



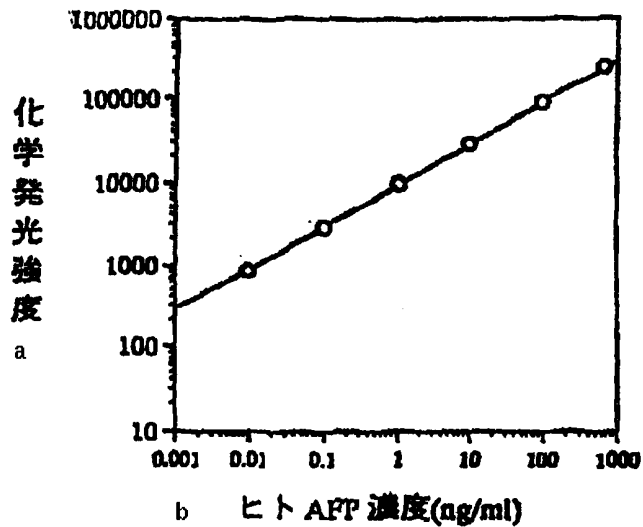
<p>(51) 国際特許分類6 C09K 11/07, G01N 33/532, 21/76</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/09626</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月24日(24.02.00)</p>																	
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04401</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月13日(13.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/244404</td> <td>1998年8月14日(14.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/244424</td> <td>1998年8月14日(14.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/244428</td> <td>1998年8月14日(14.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/361569</td> <td>1998年12月18日(18.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/361570</td> <td>1998年12月18日(18.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/361571</td> <td>1998年12月18日(18.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大日精化工業株式会社(DAINICHISEIKA COLOR & CHEMICALS MFG. CO., LTD.)(JP/JP) 〒103-8383 東京都中央区日本橋馬喰町一丁目7番6号 Tokyo, (JP)</p>	特願平10/244404	1998年8月14日(14.08.98)	JP	特願平10/244424	1998年8月14日(14.08.98)	JP	特願平10/244428	1998年8月14日(14.08.98)	JP	特願平10/361569	1998年12月18日(18.12.98)	JP	特願平10/361570	1998年12月18日(18.12.98)	JP	特願平10/361571	1998年12月18日(18.12.98)	JP	<p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>鈴木英明(SUZUKI, Hideaki)[JP/JP] 高橋樹由(TAKAHASHI, Kiyoshi)[JP/JP] 荒谷弦一郎(ARAYA, Gen-ichiro)[JP/JP] 葛城寿史(KATSURAGI, Hisashi)[JP/JP] 細越未央(HOSOGOE, Mio)[JP/JP] 〒123-8555 東京都足立区堀ノ内一丁目9番4号 大日精化工業株式会社 技術研究センター内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 久保田耕平(KUBOTA, Kohei) 〒101-0061 東京都千代田区三崎町二丁目9番5号 水道橋TJビル4階 久保田特許商標事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/244404	1998年8月14日(14.08.98)	JP																	
特願平10/244424	1998年8月14日(14.08.98)	JP																	
特願平10/244428	1998年8月14日(14.08.98)	JP																	
特願平10/361569	1998年12月18日(18.12.98)	JP																	
特願平10/361570	1998年12月18日(18.12.98)	JP																	
特願平10/361571	1998年12月18日(18.12.98)	JP																	

(54) Title: CHEMILUMINESCENT REAGENTS AND CHEMILUMINESCENCE ANALYSIS METHODS WITH THE USE OF THE SAME

(54) 発明の名称 化学発光試薬及びそれを用いる化学発光分析方法

(57) Abstract

Novel chemiluminescent reagents undergoing chemiluminescence in the presence of peroxides depending on the amount of peroxidase and chemiluminescence analysis methods with the use of the same, for example, a method for assaying peroxidase activity by using chemiluminescence and a method for detecting and quantitating various substances by enzyme immunoassay with the use of peroxidase as a labeling. More particularly, the chemiluminescent reagents contain as the major components N,N'-disubstituted-9,9'-bisacridinium salt charge transfer complexes and N,N-disubstituted carboxamide compounds optionally together with specific amino alcohols. The methods comprise assaying peroxidase activity at a high sensitivity in the presence of peroxides with the use of these reagents. A chemiluminescent enzyme immunoassay method wherein a substance to be assayed can be assayed at an elevated sensitivity by effecting a chemiluminescent reaction with the use of the above reagents in the enzyme immunoassay method with the use of peroxidase as a labeling.



a ... CHEMILUMINESCENT INTENSITY

b ... HUMAN AFP CONCENTRATION (ng/ml)

(57)要約

ペルオキシダーゼ酵素量に依存して過酸化物により化学発光する新規化学発光試薬、それを用いる化学発光分析方法、例えば、化学発光法を利用するペルオキシダーゼ酵素活性の測定方法及びペルオキシダーゼ酵素を標識物質として用いる酵素免疫測定方法による各種物質の検出及び定量分析方法を提供する。

具体的には、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及びN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物を主成分とする化学発光試薬さらに特定のアミノアルコール化合物を添加してなる化学発光試薬、該化学発光試薬を用い過酸化物の存在下においてペルオキシダーゼ活性を高感度で測定する方法を提供する。

また、ペルオキシダーゼ酵素を標識物質として用いる酵素免疫測定方法において、前記新規化学発光試薬を用いる化学発光反応により測定対象物質をより高感度で測定可能な化学発光酵素免疫測定方法を提供する。

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掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

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

明 細 書

化学発光試薬及びそれを用いる化学発光分析方法

発明の技術分野

本発明は、制御された化学発光が可能な化学発光試薬であり、化学発光分析による種々の物質の検出及び定量等に用いられる化学発光試薬に関するものである。本発明は、さらに該化学発光試薬を用いた化学発光法による水素受容体の存在下でのペルオキシダーゼ活性の測定方法及びペルオキシダーゼ酵素を標識物質として用いる化学発光酵素免疫測定方法に関するものである。

背景技術

化学発光試薬として、古くから用いられているルシゲニン（N，N' -ジメチル-9，9' -ビスアクリジニウムジ硝酸塩）は、アルカリ性水溶液中で微光を呈し、過酸化水素を加えると強く発光することが知られており、種々の微量分析に利用されている。しかしながら、ルシゲニンは過酸化水素とアルカリの存在で定量的に発光するので、過酸化水素の定量には利用することができるが、この反応による発光を制御して発光量で酵素活性を測定する化学発光酵素免疫測定方法（Chemiluminescent Enzyme Immunoassay）（以下、必要に応じ「CLEIA」と略称する。）等には利用し難いと云う問題点がある。この問題点を解決する手段として、標識酵素にグルコースオキシダーゼを用いて、グルコースの酸化反応により生成する過酸化水素をアルカリ存在下にルシゲニンに作用させることにより、測定対象物質の濃度に依存した化学発光を行なう方法等が行なわれている。

しかしながら、グルコースオキシダーゼを標識酵素とするCLEIAは、試薬の調製及び発光系の操作が煩雑である。また、安定性にも優れ、取り扱いが比較的容易なペルオキシダーゼを標識酵素とするCLEIAに利用できる化学発光

試薬としてルミノールが用いられているが、p-ヨードフェノールの如き発光促進剤を併用しても感度の点で必ずしも充分とは言えない。

このような開発事情から化学発光試薬の調製及び発光分析系の操作が容易であり、かつペルオキシダーゼを標識酵素とするCLEIAに利用でき、高感度測定が可能な化学発光試薬の開発が望まれている。

また、ペルオキシダーゼ酵素を標識物質とするCLEIAにおいても測定対象物質の低濃度領域での定量性をさらに高める必要性が生じるケースが多く、ペルオキシダーゼを標識酵素とするCLEIAのさらなる高感度化が要求されている。

発明の開示

本発明の第一の課題は、水素受容体としての過酸化水素等の過酸化物を基質とするペルオキシダーゼのモル数に依存して化学発光が可能な新規な化学発光試薬を提供することにある。

本発明の第二の課題は、化学発光量が大きく、かつ、安定性に優れた化学発光試薬を提供することにある。

また、本発明の第三の課題は、前記化学発光試薬を用い、ペルオキシダーゼ活性をより高感度で測定可能な化学発光法による新規な測定方法を提供することにある。

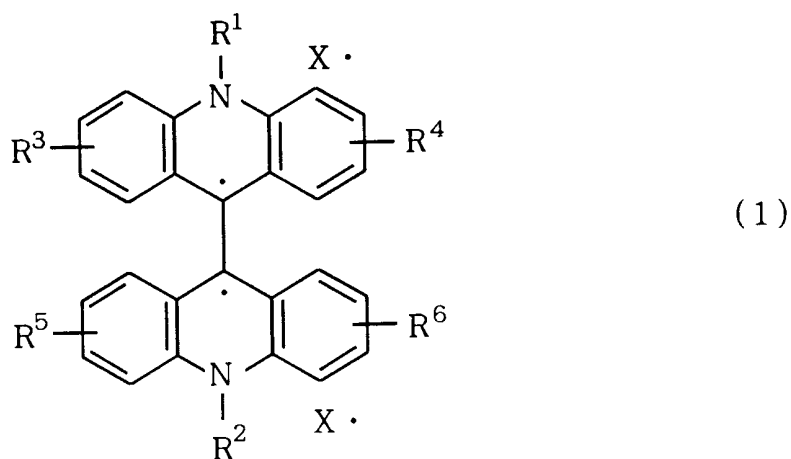
さらに、本発明の第四の課題は、前記化学発光試薬を用い、ペルオキシダーゼ酵素を標識物質とし測定対象物質をより高感度で測定可能な化学発光法による新規な免疫測定系を利用した化学発光酵素免疫測定方法を提供することにある。

そこで、本発明者らは、前記課題を達成するために鋭意検討を重ねた結果、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスジアクリジニウム塩類電荷移動錯体及びN, N'-ジ置換カルボンアミド化合物を含む化学発光試薬、該化学発光試薬にアミノアルコール化合物を添加して得られる化学発光試薬、又は、

N, N' -ジ置換-9, 9' -ビスアクリジニウム塩類をN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射下に反応させることにより得られる化学発光試薬、又は

N, N' -ジ置換-9, 9' -ビスアクリジニウム塩類をN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射下に反応させる際に、その反応時及び/又は反応後にアミノアルコール化合物を添加することにより得られる化学発光試薬が特定pH条件下において、過酸化水素とは反応せず、過酸化水素とペルオキシダーゼの存在下に、ペルオキシダーゼのモル数に依存して化学発光することを見出し、これらの知見に基づいて本発明の完成に到達したものである。

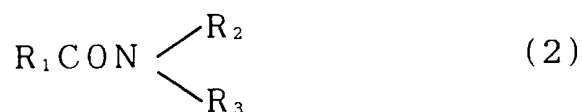
従って、本発明の第一は、下記一般式(1)



(一般式(1)において、R¹及びR²は、それぞれアルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、R³、R⁴、R⁵及びR⁶は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリーロキシ基及びハロゲン原子からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、X·は前駆体ビスアクリジニウム塩の対アニオンから電子が移動した残基である酸ラジカルを示す。)

で表されるN, N' -ジ置換-9, 9' -ビスアクリジニウム塩類の電荷移動錯体及び

下記一般式 (2)



(一般式 (2) において、 R_1 は水素原子、炭素数 1～10 のアルキル基、炭素数 2～10 のアルケニル基及び炭素数 6～20 のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよく、 R_2 はメチル基及びエチル基からなる群より選択され、 R_3 は炭素数 1～10 のアルキル基、炭素数 2～10 のアルケニル基及び炭素数 6～20 のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよく、また、 R_1 及び R_3 は、互いに結合して、それぞれが結合しているカルボニル基の炭素原子及びアミド基の窒素原子と共に環を形成していてもよい。)

で表される N、N-ジ置換カルボン酸アミド化合物を主成分とする、ペルオキシダーゼ酵素量に依存して過酸化物により化学発光することを特徴とする化学発光試薬 (以下、必要に応じ「化学発光試薬 I」という。)

に関するものである。

本発明の第二は、

前記一般式 (1) で表される N、N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体、前記一般式 (2) で表される N、N-ジ置換カルボン酸アミド化合物及び下記一般式 (3)



