

(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
2017 年 4 月 27 日(27.04.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/069192 A1

- (51) 国際特許分類:
C09K 15/28 (2006.01) *G01N 21/76* (2006.01)
C07C 309/46 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C07C 309/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/081083
- (22) 国際出願日: 2016 年 10 月 20 日(20.10.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-207370 2015 年 10 月 21 日(21.10.2015) JP
- (71) 出願人: 和光純薬工業株式会社(WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒5408605 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 加地 真也(KAJI Shinya); 〒6610963 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 Hyogo (JP). 大橋 利成(OHASHI Toshinari); 〒6610963 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 Hyogo (JP). 山本 直之(YAMAMOTO Naoyuki); 〒6610963 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 Hyogo (JP).

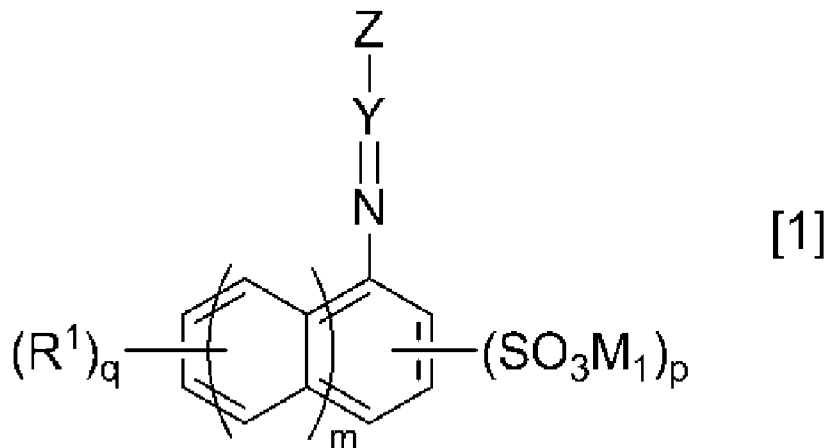
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, 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).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: STABILIZER AND STABILIZATION METHOD

(54) 発明の名称: 安定化剤および安定化方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a stabilizer of 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)-dione (L-012) or a salt thereof with which it is possible to suppress a decline in measurement sensitivity caused by exposure to light without negative effects during measurement by causing the stabilizer to be jointly present with L-012 or a salt thereof. The present invention pertains to a stabilizer of L-012 or a salt thereof shown by general formula [1] and a method for stabilizing L-012 or a salt thereof by causing the stabilizer to be jointly present with L-012 or a salt thereof. (In the formula, p number of M₁ each independently represent a hydrogen atom or alkali metal atom, q number of R¹ each independently represent a hydroxyl group or sulfonic acid group, m represents 0 or 1, p represents an integer of 1-3, q represents an integer of 0-4, Y represents a nitrogen atom or CH group (methine group), and Z represents an aryl group having a specific structure or a pyrazolyl group having a specific structure.)

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/069192 A1



8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン (L-O 1 2) またはその塩に共存させることで、測定時において悪影響を及ぼさず、なおかつ、露光による測定感度の低下を抑制できる L-O 1 2 またはその塩の安定化剤等を提供することを課題とする。本発明は、一般式 [1] で示される、L-O 1 2 またはその塩の安定化剤、および L-O 1 2 またはその塩に該安定化剤を共存させる L-O 1 2 またはその塩の安定化方法等に関する。(式中、p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基またはスルホン酸基を表し、m は、0 または 1 を表し、p は、1 ~ 3 の整数を表し、q は、0 ~ 4 の整数を表し、Y は、窒素原子または CH 基 (メチン基) を表し、Z は、特定構造のアリール基または特定構造のピラゾリル基を表す。)

明 細 書

発明の名称：安定化剤および安定化方法

技術分野

[0001] 本発明は、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン（以下、L-O 1 2 と略記する場合がある。）またはその塩の安定化剤、安定化方法、組成物および発光測定用キットに関する。

背景技術

[0002] 化学発光反応による分析方法は高感度測定が可能であることから、免疫学的分野の測定系として盛んに研究が進められている。抗原や抗体等を酵素で標識した酵素免疫測定法において酵素活性の測定に化学発光反応が利用され、化学発光物質としてルミノールやイソルミノール等のルミノール誘導体がいわれている。生体内において微量にしか存在しない物質の定量には目的物を高感度に検出する必要があるため、ルミノールやルミノール誘導体は化学発光量子収率の優れた化合物として広く用いられている。

[0003] その一方で、L-O 1 2（またはその塩）は、その発光強度がルミノールに比べて10倍以上も大きいことが知られており（例えば非特許文献1）、塩基性線維芽細胞増殖因子の定量（例えば非特許文献2）やスーパーオキシドラジカルの検出・定量（例えば非特許文献3）等の報告例がある。そのため、L-O 1 2（またはその塩）は、ルミノールに代わる優れた化学発光物質として注目されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：今田ら 生化学 第69巻 第7号 3423 (1997)

非特許文献2：Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 193, 540-545 (1993)

非特許文献3：Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 193, 554-559 (1993)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、L-O 1 2 またはその塩は、自然光（例えば太陽光）や人工光（例えば蛍光灯由来の光）に晒されると測定感度が低下するという問題点がある。このため、L-O 1 2 またはその塩を用いた測定系では、L-O 1 2 またはその塩を含む測定試薬の製造過程や該測定試薬の使用時において、これらの自然光や人工光に晒されること（露光）により、測定感度が低下して測定値に誤差を生じる可能性がある。このようなことから、測定時において悪影響を及ぼさず、なおかつ、露光による測定感度の低下を抑制できる L-O 1 2 またはその塩の安定化剤の開発が望まれている。

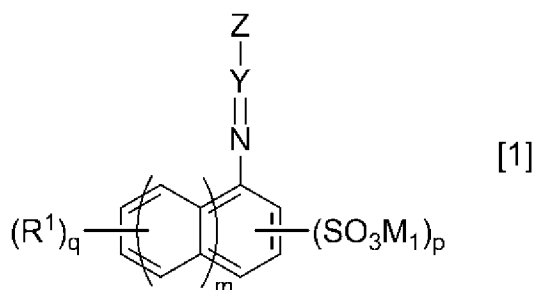
[0006] 本発明は、上述した状況に鑑み成されたものであり、測定時において悪影響を及ぼさず、なおかつ、露光によって L-O 1 2 またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）の測定感度が低下するという現象を抑制できる安定化剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、以下の構成よりなる。

（１）一般式〔１〕で示される、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド〔3, 4-d〕ピリダジン-1, 4（2 H, 3 H）-ジオン（L-O 1 2）またはその塩の安定化剤（以下、本発明の安定化剤と略記する場合がある。）。

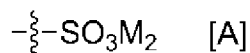
一般式〔１〕：



（式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式〔A〕で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0 または 1 を表し、 p は、1～3 の整数を表し、 q は、0～4 の整数を表し、 Y は、窒素原子または CH 基（メチ

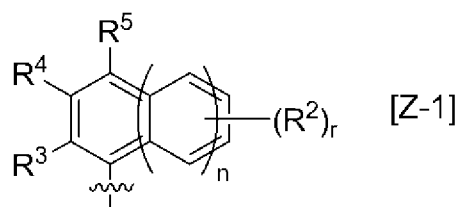
ン基)を表し、Zは、一般式[Z-1]で示される基、一般式[Z-2]で示される基または一般式[Z-3]で示される基を表す。)

一般式[A] :



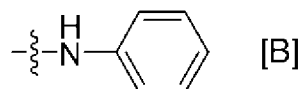
(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

一般式[Z-1] :

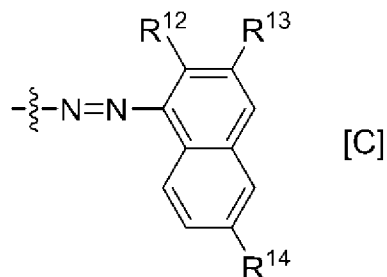


(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または上記一般式[A]で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または上記一般式[A]で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式[B]で示されるフェニルアミノ基または一般式[C]で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0または1を表し、 r は、0~4の整数を表す。)

式[B] :

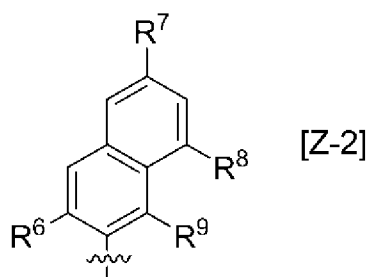


一般式[C] :



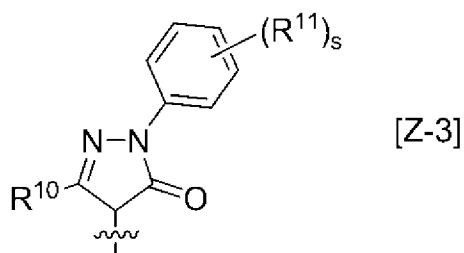
(式中、 $\text{R}^{12} \sim \text{R}^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または上記一般式[A]で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式[Z-2] :



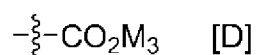
(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-3] :



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式 [D] で示されるカルボン酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5の整数を表す。)

一般式 [D] :

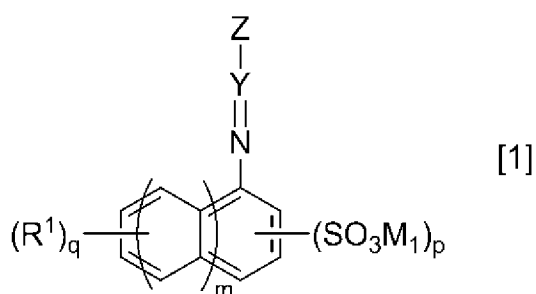


(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[0008] (2) 8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H) -ジオン (L-012) またはその塩に、一般式 [1] で示される化合物を共存させる、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H) -ジオン (L-012) またはその塩の安定化方法 (以下、本発明の安定化方法と略記する場合がある。)

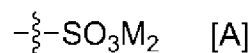
。

一般式 [1] :



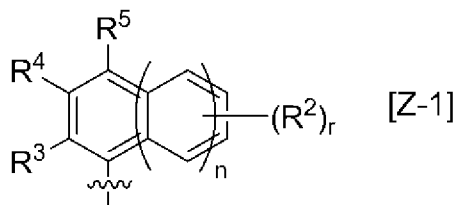
(式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0または1を表し、 p は、1～3の整数を表し、 q は、0～4の整数を表し、 Y は、窒素原子またはCH基（メチン基）を表し、 Z は、一般式 [Z-1] で示される基、一般式 [Z-2] で示される基または一般式 [Z-3] で示される基を表す。)

一般式 [A] :



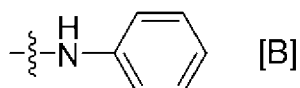
(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

一般式 [Z-1] :

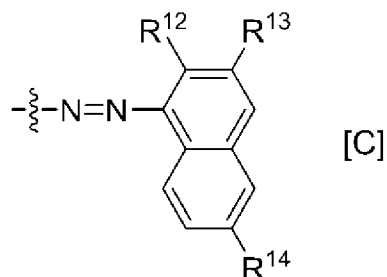


(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式 [B] で示されるフェニルアミノ基または一般式 [C] で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0または1を表し、 r は、0～4の整数を表す。)

式 [B] :

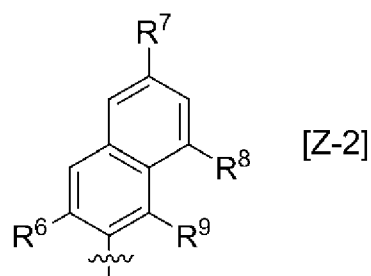


一般式 [C] :



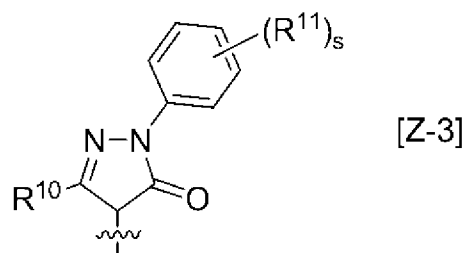
(式中、 $R^{12} \sim R^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-2] :



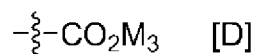
(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-3] :



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式 [D] で示されるカルボン酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5の整数を表す。)

一般式 [D] :



(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[0009] (3) 8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン (L-0 1 2) またはその塩と、上記一般式 [1] で示される化合物を含む、組成物（以下、本発明の組成物と略記する場合がある。）。

[0010] (4) 8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン (L-0 1 2) またはその塩と、上記一般式 [1] で示される化合物を含む、発光測定用キット（以下、本発明の発光測定用キットと略記する場合がある。）。

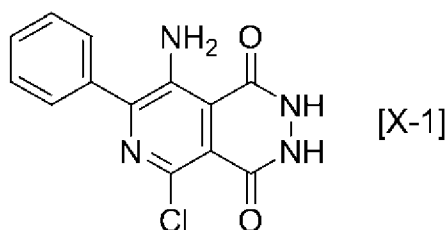
発明の効果

[0011] 本発明の安定化剤は、アゾ基またはイミノ基とベンゼンスルホン酸基を有する特定構造の化合物であり、L-0 1 2 またはその塩に本発明の安定化剤を共存させることで、L-0 1 2 またはその塩そのものが持つ発光量を保ちつつ、光によって分解（劣化）すること等に起因するL-0 1 2 またはその塩の発光強度の減少（測定感度の低下）を抑制することができる。

[0012] また、本発明の組成物および本発明の発光測定用キットは、L-0 1 2 またはその塩と上記一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を含むものであり、該組成物または該キットの製造過程やその使用時（測定時）において、露光によるL-0 1 2 またはその塩の発光強度の減少（測定感度の低下）が抑制されており、これを用いれば高感度で精度よく目的物質を測定することができる。

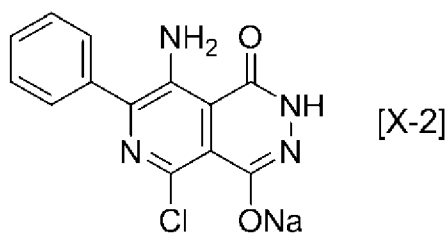
発明を実施するための形態

[0013] 本発明において、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン (L-0 1 2) またはその塩とは、式 [X-1] で示される化合物またはその塩である。
式 [X-1] :



[0014] 上記式 [X-1] で示される化合物の塩とは、該化合物中のピリドピリダジン環のカルボニル基がエノール化して、一価または二価のカチオンと塩を形成する化合物を意味する。かかる一価のカチオンとしては、例えばナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン等のアルカリ金属イオン、例えばアンモニウムイオン、例えばメチルアンモニウムイオン、エチルアンモニウムイオン、プロピルアンモニウムイオン、ブチルアンモニウムイオン等の炭素数 1～4 のモノアルキルアンモニウムイオン、例えばジメチルアンモニウムイオン、ジエチルアンモニウムイオン、ジプロピルアンモニウムイオン、ジブチルアンモニウムイオン等の炭素数 2～8 のジアルキルアンモニウムイオン、例えばトリメチルアンモニウムイオン、トリエチルアンモニウムイオン、トリプロピルアンモニウムイオン、トリブチルアンモニウムイオン等の炭素数 3～12 のトリアルキルアンモニウムイオン、例えばテトラメチルアンモニウムイオン、テトラエチルアンモニウムイオン、テトラプロピルアンモニウムイオン、テトラブチルアンモニウムイオン等の炭素数 4～16 のテトラアルキルアンモニウムイオン、ピリジニウムイオン、ヒドラジニウムイオン等のアンモニウムイオン等が挙げられる。かかる二価のカチオンとしては、例えばマグネシウムイオン、カルシウムイオン等のアルカリ土類金属イオン等が挙げられる。これらの一価または二価のカチオンのなかでも、ナトリウムイオンが好ましい。

[0015] 上述の上記式 [X-1] で示される化合物の塩の具体例としては、例えば式 [X-2] で示される、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H)-ジオン、ナトリウム塩が挙げられる。
式 [X-2] :

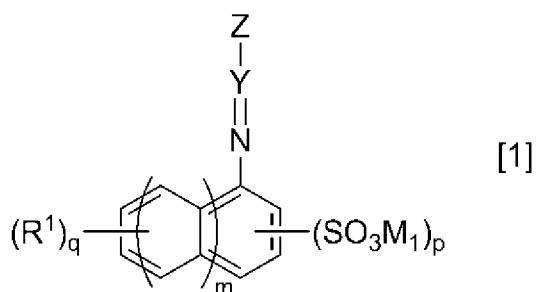


[0016] 上述の8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン (L-012) またはその塩 (上記式 [X-1] で示される化合物またはその塩) のなかでも、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン (L-012 : 上記式 [X-1] で示される化合物) および8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン, ナトリウム塩 (上記式 [X-2] で示される化合物) が好ましく、そのなかでも、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン, ナトリウム塩 (上記式 [X-2] で示される化合物) がより好ましい。なお、これらのL-012またはその塩は、市販のものを用いてもよいし、公知の方法によって適宜合成したものを用いてもよい。

[0017] ー本発明の安定化剤ー

本発明の安定化剤は、一般式 [1] で示されるものである。

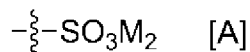
一般式 [1] :



(式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0 または 1 を表し、 p は、1 ~ 3 の整数を表し、 q は、0 ~ 4 の整数を表し、 Y は、窒素原子または CH 基 (メチン基) を表し、 Z は、一般式 [Z-1] で示される基、一般式 [Z-2] で

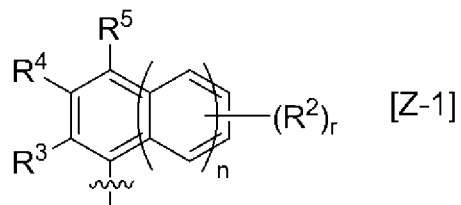
される基または一般式 [Z-3] で示される基を表す。)

一般式 [A] :



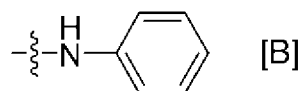
(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

一般式 [Z-1] :

