

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4434015号
(P4434015)

(45) 発行日 平成22年3月17日(2010.3.17)

(24) 登録日 平成22年1月8日(2010.1.8)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 21/76 (2006.01)	GO 1 N 21/76
CO 9 K 11/07 (2006.01)	CO 9 K 11/07
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532 B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 S
請求項の数 8 (全 18 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-515177 (P2004-515177)	(73) 特許権者	306008724 富士レビオ株式会社 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号
(86) (22) 出願日	平成15年6月24日(2003.6.24)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/007985	(74) 代理人	100116919 弁理士 齋藤 房幸
(87) 国際公開番号	W02004/001415	(72) 発明者	森山 和重 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
(87) 国際公開日	平成15年12月31日(2003.12.31)	(72) 発明者	谷本 徹二 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内
審査請求日	平成17年10月31日(2005.10.31)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-183720 (P2002-183720)		
(32) 優先日	平成14年6月24日(2002.6.24)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
前置審査			最終頁に続く

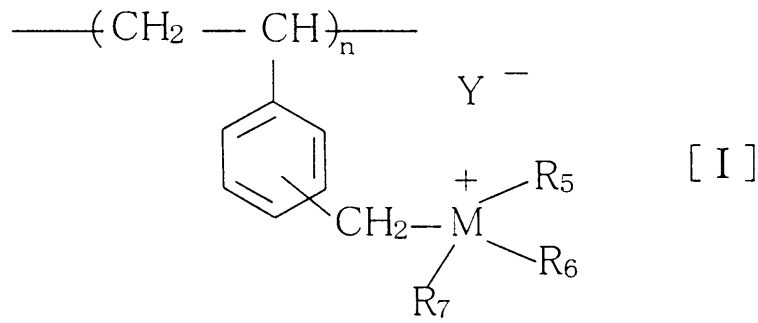
(54) 【発明の名称】 化学発光増強剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固相免疫反応系における化学発光方法であって、該化学発光方法は、
液体媒体中に分散可能な微細固体担体に固定化される抗原または/および抗体と、
酵素標識体と、
被検物質を含む検体とを、免疫反応させる工程、
前記微細固体担体を凝集させて洗浄する工程、ならびに
前記微細固体担体に免疫反応によって結合した酵素標識体と、
ジオキセタンを有する化学発光基質と、
化学発光増強剤を酸化剤または還元剤で処理することにより得られる酸化剤または還元剤
処理化学発光増強剤とを、液体媒体中で混合し、前記微細固体担体を分散させて反応させる工程を含み、
ここで、該化学発光増強剤は、一般式 [I] :

【化1】



10

[一般式 [I] 中、

R_5 、 R_6 および R_7 は、それぞれ、1~20個の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状非置換アルキル基、1個またはそれ以上のヒドロキシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アミノ基、置換アミノ基、アミド基またはウレイド基で置換された1~20個の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状アルキル基、フルオロアルカン基、フルオロアリール基、3~12個の環炭素原子を有する非置換モノシクロアルキル基、1個以上のアルキル基、アルコキシ基または縮合ベンゾ基で置換された3~12個の環炭素原子を有する置換モノシクロアルキル基、それぞれが5~12個の炭素原子を有する2個以上の縮合環を有する、非置換であるか1個以上のアルキル基、アルコキシ基またはアリール基で置換されたポリシクロアルキル基、非置換であるか1個以上のアルキル基、アリール基、フッ素またはヒドロキシル基で置換された、少なくとも1個の環および全部で6~20個の炭素原子を有するアリール基、アルカリール基またはアラルキル基であるか、あるいは R_5 、 R_6 および R_7 のうち少なくとも2個は、それらが結合している第四級原子とともに、飽和または不飽和の、3~5個の炭素原子および1~3個のヘテロ原子を有し、かつベンゼン環が縮合していてもよい窒素、リンまたは硫黄を含有する非置換であるか、または置換された環を形成している基を意味し、

20

Y は、単独に、または合わさって、ハロゲンイオン、硫酸イオン、アルキルスルホン酸イオン、アリールスルホン酸イオン、置換アリールスルホン酸イオン、ジフェニルアントラセンスルホン酸イオン、過塩素酸イオン、アルカン酸イオン、アリールカルボン酸イオン、ベンゼン複素環式アリールカルボン酸イオンからなる群より選択される対イオンを表し、

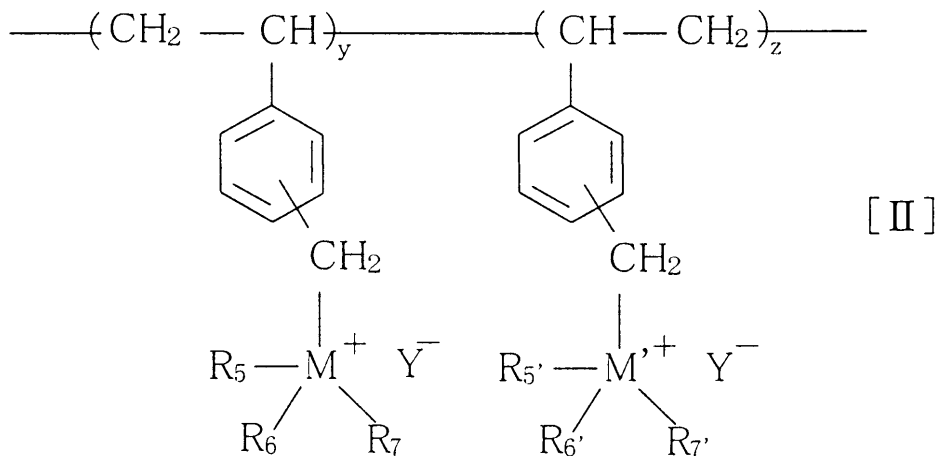
30

n は、分子量が固有粘度またはLALLS法を用いて測定して500~500,000(平均分子量)の範囲にわたる数を表し、

M は、窒素又はリンを表す]、

又は一般式 [II] :

【化2】



40

50

[一般式 [II] 中、記号 Y、M'、R₅'、R₆' および R₇' は、Y、M、R₅、R₆ および R₇ として前記で説明したものと同様であり、記号 y および z は、共重合体を構成する個々の単量体のモル分率を表す]

で表される水溶性重合体または水溶性共重合体である、
化学発光方法。

【請求項 2】

前記酸化剤または還元剤処理化学発光増強剤が、限外ろ過法で分離される分子量において、分子量 40 万ダルトンを越える成分を含有しない請求項 1 に記載の化学発光方法。

