(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3784869号
(P3784869)
(45)発行日　平成18年6月14日(2006.6.14)　(24)登録日　平成18年3月24日(2006.3.24)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/52	(2006.01)	G01N	33/52	A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z
C12Q 1/44	(2006.01)	C12Q	1/44	
C12Q 1/37	(2006.01)	C12Q	1/37	

請求項の数 17　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願平7-295289
(22)出願日　平成7年11月14日(1995.11.14)
(65)公開番号　特開平8-220090
(43)公開日　平成8年8月30日(1996.8.30)
審査請求日　平成14年10月29日(2002.10.29)
(31)優先権主張番号　08/339797
(32)優先日　平成6年11月15日(1994.11.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　391007079
バイエルコーポレーション
アメリカ合衆国、インデイアナ州、４６５１４、エルクハート、マイルス・アベニュー　１８８４
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)復代理人　100113653
弁理士　束田　幸四郎
(72)発明者　ジェームズ・ノフシンガー
アメリカ合衆国、インデイアナ州、４６５２６、ゴーシェン、ヨークタウン・ドライブ　４０４

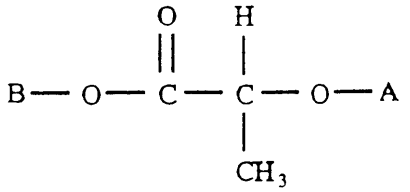
最終頁に続く

(54)【発明の名称】体液中の白血球の濃度を比色法により測定するための改良法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の、白血球、エステラーゼ及びプロテアーゼよりなる群から選択される分析対象物の存在を測定するための組成物であって、ジアゾニウム塩と、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下で加水分解されるエステルと、アルカリ土類金属の塩との混合物を含み、アルカリ土類金属の塩がジアゾニウム塩を安定化する濃度で存在してバックグラウンドのジアゾニウムカップリングを低下し、それにより、酵素の存在下でのジアゾニウムの反応性を促進する組成物ｐＨ８．８～９．０を可能にすることを特徴とする組成物。
【請求項２】
アルカリ土類金属塩が、マグネシウム、カルシウム、又はバリウムの塩である、請求項１記載の組成物。
【請求項３】
アルカリ土類金属塩が、マグネシウムの塩である、請求項２記載の組成物。
【請求項４】
塩が、$MgSO_4$ である、請求項３記載の組成物。
【請求項５】
組成物の最適ｐＨが、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下でジアゾニウムカップリングを促進し、バックグラウンドのジアゾニウムカップリング及び色の変化を最小にする、請求項１記載の組成物。
【請求項６】

エステルが、式（Ｉ）：

【化１】



（Ｉ）

（式中、Ａは、アルコール保護基であり、そしてＢは、式（Ｉ）の乳酸エステルが加水分解されて化合物Ｂ－ＯＨを生成するときに、検出可能な応答、好適には色原体応答を与えることができる部分である）の構造を有する乳酸エステルである、請求項１記載の組成物。

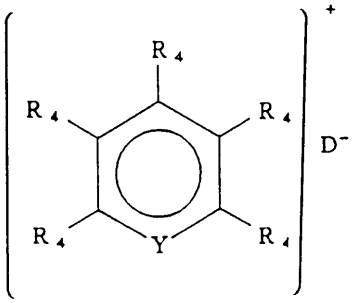
【請求項７】

化合物Ｂ－ＯＨのＢが、ピロール、チオフェン、フラン、アゾレソルシノール、フェノール、ロイコインドフェノール、アゾ染料、５－（４－ヒドロキシ－３，５－ジメトキシフェニルメチレン）－２－チオキソチアゾリン－３－酢酸、２－置換－６－ヒドロキシ－ベンゾチアゾール誘導体、ω－ニトロスチリルエステル、レソルフィン、アクリジノン、メロシアニン、８－ヒドロキシ－２Ｈ－ジベンズ－（ｂ，ｆ）アゼピン－２－オン、ジベンゾアゼピノン、
ジベンゾチアゼピノン、クマリンエステル、及びこれらの混合物よりなる群から選択される、請求項６記載のエステル。

【請求項８】

ジアゾニウム塩が、式（VII）：

【化２】



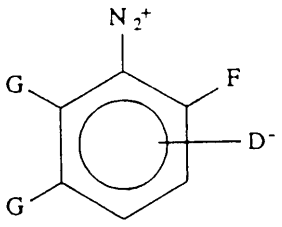
(VII)

〔式中、R_4は、個々に、水素、低級アルキル若しくはアリールであるか、又は、２つの隣り合ったR_4基が、一緒になって縮合環系を形成するが、但し、R_4の１つは、$-N^+\equiv N$であり；Ｙは、Ｎ又はCR_5（ここで、R_5は、水素又は低級アルキルである）であり；そしてD^-は、マイナス１の荷電を有する陰イオンである〕で示される構造を有する、請求項１記載の組成物。

【請求項９】

ジアゾニウム塩が、式（VIII）：

【化３】



(VIII)

〔式中、Ｆは、水素、低級アルキル又はヒドロキシであり；D^-は、マイナス１の荷電を

有する陰イオンであり；Ｇは、個々に、水素、低級アルキル又はアリールであるか、或は、両方のＧ基が、一緒になって縮合環系を形成する〕で示される構造を有する、請求項１記載の組成物。

【請求項１０】

ジアゾニウム塩が、１－ジアゾ－２－ナフトール－４－スルホナート、１－ジアゾフェニル－３－カルボナート、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－１－ナフチルスルホナート、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－ニトロ－１－ナフチルスルホナート、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－１，７－ナフチルジスルホナート、２－メトキシ－４－（Ｎ－モルホリニル）ベンゼンジアゾニウムクロリド、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－ブロモ－１－ナフチルスルホナート、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－シアノ－１－ナフチルスルホナート、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－〔１－オキソプロピル〕－１－ナフチルスルホナート、及びこれらの混合物である、請求項５記載の組成物。

