

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4550880号
(P4550880)

(45) 発行日 平成22年9月22日(2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日(2010.7.16)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 S
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5
	GO 1 N 21/78 C

請求項の数 5 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2007-319063 (P2007-319063)
 (22) 出願日 平成19年12月11日(2007.12.11)
 (65) 公開番号 特開2008-191140 (P2008-191140A)
 (43) 公開日 平成20年8月21日(2008.8.21)
 審査請求日 平成20年4月18日(2008.4.18)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-2166 (P2007-2166)
 (32) 優先日 平成19年1月10日(2007.1.10)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000002288
 三洋化成工業株式会社
 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
 (72) 発明者 宮森 将光
 京都市東山区一橋野本町11番地の1 三
 洋化成工業株式会社内

審査官 島田 英昭

(56) 参考文献 特開平08-261943 (JP, A)
 特開2001-183378 (JP, A)

最終頁に続く

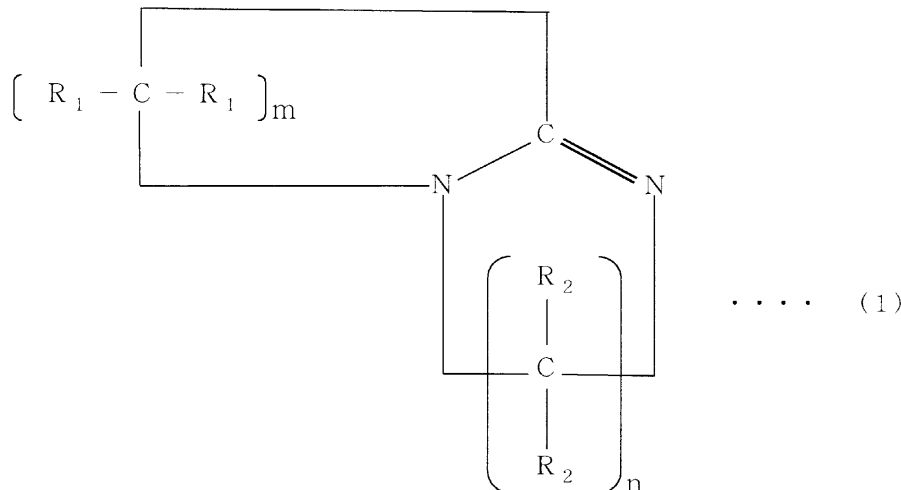
(54) 【発明の名称】 固相酵素免疫測定法用化学発光試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化学発光物質(a)、化学発光増強剤(b)、免疫複合体解離剤(c)及び緩衝液(d)を含んでなる固相酵素免疫測定法用化学発光試薬であって、該(c)がタンパク質変性剤、下記一般式(1)で表される2環式ジアミン及び該ジアミンの有機酸塩からなる群より選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする固相酵素免疫測定法用化学発光試薬。

【化 1】



10

〔式中、 R^1 及び R^2 は、互いに独立して水素原子、炭素数1～20のアルキル、炭素数2～20のアルケニル、炭素数2～20のアルキニル、炭素数6～20の(アルキル)アリール又は炭素数7～20のアリールアルキル基を表し、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール及びアリールアルキル基中の水素原子の一部又は全部が水酸基、アミノ基、(ジ)アルキル(炭素数1～16)アミノ基、(ジ)ヒドロキシアルキル(炭素数2～4)アミノ基、メルカプト基又はハロゲン原子によってさらに置換されていてもよく、2つの R^1 及び2つの R^2 は、同一であってもよいし異なってもよく、互いに結合して炭素数4～16の環を形成してもよく、 m 及び n は互いに独立して1～12の整数を表す。〕

20

1]

【請求項 2】

(c)が、固相上に形成された免疫複合体から免疫複合体中に含まれる酵素結合リガンドを、酵素活性の比として5～90%を解離させるものである請求項1に記載の化学発光試薬。

【請求項 3】

(c)が、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセン-7(DBU)の有機酸塩(c1)及び/又は1,5-ジアザビシクロ[4.3.0]ノネン-5(DBN)の有機酸塩(c2)である請求項1又は2に記載の化学発光試薬。

30

【請求項 4】

化学発光試薬中の(a)の含有量(mM; 25)が0.5～80、(b)の含有量(mM; 25)が0.1～15、(c)の含有量(mM; 25)が0.02～3,000である請求項1～3のいずれかに記載の化学発光試薬。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれかに記載の化学発光試薬を使用することを特徴とする固相酵素免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、固相酵素免疫測定法用化学発光試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、酵素結合リガンド含有検体中に、化学発光物質、化学発光増強剤、緩衝剤、キレート剤及び酸化剤からなる試薬成分を配合して、化学発光の強さにより検体中の酵素結合リガンドを測定するための固相酵素免疫測定法用化学発光試薬が知られている(非特許文献1)。

【非特許文献 1】METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL.133[Academic Press, Inc., 1986], p331～35

50

3

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、従来の化学発光試薬では、固相上に形成される免疫複合体中の酵素結合リガンドが多い場合、固相に接している化学発光物質が急激に酵素反応により消費され、反応により生じる化学発光量は短時間に増加する反面、急激に低下する（基質となる新たな化学発光物質が酵素反応の場に供給されない）ため、広範囲の酵素結合リガンド量を測定する必要のある臨床検査薬への適用が困難であるという問題がある。また、この問題を低減する方策として、反応及び化学発光量の計測を攪拌しながら行うことも挙げられるが、測定装置が複雑になる等、装置上の制約などの問題がある。

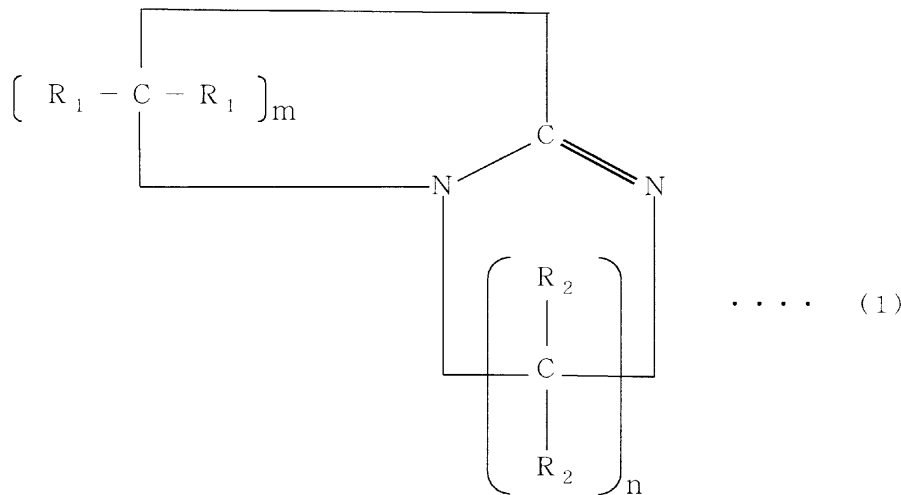
10

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の固相酵素免疫測定法用化学発光試薬の特徴は、化学発光物質（a）、化学発光増強剤（b）、免疫複合体解離剤（c）及び緩衝液（d）を含んでなる固相酵素免疫測定法用化学発光試薬であって、該（c）がタンパク質変性剤、下記一般式（1）で表される2環式ジアミン及び該ジアミンの有機酸塩からなる群より選ばれる少なくとも1種である点を要旨とする。

