

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7295708号
(P7295708)

(45)発行日 令和5年6月21日(2023.6.21)

(24)登録日 令和5年6月13日(2023.6.13)

(51)国際特許分類

F I

C 0 9 B 11/14 (2006.01)

C 0 9 B 11/14

C S P

C 0 9 B 67/02 (2006.01)

C 0 9 B 67/02

A

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

E

請求項の数 23 (全31頁)

(21)出願番号 特願2019-104764(P2019-104764)
 (22)出願日 令和1年6月4日(2019.6.4)
 (65)公開番号 特開2019-214712(P2019-214712
 A)
 (43)公開日 令和1年12月19日(2019.12.19)
 審査請求日 令和4年6月3日(2022.6.3)
 (31)優先権主張番号 特願2018-109801(P2018-109801)
 (32)優先日 平成30年6月7日(2018.6.7)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 000001007
 キヤノン株式会社
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
 (74)代理人 100094112
 弁理士 岡部 譲
 (74)代理人 100101498
 弁理士 越智 隆夫
 (74)代理人 100106183
 弁理士 吉澤 弘司
 (74)代理人 100136799
 弁理士 本田 亜希
 (72)発明者 関 真範
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
 キヤノン株式会社内
 (72)発明者 東 隆司

最終頁に続く

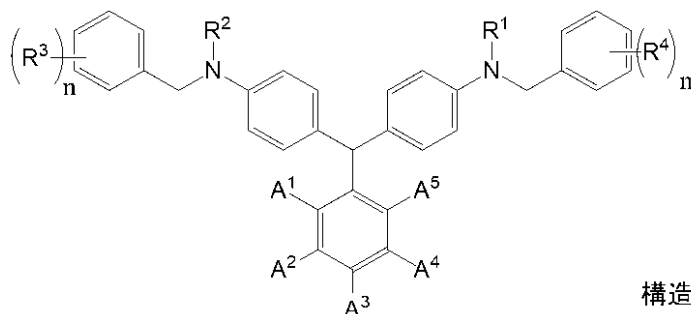
(54)【発明の名称】 過酸化水素検出用染料、染料粒子複合体、および過酸化水素検出用構造体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造式1で表される構造を有する過酸化水素検出用染料。

【化1】



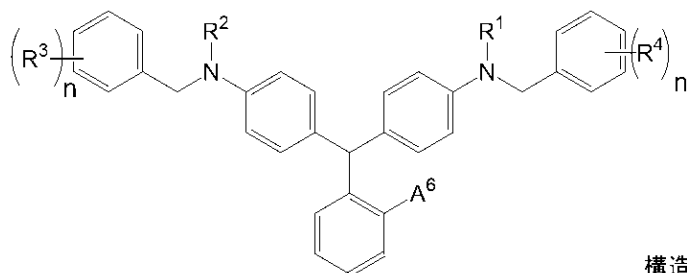
構造式1

(ただし、構造式1中R¹、R²はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が1から8の炭化水素鎖のいずれかであり、R³、R⁴は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、A¹からA⁵の少なくともいずれか1つはNO₂、SO₂NH₂、CF₃、CN、COOH、またはCOORのいずれかであり、その他は水素を示し、Rは、炭素数1以上3以下の炭化水素基であり、nは1以上5以下の整数である。)

【請求項2】

下記構造式 2、3 または 4 で表される構造を有する、請求項 1 に記載の過酸化水素検出用染料。

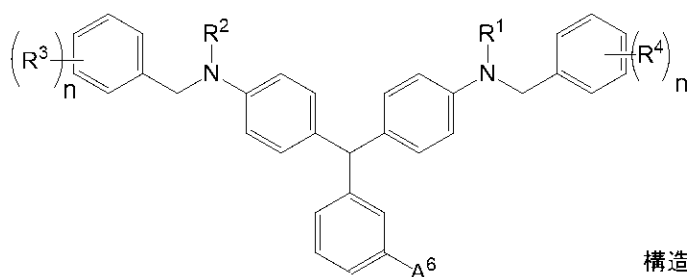
【化 2】



構造式 2

10

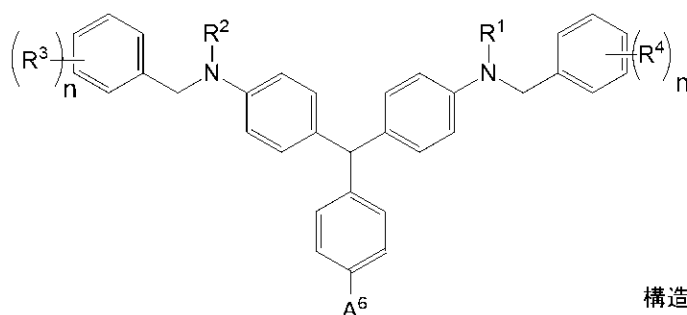
【化 3】



構造式 3

20

【化 4】



構造式 4

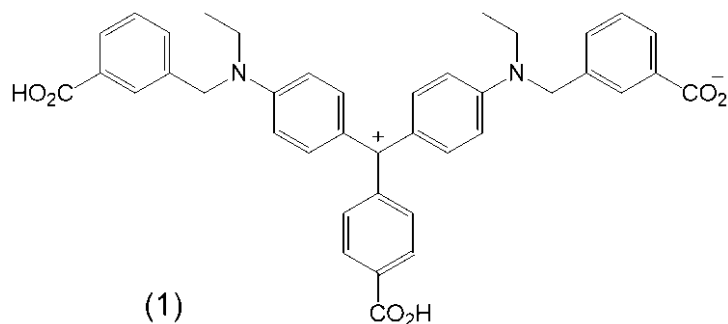
30

(ただし、構造式 2、3 および 4 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立にカルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^6 は NO_2 、 SO_2 、 NH_2 、 CF_3 、 CN 、 $COOH$ 、または $COOR$ のいずれかであり、 R は、炭素数 1 以上 3 以下の炭化水素基であり、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 3】

下記式 (1)、式 (2)、式 (12)、式 (16) または式 (40) で表される構造を有する、請求項 1 または 2 に記載の過酸化水素検出用染料。

【化 5】

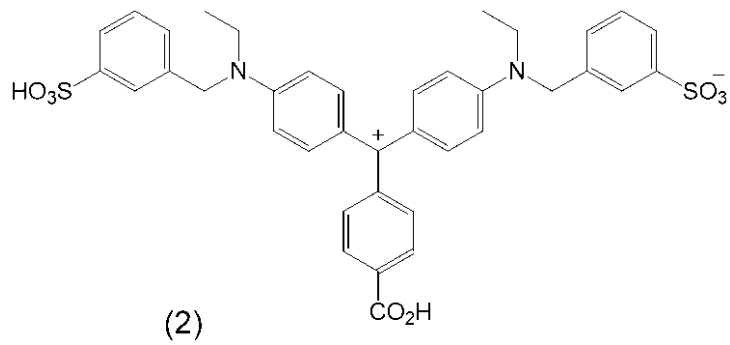


(1)

40

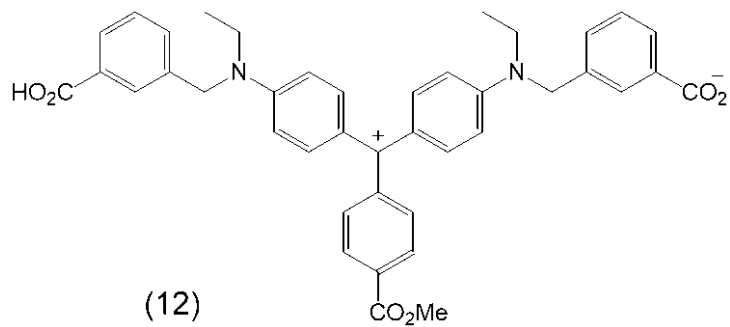
50

【化 6】



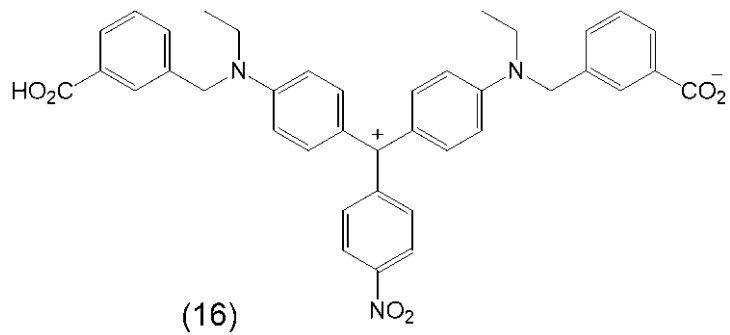
10

【化 7】



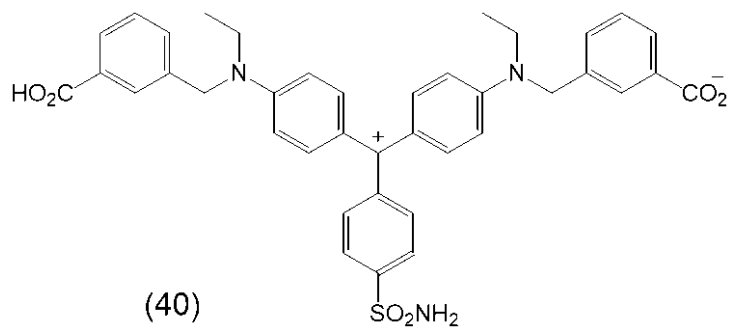
20

【化 8】



30

【化 9】



40

【請求項 4】

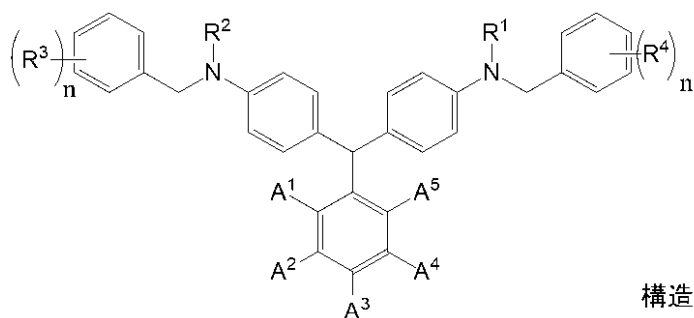
粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含む過酸化水素検出用の染料粒子複合体であって、

前記粒子が正帯電性の粒子であり、

前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする染料粒子複合体。

50

【化 1 0】



10

(ただし、構造式 1 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 は σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 5】

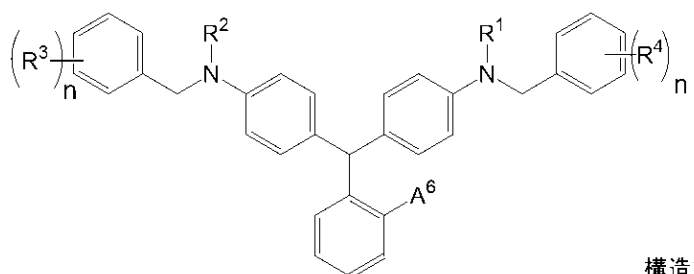
前記 A^1 から前記 A^5 の少なくともいずれか 1 つは NO_2 、 SO_2NH_2 、 CF_3 、 CN 、 COOH 、または COOR のいずれかであり、その他は水素原子であり、前記 R は、炭素数 1 以上 3 以下の炭化水素基であることを特徴とする請求項 4 に記載の染料粒子複合体。

【請求項 6】

前記染料が下記構造式 2、3 または 4 で表される構造を有することを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載の染料粒子複合体。