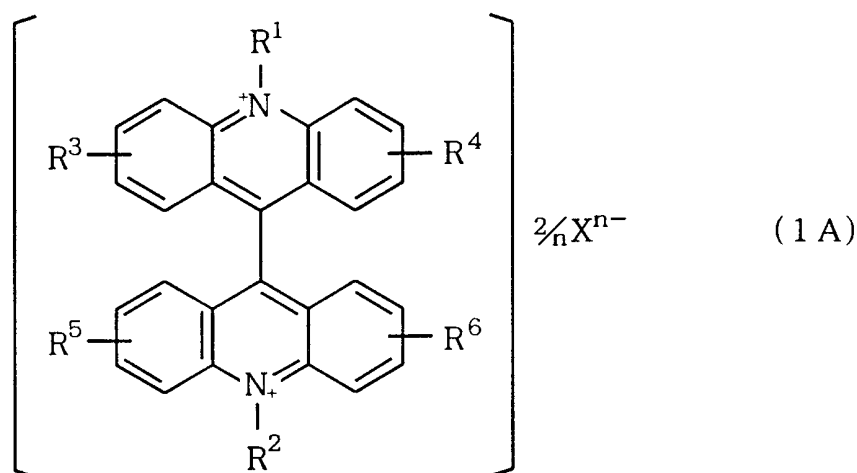
(一般式 (3) において、R は炭素数 1～5 の二価の脂肪族炭化水素基であり、m は 1～3 の整数である。)

で表されるアミノアルコール化合物を主成分とする、ペルオキシダーゼ酵素量に

依存して過酸化物により化学発光することを特徴とする化学発光試薬（以下、必要に応じ「化学発光試薬II」という。）

に関するものである。

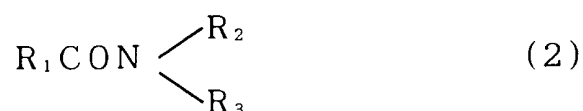
また、本発明の第三は、下記一般式（1A）



（一般式（1A）において、 R^1 及び R^2 は、それぞれアルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリーロキシ基及びハロゲン基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、 X^{n-} は n 価の陰イオンであり、 n は 1 又は 2 である。）

で表される N, N' -ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類を

下記一般式（2）



（一般式（2）において、 R_1 は、水素原子、炭素数 1～10 のアルキル基、炭素数 2～10 のアルケニル基及び炭素数 6～20 のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基及びハロゲン

原子等で置換されていてもよく、 R_2 は、メチル基及びエチル基からなる群より選択され、 R_3 は、炭素数1～10のアルキル基、炭素数2～10のアルケニル基及び炭素数6～20のアリール基からなる群より選択され、該アリール基は、アルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基及びハロゲン原子等からなる群より選択される基で置換されていてもよく、 R_1 及び R_3 は互いに結合して、それぞれが結合しているカルボニル基の炭素原子及びアミド基の窒素原子と共に環を形成していてもよい。）

で表されるN，N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射下で反応させてなることを特徴とする化学発光試薬（以下、必要に応じ「化学発光試薬Ⅲ」という。）

に関するものである。

本発明の第四は、

前記一般式（1A）で表されるN，N'-ジ置換-9，9'-ビスアクリジニウム塩類を前記一般式（2）で表されるN，N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射下で反応させる際に、その反応時及び／又は反応後に、下記一般式（3）



（一般式（3）において、Rは炭素数1～5の二価の脂肪族炭化水素基であり、mは1～3の整数である。）

で表されるアミノアルコール化合物を添加してなることを特徴とする化学発光試薬（以下、必要に応じ、「化学発光試薬Ⅳ」という。）

に関するものである。

また本発明の第五は、

本発明の前記化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下においてペルオキシダーゼ酵素活性を測定することを特徴とするペルオキシダーゼ活性の測定方法

に関するものである。

さらに、本発明の第六は、
ペルオキシダーゼ酵素標識した抗体若しくは抗原を試料中の測定すべき抗原若しくは抗体、又はこれらの凝集物と混合し、抗原抗体反応によりペルオキシダーゼ酵素標識-抗原抗体錯体から免疫複合体を形成させた後、これを分離して、本発明の前記化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下において化学発光させ、その発光強度を測定することにより試料中の抗原又は抗体の量を定量することを特徴とする化学発光酵素免疫測定方法
に関するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例1-2に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒト α -フェトプロテイン(ヒト α AFP)(標準物質)の濃度の関数としてプロットして作成したヒト α AFP測定用の検量線である。

第2図は、実施例3-2に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒト絨毛性ゴナドトロピン β 鎖(β hCG)(標準物質)の濃度の関数としてプロットして作成した β hCG測定用の検量線である。

第3図は、実施例4-2に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒトプロラクチン(PRL)(標準物質)の濃度の関数としてプロットして作成したヒトプロラクチン測定用の検量線である。

第4図は、実施例5-2に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒト α AFP(標準物質)の濃度の関数としてプロットして作成したヒト α AFP測定用の検量線である。

第5図は、比較例4-1に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒト α AFP(標準物質)の濃度の関数としてプロットして作成したヒト α AFP測定用の検量線である。

第6図は、比較例1-2に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒト α AFP（標準物質）の濃度の関数としてプロットして作成したヒト α AFP測定用の検量線である。

第7図は、比較例2-2に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒトプロラクチン（PRL）（標準物質）の濃度の関数としてプロットして作成したヒトプロラクチン測定用の検量線である。

第8図は、比較例1-3に記載の反応系を用いて化学発光させた化学発光量をヒト絨毛性ゴナドトロピン β 鎖（ β hCG）（標準物質）の濃度の関数としてプロットして作成した β hCG測定用の検量線である。

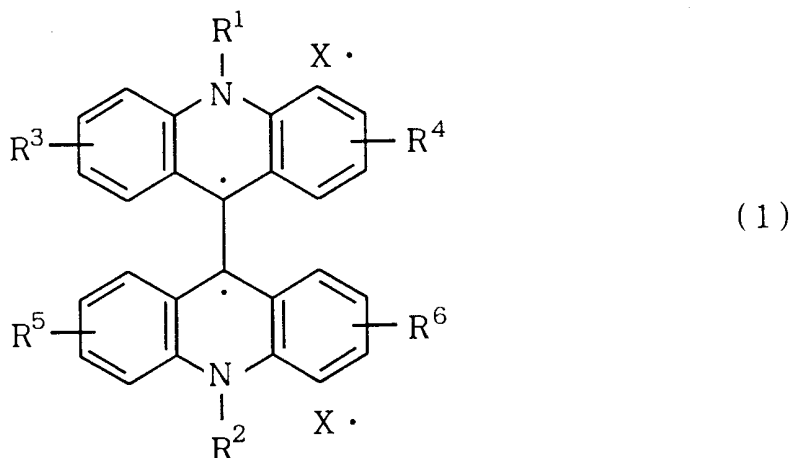
発明を実施するための形態

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

化学発光試薬

本発明の化学発光試薬Iは、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及びN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物を主成分とする組成物である。ここで「主成分」とは、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及びN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の合計量が該化学発光試薬全重量基準で50重量%以上、好ましくは70重量%以上であることを意味するものであり、該化学発光試薬には製造の際の副生成物等を含含有してもよい。

化学発光試薬Iの主成分の一つであるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体は、
次の一般式(1)



で表される化合物である。

一般式(1)において、 R^1 及び R^2 は、それぞれアルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよい。アルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基は、それぞれ炭素数1~20を有するものであり、好ましいアルキル基は炭素数1~10のものである。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基及びデシル基等の直鎖状アルキル基又はこれらの分岐状アルキル基を挙げることができる。また、アリール基は炭素数6~20のものが好ましく、例えば、フェニル基、トリール基、キシリル基等を挙げることができ、さらにアルキル基で置換されたものでもよい。アリール基としては、特にフェニル基が好ましい。ハロゲン化アリール基としてはハロゲン化フェニル基、ハロゲン化トリル基、ハロゲン化キシリル基等を挙げることができ、特にクロロフェニル基が好ましい。

一般式(1)において、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリーロキシ基及びハロゲン原子からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでよい。これらの炭化水素基としては、炭素数1~20、好ましくは1~10のものを挙げることができる。例えば、炭素数1~20の直鎖状又は分岐状アルキル基、アルコキシ基、炭

素数6～20のアリール基、アリーロキシ基を挙げることができ、アリール基、アリーロキシ基にはアルキル基が置換されたものでもよい。

好ましい実施の形態の一つとして一般式(1)において、 R^1 及び R^2 が炭素数1～10のアルキル基又は炭素数6～20のアリール基若しくはハロゲン化アリール基であり、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 が水素原子である化合物を挙げることができる。

また、一般式(1)において、 $X\cdot$ は、前駆体ビスアクリジニウム塩の対アニオンから電子が移動した残基である酸ラジカルを示す。

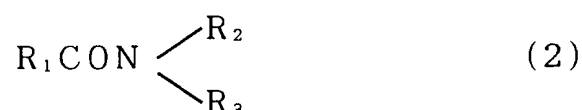
N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体は、紫外吸収スペクトルにおける550nm付近に出現する極大を有する巾広い吸収帯により示され、これを分光光度計を用いて測定することができる。

前記N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体の具体的な例としては、N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジエチル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジプロピル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジイソプロピル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジブチル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジイソブチル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジフェニル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩、N, N'-ジ-m-クロロフェニル-9, 9'-ビスアクリジニウム塩等の電荷移動錯体が挙げられる。

N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体の前駆体であるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類の対イオンとしては、塩素イオン、臭素イオン、ヨ素イオン、硝酸イオン、炭酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン及びカルボン酸イオン等が非限定的に挙げられる。従って、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体の前駆体としては、N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ塩酸塩、N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩、N, N'

ージメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩等が好ましく、特に、N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩（ルシゲニン）が好適に用いられる。

化学発光試薬 I の主成分の一つである N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物は、次の一般式 (2)



で表される化合物である。

一般式 (2) において、R₁ は水素原子、炭素数 1~10 のアルキル基、炭素数 2~10 のアルケニル基及び炭素数 6~20 のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよい。R₂ はメチル基及びエチル基からなる群より選択され、R₃ は炭素数 1~10 のアルキル基、炭素数 2~10 のアルケニル基及び炭素数 6~20 のアリール基からなる群より選択される。該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよい。また、R₁ 及び R₃ は互いに結合して、それぞれが結合しているカルボニル基の炭素原子及びアミド基の窒素原子と共に環を形成していてもよい。

前記 N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の具体的な例としては、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N, N-ジメチルアクリルアミド、N, N-ジメチルプロピオンアミド、N, N-ジメチルベンズアミド、N-メチル-2-ピロリドン等を非限定的に挙げる事ができる。

化学発光試薬 I は、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及び特定の N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物を必須成分とするものであるが、その成分の一つである N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体の前駆体である N, N'-ジ置換-9, 9'-ビス

アクリジニウム塩類は、もう一つの成分であるN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射によりN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウムカチオンへの対アニオンからの電荷移動が促進され、イオン性の高い塩類からラジカル性を有する電荷移動錯体に転化する現象が認められる。また、このN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物は、生成した電荷移動錯体のラジカルの安定性にも寄与していると考えられ、求核性の弱い酸からなるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体の形成及び安定化の必須成分として作用しているものと推定される。

化学発光試薬Iにおいて、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体とN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物との混合比は、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体に対してN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物が1~1万倍モル、好ましくは1~5千倍モルの割合が採用される。

本発明の化学発光試薬IIは、前記N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及び前記N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物との混合物にさらに、アミノアルコール化合物を添加してなるものである。

従って、化学発光試薬IIは、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体、N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物及びアミノアルコール化合物を主成分とし、これらの化合物の合計量は化学発光試薬全重量基準で50重量%以上、好ましくは70重量%以上であり、化学発光試薬Iと同様に製造時の副生成物等を含有してもよい。

化学発光試薬IIの構成成分であるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及びN, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物は、化学発光試薬Iで用いるものと同一のものであり、アミノアルコール化合物は、次の一般式(3)



で表される化合物である。

一般式(3)において、Rは炭素数1～5の二価の脂肪族炭化水素基であり、mは、1～3の整数である。

前記アミノアルコール化合物の具体例としては、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、モノイソプロパノールアミン、ジイソプロパノールアミン、トリエタノールアミン等を非限定的に挙げる事ができる。