【請求項 3】

前記化学発光増強剤が、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ライド)](BDMQ)、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)(TMQ)、ポリ[ビニルベンジル(トリブチルアンモニウムクロライド)](TBQ)、ベンジルジメチルセチルアンモニウムクロライド(BDMCAC)、ポリ[ビニルベンジル(トリエチルアンモニウムクロライド)](TEQ)、ポリ[ビニルベンジル(2-ベンジルアミノ)エチルジメチルアンモニウムクロライド](BAEDM)、ポリ[ビニルベンジルジメチル(2-ヒドロキシ)エチルアンモニウムクロライド](DME(OH)B)、ポリ[ビニルベンジル(トリメチルホスホニウムクロライド)(TM)、ポリ[ビニルベンジル(トリブチルホスホニウムクロライド)](TB)、ポリ[ビニルベンジル(トリオクチルホスホニウムクロライド)](TO) およびそれらの共重合体からなる群から選ばれる、請求項 1 または 2 に記載の化学発光方法。

【請求項 4】

前記酸化剤又は還元剤が、過硫酸アンモニウム、亜硫酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、メタ過ヨウ素酸ナトリウム、過マンガン酸カリウム、重クロム酸カリウムからなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の化学発光方法。

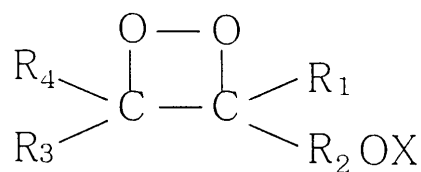
【請求項 5】

前記酵素標識体の酵素が、酸ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ及びエステラーゼからなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の化学発光方法。

【請求項 6】

前記ジオキセタンを有する化学発光基質が、一般式：

【化 3】

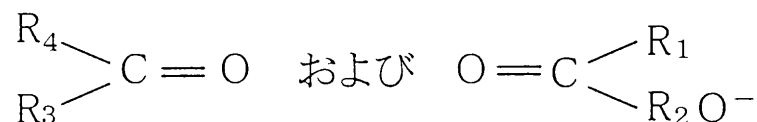


[式中、

R₂ は、X - オキシ基で置換されたアリール基であり、

X は、酸、塩基、塩、酵素、有機又は無機触媒及び電子供与体から選択される活性化剤で除去される化学的に易反応性の基であって、X が除去されると不安定なオキシド中間体の 1, 2 - ジオキセタン化合物が形成され、その不安定な 1, 2 - ジオキセタン化合物が電子エネルギーを放出して分解し、光と一般式：

【化 4】



10

20

30

40

50

の 2 個のカルボニル含有化合物とを生成する基であり、

R_1 は、アルキル基、アルコキシ基、アリーロキシ基、ジアルキルアミノ基、トリアルキルシリルオキシ基、アリールシリルオキシ基又はアリール基であるか、あるいは R_1 は R_2 と結合して、1, 2 - ジオキセタン環にスピロ結合するところの、X - オキシ基置換の多環式アリール基を形成するアリール基であり、

R_3 及び R_4 は、それぞれ独立して、アルキル基又はヘテロアルキル基であるか、あるいは R_3 及び R_4 は互いに結合して、1, 2 - ジオセタン環にスピロ結合する多環式アルキレン基を形成している。]

で表されるジオキセタン誘導体である請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の化学発光方法。

【請求項 7】

前記微細固体担体が、粒子である、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項のいずれか一項に記載の化学発光方法。

【請求項 8】

前記粒子が、磁性粒子である、請求項 7 に記載の化学発光方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、液体媒体中に分散可能な微細固体担体に固定化される抗原または / および抗体を用いる固相免疫測定法におけるシグナル検出において、化学発光基質の酵素作用による化学発光を増強する為に用いられる化学発光増強剤に関する。

【0002】

背景技術

微量成分を測定する分野、特に臨床診断学の分野では、免疫学の原理を応用した測定方法が利用され、固相に微細固体担体を用いた免疫測定方法が広く用いられている。その微細固体担体には赤血球、ゼラチン粒子、ラテックス粒子などがあり、それらの表面に、抗原または / および抗体を吸着させ、試験試料中の該抗原または / および抗体に対する抗体または / および抗原を免疫学的に反応させることにより定量的分析に供される。これらの微細固体担体を用いた免疫測定法は臨床診断以外の分野でも汎用されていることも周知である。

【0003】

1, 2 - ジオキセタン類のような化学発光基質にアルカリフォスファターゼのような酵素を作用させて化学発光を起こさせる化学発光反応を利用した化学発光測定は、検体中の測定対象物の存在又は濃度を迅速、高感度に測定することができ、HIV, HCV等のウイルス、その他生体内微量成分などを測定するために広く用いられている(特表平8-507694号参照)。

【0004】

液体媒体中で、特に水性媒体中で、ジオキセタンを有する化学発光基質の分解による化学発光に際して、消光反応が生じることは周知である。多くの試験試料は、概して生体試料であるから、これらによる試料の測定は、一般的には、水性媒体中で実施される。したがって、消光反応が、ジオキセタンを有する化学発光基質の分解によって実際に観測される化学発光を実質的に減少させることがある。特定の試験試料、例えば核酸、ウイルス抗体およびその他の蛋白質など、低レベルの検出が必要である測定法では、不可避的なバックグラウンドシグナルと合わせて、消光反応により減少した化学発光が測定法の感度を低下させるため、極めて低レベルのものを検出できないことがある。これらの消光反応を改善する為に、天然および合成分子の双方を包含している水溶性高分子の添加(米国特許第5,145,772号参照)、試験試料への各種の水溶性増強剤の添加(米国特許第4,978,614号参照)、または、水溶性重合第四級アンモニウム塩として、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)(TMQ)、ポリ(ビニルベンジルトリブチルアンモニウムクロライド)(TBQ)およびポリ(ビニルベンジルジメチルベンジルアンモニウムクロライド)(BDMQ)のような水溶性重合第四級アンモニウム塩が

10

20

30

40

50

用いられてきた（米国特許第5,112,960号、特表平8-507694号参照）。

【0005】

ところで、上記TMQ、TBQ及びBDMQなどの化学発光増強剤は、高分子量のポリマーであり、液体媒体中に分散可能な微細固体担体に固定化される抗原または/および抗体を用いる固相免疫測定法におけるシグナル検出に使用される場合、例えば免疫反応後に洗浄するために、一旦担体を物理的に凝集させると、その後に微細固体担体の分散を妨げ、被検物質の濃度に依存したジオキセタンを有する化学発光基質の酵素反応による発光を阻害し、正確な測定値を得ることができないという問題が生じる場合があった。