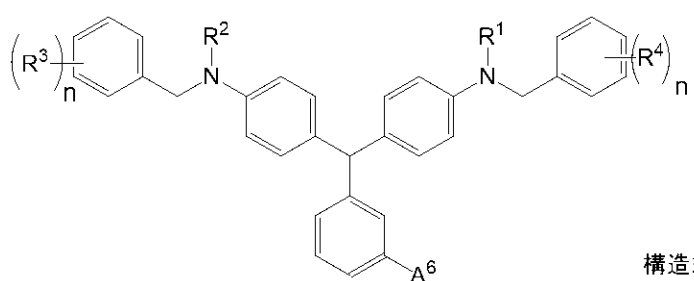
20

【化 1 1】



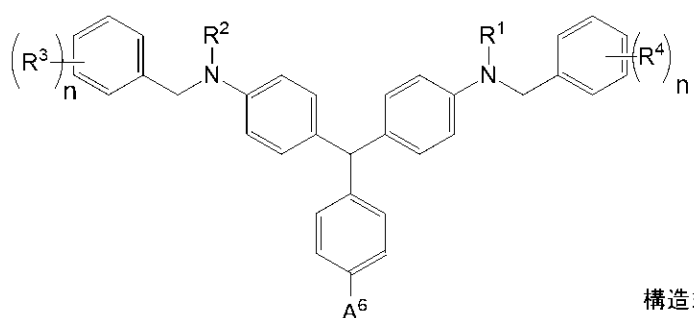
30

【化 1 2】



40

【化 1 3】



(ただし、構造式 2、3 および 4 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベ

50

ンゼン環を有してもよい炭素数が1から8の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立にカルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^6 は σ 値が正の置換基を表し、 n は1以上5以下の整数である。)

【請求項7】

前記 A^6 は NO_2 、 SO_2NH_2 、 CF_3 、 CN 、 $COOH$ 、または $COOR$ のいずれかであり、 R は、炭素数1以上3以下の炭化水素基であることを特徴とする請求項6に記載の染料粒子複合体。

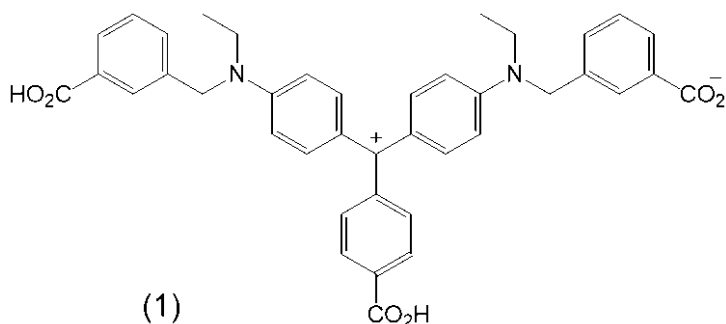
【請求項8】

前記 A^6 が、 $COOH$ 、 $COOCH_3$ 、及び CN からなる群より選択される少なくとも1種であることを特徴とする、請求項6または7に記載の染料粒子複合体。

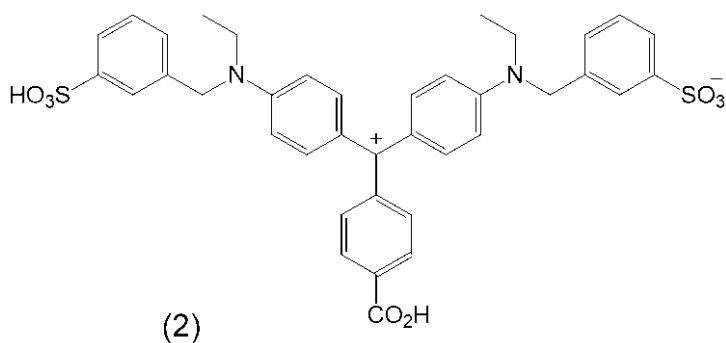
【請求項9】

前記染料が、下記式(1)、式(2)、式(12)、式(16)または式(40)で表される構造を有する、請求項4乃至8のいずれか1項に記載の染料粒子複合体。

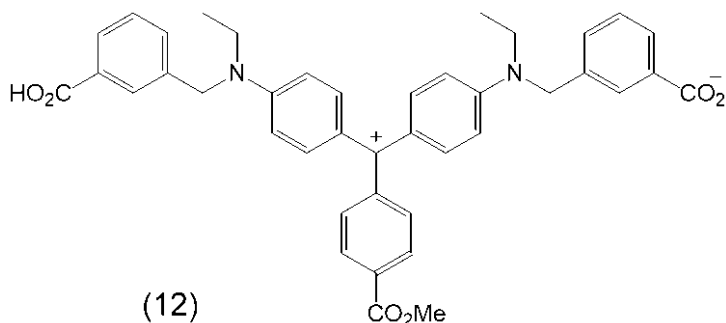
【化14】



【化15】



【化16】



10

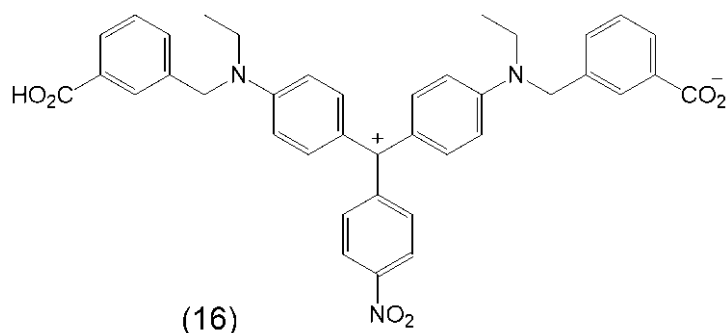
20

30

40

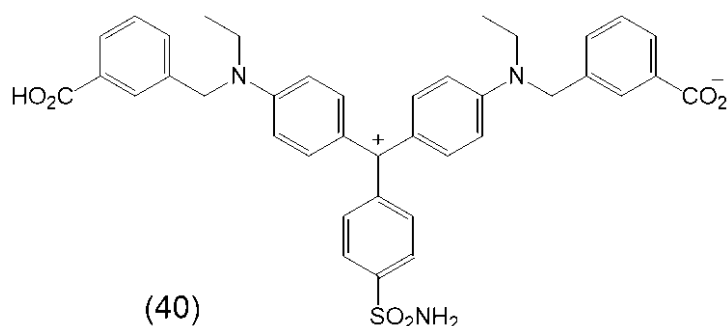
50

【化 17】



10

【化 18】



20

【請求項 10】

前記正帯電性の粒子を水性溶剤に分散した分散液と、染料を水性溶剤に溶解した水溶液を混合する工程を含む、請求項 4 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の染料粒子複合体の製造方法。

【請求項 11】

請求項 4 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の染料粒子複合体と基材とを含む過酸化水素検出用構造体。

【請求項 12】

生体サンプル中に含まれる過酸化水素の検出方法であって、

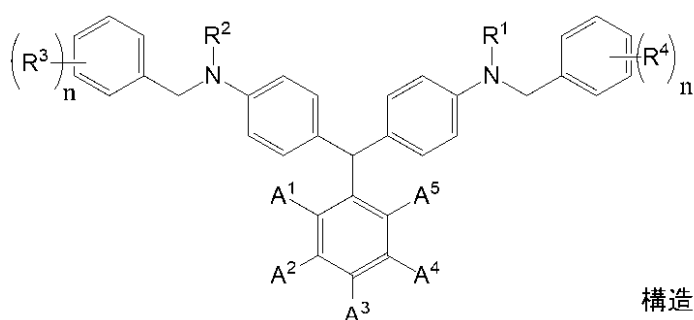
染料粒子複合体が基材に塗布された過酸化水素検出用構造体に、生体サンプルを接触させる工程、および前記構造体に前記生体サンプルを接触させた後、前記染料粒子複合体を前記基材に塗布した領域の染料粒子複合体の発色量を測定する工程と、を有し、

前記染料粒子複合体が、粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含み、

前記粒子が正帯電性の粒子であり、

前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする過酸化水素の検出方法。

【化 19】



40

(ただし、構造式 1 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独

50

立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 は σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 13】

前記 A^1 から前記 A^5 の少なくともいずれか 1 つは NO_2 、 SO_2NH_2 、 CF_3 、 CN 、 COOH 、または COOR のいずれかであり、その他は水素原子であり、前記 R は、炭素数 1 以上 3 以下の炭化水素基であることを特徴とする請求項 12 に記載の過酸化水素の検出方法。

【請求項 14】

生体サンプル中に含まれる代謝物の検出方法であって、

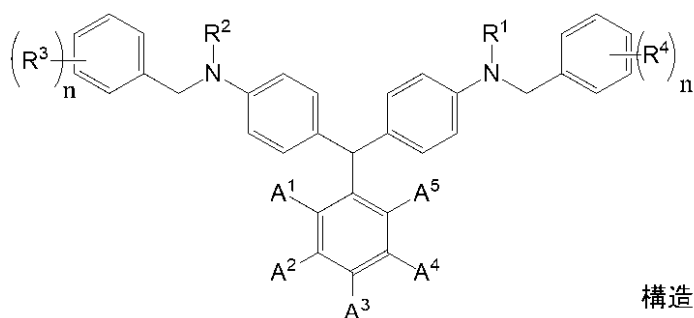
生体サンプルに、検出対象である代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素を加える工程と、染料粒子複合体が基材に塗布された過酸化水素検出用構造体に、前記生体サンプルを接触させる工程と、および前記構造体に前記生体サンプルを接触させた後、前記染料粒子複合体を前記基材に塗布した領域の染料粒子複合体の発色量を測定する工程と、を有し、

前記染料粒子複合体が、粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含み、

前記粒子が正帯電性の粒子であり、

前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする代謝物の検出方法。

【化 20】



(ただし、構造式 1 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 は σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 15】

生体サンプル中に含まれる代謝物の検出方法であって、

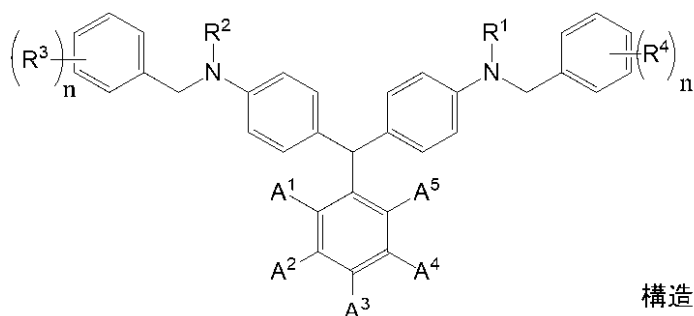
基材と、染料粒子複合体と、検出対象とする代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素を含有する過酸化水素検出用構造体に前記生体サンプルを接触させる工程と、前記構造体に前記生体サンプルを接触させた後、前記染料粒子複合体を前記基材に塗布した領域の染料粒子複合体の発色量を測定する工程と、を有し、

前記染料粒子複合体が、粒子と、該粒子の表層に吸着した染料とを含み、

前記粒子が正帯電性の粒子であり、

前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする代謝物の検出方法。

【化 21】



10

20

30

40

50

(ただし、構造式 1 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 は σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

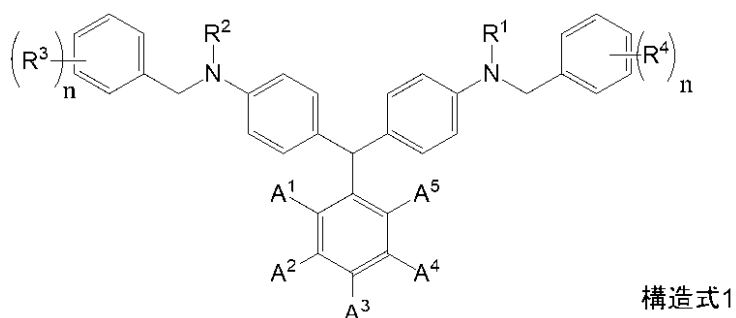
【請求項 16】

前記 A^1 から前記 A^5 の少なくともいずれか 1 つは NO_2 、 SO_2NH_2 、 CF_3 、 CN 、 $COOH$ 、または $COOR$ のいずれかであり、その他は水素原子であり、前記 R は、炭素数 1 以上 3 以下の炭化水素基であることを特徴とする請求項 14 または 15 に記載の代謝物の検出方法。

