

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/112318

発行日 平成29年1月19日 (2017.1.19)

(43) 国際公開日 平成26年7月24日 (2014.7.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 B
	GO 1 N 33/543	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁)

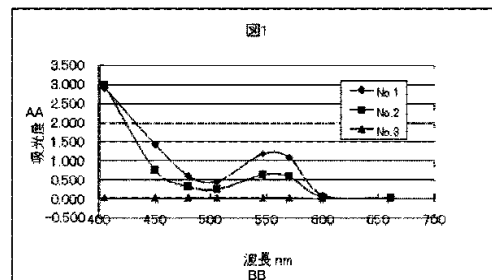
出願番号 特願2014-557383 (P2014-557383)	(71) 出願人 306008724 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/084905	
(22) 国際出願日 平成25年12月26日 (2013.12.26)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-5130 (P2013-5130)	(74) 代理人 110001656 特許業務法人谷川国際特許事務所
(32) 優先日 平成25年1月16日 (2013.1.16)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 鉄本 融 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 株式会社ティエフビー内
	(72) 発明者 平田 稔 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 株式会社ティエフビー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検体中のヘモグロビンA1cの免疫測定方法

(57) 【要約】

全血試料を前処理することなくヘモグロビンA1cを免疫測定できる手段が開示されている。本発明による検体中のヘモグロビンA1cの免疫測定は、ラテックス粒子と前処理が施されていない全血検体を低張液中で接触させ、次いで、ラテックス粒子上に吸着したヘモグロビンA1cと抗ヘモグロビンA1c抗体を接触させることを含む。免疫測定は、好ましくは凝集法により行なわれる。低張液は、例えば、緩衝能が中性からアルカリ側で最大となるグッドバッファーを0.02~0.2mol/Lの濃度で含む緩衝液である。



AA Absorbance
BB Wavelength (nm)

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラテックス粒子と前処理が施されていない全血検体を低張液中で接触させ、次いで、ラテックス粒子上に吸着したヘモグロビンA1cと抗ヘモグロビンA1c抗体を接触させることを含む、検体中のヘモグロビンA1cの免疫測定方法。

【請求項2】

前記免疫測定が凝集法により行なわれる請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記低張液が、緩衝能が中性からアルカリ側で最大となるグッドバッファーを0.02~0.2mol/Lの濃度で含む緩衝液である請求項1又は2記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体中のヘモグロビンA1cの免疫測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘモグロビンA1c (HbA1c) は、2本の鎖と2本の鎖からなるヘテロテトラマー構造を有するヘモグロビン (Hb) において、鎖のN末端パリンのアミノ基が非酵素的にグリコシル化した糖化ヘモグロビンである。このHbA1cの血中量は糖尿病の比較的長期の血糖コントロール状態を反映する。従って、HbA1cを測定することは血糖コントロール状態を知る上で臨床的に極めて有意義であり、糖尿病の治療効果のモニタリング等のためにHbA1cの測定が行なわれてきた。その後、糖尿病の診断基準は2010年7月から改定され、HbA1c値が網膜症の発症との間に一定の関係が認められることが評価され、HbA1c 6.1%以上 (JDS値) が糖尿病の判定基準に加えられた (非特許文献1)。さらに2012年4月からは世界標準に合わせるため、6.1%以上 (JDS値) から6.5%以上 (NGSP値) へと変更された。

20

【0003】

近年、HbA1c測定において、検査センターを中心に、HPLC法での多数検体処理の限界から、自動分析機による免疫測定法の開発が進んだ。そして、遠心沈降血の血球層から血球を採取し、検体希釈液で溶血液を調製する機器も開発され、自動化が進んだ。