前記化学発光試薬Iに対し、前記アミノアルコール化合物を添加することにより得られる化学発光試薬IIにおいて、該アミノアルコール化合物を添加することにより発光反応のブランク値を低下させると共に、さらに広いペルオキシダーゼ濃度範囲において安定した化学発光反応を実現することが可能となる。

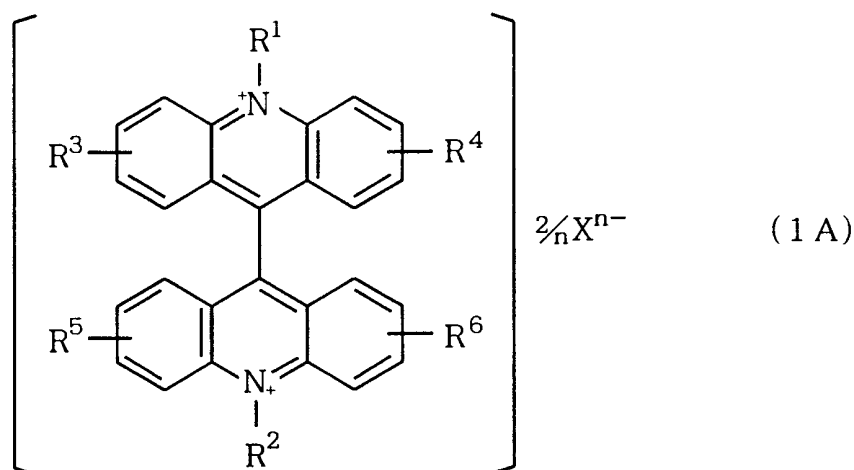
このアミノアルコール化合物の作用については必ずしも明確ではないが、ビスアクリジニウム塩類の対イオンからアクリジン環への電荷移動に関与してその反応を促進すると共に、生成する電荷移動錯体の有するラジカルを一層安定化して発光反応時における溶存酸素との反応を阻止してブランク値を高める要因を排除することにより、ブランク値の低い安定した高感度測定を可能にしているものと考えられる。

化学発光試薬IIにおいて、各成分の混合比としては、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体1モルに対し、N, N'-ジ置換カルボン酸アミド化合物1～1万倍モル、好ましくは1～5千倍モル、アミノアルコール化合物1～1万倍モル、好ましくは1～2千倍モルを採用することができる。

次に、本発明のN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体を含有する化学発光試薬の製造方法について説明する。

前記化学発光試薬 I は、N, N' -ジ置換 - 9, 9' -ビスアクリジニウム塩類を等モル以上の N, N -ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において照射下に反応を行なわせることにより製造することができる。また、化学発光試薬 II は、N, N' -ジ置換 - 9, 9' -ビスアクリジニウム塩類を N, N -ジ置換カルボン酸アミド化合物と混合して照射する際に、その反応時及び/又は反応後にアミノアルコール化合物を添加することにより調製することができる。

本発明の化学発光試薬の製造方法において、用いられる N, N -ジ置換 - 9, 9' -ビスアクリジニウム塩類は、下記一般式 (1 A)



で表される。

一般式 (1 A) において、R¹ 及び R² は、それぞれアルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよい。アルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基は、炭素数 1 ~ 20 を有するものであり、好ましいアルキル基は炭素数 1 ~ 10 のものである。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基及びデシル基等の直鎖状又は分岐状アルキル基を挙げることができる。また、アリール基は、炭素数 6 ~ 20 のものが好ましく、例えば、フェニル基、トリール基、キシリル基等を挙げることができ、さらにアルキル基で置換されたものでもよい。アリール基としては、特に、

フェニル基が好ましい。ハロゲン化アリール基としてはハロゲン化フェニル基、ハロゲン化トリル基、ハロゲン化キシリル基等を挙げることができ、特に、クロロフェニル基が好ましい。

一般式(1A)において、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリーロキシ基及びハロゲン原子からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでよい。これらの炭化水素基としては、炭素数1~20、好ましくは1~10のものを挙げることができる。例えば、炭素数1~20の直鎖状又は分岐状アルキル基、アルコキシ基、炭素数6~20のアリール基、アリーロキシ基を挙げることができ、アリール基、アリーロキシ基にはアルキル基が置換されたものでもよい。

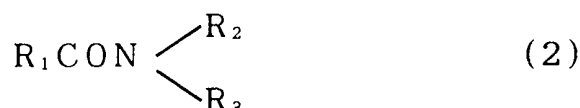
好ましい実施の形態の一つとして一般式(1A)において、 R^1 及び R^2 が炭素数1~10のアルキル基又は炭素数6~20のアリール基若しくはハロゲン化アリール基であり、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 が水素原子である化合物を挙げることができる。

また、一般式(1A)において、 X^{n-} はn価の陰イオンであり、nは1又は2である。陰イオンとしては、特に限定されるものではないが、塩素イオン、臭素イオン、酸素イオン、硝酸イオン、炭酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン及びカルボン酸イオン等を挙げることができる。これらの陰イオンのなかでも、特に硝酸イオンが好ましい。

前記N、N'-ジ置換-9,9'-ビスアクリジニウム塩類の具体例としては、N,N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジエチル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジプロピル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジイソプロピル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジブチル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジイソブチル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジフェニル-9,9'-ビスアクリジニウム塩、N,N'-ジ-m-クロロフェニル-9,9'-ビスア

クリジニウム塩等を挙げることができる。勿論これらに限定されるものではないが、特に、N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩（ルシゲニン）が好適である。

また、前記N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物は、前記のものと同一でよいが、次の一般式（2）

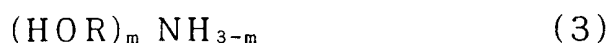


で表される。

一般式（2）において、R₁は水素原子、炭素数1～10のアルキル基、炭素数2～10のアルケニル基及び炭素数6～20のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基及びハロゲン原子、等からなる群より選択される基で置換されていてもよい。R₂はメチル基及びエチル基からなる群より選択され、R₃は炭素数1～10のアルキル基、炭素数2～10のアルケニル基及び炭素数6～20のアリール基からなる群より選択され、該アリール基は、アルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基及びハロゲン原子、等からなる群より選択される基で置換されていてもよい。R₁及びR₃のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等の直鎖状又は分岐状のものを挙げることができる。また、R₁及びR₃は互いに結合して、それぞれが結合しているカルボニル基の炭素原子及びアミド基の窒素原子と共に環を形成していてもよい。

N, N-ジ置換カルボン酸アミド化合物の具体例としては、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N, N-ジメチルアクリルアミド、N, N-ジメチルプロピオンアミド、N, N-ジメチルベンズアミド、N-メチル-2-ピロリドン等を挙げることができる。

さらに、前記アミノアルコール化合物は、次の一般式 (3)



で表される化合物である。

一般式 (3) において、Rは炭素数1～5の二価の脂肪族炭化水素基であり、mは1～3の整数である。

前記アミノアルコール化合物の具体的な例としては、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、モノイソプロパノールアミン、ジイソプロパノールアミン、トリイソプロパノールアミン等を非限定的に挙げる事ができる。

本発明の化学発光試薬の製造において、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類をN, N'-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射する際には波長領域約290～800nmの範囲の紫外可視部が用いられ、特に約400～800nmの範囲の可視光が好ましい。これらの光源としては、高圧水銀灯、低圧水銀灯、殺菌灯、蛍光灯及び白熱灯等を非限定的に用いることができるが、特に、白熱電灯が好ましい。

前記アミノアルコール化合物は、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類とN, N'-ジ置換カルボン酸アミド化合物との混合物に光照射前に添加しておいてもよいが、光照射によるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類の電荷移動反応時及び／又は反応後のいずれかに添加すればよい。特に、発光性能の安定性維持の観点からは光照射後、即ち電荷移動反応後に添加することが好ましい。

本発明におけるアミノアルコール化合物の添加は、化学発光反応時においてブランク値を低下させる効果及びペルオキシダーゼの高濃度領域における発光強度を上昇させる効果を有し、また、化学発光試薬の保存時において、その発光性能の低下を防ぐ保存安定性を改善する効果等を有し、化学発光試薬の感度や安定

性等の性能の向上に寄与する処が大きい。

本発明の化学発光試薬は、以上説明したような構成からなり、pH 7.5～13の塩基性条件下において、過剰の過酸化水素の存在下、ペルオキシダーゼの濃度に依存した量で発光するという特性を有するものである。

従って、本発明の化学発光試薬は、前記の如き発光特性を有することからペルオキシダーゼ活性の測定方法に有用であり、またそれを利用した酵素免疫測定方法への用途を有するのでこれらについて以下に説明する。

ペルオキシダーゼ活性の測定方法

本発明によれば、前記化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下においてペルオキシダーゼ酵素活性を測定する化学発光法によるペルオキシダーゼ活性の測定方法が提供される。

また、本発明によれば、前記化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下においてペルオキシダーゼ酵素活性を測定する際に、発光促進剤としてのフェノール性化合物を用いる化学発光法によるペルオキシダーゼ活性の測定方法が提供される。

ペルオキシダーゼ活性の測定方法において、その測定操作は任意であるが、通常、化学発光試薬溶液、発光促進剤及びペルオキシダーゼ酵素を含有する測定試料を混合し、特定の塩基性pH領域において水素受容体溶液を添加して化学発光反応させ、化学発光量を発光測定装置で測定する方法等を採用することができる。

ペルオキシダーゼ活性の測定において、化学発光試薬は 10^{-8} ～1M、好ましくは 10^{-6} ～ 10^{-2} Mの濃度の範囲で用いられ、その使用量は10～500 μ l、好ましくは50～300 μ lの範囲である。

本発明の化学発光試薬は、特定の塩基性条件で発光するが、この発光はフェノール性化合物等の発光促進剤の添加により増強されることが認められる。フェ

ノール性化合物としては、p-ヒドロキシ桂皮酸、p-フェニルフェノール、p-(4-クロロフェニル)フェノール、p-(4-ブロモフェニル)フェノール、p-(4-ヨードフェニル)フェノール、p-ヨードフェノール、p-ブロモフェノール、p-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、p-クマール酸、6-ヒドロキシベンゾチアゾール、2-ナフトール、ホタルルシフェリン等を非限定的に挙げる事ができる。特に、p-ヨードフェノール、p-フェニルフェノール、6-ヒドロキシベンゾチアゾール等が好ましい。発光促進剤の使用量は、化学発光試薬の0.01~100倍モル、好ましくは0.1~10倍モルの範囲であり、その濃度としては 10^{-6} ~1M、好ましくは 10^{-4} ~ 10^{-2} Mの範囲で採用することができる。

また、水素受容体としては、ペルオキシダーゼ酵素の基質となり得るものであれば特に限定されるものではなく、無機過酸化物、有機過酸化物等を任意に用いることができるが、特に過酸化水素が好ましい。水素受容体は化学発光試薬に対して十分に過剰な量で用いることが必要であり、その使用量は、化学発光試薬に対して3~1万倍モル、好ましくは10~1000倍モルの範囲が採用される。

本発明のペルオキシダーゼ活性の測定方法においてペルオキシダーゼを標識物質として用いることにより、抗原、抗体又は核酸等の種々の物質の定量が可能である。このようにペルオキシダーゼ標識物質として用いる場合には特に限定されるものではないがペルオキシダーゼとして西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)が好ましい。

化学発光反応に用いられる塩基性緩衝液としては、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ほう酸緩衝液、炭酸緩衝液、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液等を任意に挙げる事ができる。これらの緩衝液の濃度としては、1mM~1Mの範囲が好ましい。また、反応時に界面活性剤、キレート剤等の添加剤を任意に用いることもできる。

また、化学発光量の計測の方法としては、ルミノメーター、各種フォトカウン

ターのほかX線フィルム、各種感光フィルム等を用いる方法を挙げることができる。

化学発光酵素免疫測定方法

本発明の新規化学発光試薬の用途として、ペルオキシダーゼ酵素を標識物質として用いる抗原又は抗体の化学発光酵素免疫測定方法を提供することができる。

本発明の化学発光試薬を用いる化学発光酵素免疫測定方法は、ペルオキシダーゼ酵素標識した抗体又は抗原を試料中の測定すべき抗原若しくは抗体、又はそれらの凝集物と混合し、抗原抗体反応により測定すべき抗原又は抗体をペルオキシダーゼ酵素標識した免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識酵素を用いる化学発光法により測定する化学発光反応段階とからなる。