【請求項 17】

生体サンプル中に含まれる過酸化水素の検出キットであって、
前記検出キットが、基材と染料粒子複合体を含有する過酸化水素検出用構造体を含み、
前記染料粒子複合体が、粒子と、該粒子の表層に吸着した染料とを含み、
前記粒子が正帯電性の粒子であり、
前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする検出キット。

【化 22】

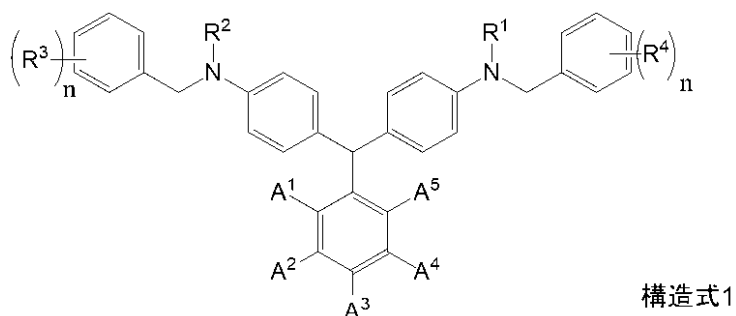


(ただし、構造式 1 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 は σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 18】

生体サンプル中に含まれる代謝物の検出キットであって、
前記検出キットが、基材と、染料粒子複合体と、検出対象とする代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素を含有する過酸化水素検出用構造体を含み、
前記染料粒子複合体が、粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含み、
前記粒子が正帯電性の粒子であり、
前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする検出キット。

【化 23】



(ただし、構造式 1 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 は σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 19】

前記 A¹ から前記 A⁵ の少なくともいずれか 1 つは NO₂、SO₂NH₂、CF₃、CN、COOH、または COOR のいずれかであり、その他は水素原子であり、前記 R は、炭素数 1 以上 3 以下の炭化水素基であることを特徴とする請求項 17 または 18 に記載の検出キット。

【請求項 20】

生体サンプルを前記構造体に接触させるための別体の容器を備えることを特徴とする、請求項 17 乃至 19 のいずれか 1 項に記載の検出キット。

【請求項 21】

生体サンプル中に含まれる代謝物の検出キットであって、

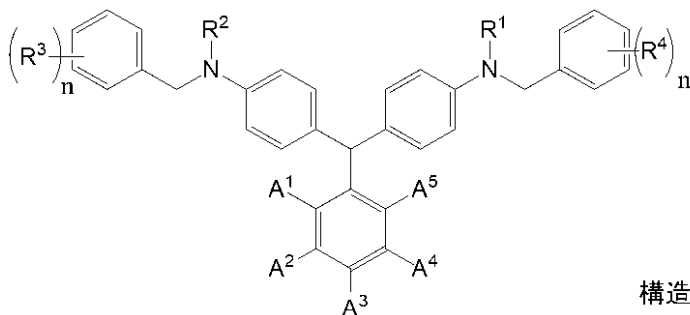
前記キットが、基材と染料粒子複合体を含有する過酸化水素検出用構造体、および前記代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素、又は前記酵素の水溶液が内包されている別体の容器を備え、

前記染料粒子複合体が、粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含み、

前記粒子が正帯電性の粒子であり、

前記染料が下記構造式 1 で表される構造を有することを特徴とする検出キット。

【化 24】



構造式1

(ただし、構造式 1 中 R¹、R² はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、R³、R⁴ は、それぞれ独立に、カルボキシ基、スルホ基、またはリン酸基であり、A¹ から A⁵ は σ 値が正の置換基を示し、n は 1 以上 5 以下の整数である。)

【請求項 22】

前記 A¹ から前記 A⁵ の少なくともいずれか 1 つは NO₂、SO₂NH₂、CF₃、CN、COOH、または COOR のいずれかであり、その他は水素原子であり、前記 R は、炭素数 1 以上 3 以下の炭化水素基であることを特徴とする請求項 21 に記載の検出キット。

【請求項 23】

過酸化水素または代謝物の量または濃度に応じた構造体の色変化をみるための、色相、明度または彩度を表す色見本を備えることを特徴とする、請求項 17 乃至 22 のいずれか 1 項に記載の検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、過酸化水素検出を目的とする染料、染料粒子複合体、および過酸化水素検出用構造体に関する。

【背景技術】

【0002】

過酸化水素の検出については、過酸化水素そのものの検出のみならず、酵素反応の生成物としての過酸化水素の検出の需要がある。

【0003】

例えば、グルコース、尿酸、コレステロール、クレアチニン等の検出や定量においては、オキシダーゼなど、それぞれに特異的な酵素と反応させ、発生する過酸化水素の量から

10

20

30

40

50

求めることができる。このような場合過酸化水素の検出、定量が必要である。

【0004】

過酸化水素を検出するための物質としては、オキシダーゼやペルオキシダーゼのような酵素を用いる場合と、過酸化水素の存在下で検出可能な色変化（吸収や発光）を受ける機能性色素を用いる場合、あるいはそれらの組み合わせによる場合とがある。機能性色素として代表的なものとして、4-アミノアンチピリンとフェノール系化合物またはアニリン系化合物を組み合わせた被酸化性呈色試薬、3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラゾンとアニリン系化合物の組み合わせ試薬、2,2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）、トリアリールメタン系色素、ベンゾジン誘導体、o-トリアジン誘導体、o-フェニレンジアミン等が挙げられる。この中でもトリアリールメタン系色素は、最大吸収波長が650nm付近にありヘモグロビンの吸収波長領域との重なりが少なく、分子吸光係数も 10^5 前後で非常に視認性が高いことから有用なものとして知られている（特許文献1～7）。

10

【0005】

過酸化水素を検知する染料を使用したデバイスの研究は近年盛んに行われている（非特許文献1）。

【0006】

発明者らは生体サンプル中の対象物の検出を目的とし、タンパク質（アルブミン等）夾雑物の存在下で色素を用いた過酸化水素の検出が可能か確認したところ、色素が夾雑物に吸着しデバイス表面より剥離溶出してしまうため、安定した過酸化水素の検出は困難であった。

20

【0007】

また、公知の染料では、過酸化水素反応性が十分でなく、この点においても、安定した過酸化水素検出は困難であった。従って、安定して過酸化水素を検出するデバイスを作製するためには、より高感度のトリアリールメタン染料を何らかの形で固定化する必要があるという認識に至った。

【0008】

一方で、上記特徴を有するトリアリールメタン系色素をポリビニルアルコールに練りこんだものが、近年テロ等に用いられる過酸化アセトン（TAPA）の検知に使用されることが報告されている（非特許文献2）。非特許文献2によると、過酸化水素によるトリアリールメタンの分解反応（非特許文献3）を応用し、トリアリールメタン蒸気を検知することができるという報告されている。しかしながら我々の検討では、色素を単純に樹脂に練りこむだけでは、夾雑物による、染料の剥離溶出を抑制することは困難であり、仮に高感度の染料があったとしても、生体サンプル中の過酸化水素を安定して検出することは困難であった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【文献】特開昭56-26199号公報

特開昭56-31641号公報

特開昭60-194363号公報

特開昭60-256056号公報

特開昭62-296号公報

特開昭62-93261号公報

特開平3-206896号公報

国際公開第2012/133696号

【非特許文献】

【0010】

【文献】Anal. Bioanal. Chem. (2009) 395:301-313

Sensors and Actuators B 136 (2009) 458-463

50

J. Chem. Soc. FARADAY TRANS, 1993, 8, 18, 1203-12(9)

Chem. Rev. 1991, 97, 165-19

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

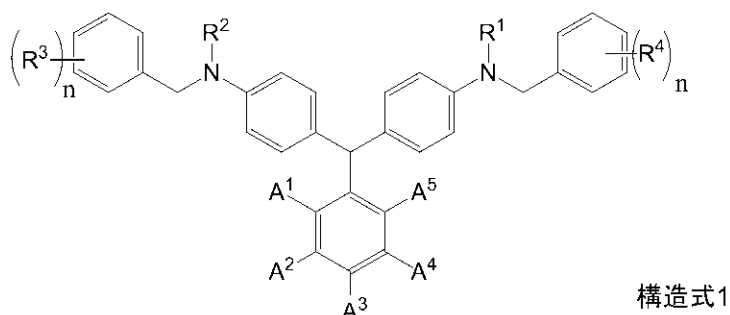
本発明は、生体サンプル中に存在する（または生体サンプル中で生成されて存在する）過酸化水素を、タンパク質等夾雑物の存在下でも安定して高感度で検出することが可能な、染料、染料粒子複合体および検出用構造体を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、下記構造式1で表される構造を有する染料を用い、過酸化水素を有効に検出できることを見出した。

【化1】



ただし、構造式1中R¹、R²はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が1から8の炭化水素鎖のいずれかであり、R³、R⁴は、それぞれ独立に、カルボン酸基、スルホン酸基、またはリン酸基であり、A¹からA⁵の少なくともいずれかのσ値が正の置換基を示し、nは1以上5以下の整数である。

【0013】

また、粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含む染料粒子複合体であって、粒子が正帯電性の粒子であり、染料が、上記構造式1の構造で表され、中心電荷が正の値であることを特徴とする、染料粒子複合体の発明に至った。

【発明の効果】

【0014】

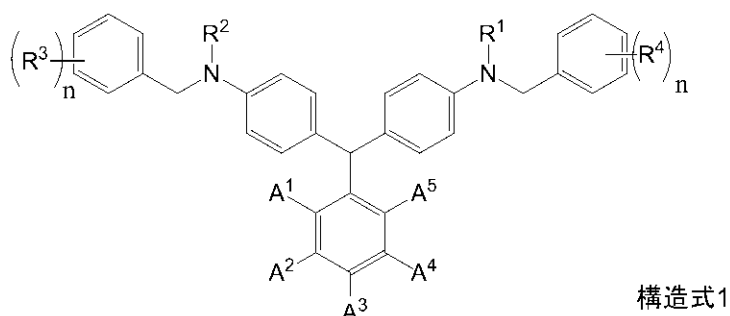
本発明により、タンパク質等夾雑物の存在下でも安定した過酸化水素検出が高感度で可能な、染料、染料粒子複合体および検出用構造体の提供が可能となった。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、第一の実施形態として、下記構造式1で表される構造を有する染料を提供する。

【化2】



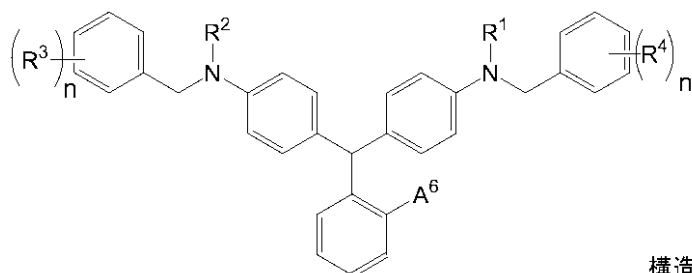
ただし、構造式1中R¹、R²はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が1から8の炭化水素鎖のいずれかであり、R³、R⁴は、それぞれ独

立に、カルボン酸基、スルホン酸基、またはリン酸基であり、 A^1 から A^5 の少なくともいずれかの σ 値が正の置換基を示し、 n は 1 以上 5 以下の整数である。

