

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-244231

(P2009-244231A)

(43) 公開日 平成21年10月22日(2009.10.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 E	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 A	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2008-94271 (P2008-94271)	(71) 出願人	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号
(22) 出願日	平成20年3月31日 (2008.3.31)	(74) 代理人	100079049 弁理士 中島 淳
		(74) 代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
		(74) 代理人	100085279 弁理士 西元 勝一
		(74) 代理人	100099025 弁理士 福田 浩志
		(72) 発明者	森 幹永 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士フイルム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的検出方法

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は簡易、迅速、かつ高感度の免疫学的検出方法を提供することにある。

【解決手段】免疫学的検出方法であって、a) 検体または検体を含む試料に、金属を含む標識により修飾された検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第一の蛋白質(Y)を作用させ、前記分析対象物および前記Yを含む複合体を形成する工程；b) 前記複合体と前記複合体を形成していない前記第一の蛋白質(Y)とを分離する工程；c) 有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により生成した有機過酸、及び発色剤を前記分離された複合体に作用させる発色工程；d) 前記発色工程により生成した色素を検出する工程を有する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的検出方法であって、

- a) 検体または検体を含む試料に、金属を含む標識より修飾された検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第一の蛋白質 (Y) を作用させ、前記分析対象物および前記 Y を含む複合体を形成する工程；
- b) 前記複合体と前記複合体を形成していない前記第一の蛋白質 (Y) とを分離する工程；
- c) 有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により生成した有機過酸、及び発色剤を前記分離された複合体に作用させる発色工程；
- d) 前記発色工程により生成し発色を検出する工程を有することを特徴とする免疫学的検出方法。

10

【請求項 2】

前記有機過酸プレカーサーがアルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基を有する化合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 3】

前記アルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基におけるアルカノイルがアセチルであることを特徴とする請求項 2 に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 4】

前記有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応から 1 時間以内に前記発色工程を行うことを特徴とした請求項 1 ~ 請求項 3 いずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法。

20

【請求項 5】

前記発色剤が還元剤及び発色素材からなる、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 6】

前記金属を含む標識が銀、金または白金原子の少なくとも 1 つを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 7】

前記金属を含む標識が銀であることを特徴とする請求項 6 に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 8】

前記金属を含む標識がハロゲン化銀であることを特徴とする請求項 6 に記載の免疫学的検出方法。

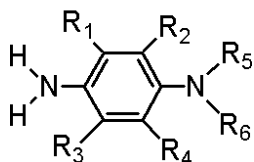
30

【請求項 9】

前記還元剤が下記一般式 (I) で表される化合物であることを特徴とする請求項 5 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法：

【化 1】

一般式 (I)



40

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 はそれぞれ独立に水素原子又は置換基を表し、 R_5 及び R_6 はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アシル基、又はスルホニル基を表し、置換基を有してもよく、また R_1 と R_2 、 R_3 と R_4 、 R_5 と R_6 、 R_2 と R_5 、又は R_4 と R_6 とが互いに結合して 5 員 ~ 7 員の環を形成してもよい。)

【請求項 10】

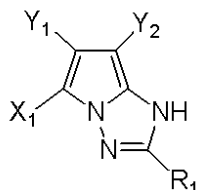
前記発色素材が下記一般式 (C - 1)、(C - 2)、(C - 3)、(M - 1)、(M - 2)、(M - 3)、(Y - 1)、(Y - 2) および (Y - 3) よりなる群より選ばれる少

50

なくとも 1 種の化合物であることを特徴とする請求項 5 ～ 請求項 9 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法：

【化 2】

一般式 (C-1)

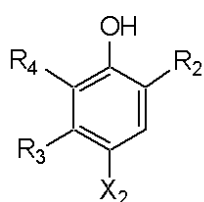


10

(式中、 X_1 は水素原子または離脱基を表し、 Y_1 および Y_2 は電子求引性の置換基を表し、 R_1 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表す。)；

【化 3】

一般式 (C-2)

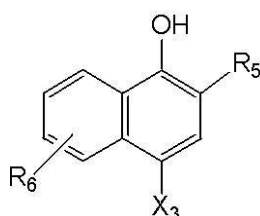


20

(式中、 X_2 は水素原子または離脱基を表し、 R_2 はアシルアミノ基、ウレイド基またはウレタン基を表し、 R_3 は水素原子、アルキル基またはアシルアミノ基を表し、 R_4 は水素原子、または置換基を表す。 R_3 と R_4 が互いに連結して環を形成してもよい。)；

【化 4】

一般式 (C-3)

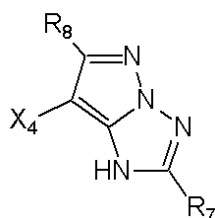


30

(式中、 X_3 は水素原子または離脱基を表し、 R_5 はカルバモイル基またはスルファモイル基を表し、 R_6 は水素原子または置換基を表す。)；

【化 5】

一般式 (M-1)

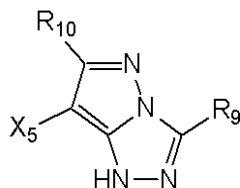


40

(式中、 X_4 は水素原子または離脱基を表し、 R_7 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、 R_8 は置換基を表す。)；

【化 6】

一般式 (M-2)

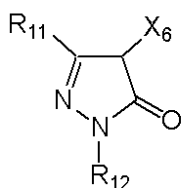


(式中、 X_5 は水素原子または離脱基を表し、 R_9 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、 R_{10} は置換基を表す。);

10

【化 7】

一般式 (M-3)

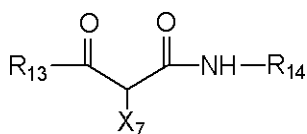


(式中、 X_6 は水素原子または離脱基を表し、 R_{11} はアルキル基、アリール基、アシルアミノ基またはアニリノ基を表し、 R_{12} はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表す。);

20

【化 8】

一般式 (Y-1)

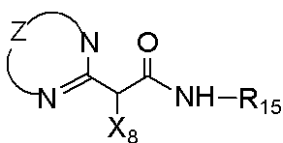


(式中、 X_7 は水素原子または離脱基を表し、 R_{13} はアルキル基、アリール基、又はインドレニル基を表し、 R_{14} はアリール基またはヘテロ環基を表す。);

30

【化 9】

一般式 (Y-2)

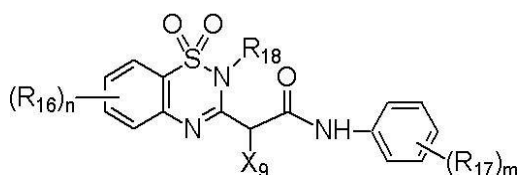


(式中、 X_8 は水素原子または離脱基を表し、 Z は 5 ~ 7 員の環を形成するのに必要な 2 価の基を表し、 R_{15} はアリール基またはヘテロ環基を表す。);

40

【化 10】

一般式 (Y-3)



(式中、 X_9 は水素原子または離脱基を表し、 R_{16} 、 R_{17} および R_{18} はそれぞれ置

50

換基を表し、 n は 0 ~ 4 の、 m は 0 ~ 5 のいずれかの整数を表す。 n または m が 2 以上のとき、複数の R_{16} および R_{17} はそれぞれ同一の基であってもよいし、異なる基であってもよい。)。

【請求項 11】

前記複合体を形成する工程が、さらに検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第二の蛋白質 (X) を含み、該第二の蛋白質 (X) を前記分析対象物および前記第一の蛋白質 (Y) に同時にまたは段階的に作用させ、前記 X、前記分析対象物および前記 Y を含む複合体を形成する工程であることを特徴とする請求項 1 ~ 請求項 10 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 12】

前記分析対象物が抗原であり、前記分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質が抗体であることを特徴とする請求項 1 ~ 請求項 11 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 13】

前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 12 に記載の免疫学的検出方法。

【請求項 14】

前記第二の蛋白質 (X) が不溶性担体に担持されていることを特徴とする請求項 11 ~ 請求項 13 のいずれか 1 項に記載の免疫学的検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分析対象物を含む試料を、簡易、迅速、高感度で検知することができる免疫学的検出方法に関する。特に増幅された発色反応を用いて高感度で分析対象物を検出する免疫学的検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

天然物、毒素、ホルモン、又は農薬等の生理活性物質又は環境汚染物質の中には、極微量で作用するものが非常に多い。従って、これらの物質の定性的及び定量的測定には、従来、高感度分析が可能な機器分析法が広く用いられてきた。しかし、機器分析法は、特異性が低く、試料の前処理工程を含め、分析に時間を要する上、操作が煩雑なため、近年要求されている迅速簡便測定目的には不都合である。一方、免疫学的測定法は、特異性も高く、操作も機器分析よりはるかに簡便であることから、生理活性物質又は環境汚染物質の測定分野に徐々に普及してきた。この中にはラテックス凝集法、RIA 法あるいは EIA 法 (酵素免疫測定法) といった免疫学的測定法があるが、ラテックス凝集法は必ずしも測定の迅速簡便性あるいは検出感度を満たすものではなく、RIA 法は標識物質に放射性同位元素を使用するので、特殊な環境が必要である。

【0003】

酵素免疫測定法は、人体に対して危険性の少ない免疫測定法として開発され、種々の物質の測定系に利用されている。しかしながら、臨床化学分析においては、その測定対象が生体試料 (主として血清、尿等) であり、その測定値は病態の診断又は経過観察等に用いられることが多く、そのためのより高感度及び高精度な測定の要求を比色法で完全に満足させることは難しい。この要求を満たすことを目的として化学発光酵素免疫法が提案されている (例えば、特許文献 1 参照)。化学発光酵素免疫測定法は、酵素の触媒活性によって化学発光性物質が中間体を経て励起状態となり、この状態から基底状態に戻る際に放出される発光量を測定して酵素活性を定量し、この酵素活性と相関性を有する測定対象物質の量を定量する方法である。この方法においては、化学反応により化学発光性物質を発光させるため光源が不要であり、光源に起因するバックグラウンドの上昇等がないため測定の高感度化が可能である。

【0004】

しかしながら、ウイルスのような増殖する分析対象物の場合、より早い段階、すなわち

10

20

30

40

50

少ないウイルス量での検出が必要であり、さらに高感度で簡便な検出方法が望まれていた。

【特許文献 1】特開 2 0 0 0 - 1 4 6 9 6 8 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

本発明は、分析対象物を含む試料を、簡易、迅速、高感度で検知することができる免疫学的検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

10

本発明の上記課題は、下記的手段により解決された。

【0 0 0 7】

< 1 > 免疫学的検出方法であって、

a) 検体または検体を含む試料に、金属を含む標識より修飾された検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第一の蛋白質 (Y) を作用させ、前記分析対象物および前記 Y を含む複合体を形成する工程；

b) 前記複合体と前記複合体を形成していない前記第一の蛋白質 (Y) とを分離する工程；

c) 有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により生成した有機過酸、及び発色剤を前記分離された複合体に作用させる発色工程；

20

d) 前記発色工程により生成し発色を検出する工程を有することを特徴とする免疫学的検出方法。

< 2 > 前記有機過酸プレカーサーがアルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基を有する化合物であることを特徴とする < 1 > に記載の免疫学的検出方法。

< 3 > 前記アルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基におけるアルカノイルがアセチルであることを特徴とする < 2 > に記載の免疫学的検出方法。

< 4 > 前記有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応から 1 時間以内に前記発色工程を行うことを特徴とした < 1 > ~ < 3 > いずれかに記載の免疫学的検出方法。

< 5 > 前記発色剤が還元剤及び発色素材からなる、< 1 > ~ < 4 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法。

30

< 6 > 前記金属を含む標識が銀、金または白金原子の少なくとも 1 つを含むことを特徴とする < 1 > ~ < 5 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法。

< 7 > 前記金属を含む標識が銀であることを特徴とする < 6 > に記載の免疫学的検出方法。

< 8 > 前記金属を含む標識がハロゲン化銀であることを特徴とする < 6 > に記載の免疫学的検出方法。

< 9 > 前記還元剤が下記一般式 (I) で表される化合物であることを特徴とする < 5 > ~ < 8 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法；

【0 0 0 8】

【化 1】

40

一般式 (I)



【0 0 0 9】

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 はそれぞれ独立に水素原子又は置換基を表し、 R_5 及び R_6 はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アシル基、又はスルホニル基を表し、置換基を有してもよく、また R_1 と R_2 、 R_3 と R_4 、 R_5 と R_6 、 R_2

50

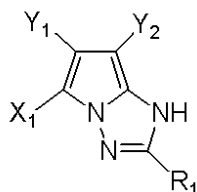
と R_5 、又は R_4 と R_6 とが互いに結合して 5 員 ~ 7 員の環を形成してもよい。)。

< 10 > 前記 Cp が下記一般式 (C - 1)、(C - 2)、(C - 3)、(M - 1)、(M - 2)、(M - 3)、(Y - 1)、(Y - 2) および (Y - 3) よりなる群より選ばれる少なくとも 1 種の化合物を含有することを特徴とする < 5 > ~ < 9 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法：

【 0 0 1 0 】

【 化 2 】

一般式 (C - 1)



10

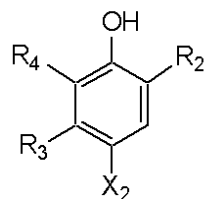
【 0 0 1 1 】

(式中、 X_1 は水素原子または離脱基を表し、 Y_1 および Y_2 は電子求引性の置換基を表し、 R_1 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表す。) ；

【 0 0 1 2 】

【 化 3 】

一般式 (C - 2)



20

【 0 0 1 3 】

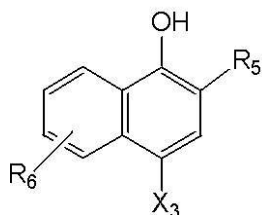
(式中、 X_2 は水素原子または離脱基を表し、 R_2 はアシルアミノ基、ウレイド基またはウレタン基を表し、 R_3 は水素原子、アルキル基またはアシルアミノ基を表し、 R_4 は水素原子、または置換基を表す。 R_3 と R_4 が互いに連結して環を形成してもよい。) ；

30

【 0 0 1 4 】

【 化 4 】

一般式 (C - 3)



40

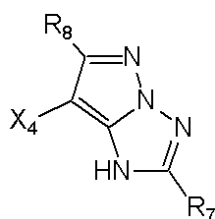
【 0 0 1 5 】

(式中、 X_3 は水素原子または離脱基を表し、 R_5 はカルバモイル基またはスルファモイル基を表し、 R_6 は水素原子または置換基を表す。) ；

【 0 0 1 6 】

【化 5】

一般式 (M-1)



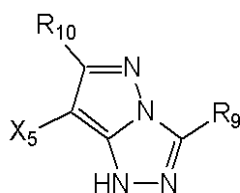
【 0 0 1 7 】

(式中、 X_4 は水素原子または離脱基を表し、 R_7 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、 R_8 は置換基を表す。) ;

【 0 0 1 8 】

【化 6】

一般式 (M-2)



