(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2014/132833

発行日　平成29年2月2日(2017.2.2)

(43)国際公開日　平成26年9月4日(2014.9.4)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53 S	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543 581J	
G01N 33/545	(2006.01)	G01N	33/545 ZNAZ	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 17 頁）

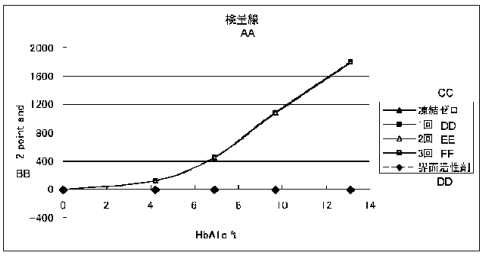
出願番号　特願2015-502870 (P2015-502870)
(21)国際出願番号　PCT/JP2014/053686
(22)国際出願日　平成26年2月18日(2014.2.18)
(31)優先権主張番号　特願2013-40337 (P2013-40337)
(32)優先日　平成25年3月1日(2013.3.1)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(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
(74)代理人　110001656
特許業務法人谷川国際特許事務所
(72)発明者　鉄本　融
東京都中央区日本橋浜町二丁目６２番５号
株式会社テイエフビー内
(72)発明者　平田　稔
東京都中央区日本橋浜町二丁目６２番５号
株式会社テイエフビー内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】未感作ラテックス試薬の劣化防止方法

(57)【要約】
免疫測定キットにおけるラテックス試薬の分散状態を良好に維持し、温度変化による凝集沈殿の発生を防止して測定性能の劣化から試薬を保護する手段であって、ラテックス試薬が少量に分注された形態の免疫凝集測定キットに対しても適用できる新規な手段が開示されている。本発明の免疫測定試薬は、溶媒中に未感作のラテックス粒子とトリメチルグリシンとを含む。試薬中のトリメチルグリシンの濃度は、好ましくは5～10w/v%である。当該試薬は、例えばヘモグロビンA1cの免疫測定試薬として好ましく用いることができる。



AA Calibration curve
BB 2 point end
CC No freezing
DD One time
EE Two times
FF Three times
DD Surfactant

【特許請求の範囲】
【請求項１】
溶媒中に未感作のラテックス粒子とトリメチルグリシンとを含む免疫測定試薬。
【請求項２】
試薬中のトリメチルグリシン濃度が5～30w/v％である請求項１記載の試薬。
【請求項３】
試薬中のトリメチルグリシン濃度が5～10w/v％である請求項１記載の試薬。
【請求項４】
凝集法による免疫測定試薬である請求項１ないし３のいずれか１項に記載の試薬。
【請求項５】
ヘモグロビンA1cの免疫測定試薬である請求項１ないし４のいずれか１項に記載の試薬。
【請求項６】
未感作ラテックス粒子を含有する免疫測定試薬にトリメチルグリシンを共存させることを含む、前記免疫測定試薬の劣化防止方法。
【請求項７】
試薬中のトリメチルグリシン濃度が5～30w/v％である請求項６記載の方法。
【請求項８】
試薬中のトリメチルグリシン濃度が5～10w/v％である請求項６記載の方法。
【請求項９】
前記免疫測定試薬が凝集法による免疫測定試薬である請求項６ないし８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記免疫測定がヘモグロビンA1cの免疫測定試薬である請求項６ないし９のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、未感作ラテックスを用いた免疫測定試薬の性能の劣化を防止する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
免疫測定キットにおけるいわゆるラテックス試薬では、一般的には、測定目的物に特異的に反応する抗体、もしくは測定目的抗体に反応する抗原物質をあらかじめラテックス表面に固相化して担持させている。このようなラテックス試薬の保存安定性を向上させるため、糖類及び／または界面活性剤が添加され、凍結乾燥が試みられている（特許文献１、２）。このような手法によれば、ラテックス試薬の安定保存が可能であろう。しかし、こうした凍結乾燥を行なう手法では、使用前にラテックス液の復元処理が必要となり、ユーザーにとっては利便性が良くなかった。
【０００３】
ユーザーの利便性を考えるならば、そのまま使用できる液状のラテックス試薬が望ましい。使用前の復元処理を要しない液状のラテックス試薬としては、凍結劣化保護のために、糖類や界面活性剤などが添加されているものが一般的である。しかし、ラテックス表面からの固相化された抗原や抗体蛋白が剥離してくる問題が完全には解決されておらず、凍結しても問題なしとするラテックス試薬は未だ存在しない。
【０００４】
未感作ラテックスを用いたヘモグロビンA1cの免疫測定試薬の場合、ラテックス液の凍結保護対策は、主に保管輸送時の温度管理を徹底させることで行なってきており、ラテックス試薬量も２０ｍＬ以上の容量があることから、過去には実質的に凍結による試薬の劣化が問題になることはなかった。