【0006】

発明の開示

本発明の目的は、公知の化学発光増強剤において、化学発光基質による発光反応に際して微細固体担体の分散性を良好に保ち、安定して化学発光増強作用を発揮させるように処理した化学発光増強剤を提供することである。

【0007】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、酸化作用または還元作用を有する試薬で処理した水溶性高分子第四級アンモニウム塩、スルホニウム塩または第四級ホスホニウム塩などの化学発光増強剤が、固相免疫測定法におけるシグナル検出において、ジオキセタンを有する化学発光基質の酵素反応による発光をより安定して増強し、かつより正確な測定結果を提供することを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、液体媒体中に分散可能な微細固体担体に固定化される抗原または/および抗体を用いる固相免疫測定法におけるシグナル検出に使用され、ジオキセタンを有する化学発光基質の酵素反応による発光を増強するための水溶性高分子第四級アンモニウム塩、スルホニウム塩または第四級ホスホニウム塩からなる化学発光増強剤であって、酸化剤または還元剤処理により前記微細固体担体の凝集抑制処理を施したものである化学発光増強剤、該化学発光増強剤を用いた化学発光方法およびキットを提供する。

【0009】

該増強剤の好ましい態様としては、限外ろ過法で分離される分子量において、分子量約40万ダルトンを越える成分を実質的に含有しない該化学発光増強剤である。

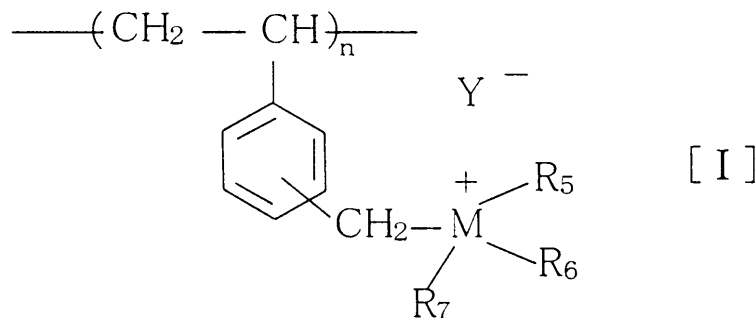
【0010】

発明を実施するための最良の形態

上記の通り、本発明の化学発光増強剤は、水溶性高分子第四級アンモニウム塩、スルホニウム塩または第四級ホスホニウム塩などを、酸化作用または還元作用を有する試薬で処理したものであり、下記一般式(I)で示される。

【0011】

【化3】



【0012】

一般式[I]中、 R_5 、 R_6 および R_7 は、それぞれ、1~20個の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状非置換アルキル基、（例えばメチル基、エチル基、 n -ブチル基、 t -ブチル基またはヘキシル基等）、1個またはそれ以上のヒドロキシル基、アルコキシ基（

10

20

30

40

50

例えばメトキシ基、エトキシ基、ベンジルオキシ基またはポリオキシエチルエトキシ基)、アリアルオキシ基(例えばフェノキシ基)、アミノ基、置換アミノ基(例えばメチルアミノ基)、アミド基(例えばアセトアミド基)またはウレイド基(例えばフェニルウレイド基)で置換された1~20個の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状アルキル基、フルオロアルカン基、フルオロアリアル基(例えばヘプタフルオロブチル基)、3~12個の環炭素原子を有する非置換モノシクロアルキル基(例えばシクロヘキシル基またはシクロオクチル基)、1個以上のアルキル基、アルコキシ基または縮合ベンゾ基で置換された3~12個の環炭素原子を有する置換モノシクロアルキル基(例えばメトキシシクロヘキシル基または1,2,3,4-テトラヒドロナフチル基)、それぞれが5~12個の炭素原子を有する2個以上の縮合環を有する、非置換であるか1個以上のアルキル基、アルコキシ基またはアリアル基で置換されたポリシクロアルキル基(例えば1-アダマンチル基または3-フェニル-1-アダマンチル基)、非置換であるか1個以上のアルキル基、アリアル基、フッ素またはヒドロキシ基で置換された、少なくとも1個の環および全部で6~20個の炭素原子を有するアリアル基、アルカリアル基またはアラルキル基(例えばフェニル基、ナフチル基、ペンタフルオロフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、ヒドロキシベンジル基、フェニルベンジル基またはデヒドロアピエチル基)であってもよく、 R_5 、 R_6 および R_7 のうち少なくとも2個は、それらが結合している第四級原子とともに、飽和または不飽和の、3~5個の炭素原子および1~3個のヘテロ原子を有し、かつベンゼン環が縮合していてもよい窒素、リンまたは硫黄を含有する非置換であるか、または置換された環(例えば1-ピリジニウム、1-(3-アルキル)イミダゾリウム、1-(3-アラルキル)イミダゾリウム、モルホリノ、アルキルモルホリニウム、アルキルピペリジニウム、N-アシルピペリジニウム、ピペリジノ、アシルピペリジノ、ベンゾオキサゾリウム、ベンズチアゾリウムまたはベンズアミダゾリウム)を形成し得る基を意味する。

【0013】

一般式[1]中の記号Yは、単独に、または合わさって、ハロゲンイオン、すなわちフッ素イオン、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン、硫酸イオン、アルキルスルホン酸イオン(例えばメチルスルホン酸イオン)、アリアルスルホン酸イオン(例えばp-トルエンスルホン酸イオン)、置換アリアルスルホン酸イオン(例えばアニリノナフチレンスルホン酸イオンと各種の異性体)、ジフェニルアントラセンスルホン酸イオン、過塩素酸イオン、アルカン酸イオン(例えば酢酸イオン)、アリアルカルボン酸イオン(例えばフルオレセインまたはフルオレセイン誘導体)、ベンゼン複素環式アリアルカルボン酸イオン(例えば7-ジエチルアミノ-4-シアノクマリン-3-カルボン酸イオン)のような部分を包含できる対イオンを表す。p-テレフタル酸イオンなどの有機ジアニオン類もYによって表されてよい。

【0014】

さらに記号nは、そのようなポリ(ビニルベンジル第四級塩)の分子量が、固有粘度またはLALLS法を用いて測定して約500~約500,000(平均分子量)、好ましくは約20,000~約70,000の範囲にわたる数を表す。Mが窒素であるこれらの重合体、関連共重合体および関連出発材料を調製する方法は、G.D.Jonesら: Journal of Polymer Science、第25巻201ページ(1958年)、米国特許第2,780,604号、第3,178,396号、第3,770,439号、4,308,335号、第4,340,522号、第4,424,326号、およびドイツ国公開特許第2,447,611号公報に開示されている。記号Mは、リンまたは硫黄でもよく、ここで、対応するホスホニウムまたはスルホニウム重合体は先行技術に記載されている(米国特許第3,236,820号および第3,065,272号参照)。