【化1】



20

30

〔式中、 R^1 及び R^2 は、互いに独立して水素原子、炭素数1～20のアルキル、炭素数2～20のアルケニル、炭素数2～20のアルキニル、炭素数6～20の（アルキル）アリアル又は炭素数7～20のアリアルアルキル基を表し、該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル及びアリアルアルキル基中の水素原子の一部又は全部が水酸基、アミノ基、（ジ）アルキル（炭素数1～16）アミノ基、（ジ）ヒドロキシアルキル（炭素数2～4）アミノ基、メルカプト基又はハロゲン原子によってさらに置換されていてもよく、2つの R^1 及び2つの R^2 は、同一であってもよいし異なってもよく、互いに結合して炭素数4～16の環を形成してもよく、 m 及び n は互いに独立して1～12の整数を表す。〕

40

1

【発明の効果】

【0005】

本発明の化学発光試薬は、酵素結合リガンド量が多い場合であっても、基質が供給不足にならず、化学発光量が低下することがないため、広範囲の酵素結合リガンドの量を測定することができる。従って、本発明の化学発光試薬を適用することにより、酵素結合リガンドを用いた固相酵素免疫測定を臨床検査薬へ適用できるようになる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

50

化学発光物質 (a) 及び化学発光増強剤 (b) としては、固相酵素免疫測定法に使用される酵素に対応して公知の物質を組み合わせる選択できる。

化学発光物質 (a) としては、例えば「生物発光と化学発光 - 基礎と実験 - 」(廣川書店, 昭和 6 4 年発行) に記載の 2 , 3 - ジヒドロ - 1 , 4 - フタラジンジオン化合物、1 , 2 - ジオキセタン化合物、アクリジン化合物、インドール化合物等が含まれる。化学発光物質 (a) のうち、測定感度及び溶液状態での保存安定性の観点から、好ましいのは 2 , 3 - ジヒドロ - 1 , 4 - フタラジンジオン化合物 (酵素がペルオキシダーゼの場合) { ルミノール、イソルミノール、N - アミノヘキシル - N - エチルイソルミノール (A H E I) 及びこれらの金属 (アルカリ金属等) 塩等} 及び 1 , 2 - ジオキセタン化合物 (酵素がアルカリフォスファターゼの場合) { 3 - ガラクトシドキシフェニルジオキセタン、4 - メトキシ - 4 - (3 - フォスフェートフェニル) スピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - アダマンタン] 等}、さらに好ましくは 2 , 3 - ジヒドロ - 1 , 4 - フタラジンジオン化合物、特に好ましいのはルミノール及びルミノールの金属塩、最も好ましいのはルミノールのナトリウム塩である。

【 0 0 0 7 】

化学発光増強剤 (b) としては、化学発光物質 (a) の種類に対応して選択され、例えば、化学発光物質 (a) がルミノール又はルミノールの金属塩の場合、特開昭 5 9 - 5 0 0 2 5 2 号、特開昭 5 9 - 1 7 1 8 3 9 号、特開平 7 - 1 4 3 8 9 9 号又は特開平 4 - 2 9 3 4 9 8 号の各公報に記載された化合物 [チアゾール化合物 { 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール、4 - [2 ' - (4 ' - メチル) チアゾリル] フェノール、4 - [4 ' - (2 ' - メチル) チアゾリル] フェノール等}、ナフトール化合物、フェノール化合物 { 4 - シアノメチルチオ - 2 - クロロフェノール、4 - (シアノメチルチオ) フェノール、4 - (2 ' - チエニル) フェノール、p - ヨードフェノール等}] が挙げられ、また、(a) が 1 , 2 - ジオキセタン化合物の場合、特開平 3 - 5 3 8 9 7 号又は特開平 4 - 1 2 4 1 8 5 号の各公報記載の化合物 [重合性 4 級アンモニウム塩 { ポリ (ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロライド)、ポリ { ビニルベンジル (ベンジルジメチルアンモニウムクロリド) } 等] が挙げられる。特に (a) が 4 - メトキシ - 4 - (3 - フォスフェートフェニル) スピロ [1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - アダマンタン] の場合、蛍光ミセル (例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミドと 5 - N - テトラデカノイル - アミノフルオレセインで形成したミセル) 等が挙げられる。

これらのうち、化学発光増強効果の観点から、チアゾール化合物、フェノール化合物が好ましく、さらに好ましいのはフェノール化合物、次にさらに好ましいのは p - ヨードフェノール、4 - (シアノメチルチオ) フェノール及び 4 - シアノメチルチオ - 2 - クロロフェノールである。

【 0 0 0 8 】

免疫複合体解離剤 (c) は、固相酵素免疫測定法により固相表面上に形成される免疫複合体から酵素結合リガンドを解離する作用を有し、化学発光反応を阻害しないものであれば制限がない。

なお、固相酵素免疫測定法により固相表面上に形成される免疫複合体とは、少なくとも 1 種類の酵素結合リガンド (例えば酵素結合抗体) と、リガンドが認識する物質 (例えば抗原) とが、結合して形成される複合体を意味する。

【 0 0 0 9 】

免疫複合体解離剤 (c) のうち、測定レンジ拡大の観点から、固相上に形成された免疫複合体から、免疫複合体中に含まれる酵素結合リガンドを、酵素活性の比として 5 ~ 9 0 % を解離させるものが好ましく、さらに好ましくは 7 ~ 8 5 %、特に好ましくは 1 0 ~ 8 0 % である。酵素活性の比は、解離前の固相上の免疫複合体中に含まれる酵素結合リガンドの酵素活性と解離した酵素結合リガンドの酵素活性との比である。

酵素活性の比は、例えば次の方法で測定される。免疫複合体が形成された固相を免疫複合体解離剤 (c) を含む化学発光試薬に浸漬した後、化学発光試薬と固相を分離し、それぞれについて酵素活性を測定する。化学発光試薬中の酵素活性を X、固相中の酵素活性を

10

20

30

40

50

Yとすると、解離した酵素結合リガンドの酵素活性の比(%)は、 $X / (X + Y) \times 100$ で求められる。なお、この場合の浸漬条件(浸漬時間、温度等)は、本発明による化学発光試薬を固相酵素免疫測定法に適用する条件に合わせて設定する。酵素活性の測定法は、用いる酵素により適宜設定することができるが、酵素結合リガンドの存在様式(遊離状態と固相に結合した状態等)により活性に差がない測定法であることが必要である。

