(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年1月18日(18.01.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/012607 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/26 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2017/025622

(22) 国際出願日： 2017年7月13日(13.07.2017)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-138547 2016年7月13日(13.07.2016) JP

(71) 出願人: キッコーマン株式会社(**KIKKOMAN CORPORATION**) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 一柳 敦 (**ICHIYANAGI Atsushi**); 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 下地 一彦 (**SHIMOJI Kazuhiko**); 〒2788601 千葉県野田市野田２５０番地 キッコーマンバイオケミファ株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, 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)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2018/012607 A1

(54) **Title:** REACTION ACCELERATOR

(54) 発明の名称： 反応促進剤

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

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

明　細　書

発明の名称 ： 反応促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、オキシダーゼの反応促進剤（例えばアマドリアーゼの反応促進剤、サルコシンオキシダーゼの反応促進剤、及び、コレステロールオキシダーゼの反応促進剤などが挙げられるがこれに限らない）に関する。

背景技術

[0002] オキシダーゼは、酸化反応を触媒する酵素であり、様々な分野に応用されている。例えば糖尿病の臨床診断分野において、糖尿病患者の診断や症状管理のための重要な血糖コントロールマーカーとして、ヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）および糖化アルブミン（ＧＡ）が注目されている。このＨｂＡ１ｃおよびＧＡを迅速かつ簡便に測定する方法として、オキシダーゼの一種であるアマドリアーゼを用いる酵素的方法がある。

[0003] アマドリアーゼは、酸素の存在下で、イミノ２酢酸もしくはその誘導体（「アマドリ化合物」ともいう）を酸化して、グリオキシル酸又はα－ケトアルデヒド、アミノ酸又はペプチド及び過酸化水素を生成する反応を触媒する。アマドリアーゼとしては、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、A1cオキシダーゼ（A1cOX）などが挙げられる。

[0004] アマドリアーゼを用いたＨｂＡ１ｃ測定法としては、例えばＨｂＡ１ｃをプロテアーゼ等で分解し、そのβ鎖アミノ末端より遊離させた糖化基質を定量する方法が知られている（例えば、特許文献１～１１）。さらに、プロテアーゼを必要とせずＨｂＡ1ｃに直接作用するアマドリアーゼ（A1cOX）もいくつか知られている（特許文献１２、１３）。

[0005] HbA1cの測定では、反応を10分程度の短時間で完了させることが望ましい。一方で、これまでに知られているA1cOXの種類は限られており、10分程度の短時間で反応を完了させるには、場合により測定試薬にA1cOXを多量に処方する必要があった。ところが酵素は一般に高価であり、HbA1c測定試薬へのA1cOX

の処方量の低減が望まれていた。

[0006] 特許文献１４は、反応系におけるフェノチアジン誘導体色素を吸光度測定により検出する方法において、フェノチアジン誘導体の検出波長をシフトさせる化合物を記載している。

[0007] サルコシンオキシダーゼ(ザルコシンオキシダーゼともいう)(EC 1.5.3.1)は、ザルコシンを加水分解してグリシン及びホルムアルデヒドを生成する触媒作用を有する酵素であり、ヒトの血清中又は尿中のクレアチニン量の測定に用いることができ、腎臓病をはじめとする各種の疾患の診断薬として利用することができる。サルコシンオキシダーゼは、コリネバクテリウム属、バチルス属、シリンドロカーボン属、シュードモナス属、アースロバクター属等の由来が知られている。改変型サルコシンオキシダーゼやサルコシンオキシダーゼの種々の由来については、例えば特許文献１５～１７を参照のこと。

[0008] コレステロールオキシダーゼ(EC 1.1.3.6)は、３β－ヒドロキシステロイドと酸素の間の反応を触媒し、相当する３－オキソステロイドと過酸化水素を生成する酸化酵素である。コレステロールオキシダーゼは、体液中のコレステロール濃度の測定（特許文献１８）等に利用することを目的として研究開発されている。コレステロールオキシダーゼはストレプトマイセス、ブレビバクテリウム、ロドコッカス、シュードモナス、バークホルデリア・セパシア等により生産されることが知られている。コレステロールオキシダーゼやその種々の由来については例えば特許文献１９を参照のこと。

[0009] アマドリアーゼを用いた糖化アルブミン（ＧＡ）測定法としては、例えばＧＡをプロテアーゼ等で分解し、遊離させた糖化基質ε－フルクトシルリジン（ε－ＦＫ）を定量する方法が知られている。例えば特許文献２０を参照のこと。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第２００４／１０４２０３号パンフレット

特許文献2：国際公開第２００５／４９８５７号パンフレット

特許文献3：特開２００１－９５５９８号公報

特許文献4：特公平０５－３３９９７号公報

特許文献5：特開平１１－１２７８９５号公報

特許文献6：国際公開第９７／１３８７２号パンフレット

特許文献7：特開２０１１－２２９５２６号公報

特許文献8：国際公開第２０１１／０１５３２５号パンフレット

特許文献9：国際公開第２００８／１０８３８５号パンフレット

特許文献10：国際公開第２０１５／００５２５８号パンフレット

特許文献11：国際公開第２０１３／１６２０３５号パンフレット

特許文献12：国際公開第２０１５／０６０４２９号パンフレット

特許文献13：国際公開第２０１５／００５２５７号パンフレット

特許文献14：国際公開第２００８／０９３７２２号パンフレット

特許文献15：特開2005-176828

特許文献16：特開2005-168487

特許文献17：特開2000-175685

特許文献18：特開平６－１６９７６５号公報

特許文献19：特開2007-014329

特許文献20：特開２００１－２０４４９５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] こうした問題に鑑み、本発明は、オキシダーゼ（例えばアマドリアーゼが挙げられるがこれに限らない）が触媒する酵素反応を促進する化合物、すなわちオキシダーゼ反応促進剤（例えばアマドリアーゼ反応促進剤等が挙げられるがこれに限らない）を提供する。さらに本発明はオキシダーゼ反応促進剤（例えばアマドリアーゼ反応促進剤が挙げられるがこれに限らない）を含む組成物を提供する。さらに本発明はオキシダーゼ及びオキシダーゼ反応促進剤を用いる方法（例えばアマドリアーゼ及びアマドリアーゼ反応促進剤を用

いるHbA1cの測定方法が挙げられるがこれに限らない）を提供する。

課題を解決するための手段

[0012] アマドリアーゼをはじめとするオキシダーゼの反応を促進させる化合物についての情報が乏しい中で、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、驚くべきことにオキシダーゼの反応を促進させることのできる化合物を見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、以下の実施形態を包含する。

[0013] [１] オキシダーゼ、及び、下記の式（I)で表されるオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、オキシダーゼ反応を用いる方法、

[化1]

$$R^1-N=N-R^2 \qquad (I)$$

[式中、

R^1及びR^2は、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

前記の置換基は、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-CO-NH_2$、$-R^3$、$-NH-R^4$、$-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

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

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよく、

$-R^3$は、－Ｈであるか、或いは、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ

、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

－Ｒ^{4}は、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

－Ｒ^{5}及び－Ｒ^{6}は、それぞれ独立に、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｏ－ＣＨ$_3$、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～８員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

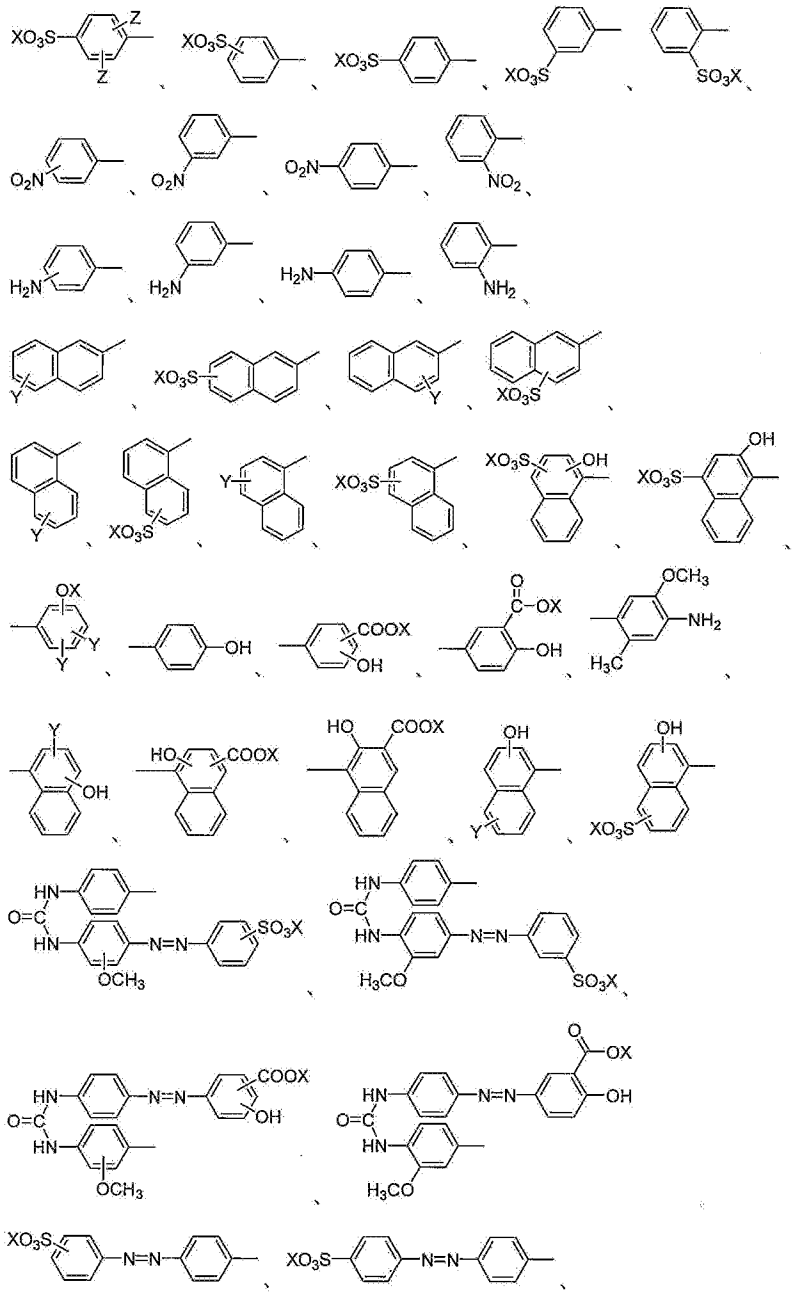
ただし、Ｒ^{1}又はＲ^{2}が、芳香族の５員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である場合には、該複素環は－ＣＯＯＸにより置換されたものではない]。

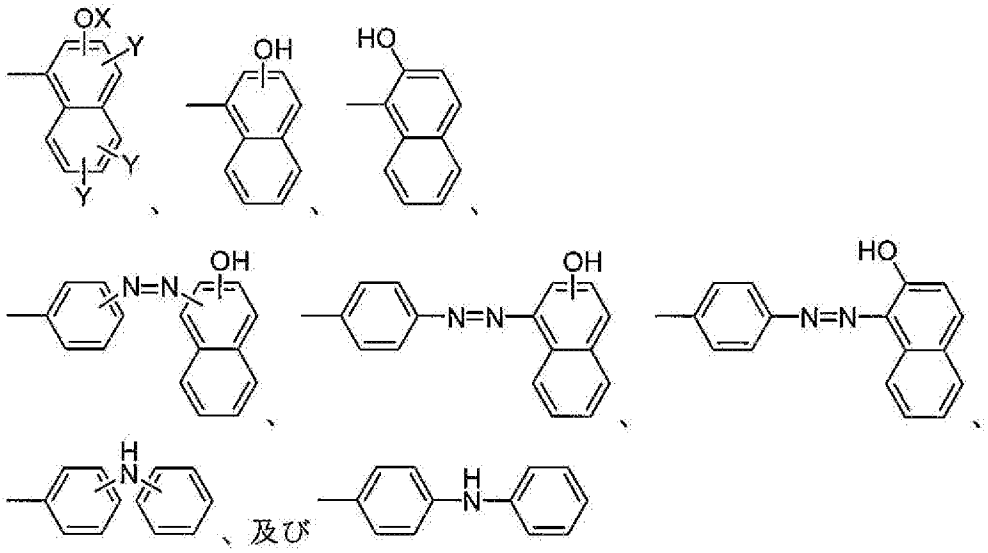
[0014] [２] 式（Ｉ）により表される反応促進剤において、Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記芳香族の６員単環の炭素環を含む１０員の縮合環である、１に記載の方法。

[0015] [３] 式（Ｉ）により表される反応促進剤において、Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、それぞれ

独立に、

[化2]

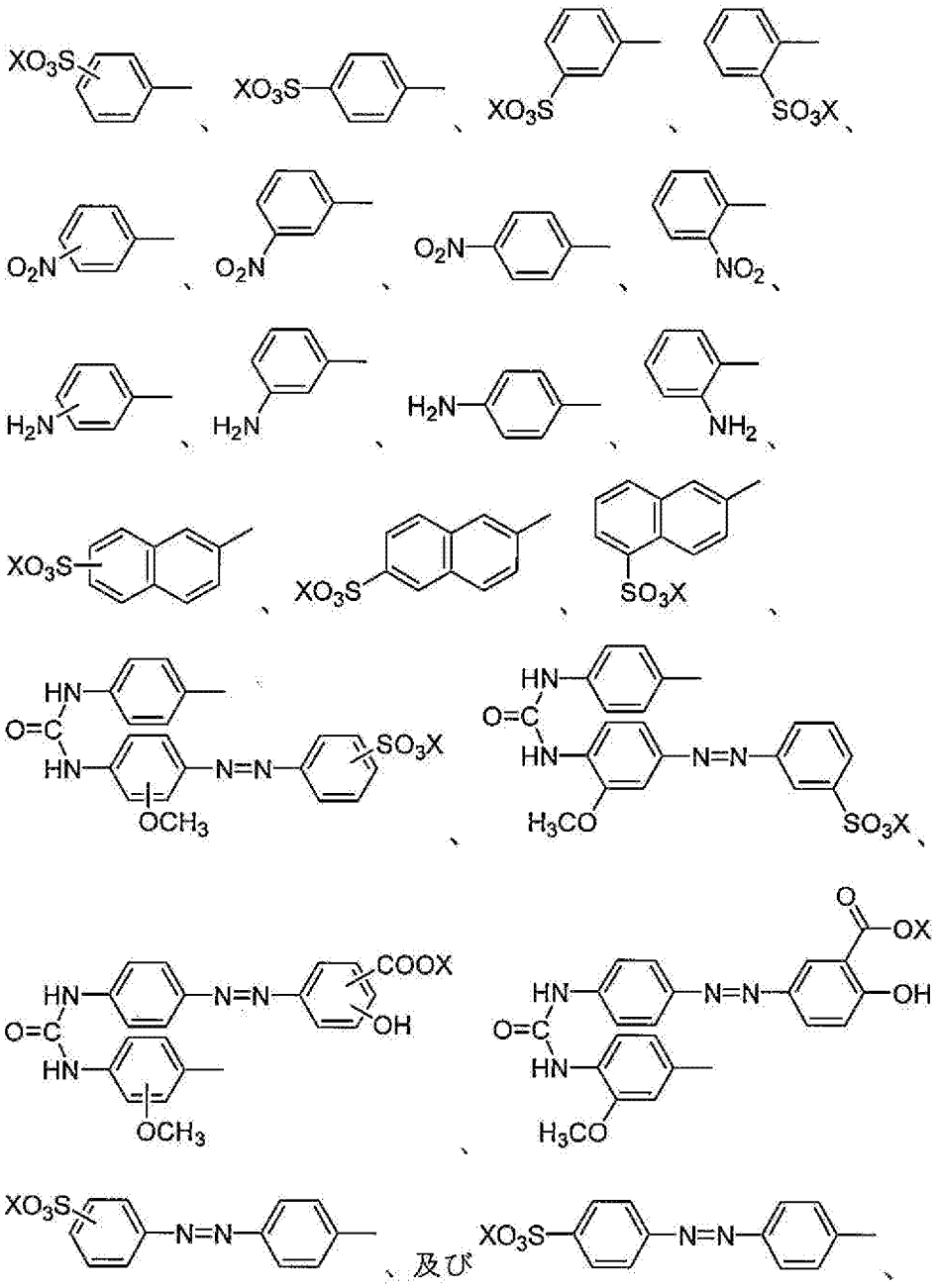




からなる群より選択され、式中、Ｘ、Ｙ、Ｚは１に定義したとおりである、１又は２に記載の方法。

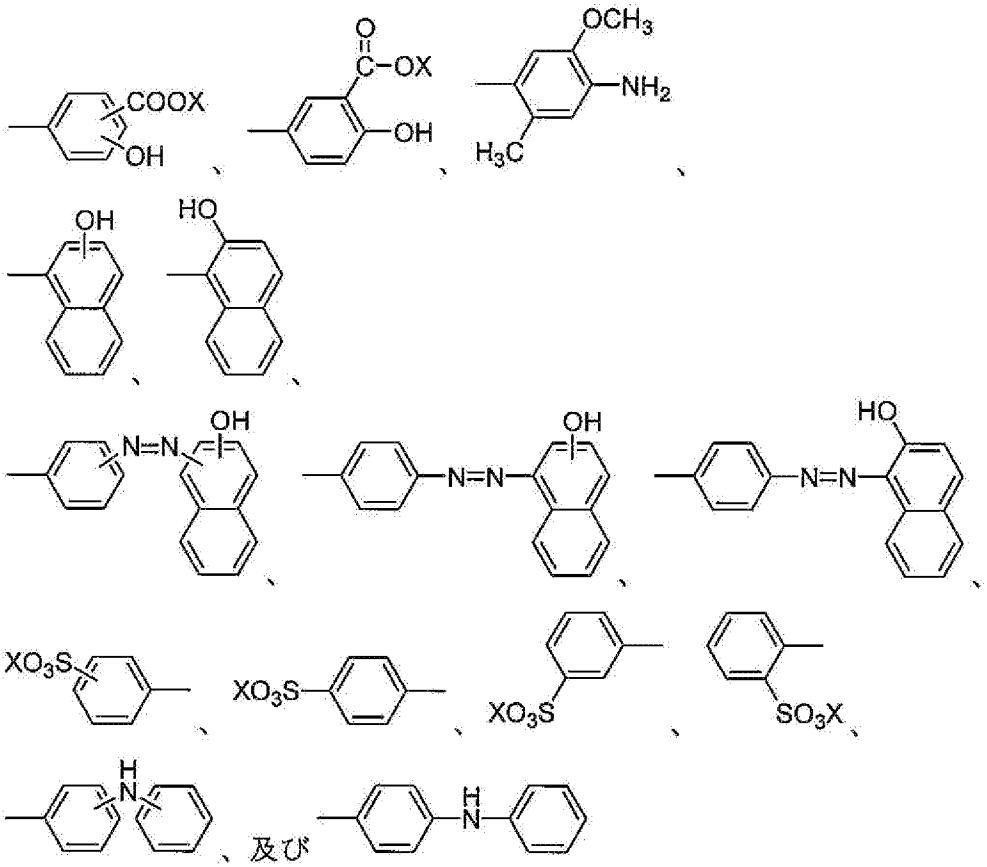
[0016]［４］ 式（I)により表される反応促進剤において、Ｒ[1]が、

[化3]



からなる群より選択され、R^2が、

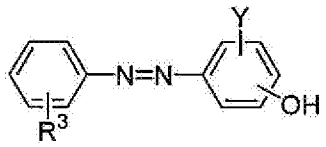
[化4]



からなる群より選択され、式中、Ｘは１に定義したとおりである、１、２又は３に記載の方法。

[0017] [５] 式（I)により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、１に記載の方法、

[化5]



(II)

［式中、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよく、

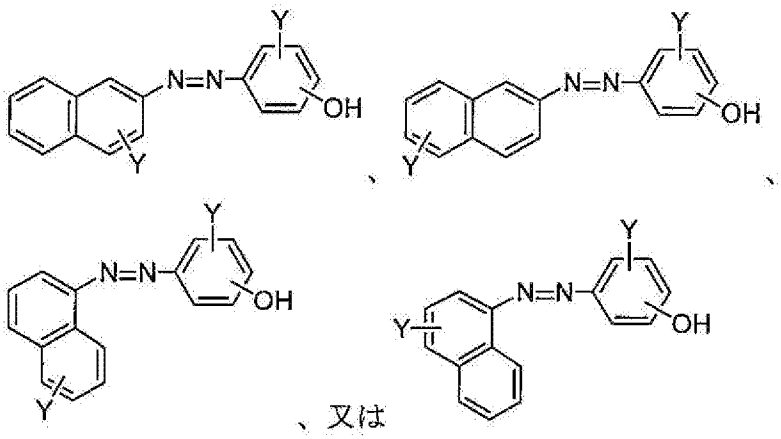
－Ｒ^{3}は、－Ｈ又は－ＮＨＣＯ－ＮＨ－Ｒ^5－Ｎ＝Ｎ－Ｒ^{6}であるか、或いは、

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

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

[0018] ［６］ 式（Ｉ）により表される反応促進剤が、下記のいずれかの式で表される反応促進剤である、１に記載の方法、

[化6]



［式中、

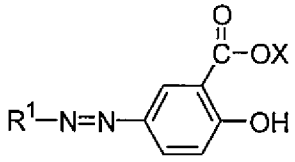
Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－SO_3Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよい]。

[0019] ［７］ 式（Ｉ）により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、１に記載の方法、

[化7]



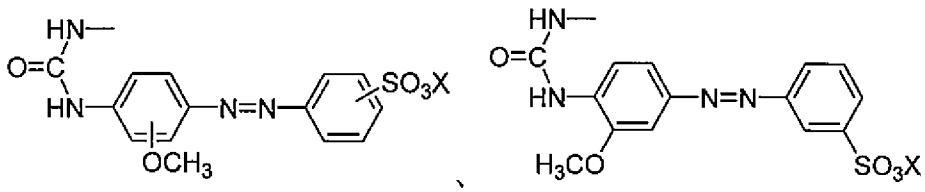
(III)

[式中、

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

前記の置換基は、－NO_2、－SO_3X、及び

[化8]



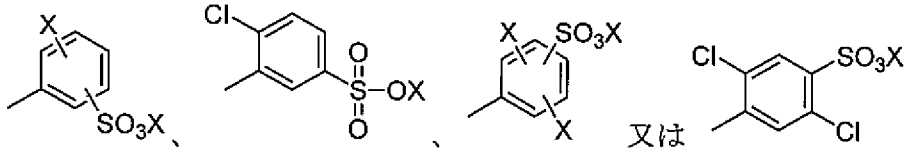
からなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]。

[0020] [８] 式（I)により表される反応促進剤において、R^1が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環であり、R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である、１に記載の方法。

[0021] [９] R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、２つの窒素原子を含む複素環であり、該複素環が

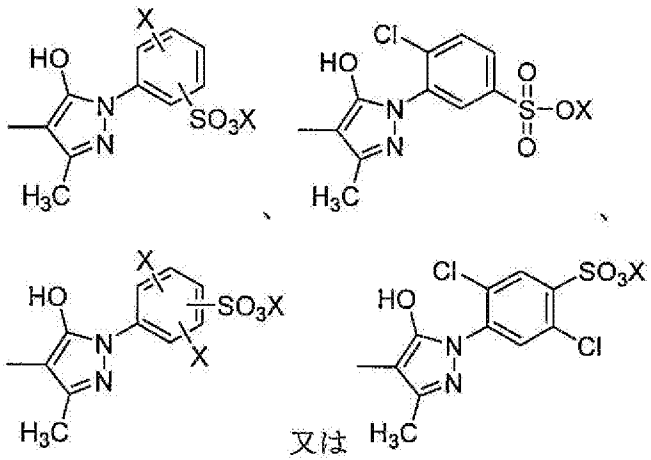
[化9]



により置換されており、式中、Ｘは１に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、１又は８に記載の方法。

[0022] [１０] R^2が、

[化10]

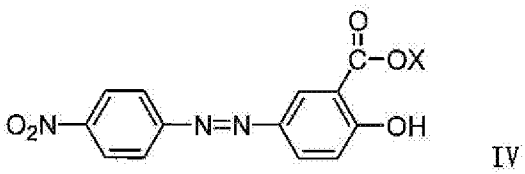


であり、式中、Ｘは１に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、１、８又は９に記載の方法。

[0023] [１１] 式（I)により表される化合物が、

以下の式により表される化合物、

[化11]

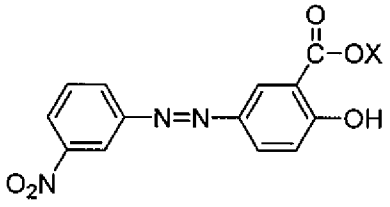


IV

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化12]

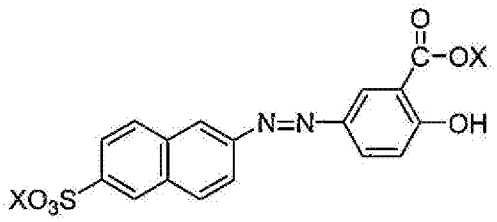


V

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化13]

