

(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10月4日(04.10.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/181796 A1

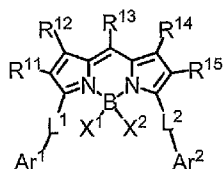
- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/543 (2006.01) C07F 5/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/013406
- (22) 国際出願日: 2018年3月29日(29.03.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2017-066921 2017年3月30日(30.03.2017) JP
- (71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 知久 浩之 (CHIKU Hiroyuki); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 渡辺 康介 (WATANABE Kousuke); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フ

イルム株式会社内 Kanagawa (JP). 金子 和平 (KANEKO Kazuhei); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). ▲浜▼田 和博 (HAMADA Kazuhiro); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 佐々木 晃逸 (SASAKI Kouitsu); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 吉岡 知昭 (YOSHIOKA Tomoaki); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 花木 直幸 (HANAKI Naoyuki); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(54) Title: KIT AND METHOD FOR MEASURING MEASUREMENT TARGET SUBSTANCE IN BIOLOGICAL SAMPLE

(54) 発明の名称: 生体試料中の測定対象物質を測定するためのキット及び方法



(1)

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a kit and method capable of accurately measuring a measurement target substance in a biological sample across a measurement range extending from low to high concentrations. The present invention provides a kit which measures a measurement target substance in a biological sample and includes marker particles which have a first binding substance which binds to the measurement target substance in the biological sample, and a substrate which has a second binding substance which binds to the first binding substance or to the measurement target substance, wherein the marker particles are light-emitting marker particles containing particles and at least one type of compound represented by formula (1). The symbols in formula (1) are as described in the description of the present application.

(57) 要約: 本発明の課題は、生体試料中の測定対象物質を、低濃度域から高濃度域までの測定範囲において高精度で測定することができる、キット及び方法を提供することである。本発明によれば、生体試料中の測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と、上記測定対象物質又は上記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板とを含む、生体試料中の測定対象物質を測定するためのキットであって、上記標識粒子は、下記式(1)で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である、上記キットが提供される。(1)中の各記号は、本明細書に記載した意味を示す。



WO 2018/181796 A1

(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 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

生体試料中の測定対象物質を測定するためのキット及び方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、生体試料中の測定対象物質を測定するためのキット、及び生体試料中の測定対象物質を測定する方法に関する。

### 背景技術

[0002] タンパク質、酵素又は無機化合物などを定量するための高感度かつ容易な測定法として蛍光検出法が広く用いられている。蛍光検出法は、特定波長の光により励起されて蛍光を発する測定対象物質を含むと考えられる試料に上記特定波長の励起光を照射した際に発する蛍光を検出することによって測定対象物質の存在を確認する方法である。測定対象物質が蛍光体でない場合には、例えば、測定対象物質と特異的に結合する物質を蛍光色素で標識した物質を、試料に接触させ、その後上記と同様にして、励起光を照射した際に発する蛍光を検出することにより、測定対象物質の存在を確認することができる。

[0003] 上記のような蛍光検出法において、微量に存在する測定対象物質を検出するための感度を向上させるため、プラズモン共鳴による電場増強の効果を利用する方法が知られている。この方法では、プラズモン共鳴を生じさせるため、透明な支持体上の所定領域に金属層を設けたセンサチップを用意し、支持体と金属膜との界面に対して支持体の金属層形成面と反対の面側から、全反射角以上の所定の角度で励起光を入射させる。かかる励起光の照射により金属層に表面プラズモンが発生するが、この表面プラズモンの発生による電場増強作用によって、蛍光を増強させることによりシグナル／ノイズ比（S／N比）が向上し高感度な測定が可能となる。表面プラズモン励起による蛍光検出法（以下、「SPF法」とする）は、落射励起による蛍光検出法（落射蛍光法とも称する）に対して、信号増強度が約10倍得られ、高感度に測定

することができる。

[0004] 特許文献1には、好ましい励起ピークを有する初期供与体染料と、好ましい発光ピークを有する最終受容体染料とをポリマー微小粒子中に配合させることにより製造される蛍光微小粒子が記載されている。特許文献1では、上記染料としてポリアザインダセン染料を使用することが記載されている。

[0005] 非特許文献1には、新規なジスチリルBODIPY<sup>R</sup>（登録商標、boron-dipyrrometheneの略称である）染料を設計及び合成したことが記載され、合成したジスチリルBODIPY<sup>R</sup>染料について、クロロメタン溶液中での吸収及び発光スペクトルが分析されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特許第3442777号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Olivier Galangau et al., Org.Biomol.Chem., 2010, 8, 4546-4553

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 上記の通り、簡易的な測定方法で高感度に測定が可能な方法としてはSPF法が知られているが、非常に微量な測定対象物質の測定に対しては十分に満足のいくものではなかった。検出法の中で、抗体でサンドイッチできないような低分子を測定する競合法においては、検出感度を上げるためには反応系中の粒子量を減らす必要があるが、その場合、蛍光強度が不足し、高濃度域が精度よく測定できない問題があった。特許文献1に記載の蛍光微小粒子は、好ましい有効ストークスシフトを有するが、量子収率が低いという問題があった。非特許文献1では、染料溶液の吸収及び発光スペクトルが分析されているが、染料を粒子に組み込むことについては記載がない。

[0009] 本発明は、低濃度から高濃度にわたる広範囲の濃度域において生体試料中

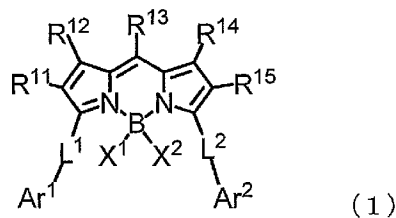
の測定対象物質の高精度の測定を実現することができるキット及び方法を提供することを解決すべき課題とした。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と、上記測定対象物質又は上記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板とを含むキットにおいて、上記標識粒子として、680nm以上という長波長領域に発光極大波長を有し、かつ高い量子収率を示す標識粒子を用いることによって、上記課題を解決できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

[0011] < 1 > 生体試料中の測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と、上記測定対象物質又は上記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板とを含む、生体試料中の測定対象物質を測定するためのキットであって、  
上記標識粒子は、下記式(1)で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である、上記キット。

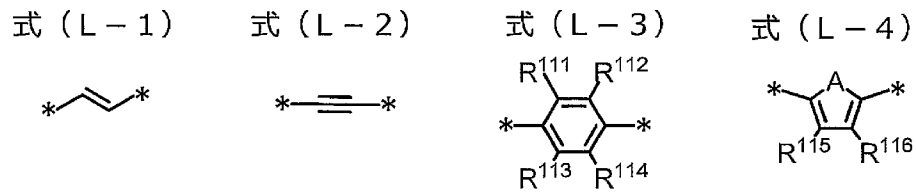
[化1]



式中、R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、R<sup>11</sup>~R<sup>15</sup>のうち少なくとも3つは水素原子以外の原子又は基を表す。X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基

、アリアルオキシ基、アルキルチオ基、アリアルチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。 $Ar^1$ 及び $Ar^2$ はそれぞれ独立に、アリアル基又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $L^1$ 及び $L^2$ はそれぞれ独立に、式(L-1)～式(L-4)の何れかを表す。

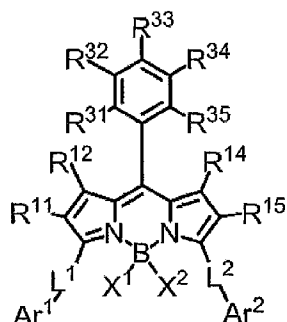
[化2]



式中、 $R^{111}$ ～ $R^{116}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリアル基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリアルオキシ基、アルキルチオ基、又はアリアルチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Aは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、又は $-NH-$ を表す。

- [0012] <2> 上記標識粒子が標識ラテックス粒子である、<1>に記載のキット。
- <3> 上記標識粒子が、カルボキシル基を有する、<1>又は<2>に記載のキット。
- <4> 上記標識粒子の平均粒子径が70～500nmである、<1>から<3>の何れか一に記載のキット。
- <5> 上記式(1)で表される化合物が、下記式(3)で表される化合物である、<1>から<4>の何れか一に記載のキット。

[化3]

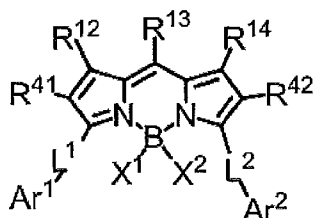


(3)

式中、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 及び $R^{15}$ の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{31} \sim R^{35}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、シアノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{34}$ 及び $R^{35}$ のいずれか一つは2原子以上からなる基である。

<6> 上記式(1)で表される化合物が、下記式(4)で表される化合物である、<1>から<4>の何れか一に記載のキット。

[化4]

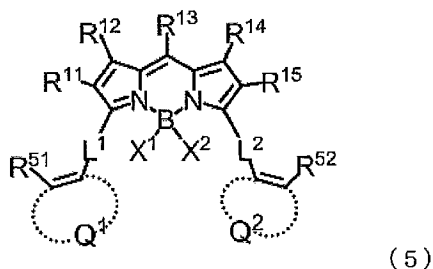


(4)

式中、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ の少なくとも1つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{41}$ 及び $R^{42}$ はそれぞれ独立に、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

[0013] <7> 上記式(1)で表される化合物が、下記式(5)で表される化合物である、<1>から<4>の何れかーに記載のキット。

[化5]



式中、 $R^{11} \sim R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義である。 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $Q^1$ 及び $Q^2$ はそれぞれ独立に、芳香族炭化水素環又は芳香族ヘテロ環を表し、これらは置換基を有していてもよい。

<8> 上記標識粒子が、少なくとも一種のエネルギードナー化合物と、少なくとも一種のエネルギーアクセプター化合物と、粒子とを含有する発光性粒子であって、上記エネルギードナー化合物及び上記エネルギーアクセプター化合物の少なくとも一種が、上記式(1)で表される化合物である、<1>から<7>の何れかーに記載のキット。

<9> 上記エネルギードナー化合物として、少なくとも一種の上記式(1)で表される化合物を含有し、上記エネルギーアクセプター化合物として、少なくとも一種の上記式(1)で表される化合物を含有する、<8>に記載のキット。

<10> エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のモル比が1:10~10:1である、<8>又は<9>に記載のキット。

<11> エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のストークスシフトが40nm以上である、<8>から<10>の何れかーに記載のキット。

< 1 2 > 上記基板が、上記第二の結合物質を有する検出領域を有する、< 1 >から< 1 1 >の何れかーに記載のキット。

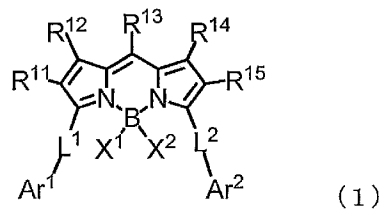
< 1 3 > 上記検出領域が金を含む金属膜である、< 1 2 >に記載のキット。

[0014] < 1 4 > 生体試料中の測定対象物質を測定する方法であって、

生体試料を、測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と反応させる反応工程と、上記測定対象物質又は上記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板に、上記反応工程で得られた反応産物を接触させて、標識粒子を基板上に捕捉させる捕捉工程と、

上記測定対象物質に関連した標識情報を取得する、標識情報取得工程と、を含み、上記標識粒子は、下記式（1）で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である、方法。

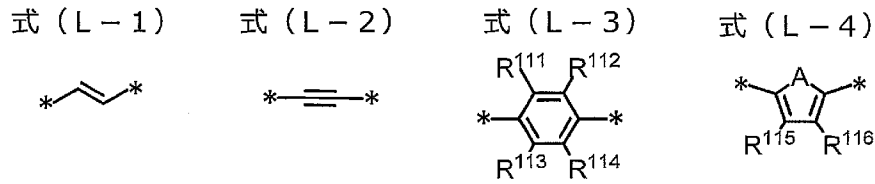
[化6]



式中、 $R^{11} \sim R^{15}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリーールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{11} \sim R^{15}$ のうち少なくとも3つは水素原子以外の原子又は基を表す。 $X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、アリーールチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。 $Ar^1$ 及び $Ar^2$ はそれぞれ独立に、アリーール基又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $L^1$ 及び $L^2$ はそ

それぞれ独立に、式(L-1)～式(L-4)の何れかを表す。

[化7]



式中、 $R^{111} \sim R^{116}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Aは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、又は $-NH-$ を表す。

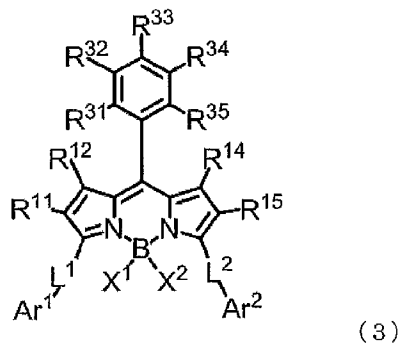
[0015] <15> 上記粒子がラテックス粒子である、<14>に記載の方法。

<16> 上記粒子が、カルボキシル基を有する、<14>又は<15>に記載の方法。

<17> 上記標識粒子の平均粒子径が70～500nmである、<14>から<16>の何れか一に記載の方法。

<18> 上記式(1)で表される化合物が、下記式(3)で表される化合物である、<14>から<17>の何れか一に記載の方法。

[化8]

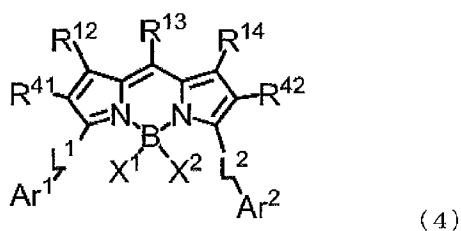


式中、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 及び $R^{15}$ の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{31} \sim R^{35}$ はそれぞれ独立に、水素原

子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、シアノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{34}$ 及び $R^{35}$ のいずれか一つは2原子以上からなる基である。

<19> 上記式(1)で表される化合物が、下記式(4)で表される化合物である、<14>から<17>の何れか一に記載の方法。

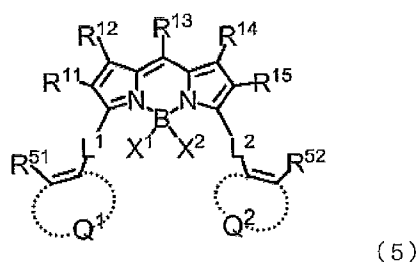
[化9]



式中、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ の少なくとも1つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{41}$ 及び $R^{42}$ はそれぞれ独立に、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

<20> 上記式(1)で表される化合物が、下記式(5)で表される化合物である、<14>から<17>の何れか一に記載の方法。

[化10]



式中、 $R^{11}$ ~ $R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義である。 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロアリー

ル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、又はアリーロチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Q<sup>1</sup>及びQ<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、芳香族炭化水素環又は芳香族ヘテロ環を表し、これらは置換基を有していてもよい。

[0016] <21> 上記標識粒子が、少なくとも一種のエネルギードナー化合物と、少なくとも一種のエネルギーアクセプター化合物と、粒子とを含有する発光性粒子であって、上記エネルギードナー化合物及び上記エネルギーアクセプター化合物の少なくとも一種が、上記式(1)で表される化合物である、<14>から<20>の何れか一に記載の方法。

<22> 上記エネルギードナー化合物として、少なくとも一種の上記式(1)で表される化合物を含有し、上記エネルギーアクセプター化合物として、少なくとも一種の上記式(1)で表される化合物を含有する、<21>に記載の方法。

<23> エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のモル比が1:10~10:1である、<21>又は<22>に記載の方法。

<24> エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のストークスシフトが40nm以上である、<21>から<23>の何れか一に記載の方法。

<25> 上記基板が、上記第二の結合物質を有する検出領域を有する、<14>から<24>の何れか一に記載の方法。

<26> 上記検出領域が金を含む金属膜である、<25>に記載の方法。

<27> 表面プラズモン励起による蛍光検出により、上記測定対象物質に関連した標識情報を取得する、<26>に記載の方法。

## 発明の効果

[0017] 本発明のキット及び方法によれば、低濃度から高濃度にわたる広範囲の濃度域において生体試料中の測定対象物質の高精度の測定を実現することができる。

## 図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、化合物(4)の400MHz  $^1\text{H}$  NMRスペクトルを示す。

[図2]図2は、化合物(7)の400MHz  $^1\text{H}$  NMRスペクトルを示す。

[図3]図3は、センサチップの概略図を示す。

[図4]図4は、センサチップの分解図を示す。

### 発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を意味する。

[0020] [生体試料中の測定対象物質を測定するためのキット]

本発明による生体試料中の測定対象物質を測定するためのキットは、生体試料中の測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と、測定対象物質又は第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板とを含むキットであって、標識粒子は、後述する式(1)で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である。

[0021] (生体試料)

生体試料としては、測定対象物質を含む可能性のある試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、生物学的試料、特に動物(例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマなど)の体液(例えば、血液、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、膿、鼻水、又は喀痰)若しくは排泄物(例えば、糞便)、臓器、組織、粘膜や皮膚などを挙げるができる。

[0022] (測定対象物質)

測定対象物質としては、特に限定されないが、例えば、サイロキシン(T4)、トリヨードサイロニン(T3)、エストラジオール(E2)、アルドステロン、対称性ジメチルアルギニン(SDMA)、胆汁酸、コルチゾール、コレステロール、コルチコステロン、プロゲステロン、テストステロン、エストロゲン、ビタミン類、クレアチニン、アミノ酸、 $\beta$ カロチン、クレアチニン、ジゴキシン、テオフィリン、葉酸、炎症マーカーや敗血症マーカー

などのタンパク質などが挙げられる。

[0023] プロゲステロンは、卵巢と胎盤から分泌され、黄体機能や妊娠に関する性ホルモンである。月経の周期異常、不妊症の診断に利用される。また、犬の交配時期、猫の卵巢遺残確認にも使用される。

[0024] (第一の結合物質)

本発明で用いる第一の結合物質は、測定対象物質と結合性を有する物質である。第一の結合物質としては、抗原、抗体、又はこれらの複合体を使用できるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、第一の結合物質は抗体である。第一の結合物質が抗体である場合は、測定対象物質と結合性を有する抗体として、例えば、その測定対象物質によって免疫された動物の血清から調製する抗血清や、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、その測定対象物質によって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片 [例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、又は $F v$ ] などを用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清又は培養上清から公知の方法により調製した抗体でも使用可能である。

[0025] 例えば、測定対象物質がプロゲステロンである場合、第一の結合物質としては、プロゲステロンに結合性を有する（好ましくは、プロゲステロンを特異的に認識する）抗プロゲステロン抗体を使用する。

[0026] 抗プロゲステロン抗体の作製方法の一つを例に挙げて以下に説明する。

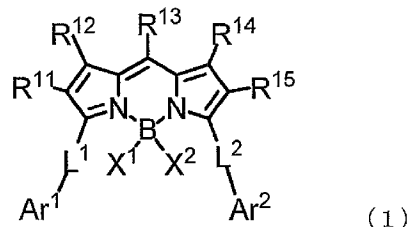
プロゲステロンと、牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin、以下BSAと略す) と、縮合剤を混合してプロゲステロン-BSA結合体を作製することができる。結合体をマウス免疫感作抗原として用いて、数回、マウス背部皮下に免疫する。この場合、完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant: CFA)、及び/又は不完全アジュバント (Incomplete Freund's Adj

u v a n t : I F A) を適宜選択して免疫感作抗原と混合して使用することができる。完全アジュバントとは、免疫を刺激する物質であって、パラフィンとアラセルの混合物である。不完全アジュバントとは、完全アジュバントに死滅したミコバクテリア又は結核菌の死菌を加え、抗原性をさらに増強させたものである。数週間で数回、適宜免疫感作を行った後にマウスから採血し抗体価の測定を実施する。抗体価の十分な上昇が認められた場合に腹腔内に抗原を投与し、数日後に脾臓を摘出する。こうして免疫マウスより摘出した脾臓細胞を、変異株骨髓腫細胞（ミエローマ）と融合させることで、抗体産生能力を備えた融合細胞を作製することができる。この融合細胞の中から目的とする抗原に対する抗体産生細胞のみを選択し、さらにその細胞株だけを増殖するために限界希釈を行う。希釈後の細胞の培養（クローニング）を行うことができる。このようにして得られる融合細胞株を、マウスの腹腔内に注射して、腹水型の抗体産生細胞を増殖させることによってモノクローナル抗体を腹水中に産生することが可能となり、これらの抗体を回収することで、目的の抗体を入手することができる。

[0027] (標識粒子)

本発明で使用される標識粒子は、下記式(1)で表される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子であり、蛍光標識粒子とも言う。

[化11]



式(1)中の各記号の意味は、本明細書中に定義した通りである。

[0028] 通常の色素化合物は、粒子への取り込み量を増やすと会合の影響を受け、量子収率が低下していくことが知られている（これを濃度消光とも言う）。

特に、吸収波長が650nm以上の長波長である蛍光色素化合物は粒子に取り込まれると濃度消光しやすく、量子収率を維持することは困難である。

[0029] 本発明で使用する式(1)で表される化合物は、共役系置換基を有することで長波長発光を可能としており、かつ、ジピロメテン骨格に複数の置換基を持たせることによりポリマー粒子中での量子収率の低下を抑制することができる。量子収率低下抑制の要因としては、ジピロメテン骨格に対して垂直方向に張り出す複数の置換基による分子間の相互作用(例えば $\pi-\pi$ 相互作用)の抑制が考えられる。式(1)で表される化合物によれば、特に長波長領域において輝度の高い発光性の標識粒子(好ましくは蛍光粒子、より好ましくは蛍光ナノ粒子)を製造することができる。なお、標識粒子が蛍光粒子である場合、輝度とは、蛍光強度のことである。本発明によれば、生体の窓の領域(生体を透過しやすい近赤外波長域である650~900nm付近)で発光量子収率が高いことから、発光を用いたセンシングの感度向上が可能である。

[0030] 本明細書において、アルキル基とは、直鎖、分岐鎖、環状又はこれらの組み合わせの何れでもよく、直鎖又は分岐鎖アルキル基の炭素数は好ましくは1~36であり、より好ましくは1~18であり、さらに好ましくは1~12であり、特に好ましくは1~6である。環状のアルキル基としては、例えば炭素数3~8のシクロアルキルなどが挙げられる。アルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*i*so-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基、*n*-ノニル基、*n*-デシル基、*n*-ウンデシル基、*n*-ドデシル基、*n*-トリデシル基、*n*-テトラデシル基、*n*-ペンタデシル基、*n*-ヘキサデシル基、*n*-ヘプタデシル基、*n*-オクタデシル基、及びシクロヘキシル基などが挙げられる。

[0031] 本明細書において、アリール基とは、炭素数が6~48のアリール基が好ましく、炭素数が6~24のアリール基がより好ましく、炭素数が6~14のアリール基がさらに好ましく、例えば、フェニル基、ナフチル基、アント

リル基、プレニル基、フェナントレニル基、ビフェニル基、フルオレニル基などが挙げられる。

[0032] 本明細書において、ヘテロ環基としては、好ましくは5～7員の置換もしくは無置換、飽和もしくは不飽和、芳香族もしくは非芳香族、単環もしくは縮環のヘテロ環基の何れでもよい。ヘテロ環基は、好ましくは、環構成原子が炭素原子、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選択され、かつ窒素原子、酸素原子及び硫黄原子の何れかのヘテロ原子を少なくとも一個有するヘテロ環基であり、さらに好ましくは、炭素数3～30の5もしくは6員の芳香族のヘテロ環基である。ヘテロ環基としては、例えば、フリル基、ベンゾフリル基、ジベンゾフリル基、チエニル基、ベンゾチエニル基、ジベンゾチエニル基、ピリジル基、ピリミジニル基、キノリル基、イソキノリル基、アクリジニル基、フェナントリジニル基、プテリジニル基、ピラジニル基、キノキサリニル基、ピリミジニル基、キナゾリル基、ピリダジニル基、シンノリニル基、フタラジニル基、トリアジニル基、オキサゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、チアゾリル基、ベンゾチアゾリル基、イミダゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、ピラゾリル基、インダゾリル基、イソオキサゾリル基、ベンゾイソオキサゾリル基、イソチアゾリル基、ベンゾイソチアゾリル基、オキサジアゾリル基、チアジアゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、フリル基、チエニル基、ピロリル基、インドリル基、イミダゾピリジニル基、カルバゾリル基等が挙げられる。