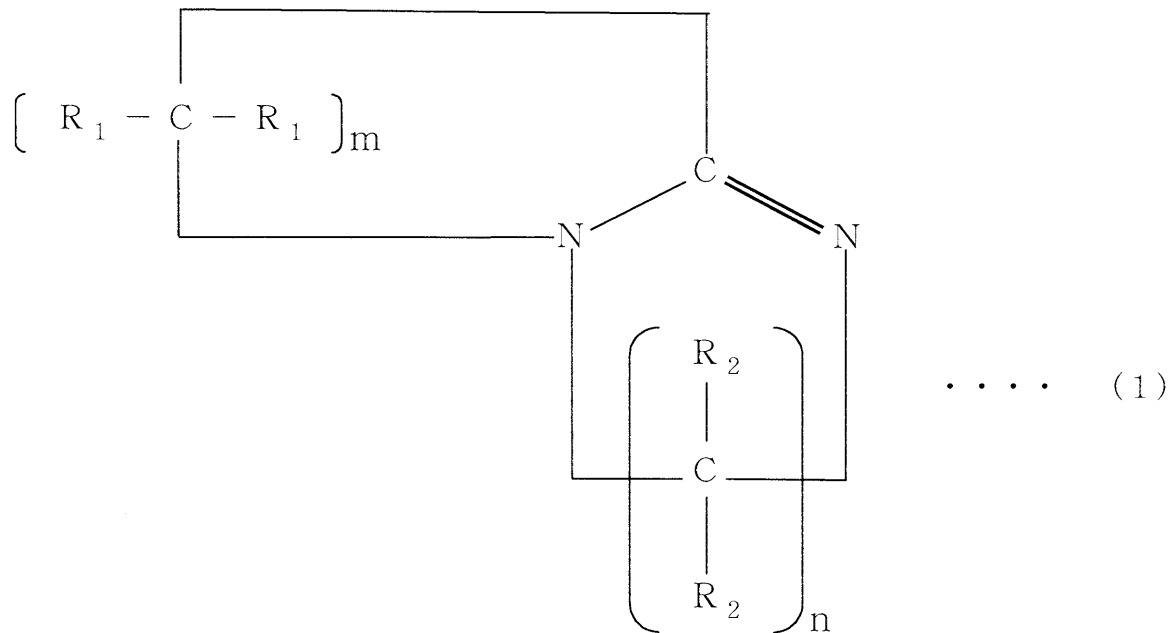
【0010】

免疫複合体解離剤(c)としては、タンパク質変性剤、界面活性剤及び下記一般式(1)で表される2環式ジアミン(有機酸塩)からなる群より選ばれる少なくとも1種が含まれる。これらは2種以上を併用してもよい。

一般式(1)で表される2環式ジアミン(有機酸塩)とは、一般式(1)で表される2環式ジアミン及び/又は該ジアミンの有機酸塩を意味する。

【0011】

【化1】



【0012】

タンパク質変性剤としては、グアニジル基を有する物質であるアルギニン、プロタミン、グアニジン塩(グアニジン塩酸塩、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン硫酸塩及びグアニジン炭酸塩等)から選ばれる1種以上の物質及び水溶性アミド{尿素及びアセトアミド等}が使用できる。これらは2種以上を併用してもよい。これらのうち、測定レンジ拡大の観点から、グアニジン塩が好ましく、さらに好ましいのは、グアニジン塩酸塩、グアニジンチオシアン酸塩、特に好ましいのはグアニジン塩酸塩である。

【0013】

界面活性剤としては、カチオン界面活性剤(臭化トリ-n-ブチルヘキサデシルホスホニウム、ベンジルトリブチルアンモニウム塩、ベンズアルコニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリド及びセチルトリメチルアンモニウムクロリド等)、アニオン界面活性剤(ドデシル硫酸ナトリウム、トリエタノールアミンラウリル硫酸、ジエタノールアミンラウリル硫酸、セチル硫酸ナトリウム、スルホニル琥珀酸ジオクチルナトリウム、スルホニル琥珀酸ジスコリウムモノココアミド、イソステアリル-2-ラクトイル酸ナトリウム、セテアリル硫酸ナトリウム及びココイルイセチオン酸ナトリウム等)、両性界面活性剤{CHA PS(3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート)、ポリエチレングリコールモノオクチルフェニルエーテル、n-オクチル-D-グルコシド、n-ヘプチル-D-チオグルコシド、ラウリン酸アミドプロピ

ルベタイン及び3 - [(3 - コラミドプロピル) - ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホナート等 }、及び非イオン界面活性剤 [高級アルコールエチレンオキサイド (エチレンオキサイドは以下EOと略記) 付加物、脂肪酸EO付加物、脂肪酸アミドEO付加物、ソルビタン脂肪酸エステルEO付加物、ポリプロピレングリコールEO付加物等] が含まれ、公知 (特開平 8 - 2 6 1 9 4 3 号公報等に記載) の界面活性剤が使用できる。これらは2種以上を併用してもよい。

これらのうち、測定レンジ拡大の観点から、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤及び非イオン界面活性剤が好ましく、さらに好ましいのは非イオン界面活性剤、よりさらに好ましいのは、高級アルコールEO付加物、脂肪酸EO付加物、脂肪酸アミドEO付加物、ソルビタン脂肪酸エステルEO付加物及びポリプロピレングリコールEO付加物、とくに好ましいのはソルビタン脂肪酸エステルエチレンオキサイド付加物、最も好ましいのはソルビタンオレイン酸モノエステルEO付加物である。

10

【 0 0 1 4 】

一般式 (1) において、 R_1 及び R_2 は、互いに独立して水素原子、炭素数 (以下Cと略記) 1 ~ 2 0 のアルキル、C 2 ~ 2 0 のアルケニル、C 2 ~ 2 0 のアルキニル、C 6 ~ 2 0 の (アルキル) アリール、C 7 ~ 2 0 のアリールアルキル基を表し、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール及びアリールアルキル基中の水素原子の一部又は全部が水酸基、アミノ基、(ジ) アルキル (C 1 ~ 1 6) アミノ基、(ジ) ヒドロキシアルキル (C 2 ~ 4) アミノ基、メルカプト基又はハロゲン原子 (フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子) によってさらに置換されていてもよい。また2つの R_1 及び2つの R_2 は、同一であってもよいし異なってもよく、互いに結合 (炭素 - 炭素結合、エーテル結合等) してC 4 ~ 1 6 の環を形成してもよい。m及びnは互いに独立して1 ~ 1 2 の整数を表す。

20

【 0 0 1 5 】

C 1 ~ 2 0 のアルキル基としては、メチル、エチル、n - プロピル、i - プロピル、n - ブチル、i - ブチル、n - ヘキシル、2 - エチルヘキシル、n - デシル、n - ドデシル、sec - トリデシル、オクタデシル、イソオクタデシル及びエイコシル基等が挙げられる。

【 0 0 1 6 】

C 2 ~ 2 0 のアルケニル基としては、エチニル、1 - プロピニル、2 - プロピニル、1 - 又は2 - ドデシニル、1 - 又は2 - トリデシニル、1 - 又は2 - テトラデシニル、1 - 又は2 - ヘキサデシニル、1 - 又は2 - ステアリニル及び1 - 又は2 - ノナデシニル、1 - 又は2 - エイコシニル基等が挙げられる。

30

【 0 0 1 7 】

C 6 ~ 2 0 の (アルキル) アリール基としては、フェニル、ノニルフェニル、3 , 5 - ジノニルフェニル、オクチルフェニル、ナフチル及び6 - ブチルナフチル基等が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

C 7 ~ 2 0 のアリールアルキル基としては、ベンジル、2 - フェニルエチル、3 - フェニルプロピル、4 - フェニルブチル、5 - フェニルペンチル、6 - フェニルヘキシル、7 - フェニルヘプチル、8 - フェニルオクチル、1 0 - フェニルデシル、1 2 - フェニルドデシル、ナフチルメチル及びナフチルエチル基等が挙げられる。

40

【 0 0 1 9 】

2つの R_1 又は2つの R_2 が互いに結合してC 4 ~ 1 6 の環を形成する場合、2つの R_1 又は2つの R_2 は、2価の有機基を形成する。

2価の有機基としては、C 4 ~ 1 6 のアルキレン、C 4 ~ 1 6 のアルケニレン、C 4 ~ 1 6 のアリーレン基等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