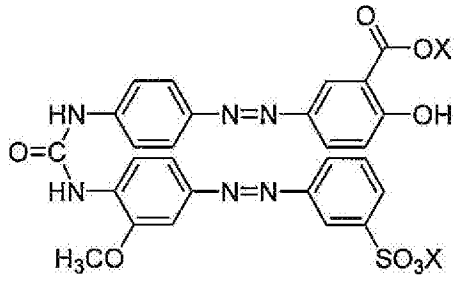


VI

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化14]

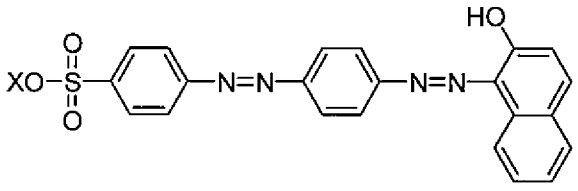


VII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化15]

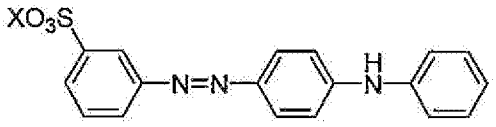


VIII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

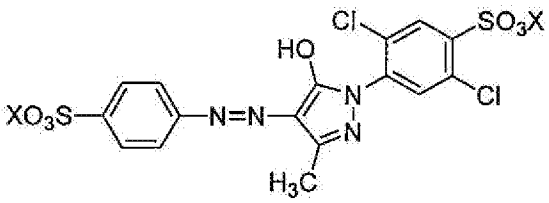
[化16]



IX

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、以下の式により表される化合物、

［化17］

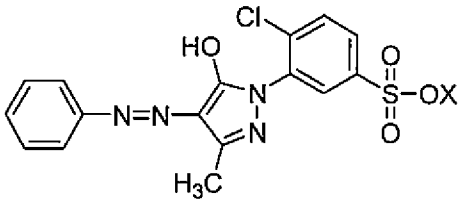


Ｘ

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい］、

以下の式により表される化合物、

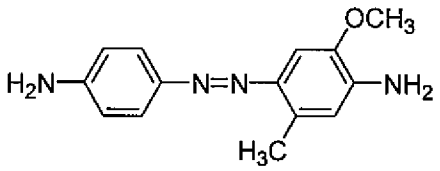
［化18］



ＸＩ

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、及び、以下の式により表される化合物、

［化19］



ＸＩＩ

からなる群より選択される、１～１０のいずれかに記載の方法。

[0024] ［１２］ オキシダーゼが、アマドリアーゼ、サルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼからなる群より選択されるオキシダーゼである、１～１１のいずれかに記載の方法。

[0025] ［１３］ 式（I)により表される化合物を含む、オキシダーゼ反応促進剤、

[化20]

$R^1-N=N-R^2$ （I）

[式中、

R^1及びR^2は、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

前記の置換基は、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-CO-NH_2$、$-R^3$、$-NH-R^4$、$-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

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

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよく、

$-R^3$は、－Ｈであるか、或いは、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-SO_3X$、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

$-R^4$は、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよ

い、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

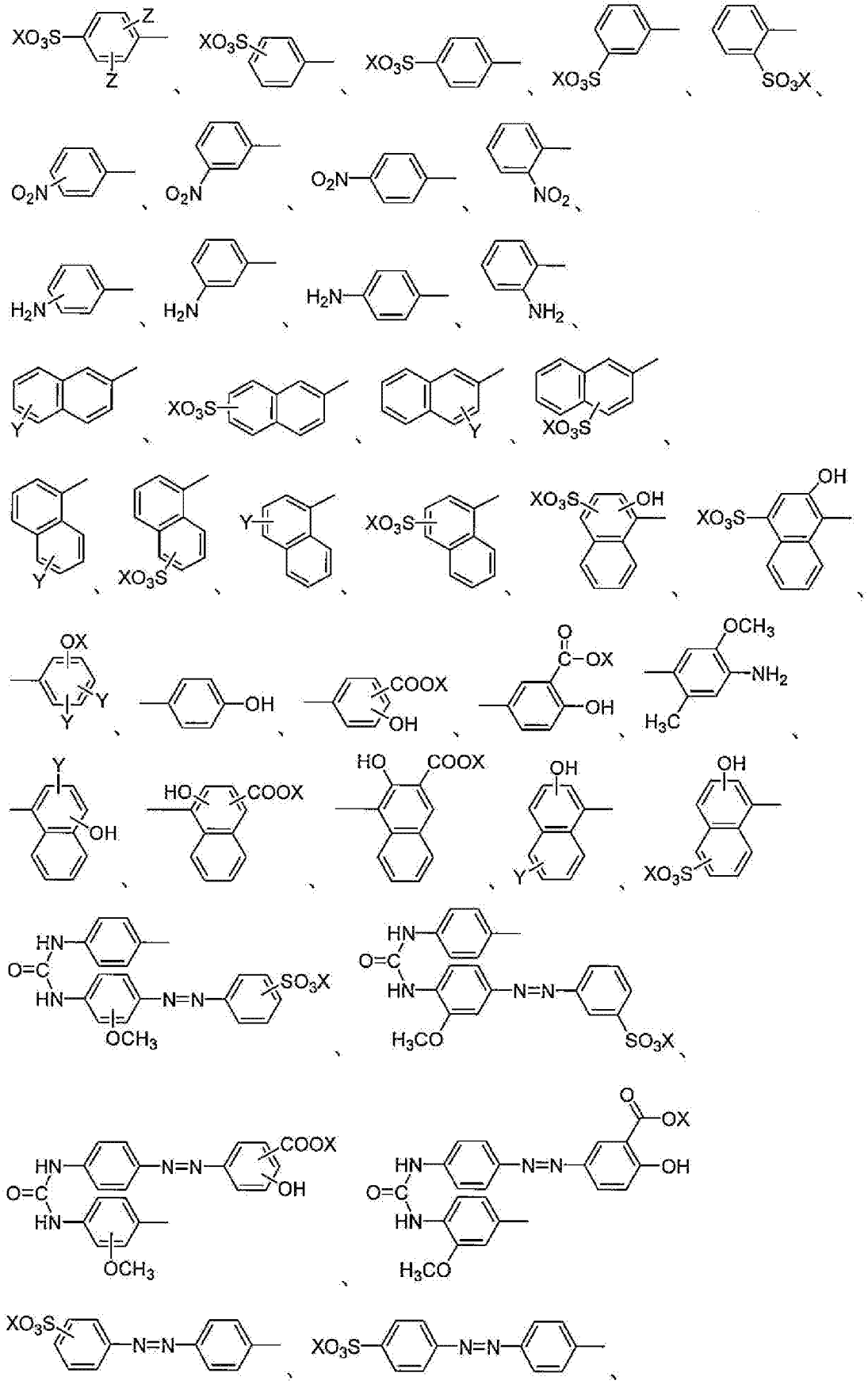
－R^5及び－R^6は、それぞれ独立に、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－C_{1-6}アルキル、－C_{2-6}アルケニル、－C_{2-6}アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－C_{1-6}アルキル、－Ｏ－CH_3、－$CONH_2$、－NO_2、－NH_2、－SO_3X、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～８員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

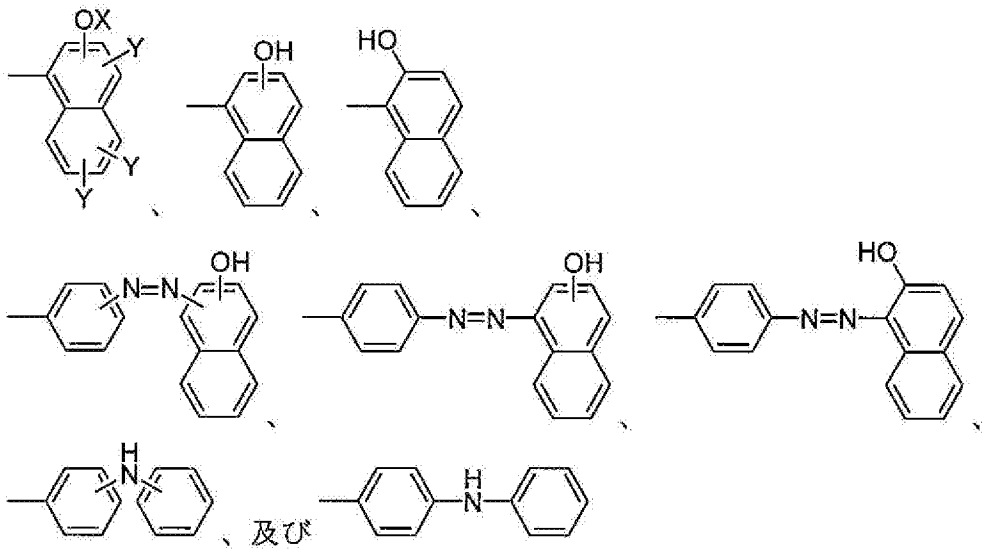
ただし、R^1又はR^2が、芳香族の５員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である場合には、該複素環は－ＣＯＯＸにより置換されたものではない]。

[0026] [１４] 式（I)により表される反応促進剤において、R^1及びR^2が、それぞれ独立に、場合により置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記芳香族の６員単環の炭素環を含む１０員の縮合環である、１３に記載の反応促進剤。

[0027] [１５] 式（I)により表される化合物において、R^1及びR^2が、それぞれ独立に、

[化21]



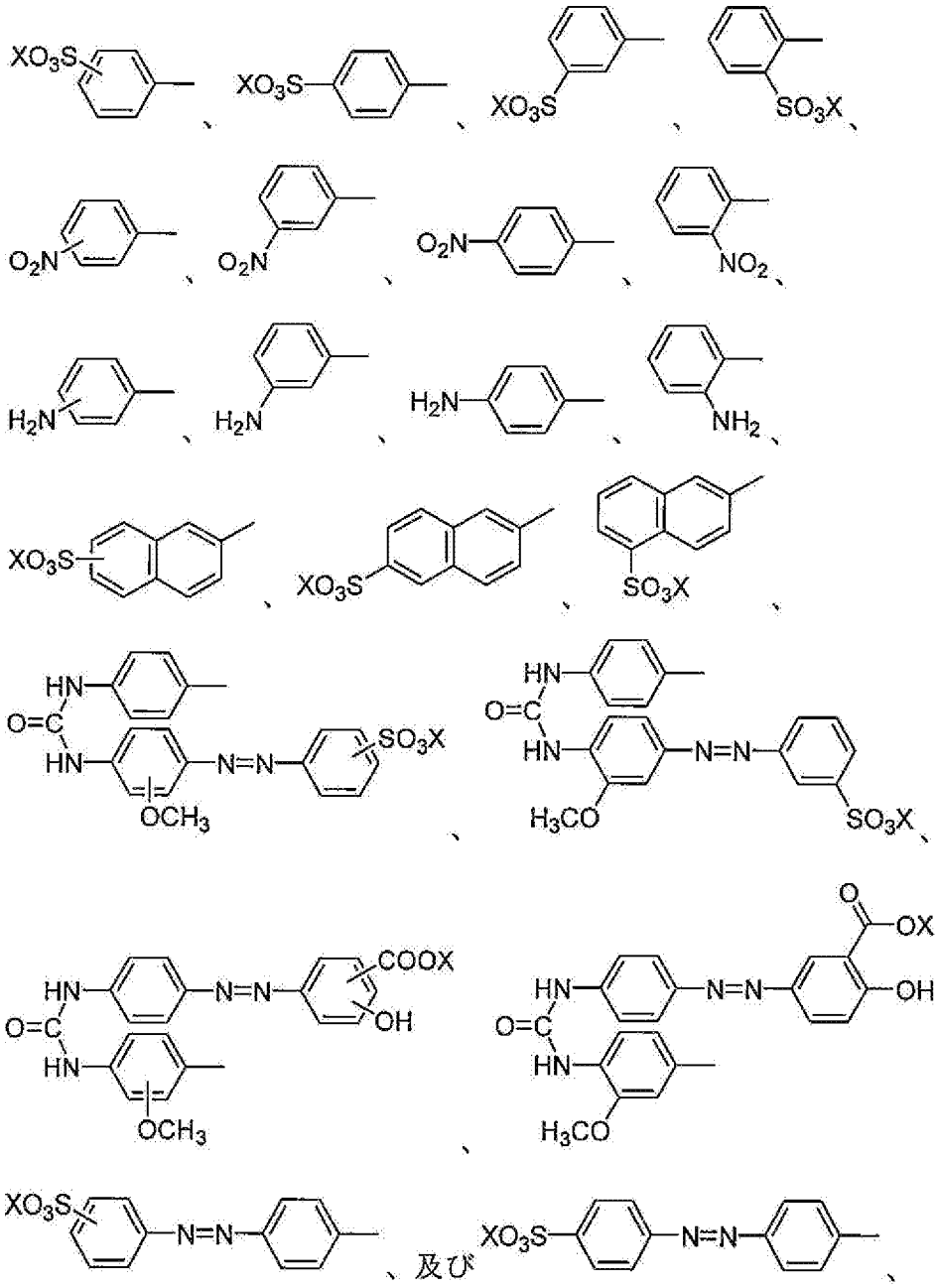


、及び

からなる群より選択され、式中、Ｘ、Ｙ、Ｚは１２に定義したとおりである、１３又は１４に記載の反応促進剤。

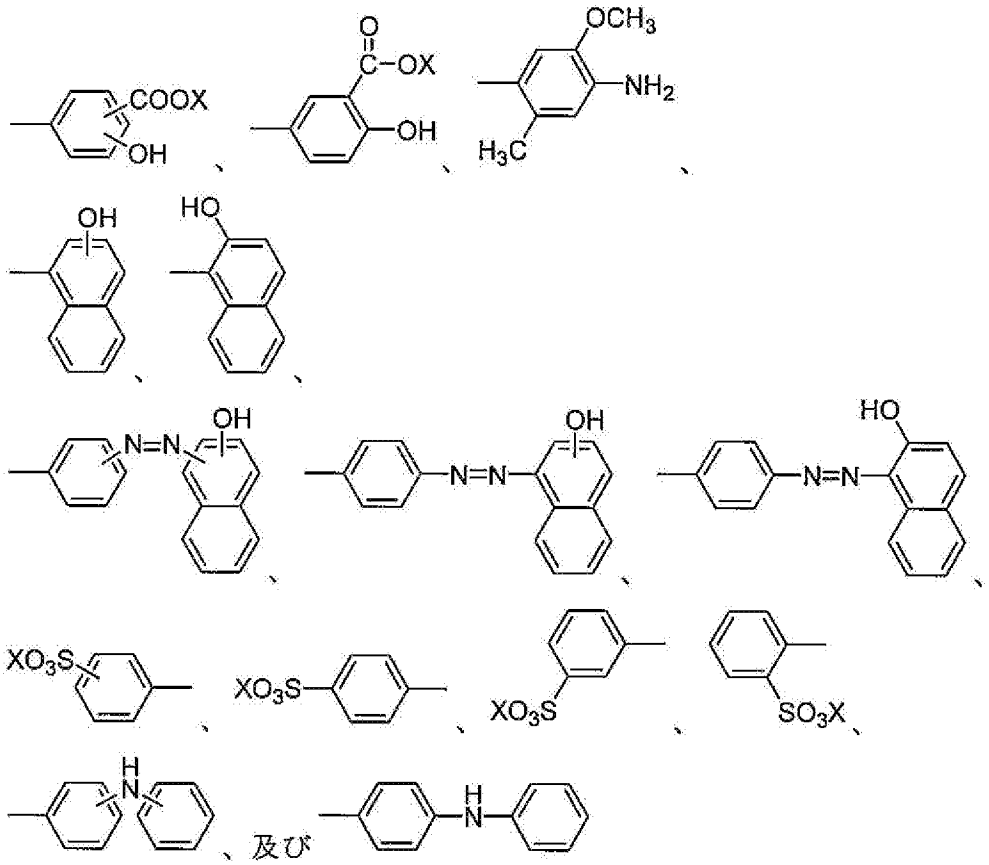
[0028]［１６］ 式（I)により表される反応促進剤において、Ｒ[1]が、

[化22]



からなる群より選択され、R^2が、

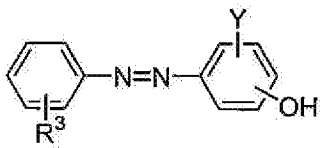
[化23]



からなる群より選択され、式中、Ｘは１２に定義したとおりである、１３～１５のいずれかに記載の反応促進剤。

[0029] [１７] 式（I)により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、１３～１６のいずれかに記載の反応促進剤、

[化24]



(II)

[式中、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

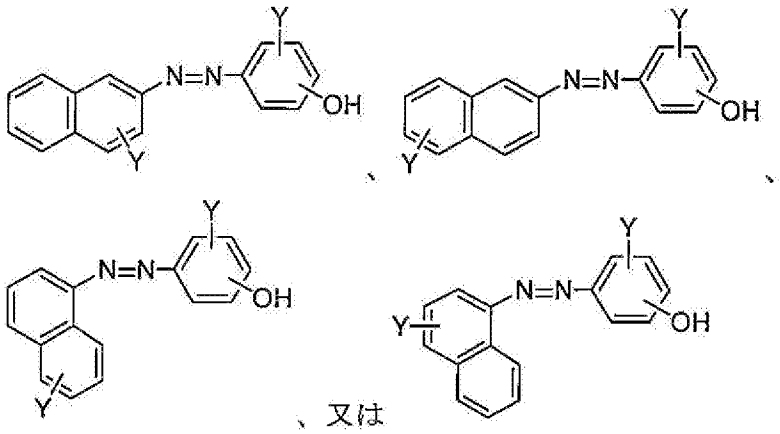
各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよく、

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

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

[0030] [１８] 式（I)により表される反応促進剤が、下記のいずれかの式で表される反応促進剤である、１３～１７のいずれかに記載の反応促進剤、

[化25]



[式中、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

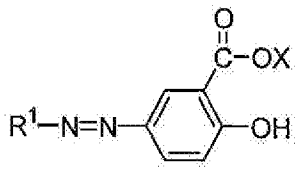
Ｙは、－Ｈ、－SO_3X、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよい]。

[0031] [１９] 式（I)により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進

剤である、１３～１７のいずれかに記載の反応促進剤、

[化26]



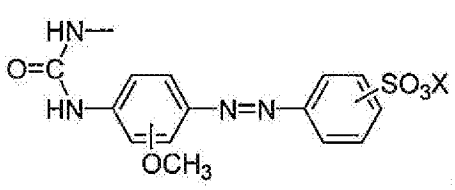
(III)

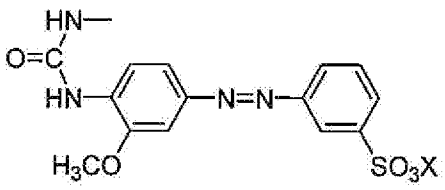
[式中、

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

前記の置換基は、－NO_2、－SO_3X、及び

[化27]





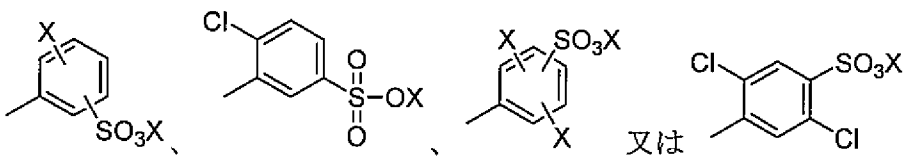
からなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]。

[0032] [２０] 式（I)により表される反応促進剤において、R^1が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環であり、R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である、１３に記載の反応促進剤。

[0033] [２１] R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、２つの窒素原子を含む複素環であり、該複素環が

[化28]

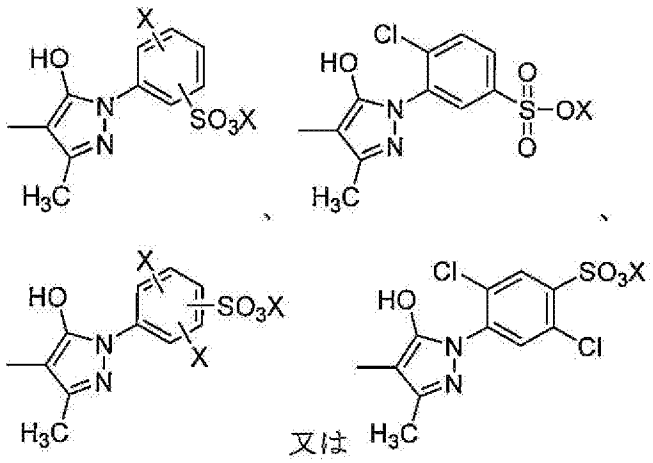


により置換されており、式中、Ｘは１２に定義したとおりであり、各Ｘは同

一でも異なっていてもよい、１３又は２０に記載の反応促進剤。

[0034] [２２] R^2が、

[化29]

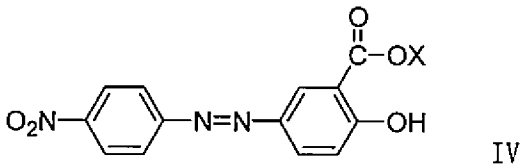


であり、式中、Ｘは１２に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、１３、２０又は２１に記載の反応促進剤。

[0035] [２３] 式（I)により表される化合物が、

以下の式により表される化合物、

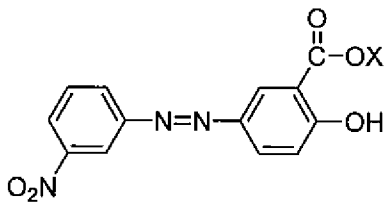
[化30]



IV

以下の式により表される化合物、

[化31]

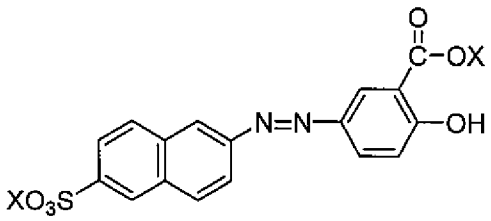


V

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化32]

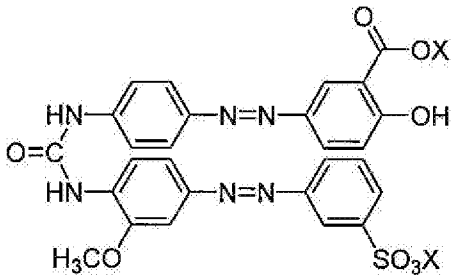


VI

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化33]

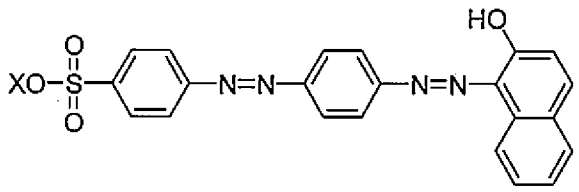


VII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化34]

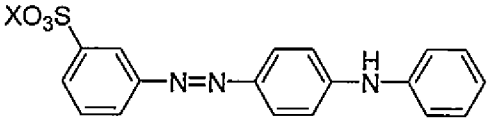


VIII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

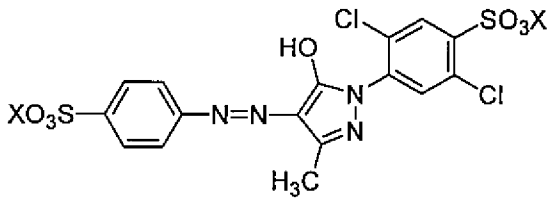
[化35]



IX

以下の式により表される化合物、

[化36]

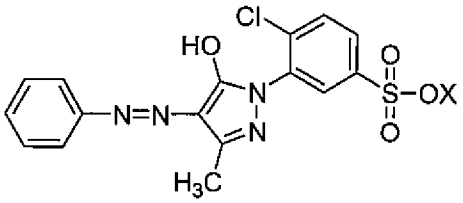


X

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化37]

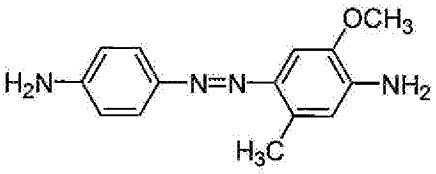


XI

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]

及び、以下の式により表される化合物、

[化38]



XII

からなる群より選択される、１３～２２のいずれかに記載の反応促進剤。

[0036] ［２４］ １３～２３のいずれかに記載の反応促進剤及びオキシダーゼを含む、組成物。

[0037] ［２５］ オキシダーゼが、アマドリアーゼ、サルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼからなる群より選択されるオキシダーゼである、２４に記載の組成物。

[0038] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-138547号の

開示内容を包含する。

発明の効果

[0039] 本発明の効果として、オキシダーゼが触媒する酵素反応を促進しうる。これにより測定に必要な酵素量を軽減したり、同じ酵素量でも反応時間を短縮したり、測定感度を高めたりすることができる。例えばある実施形態において、アマドリアーゼが触媒する酵素反応を促進することができる。これによりHbA1c測定試薬へのアマドリアーゼの処方量、例えばA1cOXの処方量や、GA測定試薬へのアマドリアーゼの処方量を、本発明のアマドリアーゼ反応促進剤を添加しない場合と比較して、低減することができる。また同一のアマドリアーゼの処方量であれば、酵素反応が促進されるため、測定の高感度化及び／又は反応時間短縮が可能となる。他のオキシダーゼ（例えばサルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ等）についても、同様である。