[0033] 本明細書において、アシル基としては、好ましくは炭素数2～15の直鎖、又は分岐アルカノイル基であり、例えば、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基、ヘプタノイル基、ベンゾイル基などが挙げられる。

[0034] 本明細書において、アルコキシ基としては、好ましくは、炭素数1～20のアルコキシ基であり、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、ペンチルオキシ基、ヘキシルオキシ基、ヘプチルオキシ基などが挙げられる。

本明細書において、アリアルオキシ基としては、好ましくは炭素数6～14のアリアルオキシ基であり、例えば、フェノキシ基、ナフトキシ基、アントリルオキシ基などが挙げられる。

[0035] アルキルチオ基としては、好ましくは、炭素数1から30のアルキルチオ基であり、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、*n*-ヘキサデシルチオ基等が挙げられる。

アリアルチオ基としては、好ましくは、炭素数6から30のアリアルチオ基であり、例えば、フェニルチオ基、*p*-クロロフェニルチオ基、*m*-メトキシフェニルチオ基等が挙げられる。

[0036] 本明細書において、ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子及びヨウ素原子が挙げられる。

[0037] 本明細書において、芳香環とは、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環、フェナンスレン環、ピレン環、ペリレン環及びテリレン環等の芳香族炭化水素環；インデン環、アズレン環、ピリジン環、ピラジン環、ピリミジン環、ピラゾール環、ピラゾリジン環、チアゾリジン環、オキサゾリジン環、ピラン環、クロメン環、ピロール環、ピロリジン環、ベンゾイミダゾール環、イミダゾリン環、イミダゾリジン環、イミダゾール環、ピラゾール環、トリアゾール環、トリアジン環、ジアゾール環、インドリン環、チオフェン環、チエノチオフェン環、フラン環、オキサゾール環、オキサジアゾール環、チアジン環、チアゾール環、インドール環、ベンゾチアゾール環、ベンゾチアジアゾール環、ナフトチアゾール環、ベンゾオキサゾール環、ナフトオキサゾール環、インドレニン環、ベンゾインドレニン環、ピラジン環、キノリン環及びキナゾリン環等の芳香族ヘテロ環；並びにフルオレン環及びカルバゾール環等の縮合型芳香環等が挙げられ、炭素数5～16の芳香環（芳香環及び芳香環を含む縮合環）が好ましい。

なお、芳香環は置換基を有していてもよく、「芳香環」との用語は、置換基を有する芳香環、及び置換基を有さない芳香環の両方を意味する。芳香環が有する置換基としては、後記する置換基群Aに記載の置換基が挙げられる

。

[0038] 本明細書において、アミノ基としては、アミノ基；モノ又はジメチルアミノ基、モノ又はジエチルアミノ基並びにモノ又はジ（ $n$ -プロピル）アミノ基等のアルキル置換アミノ基；モノ又はジフェニルアミノ基並びにモノ又はジナフチルアミノ基等の芳香族残基で置換されたアミノ基；モノアルキルモノフェニルアミノ基等のアルキル基と芳香族残基が一つずつ置換したアミノ基；ベンジルアミノ基、アセチルアミノ基、フェニルアセチルアミノ基等が挙げられる。ここで芳香族残基とは、芳香環から水素原子1個を除いた基を意味し、芳香環は本明細書中上記した通りである。

[0039]  $R^{11}$ ～ $R^{15}$ が表すアルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基は、置換基を有していてもよく、上記置換基としては、下記の置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

[0040] 置換基群A：

スルファモイル基、シアノ基、イソシアノ基、チオシアナト基、イソチオシアナト基、ニトロ基、ニトロシル基、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、アミノ基、メルカプト基、アミド基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、カルバモイル基、アシル基、アルデヒド基、カルボニル基、アリール基、アルキル基、ハロゲン原子で置換されたアルキル基、エテニル基、エチニル基、シリル基、及びトリアルキルシリル基（トリメチルシリル基等）。

[0041]  $X^1$ 及び $X^2$ が表すアルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、エテニル基、又はエチニル基は、置換基を有していてもよく、上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

[0042]  $A_{r^1}$ 及び $A_{r^2}$ が表すアリール基又はヘテロ環基は、置換基を有していてもよく、上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

$R^{111}$ ～ $R^{116}$ が表すアルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチ

ニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、又はアリーロチオ基は、置換基を有していてもよく、上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

[0043] <式(1)で表される化合物>

式(1)中、 $R^{11} \sim R^{15}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、又はアリーロチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $R^{11} \sim R^{15}$ のうち少なくとも3つは水素原子以外の原子又は基を表し、好ましくは $R^{11} \sim R^{15}$ のうち少なくとも4つは水素原子以外の原子又は基を表し、より好ましくは $R^{11} \sim R^{15}$ の全てが水素原子以外の原子又は基を表す。

[0044]  $R^{11}$ 及び $R^{15}$ は、同一の又は異なる原子又は基でもよいが、好ましくは同一の原子又は基である。 $R^{12}$ 及び $R^{14}$ は、同一の又は異なる原子又は基でもよいが、好ましくは同一の原子又は基である。

$R^{11}$ 及び $R^{15}$ は、好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

$R^{12}$ 及び $R^{14}$ は、好ましくは、アルキル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

$R^{13}$ は、好ましくは、アリール基を表し、これは置換基を有していてもよい。

[0045] 式(1)中、 $X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、アリーロチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。

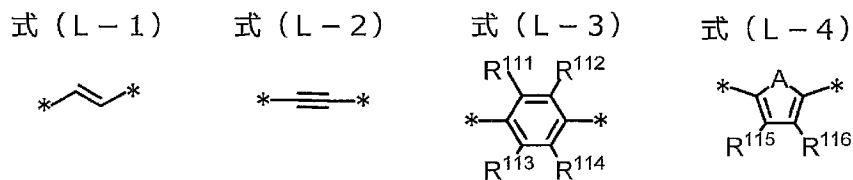
$X^1$ 及び $X^2$ は、好ましくは、ハロゲン原子、又はアルコキシ基を表す。 $X^1$ 及び $X^2$ は、フッ素原子、メトキシ基、エトキシ基、イソプロピルオキシ基、 $t$

ーブチルオキシ基であることがより好ましく、これらはフッ素原子、アルコキシ基によって置換されていることも好ましい。

[0046] 式(1)中、Ar<sup>1</sup>及びAr<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、アリール基又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

[0047] 式(1)中、L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、式(L-1)～式(L-4)の何れかを表す。

[化12]



式中、R<sup>111</sup>～R<sup>116</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Aは、-O-、-S-、又は-NH-を表す。

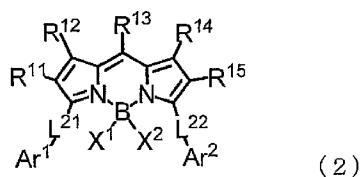
L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>は、好ましくは、式(L-1)又は式(L-2)の何れかを表す。

R<sup>111</sup>～R<sup>116</sup>は、好ましくは水素原子である。

[0048] <式(2)で表される化合物について>

式(1)で表される化合物の好ましい例としては、下記式(2)で表される化合物が挙げられる。

[化13]



式中、R<sup>11</sup>～R<sup>15</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、Ar<sup>1</sup>及びAr<sup>2</sup>は式(1)における定義と同義で

あり、好ましい範囲も、式(1)における好ましい範囲と同じである。L<sup>21</sup>及びL<sup>22</sup>はそれぞれ独立に、式(L-1)又は式(L-2)で表される基を表わす。

[化14]

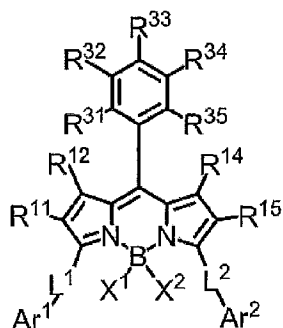
式(L-1)      式(L-2)



[0049] <式(3)で表される化合物について>

式(1)で表される化合物の好ましい例としては、下記式(3)で表される化合物が挙げられる。

[化15]



(3)

[0050] 式(3)中、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>15</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、Ar<sup>1</sup>、Ar<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>は、式(1)における定義と同義であり、好ましい範囲も、式(1)における好ましい範囲と同じである。但し、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基であり、好ましくは、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>の少なくとも3つは水素原子以外の原子又は基であり、より好ましくは、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>は、水素原子以外の原子又は基である。

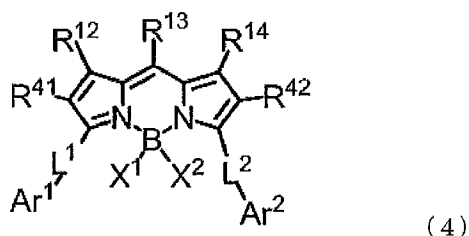
[0051] 式(3)中、R<sup>31</sup>～R<sup>35</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、シアノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基(上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる)を有していてもよく、R<sup>31</sup>、R<sup>32</sup>、R<sup>34</sup>及びR

<sup>35</sup>のいずれか一つは2原子以上からなる基である。2原子以上からなる基としては、アルキル基、アリール基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、シアノ基、アルコキシ基が好ましく、アルキル基がより好ましい。アルキル基の中でも、炭素原子と水素原子のみで構成されるアルキル基、ハロゲン原子で置換されたアルキル基が好ましく、炭素数1～6の炭素原子と水素原子のみで構成されるアルキル基、フッ素原子で置換されたアルキル基がより好ましく、メチル基、イソプロピル基、*t*-ブチル基、トリフルオロメチル基がさらに好ましく、メチル基が特に好ましい。

[0052] <式(4)で表される化合物について>

式(1)で表される化合物の好ましい例としては、下記式(4)で表される化合物が挙げられる。

[化16]



式(4)中、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、好ましい範囲も、式(1)における好ましい範囲と同じである。但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ の少なくとも1つは水素原子以外の原子又は基であり、好ましくは、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基であり、より好ましくは、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ は水素原子以外の原子又は基である。

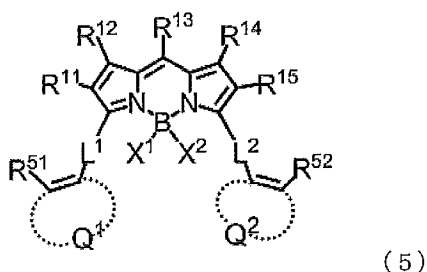
式(4)中、 $R^{41}$ 及び $R^{42}$ はそれぞれ独立に、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。 $R^{41}$ 及び $R^{42}$ はそれぞれ独立に、アリール基、エテニル基、又はエチニル基であることが好ましく、量子収率向上の観点からは、アリール基が好ましく、長波長化の観

点からは、エテニル基、エチニル基であることが好ましい。アリール基である場合、アリール基のオルト位またはメタ位に少なくとも一つ置換基を有していることが好ましく、オルト位に少なくとも一つ置換基を有していることがより好ましい。アリール基に置換する置換基の数は、1～3つが好ましく、2つまたは3つがより好ましい。アリール基に置換する置換基としては、アルキル基であることが好ましく、メチル基、イソプロピル基、*t*-ブチル基であることがより好ましく、メチル基であることがさらに好ましい。

[0053] <式(5)で表される化合物について>

式(1)で表される化合物の好ましい例としては、下記式(5)で表される化合物が挙げられる。

[化17]



[0054] 式(5)中、 $R^{11} \sim R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、好ましい範囲も、式(1)における好ましい範囲と同じである。

[0055] 式(5)中、 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有しているもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アルコキシ基であることが好ましく、量子収率向上の観点では、アルキル基であることがより好ましく、メチル基、エチル基、イソプロピル基、*t*-ブチル基であることがさらに好ましく、メチル基であることが特に好ましい。長波長化の観点では、アルコキシ基であることがより好ましく、メトキシ基、エトキシ基、イソプロピルオキシ

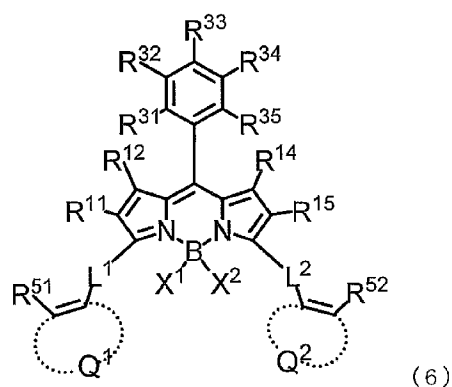
基、*t*-ブチルオキシ基であることがさらに好ましく、メトキシ基であることが特に好ましい。

[0056] Q<sup>1</sup>及びQ<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、芳香族炭化水素環又は芳香族ヘテロ環を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。Q<sup>1</sup>及びQ<sup>2</sup>は、芳香族炭化水素環であることが好ましく、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環、フェナンスレン環、ピレン環であることがより好ましく、ベンゼン環、ナフタレン環であることがさらに好ましく、ベンゼン環であることが特に好ましい。R<sup>51</sup>を含みQ<sup>1</sup>を形成する基、および、R<sup>52</sup>を含みQ<sup>2</sup>を形成する基としては、トリル基、キシリル基、メシチル基が好ましく、キシリル基、メシチル基であることがより好ましく、L<sup>1</sup>あるいはL<sup>2</sup>との結合位置に対してオルト位の両方にメチル基を有するキシリル基、L<sup>1</sup>あるいはL<sup>2</sup>との結合位置に対してオルト位の両方およびパラ位にメチル基を有するメシチル基であることがさらに好ましく、L<sup>1</sup>あるいはL<sup>2</sup>との結合位置に対してオルト位の両方およびパラ位にメチル基を有するメシチル基であることが特に好ましい。

[0057] <式(6)で表される化合物について>

式(5)で表わされる化合物は、下記式(6)で表わされる化合物であることがより好ましい。

[化18]



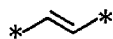
式中、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基

、アシル基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリーールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 及び $R^{15}$ の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基である。 $X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、アリーールチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。 $R^{31} \sim R^{35}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、シアノ基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリーールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{31} \sim R^{35}$ のいずれか一つは水素原子である。 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリーール基、ヘテロアリーール基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリーールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $Q^1$ 及び $Q^2$ はそれぞれ独立に、芳香族炭化水素環又は芳香族ヘテロ環を表し、これらは置換基を有していてもよい。

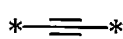
$L^1$ 及び $L^2$ はそれぞれ独立に、式(L-1)～式(L-4)の何れかを表す。

[化19]

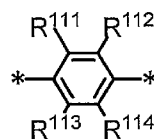
式(L-1)



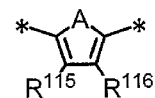
式(L-2)



式(L-3)



式(L-4)



式中、 $R^{111} \sim R^{116}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリーールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $A$ は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、又は $-NH-$ を表す。

[0058]  $R^{11}$ 及び $R^{15}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、エ

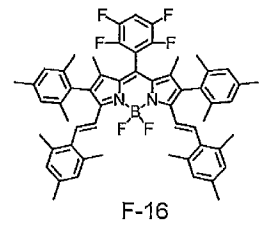
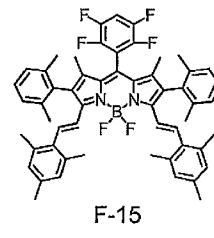
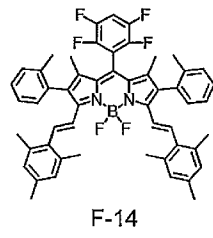
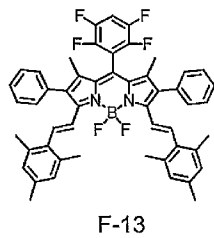
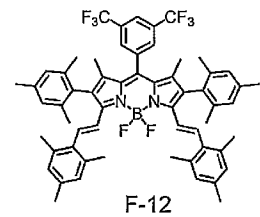
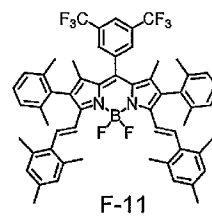
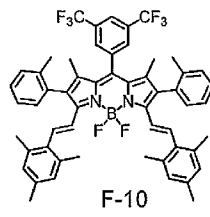
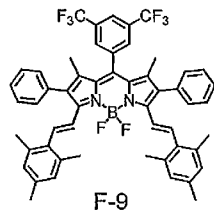
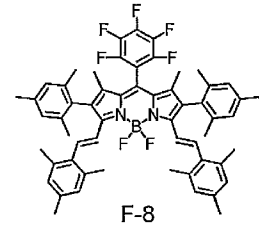
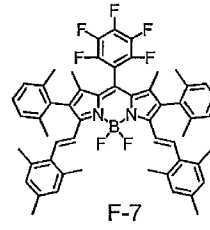
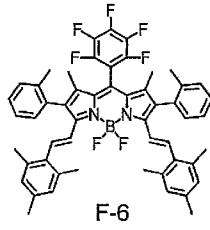
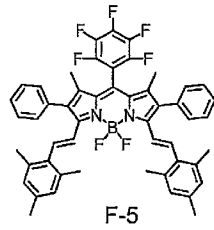
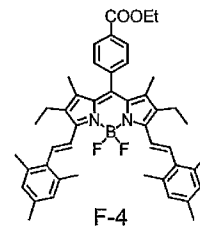
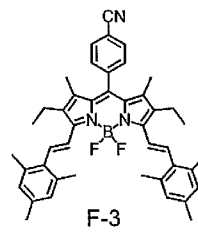
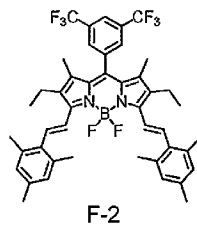
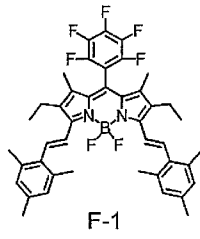
テニル基、エチニル基、アミノ基であることが好ましく、上記R<sup>41</sup>及びR<sup>42</sup>と同義であること、すなわち、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、又はエチニル基であることがより好ましく、アリール基、エテニル基、エチニル基であることがさらに好ましい。量子収率向上の観点からは、アリール基がより好ましく、長波長化の観点からは、エテニル基、エチニル基であることがより好ましい。アリール基である場合、アリール基のオルト位またはメタ位に少なくとも一つ置換基を有していることが好ましく、オルト位に少なくとも一つ置換基を有していることがより好ましい。アリール基に置換する置換基の数は、1～3つが好ましく、2つまたは3つがより好ましい。アリール基に置換する置換基としては、アルキル基であることが好ましく、メチル基、イソプロピル基、*t*-ブチル基であることがより好ましく、メチル基であることがさらに好ましい。

[0059] <式(1)～式(6)で表される化合物の具体例>

式(1)～式(6)で表される化合物の具体例を以下に記載する。Meはメチル基を示し、Etはエチル基を示し、iPrはイソプロピル基を示す。

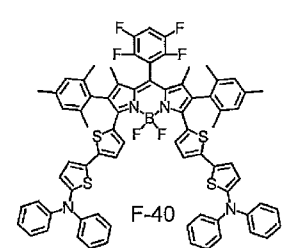
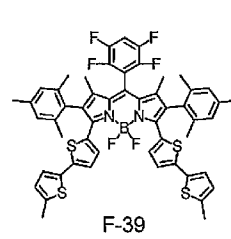
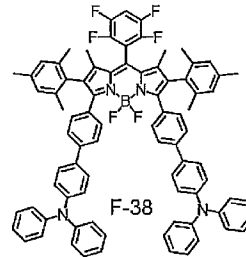
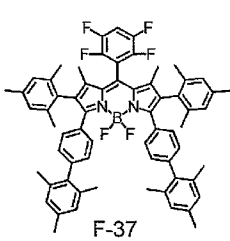
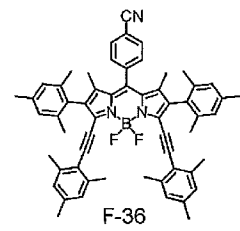
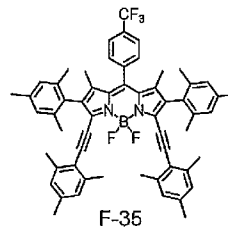
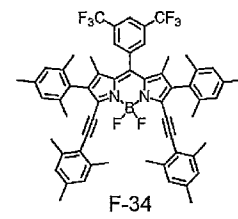
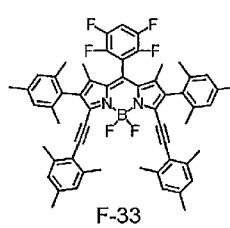
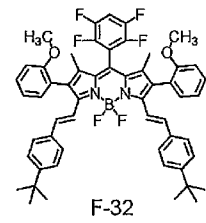
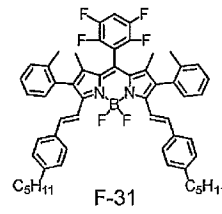
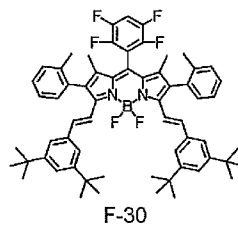
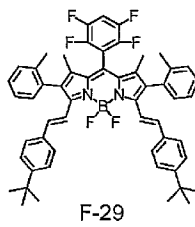
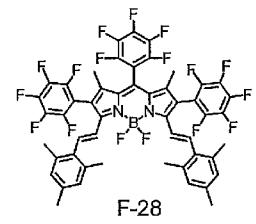
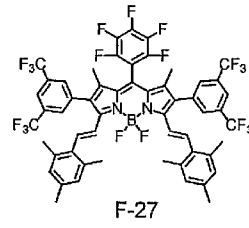
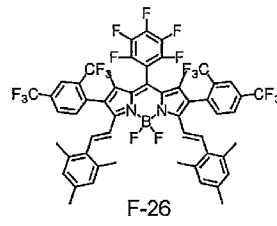
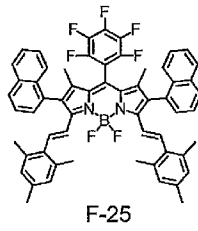
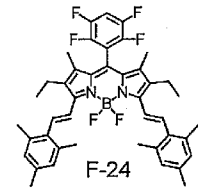
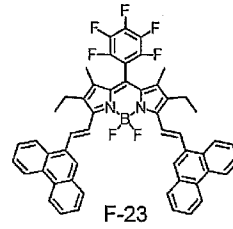
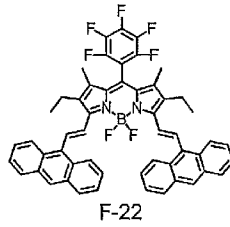
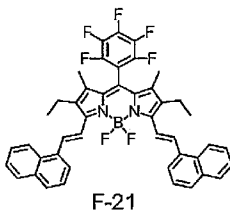
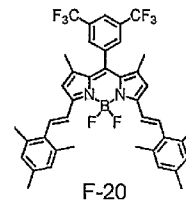
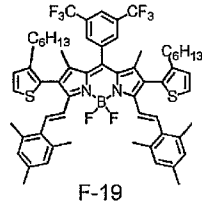
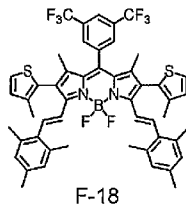
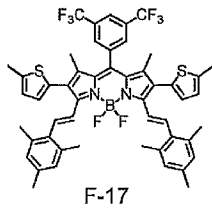
[0060]

[化20]