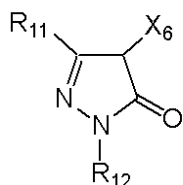
【 0 0 1 9 】

(式中、 X_5 は水素原子または離脱基を表し、 R_9 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、 R_{10} は置換基を表す。) ;

【 0 0 2 0 】

【化 7】

一般式 (M-3)



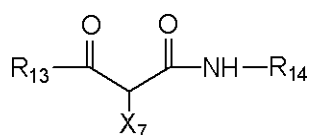
【 0 0 2 1 】

(式中、 X_6 は水素原子または離脱基を表し、 R_{11} はアルキル基、アリール基、アシルアミノ基またはアニリノ基を表し、 R_{12} はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表す。) ;

【 0 0 2 2 】

【化 8】

一般式 (Y-1)



【 0 0 2 3 】

(式中、 X_7 は水素原子または離脱基を表し、 R_{13} はアルキル基、アリール基、又はインドリル基を表し、 R_{14} はアリール基またはヘテロ環基を表す。) ;

【 0 0 2 4 】

10

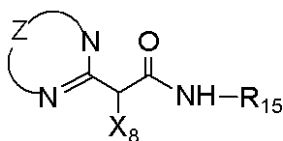
20

30

40

【化 9】

一般式 (Y-2)



【0025】

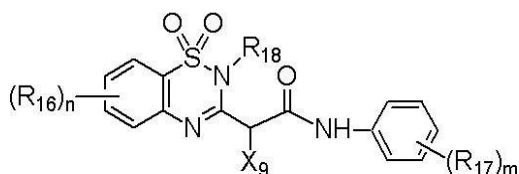
(式中、 X_8 は水素原子または離脱基を表し、 Z は 5 ~ 7 員の環を形成するのに必要な 2 価の基を表し、 R_{15} はアリール基またはヘテロ環基を表す。);

10

【0026】

【化 10】

一般式 (Y-3)



【0027】

(式中、 X_9 は水素原子または離脱基を表し、 R_{16} 、 R_{17} および R_{18} はそれぞれ置換基を表し、 n は 0 ~ 4 の、 m は 0 ~ 5 のいずれかの整数を表す。 n または m が 2 以上のとき、複数の R_{16} および R_{17} はそれぞれ同一の基であってもよいし、異なる基であってもよい。);

20

< 1 1 > 前記複合体を形成する工程が、さらに検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第二の蛋白質 (X) を含み、該第二の蛋白質 (X) を前記分析対象物および前記第一の蛋白質 (Y) に同時にまたは段階的に作用させ、前記 X、前記分析対象物および前記 Y を含む複合体を形成する工程であることを特徴とする < 1 > ~ < 1 0 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法。

< 1 2 > 前記分析対象物が抗原であり、前記分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質が抗体であることを特徴とする < 1 > ~ < 1 1 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法。

30

< 1 3 > 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする < 1 1 > に記載の免疫学的検出方法。

< 1 4 > 前記第二の蛋白質 (X) が不溶性担体に担持されていることを特徴とする < 1 1 > ~ < 1 3 > のいずれかに記載の免疫学的検出方法。

【発明の効果】

【0028】

本発明により、試料中に含まれる分析対象物を、簡易、迅速、高感度で検知することができる免疫学的検出方法が提供される。特に増幅された発色反応を用いて分析対象物を高感度で検出する免疫学的検出方法が提供される。

本発明は、抗原抗体反応を利用し、抗体または抗原上に固定された標識を触媒とした酸化還元反応を有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により生成した有機過酸により増幅して、さらに発色反応を誘導し発色した色を検知することにより、簡便に高感度で検出するものである。また、分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質の 1 つを基質に固定化して、クロマトグラフによりさらに簡便に高感度で検出することもできる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

本発明の免疫学的検出方法は下記の工程を含む。

a) 検体または検体を含む試料に、金属を含む標識により修飾された検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第一の蛋白質 (Y) を作用させ、前記分析対象物および前記 Y を含む複合体を形成する工程

50

【0030】

本工程においては、分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質を標識化した第一の蛋白質（Y）を準備する。分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質としては、抗原抗体反応を利用する場合、抗体が好ましく用いられる。本発明に於いては、標識としては、過酸化物の酸化還元反応の触媒として機能することができる金属標識が用いられる。そのような金属標識としては、銀、金、白金などの金属、あるいはハロゲン化銀などの金属塩から選ばれる金属が用いられる。

検体または検体を緩衝液などに分散した検体を含む測定用試料に、第一の蛋白質（Y）を作用させると、抗原抗体反応などの特異的相互作用により分析対象物と第一の蛋白質（Y）を含む複合体が形成される。

10

【0031】

b) 前記複合体と前記複合体を形成していない前記第一の蛋白質（Y）とを分離する工程

該分離工程は、前記形成された複合体を複合体を形成していない遊離の第一の蛋白質（Y）から分離する工程である。即ち、該分離工程では検体中に存在する分析対象物の量に対応した量の複合体が分離される。

【0032】

c) 有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により生成した有機過酸、及び発色剤を前記分離された複合体に作用させる発色工程

有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により有機過酸が形成される。生成した有機過酸、還元剤および発色素材を複合体に作用させると、金属を含む標識が触媒となって、有機過酸を介した連鎖反応が起こり、還元剤が酸化され、還元剤の酸化体を生成する。続いて還元剤の酸化体と発色素材との発色反応が起こり、発色色素を生成する。生成する色素の量は、複合体量に依存するので、分析対象物の量に相当する。

20

一般に有機過酸は不安定な化合物であり、時間と共に分解するので、有機過酸の生成後、1時間以内に速やかに用いるのが好ましい。

【0033】

d) 前記発色工程により生成した色素を検出する工程

生成した色素量は、公知の種々の手段により検出することができる。例えば、分析対象物の有無は、発色の有無を視覚的に官能評価することにより、瞬時に判定することができる。色素量を定量的に測定することも、濃度計、或いは分光光度計を用いて行うことが可能である。

30

【0034】

該分離工程に用いることのできる複合体の分離手段としては、比重差を利用した遠心分離や超遠心分離法、溶解度差を利用して沈降法、塩析法、濾過法、透析法、限外濾過法、磁気を利用した分離法などの従来公知の分離手段を利用することができるが、本発明で特に有効な分離手段は、分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質を予めメンブレンあるいはクロマトグラフの固定層などの不溶性担体上に固定化しておき、複合体を形成後、複合体を形成していない検体中の成分や検体試料作製に用いた成分等を洗浄して洗い流すか、あるいはクロマトグラフにより分離する方法である。

40

【0035】

また、分離された他方の成分である遊離の第一の蛋白質（Y）の量は、当初含有する第一の蛋白質（Y）の量から複合体を形成した量を差し引いた量に相当するので、この量も検体中に存在する分析対象物の量を反映した量である。従って、複合体量及び遊離の第一の蛋白質（Y）量のいずれも分析対象物の量の検出に利用することができる。高精度かつ簡便に検出するには、複合体を直接検出する手段が好ましい。

【0036】

有機過酸プレカーサーと過酸化物の反応により有機過酸を生成する手段、及び分離された複合体に有機過酸、還元剤および発色素材を作用させる手段としては、有機過酸プレカーサー、過酸化物、還元剤および発色素材のそれぞれを含有するかもしくはこれらの2以上を混合して含有する溶液もしくは分散液の状態で作用させる方法を用いることができる

50

。別の態様として、有機過酸ブレカーサー、過酸化物、還元剤（C D）および発色素材（C p）の少なくとも1つを含有する発色シートを準備し、分離された複合体に該発色シートを重ね合わせて、該複合体と発色剤とを接触させ、発色反応を起こさせる方法である。好ましくは、発色シートが還元剤および発色素材を含有し、有機過酸ブレカーサー及び過酸化物を混合した溶液を該重ね合わせ体へ供給する方法である。

【0037】

本発明に用いられる有機過酸ブレカーサーは、好ましくは、アルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基を有する化合物である。さらに好ましくは、アルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基におけるアルカノイルがアセチルである。

【0038】

本発明においては、好ましくは、標識が銀粒子又はハロゲン化銀粒子である。

本発明においては、発色反応には、好ましくは、還元剤の酸化体とカプラーのカップリング反応が用いられる。特に、有機銀塩を用いた熱現像記録材料中で熱現像により効率的にカップリング反応が可能な一般式（I）で表される還元剤と一般式（C - 1）、（C - 2）、（C - 3）、（M - 1）、（M - 2）、（M - 3）、（Y - 1）、（Y - 2）および（Y - 3）よりなる群より選ばれる少なくとも1種のカプラーが好ましく用いられる。

【0039】

本発明の好ましい態様は、さらに検体中の分析対象物を特異的に認識し得る第二の蛋白質（X）を含み、該第二の蛋白質（X）を前記分析対象物および前記第一の蛋白質（Y）に同時にまたは段階的に作用させ、前記X、前記分析対象物および前記Yを含む複合体を形成する工程を有する。

【0040】

好ましくは、前記分析対象物が抗原であり、前記分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質が抗体である。より好ましくは、前記抗体がモノクローナル抗体である。

さらに本発明の好ましい態様は、前記第二の蛋白質（X）を不溶性担体に担持し、クロマトグラフにより複合体を分離して検出するイムノクロマトグラフである。

【0041】

本発明に利用できる免疫反応段階を構成する抗原抗体反応は任意であり、従来公知のいずれの反応も採用することができる。

【0042】

本発明においては、分離工程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。

さらに、これら不溶性担体への抗原又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。

【0043】

また、本発明において用いられる抗体類（第一の蛋白質（X）、第二の蛋白質（Y）は、分析対象によって適当なものを適宜用いることができる。ここで、抗体類として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 $F(a b')_2$ 、 $F a b$ 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。第一の蛋白質および第二の蛋白質の両方または一方がモノクローナル抗体であること、又は $F(a b')_2$ または $F(a b')$ であることが好ましい。

【0044】

本発明の抗体とタンパク質との結合は、通常緩衝液中で行なわれる。ここに用いる緩衝液としては、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用いることができる。これらの緩衝液の濃度は1 mM ~ 1

10

20

30

40

50

Mの範囲で用いるのが望ましい。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ができる。

【0045】

本発明における免疫学的検出方法は、分析対象物と該分析対象物を特異的に認識し得る蛋白質との相互作用による複合体形成工程、該複合体の分離工程、分離された複合体に有機過酸、還元剤(CD)及び発色素材(Cp)を作用させ発色させる発色工程を有する。複合体形成工程に要する温度及び時間は、用いられる分析対象物と蛋白質の組合せによって異なるが、概ね0～50で、10秒～1時間である。有機過酸プレカーサーと過酸物との混合後により生成した有機過酸は、1時間以内、より好ましくは10分以内に複合体に作用させるのが好ましい。発色工程に要する温度及び時間は、用いられる複合体、還元剤(CD)及び発色素材(Cp)の組合せによって異なるが、概ね5～60で、30秒～30分である。

10

複合体の分離工程は、分離方法によって、それぞれ好ましい工程所要時間が設定される。

発色の判定時間は任意であるが、上記発色工程の後に、発色濃度が高く維持され、発色が安定した時間を選択することが望ましい。発色の判定時間は、概ね発色工程の後、0～24時間が好ましく、より好ましくは0～2時間、特に好ましくは0～30分である。発色工程の後の時間が長すぎると発色した色素の変色や退色が起こるので好ましくない。

【0046】

本発明においては、抗原抗体反応などの免疫学的反応を増幅して検出する手段として、金属を触媒中心とした過酸化物の酸化還元反応を利用したものである。金属を触媒中心とした過酸化物の酸化還元反応は、一般的に知られていて、例えば、引例US4414305にはカラー現像液およびH₂O₂を含み現像補力液で処理する処理方法が開示されている。

20

【0047】

金属としては、金、銀、白金およびこれらの合金、あるいはハロゲン化銀(塩化銀、臭化銀、沃化銀、塩臭化銀、沃臭化銀、塩沃臭化銀等)が用いられる。また、錫や鉄などの過酸化物を分解することが知られている金属も用いることができる。本発明に於いては、特に好ましくは、金または銀である。金属の粒子サイズは特に制限されないが、好ましくは、球相当粒径が1nm～1μmであり、10nm～100nmがより好ましい。

30

これらの金属に過酸化物が接触すると該金属を反応中心として過酸化物から活性酸化成分が生成する。該活性酸化成分が還元剤(CD)に作用し、該CDを酸化し、その酸化体(CDox)を生成し、活性酸化成分より過酸化物を再生する。再生された過酸化物は再び活性酸化成分を生成するので一連のサイクルが繰り返し進行する。酸化体(CDox)は発色色剤(Cp)をカップリング反応して色素を形成する。チェインリアクションによって酸化体(CDox)が増幅して形成されるので、増幅されて色素が生成する。従って、抗体に金属標識を修飾することによって微量の抗体量を大きく増幅する結果、検出精度を飛躍的に高めることができる。

【0048】

(有機過酸プレカーサー)

40

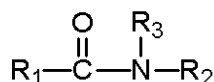
本発明に用いられる有機過酸プレカーサーは、過酸化物と反応して有機過酸を生成する化合物であれば、特に制限されるものではない。好ましい、有機過酸プレカーサーは、アルカノイルアミノ基又はアルカノイルオキシ基を有する化合物である。

アルカノイルアミノ基を有する化合物は、好ましくは下記一般式(1)で表される化合物であり、アルカノイルオキシ基を有する化合物は、好ましくは下記一般式(2)で表される化合物である。

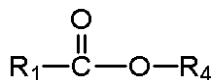
【0049】

【化 1 1】

一般式 (1)



一般式 (2)



10

【0050】

一般式 (1) 又は (2) において、 R_1 はアルキル基又はアリール基である。アルキル基としては、好ましくは炭素数 1 ~ 8 のアルキル基であり、より好ましくはメチル基である。アリール基としては、置換又は無置換のフェニル基であり、置換基としてはアシル基が好ましい。

R_2 、及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子または置換基を表し、また互いに結合して環構造を形成してもよい。置換基としては、置換又は無置換のアルキル基、置換又は無置換のアリール基、又は置換又は無置換のアシル基が好ましい。さらに好ましくは、互いに結合し環構造を形成していることであり、特に好ましくは窒素原子と共にイミダゾール基を形成する基である。

20

【0051】

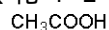
R_4 は、水素原子または置換基を表す。好ましくは、水素原子、置換又は無置換のアルキル基、又は置換又は無置換のアリール基であり、特に好ましくは水素原子である。

【0052】

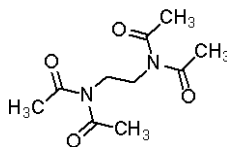
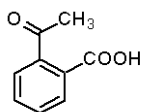
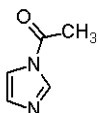
以下に本発明に用いられる有機過酸プレカーサーの具体例を挙げるが、本願はこれらの化合物に限定されるわけではない。

【0053】

【化 1 2】



30



40

【0054】

有機過酸プレカーサーの使用量は、過酸化物 1 モルに対して、0.1 モルから 1000 モルが好ましく、1 モルから 100 モルがさらに好ましい。

【0055】

(過酸化物)

