倍以上、64倍以下なるように乳化液を加えることが好ましい。

（ホ）膨潤粒子液滴中の有機溶剤を液中乾燥させて凝集発光性材料含有粒子を得る。液中

50

乾燥の条件は、有機溶剤の沸点や気化点により定まる。有機溶剤として、例えば酢酸エチルを用いた場合は、得られた膨潤粒子液滴の分散液を65℃で200rpmの速度で24時間程度攪拌することにより、酢酸エチルを乾燥させることができる。なお、加熱に換えて（もしくは加熱と併せて）減圧させてもよい。

以上により、凝集発光性材料含有粒子が製造される。

【0025】

〔粒子の用途〕

本発明の診断薬用蛍光粒子は、粒子表面にアナライトに対する結合パートナーとして抗原（または抗体）等を結合することにより、抗原-抗体反応を利用した酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、ラテックス凝集法、イムノクロマトグラフ法等の生物学的反応を利用した種々の方法に好適に用いることができる。

10

本発明によれば上述の診断薬用蛍光粒子を用いる免疫測定試薬が提供される。

【0026】

診断薬用蛍光粒子の粒子表面に抗原（または抗体）を結合させる方法としては特に限定はされず、従来公知の方法を用いることができる。例えば、抗原（または抗体）を含む緩衝液中に診断薬用蛍光粒子を浸漬させ、一定温度で一定時間インキュベートするなどの物理吸着による結合方法や、化学結合による結合方法がある。物理吸着は粒子表面と抗原（または抗体）との疎水性相互作用を利用するもので、操作が容易である特長を有し、化学結合は粒子表面の反応性官能基と抗原（または抗体）中の特定の基との化学反応を利用するもので、粒子と抗原（または抗体）との距離の制御が可能になる等の特長を有する。合成高分子がカルボキシ基を有する場合、抗原（または抗体）の含有するアミノ基を架橋させ、結合させることができる。これらは、アナライトに対する結合パートナーの特性等を考慮して適宜に選択することができる。

20

【0027】

本発明によれば、十分に強い発光を示す診断薬用蛍光粒子を作製できることにより、診断薬用蛍光粒子を免疫測定用試薬として使用した際に、目視判定性が格段に向上し、検出感度を向上させることができる。また粒子分散度が低いことから、試薬調製時のロット再現性が向上する。

【0028】

以下に診断薬用蛍光粒子の具体的用途と用語について説明する。

30

（アナライト測定法）

本発明によれば、アナライトを含むまたは含む可能性がある試料溶液と、アナライトとの結合パートナーを有する凝集蛍光材料含有粒子を含む溶液（当該溶液が、図6fに示すような、いわゆるコンジュゲート塗布パッド中において、乾燥状態で存在する場合を含む）と、を混合して混合液を調製する工程と；アナライトとの結合パートナーが固定化された検出部を少なくとも1つ有する不溶性担体に、混合液を展開させる工程と；検出部において凝集蛍光材料含有粒子から発生する蛍光強度を測定する工程と；アナライト濃度に対する蛍光強度の検量線と蛍光強度を対比して、蛍光強度と混合液中のアナライト濃度を関連付ける工程（当該蛍光強度と混合液中のアナライト濃度を関連付ける工程には、基準となる蛍光強度との強弱関係により、アナライトの存在の有無を判断する定性的あるいは判定量的な関連付けを含む）と；を備えるアナライト測定法が提供される。

40

この測定法によれば、上述の感度の高い凝集蛍光材料含有粒子を用いることより、アナライト濃度が低い場合であっても、アナライトの存否やアナライト濃度を精度よく測定できる。前記、関連付けは、目視で行っても、装置により行ってもよい。目視で行う場合、本発明は特に有利である。

またさらに、後述の第一試液（R1）と第二試液（R2）からなる測定試薬を、適宜、組み合わせることで、既存の測定装置を用いて、広いレンジ幅でアナライト測定を行うことができる。

【0029】

（テストストリップ）

50

本発明によれば、図6に示すような、プラスチック製粘着シートaと；プラスチック製粘着シート上に配置された、アナライトとの結合パートナーが固定化された検出部cを少なくとも1つ有する不溶性メンブレン担体bと；不溶性メンブレン担体bの一端側に配置された、アナライトを含む可能性がある試料溶液の供給部e、アナライトとの結合パートナーを有する凝集蛍光材料含有粒子が固定化されたコンジュゲートfを有するコンジュゲート塗布パッドdと；不溶性メンブレン担体bの他端側に配置された吸収パッドgと；を備えるイムノクロマトグラフィー用のテストストリップが提供される。