【0015】

一般式[1]で示される構造を有する化学発光増強剤としては、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ライド)](BDMQ)、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)(TMQ)、ポリ[ビニルベンジル(トリブチルアン

10

20

30

40

50

モニウムクロライド)] (T B Q)、ベンジルジメチルセチルアンモニウムクロライド (B D M C A C)、ポリメタアクリルアミドプロピレンメチルアンモニウムクロライド (ポリ M A P T A C)、ポリ [ビニルベンジル (トリエチルアンモニウムクロライド)] (T E Q)、ポリ [ビニルベンジル (2 - ベンジルアミノ) エチルジメチルアンモニウムクロライド] (B A E D M)、ポリ [ビニルベンジルジメチル (2 - ヒドロキシ) エチルアンモニウムクロライド (D M E (O H) B)、ポリ [ビニルベンジル (トリメチルホスホニウムクロライド)] (T M)、ポリ [ビニルベンジル (トリブチルホスホニウムクロライド)] (T B) 及びポリ [ビニルベンジル (トリオクチルホスホニウムクロライド)] (T O) 並びにそれらの共重合体から選択されるものが好適である。

【 0 0 1 6 】

本発明において特に好ましい、一般式 [I] の化学発光増強剤は、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ライド)] (B D M Q)、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) (T M Q)、ポリ [ビニルベンジル (トリブチルアンモニウムクロライド)] (T B Q)、ポリ [ビニルベンジル (トリエチルアンモニウムクロライド)] (T E Q)、ポリ [ビニルベンジル (トリメチルホスホニウムクロライド (T M)、ポリ [ビニルベンジル (トリブチルホスホニウムクロライド)] (T B) 及びポリ [ビニルベンジル (トリオクチルホスホニウムクロライド)] (T O) 並びにそれらの共重合体から選択されるものであり、さらに好ましくは、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) (T M Q)、ポリ [ビニルベンジル (トリブチルアンモニウムクロライド)] (T B Q) 及びポリ [ビニルベンジル (ベンジルメチルアンモニウムクロライド)] (B D M Q)、ポリ [ビニルベンジル (トリエチルアンモニウムクロライド)] (T E Q)、並びにそれらの共重合体から選択されるものであり、最も好ましくは、ポリ [ビニルベンジル (トリブチルアンモニウムクロライド)] (T B Q) 又はポリ [ビニルベンジル (ベンジルメチルアンモニウムクロライド)] (B D M Q) である。

【 0 0 1 7 】

下記一般式 [II] に記載するように、2 個以上の異なるオニウム側鎖を有する共重合体も、ここに述べた本発明で利用できる。記号 Y、M'、R₅'、R₆' および R₇' は、Y、M、R₅、R₆ および R₇ として前記で説明したものと同様である。記号 y および z は、共重合体を構成する個々の単量体のモル分率を表す。したがって、記号 y および z の合計は常に 1 に等しく、個別的には 0 . 0 1 から 0 . 9 9 まで変動してよい。好適な部分として、M は窒素またはリンであり、R₅ ~ R₇ は、それぞれ独立して、1 ~ 2 0 個の炭素原子を有する、非置換であるか、ヒドロキシル基、アミノ基、アミド基またはウレイド基で更に置換されたアルキル基、シクロアルキル基、ポリシクロアルキル基 (例えばアダマンタン基)、アラルキル基またはアリール基であるか、あるいは併せて、M 原子とのスピロ結合を介して複素環式の (場合により他の窒素、硫黄または酸素のヘテロ原子を含む芳香族、脂肪族もしくは混合の) オニウム基を形成する。

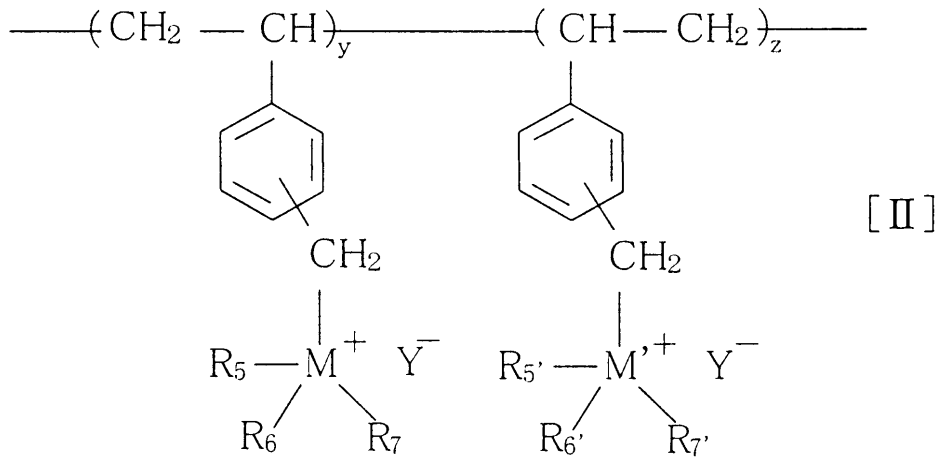
【 0 0 1 8 】

【 化 4 】

10

20

30



10

【0019】

本発明の化学発光増強剤が使用される化学発光反応自体は公知である。化学発光反応を行うための酵素としては、酸ホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ又はエステラーゼを挙げることができ、好ましい例としては、酸フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ及びエステラーゼを挙げることができる。最も好ましくは、アルカリフォスファターゼである。これらの酵素は動物、植物又は細菌などから公知の方法で精製することができ、また市販もされている。市販品も好ましく用いることができる。これらの酵素は遊離の状態であってもよく、また、抗原、抗体又はハプテン等の他の物質に結合された状態にあってもよい。