一般式 (1) で表されるアミンの具体例としては、1 , 8 - ジアザピシクロ [5 . 4 . 0] ウンデセン - 7 (以下、DBUと略記する。 : DBUはサンアプロ (株) の登録商標

50

である。)、1,5-ジアザピシクロ[4.3.0]ノネン-5(以下、DBNと略記する)、1,8-ジアザピシクロ[5.3.0]デセン-7、1,4-ジアザピシクロ[3.3.0]オクテン-4、1,5-ジアザピシクロ[4.4.0]デセン-5、6-ジメチルアミノ-1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]ウンデセン-7、6-ジブチルアミノ-1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]ウンデセン-7、6-(2-ヒドロキシエチル)-1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン、6-(2-ヒドロキシプロピル)-1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン、7-(2-ヒドロキシエチル)-1,5-ジアザピシクロ[4.3.0]-5-ノネン、7-(2-ヒドロキシプロピル)-1,5-ジアザピシクロ[4.3.0]-5-ノネン、6-ジ(2-ヒドロキシエチル)アミノ-1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン等

10

【0021】

上記アミンの有機酸塩としては、フェノール塩、C4~18のアルキル酸塩(オクチル酸塩、オレイン酸塩等)、芳香族スルホン酸塩(ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等)、ギ酸塩及び芳香族カルボン酸塩(フタル酸塩等)等が挙げられる。

【0022】

これらは2種以上を併用してもよい。

【0023】

一般式(1)で表される2環式ジアミン(有機酸塩)のうち、測定レンジ拡大の観点から、DBU、DBUの有機酸塩(c1)、DBN、及びDBNの有機酸塩(c2)が好ましく、さらに好ましいのはDBU-フェノール塩(c11)、DBU-オクチル酸塩(c12)、DBU-オレイン酸塩(c13)、DBU-p-トルエンスルホン酸塩(c14)、DBU-ギ酸塩(c15)、DBU-フタル酸塩(c16)、DBN-フェノール塩(c21)、DBN-オクチル酸塩(c22)、DBN-オレイン酸塩(c23)、DBN-p-トルエンスルホン酸塩(c24)、DBN-ギ酸塩(c25)及びDBN-フタル酸塩(c26)、とくに好ましいのは(c11)、(c12)、(c13)、(c14)及び(c15)、最も好ましいのは(c14)及び(c15)である。

20

【0024】

緩衝液(d)としては、公知(たとえば、特開平10-319015号公報又は特開2003-279489号公報)の緩衝液等が使用できる。これらのうち、化学発光増強効果及び保存安定性の観点から、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸・1水和物/水酸化ナトリウム緩衝液及びピペラジニル-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)・2水和物/水酸化ナトリウム緩衝液が好ましく、さらに好ましいのは3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液及び2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸・1水和物/水酸化ナトリウム緩衝液、特に好ましいのは3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液である。

30

40

緩衝液(d)中の緩衝剤の含有量(mM。25)は、化学発光増強効果及び保存安定性等の観点から、1~500が好ましく、さらに好ましくは5~300、特に好ましくは10~200である。

【0025】

化学発光物質(a)の含有量(mM:ミリモル/リットル。化学発光試薬を基準とする。25)は、化学発光増強効果及び保存安定性等の観点から、0.5~80が好ましく、さらに好ましくは1.8~40、特に好ましくは3.5~21である。

化学発光増強剤(b)の含有量(mM。化学発光試薬を基準とする。25)は、化学発光増強効果及び保存安定性等の観点から、0.1~15が好ましく、さらに好ましくは0.3~7.0、特に好ましくは0.6~3.4である。

50

免疫複合体解離剤(c)の含有量(mM。化学発光試薬を基準とする。25)は、化学発光増強効果及び保存安定性等の観点から、0.02~3,000が好ましく、さらに好ましくは0.1~2,500、特に好ましくは1~2,000である。

免疫複合体解離剤(c)がタンパク変性剤であるときの含有量(mM。化学発光試薬を基準とする。25)は、200~3,000が好ましく、さらに好ましくは400~2,500、特に好ましくは500~2,000である。また、(c)が界面活性剤であるときの含有量(mM。化学発光試薬を基準とする。25)は、0.02~40が好ましく、さらに好ましくは0.1~20、特に好ましくは1~10である。さらに、(c)が有機酸塩であるときの含有量(mM。化学発光試薬を基準とする。25)は、10~2,000が好ましく、さらに好ましくは25~1,000、特に好ましくは50~500

10

これらの範囲であると、さらに広範囲の酵素結合リガンドの濃度を測定できる。

【0026】

本発明の化学発光試薬には、化学発光物質(a)、化学発光増強剤(b)、免疫複合体解離剤(c)及び緩衝液(d)以外に、キレート剤等を含ませることができる。

【0027】

キレート剤としては、公知(たとえば、特開平9-75099号公報又は特開2003-279489号公報)のキレート剤が使用できる。これらのうち、化学発光増強効果及び保存安定性等の観点から、4配位キレート剤が好ましく、さらに好ましいのはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びこの塩(ナトリウム、カリウム等)、並びにトランス-1,2ジアミノシクロヘキサン-N,N,N',N'-四酢酸(CyDTA)、特に好ましいのはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びこのナトリウム塩である。

20

【0028】

キレート剤を含有する場合、化学発光試薬中のキレート剤含有量(mM)は、0.2~5.0が好ましく、さらに好ましくは0.4~2.5、特に好ましくは0.7~1.3である。この範囲であると、化学発光増強効果及び保存安定性がさらに良好となる。

【0029】

本発明の化学発光試薬の形態としては、液体であることが好ましい。

本発明の化学発光試薬は、酵素の蛍光強度の観点から、アルカリ性であることが好ましく、さらに好ましくはpHが7~11であること、特に好ましくはpHが8~10である

30

ことである。
なお、pHは、JIS K0400-12-10:2000に準拠して測定される(測定温度25)。

【0030】

本発明の化学発光試薬は、化学発光物質(a)、化学発光増強剤(b)、免疫複合体解離剤(c)及び緩衝液(d)、並びに必要に応じてキレート剤を均一混合することにより容易に得られる。

【0031】

本発明の化学発光試薬は、酸化剤を含む試薬と組み合わせ、試薬キットとすることが好適である。酸化剤を含む試薬としては、例えば、特開平8-261943号公報及び特開2000-279196号公報に記載の酸化剤の水溶液{無機の過酸化物(過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム、過ホウ酸カリウム等)、有機過酸化物(過酸化ジアルキル、過酸化アシル等)、ペルオクソ酸化合物(ペルオクソ硫酸、ペルオクソリン酸等)等の水溶液等}が挙げられる。これらのうち、保存安定性等の観点から、過酸化水素水溶液、過ホウ酸ナトリウム水溶液及び過ホウ酸カリウム水溶液が好ましく、さらに好ましくは過酸化水素水溶液である。

40

【0032】

酸化剤を含む試薬中の酸化剤の濃度(mM)は、その種類及び適用する測定方法や測定条件等によって適宜設定されるが、化学発光増強効果等の観点から、0.5~40が好ましく、さらに好ましくは1~20、特に好ましくは2.5~10である。