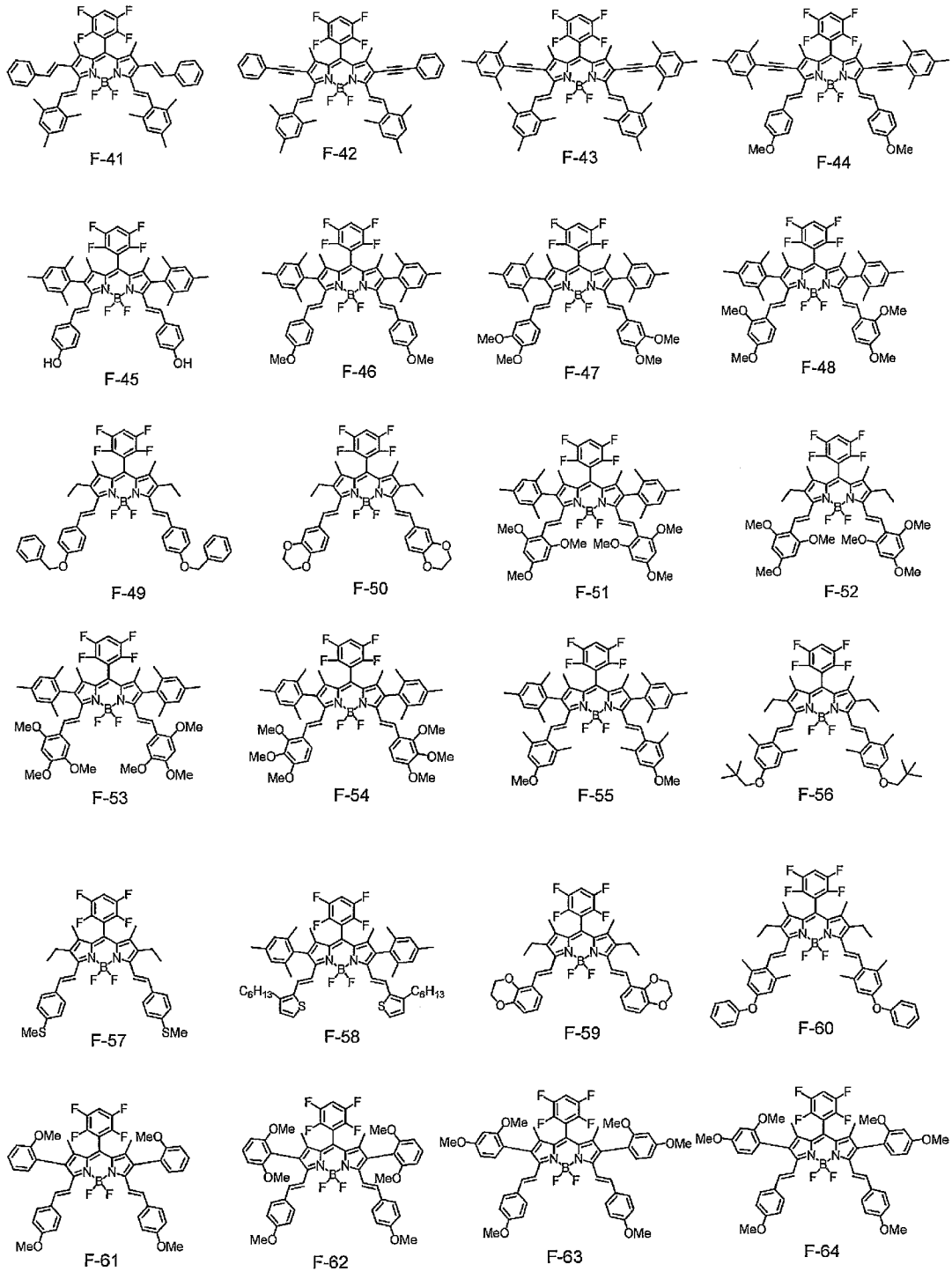
[0061]

[化21]



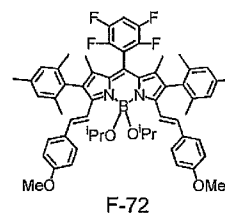
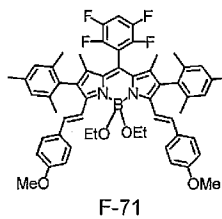
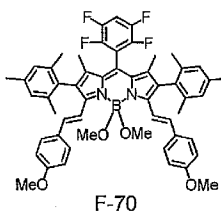
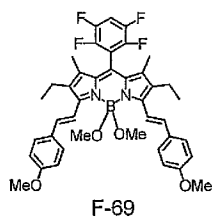
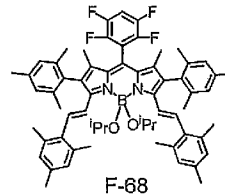
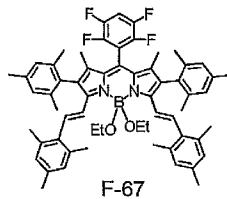
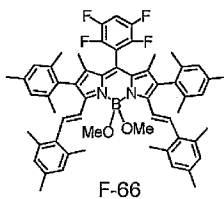
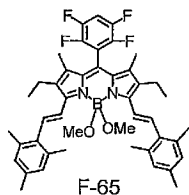
[0062]

[化22]



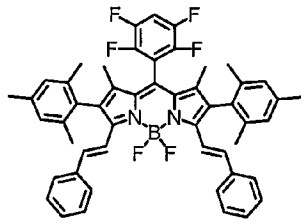
[0063]

[化23]

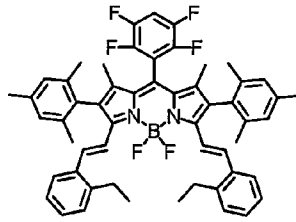


[0064]

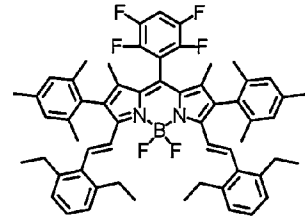
[化24]



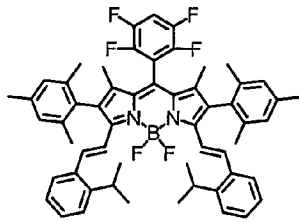
F-73



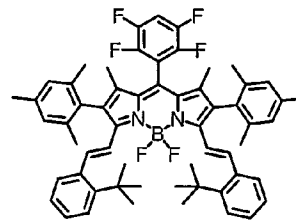
F-73



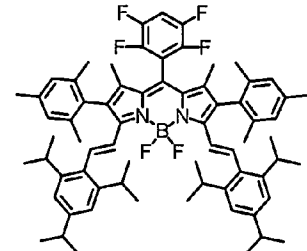
F-73



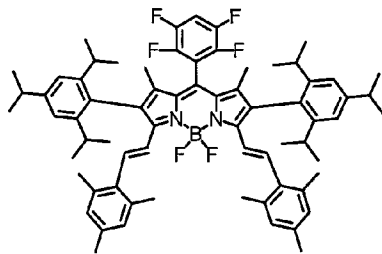
F-73



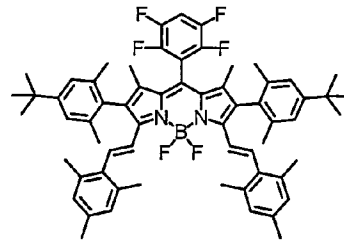
F-74



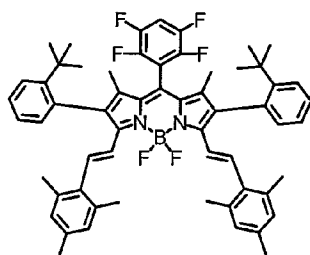
F-75



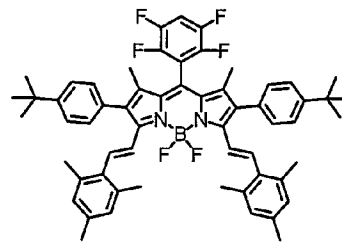
F-76



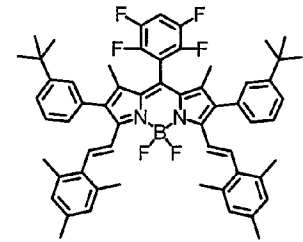
F-77



F-78



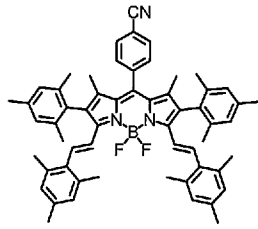
F-79



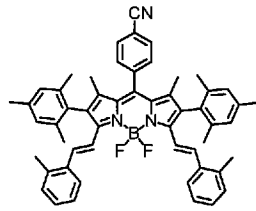
F-80

[0065]

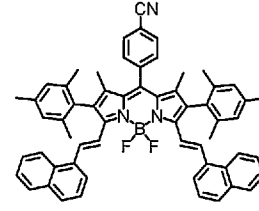
## [化25]



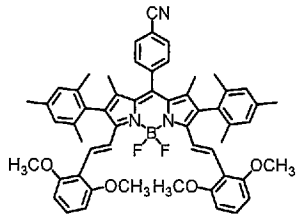
F-81



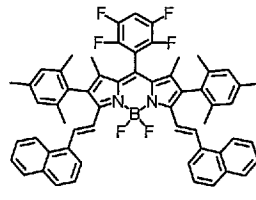
F-82



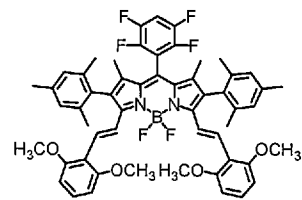
F-83



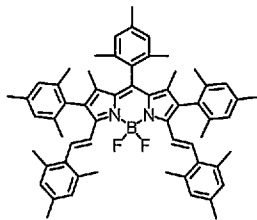
F-84



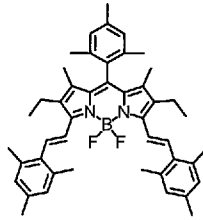
F-85



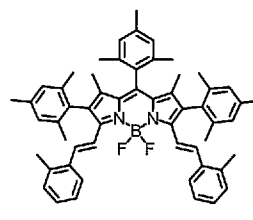
F-86



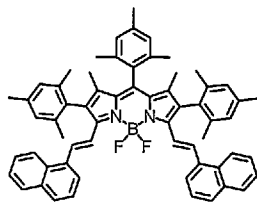
F-87



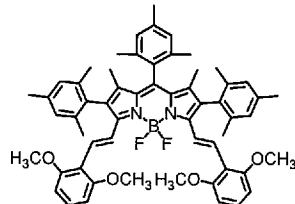
F-88



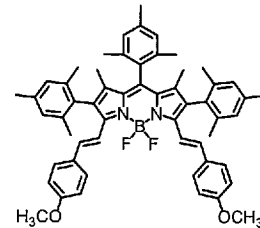
F-89



F-90



F-91



F-92

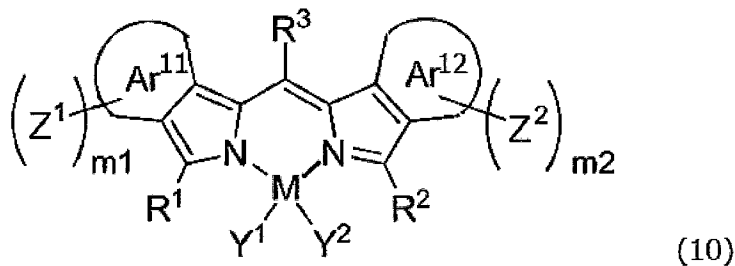
[0066] 標識粒子は、少なくとも一種のエネルギードナー化合物と、少なくとも一種のエネルギーアクセプター化合物と、粒子とを含有する標識粒子であってもよく、その場合、上記エネルギードナー化合物及び上記エネルギーアクセプター化合物の少なくとも一種が、上記式(1)で表される化合物であればよい。

[0067] 本発明の別の例においては、発光性の標識粒子は、エネルギードナー化合物及びエネルギーアクセプター化合物の何れか一方として、式(1)で表される化合物を含有し、エネルギードナー化合物及びエネルギーアクセプター

化合物の何れか他方として、後記する式(10)で表される化合物を含有する。即ち、発光性の標識粒子としては、エネルギードナー化合物として式(1)で表される化合物を含有し、エネルギーアクセプター化合物として式(10)で表される化合物を含有する発光性の標識粒子でもよいし、エネルギーアクセプター化合物として式(1)で表される化合物を含有し、エネルギードナー化合物として式(10)で表される化合物を含有する発光性の標識粒子でもよい。

[0068] <式(10)で表される化合物>

[化26]



[0069] 式(10)中、 $m_1$ 及び $m_2$ はそれぞれ独立に0~4の整数を表し、 $m_1$ 及び $m_2$ の何れかは少なくとも1以上である。Mは半金属原子又は金属原子を表す。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>はそれぞれ独立にハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、Y<sup>1</sup>及びY<sup>2</sup>は互いに連結して環を形成してもよい。Ar<sup>11</sup>及びAr<sup>12</sup>はそれぞれ独立に、置換基を有していてもよい芳香環を表す。Z<sup>1</sup>及びZ<sup>2</sup>はそれぞれ独立にアリール基、ヘテロ環基又はアミノ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $m_1$ が2以上である場合、複数のZ<sup>1</sup>は同じ基でもそれぞれ異なる基でもよく、 $m_2$ が2以上である場合、複数のZ<sup>2</sup>は同じ基でもそれぞれ異なる基でもよい。

[0070] 式(10)中、 $m_1$ 及び $m_2$ はそれぞれ独立に0~4の整数を表し、好ましくは、 $m_1$ 及び $m_2$ は共に1以上である。 $m_1$ 及び $m_2$ は同一でも異なる整数でもよいが、好ましくは同一の整数である。好ましくは、 $m_1$ 及び $m_2$ はそれぞれ独立に1又は2であり、より好ましくは、 $m_1$ 及び $m_2$ は共に1又は共に2であり、特に好ましくは $m_1$ 及び $m_2$ は共に1である。

[0071] 式(10)中、Mは半金属原子又は金属原子を表し、好ましくは半金属原子を表し、特に好ましくは、ホウ素原子を示す。

[0072] 式(10)中、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アシル基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、又はアリーロチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

好ましくは、 $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立に、アリール基又はヘテロ環基であり、これらは置換基を有していてもよい。

$R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ同一でも異なってもよいが、好ましくは同一である。

$R^1$ 及び $R^2$ は、連結して環を形成することはない。

好ましくは、 $R^3$ は、水素原子、アルキル基、アリール基又はヘテロ環基であり、これらは置換基を有していてもよい。より好ましくは、 $R^3$ は、水素原子である。

[0073] 式(10)中、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立にハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、アリーロチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $Y^1$ 及び $Y^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。

好ましくは、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、又はアリーロキシ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $Y^1$ 及び $Y^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。

より好ましくは、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子である。

さらに好ましくは、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はフッ素原子である。

$Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ同一でも異なってもよいが、好ましくは同一である。

[0074] 式(10)中、 $A r^1$ 及び $A r^2$ はそれぞれ独立に、置換基を有していてもよい芳香環を表す。

好ましくは、 $A r^1$ 及び $A r^2$ はベンゼン環を表す。

[0075] 式(10)中、 $Z^1$ 及び $Z^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、又はアミノ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $m_1$ が2以上である場合、複数の $Z^1$ は同じ基でもそれぞれ異なる基でもよく、 $m_2$ が2以上である場合、複数の $Z^2$ は同じ基でもそれぞれ異なる基でもよい。

好ましくは、 $Z^1$ 及び $Z^2$ は、それぞれ独立に、置換基を有していてもよいアリール基を表す。

より好ましくは、 $Z^1$ 及び $Z^2$ は、それぞれ独立に、フェニル基、ナフチル基、又はアントリル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

好ましくは、 $m_1$ が2以上である場合、複数の $Z^1$ は同じ基である。

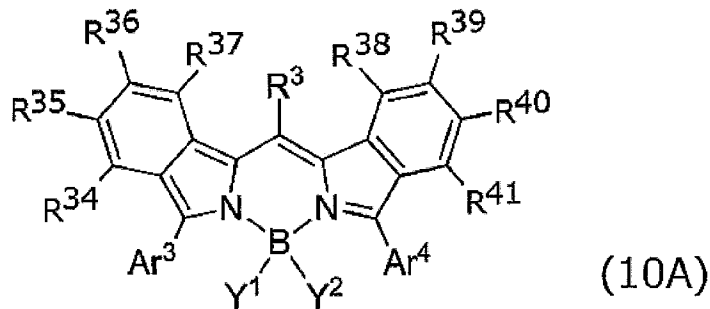
好ましくは、 $m_2$ が2以上である場合、複数の $Z^2$ は同じ基である。

式(2)で表される化合物は、分子内に、カルボン酸基、リン酸基、スルホン酸基などの酸性基を有さないことが好ましい。

[0076] <式(10A)で表される化合物について>

式(10)で表される化合物の好ましい例としては、下記式(10A)で表される化合物が挙げられる。

[化27]



[0077] 式(10A)中、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立にハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

好ましくは、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はそれぞれ独立にハロゲン原子を表す。

特に好ましくは、 $Y^1$ 及び $Y^2$ はフッ素原子である。

[0078] 式(10A)中、 $R^3$ は水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、又はアシル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

好ましくは、 $R^3$ は、水素原子、アルキル基、アリール基又はヘテロ環基であり、これらは置換基を有していてもよい。

より好ましくは、 $R^3$ は、水素原子である。

[0079] 式(10A)中、 $Ar^3$ 及び $Ar^4$ はそれぞれ独立にアリール基又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

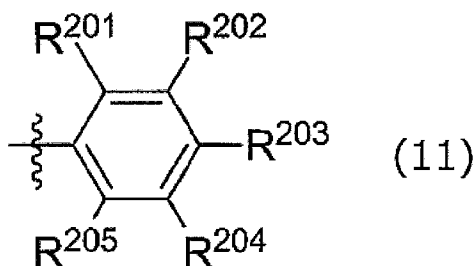
[0080] 式(10A)中、 $R^{34} \sim R^{41}$ はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、又はアミノ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

[0081] 式(10A)中、好ましくは、 $R^{34} \sim R^{41}$ の少なくとも1つ以上が、置換基を有していてもよいアリール基である。

さらに好ましくは、 $R^{34} \sim R^{37}$ の少なくとも1つ以上が、置換基を有していてもよいアリール基であり、 $R^{38} \sim R^{41}$ の少なくとも1つ以上が、置換基を有していてもよいアリール基である。

[0082] より好ましくは、 $R^{34} \sim R^{41}$ の少なくとも1つ以上が、式(11)で表される基である。さらに好ましくは、 $R^{34} \sim R^{37}$ の少なくとも1つ以上が、式(11)で表される基であり、 $R^{38} \sim R^{41}$ の少なくとも1つ以上が、式(11)で表される基である。

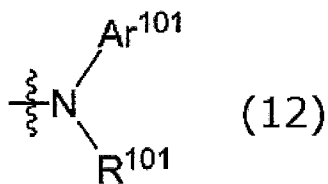
[化28]



式(11)中、 $R^{201} \sim R^{205}$ は水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、又はアミノ基であり、 $R^{201}$ 及び $R^{205}$ の少なくとも一方は水素原子以外の原子又は基である。 $R^{201}$ と $R^{202}$ は互いに連結して環を形成してもよく、 $R^{202}$ と $R^{203}$ は互いに連結して環を形成してもよく、 $R^{203}$ と $R^{204}$ は互いに連結して環を形成してもよく、 $R^{204}$ と $R^{205}$ は互いに連結して環を形成してもよい。

[0083] 別の好ましい態様によれば、 $R^{34} \sim R^{41}$ の少なくとも1つ以上が、式(12)で表される基である。さらに好ましくは、 $R^{34} \sim R^{37}$ の少なくとも1つ以上が、式(12)で表される基であり、 $R^{38} \sim R^{41}$ の少なくとも1つ以上が、式(12)で表される基である。

[化29]



式(12)中、 $R^{101}$ は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、又はアシル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。

$Ar^{101}$ はアリール基、又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。上記置換基としては、置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。 $Ar^{101}$ と $R^{101}$ は互いに連結して環を形成してもよい。

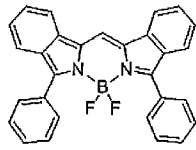
式(10)で表される化合物は、分子内に、カルボン酸基、リン酸基、スルホン酸基などの酸性基を有さないことが好ましい。

[0084] <式(10)又は式(10A)で表される化合物の具体例>

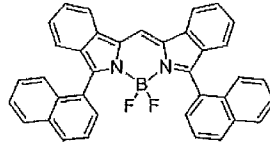
式(10)又は式(10A)で表される化合物の具体例を以下に記載する。Meはメチル基を示し、Buはn-ブチル基を示し、Phはフェニル基を示す。

[0085]

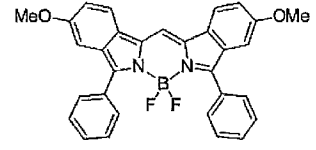
[化30]



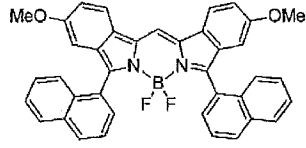
E-1



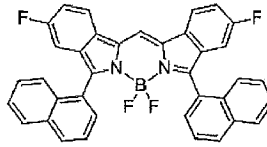
E-2



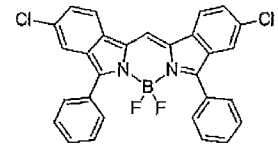
E-3



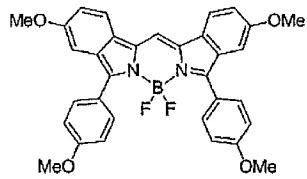
E-4



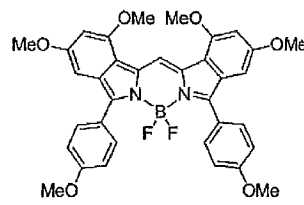
E-5



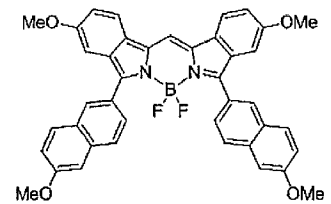
E-6



E-7

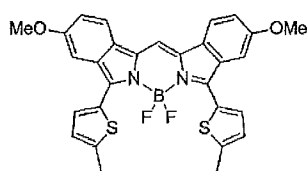


E-8

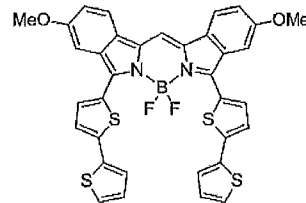


E-9

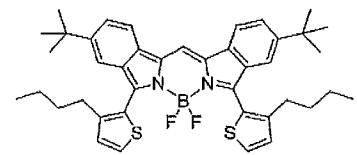
[0086] [化31]



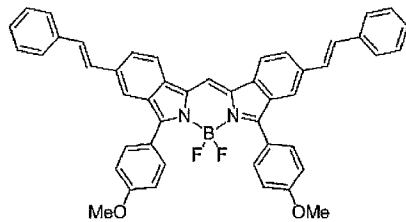
E-10



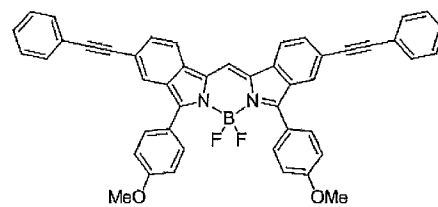
E-11



E-12



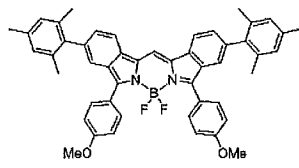
E-13



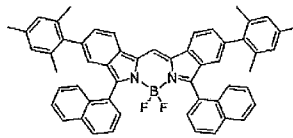
E-14

[0087]