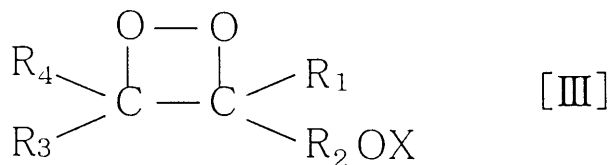
20

【0020】

ここで用いられる化学発光反応の基質としては、下記一般式 [III] で表されるジオキセタン誘導体を挙げることができる。

【0021】

【化5】



30

[式中、 R_2 はX - オキシ基で置換されたアリール基であって、Xは酸、塩基、塩、酵素、有機又は無機触媒及び電子供与体から選択した活性化剤でXを除去して反応を誘発すると不安定なオキシド中間体の1, 2 - ジオキセタン化合物を形成し、その不安定な1, 2 - ジオキセタン化合物が電子エネルギーを放出して分解し、光と2個のカルボニル含有化合物とを生成し、またXは酵素により除去される化学的に易反応性の基であり、 R_1 はアルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ジアルキルアミノ基、トリアルキルシリルオキシ基、アリールシリルオキシ基、アリール基、及びアリール基 R_2 と結合して1, 2 - ジオキセタン環にスピロ結合するところの、X - オキシ基置換の多環式アリール基を形成するアリール基から成る群から選択されたものであり、また R_3 と R_4 はそれぞれアルキル基またはヘテロアルキル基であって、 R_3 と R_4 が互いに結合して1, 2 - ジオキセタン環にスピロ結合する多環式アルキレン基を形成していてもよい。]

40

【0022】

一般式 [III] 式中、 R_1 が R_2 と結合していないときは、この R_1 は前記したようにアルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ジアルキルアミノ基、トリアルキルシリルオキシ基、アリールシリルオキシ基またはアリール基であり、好ましくは、1 ~ 8個の炭素

50

原子を有する低級のアリール基またはアルコキシ基である。R₁はまた、6～20個の炭素原子を有するアリール基、アリールオキシ基またはアリールシリルオキシ基であってもよい。R₁がアリール基であるR₂と結合して1,2-ジオキセタン環にスピロ結合する多環式アリール基を形成する場合、その多環式アリール基は炭素数30までのものであることが好ましい。この場合の多環式アリール基はキサンテニル基のように、炭素原子に代わって酸素原子を含むものであってもよく、スピロ結合多環式アリール基が、同基のC9位で1,2-ジオキセタン環にスピロ結合するフルオレニル又はキサンテニルが好ましい。

【0023】

R₂は、X-オキシ基(OX基)で置換されたアリール基であり、アリール基を含む基はフェニル基、ピフェニル基、結合フェニル基または他のアリール基で、6～30個の炭素原子を含み、且つ他の置換体を含んでいてもよい。Xは、安定なジオキセタン構造を分解して化学発光(シグナル)を生じさせるために、ジオキセタンから活性化剤により除去される基である。OX基はヒドロキシ基、アルキルシリルオキシ基、アリールシリルオキシ基、無機オキシ酸塩(特にリン酸塩または硫酸塩)、ピラノシド酸素、アリールカルボキシルエステルまたはアルキルカルボキシルエステル基から選択するのが好ましい。また、OX基がヒドロキシ基である場合、同基の水素原子はカリウムt-ブトキシドのような有機塩基あるいは水酸化カリウムのような無機塩基と易反応性であって、塩基により分解させて化学発光を生じさせることができる。活性化剤が、免疫測定用またはDNAプローブ検出用に、標識として通常良く用いられる酵素である場合には、該酵素と易反応性のXを有するOX基を適宜、選択すればよい。例えば、免疫測定用またはDNAプローブ検出において、比色基質又は蛍光基質により検出させるものとして、汎用されているアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アリールまたはアセチルコリンエステラーゼなどである場合、OX基としてリン酸塩、ピラノシド酸素または酢酸エステル基を選択することができる。

【0024】

R₃またはR₄はそれぞれアルキル基またはヘテロアルキル基であり、また互に結合して環状構造を形成し、多環式アルキレン基としていてもよい。多環式アルキレン基は6～30個の炭素原子を含み、また異種原子(窒素、酸素、硫黄又はリン)を含んでいてもよい。好ましい多環式アルキレン基はアダマンチル基である。R₃、R₄はジオキセタン構造に対し安定性をもたらし、安定性を損なう置換基でない限り、置換基を有していてもよい。

【0025】

以上のような、ジオキセタン構造を有する化合物の中で、好適な化学発光基質は、3-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ[3.3.1^{3,7}]デカン]4-イル)フェニルリン酸、特にその2ナトリウム塩(AMP PD)と、3-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1^{3,7}]デカン]4-イル)フェニルリン酸およびその2ナトリウム塩(CSPD)である(米国特許第4,962,162号、特許2552413号参照)。

【0026】

本発明で用いられる微細固体担体としては、動物赤血球、ゼラチン粒子、ラテックス粒子、磁性粒子などが挙げられる。ここで言うゼラチン粒子とは、ゼラチンに、水溶性多糖類、メタリン酸ナトリウム及びアルデヒド架橋剤などよりなる粒子を指し(特開平5-306113号、特公昭63-48021号参照)、ラテックス粒子とは、有機高分子であるポリスチレン、アクリル樹脂などの合成樹脂よりなる粒子を指し、市販もされている。市販品も好ましく用いることができる。

【0027】

本発明において用いられる微細固体担体には、核が有機高分子で表面が酸化鉄系のフェライト被覆層を有する磁性粒子を帯びるように加工したのも含まれる。磁性粒子は磁力を利用して効率良くB/F分離ができる(特許第3192149号、特許第2979414号参照)。特に好適に用いられる磁性粒子としては、例えば、マグネタイトを核としてシランを被覆した粒子(特開昭55-141670号、特開昭50-122997号参照

10

20

30

40

50

)、磁性金属酸化物を核としてシランを被覆した粒子(特開昭60-1564号参照)、有機高分子化合物を核として、酸化鉄系のフェライト被覆層を有した磁性粒子(特許2979414号参照)、さらに、有機高分子化合物を核とした磁性粒子の表面にゼラチンを有する粒子などが挙げられる(特許3192149号参照)。

【0028】

特にこれらに限定しないが、前記の微細固体担体は、各測定のための目的や測定キットの構成により、適切な担体を選択され、固相免疫測定法において使用する担体であれば、該化学発光増強剤により、発明の効果を発揮する。

【0029】

本発明に係る化学発光増強剤は、酸化作用または還元作用を有する試薬を用いた処理によって調製され得る。ここで用いられる酸化剤または還元剤としては過硫酸アンモニウム、過ヨウ素酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、メタ過ヨウ素酸ナトリウム、過マンガン酸カリウム、重クロム酸カリウムなどがあげられる。特に好ましい酸化剤または還元剤としては、過硫酸アンモニウム、亜硫酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム及びメタ過ヨウ素酸ナトリウムを挙げることができ、さらに好ましくは、亜硫酸ナトリウム及び次亜塩素酸ナトリウムを挙げることができる。