【請求項１１】

組成物が、さらに促進剤を含む、請求項１記載の組成物。

【請求項１２】

促進剤が、８～１５個の炭素原子を有するアルコールである、請求１１記載の組成物。

【請求項１３】

試料中の白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在又は濃度を測定するための試験装置であって、ジアゾニウム塩、及び、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下で加水分解されうるエステル、及びアルカリ土類金属の塩を含む試薬組成物を均一に組み込んだ担体マトリックスを含み、アルカリ土類金属の塩がバックグラウンドのジアゾニウムカップリング及び色変化を低下させることを特徴とする試験装置。

【請求項１４】

組成物が、さらに促進剤を含む、請求項１３記載の試験装置。

【請求項１５】

促進剤が、８～１５個の炭素原子を有するアルコールである、請求項１４記載の試験装置。

【請求項１６】

試料中の、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼよりなる群から選択される分析対象物の存在を測定するための方法であって、試料を、ジアゾニウム塩、及び、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下で加水分解されうるエステル、及びアルカリ土類金属の塩を含む試薬組成物、又は、試薬組成物を組み込んだ試験装置と接触させ、ここでアルカリ土類金属の塩がバックグラウンドのジアゾニウムカップリング及び色変化を低下させるものであり、次いで試薬組成物の検出可能な応答を検査することを特徴とする方法。

【請求項１７】

検出可能な応答が、色原体、蛍光、反射率変化、化学発光、比色、又は分光測光によるものである、請求項１６記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生物学的液体中の白血球の存在を比色法により測定するための方法に関する。更に詳しくは、本発明は、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下で色の変化を受けるように処方された試薬組成物中での、アルカリ土類金属の使用に関する。

【０００２】

【従来の技術】

患者の尿又は他の体液中の異常に高いレベルの白血球の存在は、恐らく腎臓又は尿生殖路の感染症或は他の機能不全のような病的状態の示標である。従って、正確な尿中白血球に関する情報は、このような病気の診断及び治療をする医師にとって非常に重要なものである。

【０００３】

伝統的に、医師は、尿沈渣又は遠心分離していない尿中の白血球を数えるという目視による測定方法であって、遠心分離機及び顕微鏡のような高価な装置と、臨床医の側の過度の時間を必要とする方法に頼ってきた。更に、この伝統的な方法は、損われていない細胞のみを検出するという不利な点を有する。泌尿器系中の白血球は、大量の細胞溶解に都合のよい状態を受けやすい。例えば、ｐＨが異常に高い尿中では、白血球の半減期は６０分間という短さになる。溶解した細胞は、目視による検査法では検出されないため、誤って低い測定値及び偽陽性という結果が出る。

【０００４】

更に最近になって、医師は、完全な細胞自体を数えるよりもむしろ白血球に含有される加水分解酵素を測定することに頼っている。白血球に含有されている加水分解酵素のエステラーゼ及びプロテアーゼの測定により、白血球の存在を比色法により測定する方法は、エステラーゼ又はプロテアーゼにより加水分解されると着色アルコール性物質を生成する色原性エステルを含む組成物を利用する。これらの組成物の多くは、促進化合物及びジアゾニウム塩カップリング剤をも含む。

【０００５】

従って、先行技術には、酵素活性により開裂すると着色した物質又は他の検出可能な物質の形成をもたらす、ある種のエステルの使用を開示している一群の参照文献が存在する。英国特許第1,128,371 号（'371）は、体液中の加水分解酵素の検出に有用な色原体としてインドキシル及びチオインドキシルエステルの使用を開示している。この酵素は、このエステルを開裂して遊離のインドキシルを生成させ、続いてこれが酸化されて、容易に観察可能な青色染料である、二量体生成物のインディゴを形成する。数ある酵素の中で、このような活性は、コリンエステラーゼによるものであると言われている。上記特許'371はまた、エステル基質のインドキシル部分に加えて酸基（acid radical）を選択することも検出すべき酵素に特に言及して教示している。例えば、酸基は、エステラーゼ又はリパーゼの検出のために、各々酢酸エステル、ラウリン酸エステル又はステアリン酸エステルであってよいと記載されている。ホスファターゼ又はスルファターゼのような酵素を検出するためには、アシル基は無機の基であってよい。即ち'371は、エステル分解酵素を測定する際の基質として色原性エステル（このようなエステルは、エステルのアルコール残基としてインドシキル又はチオインドキシルよりなり、アシル残基は測定すべき特定の酵素に対応して調製されている）の使用を教示している。

【０００６】

注意深いアシル基の選択の効果は、アシル基がＮ保護アミノ酸又はペプチドよりなるエステルのエステラーゼ特異性を証明する２つの文献において非常に明白に例示されている。Janoffらの Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 136: 1045-1049(1971)は、アラニンエステルがヒト白血球から得られたエステラーゼに対して特異的な基質であることを教示している。具体的には、Janoffは、ヒト顆粒白血球の抽出物がＮ－アセチル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アラニンメチルエステルを加水分解できることを教示している。更に、Ｌ－アラニン－ｐ－ニトロフェニルエステルが、同様に加水分解されて、黄色のｐ－ニトロフェノール着色型を生成した。

【０００７】

同様に、Sweetmanらの Jour. Hist. Soc., 22:327-339 は、エステラーゼの存在を証明するための、１－ナフチル－Ｎ－アセチル－ＤＬ－アラニン、１－ナフチル－Ｎ－アセチル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アラニル－Ｌ－アラニン及び１－ナフチルブチラートの使用を教示している。

【０００８】

ベーリンガー・マンハイム社（Boehringer Mannheim GmbH）に譲渡された米国特許第4,278,763 号は、これらの知見を組合せて、白血球エステラーゼ活性に対する従来の色原性基質の更に別の例として、アミノ酸又はペプチドのインドキシル又はチオインドキシルエステルに到達している。Janoff及びSweetmanのように、ベーリンガーの特許は、そのエステル分解傾向におけるプロテアーゼとエステラーゼの等価性を教示している。