【０００５】
ところが近年では、一般病院で、診察待ちの時間を利用して、診察前に採血、検査を実施し、その結果を診察に反映させる試みが広がっている。そのような現場で使用されているものは、小型の専用機で測定する試薬であり、試薬も１テスト分が前もってカートリッジ内に小分け分注してある。その試薬量は0.1ｍＬ程度である。標準品による検量線はデータとして予め記憶されているため、試薬の反応性が変化すると測定値が変わってしまうことになり、試薬の性能の安定性は従来以上に厳しく要求されることになる。このように試薬量が少なくなると、輸送時の温度変化を受けやすくなり、試薬の性能が損なわれることがある。例えば、製品を冷蔵輸送する際に低温側への変動で過冷却になると、少量で分注されている試薬が短時間で凍結する可能性が高くなる。実際、未感作ラテックスを使用したヘモグロビンA1cの免疫凝集測定キットでは、小分け分注したラテックス試薬が冷蔵輸送で過冷却になり、ラテックス液が凍結し、その結果としてラテックスの凝集沈殿が起こり、試薬として使用不能になる事例が実質的に起きている。そこで近年、ラテックス試薬の凍結劣化保護が緊急の課題となった。

【０００６】
特許文献２には、感作ラテックスを凍結乾燥させる際に添加する凍結防止剤が記載されており、分子量の大きな多糖類やPVPやTween20などの界面活性剤の名前が挙げられている。

【０００７】
特許文献３は、ある種のアミン化合物を用いることにより、担体粒子の自然凝集を起こさせず特異反応に基づく凝集を促進する凝集測定用試薬及び測定方法を提供するとし、そのアミン化合物にベタイン塩酸塩が含まれるとしている。しかし、その実施例に示されているデータを見ると、ベタイン塩酸塩を150mM感作ラテックスに加えたものと無添加のコントロールを比較して、4℃　3日間静置後の上清で、ベタイン添加の方が成績が良かったのは3項目中2項目、攪拌後では3項目中1項目のみであり、ベタイン添加により感作ラテックスの分散状態を維持し、自然凝集等による沈降が防止されていることを示しているとは言えない。ベタイン添加により凍結による凝集が防止されていることを示しているわけでもない。

【０００８】
免疫測定キットとは技術分野が異なるが、インクジェットインクの組成物中にベタインを加えることにより、凍結・解凍によるインクの凝集沈殿を防ぐことが知られている（特許文献４）。しかしながら、ラテックス試薬において、凍結劣化保護を目的としてベタインをラテックス液に添加して使用した例は知られていない。

【先行技術文献】
【特許文献】
【０００９】
【特許文献１】特開平１１－２５８２４１号公報
【特許文献２】特開昭６１－２２２５３１号公報
【特許文献３】国際公開公報ＷＯ２００７／０７４８６０
【特許文献４】特開２００１－２７１０１３号公報

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
本発明は、免疫測定キットにおけるラテックス試薬の分散状態を良好に維持し、温度変化による凝集沈殿の発生を防止して測定性能の劣化から試薬を保護する手段であって、ラテックス試薬が少量に分注された形態の免疫凝集測定キットに対しても適用できる新規な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】
【００１１】
ラテックス試薬に凍結保護剤として加えるものとして、上記の通り、糖類や界面活性剤