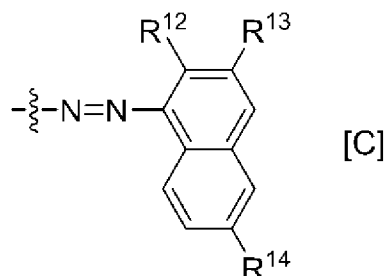


(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式 [B] で示されるフェニルアミノ基または一般式 [C] で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0 または 1 を表し、 r は、0 ~ 4 の整数を表す。)

式 [B] :

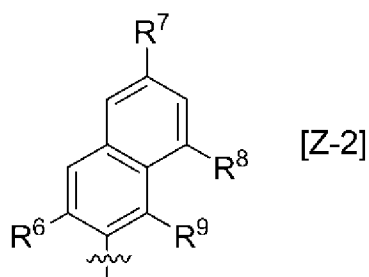


一般式 [C] :



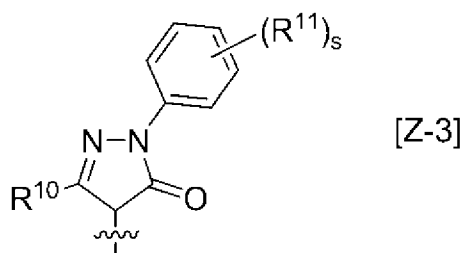
(式中、 $\text{R}^{12} \sim \text{R}^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-2] :



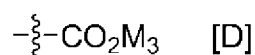
(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-3] :



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式 [D] で示されるカルボン酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または上記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5の整数を表す。)

一般式 [D] :



(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[0018] 一般式 [1] における p 個の M_1 、一般式 [A] における M_2 および一般式 [D] における M_3 で示されるアルカリ金属原子としては、リチウム原子、ナトリウム原子、カリウム原子が好ましく、なかでも、ナトリウム原子が好ましい。

[0019] 一般式 [1] における Z としては、一般式 [Z-1] で示される基が好ましい。

[0020] 一般式 [Z-1] における r 個の R^2 としては、すべての R^2 が一般式 [A] で示されるスルホン酸基であることが好ましい。

[0021] 一般式 [Z-1] における R^3 としては、ヒドロキシル基が好ましい。

- [0022] 一般式 [Z-1] における R^4 としては、水素原子が好ましい。
- [0023] 一般式 [Z-1] における R^5 としては、水素原子が好ましい。
- [0024] 一般式 [Z-2] における R^6 および R^7 としては、一般式 [A] で示されるスルホン酸基が好ましい。
- [0025] 一般式 [Z-2] における R^8 および R^9 としては、ヒドロキシル基が好ましい。
- [0026] 一般式 [Z-3] における R^{10} としては、一般式 [D] で示されるカルボン酸基が好ましい。
- [0027] 一般式 [Z-3] における s 個の R^{11} としては、すべての R^{11} が一般式 [A] で示されるスルホン酸基であることが好ましい。
- [0028] 一般式 [C] における R^{12} としては、ヒドロキシル基が好ましい。
- [0029] 一般式 [C] における R^{13} および R^{14} としては、一般式 [A] で示されるスルホン酸基が好ましい。
- [0030] 一般式 [1] における m としては、1 が好ましい。
- [0031] 一般式 [1] における m が 0 の場合は、ベンゼン環を表し、 m が 1 の場合は、ナフタレン環を表す。なお、 m が 0 の場合は、 q 個の R^1 で示される基は存在しないことを意味する。
- [0032] 一般式 [Z-1] における n が 0 の場合は、ベンゼン環を表し、 n が 1 の場合は、ナフタレン環を表す。なお、 n が 0 の場合は、 r 個の R^2 で示される基は存在しないことを意味する。
- [0033] 一般式 [1] における p としては、1～2 の整数が好ましく、なかでも、1 がより好ましい。
- [0034] 一般式 [1] における p 個の $-SO_3M_1$ で示されるスルホン酸基は、 $-N=Y-Z$ で示される基が結合する炭素原子を、ベンゼン環またはナフタレン環の 1 位の炭素原子とした場合に、ベンゼン環またはナフタレン環の 3 位または 4 位の炭素原子に結合していることが好ましい。
- [0035] 一般式 [1] における q としては、0～2 の整数が好ましく、なかでも、0 または 2 がより好ましい。なお、 q が 0 の場合は、 R^1 で示される基は存在

しないことを意味する。

[0036] 一般式 [1] における q 個の R^1 で示される基は、 $-N=Y-Z$ で示される基が結合する炭素原子を、ナフタレン環の 1 位の炭素原子とした場合に、ナフタレン環の 6 位または 8 位の炭素原子に結合していることが好ましい。

[0037] 一般式 [Z-1] における r としては、2 が好ましい。なお、 r が 0 の場合は、 R^2 で示される基は存在しないことを意味する。

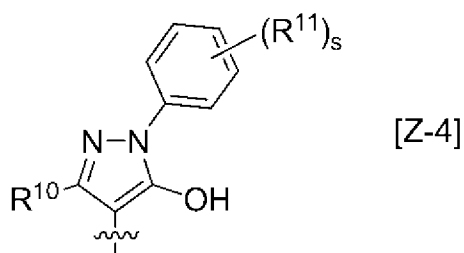
[0038] 一般式 [Z-1] における r 個の R^2 で示される基は、一般式 [1] における Y で示される基が結合する炭素原子を、ナフタレン環の 1 位の炭素原子とした場合に、ナフタレン環の 6 位または 8 位の炭素原子に結合していることが好ましい。

[0039] 一般式 [Z-3] における s としては、0～3 の整数が好ましく、なかでも、1 が好ましい。なお、 s が 0 の場合は、 R^{11} で示される基は存在しないことを意味する。

[0040] 一般式 [Z-3] における s 個の R^{11} で示される基は、ピラゾリン環が結合する炭素原子を、ベンゼン環の 1 位の炭素原子とした場合に、ベンゼン環の 4 位の炭素原子に結合していることが好ましい。

[0041] 一般式 [Z-3] で示される基（一般式 [Z-3] で示される構造）は、一般式 [Z-4] で示される基（一般式 [Z-4] で示される構造）に異性化する場合がある。本発明においては、一般式 [1] で示される安定化剤が、一般式 [Z-4] で示される構造（エノール型）のものであっても、本発明の（一般式 [1] で示される）安定化剤に含まれる。

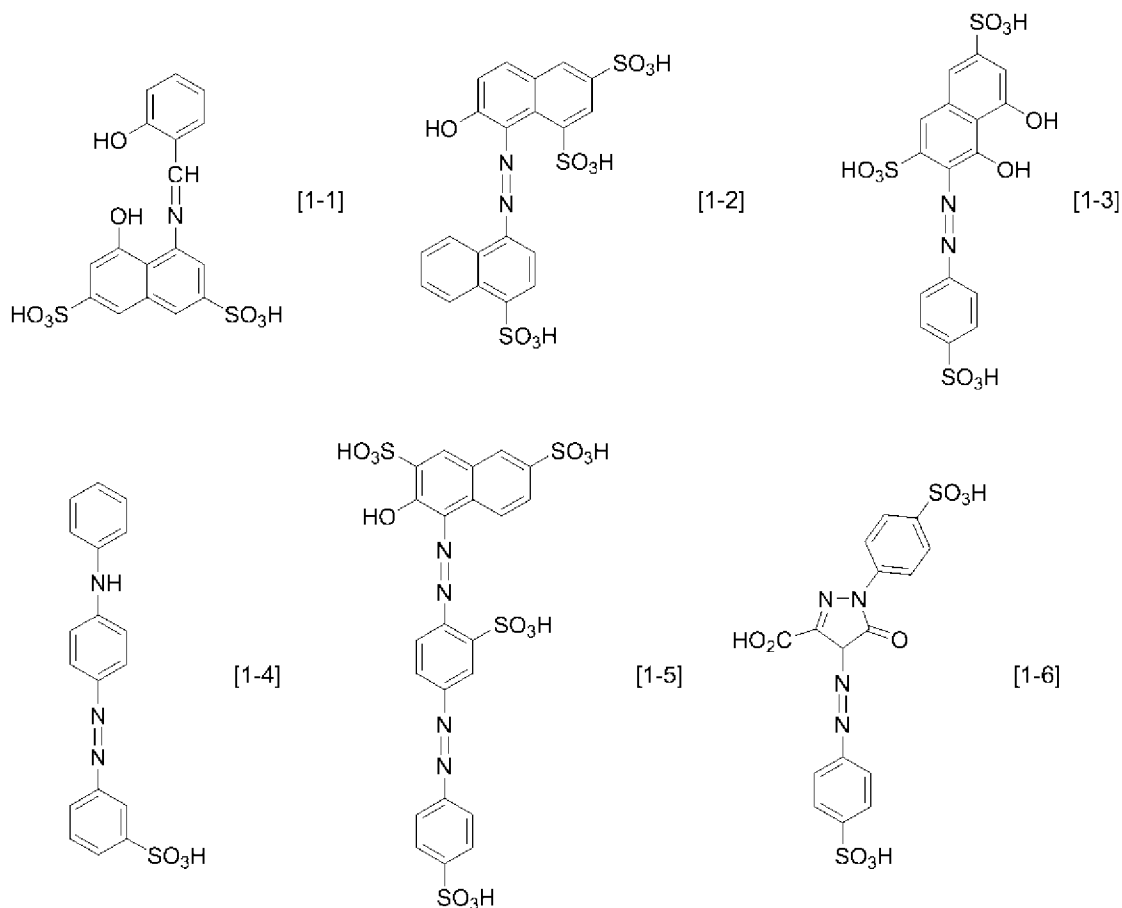
一般式 [Z-4] :



[0042] 上述の一般式 [1] で示される本発明の安定化剤の具体例としては、例えば式 [1-1] ～ [1-6] で示されるものが挙げられる。なお、本発明の安

定化剤は、式〔1-1〕～〔1-6〕で示されるものに限定されない。

式〔1-1〕～〔1-6〕：



[0043] 上述の式〔1-1〕～〔1-6〕の名称は以下のとおりである。

式〔1-1〕：4-ヒドロキシ-5-（サリチリデンアミノ）-2，7-ナフタレンジスルホン酸：アゾメチンH

式〔1-2〕：7-ヒドロキシ-8-（4-スルホ-1-ナフチルアゾ）-1，3-ナフタレンジスルホン酸

式〔1-3〕：2-（4-スルホフェニルアゾ）-1，8-ジヒドロキシ-3，6-ナフタレンジスルホン酸

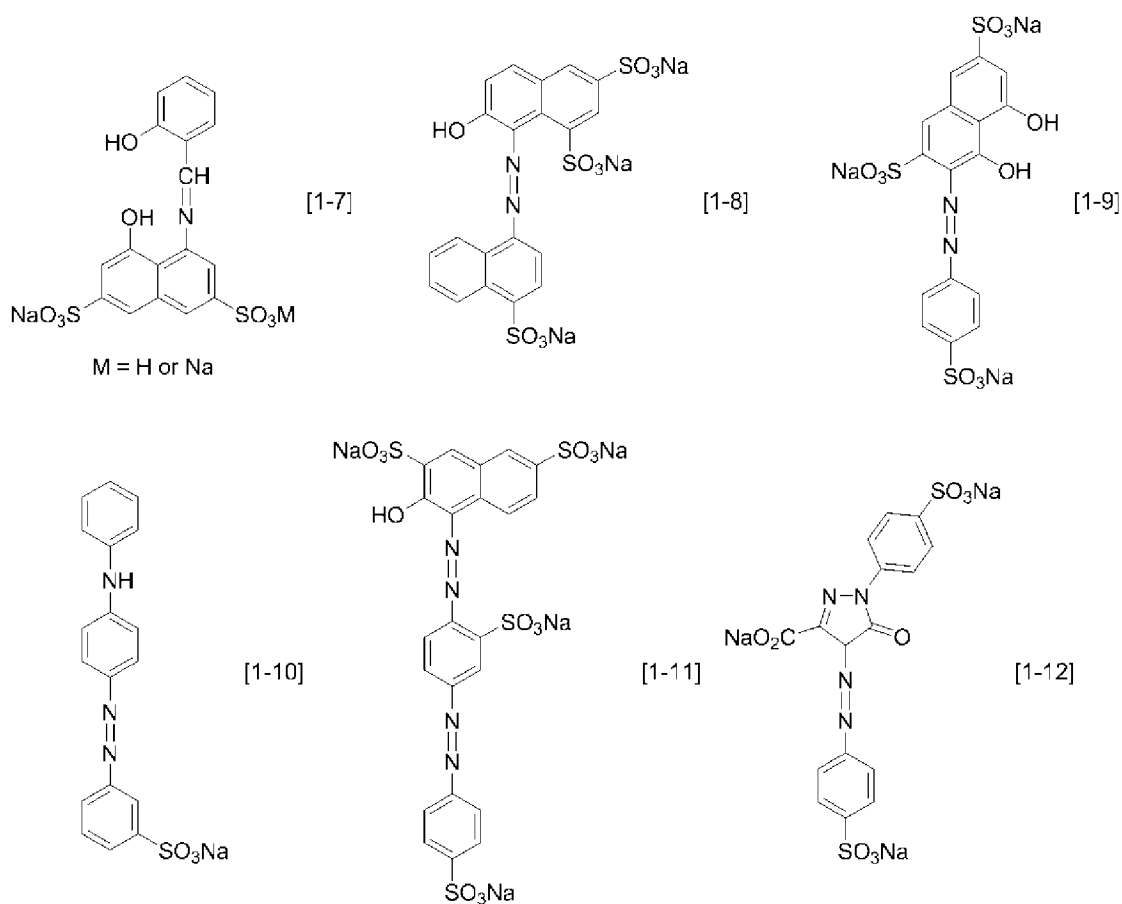
式〔1-4〕：3-〔4-（フェニルアミノ）フェニルアゾ〕ベンゼンスルホン酸

式〔1-5〕：3-ヒドロキシ-4-〔4-（4-スルホフェニルアゾ）-2-スルホフェニルアゾ〕-2，7-ナフタレンジスルホン酸

式 [1-6] : 4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[
(4-スルホフェニル)アゾ]-1H-ピラゾール-3-カルボン酸

[0044] また、上述の式 [1-1] ~ [1-6] で示される安定化剤は、アルカリ金属とで塩を形成していてもよく、例えば式 [1-7] ~ [1-12] で示されるものが挙げられる。なお、アルカリ金属塩である本発明の安定化剤は、下記式 [1-7] ~ [1-12] で示されるものに限定されない。

式 [1-7] ~ [1-12] :



[0045] 上述の式 [1-7] ~ [1-12] の名称は以下のとおりである。

式 [1-7] : 4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸, ナトリウム塩または4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸, 2ナトリウム塩 : アゾメチンH, ナトリウム塩またはアゾメチンH, 2ナトリウム塩

式 [1-8] : 7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸, 3ナトリウム塩 : ニューコクシン

式 [1-9] : 2-(4-スルホフェニルアゾ)-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸, 3ナトリウム塩 : スルファニル酸アゾクロムトップ

式 [1-10] : 3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸, ナトリウム塩 : メタニルイエロー

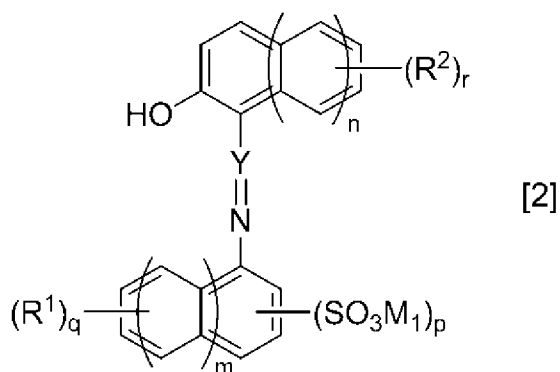
式 [1-11] : 3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2, 7-ナフタレンジスルホン酸, 4ナトリウム塩 : ポンソーS

式 [1-12] : 4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-1H-ピラゾール-3-カルボン酸, 3ナトリウム塩 : タートラジン

[0046] 本発明の安定化剤は、上述の一般式 [1] で示される特定の構造を有するが故に、L-012 またはその塩に共存させることで、測定時において悪影響を及ぼさず、なおかつ、露光による測定感度の低下を抑制できるのである。本発明の安定化剤は、一般的な水溶性色素として知られているものではある。しかしながら、水溶性色素であればどのようなものでも L-012 またはその塩の安定化効果を有するわけではなく、また、L-012 またはその塩の安定化効果は、色素の極大吸収波長とも相関しない。すなわち、本発明の安定化剤は、アゾ基またはイミノ基を有し、共鳴構造を有する一般式 [1] で示される特定の構造に特徴がある。そのため、本発明の安定化剤のみが、L-012 またはその塩の安定化効果と測定に悪影響を与えないという効果の両方を有するのである。

[0047] 上述の一般式 [1] で示される安定化剤のなかでも、一般式 [2] で示される安定化剤が好ましい。

一般式 [2] :



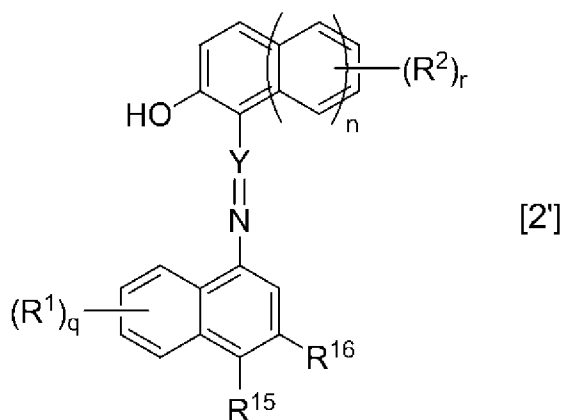
(式中、 p 個の M_1 、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 m 、 n 、 p 、 q 、 r および Y は、上記に同じ。)