本発明の過酸化物は、過酸化水素の金属塩の化学式をとる無機過酸化物やペルオキシ酸化合物、過カルボン酸を有する有機過酸化物を用いることができ、過酸化水素、過酸化水素を放出する化合物が好ましい。過酸化水素を放出する化合物としては過ホウ酸、過炭酸

50

等が好ましい。この中では過酸化水素が特に好ましい。使用する量は発色する C p に対して、同じモル数から 1 0 0 万倍程度が好ましく。同じモル数から 1 万倍がさらに好ましい。

【 0 0 5 6 】

(還元剤)

本発明に用いられる還元剤は、その酸化体が発色素材とカップリングして色素を形成し得る還元剤である。

【 0 0 5 7 】

本発明に用いられる好ましい還元剤の 1 つの態様は、下記一般式 (I) で表される還元剤である。

【 0 0 5 8 】

【化 1 3】

一般式(I)



10

20

【 0 0 5 9 】

式中、R₁、R₂、R₃及びR₄はそれぞれ独立に水素原子又は置換基を表し、R₅及びR₆はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アシル基、又はスルホニル基を表し、R₁とR₂、R₃とR₄、R₅とR₆、R₂とR₅、及びR₄とR₆の少なくとも一組は互いに結合して5員、6員又は7員の環を形成してもよい。

【 0 0 6 0 】

以下に、本発明の一般式 (I) で表される化合物について詳しく説明する。R₁、R₂、R₃及びR₄はそれぞれ独立に水素原子又は置換基を表す。R₁、R₂、R₃及びR₄で表される置換基としては、ハロゲン原子、アルキル基(シクロアルキル基、ビスシクロアルキル基を含む)、アルケニル基(シクロアルケニル基、ビスシクロアルケニル基を含む)、アルキニル基、アリール基、ヘテロ環基、シアノ基、ヒドロキシ基、ニトロ基、カルボキシ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、シリルオキシ基、ヘテロ環オキシ基、アシルオキシ基、カルバモイルオキシ基、アルコキシカルボニルオキシ基、アリールオキシカルボニルオキシ基、アミノ基(アニリノ基を含む)、アシルアミノ基、アミノカルボニルアミノ基、アルコキシカルボニルアミノ基、アリールオキシカルボニルアミノ基、スルファモイルアミノ基、アルキル及びアリールスルホニルアミノ基、メルカプト基、アルキルチオ基、アリールチオ基、ヘテロ環チオ基、スルファモイル基、スルホ基、アルキル及びアリールスルフィニル基、アルキル及びアリールスルホニル基、アシル基、アリールオキシカルボニル基、アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、アリール及びヘテロ環アゾ基、イミド基、ホスフィノ基、ホスフィニル基、ホスフィニルオキシ基、ホスフィニルアミノ基、及びシリル基が挙げられる。

30

40

【 0 0 6 1 】

更に詳しくは、ハロゲン原子(例えば、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子)、アルキル基〔直鎖、分岐、環状の置換もしくは無置換のアルキル基を表す。アルキル基(好ましくは炭素数 1 から 3 0 のアルキル基、例えばメチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、t - ブチル、n - オクチル、エイコシル、2 - クロロエチル、2 - シアノエチル、又は 2 - エチルヘキシル)、シクロアルキル基(好ましくは、炭素数 3 から 3 0 の置換又は無置換のシクロアルキル基、例えば、シクロヘキシル、シクロペンチル、又は 4 - n - ドデシルシクロヘキシル)、ビスシクロアルキル基(好ましくは、炭素数 5 から 3 0 の置換もしくは無置換のビスシクロアルキル基、つまり、炭素数 5 から 3 0 のビスシクロアルカンから水

50

素原子を一個取り去った一価の基である。例えば、ビシクロ[1, 2, 2]ヘプタン-2-イル、ビシクロ[2, 2, 2]オクタン-3-イル)、更に環構造が多いトリシクロ構造なども包含する。

【0062】

以下に説明する置換基の中のアルキル基(例えばアルキルチオ基のアルキル基)もこのような概念のアルキル基を表す。]、アルケニル基[直鎖、分岐、環状の置換もしくは無置換のアルケニル基を表す。アルケニル基(好ましくは炭素数2から30の置換又は無置換のアルケニル基、例えば、ビニル、アリル、プレニル、ゲラニル、又はオレイル)、シクロアルケニル基(好ましくは、炭素数3から30の置換もしくは無置換のシクロアルケニル基、つまり、炭素数3から30のシクロアルケンの水素原子を一個取り去った一価の基である。例えば、2-シクロペンテン-1-イル、2-シクロヘキセン-1-イル)、ビシクロアルケニル基(置換もしくは無置換のビシクロアルケニル基、好ましくは、炭素数5から30の置換もしくは無置換のビシクロアルケニル基、つまり二重結合を一個持つビシクロアルケンの水素原子を一個取り去った一価の基である。例えば、ビシクロ[2, 2, 1]ヘプト-2-エン-1-イル、ビシクロ[2, 2, 2]オクト-2-エン-4-イル)を含む]、アルキニル基(好ましくは、炭素数2から30の置換又は無置換のアルキニル基、例えば、エチニル、プロパルギル、トリメチルシリルエチニル基)、又はアリーニル基(好ましくは炭素数6から30の置換もしくは無置換のアリーニル基、例えばフェニル、p-トリル、ナフチル、m-クロロフェニル、又はo-ヘキサデカノイルアミノフェニル)、ヘテロ環基(好ましくは5又は6員の置換もしくは無置換の、芳香族もしくは非芳香族のヘテロ環化合物から一個の水素原子を取り除いた一価の基であり、更に好ましくは、炭素数3から30の5もしくは6員の芳香族のヘテロ環基である。例えば、2-フリル、2-チエニル、2-ピリミジニル、又は2-ベンゾチアゾリル)、シアノ基、ヒドロキシル基、ニトロ基、カルボキシル基、又はアルコキシ基(好ましくは、炭素数1から30の置換もしくは無置換のアルコキシ基、例えば、メトキシ、エトキシ、イソプロポキシ、t-ブトキシ、n-オクチルオキシ、又は2-メトキシエトキシ)、

【0063】

アリーロキシ基(好ましくは、炭素数6から30の置換もしくは無置換のアリーロキシ基、例えば、フェノキシ、2-メチルフェノキシ、4-t-ブチルフェノキシ、3-ニトロフェノキシ、又は2-テトラデカノイルアミノフェノキシ)、シリロキシ基(好ましくは、炭素数3から20のシリロキシ基、例えば、トリメチルシリロキシ、t-ブチルジメチルシリロキシ)、ヘテロ環オキシ基(好ましくは、炭素数2から30の置換もしくは無置換のヘテロ環オキシ基、1-フェニルテトラゾール-5-オキシ、又は2-テトラヒドロピラニルオキシ)、アシルオキシ基(好ましくはホルミルオキシ基、炭素数2から30の置換もしくは無置換のアルキルカルボニルオキシ基、炭素数6から30の置換もしくは無置換のアリールカルボニルオキシ基、例えば、ホルミルオキシ、アセチルオキシ、ピバロイルオキシ、ステアロイルオキシ、ベンゾイルオキシ、又はp-メトキシフェニルカルボニルオキシ)、カルバモイルオキシ基(好ましくは、炭素数1から30の置換もしくは無置換のカルバモイルオキシ基、例えば、N,N-ジメチルカルバモイルオキシ、N,N-ジエチルカルバモイルオキシ、モルホリノカルボニルオキシ、N,N-ジ-n-オクチルアミノカルボニルオキシ、又はN-n-オクチルカルバモイルオキシ)、アルコキシカルボニルオキシ基(好ましくは、炭素数2から30の置換もしくは無置換アルコキシカルボニルオキシ基、例えばメトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、t-ブトキシカルボニルオキシ、又はn-オクチルカルボニルオキシ)、アリーロキシカルボニルオキシ基(好ましくは、炭素数7から30の置換もしくは無置換のアリーロキシカルボニルオキシ基、例えば、フェノキシカルボニルオキシ、p-メトキシフェノキシカルボニルオキシ、又はp-n-ヘキサデシルオキシフェノキシカルボニルオキシ)、

【0064】

アミノ基(好ましくは、アミノ基、炭素数1から30の置換もしくは無置換のアルキルア

10

20

30

40

50

ミノ基、炭素数 6 から 30 の置換もしくは無置換のアニリノ基、例えば、アミノ、メチルアミノ、ジメチルアミノ、アニリノ、N - メチル - アニリノ、又はジフェニルアミノ)、アシルアミノ基(好ましくは、ホルミルアミノ基、炭素数 1 から 30 の置換もしくは無置換のアルキルカルボニルアミノ基、炭素数 6 から 30 の置換もしくは無置換のアリールカルボニルアミノ基、例えば、ホルミルアミノ、アセチルアミノ、ピバロイルアミノ、ラウロイルアミノ、ベンゾイルアミノ、又は 3, 4, 5 - トリ - n - オクチルオキシフェニルカルボニルアミノ)、アミノカルボニルアミノ基(好ましくは、炭素数 1 から 30 の置換もしくは無置換のアミノカルボニルアミノ、例えば、カルバモイルアミノ、N, N - ジメチルアミノカルボニルアミノ、N, N - ジエチルアミノカルボニルアミノ、又はモルホリノカルボニルアミノ)、アルコキシカルボニルアミノ基(好ましくは炭素数 2 から 30 の置換もしくは無置換アルコキシカルボニルアミノ基、例えば、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、t - ブトキシカルボニルアミノ、n - オクタデシルオキシカルボニルアミノ、又は N - メチル - メトキシカルボニルアミノ)、アリールオキシカルボニルアミノ基(好ましくは、炭素数 7 から 30 の置換もしくは無置換のアリールオキシカルボニルアミノ基、例えば、フェノキシカルボニルアミノ、p - クロロフェノキシカルボニルアミノ、又は m - n - オクチルオキシフェノキシカルボニルアミノ)、

10

【0065】

スルファモイルアミノ基(好ましくは、炭素数 0 から 30 の置換もしくは無置換のスルファモイルアミノ基、例えば、スルファモイルアミノ、N, N - ジメチルアミノスルホニルアミノ、又は N - n - オクチルアミノスルホニルアミノ)、アルキル及びアリールスルホニルアミノ基(好ましくは炭素数 1 から 30 の置換もしくは無置換のアルキルスルホニルアミノ、炭素数 6 から 30 の置換もしくは無置換のアリールスルホニルアミノ、例えば、メチルスルホニルアミノ、ブチルスルホニルアミノ、フェニルスルホニルアミノ、2, 3, 5 - トリクロロフェニルスルホニルアミノ、又は p - メチルフェニルスルホニルアミノ)、メルカプト基、アルキルチオ基(好ましくは、炭素数 1 から 30 の置換もしくは無置換のアルキルチオ基、例えばメチルチオ、エチルチオ、又は n - ヘキサデシルチオ)、アリールチオ基(好ましくは炭素数 6 から 30 の置換もしくは無置換のアリールチオ基、例えば、フェニルチオ、p - クロロフェニルチオ、又は m - メトキシフェニルチオ)、ヘテロ環チオ基(好ましくは炭素数 2 から 30 の置換又は無置換のヘテロ環チオ基、例えば、2 - ベンゾチアゾリルチオ、1 - フェニルテトラゾール - 5 - イルチオ)、スルファモイル基(好ましくは炭素数 0 から 30 の置換もしくは無置換のスルファモイル基、例えば、N - エチルスルファモイル、N - (3 - ドデシルオキシプロピル)スルファモイル、N, N - ジメチルスルファモイル、N - アセチルスルファモイル、N - ベンゾイルスルファモイル、N - (N' - フェニルカルバモイル)スルファモイル)、スルホ基、アルキル及びアリールスルフィニル基(好ましくは、炭素数 1 から 30 の置換又は無置換のアルキルスルフィニル基、6 から 30 の置換又は無置換のアリールスルフィニル基、例えば、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、フェニルスルフィニル、又は p - メチルフェニルスルフィニル)、

20

30

【0066】

アルキル及びアリールスルホニル基(好ましくは、炭素数 1 から 30 の置換又は無置換のアルキルスルホニル基、6 から 30 の置換又は無置換のアリールスルホニル基、例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、フェニルスルホニル、又は p - メチルフェニルスルホニル)、アシル基(好ましくはホルミル基、炭素数 2 から 30 の置換又は無置換のアルキルカルボニル基、炭素数 7 から 30 の置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、例えば、アセチル、ピバロイル、2 - クロロアセチル、ステアロイル、ベンゾイル、又は p - n - オクチルオキシフェニルカルボニル)、アリールオキシカルボニル基(好ましくは、炭素数 7 から 30 の置換もしくは無置換のアリールオキシカルボニル基、例えば、フェノキシカルボニル、o - クロロフェノキシカルボニル、m - ニトロフェノキシカルボニル、又は p - t - ブチルフェノキシカルボニル)、

40

【0067】

50

アルコキシカルボニル基（好ましくは、炭素数 2 から 30 の置換もしくは無置換アルコキシカルボニル基、例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、*t*-ブトキシカルボニル、又は *n*-オクタデシルオキシカルボニル）、カルバモイル基（好ましくは、炭素数 1 から 30 の置換もしくは無置換のカルバモイル、例えば、カルバモイル、*N*-メチルカルバモイル、*N*, *N*-ジメチルカルバモイル、*N*, *N*-ジ-*n*-オクチルカルバモイル、*N*-(メチルスルホニル)カルバモイル)、アリール及びヘテロ環アゾ基（好ましくは炭素数 6 から 30 の置換もしくは無置換のアリールアゾ基、炭素数 3 から 30 の置換もしくは無置換のヘテロ環アゾ基、例えば、フェニルアゾ、*p*-クロロフェニルアゾ、又は 5-エチルチオ-1, 3, 4-チアジアゾール-2-イルアゾ)、イミド基（例えば、*N*-スクシンイミド、*N*-フタルイミド)、ホスフィノ基（好ましくは、炭素数 2 から 30 の置換もしくは無置換のホスフィノ基、例えば、ジメチルホスフィノ、ジフェニルホスフィノ、又はメチルフェノキシホスフィノ)、ホスフィニル基（好ましくは、炭素数 2 から 30 の置換もしくは無置換のホスフィニル基、例えば、ホスフィニル、ジオクチルオキシホスフィニル、又はジエトキシホスフィニル)、ホスフィニルオキシ基（好ましくは、炭素数 2 から 30 の置換もしくは無置換のホスフィニルオキシ基、例えば、ジフェノキシホスフィニルオキシ、又はジオクチルオキシホスフィニルオキシ)、ホスフィニルアミノ基（好ましくは、炭素数 2 から 30 の置換もしくは無置換のホスフィニルアミノ基、例えば、ジメトキシホスフィニルアミノ、ジメチルアミノホスフィニルアミノ)、シリル基（好ましくは、炭素数 3 から 30 の置換もしくは無置換のシリル基、例えば、トリメチルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、又はフェニルジメチルシリル)が挙げられる。