免疫反応段階を構成する抗原抗体反応の方法は任意であり、前記化学発光試薬を用いることができるものであれば、いずれの方法も採用することができる。

例えば、

- ①不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原を捕捉させた後にペルオキシダーゼ酵素標識抗体を反応させるサンドイッチ法、
- ②サンドイッチ法において、不溶性担体に結合した抗体と異なる動物種に由来する抗体を用い、生成したサンドイッチ錯体に対して、更にこの抗体に対する標識第二抗体を反応させる二抗体法、
- ③不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原をペルオキシダーゼ酵素標識抗原の存在下で反応させる競合法、
- ④測定すべき抗原若しくは抗体を含有する試料にこれらと特異的に反応する標識した抗体若しくは抗原を作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離して分離した免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法、
- ⑤不溶性担体に結合した抗原に試料中の測定すべき抗体をペルオキシダーゼ酵素標識抗ヒトガンマグロブリン抗体を作用させる抗体検出法、更に、

⑥ビオチン標識抗体にペルオキシダーゼ酵素標識アビジンを反応させるビオチン-アビジン法等

を非限定的に用いることができる。

本発明の化学発光酵素免疫測定方法に用いられる不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等が挙げられる。また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原若しくは抗体の固定化方法は任意であるが、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

また、本発明の化学発光酵素免疫測定方法において用いられる抗体類は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれを使うことも可能であり、その形態としては全抗体又は $F(ab')_2$ 、Fab等の断片を用いることができる。また、抗体の起源は任意であるが、マウス、ラット、兎、羊、山羊、鶏等に由来する抗体が好適に用いられる。

本発明の化学発光酵素免疫測定方法の後段を構成する化学発光反応は、前記化学発光試薬を用い、そして発光促進剤の存在下に水素受容体を作用させて不溶性担体上に捕捉された標識物質であるペルオキシダーゼ酵素の活性を測定するものであり、その測定方法は任意であるが、一般に、化学発光物質及び発光促進剤を含有する測定試薬をペルオキシダーゼ酵素標識抗体又は抗原を免疫学的に捕捉した不溶性担体に添加し、特定の塩基性pH領域において、水素受容体、例えば、過酸化水素水溶液を添加して化学発光反応させ、その化学発光量を発光測定装置で測定する方法等が行なわれている。

本発明の化学発光酵素免疫測定方法において塩基性pH領域をpH7.5～13に設定することにより前記化学発光試薬が発光し、発光促進剤としては前記

のフェノール性化合物を用いることにより発光が増強することが認められる。化学発光試薬は、 10^{-8} ~ 1M 、好ましくは 10^{-6} ~ 10^{-2}M の範囲で用いられ、その使用量は 10 ~ $500\mu\text{l}$ 、好ましくは 50 ~ $300\mu\text{l}$ の範囲で採用される。また、発光促進剤は化学発光試薬の 0.01 ~ 100 倍モル、好ましくは 0.1 ~ 10 倍モルの範囲で用いられる。水素受容体、ペルオキシダーゼ、塩基性緩衝液等及びそれらの使用条件は前記のペルオキシダーゼ活性の測定方法で用いたものと同じのものでよく、使用条件も同一でよい。

発明の効果

本発明により提供される新規化学発光試薬は、安価な製造原料を用いて比較的短時間で容易に製造でき、過酸化水素とペルオキシダーゼの存在下に、ペルオキシダーゼの濃度に依存して化学発光する性質を有するのでこれを利用して、ペルオキシダーゼ酵素を高感度で検出することができる。さらに、ペルオキシダーゼを標識物質として抗原、抗体、核酸等を標識した酵素標識物を用いて、酵素免疫測定方法により抗原、抗体等を、ウェスタンブロット法により蛋白質を、サザーン及びノーザンブロット法によりDNA及びRNAを、そして酵素標識核酸プローブを用いて核酸をそれぞれ特異的にかつ高感度で測定することができる。

実施例

以下、実施例及び比較例等を示し、本発明を具体的に説明する。もっとも本発明は実施例等により何ら限定されるものではない。

なお、実施例等において発光量を測定したルミノメーターにはダイアヤトロン社製ルミナスCT-9000Dを用いた。

また、実施例及び比較例等において、「%」は重量基準である。

実施例1

N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩電荷移動錯体及びN, N-ジメチルアセトアミドを含む化学発光試薬の調製

ルシゲニンの 1×10^{-2} モル/lの水溶液に、2倍モルの固体の沃化カリウムを添加し、室温で1時間攪拌することにより赤色沈殿が生成した。この赤色沈殿を含む反応液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下に60℃で溶媒の水を蒸発して乾固させ、赤色沈殿からなる残渣をベンゼンで洗浄して副生物を除去し、ベンゼン不溶分を濾別し乾燥して粗生成物を得た。次に、この粗生成物に少量の水を加え、遮光下に95℃の湯浴上で加熱して溶解した後、室温に戻してから、更に4℃に冷却放置し、生成した沈殿を濾別、乾燥して未反応物を除去してN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩を約70%の収率で得た。次に、この化合物1.5mgを試験管に採り、これにN, N'-ジメチルアセトアミド1mlを加えて溶解させた後、30℃の温度の水浴中で250Wのコピーランプを7時間照射することによりN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩電荷移動錯体を含む化学発光試薬を得た。なお、電荷移動錯体の生成は、紫外吸収スペクトルにおける550nm付近に極大をもつ幅広い吸収帯の出現を分光光度計を用いる方法により測定して確認した。

(化学発光試薬の性能評価)

ここで得られた化学発光試薬の性能を次のペルオキシダーゼ活性の測定により評価した。

化学発光試薬50 μ lを採り、これを0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)2.95mlと混合した後、この溶液に10mMのp-ヨードフェノールを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)溶液100 μ lを添加し混合して化学発光試薬溶液を調製した。また、化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の種々の濃度水準の0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)溶液100 μ lずつを充填し、これに溶液注入装置から上記化学発光試薬溶液及び0.0017%過酸化水素水溶液100 μ lを順次注入して化学発光反応させ、この発光量をルミノメーターで0~5秒間積算した結果、表1に

示すような発光強度が得られ、ペルオキシダーゼ活性を $1 \times 10^{-13} \text{mol/l}$ の濃度まで測定できることが認められた。

この結果から、ペルオキシダーゼ濃度に応じて発光量が制御され、かつ、低濃度域まで測定が可能であることが判明した。

実施例 1 - 1

ペルオキシダーゼ活性の測定

化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の種々の濃度水準の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 溶液 $100 \mu\text{l}$ 、及び 10 mM p-ヨードフェノール溶液 $800 \mu\text{l}$ と実施例 1 の化学発光試薬 $20 \mu\text{l}$ とを 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 溶液 9.18ml に添加して調製した発光試薬溶液 $100 \mu\text{l}$ を加えた後、これに 0.0034% の過酸化水素水溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、ルミノメーターで 1~5 秒間発光量を積算した結果、表 A に示すような発光強度が得られ、HRP を $1 \times 10^{-19} \text{mol/assay}$ まで測定することが可能であった。

表 A

HRP (mol/assay)	発光量
0	119
5×10^{-20}	191
1×10^{-19}	256
1×10^{-18}	2195
1×10^{-17}	16453
1×10^{-16}	109868
1×10^{-15}	955491
1×10^{-14}	3177943

実施例 1 - 2

実施例 1 で調製した化学発光試薬を用いる同時サンドイッチ法CLEIAによる α -フェトプロテイン (AFP) の測定

参考例 1 の方法で調製した兎抗ヒト AFP ポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製したヒト AFP (標準物質) を 0 ~ 800 ng/ml の範囲で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH7.4) 50 μ l と参考例 2 の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗ヒト AFP モノクローナル抗体を約 3 μ g/ml の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH7.4) 100 μ l とを加え、37°C の温度で 1 時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに 75 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 100 μ l を加え、これに実施例 1 で調製した化学発光試薬溶液 100 μ l 及び 0.0017% 過酸化水素を含む 75 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 50 μ l を順次注入して発光させた後、この発光量をルミノメーターで 1 ~ 5 秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより第 1 図に示される濃度依存性の良い検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中のヒト AFP を 0.01 ng/ml の濃度まで測定することが可能であった。

実施例 2

N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ塩酸塩電荷移動錯体及び N, N-ジメチルホルムアミドを含む化学発光試薬の調製

ルシゲニンの 1×10^{-2} モル/l の水溶液に、2 倍モルの固体の塩化カリウムを添加し、室温で 1 時間攪拌することにより橙赤色沈殿が生成した。この橙赤色沈殿を含む反応液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下に 60°C で溶媒の水を蒸発して乾固させ、橙赤色沈殿からなる残渣をベンゼンで洗浄して副生物を除去し、ベンゼン不溶分を濾別し乾燥して粗生成物を得た。次に、この粗生成物に少量の水を加え、遮光下に 95°C の湯浴上で加熱して

溶解した後、室温に戻してから、更に4℃に冷却放置し、生成した沈殿を濾別、乾燥して未反応物を除去してN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ塩酸塩を約75%の収率で得た。次に、この化合物1.5mgを試験管に採り、これにN, N-ジメチルホルムアミド1mlを加えて溶解させた後、30℃の温度の水浴中で250Wのコピーランプを7時間照射することによりN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ塩酸塩の電荷移動錯体を含有する化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例1の化学発光試薬の代わりに実施例2の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例1と同一の操作手順及び条件にてペルオキシダーゼ活性を測定した。その結果、表1に示す発光強度が得られ、ペルオキシダーゼ活性 $1 \times 10^{-13} \text{mol/l}$ の濃度まで測定でき、また、ペルオキシダーゼ濃度に応じて発光量の制御が可能であることが判明した。

実施例3

N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩電荷移動錯体及びN, N-ジメチルアセトアミドを含む化学発光試薬の調製

ルシゲニン1.5mgを試験管に採り、これにN, N-ジメチルアセトアミド1mlを加えて溶解させた後、30℃の温度の水浴中で250Wのコピーランプを7時間照射することによりN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩電荷移動錯体を含有する化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例1の化学発光試薬の代わりに実施例3の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例1と同一の操作、手順及び条件でのペルオキシダーゼ活性の測定により性能を評価した。その結果、表1に示すような発光強度が得られ、ペルオキシダーゼ活性を $1 \times 10^{-13} \text{mol/l}$ の濃度まで測定でき、また、ペルオキシダーゼ濃度により発光量が制御されることが認められた。

実施例3-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の種々の濃度水準の0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 溶液 100 μ l、及び10 mM p-ヨードフェノール溶液 800 μ l と実施例3の化学発光試薬 20 μ l とを10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 溶液 9.18 ml に添加して調製した発光試薬溶液 100 μ l を加えた後、これに0.0034%の過酸化水素水溶液 50 μ l を加え、ルミノメーターで1~5秒間発光量を積算した結果、表Bに示すような発光強度が得られ、HRPを 1×10^{-19} mol / assay まで測定することが可能であった。

表 B

HRP (mol / assay)	発光量
0	131
5×10^{-20}	203
1×10^{-19}	281
1×10^{-18}	2587
1×10^{-17}	21578
1×10^{-16}	165711
1×10^{-15}	997519
1×10^{-14}	2965678

実施例3-2

実施例3で調製した化学発光試薬を用いる同時サンドイッチ法CLEIAによるヒト絨毛性ゴナドトロピン β 鎖 (β hCG) の測定

参考例1の方法で調製した兎抗ヒトhCGポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製した β hCG (標準物質) を0~100 mIU / ml の範囲で含有する2% BSA含有PBS溶液 (pH7.4) 50 μ l と参考例2の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗 β hCGモノクローナル抗体

を約 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含む2%BSA含有PBS溶液(pH7.4) $100\mu\text{l}$ とを加え、 37°C の温度で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに75mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8) $100\mu\text{l}$ を加え、これに実施例3で調製した化学発光試薬溶液 $100\mu\text{l}$ 及び0.0017%過酸化水素を含む75mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8) $50\mu\text{l}$ を順次注入して発光させた後、この発光量をルミノメーターで1~5秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第2図に示される濃度依存性の良い検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中の βhCG を $0.01\text{mIU}/\text{ml}$ の濃度まで測定することが可能であった。