【0016】

染料はさらに好ましくは、下記構造式 2、3 または 4 で表される構造を有する。

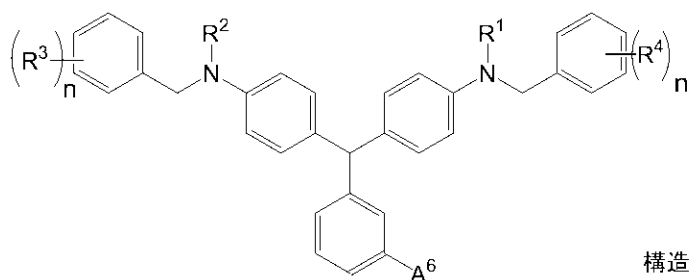
【化 3】



構造式2

10

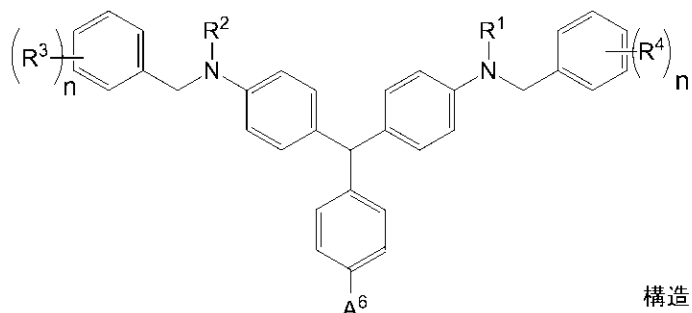
【化 4】



構造式3

20

【化 5】



構造式4

30

ただし、構造式 2、3 および 4 中 R^1 、 R^2 はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が 1 から 8 の炭化水素鎖のいずれかであり、 R^3 、 R^4 は、それぞれ独立にカルボン酸基、スルホン酸基、またはリン酸基であり、 A^6 は σ 値が正の置換基を表す。なお、炭化水素鎖、ベンゼン環は、置換基を有しても構わない。

【0017】

本発明の第一の実施形態に係る染料は、過酸化水素の存在下で退色するという性質を有し、過酸化水素の検出に好ましく用いられる。すなわち、本発明は、さらなる実施形態として、過酸化水素検出用染料を提供する。

40

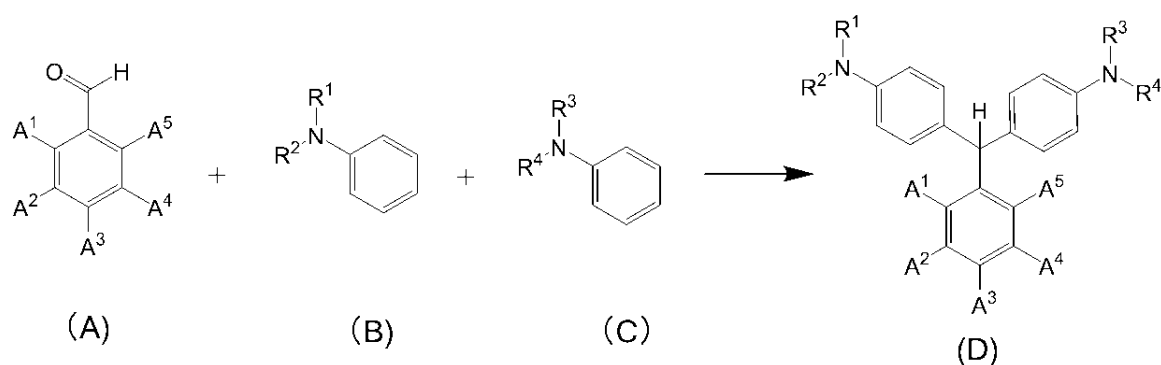
【0018】

本実施形態における構造式 1 で表される染料の合成方法は特に限定されないが、例えば下記の合成スキームに示す公知の方法に基づいて合成することができる。

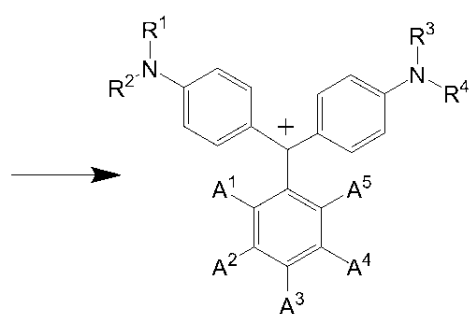
50

【化 6】

合成スキーム



10



20

構造式5

【0019】

上記合成スキームでは、まず、化合物(A)、化合物(B)および化合物(C)を、溶媒および縮合剤の存在下で縮合する縮合工程で化合物(D)を得た後、化合物(D)を、溶媒および酸化剤の存在下で酸化する酸化工程を経ることで、構造式5で表される化合物が得られる。ただし、化合物(A)～(D)の構造式および構造式5中R¹からR⁴はそれぞれ独立に水素原子または末端にベンゼン環を有してもよい炭素数が1から8の炭化水素鎖のいずれかであり、A¹からA⁵の少なくともいずれかはσ値が正の置換基を示す。

30

【0020】

初めに、上記合成スキームの縮合工程に用いる溶媒について説明する。上記縮合工程では、無溶媒で反応させることもできるが、溶媒を用いて反応することもでき、その場合溶媒は特に限定はないが、例えば、水、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノール、エチレングリコール、グリセリン、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、ジメチルスルホキシド、クロロベンゼン、1,2-ジクロロベンゼン、ニトロメタン、ニトロベンゼンなどを単独または混合して用いることが好ましい。

40

【0021】

上記合成スキームの縮合工程に用いる縮合剤について説明する。上記縮合工程における縮合剤としては、特に限定はないが、例えば、硫酸、塩酸、リン酸、酢酸、蟻酸、塩化アルミニウム、塩化亜鉛などを単独または混合して用いることが好ましい。

【0022】

構造式5において、R¹とR³、R²とR⁴が、それぞれ同一の基である化合物を合成する場合には、上記合成スキーム中の化合物(B)と化合物(C)は同じ種類のものを使うことができる。

【0023】

50

次に、上記合成スキームの酸化工程に用いる溶媒について説明する。上記酸化工程では、無溶媒で反応させることもできるが、溶媒を用いて反応することもでき、その場合溶媒は特に限定はないが、例えば、水、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノール、エチレングリコール、グリセリン、N，N-ジメチルホルムアミド、N，N-ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、1，3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、ジメチルスルホキシド、クロロベンゼン、1，2-ジクロロベンゼン、ニトロメタン、ニトロベンゼンなどを単独または混合して用いることが好ましい。

【0024】

上記合成スキームの酸化工程に用いる酸化剤について説明する。上記酸化工程における酸化剤は特に限定はなく、例えば、酸化鉛、酸化亜鉛、酸化鉄、酸化マンガン、過酸化水素、クロラニル、酸素などを単独または混合して用いることが好ましい。