50

【 0 0 3 3 】

本発明の化学発光試薬は、固相酵素免疫測定法に使用されるものである。固相酵素免疫測定法としては、例えば、「生物発光と化学発光 - 基礎と実験 -」（廣川書店，昭和 6 4 年発行）に記載の化学発光酵素免疫測定法等が挙げられる。又、酵素結合リガンドは、酵素とリガンドを結合したもので、従来免疫測定法で使用されるものが使用できる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等が挙げられる。これらのうち、取り扱いの容易さ等の観点から、ペルオキシダーゼが好ましい。

リガンドとしては、例えば「免疫化学的同定法（第 3 版）」（1993，東京化学同人）に記載の抗原に対する抗体や、MSRS catalog [Manufacturers' Specification & Reference Synopsis catalog Primary Antibodies (ISBN No.0-9643268-3-3, 1995, Aerie Corporation)] に記載の抗体や、特開 2 0 0 1 - 2 6 4 3 3 2 号公報に記載の特異的結合物質等が挙げられる。これらのうち、特異的結合の観点から、抗体が好ましく、さらに好ましいのは癌マーカー（CEA、AFP、PSA、CA19-9 及び CA125 等）に対する抗体、高分子ホルモン（甲状腺刺激ホルモン、インシュリン及びプロラクチン等）に対する抗体、血清蛋白（ α 2-ミクログロブリン、フェリチン及び CRP 等）に対する抗体、及びウイルス及びウイルス関連抗原（HBV、HCV、HIV、HBs 抗原及び HBe 抗原等）に対する抗体である。なお、これらの抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はこれらの混合のいずれであってもよい。モノクローナル抗体の場合、測定対象物に対する認識部位の異なる複数の抗体を組み合わせ使用することが好ましい。さらに、抗体は、抗体の分解物である F(ab')₂、Fab'、Fab 等であってもよい。酵素とリガンドの結合は、従来公知の方法、例えば Immunochemistry 6, 43-52 (1969)、Immunochemistry 6, 53-66 (1969)、Immobilised Affinity Ligand Techniques, Academic Press (1992)、Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996)、又は Anal. Lett. 18(B9), 1143-1155 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5374-5378 (1987) に記載された方法等が適用できる。

【 0 0 3 4 】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが本発明はこれらに限定されるものではない。

尚、以下における実施例 1 1 ~ 1 3 及び 2 2 ~ 2 5 は参考例である。

< 実施例 1 >

1) 第 1 液の調製

ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU-フェノール塩 (c 1 1) {サンアプロ (株) 製、商品名: U-CAT SA 1} 9.9 g を秤量し 1,000 ml メスフラスコに仕込んだ。3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6) を仕込んで 25 で均一混合して溶液量を 1,000 ml とし、第 1 液を調製した。測定に用いるまで冷蔵 (2 ~ 10) 保存した。(調整した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 3.5 mM、(b 1) 0.6 mM、(c 1 1) 50 mM。)

2) 第 2 液の調製

PSA 測定用臨床検査薬 {三洋化成工業 (株) 製、商品名: スフィアライト PSA} の過酸化水素液 (過酸化水素 0.017% 水溶液) を第 2 液としてそのまま使用した。

3) 第 3 液の調製

PSA 測定用臨床検査薬 {三洋化成工業 (株) 製、商品名: スフィアライト PSA} の免疫反应用緩衝液 [アジ化ナトリウム 0.09% 含有リン酸緩衝液] を第 3 液としてそのまま使用した。

4) 抗 PSA モノクローナル抗体 (マウス) 結合ビーズの調製

PSA 測定用臨床検査薬 {三洋化成工業 (株) 製、商品名: スフィアライト PSA} の抗ヒト PSA モノクローナル抗体 (マウス) 結合ビーズ [1/8 インチガラスビーズ 1 個

10

20

30

40

50

あたりに、抗ヒトP S Aモノクローナル抗体（マウス）を1.0 U / 個結合させたもの。}をそのまま使用した。

5) 酵素標識抗体液の調製

P S A測定用臨床検査薬{三洋化成工業(株)製、商品名:スフィアライトP S A}のペルオキシターゼ標識抗P S Aモノクローナル抗体(マウス){標識抗体0.17 μg / mL含有リン酸緩衝液}をそのまま使用した。

これら第1液、第2液、第3液、抗P S Aモノクローナル抗体(マウス)結合ビーズ及び酵素標識抗体液を使用してペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(1)を得た{第1液、第2液、第3液、抗P S Aモノクローナル抗体(マウス)結合ビーズ及び酵素標識抗体液から構成される}。

10

【0035】

次いで、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キットと全自動酵素免疫測定装置{スフィアライト180(オリンパス(株)製)}を用い、「P S A測定用臨床検査薬{三洋化成工業(株)製、商品名:スフィアライトP S A}添付文書記載の方法」(a.抗体ビーズ1個が入った反応層に検体40 μL及び第3液100 μLを加え、37℃、約7分間反応させる(第1反応)。b. B / F分離、洗浄を行なう。c. 酵素標識抗体液140 μLを加えて、37℃、7分間反応させる(第2反応)。d. B / F分離、洗浄を行なう。e. 第1液70 μL及び第2液70 μLを加える(酵素反応)。e. 発光量を測定する。)に準じて、複数濃度の標準P S A溶液(P S A濃度0、0.05、0.2、10、50、100、200、10000 ng / mL)を測定した。得られた化学発光量(C)を、表1に示した。なお、P S A濃度0 ng / mLを用いた場合の発光量を、ブランクの発光量(D)とした。また、酵素活性を示す化学発光量(C)を、ブランクの発光量(D)で除した比(C / D)を測定感度とした。結果を表1に示す。

20

【0036】

6) 解離溶液の調製

D B U - フェノール塩(c 1 1){サンアプロ(株)製、商品名:U - C A T S A 1}9.9 gを秤量し1,000 mLメスフラスコに仕込んだ。次いでメスフラスコに、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)を仕込んで25℃で均一混合して溶液量を1,000 mLとし、D B U - フェノール塩溶液(X 1 1)を調製した。

30

7) 免疫複合体ビーズの作成

標準P S A溶液120 μL(P S A濃度100 ng / mL)と、第3液300 μLとを混合し、測定用試料を調製した。この測定用試料420 μLと、抗P S Aモノクローナル抗体(マウス)結合ビーズ1個とを、試験管(12 x 75 mm)内で1時間反応(37℃)させた。

引き続き、試験管内から反応液をアスピレーターで除去した後、生理食塩水3 mLを加えてビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去して、反応ビーズを得た。

次に、酵素標識抗体液420 μLを反応ビーズの入った試験管に加え、37℃、1時間反応させた。反応液をアスピレーターで除去し、生理食塩水3 mLを加えてビーズを洗浄し、洗浄液をアスピレーターで除去して、免疫複合体ビーズを得た。

40

【0037】

8) 酵素活性の比の測定

(X 1 1)200 μLに免疫複合体ビーズ1個を加え、37℃、1時間反応させた。反応後液(X 1 1 a)及び反応後ビーズ(Y 1 1 b)をそれぞれ回収した。

(X 1 1 a)に後述する比較例で作成した第1液140 μLと第2液140 μLを加え、ルミネッセンスリーダー{アロカ(株)社製:BLR-210}を用いて化学発光反応を開始した。化学発光反応の開始50秒後から2秒間の発光量(積算量)を計測し、この積算量を酵素活性を示す発光量とした。同様に(Y 1 1 b)を使用して発光量を計測し