[0048] 上述の一般式〔2〕で示される安定化剤の具体例としては、例えば上記式〔1-1〕、〔1-2〕、〔1-7〕および〔1-8〕で示されるものが挙げられる。

[0049] 本発明の安定化剤のなかでも、上述の一般式〔2〕で示される安定化剤は、測定時において悪影響を及ぼさず、なおかつ、露光による測定感度の低下をより効果的に抑制できるという効果を奏する。

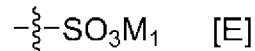
[0050] さらに、上述の一般式〔2〕で示される安定化剤のなかでも、一般式〔2′〕で示される安定化剤が好ましい。

一般式〔2′〕：



(式中、 R^{15} および R^{16} はそれぞれ独立して、水素原子または一般式〔E〕で示されるスルホン酸基を表し、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 n 、 q 、 r および Y は、上記に同じ。ただし、 R^{15} および R^{16} のうち、少なくとも1つは一般式〔E〕で示されるスルホン酸基である。)

一般式 [E] :



(式中、 M_1 は、上記に同じ。)

[0051] 上述の一般式 [2'] で示される安定化剤の具体例としては、例えば上記式 [1-1]、[1-2]、[1-7] および [1-8] で示されるものが挙げられる。

[0052] 本発明の安定化剤は、市販のものを用いてもよいし、公知の方法によって適宜合成したものを用いてもよい。

[0053] ー本発明の安定化方法ー

本発明の安定化方法は、L-O 1 2 またはその塩に、上述の一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を共存させる方法である。

[0054] 本発明の安定化方法の具体的手法としては、最終的に、L-O 1 2 またはその塩に上述の一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を共存させることができる方法であれば特に制限されず、例えば (1) L-O 1 2 またはその塩を含有する溶液に、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を添加して、L-O 1 2 またはその塩に一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を共存させる方法、(2) 一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を含有する溶液に、L-O 1 2 またはその塩を添加して、L-O 1 2 またはその塩に一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を共存させる方法、あるいは (3) L-O 1 2 またはその塩と一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）とを、水や適当な緩衝液等の溶解液に添加して、L-O 1 2 またはその塩に一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を共存させる方法等が挙げられる。

[0055] 本発明の安定化方法において、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）は、1種類の化合物（安定化剤）を単独で用いてもよいし、2種類以上の化合物（安定化剤）を組み合わせ用いてもよい。

[0056] 本発明の安定化方法において、L-O 1 2 またはその塩、あるいは／および一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）に含有させる溶解液と

しては、この分野において使用されるものであれば特に制限されず、具体的には、例えば水、緩衝液等が挙げられる。

[0057] 本発明の安定化方法にかかる水としては、この分野において使用される水であれば特に制限はなく、具体的には、例えば蒸留水、脱イオン水等の精製水等が挙げられる。

[0058] 本発明の安定化方法にかかる緩衝液としては、この分野において使用される緩衝液であれば特に制限はなく、具体的には、例えばN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシエチル)メタン(Bis-Tris)、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS)、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPSO)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸(CHES)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(EPPS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(HEPPSO)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、2-ヒドロキシ-3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPSO)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)(POP SO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、2-ヒドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPSO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチ

ル] グリシン (Tricine) 等の緩衝剤を溶解させた (グッド) 緩衝液、例えばリン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン等の緩衝剤を溶解させた緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液等が挙げられる。また、これらの緩衝液は、1種類の緩衝液を単独で用いてもよいし、2種類以上の緩衝液を組み合わせ用いてもよく、これらの緩衝液と水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物とを組み合わせ緩衝液としてもよい。緩衝液の組み合わせの具体例としては、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸 (EPSPS) / 水酸化ナトリウム緩衝液、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸 (HEPPSO) / 水酸化ナトリウム緩衝液、ホウ酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液等が挙げられる。

[0059] 本発明の安定化方法における一般式 [1] で示される化合物 (本発明の安定化剤) の濃度としては、L-O 1 2 またはその塩を含む試薬や測定溶液 (発光基質液) 等の溶液中に存在する L-O 1 2 またはその塩を安定化し得る濃度であれば特に制限されない。使用濃度の一例としては、一般式 [1] で示される化合物 (本発明の安定化剤) の種類、共存させる L-O 1 2 またはその塩の濃度、溶解液の純度等により変動するが、L-O 1 2 またはその塩が存在する溶液中での一般式 [1] で示される化合物 (本発明の安定化剤) の濃度として、下限が、通常 $0.001 \mu\text{M}$ 以上、好ましくは $0.01 \mu\text{M}$ 以上、より好ましくは $0.05 \mu\text{M}$ 以上であり、上限が、通常 $1000 \mu\text{M}$ 以下、好ましくは $800 \mu\text{M}$ 以下、より好ましくは $500 \mu\text{M}$ 以下である。

[0060] 本発明の安定化方法における L-O 1 2 またはその塩の濃度としては、化学発光測定分野において使用される濃度範囲から適宜選択すればよく、具体的には、溶液中での L-O 1 2 またはその塩の濃度として、下限が、通常 0.01 mM 以上、好ましくは 0.1 mM 以上、より好ましくは 0.3 mM 以上であり、上限が、通常 5 mM 以下、好ましくは 2 mM 以下、より好ましくは 1 mM 以下である。

[0061] 本発明の安定化方法における、L-O 1 2 またはその塩の濃度に対する一般

式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の濃度 {L-O 1 2 またはその塩に対する一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の濃度比} としては、L-O 1 2 またはその塩を安定化し得る濃度比であれば特に制限されず、濃度比の一例としては、溶液中でのL-O 1 2 またはその塩の濃度 1 mM に対して、溶液中での一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の濃度として、下限が、通常 0.002 μ M 以上、好ましくは 0.02 μ M 以上、より好ましくは 0.1 μ M 以上であり、上限が、通常 2000 μ M 以下、好ましくは 1600 μ M 以下、より好ましくは 1000 μ M 以下である。

[0062] 本発明の安定化方法における緩衝液中の緩衝剤の濃度としては、通常 10 ~ 500 mM、好ましくは 10 ~ 300 mM の範囲から適宜選択すればよい。

[0063] 本発明の安定化方法における緩衝液の pH としては、通常 pH 3 ~ 12、好ましくは pH 5 ~ 10、より好ましくは pH 6.5 ~ 9 の範囲から適宜選択すればよい。

[0064] 本発明の安定化方法においては、一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）、L-O 1 2 またはその塩、ならびに水または／および緩衝液のほかに、例えばアジ化ナトリウム等の保存剤、例えばマルトース、スクロース、トレハロース等の糖類、例えば蛋白質等の安定化剤、例えば塩化ナトリウム、塩化マグネシウム等の塩類、例えば 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン、5-ブromo-5-ニトロ-1,3-ジオキサン、(+)-10-カンファースルホン酸等の防腐剤、界面活性剤等の、この分野において使用される添加剤を共存させてもよい。

[0065] これらの添加剤の添加量としては、この分野において使用される範囲内から適宜設定すればよい。

[0066] 上述した具体的手法に基づいて行われる本発明の安定化方法は、露光によるL-O 1 2 またはその塩の分解（劣化）を抑制してL-O 1 2 またはその塩を長期間安定化し、ひいてはL-O 1 2 またはその塩の発光強度の減少（測定

感度の低下)を抑制できる方法である。また、本発明の安定化方法によって L-O 1 2 またはその塩を安定化させれば、L-O 1 2 またはその塩を含む試薬や測定溶液(発光基質液)の使用時において、一般式[1]で示される化合物(本発明の安定化剤)は測定に悪影響を及ぼさないため、高感度で精度よく目的物質を測定することができる。

[0067] ー本発明の組成物ー

本発明の組成物は、L-O 1 2 またはその塩と、上述の一般式[1]で示される化合物(本発明の安定化剤)を含むものであり、該組成物の製造過程やその使用時(測定時)において、露光によるL-O 1 2 またはその塩の発光強度の減少(測定感度の低下)が抑制されている。例えば化学発光測定において、本発明の組成物を用いれば、生体中の目的物質を高感度で精度よく測定することができる。

[0068] 本発明の組成物は、一般的には溶液状態であるが、凍結状態または凍結乾燥状態であってもよい。

[0069] 本発明の組成物は、上述した濃度範囲のL-O 1 2 またはその塩と、上述した濃度範囲の一般式[1]で示される化合物(本発明の安定化剤)とを上述した濃度比で含有するものである。

[0070] 例えば、本発明の組成物が溶液状態の場合には、適当な溶解液に、L-O 1 2 またはその塩と一般式[1]で示される化合物(本発明の安定化剤)を、それぞれ上述した濃度範囲および濃度比となるように含有させればよい。また、本発明の組成物が凍結状態または凍結乾燥状態の場合には、凍結原液あるいは凍結乾燥原液に、L-O 1 2 またはその塩と一般式[1]で示される化合物(本発明の安定化剤)を、溶解液により調製した際の濃度がそれぞれ上述した濃度範囲および濃度比となるように含有させればよい。なお、当該組成物を溶解液により調製した場合に、上述した濃度範囲のL-O 1 2 またはその塩と、上述した濃度範囲の一般式[1]で示される化合物(本発明の安定化剤)とを、上述した濃度比となるようにすれば、調製後の組成物におけるL-O 1 2 またはその塩も安定化し得ることは言うまでもない。

[0071] 本発明の組成物において使用される溶解液としては、上述の本発明の安定化方法で用いられる水、緩衝液の具体例と同様のものが挙げられ、その使用濃度やpHも上述の範囲と同様である。

[0072] 本発明の組成物には、L-O 1 2またはその塩、一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）および溶解液のほかに、この分野において使用される添加剤を共存させてもよく、このような添加剤としては、本発明の安定化方法における添加剤の具体例と同様のものが挙げられ、その添加量としては、この分野において使用される範囲内から適宜設定すればよい。

[0073] L-O 1 2またはその塩と一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）を含む測定溶液（発光基質液）を用いる発光測定法—

一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）は、L-O 1 2またはその塩を反応系に存在させる任意の発光測定法に使用することができる。

[0074] このような発光測定法の具体例としては、例えば過酸化水素等の酸化剤とL-O 1 2またはその塩との反応により生じた化学発光を検出・測定する方法等が挙げられ、その原理としては、サンドイッチ法、競合法、二抗体法等の自体公知の種々の方法が挙げられる。

[0075] 酸化剤とL-O 1 2またはその塩との反応を利用した化学発光測定の具体例としては、試料中の触媒と、酸化剤およびL-O 1 2またはその塩を反応させて化学発光を生じさせる方法、試料中の酸化剤と、触媒およびL-O 1 2またはその塩を反応させて化学発光を生じさせる方法等が挙げられる。これらの反応は、通常溶液中で行われ、測定対象により、（１）L-O 1 2またはその塩と一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）を含む測定溶液（発光基質液）、酸化剤を含む溶液および試料中の触媒を含む溶液を適宜の順序で混合して反応させる方法、（２）L-O 1 2またはその塩と一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）を含む測定溶液（発光基質液）、試料中の酸化剤を含む溶液および触媒を含む溶液を適宜の順序で混合して反応させる方法、（３）L-O 1 2またはその塩と一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）を含む測定溶液（発光基質液）、酸化剤を含む溶液、

触媒を含む溶液および試料を含む溶液を適宜の順序で混合して反応させる方法等がある。なお、上述した化学発光測定において、目的物質は、主反応に直接的に関与するものであっても、主反応に間接的に関与するものであってもよい。

[0076] 上述の触媒としては、例えばフェリシアン化カリウム等の鉄イオン、銅イオン、コバルトイオン等を含有する遷移金属錯体、ペルオキシダーゼ（POD）、カタラーゼ等の酵素、ヘモグロビン等の生体成分等が挙げられ、なかでも、ペルオキシダーゼ（POD）、カタラーゼ等の酵素が好ましく、そのなかでも、ペルオキシダーゼ（POD）がより好ましい。

[0077] 上述のペルオキシダーゼ（POD）としては、過酸化水素等の酸化剤の存在下に、L-O 12またはその塩を化学発光させることができるものであれば特に制限はない。具体的には、例えば西洋ワサビ、パイナップル、イチジク等の植物に由来するもの、例えばカビ、酵母等の微生物に由来するもの、例えば動物の白血球、甲状腺等に由来するもの等が挙げられ、なかでも、西洋ワサビに由来するものが好ましい。なお、かかるペルオキシダーゼ（POD）には、遺伝子工学により製造されたもの、あるいは天然由来のペルオキシダーゼ（POD）を、蛋白質分解酵素等により、その構造の一部を加水分解等して得られたものであって、POD活性を有するものも含まれる。また、ペルオキシダーゼ（POD）は、それ自体（未修飾のもの）であっても、例えば抗原、抗体等により化学修飾されたものであってもよい。

[0078] 上述の酸化剤としては、例えば過酸化水素、過酸化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、過塩素酸カリウム、過マンガン酸ナトリウム、過マンガン酸カリウム、ヨウ素等が挙げられ、なかでも、過酸化水素が好ましい。なお、これらの酸化剤は、市販のものをを用いればよい。

[0079] 上述の化学発光測定においては、L-O 12またはその塩、一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）、触媒および酸化剤のほかに、増感剤（エンハンサー）を使用してもよい。

[0080] 上述の増感剤（エンハンサー）としては、この分野において使用される増

感剤（エンハンサー）であれば特に制限はなく、具体的には、例えば4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール等のチアゾール誘導体、例えば4-（イミダゾール-1-イル）フェノール等のイミダゾール誘導体、例えば4-（4-ヒドロキシフェニル）オキサゾール等のオキサゾール誘導体、例えばp-ヨードフェノール、4-ヒドロキシケイ皮酸、4-（4'-チアゾリル）フェノール等のフェノール誘導体、例えば1-ブロナフトール等のナフトール誘導体等が挙げられ、なかでも、例えば4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール等のチアゾール誘導体が好ましい。なお、これらの増感剤（エンハンサー）は、1種類の増感剤（エンハンサー）を単独で用いてもよいし、2種類以上の増感剤（エンハンサー）を組み合わせ用いてもよい。なお、これらの増感剤（エンハンサー）は市販のものを用いればよい。

[0081] 上述の化学発光測定において使用するL-012またはその塩の量としては、測定の様式によって異なる場合があるため一概には言えないが、例えば総発光量を測定する場合では、試料25 μ Lに対して、通常濃度0.01～5 mMのもので5 μ L～1 mLであり、好ましくは濃度0.1～2 mMのもので10～500 μ Lであり、より好ましくは濃度0.3～1 mMのもので20～300 μ Lである。一方、単位時間あたりの発光量を測定する場合では、使用するL-012またはその塩の量は、試料25 μ Lに対して、通常濃度0.01～5 mMのもので5 μ L～1 mLであり、好ましくは濃度0.1～2 mMのもので10～500 μ Lであり、より好ましくは濃度0.3～1 mMのもので20～300 μ Lである。

[0082] 上述の化学発光測定において使用する一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の量としては、測定の様式によって異なる場合があるため一概には言えないが、例えば総発光量を測定する場合では、試料25 μ Lに対して、通常濃度0.001～1000 μ Mのもので5 μ L～1 mLであり、好ましくは濃度0.01～800 μ Mのもので10～500 μ Lであり、より好ましくは濃度0.05～500 μ Mのもので20～300 μ Lである。一方、単位時間あたりの発光量を測定する場合では、使用する一般式〔1〕

〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の量は、試料25 μL に対して、通常濃度0.001～1000 μM のもので5 μL ～1 mLであり、好ましくは濃度0.01～800 μM のもので10～500 μL であり、より好ましくは濃度0.05～500 μM のもので20～300 μL である。

[0083] L-012またはその塩と一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）を含む測定溶液（発光基質液）中における、L-012またはその塩の濃度に対する一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の濃度 {L-012またはその塩に対する一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の濃度比} としては、溶液中でのL-012またはその塩の濃度1 mMに対して、溶液中での一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）の濃度として、下限が、通常0.002 μM 以上、好ましくは0.02 μM 以上、より好ましくは0.1 μM 以上であり、上限が、通常2000 μM 以下、好ましくは1600 μM 以下、より好ましくは1000 μM 以下である。

[0084] 上述の化学発光測定において使用する触媒の量としては、使用する触媒の種類や測定の様式によって異なる場合があるため一概には言えないが、例えば触媒がペルオキシダーゼ（POD）であって、総発光量を測定する場合には、試料25 μL に対して、通常濃度0.1～200 U/mLのもので5 μL ～1 mLであり、好ましくは濃度0.2～100 U/mLのもので10～500 μL であり、より好ましくは濃度0.5～50 U/mLのもので20～300 μL である。一方、単位時間あたりの発光量を測定する場合には、使用するペルオキシダーゼ（POD）の量は、試料25 μL に対して、通常濃度0.1～200 U/mLのもので5 μL ～1 mLであり、好ましくは濃度0.2～100 U/mLのもので10～500 μL であり、より好ましくは濃度0.5～50 U/mLのもので20～300 μL である。

[0085] 上述の化学発光測定において使用する酸化剤の量としては、使用する酸化剤の種類や測定の様式によって異なる場合があるため一概には言えないが、例えば酸化剤が過酸化水素であって、総発光量を測定する場合には、試料2

5 μL に対して、通常濃度 0.3 μM ~ 0.1 mM のもので 5 μL ~ 1 mL であり、好ましくは濃度 0.5 ~ 500 μM のもので 10 ~ 500 μL であり、より好ましくは濃度 0.7 ~ 200 μM のもので 20 ~ 300 μL である。一方、単位時間あたりの発光量を測定する場合では、使用する過酸化水素の量は、試料 25 μL に対して、通常濃度 0.3 μM ~ 0.1 mM のもので 2.5 ~ 500 μL であり、好ましくは濃度 0.5 ~ 500 μM のもので 5 ~ 250 μL であり、より好ましくは濃度 0.7 ~ 200 μM のもので 10 ~ 150 μL である。