【0025】

本実施形態に係る染料の具体例として化合物（1）から化合物（51）を以下に示す。

10

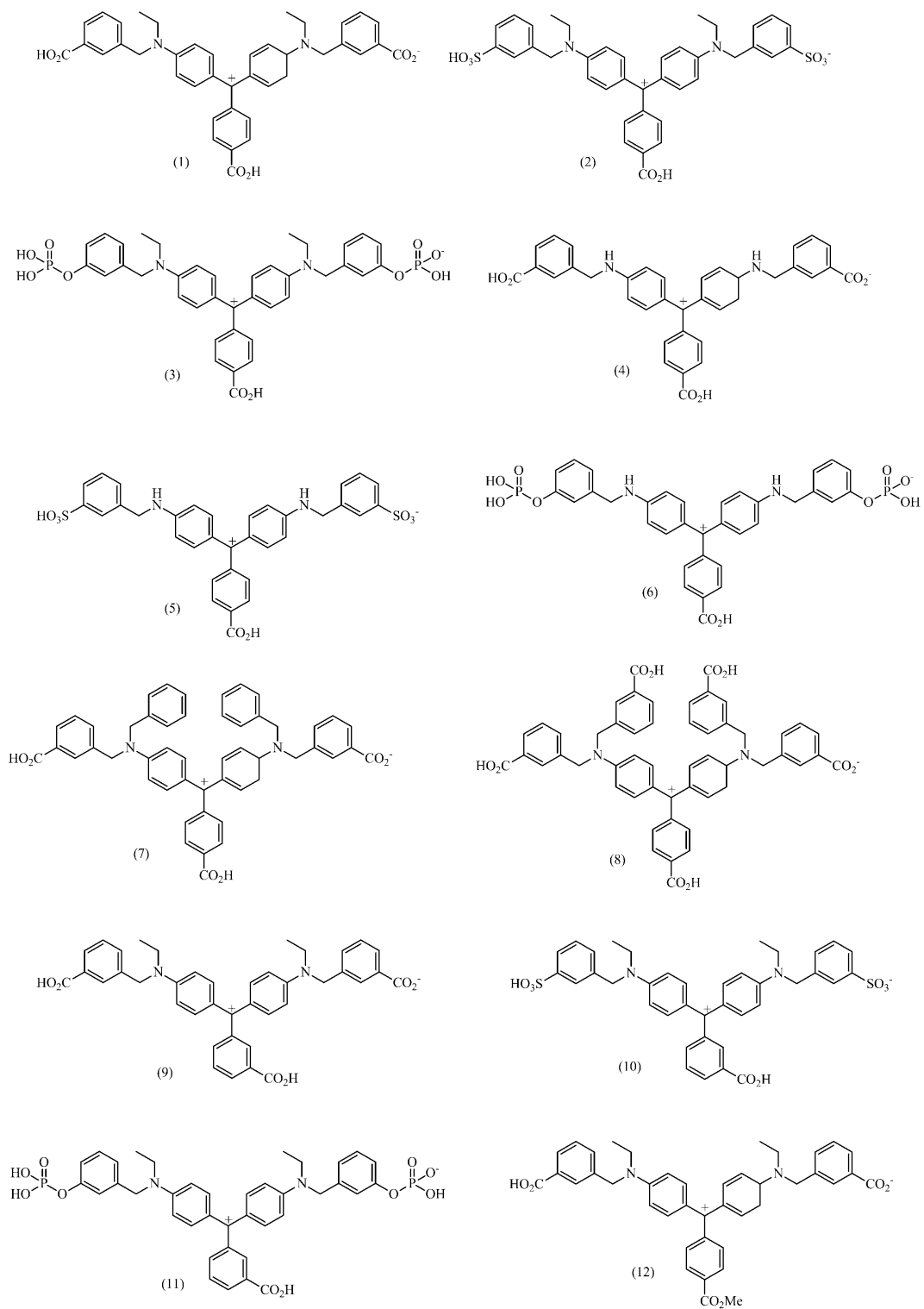
20

30

40

50

【化 7】



10

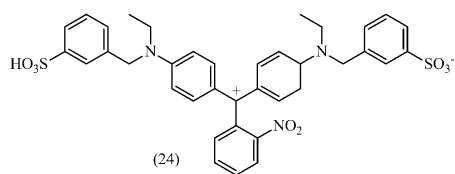
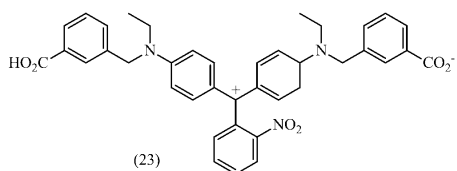
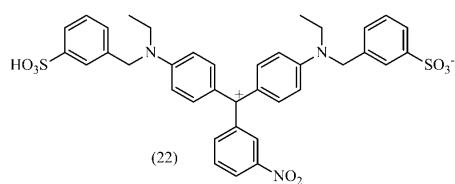
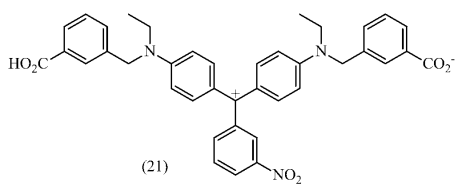
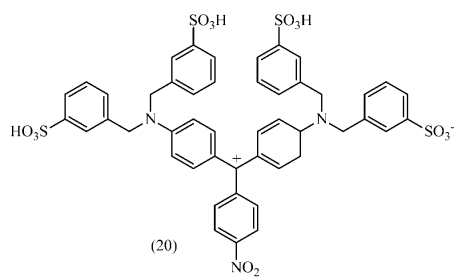
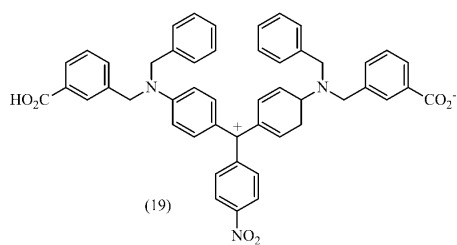
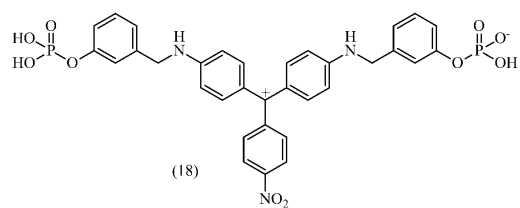
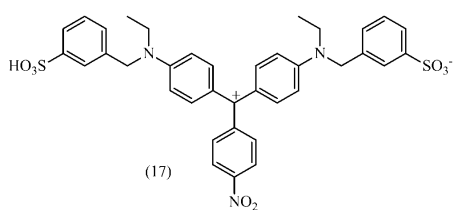
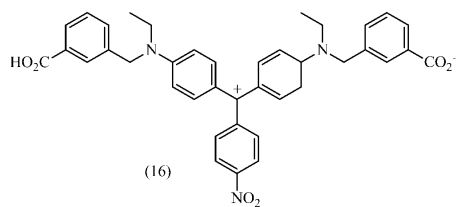
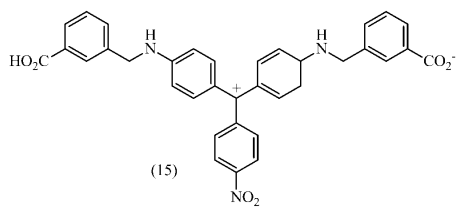
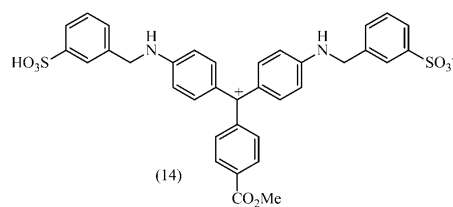
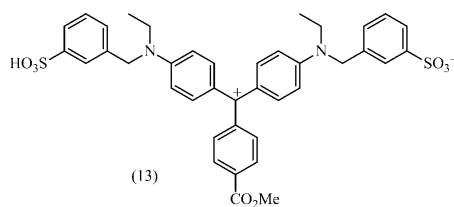
20

30

40

50

【化 8】



10

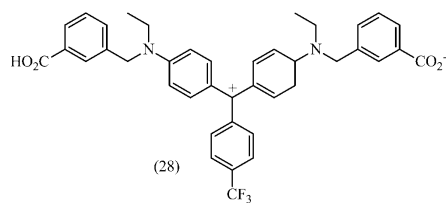
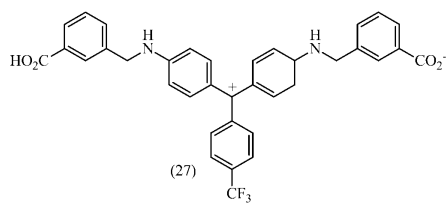
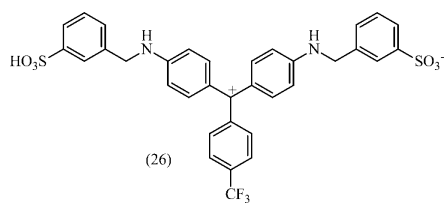
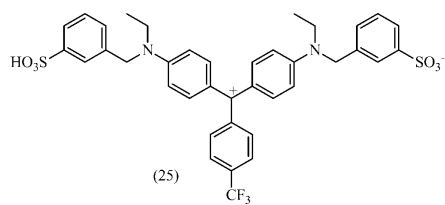
20

30

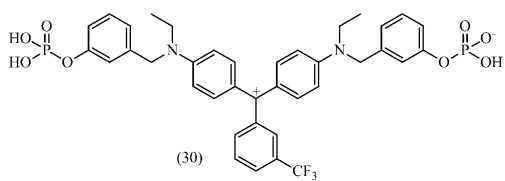
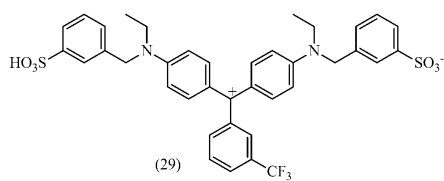
40

50

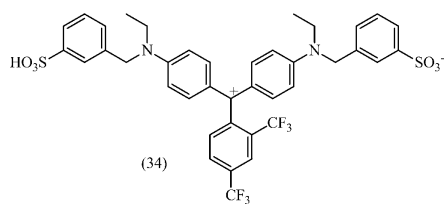
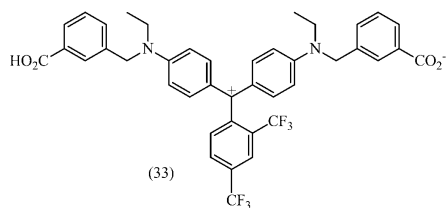
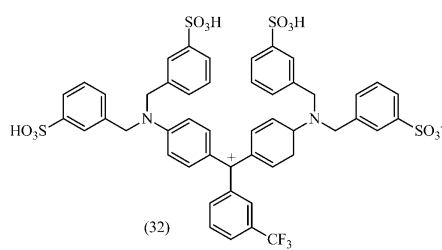
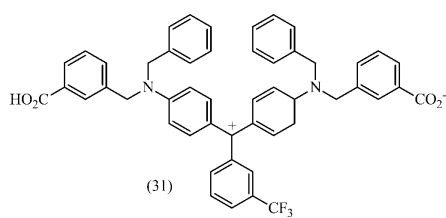
【化 9】



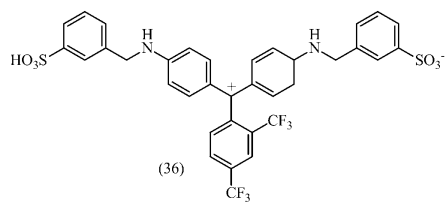
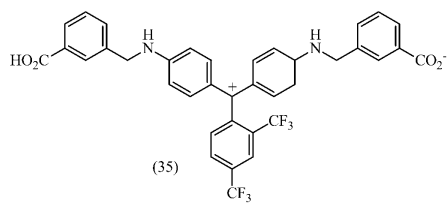
10



20



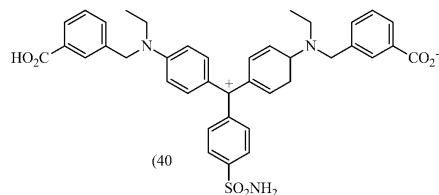
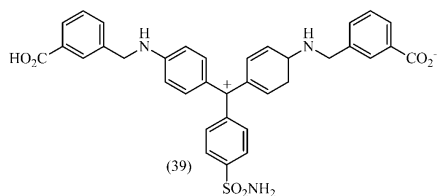
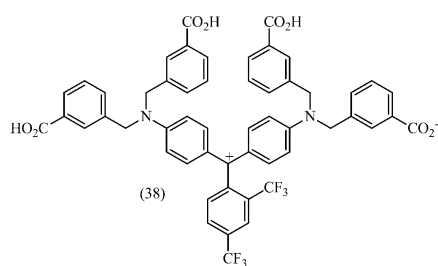
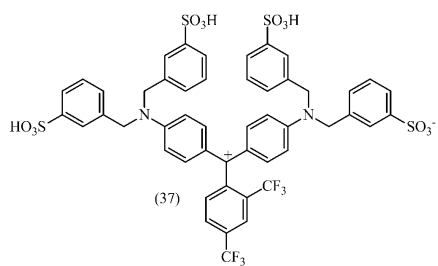
30



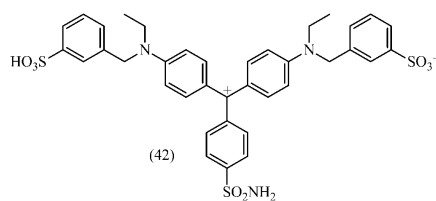
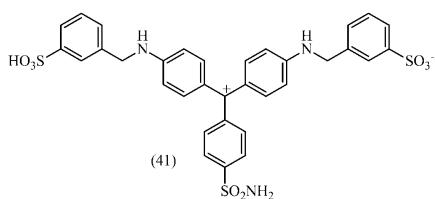
40

50

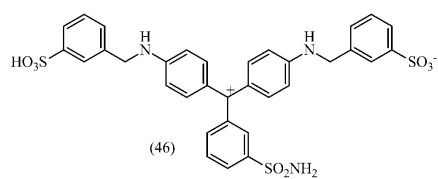
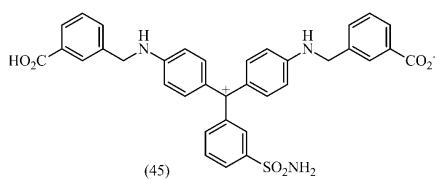
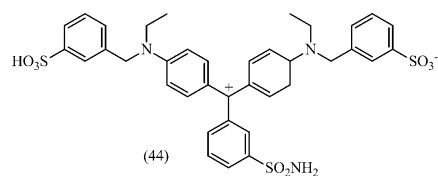
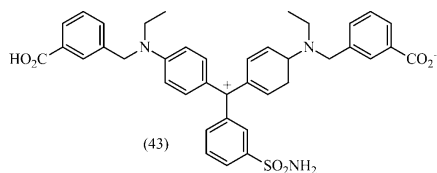
【化 10】



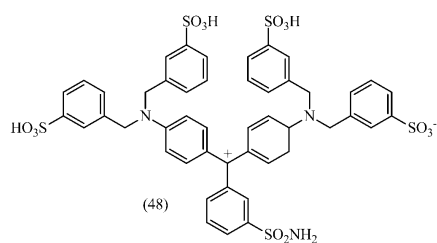
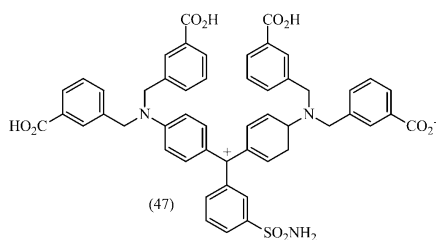
10



20



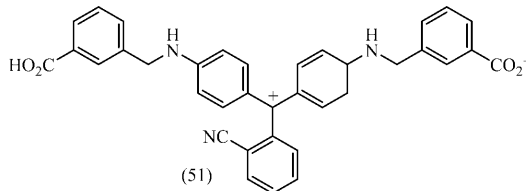
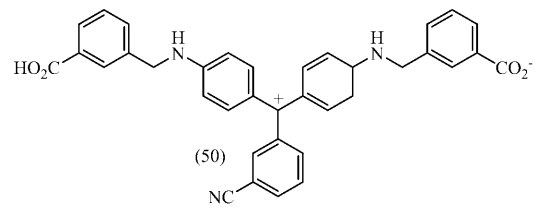
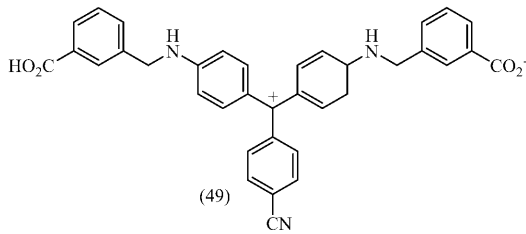
30



40

50

【化 1 1】



【 0 0 2 6 】

本発明の第一の実施形態に係る染料は過酸化水素の存在下で退色が起こる。これは、主に、非特許文献 3 に記載されている機構による。すなわちトリアリールメタンの中心炭素 (+) 部分に過酸化水素が結合することを開始反応とし、アリール基の脱離が起きる、染料の分解による不可逆反応と考えられる。

【 0 0 2 7 】

上記機構を有するため、本実施形態に係る染料を過酸化水素検出に用いる際、従来のトリアリールメタン系染料を用いた検知材料（ロイコ染料）とは異なり、pH の変動等による色の復活等は起きえないため、ロイコ染料と比較して環境の変動を受けにくいという長所を有している。

【 0 0 2 8 】

本発明は第二の実施形態として、粒子と、前記粒子の表層に吸着した染料とを含む染料粒子複合体であって、粒子が正帯電性の粒子であり、染料が、本発明の第一の実施形態に係る染料であることを特徴とする、染料粒子複合体を提供する。

