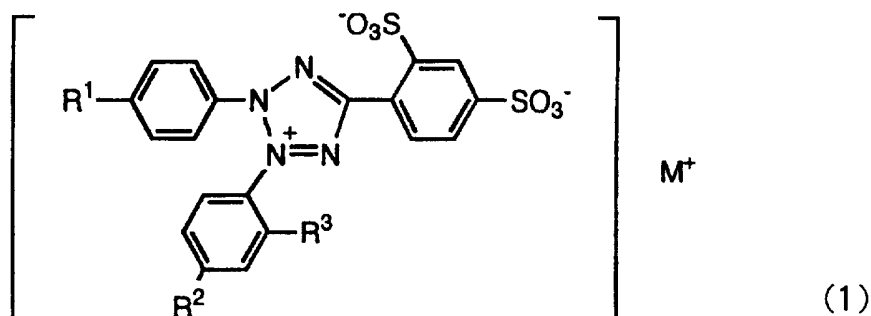




(51) 国際特許分類 C07D 257/04, C12Q 1/32, C07C 309/46	A1	(11) 国際公開番号 WO97/38985 (43) 国際公開日 1997年10月23日(23.10.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01324 (22) 国際出願日 1997年4月17日(17.04.97) (30) 優先権データ 特願平8/121134 1996年4月18日(18.04.96) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 同仁化学研究所 (DOJINDO LABORATORIES CO., LTD.)[JP/JP] 〒861-22 熊本県上益城郡益城町田原2025番地5 Kumamoto, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 石山宗孝(ISHIYAMA, Munetaka)[JP/JP] 〒862 熊本県熊本市山の神1-5-53 Kumamoto, (JP) 宮園洋子(MIYAZONO, Yoko)[JP/JP] 〒861-11 熊本県菊池郡合志町豊岡2052-71 Kumamoto, (JP) 志賀匡宣(SHIGA, Masanobu)[JP/JP] 〒862 熊本県熊本市小山町1226-39 Kumamoto, (JP) 佐々本一美(SASAMOTO, Kazumi)[JP/JP] 〒861-22 熊本県上益城郡益城町古閑51-55 Kumamoto, (JP)		(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: WATER-SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT COMPOUNDS (54)発明の名称 水溶性テトラゾリウム塩化合物 (1) (57) Abstract Tetrazolium salt compounds represented by general formula (1): wherein R¹ and R² each independently represent a hydrogen atom, a nitro group, a cyano group, a carboxyl group, or a halogen atom, preferably a nitro group; R³ represents an alkyl or alkoxyl group, preferably a methyl or methoxy group; and M represents an alkali metal or an ammonium. The compounds are useful for the quantitative determination of dehydrogenases and have high water solubility and storage stability in an aqueous solution form.		

(57) 要約

下記的一般式(1):



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、又はハロゲン原子、好ましくはニトロ基を示し、 R^3 はアルキル基又はアルコキシル基、好ましくはメチル基又はメトキシ基を示し、 M はアルカリ金属又はアンモニウムを示す) で示されるテトラゾリウム塩化合物。脱水素酵素の定量に有用であり、水溶性が高く、水溶液の状態での保存安定性に優れるという特徴を有する。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KR	韓国	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明 細 書

水溶性テトラゾリウム塩化合物

技術分野

本発明は、新規な水溶性テトラゾリウム塩化合物に関するものである。より詳しく言うと、本発明は、例えば脱水素酵素などの定量に好適に使用可能な水溶性テトラゾリウム塩化合物、及び該化合物を用いた測定方法に関する。

背景技術

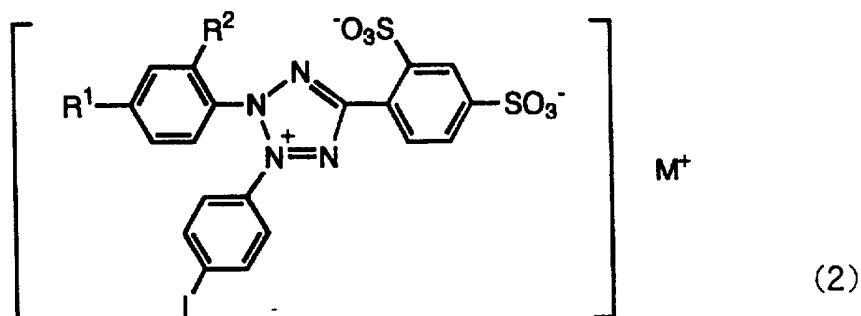
乳酸脱水素酵素（以下、本明細書において「LDH」と略称する場合がある）、アルコール脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素などの各種脱水素酵素は、従来テトラゾリウム塩化合物を用いて定量分析が行われている。テトラゾリウム塩化合物は、これらの各種脱水素酵素の作用により遊離した水素を還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド（以下、本明細書において「NADH」と略記する場合がある）などの中間電子運搬体を介して受容し、対応のホルマザン化合物を与える性質を有している。従って、生成したホルマザン化合物の吸光度を測定することにより脱水素酵素を定量することができる。

