

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-509404  
(P2011-509404A)

(43) 公表日 平成23年3月24日(2011.3.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	2 G O 4 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	2 G O 4 5
GO 1 N 33/72 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 A	2 G O 5 4
GO 1 N 33/52 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/72 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-541385 (P2010-541385)  
 (86) (22) 出願日 平成20年10月24日 (2008.10.24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年7月2日 (2010.7.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2008/006306  
 (87) 国際公開番号 W02009/099269  
 (87) 国際公開日 平成21年8月13日 (2009.8.13)

(71) 出願人 510184793  
 ボディテックメド インコーポレイテッド  
 大韓民国 カンウォンード チュンチョン  
 -シ フピョンードン 바이오ベンチャー  
 - プラザ # 3-2  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖化ヘモグロビンの定量的測定のためのシステムおよびこれを用いた糖化ヘモグロビン含有量の測定方法

(57) 【要約】

本発明は、ラテラルフローアッセイストリップ、レーザー誘起落射蛍光検出装置およびLED検出装置を含む、血中のヘモグロビンと糖化ヘモグロビンを同時に検出する装置、ならびにこれを用いて免疫学的方法で血中のヘモグロビンと糖化ヘモグロビンを同時に簡便に定量する方法を提供する。

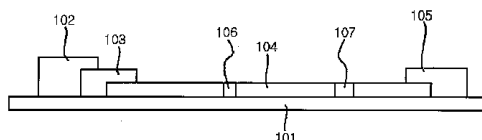
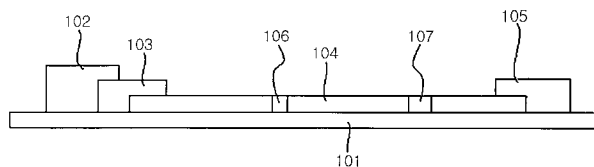


FIG. 1: Lateral flow quantitative assay strip



ラテラルフロー定量アッセイストリップ

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

支持台(backing card)、サンプルパッド、クロマトグラフィー媒体、および吸収パッドを含むラテラルフローアッセイストリップであって、

前記支持台は前記ストリップ内の構成要素全体を支持し、前記支持台の各端部には前記サンプルパッドと前記吸収パッドが互いに重ならないように接着されており；前記サンプルパッドは、前記吸収パッドが接着された方向の端部で、試料が最初にアプライされる前記クロマトグラフィー媒体の一方の端部と重なり；前記クロマトグラフィー媒体の他方の端部は前記吸収パッドと重なり、前記クロマトグラフィー媒体上には前記サンプルパッドから所定の距離をおいてキャプターが固定されており、前記キャプターは、前記試料内の分析物の一つと実質的に同一であり、そのため前記試料内の分析物との競合的免疫反応によって抗原 - 抗体反応を介して結合し；かつ、前記キャプターは糖化ヘモグロビンである、ラテラルフローアッセイストリップ。

10

**【請求項 2】**

結合体放出パッドをさらに含むラテラルフローアッセイストリップであって、結合体放出パッドの一方の端部が前記サンプルパッドと重なり、結合体放出パッドの他方の端部が前記クロマトグラフィー媒体と重なり、かつ分析物の一つと抗原 - 抗体反応によって選択的に結合することが可能なデテクターが結合体放出パッドの表面に吸着された、請求項 1 に記載のラテラルフローアッセイストリップ。

20

**【請求項 3】**

前記デテクターは抗糖化ヘモグロビン抗体である、請求項 2 に記載のラテラルフローアッセイストリップ。

**【請求項 4】**

前記デテクターは落射蛍光で標識された抗糖化ヘモグロビン抗体である、請求項 3 に記載のラテラルフローアッセイストリップ。

**【請求項 5】**

抗原 - 抗体反応によって検出される抗原分析物と色素によって検出される色素分析物とを同時に定量することが可能な一体型定量アッセイシステムであって、請求項 1 または 2 に記載のラテラルフローアッセイストリップ、前記ストリップ上のキャプター固定区域からの蛍光シグナルを検出するためのレーザー誘起落射蛍光検出装置、および色素分析物を検出するための LED 検出装置を含む、システム。

30

**【請求項 6】**

前記 LED 検出装置が 458 ~ 612 nm の範囲の光源を使用する、請求項 5 に記載の一体型定量アッセイシステム。

**【請求項 7】**

前記デテクターが抗糖化ヘモグロビン抗体である、請求項 5 に記載の一体型定量アッセイシステム。

**【請求項 8】**

前記抗原分析物が糖化ヘモグロビンであり、前記色素分析物がグリコシル化ヘモグロビンまたは非グリコシル化ヘモグロビンである、請求項 5 に記載の一体型定量アッセイシステム。

40

**【請求項 9】**

試料中の抗原分析物と色素分析物とを同時に定量する方法であって、

ラテラルフロー定量アッセイストリップが、支持台、サンプルパッド、クロマトグラフィー媒体、および吸収パッドを含み、前記支持台は前記ストリップ内の構成要素全体を支持し、前記支持台の各端部には前記サンプルパッドと前記吸収パッドが互いに重ならないように接着されており；前記サンプルパッドは、前記吸収パッドが接着された方向の端部で、試料が最初にアプライされる前記クロマトグラフィー媒体の一方の端部と重なり；前記クロマトグラフィー媒体の他方の端部は前記吸収パッドと重なり、前記クロマトグラフィー媒体上には前記サンプルパッドから所定の距離をおいてキャプターが固定されており

50

、前記キャプターは、前記試料内の分析物の一つと実質的に同一であり、そのため前記試料内の分析物との競合的免疫反応によって抗原 - 抗体反応を介して結合し、

前記ラテラルフローアッセイストリップの前記サンプルパッド上に、抗原分析物と色素分析物とを含有することが予想される試料をアプライし、前記試料が前記クロマトグラフィー媒体に沿って展開するにつれて、アプライ前に前記試料に所定量のデテクターを添加することによる免疫反応によってデテクター - 抗原分析物の結合体が形成されるように流体試料が前記クロマトグラフィー媒体を通過して移動し、前記クロマトグラフィー媒体上に固定されたキャプターと前記デテクター - 抗原分析物結合体および / または遊離デテクターとの間で結合体が形成されるように競合的免疫反応が起こり、その後、前記クロマトグラフィー媒体上に固定された前記キャプターに結合した前記デテクターの量をレーザー誘起落射蛍光検出装置によって測定し、かつ別途、前記クロマトグラフィー媒体上の前記色素分析物の量をLED検出装置によって測定する、方法。

10

【請求項 10】

試料中の抗原分析物と色素分析物とを同時に定量する方法であって、

ラテラルフロー定量アッセイストリップが、支持台、サンプルパッド、クロマトグラフィー媒体、吸収パッド、および結合体放出パッドを含み、前記支持台は前記ストリップ内の構成要素全体を支持し、前記支持台の各端部には前記サンプルパッドと前記吸収パッドが互いに重ならないように接着されており；前記サンプルパッドは、前記吸収パッドが接着された方向の端部で、試料が最初にアプライされる前記クロマトグラフィー媒体の一方の端部と重なり；前記クロマトグラフィー媒体の他方の端部は前記吸収パッドと重なり、前記クロマトグラフィー媒体上には前記サンプルパッドから所定の距離をおいてキャプターが固定されており、前記キャプターは、前記試料内の分析物の一つと実質的に同一であり、そのため前記試料内の分析物との競合的免疫反応によって抗原 - 抗体反応を介して結合し、前記結合体放出パッドの一方の端部が前記サンプルパッドと重なり、前記結合体放出パッドの他方の端部が前記クロマトグラフィー媒体と重なり、かつ分析物の一つと抗原 - 抗体反応によって選択的に結合することが可能なデテクターが前記結合体放出パッドの表面に吸着され、

20

前記ラテラルフローアッセイストリップの前記サンプルパッド上に、抗原分析物と色素分析物とを含有することが予想される試料をアプライし、前記試料が前記クロマトグラフィー媒体に沿って展開するにつれて、デテクター - 抗原分析物の結合体が形成されるように試料が前記結合体放出パッドを通過し、前記クロマトグラフィー媒体上に固定されたキャプターと前記デテクター - 抗原分析物結合体および / または遊離デテクターとの間で結合体が形成されるように競合的免疫反応が起こり、その後、前記クロマトグラフィー媒体上に固定された前記キャプターに結合した前記デテクターの量をレーザー誘起落射蛍光検出装置によって測定し、かつ別途、前記クロマトグラフィー媒体上の前記色素分析物の量をLED検出装置によって測定する、方法。