[0086] 上述の化学発光測定において使用する増感剤（エンハンサー）の量としては、使用する増感剤（エンハンサー）の種類や測定の様式によって異なる場合があるため一概には言えないが、例えば増感剤（エンハンサー）がチアゾール誘導体であって、総発光量を測定する場合では、試料 25 μL に対して、通常濃度 0.1 μM ~ 10 mM のもので 5 μL ~ 1 mL であり、好ましくは濃度 1 μM ~ 2 mM のもので 10 ~ 500 μL であり、より好ましくは濃度 100 μM ~ 1 mM のもので 20 ~ 300 μL である。一方、単位時間あたりの発光量を測定する場合では、使用するチアゾール誘導体の量は、試料 25 μL に対して、通常濃度 0.1 μM ~ 10 mM のもので 5 μL ~ 1 mL であり、好ましくは濃度 1 μM ~ 2 mM のもので 10 ~ 500 μL であり、より好ましくは濃度 100 μM ~ 1 mM のもので 20 ~ 300 μL である。

[0087] 上述の化学発光測定においては、試料中に含まれる目的物質以外の成分の影響を回避する、あるいは目的物質の検出感度を高くする等の目的のために、測定系に界面活性剤、賦活化剤等の、この分野において使用される添加剤を添加してもよい。また、これらの添加剤の添加量としては、この分野において使用される範囲内から適宜設定すればよい。

[0088] 上述の化学発光測定における L-012 またはその塩の発光反応は、通常 pH 3 ~ 12、好ましくは pH 5 ~ 10、より好ましくは pH 6.5 ~ 9 の条件下で行えばよい。

[0089] このような pH に調整するには、測定溶液（発光基質液）等の溶液の pH

を調整することで行えばよく、例えばL-O 1 2またはその塩、一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）、触媒あるいは酸化剤を含有させる緩衝液を用いることでpHを調整すればよい。このような緩衝液としては、上述の本発明の安定化方法で挙げた緩衝液の具体例と同様のものが挙げられ、その使用濃度も上述の範囲と同様である。

[0090] 上述の化学発光測定におけるL-O 1 2またはその塩の発光反応およびそれに続く発光測定は、通常10～60℃、好ましくは15～50℃、より好ましくは20～45℃の温度条件下で行えばよい。

[0091] 上述の化学発光測定におけるL-O 1 2またはその塩の発光反応およびそれに続く発光測定の時間は、通常10秒～30分、好ましくは30秒～20分、より好ましくは30秒～10分である。

[0092] 触媒として、ペルオキシダーゼ（POD）等の酵素で標識した標識抗原または標識抗体を使用し、抗原抗体反応を行って酵素標識免疫複合体を形成させ、該複合体を上述の化学発光測定に用いる場合において、抗原抗体反応は、上述の化学発光測定におけるL-O 1 2またはその塩の発光反応と同様のpH、温度条件下で行えばよい。

[0093] 上述の抗原抗体反応の反応時間は、通常10秒～120分、好ましくは30秒～60分、より好ましくは1～30分である。

[0094] 上述した化学発光測定のなかでも、ペルオキシダーゼ（POD）で標識した特定成分に対する抗体（標識抗体）と特定成分とを反応させて特定成分と標識抗体の免疫複合体を生じさせ、次いで、（PODが結合している）当該免疫複合体と過酸化水素およびL-O 1 2またはその塩とを反応させて化学発光を生じさせる方法において、一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）は、好適に使用される。

[0095] 一般式〔1〕で示される化合物（本発明の安定化剤）を用いて、試料中のB型肝炎ウイルス表面抗体（以下、HBs抗体と略記する場合がある。）を測定する方法を例にとって説明すると、例えば以下のとおりである。

[0096] 反応容器または／および測光室の反応容器周辺の雰囲気を一一定にする機構

を備えた適当な自動分析装置に、試料、Ｂ型肝炎ウイルス表面抗原（以下、ＨＢｓ抗原と略記する場合がある。）結合磁性粒子を含有する溶液、ペルオキシダーゼ（ＰＯＤ）標識ＨＢｓ抗原含有溶液、Ｌ-０１２またはその塩、一般式〔１〕で示される化合物（本発明の安定化剤）および増感剤（エンハンサー）として４-（４-ヒドロキシフェニル）チアゾールを含有する溶液（発光基質液）、過酸化水素含有溶液をそれぞれ装填する。次いで機械を始動させて、ＨＢｓ抗体を含有する試料とＨＢｓ抗原結合磁性粒子を含有する溶液とを反応させて、「ＨＢｓ抗原結合磁性粒子－ＨＢｓ抗体」複合体を形成させ、Ｂ／Ｆ分離する。次いで、「ＨＢｓ抗原結合磁性粒子－ＨＢｓ抗体」複合体を含有する溶液に、ＰＯＤ標識ＨＢｓ抗原含有溶液を加えて反応させて、「ＨＢｓ抗原結合磁性粒子－ＨＢｓ抗体－ＰＯＤ標識ＨＢｓ抗原」複合体を形成させ、Ｂ／Ｆ分離する。続いて、Ｂ／Ｆ分離を行った磁性粒子に、発光基質液と過酸化水素含有溶液を添加し、混合後、試料の発光を測定すればよい。

[0097] 上述した化学発光測定における磁性粒子としては、この分野において使用される磁性粒子であれば特に制限はなく、市販のものを用いてもよいし、公知の方法によって適宜合成したものをを用いてもよい。また、該磁性粒子を用いたＨＢｓ抗原結合磁性粒子等の抗原または抗体が結合した磁性粒子の作製は、自体公知の方法に準じて行えばよい。

[0098] 自動分析装置の代わりに一般の分光測定装置を用いて化学発光測定を行う場合には、用手法で試料と各種試薬等を反応させ、発光反応を生じさせた後、反応容器を、反応容器または／および測光室の反応容器周辺の雰囲気を一定にする機構を備えた分光測定装置にセットして、試料の発光を測定すればよい。

[0099] 上述した化学発光測定においては、ＨＢｓ抗体の測定系を例に挙げたが、一般式〔１〕で示される化合物（本発明の安定化剤）とＬ-０１２またはその塩を用いれば、種々の目的物質（測定対象物質）を測定することができる。このような目的物質（測定対象物質）としては、何らかの方法によりそれに

対する抗体または抗原を得ることができるものであれば特に制限なく挙げられ、例えば生物学のおよび臨床的重要性を有する薬剤、代謝物質、ビタミン、殺虫剤、ステロイド、ペプチド、ホルモン、肝炎マーカー、癌マーカー、抗体および血清タンパク等、通常補体免疫測定法で測定可能と考えられる測定対象物質は全て挙げることができる。具体例として、内分泌機能関連物質としては、例えば甲状腺刺激ホルモン（TSH）、副甲状腺ホルモン（iPTH）、成長ホルモン（GH）、ソマトメジンC（IGF-1）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、プロラクチン（PRL）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、バソプレッシン、オキシトシン、ソマトスタチン、エンケファリン、 β -エンドルフィン、サイロキシン、トリヨードサイロニン、サイログロブリン、抗サイログロブリン抗体、抗T3抗体、抗T4抗体、抗TSH抗体、カルシトニン、カテコールアミン、ドーパミン、セロトニン、アルドステロン、レニン、アンギオテンシン、コルチゾール、デオキシコルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、アンドロステロン、プロゲステロン、プレグネノロン、エストロゲン、エストロン、エストリオール、エストラジオール、テストステロン、ゴナドトロピン、インシュリン、抗インシュリン抗体、C-ペプチド、グルカゴン、ガストリン、セクレチン、サイクリックAMP、サイクリックGMP、プロスタグランジン類、トロンボキサン、エリスロポエチン、ヒスタミン等が挙げられ、腫瘍関連物質としては、例えばCEA、フェリチン、 β 2-マイクログロブリン、エラスターゼ、 α -フェトプロテイン、神経特異エノラーゼ、前立腺特異抗原、CA19-9等が挙げられ、薬物、ビタミン関連物質としては、例えばフェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピン、プリミドン、エトスクシミド、バルプロ酸、アセタゾールアミド、スルチアム、グルテチミド、クロナゼパム、ニトラゼパム、ジアゼパム、ペントバルビタール、セコバルビタール、ブピバカイン、メピバカイン、リドカイン、プロカインアミド、キニジン、ジゴキシン、ジキトキシン、テオフィリン、アミトリプチリン、イミプラミン、アミカシン、ゲンタマイシン、トブラ

マイシン、セファレキシン、スルファメトキサゾール、メトトレキサート、シクロスポリン、メチルプレドニゾロン、サリチル酸、アセトアミノフェン、インドメタシン、アロプリノール、ビタミンA、カロチン、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等が挙げられ、血清または血漿タンパク関連物質としては、例えばアルブミン、 α 1-マイクログロブリン、 α 1-アンチトリプシン、 α 2-マクログロブリン、ハプトглоブリン、ヘモペキシン、トランスフェリン、ミオグロビン、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、フィブリノーゲン、アンチトロンビン、プラスミノーゲン、アンチプラスミン、プロテインC、リウマチ因子、抗DNA抗体、C反応性蛋白等が挙げられ、ウイルス、感染症関連物質としては、例えばHBs抗原、HBs抗体、HBc抗体、HTLV-I抗体、HTLV-II抗体、TPHA、各種ウイルス抗原、各種ウイルス抗体等が挙げられる。これらの目的物質（測定対象物質）のなかでも、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、副甲状腺ホルモン（iPTH）、アルドステロン、レニン、コルチゾール、HBs抗体、HBc抗体が好ましい。

[0100] 化学発光測定におけるこれらの目的物質（測定対象物質）の濃度としては、目的物質（測定対象物質）の種類に応じて、この分野における濃度範囲から適宜選択すればよい。

[0101] 以上のように、L-012またはその塩を用いる化学発光測定において、L-012またはその塩に一般式[1]で示される化合物（本発明の安定化剤）を共存させることで、L-012またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）を露光させたとしても、L-012またはその塩の発光強度の減少（測定感度の低下）を抑制することができ、なおかつ、L-012またはその塩そのものの発光量には悪影響を及ぼしにくいため、測定時において悪影響を及ぼすことなく、高感度で精度よく目的物質（測定対象物質）を測定できるという効果を奏する。さらに、L-012またはその塩に本発明の安定化剤を共存させれば、L-012またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）を遮光する必要

がなくなることから、より簡便に測定できるという効果を奏する。

[0102] ー本発明の発光測定用キットー

本発明の発光測定用キットは、L-O 1 2 またはその塩の化学発光を利用する方法に用いられるものであり、上述の発光測定法の具体例から明らかなように、L-O 1 2 またはその塩の化学発光測定法において用いられる触媒、酸化剤等の自体公知の試薬類と、L-O 1 2 またはその塩と上述の一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を含むものである。

[0103] 本発明の発光測定用キットの具体例としては、例えばL-O 1 2 またはその塩、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）および酸化剤を含むキット、例えばL-O 1 2 またはその塩、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）および触媒を含むキット、例えばL-O 1 2 またはその塩、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）、酸化剤および触媒を含むキット等が挙げられる。

[0104] このような本発明の発光測定用キットの一例を以下に挙げる。

A) L-O 1 2 またはその塩、 B) 一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）およびC) 過酸化水素を含有する発光測定用キット。

A) L-O 1 2 またはその塩、 B) 一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）およびD) ペルオキシダーゼ（POD）を含有する発光測定用キット。

A) L-O 1 2 またはその塩、 B) 一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）、 C) 過酸化水素およびD) ペルオキシダーゼ（POD）を含有する発光測定用キット。

[0105] 本発明の発光測定用キットに含まれるL-O 1 2 またはその塩、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）および試薬類の含有量としては、化学発光測定の際に、L-O 1 2 またはその塩、一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）および試薬類等の各成分の終濃度および濃度比が、上述した範囲となるように含有させればよい。

[0106] 本発明の発光測定用キットには、上述した試薬類のほかに、増感剤（エン

ハンサー)、賦活化剤、保存剤、安定化剤、防腐剤、界面活性剤等の、この分野において使用される添加剤を含有させてもよい。また、これらの添加剤の含有量としては、この分野において使用される範囲内から適宜設定すればよい。

[0107] このような添加剤等を含む本発明の発光測定用キットとしては、例えば以下のものが挙げられる。

A) L-O 1 2 またはその塩、B) 一般式 [1] で示される化合物 (本発明の安定化剤)、C) 過酸化水素および E) 増感剤 (エンハンサー) を含有する発光測定用キット。

A) L-O 1 2 またはその塩、B) 一般式 [1] で示される化合物 (本発明の安定化剤)、C) 過酸化水素および F) 磁性粒子を含有する発光測定用キット。

A) L-O 1 2 またはその塩、B) 一般式 [1] で示される化合物 (本発明の安定化剤)、C) 過酸化水素、E) 増感剤 (エンハンサー) および F) 磁性粒子を含有する発光測定用キット。

[0108] 上述の本発明の発光測定用キットにおけるキット中の形態としては、溶液状態、凍結状態または凍結乾燥状態のいずれであってもよい。

実施例

[0109] 以下、実施例および比較例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例によって何ら限定されない。

[0110] ーペルオキシダーゼ (POD) を用いた化学発光測定系における試薬の調製および化学発光の測定ー

ペルオキシダーゼ (POD) を用いた化学発光測定の一般的手法において、試薬の調製、ならびに各種安定化剤または水溶性色素を用いた化学発光の測定方法および評価方法を以下に示す。

[0111] ー実施例 1 ～ 1 4 および比較例 1 ～ 1 4 ー

(1) 発光測定用試薬第 1 液の調製

(a) 発光測定用試薬第 1 - A 液の調製 (実施例 1 ～ 1 4 および比較例 1 ～

12)

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H) -ジオン, ナトリウム塩 (和光純薬工業 (株) 製) 15.6 mg および 4-(4-ヒドロキシフェニル) チアゾール (和光純薬工業 (株) 製) 3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、表 1 に示す各種安定化剤または水溶性色素を、化学発光測定時の終濃度が表 1 に示す所定濃度となるような量を添加し、さらに、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸 (HEPPSO) / 水酸化ナトリウム緩衝液 (250 mM、pH 8.55) 20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を 100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第 1-A 液を調製した。測定に用いるまで冷蔵 (2～10℃) で保存した。なお、表 1 に示す安定化剤および水溶性色素は、以下に示す市販のものを用いた。

アゾメチン H : 和光純薬工業 (株) 製

ニューコクシン : 和光純薬工業 (株) 製

スルファニル酸アゾクロムトロップ : 和光純薬工業 (株) 製

メタニルイエロー : 和光純薬工業 (株) 製

ポンソー S : 和光純薬工業 (株) 製

タートラジン : 和光純薬工業 (株) 製

N-ベンゾイル H 酸, 1 カリウム, 1 ナトリウム塩 : 和光純薬工業 (株) 製

アリザリンイエロー GG : 東京化成工業 (株) 製

クレゾールレッド : 和光純薬工業 (株) 製

(b) 発光測定用試薬第 1-B 液の調製 (比較例 13)

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H) -ジオン, ナトリウム塩 (和光純薬工業 (株) 製) 15.6 mg および 4-(4-ヒドロキシフェニル) チアゾール (和光純薬工業 (株) 製) 3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸

(HEPPSO)／水酸化ナトリウム緩衝液(250 mM、pH 8.55) 20 mLを添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-B液を調製した。測定に用いるまで冷蔵(2～10℃)で保存した。

(c) 発光測定用試薬第1-C液の調製(比較例14)

ルミノール、ナトリウム塩(和光純薬工業(株)製) 40 mgおよび4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール(和光純薬工業(株)製) 3.5 mgを100 mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、ホウ酸／水酸化ナトリウム緩衝液(250 mM、pH 8.55) 20 mLを添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-C液を調製した。測定に用いるまで冷蔵(2～10℃)で保存した。

[0112] (2) ペルオキシダーゼ(POD) 緩衝液の調製

西洋ワサビ由来POD(ロシュ・ダイアグノスティックス(株)製)を0.02 μg/mLとなるように50 mMの2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH 6.8)を用いて希釈調製し、POD緩衝液を得た。測定に用いるまで冷蔵(2～10℃)で保存した。

[0113] (3) 発光測定用試薬第2液の調製

過酸化水素水(和光純薬工業(株)製、試薬特級、濃度30重量%) 67 μLを100 mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第2液を調製した。測定に用いるまで冷蔵(2～10℃)で保存した。

[0114] (4) 化学発光の測定

得られた各試薬を用いて、以下に示す測定方法により、実施例1～14および比較例1～14にかかる発光測定用試薬第1液に基づいて発光量(平均値)を測定し、各種安定化剤または水溶性色素の光安定化効果およびL-012(のナトリウム塩)の発光強度に対する影響の有無を評価した。

まず、(1)で得られた発光測定用試薬第1液(1-A液、1-B液、1-C

液)を1 mLずつ5 mLの試験管2つにそれぞれ移し、一方については430～450 Lxの蛍光灯の光に30分間晒し(露光発光測定用試薬第1液)、他方については試験管をアルミホイルで覆うことにより遮光した(遮光発光測定用試薬第1液)。

次いで、POD緩衝液50 μ Lに、露光発光測定用試薬第1液(1-A液、1-B液、1-C液)または遮光発光測定用試薬第1液(1-A液、1-B液、1-C液)をそれぞれ100 μ Lと、発光測定用試薬第2液100 μ Lとを同時に加え、37℃で43秒間発光反応させ、発光測定用試薬第1液および第2液を同時に添加してから、43～45秒間での平均発光量を発光検出器(Lumat LB9507:ベルトールドジャパン製)で測定した。

[0115] (5) 結果

得られた結果から、以下に示すように「安定化剤または水溶性色素の光安定化効果」および「ルミノールに対する相対感度」を算出し、各種安定化剤または水溶性色素の評価を行った。結果を表1にそれぞれ示す。

〈安定化剤または水溶性色素の光安定化効果〉

それぞれの発光測定用試薬第1液について、遮光発光測定用試薬第1液での平均発光量(遮光発光量)に対する露光発光測定用試薬第1液での平均発光量(露光発光量)の割合〔露光発光量/遮光発光量 $\times$ 100%=発光量比〕を算出した。この発光量比に基づいて、各種安定化剤または水溶性色素の光安定化効果を評価した。