【０００９】
エステル加水分解反応は、無数のアルコールを含む多くの求核試薬の存在により活性化されうることが知られている。例えば、酢酸フェニルと酢酸ｐ－ニトロフェニルのエステラーゼによる加水分解の速度は、メタノール又はブタノールの添加により２．５～５．５倍に上昇する(GreenzaidとJencks, Biochemistry, 10(7), 1210-1222(1971))。加えて、この作用は、ｎ－アルキル基の長さに伴い増大する(WynneとShalatin, Eur. J. Biochem., 31:554-560(1972))。
【００１０】
特に、このアルコールの活性化作用は、アミノ酸のエステルに関して観察されてきた。ｐ－ニトロフェニル－Ｎ－アセチル－Ｌアラニンの加水分解は、メタノールの存在により活性化（加速）される(FastrezとFersht, Biochemistry, 12(11), 2025-2034(1973))。高分子量アルコールは、ｐ－ニトロフェニル－ｔ－ＢＯＣ－Ｌ－チロシンのエステラーゼ誘導性の加水分解速度を上昇させる(Ashe とZimmerman, Biochem. and Biophys. Res. Comm., 75(1), 194-199(1977))。米国特許第4,299,917 号は、ある種の金属錯体、ピリジン誘導体及びイミダゾールのような公知の他のエステル加水分解活性化剤を記載している。
【００１１】
フェノール及び偽フェノールとカップリングしてアゾ染料を生成する、ある種のジアゾニウム塩の使用も当該分野で公知である(Martinet とDornier, Compt. Rend., 170, 592(1920))。インドキシルエステルがエステラーゼにより加水分解されてインドキシルを生成し、次にこれがジアゾニウム塩とカップリングして対応するアゾ染料を形成するこのような方法は、エステラーゼの分析に使用されている(Holt とHicks, J. Cell Biol. 29, 261-366(1966); Gossrau, Histochemistry, 57, 323-342(1978); 西ドイツ特許公開第30 17 721 号（１９８０年５月９日出願））。
【００１２】
白血球、エステラーゼ、又はプロテアーゼを検出するための組成物中のカップリング剤として使用するための公知のジアゾニウム塩は、ジアゾ陽イオンに対する外来の陰イオンに依存する。更に、これまで検討された処方は、各々、ジアゾニウム塩と反応性の、試料中に存在するフェノール性又は他の化合物の存在により干渉又は不正確さを少なくともある程度まではこうむる。このような干渉が、偽陰性の測定結果をもたらすことになる。
【００１３】
Skjold（米国特許第4,637,979 号）は、色原体エステル、ジアゾニウム塩カップリング剤の使用と、反応促進剤を、使用の簡便なディップ－アンド－リード（dip-and-read）試験組成物及び試験具に組み合わせた。白血球、エステラーゼ、又はプロテアーゼの存在下で、このエステルは加水分解されて、酸とフェノールになる。次にこのフェノールが自由にジアゾニウムとカップリングして色の変化をもたらす。
【００１４】
しかし、Skjoldの組成物と試験具は、酵素が媒介する加水分解及び、それに続くジアゾニウムと放出されたフェノールとのカップリングに最も適した塩基性ｐＨでは、常に正確な結果を提供するとは限らなかった。具体的には、反応混合物の塩基性が上昇するにつれて加水分解とジアゾニウムカップリングが増大する一方で、混合物中の他の成分とのジアゾニウムのバックグラウンド反応性も上昇するため、高いｐＨでは色変化の結果は不正確であった。そして約８．８～９．０のｐＨでは、しばしば酵素の非存在下で色変化が起こった。これらのバックグラウンドの色変化は、水酸化物イオンによるジアゾニウム塩への求核攻撃が増大することによって、反応混合物のｐＨの上昇とともに起こることが示唆されている。酵素媒介加水分解とジアゾカップリングを充分に促進するｐＨで使用され、同時にこのような酵素の非存在下でのジアゾニウムの安定性を促進する、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼ検出用試薬組成物に対するニーズが明かに存在する。更に、製造工程でジアゾニウム塩が安定に保たれる試薬組成物に対するニーズも存在する。
【００１５】
ジアゾニウム化合物は、医学及び工業において種々に応用される。従って、求核攻撃及び

他の型の分解に対してこのような化合物を安定化するための種々の試みがなされてきた。安定化の試みは、有機塩基、界面活性剤、有機ホウ酸塩、抗酸化剤、酸安定化剤、及び塩化亜鉛のような化合物の使用を含んでいた。しかし、これらの試みのどれも白血球検出のために処方された試薬組成物中のジアゾニウム塩を安定化するために企画されたものではなかった。更に、どれもこのような組成物中で有効ではなかった。塩化亜鉛は、エステラーゼ及びプロテアーゼ酵素の反応性を低下させるため、有効ではない。ジアゾニウムの反応性と酵素活性を促進するために酵素検出組成物が塩基性である必要があるため、酸安定化剤は有効でない。界面活性剤、抗酸化剤、及び有機ホウ酸塩は、試験されたが、ジアゾニウムの安定化にはほとんど効果がなかった。

【００１６】

【発明が解決しようとする課題】

先行技術に前述の制限があるため、求核攻撃に対してジアゾニウムを安定化し、同時に酵素の存在下で効率的なジアゾカップリングを促進するために組成物を８．８～９．０の間のｐＨにする方法への明白なニーズがある。

【００１７】

【課題を解決するための手段】

本発明は、白血球細胞中に含有されるエステラーゼ及びプロテアーゼのような加水分解酵素の存在を検出することにより、体液試料中の白血球を測定するための、新規な組成物、試験具、及び方法を提供する。本発明の組成物は、酵素により加水分解されると、ジアゾニウム塩とカップリングして検出可能な色変化を起こし得る物質を生成するエステルを含む。この組成物は、更にアルカリ土類金属の塩を含む。この金属塩がジアゾニウムを安定化し、それによりバックグラウンドの反応性を低下させる。これにより、酵素の存在下でのジアゾニウムの反応性を促進する、より塩基性の組成物ｐＨを可能にする。