30

【0004】

しかし、遠心操作や溶血・希釈などの前処理が出来ないとして敬遠する施設があることも事実であり、自動化が進んだとは言えHPLC法と比較すれば、免疫法においては、前処理が必要であることに変わりはない。例えば、遠心沈降血の希釈溶血をせず、全血検体を希釈溶血して測定するにしても、HbA1c測定では赤血球中のヘモグロビンが測定対象であり、赤血球中に存在するが、採血後に採血管を立てておくと、赤血球は沈降し、血清サンプルのように、液面からのサンプリングでは沈降した赤血球を採取することが出来ないことになる。そこで、転倒混和後短時間のうちにサンプリングをするか、管底近くにニードルを差し込んで採取する必要があった。また、HbA1cの特異的部位である鎖N末端は、蛋白質分子の高次構造の中に埋没して存在するために、ネイティブな状態ではHbA1cに特異的なモノクローナル抗体と反応しないことが分かっている。したがって、このことによっても、HbA1cに変性剤を加えて蛋白質の高次構造を変化させたり、あるいは鎖N末端領域を酵素で切断して抗体と反応可能な状態にする、などの前処理が必要であった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第2677753号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】糖尿病 53 (6) 450, 2010

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、全血試料を前処理することなくHbA1cを免疫測定できる手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、低浸透圧の緩衝液中にラテックス粒子を浮遊させたラテックス試薬中に全血検体を前処理なしでそのまま添加することにより、ヘモグロビンが大過剰で存在することの悪影響を受けることなく、全血検体の溶血とラテックス粒子表面へのヘモグロビンの吸着を生じさせることができ、溶血処理や変性処理なしで抗HbA1c抗体によりHbA1cを検出可能であることを見出し、本願発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、ラテックス粒子と前処理が施されていない全血検体を低張液中で接触させ、次いで、ラテックス粒子上に吸着したヘモグロビンA1cと抗ヘモグロビンA1c抗体を接触させることを含む、検体中のヘモグロビンA1cの免疫測定方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、例えばラテックス粒子を含む低張液と全血検体を接触させるという1工程の中で、全血の溶血及びヘモグロビンのラテックス粒子上への吸着の両者を達成することができる。従来HbA1c免疫測定法では検体の希釈溶血処理や特別な変性処理が必須であったが、本発明によればそのような前処理工程を省略することができる。特に、汎用の自動分析機では、検体希釈と溶血のためだけに反応槽(セル)を使用している例もあるが、本発明によればその必要がなくなるため、検体処理能力が飛躍的に向上する。処理時間が短縮化されるほか、従来前処理に使用されていた試薬類やチューブ、チップ等の消耗品も低減され、医療廃棄物量及び実施のコストを抑えることができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】HbA1c標準品溶液(No.1)、溶血処理済み全血溶液(No.2)、及び血漿溶液(No.3)のそれぞれについて、吸光度を測定した結果である。分光光度計の性能を考慮し、通常使用濃度より2倍希釈したものを測定した。

【図2】2通りの標準試料を調製して作成した検量線である。

【図3】血球希釈溶血サンプルと、前処理が施されていない全血検体をそのまま全血サンプルとして測定したときの、反応過程における吸光度の変化を示したものである。

【図4】標準品にグロブリンを異なる濃度で加えて調製した標準試料で作成した検量線である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の方法は、採血後の全血を前処理なしでそのまま用いることを特徴とする。「前処理」とは、ラテックス粒子と検体とを接触させる前に検体に対して施される処理であり、溶血処理及びタンパク質変性処理が包含される。採血後の血液の溶血を防ぐためのEDTA添加やヘパリン添加は本発明にいう「前処理」に包含されない。

【0013】

本発明で用いる低張液は、全血を溶血させることができる程度に浸透圧が低い水性の液体であれば特に限定されない。血液の浸透圧は約280 mOsm/kgH₂Oであるから、これよりも十分に低い浸透圧(例えば100 mOsm/kgH₂O以下)の液体であれば低張液として使用可能である。例えば、低張液として純水を用いてもよく、あるいは中性からアルカリ側で緩衝能が最大となるグッドバッファーを適当な濃度(例えば0.02~0.2mol/L程度)で含む低浸透圧の緩衝液を好ましく用いることもできる。そのようなグッドバッファーの具体例としては、以下のものを挙げるができるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