このテストストリップによれば、上述の感度の高い凝集蛍光材料含有粒子を用いることより、従来のテストストリップよりも、目視確認が極めて容易になる。

なお、図6のように検出部を複数設けることにより、他項目の検査が可能になる。図6では、測定時間の短縮と視認性の向上を図るために、コンジュゲートfは、コンジュゲート塗布パッドdの裏面と不溶性メンブレン担体bの表面が接する領域における、試料の流れ方向の下流側端を除いた部分に、ライン状に形成した。しかし、コンジュゲートfの配置位置や形状は特に制限されることはない。

【0030】

(試料)

測定対象としては、特に限定されないが、種々の生体試料が挙げられる。例えば血液、血清、血漿、尿、唾液、喀痰、鼻汁、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、涙液などの体液である。

【0031】

(アナライト)

アナライトとしては、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖、核酸、ハプテンなど、当該アナライトに結合するパートナーが存在することを限度として理論的に測定可能な分子であれば特に制限はない。例として、インフルエンザウイルスなどのウイルス、細菌、CRP(C反応性タンパク質)、Lp(a)(リボプロテイン(a))、MMP3(マトリクスメタロプロテイナーゼ3)、抗CCP(環状シトルリン化ペプチド)抗体、抗リン脂質抗体、抗梅毒抗原抗体、RPR、IV型コラーゲン、PSA、AFP、CEA、BNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)、NT-proBNP、インスリン、マイクロアルブミン、シスタチンC、RF(リウマチ因子)、CA-RF、KL-6、PIVKA-II、FDP、Dダイマー、SF(可溶性フィブリン)、TAT(トロンビン-アンチトロンビンIII複合体)、PIC、PAI、XIII因子、ペプシノーゲンI・IIや、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、バルプロ酸、テオフィリンなどが挙げられる。

【0032】

(結合パートナー)

結合パートナーとしては、アナライトに結合する物質としてタンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖、核酸、ハプテンなどが挙げられるが、特異性および親和性の点から抗体や抗原の利用が一般的である。また、アナライトに対する結合特異性、親和性が所望の範囲に含まれていることを限度として、分子量の大小(例えば、抗体であれば、イムノグロブリン全体である場合や、アナライト結合性機能断片である場合などを含む)、天然や合成といった由来(例えば、抗体であれば、動物体液由来のものや遺伝子組み換え技術によるものを含む)に特に制限はない。

【0033】

(測定試薬)

本発明の測定法に供される測定試薬の構成に関して特に制限はないが、上述のテストストリップを含むイムノクロマトグラフィー用の試薬が好適である。また、臨床検査の分野で汎用される自動分析装置での使用を考慮した場合には、緩衝液からなる第一試液(R1)とアナライトに対する結合パートナーを担持した凝集蛍光材料含有粒子を含む第二試液(R2)の2液で構成された測定試薬が一般的である。

【0034】

(測定試薬の成分)

本発明の凝集蛍光材料含有粒子を用いる測定試薬の成分は、反応の主成分である結合パートナーを担持した微粒子の他に、試料のイオン強度や浸透圧などを緩衝する成分として、例えば、酢酸、クエン酸、リン酸、トリス、グリシン、ホウ酸、炭酸、及びグッドの緩衝液や、それらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などを含んでも良い。またアナライトと当該アナライトに結合するパートナーの結合（例えば、抗原抗体反応）を促進、増強する成分としてポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、リン脂質ポリマーなどの高分子を含んでも良い。また、アナライトと当該アナライトに結合するパートナーの結合をコントロールする成分として高分子物質、タンパク質、アミノ酸、糖類、金属塩類、界面活性剤類、還元性物質やカオトロピック物質など汎用される成分を1種類、または複数の成分を組み合わせて含んでも良い。また消泡成分を含んでも良い。

10

【実施例】

【0035】

以下、実施例、比較例により本発明の詳細について説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0036】

〔実施例1〕

（種粒子の製造）

攪拌機、還流用冷却器、温度検出器、窒素導入管及びジャケットを備えたガラス製反応容器（容量1L）に、超純水400g、スチレンモノマー10g、過硫酸カリウム0.20gを添加し、容器内を窒素ガスで置換した後、65℃で200rpmの速度で攪拌しながら24時間重合を行った（ソープフリー乳化重合法）。

20

重合終了後、上記溶液をペーパーろ紙にてろ過処理し、ラテックス粒子を取り出した。その後、透析膜にて48時間透析処理を行い、種粒子となる、精製された測定試薬用ラテックス粒子を得た。得られたラテックス粒子の平均粒子径0.15μm、粒子径のCV値は5.1%であった。

（凝集発光性材料含有粒子の製造）

凝集性発光材料としてヘキサフェニルシロール0.59gを酢酸エチル31gに溶解した溶液を、スチレンスルホン酸ナトリウム0.1gを水150gに溶解した水溶液に添加して混合することで、乳化液を調製した。