30

【請求項 11】

前記デテクターが蛍光物質で標識される、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

測定された色素分析物の濃度に対する抗原分析物の濃度の比率を算出することにより、前記試料中の前記抗原分析物を定量する工程をさらに含む、請求項 9 または 10 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記抗原分析物が糖化ヘモグロビンであり、前記色素分析物がグリコシル化ヘモグロビンまたは非グリコシル化ヘモグロビンである、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記デテクターが抗糖化ヘモグロビン抗体である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記キャプターが糖化ヘモグロビンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記キャプターが糖化ヘモグロビンである、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液に存在する糖化ヘモグロビンを高感度で定量することが可能なラテラルフロー定量アッセイシステムおよびその方法に係り、特に、糖化ヘモグロビンと総ヘモグロビンを同時に定量することが可能な一体型定量アッセイ方法およびシステムに関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は、ブドウ糖が体内の細胞に入ることができず、体内で使用されないため、血液内に過剰な血糖が残存して多様な合併症を誘発する、一種の異常炭水化物代謝疾患である。糖尿病は3つのタイプに分類される。その代表的なものは、インスリン依存性糖尿病と呼ばれる1型糖尿病であって、膵β細胞が自己免疫反応により損傷し、インスリンホルモンを合成または分泌する機能を失うタイプである。インスリン非依存性糖尿病と呼ばれる2型糖尿病は、インスリンに対する末梢インスリン抵抗性や、障害性のインスリン分泌障害などによって特徴づけられる。3型糖尿病は、一般に妊娠中に発生し得る妊娠性糖尿病である。1型糖尿病と妊娠性糖尿病は稀であるが、2型糖尿病は、最も多く見られるもので、先進国の糖尿疾患の90～95%を占めることが知られている。

【0003】

糖尿病は尿糖値または血糖値の測定によって診断できるが、尿糖の測定は信頼性に乏しく、血糖の測定もいくつかの要因、例えば食事や運動などの影響を受けるために、不正確である。よって、糖尿病を診断またはモニターするために、主として、血液中の糖化ヘモグロビンを測定する方法が用いられる。

【0004】

1986年、米国糖尿病学会(ADA)で、全てのタイプの糖尿病をモニターするために、年間2回ずつの糖化ヘモグロビン測定を推奨したことにより、糖化ヘモグロビンは、血糖調節の安定な指標として受け入れられ始め、1993年にDCC(T(Direct Control and Complication Trial)で糖化ヘモグロビンレベルと糖尿病合併症との直接的な関係が報告されて以来、糖尿病を管理するために一般的に用いられるようになってきている。

【0005】

ADA(American Diabetes Association)では、DCC(TおよびUKPDS(United Kingdom Prospective Diabetes Study)の報告書に基づいて、糖化ヘモグロビンの数値を7%以内に管理することを勧めており、糖化ヘモグロビンの数値が8%以上の場合、糖尿病治療を再評価、および必要な修正を行うよう勧めている。2001年、米国内分泌学会では標的糖化ヘモグロビン6.5%以下を推奨値としたが、これは6.5%以上のときにも糖尿病性の網膜症が増加するというUKPDSの報告結果を参照したものである。1999年、IDF(International Diabetes Federation)も同様に糖化ヘモグロビン6.5%を推奨値とした。

【0006】

DCC(Tによって6.5年間行われた、1441名の患者の臨床実験による結果によると、厳格な血糖調節を達成することによって、微細血管合併症を相当減少させることができる。したがって、患者または医師は厳格な血糖値の調節を考慮する必要性がある。

【0007】

成人のヘモグロビンは、97%のヘモグロビンA、2.5%のヘモグロビンA<sub>2</sub>および0.5%のヘモグロビンFの3種から構成されている。これらの中でも、ヘモグロビンAは、141個のアミノ酸を有する2つの鎖と146個のアミノ酸を有する2つの鎖の、4つのポリペプチド鎖から構成される。クロマトグラフィー法によって分析すると、ヘモグロビンAは96%の主要なヘモグロビンと5～6%の微量のヘモグロビンから構成され、これらのヘモグロビンをヘモグロビンA<sub>1</sub>または糖化ヘモグロビンと呼ぶ。糖化され

10

20

30

40

50

た形態は、鎖N末端のバリン残基にグルコースが結合した構造であり、80%がヘモグロビンA1であり、残部はヘモグロビンA1aとヘモグロビンA1bである。

#### 【0008】

タンパク質のアミノ基に糖残基が非酵素的な反応で結合することを糖化といい、この反応は非常に緩慢で不可逆な反応である。糖化ヘモグロビンは、ヘモグロビンと血糖との結合によって絶え間なく形成されており、ヘモグロビンと糖化ヘモグロビンの比率は赤血球の血糖への露出の程度によって決定される。具体的に、糖化過程ではヘモグロビンAのバリン残基にブドウ糖が結合してヘモグロビンA1c前駆体を形成し、これは、アマドリ転位反応によって、安定なケトアミン形態を形成する。この際、血糖値が高くなると、循環ブドウ糖とヘモグロビンとの接触頻度が高くなり、その結果、糖化ヘモグロビンの比率も増加する。よって、糖化ヘモグロビンの比率は血糖値を反映する。また、赤血球の寿命は60~120日程度なので、糖化ヘモグロビン測定は、長期間の血糖の調整をモニタリングすることに有用である。

10

#### 【0009】

血液内の糖化ヘモグロビンを測定するための多様な測定法が開発されてきた。現在応用されている方法としては、イオン交換クロマトグラフィー法、親和性クロマトグラフィー法、電気泳動法、複合比色分析法などがある。これらの方法は、使用方法が難しく、複雑で熟練した技術が要求される。また、使い捨て臨床分析システムの技術開発の動向を考察すると、遠隔、在宅またはポイント・オブ・ケア検査での使用のために非常に有用な定量分析システムが提示されており、例えば視覚的検出法、光学的検出法、および電気化学的検出法などがある。

20

#### 【0010】

近年、糖化ヘモグロビンのN末端ペプチド残基を認識することが可能なモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が開発されて以来(米国特許第4,647,654号)、これを用いて糖化ヘモグロビンを定量する免疫学的方法に関する多くの研究が進行中である。免疫学的方法は、糖化ヘモグロビンを認識する抗体を用いるため、特異性および感度が高いという利点がある。免疫学的方法を用いて糖化ヘモグロビンの量を決定するときには、糖化ヘモグロビンのグリコシル化特定部位を高感度で認識することが可能な抗体を製作することが必須要件である。血中の糖化ヘモグロビンのグリコシル化部位は、外部に露出されていないので、まず、抗体がこの部位を認識し得るように糖化ヘモグロビンを修飾しなければならず、次に、全ヘモグロビンを分光学的方法で測定するためにヘモグロビンをメトヘモグロビンに転換しなければならない。メトヘモグロビンは、特定の波長を吸収する特性があるので、分光学的な方法で吸収率を測定して全ヘモグロビンの量を定量することができるとともに、修飾された糖化ヘモグロビンを免疫学的方法で測定して血中の糖化ヘモグロビンの量を測定することができる。

30

#### 【0011】

免疫学的装置は、その原理によってフロースルー(Flow Through)方式とラテラルフロー(Lateral Flow)方式に分けられる。フロースルー方式は、抗体が共有結合している多孔性マトリクスの表面に検体を添加して検体内の分析物質を固定化抗体と結合させ、しかる後に、二次捕獲抗体を添加し、酵素基質を用いて直接視覚で検出する方式である。ラテラルフロー方式には2つのタイプあり、一つのデバイスに全分析過程を含有する方式と、流体試料が標識抗体の固定されている多孔性マトリクスを通過しながら標識抗体と結合する方式がある。

40

#### 【0012】

ラテラルフロータイプは、試料がアプライされる試料パッド、探知用抗体がコートされている放出パッド、試料中の要素が、個々に分離され、抗原-抗体反応を受けるために移動する現像用メンブレンまたはストリップ、および試料が引き続き装置中を移動できるようにするために、液体を常に吸収する吸収パッドから構成されている。このような既存のラテラルフロー分析法は、妊娠診断、癌診断、微生物検出などの多様な分野で広く簡便に使われているが、肉眼で判断を行うことができないため、正確な量を確認することは難し

50

く、その適用は制限されている。

【0013】

HbA1cに対する抗体を用いる免疫学的検査は、一般的に反応系の混濁度検査方法を利用する。この際、糖化ヘモグロビンの鎖のN末端部分のみがHbA1cの特異的な抗原決定部位なので、抗原-抗体複合体の凝集反応は起こらない。よって、多数の抗原決定基を有するポリハプテンを抗体と反応させて不溶性免疫複合体を作り、これを測定する混濁度検査方法を使用する。混濁度のシグナルは、試料中の糖化ヘモグロビンの濃度に対して反比例する。しかしながら、このような検査方式は、多様な処理過程を含むため、専門化した検査室および自動化装置が必要であるという欠点がある。