【００１８】

本発明は、また、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在を測定するための試験具を提供する。該試験具は、該組成物を含浸した担体マトリックスよりなる。この担体マトリックスは、濾紙、ガラス、フェルト又は木のような適切な物質から作られてよい。

【００１９】

本発明は更に、白血球細胞、体液中のエステラーゼ又はプロテアーゼを測定するための方法を提供する。この方法は、試料を、試薬組成物又は組成物を組み込んだ試験具と接触させて、次に色変化のような検出可能な応答を観察し測定することよりなる。

【００２０】

【発明の実施の形態】

本発明は、試料中の白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在を測定するための組成物を提供する。更に具体的には、本発明は、バックグラウンドの反応を低下させながら分析対象物の充分な検出を可能にする組成物を提供する。この組成物は、エステル、ジアゾニウム塩、及びアルカリ土類金属塩を含む。これらの成分は自由に選択できるが、最良の結果、即ち、短時間に高度の検出可能な応答の発現を得る、各々に好適な実施態様がある。この最適化は、該組成物に促進物質を含有することにより、更に促進することができる。「検出可能な応答」という表現は、本明細書では、直接の観察又は装置により認識可能であって、そして水性試料中の特異的な分析対象物の存在の関数である、試験手段系内の変化又はパラメータの発生を意味する。好適な検出可能な応答は、色、蛍光、反射率、化学発光及び赤外スペクトルの変化又は出現である。

【００２１】

この組成物は、芳香族又は擬似芳香族フェノールと酸とのエステルを含有する。更に、このエステルは、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下で触媒反応により加水分解されて、フェノール又は偽フェノールを生成し、次に、これらがジアゾ双性イオンと自由にカップリングすることができるようなものである。

【００２２】

本発明の使用に適した幾つかのエステルは、インドキシルアセタート、インドキシルブチ

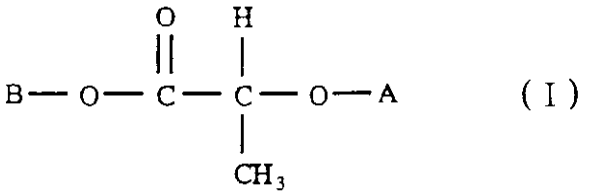
ラート、インドキシルラウリアート、インドキシルステアラート、並びにＮ－保護アミノ酸又はペプチドのインドキシルエステル及びこれらに対応するチオインドキシルエステルを含む。ｐ－ニトロフェノール－Ｎ－トシル－Ｌ－アラニン及びα－ナフチルアラニンも含まれる。好適なエステルは、乳酸エステルである。この乳酸エステルは、白血球エステラーゼにより加水分解されてヒドロキシピロール化合物を生成し、次にこれがジアゾニウム塩と相互作用して、アゾ染料を形成する。本発明の乳酸エステルは、エステラーゼにより容易に加水分解されて、約６０～約１２０秒以内に測定可能な色の遷移又は他の検出可能な応答を発生する。

【００２３】

エステラーゼを検出することができ、従って白血球細胞を検出することのできる、本発明の好適な組成物は、一般構造式（Ｉ）：

【００２４】

【化４】



（Ｉ）

【００２５】

〔式中、Ａは、アルコール保護基であり；そしてＢは、この構造式（Ｉ）の乳酸エステルが加水分解されて化合物Ｂ－ＯＨを生成する時に、検出可能な応答、好適には色原体応答を与えることのできる部分である〕を有する乳酸エステルよりなる。この乳酸エステルは、Ｄ体、Ｌ体、又は、Ｄ体とＬ体のラセミ混合物であってよい。Ｌ体が好ましい。

【００２６】

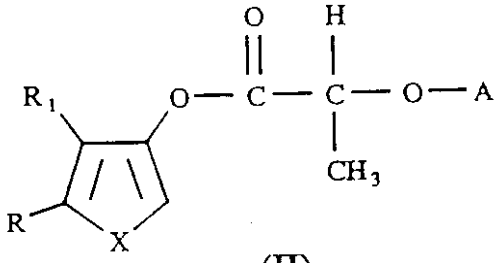
構造式（Ｉ）の化合物のＢ－Ｏ－部は、化合物Ｂ－ＯＨの残基として定義される。従ってＢ－Ｏ－部のＢは、例えば、置換又は非置換のピロール、チオフェン又はフランであってよい。残基Ｂ－Ｏ－を有する他の化合物の例は、アゾレソルシノールエステル、フェノキシエステル（酸化性カップラーとの）、ロイコインドフェノールエステル、アゾ染料エステル、５－（４－ヒドロキシ－３，５－ジメトキシフェニルメチレン）－２－チオキソチアゾリン－３－酢酸、WO 90/00618 及びEP 399 490（両者とも本明細書に参照により組み込んだ）に開示されている２－置換－６－ヒドロキシ－ベンゾチアゾール誘導体、ω－ニトロスチリルエステル、レソルフィンエステル、アクリジノン、メロシアニン、８－ヒドロキシ－２Ｈ－ジベンズ－（ｂ，ｆ）アゼピン－２－オン、ジベンゾアゼピノン、ジベンゾチアゼピノン、クマリンエステル、又は本明細書に参照により組み込まれたEP 254 051に開示された化学発光性化合物が含まれるが、これらに限定されない。

【００２７】

好適な乳酸エステルは、一般構造式（II）：

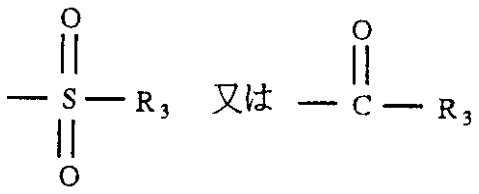
【００２８】

【化５】



(II)