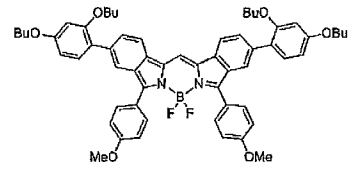
[化32]



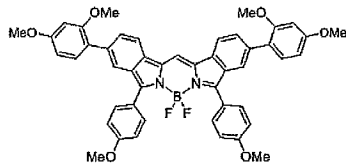
E-15



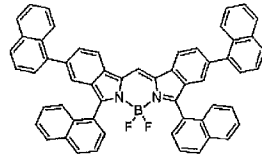
E-16



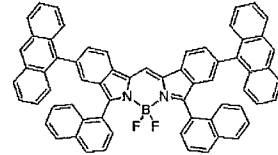
E-17



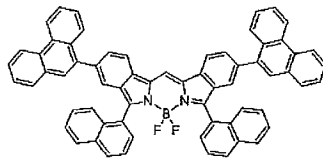
E-18



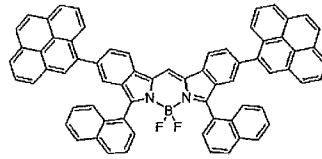
E-19



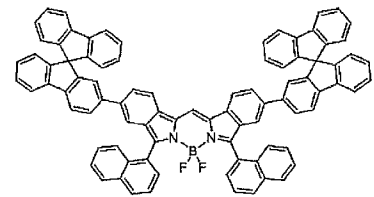
E-20



E-21

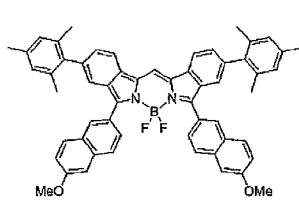


E-22

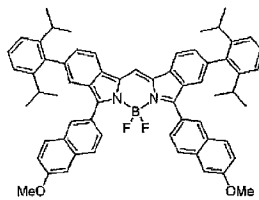


E-23

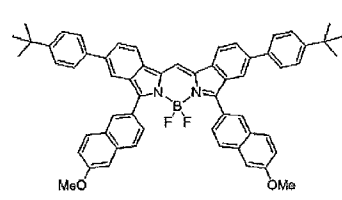
[0088] [化33]



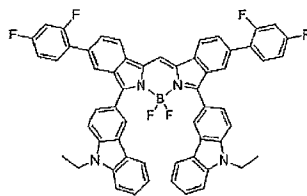
E-24



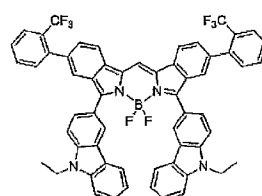
E-25



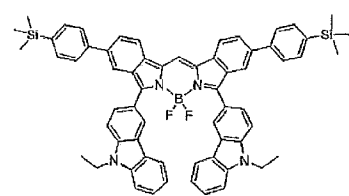
E-26



E-27



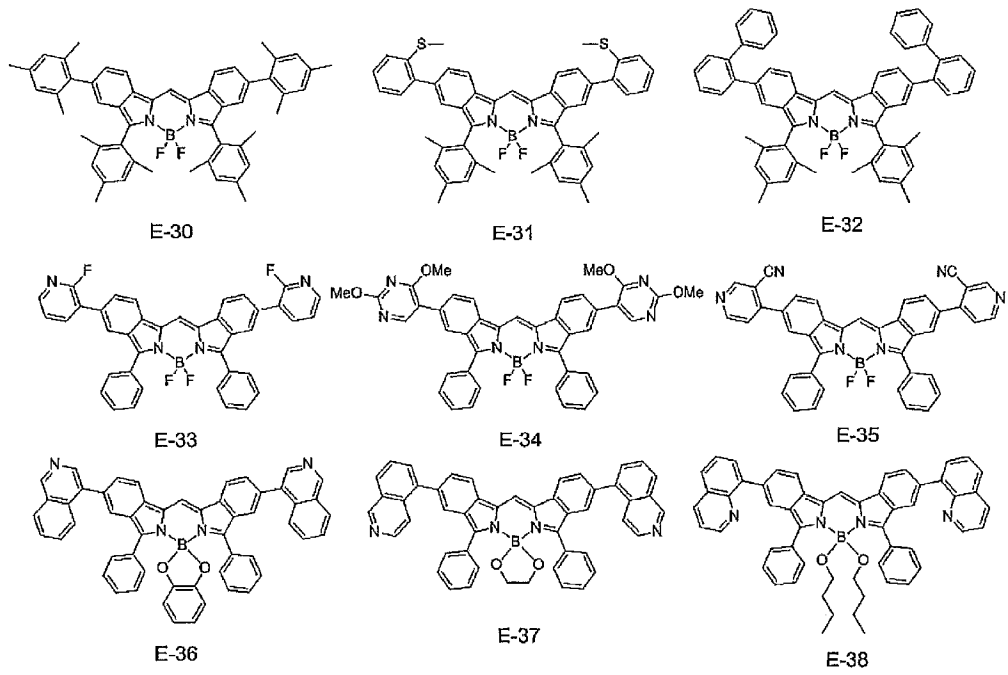
E-28



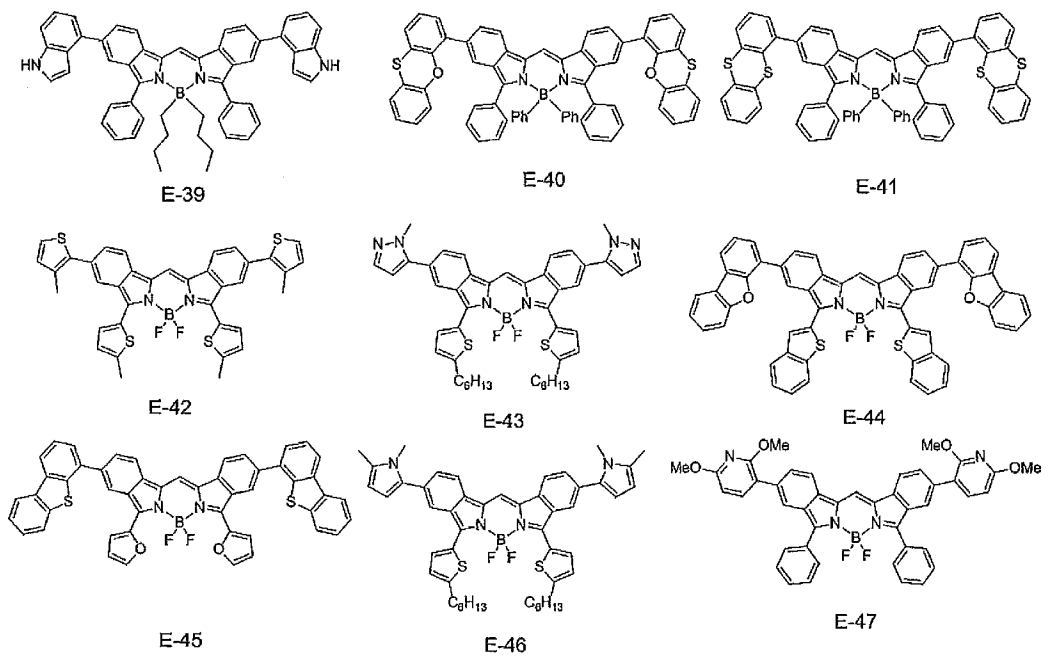
E-29

[0089]

[化34]

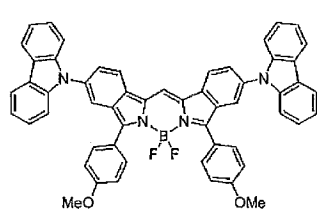


[0090] [化35]

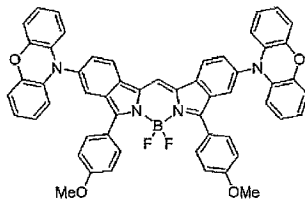


[0091]

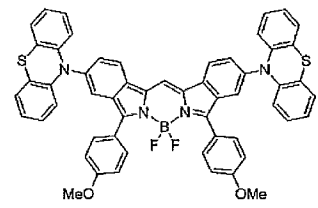
[化36]



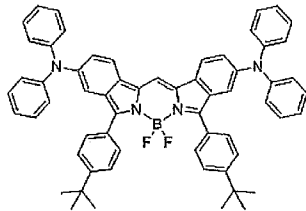
E-48



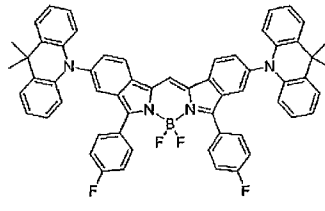
E-49



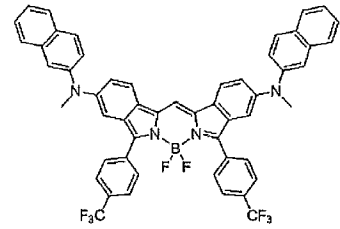
E-50



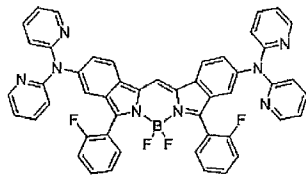
E-51



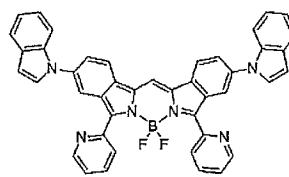
E-52



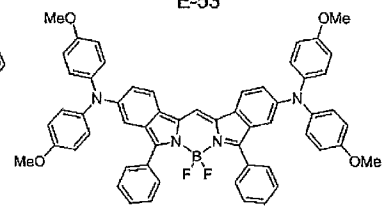
E-53



E-54

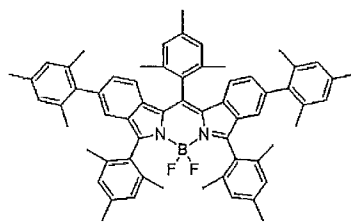


E-55

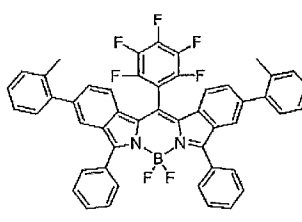


E-56

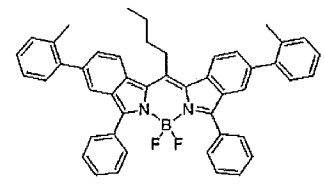
[0092] [化37]



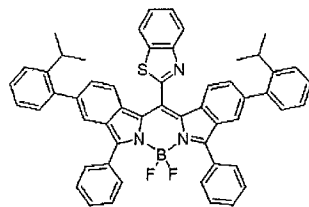
E-57



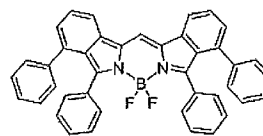
E-58



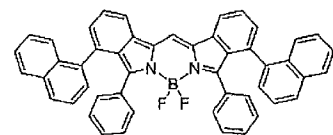
E-59



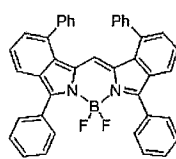
E-60



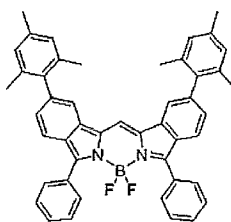
E-61



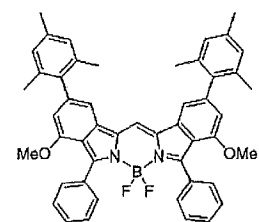
E-62



E-63



E-64



E-65

[0093] <エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物の組み合わせの具体例について>

エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物の組み合わせの具体例を以下に記載する。

[0094] [表1]

ドナー	アクセプター	ドナー	アクセプター	ドナー	アクセプター
F-2	F-43	F-16	F-64	F-37	F-43
F-2	F-44	F-16	F-69	F-37	F-44
F-2	F-46	F-16	F-70	F-37	F-46
F-2	F-51	F-16	F-71	F-37	F-51
F-2	F-55	F-16	F-72	F-37	F-55
F-2	F-69	F-24	F-43	F-65	F-43
F-16	F-38	F-24	F-44	F-65	F-44
F-16	F-39	F-24	F-46	F-65	F-46
F-16	F-41	F-24	F-51	F-65	F-51
F-16	F-42	F-24	F-55	F-65	F-55
F-16	F-43	F-24	F-69	F-65	F-69
F-16	F-45	F-27	F-43	F-66	F-43
F-16	F-46	F-27	F-44	F-66	F-44
F-16	F-48	F-27	F-46	F-66	F-46
F-16	F-49	F-27	F-51	F-66	F-51
F-16	F-50	F-27	F-55	F-66	F-55
F-16	F-51	F-27	F-69	F-66	F-69
F-16	F-52	F-29	F-43	F-67	F-43
F-16	F-53	F-29	F-44	F-67	F-44
F-16	F-54	F-29	F-46	F-67	F-46
F-16	F-55	F-29	F-51	F-67	F-51
F-16	F-56	F-29	F-55	F-67	F-55
F-16	F-57	F-29	F-69	F-67	F-69
F-16	F-58	F-33	F-43	F-68	F-43
F-16	F-59	F-33	F-44	F-68	F-44
F-16	F-60	F-33	F-46	F-68	F-46
F-16	F-61	F-33	F-51	F-68	F-51
F-16	F-62	F-33	F-55	F-68	F-55
F-16	F-63	F-33	F-69	F-68	F-69

[0095]

[表2]

ドナー	アクセプター	ドナー	アクセプター	ドナー	アクセプター
E-4	F-43	E-16	F-64	F-16	E-24
E-4	F-44	E-16	F-69	F-19	E-24
E-4	F-46	E-16	F-70	F-20	E-24
E-4	F-51	E-16	F-71	F-21	E-24
E-4	F-55	E-16	F-72	F-23	E-24
E-4	F-69	E-20	F-43	F-24	E-24
E-16	F-38	E-20	F-44	F-25	E-24
E-16	F-39	E-20	F-46	F-26	E-24
E-16	F-41	E-20	F-51	F-27	E-24
E-16	F-42	E-20	F-55	F-28	E-24
E-16	F-43	E-20	F-69	F-29	E-24
E-16	F-45	E-57	F-43	F-30	E-24
E-16	F-46	E-57	F-44	F-31	E-24
E-16	F-48	E-57	F-46	F-32	E-24
E-16	F-49	E-57	F-51	F-33	E-24
E-16	F-50	E-57	F-55	F-34	E-24
E-16	F-51	E-57	F-69	F-36	E-24
E-16	F-52	F-1	E-24	F-37	E-24
E-16	F-53	F-2	E-24	F-65	E-24
E-16	F-54	F-3	E-24	F-66	E-24
E-16	F-55	F-4	E-24	F-67	E-24
E-16	F-56	F-5	E-24	F-68	E-24
E-16	F-57	F-6	E-24	F-2	E-17
E-16	F-58	F-7	E-24	F-16	E-17
E-16	F-59	F-8	E-24	F-33	E-17
E-16	F-60	F-12	E-24	F-65	E-17
E-16	F-61	F-13	E-24	F-66	E-17
E-16	F-62	F-14	E-24	F-67	E-17
E-16	F-63	F-15	E-24	F-68	E-17

[0096] エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物の選択に関しては、吸収が短波長の化合物がエネルギードナー化合物であり、吸収が長波長の化合物がエネルギーアクセプター化合物であり、エネルギードナー化合物の発光とエネルギーアクセプター化合物の吸収が少しでも重なっている場合には、発光性の標識粒子において使用できる可能性がある。エネルギーアク

セプター化合物の吸収の極大波長が、エネルギードナー化合物の吸収の波長より10～100nm程度長波長側にある場合が好ましい。エネルギーアクセプター化合物の吸収の極大波長が、エネルギードナー化合物の吸収の波長より10～70nm長波長側にある場合がより好ましい。

[0097] エネルギードナー化合物の発光が吸収のどの程度長波長に出るか（ストークスシフトの大きさ）は化合物によって異なるため、一概には言えないが、式（1）で表される化合物では吸収極大波長+30nm程度に発光の極大があり、そこから+100nm程度までは発光スペクトルが存在するため、その付近に吸収を持つアクセプター化合物を併用することによりエネルギー移動の系が実現できることが想定される。

[0098] なお、各化合物の吸収波長に関しては、化合物を合成して測定するだけでなく、Gaussian等による計算から予測することも可能であり、計算値の関係から、エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物の組み合わせを推定することもできる。

[0099] 本発明においては、ストークスシフトの大きさが、好ましくは25nm以上であり、より好ましくは30nm以上であり、より一層好ましくは35nm以上であり、さらに好ましくは40nm以上であり、さらに一層好ましくは45nm以上であり、特に好ましくは50nm以上であり、最も好ましくは60nm以上である。ストークスシフトの大きさの上限は特に限定されないが、一般的には、150nm以下である。

[0100] <式（1）～式（6）で表される化合物の使用量>

本発明で用いる粒子（即ち、式（1）で表される化合物を添加する前の粒子）に対する式（1）で表される化合物の含有量は、本発明の効果を損なわない限り特に限定されないが、好ましくは $0.5\mu\text{mol/g}$ ～ $400\mu\text{mol/g}$ であり、より好ましくは $1\mu\text{mol/g}$ ～ $300\mu\text{mol/g}$ であり、さらに好ましくは $2\mu\text{mol/g}$ ～ $200\mu\text{mol/g}$ であり、特に好ましくは $3\mu\text{mol/g}$ ～ $100\mu\text{mol/g}$ である。

[0101] 本発明で用いる粒子（即ち、式（1）～式（6）で表される化合物を添加

する前の粒子) に対する式 (1) ~ 式 (6) で表される化合物の含有量は、本発明の効果を損なわない限り特に限定されないが、好ましくは 0.1 質量% ~ 30 質量% であり、より好ましくは 0.2 質量% ~ 20 質量% であり、さらに好ましくは 0.3 質量% ~ 10 質量% であり、特に好ましくは 0.4 質量% ~ 8 質量% である。

[0102] 発光性の標識粒子において、式 (1) ~ 式 (6) で表される化合物は少なくとも一種使用するが、二種以上の式 (1) ~ 式 (6) で表される化合物を使用してもよい。二種以上の式 (1) ~ 式 (6) で表される化合物を使用する場合には、合計量が、上記の範囲内となることが好ましい。

[0103] エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物の組み合わせを使用する場合には、エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のモル比は、1 : 10 ~ 20 : 1 であることが好ましく、1 : 10 ~ 10 : 1 がより好ましく、1 : 5 ~ 10 : 1 であることが更に好ましい。

[0104] エネルギードナー化合物として式 (1) で表される少なくとも一種の化合物を使用し、エネルギーアクセプター化合物として、式 (1) で表される少なくとも一種の化合物を使用する場合においては、エネルギードナー化合物として二種以上の式 (1) で表される化合物を使用してもよく、またエネルギーアクセプター化合物として二種以上の式 (1) で表される化合物を使用してもよい。上記の場合、使用される式 (1) で表される化合物の合計量が、上記の範囲内となることが好ましい。

[0105] <式 (1) ~ 式 (6) で表される化合物の製造方法>

式 (1) ~ 式 (6) で表される化合物は、例えば、後記する実施例に示す合成スキームにより製造することができる。

[0106] 一例として、化合物 (1) の合成の概要を以下に示す。3, 5-ビス(トリフルオロメチル)ベンズアルデヒド及びジクロロメタンの混合物に、水冷しながら 3-エチル-2, 4-ジメチルピロールとトリフルオロ酢酸を加えた後、室温で攪拌し、水冷しながらクロラニルを加え、室温で攪拌した後、水冷しながらジイソプロピルエチルアミンを滴下し、室温で攪拌し、続いて

、水冷しながら三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体を滴下し、室温で攪拌して反応を行うことにより、化合物（1-A）を合成することができる。続いて、化合物（1-A）、2, 4, 6-トリメチルベンズアルデヒド 115 mg、及び脱水トルエンを混合し、室温で攪拌する。ピペリジン及びp-トルエンスルホン酸 1水和物 1片を加えて溶媒を留去しながら攪拌し、放冷後に脱水トルエンを加えて溶媒を留去しながら攪拌して反応を行うことにより、化合物（1）を製造することができる。

[0107] 別の例としては、化合物（3）は、後記する実施例における〈合成例 2〉の合成スキームに従って、3, 5-ビス（トリフルオロメチル）ベンズアルデヒドと 2, 4-ジメチルピロールを出発化合物として、化合物（3-A）、化合物（3-B）、及び化合物（3-C）を経由して製造することができる。

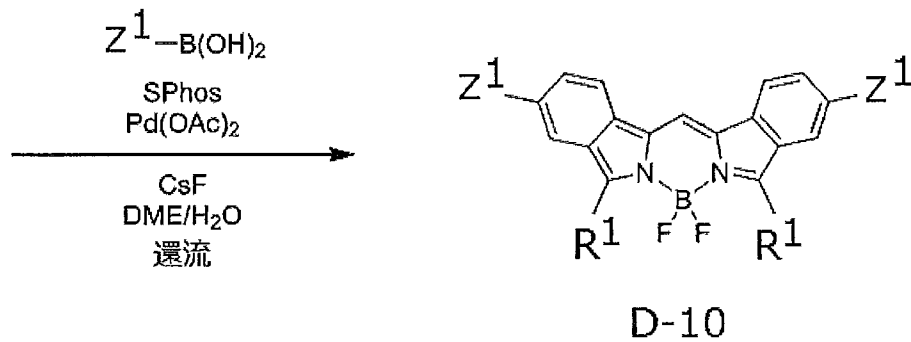
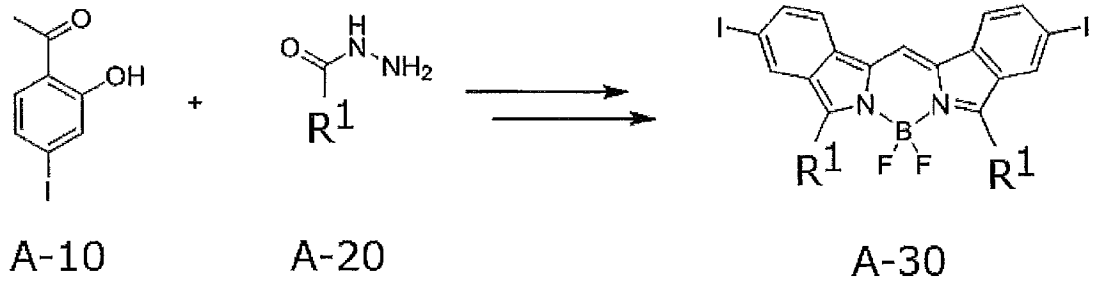
[0108] 化合物（1）及び化合物（3）は、式（1）で表される化合物の定義の範囲内である。化合物（1）及び化合物（3）以外の式（1）で表される化合物についても、反応に使用する化合物を、所望の式（1）で表される目的化合物に対応する置換基を有する化合物に置き換えることによって、製造することができる。

[0109] 〈式（10）で表される化合物の製造方法〉

式（10）で表される化合物は、例えば、以下に示す合成スキームにより製造することができる。

[0110]

[化38]



[0111] 上記合成スキームにおけるR<sup>1</sup>及びZ<sup>1</sup>の定義は、式(10)におけるR<sup>1</sup>及びZ<sup>1</sup>の定義と同義である。

化合物A-10と化合物A-20とをMacromolecules 2010、43、193-200に記載の方法に従って反応させることにより、化合物A-30を合成することができる。次いで、化合物A-30、式： $Z^1-B(OH)_2$ で表される化合物、及びフッ化セシウム(CsF)をジメトキシエタン(DME)と水の混合溶液に加え、真空引き、窒素置換を繰り返して脱気を行う。酢酸パラジウム( $Pd(OAc)_2$ )、及び2-ジシクロヘキシルホスフィノ-2'、6'-ジメトキシビフェニル(SPhos)を加え、昇温し、還流下、所定の時間(例えば、2~24時間)反応させることにより、化合物D-10を製造することができる。