【0014】

韓国公開特許第2004-0018893号では、糖化ヘモグロビンに対する抗体を含んでいる緩衝溶液、ヘモグロビンに対する抗体を含むストリップ、および洗浄溶液からなる糖化ヘモグロビン検出キットについて開示している。前記キットは、半定量分析システムに関するもので、糖化ヘモグロビンに対する抗体に染料を添加し、HbA1cが存在する場合の色相変化を肉眼または色相対照表によって比較することによって決定するので、糖化ヘモグロビンの量を正確に定量することができない。

【0015】

また、分析物の定量化が可能なRIA法またはELISA法では、酵素で処理し、洗浄するなどのいくつかの複雑な段階を経なければならない。よって、早くて簡便であるうえ、高感度で定量化することが可能な一般分析法が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

上述したように、抗体を用いて糖化ヘモグロビンの量を定量する既存のアッセイ装置は感度が低く、免疫アッセイは、このような定量のために酵素処理および洗浄を含む複数の複雑な段階を必要とする。そこで、本発明者らは、鋭意努力した結果、糖化ヘモグロビンと総ヘモグロビンとを同時に定量することが可能な一体型定量アッセイシステム、および、より速く簡便に高感度で定量化することができる方法を提供し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0017】

免疫アッセイの利点と定量分析の必要性を考慮し、本発明者らは、糖化ヘモグロビンレベルを測定するための現場分析用装置を開発することにより、簡単な方法で効果的に血中糖化ヘモグロビンレベルを定量して糖尿病の早期診断を達成した。したがって、本発明は糖尿疾患における合併症の予防または危険性を最小化するための方法、ならびに患者または医師にグルコースレベルの厳格な管理の維持における利便性を提供することを目的とする。

【0018】

本発明の他の目的は、糖化ヘモグロビンと総ヘモグロビンとを同時に定量することが可能な一体型定量アッセイシステム、すなわち糖化ヘモグロビンを定量することが可能なラテラルフローアッセイストリップ、抗原分析物を定量するレーザー誘起落射蛍光検出装置、および色素分析物を定量するLED検出装置を含む一体型定量アッセイシステムを提供することにある。

【0019】

本発明の別の目的は、免疫反応の特異性および選択性を用いて試料中の抗原分析物を定量する方法を提供することであり、この方法において、抗原分析物および所定のデテクターを含む試料が、ラテラルフローアッセイストリップに沿って移動し、試料中のデテクターと媒体上に固定されたキャプターとの競合的な抗原抗体反応が起こる間、標識されたデテクターにより発生したシグナルを測定し、かつラテラルフローアッセイストリップ上の色素分析物の量を別途測定して、色素分析物の量に対する抗原分析物の比率を算出する。

10

20

30

40

50

## 【発明の効果】

## 【0020】

上述したように、本発明に係るラテラルフローアッセイストリップ、レーザー誘起落射蛍光検出装置、およびLED検出装置からなる一体型定量アッセイシステムは、抗原-抗体反応によって効果的に糖化ヘモグロビンを定量することが可能な方法を提供するので、グルコースレベルの厳格な管理が必要な患者に非常に有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

【図1】本発明に係る血中ヘモグロビンレベルを定量するための一体型定量アッセイシステムの模式図である。

10

【図2】本発明に係るラテラルフロー定量アッセイストリップの模式図である。

【図3】図3Aはレーザー誘起落射蛍光装置を用いた糖化ヘモグロビン測定用光学系の模式図、図3BはLEDを用いた総ヘモグロビン測定用光学系の模式図である。

【図4】LED検出装置を用いたヘモグロビンの標準曲線である。

【図5】糖化ヘモグロビンの標準曲線である。

【図6】既知の大型設備と本発明に係る定量アッセイシステムとの性能を比較した結果を示すグラフである。

## 【符号の説明】

## 【0022】

100：ラテラルフロー定量アッセイストリップ

20

101：支持台 (Backing card)

102：サンプルパッド

103：結合体放出パッド

104：クロマトグラフィー媒体

105：吸収パッド

106：抗原分析物測定区域

107：色素分析物測定区域

108：窓

109：サンプルホルダー

110：ストリップハウジング

30

200：レーザー誘起落射蛍光検出装置

201：レーザー

202：レーザービーム用形状制御用レンズ

203：集光レンズ

204：蛍光フィルター

205：コンデンサレンズ

206：空間フィルター

207：光学的検出器

300：LED検出装置

301：LED光源

40

302：口径

303：光検出器

## 【発明を実施するための形態】

## 【0023】

本発明の第1の様態では、本発明は、支持台、サンプルパッド、クロマトグラフィー媒体、および吸収パッドを含むラテラルフローアッセイストリップであって、前記支持台がストリップの構成物全体を支持し、支持台の両端にはそれぞれサンプルパッドと吸収パッドが互いに重なり合わないようにつけられており；前記サンプルパッドは吸収パッドに接着される方向の端がクロマトグラフィー媒体の一方の端に重なり、そこに試料が最初にアプライされ；前記クロマトグラフィー媒体の他方の端は吸収パッドに重なり、前記クロマ

50

トグラフィー媒体上には前記サンプルパッドから所定の距離をおいてキャプターが固定されている、ラテラルフロー定量アッセイストリップを提供する。好ましくは、前記ストリップは、前記サンプルパッドとクロマトグラフィー媒体との間に、蛍光標識されたデテクターが吸着された結合体放出パッドをさらに含むことができる。さらに好ましくは、このようなストリップは、ストリップの汚染を防止するために、試料適用位置、落射蛍光検出区域、およびLED検出区域を除いたストリップ全体を覆うストリップハウジングをさらに含むことができる。

【0024】

本願において、用語「流体試料」または「試料」は、分析物、またはデテクターおよび分析物を含む分析対象化合物または組成物を意味し、本発明で使用される流体試料または試料は、クロマトグラフィー媒体を通して移動することができる、液相物質、または液体に似た流動性物質をいう。

10

【0025】

本願において、用語「分析物」は、試料中の分析対象化合物を意味し、抗原分析物および色素分析物を包含する。また、本願において、用語「色素分析物」および「抗原分析物」は、それぞれタンパク質およびグリコシル化タンパク質を意味し、特にヘモグロビンおよび糖化ヘモグロビンを意味する。抗原分析物は抗原-抗体反応に関与し、色素分析物と抗原分析物の両方は本発明に係るLEDによってシグナルを発生させる。

【0026】

本願において、用語「デテクター」は、前記言及された抗原分析物に対する抗体、好ましくは糖化ヘモグロビンに対する抗体を意味し、さらに好ましくは蛍光物質で標識されている抗体を意味する。

20

【0027】

本願において、用語「キャプター」は、試料中の抗原分析物と同一の物質または化合物を意味し、あるいはグリコシル化タンパク質、好ましくはヒトの糖化ヘモグロビンである抗原分析物のデテクター認識部位と同一の構造を持つ部分を含む物質を意味する。キャプターはストリップ上に固定され、ストリップに沿って移動する試料中の遊離デテクターを特異的かつ選択的に捕捉することができる。

【0028】

本願において、用語「落射蛍光」は、クロマトグラフィーを用いたラテラルフローアッセイストリップの抗原分析物検出区域に固定された、蛍光標識されたデテクター-分析物結合体から放出される蛍光、または蛍光標識されたデテクターから放出される蛍光をいう。

30

【0029】

本願において、用語「吸着」は、クロマトグラフィー媒体、またはストリップを構成するパッドに濃縮物質が付着していることを意味する。これはクロマトグラフィーの移動相を伝わって移動することができるが、適切な処理によって固定化されることも可能である。

【0030】

本願において、「固定」または「固定化」は、試料または試薬をクロマトグラフィー媒体またはストリップに保持することを意味し、特に、試料または試薬がクロマトグラフィーの移動相または溶媒に溶けず、前記移動相が移動しても一緒に移動せず、固定された位置で動かない状態を意味する。

40

【0031】

別の様態として、本発明は、第1の様態に係るラテラルフローアッセイストリップ、前記ラテラルフローアッセイストリップ上の蛍光物質の落射蛍光を測定することにより抗原分析物の量を決定するレーザー誘起落射蛍光検出装置、および前記ラテラルフローアッセイストリップ上の色素分析物の量を決定するLED（発光ダイオード）検出装置を含む、試料中の抗原分析物および色素分析物の量を同時に定量することが可能な一体型ラテラルフロー定量アッセイシステムを提供する。

50

## 【0032】

具体的には、前記落射蛍光検出装置において、光がレーザーのレーザービーム用形状制御用レンズを通過し、励起フィルターが照射され、反射した光が集光レンズを通過して平行光を形成する。この平行光は蛍光フィルターを通過して散乱光を除去し、その後純粋な蛍光成分光のみがコンデンサレンズに入る。このコンデンサレンズによって純粋な蛍光成分光が空間フィルターの中心に集束する。前記空間フィルターにおいて、純粋な蛍光成分光以外の光が除去される。光は光学的検出器に入る。光検出器に接続されたアナログデジタルコンバータ(ADC)により変換されたデジタル信号は中央処理装置(CPU)へ送られ、基準となる蛍光強度を有する結合体の蛍光強度と比較した相対的な値として分析物の量が決定される。