これらの脱水素酵素のうち、乳酸脱水素酵素は全ての体細胞に分布しており、特に心筋、肝臓、骨格筋、腎臓に多く存在している。心筋梗塞、悪性腫瘍、肝疾患、進行性筋萎縮、血管内溶血、巨赤芽球性貧血などの疾患の場合には、血清 LDH 活性が著しく上昇することが知られている。従って、血中 LDH 活性を測定することにより、診断に極めて有意義な臨床上の知見を得ることができる。

近年、血中の尿酸や胆汁酸のような微量成分を高感度で検出するために、生体成分の妨害をより受けにくい脱水素酵素の測定方法の開発が望まれている。このような目的で、従来、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル]-2Hテトラゾリウム塩化合物（以下、本明細書において「ニトロ-TB」と略称する場合がある）などが水素受容体として一般的に用いられている。

しかしながら、ニトロ-TB が水素を受容して生成するホルマザン化合物は水に難溶であり、実用上の問題を有していた。特に、自動分析においては、生成したホルマザン化合物がチューブやセルなどの計測系に付着し、測定値に正の誤差を与えるという問題点があった。この問題点を解決するために、水溶性のホルマザン化合物を生成するテトラゾリウム塩を用いる方法の開発が求められていた。

溶解性の良好なホルマザン化合物を生成する水溶性テトラゾリウム化合物として、特開平 7-70092号公報には下記の一般式(2) の化合物が開示されている(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子又はニトロ基を示し、M はアルカリ金属又はアンモニウムを示す)。



この化合物を用いると、検出感度が極めて高いホルマザン化合物が生成するので、従来用いられていたニトロ-TB よりも高感度な測定が可能になる。また、ホルマザン化合物が水溶性であるために、測定系への付着がなく臨床検査上有用である。特に、上記一般式において R^1 及び R^2 がニトロ基である化合物は NADH と効率よく反応して吸光度がきわめて高いホルマザン化合物が生成するという特徴がある。

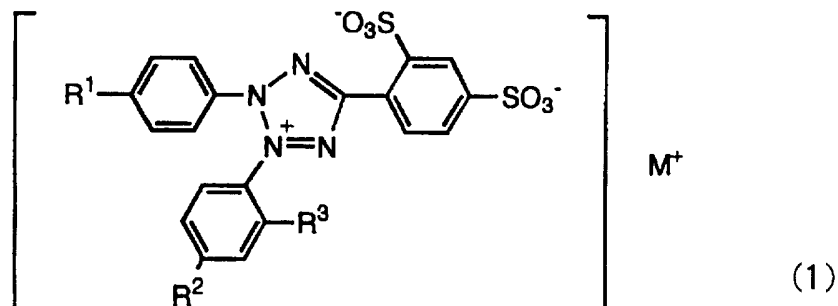
しかしながら、本発明者らの研究によれば、この化合物を水溶液状態で保存した場合には保存安定性に問題があることが判明した。通常の臨床分析では、水溶液を調製した後に長期にわたって(例えば3～6か月間)保存することも多いので、水素受容体であるテトラゾリウム化合物は水溶液の状態において高い保存安定性を有することが望まれている。

発明の開示

本発明者らは、上記一般式(2) の化合物の特徴である優れた検出感度を維持しつつ、水溶液の状態でも高い保存安定性を有する化合物を提供すべく研究を重ねた

結果、下記の一般式(1)の化合物がこのような特徴を有することを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、下記の一般式(1):

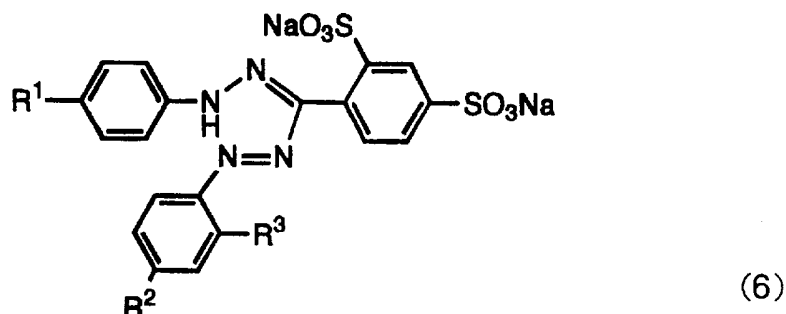


(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、又はハロゲン原子を示し、 R^3 はアルキル基又はアルコキシ基を示し、 M はアルカリ金属又はアンモニウムを示す)で表わされるテトラゾリウム化合物を提供するものである。