BES [N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid]
 MOPS [3-Morpholinopropanesulfonic acid]
 TES [N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid]
 HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]
 DIPSO [3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid]
 TAPSO [3-(N-tris[Hydroxymethyl]methylamino)-2-hydroxypropanesulfonic acid]
 POPSO [Piperazine-1,4-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)]
 HEPPSO [N-(Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-hydroxypropanesulfonic acid]
 EPPS [3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propanesulfonic acid]
 Tricine [N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine]
 Bicine [N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine]
 TAPS [N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid]

10

【 0 0 1 4 】

本発明で用いるラテックス粒子は、未感作のもの、すなわち、抗原等のタンパク質を吸着させていないラテックス粒子である。ラテックス粒子自体は、公知のHbA1c免疫凝集測定キットで用いられているものと同じものを使用することができる。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法では、前処理が施されていない全血検体とラテックス粒子を低張液中で接触させ、ラテックス粒子表面にヘモグロビン（通常のヘモグロビン及び糖化ヘモグロビンであるHbA1cが含まれる）を吸着させる。全血検体中にはラテックス粒子量に比して過剰量のヘモグロビンが存在するが、通常のヘモグロビンと糖化ヘモグロビンHbA1cとの間では未感作ラテックスへの吸着に実質上差がないため、ラテックス粒子表面に吸着されるHbA1c量は、全血検体中に存在する総Hb量に占めるHbA1cの比率をそのまま反映することになる。ラテックス粒子（粒径 50～200nm、濃度 0.05～0.2%）を含む低張液100～200 μ Lを用いる反応系の場合、全血検体を1 μ L～2 μ L程度添加すればよい。全血検体とラテックス粒子を低張液中で接触させる時間は、上記したスケールの反応系なら室温もしくは37で1～5分程度でよい。従来のHbA1c免疫測定法において用いられている抗HbA1c抗体は、HbA1cに特異的な鎖N末端領域を認識する抗体であるが、この鎖N末端領域はHbA1c分子の高次構造中に埋没して存在するため、抗HbA1c抗体でHbA1cを免疫測定するためには検体の変性処理も通常必要となる。しかしながら、ラテックスにHbA1cを吸着させると、HbA1cの鎖N末端領域が露出するので、特別な変性処理なしでも抗HbA1c抗体による免疫測定が可能になる。

20

30

【 0 0 1 6 】

次いで、ラテックス粒子上に吸着したHbA1cと、抗HbA1c抗体を接触させ、免疫測定により検体中のHbA1cを測定する。免疫測定の手法自体はこの分野において周知であり、本発明の方法ではいずれの手法を用いてもよい。免疫測定法を反応形式に基づいて分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法、イムノクロマト法、ウエスタンブロット法等があり、標識で分類すると、放射免疫測定、蛍光免疫測定、酵素免疫測定（EIA）、ビオチン免疫測定等があるが、これらのいずれもが本発明で言う「免疫測定」に包含され、本発明の方法に採用することができる。本発明において最も好ましい免疫測定の手法は凝集法であるが、ラテックス粒子を含む低張液と溶血処理が施されていない全血検体を接触させ、ラテックス粒子表面にHbA1cを吸着させた後、この反応液を粒子ごとサンプルとして用いて通常の免疫測定を行ない、HbA1cを測定することができるので、凝集法以外の手法も利用可能である。なお、本発明において、「測定」という語には定性的検出、定量、半定量が包含される。

40

【 0 0 1 7 】

例えば、凝集法では、ラテックス粒子の表面に吸着したHbA1cと抗HbA1c抗体とを接触させることで、抗HbA1c抗体によりHbA1cを介してラテックス粒子が結合、凝集し、反応液の濁度が増加する。目視で反応液の濁りを確認することでHbA1cの存在を検出することができる（定性的検出）。自動分析機等で濁度を光学的に測定し、HbA1c量を定量することも