【００２９】
（式中、Ａは、アルコール保護基であり；Ｘは、Ｏ、Ｓ又はＮＲ$_2$ であり；Ｒは、アリール又は低級アルキルであり；Ｒ$_1$ は、水素又は低級アルキルであり；そしてＲ$_2$ は、水素、低級アルキル又はアリールである）を有する。この一般構造式（II）の乳酸エステルは、酵素白血球エステラーゼにより加水分解されて、ヒドロキシピロールのようなヒドロキシ化合物を生成する。
【００３０】
乳酸エステル（II）は、約０．５～約２mM（ミリモル）、好適には約０．８～約１．５mMの濃度で試薬組成物中に存在する。この濃度範囲の中で、痕跡量の白血球細胞を検出するのに充分な色遷移又は他の検出可能な応答を与えるのに充分な量の乳酸エステルが試薬組成物中に存在する。
【００３１】
本明細書中で使用される「低級アルキル」という用語は、１～約６個の炭素原子を含有するアルキル残基をいう。低級アルキル基の例は、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、sec －ブチル、tert－ブチル及びペンチルとヘキシルの全ての異性体を含むが、これらに限定されない。この低級アルキル基は、非置換であってもよく、或はこの低級アルキル基は、置換基が白血球細胞、エステラーゼ又はプロテアーゼを検出する組成物又は試験具の能力を妨害しないのであれば置換されていてもよい。アルキル基の置換基の例は、１～６個の炭素原子を有するアルコキシ、ハロ、ニトロ、アリール、及びアミノがあるが、これらに限定されない。
【００３２】
アルコール保護基自体、即ち一般構造式（Ｉ）の乳酸エステルのＡは、特に限定されず、そしてアルコール残基を保護するために典型的に使用される、本質的にはどのような保護基からでも選択することができる。
【００３３】
このアルコール保護基Ａは、典型的にはスルホン酸塩化物又はカルボン酸塩化物（即ち、アシルクロリド）の残基であり、構造式（III ）又は（IV）：
【００３４】
【化６】



(III)　　(IV)

【００３５】
（式中、Ｒ$_3$ は、３～約２２個の炭素原子、好適には３～約６個の炭素原子を有するアル

キル基であるか、又はR_3は、アリール基である）を有する。R_3がアルキル基である時、このアルキル基は官能基化されたもの（例えば、メトキシ－スクシニル）であってもよい。

【００３６】

本明細書で使用される、Ｒ、R_2及びR_3に関する「アリール」という用語は、どのような芳香族環系をも意味する。「アリール」という用語の例は、ピロリル、フェニル及びピリジルのような５員及び６員芳香族環系、並びにナフチルのような縮合芳香族環系を含むが、これらに限定されない。この芳香族環系は、複素環又は炭素環であってよく、白血球細胞、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在下で色原体乳酸エステルが加水分解する能力を、置換基が妨害しないのであれば、置換していても或は非置換であってもよい。置換基の例は、アルキル、ハロ、アシル、アリール、ヒドロキシ、アルコキシ、スルフリル及びアミノがあるが、これらに限定されない。このアリール基は、好適には、非置換のフェニル基であるか、或は、ハロ基又は１～約１０個の炭素原子を有する、アルキル若しくはアルコキシ基のような比較的非反応性の基で置換されているフェニル基である。

【００３７】

アルコール保護基の例は、塩化ｐ－トルエンスルホニル（塩化トシル又はＴｓＣｌ）、塩化ｎ－プロピルスルホニル（ｎ－ＰｒＳＯ$_2$ Ｃｌ）、塩化ベンゾイル（ＰｈＣＯＣｌ）、塩化カルボメトキシエタンスルホニル及び塩化チオフェンスルホニルの残基があるが、これらに限定されない。多くの他の特異的アルコール保護基が、当該分野の当業者には公知であり、本発明の乳酸エステルのＡ成分として使用することができる。例えば、多くのアルコール保護基は、本明細書に参照により組み込まれるT.W. Greene らの Protecting Groups in Organic Chemistry, 2d Ed., (1991) に開示されている。

【００３８】

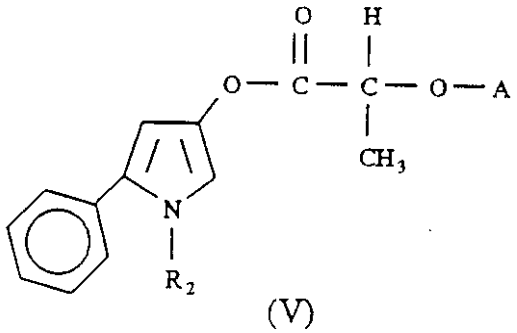
好適なアルコール保護基Ａは、構造式（III ）を有し、スルホニル残基を含む。本発明を充分有効に利用するために、この構造式（III ）のアルコール保護基は、R_3としてフェニル基を有し、このフェニル基はメチル又はメトキシ残基で置換されている。

【００３９】

本発明の好適な乳酸エステルは、Ｘが、NR_2であり；Ｒが、フェニルであり；そしてR_1が、水素である、構造式（Ｉ）の乳酸エステルのＬ体である、構造式（Ｖ）：

【００４０】

【化７】



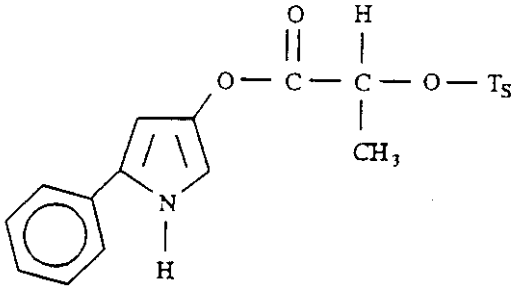
(V)