すなわち、発光量比が100%に近いほど、各種安定化剤または水溶性色素のL-012(のナトリウム塩)に対する光安定化効果が高いことを意味し、安定化剤または水溶性色素を添加していない発光測定用試薬第1-B液を用いた場合における発光量比が64%であったことから、70%以上の発光量比を示した発光測定用試薬第1-A液に含まれる安定化剤または水溶性色素を、光安定化効果が高く、露光時における測定感度の低下を抑制できる安定化剤または水溶性色素と評価した。

〈ルミノールに対する相対感度〉

それぞれの発光測定用試薬第1-A液および1-B液について、各発光測定用試薬第1-A液または1-B液での遮光発光量（L-O 1 2 発光量）に対する発光測定用試薬第1-C液での遮光発光量（ルミノール発光量）の割合〔L-O 1 2 発光量／ルミノール発光量×100％＝相対感度〕を算出した。この相対感度に基づいて、各種安定化剤または水溶性色素の測定感度を評価した。

すなわち、ルミノール発光量（127, 400 cps）よりも高いL-O 1 2 発光量を示した発光測定用試薬第1-A液は、測定感度が高く、ルミノール発光を利用した発光測定よりも、高感度での測定を可能にする試薬（L-O 1 2 発光試薬）と評価した。換言すれば、100％以上の相対感度を示した発光測定用試薬第1-A液に含まれる安定化剤または水溶性色素は、L-O 1 2 の発光強度に対して悪影響を及ぼすことなく、高感度測定が可能な安定化剤または水溶性色素であると評価した。

[0116]

[表1]

例	試薬	安定化剤	濃度	発光量 (cps)		発光量比 (%)	相対感度 (%)
				遮光発光量	露光発光量		
実施例 1	1-A 液	アゾメチンH	0.05 μ M	420,013	324,755	77	330
実施例 2	1-A 液		0.1 μ M	321,084	288,631	90	252
実施例 3	1-A 液	ニューコクシン	0.5 μ M	532,621	386,421	73	418
実施例 4	1-A 液		1 μ M	483,858	386,496	80	380
実施例 5	1-A 液	スルファニル酸アゾクロムトロップ	100 μ M	150,897	142,073	94	118
実施例 5	1-A 液		10 μ M	515,642	367,129	71	405
実施例 6	1-A 液	メタニルイエロー	100 μ M	384,111	338,649	88	302
実施例 7	1-A 液		500 μ M	269,610	270,733	100	212
実施例 8	1-A 液	ボンソーS	1 μ M	563,124	451,037	80	442
実施例 9	1-A 液		10 μ M	519,605	442,909	85	408
実施例 10	1-A 液		100 μ M	393,523	373,339	95	309
実施例 11	1-A 液		500 μ M	146,533	154,195	105	115
実施例 12	1-A 液	タートラジン	10 μ M	527,402	380,031	72	414
実施例 13	1-A 液		100 μ M	434,319	359,961	83	341
実施例 14	1-A 液		500 μ M	232,027	219,169	94	182
比較例 1	1-A 液	N-ベンゾイルH酸, 1K, 1Na	1 μ M	307,410	201,453	66	241
比較例 2	1-A 液		10 μ M	62,504	47,669	76	49
比較例 3	1-A 液		100 μ M	1,392	1,253	90	1
比較例 4	1-A 液		500 μ M	150	134	89	0.1
比較例 5	1-A 液	アリザリンイエローGG	1 μ M	556,240	373,129	67	437
比較例 6	1-A 液		10 μ M	583,699	368,105	63	458
比較例 7	1-A 液		100 μ M	587,034	388,202	66	461
比較例 8	1-A 液		500 μ M	576,029	385,218	67	452
比較例 9	1-A 液	クレゾールレッド	1 μ M	581,165	393,330	68	456
比較例 10	1-A 液		10 μ M	534,693	357,498	67	420
比較例 11	1-A 液		100 μ M	266,468	180,857	68	209
比較例 12	1-A 液		500 μ M	38,863	35,253	91	31
比較例 13	1-B 液	—	—	565,837	362,385	64	444
比較例 14	1-C 液	—	—	127,400	115,387	91	—

アゾメチンH：4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2,7-ナフタレンジルスルホン酸
 ニューコクシン：7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1,3-ナフタレンジルスルホン酸, 3ナトリウム塩
 スルファニル酸アゾクロムトロップ：2-(4-スルホフェニルアゾ)-1,8-ジヒドロキシ-3,6-ナフタレンジルスルホン酸, 3ナトリウム塩
 メタニルイエロー：3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸, ナトリウム塩
 ボンソーS：3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2,7-ナフタレンジルスルホン酸, 4ナトリウム塩
 タートラジン：4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-1H-ピラゾール-3-カルボン酸, 3ナトリウム塩
 N-ベンゾイルH酸, 1K, 1Na：4-ベンゾイルアミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジルスルホン酸, 1カリウム, 1ナトリウム塩
 アリザリンイエローGG：4-ヒドロキシ-3'-ニトロアゾベンゼン-3-カルボン酸, ナトリウム塩
 クレゾールレッド：3,3'-ビス(3-メチル-4-ヒドロキシフェニル)-3H-2,1-ベンゾオキサチオール 1,1'-ジオキシド

[0117] 表1の結果から、本発明の安定化剤である、アゾメチンH、ニューコクシン、スルファニル酸アゾクロムトロップ、メタニルイエロー、ボンソーSおよびタートラジンのみが、露光による測定感度の低下を抑制できる効果（光安定化効果）と、L-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響が少なく、高感度測定が可能であるという効果の両方を有していることがわかった。

[0118] ーペルオキシダーゼ（POD）を用いた活性型レニン測定系における試薬の

調製および活性型レニンの測定－

ペルオキシダーゼ（POD）を用いた活性型レニンの測定系において、試薬の調製、ならびに各種安定化剤または水溶性色素を用いた活性型レニンの測定方法および評価方法を以下に示す。

[0119] ー実施例 15～27 および比較例 15～28 ー

（１）発光測定用試薬第１液の調製

（a）発光測定用試薬第１-A液の調製（実施例 15～27 および比較例 15～26）

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H) -ジオン, ナトリウム塩（和光純薬工業（株）製）15.6 mg および 4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール（和光純薬工業（株）製）3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、表 2 に示す各種安定化剤または水溶性色素を、化学発光測定時の終濃度が表 2 に示す所定濃度となるような量を添加し、さらに、2-ヒドロキシ-3- [4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸（HEPPSO）／水酸化ナトリウム緩衝液（250 mM、pH 8.55）20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を 100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第１-A液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

（b）発光測定用試薬第１-B液の調製（比較例 27）

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2H, 3H) -ジオン, ナトリウム塩（和光純薬工業（株）製）15.6 mg および 4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール（和光純薬工業（株）製）3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、2-ヒドロキシ-3- [4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸（HEPPSO）／水酸化ナトリウム緩衝液（250 mM、pH 8.55）20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を 100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第１-B液を調製した。測定に

用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

（c）発光測定用試薬第1-C液の調製（比較例28）

ルミノール、ナトリウム塩（和光純薬工業（株）製）40mgおよび4-（4-ヒドロキシフェニル）チアゾール（和光純薬工業（株）製）3.5mgを100mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、ホウ酸／水酸化ナトリウム緩衝液（250mM、pH8.55）20mLを添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-C液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0120] （2）磁性粒子を含有する試薬（抗レニンモノクローナル抗体（マウス）結合磁性粒子試薬）の調製

97重量%3-アミノプロピルトリエトキシシラン含有エタノール溶液50mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に磁性粒子（WO2012/173002号公報に記載の製造例1に準じて作製）12.5mLを加え、25℃で1時間反応させた後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した。次いで、10mMの酢酸緩衝液（pH5.1）50mLを加えて蓋をし、ポリエチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去して磁性粒子を洗浄した。この洗浄操作を4回行った。

この洗浄後の磁性粒子を、0.5重量%無水コハク酸エタノール溶液50mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、25℃で2時間反応させた。反応後、100mMの2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）緩衝液（pH5.0）50mLを加えて蓋をし、ポリエチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去して磁性粒子を洗浄した。この洗浄操作を4回行った。

さらに、この洗浄後の磁性粒子を、抗レニンモノクローナル抗体（マウス）（（株）ITM製）を200μg/mLの濃度で含む100mMのMES緩衝液（pH5.0）50mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、11

℃で15～25時間反応させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、MES緩衝液で洗浄した後、ブロッキング液 {0.5%ブロックエース (雪印乳業 (株) 製) を含む50 mMのMES緩衝液 (pH 5.5)} を加え、11℃で15時間反応させることにより、抗レニンモノクローナル抗体 (マウス) 結合磁性粒子を作製した。これを、50 mMのMES緩衝液 (pH 5.5) で、抗レニンモノクローナル抗体結合磁性粒子濃度として0.5 mg/mLの濃度となるように希釈し、抗体結合磁性粒子を含有する試薬 (抗レニンモノクローナル抗体 (マウス) 結合磁性粒子試薬) を調製し、測定に用いるまで冷蔵 (2～10℃) で保存した。

[0121] (3) 免疫反应用緩衝液の調製

50 mMの3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) 緩衝液 (pH 7.0) を調製し、免疫反应用緩衝液を得た。測定に用いるまで冷蔵 (2～10℃) で保存した。

[0122] (4) 酵素標識試薬 (ペルオキシダーゼ (POD) 標識抗レニンモノクローナル抗体 (マウス) 試薬) の調製

抗レニンモノクローナル抗体 (マウス) ((株) ITM製)、西洋ワサビ由来POD (ロシュ・ダイアグノスティックス (株) 製) を用い、文献 (S. YOSHITAKE, M. IMAGAWA, E. ISHIKAWA, H. OGAWA; J Biochem (1982) Vol. 92, (5): 1413-1424) に記載の方法でPOD標識抗レニンモノクローナル抗体 (マウス) を調製した。これを、50 mMのMES緩衝液 (pH 6.5) で、POD標識抗レニンモノクローナル抗体濃度として1.0 mL/Lの濃度となるように希釈し、酵素標識試薬 (POD標識抗レニンモノクローナル抗体 (マウス) 試薬) を調製し、測定に用いるまで冷蔵 (2～10℃) で保存した。

[0123] (5) 発光測定用試薬第2液の調製

過酸化水素水 (和光純薬工業 (株) 製、試薬特級、濃度30重量%) 67 μ Lを100 mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬

第2液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0124] （6）化学発光の測定

得られた各試薬を用いて、以下に示す測定方法により、実施例15～27および比較例15～28にかかる発光測定用試薬第1液に基づいて発光量（平均値）を測定し、各種安定化剤または水溶性色素の光安定化効果およびL-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響の有無を評価した。

まず、（1）で得られた発光測定用試薬第1液のうち、第1-A液および第1-B液については、それぞれ1 mLずつ5 mLの試験管2つにそれぞれ移し、一方については430～450 nmの蛍光灯の光に30分間晒し（露光発光測定用試薬第1液）、他方については試験管をアルミホイルで覆うことにより遮光した（遮光発光測定用試薬第1液）。第1-C液については、その1 mLを5 mLの試験管1つに移し、試験管をアルミホイルで覆うことにより遮光した（遮光発光測定用試薬第1液）。

次いで、抗体結合磁性粒子を含有する試薬（抗レニンモノクローナル抗体（マウス）結合磁性粒子試薬）10～50 μ g、1%の牛血清アルブミン含有の15 mMリン酸緩衝液（pH 7.2）で調製したレニン濃度が25 pg/mLの標準レニン溶液25 μ L、および免疫反应用緩衝液50 μ Lを試験管に加えて混合し、37℃で3分間反応させて、「抗レニンモノクローナル抗体（マウス）結合磁性粒子-レニン」複合体を形成させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した後、生理食塩水100 μ Lを加え、磁性粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液体を吸引除去する洗浄操作を3回行った。

続いて、酵素標識試薬（POD標識抗レニンモノクローナル抗体（マウス）試薬）50 μ Lを試験管に加え、37℃で3分間反応させて、「抗レニンモノクローナル抗体（マウス）結合磁性粒子-レニン-POD標識抗レニンモノクローナル抗体（マウス）」複合体を形成させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した後、生理食塩水100 μ Lを加え、磁性粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液

体を吸引除去する洗浄操作を2回行った。

最後に、露光発光測定用試薬第1液（1-A液、1-B液）または遮光発光測定用試薬第1液（1-A液、1-B液、1-C液）をそれぞれ100 μ Lと、発光測定用試薬第2液100 μ Lとを同時に加え、37℃で43秒間発光反応させ、発光測定用試薬第1液および第2液を同時に添加してから、43～45秒間での平均発光量を発光検出器（Lumat LB9507：ベルトールドジャパン製）で測定した。

[0125] （7）結果

得られた結果から、以下に示すように「安定化剤または水溶性色素の光安定化効果」および「ルミノールに対する相対感度」を算出し、各種安定化剤または水溶性色素の評価を行った。結果を表2にそれぞれ示す。

〈安定化剤または水溶性色素の光安定化効果〉

それぞれの発光測定用試薬第1液について、遮光発光測定用試薬第1液での平均発光量（遮光発光量）に対する露光発光測定用試薬第1液での平均発光量（露光発光量）の割合〔露光発光量／遮光発光量 $\times$ 100%＝発光量比〕を算出した。この発光量比に基づいて、各種安定化剤または水溶性色素の光安定化効果を評価した。

すなわち、発光量比が100%に近いほど、各種安定化剤または水溶性色素のL-012（のナトリウム塩）に対する光安定化効果が高いことを意味し、安定化剤または水溶性色素を添加していない発光測定用試薬第1-B液を用いた場合における発光量比が75%であったことから、80%以上の発光量比を示した発光測定用試薬第1-A液に含まれる安定化剤または水溶性色素を、光安定化効果が高く、露光時における測定感度の低下を抑制できる安定化剤または水溶性色素と評価した。

〈ルミノールに対する相対感度〉

それぞれの発光測定用試薬第1-A液および1-B液について、各発光測定用試薬第1-A液または1-B液での遮光発光量（L-012発光量）に対する発光測定用試薬第1-C液での遮光発光量（ルミノール発光量）の割合〔L-

012 発光量／ルミノール発光量×100％＝相対感度」を算出した。この相対感度に基づいて、各種安定化剤または水溶性色素の測定感度を評価した。

すなわち、ルミノール発光量（645，938 cps）よりも高いL-012 発光量を示した発光測定用試薬第1-A液は、測定感度が高く、ルミノール発光を利用した発光測定よりも、高感度での測定を可能にする試薬（L-012 発光試薬）と評価した。換言すれば、100％以上の相対感度を示した発光測定用試薬第1-A液に含まれる安定化剤または水溶性色素は、L-012 の発光強度に対して悪影響を及ぼすことなく、高感度測定が可能な安定化剤または水溶性色素であると評価した。

[0126] [表2]

例	試薬	安定化剤	濃度	発光量 (cps)		発光量比 (%)	相対感度 (%)
				遮光発光量	露光発光量		
実施例 15	1-A 液	アゾメチンH	0.01 μM	2,311,236	1,938,529	84	358
実施例 16	1-A 液		0.05 μM	2,024,893	1,687,683	83	313
実施例 17	1-A 液		0.1 μM	1,610,475	1,494,608	93	249
実施例 18	1-A 液	ニューコクシン	0.01 μM	2,380,233	2,049,963	86	368
実施例 19	1-A 液		0.05 μM	2,157,873	1,904,557	88	334
実施例 20	1-A 液		0.1 μM	2,151,333	2,023,040	94	333
実施例 21	1-A 液		0.5 μM	2,197,549	2,099,667	96	340
実施例 22	1-A 液		1 μM	2,229,813	2,036,992	91	345
実施例 23	1-A 液		5 μM	2,214,335	2,060,100	93	343
実施例 24	1-A 液		10 μM	2,104,899	1,833,925	87	326
実施例 25	1-A 液		50 μM	1,853,872	1,674,785	90	287
実施例 26	1-A 液		100 μM	1,540,606	1,404,465	91	239
実施例 27	1-A 液	タートラジン	500 μM	836,626	671,949	80	130
比較例 15	1-A 液	N-ベンゾイルH酸, 1K, 1Na	0.1 μM	2,062,977	1,516,790	74	319
比較例 16	1-A 液		1 μM	1,197,130	909,074	76	185
比較例 17	1-A 液		10 μM	265,028	181,549	69	41
比較例 18	1-A 液		500 μM	352	311	88	0.05
比較例 19	1-A 液	アリザリンイエロー-GG	0.1 μM	2,035,000	1,542,823	76	315
比較例 20	1-A 液		1 μM	2,232,120	1,591,077	71	346
比較例 21	1-A 液		10 μM	2,231,313	1,632,327	73	345
比較例 22	1-A 液		500 μM	2,135,540	1,593,240	75	331
比較例 23	1-A 液	クレゾールレッド	0.1 μM	2,148,887	1,683,293	78	333
比較例 24	1-A 液		1 μM	2,219,140	1,394,507	63	344
比較例 25	1-A 液		10 μM	2,022,827	1,468,023	73	313
比較例 26	1-A 液		500 μM	130,327	133,218	102	20
比較例 27	1-B 液	—	—	2,213,420	1,668,553	75	343
比較例 28	1-C 液	—	—	645,938	—	—	—

アゾメチンH：4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2,7-ナフタレンジルスルホン酸
 ニューコクシン：7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1,3-ナフタレンジルスルホン酸，3ナトリウム塩
 タートラジン：4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-1H-ピラゾール-3-カルボン酸，3ナトリウム塩
 N-ベンゾイルH酸，1K，1Na：4-ベンゾイルアミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジルスルホン酸，1カリウム，1ナトリウム塩
 アリザリンイエロー-GG：4-ヒドロキシ-3'-ニトロアゾベンゼン-3-カルボン酸，ナトリウム塩
 クレゾールレッド：3,3-ビス(3-メチル-4-ヒドロキシフェニル)-3H-2,1-ベンゾオキサチオール 1,1-ジオキシド

[0127] 表2の結果から、本発明の安定化剤である、アゾメチンH、ニューコクシンおよびタートラジンは、露光による測定感度の低下を抑制できる効果（光安定化効果）と、L-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響が少なく、高感度測定が可能であるという効果の両方を有していることがわかった。