10

20

【0068】

$R_1 \sim R_4$ で表される基が更に置換可能な基である場合、 $R_1 \sim R_4$ で表される基は更に置換基を有してもよく、その場合の好ましい置換基は $R_1 \sim R_4$ で説明した置換基と同じ意味の基を表す。2 個以上の置換基で置換されている場合には、それらの置換基は同一であっても異なってもよい。

【0069】

R_5 及び R_6 はそれぞれ独立に、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アシル基、アルキルスルホニル基、又はアリールスルホニル基を表し、そのアルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アシル基、アルキルスルホニル基、及びアリールスルホニル基の好ましい範囲については、前記の $R_1 \sim R_4$ で表される置換基で説明したアルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アシル基、アルキルスルホニル基、及びアリールスルホニル基と同じ意味の基を表す。 R_5 及び R_6 で表される基が更に置換可能な基である場合、 R_5 及び R_6 で表される基は更に置換基を有してもよく、その場合の好ましい置換基は $R_1 \sim R_4$ で説明した置換基と同じ意味の基を表す。2 個以上の置換基で置換されている場合には、それらの置換基は同一であっても異なってもよい。

30

【0070】

R_1 と R_2 、 R_3 と R_4 、 R_5 と R_6 、 R_2 と R_5 、又は R_1 及び R_4 と R_6 とが互いに結合して 5 員、6 員又は 7 員の環を形成してもよい。

【0071】

以下に、一般式 (I) で表される化合物の好ましい範囲について説明する。 $R_1 \sim R_4$ は水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、アシルアミノ基、アルキル及びアリールスルホニルアミノ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、カルバモイル基、シアノ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホ基、ニトロ基、スルファモイル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、及びアシルオキシ基が好ましく、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アシルアミノ基、アルキル及びアリールスルホニルアミノ基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、シアノ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホ基、ニトロ基、スルファモイル基、アルキルスルホニル基、及びアリールスルホニル基が更に好ましい。特に好ましくは、 $R_1 \sim R_4$ の中で、 R_1 又は R_3 のいずれか一方が水素原子である。

40

50

【 0 0 7 2 】

R₅ 及び R₆ はアルキル基、アリール基、及びヘテロ環基が好ましく、アルキル基が最も好ましい。

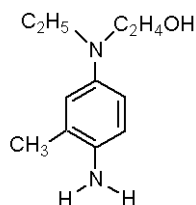
【 0 0 7 3 】

以下に本発明における一般式 (I) で表される化合物の具体例を示すが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

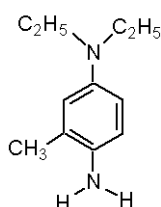
【 0 0 7 4 】

【 化 1 4 】

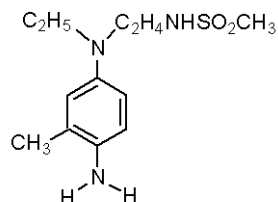
I-1



I-2

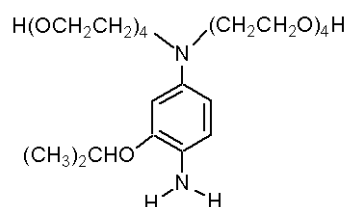


I-3

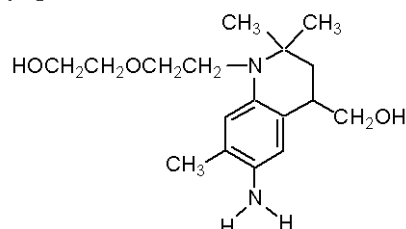


10

I-4

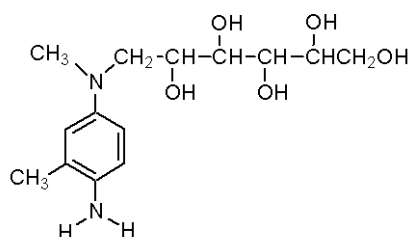


I-5

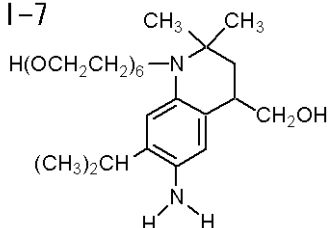


20

I-6

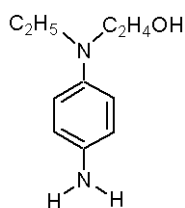


I-7

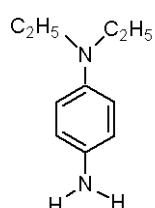


30

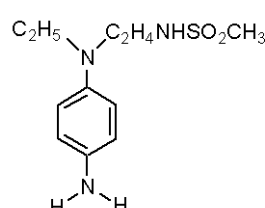
I-8



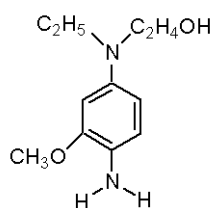
I-9



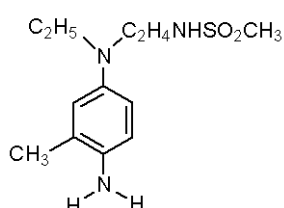
I-10



I-11



I-12



40

【 0 0 7 5 】

一般式 (I) で表される化合物の pH 10 の水中における酸化電位が 5 mV 以下 (v s S C E) であることが発色性と保存性を両立できる点で好ましい。

【 0 0 7 6 】

(還元剤の添加方法)

50

本発明においては、還元剤は、水溶液あるいは有機溶剤に溶解した溶液、乳化分散物、あるいは固体状分散物で用いることができる。

【 0 0 7 7 】

微粒子分散物で用いられる場合の数平均粒子サイズは、 $0.001\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $0.001\ \mu\text{m} \sim 0.5\ \mu\text{m}$ であることが更に好ましい。

【 0 0 7 8 】

本発明における還元剤の使用量の好ましい範囲は、使用する発色素材 1 モルに対して同じモルから 1 0 0 0 倍モルが好ましく、より好ましくは同じモルから 1 0 0 倍モルが好ましい。

【 0 0 7 9 】

(発色素材)

本発明に用いることの出来る発色素材は、好ましくは、カラー写真用途においてカプラーとして知られている化合物である。

カプラーは、本発明の還元剤の酸化体とカップリングして可視部に吸収を持つ色素を形成できる化合物であればいかなる構造をしていてもよい。このような化合物はカラー写真系ではよく知られた化合物であり、その代表例としてピロロトリアゾール型カプラー、フェノール型カプラー、ナフトール型カプラー、ピラゾロトリアゾール型カプラー、ピラズロン型カプラー、アシルアセトアニリド型カプラーなどが挙げられる。

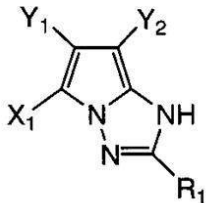
【 0 0 8 0 】

本発明において好ましいカプラーは一般式 (C - 1)、(C - 2)、(C - 3)、(M - 1)、(M - 2)、(M - 3)、(Y - 1)、(Y - 2)、または (Y - 3) で表される構造を有するカプラーである。

【 0 0 8 1 】

【 化 1 5 】

一般式 (C - 1)



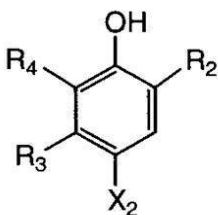
【 0 0 8 2 】

式中、 X_1 は水素原子または離脱基を表し、 Y_1 および Y_2 は電子求引性の置換基を表し、 R_1 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表す。

【 0 0 8 3 】

【 化 1 6 】

一般式 (C - 2)



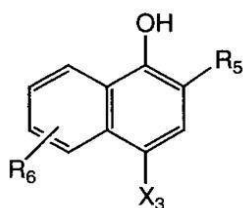
【 0 0 8 4 】

式中、 X_2 は水素原子または離脱基を表し、 R_2 はアシルアミノ基、ウレイド基またはウレタン基を表し、 R_3 は水素原子、アルキル基またはアシルアミノ基を表し、 R_4 は水素原子、または置換基を表す。 R_3 と R_4 が互いに連結して環を形成してもよい。

【 0 0 8 5 】

【化 17】

一般式 (C-3)



【0086】

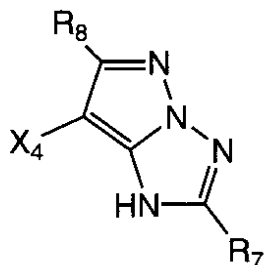
10

式中、 X_3 は水素原子または離脱基を表し、 R_5 はカルバモイル基またはスルファモイル基を表し、 R_6 は水素原子または置換基を表す。

【0087】

【化 18】

一般式 (M-1)



20

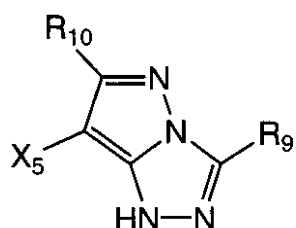
【0088】

式中、 X_4 は水素原子または離脱基を表し、 R_7 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、 R_8 は置換基を表す。

【0089】

【化 19】

一般式 (M-2)



30

【0090】

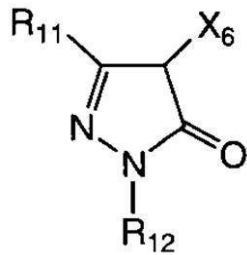
式中、 X_5 は水素原子または離脱基を表し、 R_9 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、 R_{10} は置換基を表す。

40

【0091】

【化 2 0】

一般式 (M-3)



10

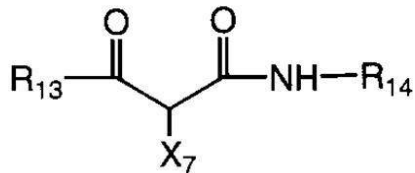
【0092】

式中、 X_6 は水素原子または離脱基を表し、 R_{11} はアルキル基、アリール基、アシルアミノ基またはアニリノ基を表し、 R_{10} はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表す。

【0093】

【化 2 1】

一般式 (Y-1)



20

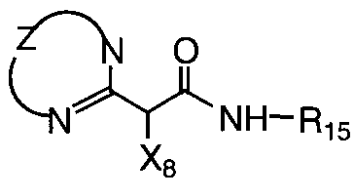
【0094】

式中、 X_7 は水素原子または離脱基を表し、 R_{13} はアルキル基、アリール基、インドレニル基を表し、 R_{14} はアリール基またはヘテロ環基を表す。

【0095】

【化 2 2】

一般式 (Y-2)



30

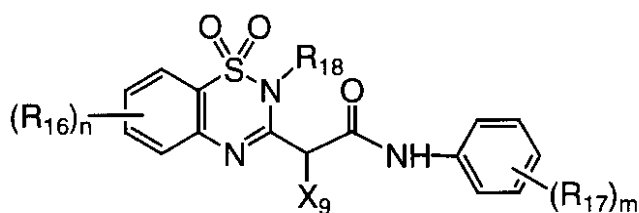
【0096】

式中、 X_8 は水素原子または離脱基を表し、 Z は5員ないし7員の環を形成するのに必要な2価の基を表し、 R_{15} はアリール基またはヘテロ環基を表す。

【0097】

【化 2 3】

一般式 (Y-3)



50

【0098】

式中、 X_9 は水素原子または離脱基を表し、 R_{16} 、 R_{17} および R_{18} はそれぞれ置換基を表し、 n は0ないし4の、 m は0ないし5のいずれかの整数を表す。 n または m が2以上のとき、複数の R_{16} および R_{17} はそれぞれ同一の基であってもよい、別々の基であってもよい。

【0099】

一般式 (C - 1) において、 X_1 は水素原子または離脱基を表し、 Y_1 および Y_2 は電子求引性の置換基を表し、 R_1 はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基を表し、これらの基は置換基を有していてもよい。

X_1 は水素原子または離脱基で、好ましくは離脱基である。

本発明で言う離脱基とは、還元剤の酸化体とカップリングし、色素を形成する際に母核から離脱可能な基を意味する。離脱基としてはハロゲン原子、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アシルオキシ基、カルバモイルオキシ基、イミド基、メチロール基、ヘテロ環基等が挙げられる。 X_1 としてはカルバモイルオキシ基またはベンゾイルオキシ基がより好ましい。 Y_1 および Y_2 は電子求引性基を表す。具体的には、シアノ基、ニトロ基、アシル基、オキシカルボニル基、カルバモイル基、スルホニル基、スルホキシド基、オキシスルホニル基、スルファモイル基、ヘテロ環基、トリフルオロメチル基、ハロゲン原子が挙げられる。その中でも好ましくはシアノ基、オキシカルボニル基、スルホニル基で、より好ましくはシアノ基、オキシカルボニル基である。 Y_1 と Y_2 のいずれか一方がシアノ基であることがさらに好ましく、 Y_1 がシアノ基であることが特に好ましい。 Y_2 はオキシカルボニル基であることが好ましく、かさ高い基で置換されたオキシカルボニル基（例えば2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルピペラジニルオキシカルボニル基）が特に好ましい。 R_1 は好ましくはアルキル基またはアリール基であり、これらの基は置換基を有していてもよい。アルキル基としては2級または3級のアルキル基が好ましく、より好ましくは3級のアルキル基である。アルキル基としては炭素数の和が3~12の範囲であることが好ましく4~8の範囲であることがより好ましい。アリール基としてはフェニル基が好ましく、置換基を有していてもよいが、炭素数の和が6~16の範囲であることが好ましく、6~12の範囲であることがより好ましい。一般式 (C - 1) のカブラーは分子量が700以下であることが好ましく、650以下であることがより好ましく、600以下であることがさらに好ましい。

【0100】

一般式 (C - 2) において、 X_2 は水素原子または離脱基を表し、 R_2 はアシルアミノ基、ウレイド基またはウレタン基を表し、 R_3 は水素原子、アルキル基またはアシルアミノ基を表し、 R_4 は水素原子、または置換基を表す。 R_3 と R_4 が互いに連結して環を形成してもよい。

X_2 は水素原子もしくは X_1 と同様の離脱基であるが、 X_2 として好ましいのはハロゲン原子、アリールオキシ基、アルコキシ基、アリールチオ基またはアルキルチオ基で、ハロゲン原子またはアリールオキシ基がより好ましい。 R_2 は好ましくはアシルアミノ基またはウレイド基である。 R_2 としては炭素数の総和が2~12の範囲が好ましく、より好ましくは2~8の範囲である。 R_3 は好ましくは炭素数1~4のアルキル基または炭素数2~12のアシルアミノ基であり、より好ましくは炭素数2~4のアルキル基または炭素数2~8のアシルアミノ基である。 R_4 は好ましくはハロゲン原子、アルコキシ基、アシルアミノ基、アルキル基であり、より好ましくはハロゲン原子またはアシルアミノ基で、特に塩素原子が好ましい。一般式 (C - 2) のカブラーは分子量が500以下であることが好ましく、450以下であることがより好ましく、400以下であることがさらに好ましい。

【0101】

一般式 (C - 3) において、 X_3 は水素原子もしくは X_1 と同様の離脱基であるが、 X_3 として好ましいのはハロゲン原子、アリールオキシ基、アルコキシ基、アリールチオ基またはアルキルチオ基で、アルコキシ基またはアルキルチオ基がより好ましい。 R_5 はア