10

## 【0033】

LED検出装置において、LED光源による光の吸収または散乱する量が色素分析物の量によって異なるという原理に基づいて、色素分析物の量が決定される。特に、分析物がLED光源により照射され、分析物によって散乱した光が光軸の前方に位置した空間フィルターによってフィルタリングされる。色素分析物による散乱した光のみが光学的検出器に供給される。光学的検出器で検出された光信号は、ADCを介してCPUへ送られて、試料中の色素分析物の量が決定される。

## 【0034】

さらに別の様態により、本発明は、本発明に係る一体型ラテラルフロー定量アッセイシステムを用いて血液中の糖化ヘモグロビンの量を測定する方法を提供する。

20

## 【0035】

具体的には、ラテラルフローアッセイストリップのサンプルパッド上に、抗原分析物および色素分析物を含むと予想される試料をアプライし、かつ試料のアプライ前または移動中に試料に所定量のデテクターを添加することにより、一次免疫応答によってデテクター-抗原分析物の結合体が形成されるように、流体試料がクロマトグラフィー媒体を通過して移動する。試料がクロマトグラフィー媒体に沿って展開するにつれて、結合体を形成するように、サンプルパッドから所定の距離に位置したクロマトグラフィー媒体上に固定されたキャプターと前記デテクター-抗原分析物結合体および/またはデテクター単一体との間で、競合的に二次免疫応答が生じる。競合反応の後、クロマトグラフィー媒体上に固定されたキャプターに結合するデテクターの量と、これとは別途にクロマトグラフィー媒体上の色素分析物の量とをそれぞれ測定し、次に試料中の分析物に対する抗原分析物の比率を決定して抗原分析物を定量する。

30

## 【0036】

好ましくは、前記所定量のデテクターは蛍光物質で標識されており、前記デテクターは、ストリップへの試料アプライ前に、液体試料に混合される。あるいは、前記デテクターは、ラテラルフローアッセイストリップが結合体放出パッドを含む場合、結合体放出パッドに予め吸着される。アプライされた試料がクロマトグラフィー媒体に沿って移動し、前記結合体放出パッドを通過する間、前記デテクターは、液体試料に溶解および/または混合される。その後、デテクターが試料中の抗原分析物と結合して、蛍光物質で標識されたデテクター-抗原分析物結合体を形成する。試料中に抗原分析物がないまたは足りない場合に、デテクターは、単一体の形でクロマトグラフィー媒体に沿って移動する。

40

## 【0037】

前記キャプターは、クロマトグラフィー媒体上に、試料の適用地点から試料の展開方向に所定の間隔(以下、「抗原分析物検出区域」という)で固定される。キャプターが固定されている領域に到達すると、キャプターが、デテクター単一体および/またはデテクター-抗原分析物結合体と結合し、デテクター-キャプター結合体を形成する。最後に、蛍光物質で標識されたデテクターを検出できるレーザー誘起落射蛍光検出装置は、抗原分析物の量、すなわちデテクターに結合した糖化ヘモグロビンの量を測定するために、前記抗原分析物検出区域から発生するシグナルを収集する。

## 【0038】

50

一方、クロマトグラフィー媒体上のヘモグロビンおよび糖化ヘモグロビンの量は、色素分析物を検出できるLEDによって測定される。色素分析物に対する抗原分析物の比率を算出して、試料中の抗原分析物の量を定量する。

#### 【0039】

以下、ラテラルフローアッセイストリップ、レーザー誘起落射蛍光検出装置、およびLED検出装置からなる一体型ラテラルフロー定量アッセイシステム、ならびにこれを用いて血液中の総ヘモグロビンの量および糖化ヘモグロビンの量を同時に測定する方法について、図面を参照して詳細に説明する。

#### 【0040】

図1は本発明の好適な実施例に係るラテラルフローアッセイストリップを示す斜視図であって、前記ストリップは支持台101、サンプルパッド102、結合体放出パッド103、クロマトグラフィー媒体104、および吸収パッド105を含む。次に、ラテラルフローアッセイストリップを構成する各構成要素について詳細に説明する。

10

#### 【0041】

##### 支持台

支持台101は、ストリップの全ての構成要素を支持しており、支持台が省略される場合にはクロマトグラフィー媒体104自体が支持台であってもよい。支持台は、通常、不水溶性、非多孔性および剛体の材料は、試料を展開し支持台上に置かれたパッドと等しい長さおよび幅を有するが、パッドより大きいまたは小さい大きさを有してもよい。支持台の準備において、多様な天然および合成の有機および無機材料を使用することができるが、但し、前記材料から作成された支持台は、吸収物質の毛細管作用を妨害したり、分析物と非特異的に結合したり、分析物とデテクターの反応を妨害したりしてはならない。支持台として使用可能な代表的な重合体の例は、以下に限定されないが、ポリエチレン、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、ガラス、セラミック、金属などを含む。

20

#### 【0042】

支持台上において、接着剤によって各種パッドが接着される。適切な接着剤の選択は、ストリップの性能を改善しかつストリップの寿命を延長する。本発明により、感圧接着剤(pressure-sensitive adhesive)(PSA)が代表的にはラテラルフローアッセイストリップに使用される。典型的なラテラルフローアッセイストリップにおける各種パッドの接着は、接着剤がパッドの孔内に浸透するにつれて達成され、これによりパッドと一緒に支持台を結合する。このような結合に関して、正常的な条件の下での接着剤の流動能力を「コールドフロー(cold flow)」という。PSAをパッドに塗る場合では加熱をしないので、ある程度のコールドフローはパッドと支持台間の結合に必須である。コールドフローの程度があまり低ければ、ストリップの貯蔵期間中に一緒に結合しているパッドまで接着剤が移動し、それにより孔を詰まらせるか、あるいは疎水性のしみが形成されるか、あるいはパッドを再び湿らすという問題につながる。接着剤のコールドフローに関連したこのような問題は直接キャストイング(direct-casting)膜を使用することにより解決できる。例えば、直接キャストイング膜は、支持プラスチックシートによって、接着剤が膜の孔に入り込むことを予防するので、貯蔵期間中に接着剤の上下移動を予防することができる。

30

40

#### 【0043】

##### サンプルパッド

サンプルパッド102はストリップの一方の端部に位置し、サンプルパッドの一方の端部は、クロマトグラフィー媒体104と、または結合体放出パッド103をさらに含む場合には結合体放出パッドの一部と重なり合う。

#### 【0044】

基本的に、サンプルパッドは、分析物が含有された流体試料を受け入れるように働く。このような機能に加えて、サンプルパッドは試料中の不溶性粒子をろ過する機能を持つことができる。このような観点から、本発明のサンプルパッドは、ろ過機能を提供すること

50

ができるセルロースろ過紙またはガラス繊維ろ過紙が好ましい。通常は、S & S社によって製造されるセルロースろ過紙（等級903）を使用する。

【0045】

サンプルパッドは、試料中の分析物がそれに非特異的に吸着されるのを防ぐために、試料の成分がクロマトグラフィー媒体を通して容易に移動し得るために、反応の感度を維持するために、かつ、蛍光物質で標識されたデテクターと試料の成分との間に起こり得る所望しない非特異的反応を防止するために、前処理することが好ましい。サンプルパッドの前処理は、通常、不活性タンパク質または界面活性剤で処理することによって行われる。例えば、不活性タンパク質による前処理を、0.1～10% B A S（ウシ血清アルブミン）含有0.1M トリス緩衝液（pH 6～9）中の0.1%～10% 脱脂粉乳の溶液、および/または0.1%～10% カゼイン溶液にパッド材料を浸すことによって行ってもよい。界面活性剤による前処理を、トリトンX-100またはツイーン20にパッドを浸すことによって行ってもよい。しかし、これらの前処理段階は、分析物および試料の種類によって決定される。

10

【0046】

結合体放出パッド (conjugate releasing pad)

ラテラルフローアッセイストリップは、選択的に結合体放出パッド103を含むことができる。その際、結合体放出パッドの一方の端部はサンプルパッド102と重なり合い、結合体放出パッドの他方の端部はクロマトグラフィー媒体104と重なり合うように、結合体放出パッドを支持台101に接着させる。

20

【0047】

結合体放出パッドには、試料中の分析物と反応して結合体を形成することが可能な、蛍光物質で標識されたデテクターが、接着させられるが固定されない。試料中の分析物と反応することによって結合体を形成した後、それは、クロマトグラフィー媒体を通して試料と一緒に移動することができる。