[0112] 化合物D-10は、式(10)で表される化合物の定義の範囲内である。化合物D-10以外の式(10)で表される化合物についても、化合物A-10、化合物A-20、及び式： $Z^1-B(OH)_2$ で表される化合物の何れか

一種以上の化合物を、対応する化合物に置き換えることによって、製造することができる。

[0113] <粒子>

標識粒子は、粒子を含む。粒子の材質及び形態は特に限定されず、例えば、ポリスチレンビーズなどの有機高分子粒子、又はガラスビーズ等の無機粒子を用いることができる。粒子の材質の具体例としては、スチレン、メタクリル酸、グリシジル（メタ）アクリレート、ブタジエン、塩化ビニル、酢酸ビニルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、フェニルメタクリレート、又はブチルメタクリレートなどのモノマーを重合させたホモポリマー、並びに2種以上のモノマーを重合させたコポリマーなどが挙げられ、上記のホモポリマー又はコポリマーを均一に懸濁させたラテックスでもよい。また、粒子としては、その他の有機高分子粉末、無機物質粉末、微生物、血球、細胞膜片、リポソーム、マイクロカプセルなどが挙げられる。粒子としては、ラテックス粒子が好ましい。

[0114] ラテックス粒子を使用する場合、ラテックスの材質の具体例としては、ポリスチレン、スチレン-アクリル酸共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、スチレン-グリシジル（メタ）アクリレート共重合体、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどが挙げられる。ラテックスとしては、単量体としてスチレンを少なくとも含む共重合体が好ましく、スチレンと、アクリル酸又はメタクリル酸との共重合体が特に好ましい。ラテックスの作製方法は特に限定されず、任意の重合方法により作製することができる。但し、発光性の標識粒子に抗体を標識して使用する場合には、界面活性剤が存在すると抗体固定化が困難となるため、ラテックスの作製には、無乳化剤乳化重合、即ち界面活性剤などの乳化剤を用いない乳化重合が好ましい。

[0115] <発光性の標識粒子>

本発明における発光性の標識粒子は、式（１）で表される化合物を含むことにより、680nm以上という長波長領域の発光極大波長を有し、高い量子収率を示す。

発光極大波長とは、吸収スペクトルにおいて吸光度が最も大きくなる波長のことを表す。

発光性の標識粒子の発光極大波長は、好ましくは680nm以上であり、より好ましくは700nm以上であり、特に好ましくは720nm以上である。本発明の発光性の標識粒子の発光極大波長の上限は特に限定されないが、好ましくは900nm以下であり、より好ましくは800nm以下である。

[0116] 発光性の標識粒子の発光極大波長は、市販の蛍光分光光度計を使用して測定することができ、例えば、島津製作所製の蛍光分光光度計RF-5300PCを使用して測定することができる。

[0117] 発光性の標識粒子の量子収率とは、発光性の標識粒子が吸収した光子数に対する蛍光として発光した光子数の割合のことである。

発光性の標識粒子が示す量子収率は、好ましくは0.25以上であり、より好ましくは0.4以上であり、さらに好ましくは0.5以上であり、さらに一層好ましくは0.6以上であり、特に好ましくは0.7以上である。量子収率の上限は特に限定されないが、一般的には、1.0以下である。

発光性の標識粒子の量子収率は、市販の量子収率測定装置を使用して測定することができ、例えば、浜松ホトニクス社製の絶対PL量子収率測定装置C9920-02を使用して測定することができる。

[0118] （発光性の標識粒子の平均粒径（平均粒子径）の測定方法）

発光性の標識粒子の平均粒径は、粒子の材質や被検物質を測定する濃度範囲、測定機器などによって異なるが、0.001~10 $\mu$ m（より好ましくは0.01~1 $\mu$ m）の範囲が好ましく、30~500nmの範囲がより好ましく、50~300nmの範囲がさらに好ましく、80~200nmの範囲が特に好ましく、100~150nmの範囲が最も好ましい。本発明に用

いることが可能な発光性の標識粒子の平均粒径は、市販の粒度分布計等で計測することができる。粒度分布の測定方法としては、光学顕微鏡法、共焦点レーザー顕微鏡法、電子顕微鏡法、原子間力顕微鏡法、静的光散乱法、レーザー回折法、動的光散乱法、遠心沈降法、電気パルス計測法、クロマトグラフィ法、超音波減衰法等が知られており、それぞれの原理に対応した装置が市販されている。これらの測定方法のうち、粒子径範囲及び測定の容易さから、動的光散乱法を用いて発光性の標識粒子の平均粒径を測定することが好ましい。動的光散乱を用いた市販の測定装置としては、ナノトラックUPA（日機装（株））、動的光散乱式粒径分布測定装置LB-550（（株）堀場製作所）、濃厚系粒径アナライザーFPAR-1000（大塚電子（株））等が挙げられる。本発明では、平均粒径は、25℃にて、粘度0.8872CP、水の屈折率1.330の条件で測定したメジアン径（ $d = 50$ ）として求めるものとする。

[0119] <発光性の標識粒子の製造方法>

発光性の標識粒子の製造方法は特に限定されないが、式（1）で表される少なくとも一種の化合物と粒子とを混合することによって製造することができる。例えば、ラテックス粒子などの粒子に、式（1）で表される化合物を添加することによって、発光性の標識粒子を作製することができる。より具体的には、水及び水溶性有機溶剤（テトラヒドロフラン、メタノール等）の何れか一種以上を含む粒子の分散液に、式（1）で表される化合物を含む溶液を添加して攪拌することにより、発光性の標識粒子を製造することができる。

[0120] 本発明においては、上記した本発明の発光性の標識粒子を含む分散液を調製してもよい。

分散液は、本発明の発光性の標識粒子を分散媒に分散することにより製造することができる。分散媒としては、水、有機溶媒、又は水と有機溶媒との混合物等が挙げられる。有機溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロパノール等のアルコール、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒など

を使用することができる。

分散液における発光性の標識粒子の固形分濃度は特に限定されないが、一般的には0.1～20質量%であり、好ましくは0.5～10質量%であり、より好ましくは1～5質量%である。

[0121] (第一の結合物質による発光性の標識粒子の修飾)

第一の結合物質を発光性の標識粒子に固定化する方法は、例えば、特開2000-206115号公報やThermo Fisher社FluoSpheres(登録商標)ポリスチレンマイクロスフィアF8813に添付のプロトコールなどに記載されており、免疫凝集反应用試薬を調製する公知の方法がいずれも使用可能である。また、結合物質として抗体を粒子に固定化する原理として、物理吸着及び共有結合による化学結合のいずれの原理も採用可能である。抗体を粒子に固定させた後に抗体が被覆されていない粒子表面を覆うブロッキング剤(即ち、第一のブロッキング剤)としては、例えば、アルブミン(BSAなど)、スキムミルク、カゼイン、大豆由来成分、魚由来成分、又はポリエチレングリコールなど、並びに上記物質又は上記物質と性質が同じである物質を含む市販の免疫反应用ブロッキング剤などが使用可能である。これらのブロッキング剤は、必要に応じて熱や酸・アルカリ等により部分変性などの前処理を施すことも可能である。さらに、第一のブロッキング剤としては、測定対象物質と結合性を有しない抗体(グロブリン)、あるいはテストエリアに使用しないタンパク質(Protein A、Protein G)などを使用することもできる。

[0122] 抗体を粒子に固定化する具体的な方法を、以下に例示する。粒子の固形分濃度が0.1～10質量%になるよう分散させた液に、0.01～20mg/mLの濃度に調整した抗体溶液を添加して、混合する。温度4～50℃の条件下で5分間～48時間攪拌を継続する。次いで遠心分離その他の方法により粒子と溶液を分離して、溶液に含まれている、粒子に結合しなかった抗体を十分に除去する。その後、粒子を緩衝液にて洗浄する操作を0～10回繰り返す。粒子と抗体とを混合して、粒子に抗体を結合させる操作を実施した後に、抗原抗体反応に関与しない成分、好ましくはタンパク質、より好ま

しくはグロブリン、アルブミン、ブロックエース（登録商標）、スキムミルク及びカゼインなどのブロッキング剤を使用して粒子表面の抗体が結合していない部分を保護することが望ましい。

[0123] 抗原や抗体等を粒子に固定化する際に、安定化剤を必要に応じて添加可能である。安定化剤とは、ショ糖や多糖類などの合成高分子あるいは天然高分子など、抗原や抗体を安定化するものであれば特に制限されず、Immunoassay Stabilizer (Advanced Biotechnologies Inc (ABI社)) などの市販の安定化剤も使用可能である。

[0124] 第一の結合物質を有する標識粒子は本発明のキットに含まれており、キットの一部である容器、たとえばカップに含まれている態様が好ましい。この場合、生体試料を、標識粒子を含む容器に注入して混合、攪拌することにより、生体試料中の測定対象物質と第一の結合物質とを結合させることができる。

[0125] (基板)

本発明では、高感度な測定を達成するために、後述する表面プラズモン蛍光 (SPF) 検出を行う測定法を採用することが好ましい。この場合における基板としては、表面に金属膜を有する基板を使用することが好ましい。金属膜を構成する金属としては、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。好ましくは金、銀、銅、アルミニウム、又は白金等の自由電子金属が挙げられ、特に金が好ましい。金を使用する場合、後記する検出領域は、金膜上にある。上記の金属は単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、1 nm以上500 nm以下であるのが好ましく、特に10 nm以上200 nm以下であるのが好ましい。500 nmを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、0.1 nm以上、10 nm以下であることが好ましい。

[0126] 金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、又は無電解めっき法等によって行うことができるが、基板材質と金属膜との混合層を設けて、金属膜の密着性を良くするためには、スパッタ法により金属膜を作製することが好ましい。この場合、基板材質と金属膜との混合層の厚さは十分な密着性が確保できれば特に制限はないが、10nm以下が好ましい。

[0127] 金属膜は好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む。本発明で使用することができる基板の材質としては例えば、一般的な光学ガラスの一種であるBK7（ホウ珪酸ガラス）等の光学ガラス、あるいは合成樹脂、具体的にはポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、又はシクロオレフィンポリマーなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。

[0128] SPF検出のための基板の好ましい態様としては、ポリメチルメタクリレート(PMMA)に金膜を蒸着した基板などを挙げることができる。

[0129] 基板は、測定対象物質又は第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する検出領域を備えている。

[0130] (第二の結合物質)

第二の結合物質は、測定対象物質と結合性を有する物質であるか、又は第一の結合物質と結合性を有する物質である。定量をサンドイッチアッセイ法で行う場合には、第二の結合物質として、測定対象物質と結合性を有する物質を使用することができる。定量を競合法で行う場合には、第二の結合物質として、第一の結合物質と結合性を有する物質を使用することができる。本発明においては、定量を競合法で行うことが好ましく、第二の結合物質として、第一の結合物質と結合性を有する物質を使用することが好ましい。

[0131] 第二の結合物質としては、特に限定されないが、好ましい例としては、抗原、抗体、又はこれらの複合体が挙げられるが、好ましくは、抗原であり、第二の結合物質として、測定対象物質（これは、第一の結合物質と結合性を有する物質である）を使用することが特に好ましい。

[0132] 第二の結合物質として、測定対象物質を使用する場合には、第二の結合物質は、測定対象物質とキャリアとの複合体であることが好ましい。キャリアとは、測定対象物質の複数の分子が結合可能な物質を意味する。好ましいキャリアの一例としては、タンパク質などが挙げられ、その中でも具体的には、ウシ血清アルブミン等を挙げるができる。

[0133] 測定対象物質が胆汁酸である場合、第二の結合物質は、コール酸及び／又はコール酸アルブミン複合体、デオキシコール酸及び／又はデオキシコール酸・アルブミン複合体、並びにケノデオキシコール酸及び／又はケノデオキシコール酸・アルブミン複合体を含むことが特に好ましい。また、測定対象物質がプロゲステロンである場合は、第二の結合物質は、プロゲステロン・アルブミン複合体であることが好ましい。

[0134] (第二の結合物質を基板に固定化する方法)

第二の結合物質を基板に固定化する方法は、例えば、Nunc社の提供するTech Notes Vol. 2-12などに記載されており、一般的なELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 酵素結合免疫吸着法) 試薬を調製する公知の方法がいずれも使用可能である。また、基板上に自己組織化単分子膜 (SAM: Self-Assembled Monolayer) などを配することによる表面修飾を施しても良く、第二の結合物質を基板に固定化する方法としては、物理吸着を用いた方法、及び共有結合による化学結合を用いた方法のいずれの方法も採用可能である。第二の結合物質を基板に固定させた後に、第二の結合物質が被覆されていない基板表面を覆うブロッキング剤 (第二のブロッキング剤) としては、公知の物質、例えば、BSA、グロブリン、スキムミルク、カゼイン、大豆由来成分、魚由来成分又はポリエチレングリコールなど、並びに上記物質又は上記物質と性質が同じである物質を含む市販

の免疫反应用ブロッキング剤などが使用可能である。これらのブロッキング剤は、必要に応じて熱や酸・アルカリ等により部分変性などの前処理を施すことも可能である。

[0135] (検出領域<テストエリア>)

本発明においては、基板上に生体試料中の測定対象物質の有無を検出するテストエリアを設けることができる。このテストエリアでは、例えば測定対象物質である抗原を捕まえて、抗原に結合した標識の量を検出し定量することで、抗原を定量することが可能となる。あるいは、抗原に結合した標識のみを結合できないようにし、抗原に結合していない標識のみを捕獲して、抗原の結合した標識の量を算出する方法により、抗原を定量することが可能となる。この検出方法は競合法と呼ばれているが、ここでは、競合法に関する基板について説明する。

[0136] 基板のテストエリアには、標識粒子上に存在する結合物質（例えば抗体）と反応するサイトを有することが好ましい。本発明の好ましい一態様としては、生体試料中に存在する抗原を、基板のテストエリア上に有する態様が好ましい。この場合、抗原とBSAを縮合剤の存在下で反応させて、抗原・BSA結合体を作製し、この結合体をテストエリア上に吸着させることでテストエリアを作製することが可能となる。測定対象物質である抗原－BSA結合体は、緩衝液に溶解させて、基板上に点着して、一定時間放置した後、上清を吸引し、乾燥させるなどの方法で基板上のテストエリアに結合させることが可能である。

[0137] (参照領域<コントロールエリア>)

本発明では、測定環境、特に測定温度の影響を極力抑えるために、基板上にコントロールエリアを有し、テストエリアの情報を、コントロールエリアの情報で規格化することによって、環境依存性を非常に低く抑えることが可能となる。コントロールエリアとしては、使用する生体試料の中に存在する測定対象物質の量に依存せず、すべての標識と結合することが可能なように設計されていることが好ましい。標識粒子上に存在する抗体すべてに相互作用

用する抗体を有することが好ましい。このように設計することによって、テストエリアの情報をコントロールエリアの情報で規格化することにより、例えば、低温環境で、生体試料の流れや、反応速度が影響を受けた場合でも、規格化によってその影響をキャンセルして、常に精度よく、測定環境に影響されない結果を得ることが可能になる。

[0138] コントロールエリアに存在させる好ましい抗体としては、標識粒子上に存在する結合物質（例えば、抗体）を認識する機能を持ち、その抗体がマウス由来であれば、抗マウス抗体であることが好ましく、標識粒子上の抗体が、ヤギ由来であれば、抗ヤギ抗体であることが好ましい。これらコントロールエリア上の抗体は、緩衝液に溶解させて、基板上に点着して、一定時間放置した後、上清を吸引し、乾燥させるなどの方法で基板に結合させることが可能である。

[0139] （ブロッキング剤）

例えば、競合法において、測定対象物質を含まない陰性となる生体試料だけでなく、測定対象物質を含む陽性となる生体試料に対しても反応して陰性となる生体試料が存在しており、高値乖離の問題の解決が課題として認識されている。このような擬陰性を示す原因は明確にはなっていないが、抗体に覆われていない標識粒子表面と、検出領域（テストエリア）との非特異的な相互作用により、本来結合してほしくない標識粒子が存在することが原因の一つではないかと考えられている。また、テストエリア上に存在する物質と同じ物質が標識粒子表面上に存在する場合にも、遊離した抗体などが生体試料中に存在する場合には、その抗体が、テストエリア上に存在する物質と、標識粒子表面上の物質のどちらにも結合することで、測定対象物質を含む陽性となる生体試料を測定した場合においても陰性として検出される場合がある。

一般的に、固相表面（例えば標識粒子表面、基板の金膜表面）、への非特異吸着抑制のためにBSAでのブロッキングが用いられている。

[0140] 測定対象物質と結合性を有する免疫グロブリン以外の免疫グロブリンとし

て具体的には、測定対象物質とは異なる抗原によって免疫された動物の血清から調製する抗血清、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、その測定対象物質によって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片〔例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、又は $F v$ 〕などを用いることが可能である。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清や培養上清から公知の方法により調製した抗体も使用可能である。

[0141] (抗体)

本発明において、抗体は、その動物種やサブクラス等によらず使用できる。例えば、本発明に用いることが可能な抗体は、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ニワトリなど免疫反応が起こり得る生物に由来する抗体、具体的には、マウス $I g G$ 、マウス $I g M$ 、ラット $I g G$ 、ラット $I g M$ 、ハムスター $I g G$ 、ハムスター $I g M$ 、ウサギ $I g G$ 、ウサギ $I g M$ 、ヤギ $I g G$ 、ヤギ $I g M$ 、ヒツジ $I g G$ 、ヒツジ $I g M$ 、ウシ $I g G$ 、ウシ $I g M$ 、トリ $I g Y$ 等であり、ポリクローナル又はモノクローナルのどちらも使用可能である。断片化抗体は、少なくとも1つの抗原結合部位を持つ、完全型抗体から導かれた分子であり、具体的には $F a b$ 、 $F(a b')_2$ 等である。これらの断片化抗体は、酵素あるいは化学的処理によって、もしくは遺伝子工学的手法を用いて得られる分子である。

[0142] (キットの他の要素)

本発明のキットは、測定対象物質を測定する方法に用いられるものであり、測定対象物質が胆汁酸である場合には、胆汁酸測定診断用のキットであり、測定対象物質がプロゲステロンである場合には、プロゲステロン測定診断用のキットである。本発明において、測定対象物質の測定を実施するに当たり、第二の結合物質を固定した基板と、蛍光粒子などの標識粒子を保持した部材を含むセンサチップを含むものであるが、表面プラズモン励起装置、及

び蛍光測定デバイスなどの、測定対象物質の測定に使用される各種の器材又は装置を含めてもよい。さらに、キットの要素として、既知量の測定対象物質を含む試料、取扱説明書などを含めてもよい。

[0143] [生体試料中の測定対象物質を測定する方法]

本発明による生体試料中の測定対象物質を測定する方法は、生体試料を、測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と反応させる反応工程と、上記測定対象物質又は上記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板に、上記反応工程で得られた反応産物を接触させて、標識粒子を基板上に捕捉させる捕捉工程と、上記測定対象物質に関連した標識情報を取得する、標識情報取得工程と、を含む方法であり、上記標識粒子は、式(1)で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である。

[0144] 本発明においては、測定対象物質の量に関連した標識情報を取得する測定対象物質関連標識情報取得工程により、測定対象物質を測定する。

本発明における測定は、測定対象物質の量の測定である限り、最も広い概念として解釈される。測定方法の具体的な実施態様としては、競合法及びサンドイッチ法が挙げられるが、競合法が好ましい。

[0145] 競合法の一例として、プロゲステロンを定量する場合を以下に説明する。プロゲステロン以外の物質を定量する場合も、同様に実施することができる。

競合法では、まず、プロゲステロン・アルブミン結合体が固定化されているプロゲステロン免疫測定用基板に、プロゲステロンを含む生体試料及び抗プロゲステロン抗体標識蛍光粒子を接触させる。その生体試料中にプロゲステロンが存在しない場合には、抗プロゲステロン抗体標識蛍光粒子と、基板上のプロゲステロン(即ち、プロゲステロン・アルブミン結合体中のプロゲステロン)とにより、基板上で抗原抗体反応が起こる。一方、生体試料中にプロゲステロンが存在する場合には、生体試料中のプロゲステロンと抗プロ

グステロン抗体標識蛍光粒子との間で抗原抗体反応が起こり、抗プログステロン抗体標識蛍光粒子と、基板上的プログステロン（即ち、プログステロン・アルブミン結合体中のプログステロン）との間の抗原抗体反応が阻害される。上記の反応が終了した後、基板上的アルブミンに結合しなかった抗プログステロン抗体標識蛍光粒子を除去する。次いで基板上的免疫複合体（即ち、抗プログステロン抗体標識蛍光粒子と、基板上的プログステロン・アルブミン結合体中のプログステロンとの複合体）の形成の度合いを蛍光強度として検出することにより、生体試料中のプログステロンの濃度などを測定することができる。

[0146] 競合法における蛍光の測定形態は、プレートリーダー測定、あるいはフロー測定の内いずれかの測定を採用することが可能であり、例えば、以下の方法により測定することができる。予め、プログステロン濃度が異なるプログステロン量既知の試料を複数用意し、この試料及び抗プログステロン抗体標識蛍光粒子を予め混合する。この混合液を、プログステロン・アルブミン結合体が固定化されている領域に接触させる。プログステロン・アルブミン結合体が固定化されている領域からの蛍光信号を、特定の時間間隔で混合液が結合体に接触している間、複数の蛍光信号として測定する。この複数の蛍光信号から、各プログステロン濃度において、蛍光量の時間変化（傾き）を求める。この時間変化をY軸、プログステロン濃度をX軸としてプロットし、最小二乗法等の適宜ふさわしいフィッティング方法を用いて、蛍光量の時間変化に対するプログステロン濃度の関係式を取得する。このように取得した関係式に基づき、検査目的とする生体試料を用いた蛍光量の時間変化の結果を用いて、生体試料に含まれるプログステロン量を定量することができる。

[0147] このプログステロン量の定量は、短時間で行うことが好ましい。具体的には、10分以内に行われることが好ましく、8分以内がより好ましく、更には6分以内で行われることが好ましい。この定量時間には、最小二乗法等の適宜ふさわしいフィッティング方法を用いて予め取得した蛍光量の時間変化とプログステロン濃度との関係式を利用して、試料及び抗プログステロン抗

体標識蛍光粒子を、プロゲステロン・アルブミン結合体が固定化されている検出領域に接触させてから、検査目的とする生体試料を用いた蛍光量の時間変化の結果を基に生体試料に含まれるプロゲステロン量を換算する時間が含まれていることが好ましい。

[0148] サンドイッチ法では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により測定対象物質を測定することができる。測定対象物質を含む可能性のある生体試料と、測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する蛍光粒子とを、基板上で接触させる。生体試料に測定対象物質が存在する場合には、測定対象物質と蛍光粒子と基板との間で結合反応（抗原抗体反応など）が生じる。その結果、生体試料中に測定対象物質が存在する場合には、基板に結合した第二の結合物質と、測定対象物質と、第一の結合物質を有する蛍光粒子とからなる免疫複合体が形成される。サンドイッチ法では、第二の結合物質と、測定対象物質と、第一の結合物質を有する蛍光粒子との反応が終了した後、上記免疫複合体を形成しなかった、第一の結合物質を有する蛍光粒子を除去し、洗浄する。次いで免疫複合体の形成の度合いを蛍光強度として検出することにより、測定対象物質の濃度などを測定することができる。なお、蛍光強度と測定対象物質の濃度は、正の相関関係がある。

[0149] (流路)