実施例4

N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩電荷移動錯体、N, N'-ジメチルアセトアミド及びトリエタノールアミンを含む化学発光試薬の調製

ルシゲニンの 1×10^{-2} モル/lの水溶液に、2倍モルの固体の沃化カリウムを添加し、室温で1時間攪拌することにより赤色沈殿が生成した。この赤色沈殿を含む反応液をナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下に 60°C で溶媒の水を蒸発して乾固させ、赤色沈殿からなる残渣をベンゼンで洗浄して副生物を除去し、ベンゼン不溶分を濾別し乾燥して粗生成物を得た。次に、この粗生成物に少量の水を加え、遮光下に 95°C の湯浴上で加熱して溶解した後、室温に戻してから、更に、 4°C に冷却放置し、生成した沈殿を濾別、乾燥して未反応物を除去してN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩を約70%の収率で得た。次に、この化合物 1.5mg を試験管に採り、これにN, N'-ジメチルアセトアミド 1ml を加えて溶解させた後、 30°C の温度の水浴中で250Wのコピーランプを7時間照射してから、トリエタノールアミン 0.5ml を添加し混合することによりN, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩電荷移動錯体、N, N'-ジメチル

アセトアミド及びトリエタノールアミンを含有する化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例1の化学発光試薬の代わりに実施例4の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例1と同一の操作、手順及び条件でのペルオキシダーゼ活性の測定により性能を評価した。その結果、表1に示すような発光強度が得られ、ペルオキシダーゼ活性を $1 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ の濃度まで測定でき、また、ペルオキシダーゼ濃度にて発光量の制御が可能であることが認められた。

実施例4-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の種々の濃度水準の0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)溶液 $100 \mu\text{l}$ 、及び10mMp-ヨードフェノール溶液 $800 \mu\text{l}$ と実施例4の化学発光試薬 $20 \mu\text{l}$ とを10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)溶液 9.18 ml に添加して調製した発光試薬溶液 $100 \mu\text{l}$ を加えた後、これに0.0034%の過酸化水素水溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、ルミノメーターで1~5秒間発光量を積算した結果、表Cに示すような発光強度が得られ、HRPを $1 \times 10^{-19} \text{ mol/assay}$ まで測定することが可能であった。

表 C

HRP (mol/assay)	発光量
0	51
5×10^{-20}	97
1×10^{-19}	114
1×10^{-18}	928
1×10^{-17}	7469
1×10^{-16}	59344
1×10^{-15}	479751
1×10^{-14}	3865678

実施例4-2

実施例4で調製した化学発光試薬を用いる同時サンドイッチ法CLEIAによるヒトプロラクチン(PRL)の測定

参考例1の方法で調製した兔抗ヒトPRLポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製したヒトPRL(標準物質)を0~100ng/mlの範囲で含有する2%BSA含有PBS溶液(pH7.4)50 μ lと参考例2の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗ヒトPRLモノクローナル抗体を約3 μ g/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液(pH7.4)100 μ lとを加え、37 $^{\circ}$ Cの温度で1時間インキュベートした。次いで、ウェル内の溶液を吸引除去し、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに75mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)100 μ lを加え、これに実施例4で調製した化学発光試薬溶液100 μ l及び0.0017%過酸化水素を含む75mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)50 μ lを順次注入して発光させた後、この発光量をルミノメーターで1~5秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第3図に示される濃度依存性の良い検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中のヒトPRLを0.01ng/mlの濃度まで測定することが可能であった。

実施例5

N, N'-ジメチル-9, 9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩の電荷移動錯体、N, N-ジメチルアセトアミド及びトリエタノールアミンを含む化学発光試薬の調製

ルシゲニン1.5mgを試験管に採り、これにN, N-ジメチルアセトアミド1mlを加えて溶解させた後、30 $^{\circ}$ Cの温度の水浴中で250Wのコピーランプを7時間照射してから、トリエタノールアミン0.5mlを添加し混合することにより化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例1の化学発光試薬の代わりに実施例5の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例1と同一の操作、手順及び条件にてペルオキシダーゼ活性の測定により評価した。その結果、表1に示すような発光強度が得られ、ペルオキシダーゼ活性を $1 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ の濃度まで測定でき、また、ペルオキシダーゼ濃度に応じて発光量が制御されることが認められた。

実施例5-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の種々の濃度水準の0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)溶液100 μl 、及び10mMp-ヨードフェノール溶液800 μl と実施例5の化学発光試薬20 μl とを10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.8)溶液9.18mlに添加して調製した発光試薬溶液100 μl を加えた後、これに0.0034%の過酸化水素溶液50 μl を加え、ルミノメーターで1~5秒間発光量を積算した結果、表Dに示すような発光強度が得られ、HRPを $1 \times 10^{-19} \text{ mol/assay}$ まで測定することが可能であった。

表 D

HRP (mol/assay)	発光量
0	48
5×10^{-20}	76
1×10^{-19}	112
1×10^{-18}	895
1×10^{-17}	7165
1×10^{-16}	57293
1×10^{-15}	366592
1×10^{-14}	2944398

実施例5-2

実施例5で調製した化学発光試薬を用いる同時サンドイッチ法CLEIAによる α -フェトプロテイン (AFP) の測定

参考例1の方法で調製した兔抗ヒトAFPポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製したヒトAFP (標準物質) を0~800 ng/mlの範囲で含有する2%BSA含有PBS溶液 (pH7.4) 50 μ lと参考例2の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗ヒトAFPモノクローナル抗体を約3 μ g/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液 (pH7.4) 100 μ lとを加え、37°Cの温度で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに75 mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 100 μ lを加え、これに実施例5で調製した化学発光試薬100 μ l及び0.0017%過酸化水素を含む75 mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.8) 50 μ lを順次注入して発光させた後、この発光量をルミノメーターで1~5秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第4図に示される濃度依存性を有する検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中のヒトAFPを0.01 ng/mlの濃度まで測定することが可能であった。

実施例6

化学発光試薬の調製

ルシゲニン1.5 mgを試験管に採り、これにN, N-ジメチルホルムアミド1 mlを加えて溶解させた後、30°Cの温度の水浴中で250 Wのコピーランプを5時間照射することにより化学発光性物質を含有する化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例1の化学発光試薬の代わりに実施例6の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例1と同一の操作、手順及び条件によるペルオキシダーゼ活性の測定により評価した。その結果、表1に示すような発光強度が得られ、光照射せずに反応を行なった比較例2に較べて発光強度において改善が認められた。

実施例6-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

実施例6の化学発光試薬を $8 \times 10^{-4} \text{M}$ のp-ヨードフェノール75mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)溶液で500倍に希釈して化学発光試薬溶液を調製した。また、化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の種々の濃度水準の75mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)溶液100 μl を充填し、これに溶液注入装置から前記化学発光試薬溶液100 μl 及び0.0017%過酸化水素の75mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)溶液50 μl を順次注入して発光反応させた後、この発光量をルミノメーターで0~5秒間の発光量を積算した結果、表Eに示す発光強度が得られ、HRPを $5 \times 10^{-19} \text{mol/assay}$ まで測定可能なことが認められ、光照射せずに反応を行なった比較例2に較べて感度及び発光強度において改善が見られた。

表 E

HRP (mol/assay)	発光量
0	546
1×10^{-19}	793
5×10^{-19}	1241
1×10^{-18}	5541
1×10^{-17}	43431
1×10^{-16}	341837
1×10^{-15}	3168503

実施例7

化学発光試薬の調製

ルシゲニン1.5mgを試験管に採り、これにN-メチル-2-ピロリドン1mlを加えて溶解させた後、30℃の温度の水浴注で250Wのコピーランプを3時間照射することにより化学発光性物質を含有する化学発光試薬を得る。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例1の化学発光試薬の代わりに実施例7の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例1の操作、手順及び条件にてペルオキシダーゼ活性を測定し、性能を評価した。その結果、表1に示すような発光強度が得られ、光照射せずに反応を行なった比較例3に較べて発光強度において改善が認められた。

実施例7-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

実施例7の化学発光試薬を $8 \times 10^{-4} \text{M}$ のp-ヨードフェノール75mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)溶液で500倍に希釈して化学発光試薬溶液を調製する。また、化学発光測定用マイクロプレートの複数のウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の種々の濃度水準の75mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)溶液100 μl を充填し、これに溶液注入装置から前記化学発光試薬溶液100 μl 及び0.0017%過酸化水素の75mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)溶液50 μl を順次注入して発光反応させた後、この発光量をルミノメーターで0~5秒間発光量を積算した結果、表Fに示す発光強度が得られ、HRPを $5 \times 10^{-19} \text{mol/assay}$ まで測定可能なことが認められ、光照射せずに反応を行なった比較例3に較べて感度及び発光強度において改善が見られた。

表 F

HRP (mol/assay)	発光量
0	398
1×10^{-19}	542
5×10^{-19}	956
1×10^{-18}	2670
1×10^{-17}	18693
1×10^{-16}	261848
1×10^{-15}	2887914

実施例 8

化学発光試薬の調製

ルシゲニン 1.5 mg を試験管に採り、これに N, N-ジメチルアセトアミド 1 ml を加えて溶解させた後、30℃の温度の水浴中で 250W のコピーランプを 7 時間照射してから、モノエタノールアミン 0.1 ml を添加し混合することにより化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

実施例 1 の化学発光試薬の代わりに実施例 8 の化学発光試薬を用いたこと以外すべて実施例 1 の操作、手順及び条件にてペルオキシダーゼ活性を測定し、性能を評価した。結果を表 1 に示す。

実施例 8-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

実施例 8 の化学発光試薬を用いて実施例 7-1 と同一の操作、手順及び条件にてペルオキシダーゼ活性を測定した。HRP を $1 \times 10^{-19} \text{ mol / assay}$ まで測定することができ、モノエタノールアミンを添加していない実施例 6-1、7-1 に比較して感度及び発光強度において改善が認められた。

表 G

HRP (mol / assay)	発光量
0	216
5×10^{-20}	379
1×10^{-19}	824
1×10^{-18}	6608
1×10^{-17}	79966
1×10^{-16}	1585325
1×10^{-15}	12371903

比較例 1

化学発光試薬の調製

ルシゲニン 1 mg を試験管に採り、これに N, N-ジメチルアセトアミド 2 ml を加えて溶解させた後、室温で 3 時間静置してから純水 2 ml を加えて混合することにより化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

この化学発光試薬を直ちに 20 μ l ずつ、複数の化学発光測定用ウェルに加え、次に、このウェルに各々西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の異なる複数の濃度水準の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) 溶液 200 μ l 及び 10 mM p-ヨードフェノールの 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) 溶液 20 μ l を加えた後、これに 0.0034% 過酸化水素水溶液 50 μ l を加え、ルミノメーターで 0~5 秒間発光量を積算した結果、表 1 に示すような発光強度が得られたにすぎなかった。

比較例 1-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

比較例 1 の化学発光試薬を 4.0×10^{-5} M、及び p-ヨードフェノールを 10^{-3} M の濃度で含有する 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) 100 μ l に、種々の濃度水準の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 水溶液 100 μ l を混合し、これに 0.0034% 過酸化水素水溶液 50 μ l を加え、ルミノメーターで 0~5 秒間発光量を積算した結果、表 a に示す如く HRP を 1×10^{-18} mol / assay まで測定することが可能であった。

表 a

HRP (mol/assay)	発光量
0	374
5×10^{-19}	425
1×10^{-18}	746
1×10^{-17}	2688
1×10^{-16}	33007
1×10^{-15}	109582

比較例 1 - 2

比較例 1 で調製した化学発光試薬の同時サンドイッチ法CLEIAによる α -フ
ェトプロテイン (AFP) の測定

参考例 1 の方法で調製した兎抗ヒトAFPポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製したヒトAFP (標準物質) を $0 \sim 800 \text{ ng/ml}$ の範囲で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) $50 \mu\text{l}$ と参考例 2 の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗ヒトAFPモノクローナル抗体を約 $3 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) $100 \mu\text{l}$ とを加え、 37°C の濃度で 1 時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに比較例 1 で調製した化学発光試薬を $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、p-ヨードフェノールを 10^{-3} M の濃度で含有する 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.4) $250 \mu\text{l}$ を加え、これに 0.0034% 過酸化水素の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.4) $50 \mu\text{l}$ を注入して発光させ、この発光量をルミノメーターで 0~5 秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第 6 図に示される濃度依存性の良い検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中のヒトAFPを 0.5 ng/ml の濃度まで測定することが可能であった。