【0048】

結合体放出パッドに試薬を付着させる方法は、既に行われている公知の方法を含んでもよい。その具体的な例としては、含浸 (impregnation process)、乾燥または凍結乾燥工程を挙げるが、これらに限定されない。

【0049】

結合体放出パッドは、迅速なる過速度と良好な粒子接着能力とを有することが好ましい。このような材料としては、ポリエステルなどの合成素材およびガラス繊維フィルターが使用できる。一般に、ガラスの主成分であるガラス繊維およびポリエステルを使用することができ、本願の実施例ではS & S社によって製造されるガラス繊維を使用した。これらは、生物学的に不活性で、天然材料より精巧な繊維材料を持っているため、水性試薬または試料がアプライされるときに歪んだり膨張したりしない。好ましくは、分析物が、蛍光物質で標識されたデテクターに非特異的に結合するのを防止するとともに、結合体の放出と移動が円滑に行われることができるように、結合体放出パッドを界面活性剤などの試薬で前処理する。

30

【0050】

結合体放出パッドを、その性能および安定性の向上のために、安定化剤および遮断剤により前処理することができる。安定化剤の例としてはスクロース、トレハロースなどの糖類を挙げるができる。遮断剤としてはB S A（ウシ血清アルブミン）、ゼラチン、カゼイン、および脱脂粉乳などのタンパク質類を挙げるができるが、これらに限定されない。

40

【0051】

クロマトグラフィー媒体

クロマトグラフィー媒体104の両端部には、サンプルパッド102と吸収パッド105が重なっている。結合体放出パッドをさらに含む場合には、結合体放出パッド103と吸収パッド105が互いに重なり合わないよう配置されている。

50

## 【 0 0 5 2 】

クロマトグラフィー媒体は支持台 1 0 1 に付着できる。他の方法として、クロマトグラフィー媒体はそれ自体が支持台であってよい。

## 【 0 0 5 3 】

クロマトグラフィー媒体の材料は、流体試料および分析物が毛細管作用によって迅速に移動し、その上に固定されたキャプターに到達できるようにするものであればいずれでもよく、均一な特性を持つことが好ましい。一般に、クロマトグラフィー媒体は、少なくとも 0 . 1  $\mu$ 、好ましくは 1 . 0  $\mu$  の孔径を有する多孔性物質を意味し、それを通して毛細管作用を介して水性媒体は容易に移動することができる。このような材料は、一般に、親水性または疎水性であってよい。その例としては、無機粉末（例えば、ろ過紙およびクロマトグラフィー紙などの繊維含有紙）、合成または改変された天然重合体（例えば、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ（塩化ビニル）、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン、アガロース、ポリアクリレートなど）が含まれ、単独で、あるいは他の物質と組み合わせて使用できる。セラミック物質もまた、用いることができる。

10

## 【 0 0 5 4 】

また、クロマトグラフィー媒体は、多作用性であり、あるいはキャプターとの共有結合を可能とするために多作用性に改変してもよい。

## 【 0 0 5 5 】

前述した性質を有するクロマトグラフィー媒体の例には、S & S 社の A E 9 8、A E 9 9 および A E 1 0 0、Millipore 社の H F 0 9 0、H F 1 2 0、H F 1 3 5、H F 1 8 0 および H F 2 4 0、ならびに Sartorius 社の C N 9 0、C N 1 4 0 および C N 2 0 0 が含まれる。好ましいクロマトグラフィー媒体は C N 9 0 膜（Sartorius 社製）である。C N 9 0 膜は、流速の変化幅が  $\pm 3$  秒と最も小さいため、再現性に優れる。また、C N 9 0 膜は、蛍光物質の増幅が優れているため、単位面積（ $\text{cm}^3$ ）当りリガンドが結合可能な結合能が 1 0 ~ 3 0  $\mu\text{g}$  でも十分である。

20

## 【 0 0 5 6 】

クロマトグラフィー媒体上には、糖化ヘモグロビンレベルの測定のために抗体または H b A 1 c 抗原がキャプターとして特定の区域（抗原分析物検出区域）に添加されている。よって、前記区域から発生する蛍光シグナルをレーザー誘起落射蛍光検出装置によって測定することにより、糖化ヘモグロビンを定量することができる。

30

## 【 0 0 5 7 】

吸収パッド (absorption pad)

吸収パッド 1 0 5 は、ラテラルフローアッセイストリップのサンプルパッドの端部から最も遠いところに位置し、クロマトグラフィー媒体の一端と重なり合っている。

## 【 0 0 5 8 】

吸収パッドは、毛細管作用によってクロマトグラフィー媒体に沿って移動してきた試料を物理的に吸収し、未反応物質を除去するための手段である。すなわち、吸収パッドは、ラテラルフローアッセイストリップの端部に位置し、試料および試薬の移動を調節および促進し、ポンプまたはこれを収容する貯蔵所として作用する。試料および試薬の速度は吸収パッドの質および大きさによって異なってよい。通常使用される吸収パッドはセルロースろ過紙、不織物、布またはセルロースアセテートなどの水吸収材質から形成されたものである。

40

## 【 0 0 5 9 】

図 2 は本発明に係る一体型定量アッセイシステムを示す。本発明に係る一体型定量アッセイシステムは、上述したラテラルフローアッセイストリップ 1 0 0、レーザー誘起落射蛍光検出装置 2 0 0、LED 検出装置 3 0 0 および駆動装置を含む。また、本発明に係る一体型定量アッセイシステムに使用されるレーザー誘起落射蛍光検出装置 2 0 0 および LED 検出装置 3 0 0 の模式図をそれぞれ図 3 - A と図 3 - B に示した。以下、前記一体型定量アッセイシステムを構成するレーザー誘起落射蛍光検出装置および LED 検出装置について詳細に説明する。

50

## 【 0 0 6 0 】

レーザー誘起落射蛍光検出装置

レーザー誘起落射蛍光検出装置（図3-A）は、レーザー201、レーザービーム形状制御用レンズ202、励起フィルター、集光レンズ203、蛍光フィルター204、コンデンサレンズ205、空間フィルター206、光検出器207、アナログデジタルコンバータ（ADC）、および中央処理装置（CPU）を含んでなる。レーザー誘起落射蛍光検出装置は、本発明者による韓国登録特許第10-0639776号で使用されたレーザー誘起落射蛍光検出装置と同一のものを使用することができる。レーザー誘起落射蛍光検出装置は、以下のように操作される。光の点または線形に加工されたレーザー光源の光が励起フィルターを通過した後、試料の所定の位置に入射し、この位置でターゲット物質に付いている蛍光物質が蛍光を発光する。蛍光は、集光レンズ、蛍光フィルターおよびコンデンサレンズを通過し、蛍光成分は、空間フィルターの中心に集束する。平行光は、光検出器に到達し、デジタルシグナルはアナログデジタルコンバータ（ADC）および中央処理装置（CPU）によって換算されて出力される。

10

## 【 0 0 6 1 】

レーザー誘起落射蛍光検出装置は、抗原分析物、好ましくは血液中の糖化ヘモグロビンレベルの定量に使用される。レーザー光源から放出された光が、抗原分析物に特異的に結合する蛍光標識デテクターに照射される。放出された蛍光を光学系によって捕集して光デテクターで定量化する。すなわち、流体試料をアプライした後、免疫反応が終わると、駆動装置によってストリップが所定の速度で光源方向に移動し、このスキャンング過程でレーザー誘起蛍光をデテクターによって測定する。好ましくは、ストリップが移動するにつれて、抗原分析物検出区域から発生するシグナルを数回捕集して定量化する。

20

## 【 0 0 6 2 】

LED検出装置

分析物内の総ヘモグロビンの量を光学的に測定するために、本発明では、LED検出装置（図3-B）を使用する。免疫反応に関与する蛍光物質とは異なり、ヘモグロビンおよび糖化ヘモグロビンはもともと赤色を呈するので、緑色LEDを光源として使用する。すなわち、必要な光源は、458～612nmのガウススペクトルプロファイルを持つ緑色LEDであり、流体試料がアプライされた区域またはクロマトグラフィー媒体上の色素分析物検出区域107から放射される光を、シリコンダイオードを用いて測定するように、光学系をデザインする。蛍光を測定する方式と同様にスキャンング方式を使用し、光源から反射される全体光量を短時間内に測定する。