この発明の好ましい態様によれば、 R^1 及び R^2 が共にニトロ基であり、 R^3 が C_{1-4} アルキル基又は C_{1-4} アルコキシ基である上記テトラゾリウム塩化合物；及び、 R^1 及び R^2 が共にニトロ基であり、 R^3 がメチル基又はメトキシ基であり、 M がナトリウムである上記テトラゾリウム塩化合物が提供される。

本発明の別の観点からは、上記テトラゾリウム塩化合物を含む脱水素酵素測定用試薬が提供される。この発明の好ましい態様として、中間電子運搬体として還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドを用いる測定方法に使用するための試薬が提供される。

本発明のさらに別の観点からは、下記の一般式(6):



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル

基、又はハロゲン原子を示し、 R^3 はアルキル基又はアルコキシ基を示す)で表わされるホルマジン化合物が提供される。

また、本発明の別の観点によれば、脱水素酵素の測定方法であって、水素受容体として上記一般式(1)の化合物を用いることを特徴とする方法が提供される。この方法の好ましい態様によれば、上記一般式(6)で表わされるホルマジン化合物の吸光度を測定する工程を含む上記方法；並びに、中間電子運搬体として還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドを用いる上記方法が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物(化合物a)及び特開平 7-70092号公報に記載の化合物(化合物b)を4℃で保存した場合の吸光度変化を示す図である。

第2図は、吸収スペクトル測定により得られた NADH の検量線を示す図である。図中、○は本発明の化合物(化合物a)の結果を示し、□は特開平 7-70092号公報に記載の化合物(化合物b)の結果を示す。

第3図は、吸収スペクトル測定により得られた NADH の検量線を示す図である。図中、○は本発明の化合物(化合物a)の結果を示し、□はニトロ-TB の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

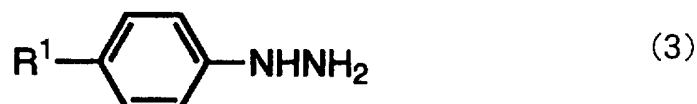
上記一般式(1)において、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、又はハロゲン原子を示すハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい。 R^1 及び R^2 がともにニトロ基であることが好ましい。

R^3 が示すアルキル基としては、例えば C_{1-4} アルキル基を用いることができ、より具体的には、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、sec-ブチル基、tert-ブチル基など用いることができる。 R^3 が示すアルコキシ基としては、例えば C_{1-4} アルコキシ基を用いることができ、より具体的には、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基などを用いることができる。 R^3 が C_{1-4} アルキル基又は C_1

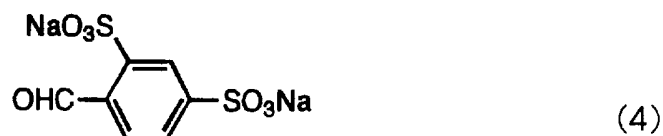
4 アルコキシ基であることが好ましく、メチル基又はメトキシ基であることがさらに好ましい。

M が示すアルカリ金属としては、例えば、ナトリウム、カリウムなどを用いることができるが、ナトリウムであることが好ましい。

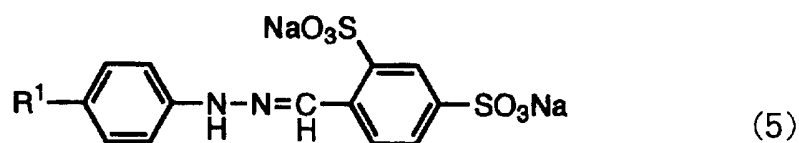
本発明の前記一般式(1)の化合物は常法によって製造することができる。例えば、次の一般式(3)：



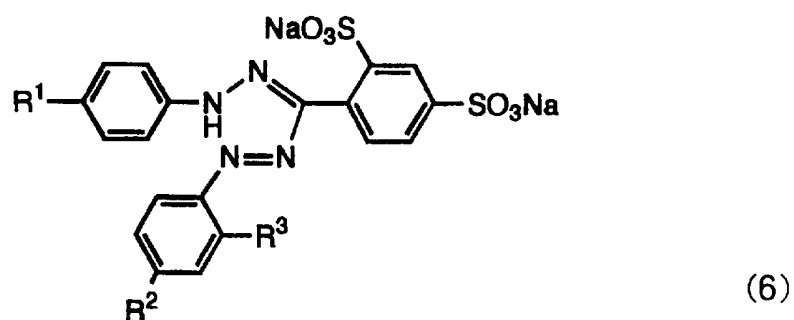
(式中、 R^1 は水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、又はハロゲン原子を示す)で表わされるヒドラジン化合物に、一般式(4)：



