

(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
2018年1月18日(18.01.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/012606 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/28 (2006.01) *C12N 9/08* (2006.01) MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/025621
- (22) 国際出願日: 2017年7月13日(13.07.2017)
- (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: 添付公開書類:
特願 2016-138640 2016年7月13日(13.07.2016) JP — 国際調査報告 (条約第21条(3))
- (71) 出願人: キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 Chiba (JP).
- (72) 発明者: 一 柳 敦 (ICHIYANAGI Atsushi); 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 下地 一彦 (SHIMOJI Kazuhiko); 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマンバイオケミファ株式会社内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー 3 2 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, 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, 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,

(54) Title: REACTION ACCELERATOR

(54) 発明の名称: 反応促進剤

(57) Abstract: Provided is a compound that accelerates an enzymic reaction catalyzed by a peroxidase. Disclosed are a peroxidase reaction accelerator comprising a compound represented by formula (I), and a hydrogen peroxide measurement method employing the same.

(57) 要約: ペルオキシダーゼが触媒する酵素反応を促進する化合物を提供する。式(I)により表される化合物を含むペルオキシダーゼ反応促進剤及びこれを用いた過酸化水素測定方法。



WO 2018/012606 A1

明 細 書

発明の名称：反応促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、反応促進剤、例えばペルオキシダーゼの反応促進剤に関する。

背景技術

[0002] ペルオキシダーゼは、種々の酵素測定法に広く利用されている。例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (EC1.11.1.7) は酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay、ELISA) や各種の診断キット、診断薬、検出反応等に広く利用されている。しかしながら、HRPは主として天然の原料に依存しており、栽培したワサビ大根 (*Armoracia rusticana*) を収穫し、抽出を行った後に精製される。こうしたことから、HRPの生産量は干ばつや温度変化など天候的要因によって左右されやすい。そのため、限られたHRP資源を効果的に活用することが望まれている。

[0003] この問題に対するアプローチとして、ペルオキシダーゼの生産量を安定させるべく、遺伝子組み換え技術を用いてペルオキシダーゼを産生する方法が挙げられる。例えば代表的なペルオキシダーゼであるC1aは、遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列が明らかになっている (非特許文献1)。C1a遺伝子を用いた組換え発現は大腸菌で試みられているが、その発現量は高いとは言えず、約0.11mg/L培地 (非特許文献2) である。また、酵母での組換え発現量は約5.3mg/L (非特許文献3) との報告がある。しかしながら、この発現系ではHRPに糖鎖が付加されており、ELISAで使用する場合には抗体標識の際、糖鎖が抗体標識に影響を及ぼす可能性がある。そのため、組換え発現産物が天然の原料を置き換えるには至っていない。また、組換え発現の場合にも、依然としてペルオキシダーゼの消費量は大きく、ペルオキシダーゼの効果的な利用方法が望まれている。

[0004] 特許文献1は、反応系におけるフェノチアジン誘導体色素を吸光度測定により検出する方法において、フェノチアジン誘導体の検出波長をシフトさせ

る化合物を記載している。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2008/093722号パンフレット

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Eur. J. Biochem., 1988, vol. 173, pp. 681-687

非特許文献2：Biotechnol. Prog., 1999, vol. 15, pp. 467-471

非特許文献3：Protein. Engineering, 2000, vol. 13, pp. 377-384

発明の概要

発明が解決しようとする課題

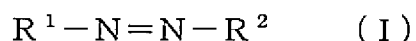
[0007] こうした問題に鑑み、本発明は、ペルオキシダーゼが触媒する酵素反応を促進する化合物、すなわちペルオキシダーゼ反応促進剤を提供する。さらに本発明はペルオキシダーゼ反応促進剤を含む組成物を提供する。さらに本発明はペルオキシダーゼ及びペルオキシダーゼ反応促進剤を用いる過酸化水素測定方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0008] 上記問題を解決するために、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、驚くべきことにペルオキシダーゼの反応を促進させることのできる化合物を見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、以下の実施形態を包含する。

[0009] [1] ペルオキシダーゼ、及び、下記の式 (I) で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、過酸化水素の測定方法、

[化1]



[式中、

R¹及びR²は、それぞれ独立に、場合により1又は複数の置換基により置換

されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

前記の置換基は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO-NH_2$ 、 $-R^3$ 、 $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ 、 Y 、 Z からなる群より選択され、

X は、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Y は、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

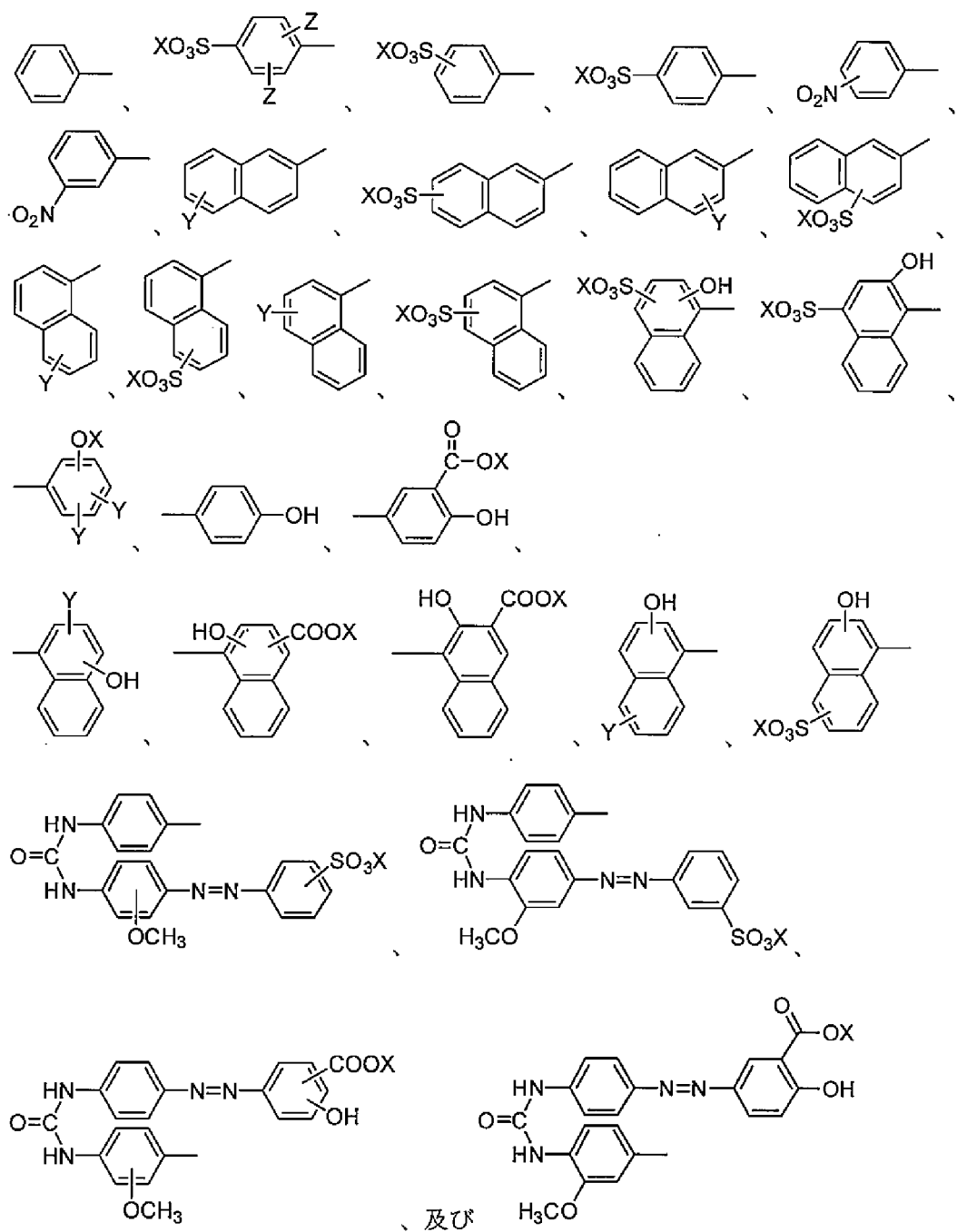
Z は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-SO_3X$ からなる群より選択され、

$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、或いは、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ 、 Y 、 Z からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環である]。

[0010] [2] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤において、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立に、

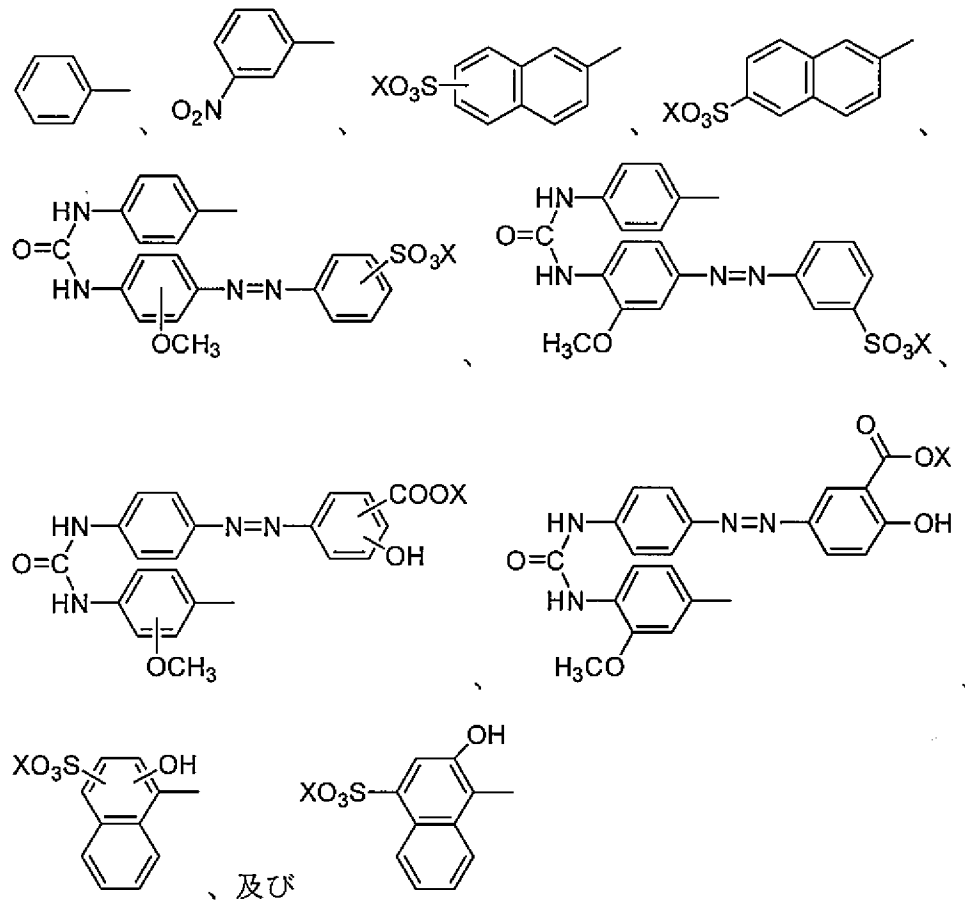
[化2]



からなる群より選択され、式中、X、Y、Zは1に定義したとおりである、
1に記載の方法。

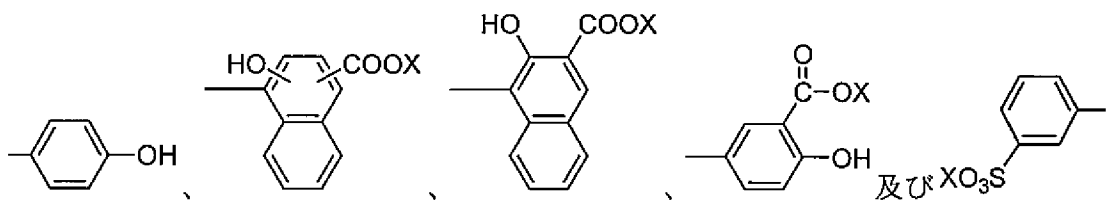
[0011] [3] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤において、 R^1 が、

[化3]



からなる群より選択され、 R^2 が、

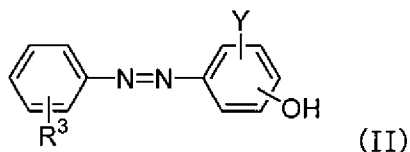
[化4]



からなる群より選択され、式中、 X は1に定義したとおりである、1又は2に記載の方法。

[0012] [4] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、1に記載の方法、

[化5]



[式中、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

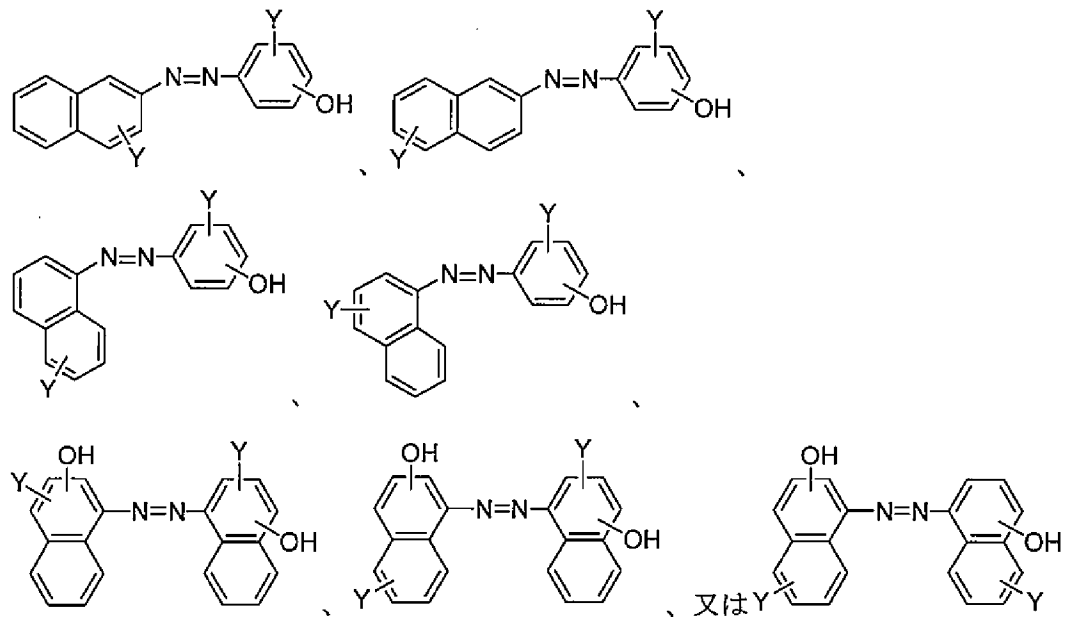
Yは、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、或いは、
 場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$
 -6 アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、
 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1
 又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環
 、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、
 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、
 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$
 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1又は複数の置換基によ
 り置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を
 含む10員の縮合環である]。