30

## 【 0 0 6 3 】

本発明に係るラテラルフローアッセイシステムを用いて試料中の抗原分析物を定量する方法について、図面を参照してより詳細に説明する。

## 【 0 0 6 4 】

図1は本発明に係るラテラルフロー定量アッセイに使用されるストリップの模式図を示す。本発明に係る抗原分析物の定量は、流体試料を本発明に係るストリップにアプライすることにより始まる。流体試料はサンプルパッド102に、好ましくはサンプル投入口109を介してアプライされる。試料がサンプルパッドにアプライされると、毛細管作用によって移動し、その移動速度は吸収パッドの質や大きさに応じて変動し得る。この際、試料のアプライ前または移動中に、試料にデテクターが導入されると、一次免疫応答が起って結合体が形成されるが、これは2つの方法によって行われる。一つの方法は以下の通りである：流体試料を試料から採取した後、定量を実施する前に流体試料に直接所定量の標識デテクターを添加し、これにより流体試料中の抗原分析物とデテクターとの一次免疫応答が生じる。得られた流体試料をストリップにアプライする。他の代替方法は、予め蛍光標識されたデテクターを結合体放出パッド103に吸着させて製造した結合体放出パッドを含むストリップに液体試料をアプライする方法である。この際、デテクターは、結合体放出パッド上に吸着されているが、溶媒または結合体放出パッドにアプライされた液体試料に溶解および/または混合されて、抗原分析物との一次免疫応答が起こる。上述した方

40

50

法のいずれも利用できるが、様々な種類のデテクターを適用して分析することが容易であるうえ、総ヘモグロビンレベルの測定も容易なので、第1の方法が好ましい。

【0065】

デテクターは、流体試料中の他の色素分析物には結合しないが、抗原分析物としての糖化ヘモグロビンに特異的に結合する抗体であって、本発明の出願日の前に開示された多様な方法によって製造できる。好ましくは、マウスモノクローナル抗体を使用することができるが、これに限定されない。また、上述したデテクターを試料に導入する方法と関係なく、シグナル発生源となる蛍光物質で標識されたデテクターを使用することが好ましい。

【0066】

前記一次免疫応答の結果、蛍光標識されたデテクター - 抗原分析物の結合体が形成されてクロマトグラフィー媒体104に沿って移動し、抗原分析物に結合しない遊離デテクターは、ストリップに沿って移動して抗原分析物検出区域106に到達する。

10

【0067】

抗原分析物検出区域は、試料のアプライ地点としてのサンプルパッドから所定の距離に位置しており、所定量のキャプターがそこに固定されている。前記キャプターは、糖化ヘモグロビンであり、あるいは前記デテクターを認識することが可能な化合物であって、抗原分析物検出区域に固定されている。したがってキャプターは、液体試料がストリップに沿って展開されても、液体試料と一緒に移動しない。デテクター - 抗原分析物の結合体および/または遊離デテクターを含む試料が、キャプターの固定された領域に到達すると、デテクター、デテクター - 抗原分析物結合体、およびキャプターの間で競合的に二次免疫応答が起こり、レーザー誘起落射蛍光検出装置は、前記キャプターが固定された領域（抗原分析物検出区域）で、蛍光標識されたデテクター - キャプター結合体によって発生したシグナルを収集する。

20

【0068】

また、試料は、引き続きストリップに沿って移動しながら色素分析物検出区域107を通過する。色素分析物検出区域は、特定されていないが、キャプターが固定された区域ではなければストリップ上のいずれの位置でもよい。好ましくは、色素分析物検出区域は、サンプルパッドまたはストリップハウジング110に形成された検査窓108を介して露出された区域であり得る。色素分析物検出区域では、ヘモグロビンの赤色に反応するLEDによって総ヘモグロビンの量が測定される。その後、抗原分析物検出区域および色素分析物検出区域を通過した試料は吸収パッド150に貯蔵される。

30

【0069】

抗原分析物の定量のためにはヘモグロビンおよび糖化ヘモグロビンの標準曲線の作成が必要であり、この際全血が使用され、濃度は当該技術分野における公知の任意の方法によって測定することができる。準備された全血検体を本発明に係るストリップにアプライしてレーザー誘起落射蛍光検出装置によって蛍光を測定し、標準曲線を作成する。

【実施例】

【0070】

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明する。しかし、これらの実施例は例示するものに過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

40

【0071】

実施例1：タンパク質 - 蛍光物質結合体の調製

関心対象の抗原分析物としての糖化ヘモグロビン（HbA1c）に対するマウスモノクローナル抗体にシグナル発生源としての蛍光物質を以下のように連結した。蛍光物質の結合に使用するタンパク質は、少なくとも95%の純度まで精製した。最適な結合のために、このタンパク質を少なくとも1mg/mLの濃度で使用した。蛍光物質との反応を容易にするために、精製したタンパク質をアンモニアまたはアミンイオンの入っていない緩衝溶液（0.1M重炭酸ナトリウム、pH8.5）で4の冷蔵庫で12~24時間透析した。透析したタンパク質を、使用するまで零下20で冷凍庫で保管した。緩衝溶液で透析したタンパク質を、粉末状のAlexa647蛍光物質（Molecular Pro

50

b e s、米国)へ直接しかしゆっくり添加した後、4 の冷蔵庫で1~2時間この混合物を撈拌した。

【0072】

#### 実施例2：タンパク質-蛍光物質結合体の精製

S e p h a d e x G - 2 5を充填した分配カラムを用いて、タンパク質/蛍光物質結合体と反応せずに残っている余分の蛍光物質を除去した。精製緩衝溶液は0.1M重炭酸ナトリウム(pH8.5)を使用した。精製したタンパク質/蛍光物質結合体は、使用するまで冷蔵または零下20 の冷凍庫に保管した。

【0073】

#### 実施例3：ニトロセルロース膜へのキャプターの固定

濃度と量を変化させて、B i o d o t分注器を用いてキャプターH b A 1 cを細い線の形状でニトロセルロース膜上に固定した。タンパク質が固定化された膜を、25 および湿度35~50%に維持される除湿装置内で2時間保管した。次いで、タンパク質を安定化し、かつ試薬間の非特異的反応を防ぐために、膜を安定化液(1%BSA、0.05%Twee n 2 0、1%スクロース、0.1%PVA)で処理して5分間平衡化させた。前記安定化液成分として、BSAはゼラチンで置換してもよく、Twee n 2 0はトリトンX-100で置換してもよく、スクロースはトレハロースで置換してもよく、PVA(ポリビニルアルコール)はPEGまたはPVP(ポリビニルピロリドン)で置換してもよい。余分な溶液を除去した後、膜を40 で30分間乾燥した。乾燥した膜を、25、RH35~50%が維持される適切な容器内で使用まで保管した。

10

20

【0074】

#### 実施例4：サンプルパッドの前処理

ニトロセルロース膜を介しての溶液成分の移動を容易にし、反応の高い感度を維持し、かつタンパク質/蛍光物質結合体と試料との非特異的反応による実験誤差を防ぐために、サンプルパッドを前処理した。

【0075】

前処理溶液(20mMトリス-Cl、0.1%トリトンX-100、0.05%Na N<sub>3</sub>、pH8.5)を用い、この溶液1mLを繰り返してかけることで、サンプルパッド(2.5x30cm)を十分に濡らして10分間平衡化した。全血を試料として用いる場合には、他の前処理溶液(PBS、10mMホスフェート、150mMNaCl、1%BSA、0.05%Twee n 2 0、0.05%NaN<sub>3</sub>、pH7.4)を用いて赤血球の溶血を防止した。余分な溶液を除去した後、熱によるパッドの変形を防ぐために、サンプルパッドを50~60の温度で1時間真空乾燥した。タンパク質/蛍光物質結合体の変性を最小化するために、凍結乾燥法を選択した。準備したパッドは前記膜と同一条件下で、適切な容器で保管した。

30

【0076】

#### 実施例5：糖化ヘモグロビン用蛍光免疫クロマトグラフィーアッセイストリップの製造

ニトロセルロース膜(NC膜)、サンプルパッド、吸収パッドおよび支持台を、460mmのサイズを有するストリップを製造するために、使い捨てカセットに組み立てた。キャプターとしてのヒト糖化ヘモグロビン(2mg/mL)を、B i o D o t分注器を用いて0.88μL/cmの量で線の幅が0.8mmとなるようにNC膜上に分注した後、RH35~50%で2時間固定化した。次いで、タンパク質を安定化し、かつ試薬間の非特異的反応を防ぐために、膜を安定化液(1%BSA、0.05%Twee n 2 0、0.1%PVA)で処理して5分間平衡化させた(前記安定化液成分として、BSAはゼラチンで置換してもよく、Twee n 2 0はトリトンX-100で置換してもよく、スクロースはトレハロースで置換してもよく、PVAはPEGまたはPVPで置換してもよい)。余分な溶液を除去した後、処理した膜を40 で30分間乾燥した。試験に使用する膜は、サンプルパッド、吸収パッドなどと重ね合わせた後、切断器を用いて4mmの幅に切断し、最終的にストリップが4x60mmの寸法を有するようにした。