[0128] ペルオキシダーゼ（POD）を用いたHBs抗体測定系における試薬の調製およびHBs抗体の測定－

ペルオキシダーゼ（POD）を用いたHBs抗体の測定系において、試薬の調製、ならびに各種安定化剤または水溶性色素を用いたHBs抗体の測定方法および評価方法を以下に示す。

[0129] ー実施例28～43および比較例29～30－

（1）発光測定用試薬第1液の調製

（a）発光測定用試薬第1-A液の調製（実施例28～43）

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジン-1, 4(2H, 3H)-ジオン, ナトリウム塩（和光純薬工業（株）製）15.6mgおよび4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール（和光純薬工業（株）製）3.5mgを100mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、表3に示す各種安定化剤または水溶性色素を、化学発光測定時の終濃度が表3に示す所定濃度となるような量を添加し、さらに、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸（HEPPSO）／水酸化ナトリウム緩衝液（250mM、pH8.55）20mLを添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-A液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

（b）発光測定用試薬第1-B液の調製（比較例29）

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジン-1, 4(2H, 3H)-ジオン, ナトリウム塩（和光純薬工業（株）製）15.6mgおよび4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール（和光純薬工業（株）製）

） 3. 5 m g を 1 0 0 m L メスフラスコに仕込んだ。次いで、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸（HEPPSO）／水酸化ナトリウム緩衝液（250 mM、pH 8.55）20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-B液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

（c）発光測定用試薬第1-C液の調製（比較例30）

ルミノール、ナトリウム塩（和光純薬工業（株）製）40 mg および4-(4-ヒドロキシフェニル)チアゾール（和光純薬工業（株）製）3.5 mg を100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、ホウ酸／水酸化ナトリウム緩衝液（250 mM、pH 8.55）20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-C液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0130] （2）磁性粒子を含有する試薬（HBs抗原結合磁性粒子試薬）の調製

97重量%3-アミノプロピルトリエトキシシラン含有エタノール溶液50 mL の入った蓋付きポリエチレン瓶に磁性粒子（WO2012/173002号公報に記載の製造例1に準じて作製）12.5 mL を加え、25℃で1時間反応させた後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した。次いで、10 mM の酢酸緩衝液（pH 5.1）50 mL を加えて蓋をし、ポリエチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去して磁性粒子を洗浄した。この洗浄操作を4回行った。

この洗浄後の磁性粒子を、25重量%グルタルアルデヒド1 mL／炭酸水素ナトリウム緩衝液9 mL の入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、25℃で1時間反応させた。反応後、蒸留水を加えて蓋をし、ポリエチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去して磁性粒子を洗浄した。この洗浄操作を3回行っ

た。

さらに、この洗浄後の磁性粒子を、HBs抗原（TRINA BIOREACTIVES AG製）を2.24 mg/mLの濃度で含む15 mMのリン酸緩衝液（pH 7.2）8 mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、25℃で2時間反応させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、生理食塩水で洗浄した後、ブロッキング液（0.5%ブロックエースを含む50 mMのMES緩衝液（pH 5.5））を加え、37℃で15～25時間反応させることにより、HBs抗原結合磁性粒子を作製した。これを、ブロックエース（雪印乳業（株）製）0.5%を含む50 mMの3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）緩衝液（pH 7.5）で、HBs抗原結合磁性粒子濃度として0.5 mg/mLの濃度となるように希釈し、抗原結合磁性粒子を含有する試薬（HBs抗原結合磁性粒子試薬）を調製し、測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0131] （3）酵素標識試薬（ペルオキシダーゼ（POD）標識HBs抗原試薬）の調製

HBs抗原（TRINA BIOREACTIVES AG製）、西洋ワサビ由来POD（ロシュ・ダイアグノスティックス（株）製）を用い、文献（S. YOSHITAKE, M. IMAGAWA, E. ISHIKAWA, H. OGAWA; J Biochem (1982) Vol. 92, (5): 1413-1424）に記載の方法でPOD標識HBs抗原を調製した。これを、50 mMのMES緩衝液（pH 6.8）で、POD標識HBs抗原濃度として1.0 mL/Lの濃度となるように希釈し、酵素標識試薬（POD標識HBs抗原試薬）を調製し、測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0132] （4）発光測定用試薬第2液の調製

過酸化水素水（和光純薬工業（株）製、試薬特級、濃度30重量%）67 μ Lを100 mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第2液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0133] （5）化学発光の測定

得られた各試薬を用いて、以下に示す測定方法により、実施例 28～43 および比較例 29～30 にかかる発光測定用試薬第 1 液に基づいて発光量（平均値）を測定し、各種安定化剤または水溶性色素の光安定化効果および L-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響の有無を評価した。

まず、(1) で得られた発光測定用試薬第 1 液（1-A 液、1-B 液、1-C 液）を 1 mL ずつ 5 mL の試験管 2 つにそれぞれ移し、一方については 430～450 nm の蛍光灯の光に 30 分間晒し（露光発光測定用試薬第 1 液）、他方については試験管をアルミホイルで覆うことにより遮光した（遮光発光測定用試薬第 1 液）。

次いで、抗原結合磁性粒子を含有する試薬（HBs 抗原結合磁性粒子試薬）10～50 μ g、および 2% の牛血清アルブミン含有の 50 mM MOPS 緩衝液（pH 7.5）で調製した HBs 抗体濃度が 250 mIU/mL の標準 HBs 抗体溶液 25 μ L を試験管に加えて混合し、37℃で 3 分間反応させて、「HBs 抗原結合磁性粒子-HBs 抗体」複合体を形成させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した後、生理食塩水 100 μ L を加え、磁性粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液体を吸引除去する洗浄操作を 3 回行った。

続いて、酵素標識試薬（POD 標識 HBs 抗原試薬）50 μ L を試験管に加え、37℃で 3 分間反応させて、「HBs 抗原結合磁性粒子-HBs 抗体-POD 標識 HBs 抗原」複合体を形成させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した後、生理食塩水 100 μ L を加え、磁性粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液体を吸引除去する洗浄操作を 2 回行った。

最後に、露光発光測定用試薬第 1 液（1-A 液、1-B 液、1-C 液）または遮光発光測定用試薬第 1 液（1-A 液、1-B 液、1-C 液）をそれぞれ 100 μ L と、発光測定用試薬第 2 液 100 μ L とを同時に加え、37℃で 43 秒間発光反応させ、発光測定用試薬第 1 液および第 2 液を同時に添加してから、43～45 秒間での平均発光量を発光検出器（Lumat LB9507：ベルトール

ドジャパン製)で測定した。

[0134] (6) 結果

得られた結果から、以下に示すように「安定化剤または水溶性色素の光安定化効果」および「ルミノールに対する相対感度」を算出し、各種安定化剤または水溶性色素の評価を行った。結果を表3にそれぞれ示す。

〈安定化剤または水溶性色素の光安定化効果〉

それぞれの発光測定用試薬第1液について、遮光発光測定用試薬第1液での平均発光量(遮光発光量)に対する露光発光測定用試薬第1液での平均発光量(露光発光量)の割合〔 $\text{露光発光量} / \text{遮光発光量} \times 100\% = \text{発光量比}$ 〕を算出した。この発光量比に基づいて、各種安定化剤または水溶性色素の光安定化効果を評価した。

すなわち、発光量比が100%に近いほど、各種安定化剤または水溶性色素のL-012(のナトリウム塩)に対する光安定化効果が高いことを意味し、安定化剤または水溶性色素を添加していない発光測定用試薬第1-B液を用いた場合における発光量比が67%であったことから、72%以上の発光量比を示した発光測定用試薬第1-A液に含まれる安定化剤または水溶性色素を、光安定化効果が高く、露光時における測定感度の低下を抑制できる安定化剤または水溶性色素と評価した。

〈ルミノールに対する相対感度〉

それぞれの発光測定用試薬第1-A液および1-B液について、各発光測定用試薬第1-A液または1-B液での遮光発光量(L-012発光量)に対する発光測定用試薬第1-C液での遮光発光量(ルミノール発光量)の割合〔 $\text{L-012発光量} / \text{ルミノール発光量} \times 100\% = \text{相対感度}$ 〕を算出した。この相対感度に基づいて、各種安定化剤または水溶性色素の測定感度を評価した。

すなわち、ルミノール発光量(321, 482 cps)よりも高いL-012発光量を示した発光測定用試薬第1-A液は、測定感度が高く、ルミノール発光を利用した発光測定よりも、高感度での測定を可能にする試薬(L-01

2 発光試薬) と評価した。換言すれば、100%以上の相対感度を示した発光測定用試薬第1-A液に含まれる安定化剤または水溶性色素は、L-012の発光強度に対して悪影響を及ぼすことなく、高感度測定が可能な安定化剤または水溶性色素であると評価した。

[0135] [表3]

例	試薬	安定化剤	濃度	発光量 (cps)		発光量比 (%)	相対感度 (%)
				遮光発光量	露光発光量		
実施例 28	1-A 液	アゾメチンH	0.05 μ M	634,920	526,277	83	197
実施例 29	1-A 液		0.1 μ M	512,987	424,889	83	160
実施例 30	1-A 液	ニューコクシン	0.05 μ M	801,594	618,200	77	249
実施例 31	1-A 液		0.1 μ M	855,859	623,586	73	266
実施例 32	1-A 液		0.5 μ M	824,050	603,028	73	256
実施例 33	1-A 液		1 μ M	822,063	599,850	73	256
実施例 34	1-A 液	スルファニル酸アゾクロムトロップ	1 μ M	826,752	647,482	78	257
実施例 35	1-A 液		10 μ M	717,446	643,437	90	223
実施例 36	1-A 液	メタニルイエロー	1 μ M	826,491	606,059	73	257
実施例 37	1-A 液		10 μ M	792,933	668,537	84	247
実施例 38	1-A 液	ボンソーS	1 μ M	833,179	686,334	82	259
実施例 39	1-A 液		10 μ M	777,020	654,278	84	242
実施例 40	1-A 液		100 μ M	570,843	485,055	85	178
実施例 41	1-A 液	タートラジン	1 μ M	866,469	688,004	79	270
実施例 42	1-A 液		10 μ M	840,689	694,914	83	262
実施例 43	1-A 液		100 μ M	675,466	600,330	89	210
比較例 29	1-B 液	—	—	881,359	590,311	67	274
比較例 30	1-C 液	—	—	321,482	313,358	97	—

アゾメチンH: 4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2,7-ナフタレンジルホン酸
 ニューコクシン: 7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1,3-ナフタレンジルホン酸, 3ナトリウム塩
 スルファニル酸アゾクロムトロップ: 2-(4-スルホフェニルアゾ)-1,8-ジヒドロキシ-3,6-ナフタレンジルホン酸, 3ナトリウム塩
 メタニルイエロー: 3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸, ナトリウム塩
 ボンソーS: 3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2,7-ナフタレンジルホン酸, 4ナトリウム塩
 タートラジン: 4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-1H-ピラゾール-3-カルボン酸, 3ナトリウム塩

[0136] 表3の結果から、本発明の安定化剤である、アゾメチンH、ニューコクシン、スルファニル酸アゾクロムトロップ、メタニルイエロー、ボンソーSおよびタートラジンのいずれにおいても、露光による測定感度の低下を抑制できる効果（光安定化効果）と、L-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響が少なく、高感度測定が可能であるという効果の両方を有していることがわかった。

[0137] ペルオキシダーゼ（POD）を用いたアルドステロン測定系における試薬の調製およびアルドステロンの測定—

ペルオキシダーゼ（POD）を用いたアルドステロンの測定系において、試薬の調製、ならびに各種安定化剤または水溶性色素を用いたアルドステロ

ンの測定方法および評価方法を以下に示す。

[0138] ー実施例 4 4 ～ 4 7 および比較例 3 1 ～ 3 6 ー

(1) 発光測定用試薬第 1 液の調製

(a) 発光測定用試薬第 1-A 液の調製 (実施例 4 4 ～ 4 7)

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン, ナトリウム塩 (和光純薬工業 (株) 製) 15.6 mg および 4-(4-ヒドロキシフェニル) チアゾール (和光純薬工業 (株) 製) 3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、アゾメチン H を、化学発光測定時の終濃度が表 4 に示す所定濃度となるような量を添加し、さらに、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸 (EPPS) / 水酸化ナトリウム緩衝液 (250 mM、pH 8.0) 20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を 100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第 1-A 液を調製した。測定に用いるまで冷蔵 (2～10℃) で保存した。

(b) 発光測定用試薬第 1-B 液の調製 (比較例 3 1 ～ 3 3)

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオン, ナトリウム塩 (和光純薬工業 (株) 製) 15.6 mg および 4-(4-ヒドロキシフェニル) チアゾール (和光純薬工業 (株) 製) 3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸 (EPPS) / 水酸化ナトリウム緩衝液 (250 mM、pH 8.0) 20 mL を添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を 100 mL にメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第 1-B 液を調製した。測定に用いるまで冷蔵 (2～10℃) で保存した。

(c) 発光測定用試薬第 1-C 液の調製 (比較例 3 4 ～ 3 6)

ルミノール, ナトリウム塩 (和光純薬工業 (株) 製) 40 mg および 4-(4-ヒドロキシフェニル) チアゾール (和光純薬工業 (株) 製) 3.5 mg を 100 mL メスフラスコに仕込んだ。次いで、ホウ酸 / 水酸化ナトリウム緩

衝液（250 mM、pH 8.55）20 mLを添加した後、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25℃で均一に混合して発光測定用試薬第1-C液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）で保存した。

[0139] （2）磁性粒子を含有する試薬（抗マウスIgGポリクローナル抗体（ヤギ）結合磁性粒子試薬）の調製

97重量%3-アミノプロピルトリエトキシシラン含有エタノール溶液80 mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に磁性粒子（WO2012/173002号公報に記載の製造例1に準じて作製）20 mLを加え、25℃で1時間反応させた後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した。次いで、10 mMの酢酸緩衝液（pH 5.1）80 mLを加えて蓋をし、ポリエチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去して磁性粒子を洗浄した。この洗浄操作を4回行った。

この洗浄後の磁性粒子を、0.5重量%無水コハク酸エタノール溶液80 mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、25℃で2時間反応させた。反応後、100 mMの2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）緩衝液（pH 5.0）80 mLを加えて蓋をし、ポリエチレン瓶をゆっくりと2回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去して磁性粒子を洗浄した。この洗浄操作を4回行った。

さらに、この洗浄後の磁性粒子を、抗マウスIgGポリクローナル抗体（ヤギ）（Jackson ImmunoResearch製）を100 μg/mLの濃度で含む100 mMのMES緩衝液（pH 5.0）80 mLの入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、25℃で15～25時間反応させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、MES緩衝液で洗浄した後、0.03%グルタルアルデヒド水溶液8 mLを加えて、25℃で2時間反応させた。次いで、水素化ホウ素ナトリウム19.2 mgを加えて、25℃で30分反応させた後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、MES緩衝液で洗浄した後、ブロッキング

液 {0.5% ブロックエース (雪印乳業 (株) 製) を含む 50 mM の MES 緩衝液 (pH 5.5)} を加え、25℃ で 15 ~ 25 時間反応させることにより、抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (ヤギ) 結合磁性粒子を作製した。さらに、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、ブロッキング液をアスピレーターで吸引除去した後、これを、MES 緩衝液 (pH 5.5) で、抗マウス IgG ポリクローナル抗体結合磁性粒子濃度として 0.5 mg/mL の濃度となるように希釈し、抗体結合磁性粒子を含有する試薬 (抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (ヤギ) 結合磁性粒子試薬) を調製し、測定に用いるまで冷蔵 (2 ~ 10℃) で保存した。

[0140] (3) 免疫反应用緩衝液 (抗アルドステロンモノクローナル抗体 (マウス) 含有緩衝液) の調製

200 mM の N- [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] グリシン (Tricine) 緩衝液 (pH 8.2) 100 mL に、抗アルドステロンモノクローナル抗体 (マウス) ((株) ITM 製) 0.1 mL を添加した後、25℃ で 5 分間攪拌することにより、抗アルドステロンモノクローナル抗体 (マウス) を 1 mL/L の濃度で含む 200 mM の N- [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] グリシン緩衝液 (pH 8.2) を調製し、免疫反应用緩衝液を得た。測定に用いるまで冷蔵 (2 ~ 10℃) で保存した。

[0141] (4) 酵素標識試薬 (ペルオキシダーゼ (POD) 標識アルドステロン抗原試薬) の調製

アルドステロン抗原 (SIGMA ALDRICH 製)、西洋ワサビ由来 POD (ロシュ・ダイアグノスティックス (株) 製) を用い、文献 (S. YOSHITAKE, M. IMAGAWA, E. ISHIKAWA, H. OGAWA; J Biochem (1982) Vol. 92, (5): 1413-1424) に記載の方法で POD 標識アルドステロン抗原を調製した。これを、50 mM の N- (2-アセトアミド) -2-アミノエタンスルホン酸 (ACES) 緩衝液 (pH 7.2) で、POD 標識アルドステロン抗原濃度として 1.0 mL/L の濃度となるように希釈し、酵素標識試薬 (POD 標識アルドステロン抗原試薬) を調製し、測定に用いるまで冷蔵 (2 ~ 10℃) で保存した。

[0142] (5) 発光測定用試薬第2液の調製

過酸化水素水（和光純薬工業（株）製、試薬特級、濃度30重量%）67 μL を100 mLメスフラスコに仕込んだ。次いで、蒸留水を用いて溶液の容量を100 mLにメスアップし、25°Cで均一に混合して発光測定用試薬第2液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10°C）で保存した。

[0143] (6) 化学発光の測定

得られた各試薬を用いて、以下に示す測定方法により、実施例44～47および比較例31～36にかかる発光測定用試薬第1液に基づいて発光量（平均値）を測定し、アゾメチンHの光安定化効果およびL-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響の有無を評価した。