[0013] [5] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記のいずれ
 かの式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、1に記載の方法、

[化6]



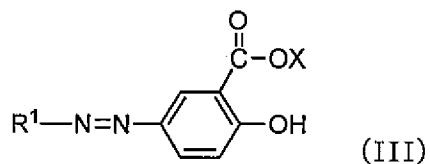
[式中、

Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Yは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択される]。

[0014] [6] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、1に記載の方法、

[化7]

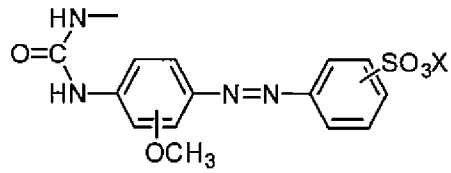


[式中、

R^1 は、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、ベンゼン環又はナフタレン環であり、

前記の置換基は、 $-NO_2$ 、 $-SO_3X$ 、及び

[化8]

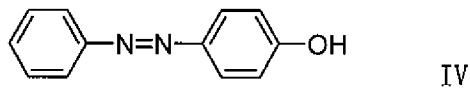


からなる群より選択され、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]。

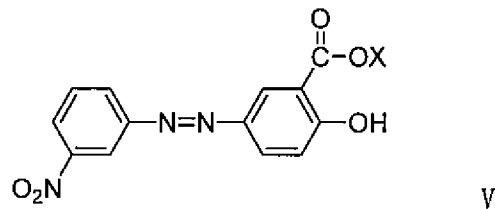
[0015] [7] 式 (I)により表される化合物が、以下の式により表される化合物 (4-(フェニルアゾ)フェノール、CAS 1689-82-3) 、

[化9]



以下の式により表される化合物、

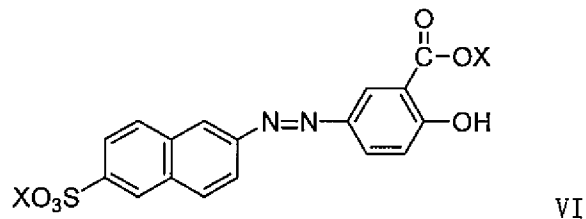
[化10]



[式中、Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

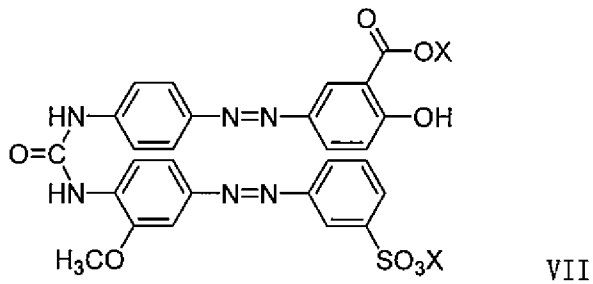
[化11]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物

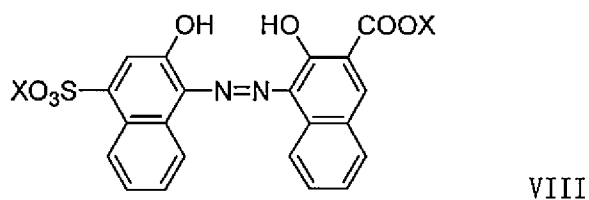
[化12]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化13]

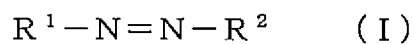


[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

からなる群より選択される化合物である、1～6のいずれかに記載の方法。

[0016] [8] 式 (I)により表される化合物を含む、ペルオキシダーゼ反応促進剤、

[化14]



[式中、

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

前記の置換基は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アル

キル、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{R}^3$ 、 $-\text{NHCO}-\text{NH}-\text{R}^5-\text{N}=\text{N}-\text{R}^6$ 、 $-\text{SO}_3\text{X}$ 、 $-\text{COOX}$ 、 Y 、 Z からなる群より選択され、

X は、 $-\text{H}$ 、 $-\text{Na}$ 、 $-\text{K}$ 、 $-\text{Li}$ からなる群より選択され、

Y は、 $-\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{X}$ 、 $-\text{COOX}$ からなる群より選択され、

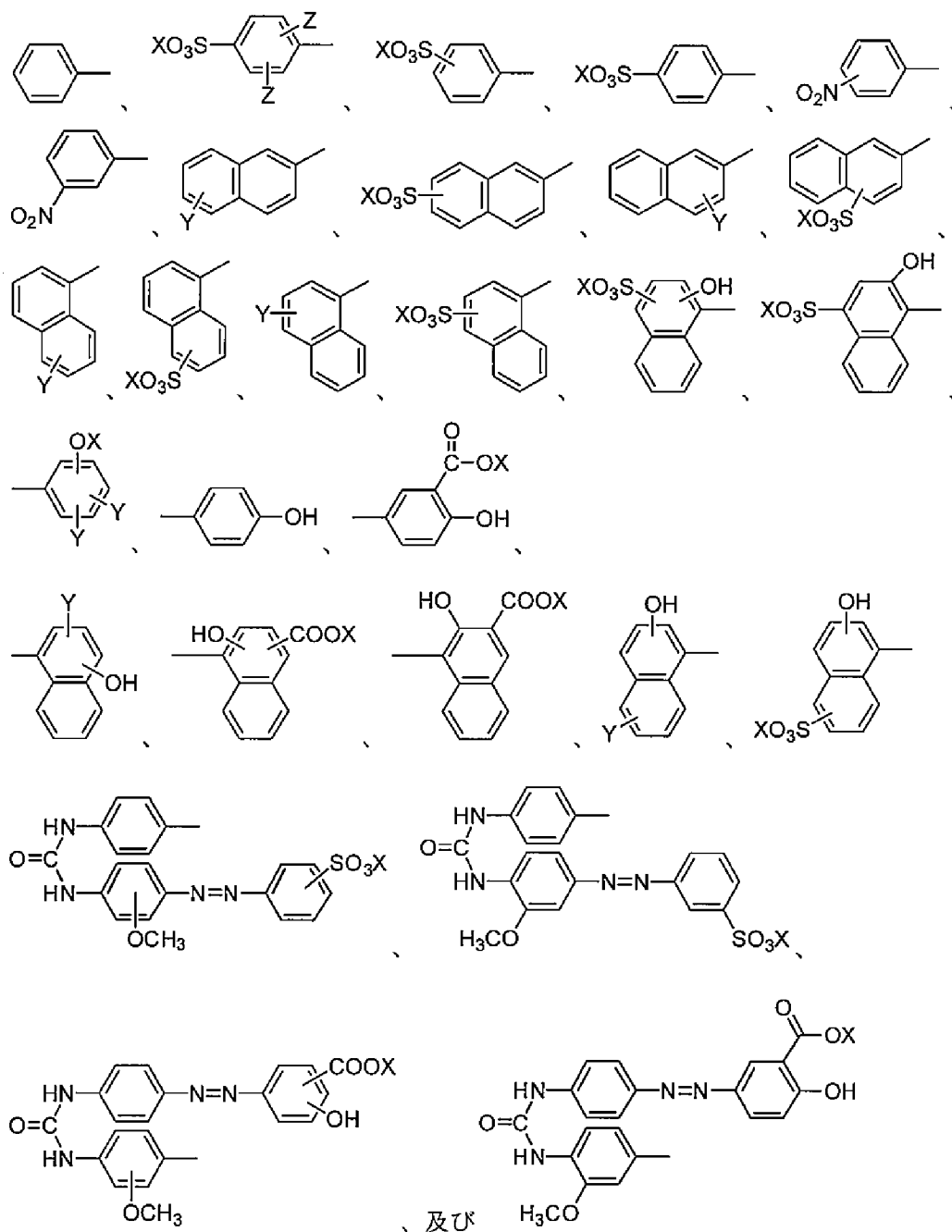
Z は、 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{SO}_3\text{X}$ からなる群より選択され、

$-\text{R}^3$ は、 $-\text{H}$ 又は $-\text{NHCO}-\text{NH}-\text{R}^5-\text{N}=\text{N}-\text{R}^6$ であるか、或いは、場合により $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{At}$ 、 $-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{C}_{2-6}$ アルケニル、 $-\text{C}_{2-6}$ アルキニル、 $=\text{O}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_3\text{X}$ 、からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

$-\text{R}^5$ 及び $-\text{R}^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{At}$ 、 $-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{C}_{2-6}$ アルケニル、 $-\text{C}_{2-6}$ アルキニル、 $=\text{O}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_3\text{X}$ 、 $-\text{COOX}$ 、 Y 、 Z からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環である]。

[0017] [9] 式 (I)により表される化合物において、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立に、

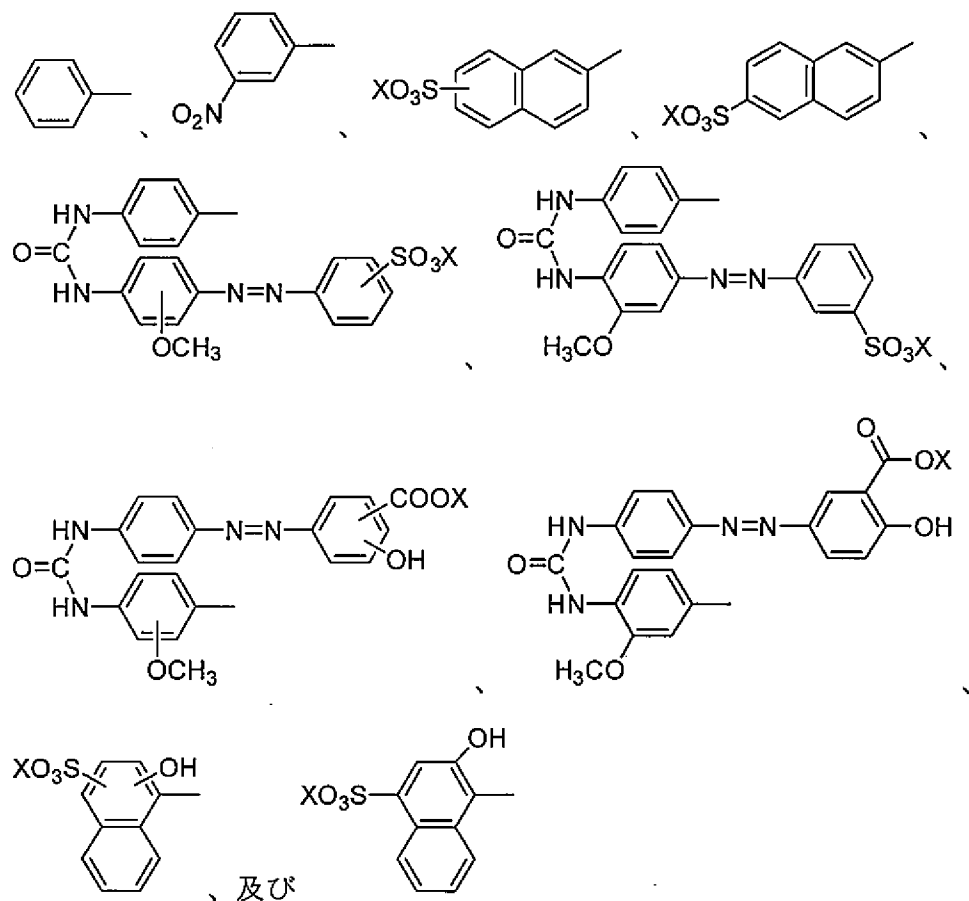
[化15]



からなる群より選択され、式中、X、Y、Zは8に定義したとおりである、
8に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤。

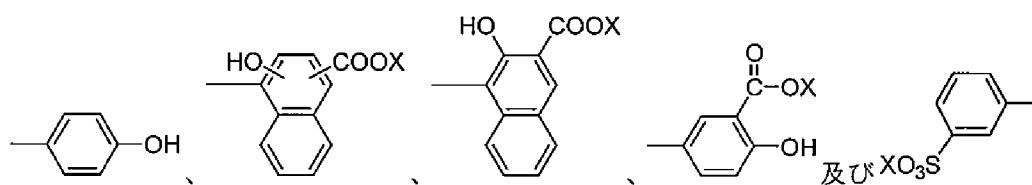
[0018] [10] 式(I)により表される化合物において、 R^1 が、

[化16]



からなる群より選択され、 R^2 が、

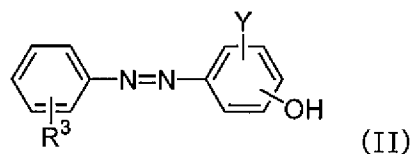
[化17]



からなる群より選択され、式中、Xは8に定義したとおりである、8又は9に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤。

[0019] [1 1] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、8に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤、

[化18]