で示されるアルデヒド化合物をアルコール溶液中で反応させて一般式(5)：



で示されるヒドラゾン化合物を得、次いで、対応するジアゾニウム塩を有機溶媒／水中で塩基性条件下で反応させて一般式(6)：



で示されるホルマザン化合物を得ることができる。上記一般式(6)において R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、又はハロゲン原子を示し、 R^3 はアルキル基又はアルコキシ基を示し、好ましくは、上記の一

一般式(1)の R^1 、 R^2 、及び R^3 について具体的に説明した置換基を用いることができる。

上記の反応において、塩基性化剤としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどを用いることができる。ついで、得られた一般式(6)のホルマザン化合物を亜硝酸ブチルなどの酸化剤を用いてアルコール溶媒中で酸化し、前記一般式(1)のテトラゾリウム塩化合物を得ることができる。

本発明の化合物は、脱水素酵素の作用により生じた水素を NADH などを介して受け取り、それ自体が還元されて上記一般式(6)で表わされるホルマザン化合物を生成する性質を有している。従って、本発明の化合物を水素受容体として用いることにより、例えば、乳酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素などの脱水素酵素の濃度を定量することができる。また、下記の実施例に具体的に示したように、NADH などの還元性物質の定量に用いることもできる。一般的には、これらの物質の定量を行うためには反応系内で生成した一般式(6)のホルマザン化合物の吸光度を測定すればよいが、蛍光やその他の分光学的手段によって測定してもよい。なお、中間電子運搬体である NADH などを介在させて脱水素酵素の測定を行う方法はそれ自体周知であり、反応条件や測定手段などは当業者が適宜選択可能である。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：一般式(1)において R^1 及び R^2 がニトロ基であり、 R^3 がメトキシ基である化合物（化合物a）の合成

p-ニトロフェニルヒドラジン 18.4 g と4-ホルミル-1,3-ベンゼンジスルホン酸ナトリウム 37.2 g をメタノールに混合し、2時間加熱還流した。沈殿物を濾取し、ヒドラゾンを85%の収率で得た。得られたヒドラゾン 6.7 g を水 200 ml に溶解し、0℃に冷却した。別途、5-ニトロ-o-アニシジン 2.7 g を常法によりジアゾ化し、上記のヒドラゾン溶液に加えた。この反応混合液を -5 ~ 0℃に保持しながら、NaOH 2.6 g を水 40 ml に溶解した水溶液を滴下し、滴下終了後一夜室温で攪

拌した。反応混合液に塩酸を加えて濃縮し、イソプロパノールを加えて生じた沈殿物を濾取し、63 %の収率でホルマザンを得た。得られたホルマザン 5 gをメタノール 250 ml に懸濁し、濃塩酸 6.7 ml 及び亜硝酸ブチル 4.1 gを加えて室温で一夜攪拌した。反応液を濃縮してイソプロパノールを加え、析出した沈澱を濾取し、粗生成物をエタノールで再結晶して45 %の収率で表題のテトラゾリウム塩（化合物 a）を得た。

元素分析値 計算値 ($C_{20}H_{12}N_6O_{11}S_2Na$) C: 40.00%, H: 2.18%, N: 14.00%; 実測値 C: 39.78%, H: 2.15%, N: 13.76%

例 2 : 一般式(1) において R^1 及び R^2 がニトロ基であり、 R^3 がメチル基である化合物の合成

例 1 と同様にして表題の化合物を製造した。

元素分析値 計算値 ($C_{20}H_{13}N_6O_{10}S_2Na$) C: 41.10%, H: 2.24%, N: 14.38%; 実測値 C: 40.86%, H: 2.44%, N: 14.17%

例 3 : 保存安定性試験

化合物 a を 1 mM 含有する 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) を 4°C で 0、1、7、14、31、及び 90 日保存したときの 460 nm における吸光度を測定した。同時に、特開平 7-70092 号公報に記載された上記一般式(2) の化合物（背景技術の項を参照）において R^1 及び R^2 がいずれもニトロ基である化合物（化合物 b）を同様に保存して、吸光度の変化を測定した。化合物 a 及び化合物 b についての保存日数と吸光度の関係を第 1 図に示す。化合物 b では吸光度の急激な上昇が認められたが、本発明の化合物 a では 90 日間にわたって吸光度の上昇が認められず、極めて安定性に優れることが明らかとなった。