シル基、オキシカルボニル基、カルバモイル基またはスルファモイル基が好ましく、カルバモイル基またはスルファモイル基がより好ましい。R₅として炭素数の和が1～12の基が好ましく、より好ましくは炭素数が2～10である。R₆は水素原子もしくは置換基であるが、置換基としては好ましくはアミド基、スルホンアミド基、ウレタン基またはウレイド基であり、アミド基またはウレタン基がより好ましい。置換位置としてはナフトール環の5位または8位が好ましく、5位がより好ましい。R₆として炭素数の和が2～10の基が好ましく、より好ましくは炭素数が2～6である。一般式(C-2)のカブラーは分子量が550以下であることが好ましく、500以下であることがより好ましく、450以下であることがさらに好ましい。

【0102】

一般式(M-1)においてX₄は水素原子もしくはX₁と同様の離脱基あるが、X₄として好ましいのはハロゲン原子、アリーロキシ基、アルコキシ基、アリールチオ基、アルキルチオ基またはヘテロ環基で、ハロゲン原子、アリーロキシ基、アリールチオ基またはヘテロ環基がより好ましい。ヘテロ環基としてはピラゾール基、イミダゾール基、トリアゾール基、テトラゾール基、ベンゾイミダゾール基、ベンゾトリアゾール基等のアゾール基が好ましく、ピラゾール基がより好ましい。R₇はアルキル基、アリール基またはヘテロ環基で、これらの基は置換基を有していてもよい。好ましくは2級もしくは3級のアルキル基またはアリール基である。アルキル基としては炭素数が2～14の基が好ましく、より好ましくは炭素数3～10の基である。アリール基としては好ましくは炭素数が6～18の基で、より好ましくは6～14の基である。R₈は好ましくはアルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基またはヘテロ環であり、これらの基は置換基を有していてもよい。アルキル基としては2級または3級のアルキル基が好ましく、より好ましくは3級のアルキル基である。アルキル基としては炭素数の和が3～12の範囲であることが好ましく4～8の範囲であることがより好ましい。アリール基としてはフェニル基が好ましく、置換基を有していてもよいが、炭素数の和が6～16の範囲であることが好ましく、6～12の範囲であることがより好ましい。アルコキシ基としては炭素数1～8のアルコキシ基が好ましく、より好ましくは炭素数1～4のアルコキシ基である。アリーロキシ基としては炭素数6～14のアリーロキシ基が好ましく炭素数6～10の基がより好ましい。アルキルチオ基、アリールチオ基もそれぞれアルコキシ基、アリーロキシ基と同様の炭素数の基が好ましい。一般式(M-1)のカブラーは分子量が600以下であることが好ましく、550以下であることがより好ましく、500以下であることがさらに好ましい。

【0103】

一般式(M-2)のカブラーのX₅、R₉およびR₁₀で表される基はそれぞれ一般式(M-1)のカブラーのX₄、R₇およびR₈で表される基と同様の基で、それぞれの基の好ましい範囲も一般式(M-1)のカブラーと同様である。

【0104】

一般式(M-3)において、X₆は水素原子もしくはX₁と同様の離脱基あるが、X₆として好ましいのはアルキルチオ基、アリールチオ基またはヘテロ環基で、より好ましくはアリールチオ基またはヘテロ環基である。アリールチオ基としてはフェニル基が好ましく、特に2位にアルコキシ基、アミド基が置換したアリールチオ基が好ましい。アリールチオ基の炭素数の和は6～16の範囲が好ましく、7～12の範囲がより好ましい。ヘテロ環基としてはピラゾール基、イミダゾール基、トリアゾール基、テトラゾール基、ベンゾイミダゾール基、ベンゾトリアゾール基等のアゾール基が好ましく、ピラゾール基がより好ましい。R₁₁としてはアルキル基、アリール基、アシルアミノ基またはアニリノ基が好ましく、アシルアミノ基またはアニリノ基がより好ましい。最も好ましいのはアニリノ基である。アルキル基としては炭素数1～8のアルキル基が好ましく、アリール基としては炭素数6～14のアリール基が好ましい。アシルアミノ基としては炭素数2～14の基が好ましく2～10の基がより好ましい。アニリノ基としては炭素数6～16の基が好ましく6～12の基がより好ましい。アニリノ基の置換基としてはハロゲン原子、アシル

10

20

30

40

50

アミノ基が好ましい。一般式 (M - 3) のカブラーは分子量が 700 以下であることが好ましく、650 以下であることがより好ましく、600 以下であることがさらに好ましい。

【0105】

一般式 (Y - 1) において、 X_7 は水素原子もしくは X_1 と同様の離脱基あるが、 X_7 として好ましいのはアリールオキシ基、イミド基またはヘテロ環基である。アリールオキシ基としては電子求引性基で置換されたアリールオキシ基が好ましい。イミド基としては環状のイミド基が好ましく、ヒダントイン基、1, 3 - オキサゾリジン - 2, 5 - ジオン基およびコハクイミド基が特に好ましい。イミド基の炭素数の総和は 3 ~ 15 の範囲が好ましく、より好ましくは 4 ~ 11 の範囲で、さらに好ましくは 5 ~ 9 の範囲である。ヘテロ環基としてはピラゾール基、イミダゾール基、トリアゾール基、ベンゾイミダゾール基、ベンゾトリアゾール基が好ましく、イミダゾール基がより好ましい。アゾール基の炭素数の総和は 3 ~ 12 の範囲が好ましく、より好ましくは 3 ~ 10 の範囲で、さらに好ましくは 3 ~ 8 の範囲である。 R_{13} は好ましくは 2 級もしくは 3 級のアルキル基、アリール基またはヘテロ環基である。アルキル基はシクロアルキル基、ビスシクロアルキル基であってもよく 3 級アルキル基がより好ましい。1 - アルキルシクロプロピル基、ビスシクロアルキル基、アダマンチル基は特に好ましい。 R_{14} はアリール基もしくはヘテロ環基で、アリール基がより好ましい。そのなかでも 2 位にハロゲン原子、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基またはアリールチオ基が置換したフェニル基が特に好ましい。 R_{14} の炭素数の総和は 6 ~ 18 の範囲が好ましく、より好ましくは 7 ~ 16 の範囲、さらに好ましくは 8 ~ 14 の範囲である。一般式 (Y - 1) のカブラーは分子量が 700 以下であることが好ましく、650 以下であることがより好ましく、600 以下であることがさらに好ましい。

10

20

【0106】

一般式 (Y - 2) のカブラーの X_8 および R_{15} で表される基はそれぞれ一般式 (Y - 1) のカブラーの X_7 、 R_{14} で表される基と同様の基で、それぞれの基の好ましい範囲も一般式 (Y - 1) のカブラーと同様である。Z は 5 ないし 7 員の環を形成するために必要な 2 価の基を表し、この環には置換基があってもよいし、別の環が縮環していてもよい。

30

【0107】

一般式 (Y - 2) のなかでも好ましいのは一般式 (Y - 3) で表されるカブラーである。

一般式 (Y - 3) のカブラーにおいて、 X_9 は一般式 (Y - 1) の X_7 と同義で、好ましい範囲も同じである。 R_{16} は好ましくはハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アシル基、アシルオキシ基、アシルアミノ基、アルコキシカルボニル基、スルホンアミド基、シアノ基、スルホニル基、スルファモイル基、カルバモイル基またはアルキルチオ基で炭素数 1 ~ 4 の置換基であることがより好ましい。n は好ましくは 0 ~ 3 の整数で、より好ましくは 0 ~ 2、さらに好ましくは 0 ~ 1、最も好ましくは 0 である。 R_{17} は好ましくは R_{16} と同様の基で、より好ましくはハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、アシルアミノ基、スルホンアミド基、アルコキシカルボニル基、スルファモイル基、スルホニル基である。特に NH 基に対してオルト位にハロゲン原子、アルコキシ基またはアルキルチオ基である R_{17} が置換されていることがより好ましい。最も好ましいのはアルキルチオ基である。一般式 (Y - 3) のカブラーは分子量が 750 以下であることが好ましく、700 以下であることがより好ましく、650 以下であることがさらに好ましい。

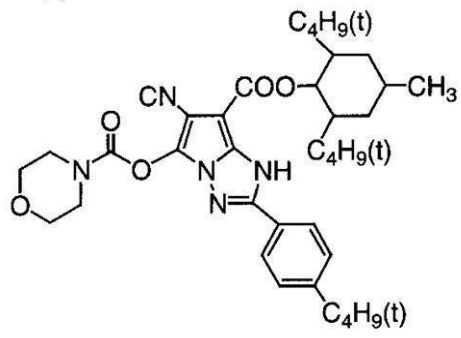
40

以下に本発明のカブラーの具体例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0108】

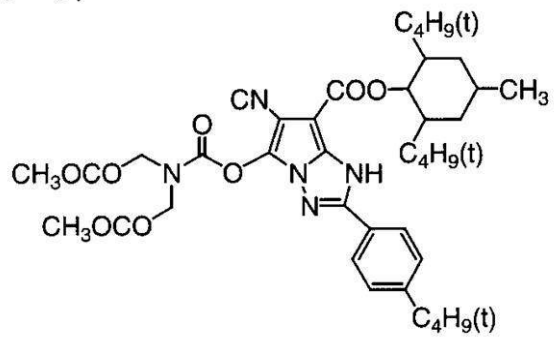
【化 2 4】

(C-1-1)



10

(C-1-2)

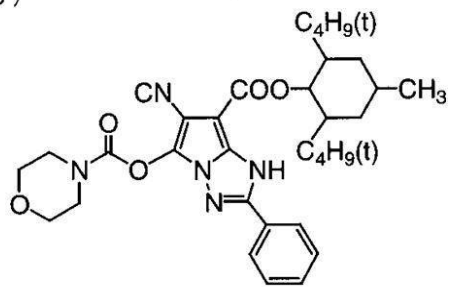


20

【 0 1 0 9 】

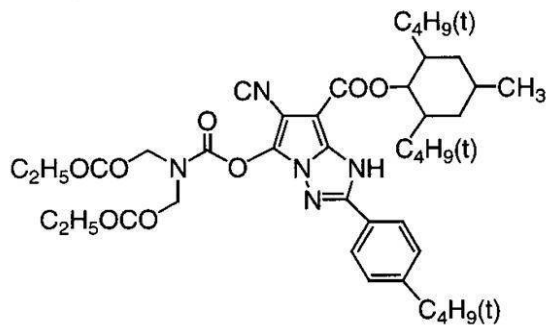
【化 2 5】

(C-I-3)



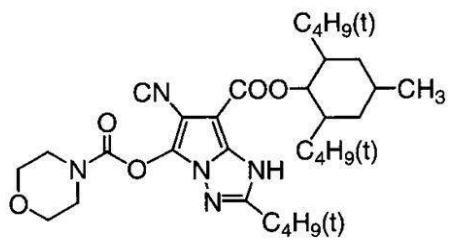
10

(C-I-4)



20

(C-I-5)

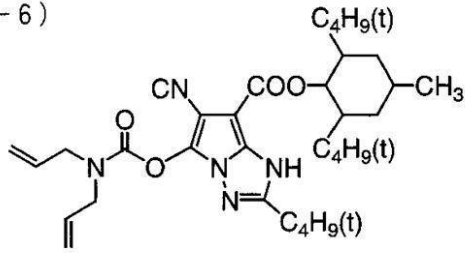


【 0 1 1 0 】

30

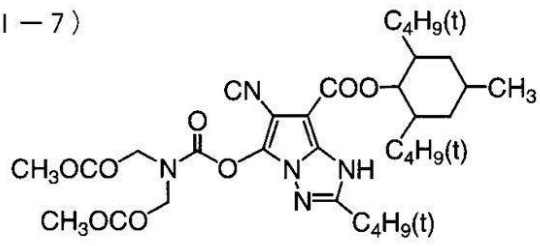
【化 2 6】

(C-I-6)

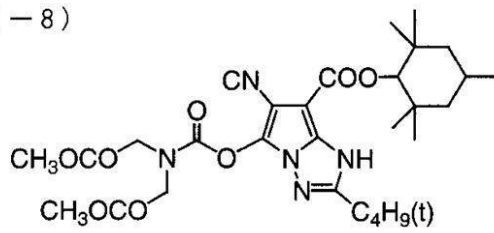


10

(C-I-7)



(C-I-8)

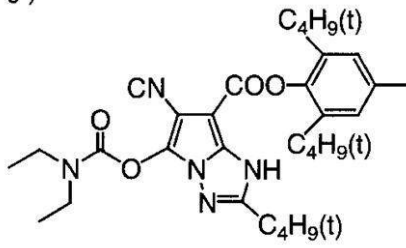


20

【 0 1 1 1 】

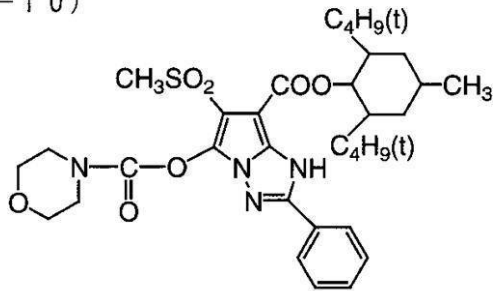
【化 2 7】

(C-1-9)



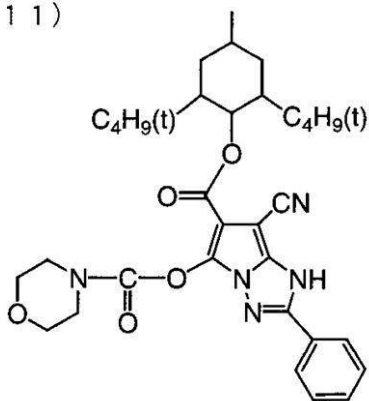
10

(C-1-10)



20

(C-1-11)

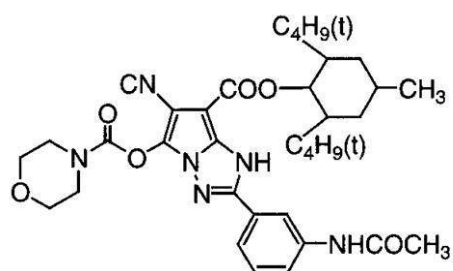


30

【 0 1 1 2 】

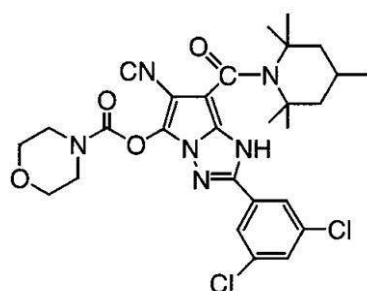
【化 2 8】

(C-I-12)



10

(C-I-13)