[式中、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

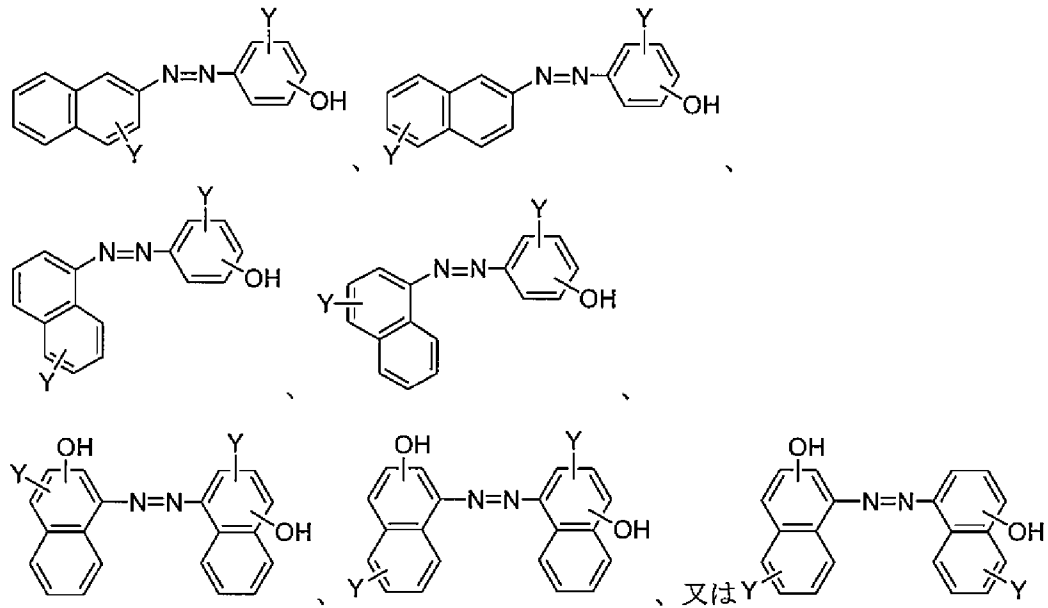
Yは、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、或いは、
 場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$
 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、
 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1
 又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環
 、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、
 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、
 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$
 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1又は複数の置換基によ
 り置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を
 含む10員の縮合環である]。

[0020] [12] 式(I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記のいづ
 れかの式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、8に記載のペルオ
 キシダーゼ反応促進剤、

[化19]



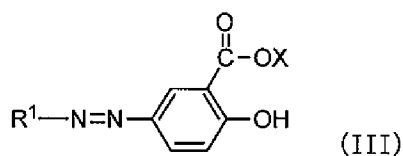
[式中、

Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Yは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択される]。

[0021] [13] 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、8に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤、

[化20]

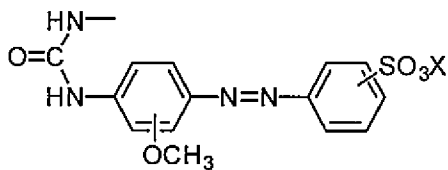


[式中、

R^1 は、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、ベンゼン環又はナフタレン環であり、

前記の置換基は、 $-NO_2$ 、 $-SO_3X$ 、及び

[化21]

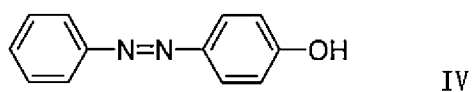


からなる群より選択され、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]。

[0022] [14] 式 (I) により表される化合物が、以下の式により表される化合物 (4-(フェニルアゾ)フェノール、CAS1689-82-3)、

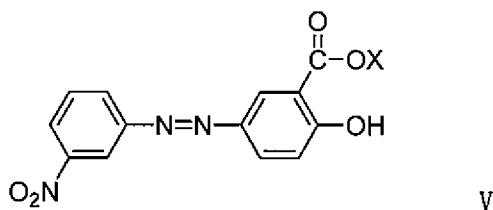
[化22]



IV

以下の式により表される化合物、

[化23]

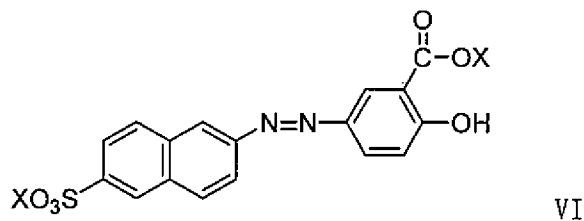


V

[式中、Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化24]

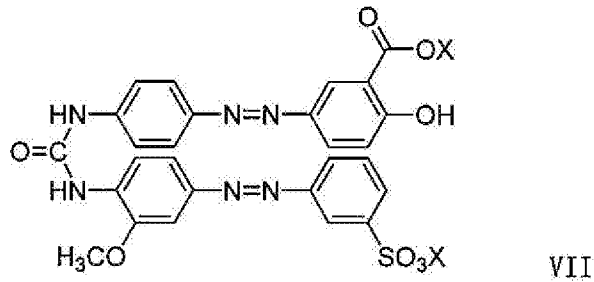


VI

[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

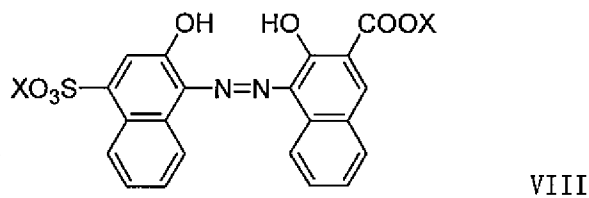
[化25]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化26]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

からなる群より選択される化合物である、8～13のいずれかに記載のペルオキシダーゼ反応促進剤。

[0023] [15] ペルオキシダーゼ及び8～14のいずれかに記載のペルオキシダーゼ反応促進剤を含む、過酸化水素測定用組成物。

[0024] [16] ペルオキシダーゼが西洋ワサビペルオキシダーゼである、15に記載の組成物。

[0025] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-138640号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0026] 本発明の効果として、ペルオキシダーゼが触媒する酵素反応を促進するこ

とができる。これにより診断試薬や測定試薬へのペルオキシダーゼの処方量を、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤を添加しない場合と比較して、低減することができる。また同一のペルオキシダーゼの処方量であれば、酵素反応が促進されるため、測定の高感度化及び／又は反応時間短縮が可能となる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]希釈試料と第1試薬-Aを混合してから10分間の、波長694 nm及び751 nmの光に対する反応液の吸光度 (A_{694} 及び A_{751}) を経時的に測定した結果を示す。横軸は時間 (分) であり、縦軸は $A_{694/751}$ である。また、 $A_{694/751}$ と、 ΔA_{9min} 及び ΔA_{10min} との関係を示す。

発明を実施するための形態

[0028] ある実施形態において、本発明は、ペルオキシダーゼ反応促進剤を提供する。ここでペルオキシダーゼ反応促進剤とは、ペルオキシダーゼが触媒する酵素反応を促進する化合物をいう。ペルオキシダーゼが触媒する酵素反応を促進するとは、ペルオキシダーゼ反応促進剤が系に存在しない場合と比較して、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤が系に存在する場合、同一反応時間中により多くの過酸化水素が分解される、又は、より短時間で過酸化水素分解反応が完了する若しくはほぼ完了することをいう。

[0029] ペルオキシダーゼとしては任意の公知のものを使用しうる。ペルオキシダーゼは、過酸化水素と発色剤との酸化還元反応を触媒する。この反応により発色剤が発色する。ある実施形態において、反応が促進されるペルオキシダーゼは、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) である。ある実施形態において、反応が促進されるペルオキシダーゼは、ヘム依存性ペルオキシダーゼ、例えば動物ヘム依存性ペルオキシダーゼ、非ヘム依存性ペルオキシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、例えばラクトペルオキシダーゼ、チオールペルオキシダーゼ、例えばグルタチオンペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、バナジウムブロモペルオキシダーゼ、又はクロリドペルオキシダーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、リグニンペルオキ

シダーゼ、ダイズペルオキシダーゼ、*Arthromyces ramosus*由来ペルオキシダーゼ、*Coprinus*由来ペルオキシダーゼである。本発明の反応促進剤という場合、特に断らない限りこれはペルオキシダーゼ反応促進剤を意味する。

[0030] ある実施形態において、本発明は、ペルオキシダーゼ及びペルオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、過酸化水素分解を利用した測定方法を提供する。ある実施形態において、本発明の測定方法は、過酸化水素を含む試料又は酵素反応等により過酸化水素が生成しうる試料にペルオキシダーゼ、及びペルオキシダーゼ反応促進剤を含む第1試薬を添加し加温する工程、発色剤を含む第2試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ及びペルオキシダーゼ反応促進剤を含む第1試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。発色剤を含む第2試薬は、単一の試薬でもよく、他の成分を含んでもよい。測定は定性的でも定量的でもよい。

[0031] 別の実施形態では、本発明の測定方法は、ペルオキシダーゼ反応促進剤を含む第2試薬にペルオキシダーゼ、及び発色剤を含む第1試薬を添加し加温する工程、並びに、過酸化水素を含む試料又は酵素反応等により過酸化水素が生成しうる試料を添加し加温する工程を含む。やはり試薬中の各成分は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。

[0032] 上記の第1試薬と第2試薬を一つの試薬として、単一工程にて添加することもできる。すなわち、別の実施形態において、本発明の測定方法は、過酸化水素を含み得る試料又は過酸化水素を生成しうる試料に、ペルオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ反応促進剤、及び発色剤を含む測定試薬を添加し加温する工程、並びに試薬の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ反応促進剤、及び発色剤を含む測定試薬は単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。

[0033] ある実施形態において、ペルオキシダーゼとして、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用いることができる。この場合、本発明の測定方法は、HRP

の基質となる過酸化水素を生成するための工程をさらに有しうる。過酸化水素生成は、任意の公知の反応により行うことができる。例えばHbA1cに直接作用しうるヘモグロビンA1cオキシダーゼ (A1cOX) を、HbA1cを含む試料に添加すると、HbA1cが酸化され、過酸化水素が生じる。

[0034] HRPは溶液中に遊離していてもよく、固相に固定化されたものでもよい。HRPは、単独でもよく、別の化合物やタンパク質、例えば酵素や抗体に連結されたものでもよい。

[0035] 試料溶液に添加する本発明の反応促進剤の終濃度は特に限定されず、例えば、0.01~200mM、0.02~150mM、0.03~100mM、0.04~80mM、0.05~60mM、0.06~50mM、0.08~40mM、0.1mM~30mM、0.15~20mM、0.2~10mM、0.3~5mM、0.4~3mM、例えば0.05~10mMの範囲であり得る。例えば試料溶液中に生成しうる過酸化水素の濃度が0~0.005mMの場合、添加する本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤の終濃度は、例えば、0.01~20mM、例えば0.02~10mMとすることができる。試料溶液に添加する本発明の反応促進剤の終濃度は特に限定されず、例えば0.001~5% (w/v)、0.003~3% (w/v)、0.005~1% (w/v)、0.01~0.5% (w/v)、0.02~0.3% (w/v)、0.03~0.1% (w/v) であり得る。なお、反応促進剤と他の酵素や試薬との添加順序は制限されず、同時でも逐次添加でもよい。

[0036] ある実施形態において合計反応時間は、60分以下、30分以下、20分以下、好ましくは15分以下、好ましくは10分程度とすることができる。例えば、上記の第1試薬添加後の加温を30分以下、20分以下、15分以下、10分、例えば5分程度とすることができ、上記の第2試薬添加後の加温を30分以下、20分以下、15分以下、10分、例えば5分程度とすることができる。また、試料に含まれる又は試料中に生成すると推定される過酸化水素の濃度範囲に対して、ペルオキシダーゼによる反応が完了するか又はほ

ば完了するよう、測定試薬の各成分の濃度を調節することができる。反応が完了するとは、試料に含まれる過酸化水素、又は当該試料から潜在的に生成されうる過酸化水素の100%が反応したことをいう。反応がほぼ完了するとは、試料に含まれる過酸化水素、又は当該試料から潜在的に生成されうる過酸化水素の例えば75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、例えば99%以上が反応したことをいう。

[0037] 吸光度測定における測定波長は、発色剤に応じて選択することができる。吸光度の測定波長は、例えば340~900nm、590~900nm、600~751nm、610~730nmでありうる。ある実施形態において、2つの測定波長 A_1 及び A_2 で測定を行い、その差(A_1-A_2 又は $A_{1/2}$ と表記することがある)を取得することもできる。2つの測定波長 A_1 及び A_2 は、590~900nmの範囲の任意の2つの波長とすることができる。例えば A_1 を色素の吸光波長とし、 A_2 をバックグラウンド波長とし、その差(A_1-A_2)を算出し得る。吸光度の測定波長は、フェノチアジン誘導体色素を用いる場合、590~730nm、例えば610~710nmでありうる。バックグラウンド波長は、フェノチアジン誘導体色素を用いる場合、当該フェノチアジン誘導体色素の吸収がほとんどない領域、例えば710nmより高く900nm以下である範囲から選択することができる。例えば $A_1=A_{694}$ とし、 $A_2=A_{751}$ とし、これらから $A_{694}-A_{751}$ を算出してよい。吸収波長を $A_1=A_{654}$ としてもよい。吸光度測定は自動分析装置を用いて行ってもよい。

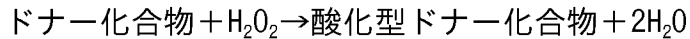
[0038] 発色剤は、特に限定されないが、過酸化水素存在下でのペルオキシダーゼの触媒反応により吸光度が変化する化合物が好ましい。発色剤としては、4-アミノアンチピリンや、例えば、A D O S (N-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルホプロピル)-m-アニシジン)、A L O S (N-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルホプロピル)アニリン)、T O O S (N-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルホプロピル)-m-トリイジンナトリウム)、D A-67 (10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3、7-ビス(ジメチルアミノ)-フェノシアジン)、D A-64 (N-(カ

ルボキシメチルアミノカルボニル) - 4, 4' - ビス (ジメチルアミノ) - ジフェニルアミン) 等が挙げられる。ADOS、ALOS、TOOSは4 - アミノアンチピリンと縮合した際に発色する。DA-64、DA-67は4 - アミノアンチピリンを必要とせず、単独で処方するだけで発色する。いずれの場合も、発色反応はパーオキシダーゼにより触媒される。さらに発色剤として、メチレンブルー、10 - (アセチルアミノカルボニル) - 3, 7 - ビス (ジメチルアミノ) フェノチアジン、10 - (カルボキシメチルアミノカルボニル) - 3, 7 - ビス (ジメチルアミノ) フェノチアジン、10 - (フェニルカルボニル) - 3, 7 - ビス (ジメチルアミノ) フェノチアジン、10 - (3 - (メチルカルボキシアミノ) - ヘキサメチルアミノ) - フェノチアジン、10 - ((3 - (メチルカルボキシアミノ) - 4 - メチルフェニル) - アミノ) - フェノチアジン、10 - ((3 - (メチルカルボキシアミノメチル) - フェニル) - メチルアミノ) - フェノチアジン、10 - (1 - ナフタレンアミノ) - フェノチアジン、10 - (メチル) - フェノチアジン、10 - (フェニルアミノ) - フェノチアジン、10 - (メチルアミノ) - フェノチアジン、アズールA、アズールB、アズールC、トルイジンブルーO、1, 9 - ジメチル - 3, 7 - ビス (ジメチルアミノ) フェノチアジン塩、メチレングリーン若しくはその塩、又はそのロイコ体等が挙げられるがこれに限らない。発色剤は、反応溶液における終濃度が、0.001 ~ 10 mM、例えば0.005 ~ 2 mMとなるよう添加しうる。