【００４１】

を有する色原体化合物である。Ａ及びR_2は、前記と同義である。更に好適な実施態様において、この色原体乳酸エステルは、上記（Ｖ）式中、R_2が、水素であり、そしてＡが、ｐ－トルエンスルホニル（即ち、Ｔｓ）である、構造式（VI）：

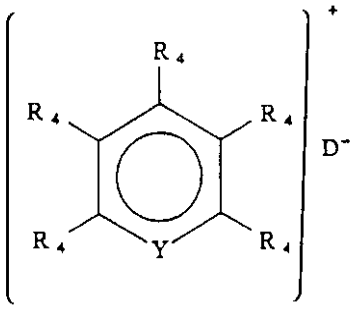
【００４２】

【化８】



(VI)

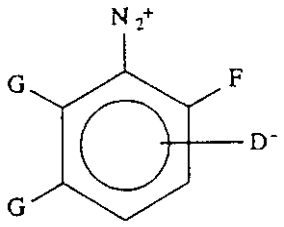
【００４３】
の化合物、即ち、Ｘが、ＮＨであり；Ａが、Ｔｓであり；Ｒが、フェニルであり；そしてR^1が、Ｈである、構造式（II）の乳酸エステルのＬ体である。
【００４４】
好適な乳酸エステルの合成方法は、米国特許出願第293,723 号（１９９４年８月２２日出願、インディアナ州のマイルズ社（Miles Inc ）に譲渡された）に詳細に記載されている。
【００４５】
本発明の組成物は、エステルに加えて、種々の促進物質を含むことができる。「促進物質」という表現は、本明細書に記載された色原体エステルの加水分解の速度を増大させる任意の化合物をいう。ピリジン、イミダゾール及びこれらの誘導体；ある種の金属錯体；及びアルコールのような化学的に多様な物質が含まれる。適切なアルコールは、１～約１５個の炭素原子を有する。分岐鎖アルコールよりも直鎖状アルコールが好適であるが、分岐鎖も本発明の範囲に含まれる。８～１５個の炭素原子を有するアルコールは、エステラーゼ及びプロテアーゼで触媒される本明細書で検討されるエステルの加水分解を増大させるのに特に有用である。デカノール、ウンデカノール及びドデカノールが、低分子量のアルコールに比べて揮発性が低いため、本発明での使用に特別に好適である。
【００４６】
本組成物は、また、カップリング剤としてジアゾニウム塩を含む。このジアゾニウム塩カップリング剤は、一般構造式：$ArN^+ \equiv N$（式中、Ａｒはアリール基である）を有する。更に詳しくは、このジアゾニウム塩は、典型的には一般構造式（VII ）：
【００４７】
【化９】



(VII)

【００４８】
〔式中、R_4 は、個々に、水素、低級アルキル若しくはアリールであるか、又は、２つの隣り合ったR_4 基が、一緒になって縮合環系を形成するが但し、R_4 の１つは、$-N^+ \equiv N$である；Ｙは、Ｎ又はCR_5 （ここで、R_5 は、水素又は低級アルキルである）であり；そしてD^- は、塩化物イオン、臭化物イオン、又は、ジアゾニウム残基の対イオンとして好適な他の陰イオンである〕を有する芳香族ジアゾニウム塩である。別の好適なジアゾニウム塩は、式（VIII）：

【００４９】
【化１０】



(Ⅷ)

【００５０】
〔式中、Ｆは、水素、低級アルキル又はヒドロキシであり；Ｄは、共有結合した陰イオンであり；Ｇは、個々に、水素、低級アルキル又はアリールであるか、或は、両方のＧ基は、一緒に縮合環系を形成する〕で示される構造を有する。
【００５１】
本明細書で使用される「縮合環系」という用語は、１対の炭素原子を共有する２つ以上の芳香族環を意味する。
【００５２】
双性イオンのジアゾニウム塩は、好適なカップリング剤である。この双性イオンのジアゾニウム化合物は、ジアゾニウム残基の対イオン（即ち、陰イオン）が、環系に共有結合しているジアゾニウム塩の一種である。このような陰イオンの例は、スルホナート（SO_3）、カルボナート（CO_2）及びホスホナート（PO_3）のイオンがあるが、これらに限定されない。
【００５３】
種々のジアゾニウム塩が、本明細書に参照により組み込まれるSkjoldらの米国特許第4,637,979 号；Hughらの米国特許第4,806,423 号；及びHuglらの4,814,271 号に開示されている。本発明の組成物及び方法に有用なジアゾニウム塩の具体的な例は、１－ジアゾ－２－ナフトール－４－スルホナート及び１－ジアゾフェニル－３－カルボナートであるが、これらに限定されない。ジアゾニウム塩の他の例は、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－１－ナフチルスルホナート（ＤＮＳＡ）、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－ニトロ－１－ナフチルスルホナート（ＮＤＮＳＡ）、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－１，７－ナフチルジスルホナート、塩２－メトキシ－４－（Ｎ－モルホリニル）ベンゼンジアゾニウムクロリド、４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－ブロモ－１－ナフチルスルホナート及び４－ジアゾ－３－ヒドロキシ－７－〔１－オキソプロピル〕－１－ナフチルスルホナートがあるが、これらに限定されない。
【００５４】
本組成物のエステルが、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼにより加水分解されるとヒドロキシピロールが遊離し、ジアゾニウム塩と相互作用して鮮やかなアゾ染料及び色変化を形成することができる。
【００５５】
本発明の組成物は、また、アルカリ土類金属の塩を含有する。好適なアルカリ土類金属は、マグネシウム、カルシウム、及びバリウムなどである。好適な塩は硫酸マグネシウムであるが、全てのアルカリ土類金属は同様に作用することが期待される。このアルカリ土類金属は、試薬組成物の製造及び保存中の求核試薬の攻撃に対してジアゾニウムを安定化し、また体液の試験中にジアゾニウムのバックグラウンド反応性を低下させる。この金属塩は、両方の場合のバックグラウンドの色変化を低下させる。バックグラウンドの色変化とは、酵素の非存在下で起こるものである。このような色変化は、反応混合物の成分によるジアゾニウム塩への求核攻撃、及び製造工程での他の外因により引き起こされるものと推測されている。