50

できる。その場合、HbA1c濃度が既知の標準試料を準備して測定を行ない、各標準試料の濁度を光学的に測定し、濁度測定値とHbA1c濃度との関係をプロットして検量線を作成しておけばよい。全血検体の測定値をこの検量線に当てはめることで、全血検体中のHbA1c量を求めることができる。

【0018】

サンドイッチ法によりHbA1cを測定する場合、抗Hb抗体（HbA1cを含めヘモグロビン全般に結合する）を固相に固定化しておき、ラテックス粒子を含む低張液と全血検体を接触させた反応液を固相化抗体と反応させ、洗浄後、標識された抗HbA1c抗体を反応させ、洗浄後、固相に結合した標識抗体を標識からのシグナルに基づいて測定すればよい。抗HbA1c抗体を固相化抗体とし、抗Hb抗体を標識抗体として用いてもよい。HbA1c濃度が既知の標準試料を測定し、シグナル強度とHbA1c濃度との関係をプロットして検量線を作成し、この検量線に全血検体の測定値を当てはめれば、全血検体中のHbA1c量を定量することができる。

10

【0019】

サンドイッチ法の一例として、例えばラテラルフロー方式のイムノクロマトグラフィーでHbA1cを測定する場合、イムノクロマト器具は以下のような構成のものを用いればよい。

【0020】

ニトロセルロース膜のような多孔性素材からなるマトリックスは、通常、帯状に形成される。このマトリックス上に、抗HbA1cモノクローナル抗体を固相化した検出ゾーンを設け、その上流側（後述する展開液が流れる方向における上流側）に、標識した抗Hbモノクローナル抗体を点着した標識試薬ゾーンを設ける。標識試薬ゾーンは、通常、標識抗体を点着した多孔性のパッドにより構成される。マトリックスの上流端には、展開液を貯蔵した展開液槽を設ける。標識として酵素を用いる場合、標識酵素の基質を点着した基質ゾーンを標識試薬ゾーンの上流に設ければよい。

20

【0021】

測定時には、HbA1cをラテックス粒子表面に吸着させた後の反応液を粒子ごと標識試薬ゾーンに添加する。添加後に展開液槽を破ると、展開液がマトリックスの毛管現象により下流に向かって流れる。基質ゾーン及び標識試薬ゾーンを展開液が順次通過し、基質、標識抗体、及びヘモグロビンが吸着したラテックス粒子が展開液と共に下流に流れていく。この時にラテックス粒子表面のヘモグロビンと標識抗Hb抗体とが抗原抗体反応により結合する。この免疫複合体が検出ゾーンに達すると、ラテックス粒子表面のヘモグロビンのうちのHbA1cを介して標識抗体が検出ゾーンの抗HbA1c抗体に捕捉される。基質も同時に流れているため、標識抗体が捕捉された検出ゾーンが呈色する。この呈色を目視により判定すればよい。呈色の有無に基づいてHbA1cの定性的検出が可能である他、検出ゾーンの呈色の強さに基づいて大まかな定量も可能である。

30

【0022】

なお、イムノクロマト器具では、検出ゾーンに固相化する抗体を抗Hb抗体とし、標識試薬ゾーンに点着する標識抗体を抗HbA1c抗体としてもよい。また、標識物質に対する抗体を上記検出ゾーンの隣に点着してコントロールゾーンを設け、標識抗体の展開が適切に生じたかどうかを確認できるようにしてもよい。

40

【0023】

抗HbA1c抗体は公知であり、抗HbA1c抗体を用いたHbA1c免疫測定キットも各種のものが市販されている。本発明ではそのような公知の抗HbA1c抗体を用いることができる。また、抗体の作製方法も周知の常法であるので、糖化していない通常のヘモグロビンと区別してHbA1cを特異的に認識できる抗体を作製して用いてもよい。上記の通り、HbA1cに特異的な部位は鎖N末端領域であるので、このHbA1cの鎖N末端領域を免疫原として用いて動物（ヒトを除く）を免疫し、該動物体内でHbA1cに対する抗体を誘起させれば、該動物の血清からHbA1cに対するポリクローナル抗体を得ることができる。また、免疫した動物から脾細胞を回収し、常法のハイブリドーマ法により、HbA1cに特異的に結合する抗HbA1cモ