[0039] 測定反応に用いるペルオキシダーゼとしては任意の公知のものを使用しうる。ある実施形態において、ペルオキシダーゼは、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) である。ある実施形態において、ペルオキシダーゼは、ヘム依存性ペルオキシダーゼ、例えば動物ヘム依存性ペルオキシダーゼ、非ヘム依存性ペルオキシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、例えばラクトペルオキシダーゼ (LP0)、チオールペルオキシダーゼ、例えばグルタチオンペルオキシダーゼ (GluP)、甲状腺ペルオキシダーゼ (TP0)、バナジウムブROMOPEROXIDASE (VBrP0)、又はクロリドペルオキシダーゼ (ClP0) である。これらは

公知のものや市販のものを利用しうる。

[0040] 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) は、以下の反応を触媒する。



[0041] ドナー化合物は電子供与体ともいい、フェノール、グアイヤコール、ピロガロール系化合物等が挙げられる。HRPにはアイソザイムが存在するが、本明細書でHRPというとき、これは主要アイソザイムであるペルオキシダーゼC1aを指す。HRPは4つの分子内S-S結合を有する。またHRPは構造形成にカルシウムイオンが必須である。さらにHRPは酵素活性にヘム補因子を必要とする。

[0042] 過酸化水素分解反応は緩衝溶液中で行うことができる。過酸化水素生成反応も行う場合は、当該生成反応と同じ緩衝溶液を過酸化水素分解反応に使用しうる。反応溶液のpHは特に限定されないが、例えば3~11、4~10、5~9、例えば6~8でありうる。反応温度は、例えば、10~45℃、10~40℃、10~38℃、20~37℃、例えば25~37℃でありうる。反応時間は、0.1~60分、0.1~30分、0.1~20分、0.1~15分、0.1~10分、例えば0.1~5分であり得る。

[0043] ペルオキシダーゼは、試料溶液中に含まれる過酸化水素、又は過酸化水素を生成しうる基質の量にもよるが、例えば終濃度が0.01~300KU/L、0.01~100KU/L、0.01~50U/mL、0.1~20U/mL、0.2~10U/mL、0.5~50KU/L、例えば0.5~10U/mLとなるよう試料に添加することができる。ペルオキシダーゼの活性「U」は、次の反応条件下で、20秒間に1mgのプルプロガリン(purpurogallin)を生成する酵素(POD)量を1プルプロガリン単位と定義する。

[0044] 試薬：

A. 5%(W/V)ピロガロール水溶液

B. 0.147M H₂O₂水溶液(30%(W/V)H₂O₂溶液1.67mlを蒸留水で希釈して100mlとする)

C. 0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0 (反応混液及び酵素希釈用)

D. 2.0N H₂SO₄溶液

酵素溶液：酵素標品を予め氷冷した0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で溶解し、同緩衝液で3.0～6.0 プルプロガリン U/Pに希釈して氷冷保存する

[0045] 手順：

1 試験管(32φ×200mm)に下記反応混液を調製し、20℃で約5分間予備加温する

14.0ml 蒸留水

2.0ml ピロガロール水溶液(A)

1.0ml H₂O₂水溶液(B)

2.0ml リン酸緩衝液(C)

2 酵素溶液1.0mlを加え、反応を開始する

3 20℃で正確に20秒間反応させた後、H₂SO₄溶液(D)1.0mlを加えて反応を停止させる。反応停止後の混液から生成したプルプロガリンをエーテル15mlで抽出する。この操作を5回繰り返し、抽出液を合わせ、更にエーテルを加えて全量を100mlにする。この液について420nmにおける吸光度を測定する(OD_{test})。

4 盲検は反応混液1を20℃で20秒間放置後、H₂SO₄溶液(D)1.0mlを加えて混和し、次いで酵素溶液1.0mlを加えて調製する。この液につき上記同様にエーテル抽出を行って吸光度を測定する(OD blank)。

計算式は次のとおりである：

$$\begin{aligned} \text{U/ml} &= \Delta \text{OD}(\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{blank}}) \times \text{希釈倍率} / (0.117 \times 1\text{ml}) \\ &= \Delta \text{OD} \times 8.547 \times \text{希釈倍率} \end{aligned}$$

$$\text{U/mg} = \text{U/ml} \times 1/\text{C}$$

0.117: 1mg% プルプロガリンエーテル溶液の420nmにおける吸光度

C: 溶解時の酵素濃度(c mg/ml)

1プルプロガリン単位は13.5国際単位(o-ジアニシジンを基質とし、25℃の反応条件下)に相当する。

[0046] 吸光度測定には、任意の公知の分光光度計や検出機器を使用しうる。反応

溶液の吸光度は発色した発色剤の量を示し、ここから試料中の過酸化水素濃度を決定しうる。また、過酸化水素を生成する反応と共役させた場合は、当該過酸化水素を生成するための基質の濃度を決定しうる。濃度が既知の過酸化水素を含む標準物質についての吸光度を測定し、濃度と吸光度の関係をプロットして検量線を作成しうる。次いで、濃度未知の過酸化水素、又は過酸化水素を生成するための基質を含む試料について吸光度を測定し、前記検量線から過酸化水素、又は過酸化水素を生成するための基質の濃度を決定しうる。

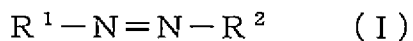
[0047] ある実施形態において、本発明は、ペルオキシダーゼ反応促進剤を含む、過酸化水素測定用組成物を提供する。この組成物は場合により、過酸化水素を生成しうる酵素、ペルオキシダーゼ、緩衝剤、安定化剤、発色剤、界面活性剤等を含み得る。また本発明の組成物に、過酸化水素以外の化合物を測定するためのさらなる酵素や試薬を追加してもよい。

[0048] 緩衝剤としては、例えば、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、硼酸塩、クエン酸塩、ジメチルグルタミン酸塩、トリシン、HEPES、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、フタル酸、酒石酸等が挙げられる。さらに必要により、溶解補助剤、安定化剤、反応性向上剤、HbA1c変性剤等として、界面活性剤(n-オクチル-β-D-グルコシド、n-オクチル-β-D-チオグルコシド、n-ドデシル-β-D-マルトシド、n-テトラデシル-β-D-マルトシド、n-オクチル-β-D-マルトシド、1-ドデシルピリジニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、トリトンX-100、ブリッジ35、ブリッジ58、ツイーン80、コール酸塩、n-ヘプチル-β-D-チオグルコシド、3-オキサトリデシル-α-D-マンノシド、n-ノニル-β-D-チ

オマルトシド、 n -デシル- β -D-マルトシド、 n -ウンデシル- β -D-マルトシド、トレハロースC8、トレハロースC10、トレハロースC12、トレハロースC14、トレハロースC16、BIGCHAP、deoxy-BIGCHAP、MEGA-8、MEGA-9、MEGA-10、ヘキサデシルピリジニウム塩、オクタデシルトリメチルアンモニウム塩、デシルトリメチルアンモニウム塩、ノニルトリメチルアンモニウム塩、オクチルトリメチルアンモニウム塩、ヘキシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシル硫酸ナトリウム等)、還元剤(ジチオスレイトール、メルカプトエタノール、L-システイン等)、亜硝酸塩、牛血清アルブミン、糖類(グリセリン、乳糖、シュクロース等)等を適宜添加してもよい。

[0049] ある実施形態において、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤は以下の式(I)により表される化合物を含む。

[化27]



[式中、

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

前記の置換基は、-F、-Cl、-Br、-I、-At、-C₁₋₆アルキル、-C₂₋₆アルケニル、-C₂₋₆アルキニル、=O、-OH、-O-C₁₋₆アルキル、-CONH₂、-NO₂、-NH₂、-CO-NH₂、-R³、-NHCO-NH-R⁵-N=N-R⁶、-SO₃X、-COOX、Y、Zからなる群より選択され、

Xは、-H、-Na、-K、-Liからなる群より選択され、

Yは、-H、-SO₃X、-COOXからなる群より選択され、

Zは、-H、-C₁₋₆アルキル、-O-C₁₋₆アルキル、-SO₃Xからなる群より選択され、

—R³は、—H又は—NHCO—NH—R⁵—N=N—R⁶であるか、或いは、場合により—F、—Cl、—Br、—I、—At、—C₁₋₆アルキル、—C₂₋₆アルケニル、—C₂₋₆アルキニル、=O、—OH、—O—C₁₋₆アルキル、—CONH₂、—NO₂、—NH₂、—SO₃X、からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、—R⁵及び—R⁶は、それぞれ独立に、場合により—F、—Cl、—Br、—I、—At、—C₁₋₆アルキル、—C₂₋₆アルケニル、—C₂₋₆アルキニル、=O、—OH、—O—C₁₋₆アルキル、—O—CH₃、—CONH₂、—NO₂、—NH₂、—SO₃X、—COOX、Y、Zからなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環である]。

[0050] 6員単環は場合により1、2、3、4若しくは5つの置換基により置換されていてもよく、10員縮合環は場合により1、2、3、4、5、6若しくは7つの置換基により置換されていてもよい。

[0051] 芳香族の単環の炭素環としてはベンゼン環が挙げられる。芳香族の炭素環と炭素環との縮合環としてはナフタレン環が挙げられる。

[0052] —C₁₋₆アルキルとしては、メチル、エチル、プロピル（n-プロピル、イソプロピル）、ブチル（n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル）、ペンチル（n-ペンチル、tert-ペンチル、ネオペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、3-ペンチル）、ヘキシル（n-ヘキシル、イソヘキシル、ネオヘキシル）基が挙げられる。

[0053] —C₂₋₆アルケニルとしては、エテニル基（ビニル基）、1-プロペニル基、2-プロペニル基（アリル基）、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基などが挙げられる。

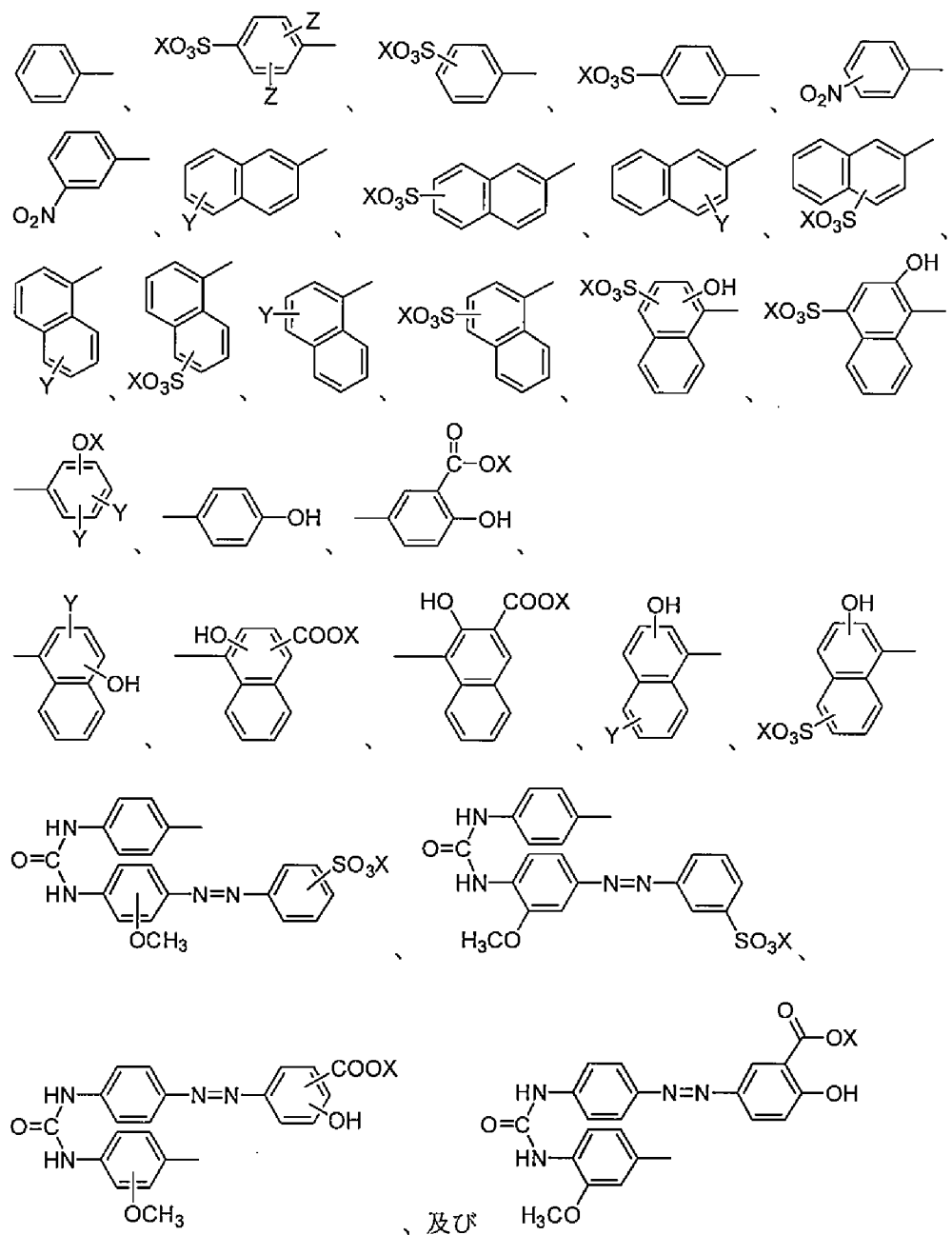
[0054] —C₂₋₆アルキニルとしては、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基、2-ブチニル基、3-ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基などが挙げられる。