図面の簡単な説明

[0040] [図1]希釈試料と第１試薬を混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定した結果を示す。横軸は時間（分）であり、縦軸は$A_{694/751}$（$A_{694}-A_{751}$）である。また、$A_{694/751}$と、ΔA_{9min}及びΔA_{10min}との関係を示す。

発明を実施するための形態

[0041] ある実施形態において、本発明は、オキシダーゼ反応促進剤を提供する。ここでオキシダーゼ反応促進剤とは、オキシダーゼが触媒する酵素反応を促進する化合物をいう。オキシダーゼが触媒する酵素反応を促進するとは、オキシダーゼ反応促進剤が系に存在しない場合と比較して、本発明のオキシダーゼ反応促進剤が系に存在する場合、同一反応時間中により多くの生成物（過酸化水素等）が生成する、又は、より短時間で反応が完了する若しくはほぼ完了することをいう。

[0042] 本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、種々のオキシダーゼの反応を促進しうる。ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、アマドリアーゼの反応を促進しうる。この場合、本発明のオキシダーゼ反応促進剤

のことをアマドリアーゼ反応促進剤ともいう。ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、サルコシンオキシダーゼの反応を促進しうる。この場合、本発明のオキシダーゼ反応促進剤のことをサルコシンオキシダーゼ反応促進剤ともいう。ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、コレステロールオキシダーゼの反応を促進しうる。この場合、本発明のオキシダーゼ反応促進剤のことをコレステロールオキシダーゼ反応促進剤ともいう。なお、これらの名称はあくまで便宜上のものである。例えば同一の反応促進剤化合物が、アマドリアーゼの反応を促進し、かつ、サルコシンオキシダーゼの反応を促進することがあり、このような反応促進剤は、アマドリアーゼ反応促進剤に該当するとともにサルコシンオキシダーゼ反応促進剤にも該当する。したがってアマドリアーゼ反応促進剤などの名称は、何ら本発明の反応促進剤を限定する意味に解されてはならない。本明細書において本発明の反応促進剤という場合、特に断らない限りこれはオキシダーゼ反応促進剤を意味する。

[0043] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、アマドリアーゼの反応を促進しうる。ある実施形態において反応が促進されるアマドリアーゼとしては、α-フルクトシルバリン（αFV）、α-フルクトシルバリルヒスチジン（αFVH）、及び／又はα-フルクトシルヘキサペプチド（αF6P）を基質とするアマドリアーゼが挙げられるがこれに限らない。ある実施形態において、反応が促進されるアマドリアーゼとしては、ε－フルクトシルリジン（ε－ＦＫ）を基質とするアマドリアーゼが挙げられる。ある実施形態において、反応が促進されるアマドリアーゼとしては、ヘモグロビンA1ｃに直接作用するアマドリアーゼ、すなわちヘモグロビンA1ｃオキシダーゼ（A1c OX）が挙げられる。この場合、本発明のアマドリアーゼ反応促進剤のことをヘモグロビンA1ｃオキシダーゼ反応促進剤ともいう。

[0044] ある実施形態において、本発明は、オキシダーゼ及びオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む方法を提供する。例えばある実施形態において、本発明は、オキシダーゼ及びオキシダーゼ反応促進剤を用いることを含む、オ

キシダーゼ反応生成物の測定方法を提供する。別の実施形態では、本発明はオキシダーゼ及びオキシダーゼ反応促進剤を用いることを含む、生成物の合成方法を提供する。別の実施形態では、本発明はオキシダーゼ及びオキシダーゼ反応促進剤を用いることを含む、過酸化水素の生成方法を提供する。この方法は例えば、生成する過酸化水素を利用し、殺菌、洗浄、酸化反応などに適用しうる。

[0045] ある実施形態において、本発明は、オキシダーゼ及びオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、測定対象物質の測定方法を提供する。ある実施形態において、本発明の方法は、測定対象物質を含み得る試料にペルオキシダーゼ、及びオキシダーゼ反応促進剤を含む第１試薬を添加し加温する工程、発色剤と反応促進されるオキシダーゼとを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、及びオキシダーゼ反応促進剤を含む第１試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。発色剤と反応促進されるオキシダーゼを含む第２試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。別の実施形態では、本発明の測定方法は、測定対象物質を含み得る試料にペルオキシダーゼ、発色剤及びオキシダーゼ反応促進剤を含む第1試薬を添加し加温する工程、反応促進されるオキシダーゼを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。やはり試薬中の各成分は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数試薬の組み合わせでもよい。測定は定性的でも定量的でもよい。

[0046] 別の実施形態において、本発明の測定方法は、測定対象物質を含み得る試料に、ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ反応促進剤、発色剤及び反応促進されるオキシダーゼを含む測定試薬を添加し加温する工程、並びに試薬の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、オキシダーゼ反応促進剤、発色剤及び反応促進されるオキシダーゼを含む測定試薬は単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。

[0047] ある実施形態において、本発明は、アマドリアーゼ及びアマドリアーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、HbA1cの測定方法を提供する。ある実施形態において、本発明のHbA1cの測定方法は、HbA1cを含み得る試料にペルオキシダーゼ、及びアマドリアーゼ反応促進剤を含む第１試薬を添加し加温する工程、発色剤とアマドリアーゼを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、及びアマドリアーゼ反応促進剤を含む第１試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。発色剤とアマドリアーゼを含む第２試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。別の実施形態では、本発明のHbA1cの測定方法は、HbA1cを含み得る試料にペルオキシダーゼ、発色剤及びアマドリアーゼ反応促進剤を含む第1試薬を添加し加温する工程、アマドリアーゼを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。やはり試薬中の各成分は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数試薬の組み合わせでもよい。測定は定性的でも定量的でもよい。ある実施形態では、ペルオキシダーゼ及びアマドリアーゼ反応促進剤を含む第１試薬を添加し加温する工程において、さらに試料中の全ヘモグロビンを定量することができる。ある実施形態ではさらに、定量した全ヘモグロビン及び糖化ヘモグロビンから、試料中の全ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンの割合、HbA1c％を算出しうる。

[0048] 別の実施形態において、本発明のHbA1cの測定方法は、HbA1cを含み得る試料に、ペルオキシダーゼ、アマドリアーゼ反応促進剤、発色剤及びアマドリアーゼを含む測定試薬を添加し加温する工程、並びに試薬の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、アマドリアーゼ反応促進剤、発色剤及びアマドリアーゼを含む測定試薬は単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。

[0049] ある実施形態において、アマドリアーゼとしてはαFV、αFVH及び／又はαF6P等の糖化基質に作用するアマドリアーゼを用いることができる。この場合

、本発明のHbA1c測定方法は、HbA1cをプロテアーゼで前処理する工程をさらに有しうる。プロテアーゼとしては任意の公知のものを使用しうる。別の実施形態において、アマドリアーゼとして、ε－ＦＫに作用するアマドリアーゼを用いることができる。これは糖化アルブミン（ＧＡ）の測定方法に利用することができる。この場合、GA測定方法は、ＧＡをプロテアーゼで前処理する工程をさらに有しうる。別の実施形態において、アマドリアーゼとして、HbA1cに直接作用するヘモグロビンA1ｃオキシダーゼ（A1cOX）を用いることができる。この場合、プロテアーゼでの前処理は行わなくともよい。

[0050] ある実施形態において、本発明は、サルコシンオキシダーゼ及び本発明の反応促進剤を用いる工程を含む、サルコシンの測定方法を提供する。この測定方法には、上流工程として、クレアチニンをクレアチニンアミドヒドロラーゼ（クレアチニナーゼともいう）によりクレアチンに変換し、クレアチンをクレアチンアミジノヒドロラーゼ（クレアチナーゼともいう）によりサルコシンに変換する工程を追加してもよい。これによりクレアチニン又はクレアチンの測定方法が提供される。ある実施形態において、本発明の測定方法は、測定対象物質（サルコシン）を含み得る試料にペルオキシダーゼ、及び本発明の反応促進剤を含む第１試薬を添加し加温する工程、発色剤とサルコシンオキシダーゼとを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、及び本発明の反応促進剤を含む第１試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。発色剤とサルコシンオキシダーゼとを含む第２試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。別の実施形態では、本発明の測定方法は、測定対象物質を含み得る試料にペルオキシダーゼ、発色剤及び本発明の反応促進剤を含む第1試薬を添加し加温する工程、サルコシンオキシダーゼを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。やはり試薬中の各成分は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数試薬の組み合わせでもよい。測定は定性的でも定量的でもよい。

[0051] 別の実施形態において、本発明の測定方法は、測定対象物質を含み得る試料に、ペルオキシダーゼ、本発明の反応促進剤、発色剤及びサルコシンオキシダーゼを含む測定試薬を添加し加温する工程、並びに試薬の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、本発明の反応促進剤、発色剤及び反応促進されるオキシダーゼを含む測定試薬は単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。

[0052] ある実施形態において、本発明は、コレステロールオキシダーゼ及び本発明の反応促進剤を用いる工程を含む、コレステロールの測定方法を提供する。この測定方法には、上流工程として、コレステロールエステルをコレステロールエステラーゼによりコレステロールに変換する工程を追加してもよい。ある実施形態において、本発明の測定方法は、コレステロールを含み得る試料にペルオキシダーゼ、及び本発明の反応促進剤を含む第１試薬を添加し加温する工程、発色剤とコレステロールオキシダーゼとを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、及び本発明の反応促進剤を含む第１試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。発色剤とコレステロールオキシダーゼとを含む第２試薬は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。別の実施形態では、本発明の測定方法は、コレステロールを含み得る試料にペルオキシダーゼ、発色剤及び本発明の反応促進剤を含む第1試薬を添加し加温する工程、コレステロールオキシダーゼを含む第２試薬を添加し加温する工程、並びに試料の吸光度を測定する工程を含む。やはり試薬中の各成分は、単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数試薬の組み合わせでもよい。測定は定性的でも定量的でもよい。

[0053] 別の実施形態において、本発明の測定方法は、コレステロールを含み得る試料に、ペルオキシダーゼ、本発明の反応促進剤、発色剤及びコレステロールオキシダーゼを含む測定試薬を添加し加温する工程、並びに試薬の吸光度を測定する工程を含む。ペルオキシダーゼ、本発明の反応促進剤、発色剤及

びコレステロールオキシダーゼを含む測定試薬は単一の試薬でもよく、個別の成分をそれぞれ含有する複数の試薬の組み合わせでもよい。

[0054] 試料溶液に添加する本発明の反応促進剤の終濃度は特に限定されず、例えば、０．０１～２００ｍＭ、０．０２～１５０ｍＭ、０．０３～１００ｍＭ、０．０４～８０ｍＭ、０．０５～６０ｍＭ、０．０６～５０ｍＭ、０．０８～４０ｍＭ、０．１ｍＭ～３０ｍＭ、０．１５～２０ｍＭ、０．２～１０ｍＭ、０．３～５ｍＭ、０．４～３ｍＭ、例えば０．０５～１０ｍＭの範囲であり得る。試料溶液に添加する本発明の反応促進剤の終濃度は特に限定されず、例えば０．００１～５％（ｗ／ｖ）、０．００３～３％（ｗ／ｖ）、０．００５～１％（ｗ／ｖ）、０．０１～０．５％（ｗ／ｖ）、０．０２～０．３％（ｗ／ｖ）、０．０３～０．１％（ｗ／ｖ）であり得る。なお、反応促進剤と他の酵素や試薬との添加順序は制限されず、同時でも逐次添加でもよい。

[0055] 例えば測定対象物質が糖化基質であり、試料溶液中の糖化基質濃度が０～０．５ｍＭの場合、添加するアマドリアーゼ反応促進剤の終濃度は、例えば、０．０１～２０ｍＭ、例えば０．０２～１０ｍＭとすることができる。

[0056] 例えば測定対象物質がHbA1cであり、試料溶液中のHbA1c濃度が０～０．５ｍＭの場合、添加するアマドリアーゼ反応促進剤の終濃度は、例えば、０．０１～２０ｍＭ、例えば０．０２～１０ｍＭとすることができる。

[0057] 例えば測定対象物質がサルコシンであり、試料溶液中のサルコシン濃度が0.1～2mg/dLの場合、添加するサルコシンオキシダーゼ反応促進剤の終濃度は、例えば、０．０１～２０ｍＭ、例えば０．０２～１０ｍＭとすることができる。なお本明細書にいう、測定対象物質をサルコシンとする方法は、上流工程として、クレアチニンをクレアチニンアミドヒドロラーゼ（クレアチニナーゼともいう）によりクレアチンに変換し、クレアチンをクレアチンアミジノヒドロラーゼ（クレアチナーゼともいう）によりサルコシンに変換する工程を含む方法を包含するものとする。

[0058] 例えば測定対象物質がコレステロールであり、試料溶液中のコレステロー

ル濃度が1～1000mg/dLの場合、添加するコレステロールオキシダーゼ反応促進剤の終濃度は、例えば、０．０１～２０ｍＭ、例えば０．０２～１０ｍＭとすることができる。

[0059] ある実施形態において合計反応時間は、６０分以下、３０分以下、２０分以下、好ましくは１５分以下、好ましくは１０分程度とすることができる。例えば、上記の第1試薬添加後の加温を３０分以下、２０分以下、１５分以下、１０分、例えば５分程度とすることができ、上記の第2試薬添加後の加温を３０分以下、２０分以下、１５分以下、１０分、例えば５分程度とすることができる。また、試料に含まれると推定される測定対象物質（例えば糖化ヘモグロビン）の濃度範囲に対して、オキシダーゼ（例えばアマドリアーゼ）による反応が完了するか又はほぼ完了するよう、測定試薬の各成分の濃度を調節することができる。反応が完了するとは、試料に含まれる測定対象物質（例えば糖化ヘモグロビン又は糖化基質）の１００％が反応したことをいう。反応がほぼ完了するとは、試料に含まれる測定対象物質（例えば糖化ヘモグロビン又は糖化基質）の例えば９０％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、例えば９９％以上が反応したことをいう。

[0060] 吸光度測定における測定波長は、発色剤に応じて選択することができる。吸光度の測定波長は、例えば340～900nm、590～900nm、600～751nm、610～730nmでありうる。ある実施形態において、２つの測定波長A_1及びA_2で測定を行い、その差（A_1-A_2又はA_1/A_2と表記することがある）を取得することもできる。２つの測定波長A_1及びA_2は、590～900nmの範囲の任意の２つの波長とすることができる。例えばA_1を色素の吸光波長とし、A_2をバックグラウンド波長とし、その差（A_1-A_2）を算出し得る。吸光度の測定波長は、フェノチアジン誘導体色素を用いる場合、590～730nm、例えば610～710nmでありうる。バックグラウンド波長は、フェノチアジン誘導体色素を用いる場合、当該フェノチアジン誘導体色素の吸収がほとんどない領域、例えば710nmより高く900nm以下である範囲から選択することができる。例えばA_1＝A_{694}とし、A_2＝A_{751}とし、これらからA_{694}-A_{751}を算出してもよい。吸収波長をA_1＝A_{654}としてもよい。吸光度

測定は自動分析装置を用いて行ってもよい。

[0061] 発色剤は、特に限定されないが、過酸化水素存在下でのペルオキシダーゼの触媒反応により吸光度が変化する化合物が好ましい。発色剤としては、４－アミノアンチピリンや、例えば、ＡＤＯＳ（Ｎ－エチル－Ｎ－（２－ヒドロキシ－３－スルホプロピル）－ｍ－アニシジン）、ＡＬＯＳ（Ｎ－エチル－Ｎ－（２－ヒドロキシ－３－スルホプロピル）アニリン）、ＴＯＯＳ（Ｎ－エチル－Ｎ－（２－ヒドロキシ－３－スルホプロピル）－ｍ－トルイジンナトリウム）、ＤＡ－６７（１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３、７－ビス（ジメチルアミノ）－フェノシアジン）、ＤＡ－６４（Ｎ－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－４、４’－ビス（ジメチルアミノ）－ジフェニルアミン）等が挙げられる。ＡＤＯＳ、ＡＬＯＳ、ＴＯＯＳは４－アミノアンチピリンと縮合した際に発色する。ＤＡ－６４、ＤＡ－６７は４－アミノアンチピリンを必要とせず、単独で処方するだけで発色する。いずれの場合も、発色反応はパーオキシダーゼにより触媒される。さらに発色剤として、メチレンブルー、１０－（アセチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジン、１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジン、１０－（フェニルカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジン、１０－（３－（メチルカルボキシアミノ）－ヘキサメチル－アミノ）－フェノチアジン、１０－（（３－（メチルカルボキシアミノ）－４－メチル－フェニル）－アミノ）－フェノチアジン、１０－（（３－（メチルカルボキシアミノメチル）－フェニル）－メチルアミノ）－フェノチアジン、１０－（１－ナフタレンアミノ）－フェノチアジン、１０－（メチル）－フェノチアジン、１０－（フェニルアミノ）－フェノチアジン、１０－（メチルアミノ）－フェノチアジン、アズールＡ、アズールＢ、アズールＣ、トルイジンブルーＯ、１，９－ジメチル－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジン塩、メチレングリーン若しくはその塩、又はそのロイコ体等が挙げられるがこれに限らない。発色剤は、反応溶液における終濃度が、０．００１～

１０ｍＭ、例えば０．００５～２ｍＭとなるよう添加しうる。

[0062] オキシダーゼとしては、任意の公知のアマドリアーゼ、サルコシンオキシダーゼ、及びコレステロールオキシダーゼを使用しうるがこれに限らない。公知のサルコシンオキシダーゼについては例えば特許文献１５～１７を参照のこと。公知のコレステロールオキシダーゼについては、例えば特許文献１９を参照のこと。参照によりそれらの全内容を本明細書に組み入れる。これらの改変体や均等物も使用しうる。

[0063] アマドリアーゼとしては任意の公知のものを使用しうる。例えばアマドリアーゼとしては、αFV、αFVH及び／又はαF6P等の糖化基質に作用するものが挙げられる。例えば特許文献１～７、８～１１を参照されたい。他の公知のアマドリアーゼも使用しうる。またアマドリアーゼとしては、HbA1cに直接作用するA1c0Xが挙げられ、特許文献１２、１３に記載のもの等が例示される。同等の機能を有する他のA1c0Xも使用しうる。またアマドリアーゼとしては、ε－ＦＫに作用するアマドリアーゼが挙げられ、特許文献２０に記載のもの等が例示される。参照によりこれらの全内容を本明細書に組み入れる。

[0064] アマドリアーゼ反応では、糖化基質又はHbA1cを含み得る試料溶液にアマドリアーゼを添加し、基質にアマドリアーゼを作用させて過酸化水素を生成させる。このとき、系に本発明アマドリアーゼ反応促進剤を共存させる。

[0065] アマドリアーゼは、α及び／又はε-アミノ基が糖化された、糖化アミノ酸、糖化ペプチド又は糖化タンパク質に作用して、過酸化水素及びα－ケトアルデヒドを発生する反応を触媒する。このとき、系に本発明アマドリアーゼ反応促進剤が存在すると、この反応が促進されると考えられる。ただし本発明は特定の作用機序に拘束されるものではない。

[0066] アマドリアーゼ反応は緩衝溶液中で行うことができる。プロテアーゼを用いた前処理を行う場合は、当該前処理反応と同じまたは異なる緩衝溶液をアマドリアーゼ反応に使用しうる。反応溶液のｐＨは特に限定されないが、例えば３～１１、４～１０、５～９、例えば６～８でありうる。反応温度は、例えば、１０～４５℃、１０～３８℃、２０～３７℃、例えば２５～３７℃

でありうる。反応時間は、０．１～６０分、０．１～３０分、０．１～２０分、０．～１５分、０．１～１０分、例えば０．１～５分であり得る。

[0067] サルコシンオキシダーゼを用いた反応は緩衝溶液中で行うことができる。上流工程として、クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼを用いて、クレアチニンをクレアチンに、次いでサルコシンに変換する場合は、当該上流工程での反応と同じまたは異なる緩衝溶液をサルコシンオキシダーゼを用いた反応に使用しうる。反応溶液のｐＨは特に限定されないが、例えば３～１１、４～１０、５～９、例えば６～８でありうる。反応温度は、例えば、１０～４５℃、１０～３８℃、２０～３７℃、例えば２５～３７℃でありうる。反応時間は、０．１～６０分、０．１～３０分、０．１～２０分、０．～１５分、０．１～１０分、例えば０．１～５分であり得る。

[0068] コレステロールオキシダーゼを用いた反応は緩衝溶液中で行うことができる。コレステロールエステラーゼを用いた前処理を行う場合は、当該前処理反応と同じまたは異なる緩衝溶液をコレステロールオキシダーゼ反応に使用しうる。反応溶液のｐＨは特に限定されないが、例えば３～１１、４～１０、５～９、例えば６～８でありうる。反応温度は、例えば、１０～４５℃、１０～３８℃、２０～３７℃、例えば２５～３７℃でありうる。反応時間は、０．１～６０分、０．１～３０分、０．１～２０分、０．～１５分、０．１～１０分、例えば０．１～５分であり得る。

[0069] オキシダーゼ（例えばアマドリアーゼ）は、試料溶液中に含まれる基質（例えば糖化基質）の量にもよるが、例えば終濃度が０．０１～５０Ｕ/ｍＬ、０．１～２０Ｕ/ｍＬ、０．２～１０Ｕ／ｍＬ、例えば０．５～１０Ｕ／ｍＬとなるよう試料に添加することができる。酵素活性「Ｕ」は、αFVを基質とするアマドリアーゼについては、αFVを基質として１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとすることができる。酵素活性「Ｕ」は、αFVHを基質とするアマドリアーゼについては、αFVHを基質として１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとすることができる。酵素活性「Ｕ」は、ε-FKを基質とするアマドリアーゼについては、ε-FKを基質とし

て１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとすることができる。酵素活性「Ｕ」は、αF6Pを基質とするアマドリアーゼについては、αF6Pを基質として１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとすることができる。酵素活性「Ｕ」は、HbA1cを基質とするアマドリアーゼについては、HbA1cを基質として１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとすることができる。酵素活性「Ｕ」は、サルコシンを基質とするサルコシンオキシダーゼについては、サルコシンを基質として１分間に１マイクロモルの尿素を生成する量を１Ｕとすることができる。酵素活性「Ｕ」は、コレステロールを基質とするコレステロールオキシダーゼについては、コレステロールを基質として１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとすることができる。本明細書では、アマドリアーゼについて、特に断らない限り、酵素活性「Ｕ」は、HbA1cを基質として１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する量を１Ｕとして定義する。

[0070] ペルオキシダーゼとしては任意の公知のものを使用しうる。ペルオキシダーゼは、過酸化水素と発色剤との酸化還元反応を触媒する。この反応により発色剤が発色する。ペルオキシダーゼを用いる条件は特に制限されず、反応液のｐＨは、例えば、５～９であり、処理温度は、例えば、１０～４０℃の範囲であり、好ましくは２５～３７℃である。処理時間も特に制限されず、０．１～６０分、０．１～１０分、例えば０．１～５分でありうる。ペルオキシダーゼは、終濃度が０．０１～３００ＫＵ/Ｌ、例えば０．５～５０ＫＵ／Ｌとなるよう反応溶液に添加しうる。ペルオキシダーゼの活性「Ｕ」は、次の反応条件下で、20秒間に1mgのプルプロガリン(purpurogallin)を生成する酵素(POD)量を1 プルプロガリン単位と定義する：

[0071] 試薬：

A. 5%(W/V)ピロガロール水溶液

B. 0.147M H_2O_2水溶液(30%(W/V)H_2O_2溶液1.67mlを蒸留水で希釈して100mlとする)

C. 0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0（反応混液及び酵素希釈用）

D. 2.0N H_2SO_4溶液

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

[0072] 手順：

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

14.0ml 蒸留水

2.0ml ピロガロール水溶液(A)

1.0ml H_2O_2水溶液(B)

2.0ml リン酸緩衝液(C)

２　酵素溶液1.0mlを加え、反応を開始する。

３　20℃で正確に20秒間反応させた後、H_2SO_4溶液(D)1.0mlを加えて反応を停止させる。反応停止後の混液から生成したプルプロガリンをエーテル15mlで抽出する。この操作を5回繰り返し、抽出液を合わせ、更にエーテルを加えて全量を100 mlにする。この液について420nmにおける吸光度を測定する(OD test)。

４　盲検は反応混液１を20℃で20秒間放置後、H_2SO_4溶液(D)1.0mlを加えて混和し、次いで酵素溶液1.0mlを加えて調製する。この液につき上記同様にエーテル抽出を行って吸光度を測定する(ODblank)。

計算式は次のとおりである：

U/ml＝ΔOD(OD test-OD blank)×希釈倍率／ (0.117×1ml)

＝ΔOD×8.547×希釈倍率

U/mg ＝ U/ml×1/C

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

C : 溶解時の酵素濃度(c mg/ml)

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

[0073] 吸光度測定には、任意の公知の分光光度計や検出機器を使用しうる。反応

溶液の吸光度は発色した発色剤の量を示し、ここから試料中の測定対象物質（例えばHbA1c）濃度を決定しうる。例えば濃度が既知の基質（例えば濃度が既知の糖化ヘモグロビン又は糖化基質）を含む標準物質についての吸光度を測定し、濃度と吸光度の関係をプロットして検量線を作成しうる。次いで、濃度未知の基質（例えば糖化ヘモグロビン又は糖化基質）を含む試料について吸光度を測定し、前記検量線から基質（例えば糖化ヘモグロビン又は糖化基質）の濃度を決定しうる。