【0030】

本発明に係る化学発光増強剤を調製するに際しては、既知の方法により製造された前記一般式[Ⅰ]または[Ⅱ]の化学発光増強剤または市販品の該化学発光増強剤が、前記の酸化剤または還元剤により適切な条件下で処理される。処理条件としては、該化学発光増強剤の有する化学種、分子量、濃度等を考慮することにより、酸化剤又は還元剤の試薬濃度、反応時間、反応温度、使用する溶媒系等が適切に選択され得る。特に限定するものではないが、例えば、化学発光増強剤が数g~数100g程度の量である場合、水性溶液中において、5mM亜硫酸ナトリウムでは室温にて1時間、あるいは0.1%次亜塩素酸ナトリウムでは室温にて2時間、あるいは1mM過硫酸アンモニウム及び1mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムでは60にて2時間、あるいは15%過酸化水素では室温にて17時間、あるいは1mM過マンガン酸カリウム及び1mM重クロム酸カリウムでは80で2時間の処理により、本願発明に係る化学発光増強剤を得ることができる。なお、亜硫酸ナトリウムは条件により酸化作用又は還元作用を示すことが知られている。

【0031】

下記の実施例をもって例示するように、本発明の化学発光増強剤は次亜塩素酸ナトリウム処理後に、約14000以下の分子量をカットする透析膜を用いて精製することが望ましい。また、未処理の化学発光増強剤の多くは、分子量30万カットの限外ろ過フィルターを通過しえないが、一方で、本発明の化学発光増強剤は通過しえるようになることが判明している。さらに、酸化・還元条件によっては、フィルターの透過率が低い化学発光増強剤であっても、透析液の条件を変更することにより、本発明の化学発光増強剤の透過率が向上することを見出している。

【0032】

下記の実施例をもって例示するように、本発明の化学発光増強剤を微細固体担体、すなわち例えば磁性粒子の分散系に添加すると、未処理の化学発光増強剤の添加と比較して、分散性が改善されていることが判明した。このような微細固体担体の良好な分散性が、ジオキセタンを有する化学発光基質の酵素反応による発光(シグナル)の増強・安定化をもたらすものと考えられる。

【0033】

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。尚、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0034】

実施例1-1 未処理と酸化還元処理TBQの化学発光測定に与える影響

TBQ溶液(35.2mg/ml)2mlに、2mM亜硫酸ナトリウム溶液、0.015%(有

10

20

30

40

50

効塩素濃度)次亜塩素酸ナトリウム溶液、2mMメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液又は2mM過硫酸アンモニウム溶液を2ml加え、混合後、60℃にて4時間処理した。これら処理TBQを透析膜(分子量カット12000~14000、三光純薬社製)に分注後MilliQ水(超純水)を外液として透析を行い、処理TBQとした。次に0.8mg/mlの未処理TBQ又は処理TBQを含有した0.4mg/mlAMPD液(0.2Mジエタノールアミン(DEA)、1mM塩化マグネシウム(MgCl₂)、0.05%アジ化ナトリウム(NaN₃) pH10.0)を調製した(基質液)。0.015%アルカリフォスファターゼ(ALP)結合磁性粒子を反応容器に200μl分注し、磁石を接して粒子を集磁させ上清を除き洗浄した。この反応容器に、前記の基質液200μlを加えて混合し、37℃で5分間反応させた後、フロンカウンタ(浜松フォニクス社製)で発光(シグナル)をカウントし、2秒間の積算値を求めた。上記の磁性粒子と基質による反応を5回行った。この結果を表1に示す。未処理TBQと比較し、いずれの処理条件においても、処理TBQ添加群はシグナルが増加し、同時再現性(CV値)も向上した。

【0035】

【表1】

表1

	未処理TBQ	処理TBQ			
		亜硫酸Na	次亜塩素酸Na	メタ過ヨウ素酸Na	過硫酸アンモニウム
カウント	1188601	1795546	1900953	1882699	1887294
	1144091	1803082	1893218	1880734	1853619
	1159564	1760605	1859213	1864943	1855904
	1100897	1774889	1881518	1859709	1852409
	1164963	1768074	1864585	1845497	1837743
平均	1151623	1780439	1879897	1866716	1857394
CV	2.8%	1.0%	1.0%	0.8%	1.0%

【0036】

実施例1-2 未処理と酸化還元処理TBQの粒子分散に与える影響

0.8mg/ml未処理TBQ又は処理TBQを含む0.1M DEA溶液(pH10.0)を調製した。0.03%磁性粒子を反応容器に100μl分注し、磁石を接して粒子を集磁させ上清を除いた。前記TBQを含むDEA溶液200μlを加えて30秒攪拌した。攪拌後15秒後にピペットマン(GILSON社製マイクロピペット)で液上面から150μlを吸引し、分光光度計用セルに分注し、10秒後に分光光度計(SHIMADZU社製UV-1200)で濁度(OD500)を測定した。この結果を表2に示す。処理TBQは未処理TBQにくらべて、濁度が高く、粒子の分散は向上した。

【0037】

【表2】

表2

	未処理TBQ	処理TBQ			
		亜硫酸Na	次亜塩素酸Na	メタ過ヨウ素酸Na	過硫酸アンモニウム
濁度	0.035	0.261	0.368	0.430	0.487

【0038】

実施例2-1 未処理と酸化還元処理TBQの化学発光測定に与える影響

10

20

30

40

50

35. 2mg/ml TBQ溶液 2mlに、有効塩素濃度として0.005%、0.05%又は0.5%次亜塩素酸ナトリウムを含む溶液を2ml加え、混合後、25℃にて24時間放置した。次に、透析膜(分子量カット12000~14000、三光純薬社製)に分注後MilliQ水を外液として透析を行い、処理TBQとした。0.8mg/mlの未処理TBQ又は処理TBQを含有した0.2mg/ml AMP PD液(0.1M DEA、1mM MgCl₂、0.05% NaN₃、pH10.0)を調製した(基質液)。次に0.015% ALP結合磁性粒子を反応容器に200µl分注し、磁石を接して粒子を集磁させ上清を除き洗浄した。前記の基質液200µlを加えて混合し、37℃で5分間反応させた後、フロンカウンター(浜松フォトニクス社製)で発光(シグナル)をカウントし、2秒間の積算値を求めた。この結果を表3に示す。未処理TBQと比較し、いずれの処理条件においても、処理TBQ添加群はシグナルが増加し、同時再現性(CV値)も向上した。