本発明の好ましい態様においては、測定対象物質を含む可能性のある生体試料と、第一の結合物質を有する標識粒子とを混合した混合液を、基板上に適用し、流路に展開することができる。流路とは、生体試料と、第一の結合物質を有する標識粒子とを、検出領域まで流下する通路であれば、特に制限はない。好ましい流路の態様としては、第一の結合物質を有する標識粒子を含む生体試料液を点着する点着口、検出領域としての金属膜、及び金属膜を超えて流路が存在し、生体試料が、金属膜上を通過できる構造を有するものである。好ましくは、金属膜に対して、点着口とは反対側に、吸引口を設けることができる。

[0150] (表面プラズモン蛍光測定)

本発明における蛍光などの標識の検出方法としては、特に限定されないが、例えば、蛍光強度を検出することができる機器、具体的には、マイクロプレートリーダー、又は表面プラズモン励起による蛍光検出（SPF）を行うためのバイオセンサーなどを用いて蛍光強度を検出することが好ましい。好ましくは、表面プラズモン共鳴による蛍光検出により、測定対象物質の量に関連した標識情報を取得することができる。

[0151] なお、蛍光の測定の形態は、プレートリーダー測定でもよいし、フロー測定でもよい。表面プラズモン励起による蛍光検出法（SPF法）は、落射励起による蛍光検出法（落射蛍光法）よりも高感度に測定することができる。

[0152] 表面プラズモン蛍光（SPF）バイオセンサーとしては、例えば、特開2008-249361号公報に記載されているような、所定波長の励起光を透過させる材料から形成された光導波路と、この光導波路の一表面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを光導波路に通し、上記光導波路と金属膜との界面に対して表面プラズモンを発生させる入射角で入射させる光学系と、上記表面プラズモンによって増強されたエバネッセント波によって励起されることによって発生する蛍光を検出する蛍光検出手段とを備えたセンサーを用いることができる。

[0153] 本発明の蛍光粒子を用いた表面プラズモン励起による蛍光検出（SPF）系は、好ましくは、基板上の金属膜上に固定化された測定対象物質の量に依存した蛍光物質からの蛍光を検出するアッセイ方法であり、例えば、溶液中での反応の進行により、光学的な透明度の変化を濁度として検出する、いわゆるラテックス凝集法とは異なる方法である。ラテックス凝集法は、ラテックス試薬中の抗体感作ラテックスと生体試料中の抗原が、抗体反応により結合し凝集する。この凝集塊は時間と共に増大し、この凝集塊に近赤外光を照射して得られた単位時間当たりの吸光度変化から、抗原濃度を定量化する方法である。本発明では、ラテックス凝集法に比べて、非常に簡便な測定対象物質の検出方法を提供できる。

[0154] （規格化）

さらに本発明の方法は、標識粒子の量に関連した標識情報を取得する、標識粒子関連標識情報取得工程；及び測定対象物質の量に関連した標識情報を取得する測定対象物質関連標識情報取得工程で取得した標識情報を、標識粒子関連標識情報取得工程で取得した標識情報により規格化する、規格化工程を含む方法でもよい。

[0155] ここで、生体試料と、測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子とを含む混合液を、検出領域（テストエリア）と参照領域（コントロールエリア）とを有する基板に接触させて検出領域と参照領域上に表面プラズモンを発生させ、放出された蛍光の強度を測定する工程のうち、検出領域上で発生する表面プラズモンによる蛍光の強度を測定する工程が、測定対象物質の量に関連した標識情報を取得する測定対象物質関連標識情報取得工程であり、参照領域上で発生する表面プラズモンによる蛍光の強度を測定する工程が、標識粒子関連標識情報取得工程である。この2つの工程で取得した蛍光強度の単位時間における増加速度を蛍光シグナル値の変化率として求め、検出領域のシグナル値の変化率を参照領域のシグナル値の変化率で除する工程が規格化工程である。

[0156] 以下に、本発明の実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。なお、以下の実施例に示される材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例により限定的に解釈されるべきものではない。

## 実施例

[0157] < 1 - 1 > 化合物の合成

用語は以下の意味を示す。

MS : 質量分析 (mass spectrometry)

ESI : エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization)

NMR : 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance)

Me : メチル基

Et : エチル基

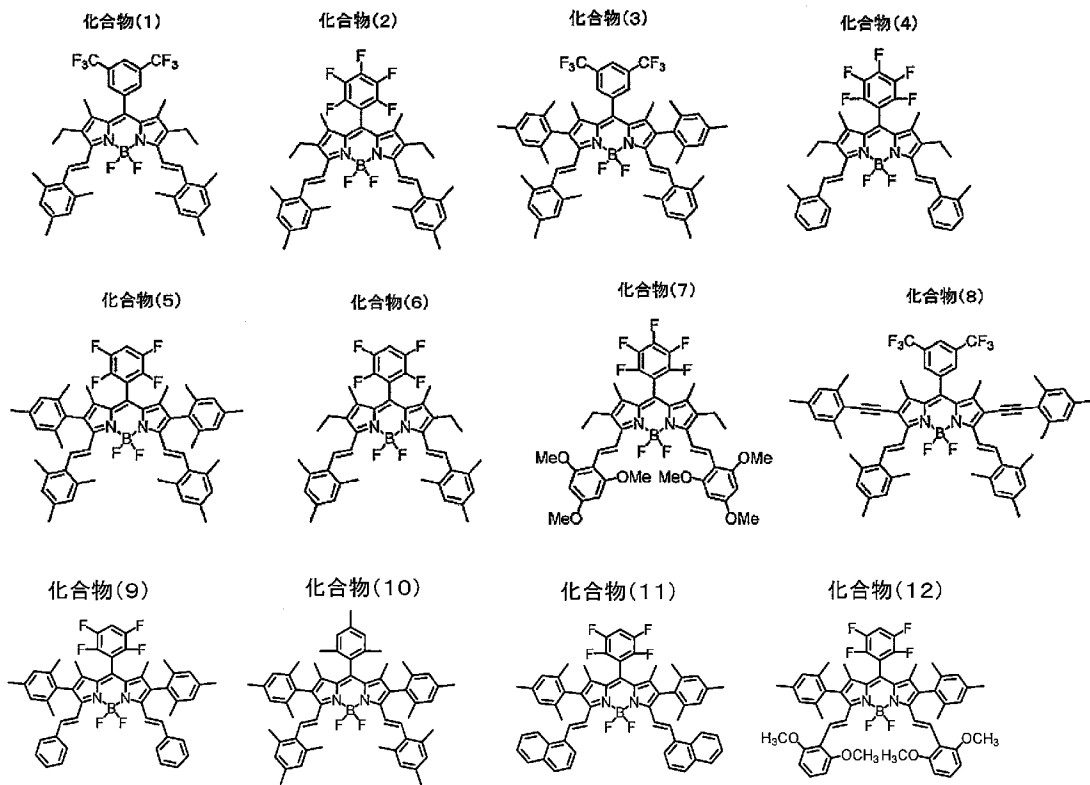
Bu : n-ブチル基

PL : フォトルミネセンス

THF : テトラヒドロフラン

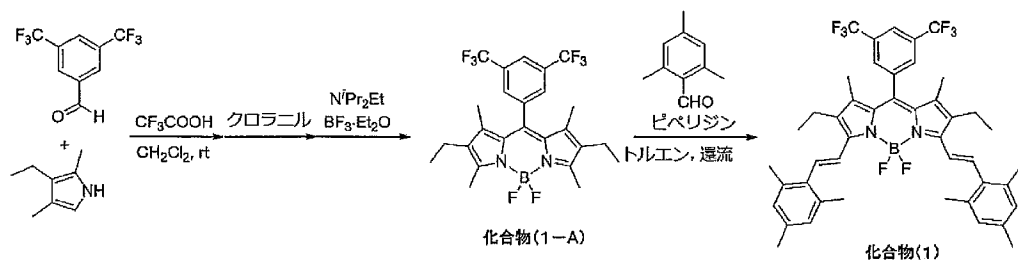
[0158] 化合物(1)～化合物(12)の構造を以下に示す。

[化39]



[0159] <化合物(1)の合成>

[化40]



[0160] 化合物(1-A)の合成

100 mL三ツロフラスコに、窒素雰囲気下、3,5-ビス(トリフルオ

ロメチル) ベンズアルデヒド 1.00 g 及びジクロロメタン 20 mL を導入し、室温で攪拌した。水冷しながら 3-エチル-2,4-ジメチルピロール 0.98 g を滴下し、続いて、トリフルオロ酢酸を 2 滴加えた後、室温で 30 分間攪拌した。水冷しながらクロラニル 1.0 g を加え、室温で 10 分間攪拌した後、水冷しながらジイソプロピルエチルアミン (N<sub>i</sub>P r<sub>2</sub>E t) 3.67 g を滴下し、室温で 15 分間攪拌した。続いて、水冷しながら三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 5.6 mL を滴下し、室温で 30 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウムおよびトルエンを滴下し、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル) で精製した後、メタノールで再結晶することにより、化合物 (1-A) を 1.28 g 得た。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ 8.03 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 2.54 (s, 6H), 2.31 (q, J=7.6 Hz, 4H), 1.21 (s, 6H), 1.00 (t, J=7.6 Hz, 6H).

#### [0161] 化合物 (1) の合成

100 mL 三口フラスコに、化合物 (1-A) 100 mg、2,4,6-トリメチルベンズアルデヒド 115 mg、及び脱水トルエン 5 mL を導入し、室温で攪拌した。ピペリジン 1 mL および p-トルエンスルホン酸 1 水和物 (和光純薬工業 (株) 社製、試薬特級) 1 片を加えて 140°C で溶媒を留去しながら 1 時間攪拌し、放冷後に脱水トルエン 5 mL を加えて 140°C で溶媒を留去しながら 1 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮して得られた粗生成物を分取 TLC (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル) で精製した後、メタノールで再結晶することにより、化合物 (1) を 71 mg 得た。化合物の同定は、<sup>1</sup>H-NMR と ESI-MS により行った。

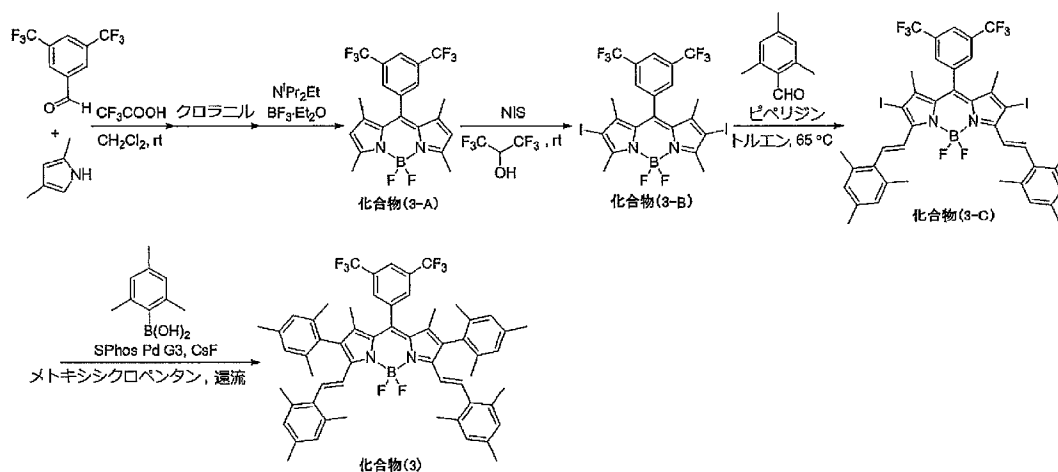
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ 8.06 (s, 1H), 7.87 (s, 2H), 7.38 (d, J=17.2 Hz, 2H), 7.3

2 (d,  $J = 17.2$  Hz, 2H), 6.93 (s, 4H), 2.63 (q,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 2.44 (s, 12H), 2.30 (s, 6H), 1.27 (s, 6H), 1.17 (t,  $J = 7.6$  Hz, 6H).

ESI-MS:  $[M-H]^- = 775.8$

[0162] <化合物(3)の合成>

[化41]



[0163] 化合物(3-A)の合成

1 L ミツロフラスコに、窒素雰囲気下、3, 5-ビス(トリフルオロメチル)ベンズアルデヒド 16.22 g、及びジクロロメタン 200 mL を導入し、室温で攪拌した。水冷しながら、2, 4-ジメチルピロール 15.75 g を滴下し、続いて、トリフルオロ酢酸を 5 滴加えた後、室温で 30 分間攪拌した。水冷しながらクロラニル (Chloranil) 19.45 g を加え、室温で 30 分間攪拌した後、水冷しながらジイソプロピルエチルアミン ( $NiPr_2Et$ ) 80 mL を滴下し、室温で 30 分間攪拌した。続いて、水冷しながら三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 ( $BF_3 \cdot Et_2O$ ) 85 mL を滴下し、室温で 30 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム 400 mL を滴下し、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル) で精製した後、エタノールで再結晶することにより、化合物(3-A)を 4.40 g 得た。

## [0164] 化合物（3-B）の合成

300 mL三口フラスコに、化合物（3-A）を3.05 g、及び1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール60 mLを導入し、室温で攪拌した。N-ヨードスクシンイミド3.60 gを導入し、室温で1時間半攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、チオ硫酸ナトリウム水溶液50 mL（チオ硫酸ナトリウム10 g溶解）、及び塩化メチレン100 mLを加え、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物をエタノールで再結晶することにより、化合物（3-B）を3.90 g得た。

## [0165] 化合物（3-C）の合成

100 mL三口フラスコに、化合物（3-B）を2.2 g、2, 4, 6-トリメチルベンズアルデヒド2.6 g及び脱水トルエン40 mLを導入し、室温で攪拌した。ピペリジン4 mLを導入して65°Cで1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮して得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン／酢酸エチル）で精製した後、エタノールで再結晶することにより、化合物（3-C）を2.4 g得た。

## [0166] 化合物（3）の合成

100 mL三口フラスコに、化合物（3-C）を96 mg、2, 4, 6-トリメチルフェニルボロン酸64 mg、フッ化セシウム130 mg、及びメトキシシクロペンタン10 mLを導入し、室温で攪拌しながら、減圧脱気後、窒素雰囲気にした。ここに、SPhos Pd G3（Aldrich製）63 mgを加え、1時間加熱還流した。飽和塩化アンモニウム水溶液10 mL、及び酢酸エチル10 mLを加え、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物を分取TLC（展開溶媒：ヘキサン／酢酸エチル）で精製した後、エタノールで再結晶することにより、化合物（3）を16 mg得た。化合物の同定は、<sup>1</sup>H-NMRとESI-MSにより行った。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ 8.02 (s, 1H),

8.00 (s, 2H), 7.42 (d,  $J=22.4$  Hz, 2H), 6.92 (s, 4H), 6.80 (s, 4H), 6.67 (d,  $J=22.4$  Hz, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.17 (s, 6H), 2.16 (s, 6H), 2.11 (s, 12H), 2.01 (s, 12H).

ESI-MS:  $[M-H]^- = 955.8$

[0167] <化合物(2)の合成>

化合物(3)の合成において、3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンズアルデヒドを2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンズアルデヒドに置き換え、さらに2,4-ジメチルピロールを2,4-ジメチル-3-エチルピロールに置き換えたこと以外は、同様にして合成を行い、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル)で精製した後、ジクロロメタン/メタノールで再結晶することにより、化合物(2)を8mg得た。化合物の同定は $^1H-NMR$ 測定で行い、Org.Biomol.Chem., 2010, 8, 4546-4553と同様のNMRスペクトルであることを確認した。

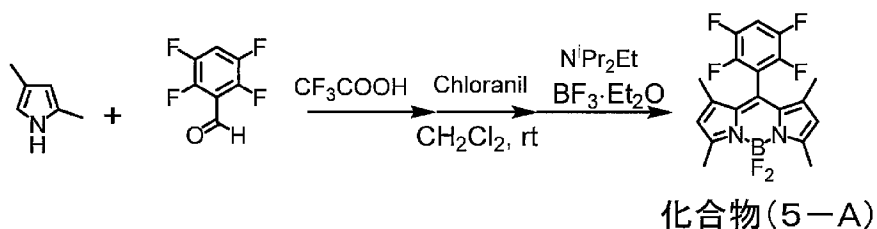
[0168] <化合物(4)の合成>

化合物(2)の合成において、2,4,6-トリメチルベンズアルデヒドを $o$ -トルアルデヒドに置き換えたこと以外は同様にして合成し、化合物(4)を合成した。化合物の同定は、 $^1H-NMR$ とESI-MSにより行った。 $400MHz$   $^1H-NMR$ スペクトルは図1に示す。

ESI-MS:  $[M-H]^- = 673.3$

[0169] <化合物(5)の合成>

[化42]

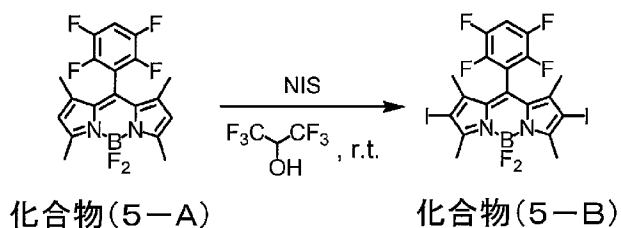


[0170] 化合物(5-A)の合成

500 mL三口フラスコに、窒素雰囲気下、2,4-ジメチルピロール 1.16 mL及びジクロロメタン140 mLを導入し、室温で攪拌した。2,3,5,6-テトラフルオロベンズアルデヒド1.0 g、トリフルオロ酢酸1滴を加えた後、室温で15分間攪拌した。クロラニル (Chloranil) 1.38 gを加え、室温で15分間攪拌した後、水冷しながらジイソプロピルエチルアミン (N<sub>i</sub>P<sub>r</sub><sub>2</sub>E<sub>t</sub>) 6.8 mLを滴下し、室温で20分間攪拌した。続いて、水冷しながら三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) 7.8 mLを滴下し、室温で30分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム 400 mLを滴下し、ジクロロメタンで抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル)で精製した後、メタノールで再結晶することにより、化合物(5-A)を360 mg得た。

[0171] 化合物(5-B)の合成

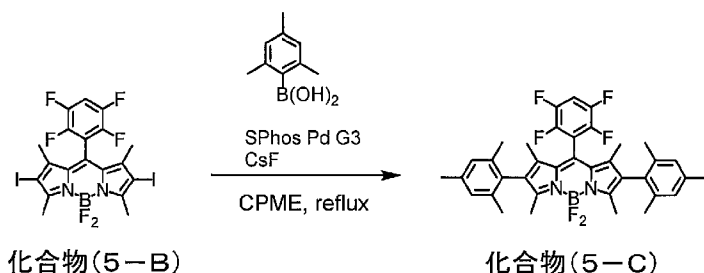
[化43]



[0172] 300 mL三口フラスコに、化合物(5-A)を300 mg、及び1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール8 mLを導入し、室温で攪拌した。N-ヨードスクシンイミド409 mgを導入し、室温で1時間半攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、塩化メチレン40 mLを加え、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、ろ過を施し減圧濃縮した。この粗生成物にエタノールを加えて分散洗浄およびろ過を施すことにより、化合物(5-B)を382 mg得た。

[0173] 化合物(5-C)の合成

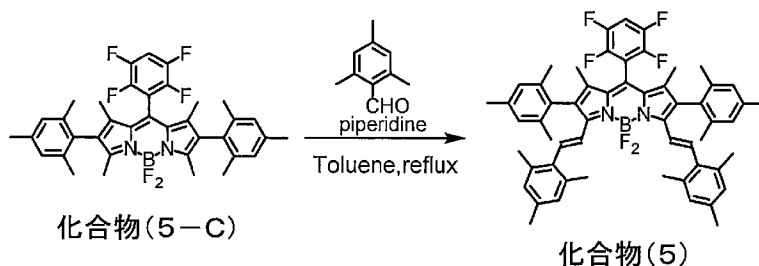
## [化44]



[0174] 100 mL三口フラスコに、化合物(5-B)を278 mg、2,4,6-トリメチルフェニルボロン酸564 mg、フッ化セシウム653 mg、及びメトキシシクロペンタン43 mLを導入し、室温で攪拌しながら、減圧脱気後、窒素雰囲気にした。ここに、SPhos Pd G3 (Aldrich製) 269 mgを加え、1時間加熱還流した。酢酸エチル250 mLを加え、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この組成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル)で精製した後、ジクロロメタン5 mLに溶解させ、さらにメタノール15 mLを加えた後にジクロロメタンを留去し、再沈殿させた。沈殿物をろ過し、化合物(5-C) 206 mgを得た。

[0175] 化合物(5)の合成

## [化45]



[0176] 100 mL三口フラスコに、化合物(5-C)を50 mg、トルエン5 mL、2,4,6-トリメチルベンズアルデヒド46  $\mu$ l、ピペリジン400  $\mu$ l、p-トルエンスルホン酸1片を導入し、窒素下で1時間加熱還流した。2,4,6-トリメチルベンズアルデヒド46  $\mu$ lを追添して1時間加熱還流させた後、ピペリジン200  $\mu$ lを追添してさらに1時間加熱還流さ

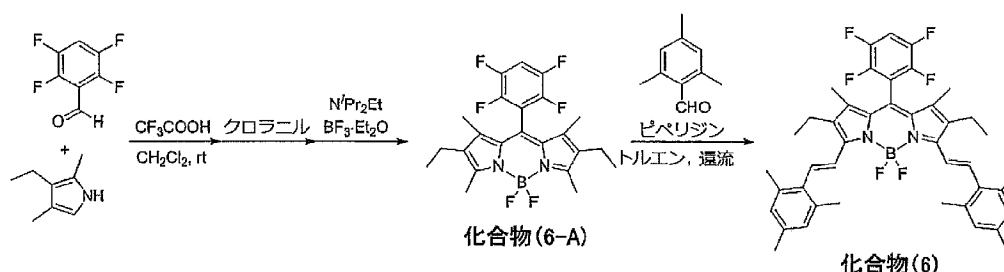
せた。反応終了後、減圧濃縮し、この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン／トルエン）で精製した後、ジクロロメタン3 mLに溶解させ、メタノール15 mLを加えた後にジクロロメタンを除去し、再沈殿させることにより、化合物（5）を16 mg得た。化合物の同定は、 $^1\text{H-NMR}$ とESI-MSにより行った。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) :  $\delta$  7.43 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.29–7.21 (m, 1H), 6.94 (s, 4H), 6.80 (s, 4H), 6.69 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.23 (s, 6H), 2.08 (s, 12H), 2.03 (s, 12H), 1.33 (s, 6H).

ESI-MS :  $[\text{M-H}]^- = 891.4$

#### [0177] <化合物（6）の合成>

##### [化46]



#### [0178] 化合物（6-A）の合成

100 mL三口フラスコに、窒素雰囲気下、2, 3, 5, 6-テトラフルオロベンズアルデヒド1.00 g及びジクロロメタン20 mLを導入し、室温で攪拌した。水冷しながら3-エチル-2, 4-ジメチルピロール0.98 gを滴下し、続いて、トリフルオロ酢酸を2滴加えた後、室温で15分間攪拌した。水冷しながらクロラニル1.0 gを加え、室温で10分間攪拌した後、水冷しながらジイソプロピルエチルアミン3.67 gを滴下し、室温で15分間攪拌した。続いて、水冷しながら三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体5.6 mLを滴下し、室温で60分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム及びトルエンを滴下し、抽出・分液して得られた有機層を無水硫酸ナトリ

ウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：トルエン）で精製した後、メタノールで再結晶することにより、化合物（6-A）を0.76g得た。

$^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) :  $\delta$  7.20–7.30 (m, 1H), 2.54 (s, 6H), 2.33 (q, J=7.6Hz, 4H), 1.51 (s, 6H), 1.01 (t, J=7.6Hz, 6H).