例 4 : NADH 濃度測定

化合物 a 0.1 mM 及び 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメトスルフェート 5 μ M を含有する 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) 5 ml に 5 mM の NADH をそれぞれ 0、10、20、30、40 及び 50 μ l 加え、5 分間室温で反応させた後に吸光度を測定

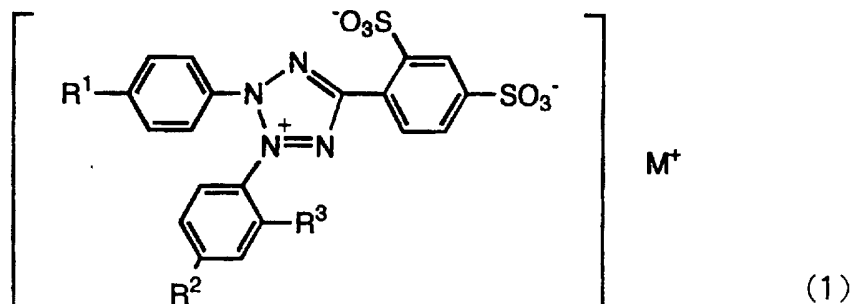
した。NADH 濃度と吸光度との関係を第 2 図に示す。化合物 b について同様に測定した。両化合物とも NADH 濃度と吸光度との間で原点を通る直線性の検量線が得られ、その検出感度はほぼ同じであった。一方、ニトロ-TB を用いて同様に NADH 濃度と吸光度との関係を求めたところ、第 3 図に示すように本発明の化合物よりも明らかに測定感度が劣っていた。

産業上の利用可能性

本発明のテトラゾリウム化合物を水素受容体として用いると水溶性のホルマザンが得られるので、測定機器への沈着がなく、自動分析装置による測定が容易になる。また、本発明の化合物は、水素受容体として臨床検査で一般に用いられているニトロ-TB よりもさらに高感度であり、NADH を容易に検出できるという特徴があり、さらに、水溶液状態における保存性に優れるという特徴を有している。従って、本発明の化合物は、例えば、臨床検査用の試薬として極めて有用である。

請 求 の 範 囲

1. 下記の一般式(1):



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、又はハロゲン原子を示し、 R^3 はアルキル基又はアルコキシ基を示し、 M はアルカリ金属又はアンモニウムを示す)

で表わされるテトラゾリウム塩化合物。

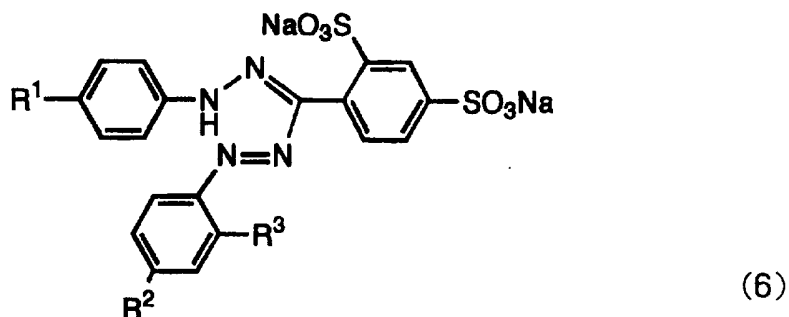
2. R^1 及び R^2 が共にニトロ基であり、 R^3 が C_{1-4} アルキル基又は C_{1-4} アルコキシ基である請求の範囲第1項に記載のテトラゾリウム塩化合物。

3. R^1 及び R^2 が共にニトロ基であり、 R^3 がメチル基又はメトキシ基であり、 M がナトリウムである請求の範囲第1項に記載のテトラゾリウム塩化合物。

4. 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物を含む脱水素酵素測定用試薬。

5. 中間電子運搬体として還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドを用いる測定方法に使用するための請求項4に記載の試薬。

6. 下記の一般式(6):