50

た。以下のようにして酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

酵素活性の比 = (X11a)の発光量 / {(X11a)の発光量 + (Y11b)の発光量} × 100

【0038】

<実施例2>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1g、DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}4.2g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.56g、DBU-オクチル酸塩(c12){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT SA 102}123g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10mM、pH8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(200mM、pH8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(2)を得た。(調整した第1液の各試薬の濃度は、(a1)21mM、(b1)3.4mM、(c12)500mM。)

10

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(2)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表1に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「DBU-オクチル酸塩(c12)123g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

20

【0039】

<実施例3>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1g、DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}2.4g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.33g、DBU-オレイン酸塩(c13){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT SA 106}74g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10mM、pH8.6)」を「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(105mM、pH8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(3)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)12.3mM、(b1)2.0mM、(c13)275mM。)

30

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(3)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表1に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「DBU-オレイン酸塩(c13)74g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

40

【0040】

<実施例4>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1g、DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35g、DBU-p-トルエン
スルホン酸塩(c14){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT SA 506}81g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10mM、pH8.6)」を、「3-[4-(2

50

- ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(4)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6 mM、(b1)2.1 mM、(c14)250 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(4)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表1に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「DBU-p-トルエンスルホン酸塩(c14)81 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

10

【0041】

<実施例5>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1 g、DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35 g、DBU-ギ酸塩(c15){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT SA 603}49.5 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(5)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6 mM、(b1)2.1 mM、(c15)250 mM。)

20

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(5)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表1に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「DBU-ギ酸塩(c15)49.5 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

30

【0042】

<実施例6>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1 g、DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35 g、DBU-フタル酸塩(c16){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT SA 810}103 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(6)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6 mM、(b1)2.1 mM、(c16)250 mM。)

40

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(6)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表1に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「DBU-フタル酸塩(c16)103 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

【0043】

<実施例7>

50

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1g、DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35g、DBN-オクチル酸塩(c22){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT 1102}67g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10mM、pH8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50mM、pH8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(7)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6mM、(b1)2.1mM、(c22)250mM。)

10

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(7)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表1に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「DBN-オクチル酸塩(c22)67g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表1に示す。

【0044】

<実施例8>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1g、DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35g、グアニジン塩酸塩(c3){ナカライテスク(株)製、生化学研究用特製試薬}47.8g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10mM、pH8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50mM、pH8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(8)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6mM、(b1)2.1mM、(c3)500mM。)

20

30

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(8)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表2に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「グアニジン塩酸塩(c3)47.8g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表2に示す。

【0045】

<実施例9>

第1製の調整において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1g、DBU-フェノール塩(c11)9.9g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35g、グアニジン塩酸塩(c3){ナカライテスク(株)製、生化学研究用特製試薬}191g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10mM、pH8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50mM、pH8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(9)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6mM、(b1)2.1mM、(c3)2000mM。)

40

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(9)を使用したこと以外

50

は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 2 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9.9 g」を、「グアニジン塩酸塩 (c 3) 191 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 2 に示す。

【0046】

<実施例 10>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、グアニジン塩酸塩 (c 3) {ナカライテスク (株) 製、生化学研究用特製試薬} 119 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (10) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 3) 1250 mM。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (10) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 2 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9.9 g」を、「グアニジン塩酸塩 (c 3) 119 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 2 に示す。

【0047】

<実施例 11>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (c 4) {ナカライテスク (株) 製、商品名：ツイン 80} 1.5 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (11) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 4) 1 mM。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (11) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 2 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9.9 g」を、「ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (c 4) 1.5 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 2 に示す。

【0048】

<実施例 12>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (c 4) {ナカライテスク (株) 製、商品名：ツイン 80} 1.5

g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(12)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6 mM、(b1)2.1 mM、(c4)10 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(12)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表2に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(c4)15 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表2に示す。

【0049】

<実施例13>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1 g、DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}3.5 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.35 g、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(c4){ナカライテスク(株)製、商品名:ツイン80}7.5 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(13)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)17.6 mM、(b1)2.1 mM、(c4)5 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(13)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表2に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(c4)7.5 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表2に示す。

【0050】

<実施例14>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1)0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.1 g、DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1){シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製}0.1 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1)0.02 g、DBU-ギ酸塩(c15){サンアプロ(株)製、商品名:U-CAT SA 603}1.98 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(1 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(14)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1)0.5 mM、(b1)0.1 mM、(c15)10 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(14)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表3に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11)9.9 g」を、「DBU-ギ酸塩(c15)1.98 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表3に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

< 実施例 1 5 >

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0 . 7 g、4 - (シアノメチルチオ) フェノール (b 1) 0 . 1 g、DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9 . 9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) { シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製 } 0 . 4 g、4 - (シアノメチルチオ) フェノール (b 1) 0 . 0 5 g、DBU - ギ酸塩 (c 1 5) { サンアプロ (株) 製、商品名 : U - C A T S A 6 0 3 } 4 . 9 5 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (1 0 m M、p H 8 . 6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (5 m M、p H 8 . 6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (1 5) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 1 . 8 m M、(b 1) 0 . 3 m M、(c 1 5) 2 5 m M。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (1 5) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 3 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9 . 9 g」を、「DBU - ギ酸塩 (c 1 5) 4 . 9 5 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 3 に示す。

【 0 0 5 2 】

< 実施例 1 6 >

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0 . 7 g、4 - (シアノメチルチオ) フェノール (b 1) 0 . 1 g、DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9 . 9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) { シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製 } 8 . 0 g、4 - (シアノメチルチオ) フェノール (b 1) 1 . 1 6 g、DBU - ギ酸塩 (c 1 5) { サンアプロ (株) 製、商品名 : U - C A T S A 6 0 3 } 1 9 8 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (1 0 m M、p H 8 . 6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (3 0 0 m M、p H 8 . 6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (1 6) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 4 0 m M、(b 1) 7 m M、(c 1 5) 1 0 0 0 m M。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (1 6) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 3 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9 . 9 g」を、「DBU - ギ酸塩 (c 1 5) 1 9 8 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 3 に示す。

【 0 0 5 3 】

< 実施例 1 7 >

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0 . 7 g、4 - (シアノメチルチオ) フェノール (b 1) 0 . 1 g、DBU - フェノール塩 (c 1 1) 9 . 9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) { シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製 } 1 5 . 9 g、4 - (シアノメチルチオ) フェノール (b 1) 2 . 4 8 g、DBU - ギ酸塩 (c 1 5) { サンアプロ (株) 製、商品名 : U - C A T S A 6 0 3 } 3 9 6 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (1 0 m M、p H 8 . 6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル] プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (5 0 0 m M、p H 8 . 6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (1 7) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 8 0

10

20

30

40

50

mM、(b1) 15 mM、(c15) 2000 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(17)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表3に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「DBU-ギ酸塩(c15) 396 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表3に示す。

【0054】

<実施例18>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1) 0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.1 g、DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩(a1) {シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製} 3.5 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.35 g、グアニジン塩酸塩(c3) {ナカライテスク(株)製、生化学研究用特製試薬} 19 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(18)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1) 17.6 mM、(b1) 2.1 mM、(c3) 200 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(18)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表3に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「グアニジン塩酸塩(c3) 19 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表3に示す。

【0055】

<実施例19>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1) 0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.1 g、DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩(a1) {シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製} 3.5 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.35 g、グアニジン塩酸塩(c3) {ナカライテスク(株)製、生化学研究用特製試薬} 38 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(19)を得た。(調製した第1液の各試薬の濃度は、(a1) 17.6 mM、(b1) 2.1 mM、(c3) 400 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(19)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表3に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「グアニジン塩酸塩(c3) 38 g」に変更したこと以外、実施例1と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表3に示す。

【0056】

<実施例20>

第1液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1) 0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.1 g、DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩(a1) {シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製} 3.