上記で合成した種粒子の分散液に、種粒子重量の0.43倍のヘキサフェニルシロールとなるように乳化液を加え、24時間攪拌して、ヘキサフェニルシロールと酢酸エチルを吸収した種粒子の膨潤粒子液滴の分散液を得た。

30

得られた膨潤粒子液滴の分散液を65℃で200rpmの速度で24時間攪拌しながら酢酸エチルを乾燥することにより、凝集発光性材料含有粒子を得た（シード膨潤法）。

【0037】

（実施例2）

ヘキサフェニルシロールをヘキサフェニルベンゼンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0038】

（実施例3）

ヘキサフェニルシロールを4-（ジ-*p*-トリルアミノ）ベンズアルデヒドに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

40

【0039】

（実施例4）

ヘキサフェニルシロールを種粒子重量の0.11倍のテトラフェニルエチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0040】

（実施例5）

ヘキサフェニルシロールをテトラフェニルエチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

50

【0041】

(実施例6)

ヘキサフェニルシロールを種粒子重量の等倍のテトラフェニルエチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0042】

(実施例7)

ヘキサフェニルシロールを種粒子重量の2.33倍のテトラフェニルエチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0043】

(実施例8)

ヘキサフェニルシロールを種粒子重量の9倍のテトラフェニルエチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0044】

(実施例9)

(種粒子の製造)

攪拌機、還流用冷却器、温度検出器、窒素導入管及びジャケットを備えたガラス製反応容器(容量1L)に、超純水400g、スチレンモノマー10g、メタクリル酸1g、過硫酸カリウム0.20gを添加し、容器内を窒素ガスで置換した後、65℃で200rpmの速度で攪拌しながら24時間重合を行った(ソープフリー乳化重合法)。

重合終了後、上記溶液をペーパーろ紙にてろ過処理し、ラテックス粒子を取り出した。その後、透析膜にて48時間透析処理を行い、種粒子となる精製された測定試薬用ラテックス粒子を得た。得られたラテックス粒子の平均粒子径0.16μm、粒子径のCV値は8.6%であった。

(凝集発光性材料含有粒子の製造)

凝集性発光材料としてテトラフェニルエチレン0.59gを酢酸エチル31gに溶解した溶液を、スチレンスルホン酸ナトリウム0.1gを水150gに溶解した水溶液に添加して混合することで、乳化液を調製した。

上記で合成した種粒子の分散液に、種粒子重量の0.11倍のテトラフェニルエチレンとなるように乳化液を加え、24時間攪拌して、テトラフェニルエチレンと酢酸エチルを吸収した種粒子の膨潤粒子液滴の分散液を得た。

得られた膨潤粒子液滴の分散液を65℃で200rpmの速度で24時間攪拌しながら酢酸エチルを乾燥することにより、凝集発光性材料含有粒子を得た(シード膨潤法)。

【0045】

(実施例10)

ヘキサフェニルシロールを1-(4-プロモフェニル)-1,2,2-トリフェニルエチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0046】

(実施例11)

ヘキサフェニルシロールをテトラキス(4-ヒドロキシフェニル)エチレンに変更したこと以外は実施例1と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0047】

(比較例1)

ヘキサフェニルシロールを種粒子重量の0.05倍に変更したこと以外は実施例4と同様にして、凝集発光性材料含有粒子を得た。

【0048】

(比較例2)

(種粒子の製造)

スチレンスルホン酸ナトリウム0.1gを溶解した超純水400gにアゾイソブチロニトリル0.01gを溶解したスチレンモノマー10gを加えホモジナイザーを用いて12000rpm、5minの条件で攪拌し、乳化液を得た。得られた乳化液を攪拌機、還流

10

20

30

40

50

用冷却器、温度検出器、窒素導入管及びジャケットを備えたガラス製反応容器（容量 1 L）に加え、65℃で200 rpmの速度で攪拌しながら24時間重合を行った（懸濁重合）。

重合終了後、上記溶液をペーパーろ紙にてろ過処理し、ラテックス粒子を取り出した。その後、透析膜にて48時間透析処理を行い、種粒子となる精製された測定試薬用ラテックス粒子を得た。得られたラテックス粒子の平均粒子径0.22 μm、粒子径のCV値は34.5%であった。

（凝集発光性材料含有粒子の製造）

凝集性発光材料としてテトラフェニルエチレン0.59 gを酢酸エチル31 gに溶解した溶液を、スチレンスルホン酸ナトリウム0.1 gを水150 gに溶解した水溶液に添加して混合することで、乳化液を調製した。

上記で合成した種粒子分散液に、種粒子重量の0.11倍のテトラフェニルエチレンとなるように乳化液を加え、24時間攪拌して、テトラフェニルエチレンと酢酸エチルを吸収した種粒子の膨潤粒子液滴の分散液を得た。