比較例 1 - 3

比較例 3 で調製した化学発光試薬を用いる同時サンドイッチ法 CLEIA による ヒト絨毛性ゴナドトロピン β 鎖 (β hCG) の測定

参考例 1 の方法で調製した兔抗ヒト hCG ポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製した β hCG (標準物質) を 0 ~ 200 mIU/ml の範囲で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) 50 μ l と参考例 2 の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗 β hCG モノクローナル抗体を約 2 μ g/ml の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) 100 μ l とを加え、37°C の温度で 1 時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄してから、各ウェルに比較例 1 の化学発光試薬を 4.0×10^{-5} M、p-ヨードフェノールを 10^{-3} M の濃度で含有する 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.4) 250 μ l を加え、これに 0.0034% 過酸化水素の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.4) 50 μ l を注入して発光させ、この発光量をルミノメーターで 0 ~ 5 秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第 8 図に示される濃度依存性の良い検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中の β hCG を 1.0 mIU/ml の濃度まで測定することが可能であった。

比較例 2

化学発光試薬の調製

ルシゲニン 1 mg を試験管に採り、これに N, N-ジメチルホルムアミド 2 ml を加えて溶解させた後、室温で 90 分静置してから純水 2 ml を加えて混合することにより化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

この化学発光試薬について比較例 1 と同一の操作、手順及び条件で発光量を測定し化学発光試薬としての性能を評価した。その結果、表 1 に示す発光強度が得られた。

比較例 2 - 1

ペルオキシダーゼ活性の測定

比較例 2 の化学発光試薬を $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 及び p-ヨードフェノールを 10^{-3}M の濃度で含有する 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.4) $100 \mu\text{l}$ に、種々の濃度水準の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 水溶液 $100 \mu\text{l}$ を混合し、これに 0.0034% 過酸化水素水溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、ルミノメーターで 0~5 秒間発光量を積算した結果、表 b に示す如く HRP を $1 \times 10^{-18} \text{mol}$ / assay まで測定することが可能であった。

表 b

HRP (mol / assay)	発光量
0	409
5×10^{-19}	689
1×10^{-18}	2500
1×10^{-17}	18356
1×10^{-16}	194052
1×10^{-15}	1390722

比較例 2 - 2

比較例 2 で調製した化学発光試薬の同時サンドイッチ法 CLEIA によるプロラクチン (PRL) の測定

参考例 1 の方法で調製した兔抗ヒト PRL ポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製したヒト PRL (標準物質) を 0~200 ng/ml の範囲で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) $50 \mu\text{l}$ と参考例 2 の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗ヒト PRL モノクローナル抗体を約 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で含有する 2% BSA 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) $100 \mu\text{l}$ とを加え、 37°C の温度で 1 時間インキュベートした。次いで、

ウェル内の溶液を吸引除去し、生理食塩水で洗浄してから、各ウェルにルシゲニン-N, N-ジメチルアセトアミド複合体を $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、p-ヨードフェノールを 10^{-3}M の濃度で含有する0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4) $250 \mu\text{l}$ を加え、これに0.0034%過酸化水素の0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4) $50 \mu\text{l}$ を注入して発光させ、この発光量をルミノメーターで0~5秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第7図に示される濃度依存性の良好な検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中のヒトプロラクチンを 1.0 ng/ml の濃度まで測定することが可能であった。

比較例3

化学発光試薬の調製

ルシゲニン1mgを試験管に採り、これにN-メチル-2-ピロリドン2mlを加えて溶解させた後、室温において90分静置してから純水2mlを加えて混合することにより化学発光試薬を得た。

(化学発光試薬の性能評価)

この化学発光試薬について比較例1と同一の操作、手順及び条件にて発光量を測定した。その結果、表1に示す発光強度が得られたにすぎなかった。

比較例3-1

ペルオキシダーゼ活性の測定

比較例3の化学発光試薬を $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、及びp-ヨードフェノールを 10^{-3}M の濃度で含有する0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4) $100 \mu\text{l}$ に、種々の濃度水準の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)水溶液 $100 \mu\text{l}$ を混合し、これに0.0034%過酸化水素水溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え、ルミノメーターで0~5秒間発光量を積算した結果、表cに示す如くHRPを $1 \times 10^{-18} \text{ mol/l assay}$ まで測定することが可能であった。

表 c

HRP (mol/assay)	発光量
0	486
5×10^{-19}	646
1×10^{-18}	1311
1×10^{-17}	12604
1×10^{-16}	211206

比較例 4

ルミノールを用いるペルオキシダーゼ活性の測定

複数の化学発光測定用ウェルに西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の種々の濃度水準の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) 溶液 200 μ l 及び p-ヨードフェノール 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) 溶液 20 μ l を加えた後、これにルミノール 5.6×10^{-5} M の濃度で含有する 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.4) 100 μ l 及び 0.0034% 過酸化水素水溶液 50 μ l を順次加え、ルミノメーターで 0~5 秒間発光量を積算した結果、表 d に示すような発光強度が得られ、HRP を 1×10^{-17} mol/assay まで測定することが可能であった。

表 d

HRP (mol/assay)	発光量
0	36
1×10^{-18}	60
1×10^{-17}	81
1×10^{-16}	297
1×10^{-15}	20469
1×10^{-14}	1350786

比較例 4-1

ルミノールを用いる同時サンドイッチ法CLEIAによる α -フェトプロテイン(AFP)の測定

参考例1の方法で調製した兎抗ヒトAFPポリクローナル抗体を固定化した白色マイクロプレートに、精製したヒトAFP(標準物質)を0~800 ng/mlの範囲で含有する2%BSA含有PBS溶液(pH7.4) 50 μ lと参考例3の方法で調製したペルオキシダーゼ酵素標識マウス抗ヒトAFPモノクローナル抗体を約3 μ g/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液(pH7.4) 100 μ lとを加え、37 $^{\circ}$ Cの温度で1時間インキュベートした。次に、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、各ウェルにp-ヨードフェノールを 10^{-3} Mの濃度で含有する0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4) 100 μ lを加え、これにルミノールを 5.6×10^{-5} Mの濃度で含有する0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4) 100 μ l、及び0.0034%過酸化水素の0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4) 50 μ lを注入して発光させ、この発光量をルミノメーターで0~5秒間積算して測定し、この値を標準物質濃度に対してプロットすることにより、第5図に示される濃度依存性を有する検量線を得た。この検量線を用いて血清検体中のヒトAFPを2.0 ng/mlの濃度まで測定することが可能であった。

参考例1

不溶性担体固定化ポリクローナル抗体の調製

抗原に特異的反応性を有する兎等の動物由来のポリクローナル抗体を10mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.4)に10 μ g/mlの濃度で溶解した溶液を、白色マイクロプレート(ラボシステム社)の各ウェルに0.1mlずつ加え、37 $^{\circ}$ Cの温度で1時間放置した後、PBSで洗浄してから、1%ウシ血清アルブミン(BSA)水溶液を0.3mlずつ加えて37 $^{\circ}$ Cの温度で1時間放置してポストコーティング処理を実施してポリクローナル抗体固定化白色マイクロプレートを得た。

参考例2

ペルオキシダーゼ酵素標識モノクローナル抗体の調製

抗原に特異的反応性を有するマウス由来等のモノクローナル抗体を10mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.4)に1.0mg/mlの濃度で溶解した溶液1mlに、N-(m-マレイミド安息香酸)-N-サクシンイミドエステル(MBS)の10mg/mlの濃度のジメチルホルムアミド溶液0.1mlを添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応MBSとを分離した。

一方、ペルオキシダーゼ酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)の1.0mg/mlのPBS溶液に、N-サクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)の10mg/mlの濃度のエタノール溶液を添加し、25℃の温度で30分間反応させた。

次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、10mM酢酸緩衝液(pH4.5)でゲル濾過して精製、ピリジルジスルフィド化HRPを含有する画分を採取し、これをコロジオンバック中において氷冷下に約10倍に濃縮した。次に、これに0.1Mジチオスレイトールを含有する0.1M酢酸緩衝生理食塩水(pH4.5)1mlを添加して、25℃の温度で30分間攪拌してHRP分子中に導入したピリジルジスルフィド基を還元した後、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用いてゲル濾過し、チオール化HRPを含有する画分を得た。

次に、マレイミド化モノクローナル抗体とチオール化HRPとを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に4mg/mlの蛋白質濃度まで濃縮し、4℃で一昼夜放置した後、ウルトロゲルAcA44(SEPRACOR社)を充填したカラムを用いてゲル濾過し、ペルオキシダーゼ酵素標識モノクローナル抗体を得た。

表 1

	発 光 量											
	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	実施例 8	比較例 1	比較例 2	比較例 3	
HRP (mol/l)												
0	168	195	381	137	279	614	897	350	544	409	515	
1×10^{-13}	523	462	968	689	1156	2668	2589	1186	690	1904	1663	
1×10^{-12}	2364	2508	10472	9459	12177	19460	18662	12942	1946	10054	12850	
1×10^{-11}	25071	28114	125789	129987	132176	257425	205188	129418	21803	127301	220408	
1×10^{-10}	605734	309663	1158954	1098131	1324564	2525468	1729505	1233783	121243	1551013	742044	
1×10^{-9}	9188068	4905576	9898434	11786664	13981533	-	-	13476191	1710931	-	-	

注) HRP : 西洋ワサビペルオキシダーゼ

以上の実施例1～8によれば、本発明の化学発光試薬は特定pH条件下、過酸化物の存在下においてペルオキシダーゼ濃度に応じて鋭敏に反応し、低濃度域まで測定可能であることが示されているに対し、比較例1～4では発光量が小さく測定可能限界濃度も高いことがわかる。また、実施例1-1～8-1及び比較例1-1～4の対比では、本発明の化学発光試薬を使用した場合にはペルオキシダーゼ活性の測定において低濃度までの測定が可能であることがわかる。

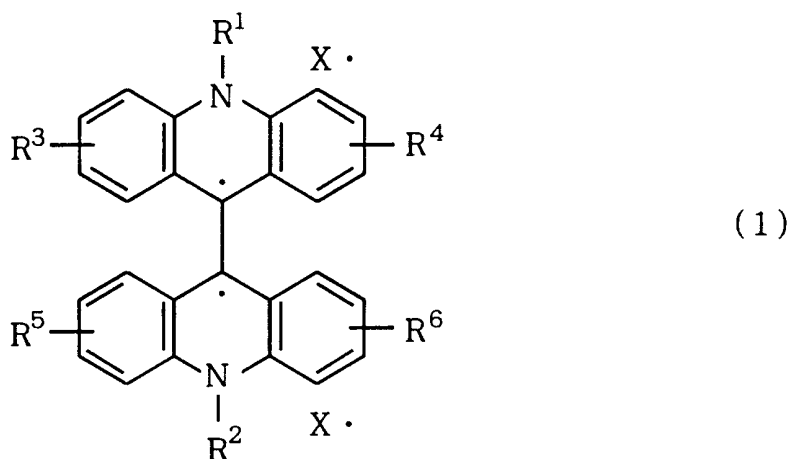
さらに、実施例1-2～5-2では、比較例1-2～4-1との対比において、AFP、PRL、βhCG等の微量成分が高感度で測定できることが示されている。

産業上の利用性

本発明は、N, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体を含む新規化学発光試薬及びそれを用いる化学発光分析方法、特に、ペルオキシダーゼ活性の測定方法および酵素免疫測定方法において高感度測定方法を提供するものであり、臨床検査、食品検査及び動植物検査等の分野における高感度化学発光分析技術の実用化にとって寄与する点が極めて大きい。

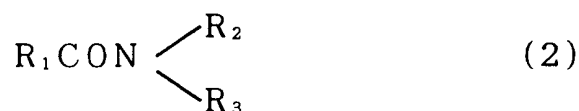
請求の範囲

1. 下記一般式(1)



(一般式(1)において、 R^1 及び R^2 は、それぞれアルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリーロキシ基及びハロゲン原子からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、 $X\cdot$ は前駆体ビスアクリジニウム塩の対アニオンから電子が移動した残基である酸ラジカルを示す。)