5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、グアニジン塩酸塩 (c 3) {ナカライテスク (株) 製、生化学研究用特製試薬} 239 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (20) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 3) 2500 mM。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (20) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 3 に示す。

10

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「グアニジン塩酸塩 (c 3) 239 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 3 に示す。

【0057】

<実施例 21>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、グアニジン塩酸塩 (c 3) {ナカライテスク (株) 製、生化学研究用特製試薬} 287 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (21) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 3) 3000 mM。)

20

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (21) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 4 に示す。

30

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「グアニジン塩酸塩 (c 3) 287 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 4 に示す。

【0058】

<実施例 22>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (c 4) {ナカライテスク (株) 製、商品名: ツイン 80} 0.03 g」に変更し、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (22) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 4) 0.02 mM。)

40

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (22) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 4 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「ボ

50

リオキシエチレンソルピタンモノオレエート (c 4) 0.03 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 4 に示す。

【0059】

<実施例 23>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、ポリオキシエチレンソルピタンモノオレエート (c 4) {ナカライテスク (株) 製、商品名：ツイン 80} 0.15 g」に変更し、
「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、
「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (23) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 4) 0.1 mM。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (23) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 4 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「ポリオキシエチレンソルピタンモノオレエート (c 4) 0.15 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 4 に示す。

【0060】

<実施例 24>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、ポリオキシエチレンソルピタンモノオレエート (c 4) {ナカライテスク (株) 製、商品名：ツイン 80} 30 g」に変更し、
「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、
「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット (24) を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a 1) 17.6 mM、(b 1) 2.1 mM、(c 4) 20 mM。)

化学発光試薬キット (1) の代わりに、化学発光試薬キット (24) を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量 (C) を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 4 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、「ポリオキシエチレンソルピタンモノオレエート (c 4) 30 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 4 に示す。

【0061】

<実施例 25>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) 0.7 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.1 g、DBU - フェノール塩 (c 11) 9.9 g」を、
「ルミノールのナトリウム塩 (a 1) {シグマ アルドリッチ ジャパン (株) 製} 3.5 g、4 - (シアノメチルチオ)フェノール (b 1) 0.35 g、ポリオキシエチレンソルピタンモノオレエート (c 4) {ナカライテスク (株) 製、商品名：ツイン 80} 60 g」に変更し、
「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 8.6)」を、
「3 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジニル]プロパンスルホン酸 / 水酸化ナトリウム緩衝液

(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(25)を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a1) 17.6 mM、(b1) 2.1 mM、(c4) 40 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(25)を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 4 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(c4) 60 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 4 に示す。

【0062】

<実施例 26>

第 1 液の調製において「ルミノールのナトリウム塩(a1) 0.7 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.1 g、DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「ルミノールのナトリウム塩(a1) {シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製} 3.5 g、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 0.35 g、DBU-ギ酸塩(c15) {サンアプロ(株)製、商品名: U-CAT SA 603} 24.8 g、DBN-オクチル酸塩(c22) {サンアプロ(株)製、商品名: U-CAT 1102} 33.5 g」に変更し、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(10 mM、pH 8.6)」を、「3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 8.6)」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、ペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キット(26)を得た。(調製した第 1 液の各試薬の濃度は、(a1) 17.6 mM、(b1) 2.1 mM、(c15) 125 mM、(c22) 125 mM。)

化学発光試薬キット(1)の代わりに、化学発光試薬キット(26)を使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 4 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「DBU-ギ酸塩(c15) 24.8 g、DBN-オクチル酸塩(c22) 33.5 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 4 に示す。

【0063】

<比較例>

ルミノールのナトリウム塩(a1) {シグマ アルドリッチ ジャパン(株)製} 17.6 mM、4-(シアノメチルチオ)フェノール(b1) 2.1 mM、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液(49.9 mM、pH 8.6)を均一混合して、第 1 液を調製し、測定に用いるまで冷蔵(2~10)保存した。実施例 1 における第 1 液をこの第 1 液に変更した以外、実施例 1 と同様にして、比較用のペルオキシターゼ測定用化学発光試薬キットを得た。

化学発光試薬キット(1)の代わりに、比較用の化学発光試薬キットを使用したこと以外は、実施例 1 と同様にして化学発光量(C)を測定し、同様にして測定感度を求めた。結果を表 2 に示す。

また、解離溶液の調製において「DBU-フェノール塩(c11) 9.9 g」を、「生理食塩水 9.9 g」に変更したこと以外、実施例 1 と同様にして、酵素活性の比を算出した。結果を表 2 に示す。

【0064】

10

20

30

40

【表 1】

	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	
	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)
0	765	12.0	3060	12.0	600	2.2	586	1.129	1.185	900				
0.05	9,180	65.4	36,720	78.5	1,301	7.6	1,626	3,132	2.506	1,691	2.1	1,691	1.9	
0.2	50,055	327.5	240,262	3925.9	4,577	4847.3	5,582	15,616	16,397	5,493	13.8	5,493	6.1	
10	2,502,729	16,357.7	12,013,101	196,292	4,338,485	7230.8	5,227,090	6,161,324	6,038,098	4,772,333	5095.4	4,772,333	5302.6	
50	12,513,647	83,763.7	60,065,503	2,907.9	29,068,400	48,447.3	34,198,118	45,794,340	48,084,057	30,521,820	40,577.3	30,521,820	33913.1	
100	18,770,470	245,366.6	70,098,255	22,907.9	50,258,211	83,763.7	62,822,776	82,763,820	73,307.2	45,232,399	71,938.2	45,232,399	50,258.2	
200	25,038,210	327,297.7	81,900,220	26,764.8	84,210,393	140,350.7	105,262,991	137,178,703	121,504.6	71,578,834	118,077.9	71,578,834	79,532.0	
10,000	36,790,121	480,917.7	93,738,224	306,334.4	118,938,247	1,982,304.4	1,985,843,291	2,651,140,466	2,348,220.0	89,362,948	145,421.2	89,362,948	99,292.2	
酵素活性の比	45		14		14		75	78	23	25				

10

20

30

40

【 表 2 】

	実施例8		実施例9		実施例10		実施例11		実施例12		実施例13		比較例	
	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)
0	4,890	6.0	4,885	6.0	4,152	6.0	4,802	6.0	4,562	6.0	4,016	6.0	4,885	6.0
0.05	28,019	25.2	29,186	25.2	24,808	26.7	28,888	25.2	27,541	25.7	27,973	29.6	29,186	25.2
0.2	118,101	2186.5	123,022	2492.7	110,720	2698.1	120,923	1402.7	117,295	1447.0	118,862	1657.0	123,022	2492.7
10	10,254,871	10443.7	12,176,637	10128.1	11,202,506	11320.3	6,735,901	10282.4	6,601,183	10888.3	6,654,672	12208.8	12,176,637	10128.1
50	48,980,957	13831.0	49,475,714	13413.0	47,001,928	15623.2	49,376,021	13726.8	49,672,272	15749.3	49,030,378	17150.2	49,475,714	13413.0
100	64,867,519	16652.2	65,522,746	16748.8	64,867,519	19705.7	65,915,882	16728.5	71,848,312	19369.4	68,875,209	22871.9	65,522,746	16652.2
200	78,098,874	20969.3	81,817,868	20098.6	81,817,868	21479.2	80,330,270	18066.8	88,363,297	21489.5	91,853,648	25054.6	78,098,874	20969.3
10,000	98,345,980	20	98,181,442	20	89,181,476	20	86,756,692	20	98,035,062	11	100,619,110	11	98,345,980	20
酵素活性の比														