[0055] $-O-C_{1-6}$ アルキルは、 C_{1-6} アルコキシ基ともいい、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ基などの直鎖状又は分岐鎖状アルコキシ基が挙げられる。

[0056] ある実施形態において、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環（ベンゼン環）である。ある実施形態において、 R^1 は、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環であり、 R^2 は10員の炭素環の縮合環（ナフタレン環）である。

[0057] ある実施形態において、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、

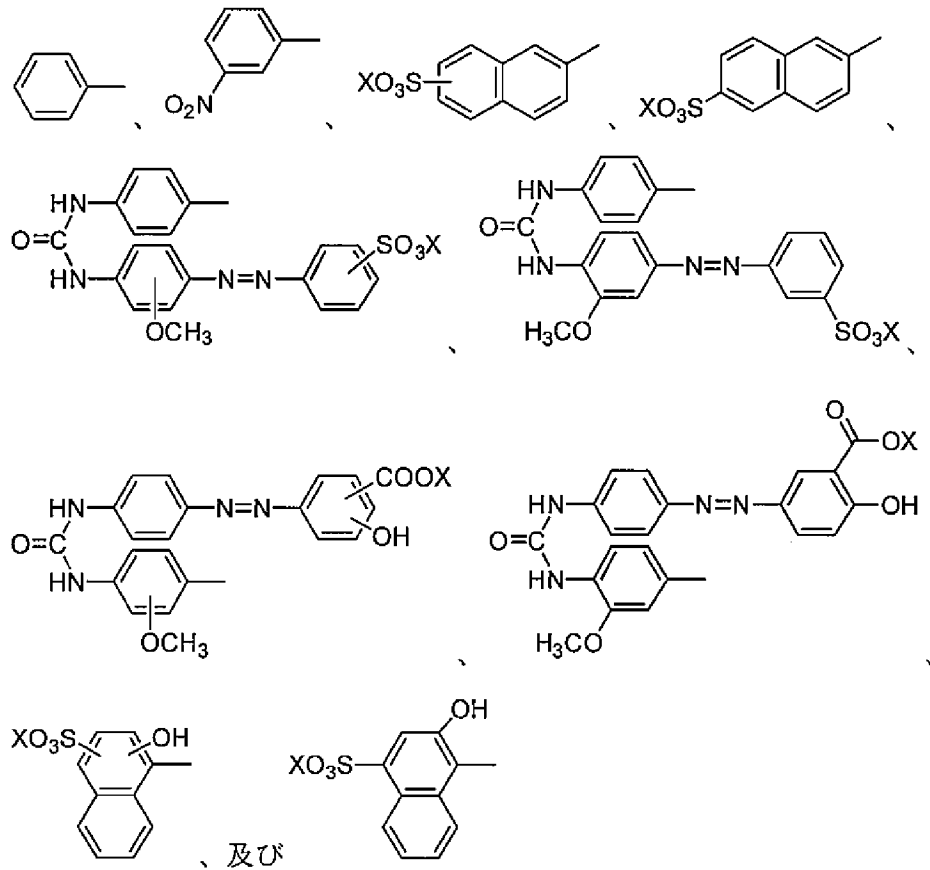
[化28]



からなる群より選択される基である。式中、 X 、 Y 、 Z は上記に定義したとおりである。

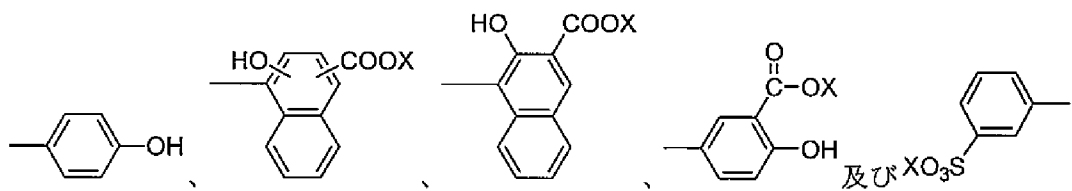
[0058] ある実施形態において、 R^1 は、

[化29]



からなる群より選択され、 R^2 は、

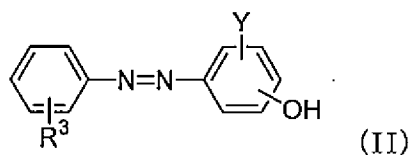
[化30]



からなる群より選択され、式中、Xは上記に定義したとおりである。

[0059] ある実施形態において、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤は、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤を含む：

[化31]



[式中、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

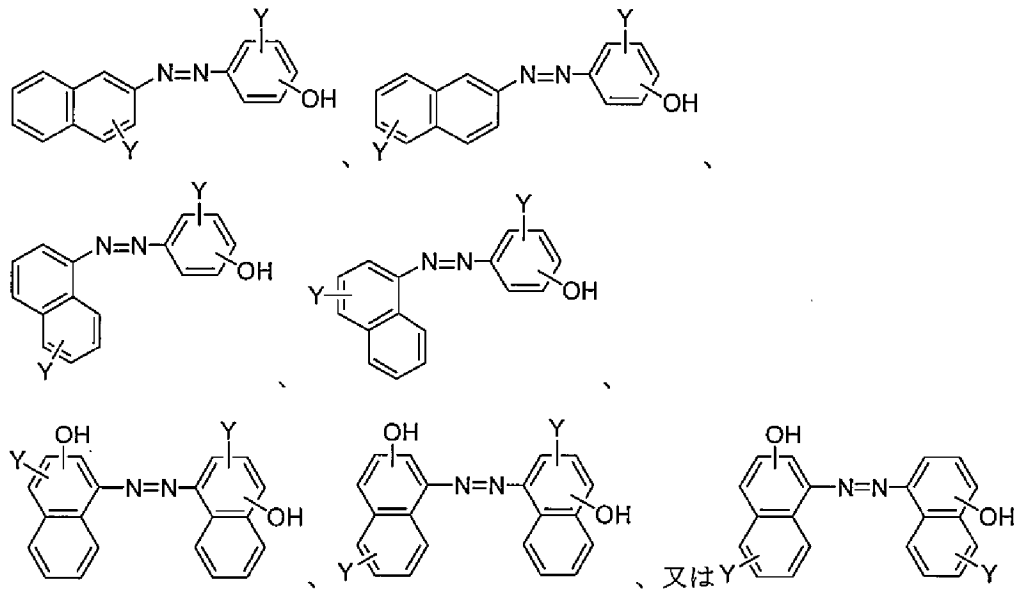
Yは、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、或いは、
 場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$
 アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、
 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1
 又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環
 、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、
 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$
 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1又は複数の置換基によ
 り置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を
 含む10員の縮合環である]。

[0060] ある実施形態において、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤は、下記の
 いずれかの式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤を含む：

[化32]



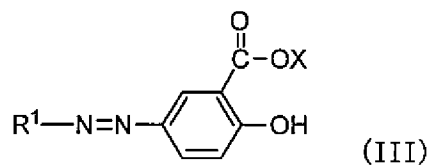
[式中、

Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Yは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択される]。

[0061] ある実施形態において、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤は、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤を含む：

[化33]

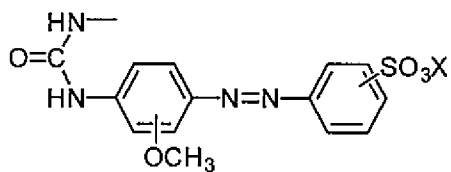


[式中、

R^1 は、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、ベンゼン環又はナフタレン環であり、

前記の置換基は、 $-NO_2$ 、 $-SO_3X$ 、及び

[化34]

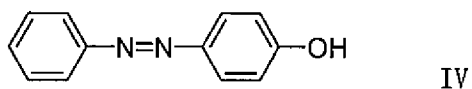


からなる群より選択され、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]。

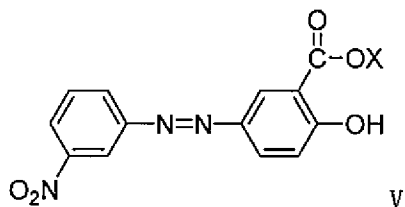
[0062] ある実施形態において、本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤は、以下の式により表される化合物（4-(フェニルアゾ)フェノール、CAS 1689-82-3）、

[化35]



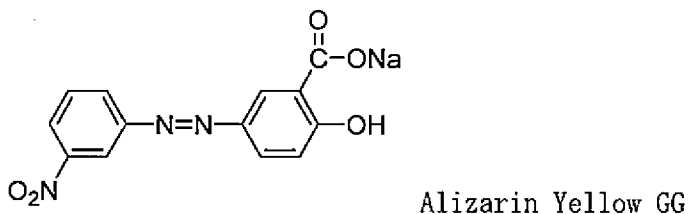
以下の式により表される化合物、

[化36]



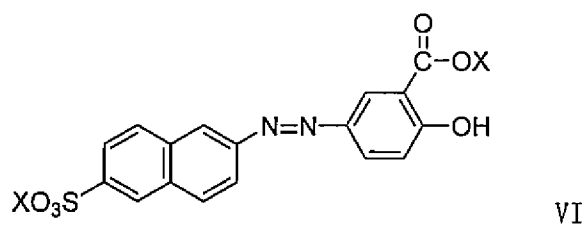
[式中、Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、
例えば以下のAlizarin Yellow GG (CAS584-42-9)、

[化37]



以下の式により表される化合物、

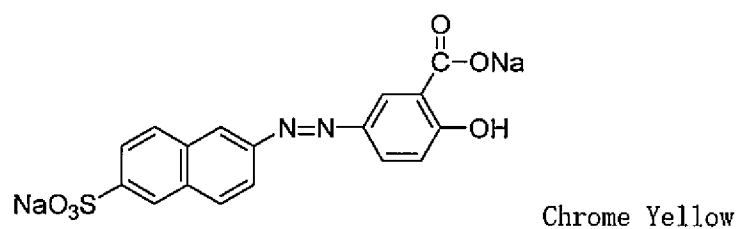
[化38]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からの群より選択される]、

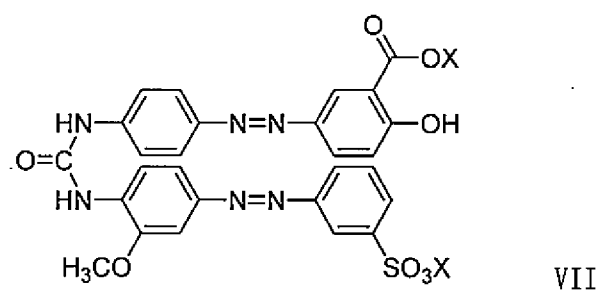
例えば以下のChrome Yellow (CAS6054-97-3) 、

[化39]



以下の式により表される化合物、

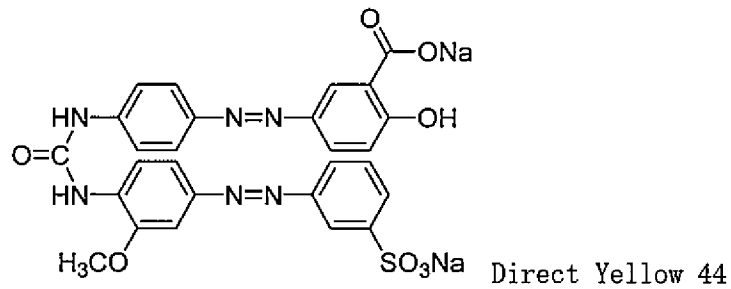
[化40]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からの群より選択される]、

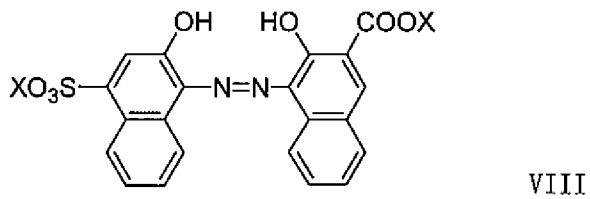
例えば以下のDirect Yellow 44 (CAS8005-52-5) 、

[化41]



以下の式により表される化合物、

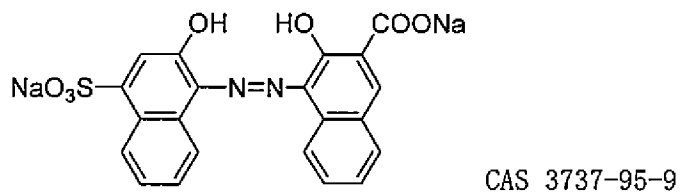
[化42]



[式中、Xは、それぞれ独立に、-H、-Na、-K、-Liからなる群より選択される]、

例えば以下の2-ヒドロキシ-1-(2-ヒドロキシ-4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-3-ナフトエ酸 (CAS 3737-95-9) 、

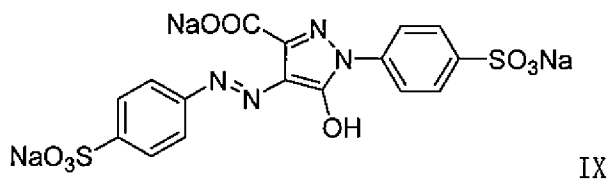
[化43]



からなる群より選択される化合物である。

[0063] 本発明の反応促進剤からは、以下の式により表される化合物(Tartrazine、CAS 1934-21-0)は除かれる：

[化44]



上記の式IV～式VIIIの化合物は市販されているものやそれらの塩を使用しうる。他の式I～IIIの化合物は慣用の手法を用いて合成するか、又は市販されているものを使用しうる。

[0064] 化合物がペルオキシダーゼによる過酸化水素分解反応を促進するか否かは、系に候補化合物を添加した場合の反応の進行と、添加しなかった場合の反応の進行とを比較することにより評価することができる。

[0065] (過酸化水素測定方法の例)

本発明の過酸化水素測定試薬及び測定方法について例示する。ただし本発明はこれ限定されない。

[0066] 過酸化水素及び色素は市販のものを使用しうる。ペルオキシダーゼは、天然の原料から精製してもよく、又は市販品を使用してもよい。

[0067] 以下の過酸化水素測定用試薬を調製する。

濃度既知の過酸化水素試料

0～0.0003% (w/v) 過酸化水素

第1試薬-A (ペルオキシダーゼ、ロイコ色素を含む溶液)