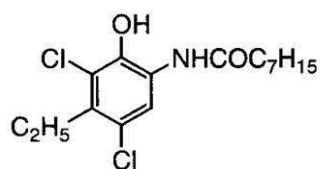


20

【 0 1 1 3】

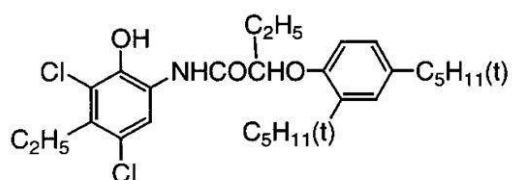
【化 2 9】

(C-II-1)



30

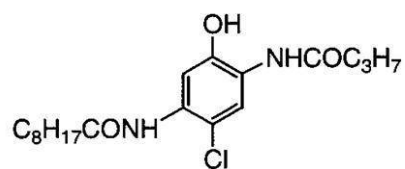
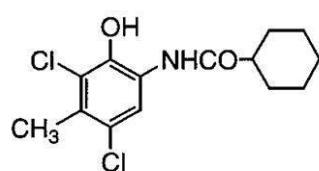
(C-II-2)



40

(C-II-3)

(C-II-4)

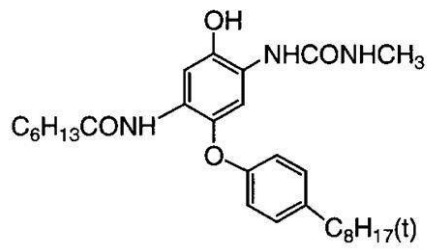


50

【 0 1 1 4 】

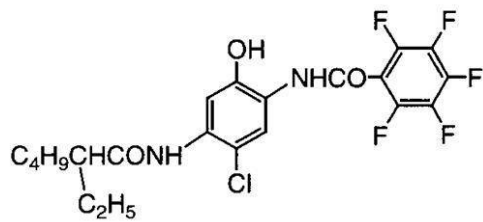
【 化 3 0 】

(C-II-5)



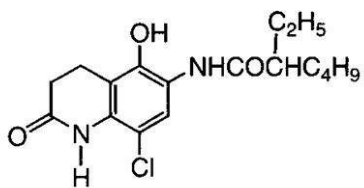
10

(C-II-6)



20

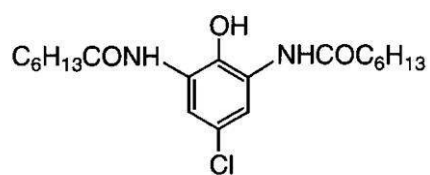
(C-II-7)



【 0 1 1 5 】

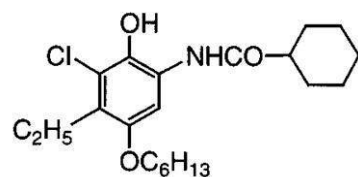
【化 3 1】

(C-II-8)



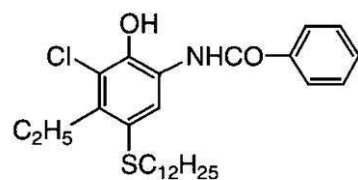
(C-II-9)

10



(C-II-10)

20

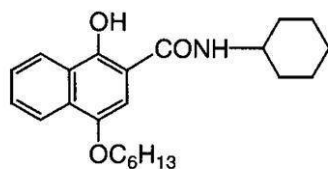
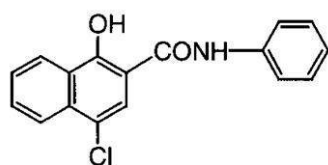


【 0 1 1 6 】

【化 3 2】

(C-III-1)

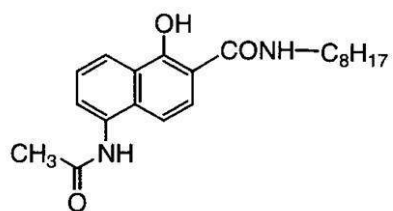
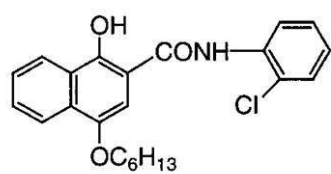
(C-III-2)



30

(C-III-3)

(C-III-4)

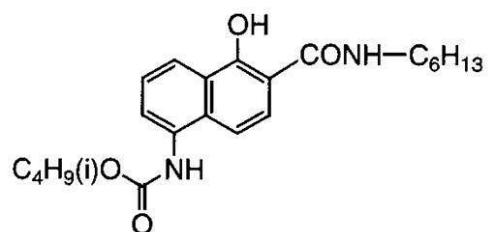


40

【 0 1 1 7 】

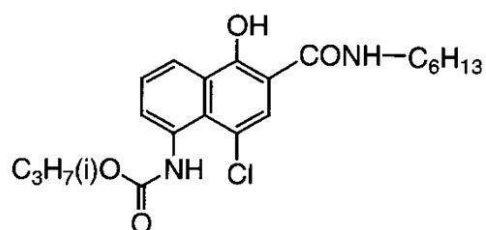
【化 3 3】

(C-III-5)

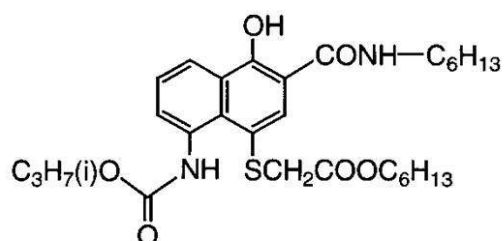


10

(C-III-6)



(C-III-7)



20

【 0 1 1 8 】

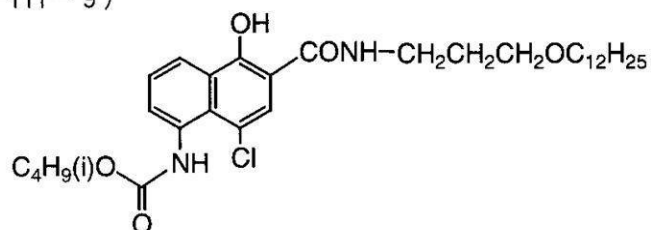
【化 3 4】

30

(C-III-8)



(C-III-9)

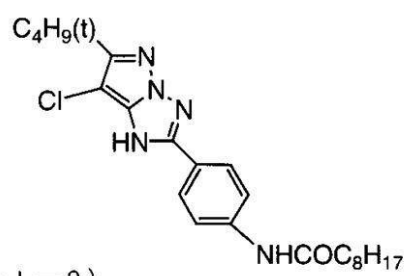


40

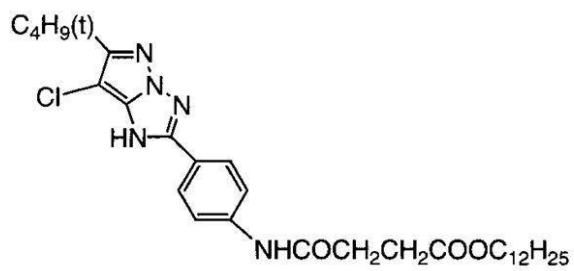
【 0 1 1 9 】

【化 3 5】

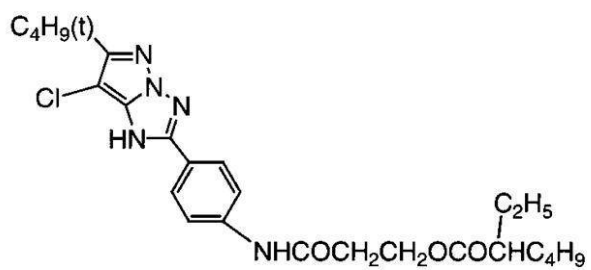
(M-1-1)



(M-1-2)



(M-1-3)



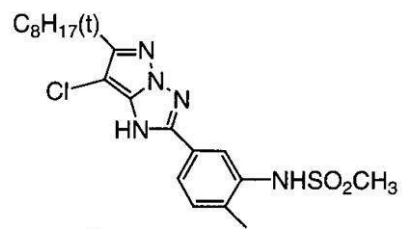
【 0 1 2 0 】

10

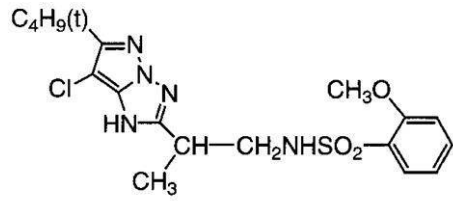
20

【化 3 6】

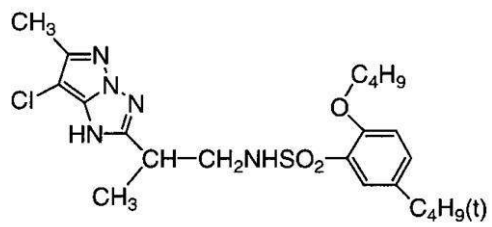
(M-I-4)



(M-I-5)



(M-I-6)



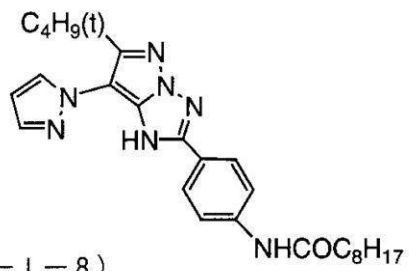
【 0 1 2 1 】

10

20

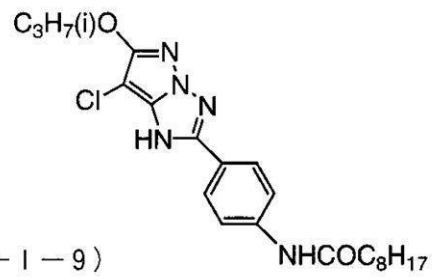
【化 3 7】

(M-1-7)



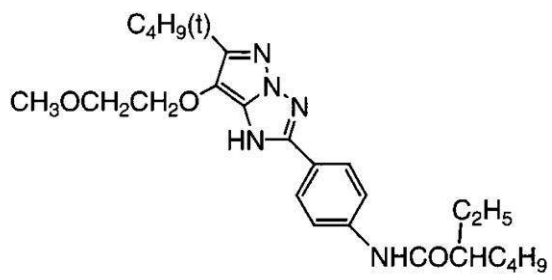
(M-1-8)

10



(M-1-9)

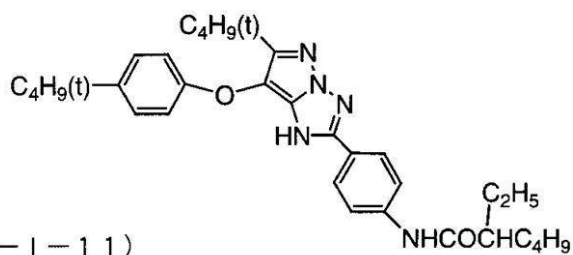
20



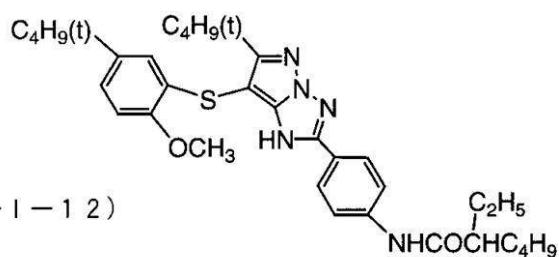
【 0 1 2 2 】

【化 3 8】

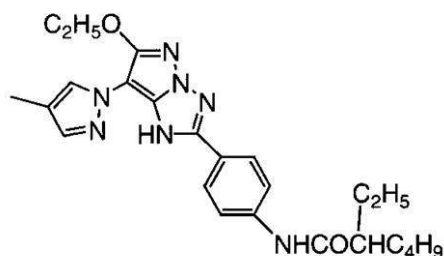
(M-I-10)



(M-I-11)



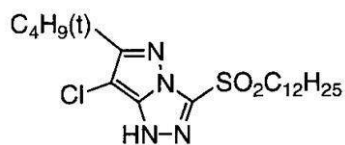
(M-I-12)



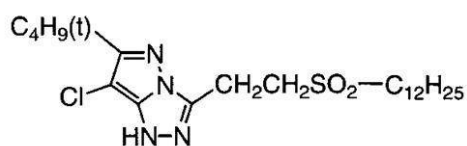
【 0 1 2 3】

【化 3 9】

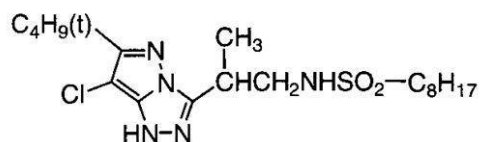
(M-II-1)



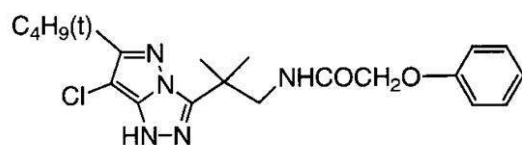
(M-II-2)



(M-II-3)



(M-II-4)



10

20

30

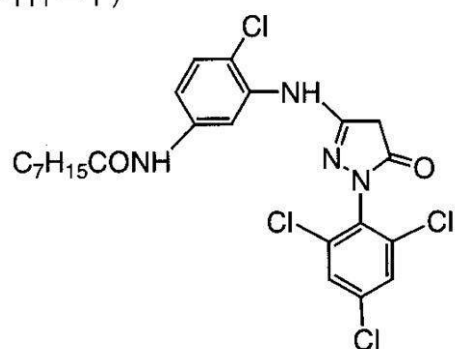
40

50

【 0 1 2 4 】

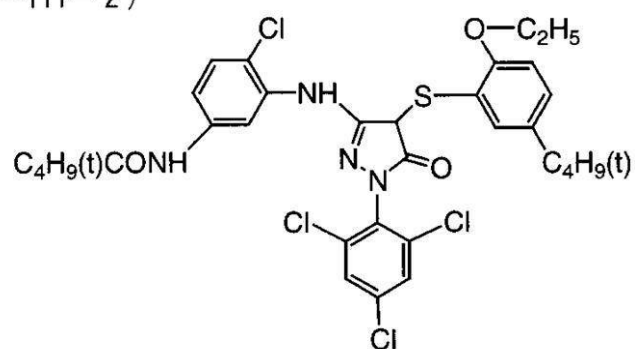
【 化 4 0 】

(M-III-1)



10

(M-III-2)

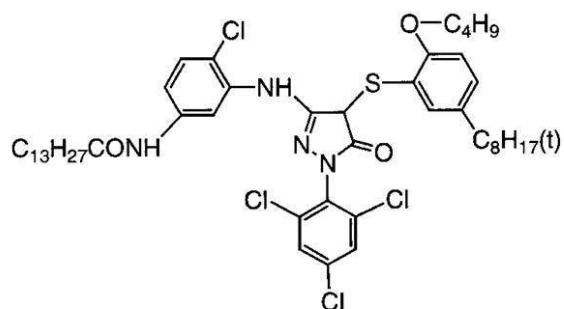


20

【 0 1 2 5 】

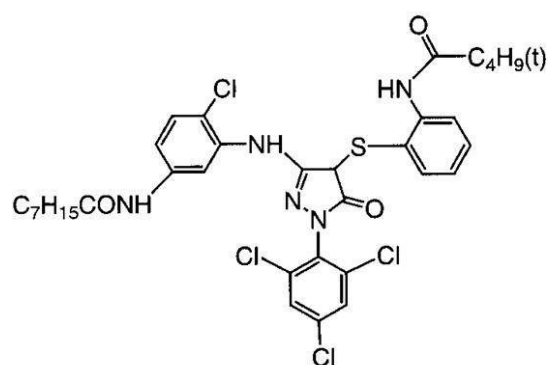
【 化 4 1 】

(M-III-3)