得られた膨潤粒子液滴の分散液を65℃で200 rpmの速度で24時間攪拌しながら酢酸エチルを乾燥することにより、凝集発光性材料含有粒子を得た

【0049】

【表 1】

	凝集性発光材料種類	凝集性発光材料含有率(%)	合成高分子組成	合成高分子含有量	CV値(%)	視認性評価	再現性
実施例1	ヘキサフェニルシロール	30	スチレン	70	10	5	◎
実施例2	ヘキサフェニルベンゼン	30	スチレン	70	10	5	◎
実施例3	4-(ジ-p-トリルアミノ)ベンズアルデヒド	30	スチレン	70	10	4	◎
実施例4	テトラフェニルエチレン	10	スチレン	90	10	4	◎
実施例5	テトラフェニルエチレン	30	スチレン	70	10	5	◎
実施例6	テトラフェニルエチレン	50	スチレン	50	10	5	◎
実施例7	テトラフェニルエチレン	70	スチレン	30	10	5	◎
実施例8	テトラフェニルエチレン	90	スチレン	10	18	5	○
実施例9	テトラフェニルエチレン	10	スチレン+カルボン酸	90	10	4	◎
実施例10	1-(4-プロモフェニル)-1,2,2-トリフェニルエチレン	30	スチレン	30	10	5	◎
実施例11	テトラキス(4-ヒドロキシフェニル)エチレン	30	スチレン	30	10	4	◎
比較例1	テトラフェニルエチレン	5	スチレン	95	6.4	1	◎
比較例2	テトラフェニルエチレン	10	スチレン	90	25	4	×

【0050】

(1) 平均粒子径と分散度の測定

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて 1 視野に約 100 個の凝集性発光材料含有粒子が観察できる倍率で粒子を観察し、任意に選択した 50 個の凝集発光性材料願湯粒子の最長

10

20

30

40

50

径をノギスで測定し、この値の数平均値と変動係数を求め、これを平均粒子径と分散度とした。

(2) 凝集発光性材料含有率

熱分解ガスクロマトグラフィー (Q1000、日本電子社製) を用いて、凝集性発光材料含有粒子 0.01 g 中に含まれる凝集発光性材料の含有量 (質量) を測定した。

(3) 合成高分子含有率

熱分解ガスクロマトグラフィー (Q1000、日本電子社製) を用いて、凝集性発光材料含有粒子 0.01 g 中に含まれる合成高分子の含有量を測定した。

(4) 視認性

後述の適用例の欄における「1.」～「5.」に従って作製したインフルエンザウィルス測定用イムノクロマトグラフ試薬 13 種類を用いて、A 型インフルエンザウィルスを同欄「6.」に記載の検体抽出液により $3.8 \times 10^5 \sim 4.8 \times 10^5$ TCID₅₀/mL に調整した試料をサンプルとし、「8. 試薬性能評価測定」に準じて視認性を評価した。

(5) 再現性

上記視認性評価を繰り返し 3 回行った。その結果、すべて一致したものを◎、誤差 1 以内を○、誤差 2 以上を×として評価した。

(6) 表面観察

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて凝集性発光材料含有粒子の表面を観察した。得られた、SEM 写真の中から、実施例 10 に係る SEM 写真を図 1 に示した。また図 2 に凝集性発光材料含有粒子に波長 365 nm の紫外線 (UV) を照射した際の凝集発光の様子を示した。図 3 に図 2 の一部拡大図を示した。また、図 4 に比較例 1 の凝集発光性粒子に波長 365 nm の紫外線 (UV) を照射した際の凝集発光の様子を示した。図 5 に図 4 の一部拡大図を示した。

【0051】

[適用例]

＜インフルエンザウィルス測定用イムノクロマトグラフ法試薬の作製＞

1. 凝集発光性材料含有粒子標識抗 A 型インフルエンザウィルス抗体の調製

(1) 下記 (i) から (iv) を準備し、(i) 5 mL、(ii) 0.2 mL 及び (iii) 0.8 mL を加えて攪拌後、これに (iv) を 4 mL 添加し、室温で 2 時間攪拌した。

(2) 上記 (1) で得られた溶液を 13,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去後、10% スクロース含有 2% ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液を 10 mL 添加し、さらに 2 時間攪拌後、13,000 rpm で 10 分間遠心分離し、13 種類のコンジュゲートを得た。

(3) 上記 (2) により得られたコンジュゲートに対し、10% スクロース含有 2% BSA 水溶液を 10 mL 添加しコンジュゲートを懸濁させて、青色着色ラテックス粒子標識抗 A 型インフルエンザウィルス抗体を得た。

(i) 2% 青色凝集発光性材料含有粒子 (実施例 1～実施例 11、及び比較例 1、2 の計 13 種類) をそれぞれ含む 20mM MES (pH6.5) 緩衝液