[0074] ある実施形態において、本発明は、オキシダーゼ反応促進剤を含む組成物を提供する。この組成物は場合により、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、緩衝剤、安定化剤、発色剤、界面活性剤等を含み得る。また本発明の組成物に、マーカーや化合物を測定するためのさらなる酵素や試薬を追加してもよい。

[0075] ある実施形態において、本発明は、アマドリアーゼ反応促進剤を含む、HbA1c測定用の組成物を提供する。この組成物は場合により、アマドリアーゼ、ペルオキシダーゼ、緩衝剤、安定化剤、発色剤、界面活性剤等を含み得る。また本発明の組成物に、HbA1c以外のマーカーや化合物を測定するためのさらなる酵素や試薬を追加してもよい。

[0076] ある実施形態において、本発明は、サルコシンオキシダーゼ反応促進剤を含む、サルコシン測定用の組成物を提供する。この組成物は場合により、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、緩衝剤、安定化剤、発色剤、界面活性剤等を含み得る。クレアチニンアミドヒドロラーゼやクレアチンアミジノヒドロラーゼ、及びペルオキシダーゼを用いることによりクレアチン又はクレアチニンを測定することができる。したがってある実施形態において、本発明はさらに、サルコシンオキシダーゼ反応促進剤、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼ、及びペルオキシダーゼを含む、クレアチン又はクレアチニン測定用の組成物を提供する。

[0077] ある実施形態において、本発明は、コレステロールオキシダーゼ反応促進剤を含む、コレステロール測定用の組成物を提供する。この組成物は場合により、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、緩衝剤、安定化剤、発色剤、界面活性剤等を含み得る。

[0078] 緩衝剤としては、例えば、Ｎ－［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］グリシン、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン、硼酸塩、クエン酸塩、ジメチルグルタミン酸塩、トリシン、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ、ＡＤＡ、ＰＩＰＥＳ、ＡＣＥＳ、ＭＯＰＳＯ、ＢＥＳ、ＭＯＰＳ、ＴＥＳ、ＤＩＰＳＯ、ＴＡＰＳＯ、ＰＯＰＳＯ、ＨＥＰＰＳＯ、ＥＰＰＳ、Ｔｒｉｃｉｎｅ、Ｂｉｃｉｎｅ、ＴＡＰＳ、フタル酸、酒石酸等が挙げられる。さらに必要により、溶解補助剤、安定化剤、反応性向上剤、ＨｂＡ１ｃ変性剤等として、界面活性剤（ｎ－オクチル－β－Ｄ－グルコシド、ｎ－オクチル－β－Ｄ－チオグルコシド、ｎ－ドデシル－β－Ｄ－マルトシド、ｎ－テトラデシル－β－Ｄ－マルトシド、ｎ－オクチル－β－Ｄ－マルトシド、１－ドデシルピリジニウム塩、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩、テトラデシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、トリトンＸ－１００、ブリッジ３５、ブリッジ５８、ツイーン８０、コール酸塩、ｎ－ヘプチル－β－Ｄ－チオグルコシド、３－オキサトリデシル－α－Ｄ－マンノシド、ｎ－ノニル－β－Ｄ－チオマルトシド、ｎ－デシル－β－Ｄ－マルトシド、ｎ－ウンデシル－β－Ｄ－マルトシド、トレハロースＣ８、トレハロースＣ１０、トレハロースＣ１２、トレハロースＣ１４、トレハロースＣ１６、ＢＩＧＣＨＡＰ、ｄｅｏｘｙ－ＢＩＧＣＨＡＰ、ＭＥＧＡ－８、ＭＥＧＡ－９、ＭＥＧＡ－１０、ヘキサデシルピリジニウム塩、オクタデシルトリメチルアンモニウム塩、デシルトリメチルアンモニウム塩、ノニルトリメチルアンモニウム塩、オクチルトリメチルアンモニウム塩、ヘキシルトリメチルアンモニウム塩、ドデシル硫酸ナトリウム等）、還元剤（ジチオスレイトール、メルカプトエタノール、Ｌ－システイン等）、亜硝酸塩、牛血清アルブミン、糖類（グリセリン、乳

糖、シュークロース等）等を適宜添加してもよい。

[0079] アマドリアーゼがA1cOXであり、糖化基質がHbA1cである場合において、A1cOXとHbA1cとの反応効率を高めるために、HbA1cを予め変性させてもよい。変性は、界面活性剤処理や熱処理、又は酸若しくはアルカリでの処理により行うことができる。変性処理として界面活性剤添加と熱処理の両方を行う場合、その順序は任意である。熱処理はHbA1cの全部又は一部を変性させるのに十分な温度及び時間で行われうる。処理温度は例えば６０℃以上、７０℃以上、８０℃以上、９０℃以上、例えば９８℃とすることができる。処理時間は温度にもよるが例えば１０秒以上、２０秒、３０秒以上、１分以上、又は２分以上であり得る。界面活性剤の例は上述したとおりであり、これらを適当な濃度で添加しうる。

[0080] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は以下の式（I）により表される化合物である。

[0081] [化39]

$$R^1-N=N-R^2 \qquad (I)$$

[式中、

R^1及びR^2は、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

前記の置換基は、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-CO-NH_2$、$-R^3$、$-NH-R^4$、$-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

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

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよく、

－Ｒ^{3}は、－Ｈであるか、或いは、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

－Ｒ^{4}は、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

Ｒ^{5}及びＲ^{6}は、それぞれ独立に、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｏ－ＣＨ$_3$、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～８員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

ただし、Ｒ^{1}又はＲ^{2}が、芳香族の５員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である場合には、該複素環は－ＣＯＯＸにより置換されたものではない]。

[0082] ５～６員単環としては５～６員炭素環や５～６員複素環が挙げられる。

９～１０員の縮合環は、複素環と複素環との縮合環、炭素環と複素環との縮合環、炭素環と炭素環との縮合環であってもよい。

[0083] ５員単環の場合には該単環は場合により１、２、３、若しくは４つの置換基により置換されていてもよく、６員単環の場合には該単環は場合により１、２、３、４若しくは５つの置換基により置換されていてもよく、９員縮合環の場合には該縮合環は場合により１、２、３、４、５、若しくは６つの置換基により置換されていてもよく、１０員縮合環の場合には該縮合環は場合により１、２、３、４、５、６若しくは７つの置換基により置換されていてもよい。

[0084] 芳香族の単環の炭素環としてはベンゼン環が挙げられる。芳香族の炭素環と炭素環との縮合環としてはナフタレン環が挙げられる。

[0085] 五員複素環としては、ピロリン、イミダゾリン、ピラゾリン、ピロリジン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、テトラヒドロチオフェン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピロールが挙げられるがこれに限らない。

[0086] 六員複素環としては、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、テトラジン、オキサジンが挙げられるがこれに限らない。

[0087] 芳香族の五員複素環としては、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、チオフェン、オキサジアゾール（例えば1,2,3-オキサジアゾール、1,2,4-オキサジアゾール、1,2,5-オキサジアゾール（フラザンともいう）、1,3,4-オキサジアゾール、フラン、ピロール(1H-ピロール、2H-ピロール）、トリアゾール（1,2,3-トリアゾール、1,2,4-トリアゾール）、テトラゾール、ペンタゾール、チアジアゾールが挙げられるがこれに限らない。

[0088] 芳香族の六員複素環式化合物としては、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、トリアジン（1,2,3-トリアジン、1,2,4-トリアジン、1,3,5-トリアジン）が挙げられるがこれに限らない。

[0089] 縮合環としては９員環のベンズイミダゾール、ベンゾオキサゾール、ベン

ズイソオキサゾール(Benzisoxazole)、1,3-ベンゾジオキソール、ベンゾチオフェン、ベンゾ[c]チオフェン、ベンゾチアゾール、インドール（2,3-ベンゾピロール）、インダゾール、イソインドール、プリン、キノリン、イソキノリン、フタラジン、イソベンゾフランが挙げられるがこれに限らない。

[0090] 縮合環としては１０員環のベンゾジオキサン、1,4-ベンゾジオキシン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジンが挙げられるがこれに限らない。

[0091] －C_{1-6}アルキルとしては、メチル、エチル、プロピル（n-プロピル、イソプロピル）、ブチル（n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル）、ペンチル（n-ペンチル、tert-ペンチル、ネオペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、3-ペンチル）、ヘキシル（n-ヘキシル、イソヘキシル、ネオヘキシル）基が挙げられる。

[0092] －C_{2-6}アルケニルとしては、エテニル基（ビニル基）、１-プロペニル基、２-プロペニル基（アリル基）、１-ブテニル基、２-ブテニル基、３-ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基などが挙げられる。

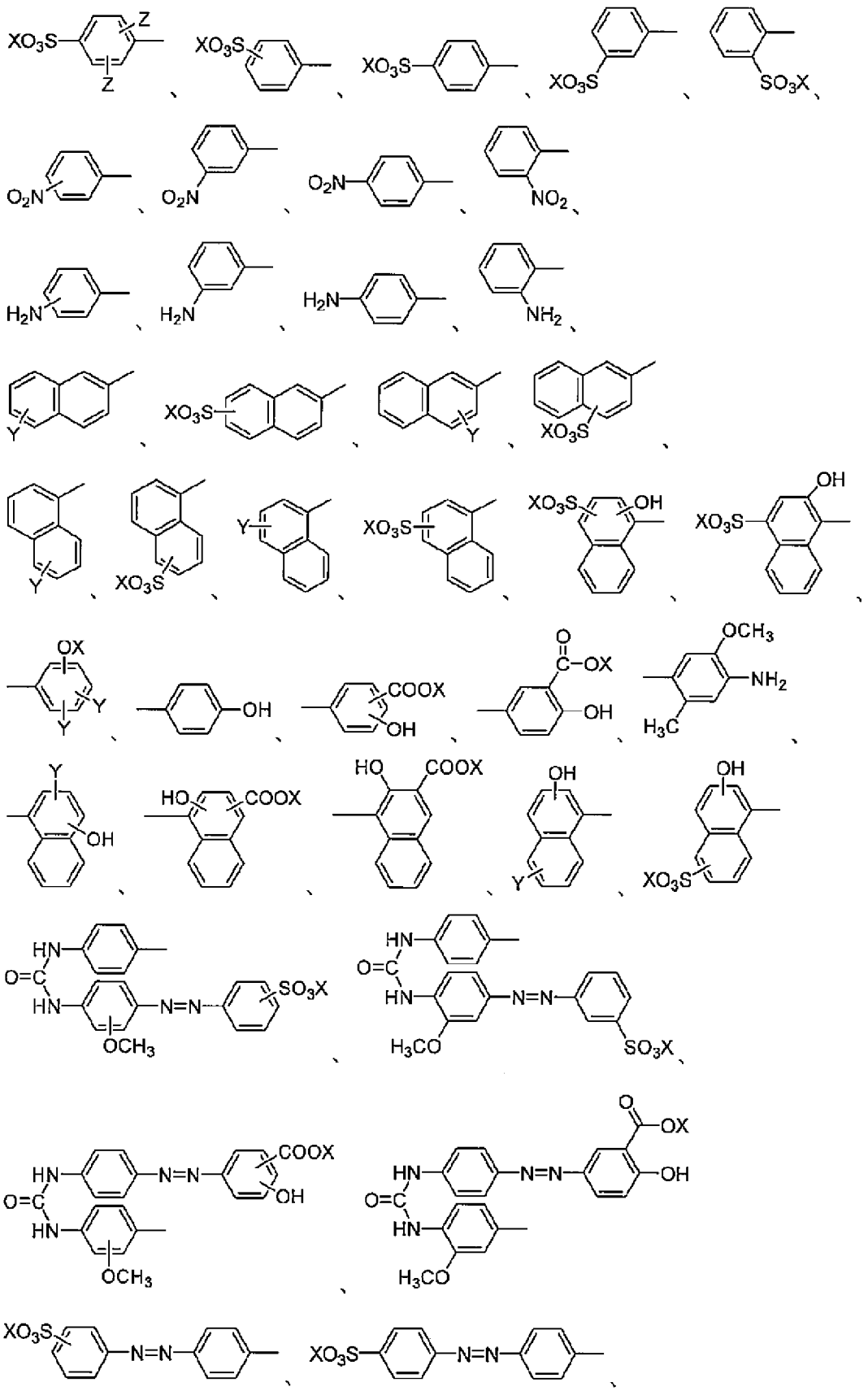
[0093] －C_{2-6}アルキニルとしては、エチニル基、１-プロピニル基、２-プロピニル基、１-ブチニル基、２-ブチニル基、３-ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基などが挙げられる。

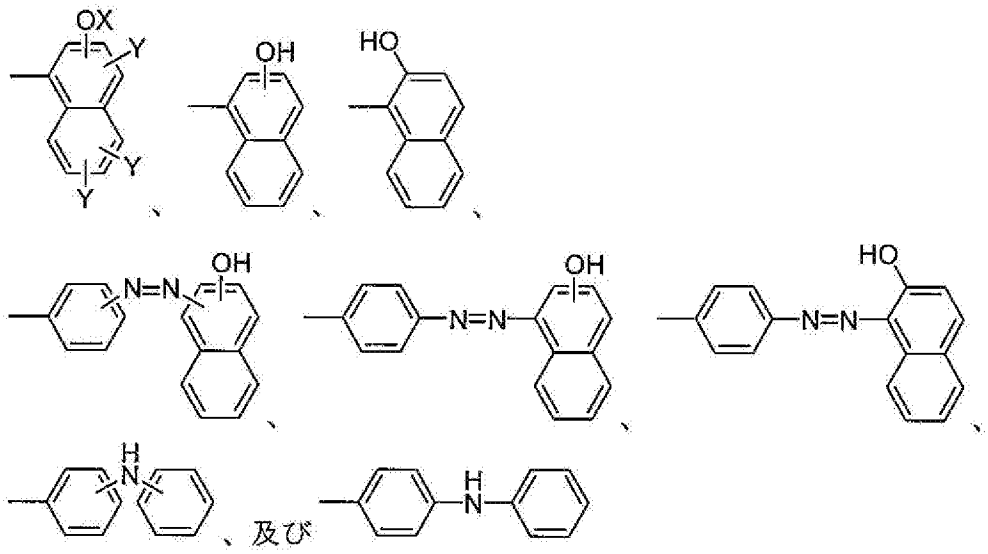
[0094] －Ｏ－C_{1-6}アルキルは、C_{1-6}アルコキシ基ともいい、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ基などの直鎖状又は分岐鎖状アルコキシ基が挙げられる。

[0095] ある実施形態において、R^1及びR^2は、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記芳香族の６員単環の炭素環を含む１０員の縮合環である。

[0096] ある実施形態において、R^1及びR^2は、それぞれ独立に、

[化40]



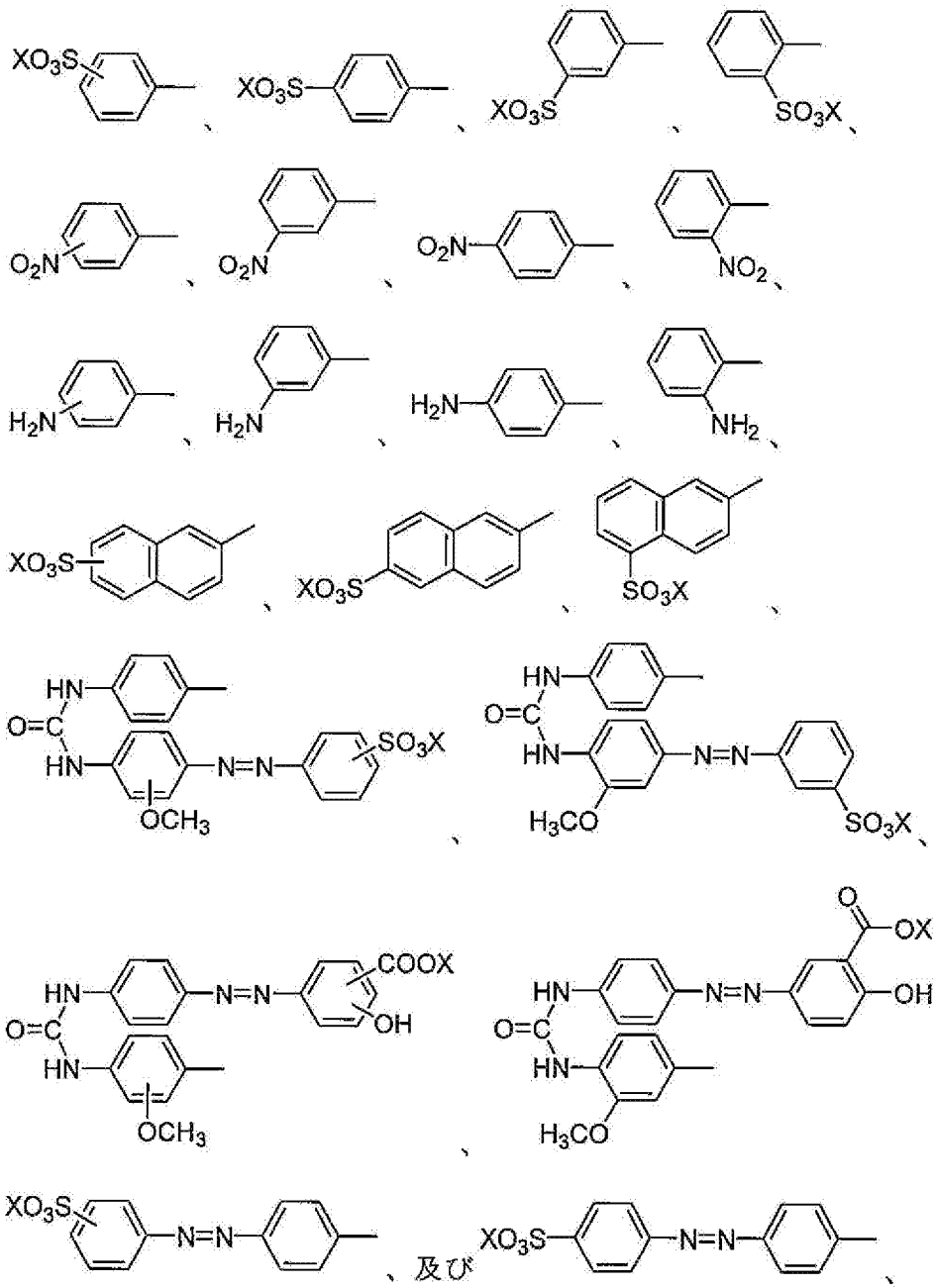


、及び

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

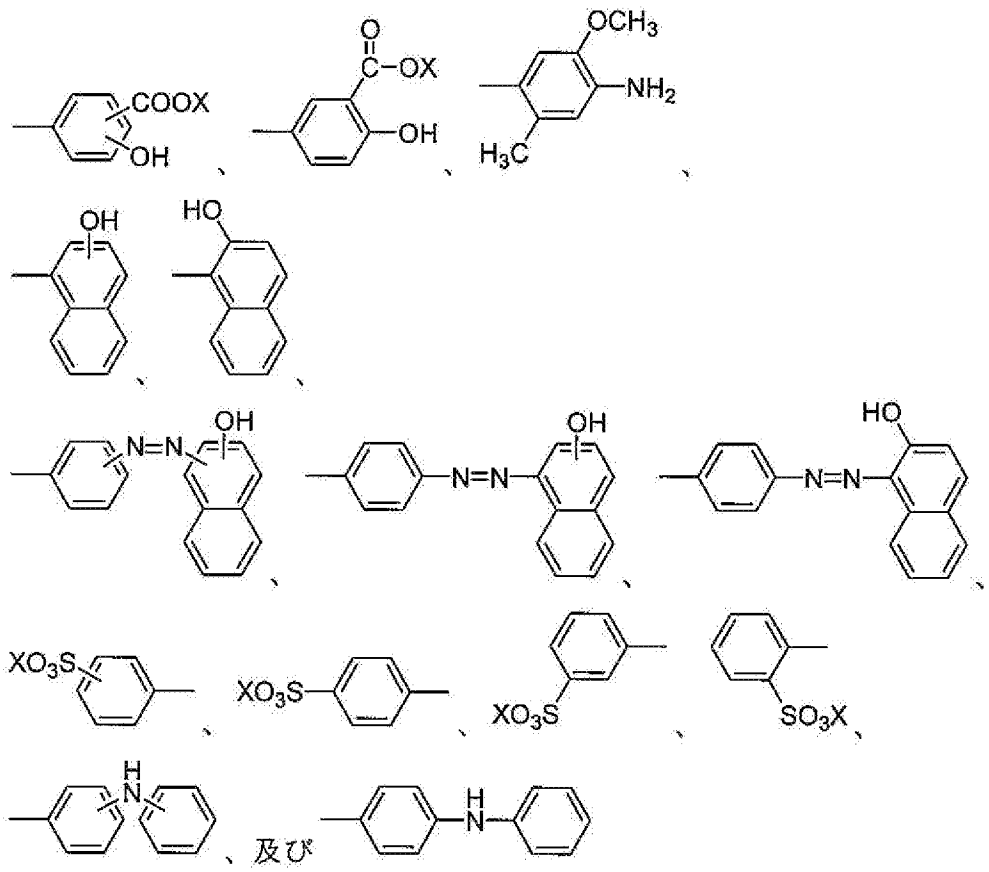
[0097] ある実施形態において、Ｒ[1]は、

[化41]



からなる群より選択され、R^2は、

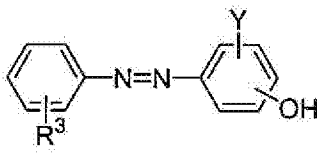
[化42]



からなる群より選択され、式中、Ｘは上記に定義したとおりである。

[0098] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、下記の式で表される化合物を含む、

[化43]



(II)

[式中、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－SO_3X、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよく、

－R^3は、－Ｈ又は－ＮＨＣＯ－ＮＨ－R^5－Ｎ＝Ｎ－R^6であるか、或いは、

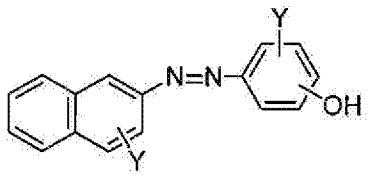
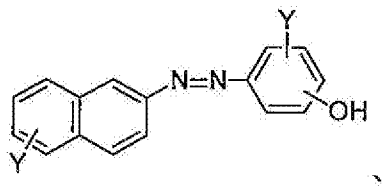
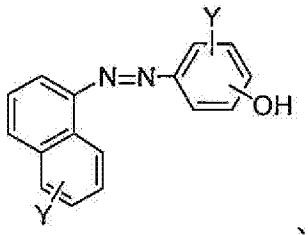
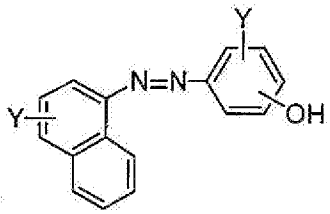
場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－C_{1-6}アルキル、－C_{2-}

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

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

[0099] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、下記のいずれかの式で表される化合物を含む、

[化44]


、

、

、

、又は

[式中、

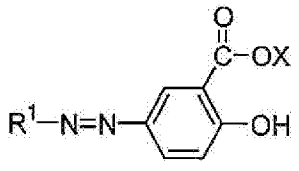
Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－SO_3Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよい]。

[0100] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、下記の式で表される化合物を含む、

[化45]



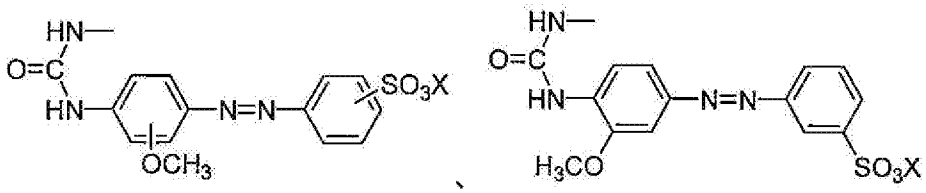
(III)

[式中、

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

前記の置換基は、－NO_2、－SO_3X、及び

[化46]



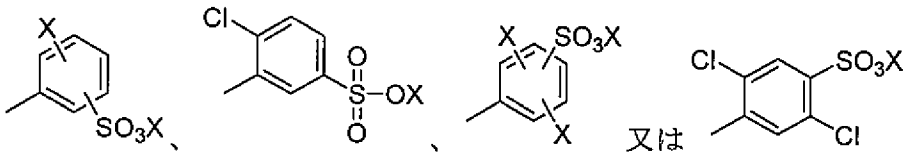
からなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]。

[0101] ある実施形態において、R^1は、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環であり、R^2は、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である。

[0102] ある実施形態において、R^2は、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、２つの窒素原子を含む複素環であり、該複素環は