50

ノクローナル抗体を調製することができる。免疫測定における再現性等の観点から、本発明では抗HbA1cモノクローナル抗体を用いることが好ましい。

【0024】

上記の免疫原として用いるHbA1cの鎖N末端領域の調製方法、及び該領域に対するモノクローナル抗体の作製方法の具体例は、例えば特許文献1（特許第2677753号）等に詳述されており、当業者であれば適宜調製することができる。以下、そのプロセスについて具体的に説明する。

【0025】

免疫原として用いるHbA1cの鎖N末端領域は、ヘモグロビン鎖のN末端領域に相当するペプチドを合成し、N末端アミノ酸残基であるバリンのアミノ基にグルコースを非酵素的に結合させることにより調製することができる。糖化处理に付すペプチドの合成は、市販のペプチド合成機を用いて常法により実施できる。合成するヘモグロビン鎖N末端領域は数残基程度でよい。配列番号1にはヒトヘモグロビン鎖N末端の5残基の配列を示した。調製後のN末端ペプチドを酢酸に溶解し、ピリジン存在下でモル比2倍量のグルコースを添加し、室温で約10日間攪拌することにより、N末端ペプチドを糖化することができる。ペプチドが糖化されるとHPLCでの保持時間が短くなるので、糖化反応の進行はHPLCでチェックすることができる。HPLCによる分析条件は、例えば以下の通りでよい。

10

【0026】

カラム：TSKgel、ODS-120A（4.6×250mm、東ソー社製）

機器：島津HPLCシステム

20

移動相：10%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸から60%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸への直線勾配

流速：0.8mL/min

時間：25min

モニター：吸光度280nm

【0027】

得られた糖化ペプチド（HbA1cの鎖N末端領域）は、例えば以下の分離条件でHPLC精製することができる。

【0028】

カラム：TSKgel、ODS-120A（21.5×300mm、東ソー社製）

30

移動相：10%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸から60%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸への直線勾配

流速：5mL/min

モニター：吸光度280nm

【0029】

精製後のペプチドから、ペプチド化学合成工程で付加されているシステイン保護基を常法により脱離後、上記の分離条件（ただしモニターする吸光度は215nmでよい）で再度HPLC精製したものを免疫原として用いることができる。

【0030】

上記の通りに製造したHbA1cの鎖N末端領域は数残基のサイズであるので、免疫原として用いる場合、適当なキャリアタンパク質（例えば、チログロブリン、エデスチン等）に結合させ、適当なアジュバント（例えば、完全フロインドアジュバント、不完全フロインドアジュバント等）と混合して動物（ヒトを除く）に免疫すればよい。これにより、上述した通り、該動物体内で免疫原に対する抗体を誘導することができ、該動物から脾細胞を回収してハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体を調製することができる。

40

【0031】

HbA1cへの望ましい特異性を有する抗HbA1c抗体のスクリーニングは、例えば、通常のヘモグロビンを固相化したプレートとHbA1cを固相化したプレートを準備し、得られた複数ラインの抗体の両者への反応性を確認することにより実施できる。通常のヘモグロビンへの結合性がバックグラウンド程度以下であり、かつ、HbA1cへの反応性が高い抗体を、HbA

50

1c特異抗体として好ましく用いることができる。

【0032】

適当な標準試料を調製して検量線を作成すれば、HbA1cの定量も可能になる。本発明では全血検体を用いるが、血球溶血処理検体と比べて全血検体には血漿が多く含まれる。このような検体を用いる場合、検量線の作成には、血清、血漿ないしは血漿タンパク質（例えばアルブミン、グロブリン等）、その他の生体タンパク質等の適当な物質を添加して調製したHbA1c標準試料を用いればよい。このような技術自体は常法であり、当業者であれば適宜、全血検体の測定に適したHbA1c標準試料を調製して検量線を作成することができる。