[0179] 化合物（6）の合成

100mL三口フラスコに、化合物（6-A）を181mg、2, 4, 6-トリメチルベンズアルデヒド237mg、及び脱水トルエン10mLを導入し、室温で攪拌した。ピペリジン2mLおよびp-トルエンスルホン酸1水和物（和光純薬工業（株）社製、試薬特級）2片を加えて140°Cで溶媒を留去しながら1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮して得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：トルエン）で精製した後、アセトニトリルで再結晶することにより、化合物（6）を194mg得た。化合物の同定は、 $^1\text{H-NMR}$ とESI-MSにより行った。

$^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) :  $\delta$  7.40 (d, J=17.2Hz, 2H), 7.32 (d, J=17.2Hz, 2H), 7.20–7.30 (m, 1H), 6.93 (s, 4H), 2.66 (q, J=7.6Hz, 4H), 2.44 (s, 12H), 2.30 (s, 6H), 1.55 (s, 6H), 1.19 (t, J=7.6Hz, 6H).

ESI-MS : [M-H]<sup>-</sup> = 711.7

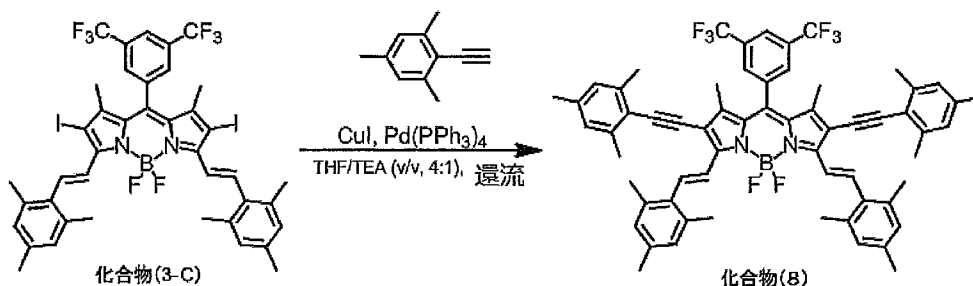
[0180] <化合物（7）の合成>

化合物（2）の合成において、2, 4, 6-トリメチルベンズアルデヒドを2, 4, 6-トリメトキシベンズアルデヒドに置き換えたこと以外は同様にして合成し、化合物（7）を合成した。化合物の同定は、 $^1\text{H-NMR}$ とESI-MSにより行った。400MHz  $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを図2に示す。

ESI-MS : [M+H]<sup>+</sup> = 825.3

## [0181] &lt;化合物(8)の合成&gt;

[化47]



## [0182] 化合物(8)の合成

50 mLニ口フラスコに、化合物(3-C)を97 mg、2-エチニル-1,3,5-トリメチルベンゼン58 mg、ヨウ化銅(I)3.8 mg、THF4 mL、及びトリエチルアミン1 mLを導入し、室温で攪拌しながら、減圧脱気後、窒素雰囲気にした。ここにテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ )を加え、2時間加熱還流した。減圧留去で溶媒を除去し、そこにジクロロメタン30 mLを加え、水20 mLと飽和塩化ナトリウム水溶液20 mLで洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで予備乾燥した後、減圧濃縮した。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:ヘキサン/トルエン)で精製した後、メタノールで再結晶することにより、化合物(8)を26 mg得た。化合物の同定は、 $^1\text{H-NMR}$ とESI-MSにより行った。

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.60 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (s, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.88 (s, 4H), 6.85 (s, 4H), 2.36 (s, 12H), 2.34 (s, 12H), 2.28 (s, 6H), 2.27 (s, 6H).

ESI-MS:  $[\text{M-H}]^- = 1003.5$

## [0183] &lt;化合物(9)の合成&gt;

化合物(5-A)~化合物(5-C)を経由して化合物(5)を合成する

方法において、化合物（５）の合成における２，４，６－トリメチルベンズアルデヒドをベンズアルデヒドに置き換え、その他は同様の方法で合成することにより、化合物（９）を合成した。

[0184] <化合物（１０）の合成>

化合物（５－Ａ）～化合物（５－Ｃ）を経由して化合物（５）を合成する方法において、化合物（５－Ａ）の合成における２，３，５，６－テトラフルオロベンズアルデヒドを２，４，６－トリメチルベンズアルデヒドに置き換え、その他は同様の方法で合成することにより、化合物（１０）を合成した。

[0185] <化合物（１１）の合成>

化合物（５－Ａ）～化合物（５－Ｃ）を経由して化合物（５）を合成する方法において、化合物（５）の合成における２，４，６－トリメチルベンズアルデヒドを２－ホルミルナフタレンに置き換え、その他は同様の方法で合成することにより、化合物（１１）を合成した。

[0186] <化合物（１２）の合成>

化合物（５－Ａ）～化合物（５－Ｃ）を経由して化合物（５）を合成する方法において、化合物（５）の合成における２，４，６－トリメチルベンズアルデヒドを２，６－ジメトキシベンズアルデヒドに置き換え、その他は同様の方法で合成することにより、化合物（１２）を合成した。

[0187] <１－２>高輝度蛍光ラテックス分散液の作製

蛍光ラテックス粒子の作製を行った。ラテックス粒子としてはスチレンとアクリル酸の９／１（質量比）混合物を水中に分散させた状態で重合させて作製した、平均粒径１５０ｎｍの粒子を用いた。平均粒径は動的光散乱法を用いて測定した。上記で作製した固形分２％のラテックス粒子分散液（ラテックス分散液）（２５ｍＬ、固形５００ｍｇ）に対してＴＨＦ（５ｍＬ）を滴下して１０分攪拌した。そこに、化合物（１） $24\mu\text{mol/g}$ を含むＴＨＦ溶液（２．５ｍＬ）を１５分間かけて滴下した。表中の化合物量の $\mu\text{mol/g}$ はラテックスの固形１ｇに対する使用した化合物のモル数、質量％

はラテックスの固形 1 g に対する使用した化合物の質量%を表す。化合物の滴下終了後、30分攪拌した後、減圧濃縮してTHFを除去した。その後、遠心分離して粒子を沈殿させた後、超純水を加えて再度分散させることで固形分濃度 2%の高輝度蛍光ラテックス分散液を製造した。

また、化合物(1)の代わりに化合物(5)を用いて同様の操作を行い、化合物(5)を含む固形分濃度 2%の高輝度蛍光ラテックス分散液を製造した。

さらに、化合物(1) 24  $\mu\text{mol/g}$ と化合物(5) 12  $\mu\text{mol/g}$ を混合したものをを用いて同様の操作を行い、化合物(1)と化合物(5)を含む固形分濃度 2%の高輝度蛍光ラテックス分散液を製造した。

[0188] <2-1>抗プロゲステロン抗体で標識した蛍光粒子の調製

抗プロゲステロン抗体で標識した高輝度蛍光ラテックス粒子(平均粒径 150 nm)を、以下の通り調製した。

<1-2>で作製した固形分濃度が 2 質量%の高輝度蛍光ラテックス分散液 375  $\mu\text{L}$ に、50 mMのMES (2-モルホリノエタノルスルホン酸、同仁化学研究所社製)緩衝液(pH 6.0)を 117  $\mu\text{L}$ 、10 mg/mLのWSC (水溶性カルボジイミド)水溶液を 5  $\mu\text{L}$ 加え、室温で 15 分間攪拌した。その後、0.5 mg/mLの抗プロゲステロンモノクローナル抗体(GeneTex社製)を 182.4  $\mu\text{L}$ 添加し、室温で 1.5 時間攪拌した。2 mol/LのGlycine (和光純薬社製)水溶液を 37.5  $\mu\text{L}$ 添加し、15 分間攪拌した後、遠心分離(15,000 rpm、4°C、30分)にて、蛍光ラテックス粒子を沈降させた。上清液を取り除き、PBS (Phosphate Buffered Saline リン酸緩衝生理食塩水; 和光純薬社製)溶液(pH 7.4)を 750  $\mu\text{L}$ 加え、超音波洗浄機により蛍光ラテックス粒子を再分散させた。さらに遠心分離(15,000 rpm、4°C、15分)を行い、上清液を除いた後、1 質量%BSAを含むPBS (pH 7.4)溶液 750  $\mu\text{L}$ を加え、蛍光ラテックス粒子を再分散させることで、抗プロゲステロン抗体結合蛍光ラテックス粒子の 1 質量%溶液を得た。

[0189] <2-2>プロゲステロン-BSA結合体のクエン酸緩衝液の溶液の調製  
プロゲステロン-BSA結合体（BIO-RAD社製）150 $\mu$ gを、50 mM濃度のクエン酸緩衝液1 mL（pH 5.2, 150 mM NaCl）に添加して溶解させ、クエン酸緩衝液の溶液を得た。

[0190] <2-3>プロゲステロン-BSA結合体固定基板の製造  
ポリメチルメタクリレート（PMMA）の基体（三菱レイヨン（株）社製、アクリペット（登録商標）VH）を準備し、蒸着法により、厚さ50 nmの金膜を片面に蒸着し7 mmの幅に裁断して、同じ基板を7枚作製した。この基板の金蒸着面上に、1. で調製したプロゲステロン-BSA結合体のクエン酸緩衝液による溶液を点着して乾燥させ、プロゲステロン-BSA結合体を固定化した基板を作製した。

[0191] <2-4>基板の洗浄及びブロッキング  
このように調製した基板をセンサチップの流路に取り付ける前に、Tween 20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、和光純薬社製）を0.05質量%の濃度で含むPBS溶液（pH 7.4）を予め調製し、この溶液300 $\mu$ Lを用いて3回繰り返し洗浄した。洗浄終了後、金蒸着膜上のT4-BSA結合体の未吸着部分のブロッキングを行うため、1質量%カゼイン（Thermo Scientific社製）を含むPBS溶液（pH 7.4）を300 $\mu$ L添加し、1時間、室温で静置した。上記の洗浄用溶液で洗浄後、安定化剤としてImmunoassay Stabilizer（ABI社製）300 $\mu$ Lを添加し、室温で30分間放置し、溶液を除去して乾燥機を用いて水分を完全に取り除いた。

[0192] <2-5>センサチップの作製  
特開2010-190880号公報の第2の実施形態の構成となるように、流路型センサチップを作製した。その概略図を図3及び図4に示した。図3は、センサチップ1の概略図であり、図4は、センサチップ1の分解図である。センサチップ1は、上部部材2、中間部材3及び基板4から構成されている。上部部材2には、第一の容器5及び第二の容器6が設けられている

。なお、第一の容器5及び第二の容器6を併せて、容器群7と称する。基板4には、流路10が形成されており、流路10の上には、検出領域8及び参照領域9が形成されている。

[0193] <3-1>大型機（既存のプロゲステロン測定試薬）での測定

免疫測定で、当業者により広く使用されている大型機であるイムライズ1000（株式会社LSIメディエンス）により、取り扱い説明書に従い、プロゲステロンの量が既知である試料の測定を行い、プロゲステロンの測定値を得た。

[0194] <3-2>抗体標識粒子を用いたプロゲステロンの測定

各種濃度（0.00 ng/mL、0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、15.0 ng/mL、30.0 ng/mL、45.0 ng/mL）のプロゲステロンを含む試料を用意した。次に、<2-1>で調製した抗プロゲステロン抗体で標識した抗体標識粒子と各種試料の混合液を作製した時点での抗体標識粒子の濃度が、0.080%、0.040%、0.020%、0.010%、0.005%、0.002%、0.001%となるように、各抗体標識粒子の濃度のカップを複数準備し、それぞれの濃度のカップに上記で用意した各種濃度の試料を添加し、抗体標識粒子と試料との混合液を10分間攪拌しながら調製した。次に、2-5. で作製した基板を封入した流路型センサチップに抗体標識粒子と試料との混合液をそれぞれ点着した。点着後、ポンプ吸引を行いながら混合液を10  $\mu$ L/minの速度で混合液を流下させ、プロゲステロン-BSA結合体を固定した金膜面上に接触させてから、蛍光強度を1.5分間継続して測定した。各基板において得られた検出領域と参照領域のそれぞれの蛍光強度の単位時間における増加速度を蛍光シグナル値として求め、検出領域のシグナル値を参照領域のシグナル値で除することで規格化を行った。また、プロゲステロン濃度0の試料を用意して同様に、プロゲステロンを含まない試料からのシグナル値の規格化を行った。

[0195] <4>検量線の作成

<3-2>で求めたプロゲステロンの量が既知である試料から規格化した

蛍光シグナル値と、〈3-1〉で求めた大型機での測定値、との対応関係を求めることで、〈2-2〉で調製した、プロゲステロン-B S A 結合体を用いた基板に対して、検量線を作成した。文献「The Immunoassay Handbook Third Edition Edited by David Wild (2005)」に競合法の検量線として、シグモイド関数の4パラメータロジスティック曲線モデルが適用できることが記載されており、この方法に従って、近似線を得る方法として一般的に知られている最小二乗法を用いて、3-2. で測定した各プロゲステロン濃度における蛍光シグナル値の各点の最近傍を通る4パラメータロジスティック曲線を求め、検量線とした。

[0196] 以上のようにして求めた検量線から、各プロゲステロン濃度の試料の測定値を算出した。

[0197] 性能は検量線の規格を満たすかどうかで判定した。検量線は2箇所で規定した。一つ目は低濃度域の検量線の傾きであり、逆数を取って、2.0以内であることを規格とした。二つ目は高濃度域の測定点の検量線からの乖離（ズレ）であり、4%以内を規格とした。この範囲内では、測定値の変動係数が10%以内であり、且つ、正確度が10%以内であることが達成でき、高精度な測定が可能となる。

[0198] 低濃度域として、臨床的に意義のあるプロゲステロンの最小濃度である0.5 ng/mLにおける検量線の傾きを求めた。また、高濃度域として、プロゲステロン濃度が30.0 ng/mLと45.0 ng/mLのそれぞれの検量線からの乖離（ズレ）を求め、平均値を算出して評価した。結果を表3にまとめた。

[0199] 〈5〉比較用粒子の調製

〈5-1〉比較蛍光ラテックス粒子分散液の作製

〈1-2〉で作製したラテックス粒子分散液の固形分濃度2質量%の水分散液100 mLにメタノール100 mLを加え、10分間、室温で攪拌した。一方、別途用意した蛍光色素（比較化合物：特許3442777号公報記載の化合物5）溶液（N,N-ジメチルホルムアミド1 mL、CHCl<sub>3</sub> 9 mL

、エタノール16 mLに溶解)を60分間かけてゆっくりラテックス粒子分散液に滴下した。滴下完了後、エバポレーターで有機溶媒を減圧留去した後、遠心分離とPBS水溶液への再分散を3回繰り返し、精製を行うことで、比較用蛍光ラテックス粒子分散液を調製した。

[0200] <5-2>抗プロゲステロン抗体で標識した比較用抗体標識粒子の調製

<2-1>で調製した蛍光ラテックス粒子の調製において、蛍光ラテックス粒子の代わりに、<5-1>で調製した2質量% (固形分濃度) の比較用蛍光ラテックス粒子に置き換え、それ以外の作業は同様に行って、比較用抗体標識粒子を調製した。それ以外の作業は同様に<4>の測定まで実施した。

[0201] <6>粒子蛍光強度の測定

上記で固形分濃度2質量%の蛍光ラテックス分散液を超純水で200倍に希釈し、蛍光分光光度計RF-5300PC (島津製作所製) の励起光を658nmに設定し、測定を行った。蛍光ラテックス分散液の蛍光強度が測定範囲を超えるほど高い場合には、蛍光強度の極大値が測定可能な範囲まで超純水で希釈を行った。7-1. で作製した蛍光ラテックス分散液の発光スペクトルの蛍光強度の積分値に対する、蛍光ラテックス分散液の発光スペクトルの蛍光強度の積分値を粒子蛍光強度 (相対値) とした。算出に用いた計算式を以下に示す。

蛍光強度 (相対値) = (蛍光ラテックス分散液の発光スペクトルの蛍光強度の積分値) / (比較例で作製した蛍光ラテックス分散液の発光スペクトルの蛍光強度の積分値)

[0202] <評価基準>

低濃度域の検量線傾きの逆数は、2.0以下の場合の判定をAとし、2.0より大きい場合の判定をBとした。

高濃度域での検量線からのズレは、4%以下の場合の判定をAとし、4%より大きい場合の判定をBとした。

[0203]

[表3]

	化合物	粒子濃度	粒子 蛍光強度 (相対値)	低濃度域の検量 線傾きの逆数		高濃度域での検 量線からのズレ	
					判定		判定
実施例 1	(1)、(5)	0.080 質量%	12.1	1.7	A	1.8%	A
実施例 2	(1)、(5)	0.040 質量%	12.1	1.6	A	1.9%	A
実施例 3	(1)、(5)	0.020 質量%	12.1	1.5	A	2.0%	A
実施例 4	(1)、(5)	0.010 質量%	12.1	1.4	A	2.4%	A
実施例 5	(1)、(5)	0.005 質量%	12.1	1.3	A	2.9%	A
実施例 6	(1)、(5)	0.002 質量%	12.1	1.2	A	3.3%	A
実施例 7	(1)、(5)	0.001 質量%	12.1	1.1	A	3.4%	A
実施例 8	(1)	0.080 質量%	5.8	2.0	A	2.0%	A
実施例 9	(1)	0.040 質量%	5.8	1.9	A	2.4%	A
実施例 10	(1)	0.020 質量%	5.8	1.8	A	2.8%	A
実施例 11	(1)	0.010 質量%	5.8	1.7	A	3.2%	A
実施例 12	(1)	0.005 質量%	5.8	1.6	A	3.4%	A
実施例 13	(1)	0.002 質量%	5.8	1.5	A	3.6%	A
実施例 14	(1)	0.001 質量%	5.8	1.4	A	3.8%	A
実施例 15	(5)	0.080 質量%	7.0	1.9	A	1.9%	A
実施例 16	(5)	0.040 質量%	7.0	1.8	A	2.2%	A
実施例 17	(5)	0.020 質量%	7.0	1.7	A	2.5%	A
実施例 18	(5)	0.010 質量%	7.0	1.6	A	3.1%	A
実施例 19	(5)	0.005 質量%	7.0	1.5	A	3.3%	A
実施例 20	(5)	0.002 質量%	7.0	1.4	A	3.5%	A
実施例 21	(5)	0.001 質量%	7.0	1.3	A	3.6%	A
比較例 1	比較化合物	0.080 質量%	1.0	3.8	B	2.0%	A
比較例 2	比較化合物	0.040 質量%	1.0	2.0	A	4.1%	B
比較例 3	比較化合物	0.020 質量%	1.0	1.9	A	4.5%	B
比較例 4	比較化合物	0.010 質量%	1.0	1.8	A	5.2%	B
比較例 5	比較化合物	0.005 質量%	1.0	1.7	A	7.2%	B
比較例 6	比較化合物	0.002 質量%	1.0	1.6	A	9.0%	B
比較例 7	比較化合物	0.001 質量%	1.0	1.5	A	10.2%	B

[0204] 表3の結果から、粒子蛍光強度が低い比較例の粒子においては、粒子濃度が高いと低濃度域の検量線傾きが取れなくなり、粒子濃度が低いと高濃度域での検量線からのズレが大きくなったため、測定範囲全般で高精度に測定できる条件がなかった。これに対し本発明の高輝度蛍光粒子では、測定範囲全

般で高精度に測定できることがわかり、本発明の効果が確認された。

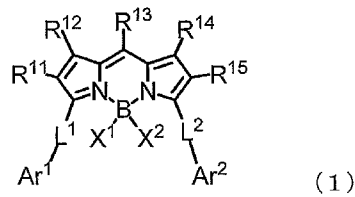
### 符号の説明

- [0205] 1 センサチップ  
2 上部部材  
3 中間部材  
4 基板  
5 第一の容器  
6 第二の容器  
7 容器群  
8 検出領域  
9 参照領域  
10 流路

## 請求の範囲

[請求項1] 生体試料中の測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と、前記測定対象物質又は前記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板とを含む、生体試料中の測定対象物質を測定するためのキットであって、前記標識粒子は、下記式(1)で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である、前記キット。

[化1]

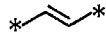


式中、 $R^{11} \sim R^{15}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{11} \sim R^{15}$ のうち少なくとも3つは水素原子以外の原子又は基を表す。

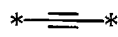
$X^1$ 及び $X^2$ はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $X^1$ 及び $X^2$ は互いに連結して環を形成してもよい。 $Ar^1$ 及び $Ar^2$ はそれぞれ独立に、アリール基又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $L^1$ 及び $L^2$ はそれぞれ独立に、式(L-1)～式(L-4)の何れかを表す。

[化2]

式 (L-1)



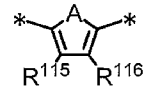
式 (L-2)



式 (L-3)



式 (L-4)



式中、R<sup>111</sup>～R<sup>116</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エチニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Aは、-O-、-S-、又は-NH-を表す。

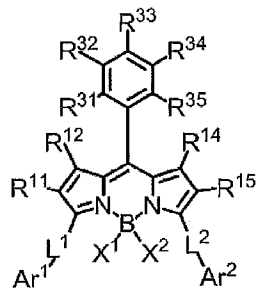
[請求項2] 前記標識粒子が標識ラテックス粒子である、請求項1に記載のキット。

[請求項3] 前記標識粒子が、カルボキシル基を有する、請求項1又は2に記載のキット。

[請求項4] 前記標識粒子の平均粒子径が70～500nmである、請求項1から3の何れか一項に記載のキット。

[請求項5] 前記式(1)で表される化合物が、下記式(3)で表される化合物である、請求項1から4の何れか一項に記載のキット。

[化3]



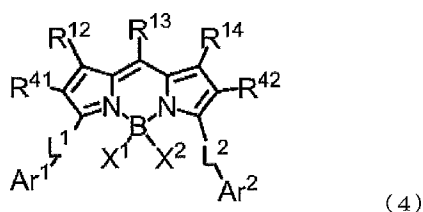
(3)

式中、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>15</sup>、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、Ar<sup>1</sup>、Ar<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>は、式(1)における定義と同義であり、但し、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基である。R<sup>31</sup>～R<sup>35</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基

、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、シア  
ノ基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、又はアリ  
ールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{31}$ 、 $R^{32}$   
、 $R^{34}$ 及び $R^{35}$ のいずれか一つは2原子以上からなる基である。

[請求項6] 前記式(1)で表される化合物が、下記式(4)で表される化合物で  
ある、請求項1から4の何れか一項に記載のキット。

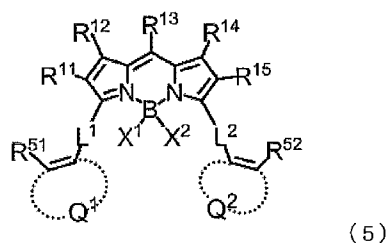
[化4]



式中、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ の少なくとも一つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{41}$ 及び $R^{42}$ はそれぞれ独立に、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

[請求項7] 前記式(1)で表される化合物が、下記式(5)で表される化合物で  
ある、請求項1から4の何れか一項に記載のキット。

[化5]



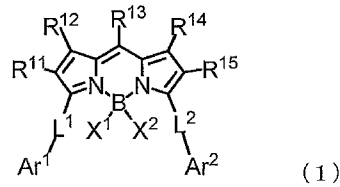
式中、 $R^{11} \sim R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義である。 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは

置換基を有していてもよい。Q<sup>1</sup>及びQ<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、芳香族炭化水素環又は芳香族ヘテロ環を表し、これらは置換基を有していてもよい。