まず、(1)で得られた発光測定用試薬第1液のうち、第1-A液および第1-B液については、それぞれ1 mLずつ5 mLの試験管2つにそれぞれ移し、一方については430～450 nmの蛍光灯の光に30分間晒し（露光発光測定用試薬第1液）、他方については試験管をアルミホイルで覆うことにより遮光した（遮光発光測定用試薬第1液）。第1-C液については、その1 mLを5 mLの試験管1つに移し、試験管をアルミホイルで覆うことにより遮光した（遮光発光測定用試薬第1液）。

次いで、抗体結合磁性粒子を含有する試薬（抗マウスIgGポリクローナル抗体（ヤギ）結合磁性粒子試薬）10～50 μg 、1%の牛血清アルブミン含有の15 mMリン酸緩衝液（pH 7.2）で調製したアルドステロン濃度が0～800 pg/mLの標準アルドステロン溶液25 μL 、および免疫反应用緩衝液50 μL を試験管に加えて混合し、37°Cで3分間反応させた後、さらに、酵素標識試薬（POD標識アルドステロン抗原試薬）50 μL を試験管に加え、37°Cで3分間反応させて、「抗マウスIgGポリクローナル抗体（ヤギ）結合磁性粒子-抗アルドステロンモノクローナル抗体（マウス）-POD標識アルドステロン抗原」複合体を形成させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性粒子を集磁し、液体をアスピレーターで吸引除去した後、生理食塩水100 μL を加え、磁性粒子を分散させて集磁後、アスピレー

ターで液体を吸引除去する洗浄操作を2回行った。

最後に、露光発光測定用試薬第1液（1-A液、1-B液）または遮光発光測定用試薬第1液（1-A液、1-B液、1-C液）をそれぞれ100 μ Lと、発光測定用試薬第2液100 μ Lとを同時に加え、37℃で43秒間発光反応させ、発光測定用試薬第1液および第2液を同時に添加してから、43～45秒間での平均発光量を発光検出器（Lumat LB9507：ベルトールドジャパン製）で測定した。

[0144] （7）結果

得られた結果から、以下に示すように「アゾメチンH（安定化剤）の光安定化効果」および「ルミノールに対する相対感度」を算出し、アゾメチンH（安定化剤）の評価を行った。結果を表4にそれぞれ示す。

〈アゾメチンH（安定化剤）の光安定化効果〉

それぞれの発光測定用試薬第1液について、遮光発光測定用試薬第1液での平均発光量（遮光発光量）に対する露光発光測定用試薬第1液での平均発光量（露光発光量）の割合〔露光発光量／遮光発光量 $\times$ 100%＝発光量比〕を算出した。この発光量比に基づいて、アゾメチンH（安定化剤）の光安定化効果を評価した。

すなわち、発光量比が100%に近いほど、アゾメチンH（安定化剤）のL-012（のナトリウム塩）に対する光安定化効果が高いことを意味し、表4に示す各アルドステロン濃度において、アゾメチンH（安定化剤）を添加していない発光測定用試薬第1-B液を用いた場合における発光量比よりも高い発光量比を示すか否かを判定し、アルドステロンの濃度範囲と光安定化効果との関係性を評価した。

〈ルミノールに対する相対感度〉

それぞれの発光測定用試薬第1-A液および1-B液について、各発光測定用試薬第1-A液または1-B液での遮光発光量（L-012発光量）に対する発光測定用試薬第1-C液での遮光発光量（ルミノール発光量）の割合〔L-012発光量／ルミノール発光量 $\times$ 100%＝相対感度〕を算出した。この

相対感度に基づいて、アゾメチンH（安定化剤）の測定感度を評価した。

すなわち、表4に示す各アルドステロン濃度において、ルミノール発光量よりも高いL-012発光量を示すか否かを判定し、アルドステロンの濃度範囲と測定感度との関係性を評価した。

[0145] [表4]

例	試薬	ALD標準液	安定化剤	濃度	発光量 (cps)		発光量比 (%)	相対感度 (%)
					遮光発光量	露光発光量		
実施例 44	1-A 液	0 pg/mL	アゾメチンH	0.1 μ M	1,652,310	1,407,817	85	337
実施例 45	1-A 液			0.5 μ M	503,287	575,777	114	103
実施例 46	1-A 液	100 pg/mL		0.1 μ M	1,137,125	1,227,820	108	286
実施例 47	1-A 液	800 pg/mL		0.1 μ M	140,838	165,479	117	168
比較例 31	1-B 液	0 pg/mL	—	—	2,834,737	1,841,217	65	578
比較例 32	1-B 液	100 pg/mL	—	—	2,246,053	1,438,727	64	565
比較例 33	1-B 液	800 pg/mL	—	—	454,355	223,750	49	542
比較例 34	1-C 液	0 pg/mL	—	—	490,198	—	—	—
比較例 35	1-C 液	100 pg/mL	—	—	397,365	—	—	—
比較例 36	1-C 液	800 pg/mL	—	—	83,790	—	—	—

ALD：アルドステロン
アゾメチンH：4-ヒドロキシ-5-(ザリチリデンアミノ)-2,7-ナフタレンジスルホン酸

[0146] 表4の結果から、本発明の安定化剤であるアゾメチンHは、アルドステロンの濃度が0～800 pg/mLと、幅広い濃度範囲において、露光による測定感度の低下を抑制できる効果（光安定化効果）と、L-012（のナトリウム塩）の発光強度に対する影響が少なく、高感度測定が可能であるという効果の両方を有していることから、本発明の安定化剤は、目的物質（測定対象物質）の濃度によらず、光安定化効果と高感度測定が可能であるという効果の両方を有していることがわかった。

[0147] 表1～表4の結果から、本発明の安定化剤である、アゾメチンH、ニューコクシン、スルファニル酸アゾクロムトロップ、メタニルイエロー、ポンソーSおよびタートラジンのいずれをL-012またはその塩の安定化剤として用いた場合でも、安定化剤を用いない場合と比べて、高い発光量比を示すことから、本発明の安定化剤は、露光によるL-012またはその塩の劣化（分解）を抑制している（光安定化効果を有する）ことがわかった。故に、化学発光測定において、L-012またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）に本発明の安定化剤を共存させれば、露光による測定感度の低下を抑制できるため、L-012またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）を遮光する必要

がなくなり、より簡便に測定に供することができるのである。さらに、本発明の安定化剤は、L-O 1 2 またはその塩そのものの発光量には、悪影響を及ぼしにくく、ルミノール発光を利用した発光測定に比べて、高感度での測定が可能であることがわかった。故に、化学発光測定において、L-O 1 2 またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）に本発明の安定化剤を共存させれば、測定に悪影響を及ぼすことなく、高感度で精度よく目的物質（測定対象物質）を測定できるのである。また、これらの安定化剤のなかでも、アゾメチンHおよびニューコクシンは、概して光安定化効果が高く、測定系によらず高感度で精度よく目的物質（測定対象物質）を測定できることがわかった。その一方で、N-ベンゾイルH酸、1カリウム、1ナトリウム塩、アリザリンイエローG Gおよびクレゾールレッド等の水溶性色素は、光安定化効果が得られないか、あるいは測定に悪影響を及ぼしてしまい、目的物質（測定対象物質）を精度よく測定できないことがわかった。上述したような効果は、安定化剤の極大吸収波長と相関しないことを考慮すると、安定化剤の構造と関係があるものと示唆される。

[0148] 以上のことから、本発明の安定化剤のみが、L-O 1 2 またはその塩の安定化効果と測定に悪影響を及ぼさないという効果の両方を有していることがわかった。故に、化学発光測定において、L-O 1 2 またはその塩を含む測定溶液（発光基質液）に本発明の安定化剤を共存させれば、生体中の種々の目的物質（測定対象物質）を高感度で精度よく、なおかつ、簡便に測定できることがわかった。

産業上の利用可能性

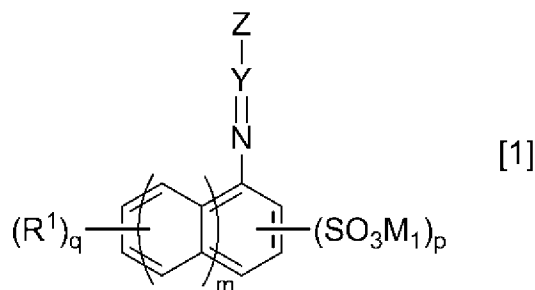
[0149] 本発明の一般式〔1〕で示される安定化剤は、化学発光物質であるL-O 1 2 またはその塩の露光による分解（劣化）を抑制できる化合物であり、化学発光測定において、L-O 1 2 またはその塩に本発明の安定化剤を共存させることで、露光によるL-O 1 2 またはその塩の分解（劣化）を抑制してL-O 1 2 またはその塩を長期間安定化し、ひいてはL-O 1 2 またはその塩の発光強度の減少（測定感度の低下）を抑制できるものである。

[0150] また、本発明の組成物および本発明の発光測定用キットは、L-O 1 2 またはその塩と、上述の一般式 [1] で示される化合物（本発明の安定化剤）を含むものであり、該組成物または該キットの製造過程やその使用時（測定時）において、露光によるL-O 1 2 またはその塩の発光強度の減少（測定感度の低下）が抑制されており、なおかつ、L-O 1 2 またはその塩そのものの発光量には悪影響を及ぼしにくいため、例えば化学発光測定においてこれを用いれば、生体中の目的物質（測定対象物質）を高感度で精度よく、かつ簡便に測定することができるものである。

請求の範囲

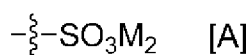
〔請求項1〕 一般式〔1〕で示される、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド
〔3, 4-d〕ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオンまたはその
塩の安定化剤。

一般式〔1〕：



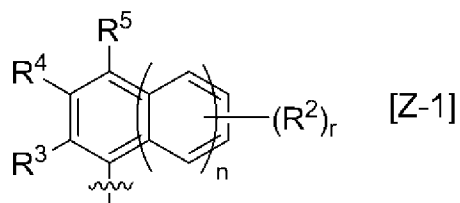
(式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式〔A〕で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0 または 1 を表し、 p は、1 ~ 3 の整数を表し、 q は、0 ~ 4 の整数を表し、 Y は、窒素原子または CH 基 (メチン基) を表し、 Z は、一般式〔Z-1〕で示される基、一般式〔Z-2〕で示される基または一般式〔Z-3〕で示される基を表す。)

一般式〔A〕：



(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

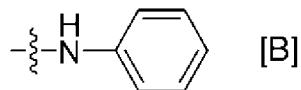
一般式〔Z-1〕：



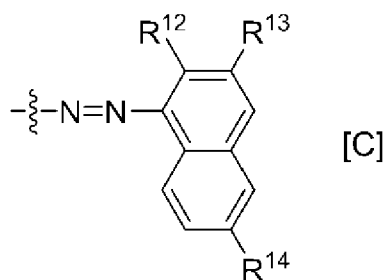
(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式〔A〕で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または前記一般式〔A〕

で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式[B]で示されるフェニルアミノ基または一般式[C]で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0または1を表し、 r は、0～4の整数を表す。）

式[B]：

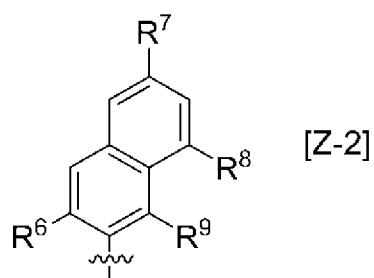


一般式[C]：



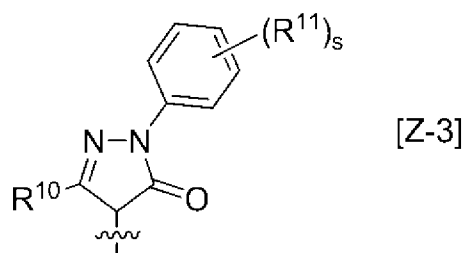
(式中、 $R^{12} \sim R^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式[A]で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式[Z-2]：



(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式[A]で示されるスルホン酸基を表す。)

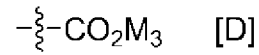
一般式[Z-3]：



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式[D]で示されるカルボン

酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5 の整数を表す。)

一般式 [D] :

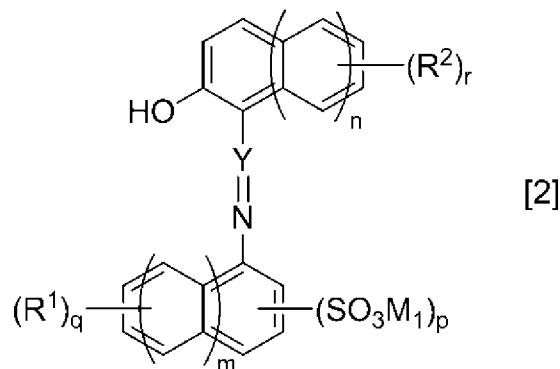


(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[請求項2]

前記一般式 [1] で示される安定化剤が、一般式 [2] で示されるものである、請求項 1 に記載の安定化剤。

一般式 [2] :

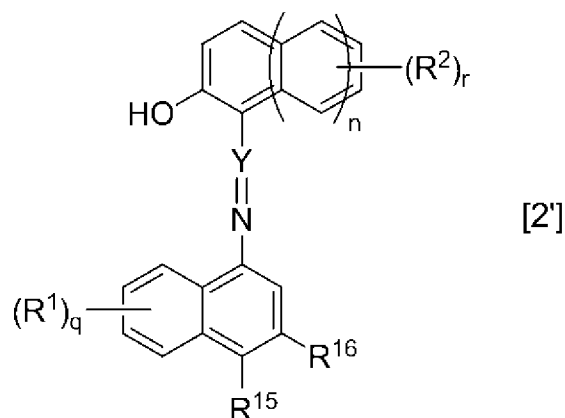


(式中、 p 個の M_1 、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 m 、 n 、 p 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。)

[請求項3]

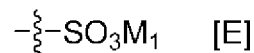
前記一般式 [1] で示される安定化剤が、一般式 [2'] で示されるものである、請求項 1 に記載の安定化剤。

一般式 [2'] :



(式中、 R^{15} および R^{16} はそれぞれ独立して、水素原子または一般式 [E] で示されるスルホン酸基を表し、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 n 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。ただし、 R^{15} および R^{16} のうち、少なくとも 1 つは一般式 [E] で示されるスルホン酸基である。)

一般式 [E] :



(式中、 M_1 は、前記に同じ。)

[請求項4]

前記一般式 [1] で示される安定化剤が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、2-(4-スルホフェニルアゾ)-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸またはその塩、3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[4-(4-スルホフェニル)アゾ]-1 H-ピラゾール-3-カルボン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項1に記載の安定化剤。

[請求項5]

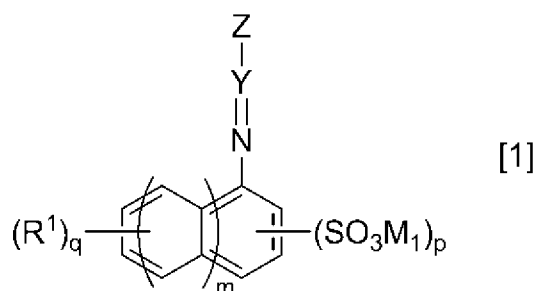
前記一般式 [1] で示される安定化剤が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項1に記載の安定化剤。

[請求項6]

8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオンまたはその塩に、一般式 [1] で示される化合物を共存させる、8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオンまたはその

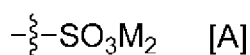
塩の安定化方法。

一般式 [1] :



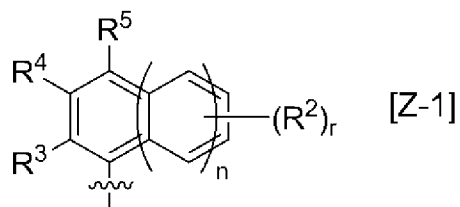
(式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0 または 1 を表し、 p は、1～3 の整数を表し、 q は、0～4 の整数を表し、 Y は、窒素原子または CH 基 (メチン基) を表し、 Z は、一般式 [Z-1] で示される基、一般式 [Z-2] で示される基または一般式 [Z-3] で示される基を表す。)

一般式 [A] :



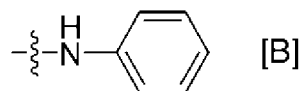
(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

一般式 [Z-1] :

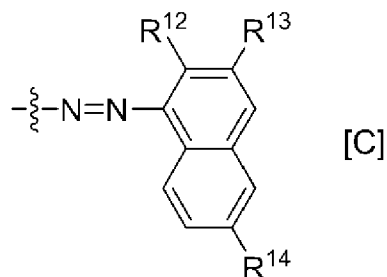


(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式 [B] で示されるフェニルアミノ基または一般式 [C] で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0 または 1 を表し、 r は、0～4 の整数を表す。)

式 [B] :

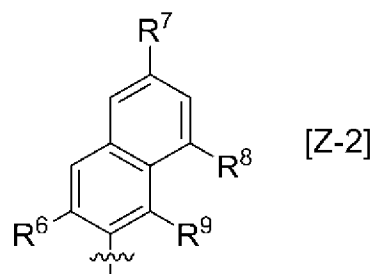


一般式 [C] :



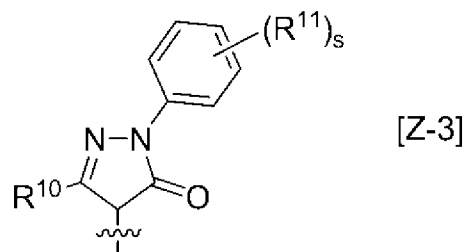
(式中、 $R^{12} \sim R^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-2] :



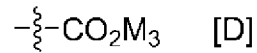
(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-3] :



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式 [D] で示されるカルボン酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5の整数を表す。)

一般式 [D] :

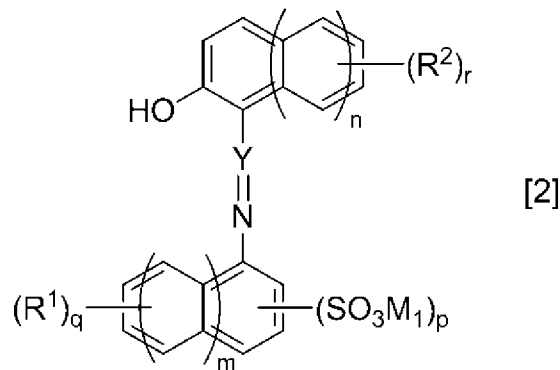


(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[請求項7]