30

(M-III-4)



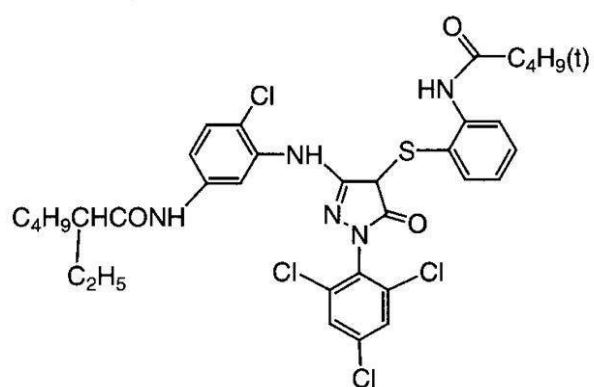
40

【 0 1 2 6 】

50

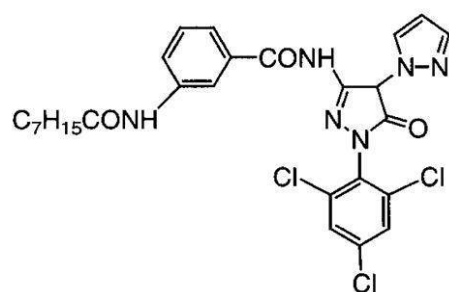
【化 4 2】

(M-III-5)



10

(M-III-6)

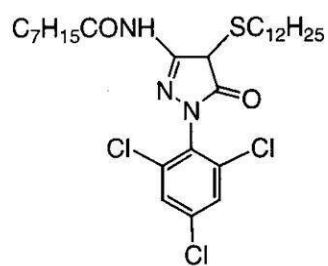


20

【 0 1 2 7 】

【化 4 3】

(M-III-7)



(M-III-8)

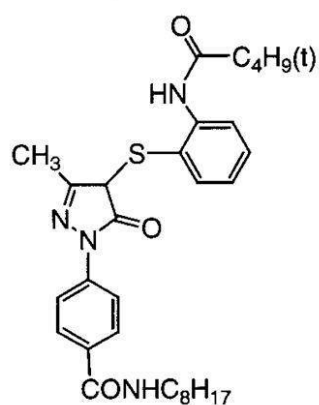


30

【 0 1 2 8 】

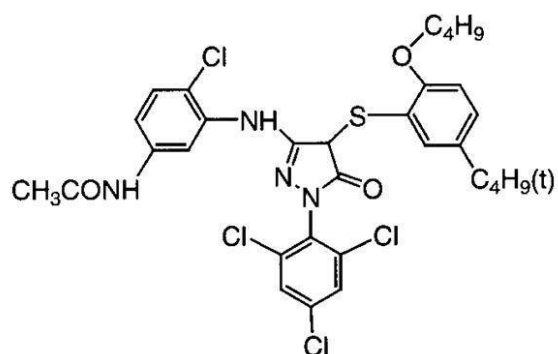
【化 4 4】

(M-III-9)



10

(M-III-10)

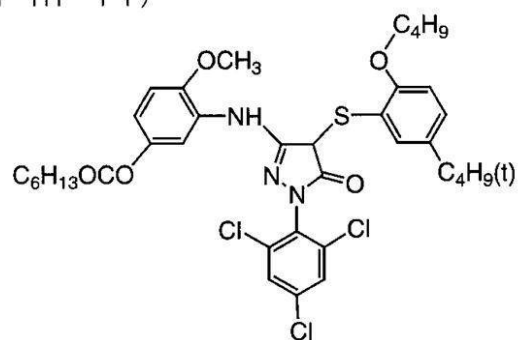


20

【 0 1 2 9】

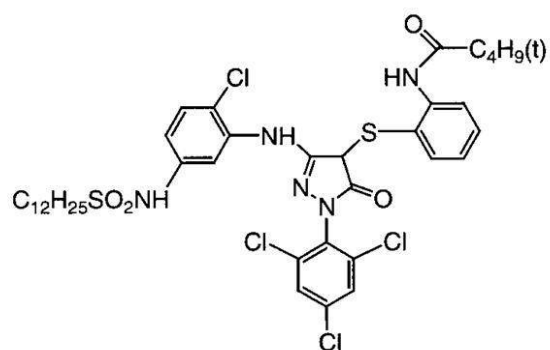
【化 4 5】

(M-III-11)



30

(M-III-12)



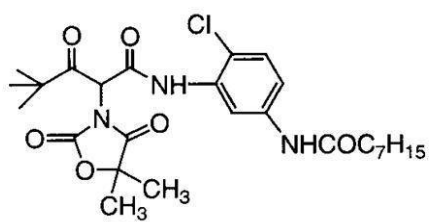
40

【 0 1 3 0】

50

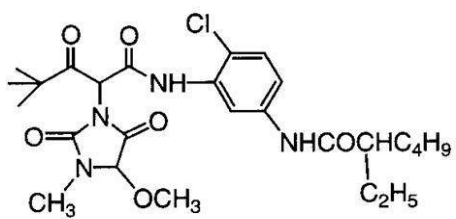
【化 4 6】

(Y-I-1)



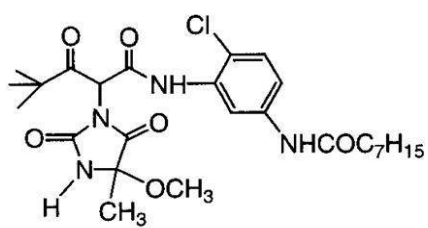
(Y-I-2)

10



(Y-I-3)

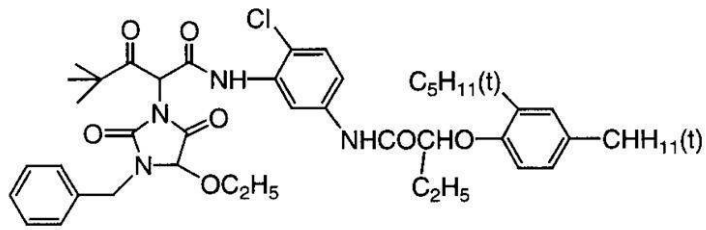
20



【 0 1 3 1 】

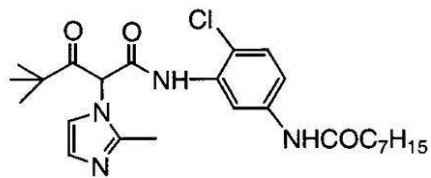
【化 4 7】

(Y-I-4)

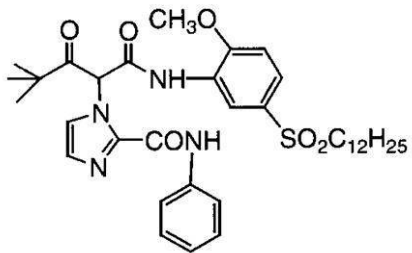


10

(Y-I-5)



(Y-I-6)

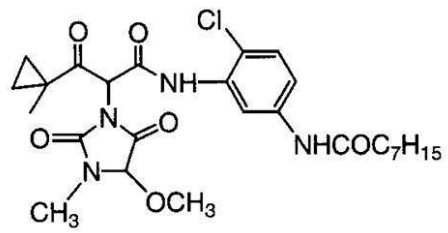


20

【 0 1 3 2 】

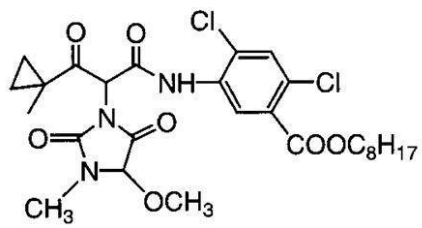
【化 4 8】

(Y-I-7)

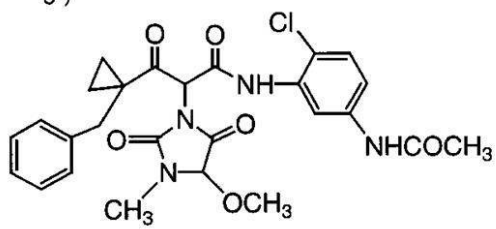


10

(Y-I-8)



(Y-I-9)

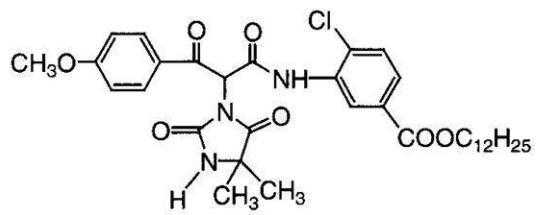


20

【 0 1 3 3 】

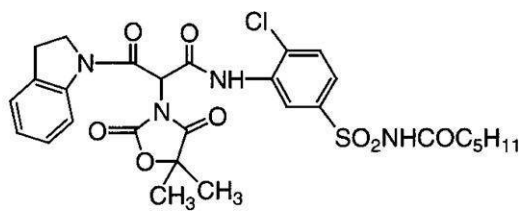
【化 4 9】

(Y-I-10)



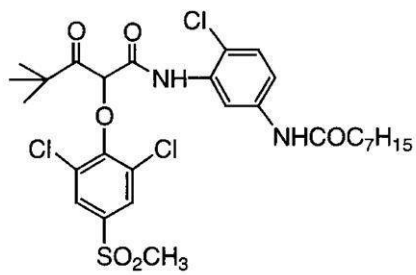
10

(Y-I-11)



(Y-I-12)

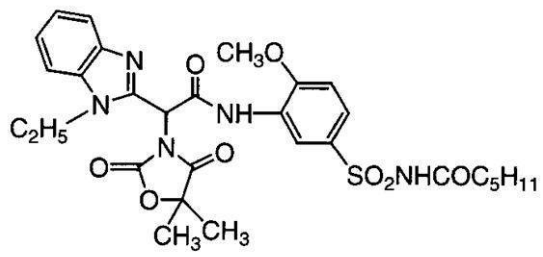
20



【 0 1 3 4 】

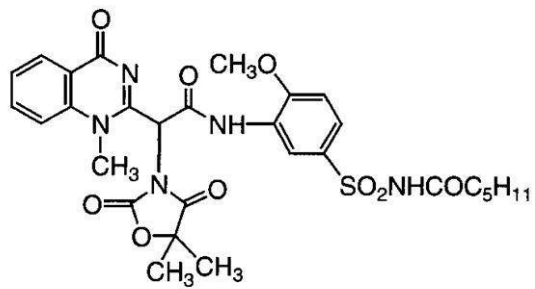
【化 5 0】

(Y-II-1)



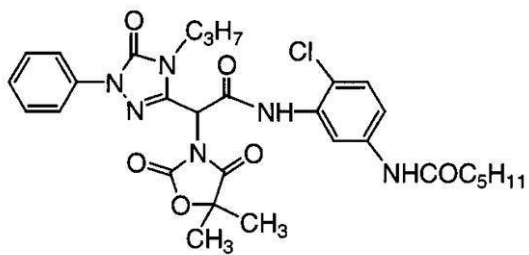
10

(Y-II-2)



(Y-II-3)

20

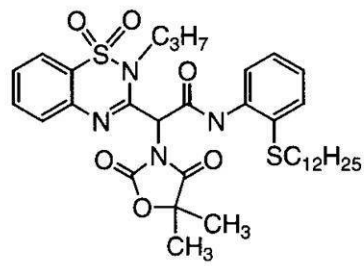


【 0 1 3 5】

30

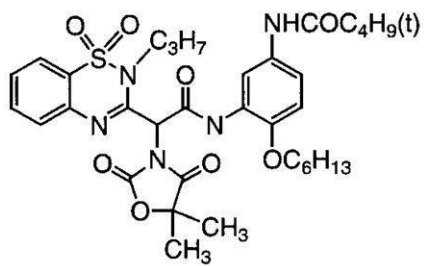
【化 5 1】

(Y-III-1)



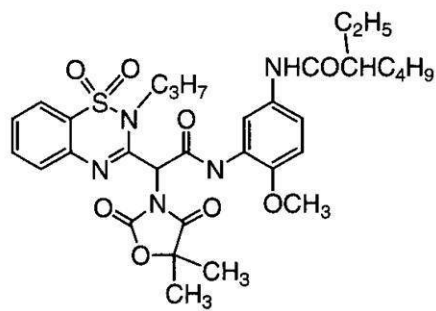
10

(Y-III-2)



20

(Y-III-3)

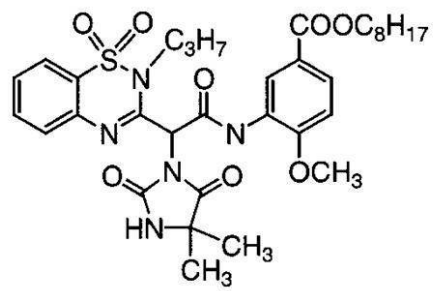


30

【 0 1 3 6 】

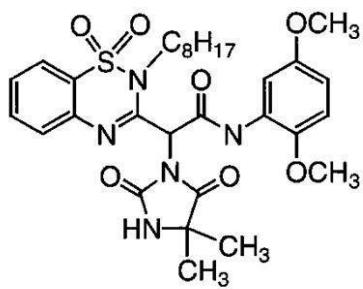
【化 5 2】

(Y-III-4)



10

(Y-III-5)

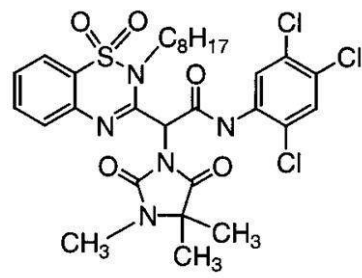


20

【 0 1 3 7 】

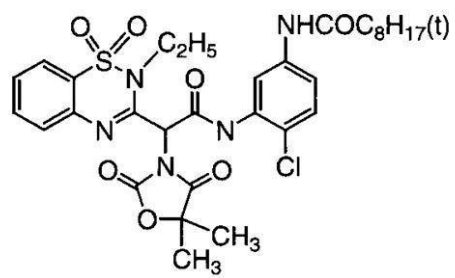
【化 5 3】

(Y-III-6)



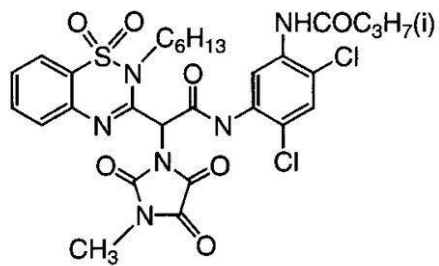
10

(Y-III-7)



20

(Y-III-8)