(ii) 20mM MES (pH6.5) 緩衝液

(iii) 架橋剤 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC) 15mg/mL

(iv) 2.5mg/mL 抗 A 型インフルエンザウィルスモノクローナル抗体を含む 20mM MES (pH6.5) 緩衝液
試薬性能評価において、コンジュゲートの吸光度の測定は、凝集発光性材料の最大吸収波長で測定した。

【0052】

3. コンジュゲート塗布パッドの作製

上記 1. および上記 2. で調製したコンジュゲート 13 種類を、それぞれ 6.4 OD/mL となるように、0.5% カゼイン及び 10% スクロース含有トリス緩衝液 (pH8.5) と混合してコンジュゲート溶液を作製した。次に、22.0 mm × 25.4 mm × 0.56 mm (幅 × 長さ × 厚さ) のグラスファイバー製パッド (Lydall 社製) にイムノク

ロマトグラフ法用のディスペンサー「X U Z 3 0 5 0」（B I O D O T社製）を用いて該コンジュゲート溶液を $10\mu\text{L}/\text{cm}$ でしみこませた。その後、ドライオープン内で 70°C 、30分間加温して乾燥させ、コンジュゲート塗布パッドとした。なお、界面活性剤（例えば、エマルゲン150（花王社製）、アミート320（花王社製））などを添加する場合には、上述のコンジュゲート溶液に必要量を添加後、同様の操作を行うことができる。

【0053】

4. 抗インフルエンザウィルス抗体固定化膜の作製

25. $0\text{mm}\times 254\text{mm}\times 0.235\text{mm}$ （短辺×長辺×厚さ）のニトロセルロース膜（S a r t o r i u s社製）に、 $0.75\text{mg}/\text{mL}$ に調製した上述の青色着色ラテックス粒子標識抗A型インフルエンザウィルス抗体とはエピトープを異にする抗A型インフルエンザウィルス抗体、 $0.75\text{mg}/\text{mL}$ に調製した抗K L H抗体、及び2.5%スクロースを含む 10mM リン酸緩衝液（ $\text{pH}7.2$ ）を、幅約 1mm のライン状に塗布した。塗布は、イムノクロマトグラフ法用のディスペンサー「X Y Z 3 0 5 0」（B I O D O T社製）を用い、吐出量を $1\mu\text{L}/\text{cm}$ となるように設定した。ライン塗布後のニトロセルロース膜をドライオープン内で 70°C 、45分間乾燥させ、抗インフルエンザウィルス抗体固定化膜とした。

【0054】

5. テストストリップの作製

プラスチック製粘着シートに上記抗インフルエンザウィルス抗体固定化膜を貼り、上記3.で作製した13種類のコンジュゲート塗布パッドをそれぞれ配置装着し、反対側の端には吸収パッド（W h a t m a n社製、740-E）を配置装着した（図6参照）。最後に、抗体固定化膜および吸収パッドを被覆するように上面にポリエステルフィルムを配置装着し、ラミネートした。このように各構成要素を重ね合わせた構造物を 4mm 幅に切断し、テストストリップを作成した。該テストストリップの該寸は、 $4\text{mm}\times 98\text{mm}$ （幅×長さ）であり、イムノクロマトテストストリップの形態にした。

【0055】

6. 検体抽出液の調製

200mM 塩化カリウム、 150mM アルギニン、0.5% B r i j 3 5、0.25% B S A、及び0.05% プロクリン（登録商標）950を含む 50mM トリス緩衝液（ $\text{pH}8.5$ ）を検体抽出液とした。

【0056】

7. サンプルの調製

a. 鼻腔吸引検体の場合

鼻腔吸引液に綿棒1本を浸し、検体をしみこませた綿棒を $320\mu\text{L}$ のP B Sへ入れて、検体成分をP B Sへ溶解させて試薬性能評価のサンプルとした。この時のA型インフルエンザウィルスの濃度は、 $3.8\times 10^5\sim 4.8\times 10^5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 相当である。

b. 鼻腔拭い検体の場合

綿棒2本で鼻腔を拭い、綿棒を $320\mu\text{L}$ のP B Sへ溶解させて試薬性能評価のサンプルとした。この時のA型インフルエンザウィルスの濃度は、 $3.8\times 10^5\sim 4.8\times 10^5\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 相当である。

【0057】

8. 試薬性能評価測定

サンプルに上記5.で作製した13種類のテストストリップを浸し、10分後にAライン（検出部C1）、コントロールライン（図示せず）にUV光を照射し、発光強度を測定した。なお、発光強度（視認性）は5段階で評価し、 $n=3$ で測定した。表1に示す視認性と同様の成績が得られた。