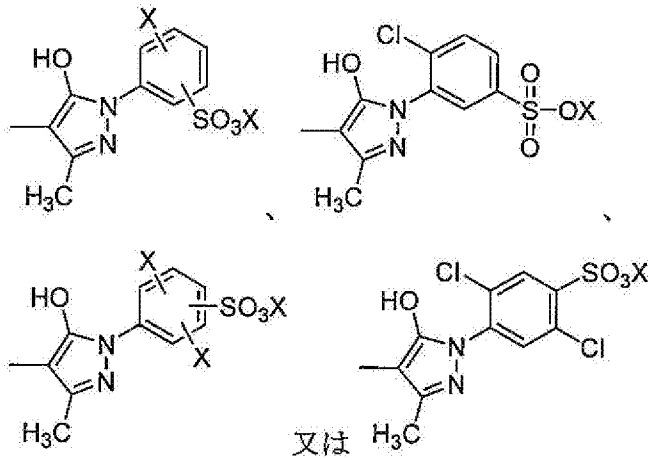
[化47]



により置換されており、式中、Ｘは上記に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい。

[0103] ある実施形態において、R^2は、

[化48]



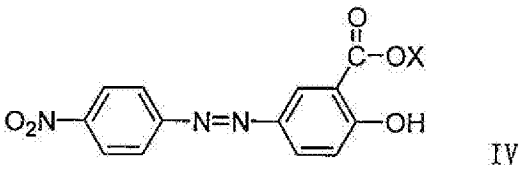
であり、式中、Ｘは上記に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい。

[0104] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤はアゾベンゼン誘導体、例えば水溶性を示すアゾベンゼン誘導体、例えばアゾベンゼン-4-スルホン酸骨格を有する化合物である。

[0105] ある実施形態において、本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、

以下の式により表される化合物、

[化49]

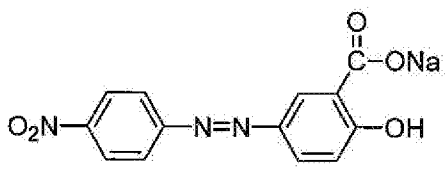


IV

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、

例えば、以下の式により表されるMordant Orange 1 (CAS 2243-76-7)

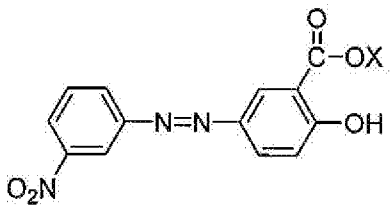
[化50]



Mordant Orange 1

以下の式により表される化合物、

[化51]

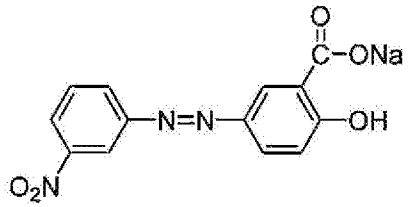


V

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

例えば以下の式により表されるAlizarin Yellow GG (CAS 584-42-9)、

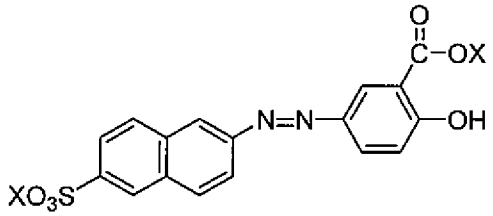
[化52]



Alizarin Yellow GG

以下の式により表される化合物、

[化53]

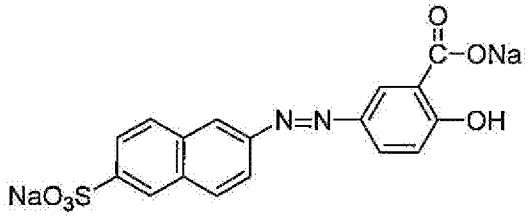


VI

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

例えば以下の式により表されるChrome Yellow (CAS6054-97-3) 、

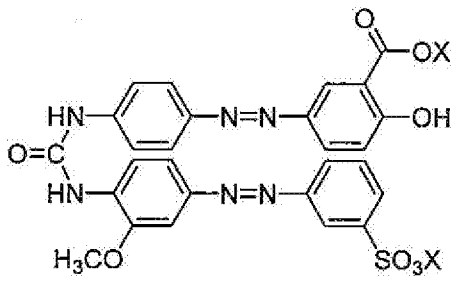
[化54]



Chrome Yellow

以下の式により表される化合物、

[化55]

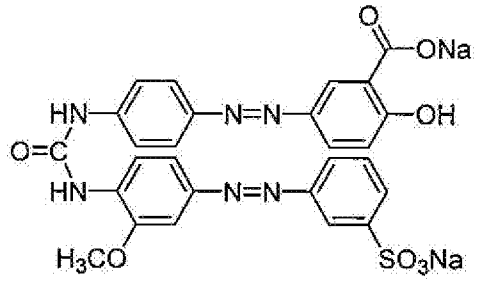


VII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

例えば以下の式により表されるDirect Yellow 44 (CAS8005-52-5)、

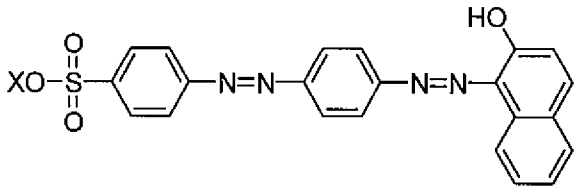
[化56]



Direct Yellow 44

以下の式により表される化合物、

[化57]

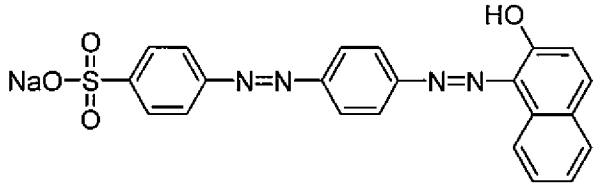


VIII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

例えば以下の式により表されるAcid Red 151 (CAS6406-56-0)

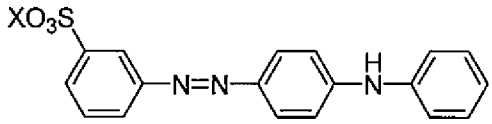
[化58]



Acid Red 151

以下の式により表される化合物、

[化59]

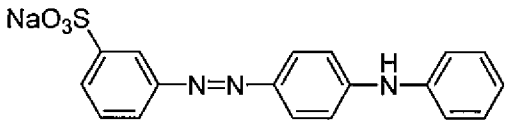


IX

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

例えば以下の式により表されるAcid Yellow 36 (CAS587-98-4)

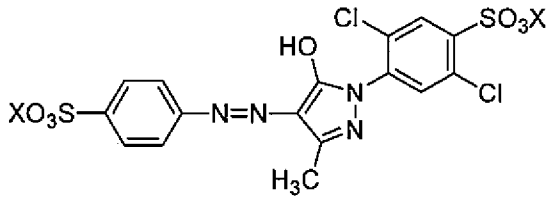
[化60]



Acid Yellow 36

以下の式により表される化合物、

[化61]

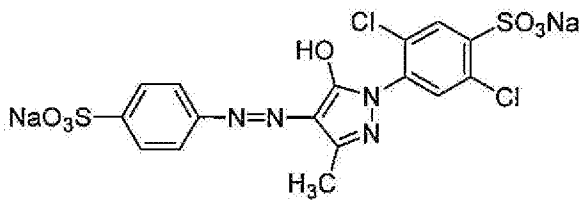


X

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

例えば以下の式により表されるXylene Fast Yellow 2G(CAS 6359-98-4)、

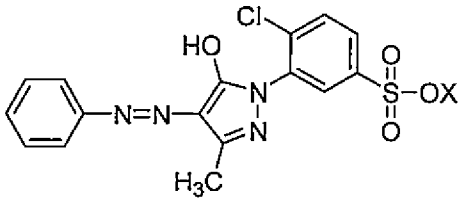
[化62]



Xylene Fast Yellow 2G

及び、以下の式により表される化合物、

[化63]

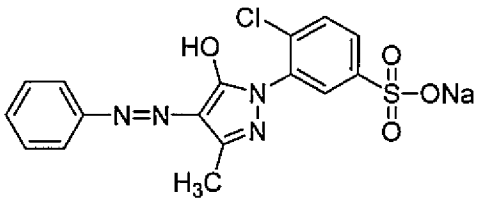


XI

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

例えば以下の式により表されるAcid Yellow 34 (CAS 6359-90-6)、

[化64]

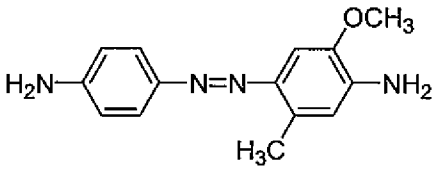


Acid Yellow 34

及び、以下の式により表されるDisperse Diazo Black 3BF (CAS 6232-57-1)

、

[化65]

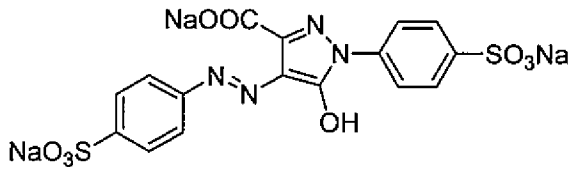


Disperse Diazo Black 3BF

からなる群より選択される化合物である。

[0106] 本発明の反応促進剤からは、以下の式により表される化合物(Tartrazine、CAS 1934-21-0)は除かれる：

[化66]



Tartrazine

[0107] 上記の化合物は市販されているもの又はその塩を使用しうる。他の式Iの化

合物は慣用の手法を用いて合成するか、又は市販されているもの又はその塩を使用しうる。

[0108] ある実施形態において本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、アマドリアーゼの反応を促進しうる。このような反応促進剤（アマドリアーゼ反応促進剤ともいう）としては、上記の化合物、例えば式I、式II、及び式IIIの化合物、式IVの化合物、例えばMordant Orange 1、式Vの化合物、例えばAlizarin Yellow GG、式VIの化合物、例えばChrome Yellow、式VIIの化合物、例えばDirect Yellow 44、式VIIIの化合物、例えばAcid Red 151、式IXの化合物、例えばAcid Yellow 36、式Xの化合物、例えばXylene Fast Yellow 2G、式XIの化合物、例えばAcid Yellow 34及び式XIIの化合物、例えばDisperse Diazo Black 3BFが挙げられるがこれに限らない。

[0109] ある実施形態において本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、サルコシンオキシダーゼの反応を促進しうる。このような反応促進剤（サルコシンオキシダーゼ反応促進剤ともいう）としては、上記の化合物、例えば式I、式II、及び式IIIの化合物、式IVの化合物、例えばMordant Orange 1、式Vの化合物、例えばAlizarin Yellow GG、式VIの化合物、例えばChrome Yellow、式VIIの化合物、例えばDirect Yellow 44、式VIIIの化合物、例えばAcid Red 151、式Xの化合物、例えばXylene Fast Yellow 2G、及び式XIIの化合物、例えばDisperse Diazo Black 3BFが挙げられるがこれに限らない。

[0110] ある実施形態において本発明のオキシダーゼ反応促進剤は、コレステロールオキシダーゼの反応を促進しうる。このような反応促進剤（コレステロールオキシダーゼ反応促進剤ともいう）としては、上記の化合物、例えば式I、式II、及び式IIIの化合物、式IVの化合物、例えばMordant Orange 1、式Vの化合物、例えばAlizarin Yellow GG、式VIの化合物、例えばChrome Yellow、式VIIの化合物、例えばDirect Yellow 44、式VIIIの化合物、例えばAcid Red 151、式IXの化合物、例えばAcid Yellow 36、式XIの化合物、例えばAcid Yellow 34及び式XIIの化合物、例えばDisperse Diazo Black 3BFが挙げられるがこれに限らない。

[0111] （HbA1c測定方法の例）

本発明のHbA1c測定試薬及び測定方法について例示する。ただし本発明はこれ限定されない。

[0112] 以下のHbA1c測定用試薬を調製する。

ＨｂＡ１ｃ標準物質

ＨｂＡ１ｃ認証実用標準物質ＪＣＣＲＭ４２３－９ｂ（検査医学標準物質機構製）

総ヘモグロビン濃度１３３ｇ／ｌ、

ＨｂＡ１ｃ濃度３レベル（ＮＧＳＰ値　５．６１％、７．７１％、１０．５５％）

第１試薬（ペルオキシダーゼ、ロイコ色素を含む溶液）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ６．５

１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ

０．２％（ｗ／ｖ）　ｎ－ドデシル－β－Ｄ－マルトシド（同仁化学研究所製）

４ｍＭ　$NaNO_2$

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

第２試薬（A1cOXを含む溶液）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ６．５

５．３ｍｇ／ｍｌ　ＣＦＰ－ＤＨ４（A1cOX）

[0113] Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用して、次に示す手順に沿ってＨｂＡ１ｃを測定する。イオン交換水で１２．５倍希釈したＨｂＡ１ｃ標準物質８μｌを、９６μｌの第１試薬に添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬を添加してＨｂＡ１ｃのβ鎖アミノ末端の酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で

５分間進行させる。希釈した標準物質と第１試薬を混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、$A_{694/751}$（$A_{694}-A_{751}$）を求める。横軸にＨｂＡ１ｃ標準物質の濃度を、縦軸に希釈した標準物質と第１試薬を混合してから１０分後の$A_{694/751}$をプロットし、ＨｂＡ１ｃ濃度と$A_{694/751}$の相関性を表す検量線を作成する。

[0114] 次に、ＨｂＡ１ｃ標準物質の代わりに、ＨｂA1ｃ濃度が未知の試料を用いて、上記と同様の測定を行う。希釈試料と第１試薬を混合してから１０分後の$A_{694/751}$と、上記で作成した検量線を用いて、試料のＨｂA1ｃ濃度を決定する。

[0115] 化合物がオキシダーゼ反応を促進するか否かは、系に候補化合物を添加した場合の反応の進行と、添加しなかった場合の反応の進行とを比較することにより評価することができる。

[0116] （サルコシンオキシダーゼを用いた測定方法の例）

サルコシンオキシダーゼを用いた測定試薬及び測定方法について例示する。ただし本発明はこれ限定されない。尚、サルコシンオキシダーゼの酵素活性に関し、サルコシンを基質として、1分間に1マイクロモルの尿素を生成するサルコシンオキシダーゼ酵素活性を1単位（Ｕ）とする。

[0117] Ａ．試薬の調製

反応用試薬として、以下の溶液を調製する。

1) 0.2M ザルコシン, 100mM Tris-HCl, 2 mM KCl, 0.05% Triton-X100 pH7.7

2) 80U/ml POD溶液

3) 0.2% phenol 溶液

4) 0.2% 4-アミノアンチピリン溶液

5) 0.3% SDS 溶液

6) 20mM Tris-HCl, 1mM KCl, 0.2% BSA pH7.7 （酵素希釈液）

次いで、上記各溶液を以下の数量混合し、活性測定液を調製する。

1) 5ml

2) 1ml

3) 2ml

4) 1ml

[0118] Ｂ．測定法

測定は、以下のようにして行う。

1)活性測定液　0.95 mlを37℃、５分間プレインキュベーションする。

2)酵素液（0.04U/ml～0.16U/mlに酵素希釈液で調整）0.05mlを添加混合する。

3) 37℃において10分間反応させる。

4) 10分間の反応後、上記0.3% SDS 溶液を混合する。

5) 25℃にて10分間放置後、495 nmの吸光度を測定する。（ＯＤsample）

[0119] ブランク値は、酵素液の混合前に 0.3% SDS 溶液を混合することによって測定する。ＯＤblank）

（活性換算式）

Ｕ／ｍｌ＝（ＯＤsample－ＯＤblank）×0.95

[0120] （コレステロールオキシダーゼを用いた測定方法の例）

コレステロールオキシダーゼを用いた測定試薬及び測定方法について例示する。ただし本発明はこれ限定されない。コレステロールオキシダーゼの酵素活性の測定方法の例として、過酸化水素量を測定する方法について示す。以下のコレステロールオキシダーゼの活性測定には、特に断らない限り、コレステロールを基質として用いる。なお、コレステロールオキシダーゼの酵素力価は、コレステロールを基質として測定したとき、１分間に１μｍｏｌの過酸化水素を生成する酵素量を１Ｕと定義する。

[0121] Ａ．試薬の調製

（１）試薬１：コレステロール溶液

５．０ｍｌのＴｒｉｔｏｎＸ－１００に５００ｍｇのコレステロール（和光純薬製）を添加し、ヒーター上で攪拌溶解する。これに９０ｍｌのイオン交

換水を添加後、煮沸後、氷上で冷却し、４．０ｇのコール酸ナトリウム（ナカライテスク製）を添加し、溶解した後、１００ｍｌに定容する。

（２）試薬２：６．０％フェノール溶液

フェノール６．０ｇをイオン交換水に溶解して１００ｍｌにする。

（３）試薬３：０．１５％ペルオキシダーゼ溶液

１５０ｍｇを１００ｍｌの０．１Ｍリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．０）に溶解する。

（４）試薬４：４－アミノアンチピリン溶液

１．７６ｇの４－アミノアンチピリン（和光純薬製）をイオン交換水に溶解し、１００ｍｌに定容する。

[0122] Ｂ．測定法

４．０ｍｌの試薬１と５１ｍｌの０．１Ｍリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．０）とを混合した後、２．０ｍｌの試薬２、２．０ｍｌの試薬３、１．０ｍｌの試薬４を順に加え、混合する。これを３．０ｍｌずつ試験管に分注し、氷冷保存する。測定時は、３．０ｍｌを３７℃で５分加温し、５０μｌの酵素液を加え混和し、分光光度計（Ｕ－３０１０、日立社製）により、５００ｎｍにおける吸光度を測定する。測定値（ΔODtest）は、５００ｎｍにおける２分後から４分後の１分間あたりの吸光度変化とする。なお対照液（ΔODblank）は、酵素液の代わりに５０μｌの０．２％牛血清アルブミンを含む２０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．０）を加える以外は前記と同様にしたものである。下記の計算式に従い、算出した値を酵素活性値（Ｕ／ｍｌ）とした。

[数1]

$$U/ml = \frac{\Delta OD/min\ (\Delta ODtest - \Delta ODblank) \times 3.05(ml) \times 希釈倍率}{13.78 \times 1/2 \times 1.0 \times 0.05(ml)}$$

１３．７８：上記の測定条件下でのミリモル分子吸光係数（cm^2/micromole）

１／２：酵素反応で生成したH_2O_2の２分子から形成するQuinoneimine色素は１分子であることによる係数。

１．０：光路長(cm)。

実施例

[0123] 以下の実施例において本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。特に断らない場合、試薬は市販品を用いた。

[0124] [実施例１]アマドリアーゼ遺伝子を保持するプラスミドｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２の調製

ＨｂＡ１ｃに作用するアマドリアーゼ（ＣＦＰ－ＤＨ２、国際公開第２０１５／０６０４２９号参照）のアミノ酸配列を配列番号１に示す。ＣＦＰ－ＤＨ２遺伝子（配列番号２）を組込んだｐＫＫ２２３－３ベクターであるｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２を調製するために、ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２を有する大腸菌ＪＭ１０９株を、３ｍｌのＬＢ－ａｍｐ培地［１％（ｗ／ｖ）バクトトリプトン、０．５％（ｗ／ｖ）ペプトン、０．５％（ｗ／ｖ）ＮａＣｌ、５０μｇ／ｍｌ　アンピシリン］に接種して、３７℃で１６時間振とう培養し、培養物を得た。

[0125] この培養物を１０，０００×ｇで、１分間遠心分離することにより集菌して菌体を得た。この菌体より、GenElute Plasmid MiniprepKit (Sigma-Aldrich社製）を用いてｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２を抽出して精製し、２．５μｇの組換え体プラスミドｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２を得た。

[0126] [実施例２]ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２の部位特異的改変操作

得られたｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２を鋳型として、配列番号３、４の合成オリゴヌクレオチド、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡績社製）を用い、以下の条件でＰＣＲ反応を行った。

[0127] すなわち、１０×ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－緩衝液を５μｌ、ｄＮＴＰが各２ｍＭになるよう調製されたｄＮＴＰｓ混合溶液を５μｌ、２５ｍＭの$MgSO_4$溶液を２μｌ、鋳型となるｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ２を５０ｎｇ、上記合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ１５ｐｍｏｌ、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－を１Ｕｎｉｔ加えて、滅菌水により全量を５０μｌとした。調製した反応液をサーマルサイクラー（エッペンドルフ社製）を用いて、９４℃で２分間イ

ンキュベートし、続いて、「９４℃、１５秒」－「５０℃、３０秒」－「６８℃、６分」のサイクルを３０回繰り返した。

[0128] 得られた反応液に、制限酵素ＤｐｎＩ（NEW ENGLAND BioLabs社製）を添加して３７℃で反応させ、残存している鋳型ＤＮＡを切断した後、大腸菌ＪＭ１０９を形質転換し、ＬＢ－ａｍｐ寒天培地に展開した。生育したコロニーをＬＢ－ａｍｐ培地に接種して振とう培養し、実施例１と同様の方法でプラスミドＤＮＡを単離した。該プラスミド中のアマドリアーゼをコードするＤＮＡの塩基配列を、マルチキャピラリーＤＮＡ解析システムApplied Biosystems 3130xlジェネティックアナライザ（LifeTechnologies社製）を用いて決定し、配列番号１記載のアミノ酸配列の６４位のアルギニンがグリシンに置換された改変型アマドリアーゼ（ＣＦＰ－ＤＨ３、配列番号５）の遺伝子を保持するプラスミド（ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ３）を得た。

[0129] 続いて、ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ３を鋳型として、配列番号６、配列番号７のオリゴヌクレオチド、及びＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－ を用い、先述の条件でＰＣＲ反応、大腸菌ＪＭ１０９の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドＤＮＡ中のアマドリアーゼをコードするＤＮＡの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の６４位のアルギニンがグリシンに置換され、かつ、１１０位のロイシンがチロシンに置換された改変型アマドリアーゼ（ＣＦＰ－ＤＨ４、配列番号８）の遺伝子を保持するプラスミド（ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ４）を得た。

[0130] ［実施例３］ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ４の製造及び精製

ＣＦＰ－ＤＨ４遺伝子を保持するプラスミド（ｐＫＫ２２３－３－ＣＦＰ－ＤＨ４）を導入した大腸菌ＪＭ１０９株を、終濃度０．１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを添加したＬＢ－ａｍｐ培地２００ｍｌに植菌し、２５℃で１６時間培養した。得られた各培養菌体を２ｍＭ リン酸カリウム緩衝液（ｐＨ８．０）で洗浄した後、同緩衝液に菌体を懸濁して超音波破砕処理を行い、２０，０００×ｇで１０分間遠心分離し、粗酵素液４０ｍｌを調製した。

[0131] Ｑ－ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（ＧＥヘルスケア社製）を充てんしたカラ

ムを２ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液（ｐＨ８．０）で平衡化した後、調製したＣＦＰ－ＤＨ４を含む粗酵素液をアプライしてアマドリアーゼを陰イオン交換樹脂に結合させた。その後、４ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液（ｐＨ８．０）を２０カラム体積分送液し、夾雑タンパク質を溶出させた後、３０ｍＭのＮａＣｌを含む４ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液（ｐＨ８．０）で樹脂に結合したタンパク質を溶出させ、アマドリアーゼ活性を示す画分を回収した。

[0132] 得られたそれぞれのアマドリアーゼ活性を示す画分を、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３０Ｋ（ミリポア社製）により濃縮し、Ｈｉ　Ｌｏａｄ　２６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００により精製した。樹脂の平衡化、溶出には１５０ｍＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭ　リン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．５）を用いた。溶出した各フラクションの純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより評価し、夾雑タンパク質を含んでいないフラクションを回収し、ＣＦＰ－ＤＨ４の精製標品とした。

[0133] ［実施例４］ＨｂＡ１ｃ検出反応が完遂した場合における吸光度の測定

本実施例では過剰量のA1cOXを用いて、HbA1c検出反応が完遂した場合の吸光度変化量を決定する。

[0134] 以下の組成を有するＨｂＡ１ｃ測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してＨｂＡ１ｃの測定を実施した。

（試料）

血球（ＨｂＡ１ｃ　１０．４％（ＮＧＳＰ値））

（第１試薬－Ａ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ６．５

１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ

０．２％（ｗ／ｖ）　ｎ－ドデシル－β－Ｄ－マルトシド（同仁化学研究所製）

４ｍＭ　$NaNO_2$

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物（和光純薬工業）、本発明の化合物のいずれか一つ（いずれも東京化成工業、ただしAcid Yellow 34のみMP Biomedicals）、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）

イオン交換水

（第２試薬－Ａ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ６．５

５．３ｍｇ／ｍｌ　ＣＦＰ－ＤＨ４（A1cOX）

[0135] イオン交換水で５１倍希釈した試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ａに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ａを添加してＨｂＡ１ｃのβ鎖アミノ末端の酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた。希釈試料と第１試薬－Ａを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、希釈試料と第１試薬－Ａを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、希釈試料と第１試薬－Ａを混合してから４．８分後は、第２試薬－Ａを添加する直前を表す。希釈試料と第１試薬を混合してから９分後、１０分後のΔＡ（ΔA_{9min}及びΔA_{10min}）を表１に示す。また、一例として、比較例２における、$A_{694/751}$、ΔA_{9min}及びΔA_{10min}の関係性を図１に示す。

[0136]

[表1]

	ΔA_{9min}	ΔA_{10min}
添加せず (比較例 1)	0.009	0.009
Tartrazine (比較例 2)	0.032	0.032
Mordant Orange 1 (本発明 1)	0.016	0.016
Alizarin Yellow GG (本発明 2)	0.016	0.016
Chrome Yellow (本発明 3)	0.024	0.024
Direct Yellow 44 (本発明 4)	0.017	0.017
Acid Red 151 (本発明 5)	0.014	0.014
Acid Yellow 36 (本発明 6)	0.011	0.011
Xylene Fast Yellow 2G (本発明 7)	0.015	0.015
Acid Yellow 34 (本発明 8)	0.011	0.011