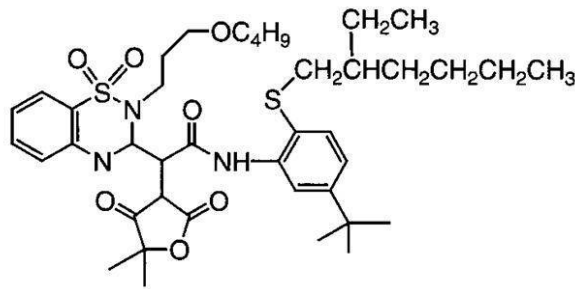


30

【 0 1 3 8 】

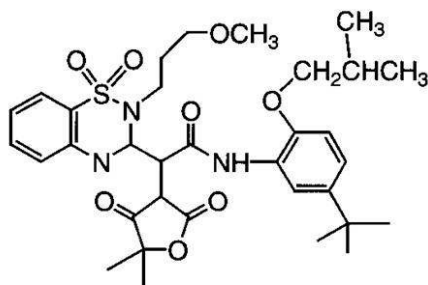
【化 5 4】

(Y-III-9)



10

(Y-III-10)



20

【0139】

上記の他に、特開 2004-4439 に記載の化合物 No. CP101~CP117、CP201~CP220、および CP301~CP331 など本発明に用いることが出来る。

【0140】

本発明のカプラーはオイル乳化物あるいは固体微粒子分散物として、例えばゼラチンやポリマーラテックスをバインダーとした塗布膜として用いることができる。このときの塗布量は、好ましくは 1×10^{-6} モル/ m^2 ~ 1×10^{-2} モル/ m^2 が好ましく、さらに好ましくは 1×10^{-5} モル/ m^2 ~ 1×10^{-3} モル/ m^2 で使用することである。

30

【0141】

(不活性担体)

本発明に用いられる不活性担体(基質)は担持する抗体蛋白を含むメンブレンや固定層に拡散せず、生成した複合体がメンブレンや固定層に固定もしくは拡散するのを妨害することのない不活性な材料が好ましい。

本発明に用いられる不活性担体としては、例えば、ニトロセルローズが挙げられる。

本発明に用いられる不活性担体が発色した色素を観察する背景となる場合は、白色の光反射性基質であることが好ましく、また、不活性担体を通りして発色した色素を観察する場合は、透明基質であることが好ましい。

40

【実施例】

【0142】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0143】

実施例 1

1. 発色シートの作製

カプラー(CP-1) 4.5 g、色像安定剤(ST-1) 1.3 g、色像安定剤(ST-2) 0.22 g 及び色像安定剤(ST-3) 1.4 g を溶媒(SOL-1) 6.7 g、

50

溶媒 (SOL - 2) 6.7 g および溶媒 (酢酸エチル) 19 g に溶解し、この液を 1.0 g のドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを含む 25 質量% のゼラチン水溶液 84 mL と混合して、高速攪拌乳化機 (ディゾルバー) で乳化分散し、さらに水を加えて 230 g の乳化分散物 A を作製した。

乳化分散物 A にゼラチン水溶液を加えて、ゼラチン架橋剤 (H - 1) を添加し、以下の組成となるように塗布溶液を調製し、これをトリアセチルセルロース (TAC) 支持体上に塗布し乾燥した。これを 5 mm × 18 mm のサイズに裁断し、発色シートを作製した。

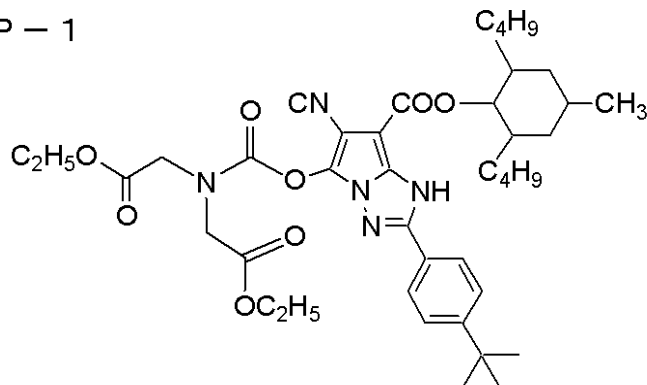
【0144】

	(g / m ²)	
CP - 1	0.27	10
ST - 1	0.079	
ST - 2	0.0133	
ST - 3	0.085	
SOL - 1	0.41	
SOL - 2	0.41	
ゼラチン	2.2	
H - 1	0.026	

【0145】

【化55】

CP - 1 20

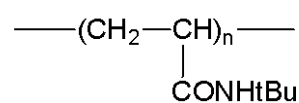
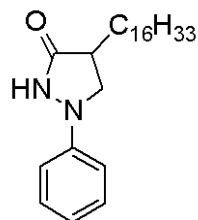
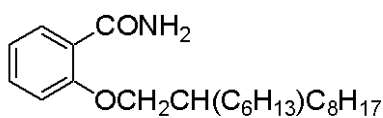


30

ST - 1

ST - 2

ST - 3



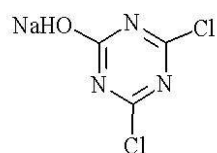
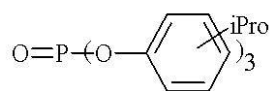
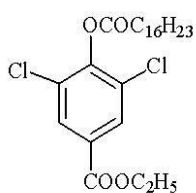
【0146】

【化56】

SOL - 1

SOL - 2

H - 1



【0147】

50

2. hCG検出イムノクロマトキットの作製

(2-1) 抗hCG抗体修飾銀コロイドの作製

直径80nmの銀コロイド溶液(品番:EM・SC80、BBI社製)90mLを8000G、4、15分遠心分離(himacCF16RX、日立)し上精を取り除くことで9mLにまで濃縮した。この銀コロイド溶液に20mMホウ酸バッファー(pH9.0)1mLを加えることでpHを調整した銀コロイド溶液に、60μg/mLの抗hCGモノクローナル抗体(品名:Anti-hCG 5008 SP-5、Medix Biochemica社製、等電点=7.4)溶液1mLを加え攪拌した。10分間静置した後、1質量%ポリエチレングリコール(PEG Mw・20000、品番168-11285、和光純薬製)水溶液を550μL加え攪拌し、続いて10質量%牛血清アルブミン(BSA Fraction V、品番A-7906、SIGMA)水溶液を1.1mL加え攪拌した。この溶液を8000G、4、30分遠心分離(himacCF16RX、日立)した後、1mL程度を残して上清を取り除き、超音波洗浄機により銀コロイドを再分散した。この後、20mLの銀コロイド保存液(20mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩バッファー(pH8.2), 0.05質量%PEG(Mw・20000), 150mM NaCl, 1質量%BSA, 0.1質量%NaN₃)に分散し、再び8000G、4、30分間遠心分離した後、1mL程度を残して上清を取り除き、超音波洗浄機により銀コロイドを再分散し、抗体修飾銀コロイド(80nm)溶液を得た。

10

【0148】

(2-2) 銀コロイド抗体保持パットの作製

(2-1)で作製した各抗体修飾銀コロイドを、銀コロイド塗布液(20mM Tris-HClバッファー(pH8.2), 0.05質量%PEG(Mw・20000), 5質量%スクロース)及び水により希釈した。その際、光路長1cmの条件で455nmの単色光により光学濃度を測定し、1.25となるように希釈した。この溶液を、8mm×150mmに切ったグラスファイバーパッド(品名:Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社製)1枚あたり0.8mLずつ均一に塗布し、一晚減圧乾燥し、銀コロイド抗体保持パッドを得た。

20

【0149】

(2-3) 抗体固定化メンブレン(クロマトグラフ担体)の作製

25mm×200mmに切断したニトロセルロースメンブレン(プラスチックの裏打ちあり、品名:HiFlow Plus HF120、ミリポア社製)に関し以下のような方法により抗体を固定し抗体固定化メンブレンを作製した。メンブレンの長辺を下にして、該メンブレンの下から8mmの位置に、0.5mg/mLとなるように調製した固定化用抗hCGモノクローナル抗体(品名:Anti-Alpha subunit 6601 SPR-5、Medix Biochemica社製、等電点=7.4)溶液をインクジェット方式の塗布機(BioDot社)を用いて幅1mm程度のライン状に塗布した。同様に、下から12mmの位置に、0.5mg/mLとなるように調製したコントロール用抗マウスIgG抗体(抗マウスIgG(H+L), ウサギF(ab')₂, 品番566-70621、和光純薬製)溶液をライン状に塗布した。塗布したメンブレンは、温風式乾燥機で50、30分間乾燥した。ブロッキング液(0.5質量%カゼイン(乳由来、品番030-01505、和光純薬製)含有50mMホウ酸バッファー(pH8.5))500mLをバットに入れ、そのまま30分間静置した。その後、同様のバットに入れた洗浄・安定化液(0.5質量%スクロースおよび0.05質量%コール酸ナトリウムを含む50mM Tris-HCl(pH7.5)バッファー)500mLに移して浸し、そのまま30分間静置した。メンブレンを液から取り出し、室温で一晩乾燥し、抗体固定化メンブレンとした。

30

40

【0150】

(2-4) イムノクロマトグラフキットの作製

バック粘着シート(ARcare9020、ニッポンテクノクラスタ社)に、(1-3)で作製した抗体固定化メンブレンを貼り付けた。その際メンブレン長辺側のうち、抗h

50

C G 抗体ライン側を下側とする。抗体固定化メンブレンの下側に約 2 mm 重なるように (2 - 2) で作製した銀コロイド抗体保持パッドを貼り付け、約 4 mm 重なるようにして銀コロイド抗体保持パッド下側に試料添加パッド (18 mm × 150 mm に切ったグラスファイバーパッド (品名: Glass Fiber Conjugate Pad、ミリボア社製)) を重ねて貼り付けた。さらに、抗体固定化メンブレンの上側には約 5 mm 重なるように吸収パッド (80 mm × 150 mm に切ったセルロース・グラス膜 (品番: CF6、ワットマン社製)) を重ねて貼り付けた。これら重ね張り合わせた部材を、部材の長辺側を 5 mm 幅になるように短辺に平行にギロチン式カッター (品番: CM4000、ニッポンテクノクラスタ社製) で切断していくことで、5 mm × 55 mm のイムノクロマト用ストリップを作製した。これらをプラスチックケース (ニッポンテクノクラスタ社) に納め、試験用イムノクロマトキットとした。

10

【0151】

(2 - 5) 発色液の作製

8 N 水酸化カリウム 0.4 mL、炭酸水素カリウム 26.4 g からなるバッファー水溶液 800 mL に、有機過酸プレカーサーとして N - アセチルイミダゾール 75 g、亜硫酸カリウム 4 g および 17D3.2 g を添加し、溶解後、全液量が 1000 mL となるように水で希釈し、発色液を作製した。

【0152】

3. 検出ラインでのシグナル増幅

(3 - 1) 検出ラインでの抗体修飾金属コロイドの吸着処理

1 質量 % BSA を含む PBS バッファーに hCG (リコンビナント hCG R - 506、ロート製薬 (株) 製) を溶解し、表 1 に示すように各濃度の試験用 hCG 溶液を作製した。この試験用 hCG 溶液を各試験用イムノクロマトキットの試料添加パッドに 100 μL 滴下し、10 分静置した。

20

【0153】

(3 - 2) 発色シートおよび発色液によるシグナル増幅

(3 - 1) の処理を終了した後のイムノクロマトキットのケースからメンブレンを取り出し、さらに吸水パッドを取り除いた後に、新たな吸水パッドとして 5 mm × 20 mm (品名: Cellulose Fiber Sample Pad、ミリボア社製) を取り除いた場所に 3 枚をセロハンテープで貼り付けた。検出ライン部に発色シートを重ね合わせ、その重ねた部位を 2 枚の亚克力板で挟み固定した。このメンブレンを、発色液 9 mL に 30 質量 % の過酸化水素水を混合した液を 200 μL 入れたマイクロチューブ (ピーエム機器 (株)、品番: BM4020) に検体滴下部 (試料添加パッド) が液に漬かるように立てかけた。このとき、発色液と過酸化水素水の混合から試料添加パッドの浸漬までの時間を 5 分とした。立てかけた時点を 0 分として 10 分後に取り出し、発色シートを剥がし 1 % 酢酸溶液に 1 分間浸すことで発色反応を停止させた。

30

【0154】

実施例 2

実施例 1 において、(3 - 2) 項で説明した発色液と過酸化水素水の混合から試料添加パッドの浸漬までの時間を 1 時間とした。

40

【0155】

(比較例 1)

実施例 1 で、(2 - 5) 項における N - アセチルイミダゾールを除き、それ以外は実施例 1 と同様に試験を行った。

【0156】

(比較例 2)

実施例 1 で、(2 - 5) 項における N - アセチルイミダゾール 75 g を酢酸 41 g に置き換えて、それ以外は実施例 1 と同様に試験を行った。

【0157】

(評価方法)

50

実施例 1, 2 及び比較例 1, 2 で得られたメンブレンの検出ラインに接した発色シートの部位もしくはメンブレンの検出ラインを、通常の明るさの蛍光灯を照明とした室内で目視観察することで、各イムノクロマトキットの性能を評価した。下記に評価基準を示す。

○：青色（650nm）の発色が観察され、コントロール（hCG濃度0）の場合と明確に区別でき、検体中のhCGの存在を検知できた。

×：コントロールと区別できなかった。

【0158】

得られた結果を表1に示した。

【0159】

【表1】

イムノクロマトキット	試験用hCG濃度 (pg/mL)					
	1.0	0.8	0.6	0.5	0.4	0.3
実施例1	○	○	○	○	○	○
実施例2	○	○	○	○	×	×
比較例1	○	○	○	×	×	×
比較例2	○	○	○	×	×	×

【0160】

表1より明らかに示されるように、本発明の発色シートを用いることにより、微量の抗原（hCG）量を検出できることがわかる（検出感度が著しく向上した）。

中でも、特に、発色液と過酸化水素水の混合から試料添加パッドの浸漬までの時間が短い実施例1が、検出感度が高かった。

10

20

フロントページの続き

(72)発明者 大関 勝久

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士フイルム株式会社内

Fターム(参考) 2G054 AB04 CA20 CE02 EA06 GE06

专利名称(译)	免疫学的检出方法		
公开(公告)号	JP2009244231A	公开(公告)日	2009-10-22
申请号	JP2008094271	申请日	2008-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	森 幹永 大関 勝久		
发明人	森 幹永 大関 勝久		
IPC分类号	G01N33/536 G01N21/78		
FI分类号	G01N33/536.E G01N21/78.A		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/CA20 2G054/CE02 2G054/EA06 2G054/GE06		
代理人(译)	中岛敦 福田浩		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明要解决的问题本发明的目的是提供一种简单，快速且高度灵敏的免疫学检测方法。 第一种能够特异性识别用含有金属的标记物修饰的样品中的分析物的蛋白质 (Y.)，从而形成分析物和含有Y的复合物; b) 将复合物与不形成复合物的第一种蛋白质 (Y) 分离; c) 通过有机过酸前体与过氧化物和着色剂反应产生的有机过酸作用于分离的络合物; d) 检测由着色步骤产生的染料。 【选择图】无