【実施例】

【0033】

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

【0034】

1. 緩衝液による溶血の確認

前処理が施されていない全血検体の測定系では、ラテックス試薬（ラテックス粒子を含む低浸透圧の緩衝液）中に全血を添加して赤血球の溶血及びヘモグロビンのラテックス表面への吸着を完結させる必要がある。そのため、まず、ラテックスを浮遊させる緩衝液自体に赤血球を溶血させる効果があるかどうかを確認した。

【0035】

表1に示す溶液をそれぞれチューブに2mLとり、これに全血10 μ Lを加え、目視で溶血の判定を行なった。0.15M NaClは溶血を生じさせない溶液として検討に加えた。

【0036】

【表1】

	使用した溶液	結果
1	0.15M NaCl	-
2	市販のキットに含まれる検体希釈液	+
3	R1緩衝液(ラテックス試薬に用いる緩衝液)	+++

2の組成:

アジ化ナトリウムを主成分とする低浸透圧の緩衝液

3の組成:

緩衝能が中性からアルカリ側で最大となるグッドバッファーを主成分とする低浸透圧の緩衝液

【0037】

市販のキットに含まれる検体希釈液でも溶血は確認されたが、採血直後の全血ではクリアな溶血ではなかった。しかし、採血3時間後の全血を添加した場合には、R1緩衝液との間で明確な差はなかった。R1緩衝液では採血直後の全血でもクリアに溶血した。

【0038】

2. 全血サンプルでの吸光度測定

下記のサンプルについて、分光光度計Ubest-V530(JASCO)で吸光度を測定した。

No.1: HbA1c標準品(凍乾品、市販)にR1緩衝液2mLを加えて復元したもの

No.2: 全血10 μ LをR1緩衝液2mLに添加して溶血したもの

No.3: 血漿10 μ LをR1緩衝液2mLに溶解したもの

【0039】

結果を図1に示す。全血検体の溶血液は、ヘモグロビン濃度が標準品の約半分であることが確認された。標準品(サンプルNo.1)は血球層から血球を採取して溶血したサンプルを想定したものであり、全血検体(サンプルNo.2)は血漿が含まれる分、サンプルNo.1よりもヘモグロビン濃度が低くなっていた。ヘモグロビン色素の吸光度を示す波長がほぼ

10

20

30

40

50

00nm より短波長側に限定されているので、その影響を避けるために、ラテックスの凝集の程度を測定するための波長は、それよりも長波長側の波長を使用する必要があることを示す。

【 0 0 4 0 】

3 . 免疫凝集法による前処理が施されていない全血サンプルからのHbA1cの検出

HbA1c標準品（凍乾品、市販）を用いて以下の2通りの標準試料（HbA1c濃度は0.0%～14.9%）を調製し、日立7170自動分析機を用いてラテックス凝集法による測定を行ない、検量線を作成した（図2）。HbA1c特異抗体として、市販のキットにも用いられている公知の抗HbA1cモノクローナル抗体（特許文献1参照）を用いた。

標準試料1：

HbA1c標準品を検体希釈液1 mLで復元し、4.8 μLをサンプルとした。

標準試料2：

HbA1c標準品を検体希釈液100 μLで復元し、12 μLをサンプルとした。

【 0 0 4 1 】

ラテックス粒子を浮遊させたR1緩衝液を用いて、日立7170自動分析機により全血サンプル2 μLの測定を行なった。測定シグナルを図2に示した2種の検量線にそれぞれ当てはめ、全血サンプル中のHbA1c濃度を算出した。その結果、表2に示す通りに濃度が算出された。

【 0 0 4 2 】

【表2】

用いた検量線	HbA1c濃度
標準試料1	4.63%
標準試料2	4.70%

【 0 0 4 3 】

ここで使用した全血サンプルの血球層から血球を採取して溶血させ、従来法による測定を行なったところ、HbA1cの濃度は5.2%と算出された。検量線を作成する標準試料の種類に応じて測定値が変動したが、溶血等の前処理をしない全血サンプルをダイレクトに免疫測定しても測定値を得ることができることが確認された。標準試料を適当に調製すればより正確な測定が可能になる。