10

【0039】

【表3】

表3

	未処理TBQ	次亜塩素酸ナトリウム処理TBQ		
		0.005%処理	0.05%処理	0.5%処理
カウント	1243067	1939907	1874673	1742837
	1138533	1951098	1904467	1747014
	1185676	1958058	1896528	1742927
	1213137	1958925	1928099	1749573
	1046363	1944462	1889804	1753686
	1198577	1931453	1879883	1738024
平均	1170892	1947317	1895576	1745677
CV	6.0%	0.6%	1.0%	0.3%

20

【0040】

実施例2-2

未処理と酸化還元処理TBQの粒子分散に与える影響

実施例2-1に記した方法により処理TBQを得た。0.8mg/ml未処理TBQ又は処理TBQを含む0.1M DEA溶液(pH10.0)を調製した。0.03%磁性粒子を反応容器に100µl分注し、磁石を接して粒子を集磁させ上清を除いた。前記TBQを含むDEA溶液200µlを加えて30秒攪拌した。攪拌後15秒後にピペットマンで液上面から150µlを吸引し、分光光度計用セルに分注し、10秒後に分光光度計(SHIMADZU社製UV-1200)で濁度(OD500)を測定した。この結果を表4に示す。各処理TBQは未処理TBQに比べて濁度が高く、粒子の分散は向上した。

30

【0041】

【表4】

40

表4

	未処理TBQ	次亜塩素酸ナトリウム処理TBQ		
		0.005%処理	0.05%処理	0.5%処理
濁度	0.035	0.314	0.385	0.510

10

【0042】

実施例3 未処理と酸化還元処理TBQの限外ろ過フィルターの透過率

0.1M又は1M塩化ナトリウム(NaCl)溶液で未処理と各処理TBQを1mg/ml以下に希釈した。この溶液を分子量30万カットの限外ろ過フィルター(ミリポア社製)で限外ろ過し、ろ液の吸光度(OD268)を測定し、透過率を算出した。その結果を表5に示す。未処理TBQと比較し、各処理TBQのフィルター透過率は上昇した。更に、0.1M NaCl溶液では低い透過率であった0.005%次亜塩素酸ナトリウム処理TBQは1M NaCl溶液に溶解した場合、フィルター透過率は向上した。

【0043】

【表5】

20

表5

	未処理TBQ	次亜塩素酸ナトリウム処理TBQ		
		0.005%処理	0.05%処理	0.5%処理
フィルター透過率	0.1M NaCl溶液	3%	31%	94%
	1M NaCl溶液	7%	96%	95%

30

【0044】

実施例4 未処理と酸化還元処理TBQの化学発光免疫測定に与える影響(1)

35.2mg/ml TBQ溶液2mlに2M亜硫酸ナトリウム溶液を2ml加え、混合後、60にて4時間処理した。次にこれを透析膜(分子量カット12000~14000、三光純薬社製)に分注後MilliQ水を外液として透析を行い、処理TBQとした。0.8mg/mlの未処理TBQ又は処理TBQを含有した0.2mg/ml AMP PD液(0.1M DEA、1mM MgCl₂、0.05% NaN₃、pH10.0)を調製した(基質液)。フェトプロテイン(AFP) 0、10、100、800及び2000ng/mlを含む試験試料をBSA溶液で20倍希釈した。0.03%抗AFP抗体結合磁性粒子50µlを入れた反応容器中に各測定試料を各々20µl添加・混合し、37で8分間反応させた。この後、反応容器に磁石を接して粒子を集磁させ上清を除き洗浄した。0.1µg/ml ALP結合抗AFP抗体溶液を50µl添加・混合し、37で8分間反応させた。反応後この反応容器に磁石を接して粒子を集磁させ上清を除き洗浄した。この粒子に前記基質液を200µl添加・混合した。37で4分間反応させた後、フォトンカウンター(浜松フォトニクス社製)で発光(シグナル)をカウントし、2秒間の積算値を求めた。その結果を表6に示す。未処理TBQと比較し、亜硫酸ナトリウム処理TBQの同時再現性(CV値)は向上した。

40

【0045】

【表6】

表6
未処理TBQ

	AFP濃度 (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
カウント	737	22413	190157	1204985	2201469
	689	25275	205970	874704	1396455
	822	30756	199645	932275	2335765
	824	30605	205809	816211	2214843
	859	33443	189985	946657	1430978
	853	22297	196053	1064297	1374801
平均	797	27465	197937	973188	1825719
CV	8.6%	17.3%	3.6%	14.4%	25.6%

10

亜硫酸ナトリウム処理TBQ

	AFP濃度 (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
カウント	354	17298	165651	1230392	2391362
	380	17595	166482	1236687	2514891
	370	17634	167006	1245664	2397218
	385	17515	167636	1192276	2515427
	381	17557	166714	1191075	2442702
	371	16806	164900	1216407	2540877
平均	374	17401	166398	1218750	2467080
CV	3.0%	1.8%	0.6%	1.9%	2.6%

20

30

【0046】

実施例5 未処理と酸化還元処理TBQの化学発光免疫測定に与える影響(2)

35.2 mg/ml TBQ溶液300 mlに1 M亜硫酸ナトリウム-HCl溶液(pH6.0)を15 ml加え、混合後、25℃にて24時間処理した。次にこれを透析膜(分子量カット12000-14000、三光純薬社製)に分注後、MilliQ水を外液として透析を行い、処理TBQとした。0.8 mg/mlの未処理TBQ又は処理TBQを含有した0.2 mg/ml AMP PD液(0.1 M DEA、1 mM MgCl₂、0.05% NaN₃、pH10.0)を調整した(基質液)。

【0047】

前記実施例4と同様に試験試料としてフェトプロテインを用いて、免疫測定を行い発光(シグナル)をカウントして測定を行った。その結果を表7に示す。未処理TBQと比較し、亜硫酸ナトリウム処理TBQ同時再現性(CV値)は向上した。

40

【0048】

【表7】

表7
未処理TBQ

	AFP濃度 (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
カウント	549	37542	188792	1064676	1714369
	560	38510	219614	908606	1985371
	609	41285	212975	958981	1866508
	551	38169	207767	1051242	1464529
	505	41844	232717	983756	1498278
	472	27779	211984	1054501	1684947
平均	541	37522	212308	1003627	1702334
CV	8.8%	13.5%	6.8%	6.3%	11.9%

10

亜硫酸ナトリウム処理TBQ

	AFP濃度 (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
カウント	374	27079	234281	1140508	2163595
	380	25361	233081	1160725	1925163
	362	27141	220616	1153611	2031717
	363	25705	228368	1117495	2060136
	426	27389	221167	1104866	1978776
	399	24851	227564	1130180	2036848
平均	384	26254	227513	1134564	2032706
CV	6.4%	4.1%	2.5%	1.9%	4.0%