30mM MOPS-NaOH緩衝液 pH6.5

0.2% (w/v) n-ドデシル-β-D-マルトシド (同仁化学研究所製)

0.067U/ml ペルオキシダーゼ PEO-301 (東洋紡)

0.023mM 10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム (DA-67、和光純薬工業製)

[0068] Bio Majesty JCA-BM1650 (日本電子製) を利用して、次に示す手順に沿ってHbA1cを測定する。イオン交換水8μlを、

96 μ l の第1試薬-Aに添加して37℃で5分間インキュベートした後、24 μ l の濃度既知の過酸化水素試料を添加して過酸化水素の定量反応を37℃で5分間進行させる。イオン交換水と第1試薬-Aを混合してから10分間の、波長694 nm及び751 nmの光に対する反応液の吸光度 (A_{694} 及び A_{751}) を経時的に測定し、それらの差である $A_{694/751}$ を求める。横軸に過酸化水素の濃度を、縦軸にイオン交換水と第1試薬を混合してから10分後の $A_{694/751}$ をプロットし、過酸化水素濃度と $A_{694/751}$ の相関性を表す検量線を作成する。

- [0069] 次に、濃度既知の過酸化水素試料の代わりに、濃度未知の過酸化水素試料を用いて、上記と同様の測定を行う。イオン交換水と第1試薬-Aを混合してから10分後の $A_{694/751}$ と、上記で作成した検量線を用いて、試料の過酸化水素濃度を決定する。

実施例

- [0070] 以下の実施例において本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。特に断らない場合、試薬は市販品を用いた。

- [0071] [実施例1] ペルオキシダーゼによる過酸化水素検出反応が完遂した場合における吸光度の測定

本実施例では、過剰量のペルオキシダーゼを用いて、過酸化水素検出反応が完遂した場合の吸光度変化量を決定する。

- [0072] 以下の組成を有する過酸化水素測定用試薬を調製し、Bio Majesty JCA-BM1650（日本電子製）を利用して過酸化水素の測定を実施した。

（試料）

100 mM MOPS-NaOH緩衝液 pH 6.5

0.00012% (w/v) 過酸化水素

（第1試薬-A）

30 mM MOPS-NaOH緩衝液 pH 6.5

0.2% (w/v) n-ドデシル- β -D-マルトシド（同仁化学研究所

製)

0.067 U/ml ペルオキシダーゼ PEO-301 (東洋紡)

0.023 mM 10- (カルボキシメチルアミノカルボニル) -3, 7-
ビス (ジメチルアミノ) フェノチアジンナトリウム (DA-67、和光純薬
工業製)

(第2試薬)

0.48% (w/v) 表1における比較例2の化合物 (和光純薬工業)、
本発明の化合物のいずれか一つ (いずれも東京化成工業)、もしくは化合物
を含有しない (比較例1とする) イオン交換水

[0073] 第2試薬8 μ lを、96 μ lの第1試薬-Aに添加して37°Cで5分間イ
ンキュベートした後、24 μ lの試料を添加して過酸化水素の定量反応を3
7°Cで5分間進行させた。第2試薬と第1試薬-Aを混合してから10分間
の、波長694 nm及び751 nmの光に対する反応液の吸光度 (A_{694} 及び
 A_{751}) を経時的に測定し、 A_{694} から A_{751} を引いた値、すなわち $A_{694/751}$
を求めた。続いて、第2試薬と第1試薬-Aを混合してから4.8分後の $A_{694/751}$
を(104/128)倍した値を、 $A_{694/751}$ から引いて ΔA を算
出した。なお、第2試薬と第1試薬-Aを混合してから4.8分後は、試料
を添加する直前を表す。第2試薬と第1試薬-Aを混合してから9分後、1
0分後の ΔA (ΔA_{9min} 及び ΔA_{10min}) を表1に示す。また、一例として
、比較例1における、 $A_{694/751}$ 、 ΔA_{9min} 及び ΔA_{10min} の関係性を図1
に示す。

[表1]

	ΔA_{9min}	ΔA_{10min}
添加せず (比較例 1)	0.079	0.079
Tartrazine (比較例 2)	0.344	0.344
Alizarin Yellow GG (本発明 1)	0.170	0.170
Chrome Yellow (本発明 2)	0.272	0.272
Direct Yellow 44 (本発明 3)	0.228	0.228
4-(Phenylazo)phenol (本発明 4)	0.122	0.122
2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)- 3-naphthoic Acid(本発明 5)	0.084	0.085

[0074] 表 1 に示した通り、本発明の化合物及び比較例について、 ΔA_{9min} 及び ΔA_{10min} に差は見られない。つまり、希釈試料と第 1 試薬-B を混合してから 10 分後には、過酸化水素の定量反応は完遂していることが分かる。そこで、各比較例、及び本発明における ΔA_{10min} を、それぞれの条件において過酸化水素定量反応が 100%進行した時の ΔA ($\Delta A_{100\%}$)と定義した。

[0075] [実施例 2] 本発明の化合物による、ペルオキシダーゼによる過酸化水素検出反応促進効果の確認

次に本実施例では、少量のペルオキシダーゼを用いて、本発明の化合物による、過酸化水素検出反応の促進の度合いを決定した。

[0076] 以下の組成を有する HbA1c 測定用試薬を調製し、Bio Majesty JCA-BM1650 (日本電子製) を利用して過酸化水素の測定を実施した。

(試料)

100mM MOPS-NaOH 緩衝液 pH6.5

0.00012% (w/v) 過酸化水素

(第1試薬-B)

30 mM MOPS-NaOH緩衝液 pH 6.5

0.2% (w/v) n-ドデシル-β-D-マルトシド (同仁化学研究所製)

0.013 U/ml ペルオキシダーゼ PEO-301 (東洋紡)

0.023 mM 10- (カルボキシメチルアミノカルボニル) -3, 7-ビス (ジメチルアミノ) フェノチアジンナトリウム (DA-67、和光純薬工業製)

(第2試薬)

0.48% (w/v) 表2における比較例2の化合物、本発明の化合物のいずれか、もしくは化合物を含有しない (比較例1とする) イオン交換水

[0077] 第2試薬8 μlを、96 μlの第1試薬-Bに添加して37℃で5分間インキュベートした後、24 μlの試料を添加して過酸化水素の定量反応を37℃で5分間進行させた。第2試薬と第1試薬-Bを混合してから10分間の、波長694 nm及び751 nmの光に対する反応液の吸光度 (A_{694} 及び A_{751}) を経時的に測定し、 A_{694} から A_{751} を引いた値、すなわち $A_{694/751}$ を求めた。続いて、第2試薬と第1試薬-Bを混合してから4.8分後の $A_{694/751}$ を (104/128) 倍した値を、 $A_{694/751}$ から引いて ΔA を算出した。なお、第2試薬と第1試薬-Bを混合してから4.8分後は、試料を添加する直前を表す。

[0078] 次に、本実施例で算出された ΔA を実施例1で定義した $\Delta A_{100\%}$ で割り、過酸化水素検出反応の進行度を算出した。第2試薬と第1試薬-Bを混合してから7.5分後及び10分後 (換言すると、それぞれ試料を添加してから2.5分及び5分後) の過酸化水素検出反応の進行度を表2に示す。

[表2]

	7.5 分後の 反応進行度(%)	10 分後の 反応進行度(%)
添加せず (比較例 1)	55	83
Tartrazine (比較例 2)	57	85
Alizarin Yellow GG (本発明 1)	64	89
Chrome Yellow (本発明 2)	66	92
Direct Yellow 44 (本発明 3)	64	89
4-(Phenylazo)phenol (本発明 4)	69	90
2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)- 3-naphthoic Acid(本発明 5)	61	90

[0079] 表2に示した通り、Tartrazine、Alizarin Yellow GG、Chrome Yellow、Direct Yellow44、4-(フェニルアゾ)フェノール、及び2-ヒドロキシ-1-(2-ヒドロキシ-4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-3-ナフトエ酸は、ペルオキシダーゼを用いた過酸化水素検出反応を促進した。

産業上の利用可能性

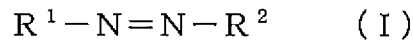
[0080] 本発明のペルオキシダーゼ反応促進剤を用いることにより、過酸化水素測定試薬に処方するペルオキシダーゼの量を低減することができる。また、同量のペルオキシダーゼを用いた場合の測定感度を向上させることができる。

[0081] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] ペルオキシダーゼ、及び、下記の式 (I) で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、過酸化水素の測定方法、

[化1]



[式中、

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、場合により 1 又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の 6 員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む 10 員の縮合環であり、

前記の置換基は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO-NH_2$ 、 $-R^3$ 、 $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ 、 Y 、 Z からなる群より選択され、

X は、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Y は、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

Z は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-SO_3X$ からなる群より選択され、

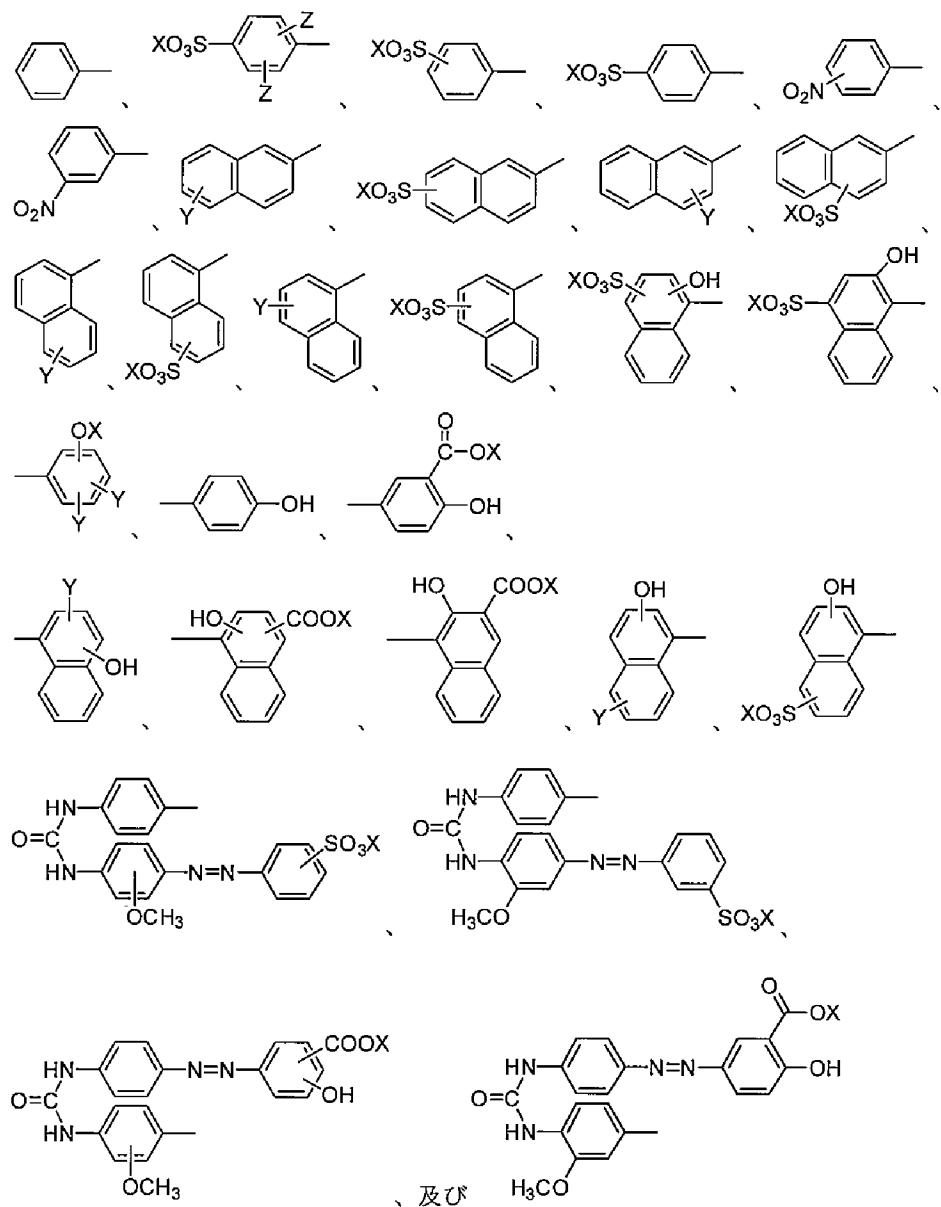
$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、或いは、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ からなる群より選択される 1 又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の 6 員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む 10 員の縮合環であり、

$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_2$

—₆アルキニル、=O、—OH、—O—C₁₋₆アルキル、—O—CH₃、
—CONH₂、—NO₂、—NH₂、—SO₃X、—COOX、Y、
Zからなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されてい
てもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10
員の縮合環である]。

[請求項2] 式 (I) により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤において、R¹
及びR²が、それぞれ独立に、