- [請求項8] 前記標識粒子が、少なくとも一種のエネルギードナー化合物と、少なくとも一種のエネルギーアクセプター化合物と、粒子とを含有する発光性粒子であって、前記エネルギードナー化合物及び前記エネルギーアクセプター化合物の少なくとも一種が、前記式(1)で表される化合物である、請求項1から7の何れか一項に記載のキット。
- [請求項9] 前記エネルギードナー化合物として、少なくとも一種の前記式(1)で表される化合物を含有し、前記エネルギーアクセプター化合物として、少なくとも一種の前記式(1)で表される化合物を含有する、請求項8に記載のキット。
- [請求項10] エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のモル比が1:10~10:1である、請求項8又は9に記載のキット。
- [請求項11] エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のストークスシフトが40nm以上である、請求項8から10の何れか一項に記載のキット。
- [請求項12] 前記基板が、前記第二の結合物質を有する検出領域を有する、請求項1から11の何れか一項に記載のキット。
- [請求項13] 前記検出領域が金を含む金属膜である、請求項12に記載のキット。
- [請求項14] 生体試料中の測定対象物質を測定する方法であって、  
生体試料を、測定対象物質と結合性を有する第一の結合物質を有する標識粒子と反応させる反応工程と、前記測定対象物質又は前記第一の結合物質の何れかと結合性を有する第二の結合物質を有する基板に、前記反応工程で得られた反応産物を接触させて、標識粒子を基板の上に捕捉させる捕捉工程と、  
前記測定対象物質に関連した標識情報を取得する、標識情報取得工程と、

を含み、前記標識粒子は、下記式（1）で示される少なくとも一種の化合物と粒子とを含有する発光性の標識粒子である、方法。

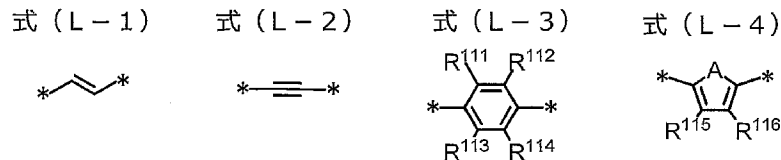
[化6]



式中、R<sup>11</sup>～R<sup>15</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリーールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、R<sup>11</sup>～R<sup>15</sup>のうち少なくとも3つは水素原子以外の原子又は基を表す。

X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、アリーールチオ基、エテニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよく、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は互いに連結して環を形成してもよい。Ar<sup>1</sup>及びAr<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、アリーール基又はヘテロ環基を表し、これらは置換基を有していてもよい。L<sup>1</sup>及びL<sup>2</sup>はそれぞれ独立に、式（L-1）～式（L-4）の何れかを表す。

[化7]



式中、R<sup>111</sup>～R<sup>116</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリーール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリーールオキシ基、アルキルチオ基、

又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。Aは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、又は $-NH-$ を表す。

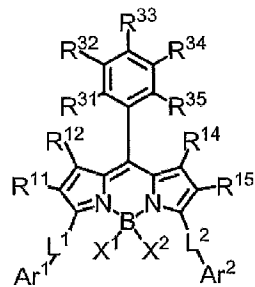
[請求項15] 前記粒子がラテックス粒子である、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 前記粒子が、カルボキシル基を有する、請求項14又は15に記載の方法。

[請求項17] 前記標識粒子の平均粒子径が70~500nmである、請求項14から16の何れか一項に記載の方法。

[請求項18] 前記式(1)で表される化合物が、下記式(3)で表される化合物である、請求項14から17の何れか一項に記載の方法。

[化8]

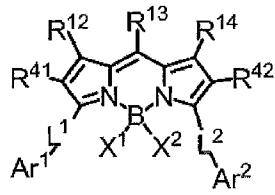


(3)

式中、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{14}$ 及び $R^{15}$ の少なくとも2つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{31} \sim R^{35}$ はそれぞれ独立に、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、エテニル基、エチニル基、アミノ基、アシル基、シアノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよく、 $R^{31}$ 、 $R^{32}$ 、 $R^{34}$ 及び $R^{35}$ のいずれか一つは2原子以上からなる基である。

[請求項19] 前記式(1)で表される化合物が、下記式(4)で表される化合物である、請求項14から17の何れか一項に記載の方法。

[化9]



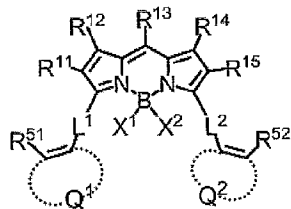
(4)

式中、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $Ar^1$ 、 $Ar^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義であり、但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 及び $R^{14}$ の少なくとも1つは水素原子以外の原子又は基である。 $R^{41}$ 及び $R^{42}$ はそれぞれ独立に、アリール基、ヘテロ環基、エチニル基、又はエチニル基を表し、これらは置換基を有していてもよい。

[請求項20]

前記式(1)で表される化合物が、下記式(5)で表される化合物である、請求項14から17の何れか一項に記載の方法。

[化10]



(5)

式中、 $R^{11}$ ～ $R^{15}$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $L^1$ 及び $L^2$ は、式(1)における定義と同義である。 $R^{51}$ 及び $R^{52}$ はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アミノ基、アシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、又はアリールチオ基を表し、これらは置換基を有していてもよい。 $Q^1$ 及び $Q^2$ はそれぞれ独立に、芳香族炭化水素環又は芳香族ヘテロ環を表し、これらは置換基を有していてもよい。

[請求項21]

前記標識粒子が、少なくとも一種のエネルギードナー化合物と、少なくとも一種のエネルギーアクセプター化合物と、粒子とを含有する発光性粒子であって、前記エネルギードナー化合物及び前記エネルギー

アクセプター化合物の少なくとも一種が、前記式（１）で表される化合物である、請求項 14 から 20 の何れか一項に記載の方法。

[請求項22] 前記エネルギードナー化合物として、少なくとも一種の前記式（１）で表される化合物を含有し、前記エネルギーアクセプター化合物として、少なくとも一種の前記式（１）で表される化合物を含有する、請求項 21 に記載の方法。

[請求項23] エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のモル比が 1 : 10 ~ 10 : 1 である、請求項 21 又は 22 に記載の方法。

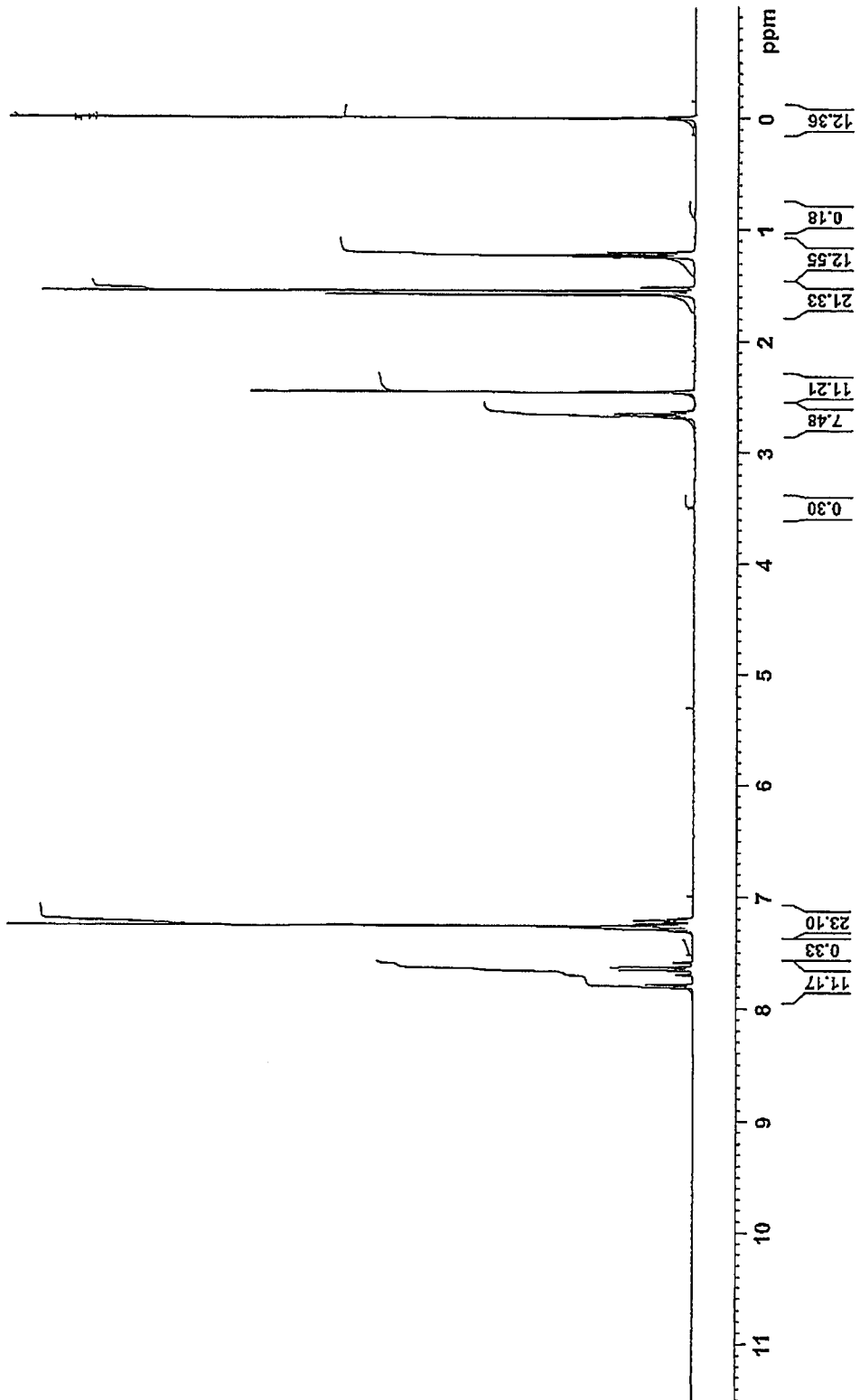
[請求項24] エネルギードナー化合物とエネルギーアクセプター化合物のストークスシフトが 40 nm 以上である、請求項 21 から 23 の何れか一項に記載の方法。

[請求項25] 前記基板が、前記第二の結合物質を有する検出領域を有する、請求項 14 から 24 の何れか一項に記載の方法。

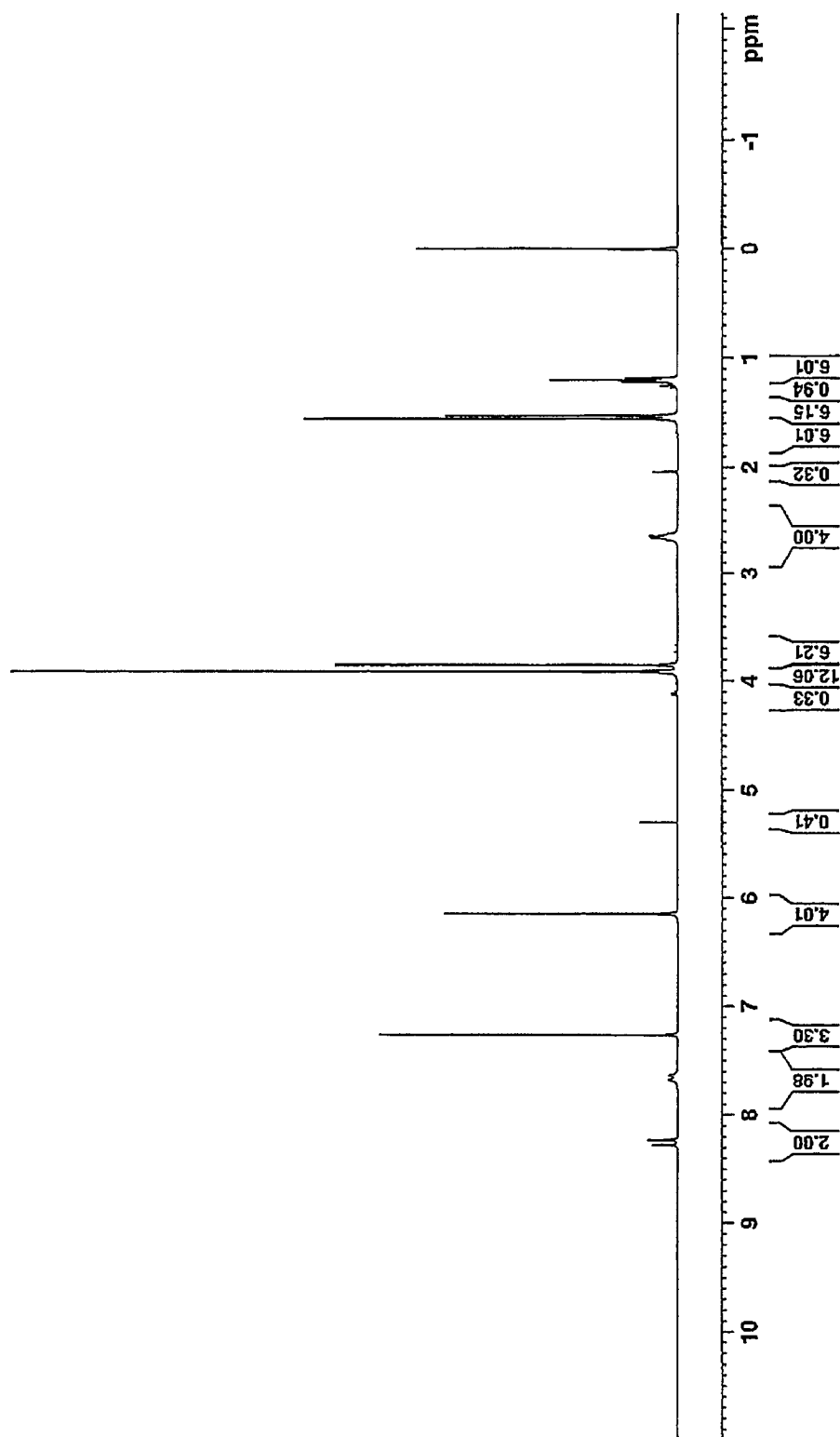
[請求項26] 前記検出領域が金を含む金属膜である、請求項 25 に記載の方法。

[請求項27] 表面プラズモン励起による蛍光検出により、前記測定対象物質に関連した標識情報を取得する、請求項 26 に記載の方法。

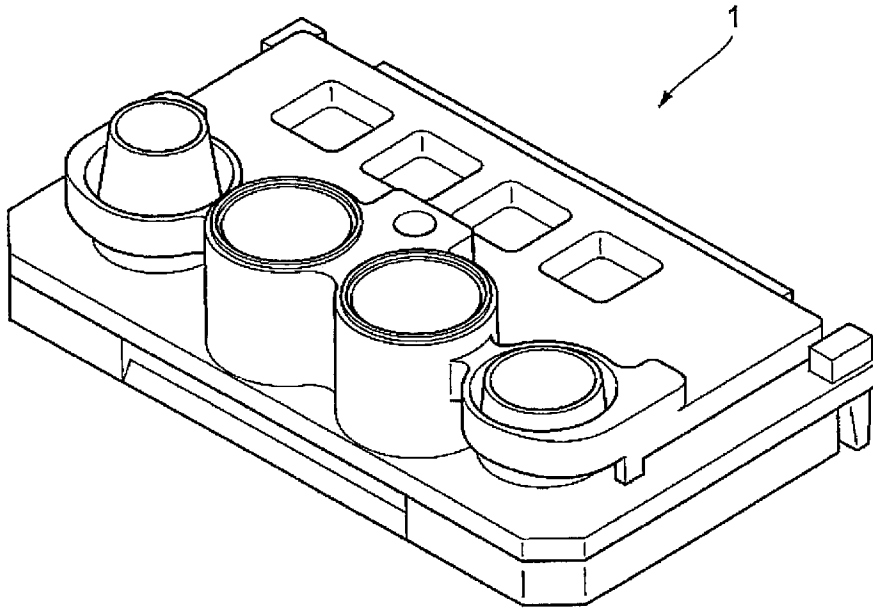
[] 1



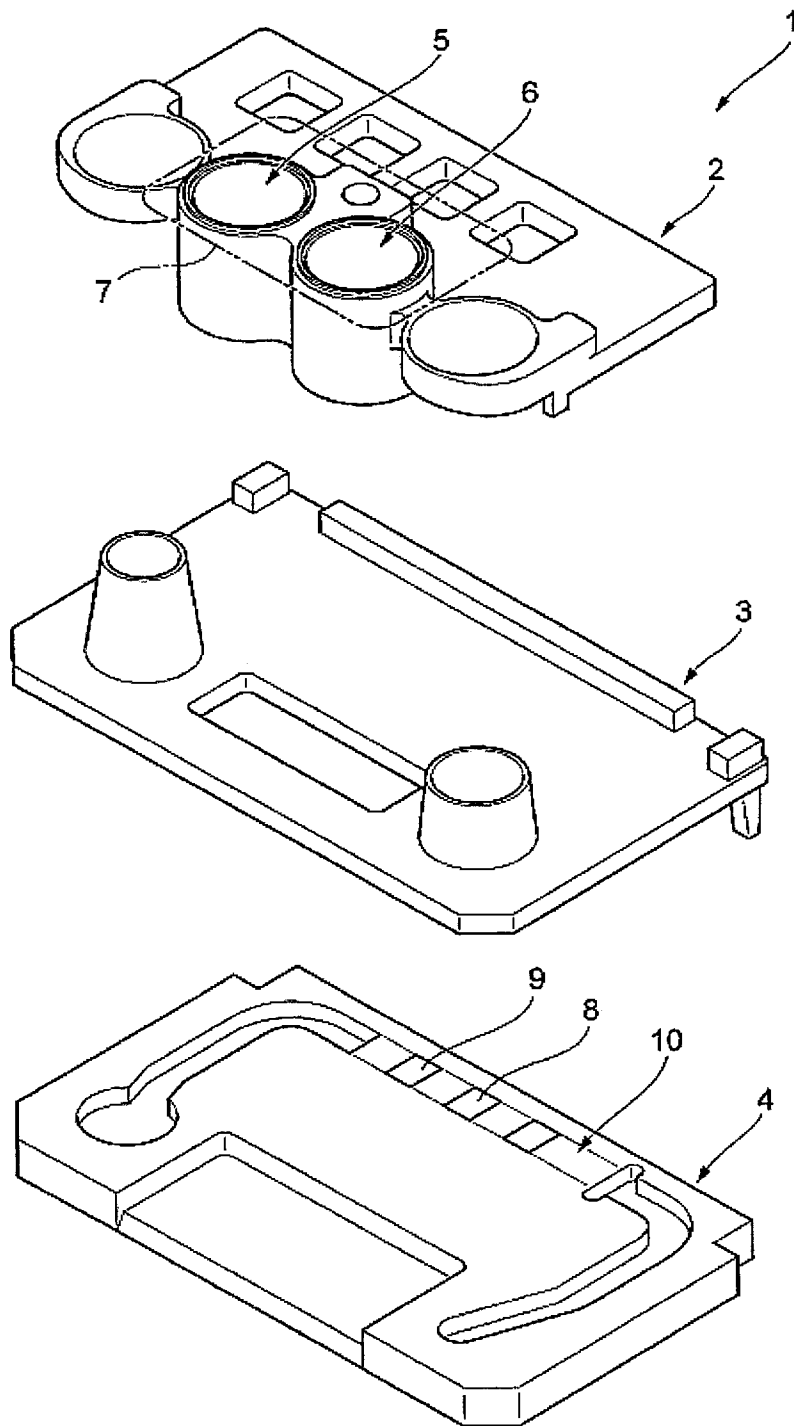
[2]



[図3]



[図4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/013406

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 Int.Cl. G01N33/543 (2006.01) i, C07F5/02 (2006.01) i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 Int.Cl. G01N33/543, C07F5/02

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 7-508309 A (MOLECULAR PROBES, INC.) 14 September 1995, claims, publication gazette, page 8, upper right column, lines 15-23, page 9, upper left column, line 13 to page 10, upper right column, line 10, examples 6, 8-10 & US 5326692 A, claims, column 13, line 63 to column 14, line 9, column 16, line 8 to column 19, line 44, examples 6, 8-10 & WO 1993/023492 A1	1-12, 14-25 13, 26-27
Y	US 2011/0054187 A1 (BAM BUNDESANSTALT FUER MATERIALFORSCHUNG UND-PRUEFUNG) 03 March 2011, claims, paragraphs [0002], [0010]-[0026] & EP 2302002 A2	1-27

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 18 June 2018 (18.06.2018)	Date of mailing of the international search report 26 June 2018 (26.06.2018)
--	---

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/013406

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1944540 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 11 April 2007, claims, publication gazette, pp. 3-6, page 11, line 14 from the bottom to page 13, line 5 (Family: none)	1-27
Y	XU, Junchao et al., "meso-C6F5 substituted BODIPYs with distinctive spectroscopic properties and their application for bioimaging in living cells", Tetrahedron, 2014, vol. 70, pp. 5800-5805, scheme 1, table 1	1-27
Y	HECHT, Mandy et al., "Fluorinated Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyes: Bright and Versatile Probes for Surface Analysis", ChemistryOpen, 2013, vol. 2, pp. 25-38, scheme 1, table 3	1-27
Y A	JP 2016-057145 A (FUJIFILM CORP.) 21 April 2016, claims, paragraphs [0024]-[0030], [0041], [0057]-[0064] & US 2016/0069909 A1, claims, paragraphs [0047]-[0054], [0074]-[0075], [0101]-[0110]	1-7, 12-20, 25-27 8-11, 21-24
A	WO 2015/129361 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 03 September 2015, claims, paragraphs [0041]-[0044] & US 2016/0370289 A1, claims, paragraphs [0059]-[0062]	1-27
PY	WO 2018/038138 A1 (FUJIFILM CORP.) 01 March 2018, claims (Family: none)	1-27
PY	WO 2018/038137 A1 (FUJIFILM CORP.) 01 March 2018, claims (Family: none)	1-27

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C07F5/02(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, C07F5/02		
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 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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) CPlus/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
Y A	JP 7-508309 A (モレキュラー・プロウブズ・インコーポレーテッド) 1995.09.14, [特許請求の範囲], 公報 8 頁右上欄 15-23 行, 9 頁左上欄 13 行-10 頁右上欄 10 行, 実施例 6, 実施例 8-10 & US 5326692 A, Claims, column13, line63-column14, line9, column16, line8-colum n19, line44, example6, examples8-10 & WO 1993/023492 A1	1-12, 14-25 13, 26-27
Y	US 2011/0054187 A1 (BAM BUNDESANSTALT FUER MATERIALFORSCHUNG UND-PRUEFUNG) 2011.03.03, Claims, [0002], [0010]-[0026] & EP 2302002 A2	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 18.06.2018	国際調査報告の発送日 26.06.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大瀧 真理 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J   9812

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CN 1944540 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 2007. 04. 11, [特許請求の範囲], 公報 3 頁-6 頁, 11 頁下から 14 行-13 頁 5 行 (ファミリーなし)	1-27
Y	XU, Junchao et al., meso-C6F5 substituted BODIPYs with distinctive spectroscopic properties and their application for bioimaging in living cells, Tetrahedron, 2014, Vol. 70, pp. 5800-5805, Scheme 1., Table 1	1-27
Y	HECHT, Mandy et al., Fluorinated Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyes: Bright and Versatile Probes for Surface Analysis, ChemistryOpen, 2013, Vol. 2, pp. 25-38, Scheme 1., Table 3	1-27
Y	JP 2016-057145 A (富士フイルム株式会社) 2016. 04. 21, [特許請求の範囲], [0024]-[0030], [0041], [0057]-[0064] & US 2016/0069909	1-7, 12-20, 25-27
A	A1, Claims, [0047]-[0054], [0074]-[0075], [0101]-[0110]	8-11, 21-24
A	WO 2015/129361 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2015. 09. 03, [特許請求の範囲], [0041]-[0044] & US 2016/0370289 A1, Claims, [0059]-[0062]	1-27
PY	WO 2018/038138 A1 (富士フイルム株式会社) 2018. 03. 01, [特許請求の範囲] (ファミリーなし)	1-27
PY	WO 2018/038137 A1 (富士フイルム株式会社) 2018. 03. 01, [特許請求の範囲] (ファミリーなし)	1-27