【 0 0 2 9 】

粒子の形状は特に問わないが、球形またはそれに類した形状の粒子が入手の容易さから好ましい。粒子の直径（粒径）は、特に限定はないが、好ましくは $0.01\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $0.05\ \mu\text{m} \sim 0.20\ \mu\text{m}$ である。粒径が小さすぎる場合、夾雑物による剥離溶解が起きやすく、粒径が大きすぎる場合、発色性に問題を生じる場合がある。粒子は、有機、無機、有機-無機ハイブリッド材料等を挙げられる。粒子は、正帯電性のものが好ましいが、負帯電性または事実上帯電のない粒子表面を、シランカップリング剤や界面活性剤等で処理した粒子や、負帯電性の粒子をレイヤーバイレイヤー法により正帯電性とする事で、正帯電性の粒子として用いることができる。具体的には、ベンゾグアナミン・ホルムアルデヒド縮合物、ベンゾグアナミン・メラミン・ホルムアルデヒド縮合物、メラミン・ホルムアルデヒド縮合物、カチオン変性ポリアクリルアミド樹脂、カチオン変性ポリアミン樹脂、カチオン変性脂肪アミド樹脂、カチオン変性ポリアミドポリアミン樹脂、カチオン変性ポリアクリル酸エステル樹脂、カチオン変性ポリメタクリル酸エステル樹脂、ポリエチルイミン樹脂によるナノ粒子または、これら樹脂により表面修飾されたナノ粒子、N-2-(アミノエチル)-3-アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N-2-(アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-トリエトキシシリル-N-(1,3-ジメチル-ブチリデン)プロピルアミン、N-フェニル-3-アミノプロピルトリメトキシシラン、N-(ビニルベンジル)-2-アミノエチル-3-アミノプロピルトリメトキシシランの塩酸塩等で表面処理された、シリカ、アルミナ、アパ

10

20

30

40

50

タイト等の無機粒子が挙げられるが、これら粒子に限定されるものではない。本発明の実施形態において、中心電荷とは、DFT計算で得られる、構造式中の+で示される位置のマリケンチャージの計算値を中心電荷とした値である。中心電荷の値は構造式中、 A^1 から A^6 で記載される置換基構造のいわゆるハメットの σ 値と相関があることが、我々の鋭意検討により判明している。本発明の実施形態において、 σ 値とは、非特許文献4記載の σ_p+ または σ_p- の値を参考とした値である。 σ 値が正である置換基構造のより好ましい例としては、Br、Cl、F、I、 NO_2 、 SO_3^- 、 $B(OH)_2$ 、 CF_3 、 OCF_3 、 SO_2NH_2 、 $SO_2(CF_3)$ 、 SCF_3 、 $SeCF_3$ 、CN、 COO^- 、 $COOR$ (Rは炭化水素鎖)、 $COOH$ 、 SO_3H 、 CF_2CF_3 、 CH_2CN 、 C_6F_5 、ピリジルなどが挙げられ、感度上より好ましくは、 NO_2 、 SO_2NH_2 、 CF_3 、CN、 $COOH$ 、 $COOR$ が挙げられる。Rは、炭素数1以上3以下の炭化水素基であることが好ましい。なかでも、 σ 値が正である置換基は、 $COOH$ 、 $COOCH_3$ 、及びCNからなる群より選択される少なくとも1種であることが好ましい。

10

【0030】

本実施形態における染料粒子複合体は、粒子表面に染料をイオン性結合で吸着するため、粒子から染料が脱離しづらい。

【0031】

本実施形態における染料粒子複合体は、正帯電性の粒子表面に対して、イオン性置換基を有する、本発明の実施形態に係る染料を吸着させることにより製造できる。具体的には、水性溶剤中に正帯電性の粒子を超音波分散機等で分散し、得られる分散液と、水性溶剤に溶解した染料水溶液を混合する。10分間ほど攪拌した後、遠心分離機等で固液分離を行い、必要に応じて水洗することで、目的とする染料が表面に吸着した染料粒子複合体が形成される。

20

【0032】

本実施形態に係る染料粒子複合体は、目視で識別できる色を有するが、過酸化水素存在下では脱色が起こるため、過酸化水素の検出に好ましく用いられる。

【0033】

また、本実施形態に係る染料粒子複合体は、過酸化水素検出に用いる際、染料単独で用いるよりも、感度が高く、また、夾雑物の影響も受けにくい。また、染料粒子複合体自体に重量があるため、染料単独で用いるよりも、基材に定着させやすい。

30

【0034】

また、たとえば、染料を、PVAに直接練りこむような形態をとると、過酸化水素がしみこみづらいが、本実施形態に係る染料粒子複合体は、過酸化水素と接触しやすく、感度が高い。

【0035】

本発明は第三の実施形態として、本発明の第二の実施形態に係る染料粒子複合体と基材とを含む、過酸化水素検出用構造体を提供する。

【0036】

本実施形態の構造体においては、基材上の感知領域に本発明の第二の実施形態に係る染料粒子複合体が含有されることが好ましい。基材とは自立した材料を意味し、過酸化水素に対する反応性が低ければ特に材質を選ばない。しかしながら染料粒子複合体を基材上に固定することが好ましく、粘着性の接着層を有するか、セルロースまたは μ ファイバー等を用いた紙、フェルト、編み物、不織布、または多孔質材料が望ましく、容易に入手可能なことから紙が推奨される。

40

【0037】

本発明の第二の実施形態に係る染料粒子複合体は、本実施形態の過酸化水素検出用構造体に好ましく用いることができる。

【0038】

また、本実施形態の過酸化水素検出用構造体は、必要に応じて代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素を併用することができる。酵素を併用した場合、本質的には酵素の

50

生成物である過酸化水素を検出する構造体であるものの、様々な検出対象を検出することが可能となる。

【0039】

本実施形態において併用することができる酵素として、グルコースオキシダーゼ (glucose oxidase)、ヘキソースオキシダーゼ (hexose oxidase)、コレステロールオキシダーゼ (cholesterol oxidase)、アリールアルコールオキシダーゼ (aryl-alcohol oxidase)、L-グロノラクトンオキシダーゼ (L-gulonolactone oxidase)、ガラクトースオキシダーゼ (galactose oxidase)、ピラノースオキシダーゼ (pyranose oxidase)、L-ソルボースオキシダーゼ (L-sorbose oxidase)、ピリドキシン4-オキシダーゼ (pyridoxine 4-oxidase)、アルコールオキシダーゼ (alcohol oxidase)、カテコールオキシダーゼ (catechol oxidase)、(S)-2-ヒドロキシ酸オキシダーゼ ((S)-2-hydroxy-acid oxidase)、エクジソンオキシダーゼ (ecdysone oxidase)、コリンオキシダーゼ (choline oxidase)、第二級アルコールオキシダーゼ (secondary-alcohol oxidase)、4-ヒドロキシマンデル酸オキシダーゼ (4-hydroxymandelate oxidase)、長鎖アルコールオキシダーゼ (long-chain-alcohol oxidase)、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (glycerol-3-phosphate oxidase)、チアミンオキシダーゼ (thiamin oxidase)、ヒドロキシフィタン酸オキシダーゼ (hydroxyphytanate oxidase)、ヌクレオシドオキシダーゼ (nucleoside oxidase)、N-アシルヘキサミンオキシダーゼ (N-acylhexosamine oxidase)、ポリビニルアルコールオキシダーゼ (polyvinyl-alcohol oxidase)、D-アラビノノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ (D-arabino-1,4-lactone oxidase)、バニリルアルコールオキシダーゼ (vanillyl-alcohol oxidase)、ヌクレオシドオキシダーゼ (H₂O₂形成) (nucleoside oxidase (H₂O₂-forming))、D-マンニトールオキシダーゼ (D-mannitol oxidase)、アルジトールオキシダーゼ (alditol oxidase)、プロソラナピロン-II オキシダーゼ (prosolanapyrone-II oxidase)、パロマミン6'-オキシダーゼ (paromamine 6'-oxidase)、6',6',6'-トリヒドロキシネオマイシンCオキシダーゼ (6',6',6'-hydroxyneomycin C oxidase)、アクラシノマイシン-Nオキシダーゼ (aclacinomycin-N oxidase)、5-(ヒドロキシメチル)フルフラールオキシダーゼ (5-(hydroxymethyl)furfural oxidase)、3-デオキシ-α-D-マンノ-オクトロソナート8-オキシダーゼ (3-deoxy-α-D-manno-octulosonate 8-oxidase)、(R)-マンデルロニトリルオキシダーゼ ((R)-mandelonitrile oxidase)、アルデヒドオキシダーゼ (aldehyde oxidase)、ピルビン酸オキシダーゼ (pyruvate oxidase)、シュウ酸オキシダーゼ (oxalate oxidase)、グリオキシル酸オキシダーゼ (glyoxylate oxidase)、インドール-3-アセトアルデヒドオキシダーゼ (indole-3-acetaldehyde oxidase)、ピリドキサルオキシダーゼ (pyridoxal oxidase)、アリールアルデヒドオキシダーゼ (aryl-aldehyde oxidase)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸オキシダーゼ (4-hydroxyphenylpyruvate oxidase)、アブシシンアルデヒドオキシダーゼ (abscisic aldehyde oxidase)、(メチル)グリオキサールオキシダーゼ ((methyl)glyoxal oxidase)、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ (coproporphyrinogen oxidase)、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protoporphyrinogen oxidase)、ビリルビンオキシダーゼ (bilirubin oxidase)、アシルCoAオキシダーゼ (acyl-CoA oxidase)、ジヒドロウラシルオキシダーゼ (dihydrouracil oxidase)、テトラヒドロベルベリンオキシダーゼ (tetrahydroberberine oxidase)、セコログニンシンターゼ (secologanin synthase)、トリプトファンα,β-オキシダーゼ (tryptophan α,β-oxidase)、ピロロキノリンキノンシンターゼ (pyrroloquinoline-quinone synthase)、L-ガラクトノラクトンオキシダーゼ (L-galactonolactone oxidase)、アルボノウルシンシンターゼ (albonoursin synthase)、アクラシノマイシン-Aオキシダーゼ (aclacinomycin-A oxidase)、コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ (コプロポルフィリン形成) (coproporphyrinogen III oxidase (coproporphyrin-forming))、D-アスパラギン酸オキシダーゼ (D-aspartate oxidase)、L-アミノ酸オキシダーゼ (L-amino-acid oxidase)、D-アミノ酸オキシダーゼ (