【産業上の利用可能性】

【0058】

10

20

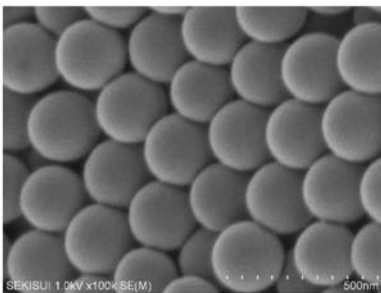
30

40

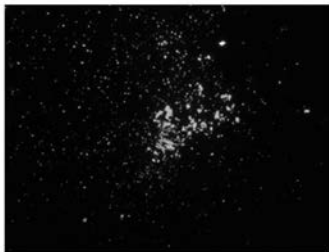
50

本発明の診断薬用蛍光粒子及びこれを用いた免疫測定試薬を用いることにより、免疫クロマト法等の免疫測定法の粒子として使用した場合、目視判定性や検出感度に優れるため、疾患の早期診断、誤判断の防止に貢献する。また、測定感度を従来程度とすれば、使用する抗体量を減少させることができ、コストダウンにもつながり有用である。

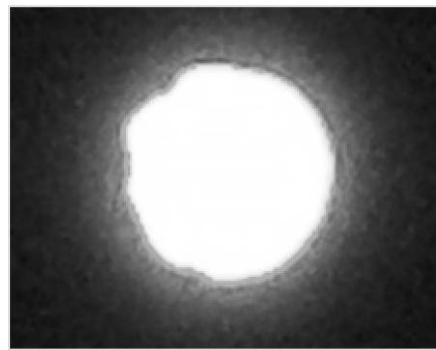
【図 1】



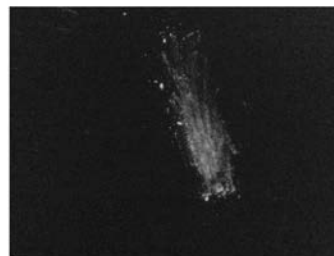
【図 2】



【図 3】



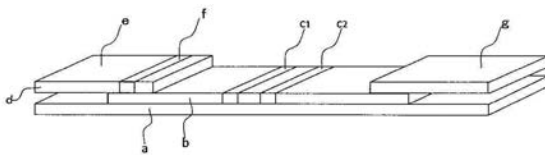
【図 4】



【図 5】



【図 6】



- a : プラスチック製粘着シート
- b : 不溶性メンブレン躯体
- c1, c2 : 検出部
- d : コンジュゲート塗布パッド
- e : 供給部
- f : コンジュゲート
- g : 吸収パッド

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/031499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N33/543, C09K11/06, G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/056894 A1 (NANOCARRIER CO., LTD.) 08 July 2004, page 2, line 18 to page 3, line 2, page 2, line 17 to page 4, line 7, page 17, lines 9-20, page 18, line 16 to page 19, line 3, examples, tables 1, 2 & EP 1582539 A1 (paragraphs [0002]-[0006], [0022]-[0024], [0025] examples, tables 1, 2) & US 2006/0138381 A1 & US 2009/0179176 A1	1-18
Y	JP 6-322176 A (SOCIETE PROLABO) 22 November 1994, paragraphs [0021]-[0031] & US 5607864 A (Column 4, line 14 to Column 5, line, 35) & EP 566448 A1	1-18

☒ 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

"B" 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
10 January 2018 (10.01.2018)Date of mailing of the international search report
30 January 2018 (30.01.2018)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/031499

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHAN, C. P., Silole nanocrystals as novel biolabels, J Immunol Methods, December 2004, vol. 295, no. 1/2, pp. 111-118, abstract, fig. 1	1-18
Y	JP 2014-12654 A (DOJINDO LABORATORIES) 23 January 2014, abstract, paragraph [0001] (Family: none)	1-18
Y	WO 2014/077142 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 22 May 2014, paragraphs [0023], [0041] (Family: none)	11-18
Y	JP 2015-197399 A (CHAOS APPLIED CO., LTD.) 09 November 2015, claims 1, 3 (Family: none)	11-18
Y	WO 2016/031892 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 03 March 2016, paragraphs [0012], [0021] (Family: none)	11-18
A	WO 2015/124802 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 27 August 2015, abstract & CN 106164214 A & EP 3110906 A1 & EP 2910618 A1 & JP 2017-509746 A & KR 10-2016-0136295 A & US 2016/0362601 A1	1-18
A	JP 2013-163767 A (KYOTO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 22 August 2013, claims (Family: none)	1-18
A	JP 2014-531031 A (DECIMADX, LLC) 20 November 2014, claims 6-8 & WO 2013/059805 A1 (claims 6-8) & JP 2017-138325 A & US 2013/0102003 A1 & EP 2769219 A1	1-18
A	WO 2013/151066 A1 (KONICAMINOLTA, INC.) 10 October 2013, paragraphs [0031]-[0034] & EP 2835643 A1 (paragraphs [0039]-[0042]) & US 2015/0079608 A1	1-18
A	JP 9-504041 A (SOCIETE PROLABO) 22 April 1997, example 1 & US 5716855 A (example 1) & WO 1995/002635 A1 & EP 712426 A1	1-18
A	JP 2015-68764 A (TOPPAN PRINTING CO., LTD.) 13 April 2015, paragraph [0038] (Family: none)	1-18
A	US 2014/0255696 A1 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11 September 2014, paragraphs [0005]-[0011] & US 2013/0210047 A1 & US 2012/0237964 A1	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/031499