【００５６】
第１表は、$MgSO_4$が、バックグラウンドの色変化に対して試薬組成物を安定化したことをより詳しく証明している。
【００５７】
第１表の第４欄のデータは、前述の通り処方された１番目の浸漬溶液に$MgSO_4$を添加した時、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの非存在下での色変化（バックグラウンド）が少なかったことを示している。$MgSO_4$は、反応混合物中の過剰のOH^-と金属水酸化物を形成し易い。これらの金属水酸化物は、水酸化ナトリウムより求核性が低く、従ってジアゾニウムに対して反応性が低い。
【００５８】
【表１】

第１表
白血球の非存在下及び保存条件下のジアゾニウムの安定化

処　方	保存条件 時間	温度	陰性試験溶液 浸漬後の反応性	陽性試験溶液 浸漬後の反応性
対照	開始時	２３°	９５４	６８６
$MgSO_4$	〃	２３°	９７３	６１０
対照	１週間	２３°	９６０	７１３
$MgSO_4$	〃	２３°	９７５	６５０
対照	〃	６０°	８７５	７４４
$MgSO_4$	〃	６０°	９１４	７２９
$MgCl_2$	開始時	２３°	９６８	６７５

【００５９】
第１表の４欄の数値は、CLINITEK（登録商標）-200尿化学分析機（Urine Chemistry Analyzer）（製造元：マイルズ社（Miles Inc.）、インディアナ州）により測定された組成物のパーセント反射率を表す。この組成物でコートした試薬ストリップのパーセント反射率は、波長５７０ナノメートルで測定し、６９０ナノメートルの標準で測定した反射率で割り、１０００倍して求めた。パーセント反射率は、色変化と逆比例しているため、パーセント反射率の数値が小さいほど色変化が大きく、従って酵素の非存在下での偽陽性が大きい。
【００６０】
第１表の第５欄のデータは、金属塩が保存中の試薬組成物を安定化したことを証明している。白血球、エステラーゼ及びプロテアーゼの検出は、保存中にジアゾニウム塩の分解が少ないほど増強される。具体的には、第５欄の数値は、４２白血球細胞/ml の試験溶液の存在下での組成物の反応性を示している。表に見られるように、保存１週間後には、$MgSO_4$が試薬混合物中に存在した時、白血球の存在下での色変化が大きかった。ここで、パーセント反射率を測定したため、数値が小さいほど白血球の存在下での色変化が大きいことを再び言及したい。
【００６１】
第２表は、６０℃で４週間の保存模擬実験後の$MgSO_4$によるジアゾニウムの安定化の効果を示す。

【００６２】
【表２】

第２表
４週間保存後のジアゾニウムの安定性データ

	陽性試験溶液に浸漬後の反応性
対照 (pH８．８)	６７３
$MgSO_4$ (pH８．８)	５９６
$MgSO_4$ (pH８．９５)	５５７

CLINITEK（登録商標）－２００値は、（５７０mmでの％反射率／６９０mmでの％反射率）×１０００である。

試験溶液中に４２白血球細胞／mlが存在する。

【００６３】
４２細胞/ml の試験溶液の存在下で、$MgSO_4$ を含有する試薬組成物は、対照溶液に比べて大きな色変化を示した。この色変化は、酵素加水分解とジアゾニウムカップリングに最適なｐＨであるｐＨ８．９５で最も著しかった。
【００６４】
保存の間ジアゾニウムを安定化することに加えて、アルカリ土類金属イオンはまた乾燥機（drying oven ）中で生成した湿気を吸収し易い。湿気は、水分子とジアゾニウム塩との反応によるバックグラウンドの色変化を引き起こし易い。第３表は、試薬組成物中に$MgSO_4$ が存在する時にこの組成物が高湿度に曝された時、バックグラウンドの色変化が少なかったことを証明している。
【００６５】
【表３】

第３表
２番目の混合物に添加される硫酸マグネシウム

処　方	湿度条件		CLINITEK-200
	相対湿度 %ＲＨ	温度（力氏）	白血球の非存在下での反応性
対照	２７%	７２ °F	９５６
〃	４５%	７２ °F	９０６
〃	５５%	７２ °F	８６０
４mM $MgSO_4$	３０%	７２ °F	９５７
４mM $MgSO_4$	５５%	７１ °F	９６０

【００６６】
従って、本発明の試薬組成物へのアルカリ土類金属塩の添加は、２つの基本的な点で白血球検出を増強したようである。第１は、体液の試験中、この金属塩は、試薬組成物中の異質の成分による求核攻撃に対してジアゾニウムを保護したと考えられる。従って、白血球の非存在下での色変化（バックグラウンド）が低下する。第２は、この金属塩は、製造の乾燥工程において湿気を吸収し、組成物と試験具の保存期間を延ばしたと考えられる。ジアゾニウムの分解が少ないため、この試験組成物は白血球に対してより感受性である。
【００６７】
本発明の組成物は、緩衝剤を含んでもよい。この緩衝剤は、水性の試料と接触すると、反応に適したｐＨを与える化合物である。好適には、この緩衝剤は、約８．８～９．０の範囲のｐＨを生成することができる。前述のように、後者のｐＨ範囲は、エステラーゼとプロテアーゼによる加水分解、及びジアゾニウムカップリングを促進するため、白血球、エステラーゼ、又はプロテアーゼの存在下で最も劇的な色変化を可能にする。この金属塩は、白血球、エステラーゼ、又はプロテアーゼの非存在下での色変化である、バックグラウンドの色変化を防御する。
【００６８】
本発明の試薬組成物中に、約２００～約６００mMの濃度で緩衝剤を含むことができるが、特定の状況では、この緩衝剤の濃度は、この範囲より上又は下であってもよい。
【００６９】
従って、本発明の試薬組成物は、炭酸；ＢＩＣＩＮＥ；ＣＨＥＳ；ホウ酸塩；リン酸塩；２，２－ビス（ヒドロキシメチル）－２，２’，２”－ニトリロトリエタノール；３，３－ジメチルグルタル酸；３－Ｎ－モルホリノプロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）；１，３－ビス〔トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕プロパン（Ｂｉｓ－ＴＲＩＳ）；トリ（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ＴＲＩＳ）；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン－マレイン酸（ＴＲＩＳ－マレイン酸）；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン－マロン酸（ＴＲＩＳ－マロン酸）；３－Ｎ－（トリスヒドロキシメチル）メチルアミノ－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＴＡＰＳＯ）；２－（〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕アミノ）エタンスルホン酸（ＴＥＳ）；Ｎ－２－ヒドロキシエチルピペラジン－Ｎ’－２－エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）；及び当該分野で公知の他の緩衝剤、又はこれらの組合せのような緩衝剤により適切なｐＨに緩衝化される。好適な緩衝剤は、ホウ酸－ＮａＯＨである。