が知られていた。しかしながら、未感作ラテックスを使用するヘモグロビンA1cの免疫測定試薬では、試料中のヘモグロビンを希釈したサンプルをラテックス試薬に加えることにより、ラテックス表面にヘモグロビンA1cを物理吸着させている。このような免疫測定試薬の場合、凍結保護剤として物理吸着を阻害する界面活性剤は使用することができない。さらに、カートリッジにごく少量封入されたラテックス試薬は、その構造にもよるが、微小な構造内を自由に流動させることが必要となる。すなわち、添加物によりラテックス試薬の粘性が上がり、流動性が悪くなると、試薬の性能に影響がでてくる問題がある。従って、分子量の大きいものも使用は困難である。

【００１２】

本願発明者らは、以上のことを踏まえて鋭意検討した結果、ラテックス試薬に適当量のベタイン（トリメチルグリシン）を添加することで、凍結・解凍を経た後でもラテックス粒子の凝集沈殿を防止して免疫測定試薬としての性能を維持できることを見出し、本願発明を完成した。

【００１３】

すなわち、本発明は、溶媒中に未感作のラテックス粒子とトリメチルグリシンとを含む免疫測定試薬を提供する。また、本発明は、未感作ラテックス粒子を含有する免疫測定試薬にトリメチルグリシンを共存させることを含む、前記免疫測定試薬の劣化防止方法を提供する。

【発明の効果】

【００１４】

本発明により、ラテックス試薬の凍結・解凍による性能劣化を防止する新規な方法が提供された。本発明によれば、ラテックス試薬が凍結しても凝集が起こらず、免疫測定試薬としての性能を維持できることから、輸送時の温度管理の悪い地域にも性能を劣化させずに輸送可能になる。ベタインは低分子の物質であり、数％の濃度で用いても糖類のように試薬の粘性を高めるおそれがないので、試薬量の少ないカートリッジ式の免疫測定キットに適用しても、流動性が低下することによる悪影響の懸念がない。また、界面活性剤のように、未感作ラテックス粒子上への測定対象タンパク質の吸着を妨げるおそれもない。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】ベタインを6w/v％添加したラテックス試薬R1を０回～６回の凍結解凍処理に付した場合の、シグナルの数値の変化を示すグラフである。

【図２】ベタインを6w/v％添加したラテックス試薬R1（凍結解凍０回～３回）を用いて、HbA1c標準品のシグナルを測定して作成した検量線である。ベタインに代えて界面活性剤であるTween 20を添加したR1試薬（凍結解凍１回）を用いて同様に作成した検量線もあわせて示す。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

本発明の免疫測定試薬は、ラテックス粒子を溶媒中に浮遊させた形態の試薬（ラテックス試薬）であり、ラテックス粒子として未感作の粒子を用いること、及びベタインを含有することを特徴とする。

【００１７】

「未感作」とは、抗原又は抗体等のタンパク質がラテックス粒子表面に実質的に担持されていない状態を指す。ラテックス凝集法による免疫測定方法のひとつとして、ラテックス試薬に未感作のラテックス粒子を用いる手法が知られている（特許第2677753号）。該手法では、未感作ラテックス粒子を検体試料と接触させることにより測定対象タンパク質を粒子表面に吸着させ、これに対象タンパク質に対する抗体を反応させて粒子の凝集を生じさせ、反応液の濁度により対象タンパク質の量を測定する。本発明は、こうした手法による免疫測定法に好ましく適用することができる。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。

【００１８】

ラテックス粒子自体は、公知の免疫凝集測定キットで用いられているラテックス粒子と同じものを使用することができる。具体的には、ラテックス粒子の平均粒径は0.04～0.8μm程度、例えば0.08～0.2μm程度であり得る。ラテックスの材質は特に限定されないが、ポリスチレンラテックス等のスチレン系ラテックス、アクリル酸系ラテックス等が好ましく用いられる。表面の疎水性が強いラテックス（例えばポリスチレンラテックス）を用いることは、検体試料中の測定対象タンパク質の吸着をスムーズにする上で好ましい。更には、種々の変性ラテックス（例えば、カルボン酸変性ラテックス）、磁性ラテックス（磁性粒子を内包させたラテックス）等を必要に応じて用いてもよい。

【００１９】

溶媒は、ラテックス凝集法による免疫測定キットのラテックス試薬において、ラテックスを浮遊させる液体として通常使用される緩衝液であってよい。例えば、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、これらに限定されない。試薬中のラテックス濃度は通常0.05～0.5w/v%程度である。