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/0148262 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 28 May 2015, paragraphs [0073], [0074], [0103]–[0106], [0169], [0170] claims & WO 2013/176625 A1 & EP 2839284 A1	1–18
A	US 2013/0177991 A1 (LIMITED NANO AND ADVANCED MATERIALS INSTITUTE) 11 July 2013, paragraphs [0002], [0005], [0018], [0019], [0031] claims & CN 103196874 A	1–18
A	WO 2016/041022 A1 (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 24 March 2016, paragraphs [00101]–[00103] (Family: none)	1–18
P, A	JP 2016-164227 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 08 September 2016 (Family: none)	1–18
E, A	JP 2017-223582 A (JSR CORPORATION) 21 December 2017 (Family: none)	1–18

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 1 4 9 9	
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, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/64(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, C09K11/06, G01N21/64			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)			
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	
Y	WO 2004/056894 A1 (ナノキャリア株式会社) 2004.07.08, 2ページ 18行～3ページ2行、2ページ17行～4ページ7行、17ページ 9行～20行、18ページ16行～19ページ3行、実施例、表 1、表2 & EP 1582539 A1 ([0002]-[0006][0022]-[0024][0025]EXAMPLES Table1 Table2) & US 2006/0138381 A1 & US 2009/0179176 A1	1-18	
Y	JP 6-322176 A (ソシエテ プロラボ) 1994.11.22, [0021]～ [0031] & US 5607864 A(Col.4 line.14-Col.5 line.35) & EP	1-18	
☒ 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 10.01.2018		国際調査報告の発送日 30.01.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 1 4 9 9
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
	566448 A1	
Y	CHAN C P, Silole nanocrystals as novel biolabels, J Immunol Methods, 2004. 12, Vol. 295 No. 1/2, Page. 111-118, Abstract, Fig. 1	1-18
Y	JP 2014-12654 A (株式会社同仁化学研究所) 2014. 01. 23, [要約] [0001] (ファミリーなし)	1-18
Y	WO 2014/077142 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2014. 05. 22, [00 23][0041] (ファミリーなし)	11-18
Y	JP 2015-197399 A (カオス, アプライド株式会社) 2015. 11. 09, [請 求項1][請求項3] (ファミリーなし)	11-18
Y	WO 2016/031892 A1 (積水メディカル株式会社) 2016. 03. 03, [00 12][0021] (ファミリーなし)	11-18
A	WO 2015/124802 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 2015. 08. 27, ABSTRACT & CN 106164214 A & EP 3110906 A1 & EP 2910618 A1 & JP 2017-509746 A & KR 10-2016-0136295 A & US 2016/0362601 A1	1-18
A	JP 2013-163767 A (国立大学法人京都工芸繊維大学) 2013. 08. 22, [特許請求の範囲] (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2014-531031 A (デシマドックス, エルエルシー) 2014. 11. 20, [請求項6] ~ [請求項8] & WO 2013/059805 A1(Claim6-8) & JP 2017-138325 A & US 2013/0102003 A1 & EP 2769219 A1	1-18
A	WO 2013/151066 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2013. 10. 10, [00 31] ~ [0034] & EP 2835643 A1([0039]-[0042]) & US 2015/0079608 A1	1-18
A	JP 9-504041 A (ソシエテ、プロラボ) 1997. 04. 22, 実施例1 & US 5716855 A(EXAMPLE1) & WO 1995/002635 A1 & EP 712426 A1	1-18
A	JP 2015-68764 A (凸版印刷株式会社) 2015. 04. 13, [0038] (フ ァミリーなし)	1-18
A	US 2014/0255696 A1 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2014. 09. 11, [0005] - [0011] & US	1-18

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 1 4 9 9
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
	2013/0210047 A1 & US 2012/0237964 A1	
A	US 2015/0148262 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 2015.05.28, [0073][0074][0103] - [0106][0169][0170] Claims & WO 2013/176625 A1 & EP 2839284 A1	1-18
A	US 2013/0177991 A1 (LIMITED NANO AND ADVANCED MATERIALS INSTITUTE) 2013.07.11, [0002][0005][0018][0019][0031] Claims & CN 103196874 A	1-18
A	WO 2016/041022 A1 (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 2016.03.24, [00101] - [00103] (ファミリーなし)	1-18
PA	JP 2016-164227 A (積水化学工業株式会社) 2016.09.08, (ファミリーなし)	1-18
EA	JP 2017-223582 A (JSR 株式会社) 2017.12.21, (ファミリーなし)	1-18