40

【0077】

50

Bio Dot分注器 (Irvine、CA、米国) を用いて、NC膜上に内部標準の対照の線としてストレプトアビジン (3 g/L) を、 $1 \mu\text{L}/\text{cm}$  の量で線の幅が 1 mm となるように分注した。製造されたストリップは、レーザー蛍光スキャナのホルダーにフィットするように設計された使い捨てカセット (16 x 90 mm) 中で組み立て、除湿室で包装した後、使用まで室温で保管した。

【0078】

#### 実施例 6：デテクター緩衝溶液の調製

一般に既知のラテラルフロークロマトグラフィーで使用される、デテクターを結合体放出パッドに固定する方式の代わりに、このデテクターを液体状態で新しいチューブに保管した。採取した血液が  $5 \mu\text{L}$  に過ぎないため、展開膜上で移動を誘発するには足りない体積である。したがって、緩衝溶液の添加が必要である。使用した緩衝溶液は、1% BSA の添加された PBS である。

【0079】

#### 実施例 7：赤血球溶血溶液の調製

10 mM Kpi 溶液 1 L にフェリシアン化カリウム 50 g を溶かした後、赤血球の溶血のためにジギトニン 100 mg をそこへ添加して pH 7.4 の溶液を調製した。調製した溶液を  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブレインフィルターを用いて滅菌し、使用まで冷暗所に保管した。

【0080】

#### 実施例 8：LED 検出システムを用いたヘモグロビンの標準曲線の作成

ヘモグロビン測定のための参照物質としては、既知の生化学試験によって測定し濃度が確認された全血を使用した。準備された溶液を糖化ヘモグロビン測定用ストリップにアプラインして、糖化ヘモグロビンとヘモグロビンを同時に測定するように製造された機器でヘモグロビン値を測定し、標準曲線を作成した。シリコンダイオードによって測定されたヘモグロビン濃度は、既知の生化学試験によって測定された濃度と比較したところ、完全に一致することを確認した。濃度依存的な結果を図 4 に示した。ストリップで測定された濃度と既存の方法で測定された濃度とは相関が高かった ( $R^2$  値が 0.98 以上)。再現性を示す CV% 値は 3% 未満であり、信頼性が非常に高かった。

【0081】

#### 実施例 9：免疫クロマトグラフィー方法を用いた糖化ヘモグロビン標準曲線の作成

糖化ヘモグロビン検出溶液を調製するために、BSA-ビオチン結合体 ( $0.1 \text{g}/\text{L}$ ) と抗 HbA1c 抗体 ( $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を使用した。糖化ヘモグロビン 0.25、0.5、1、および  $2 \text{mg}/\text{mL}$  それぞれを検出溶液と 1:1 の比率で混合した。カセットのサンプルホルダーに各混合物  $75 \mu\text{L}$  を添加した。混合溶液をアプラインしたカートリッジは、室温で 12 分間反応させた後、蛍光検出器を用いて蛍光強度を測定した。検査の線と対照の線で記録された結果を、準備されたプログラムを用いて面積値 (検査の線:  $A_T$ 、対照の線:  $A_C$ ) に転換した後、面積比 ( $A_T/A_C$ ) を用いて、抗原の濃度を計算し、図 5 に示した。図 5 によれば、面積値は糖化ヘモグロビンの濃度に濃度依存的に比例し、この標準曲線を用いて HbA1c% 値を計算した。その結果、HbA1c の濃度とは相関が高かった ( $R$  値: 0.99)。CV% の値も 5% 程度と低かった。

【0082】

#### 実施例 10：既知の HbA1c 測定装置を用いた実検体の比較試験

HPLBio-Rad Variant II を使用して糖化ヘモグロビン値を確認した後、本発明の糖化ヘモグロビン測定システムを用いて実検体を測定した。測定値を違いに比較した。結果の値を比較した資料を図 6 に示した。本発明で使用した免疫分析法と HPLC 法は、原理的には互いに異なる方法であるが、 $R$  値は 0.96 であって、相関が高かった。

【産業上の利用可能性】

【0083】

本発明に係るラテラルフローアッセイストリップ、レーザー誘起落射蛍光検出装置およ

10

20

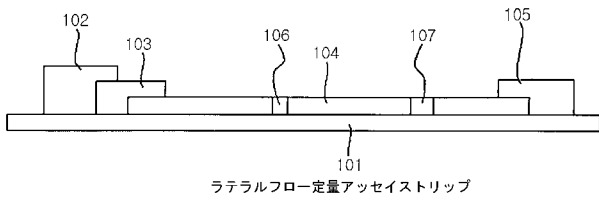
30

40

50

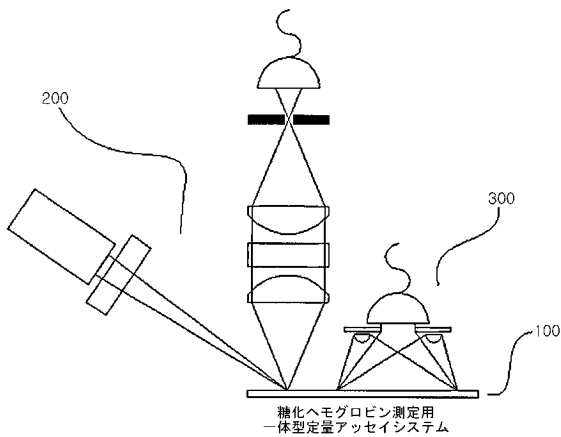
びLED検出装置からなるラテラルフロー定量アッセイシステムは、抗原-抗体反応によって効果的に糖化ヘモグロビンを定量する方法を提供する。その結果、グルコースレベルの管理が必要な患者に非常に有用である。