前記一般式 [1] で示される化合物が、一般式 [2] で示されるものである、請求項6に記載の安定化方法。

一般式 [2] :

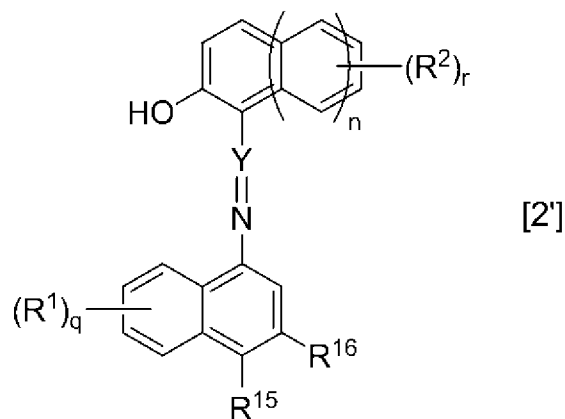


(式中、 p 個の M_1 、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 m 、 n 、 p 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。)

[請求項8]

前記一般式 [1] で示される化合物が、一般式 [2'] で示されるものである、請求項6に記載の安定化方法。

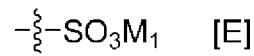
一般式 [2'] :



(式中、 R^{15} および R^{16} はそれぞれ独立して、水素原子または一般式 [E] で示されるスルホン酸基を表し、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 n 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。ただし、 R^{15} および R^{16} のう

ち、少なくとも1つは一般式[E]で示されるスルホン酸基である。
)

一般式[E] :



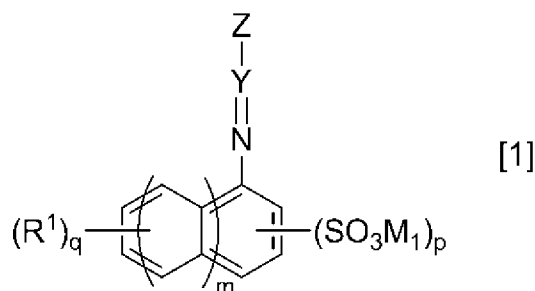
(式中、 M_1 は、前記に同じ。)

[請求項9] 前記一般式[1]で示される化合物が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、2-(4-スルホフェニルアゾ)-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸またはその塩、3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[4-(4-スルホフェニル)アゾ]-1 H-ピラゾール-3-カルボン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項6に記載の安定化方法。

[請求項10] 前記一般式[1]で示される化合物が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項6に記載の安定化方法。

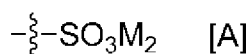
[請求項11] 8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3, 4-d]ピリダジン-1, 4(2H, 3H)-ジオンまたはその塩と、一般式[1]で示される化合物を含む、組成物。

一般式[1] :



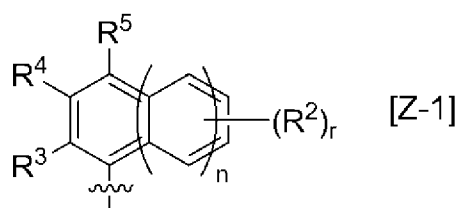
(式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0 または 1 を表し、 p は、1～3 の整数を表し、 q は、0～4 の整数を表し、 Y は、窒素原子または CH 基 (メチン基) を表し、 Z は、一般式 [Z-1] で示される基、一般式 [Z-2] で示される基または一般式 [Z-3] で示される基を表す。)

一般式 [A] :



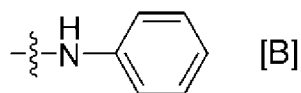
(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

一般式 [Z-1] :

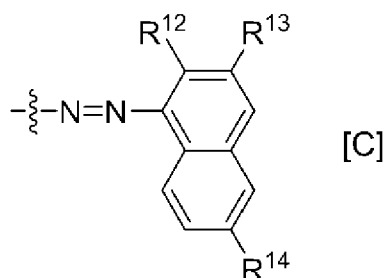


(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式 [B] で示されるフェニルアミノ基または一般式 [C] で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0 または 1 を表し、 r は、0～4 の整数を表す。)

式 [B] :

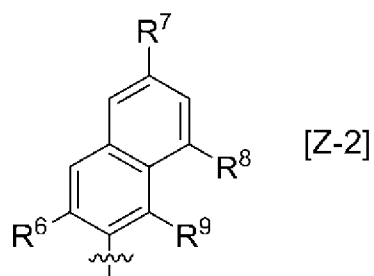


一般式 [C] :



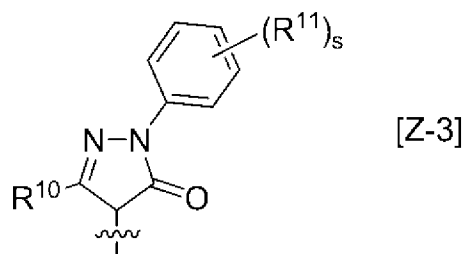
(式中、 $R^{12} \sim R^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-2] :



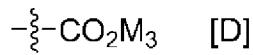
(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-3] :



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式 [D] で示されるカルボン酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5の整数を表す。)

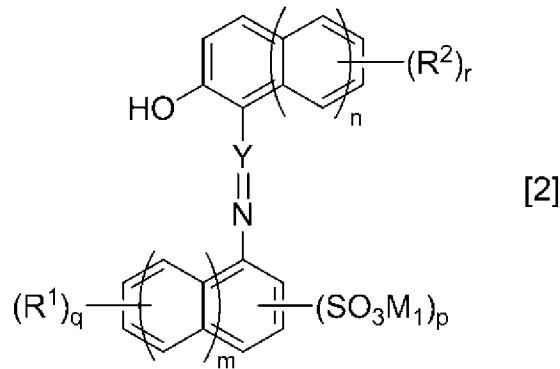
一般式 [D] :



(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[請求項12] 前記一般式〔1〕で示される化合物が、一般式〔2〕で示されるものである、請求項11に記載の組成物。

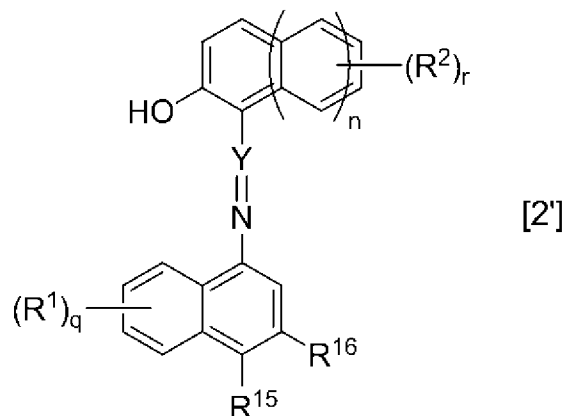
一般式〔2〕：



(式中、 p 個の M_1 、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 m 、 n 、 p 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。)

[請求項13] 前記一般式〔1〕で示される化合物が、一般式〔2'〕で示されるものである、請求項11に記載の組成物。

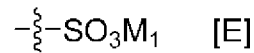
一般式〔2'〕：



(式中、 R^{15} および R^{16} はそれぞれ独立して、水素原子または一般式〔E〕で示されるスルホン酸基を表し、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 n 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。ただし、 R^{15} および R^{16} のうち、少なくとも1つは一般式〔E〕で示されるスルホン酸基である。

)

一般式 [E] :

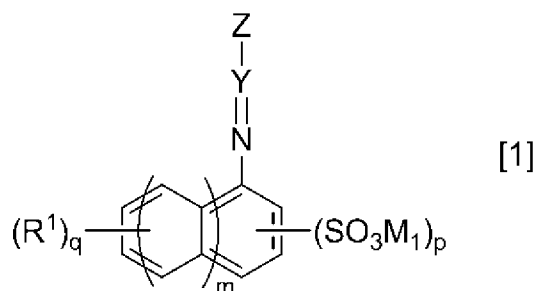
(式中、 M_1 は、前記に同じ。)

[請求項14] 前記一般式 [1] で示される化合物が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、2-(4-スルホフェニルアゾ)-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸またはその塩、3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[4-(4-スルホフェニル)アゾ]-1 H-ピラゾール-3-カルボン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項11に記載の組成物。

[請求項15] 前記一般式 [1] で示される化合物が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項11に記載の組成物。

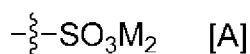
[請求項16] 8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド [3, 4-d] ピリダジン-1, 4 (2 H, 3 H) -ジオンまたはその塩と、一般式 [1] で示される化合物を含む、発光測定用キット。

一般式 [1] :



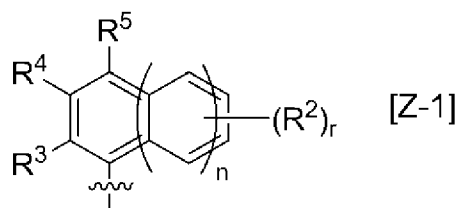
(式中、 p 個の M_1 はそれぞれ独立して、水素原子またはアルカリ金属原子を表し、 q 個の R^1 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 m は、0 または 1 を表し、 p は、1～3 の整数を表し、 q は、0～4 の整数を表し、 Y は、窒素原子または CH 基 (メチン基) を表し、 Z は、一般式 [Z-1] で示される基、一般式 [Z-2] で示される基または一般式 [Z-3] で示される基を表す。)

一般式 [A] :



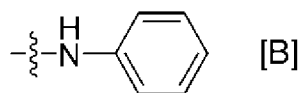
(式中、 M_2 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

一般式 [Z-1] :

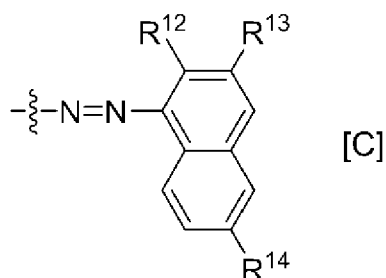


(式中、 r 個の R^2 はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^3 は、水素原子またはヒドロキシル基を表し、 R^4 は、水素原子または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 R^5 は、水素原子、式 [B] で示されるフェニルアミノ基または一般式 [C] で示されるナフチルアゾ基を表し、 n は、0 または 1 を表し、 r は、0～4 の整数を表す。)

式 [B] :

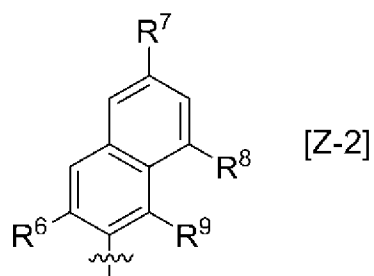


一般式 [C] :



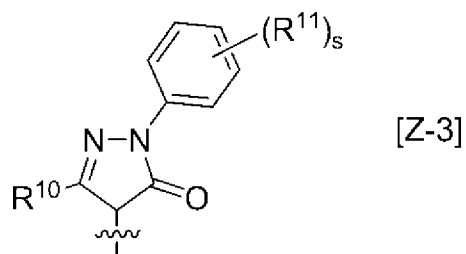
(式中、 $R^{12} \sim R^{14}$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-2] :



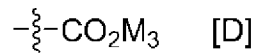
(式中、 $R^6 \sim R^9$ はそれぞれ独立して、水素原子、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表す。)

一般式 [Z-3] :



(式中、 R^{10} は、水素原子または一般式 [D] で示されるカルボン酸基を表し、 s 個の R^{11} はそれぞれ独立して、ヒドロキシル基または前記一般式 [A] で示されるスルホン酸基を表し、 s は、0～5の整数を表す。)

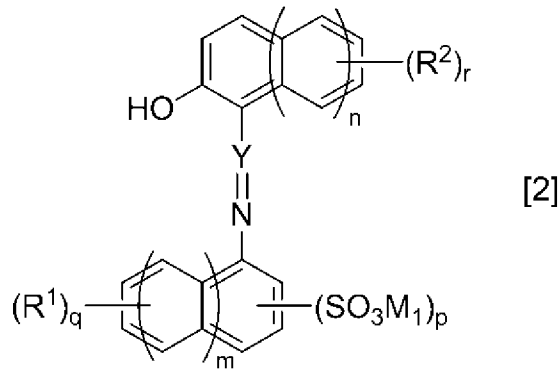
一般式 [D] :



(式中、 M_3 は、水素原子またはアルカリ金属原子を表す。)

[請求項17] 前記一般式〔1〕で示される化合物が、一般式〔2〕で示されるものである、請求項16に記載の発光測定用キット。

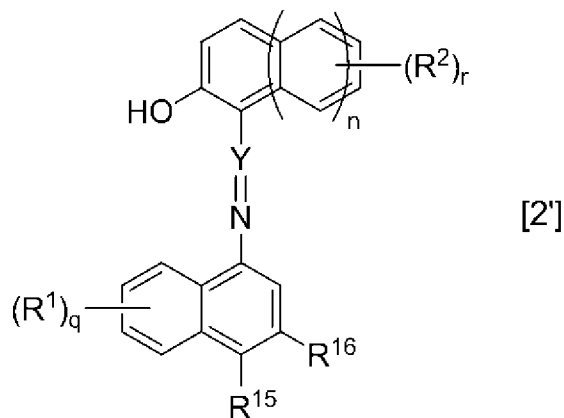
一般式〔2〕：



(式中、 p 個の M_1 、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 m 、 n 、 p 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。)

[請求項18] 前記一般式〔1〕で示される化合物が、一般式〔2'〕で示されるものである、請求項16に記載の発光測定用キット。

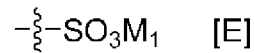
一般式〔2'〕：



(式中、 R^{15} および R^{16} はそれぞれ独立して、水素原子または一般式〔E〕で示されるスルホン酸基を表し、 q 個の R^1 、 r 個の R^2 、 n 、 q 、 r および Y は、前記に同じ。ただし、 R^{15} および R^{16} のうち、少なくとも1つは一般式〔E〕で示されるスルホン酸基である。

)

一般式 [E] :

(式中、 M_1 は、前記に同じ。)

[請求項19] 前記一般式 [1] で示される化合物が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、2-(4-スルホフェニルアゾ)-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、3-[4-(フェニルアミノ)フェニルアゾ]ベンゼンスルホン酸またはその塩、3-ヒドロキシ-4-[4-(4-スルホフェニルアゾ)-2-スルホフェニルアゾ]-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1-(4-スルホフェニル)-4-[4-(4-スルホフェニル)アゾ]-1 H-ピラゾール-3-カルボン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項16に記載の発光測定用キット。

[請求項20] 前記一般式 [1] で示される化合物が、4-ヒドロキシ-5-(サリチリデンアミノ)-2, 7-ナフタレンジスルホン酸またはその塩、および7-ヒドロキシ-8-(4-スルホ-1-ナフチルアゾ)-1, 3-ナフタレンジスルホン酸またはその塩から選ばれるものである、請求項16に記載の発光測定用キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/081083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09K15/28(2006.01)i, C07C309/46(2006.01)i, C07C309/50(2006.01)i,
G01N21/76(2006.01)i, G01N33/50(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)

C09K15/28, C07C309/46, C07C309/50, G01N21/76, G01N33/50

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 05-078356 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 March 1993 (30.03.1993), claims; examples & US 5420275 A claims; examples & EP 491477 A1	1-20
A	JP 06-281581 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 07 October 1994 (07.10.1994), claims; examples (Family: none)	1-20

☒ 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
21 December 2016 (21.12.16)

Date of mailing of the international search report
10 January 2017 (10.01.17)

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/JP2016/081083

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAIBER, Andreas et al., Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012, Free Radical Biology & Medicine, (2004), 36(1), 101-111, entire text	1-20
A	NAKAZAWA, Hiroyuki et al., On-line photostability evaluation system for chemiluminescence detection of phloxine (R-104), Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1997), 45(12), 4525-4529	1-20
A	WO 2015/155248 A1 (BIO-RAD INNOVATIONS), 15 October 2015 (15.10.2015), REVANDICATIONS; examples & FR 3019899 A1	1-20
A	Shiro YAMASHOJI et al., "Chemiluminescent Cytotoxicity Test for Food Stuff with Vitamin K3", Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, (1997), 44(6), 424 to 429, entire text	1-20
A	WO 2014/118543 A1 (VANTIX HOLDINGS LTD.), 07 August 2014 (07.08.2014), claims; examples (Family: none)	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C09K15/28(2006.01)i, C07C309/46(2006.01)i, C07C309/50(2006.01)i, G01N21/76(2006.01)i, G01N33/50(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. C09K15/28, C07C309/46, C07C309/50, G01N21/76, G01N33/50

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

CAplus/REGISTRY (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
A	JP 05-078356 A (武田薬品工業株式会社) 1993.03.30, 特許請求の範囲, 実施例等 & US 5420275 A, CLAIMS, EXAMPLES & EP 491477 A1	1-20
A	JP 06-281581 A (武田薬品工業株式会社) 1994.10.07, 特許請求の範囲, 実施例等 (ファミリーなし)	1-20

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.12.2016

国際調査報告の発送日

10.01.2017

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)

井上 恵理

4 V

4 7 6 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3483

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
A	DAIBER, Andreas et al., Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012, Free Radical Biology & Medicine, (2004), 36(1), 101-111, 全文献	1-20
A	NAKAZAWA, Hiroyuki et al., On-line photostability evaluation system for chemiluminescence detection of phloxine (R-104), Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1997), 45(12), 4525-4529	1-20
A	WO 2015/155248 A1 (BIO-RAD INNOVATIONS) 2015.10.15, REVANDICATIONS, EXEMPLES & FR 3019899 A1	1-20
A	山庄司志朗 ほか, ビタミンK 3 添加化学発光法を用いた細胞致死性の測定, Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, (1997), 44(6), 424-429, 全文献	1-20
A	WO 2014/118543 A1 (VANTIX HOLDINGS LIMITED) 2014.08.07, CLAIMS, EXAMPLES (ファミリーなし)	1-20