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 8 L	25/04	(2006.01)	G 0 1 N 21/78	A
C 0 9 K	11/06	(2006.01)	C 0 8 L 25/04	
			C 0 9 K 11/06	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 脇屋 武司
大阪府三島郡島本町百山 2-1 積水化学工業株式会社内

(72)発明者 北原 慎一郎
東京都中央区日本橋二丁目 1 番 3 号 積水メディカル株式会社内

(72)発明者 家治 真亜紗
東京都中央区日本橋二丁目 1 番 3 号 積水メディカル株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 BA17 CA03 DA01 EA01 KA03 LA01 LA05
2G054 AA07 AB02 AB04 AB05 BA04 BB06 CA20 CA21 CA22 CA23
CA25 CA28 CA30 CE02 CE08 CE10 EA03 EB01 FA46 GA02
GA04 GB02 GB04 GE06
4J002 BC031 BC071 EA046 EB136 EC056 EX006 FD206 GB04 HA09

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) 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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 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)	用于诊断药物的荧光颗粒和使用其的免疫测定试剂		
公开(公告)号	JPWO2018043687A1	公开(公告)日	2019-08-15
申请号	JP2018537422	申请日	2017-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社 积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社 积水医疗有限公司		
[标]发明人	岩本匡志 杉本理 脇屋武司 北原慎一郎		
发明人	岩本 匡志 杉本 理 脇屋 武司 北原 慎一郎 家治 真亜紗		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/531 G01N21/64 G01N21/78 C08L25/04 C09K11/06		
CPC分类号	C09K11/06 G01N21/64 G01N33/543 G01N33/533 G01N33/54386 G01N33/582 A61K49/0017 C09K11/02		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/545.A G01N33/531.B G01N33/543.521 G01N21/64.F G01N21/78.A C08L25/04 C09K11/06		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/BA17 2G043/CA03 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/KA03 2G043/LA01 2G043/LA05 2G054/AA07 2G054/AB02 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BA04 2G054/BB06 2G054/CA20 2G054/CA21 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA25 2G054/CA28 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/CE08 2G054/CE10 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/FA46 2G054/GA02 2G054/GA04 2G054/GB02 2G054/GB04 2G054/GE06 4J002/BC031 4J002/BC071 4J002/EA046 4J002/EB136 4J002/EC056 4J002/EX006 4J002/FD206 4J002/GB04 4J002/HA09		
优先权	2016168791 2016-08-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于诊断剂的荧光颗粒，其包含合成聚合物和基于颗粒总质量的10质量%或更多的粘结发光材料，并且具有用于将分析物结合在表面上的结合伴侣。提供了一种用于诊断剂的荧光颗粒，其具有用于分析物的结合伴侣并且是无毒的并且具有改善的可见性和再现性。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2018/043687	
発行日 令和1年8月15日 (2019. 8. 15)		(43) 国際公開日		平成30年3月8日 (2018. 3. 8)	
(51) Int. Cl.		F I		データベース (参考)	
G 0 1 N 33/543 (2006. 01)		G 0 1 N 33/543 5 7 5		2 G 0 4 3	
G 0 1 N 33/545 (2006. 01)		G 0 1 N 33/545 A		2 G 0 5 4	
G 0 1 N 33/531 (2006. 01)		G 0 1 N 33/531 B		4 J 0 0 2	
G 0 1 N 21/64 (2006. 01)		G 0 1 N 33/543 5 2 1			
G 0 1 N 21/78 (2006. 01)		G 0 1 N 21/64 F			
審査請求 未請求		予備審査請求 未請求		(全 25 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2018-537422 (P2018-537422)		(71) 出願人 000002174			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/031499		株式会社 株式会社		株式会社 株式会社	
(22) 国際出願日 平成28年8月31日 (2017. 8. 31)		大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号		大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号	
(31) 優先権主張番号 特願2016-168791 (P2016-168791)		(71) 出願人 390037327		株式会社 株式会社	
(32) 優先日 平成28年8月31日 (2016. 8. 31)		株式会社 株式会社		株式会社 株式会社	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)		東京都中央区日本橋二丁目1番3号		東京都中央区日本橋二丁目1番3号	
		(74) 代理人 110000774		特許業務法人 もえぎ特許事務所	
		(72) 発明者 岩本 匡志		大阪府三島郡島本町百山2-1 株式会社	
		(72) 発明者 杉本 理		株式会社 株式会社	
				大阪府三島郡島本町百山2-1 株式会社	
				株式会社 株式会社	
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 診断薬用蛍光粒子及びそれを用いた免疫測定試薬					