で表されるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体及び下記一般式(2)



(一般式(2)において、 R_1 は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、炭素数2~10のアルケニル基及び炭素数6~20のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよく、 R_2 はメチル基及びエチル基からなる群より選択

され、 R_3 は炭素数1～10のアルキル基、炭素数2～10のアルケニル基及び炭素数6～20のアリール基からなる群より選択され、該アリール基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよく、 R_1 及び R_3 は、互いに結合して、それぞれが結合しているカルボニル基の炭素原子及びアミド基の窒素原子と共に環を形成していてもよい。）

で表されるN，N-ジ置換カルボン酸アミド化合物を主成分とする、ペルオキシダーゼ酵素量に依存して過酸化物により化学発光することを特徴とする化学発光試薬。

2. 前記一般式(1)で表されるN，N'-ジ置換-9，9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体、前記一般式(2)で表されるN，N-ジ置換カルボン酸アミド化合物及び下記一般式(3)



(一般式(3)において、Rは炭素数1～5の二価の脂肪族炭化水素基を表わし、mは1～3の整数を表わす。)

で表されるアミノアルコール化合物とを主成分とする、ペルオキシダーゼ酵素量に依存して過酸化物により化学発光することを特徴とする化学発光試薬。

3. 前記一般式(1)の R^1 及び R^2 が、炭素数1～20のアルキル基、アリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択される炭化水素基であり、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 が、水素原子、ハロゲン原子並びに炭素数1～20のアルキル基、アリール基、アルコキシ基及びアリーロキシ基からなる群より選択される水素原子、ハロゲン原子又は炭化水素基である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化学発光試薬。

4. 前記 R^1 及び R^2 が、炭素数1～10のアルキル基並びに炭素数6～20のアリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択される炭化水素基であり、前記 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 が、水素原子、ハロゲン原子、炭素数1～10のアルキル基並びに炭素数6～20のアリール基、アルコキシ基及びアリーロキ

シ基からなる群より選択される水素原子、ハロゲン原子又は炭化水素基である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかの1項に記載の化学発光試薬。

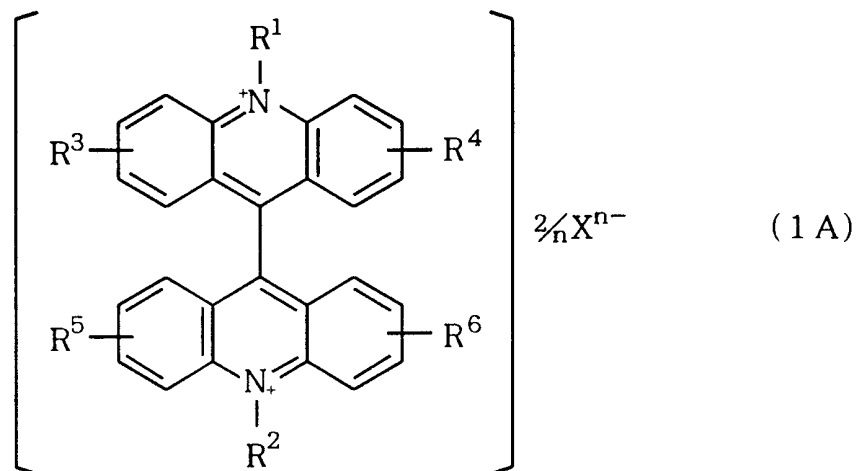
5. 前記R¹及びR²が、炭素数1～10のアルキル基又は炭素数6～20のアリール基若しくはハロゲン化アリール基であり、前記R³、R⁴、R⁵及びR⁶が水素原子である請求の範囲第4項に記載の化学発光試薬。

6. 前記N、N'-ジ置換-9,9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体が、N、N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩、N、N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウムジ塩酸塩及びN、N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩からなる群より選択される塩類の電荷移動錯体である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化学発光試薬。

7. 前記N、N-ジ置換カルボン酸アミド化合物が、N、N-ジメチルホルムアミド、N、N-ジメチルアセトアミド及びN-メチル-2-ピロリドンからなる群より選択される少なくとも一種の化合物である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化学発光試薬。

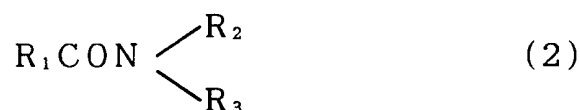
8. 前記アミノアルコール化合物が、モノアルカノールアミン、ジアルカノールアミン及びトリアルカノールアミンからなる群より選択される少なくとも一種の化合物である請求の範囲第2項に記載の化学発光試薬。

9. 下記一般式(1A)



(一般式(1A)において、 R^1 及び R^2 は、それぞれアルキル基、アリアル基及びハロゲン化アリアル基からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリアル基、アルコキシ基、アリーロキシ基及びハロゲン原子からなる群より選択され、互いに同一でも又は異なるものでもよく、 X^{n-} は n 価の陰イオンであり、 n は1又は2である。)

で表されるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類を
下記一般式(2)



(上記一般式(2)において、 R_1 は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、炭素数2~10のアルケニル基及び炭素数6~20のアリアル基からなる群より選択され、該アリアル基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基又はハロゲン原子等で置換されていてもよく、 R_2 はメチル基及びエチル基からなる群より選択され、 R_3 は炭素数1~10のアルキル基、炭素数2~10のアルケニル基及び炭素数6~20のアリアル基からなる群より選択され、該アリアル基はアルキル基、ニトロ基、水酸基、アミノ基及びハロゲン原子等からなる群より選択される基で置換されていてもよく、 R_1 及び R_3 は互いに結合して、それぞれが結合しているカルボニル基の炭素原子及びアミド基の窒素原子と共に環を形成していてもよい。)

で表されるN, N'-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射下で反応させてなることを特徴とする化学発光試薬。

10. 請求の範囲第9項において、前記一般式(1A)で表されるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類を前記一般式(2)で表されるN, N'-ジ置換カルボン酸アミド化合物の存在下において光照射下で反応させる

際に、その反応時及び／又は反応後に前記一般式(3)で表されるアミノアルコール化合物を添加してなることを特徴とする化学発光試薬。

11. 前記一般式(1A)の R^1 及び R^2 が、炭素数1~20のアルキル基、アリール基、アルコキシ基及びアリーロキシ基からなる群より選択される炭化水素基であり、前記 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は水素原子、ハロゲン原子並びに炭素数1~20のアルキル基、アリール基、アルコキシ基及びアリーロキシ基から選択された水素原子、ハロゲン原子又は炭化水素基である請求の範囲第9項に記載の化学発光試薬。

12. 前記 R^1 及び R^2 が、炭素数1~10のアルキル基並びに炭素数6~20のアリール基及びハロゲン化アリール基からなる群より選択される炭化水素基であり、前記 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 が、水素原子、ハロゲン原子並びに炭素数1~10のアルキル基、炭素数6~20のアリール基、アルコキシ基及びアリーロキシ基からなる群より選択される水素原子、ハロゲン原子又は炭化水素基である請求の範囲第9項ないし第11項のいずれかの1項に記載の化学発光試薬。

13. 前記 R^1 及び R^2 が炭素数1~10のアルキル基又は炭素数6~20のアリール基若しくはハロゲン化アリール基であり、前記 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 が水素原子である請求の範囲第12項に記載の化学発光試薬。

14. 前記N、N'-ジ置換-9,9'-ビスアクリジニウム塩類が、N、N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウムジ硝酸塩、N、N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウムジ塩酸塩及びN、N'-ジメチル-9,9'-ビスアクリジニウムジ沃化水素酸塩からなる群より選択される塩類である請求の範囲第9項又は第10項に記載の化学発光試薬。

15. 前記光照射に用いる光源が可視光を発する光源である請求の範囲第9項又は第10項に記載の化学発光試薬。

16. 前記請求の範囲第1項、第2項、第9項又は第10項のいずれかの1項に記載の化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下においてペルオキシダーゼ酵

素活性を測定することを特徴とする化学発光法によるペルオキシダーゼ活性の測定方法。

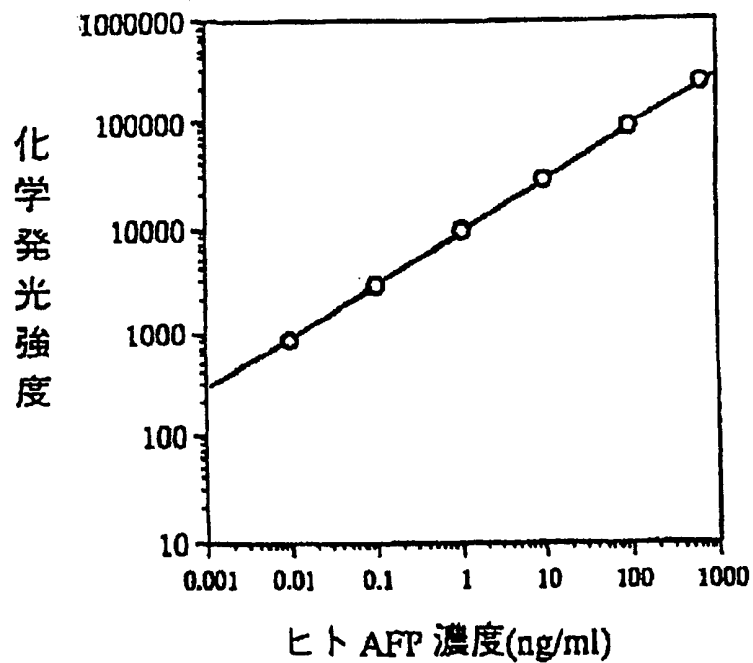
17. 前記化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下においてペルオキシダーゼ酵素活性を測定する際に用いる発光促進剤がp-ヨードフェノール、p-フェニルフェノール、6-ヒドロキシベンゾチアゾールからなる群より選択される少なくとも1種のフェノール性化合物である請求の範囲第16項に記載のペルオキシダーゼ活性の測定方法。

18. ペルオキシダーゼ酵素標識した抗体若しくは抗原を試料中の測定すべき抗原若しくは抗体、又はそれらの凝集物と混合し、抗原抗体反応によりペルオキシダーゼ酵素標識-抗原抗体錯体からなる免疫複合体を形成させた後、これを分離して、請求の範囲第1項、第2項、第9項又は第10項のいずれかの1項に記載の化学発光試薬を用い、水素受容体の存在下において化学発光させ、その発光強度を測定することにより試料中の抗原又は抗体の量を定量することを特徴とする化学発光酵素免疫測定方法。

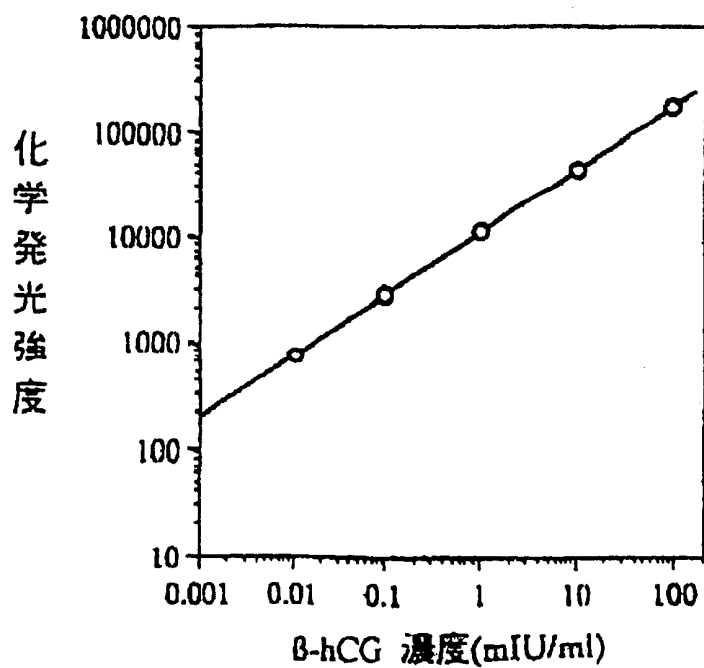
19. 前記抗原抗体反応が、不溶性担体に固定化した抗体の存在下において行なわれ、ペルオキシダーゼ酵素にて標識化された免疫複合体が該不溶性担体上に形成されたものである請求の範囲第18項に記載の化学発光酵素免疫測定方法。