[0137] 表１に示した通り、本発明の化合物及び比較例について、ΔＡ$_{9min}$及びΔＡ$_{10min}$に差は見られない。つまり、希釈試料と第１試薬－Ａを混合してから１０分後には、ＨｂＡ１ｃ定量反応、すなわちＨｂＡ１ｃの酸化により生じた過酸化水素の定量反応は完遂していることが分かる。そこで、実施例４および５において、各比較例、及び本発明におけるΔＡ$_{10min}$を、それぞれの条件においてＨｂＡ１ｃ定量反応が１００％進行した時のΔＡ（ΔＡ$_{100\%}$）と定義した。

[0138] ［実施例５］本発明の化合物による、ＨｂＡ１ｃ検出反応促進効果の算出

次に本実施例では、少量のA1c0Xを用いて、本発明の化合物による、ＨｂＡ１ｃ検出反応の促進の度合いを決定した。

[0139] 以下の組成を有するＨｂＡ１ｃ測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してＨｂＡ１ｃの測定を

実施した。

（試料）

血球（ＨｂＡ１ｃ　１０．４％（ＮＧＳＰ値））

（第１試薬）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ６．５

１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ

０．２％（ｗ／ｖ）　ｎ－ドデシル－β－Ｄ－マルトシド（同仁化学研究所製）

４ｍＭ　$NaNO_2$

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表２における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｂ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ６．５

１．１ｍｇ／ｍｌ　ＣＦＰ－ＤＨ４（A1cOX）

[0140] イオン交換水で５１倍希釈した試料８μｌを、９６μｌの第１試薬に添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｂを添加してＨｂＡ１ｃのβ鎖アミノ末端の酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた。希釈試料と第１試薬を混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、希釈試料と第１試薬を混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、希釈試料と第１試薬を混合してから５分後は、第２試薬－Ｂを添加

する直前を表す。

[0141] 次に、本実施例で算出されたΔＡを実施例４で定義したΔＡ$_{100\%}$で割り、ＨｂＡ１ｃ検出反応の進行度を算出した。希釈試料と第１試薬を混合してから７．５、１０分後（換言すると、第２試薬－Ｂを添加してから２．５、５分後）のＨｂＡ１ｃ検出反応の進行度を表２に示す。

[0142] [表2]

	7.5 分後の反応進行度(%)	10 分後の反応進行度(%)
添加せず (比較例 1)	51	73
Tartrazine (比較例 2)	38	62
Mordant Orange 1 (本発明 1)	80	94
Alizarin Yellow GG (本発明 2)	76	91
Chrome Yellow (本発明 3)	53	77
Direct Yellow 44 (本発明 4)	77	96
Acid Red 151 (本発明 5)	55	80
Acid Yellow 36 (本発明 6)	53	81
Xylene Fast Yellow 2G (本発明 7)	58	83
Acid Yellow 34 (本発明 8)	75	95

[0143] 表２に示した通り、Mordant Orange 1、AlizarinYellow GG、Chrome Yellow、DirectYellow 44、Acid Red 151、AcidYellow 36、Xylene Fast Yellow 2G、Acid Yellow 34には、ＨｂＡ１ｃ検出反応を促進する効果があることが見出された。

[0144] ［実施例６］フルクトシルペプチドオキシダーゼによるフルクトシルバリルヒスチジン検出反応が完遂した場合における吸光度の測定

本実施例ではオキシダーゼの一種であるフルクトシルペプチドオキシダー

ゼ（ＦＰＯＸ－ＣＥＴ）を過剰量用いて、基質であるフルクトシルバリルヒスチジン検出反応が完遂した場合の吸光度変化量を決定する。

[0145] 以下の組成を有するフルクトシルバリルヒスチジン測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ Ｍａｊｅｓｔｙ ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してフルクトシルペプチドオキシダーゼによるフルクトシルバリルヒスチジンの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ フルクトシルバリルヒスチジン（キッコーマンバイオケミファ製）

（第１試薬－Ｂ）

３０ｍＭ ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液 ｐＨ７．０

０．２％（ｖ／ｖ） Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（和光純薬工業製）

１０Ｕ／ｍｌ ペルオキシダーゼ ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ １０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ） 表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｃ）

１０ｍＭ ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液 ｐＨ７．０

４．８Ｕ／ｍｌ ＦＰＯＸ－ＣＥＴ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0146] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｂに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｃを添加してフルクトシルバリルヒスチジンの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた。試料と第１試薬－Ｂを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試

料と第１試薬－Ｂを混合してから４．８分後のＡ$_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、Ａ$_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｂを混合してから４．８分後は、第２試薬－Ｃを添加する直前を表す。希釈試料と第１試薬－Ｂを混合してから９分後、１０分後のΔＡ（ΔＡ$_{9min}$及びΔＡ$_{10min}$）を表３に示す。

[0147] [表3]

	ΔA_{9min}	ΔA_{10min}
添加せず (比較例 1)	0.016	0.016
Chrome Yellow (本発明 3)	0.064	0.064
Direct Yellow 44 (本発明 4)	0.043	0.043
Xylene Fast Yellow 2G (本発明 7)	0.027	0.027
Acid Yellow 34 (本発明 8)	0.032	0.033

[0148] 表３に示した通り、本発明の化合物及び比較例について、ΔＡ$_{9min}$及びΔＡ$_{10min}$に差は見られない。つまり、希釈試料と第１試薬－Ｂを混合してから１０分後には、フルクトシルバリルヒスチジン定量反応、すなわちフルクトシルバリルヒスチジンの酸化により生じた過酸化水素の定量反応は完遂していることが分かる。そこで、実施例６および７において、各比較例、及び本発明におけるΔＡ$_{10min}$を、それぞれの条件においてＨｂＡ１ｃ定量反応が１００％進行した時のΔＡ（ΔＡ$_{100\%}$）と定義した。

[0149] ［実施例７］本発明の化合物による、フルクトシルペプチドオキシダーゼによるフルクトシルバリルヒスチジン検出反応促進効果の算出

次に本実施例では、少量のフルクトシルペプチドオキシダーゼを用いて、本発明の化合物による、フルクトシルバリルヒスチジン検出反応の促進の度合いを決定した。

[0150] 以下の組成を有するフルクトシルバリルヒスチジン測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用して

フルクトシルバリルヒスチジンの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　フルクトシルバリルヒスチジン（キッコーマンバイオケミファ製）

（第１試薬－Ｂ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ７．０

０．２％（ｖ／ｖ）　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（和光純薬工業製）

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｄ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ７．０

０．４８Ｕ／ｍｌ　ＦＰＯＸ－ＣＥＴ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0151] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｂに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｄを添加してフルクトシルバリルヒスチジンの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた試料と第１試薬－Ｂを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｂを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｂを混合してから５分後は、第２試薬－Ｄを添加する直前を表す。

[0152] 次に、本実施例で算出されたΔＡを実施例６で定義した$\Delta A_{100\%}$で割り、フルクトシルバリルヒスチジン検出反応の進行度を算出した。試料と第１試

薬－Ｂを混合してから７．５、１０分後（換言すると、第２試薬－Ｄを添加してから２．５、５分後）のフルクトシルバリルヒスチジン検出反応の進行度を表４に示す。

[0153] [表4]

	7.5 分後の反応進行度(%)	10 分後の反応進行度(%)
添加せず (比較例 1)	57	81
Chrome Yellow (本発明 3)	62	86
Direct Yellow 44 (本発明 4)	66	88
Xylene Fast Yellow 2G (本発明 7)	63	96
Acid Yellow 34 (本発明 8)	62	86

[0154] 表４に示した通り、Chrome Yellow、Direct Yellow 44、Xylene Fast Yellow 2G、Acid Yellow 34には、フルクトシルバリルヒスチジン検出反応を促進する効果があることが見出された。

[0155] ［実施例８］フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによるフルクトシルバリン検出反応が完遂した場合における吸光度の測定

本実施例ではオキシダーゼの一種であるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（ＦＡＯＤ－Ｅ）を過剰量用いて、基質であるフルクトシルバリン検出反応が完遂した場合の吸光度変化量を決定する。

[0156] 以下の組成を有するフルクトシルバリン測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによるフルクトシルバリンの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　フルクトシルバリン（キッコーマンバイオケミファ製）

（第１試薬－Ｃ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

０．２％（ｖ／ｖ）　ナイミーンＦ－２１５（日油製）

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｅ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

２１．４Ｕ／ｍｌ　ＦＡＯＤ－Ｅ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0157] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｃに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｅを添加してフルクトシルバリンの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた。試料と第１試薬－Ｃを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｃを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｃを混合してから４．８分後は、第２試薬－Ｅを添加する直前を表す。希釈試料と第１試薬－Ｃを混合してから９分後、１０分後のΔＡ（ΔA_{9min}及びΔA_{10min}）を表５に示す。

[0158]

[表5]

	ΔA_{9min}	ΔA_{10min}
添加せず (比較例 1)	0.023	0.024
Mordant Orange 1 (本発明 1)	0.049	0.051
Alizarin Yellow GG (本発明 2)	0.044	0.046
Chrome Yellow (本発明 3)	0.066	0.067
Disperse Diazo Black 3BF (本発明 9)	0.062	0.061

[0159] 表５に示した通り、本発明の化合物及び比較例について、ΔＡ$_{9min}$及びΔＡ$_{10min}$に差は見られない。つまり、希釈試料と第１試薬－Ｃを混合してから１０分後には、フルクトシルバリン定量反応、すなわちフルクトシルバリンの酸化により生じた過酸化水素の定量反応は完遂していることが分かる。そこで、実施例８および９において、各比較例、及び本発明におけるΔＡ$_{10min}$を、それぞれの条件においてＨｂＡ１ｃ定量反応が１００％進行した時のΔＡ（ΔＡ$_{100\%}$）と定義した。

[0160] ［実施例９］本発明の化合物による、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼによるフルクトシルバリン検出反応促進効果の算出

次に本実施例では、少量のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて、本発明の化合物による、フルクトシルバリン検出反応の促進の度合いを決定した。

[0161] 以下の組成を有するフルクトシルバリン測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してフルクトシルバリンの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　フルクトシルバリン（キッコーマンバイオケミファ製）

（第１試薬－Ｃ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

０．２％（ｖ／ｖ）　ナイミーンＦ－２１５（日油製）

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｆ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

２．１４Ｕ／ｍｌ　ＦＡＯＤ－Ｅ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0162] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｃに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｆを添加してフルクトシルバリンの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた試料と第１試薬－Ｃを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｃを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｃを混合してから５分後は、第２試薬－Ｆを添加する直前を表す。

[0163] 次に、本実施例で算出されたΔＡを実施例８で定義した$\Delta A_{100\%}$で割り、フルクトシルバリン検出反応の進行度を算出した。試料と第１試薬－Ｃを混合してから７．５、１０分後（換言すると、第２試薬－Ｆを添加してから２．５、５分後）のフルクトシルバリン検出反応の進行度を表６に示す。

[0164]

[表6]

	7.5分後の反応進行度(%)	10分後の反応進行度(%)
添加せず (比較例1)	29	48
Mordant Orange 1 (本発明1)	37	59
Alizarin Yellow GG (本発明2)	38	62
Chrome Yellow (本発明3)	43	68
Disperse Diazo Black 3BF (本発明9)	86	89

[0165] 表６に示した通り、Mordant Orange 1、Alizarin Yellow GG、Chrome Yellow、Disperse Diazo Black 3BFには、フルクトシルバリン検出反応を促進する効果があることが見出された。

[0166] ［実施例１０］サルコシンオキシダーゼによるサルコシン検出反応が完遂した場合における吸光度の測定

本実施例ではオキシダーゼの一種であるサルコシンオキシダーゼ（ＳＯＤ－ＴＥ）を過剰量用いて、基質であるサルコシン（Ｎ－メチルグリシン）検出反応が完遂した場合の吸光度変化量を決定する。

[0167] 以下の組成を有するサルコシン測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してサルコシンオキシダーゼによるサルコシンの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　サルコシン（和光純薬工業製）

（第１試薬－Ｄ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

０．２％（ｖ／ｖ）　ＮＰ－１０（ＨＥＬＭ製）

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－

ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｇ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

１２３Ｕ／ｍｌ　ＳＯＤ－ＴＥ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0168] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｄに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｇを添加してサルコシンの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた。試料と第１試薬－Ｄを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｄを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｄを混合してから４．８分後は、第２試薬－Ｇを添加する直前を表す。希釈試料と第１試薬－Ｄを混合してから９分後、１０分後のΔＡ（ΔA_{9min}及びΔA_{10min}）を表７に示す。

[0169]

[表7]

	ΔA_{9min}	ΔA_{10min}
添加せず (比較例 1)	0.082	0.083
Mordant Orange 1 (本発明 1)	0.327	0.328
Alizarin Yellow GG (本発明 2)	0.197	0.197
Chrome Yellow (本発明 3)	0.186	0.186
Direct Yellow 44 (本発明 4)	0.315	0.315
Acid Red 151 (本発明 5)	0.212	0.212
Xylene Fast Yellow 2G (本発明 7)	0.158	0.158
Disperse Diazo Black 3BF (本発明 9)	0.156	0.156

[0170] 表７に示した通り、本発明の化合物及び比較例について、ΔA_{9min}及びΔA_{10min}に差は見られない。つまり、希釈試料と第１試薬－Ｄを混合してから１０分後には、サルコシン定量反応、すなわちサルコシンの酸化により生じた過酸化水素の定量反応は完遂していることが分かる。そこで、実施例１０および１１において、各比較例、及び本発明におけるΔA_{10min}を、それぞれの条件においてＨｂＡ１ｃ定量反応が１００％進行した時のΔＡ（$\Delta A_{100\%}$）と定義した。

[0171] ［実施例１１］本発明の化合物による、サルコシンオキシダーゼによるサルコシン検出反応促進効果の算出

次に本実施例では、少量のサルコシンオキシダーゼを用いて、本発明の化合物による、サルコシン検出反応の促進の度合いを決定した。

[0172] 以下の組成を有するサルコシン測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してサルコシンの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　サルコシン（和光純薬工業製）

（第１試薬－Ｄ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

０．２％（ｖ／ｖ）　ＮＰ－１０（ＨＥＬＭ製）

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｈ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ８．０

１２．３Ｕ／ｍｌ　ＳＯＤ－ＴＥ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0173] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｄに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｈを添加してサルコシンの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた試料と第１試薬－Ｄを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｄを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｄを混合してから５分後は、第２試薬－Ｈを添加する直前を表す。

[0174] 次に、本実施例で算出されたΔＡを実施例１０で定義した$\Delta A_{100\%}$で割り、サルコシン検出反応の進行度を算出した。試料と第１試薬－Ｄを混合してから７．５、１０分後（換言すると、第２試薬－Ｈを添加してから２．５、５分後）のサルコシン検出反応の進行度を表８に示す。

[0175]

[表8]

	7.5分後の反応進行度(%)	10分後の反応進行度(%)
添加せず (比較例1)	60	82
Mordant Orange 1 (本発明1)	67	88
Alizarin Yellow GG (本発明2)	64	86
Chrome Yellow (本発明3)	65	87
Direct Yellow 44 (本発明4)	68	89
Acid Red 151 (本発明5)	68	89
Xylene Fast Yellow 2G (本発明7)	64	86
Disperse Diazo Black 3BF (本発明9)	63	84

[0176] 表８に示した通り、Mordant Orange 1、Alizarin Yellow GG、Chrome Yellow、Direct Yellow 44、Acid Red 151、Xylene Fast Yellow 2G、Disperse Diazo Black 3BFには、サルコシン検出反応を促進する効果があることが見出された。

[0177] ［実施例１２］コレステロールオキシダーゼによるコレステロール検出反応が完遂した場合における吸光度の測定

本実施例ではオキシダーゼの一種であるコレステロールオキシダーゼ（ＣＨＯ－ＣＥ）を過剰量用いて、基質であるコレステロール検出反応が完遂した場合の吸光度変化量を決定する。

[0178] 以下の組成を有するコレステロール測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してコレステロールオキシダーゼによるコレステロールの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　コレステロール（和光純薬工業製）

５．０％（ｖ／ｖ）　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（和光純薬工業製）

４．０％（ｗ／ｖ）　コール酸ナトリウム（和光純薬工業製）

（第１試薬－Ｅ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ７．０

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｉ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ７．０

１１．６Ｕ／ｍｌ　ＣＨＯ－ＣＥ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0179] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｅに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｉを添加してコレステロールの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた。試料と第１試薬－Ｅを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｅを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｅを混合してから４．８分後は、第２試薬－Ｉを添加する直前を表す。希釈試料と第１試薬－Ｅを混合してから９分後、１０分後のΔＡ（ΔA_{9min}及びΔA_{10min}）を表９に示す。

[0180]

[表9]

	ΔA_{9min}	ΔA_{10min}
添加せず (比較例 1)	0.022	0.022
Mordant Orange 1 (本発明 1)	0.041	0.041
Alizarin Yellow GG (本発明 2)	0.039	0.039
Chrome Yellow (本発明 3)	0.071	0.072
Acid Red 151 (本発明 5)	0.036	0.036
Acid Yellow 36 (本発明 6)	0.033	0.033
Acid Yellow 34 (本発明 8)	0.033	0.033
Disperse Diazo Black 3BF (本発明 9)	0.028	0.032

[0181] 表９に示した通り、本発明の化合物及び比較例について、ΔA_{9min}及びΔA_{10min}に差は見られない。つまり、希釈試料と第１試薬－Ｅを混合してから１０分後には、コレステロール定量反応、すなわちコレステロールの酸化により生じた過酸化水素の定量反応は完遂していることが分かる。そこで、実施例１２および１３において、各比較例、及び本発明におけるΔA_{10min}を、それぞれの条件においてコレステロール定量反応が１００％進行した時のΔＡ（$\Delta A_{100\%}$）と定義した。

[0182] ［実施例１３］本発明の化合物による、コレステロールオキシダーゼによるコレステロール検出反応促進効果の算出

次に本実施例では、少量のコレステロールオキシダーゼを用いて、本発明の化合物による、コレステロール検出反応の促進の度合いを決定した。

[0183] 以下の組成を有するコレステロール測定用試薬を調製し、Ｂｉｏ　Ｍａｊｅｓｔｙ　ＪＣＡ－ＢＭ１６５０（日本電子製）を利用してコレステロールの測定を実施した。

（試料）

３２μＭ　コレステロール（和光純薬工業製）

５．０％（ｖ／ｖ）　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（和光純薬工業製）

４．０％（ｗ／ｖ）　コール酸ナトリウム（和光純薬工業製）

（第１試薬－Ｅ）

３０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ７．０

１０Ｕ／ｍｌ　ペルオキシダーゼ　ＰＥＯ－３０１（東洋紡）

０．０２３ｍＭ　１０－（カルボキシメチルアミノカルボニル）－３，７－ビス（ジメチルアミノ）フェノチアジンナトリウム（ＤＡ－６７、和光純薬工業製）

０．０４％（ｗ／ｖ）　表１における比較例２の化合物、本発明の化合物のいずれか一つ、もしくは化合物を含有しない（比較例１とする）イオン交換水

（第２試薬－Ｊ）

１０ｍＭ　ＭＯＰＳ－ＮａＯＨ緩衝液　ｐＨ７．０

２．３１Ｕ／ｍｌ　ＣＨＯ－ＣＥ（キッコーマンバイオケミファ製）

[0184] 試料８μｌを、９６μｌの第１試薬－Ｅに添加して３７℃で５分間インキュベートした後、２４μｌの第２試薬－Ｊを添加してコレステロールの酸化により生じる過酸化水素の定量反応を３７℃で５分間進行させた試料と第１試薬－Ｅを混合してから１０分間の、波長６９４ｎｍ及び７５１ｎｍの光に対する反応液の吸光度（A_{694}及びA_{751}）を経時的に測定し、A_{694}からA_{751}を引いた値、すなわち$A_{694/751}$を求めた。続いて、試料と第１試薬－Ｅを混合してから４．８分後の$A_{694/751}$を（１０４／１２８）倍した値を、$A_{694/751}$から引いてΔＡを算出した。なお、試料と第１試薬－Ｅを混合してから５分後は、第２試薬－Ｊを添加する直前を表す。

[0185] 次に、本実施例で算出されたΔＡを実施例１２で定義した$\Delta A_{100\%}$で割り、コレステロール検出反応の進行度を算出した。試料と第１試薬－Ｅを混合してから７．５、１０分後（換言すると、第２試薬－Ｊを添加してから２．５、５分後）のコレステロール検出反応の進行度を表１０に示す。

[0186] [表10]

	7.5分後の反応進行度(%)	10分後の反応進行度(%)
添加せず (比較例1)	65	88
Mordant Orange 1 (本発明1)	74	94
Alizarin Yellow GG (本発明2)	73	93
Chrome Yellow (本発明3)	67	91
Acid Red 151 (本発明5)	74	94
Acid Yellow 36 (本発明6)	73	92
Acid Yellow 34 (本発明8)	72	92
Disperse Diazo Black 3BF (本発明9)	66	97

[0187] 表１０に示した通り、Mordant Orange 1、Alizarin Yellow GG、Chrome Yellow、Acid Red 151、Acid Yellow 36、Acid Yellow 34、Disperse Diazo Black 3BFには、コレステロール検出反応を促進する効果があることが見出された。

[0188] なお、本発明の反応促進剤は、ペルオキシダーゼが触媒する酵素反応も促進する可能性があるが、本実施例の条件下では、系に過剰量のペルオキシダーゼが添加されており、各種オキシダーゼの酵素反応により生じた過酸化水素は直ちにペルオキシダーゼによって分解されると考えられる。そのため、上記の反応促進の結果は、主として、本発明の反応促進剤が各種オキシダーゼの酵素反応を促進していることに起因するものと考察される。

産業上の利用可能性

[0189] 本発明のオキシダーゼ反応促進剤を用いることにより、臨床診断用試薬、例えばHbA1c測定試薬、GA測定試薬、サルコシン測定試薬、コレステロール測定試薬等に処方するオキシダーゼの量を低減することができる。また、反応

時間を短縮したり、検出感度を高めることができる。

[0190] [配列表の簡単な説明]

配列番号1　CFP-DH2のアミノ酸配列

配列番号2　CFP-DH2遺伝子の塩基配列

配列番号3　R64G導入用プライマー

配列番号4　R64G導入用プライマー

配列番号5　CFP-DH3のアミノ酸配列

配列番号6　L110Y導入用プライマー

配列番号7　L110Y導入用プライマー

配列番号8　CFP-DH4のアミノ酸配列

[0191]　本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] オキシダーゼ、及び、下記の式（I）で表されるオキシダーゼ反応促進剤を用いる工程を含む、オキシダーゼ反応を用いる方法、

[化1]

$$R^1-N=N-R^2 \qquad (I)$$

[式中、

R^1及びR^2は、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

前記の置換基は、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-CO-NH_2$、$-R^3$、$-NH-R^4$、$-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

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

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよく、

$-R^3$は、－Ｈであるか、或いは、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-SO_3X$、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を

含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

－R^4は、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－C_{1-6}アルキル、－C_{2-6}アルケニル、－C_{2-6}アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－C_{1-6}アルキル、－ＣＯＮH_2、－NO_2、－NH_2、－SO_3Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