【００７０】
上述の組成物は、白血球、エステラーゼ又はプロテアーゼの存在を測定するために使用することができる。或はこの組成物は、試験具を形成するために担体マトリックス中に組み込まれ、これにより分析対象物の存在の迅速で信頼性のある推定を可能にする。この担体マトリックスは、通常は濾紙のような多孔性物質であるが、必ずしもそうでなくともよい。他のよく知られた担体マトリックス材は、フェルト、多孔性セラミックストリップ、及び織られた若しくはからみあわせた（matted）ガラス繊維（米国特許第3,846,247 号）である。木、布、スポンジ材及び陶土質物質の使用も考えられる（米国特許第3,552,928 号）。或は、この担体マトリックスは、種々のポリマーフィルム、ガラスなどのように非多孔性であってもよい。このような担体マトリックス物質は全て、他のもの同様に本発明の使用に適している。濾紙が特に適切であることが見い出された。

【００７１】
この器具を製造する好適な方法では、濾紙の一片を緩衝剤と水性アルカリ土類金属塩の水溶液で湿らせた。この１番目の浸液は、洗剤、ポリビニルピロリドンのようなのり剤及び他の不活性成分などの種々の加工成分も含有してよい。

【００７２】
次にこの浸漬した濾紙を乾燥し、２番目の浸液、すなわちアセトンとＤＭＳＯ又は他の非水性溶媒中のジアゾニウム塩、必要ならば促進物質又は追加の緩衝剤で湿らせた。次にこの２度浸漬した紙を２回乾燥し、こうして白血球又は他の分析対象物の存在に感受性の試験具を作成した。全ての必要な試薬を含有する１回浸漬するのみの溶液（one-dip solution）を利用して濾紙に浸漬することも可能である。

【００７３】
試薬組成物に好適な処方を第４表に示す。

【００７４】
【表４】

第４表　白血球検出用試薬組成物

成　分	機　能	好適な使用濃度	許容範囲
	１番目の適用		
水	溶媒	1000mL	---
硫酸マグネシウム	DNSA安定剤	14.6g	1-30g/L
Bio-Terge AS40	界面活性剤	2g	0-4g/L
ホウ酸	緩衝剤	24.7g	5-35g/L
ＰＶＰ	ポリマー	20.0g	5-50g/L
	２番目の適用		
ＭＯＰ	溶媒	955mL	---
ＤＭＰＵ	〃	30mL	10-60mL
ＤＮＳＡ	ジアゾニウム指示薬	0.174g	0.050-0.5g/L
ＰＰＴＡ	酵素基質	0.422g	0.10-0.8g/L
	酵素活性剤		
デカノール	（促進物質）	15mL	5-40mL/L
ホウ酸	緩衝剤	0.5g	0-3.0g/L

ＤＮＳＡ＝１－ジアゾ－２－ナフトール－４－スルホン酸

ＰＰＴＡ＝２－ヒドロキシ－５－フェニル－ピロール－Ｎ－トシル－Ｌ－アラニンエステル

【００７５】

必要であれば、乾燥した試薬を含んだ担体マトリックスを、裏材上に張り付けることもできる。例えば、試験具の好適な実施態様では、濾紙の担体マトリックスに上述のように組成物を浸漬し、一枚の長い透明ポリスチレンフィルムの一方の側にマトリックスが固定されるように組み込んだ。このマトリックスを、該ポリスチレンフィルムのもう一方の端がハンドルとなるようにして、両面粘着テープ（ダブルスティック（Double Stick）（登録商標）、販売元：３Ｍ社（3M Company））のような任意の適切な方法によりフィルムに固定した。使用に当たっては、このような装置を、ポリスチレンフィルム裏材の何もついていない端を掴み、マトリックスのついた端を試料（例えば、尿）中に浸漬し、迅速に取り出した。予め決められた時間後に色の形成又は他の検出可能な応答を観察し、白血球、又はエステラーゼ若しくはプロテアーゼ活性を有する他の分析対象物の既知濃度の応答に対応する標準物質と比較した。通常は約１～３分間のインキュベーション時間が、試薬含有濾紙で色の展開を起こすのに充分であることが見い出された。

フロントページの続き

(72)発明者　マイケル・ジェイ・プジア
アメリカ合衆国、インデイアナ州、４６５３０、グレンジャー、フォックス・ホロー・コート　５１６２１
(72)発明者　メルビン・ディー・スミス
アメリカ合衆国、インデイアナ州、４６５３０、グレンジャー、クウェイル・ポイント・ドライブ　３０５１７

審査官　加々美　一恵

(56)参考文献　特開昭６０－２３２０９８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 33/48-33/98
C12Q 1/37
C12Q 1/44