20. 前記一般式(1)で表わされ、化学発光試薬に用いられるN, N'-ジ置換-9, 9'-ビスアクリジニウム塩類電荷移動錯体。

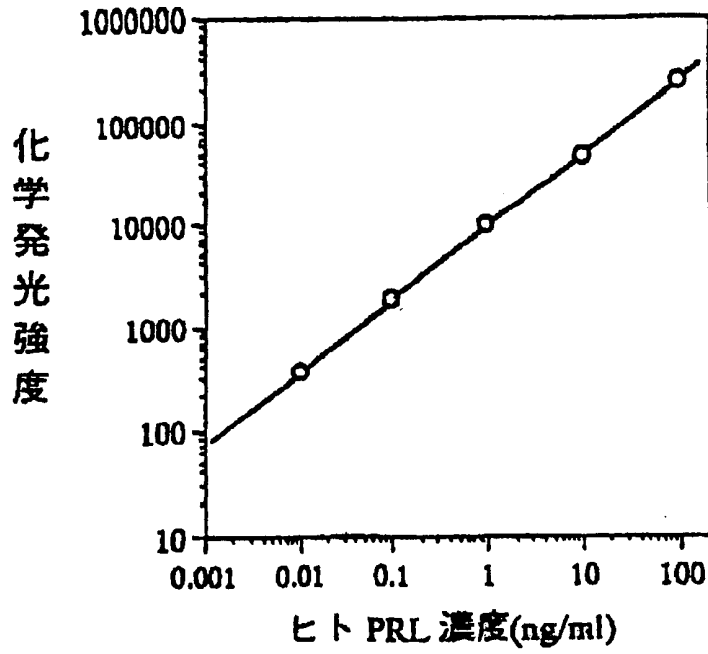
第 1 図



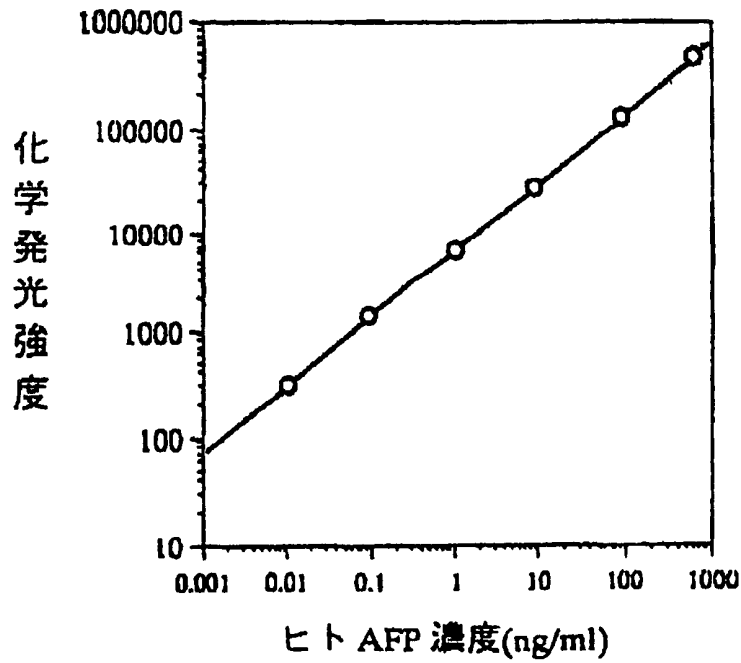
第 2 図



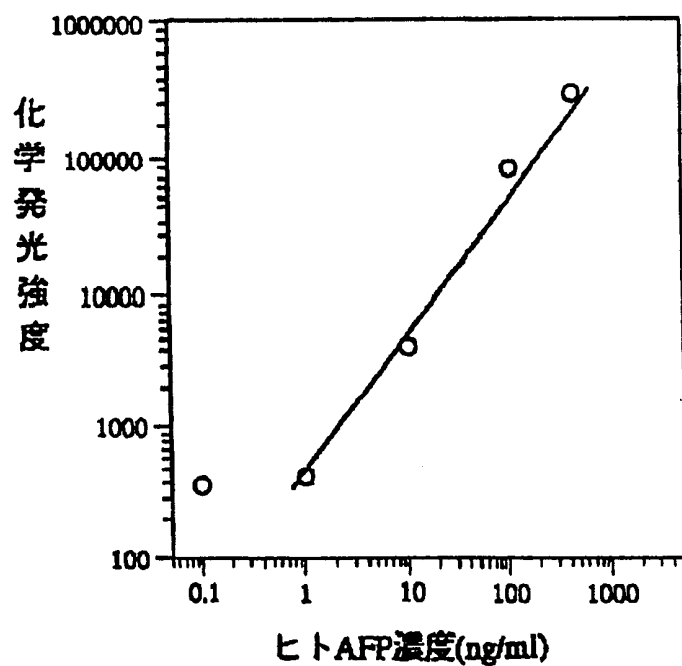
第 3 図



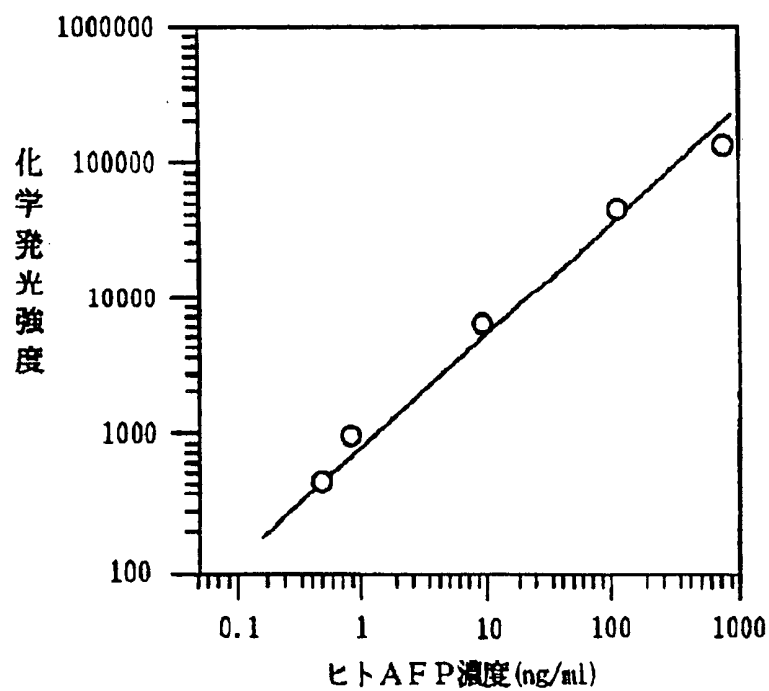
第 4 図



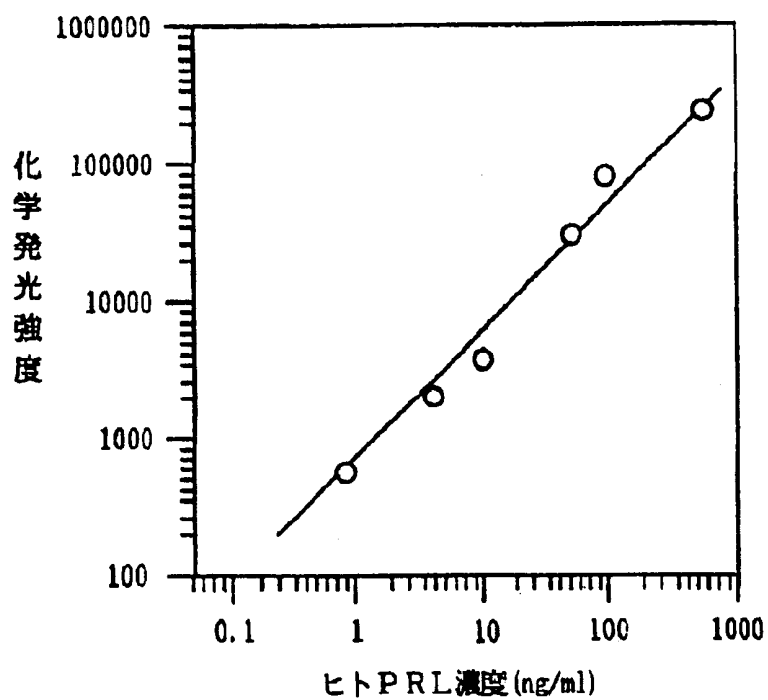
第5図



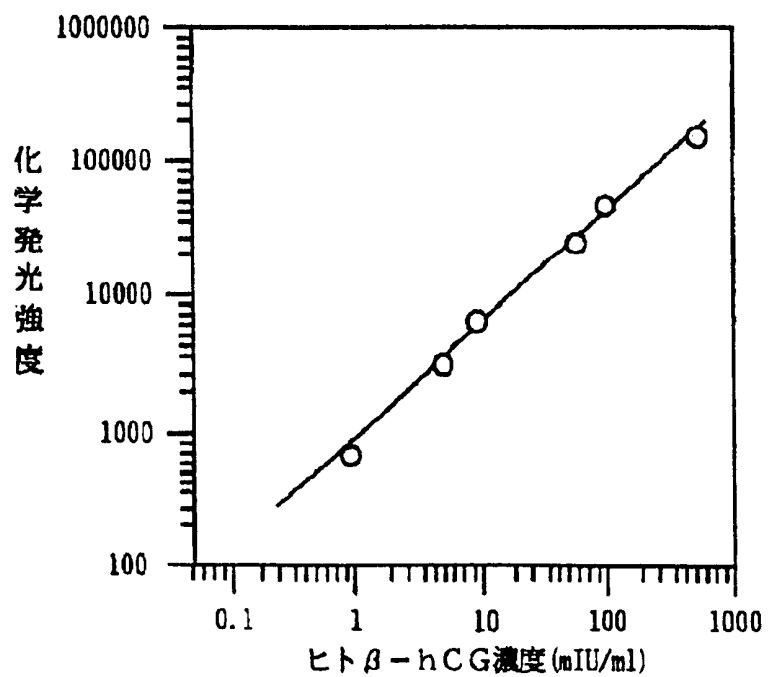
第6図



第7図



第8図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C09K11/07, G01N33/532, G01N21/76

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 C09K11/07, G01N33/532, G01N21/76

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)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. AHLBERG et al., "Electron-transfer reactions accompanied by large structural changes. 1. Lucigenin-10,10'-dimethyl-9,9'-biacridylidene redox system", J. Am. Chem. Soc. (1981), Vol. 103, P.844-849	1, 3-7, 9, 11-15, 20
P, A	K. PAPADOPOULOS et al., "Photo- and radiochemiluminescence: reductive chemiluminescence of lucigenin by photo- or radiooxy genated amines and amides", J. Photochem. Photobiol. A, Vol. 124, No. 1-2, 16 July, 1999 (16. 07. 99), P.85-90	1-20
P, A	JP, 10-300674, A (Dainichi Seika Colour & Chemicals Mfg. Co., Ltd.), 13 November, 1998 (13. 11. 98) (Family: none)	1-20

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

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier 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
20 October, 1999 (20. 10. 99)Date of mailing of the international search report
2 November, 1999 (02. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C09K11/07, G01N33/532, G01N21/76

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^o C09K11/07, G01N33/532, G01N21/76

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)

CA (STN), 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 請求の範囲の番号
X	E. AHLBERG et al., "Electron-transfer reactions accompanied by large structural changes. 1. Lucigenin-10, 10'-dimethyl-9, 9'-biacridylidene redox system", J. Am. Chem. Soc. (1981), Vol. 103, P. 844-849	1, 3-7, 9, 11-15, 20
P, A	K. PAPADOPOULOS et al., "Photo- and radiochemiluminescence: reductive chemiluminescence of lucigenin by photo- or radiooxy genated amines and amides", J. Photochem. Photobiol. A, Vol. 124, No. 1-2, 16. 7月. 1999 (16. 07. 99), P. 85-90	1-20
P, A	JP, 10-300674, A (大日精化工業株式会社) 13. 11月. 1998 (13. 11. 98) (ファミリーなし)	1-20

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日
20. 10. 99

国際調査報告の発送日
02.11.99

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)
渡辺 陽子
電話番号 03-3581-1101 内線 3483