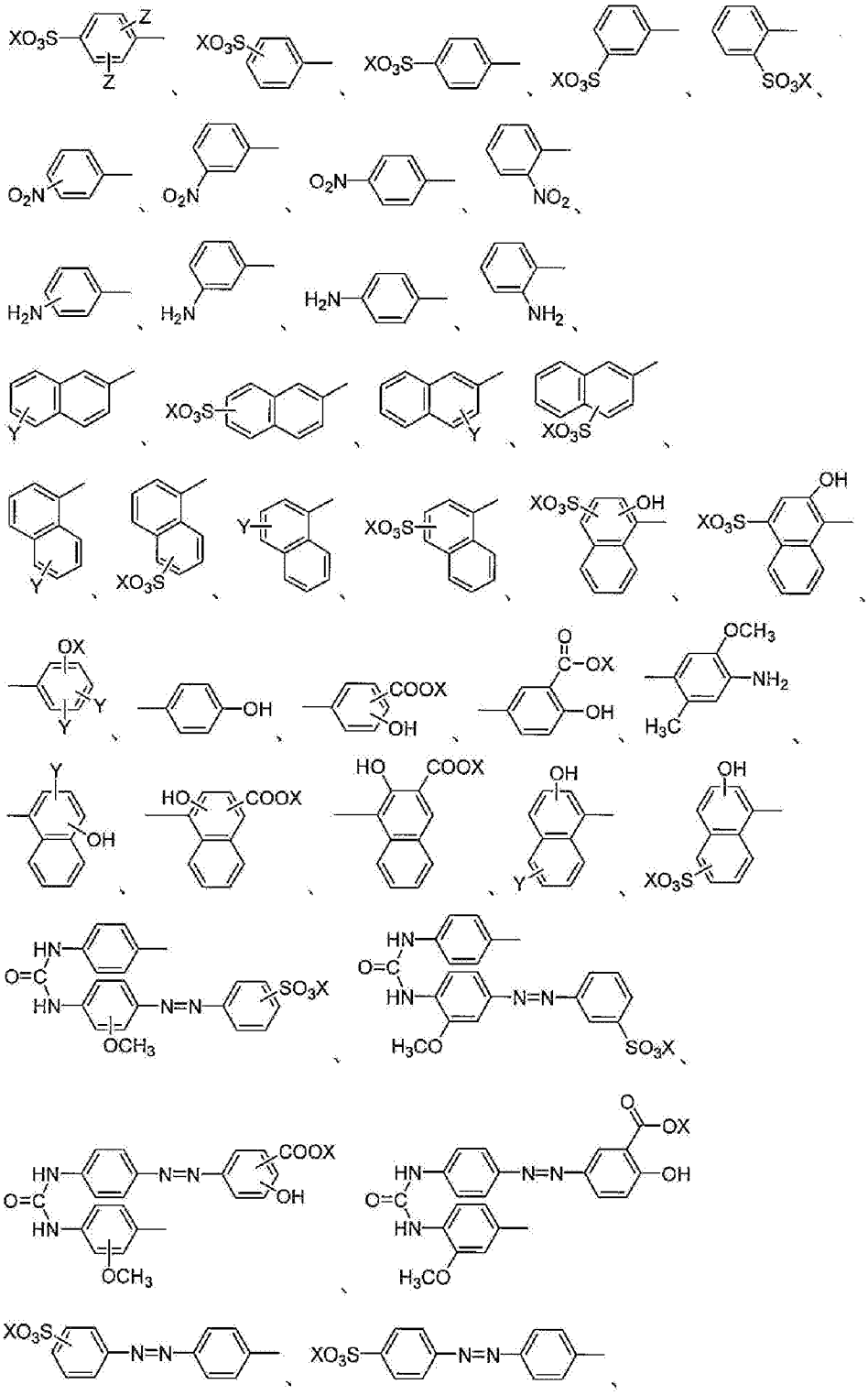
－R^5及び－R^6は、それぞれ独立に、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－C_{1-6}アルキル、－C_{2-6}アルケニル、－C_{2-6}アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－C_{1-6}アルキル、－Ｏ－CH_3、－ＣＯNH_2、－NO_2、－NH_2、－SO_3Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～８員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

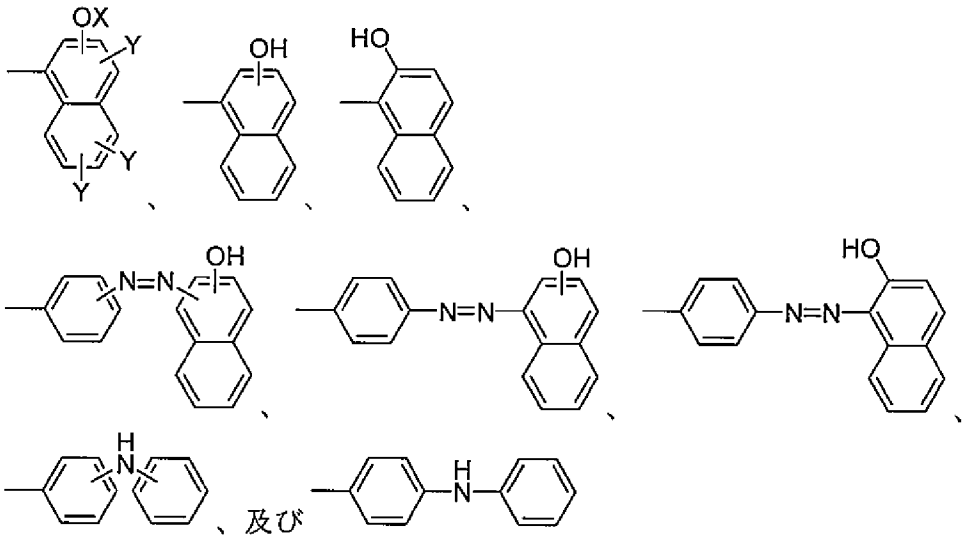
ただし、R^1又はR^2が、芳香族の５員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である場合には、該複素環は－ＣＯＯＸにより置換されたものではない]。

[請求項2] 式（Ｉ）により表される反応促進剤において、R^1及びR^2が、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記芳香族の６員単環の炭素環を含む１０員の縮合環である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 式（Ｉ）により表される反応促進剤において、R^1及びR^2が、それぞれ独立に、

[化2]



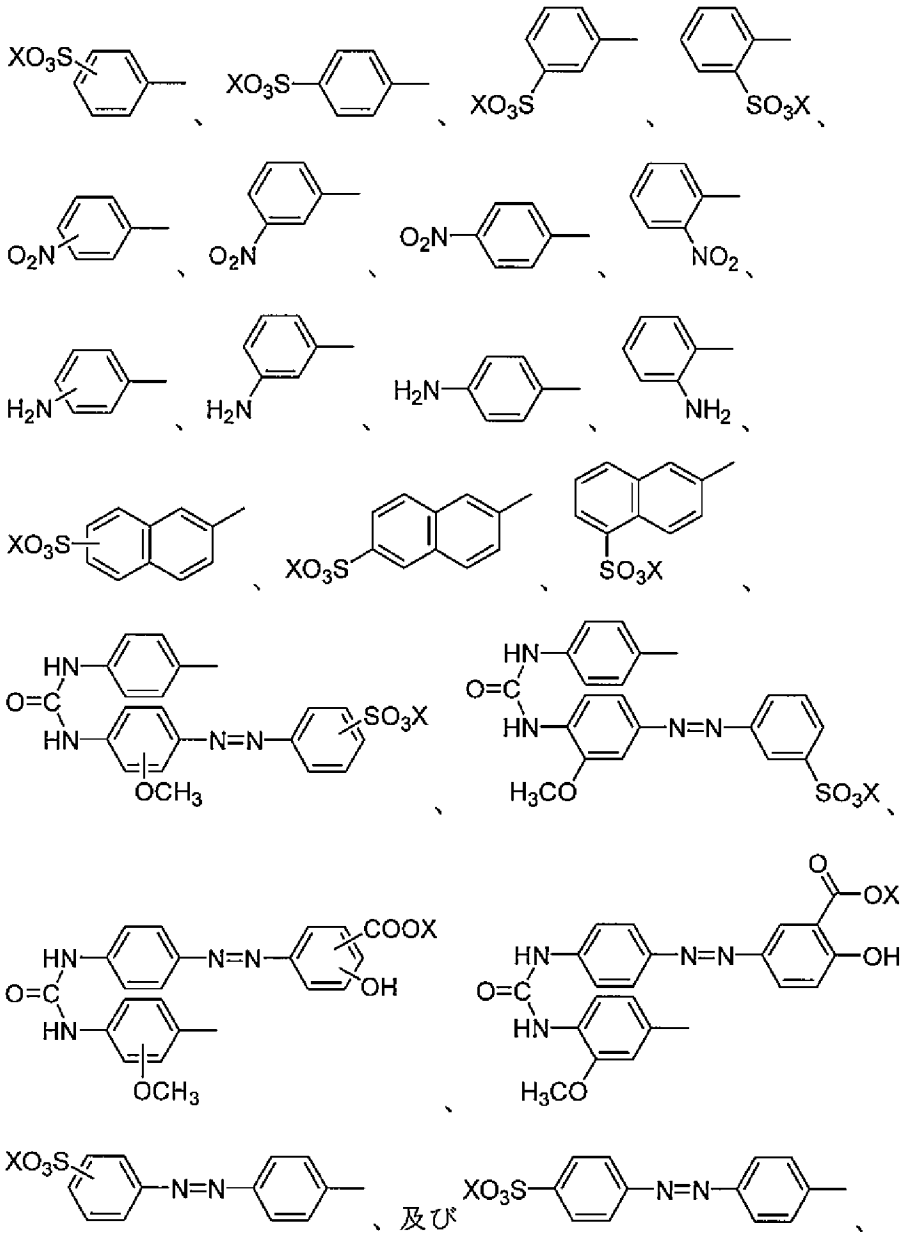


、及び

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

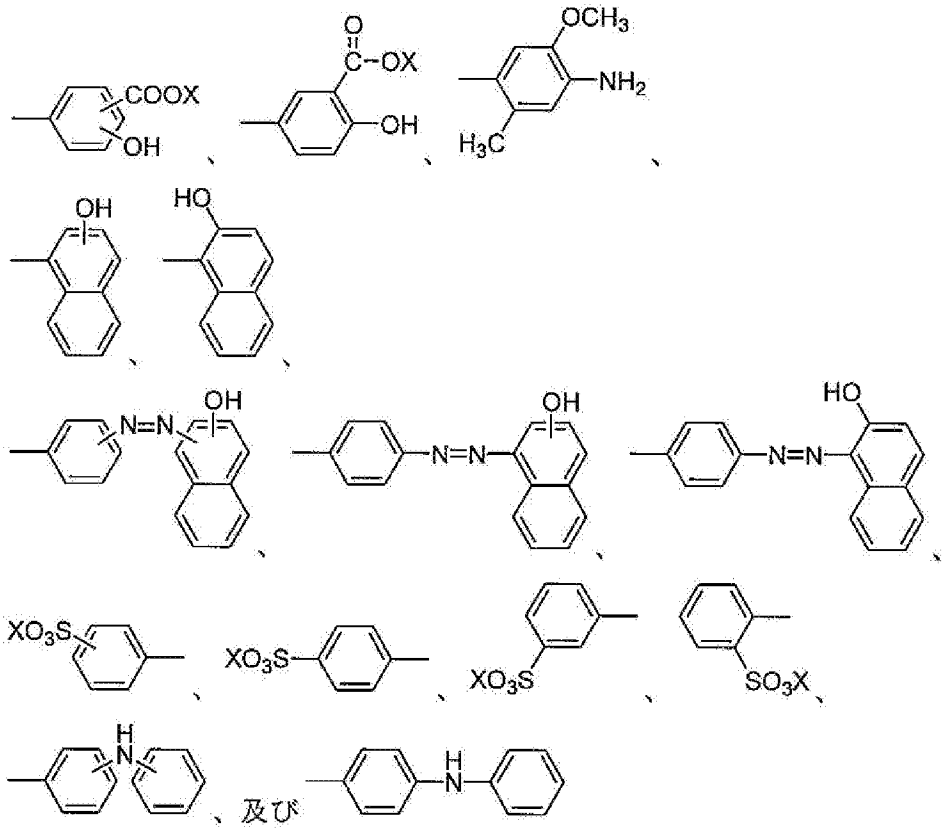
[請求項4] 式（Ｉ）により表される反応促進剤において、Ｒ[1]が、

[化3]



からなる群より選択され、R^2が、

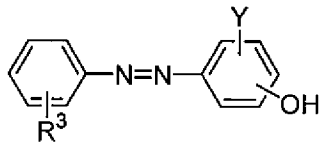
[化4]



からなる群より選択され、式中、Ｘは請求項１に定義したとおりである、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 式（I)により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、請求項１に記載の方法、

[化5]



(II)

[式中、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－SO_3Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよく、

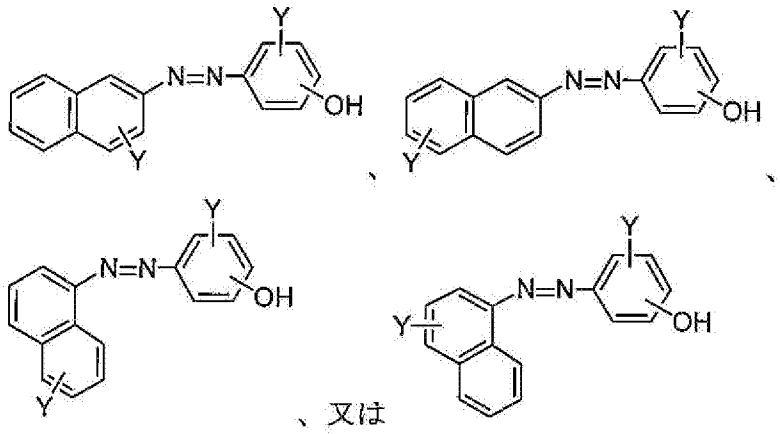
$-R^3$は、－Ｈ又は－ＮＨＣＯ－ＮＨ－R^5－Ｎ＝Ｎ－R^6であるか、

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

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

［請求項6］ 式（Ｉ）により表される反応促進剤が、下記のいずれかの式で表される反応促進剤である、請求項１に記載の方法、

［化6］



、又は

［式中、

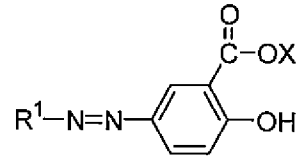
Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－SO_3Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよい］。

[請求項7] 式（I）により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、請求項１に記載の方法、

[化7]



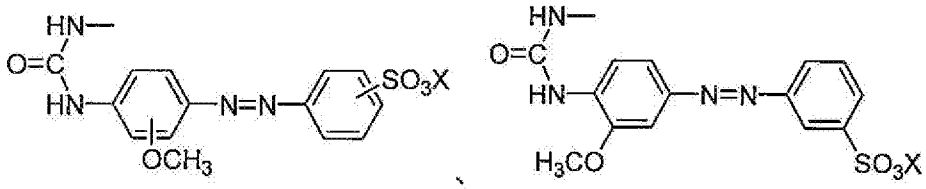
(III)

［式中、

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

前記の置換基は、－NO_2、－SO_3X、及び

[化8]



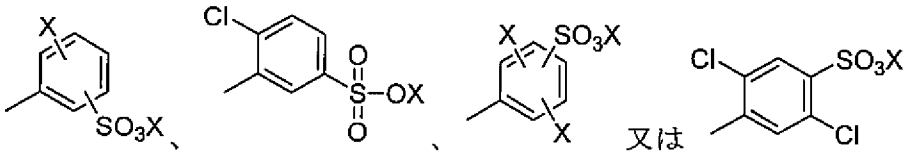
からなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］。

[請求項8] 式（I）により表される反応促進剤において、R^1が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環であり、R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である、請求項１に記載の方法。

[請求項9] R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、２つの窒素原子を含む複素環であり、該複素環が

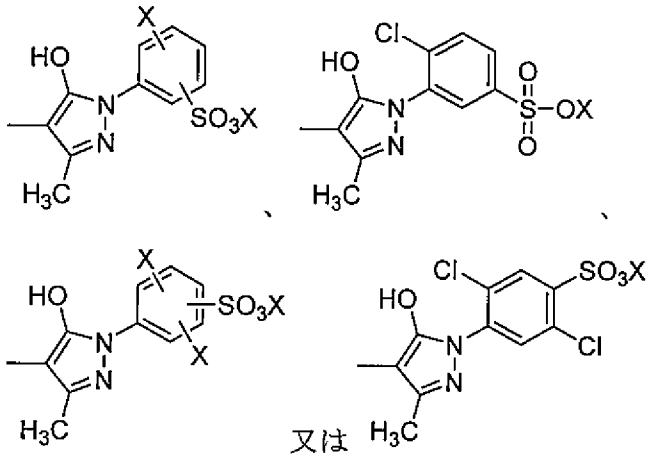
[化9]



により置換されており、式中、Ｘは請求項１に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、請求項１又は８に記載の方法。

[請求項10] Ｒ２が、

[化10]

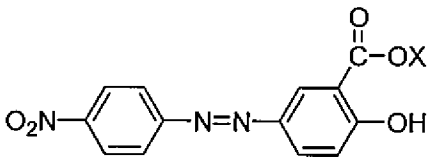


であり、式中、Ｘは請求項１に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、請求項１、８又は９に記載の方法。

[請求項11] 式（I)により表される化合物が、

以下の式により表される化合物、

[化11]

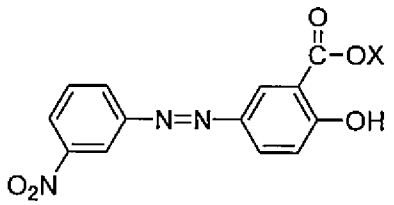


IV

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい］、

以下の式により表される化合物、

[化12]

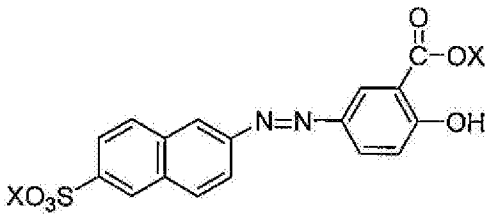


V

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、

以下の式により表される化合物、

[化13]

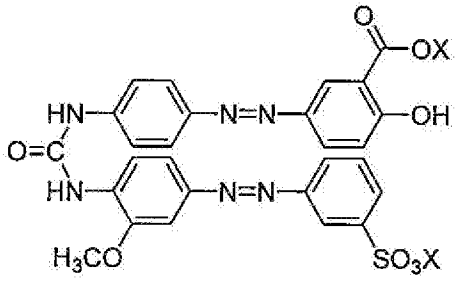


VI

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい］、

以下の式により表される化合物、

[化14]

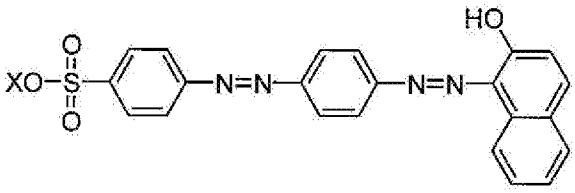


VII

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい］、

以下の式により表される化合物、

[化15]

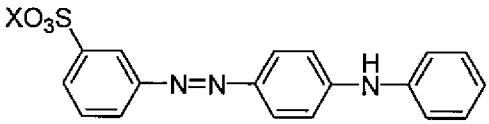


VIII

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、

以下の式により表される化合物、

[化16]

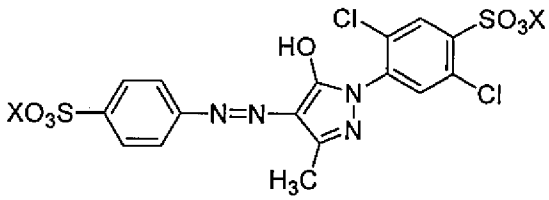


IX

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、

以下の式により表される化合物、

[化17]

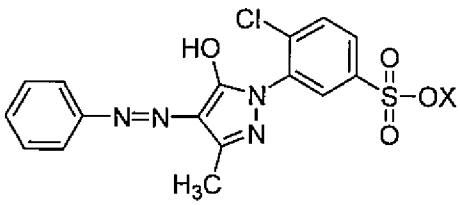


X

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい］、

以下の式により表される化合物、

[化18]

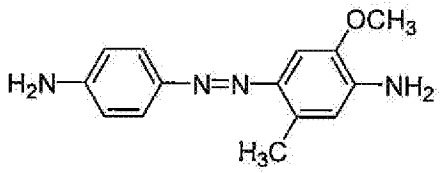


XI

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、

及び、以下の式により表される化合物、

［化19］



XII

からなる群より選択される、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

［請求項12］ オキシダーゼが、アマドリアーゼ、サルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼからなる群より選択されるオキシダーゼである、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。

［請求項13］ 式（I)により表される化合物を含む、オキシダーゼ反応促進剤、

［化20］

$$R^1-N=N-R^2 \qquad (I)$$

［式中、

R^1及びR^2は、それぞれ独立に、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

前記の置換基は、－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、$-C_{1-6}$アルキル、$-C_{2-6}$アルケニル、$-C_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、$-O-C_{1-6}$アルキル、$-CONH_2$、$-NO_2$、$-NH_2$、$-CO-NH_2$、$-R^3$、$-NH-R^4$、$-NHCO-NH-R^5-N=N-R^6$、$-SO_3X$、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

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

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよく、

－Ｒ^{3}は、－Ｈであるか、或いは、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

－Ｒ^{4}は、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～６員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環であり、

－Ｒ^{5}及び－Ｒ^{6}は、それぞれ独立に、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｃ$_{2-6}$アルケニル、－Ｃ$_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-6}$アルキル、－Ｏ－ＣＨ$_3$、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_3$Ｘ、－ＣＯＯＸ、Ｙ、Ｚからなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５～６員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環、或いは前記芳香族の５～８員単環の炭素環若しくは複素環を含む９～１０員の縮合環で

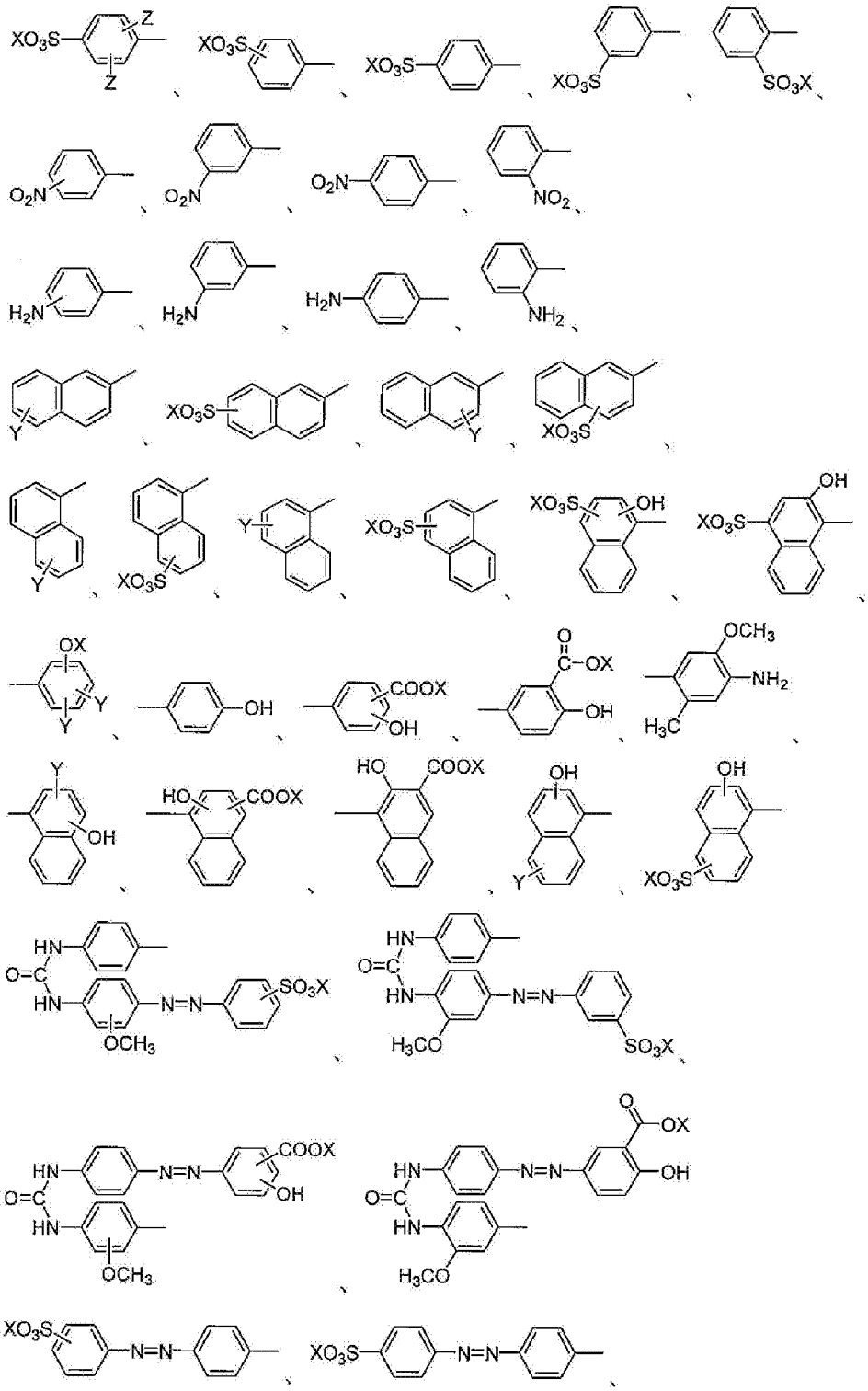
あり、

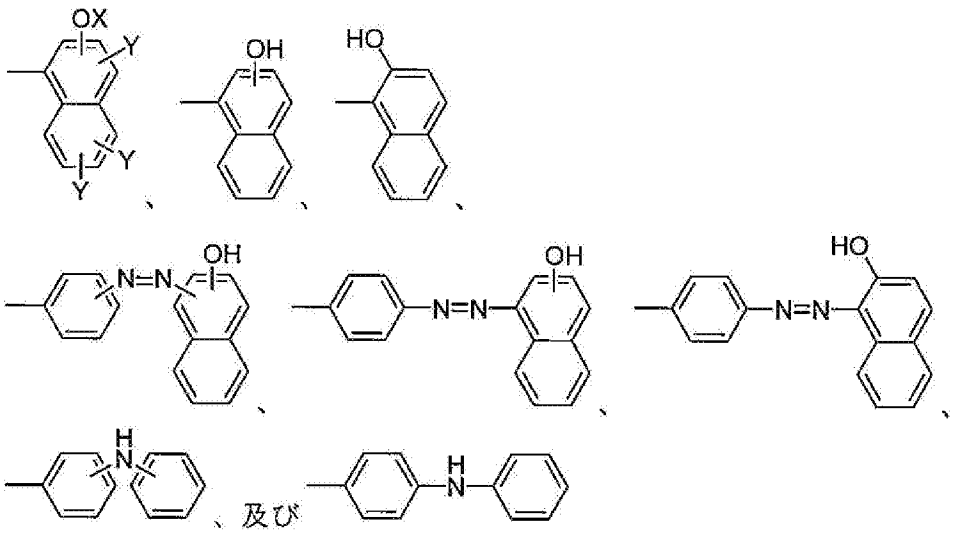
ただし、R^1又はR^2が、芳香族の５員単環の、炭素環又は少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である場合には、該複素環は－ＣＯＯＸにより置換されたものではない]。