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル

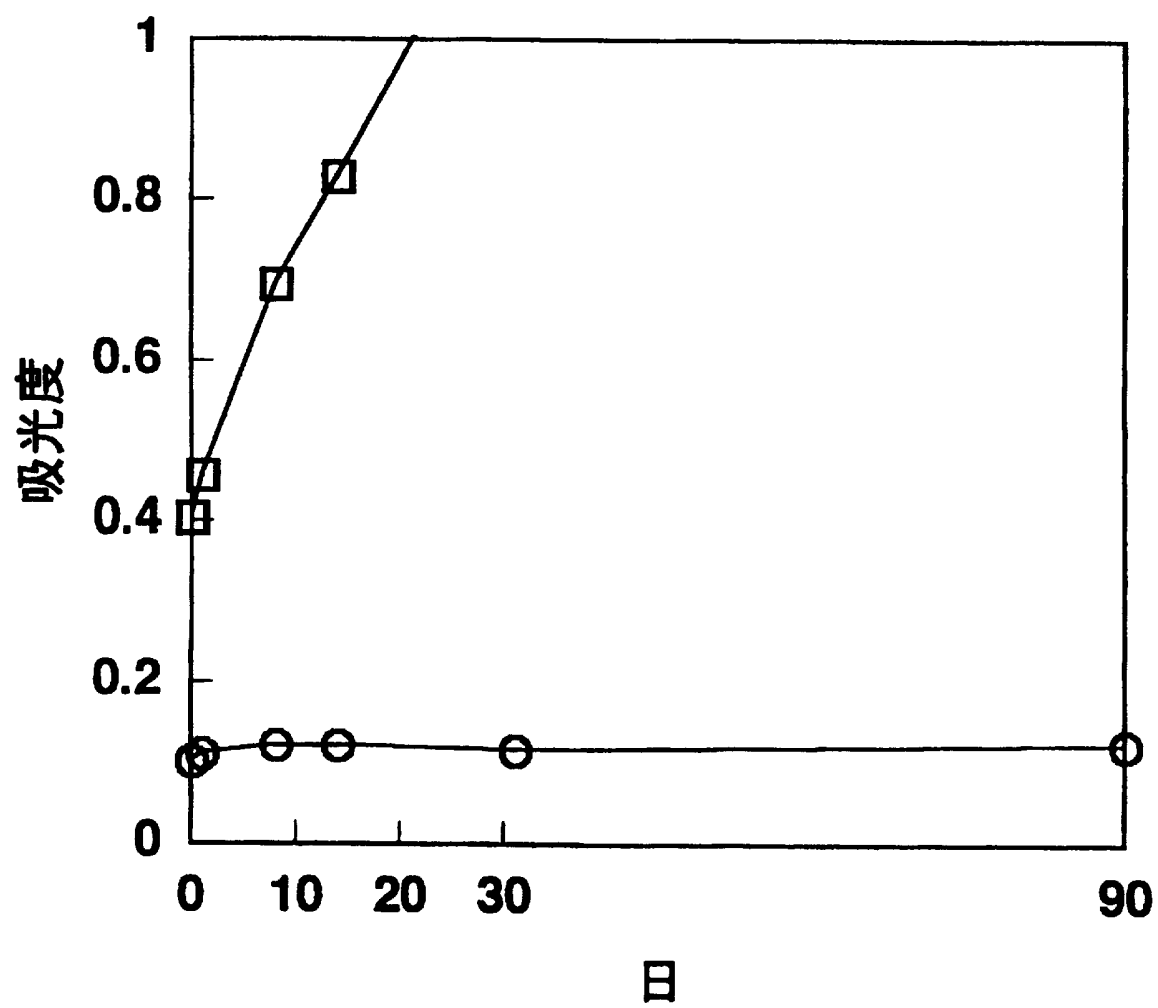
基、又はハロゲン原子を示し、 R^3 はアルキル基又はアルコキシル基を示す)で表わされるホルマザン化合物。