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

【 附 3 】

	実施例14		実施例15		実施例16		実施例17		実施例18		実施例19		実施例20	
	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)
0	2,281		2,621		1,533		1,800		4,553		4,470		3,962	
0.05	6,229	2.7	14,249	5.4	2,893	1.9	3,537	2.0	27,668	6.1	26,880	6.0	23,728	6.0
0.2	33,233	14.6	59,401	22.7	22,864	14.9	16,621	9.2	117,609	25.8	115,395	25.8	105,307	26.6
10	4,320,807	1894.4	6,709,150	2560.0	8,563,298	5584.9	9,907,916	5504.6	11,908,751	2615.7	11,713,925	2620.7	10,946,797	2763.1
50	25,484,153	11173.3	44,548,857	16998.2	77,398,715	50478.4	84,388,882	46884.6	48,882,005	10736.6	48,387,248	10825.4	44,824,997	11314.5
100	36,665,195	16075.5	75,193,573	28691.0	128,154,982	83580.9	164,028,243	91130.5	65,850,360	14463.6	65,457,223	14644.4	64,146,768	16191.6
200	48,460,396	21247.0	114,327,268	43623.0	190,948,623	124534.1	252,911,801	140512.2	74,974,919	16467.8	78,173,254	17489.3	82,636,047	20858.5
10,000	49,063,299	21511.4	174,776,656	66688.2	355,925,787	232130.0	452,597,983	251453.5	79,618,265	17487.7	84,305,631	18861.3	93,613,402	23629.4
酵素活性の比	6		33		85		90		6		8		13	

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

50

【表 4】

	実施例21		実施例22		実施例23		実施例24		実施例25		実施例26	
	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)	化学発光量 (cps)	測定感度 (C/D)
0	3,903	4.831	4,778	3.898	3,366	1,625	3,898	3,366	1,625	3,366	1,625	
0.05	23,378	6.0	29,069	6.1	26,705	6.8	26,705	23,028	6.8	23,028	10,388	
0.2	99,156	25.4	122,653	25.7	110,843	28.4	110,843	102,231	30.4	102,231	43,373	
10	9,923,959	2542.6	7,610,398	1559.8	6,124,848	1801.7	6,124,848	6,063,965	1801.7	6,063,965	6,967,688	
50	42,202,784	10812.6	49,463,785	10353.8	48,387,248	12412.6	48,387,248	47,051,404	13979.4	47,051,404	46,274,445	
100	62,901,836	16115.8	68,536,792	14030.2	71,943,975	18455.5	71,943,975	75,744,294	22504.3	75,744,294	80,178,954	
200	85,908,761	22010.3	88,504,619	18319.1	81,669,108	24785.5	96,619,464	100,859,117	29966.2	100,859,117	126,661,747	
10,000	95,287,461	24413.2	93,077,703	19265.7	87,051,089	27604.5	107,608,538	112,028,055	33284.6	112,028,055	227,072,993	
酵素活性の比	11	5	7	11	11	55	11	11	11	11	55	

10

20

30

40

【0068】

本発明の化学発光試薬は、比較用の化学発光試薬を用いた場合に比べて、標準PSA溶液が高濃度の場合でも、発光量の低下がなく測定範囲が大幅に広がった。特に実施例4及び5において、極めて広い測定範囲を示した。実施例4及び5と比較例を比較すると、比較例の場合、100ng/mL以上のPSA濃度では、ほぼ同等の化学発光量であり、検量できない。すなわち比較例では、測定可能範囲はPSA濃度が0~約100ng/mL

50

の範囲となる。一方、実施例4及び5の場合では、100～10,000 ng/mLのPSA濃度の値に対しても、それぞれ異なる化学発光量となっている。すなわち実施例4及び5では、比較例よりも広い測定範囲となる。

【産業上の利用可能性】

【0069】

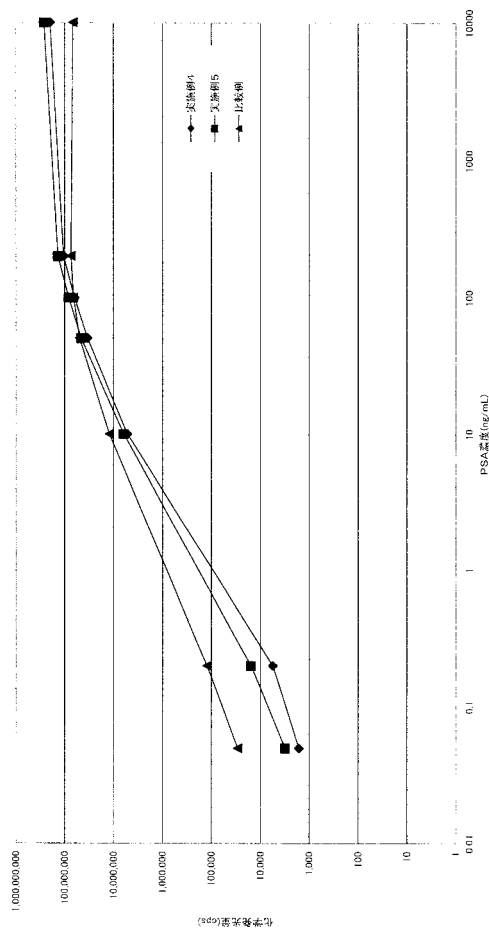
本発明の化学発光試薬は、酵素結合リガンド量が多い場合であっても、基質が供給不足にならず、化学発光量が低下することがないため、広範囲の酵素結合リガンドの量を測定することができる。従って、本発明の化学発光試薬を適用することにより、酵素結合リガンドを用いた固相酵素免疫測定を臨床検査薬へ適用できるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】実施例4及び5と比較例のPSA濃度と化学発光量との関係を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 2 1 / 7 5 - 2 1 / 8 3

G 0 1 N 3 3 / 5 3 1

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3

专利名称(译)	用于固相酶免疫测定的化学发光试剂		
公开(公告)号	JP4550880B2	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	JP2007319063	申请日	2007-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	宫森将光		
发明人	宫森 将光		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/78		
FI分类号	G01N21/76 G01N33/543.545.S G01N33/531.B G01N33/543.575 G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/JA06		
审查员(译)	岛英昭		
优先权	2007002166 2007-01-10 JP		
其他公开文献	JP2008191140A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：测量多种酶联配体的量，即使在酶联配体的量很大的情况下，也不会缺乏底物供应或化学发光量的减少。解决方案：用于固相酶免疫测定的化学发光试剂包括化学发光物质 (a)，化学发光增强剂 (b)，免疫复合物解离剂 (c) 和缓冲溶液 (d)。Ž