【 0 0 4 4 】

4 . 免疫凝集法による前処理を施されていない全血からのHbA1cの検出時における反応過程の吸光度変化

全血検体の血球層から血球を採取して溶血させた希釈サンプルと、前処理を施されていない全血サンプルをダイレクトに免疫測定した場合の反応過程の吸光度変化を図3に示した。

【 0 0 4 5 】

全血サンプルの測光ポイント1で吸光度が高いのは、溶血の途中であることを示していて、測光ポイント2では吸光度はほぼ一定になっていることから、溶血が速やかに進行していることが示された。希釈サンプルの反応過程の吸光度変化と比較して、全血サンプルの場合は、全体的に吸光度は高い方に平行移動してかさ上げされている状態だった。かさ上げの原因は、赤血球の溶血後の細胞膜などの残骸の影響と思われた。測定値は、R2試薬（抗体液）が入るポイント16過ぎから、最終ポイント34の間の適当な区間の吸光度差で求めるので、かさ上げの実質上の影響は無いことになる。

【 0 0 4 6 】

5 . 標準品に異なる濃度のグロブリンを加えてHbA1c標準試料を調製して測定することにより作成した検量線

HbA1c標準品（凍乾品、市販）を用いて、以下の4通りの標準試料（HbA1c濃度は0.0%～14.9%）を調製し、2 μLをサンプルとして日立7170自動分析機を用いてラテックス凝集法による測定を行ない、検量線を作成した。その検量線を図4に示す。

標準試料 3 :

HbA1c標準品をR1緩衝液 100 μLで復元したもの。

標準試料 4 :

HbA1c標準品を、 グロブリン1.25mg/mL 含むR1緩衝液 100 μLで復元したもの。

標準試料 5 :

HbA1c標準品を、 グロブリン 2.5mg/mL 含むR1緩衝液 100 μLで復元したもの。

標準試料 6 :

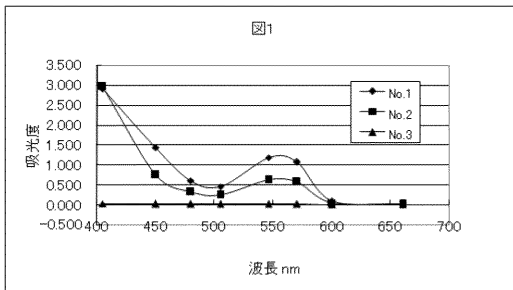
HbA1c標準品を グロブリン 5mg/mL 含むR1緩衝液 100 μLで復元したもの。

【 0 0 4 7 】

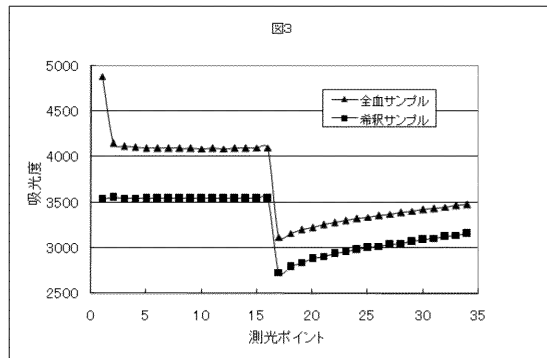
グロブリンの濃度が高くなるにつれて、検量線のシグナルは低下した。検体の最低分注可能サンプル量は自動分析機により異なるため、加える グロブリン等の濃度及び標準試料のサンプル量は、前処理を施されていない全血サンプルの量 (μL) と、ラテックス試薬の濃度や試薬量により、適宜最適なものを検討選択して決めることができる。