[請求項14] 式（I）により表される反応促進剤において、R^1及びR^2が、それぞれ独立に、場合により置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記芳香族の６員単環の炭素環を含む１０員の縮合環である、請求項１３に記載の反応促進剤。

[請求項15] 式（I）により表される化合物において、R^1及びR^2が、それぞれ独立に、

[化21]



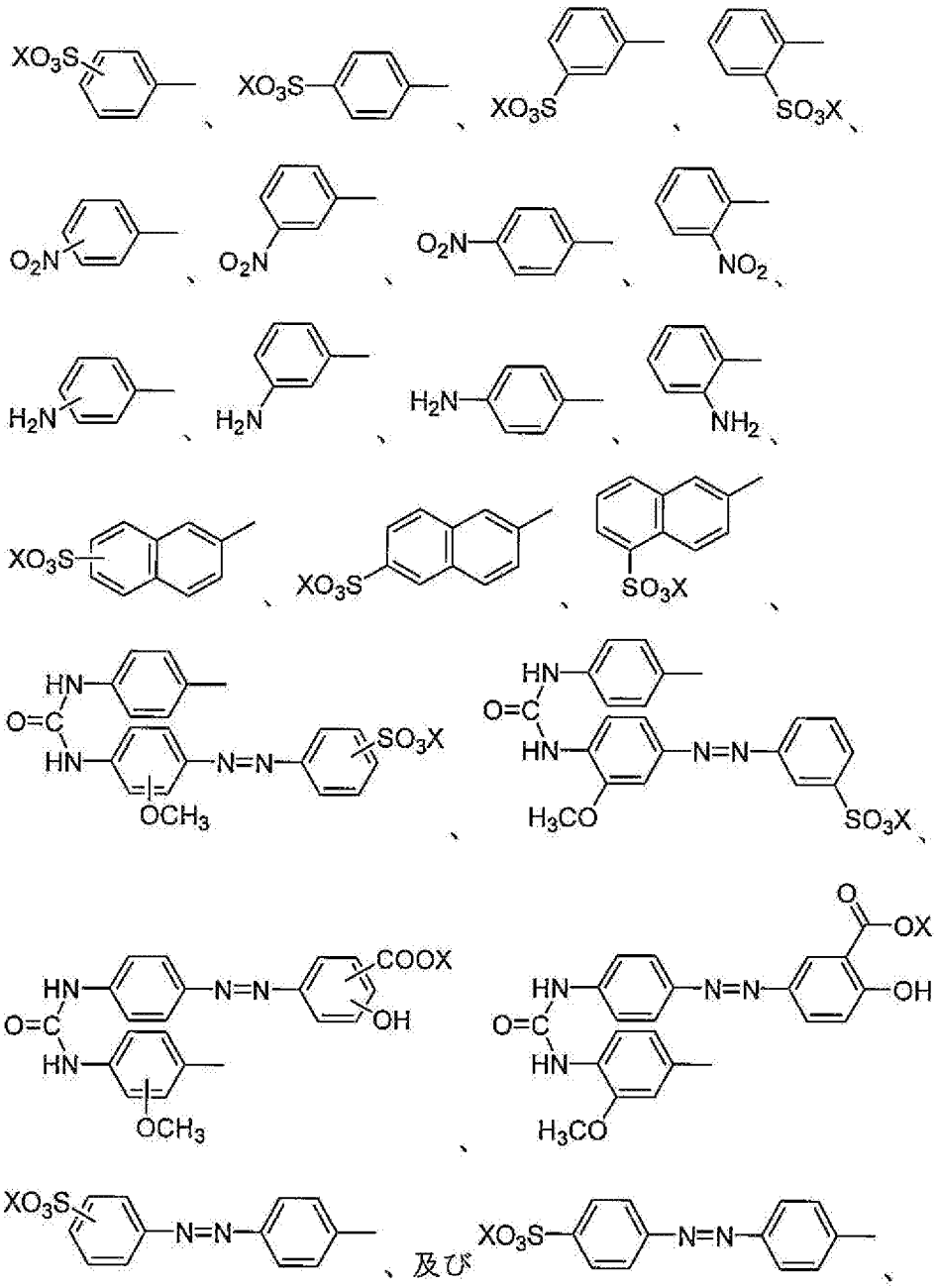


、及び

からなる群より選択され、式中、Ｘ、Ｙ、Ｚは請求項１２に定義したとおりである、請求項１３又は１４に記載の反応促進剤。

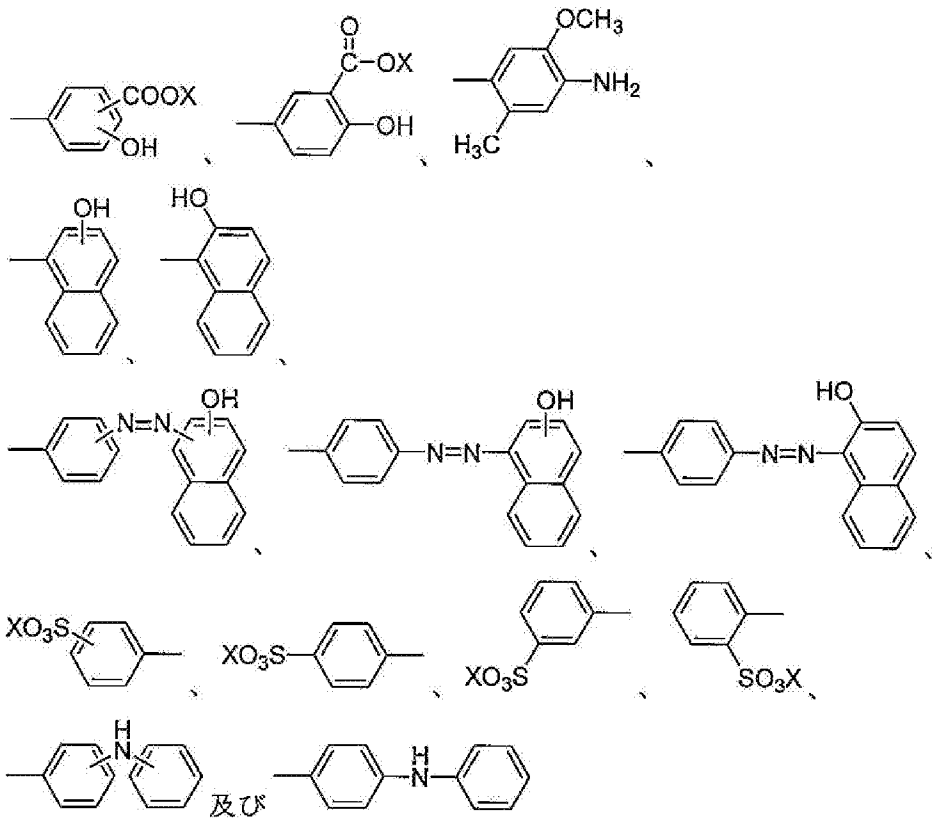
[請求項16] 式（Ｉ）により表される反応促進剤において、Ｒ[1]が、

[化22]



からなる群より選択され、R^2が、

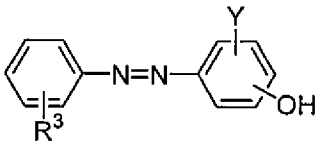
[化23]



からなる群より選択され、式中、Ｘは請求項１２に定義したとおりである、請求項１３～１５のいずれか１項に記載の反応促進剤。

[請求項17] 式（I)により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の反応促進剤、

[化24]



(II)

［式中、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－SO_3X、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙは、同一でも異なっていてもよく、

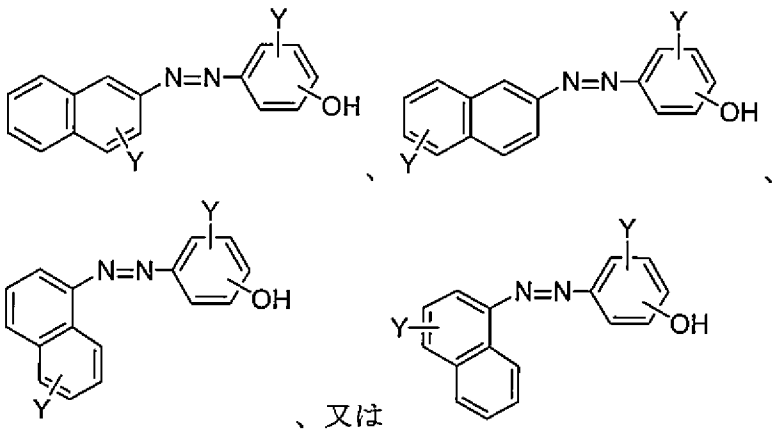
－R^3は、－Ｈ又は－ＮＨＣＯ－ＮＨ－R^5－Ｎ＝Ｎ－R^6であるか、

或いは、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－$Ｃ_{1-6}$アルキル、－$Ｃ_{2-6}$アルケニル、－$Ｃ_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－$Ｃ_{1-6}$アルキル、－ＣＯ$ＮＨ_2$、－$ＮＯ_2$、－$ＮＨ_2$、－$ＳＯ_3$Ｘ、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む１０員の縮合環であり、

－$Ｒ^5$及び－$Ｒ^6$は、それぞれ独立に、場合により－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒ、－Ｉ、－Ａｔ、－$Ｃ_{1-6}$アルキル、－$Ｃ_{2-6}$アルケニル、－$Ｃ_{2-6}$アルキニル、＝Ｏ、－ＯＨ、－Ｏ－$Ｃ_{1-6}$アルキル、－Ｏ－$ＣＨ_3$、－ＣＯ$ＮＨ_2$、－$ＮＯ_2$、－$ＮＨ_2$、－$ＳＯ_3$Ｘ、からなる群より選択される１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環、或いは前記炭素環を含む１０員の縮合環である］。

［請求項18］ 式（Ｉ）により表される反応促進剤が、下記のいずれかの式で表される反応促進剤である、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の反応促進剤、

［化25］



［式中、

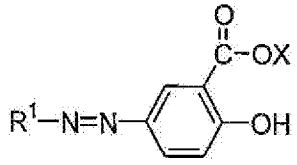
Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、

Ｙは、－Ｈ、－$ＳＯ_3$Ｘ、－ＣＯＯＸからなる群より選択され、

各Ｘ、Ｙ、Ｚは、同一でも異なっていてもよい]。

[請求項19] 式（I)により表される反応促進剤が、下記の式で表される反応促進剤である、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の反応促進剤、

[化26]



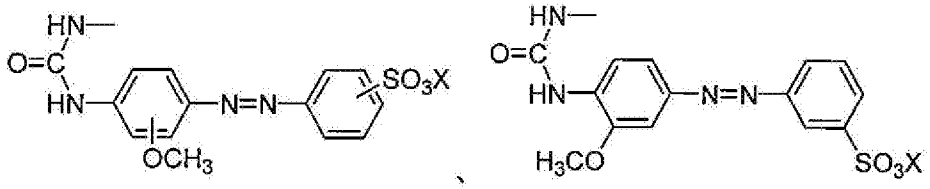
(III)

[式中、

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

前記の置換基は、－NO_2、－SO_3X、及び

[化27]



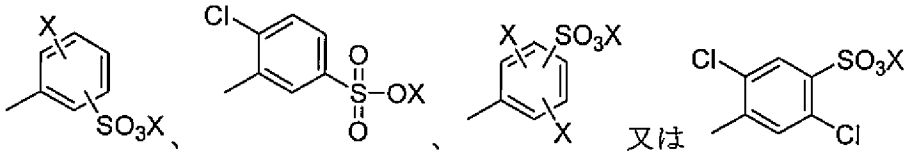
からなる群より選択され、

Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]。

[請求項20] 式（I)により表される反応促進剤において、R^1が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の６員単環の炭素環であり、R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、少なくとも１つの窒素原子、硫黄原子若しくは酸素原子を含む複素環である、請求項１３に記載の反応促進剤。

[請求項21] R^2が、場合により１又は複数の置換基により置換されていてもよい、芳香族の５員単環の、２つの窒素原子を含む複素環であり、該複素環が

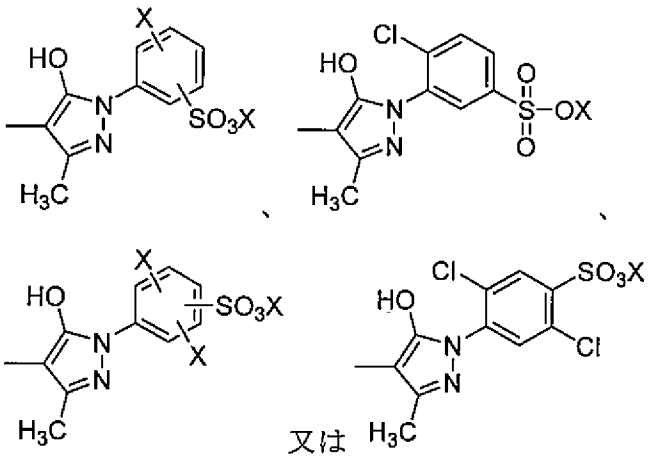
[化28]



により置換されており、式中、Ｘは請求項１２に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、請求項１３又は２０に記載の反応促進剤。

[請求項22] Ｒ[2]が、

[化29]

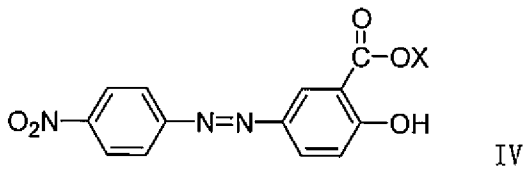


であり、式中、Ｘは請求項１２に定義したとおりであり、各Ｘは同一でも異なっていてもよい、請求項１３、２０又は２１に記載の反応促進剤。

[請求項23] 式（I)により表される化合物が、

以下の式により表される化合物、

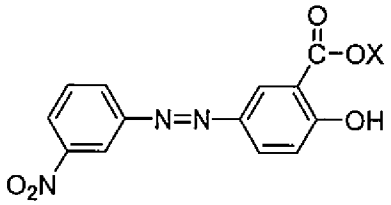
[化30]



IV

以下の式により表される化合物、

[化31]

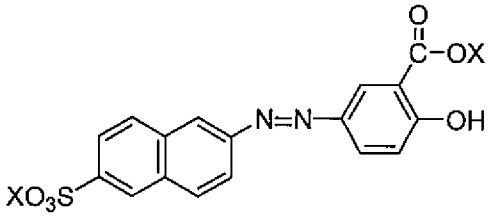


V

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される]、

以下の式により表される化合物、

[化32]

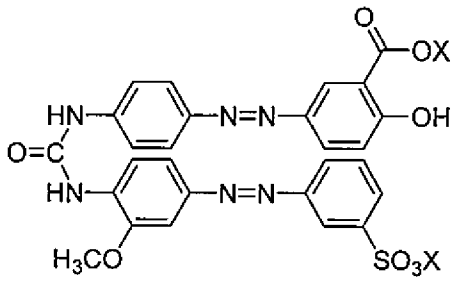


VI

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化33]

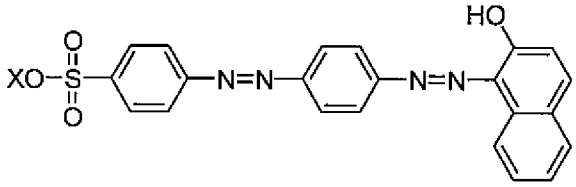


VII

[式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい]、

以下の式により表される化合物、

[化34]

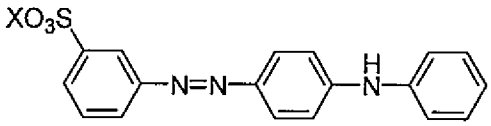


VIII

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］、

以下の式により表される化合物、

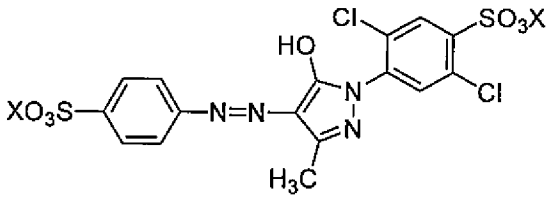
[化35]



IX

以下の式により表される化合物、

[化36]

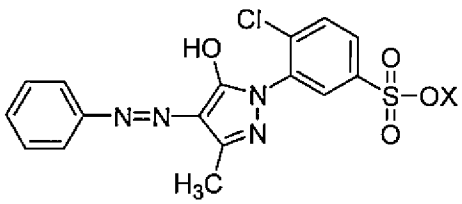


X

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択され、各Ｘは、同一でも異なっていてもよい］、

以下の式により表される化合物、

[化37]

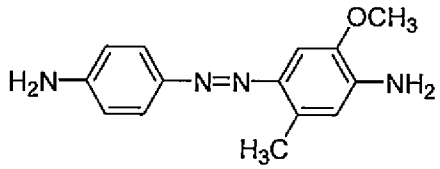


XI

［式中、Ｘは、－Ｈ、－Ｎａ、－Ｋ、－Ｌｉからなる群より選択される］

及び、以下の式により表される化合物、

[化38]



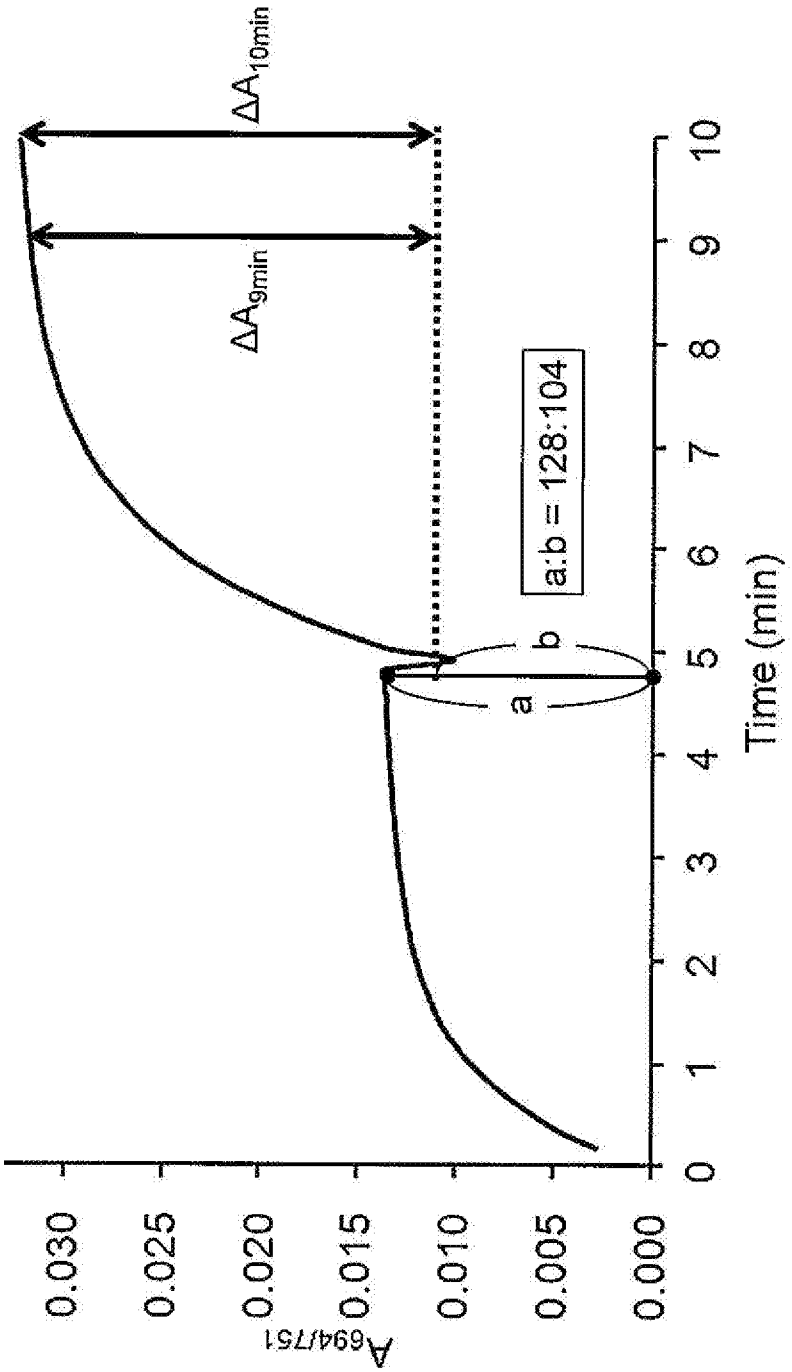
XII

からなる群より選択される、請求項１３～２２のいずれか１項に記載の反応促進剤。

[請求項24] 請求項１３～２３のいずれか１項に記載の反応促進剤及びオキシダーゼを含む、組成物。

[請求項25] オキシダーゼが、アマドリアーゼ、サルコシンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼからなる群より選択されるオキシダーゼである、請求項２４に記載の組成物。

[図1]


ΔA10min
ΔA9min
a:b = 128:104
a
b
A694/751
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Time (min)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/025622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/26(2006.01)i, *C12N9/02*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/26, C12N9/02, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-503277 A (The Procter & Gamble Co.), 06 April 1995 (06.04.1995), page 9 & WO 1993/015175 A1 page 17 & EP 553607 A1 & AU 4862793 A & TR 26494 A & CA 2127097 A & MX 9300491 A & MA 22780 A & CN 1075503 A	1-4,11,24
X	WO 2003/023134 A1 (HERCULES INC.), 20 March 2003 (20.03.2003), page 2, line 20 to page 3, line 3; page 8, line 24 to page 9 & US 2003/0089472 A1 & AU 2002307553 A	1-4,11, 13-16,23-24

☒ 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	Date of mailing of the international search report
22 August 2017 (22.08.17)	29 August 2017 (29.08.17)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/025622

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-201968 A (Asahi Kasei Pharma Corp.), 04 September 2008 (04.09.2008), examples 12 to 13 & US 2008/0295259 A1 examples 12 to 13	1-2,12,24-25
X	JP 60-36961 A (Boehringer Mannheim GmbH), 26 February 1985 (26.02.1985), page 3; examples 3, 8 & US 5055195 A columns 2 to 3; examples 3, 8 & EP 133895 A1 & DE 3323973 A & DE 3483383 C & DE 3483383 D & DE 3323973 A1 & AT 57437 E & AT 57437 T	1-12,24-25
X	WO 2008/093722 A1 (Arkray, Inc.), 07 August 2008 (07.08.2008), paragraphs [0002] to [0023], [0059], [0080]; examples 2 to 5 & US 2010/0112622 A1 paragraphs [0002] to [0029], [0035] to [0046], [0096], [0117]; examples 2 to 5 & EP 2108952 A1 & EP 3001190 A1 & CN 101595386 A	1-3,12,24-25
A	RUBENS, A. et al., Enzymatic activity of cholesterol oxidase immobilized onto polymer nanoparticles mediated by Congo red, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, Vol. 110, pp.347-355	1-25

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０２５６２２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/26(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/26, C12N9/02, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 7-503277 A (ザ、プロクター、エンド、ギャンブル、カンパニー) 1995.04.06, 第９頁 & WO 1993/015175 A1, pp.17 & EP 553607 A1 & AU 4862793 A & TR 26494 A & CA 2127097 A & MX 9300491 A & MA 22780 A & CN 1075503 A	1-4,11,24

☑　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	国際調査報告の発送日
２２．０８．２０１７	２９．０８．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　４１５３
高山　敏充
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
X	WO 2003/023134 A1 (HERCULES INCORPORATED) 2003.03.20, 第２頁第20行-第３頁第３行、第８頁第24行-9頁 & US 2003/0089472 A1,& AU 2002307553 A	1-4,11, 13-16,23-24
X	JP 2008-201968 A (旭化成ファーマ株式会社) 2008.09.04, 実施例１２－１３ & US 2008/0295259 A1, Example 12-13	1-2,12,24-25
X	JP 60-36961 A (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシヤフト・ミツト・ベシユレンクテル・ハフツング) 1985.02.26, 第３頁、例３、例８ & US 5055195 A, col. 2-3, EXAMPLE 3,8 & EP 133895 A1 & DE 3323973 A & DE 3483383 C & DE 3483383 D & DE 3323973 A1 & AT 57437 E & AT 57437 T	1-12,24-25
X	WO 2008/093722 A1 (アークレイ株式会社) 2008.08.07, [0002]－[0023]、[0059]、[0080]、実施例２－５ & US 2010/0112622 A1, [0002]－[0029]、[0035]－[0046]、[0096]、[0117], EXAMPLE 2-5 & EP 2108952 A1 & EP 3001190 A1 & CN 101595386 A	1-3,12,24-25
A	RUBENS, A. et al., Enzymatic activity of cholesterol oxidase immobilized onto polymer nanoparticles mediated by Congo red, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, Vol. 110, pp.347-355	1-25