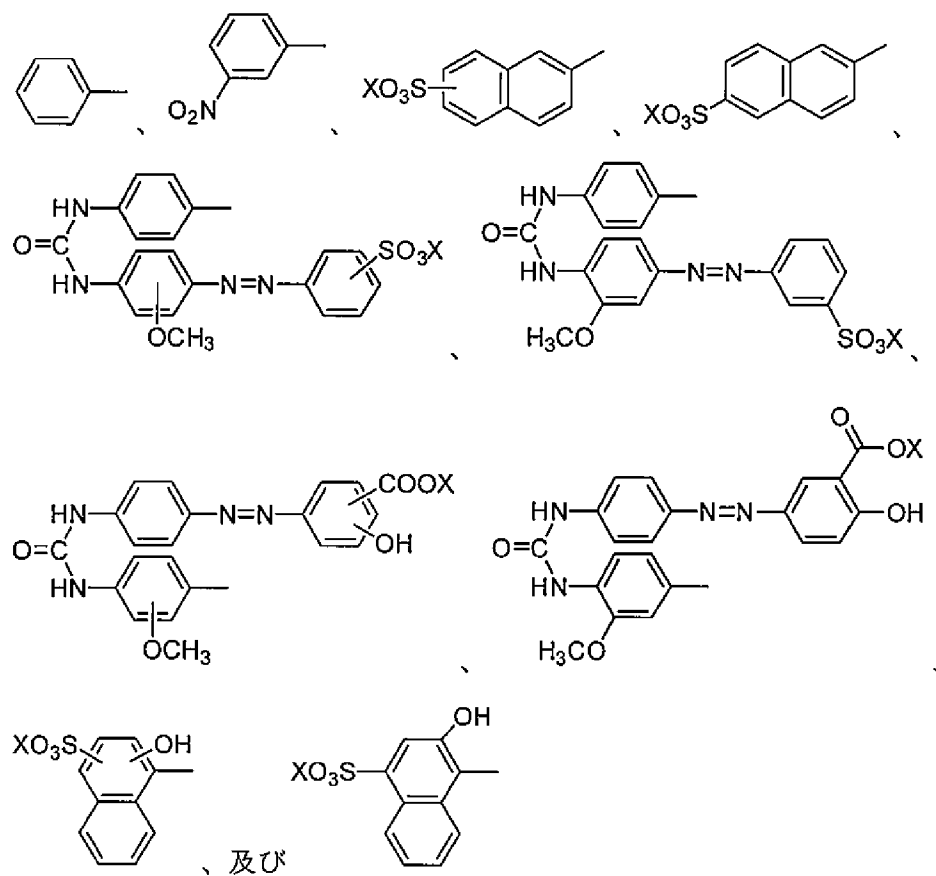
[化2]



からなる群より選択され、式中、X、Y、Zは請求項1に定義したとおりである、請求項1に記載の方法。

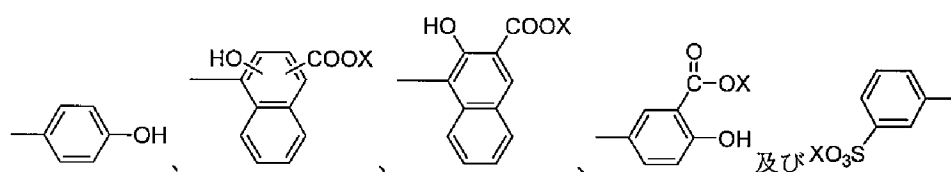
【請求項3】 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤において、R¹が、

[化3]



からなる群より選択され、 R^2 が、

[化4]



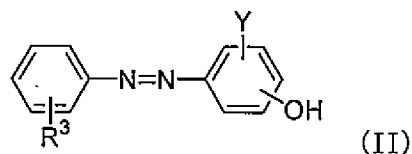
からなる群より選択され、式中、Xは請求項1に定義したとおりである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 式 (I)により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で

表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、請求項 1 に記載の方法

、

[化5]



[式中、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Yは、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、
或いは、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$
アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$
、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$
X、からなる群より選択される 1 又は複数の置換基により置換されて
いてもよい、芳香族の 6 員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む 10
員の縮合環であり、

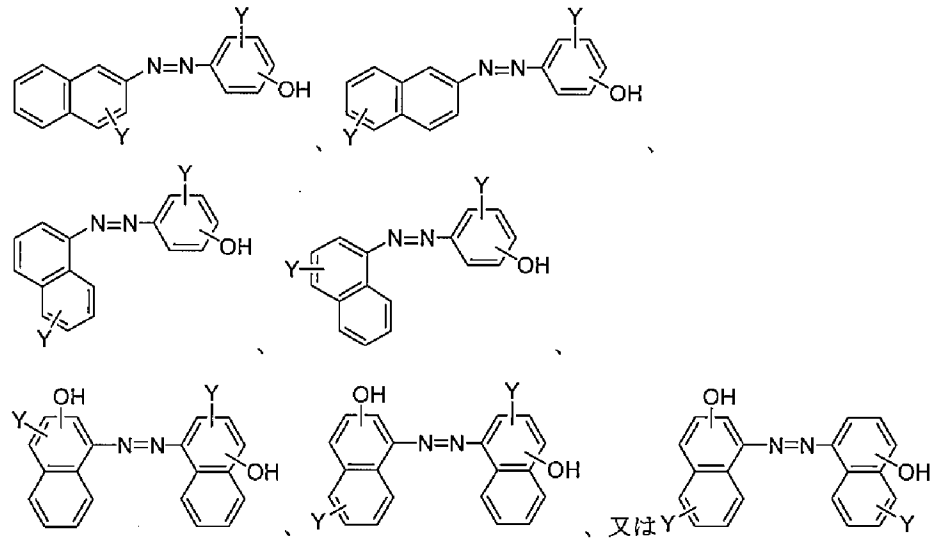
$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-$
 Br 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$
アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$
、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選
択される 1 又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の
6 員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む 10 員の縮合環である]

。

[請求項5]

式 (I) により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記のい
ずれかの式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、請求項 1 に
記載の方法、

[化6]



[式中、

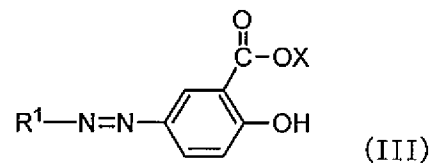
Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Yは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択される]。

[請求項6]

式 (I) により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、請求項 1 に記載の方法、

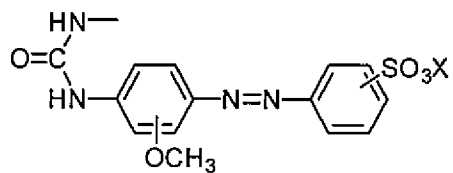
[化7]



[式中、

R^1 は、場合により 1 又は複数の置換基により置換されていてもよい、ベンゼン環又はナフタレン環であり、
前記の置換基は、 $-NO_2$ 、 $-SO_3X$ 、及び

[化8]



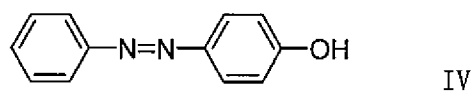
からなる群より選択され、

Xは、-H、-Na、-K、-Li からなる群より選択される]。

[請求項7]

式 (I)により表される化合物が、以下の式により表される化合物 (4-(フェニルアゾ)フェノール、CAS1689-82-3)、

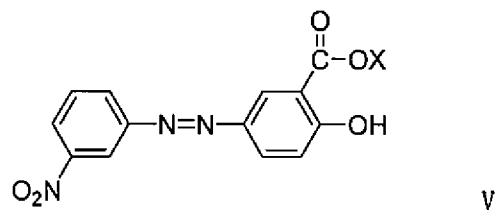
[化9]



IV

以下の式により表される化合物、

[化10]

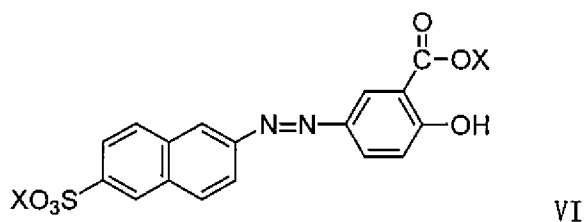


V

[式中、Xは、-H、-Na、-K、-Li からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化11]

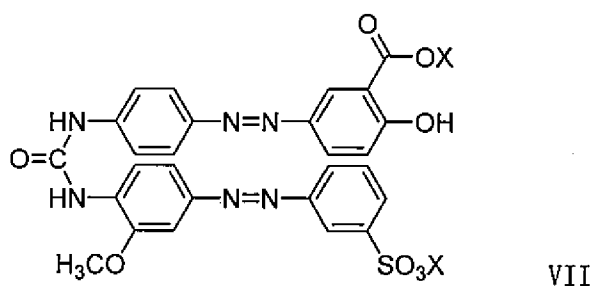


VI

[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

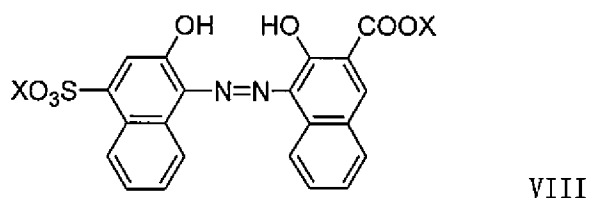
[化12]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化13]

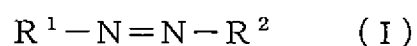


[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

からなる群より選択される化合物である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

[請求項8] 式 (I)により表される化合物を含む、ペルオキシダーゼ反応促進剤、

[化14]



[式中、

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に、場合により1又は複数の置換基に

より置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

前記の置換基は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO-NH_2$ 、 $-R^3$ 、 $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ 、 Y 、 Z からなる群より選択され、

X は、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Y は、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

Z は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-SO_3X$ からなる群より選択され、

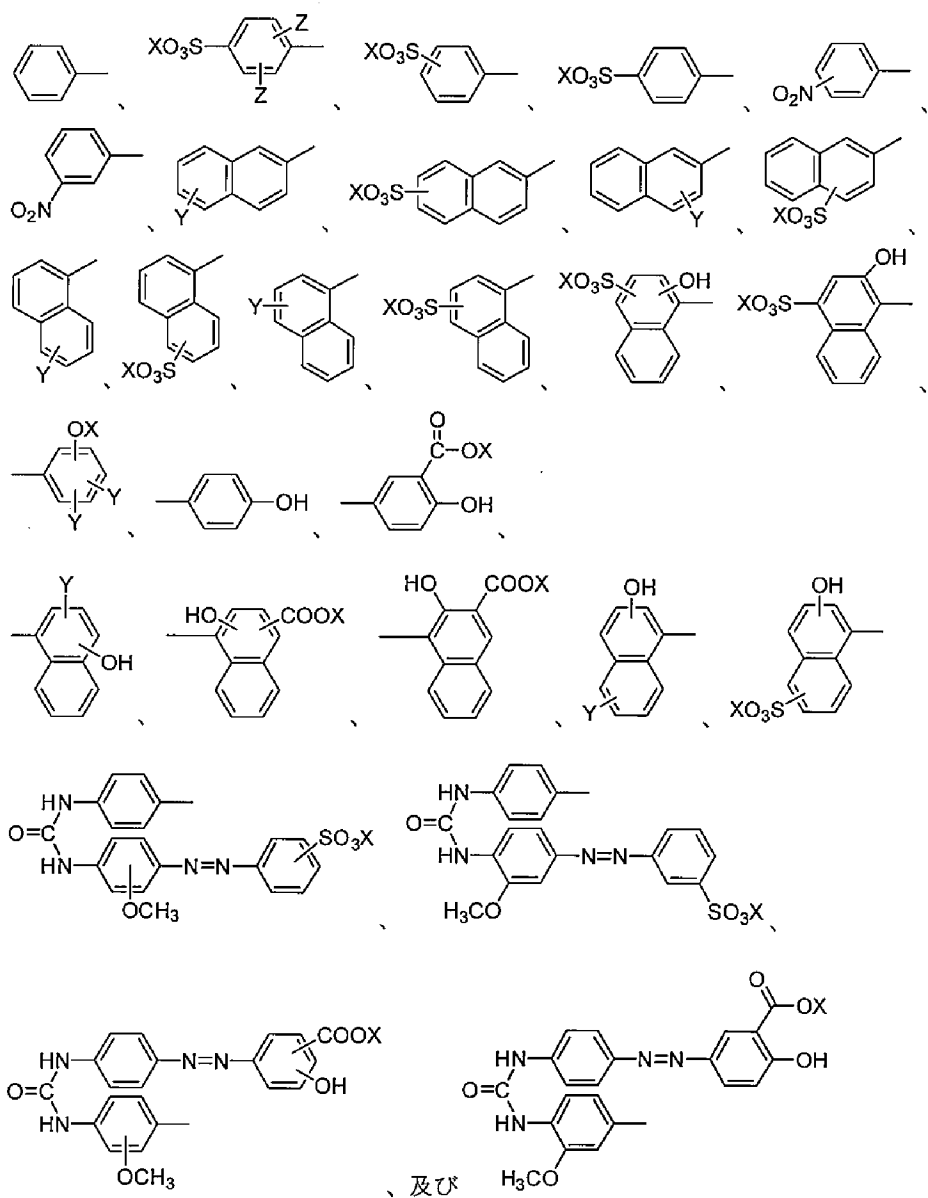
$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、或いは、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環であり、

$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ 、 Y 、 Z からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環である]。

[請求項9]

式 (I) により表される化合物において、 R^1 及び R^2 が、それぞれ独立に、

[化15]

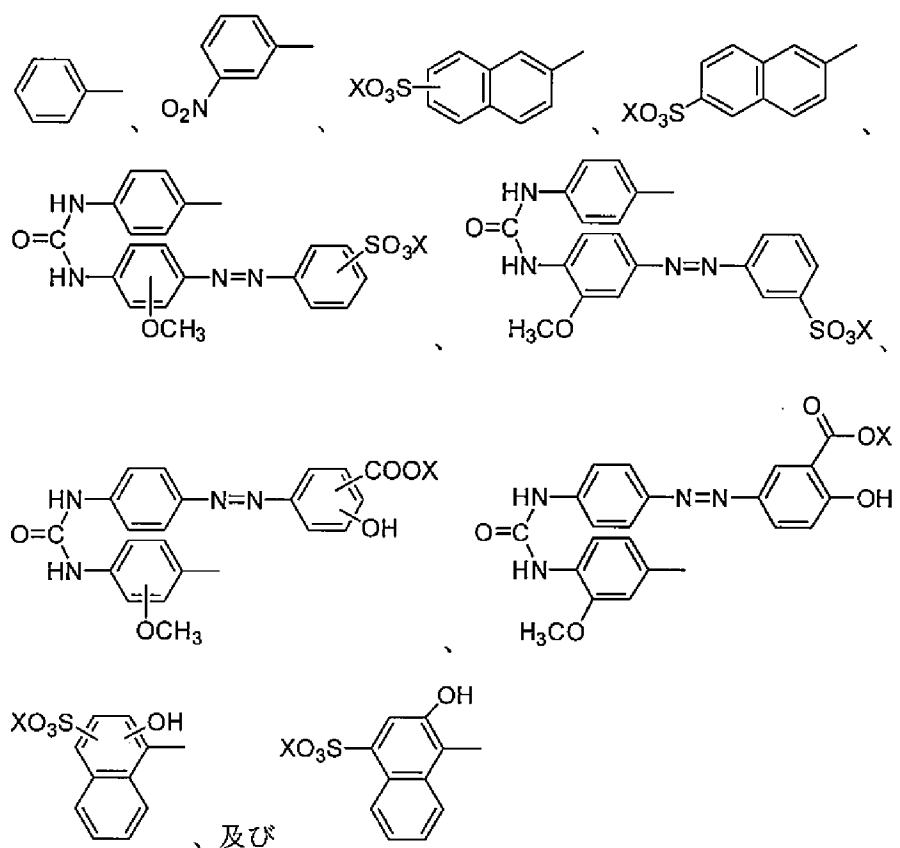


からなる群より選択され、式中、X、Y、Zは請求項8に定義したとおりである、請求項8に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤。