D-amino-acid oxidase)、アミノオキシダーゼピロドキサル 5'-リン酸シンターゼ (amine oxidase、pyridoxal 5'-phosphate synthase)、D-グルタミン酸オキシダーゼ (D-glutamate oxidase)、エタノールアミノオキシダーゼ (ethanolamine oxidase)、プトレシンオキシダーゼ (putrescine oxidase)、L-グルタミン酸オキシダーゼ (L-glutamate oxidase)、シクロヘキシルアミノオキシダーゼ (cyclohexylamine oxidase)、タンパク質-リジン 6-オキシダーゼ (protein-lysine 6-oxidase)、L-リジンオキシダーゼ (L-lysine oxidase)、D-グルタミン酸 (D-アスパラギン酸) オキシダーゼ (D-glutamate(D-aspartate) oxidase)、L-アスパラギン酸オキシダーゼ (L-aspartate oxidase)、グリシンオキシダーゼ (glycine oxidase)、L-リジン 6-オキシダーゼ (L-lysine 6-oxidase)、第一級アミノオキシダーゼ (primary-amine oxidase)、ジアミンオキシダーゼ (diamine oxidase)、7-クロロ-L-トリプトファンオキシダーゼ (7-chloro-L-tryptophan oxidase)、プソイドオキシニコチンオキシダーゼ (pseudooxynicotine oxidase)、L-アルギニンオキシダーゼ (L-arginine oxidase)、サルコシンオキシダーゼ (sarcosine oxidase)、N-メチル-L-アミノ酸オキシダーゼ (N-methyl-L-amino-acid oxidase)、N⁶-メチル-リジンオキシダーゼ (N⁶-methyl-lysine oxidase)、(S)-6-ヒドロキシニコチンオキシダーゼ ((S)-6-hydroxynicotine oxidase)、(R)-6-ヒドロキシニコチンオキシダーゼ ((R)-6-hydroxynicotine oxidase)、L-ピペコリン酸オキシダーゼ (L-pipecolate oxidase)、ジメチルグリシンオキシダーゼ (dimethylglycine oxidase)、ジヒドロベンゾフエナントリジンオキシダーゼ (dihydrobenzophenanthridine oxidase)、N¹-アセチルポリアミンオキシダーゼ (N¹-acetylpolymine oxidase)、ポリアミンオキシダーゼ (プロパン-1,3-ジアミン形成) (polyamine oxidase (propane-1,3-diamine-forming))、N⁸-アセチルスぺルミジンオキシダーゼ (プロパン-1,3-ジアミン形成) (N⁸-acetylspermidine oxidase (propane-1,3-diamine-forming))、スぺルミンオキシダーゼ (spermine oxidase)、非特異的ポリアミンオキシダーゼ (non-specific polyamine oxidase)、L-サッカロピンオキシダーゼ (L-saccharopine oxidase)、4-メチルアミノブタン酸オキシダーゼ (ホルムアルデヒド形成) (4-methylaminobutanoate oxidase (formaldehyde-forming))、N-アルキルグリシンオキシダーゼ (N-alkylglycine oxidase)、4-メチルアミノブタン酸オキシダーゼ (メチルアミン形成) (4-methylaminobutanoate oxidase (methylamine-forming))、コエンザイム F₄₂₀H₂ オキシダーゼ (coenzyme F₄₂₀H₂ oxidase)、グリホサートオキシドレダクターゼ (glyphosate oxidoreductase)、NAD(P)H オキシダーゼ (H₂O₂ 形成) (NAD(P)H oxidase (H₂O₂-forming))、NAD(P)H オキシダーゼ (H₂O 形成) (NAD(P)H oxidase (H₂O-forming))、NADH オキシダーゼ (H₂O₂ 形成) (NADH oxidase (H₂O₂-forming))、NADH オキシダーゼ (H₂O 形成) (NADH oxidase (H₂O-forming))、レナラーゼ (renalase)、ニトロアルカンオキシダーゼ (nitroalkane oxidase)、アセチルインドキシルオキシダーゼ (acetylindoxyl oxidase)、因子非依存性尿酸ヒドロキシラーゼ (factor-independent urate hydroxylase)、3-aci-ニトロプロパン酸オキシダーゼ (3-aci-nitropropanoate oxidase)、ヒドロキシルアミノオキシダーゼ (シトクロム) (hydroxylamine oxidase (cytochrome))、亜硫酸オキシダーゼ (sulfite oxidase)、チオールオキシダーゼ (thiol oxidase)、グルタチオンオキシダーゼ (glutathione oxidase)、メタンチオールオキシダーゼ (methanethiol oxidase)、プレニルシステインオキシダーゼ (prenylcysteine oxidase)、ファルネシルシステインリアーゼ (farnesylcysteine lyase)、シトクロム-c オキシダーゼ (cytochrome-c oxidase)、ラッカーゼ (laccase)、L-アスコルビン酸オキシダーゼ (L-ascorbate oxidase)、o-アミノフェノールオキシダーゼ (o-aminophenol oxidase)、3-ヒドロキシアントラニル酸オキシダーゼ (3-hydroxyanthranilate oxidase)、リファマイシン-B オキシダーゼ (rifamycin-B oxidase)、フォトシステム II (photosystem II)、ユビキノールオキシダーゼ (H⁺ 輸送) (ubiquinol oxidase (H⁺-transporting))、ユビキノールオキシダーゼ (電位不形成型) (ubiquinol

10

20

30

40

50

oxidase (non-electrogenic))、メナキノールオキシダーゼ (H^+ 輸送) (menaquinol oxidase (H^+ -transporting))、カルダリエラキノールオキシダーゼ (H^+ 輸送) (caldariellaquinol oxidase (H^+ -transporting))、ユビキノールオキシダーゼ (電位形成型、非 H^+ 輸送) (ubiquinol oxidase (electrogenic, non H^+ -transporting))、グリキサゾンシンターゼ (grixazone synthase)、ジヒドロフェナジンジカルボン酸シンターゼ (dihydrophenazinedicarboxylate synthase)、フェロキシダーゼ (ferroxidase)、細菌性非ヘムフェリチン (bacterial non-heme ferritin)、プテリジンオキシダーゼ (pteridine oxidase)、キサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase)、6-ヒドロキシニコチン酸デヒドロゲナーゼ (6-hydroxynicotinate dehydrogenase)、ジュグロン3-ヒドロキシラーゼ (juglone 3-hydroxylase)、イソペニシリン-Nシンターゼ (isopenicillin-N synthase)、コロンバミンオキシダーゼ (columbamine oxidase)、レチクリンオキシダーゼ (reticuline oxidase)、スロクリンオキシダーゼ [(+) -ビスデクロロゲオジン形成] (sulochrin oxidase [(+)-bisdechlorogeodin-forming])、スロクリンオキシダーゼ [(-) -ビスデクロロゲオジン形成] (sulochrin oxidase [(-)-bisdechlorogeodin-forming])、オーロイシジンシンターゼ (aureusidin synthase)、テトラヒドロカンナビノール酸シンターゼ (tetrahydrocannabinolic acid synthase)、カンナビジオール酸シンターゼ (cannabidiolic acid synthase)、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase)、スーパーオキシドレダクターゼ (superoxide reductase)、NADHペルオキシダーゼ (NADH peroxidase)、NADPHペルオキシダーゼ (NADPH peroxidase)、脂肪酸ペルオキシダーゼ (fatty-acid peroxidase)、シトクロム-cペルオキシダーゼ (cytochrome-c peroxidase)、カタラーゼ (catalase)、ペルオキシダーゼ (peroxidase)、ヨージドペルオキシダーゼ (iodide peroxidase)、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase)、クロリドペルオキシダーゼ (chloride peroxidase)、L-アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (L-ascorbate peroxidase)、リン脂質-ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase)、マンガンペルオキシダーゼ (manganese peroxidase)、リグニンペルオキシダーゼ (lignin peroxidase)、ペルオキシレドキシ (peroxiredoxin)、万能ペルオキシダーゼ (versatile peroxidase)、グルタチオンアミド依存性ペルオキシダーゼ (glutathione amide-dependent peroxidase)、ブロミドペルオキシダーゼ (bromide peroxidase)、色素脱色型ペルオキシダーゼ (dye decolorizing peroxidase) (Dye decolorizing peroxidase)、プロスタミド/プロスタグランジン $F2\alpha$ シンターゼ (prostamide/prostaglandin $F2\alpha$ synthase)、カタラーゼ-ペルオキシダーゼ (catalase-peroxidase)、ヒドロペルオキシ脂肪酸レダクターゼ (hydroperoxy fatty acid reductase)、(S)-2-ヒドロキシプロピルホスホン酸エポキシダーゼ ((S)-2-hydroxypropylphosphonic acid epoxidase)、フルクトシル-アミノ酸オキシダーゼ (Fructosyl-amino Acid Oxidase)、乳酸オキシダーゼ (Lactate Oxidase)、L-アルギニンオキシダーゼ (L-arginine oxidase)、L-ヒスチジンオキシダーゼ (L-histidine oxidase)、L-システインオキシダーゼ (L-cysteine oxidase) が挙げられるが、本実施形態において併用可能な酵素は上記酵素に限定されるものではない。

【0040】

＜過酸化水素の検出方法＞

生体サンプル中に含まれる過酸化水素の検出方法は、以下の工程を有する。染料粒子複合体としては、上述に記載の複合体を用いる。発色量とは、色強度または蛍光強度の信号強度のことを指す：

(1) 染料粒子複合体が基材に塗布された過酸化水素検出用構造体に、生体サンプルを接触させる工程；及び

(2) 構造体に前記生体サンプルを接触させた後、前記染料粒子複合体を前記基材に塗布した領域の染料粒子複合体の発色量を測定する工程。

また、生体サンプル中に含まれる過酸化水素の検出方法は、(1)、(2)の他に以下

の（３）の工程を有することが好ましい：

（３）構造体に生体サンプルを接触させた後、染料粒子複合体を基材に塗布した領域から漏出した染料粒子複合体の発色量を測定する工程。

【００４１】

＜代謝物の検出方法＞

生体サンプル中に含まれる代謝物の検出方法は、以下の工程を有する。染料粒子複合体としては、上述に記載の複合体を用いる：

（１）生体サンプルに、検出対象である代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素を加える工程；

（２）染料粒子複合体が基材に塗布された過酸化水素検出用構造体に、生体サンプルを接触させる工程；及び

（３）構造体に生体サンプルを接触させた後、染料粒子複合体を基材に塗布した領域の染料粒子複合体の発色量を測定する工程。

他の代謝物の検出方法は、代謝物の検出方法における（１）の工程ではなく、（１'）の工程を有する。染料粒子複合体としては、上述に記載の複合体を用いる：

（１'）基材と、染料粒子複合体と、検出対象とする代謝物を基質として過酸化水素を発生する酵素を含有する過酸化水素検出用構造体に生体サンプルを接触させる工程。

【００４２】

＜検出キット＞

本実施形態に係る過酸化水素検出用構造体を用いた生体サンプル中の過酸化水素または代謝物の検出キットを提供することができる。本実施形態に係る検出キットは、少なくとも染料粒子複合体が基材に固定されていればよく、染料粒子複合体が支持体上の基材に固定されていてもよい。過酸化水素を含んでいると思われる生体サンプルを構造体に直接滴下することで過酸化水素の量や濃度を測ることができる。また、生体サンプルに構造体を浸透させるための別体の容器を設けてもよい。別体の容器を設けることで、生体サンプルを構造体に対して均一に浸透させることができる。酵素及び酵素の水溶液を別体の容器内に予め内包していてもよい。その容器内に生体サンプルを添加すると同時に構造体を浸透させることもできる。また、その容器内に生体サンプルを添加し一定時間経過させて過酸化水素を発生させた後に、構造体を浸透させることもできる。

【００４３】

検出キットは、過酸化水素または代謝物の、量または濃度に応じた構造体の色（蛍光）変化をみるための、色相、明度や彩度を表した色見本を備えていてもよい。紙やプラスチック板などの別体に印刷されたものでもよい。構造体の変化後の色と色見本との比較により目視観察によって、生体サンプルに含まれる過酸化水素や代謝物の量または濃度を半定量的に判定することもできる。

【実施例】

【００４４】

以下に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、これらの実施例によって限定されるものではない。

【００４５】

＜化合物の同定＞

下記で合成した化合物は、下記の分析手法により同定を行った。

ＬＣ／ＭＳ質量分析：ＬＣ／ＴＯＦ ＭＳ（ＬＣ／ＭＳＤ ＴＯＦ；Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製）。なお、イオン化法としては、エレクトロスプレーイオン化法（ＥＳＩ）を利用した。

【００４６】

＜合成例＞

＜合成実施例１：化合物（１）の合成＞

Ｎ－エチル－Ｎ－（３－カルボキシベンジル）アニリン２．６０ｇおよびテレフタルアルデヒド酸０．７９ｇを、水１５ｍＬ中、硫酸５．０ｇの存在下において、７０℃で２４

10

20

30

40

50

時間加熱して反応させた。この反応液を室温まで冷却した後、氷100g上に排出し、クロロホルムを加えて分液して水層を抽出した。ここに酸化マンガン2.00gを加え、室温で24時間攪拌した。反応液をろ過し、ろ液に2mol/L水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH7.0に中和した後、塩化ナトリウムを加えて塩析し、ろ過して塩析物を回収した。塩析物をメタノール100mLに分散してろ過し、ろ液を減圧濃縮した後、カラムクロマトグラフィーにより精製することで、化合物(1)0.96gを得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 642.2633$ (M^+)