7. 脱水素酵素の測定方法であって、水素受容体として請求項1ないし3のいずれか1項に記載の化合物を用いることを特徴とする方法。

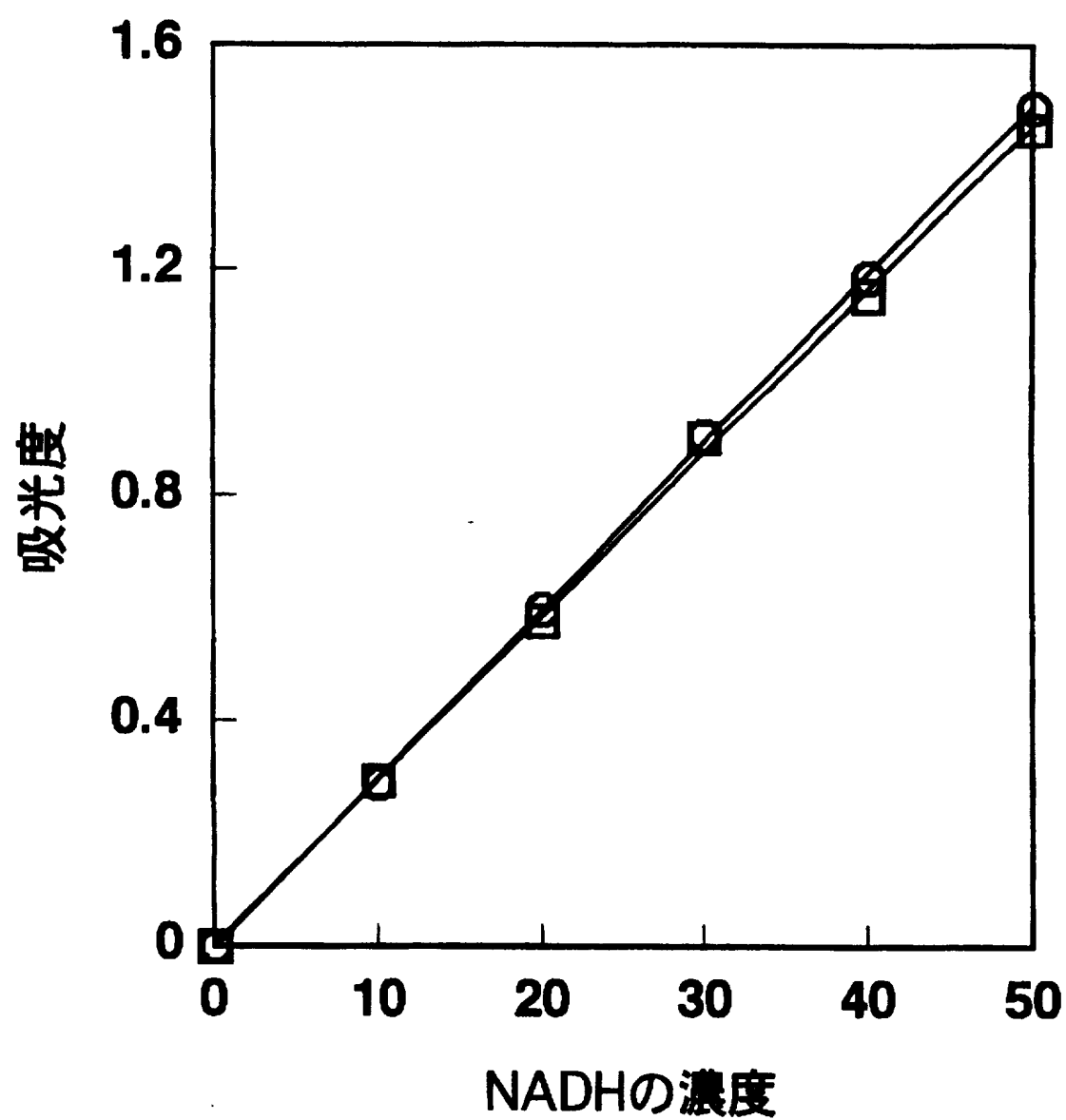
8. 請求項6に記載のホルマザン化合物の吸光度を測定する工程を含む請求項7に記載の方法。

9. 中間電子運搬体として還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドを用いる請求項7又は8に記載の方法。