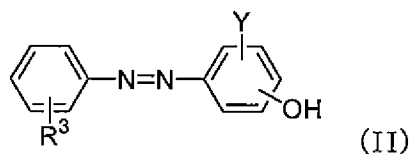
[請求項10]

式 (I) により表される化合物において、 R^1 が、

[化16]



[化18]



[式中、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、Yは、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択され、

$-R^3$ は、 $-H$ 又は $-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$ であるか、
 或いは、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$
 アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$
 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3$
 X 、からなる群より選択される1又は複数の置換基により置換されて
 いてもよい、芳香族の6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む1
 0員の縮合環であり、

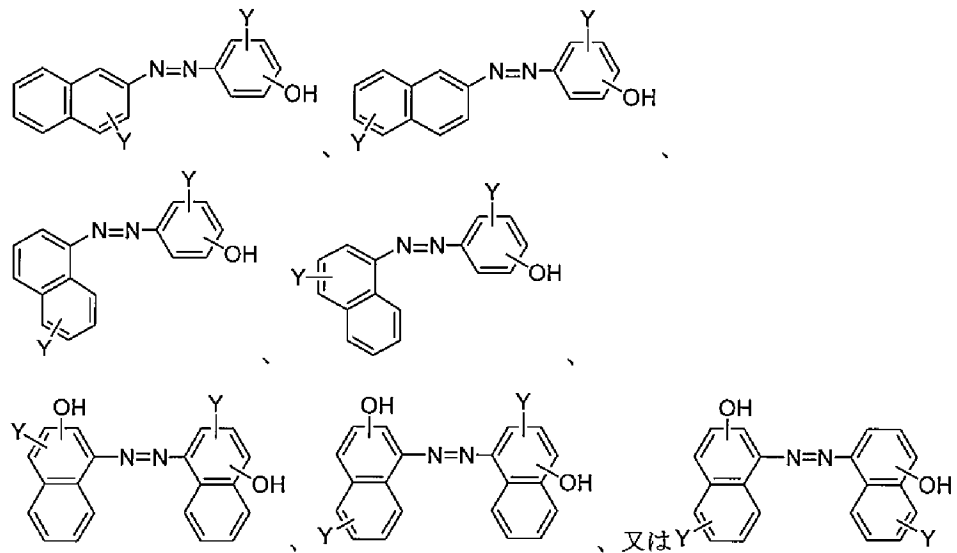
$-R^5$ 及び $-R^6$ は、それぞれ独立に、場合により $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-$
 Br 、 $-I$ 、 $-At$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$
 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $=O$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-CH_3$
 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-SO_3X$ 、からなる群より選
 択される1又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の
 6員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む10員の縮合環である]

。

[請求項12]

式 (I) により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記のいず
 れかの式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、請求項8に
 記載のペルオキシダーゼ反応促進剤、

[化19]



[式中、

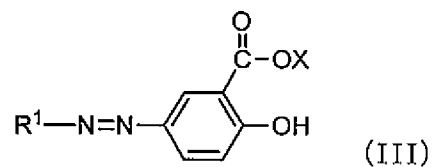
Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択され、

Yは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-SO_3X$ 、 $-COOX$ からなる群より選択される]。

[請求項13]

式 (I) により表されるペルオキシダーゼ反応促進剤が、下記の式で表されるペルオキシダーゼ反応促進剤である、請求項8に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤、

[化20]

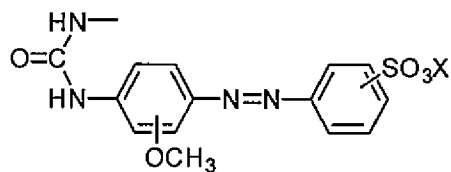


[式中、

R^1 は、場合により1又は複数の置換基により置換されていてもよい、ベンゼン環又はナフタレン環であり、

前記の置換基は、 $-NO_2$ 、 $-SO_3X$ 、及び

[化21]



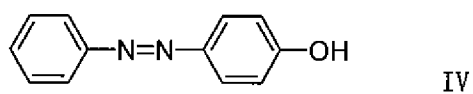
からなる群より選択され、

Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]。

[請求項14]

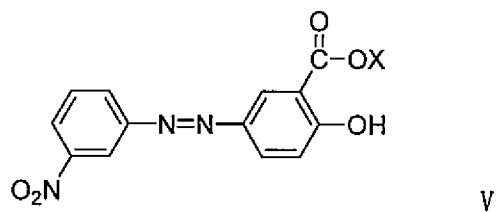
式 (I) により表される化合物が、以下の式により表される化合物（4-(フェニルアゾ)フェノール、CAS1689-82-3）、

[化22]



以下の式により表される化合物、

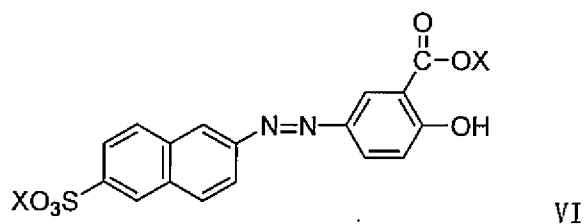
[化23]



[式中、Xは、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からなる群より選択される]、

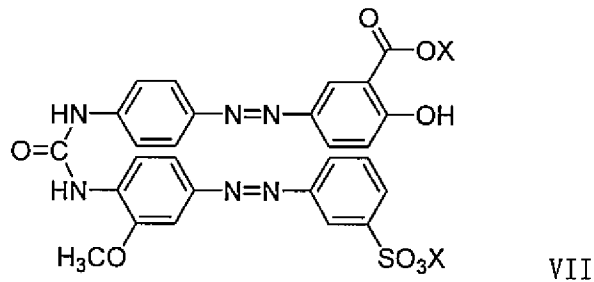
以下の式により表される化合物、

[化24]

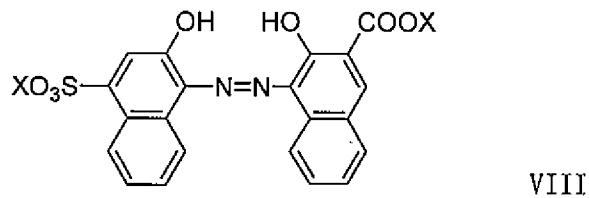


[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からな

る群より選択される]、
 以下の式により表される化合物、
 [化25]



[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からの群より選択される]、
 以下の式により表される化合物
 [化26]

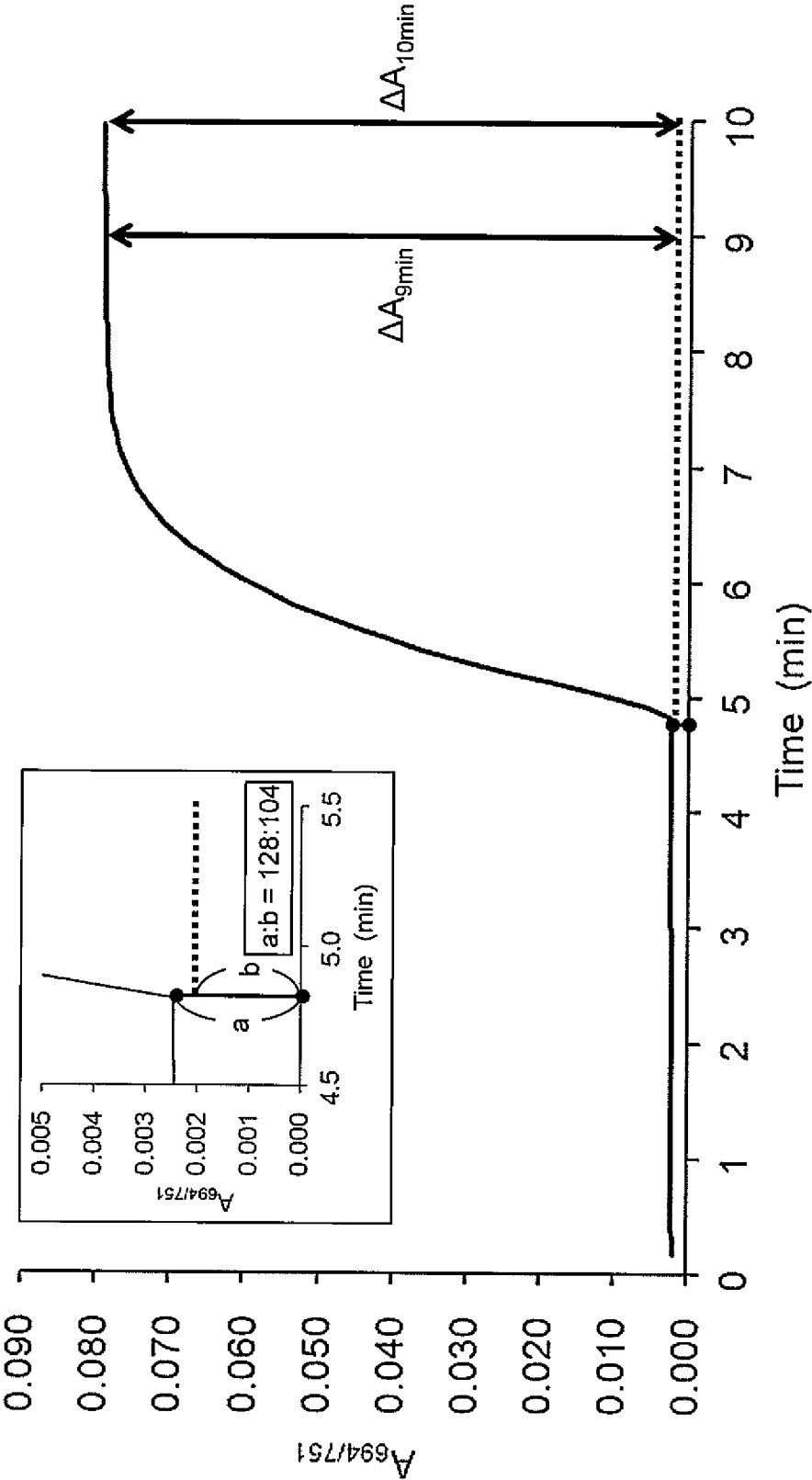


[式中、Xは、それぞれ独立に、 $-H$ 、 $-Na$ 、 $-K$ 、 $-Li$ からの群より選択される]、
 からの群より選択される化合物である、請求項8～13のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤。

[請求項15] ペルオキシダーゼ及び請求項8～14のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ反応促進剤を含む、過酸化水素測定用組成物。

[請求項16] ペルオキシダーゼが西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項15に記載の組成物。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/025621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/28(2006.01)i, C12N9/08(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)

C12Q1/28, C12N9/08

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/REGISTRY(STN),
CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

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 1-109261 A (Miles Inc.), 26 April 1989 (26.04.1989), claims; examples & US 4855228 A claims; examples & EP 306803 A2	1, 2/1-16
Y	JP 2001-9466 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 16 January 2001 (16.01.2001), claims; examples (Family: none)	1-16
Y	SABNIS, Ram W.et al., Indicator reagents, ULLMANN's encyclopedia of industrial chemistry, Vol.19, 2012, p.9-53, DOI:10.1002/14356007.a14_ 127.pub2, p.11-15	1-16

☒ 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
03 October 2017 (03.10.17)

Date of mailing of the international search report
10 October 2017 (10.10.17)

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/JP2017/025621

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 8-503371 A (Novo Nordisk A/S), 16 April 1996 (16.04.1996), claims; examples & US 5965510 A claims; examples & WO 1994/012620 A1 & EP 677102 A1 & DK 144192 D	1-16
A	JP 2001-508677 A (Novo Nordisk A/S), 03 July 2001 (03.07.2001), pages 19 to 22 & US 6100080 A columns 9 to 12 & WO 1998/026807 A1 & EP 946207 A1	1-16
A	JP 10-501276 A (The Procter & Gamble Co.), 03 February 1998 (03.02.1998), claims & US 5445755 A claims & WO 1995/033042 A1 & EP 763095 A1	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/28(2006.01)i, C12N9/08(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. C12Q1/28, C12N9/08

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)
 CAlus/REGISTRY (STN)
 CAlus/MEDLINE/EMBASE/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
X/Y	JP 1-109261 A (マイルス・インコーポレーテッド) 1989.04.26, 特許請求の範囲、実施例 & US 4855228 A, claims, examples & EP 306803 A2	1, 2/1-16
Y	JP 2001-9466 A (三菱瓦斯化学株式会社) 2001.01.16, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-16

☒ 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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日

03.10.2017

国際調査報告の発送日

10.10.2017

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)

松原 寛子

4N

4154

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y	SABNIS, Ram W. et al., Indicator reagents, ULLMANN' s encyclopedia of industrial chemistry, Vol.19, 2012, p.9-53, DOI:10.1002/14356007.a14_127.pub2, p.11-15	1-16
A	JP 8-503371 A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ) 1996.04.16, 特許請求の範囲、実施例 & US 5965510 A, claims, examples & WO 1994/012620 A1 & EP 677102 A1 & DK 144192 D	1-16
A	JP 2001-508677 A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ) 2001.07.03, p.19-22 & US 6100080 A, column 9-12 & WO 1998/026807 A1 & EP 946207 A1	1-16
A	JP 10-501276 A (ザ、プロクター、エンド、ギャンブル、カンパニ ー) 1998.02.03, 特許請求の範囲 & US 5445755 A, claims & WO 1995/033042 A1 & EP 763095 A1	1-16