【0047】

10

<合成実施例2：化合物(2)の合成>

合成実施例1でのN-エチル-N-(3-カルボキシベンジル)アニリンを4-[(エチルフェニルアミノ)メチル]ベンゼンスルホン酸に換えた他は同様の方法で化合物(2)を0.80g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 712.1868$ (M^+)

【0048】

<合成実施例3：化合物(9)の合成>

合成実施例1でのテレフタルアルデヒド酸をイソフタルアルデヒド酸に換えた他は同様の方法で化合物(9)を0.85g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 642.1629$ (M^+)

20

【0049】

<合成実施例4：化合物(10)の合成>

合成実施例2でのテレフタルアルデヒド酸をイソフタルアルデヒド酸に換えた他は同様の方法で化合物(10)を0.95g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 712.1987$ (M^+)

【0050】

<合成実施例5：化合物(13)の合成>

30

合成実施例2でのテレフタルアルデヒド酸をテレフタルアルデヒド酸メチルに換えた他は同様の方法で化合物(13)を0.75g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 726.2007$ (M^+)

【0051】

<合成実施例6：化合物(49)の合成>

合成実施例1でのテレフタルアルデヒド酸を4-ホルミルベンゾニトリルに換えた他は同様の方法で化合物(49)を0.80g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 568.2178$ (M^+)

40

【0052】

<合成実施例7：化合物(50)の合成>

合成実施例1でのテレフタルアルデヒド酸を3-ホルミルベンゾニトリルに換えた他は同様の方法で化合物(50)を0.71g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 568.2202$ (M^+)

【0053】

<合成実施例8：化合物(51)の合成>

合成実施例1でのテレフタルアルデヒド酸を3-ホルミルベンゾニトリルに換えた他は同様の方法で化合物(51)を0.64g得た。得られた化合物が目的とする化合物の構

50

造を持つことを、LC/TOF MS質量分析で確認した。LC/TOF MS質量分析の結果は以下のとおりであった。 $m/z = 568.2189 (M^+)$

【0054】

<表面処理正帯電性粒子の作製例>

本発明における表面処理による正帯電性粒子の作製方法を示すが、本発明はその要旨を超えない限り、これらの実施例によって限定されるものではない。

【0055】

<表面処理正帯電性粒子の作製例1>

シリカ粒子（スノーテックSTZL 日産化学製）をメタノールで10w%に希釈、次いでシリカ粒子の固形分量と同量のN-2-（アミノエチル）-3-アミノプロピルトリメトキシシラン（KBM-603 信越シリコン製）を滴下し、12時間室温で攪拌を行った。攪拌終了後、メタノールを減圧除去、次いで24時間加熱還流を行った。加熱還流終了後遠心処理、上澄み除去、イオン交換水での洗浄を行うことで目的とする表面処理正帯電粒子を作製した。

【0056】

<樹脂被覆正帯電性粒子の作製例2>

シリカ粒子（スノーテックSTZL 日産化学製）を水で10w%に希釈し、特許文献8と同様の方法で表層にポリ（ジアリールジメチルアンモニウムクロライド）（PDPA：シグマアルドリッチ製）を理論上1層被覆した樹脂被覆正帯電性粒子を作製した。

【0057】

<染料粒子複合体1の調製>

20w%の正帯電性の粒子（エポスターSS 日本触媒製）の水溶液に、1w%の化合物（1）分子水溶液を滴下し、その後、10分間超音波処理（W-133サンパ（本多電子製））を行なった。次いで遠心処理、上澄み液除去、イオン交換水を投入し、10分間超音波処理し、上澄み液の電子吸収スペクトルを測定した。上澄み液の電子吸収スペクトルのピークトップ高さ（abs）が0.1以下となるまで、超音波、遠心処理の工程を繰り返すことで、染料粒子複合体1を得た。

【0058】

<染料粒子複合体2の調製>

正帯電性の粒子をエポスターS（日本触媒製）とした以外は、染料粒子複合体1の調製と同様の方法で染料粒子複合体2を得た。

【0059】

<染料粒子複合体3の調製>

正帯電性の粒子をエポスターS6（日本触媒製）とした以外は、染料粒子複合体1の調製と同様の方法で染料粒子複合体3を得た。

【0060】

<染料粒子複合体4の調製>

正帯電性の粒子をエポスターS12（日本触媒製）とした以外は、染料粒子複合体1の調製と同様の方法で染料粒子複合体4を得た。

【0061】

<染料粒子複合体5の調製>

正帯電性の粒子をエポスターMS（日本触媒製）とした以外は、染料粒子複合体1の調製と同様の方法で染料粒子複合体5を得た。

【0062】

<染料粒子複合体6の調製>

正帯電性の粒子を表面処理正帯電粒子とした以外は、染料粒子複合体1の調製と同様の方法で染料粒子複合体6を得た。

【0063】

<染料粒子複合体7の調製>

正帯電性の粒子を樹脂被覆正帯電粒子とした以外は、染料粒子複合体1の調製と同様の

10

20

30

40

50

方法で染料粒子複合体 7 を得た。

【0064】

＜染料粒子複合体 8 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (2) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 8 を得た。

【0065】

＜染料粒子複合体 9 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (9) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 9 を得た。

【0066】

＜染料粒子複合体 10 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (10) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 10 を得た。

【0067】

＜染料粒子複合体 11 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (13) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 11 を得た。

【0068】

＜染料粒子複合体 12 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (49) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 12 を得た。

【0069】

＜染料粒子複合体 13 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (50) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 13 を得た。

【0070】

＜染料粒子複合体 14 の調製＞

化合物 (1) を化合物 (51) とした以外は、染料粒子複合体 1 の調製と同様の方法で染料粒子複合体 14 を得た。

【0071】

＜検知紙の製造方法＞

＜サンプル紙 1＞

濾紙 (Advantec 製) に染料粒子複合体 1 の水分散液 (10^{-4} g/L、1 μ L) を塗布し、乾燥させることで、サンプル紙 1 を得た。

【0072】

＜サンプル紙 2～14＞

染料粒子複合体 1 をそれぞれ染料粒子複合体 2～14 に替える以外は、サンプル紙 1 と同様の方法でサンプル紙 2～14 を得た。

【0073】

＜比較サンプル紙＞

濾紙 (Advantec 製) に染料 1 (化合物 (1) からなる染料) の 0.5 mM 水溶液 1 mL を塗布し、乾燥させることで、比較サンプル紙を得た。

【0074】

[実施例 1]

サンプル紙 1 を、5 mM 過酸化水素および 10% (v/v) ウシ胎児血清を含む 1 $\times$ リン酸緩衝生理食塩水 (200 μ L) (反応槽) に室温で 2 時間浸透させることで評価した。反射濃度計 SpectroLineo (Gretag Macbeth 製) にて、評価前後でのサンプル紙 1 の光学濃度 (Optical Density、以下 OD 値) を測定した。評価前のサンプル紙の OD 値を OD0、評価後のサンプル紙の OD 値を OD1 とした。サンプル紙 1 を 10 回作製し同様に評価を行い、 $1 - OD1 / OD0$ の平均値 (ΔO

10

20

30

40

50

D) および、標準偏差（以下SD）を算出したところ、それぞれ0.73と0.03であった。

【0075】

【実施例2】

サンプル紙1をサンプル紙2に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.53と0.02であった。

【0076】

【実施例3】

サンプル紙1をサンプル紙3に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.42と0.02であった。

【0077】

【実施例4】

サンプル紙1をサンプル紙4に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.32と0.03であった。

【0078】

【実施例5】

サンプル紙1をサンプル紙6に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.26と0.02であった。

【0079】

【実施例6】

サンプル紙1をサンプル紙6に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.72と0.08であった。

【0080】

【実施例7】

サンプル紙1をサンプル紙7に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.75と0.11であった。

【0081】

【実施例8】

サンプル紙1をサンプル紙8に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.71と0.03であった。

【0082】

【実施例9】

サンプル紙1をサンプル紙9に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.69と0.01であった。

【0083】

【実施例10】

サンプル紙1をサンプル紙10に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.72と0.01であった。

【0084】

【実施例11】

サンプル紙1をサンプル紙11に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.63と0.02であった。

【0085】

【実施例12】

過酸化水素濃度を0.1mMに替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.20と0.07であった。

【0086】

【実施例13】

過酸化水素濃度を20mMに替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 Δ ODおよびSDはそれぞれ0.87と0.02であった。

10

20

30

40

50

【0087】

〔実施例14〕

ウシ胎児血清を除いた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.76と0.03であった。

【0088】

〔実施例15〕

1.0% (v/v) ウシ胎児血清を用いた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.75と0.04であった。

【0089】

〔実施例16〕

99% (v/v) ウシ胎児血清を用いた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.61と0.09であった。

【0090】

〔実施例17〕

サンプル紙1をサンプル紙12に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.70と0.03であった。

【0091】

〔実施例18〕

サンプル紙1をサンプル紙13に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.54と0.02であった。

【0092】

〔実施例19〕

サンプル紙1をサンプル紙14に替えた以外は実施例1と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.61と0.02であった。

【0093】

〔比較例1〕

比較サンプル紙を用いた以外は実施例12と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.82と0.23であったが、反応槽が染料1で染色されてしまう現象が観測された。

【0094】

〔比較例2〕

比較サンプル紙を用いた以外は実施例13と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.81と0.22であったが、反応槽が染料1で染色されてしまう現象が観測された。

【0095】

〔比較例3〕

比較サンプル紙を用いた以外は実施例14と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.88と0.21であったが、反応槽が染料1で染色されてしまう現象が観測された。

【0096】

〔比較例4〕

比較サンプル紙を用いた以外は実施例15と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.83と0.26であったが、反応槽が染料1で染色されてしまう現象が観測された。

【0097】

〔比較例5〕

比較サンプル紙を用いた以外は実施例16と同様の方法で評価を行った。 ΔOD およびSDはそれぞれ0.86と0.33であったが、反応槽が染料1で染色されてしまう現象が観測された。

【0098】

10

20

30

40

50

評価としては、下記の基準とし、A～Cまでを許容レベル、Dを許容できないレベルとした。

A：SD値が0.05未満

B：SD値が0.05以上、0.1未満

C：SD値が0.1以上、0.2未満

D：SD値が0.2以上

【0099】

以下に本発明の実施例で得られたサンプル紙の評価結果を表1に記載する。

【表1】

表1

	ΔOD	SD	評価結果	備考
実施例1	0.73	0.03	A	
実施例2	0.53	0.02	A	
実施例3	0.42	0.02	A	
実施例4	0.32	0.03	A	
実施例5	0.26	0.02	A	
実施例6	0.72	0.08	B	
実施例7	0.75	0.11	C	
実施例8	0.71	0.03	A	
実施例9	0.69	0.01	A	
実施例10	0.72	0.01	A	
実施例11	0.63	0.02	A	
実施例12	0.20	0.07	B	
実施例13	0.87	0.02	A	
実施例14	0.76	0.03	A	
実施例15	0.75	0.04	A	
実施例16	0.61	0.09	B	
比較例1	0.82	0.23	C	反応槽が染色された
比較例2	0.81	0.22	C	反応槽が染色された
比較例3	0.88	0.21	C	反応槽が染色された
比較例4	0.83	0.26	C	反応槽が染色された
比較例5	0.86	0.33	C	反応槽が染色された

10

20

30

40

50

フロントページの続き

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
(72)発明者 水澤 圭吾
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
(72)発明者 河田 功
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
(72)発明者 伊藤 祐斗
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
(72)発明者 山本 毅
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
(72)発明者 金崎 健吾
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

審査官 堀 洋樹

(56)参考文献 特開昭56-31641 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C09B 1/00-69/10

G01N 33/48-33/98

CAPLUS/REGISTRY (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)