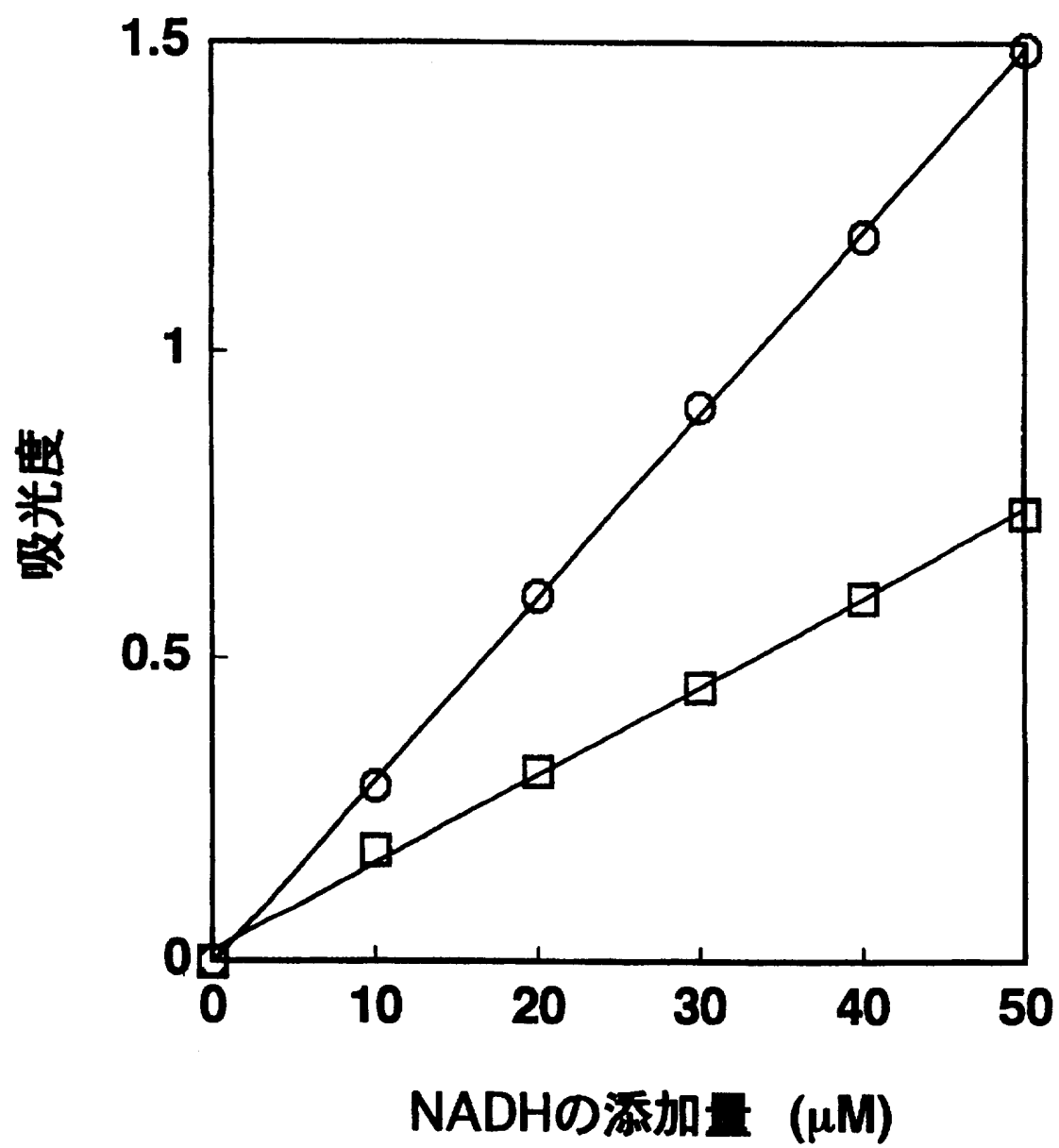
第1図



第2図



第3図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07D257/04, C12Q1/32, C07C309/46

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. Cl⁶ C07D257/04, C12Q1/32, C07C309/46, C07C245/00

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

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

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol. 41 (No. 6), p. 1118-1122 (1993), Ishiyama, M. et al. "A New Tetrazorium salt that produces a highly water-soluble formazan dye"	1 - 9
A	JP, 7-70092, A (Dojindo Laboratories Co., Ltd.), March 14, 1993 (14. 03. 93) (Family: none)	1 - 9
A	JP, 56-61366, A (Dojindo Laboratories Co., Ltd.), May 26, 1981 (26. 05. 81) (Family: none)	1 - 9
A	JP, 56-61367, A (Dojindo Laboratories Co., Ltd.), May 26, 1981 (26. 05. 81) (Family: none)	1 - 9

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 14, 1997 (14. 07. 97)

Date of mailing of the international search report

July 23, 1997 (23. 07. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C 07 D 257/04、C 12 Q 1/32、C 07 C 309/46

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.Cl¹ C 07 D 257/04、C 12 Q 1/32、C 07 C 309/46、C 07 C 245/00

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

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

CAS ONLINE

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 請求の範囲の番号
A	Chemical & Pharmaceutical Bulletin, vol. 41 (No. 6), p1118-1122 (1993) Ishiyama, M et. all "A New Tetrazorium salt that prroduces a highly water-solubule formazan dye"	1-9
A	J P, 7-70092, A (株式会社同仁化学研究所) 14.3月.1993 (14.03.93) (ファミリーなし)	1-9
A	J P, 56-61366, A (株式会社同仁化学研究所) 26.5月.1981 (26.05.81) (ファミリーなし)	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、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

14.07.97

国際調査報告の発送日

23.07.97

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

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)

4C 7822

印

横尾 俊一

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

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 請求の範囲の番号
A	J P, 5 6 - 6 1 3 6 7, A (株式会社同仁化学研究所) 26. 5月. 1981 (26. 05. 81) (ファミリーなし)	1 - 9