【図1】



ラテラルフロー定量アッセイストリップ

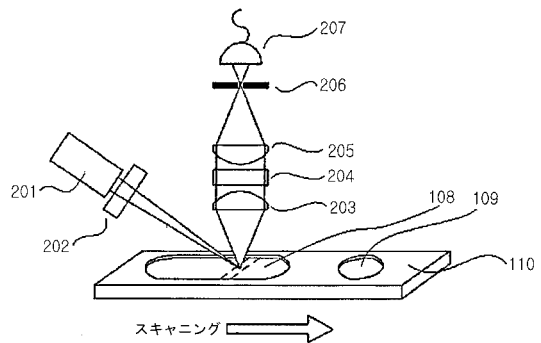
【図2】



糖化ヘモグロビン測定用  
一体型定量アッセイシステム

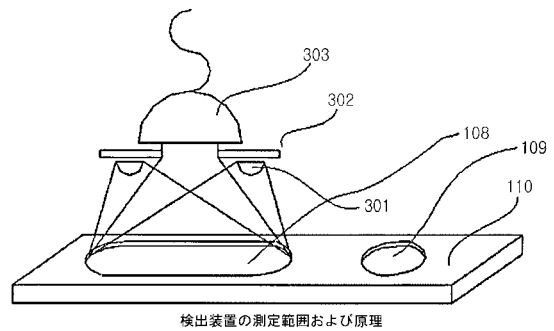
【図3】

A: レーザ誘起落射蛍光検出装置



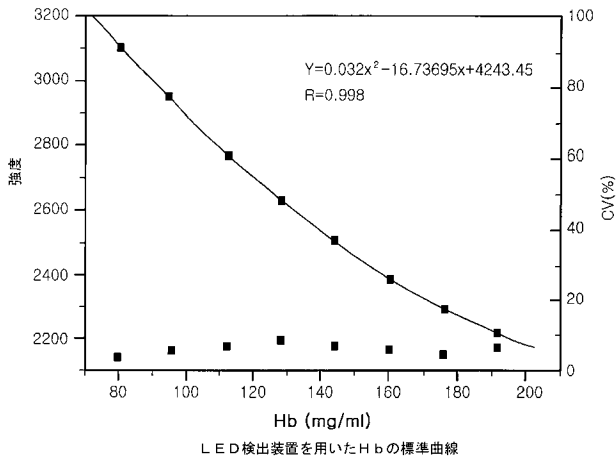
スキャニング

B: LED検出装置

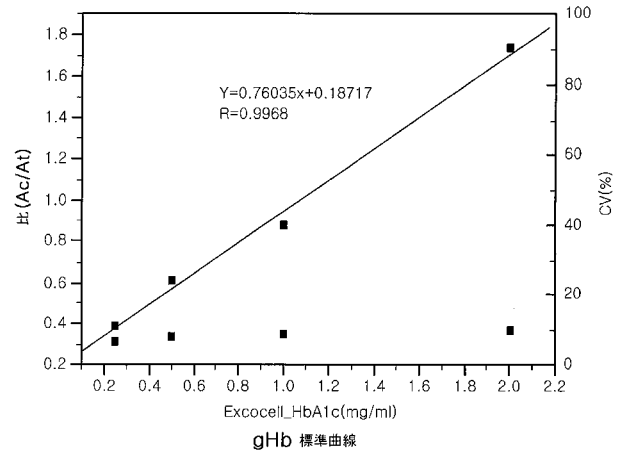


検出装置の測定範囲および原理

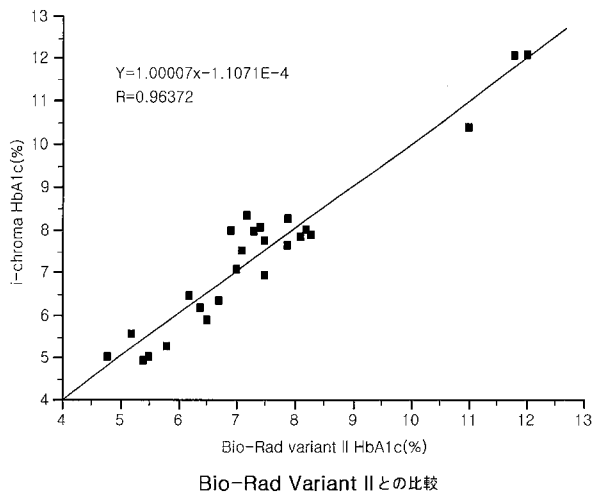
【 図 4 】





【 図 5 】



【 図 6 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2008/006306</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/72(2006.01)i, G01N 30/88(2006.01)i, B01D 15/08(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC : G01N 33/72, G01N 30/88, B01D 15/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models since 1975 Japanese Utility models and applications for Utility models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  eKIPASS (KIPO internal) & keywords: glycohemoglobin		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/066624 A1 (BIO-MED PHOTONICS CO. LTD., et al.) 21 July 2005 See page 11, line 19 - page 117, line 21; and figures 1-17.	1 - 16
A	KR 10-2006-0023098 A (BIO FOCUS LTD.) 13 March 2006 See page 2, line 44 - page 3, line 35; and claims 1-5.	1 - 16
A	JP 14-303629 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND. CO. LTD.) 18 October 2002 See paragraph 6 - paragraph 45; and figure 1.	1 - 16
A	US 4,647,654 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC.) 03 March 1987 See column 5, line 10 - column 16, line 43; and claims 1-3.	1 - 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 JUNE 2009 (03.06.2009)		Date of mailing of the international search report <b>04 JUNE 2009 (04.06.2009)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, CHUNG HO Telephone No. 82-42-481-8133 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2008/006306**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005/066624 A1	21.07.2005	EP 1550872 A2	06.07.2005
		EP 1550872 A3	02.11.2005
		WO 2005-065548 A1	21.07.2005
		WO 2005-068893 A1	28.07.2005
		WO 2005-070635 A1	04.08.2005
		WO 2006-051246 A1	18.05.2006
KR 10-2006-0023098 A	13.03.2006	None	
JP 14-303629 A	18.10.2002	CN 1380551 A	20.11.2002
		EP 1255111 A1	06.11.2002
		JP 2002-303629 A	18.10.2002
		KR 10-2002-0079488	19.10.2002
		US 2002-146754 A1	10.10.2002
US 4647654 A	03.03.1987	CA 1339952 C	14.07.1998
		DE 3586679 D1	29.10.1992
		EP 0185870 B2	17.06.1998
		EP 0316306 A2	17.05.1989
		ES 548270 D0	01.05.1987
		ES 556865 D0	16.10.1987
		ES 8705633 A1	16.07.1987
		ES 8800435 A1	01.01.1988
		FI 84107 B	28.06.1991
		FI 854187 D0	25.10.1985
		IE 930440 L	29.04.1986
		IL 76827 D0	28.02.1986
		IL 76827 A	29.11.1990
		IL 91034 A	29.11.1990
		IL 91034 D0	09.02.1990
		JP 07-051087	28.02.1995
		JP 61-172064 A	02.08.1986
		JP 61-172064	02.08.1986
		JP 7051087 A	28.02.1995
		NZ 213959 A	27.03.1990
		NZ 228194 A	27.03.1990
		US 4658022	14.04.1987
US 4727036	23.02.1988		

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 21/64 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/52	A
	G 0 1 N 21/78	C
	G 0 1 N 21/64	F
	G 0 1 N 21/78	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 チェ ウイ ユル

大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ ウドゥ - ドン 1068 サムスン アパートメント #102-1205

(72) 発明者 ナム キエ ボン

大韓民国 ソウル カンナム - ク デチ - ドン 612 クッチェ アpartment #2-207

(72) 発明者 キム ジェ ホン

大韓民国 キョンギ - ド ヨンイン - シ スチ - ク チュクチェン - ドン 33ブロック チュクチェン ハウジング ディベロップメント エリア シンヨン プロバンス コトメ メウル ハラ #605-1102

(72) 発明者 ジョン ドン ソク

大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ ソクサ - ドン 727-5 チンファン アpartment #104-702

(72) 発明者 バク サン ヨル

大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ ソクサ - ドン トエケ ジュゴン 5 - チャ アpartment #518-303

(72) 発明者 ムン チュン デ

大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ ウドゥ - ドン ロッテ アpartment #109-1001

(72) 発明者 ジュン ジン ハ

大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ フピョン - ドン 711-55 ダカク チュテ

ク #エイ - 202

(72)発明者 キム ヨン ミン  
大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ フピョン 3 - ドン セキョン アパートメント  
# 403 - 304

(72)発明者 ジュン ソ ヨン  
大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ フピョン 3 - ドン 95 - 4

(72)発明者 パク エ キュン  
大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ キョ - ドン 147 - 1 ダカク チュテク #  
402

(72)発明者 キム ビョン チュル  
大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ フピョン - ドン ヒュンダイ 2 - チャ アパー  
トメント # 203 - 1008

(72)発明者 キム スン ジュン  
大韓民国 カンウォン - ド チュンチョン - シ キョ - ドン 93 - 133 ホワイトヒル # 4  
02

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 EA01 HA01 HA02 HA09 JA02 KA09 LA01  
2G045 AA07 CA25 DA45 DA51 FA12 FB03 FB06 FB11 FB12 GA06  
GC11 GC15  
2G054 AB04 CE02 EA03 FA06 FA17 FA19 FA20 FA32 GA05

专利名称(译)	用于定量测量糖化血红蛋白的系统和使用其测量糖化血红蛋白含量的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011509404A</a>	公开(公告)日	2011-03-24
申请号	JP2010541385	申请日	2008-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	BODITECHMED		
申请(专利权)人(译)	车身技术医学公司		
[标]发明人	チェウイユル ナムキエボン キムジェホン ジョンドンソク パクサンヨル ムンチュンデ ジュンジンハ キムヨンミン ジュンソヨン パクエキユン キムビヨンチュル キムスンジュン		
发明人	チェ ウイ ユル ナム キエ ボン キム ジェ ホン ジョン ドン ソク パク サン ヨル ムン チュン デ ジュン ジン ハ キム ヨン ミン ジュン ソ ヨン パク エ キュン キム ビヨン チュル キム スン ジュン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/72 G01N33/52 G01N21/78 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/723 G01N33/726		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.V G01N33/543.511.A G01N33/543.575 G01N33/72.A G01N33/52.A G01N21/78.C G01N21/64.F G01N21/78.A		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA09 2G043/JA02 2G043/KA09 2G043/LA01 2G045/AA07 2G045/CA25 2G045/DA45 2G045/DA51 2G045/FA12 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB11 2G045/FB12 2G045/GA06 2G045/GC11 2G045/GC15 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/FA06 2G054/FA17 2G054/FA19 2G054/FA20 2G054/FA32 2G054/GA05		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		

## 摘要(译)

本发明中，侧流测定条，其中包括使用相同的在免疫学方法中的血液激光诱导落射荧光检测装置和LED检测器，用于在同一时间检测所述血液中的血红蛋白和糖化血红蛋白的装置，和血红蛋白和糖化血红蛋白同时出现。

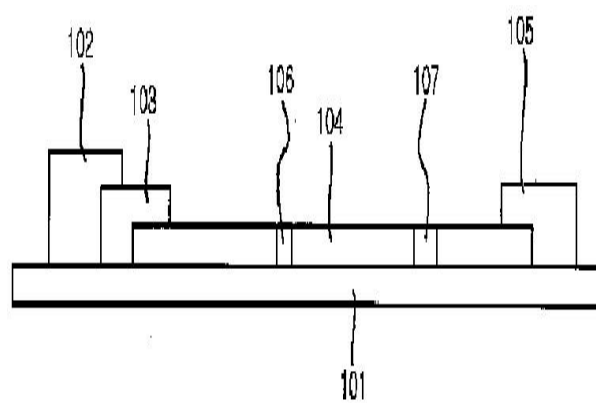


FIG. 1: Lateral flow quantitative assay strip