20

30

【0049】

実施例6 未処理と酸化還元処理BDMQの化学発光免疫測定に与える影響

BDMQ溶液(25.4 mg/ml) 10 mlに1 M亜硫酸ナトリウム - HCl溶液(pH6.0)を0.5 ml加え、混合後、25℃にて24時間処理した。次にこれを透析膜(分子量カット12000-14000、三光純薬社製)に分注後、MilliQ水を外液として透析を行い、処理BDMQとした。

【0050】

次に0.4 mg/mlの未処理BDMQ又は処理BDMQを含有した0.2 mg/ml AMPPD液(0.1 Mジエタノールアミン(DEA)、1 mM塩化マグネシウム(MgCl₂)、0.05%アジ化ナトリウム(NaN₃) pH10.0)を調製した(基質液)。

40

【0051】

フェトプロテイン(AFP)0, 10, 100, 800および2000 ng/mlを含む試験試料をBSA溶液で10倍希釈した。0.015%抗AFP抗体結合磁性粒子250 μlを入れた反応容器中に各測定試料を各々20 μl添加・混合し、37℃で10分間反応させた。この後、反応容器に磁石を接して粒子を集磁させ上清を除き洗浄した。0.1 μg/ml ALP結合抗AFP抗体溶液を250 μl添加・混合し、37℃で10分間反応させた。反応後、この反応容器に磁石を接して粒子を集磁させ上清を除き洗浄した。この粒子に前記基質液を200 μl添加・混合した。37℃で5分間反応させた後、フォトンカ

50

ウンター（浜松フォトニクス社製）で発光（シグナル）をカウントし、2秒間の積算値を求めた。その結果を表8示す。未処理BDMQと比較し、亜硫酸ナトリウム処理BDMQの同時再現性（CV値）は向上した。

【0052】

【表8】

表8

未処理BDMQ

	AFP濃度(ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
カウント	235	29915	200489	860407	1600060
	242	30126	203080	904037	1735060
	222	29949	198255	891405	1759976
	242	29466	208122	935003	1512594
平均	235	29864	202487	897713	1651923
CV	4.00%	0.90%	2.10%	3.40%	7.10%

10

亜硫酸ナトリウム処理BDMQ

	AFP濃度(ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
カウント	201	24969	198765	1212549	2354980
	212	25586	195978	1210283	2371754
	207	25043	196434	1213840	2339963
	184	25086	195111	1219413	2371016
平均	201	29864	202487	897713	1651923
CV	6.10%	0.90%	0.80%	0.40%	0.90%

20

30

【0053】

実施例7 未処理と酸化還元処理BDMQの粒子分散に与える影響

BDMQ溶液（25.4mg/ml）10mlに1M亜硫酸ナトリウム-HCl溶液（pH6.0）を0.5ml加え、混合後、25℃にて24時間処理した。次にこれを透析膜（分子量カット12000-14000、三光純薬社製）に分注後、MilliQ水を外液として透析を行い、処理BDMQとした。

【0054】

次に0.4mg/ml未処理BDMQ又は処理BDMQを含む0.1MDEA（pH10.0）を調製した。0.03%磁性粒子を反応容器に100μl分注し、磁石を接して粒子を集磁させ上清を除いた。前記BDMQを含むDEA溶液200μlを加えて30秒攪拌した。攪拌後、15秒後にピペットマンで液上面から150μlを吸引し、分光光度計用セルに分注し、10秒後に分光光度計（SHIMADZU社製UV-1200）で濁度（OD500）を測定した。この結果を表9に示す。処理BDMQは未処理BDMQに比べて、濁度は高く、粒子の分散性は向上した。

40

【0055】

【表9】

表9

	未処理BDMQ	処理BDMQ
濁度	0.045	0.339

【 0 0 5 6 】

発明の効果

上記のように、酸化剤または還元剤処理により、液体媒体中に分散可能な微細固体担体に固定化される抗原または / および抗体を用いる固相免疫測定法におけるシグナル検出に使用され、従来の化学発光増強剤と比較して該微細固体担体の分散性を改善し、ジオキセタンを有する化学発光基質の酵素反応による発光の増強作用の優れた化学発光増強剤、該化学発光増強剤を用いた化学発光方法及びキットが提供された。また、本発明の化学発光増強剤を用いると測定値の同時再現性が向上し、より正確な定量が可能になる。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/42 (2006.01) C 1 2 Q 1/34
C 1 2 Q 1/44 (2006.01) C 1 2 Q 1/42
C 1 2 Q 1/44

(72) 発明者 松野 達樹
東京都中央区日本橋浜町二丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内
(72) 発明者 芦原 義弘
東京都中央区日本橋浜町二丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内

審査官 高 場 正光

(56) 参考文献 特表平 0 9 - 5 0 7 5 7 1 (J P , A)
特開平 0 6 - 0 0 9 7 2 1 (J P , A)
特開平 1 1 - 3 2 2 9 2 4 (J P , A)

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G01N21/76
G01N33/543
G01N33/553

专利名称(译)	化学发光增强剂		
公开(公告)号	JP4434015B2	公开(公告)日	2010-03-17
申请号	JP2004515177	申请日	2003-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
当前申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	森山和重 谷本徹二 松野達樹 芦原義弘		
发明人	森山 和重 谷本 徹二 松野 達樹 芦原 義弘		
IPC分类号	G01N21/76 C09K11/07 G01N33/532 G01N33/543 C12Q1/34 C12Q1/42 C12Q1/44 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/76 G01N33/532		
FI分类号	G01N21/76 C09K11/07 G01N33/532.B G01N33/543.541.A G01N33/543.545.S C12Q1/34 C12Q1/42 C12Q1/44		
代理人(译)	津国 肇		
优先权	2002183720 2002-06-24 JP		
其他公开文献	JPWO2004001415A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种化学发光增强剂，其经过处理以保持细固体载体的良好分散性并稳定地发挥化学发光增强作用。一种免疫测定方法，用于使用抗原或和固定在液体介质中可分散的细固体载体上的抗体在固相免疫测定中检测信号，并用于具有二恶丁环的化学发光底物的信号检测一种化学发光增强剂，由水溶性聚合季铵盐，季铈盐或季磷盐组成，通过用氧化剂或还原剂处理对细固体载体进行聚集抑制处理，提供了化学发光方法和使用化学发光增强剂的试剂盒。