10

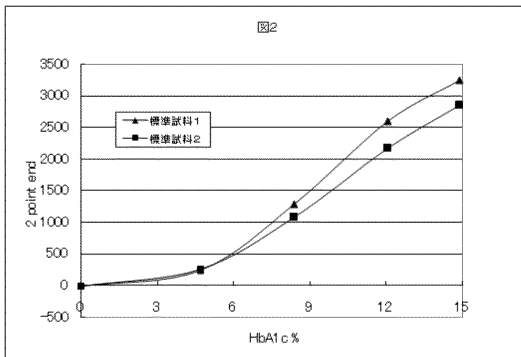
【 図 1 】



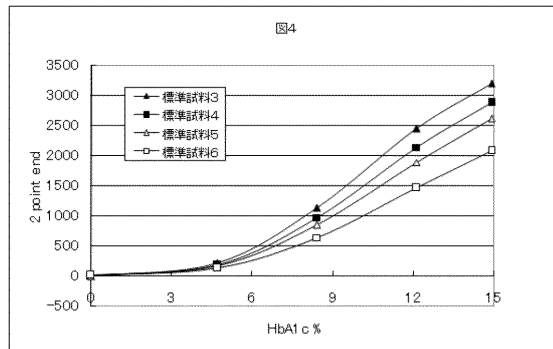
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



【配列表】

2014112318000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/084905
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, G01N33/48, G01N33/545 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 7-35752 A (SRL, Inc.), 07 February 1995 (07.02.1995), (Family: none)	1-3
A	JP 2004-59477 A (Fujikura Kasei Co., Ltd.), 26 February 2004 (26.02.2004), (Family: none)	1-3
A	JP 2001-296292 A (Horiba, Ltd.), 26 October 2001 (26.10.2001), (Family: none)	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 January, 2014 (21.01.14)		Date of mailing of the international search report 28 January, 2014 (28.01.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 8 4 9 0 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, G01N33/48, G01N33/545											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	JP 7-35752 A (株式会社エスアールエル) 1995.02.07, (ファミリーなし)	1-3									
A	JP 2004-59477 A (藤倉化成株式会社) 2004.02.26, (ファミリーなし)	1-3									
A	JP 2001-296292 A (株式会社堀場製作所) 2001.10.26, (ファミリーなし)	1-3									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 21.01.2014		国際調査報告の発送日 28.01.2014									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 将志	2 J 4 6 3 6								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

フロントページの続き

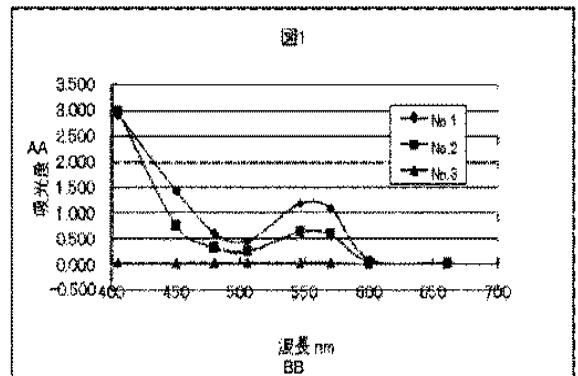
(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	免疫测定样品中血红蛋白A1c的方法		
公开(公告)号	JPWO2014112318A1	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2014557383	申请日	2013-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	鉄本融 平田稔		
发明人	鉄本 融 平田 稔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/721 G01N33/723		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.581.B G01N33/543.ZNA		
优先权	2013005130 2013-01-16 JP		
其他公开文献	JP6172163B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了无需预处理全血样品就可以免疫测定血红蛋白A1c的方法。对根据本发明的样品中的血红蛋白A1c进行免疫测定，将未经过乳胶颗粒预处理的全血样品在低渗溶液中接触，然后将血红蛋白A1c和抗血红蛋白A1c抗体吸附在乳胶颗粒上。正在联络。免疫测定优选通过凝集法进行。低渗溶液是，例如，含有在中性至碱性侧具有最大缓冲能力的Good缓冲液的浓度为0.02~0.2mol / L的缓冲液。



AA Absorbance
BB Wavelength (nm)