【００２０】

本発明で用いるベタインとはトリメチルグリシン(N,N,N-trimethylglycine)である。未感作ラテックスを含む溶媒中にトリメチルグリシンを含有させるためには、トリメチルグリシンの無水物、水和物又は塩を溶媒中に添加すればよい。トリメチルグリシンの塩の具体例としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等が挙げられるが、これらに限定されない。

【００２１】

免疫測定試薬中のベタインの含有量は、好ましくは5～30w/v%であり、例えば5～25w/v%、5～20w/v%、5～10w/v%、5.5～8.5w/v%、又は5.5～7.5w/v%であり得る。ラテックス試薬中にベタインを含有させることで、試薬の輸送中や貯蔵中の温度変化（例えば、過冷却による凍結及びその後の融解）により生じるラテックス粒子の凝集沈殿の発生を抑制し、免疫測定試薬としての性能の劣化を防止することができる。ベタイン濃度5～30w/v%の範囲であれば、凍結・解凍0回と1回でシグナル検出値に差が無く、凍結劣化防止効果が得られる。ベタイン濃度が5w/v%未満では、凍結・解凍を繰り返すとシグナル検出値が上昇する傾向があり、正確な測定値を得ることが困難である。一方、ベタイン濃度が8.5w/v%を超えると、凍結・解凍を繰り返すことによりシグナル検出値は若干低下する傾向があるが、凍結・解凍0回のシグナル検出値も低下しており、凍結・解凍の回数による低下を比率で評価すればいずれの濃度でもほぼ同じであることが確認されている。つまり、8.5w/v%を超える濃度では、測定シグナルの絶対値がさらに低下するだけであって性能劣化を防止する効果自体は得られるが、劣化防止の効果がさらに向上することは無かった。従って、特に限定されないが、ベタインの使用濃度は8.5w/v%以下、例えば7.5w/v%以下としてよい。もっとも、ラテックス試薬に含有させるベタインの最適な濃度は、ラテックスの種類や濃度、緩衝液の種類により変わり得るので、適宜最適なベタイン濃度を検討することができる。例えば、試薬中のラテックス濃度を高くするとシグナル検出値が高まるので、ベタインを高めの濃度で用いる場合にはラテックス濃度を高めるとよい。

【００２２】

未感作のラテックス試薬を利用する免疫測定法の具体例として、ヘモグロビンA1c（HbA1c）の免疫測定方法を挙げることができる。HbA1cは、2本のα鎖と2本のβ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、β鎖のN末端バリンのα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り、近年では糖尿病の判定基準としてHbA1cが用いられている。糖化していないHbとHbA1cとを区別して免疫測定する場合、HbA1cに特異的な領域であるβ鎖N末端領域に対する抗体が用いられる。このβ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が、ラテックス表面にHbA1cを吸着させるとHbA1cのβ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。未感作ラテックス試薬を用いる市販のHbA1c免疫測定キットは、このような原理を利用したキットである。本発明の試薬は、例えばこのようなHbA1c免疫測定キットに好ましく適用することができる。

【００２３】

本発明の免疫測定試薬を用いた凝集法によるHbA1cの免疫測定は、未感作ラテックス試薬にベタインを含有させること以外は、上記した市販のHbA1c免疫測定キットを通常通りに使用して行なうことができる。測定の工程を具体的に説明すると、まず、本発明の試薬と血液等の検体試料を接触させることにより、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。検体は、変性処理は不要であるが、必要に応じて希釈溶血処理や遠心処理等の前処理を施してもよい。次いで、ラテックス粒子上に吸着したHbA1cと抗HbA1c抗体を接触させる。抗HbA1c抗体によりHbA1cを介してラテックス粒子が結合、凝集するので、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）。あるいは、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できる。後者の場合、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。検体の測定値をこの検量線に当てはめることで、検体中のHbA1c量を求めることができる。

【００２４】

もっとも、ラテックス粒子上に吸着させたHbA1cは、ラテックス粒子ごと免疫測定のサンプルとして使用することもできるので、凝集法以外の免疫測定法によりラテックス粒子上のHbA1cを測定しても差し支えない。免疫測定の手法自体はこの分野において周知であり、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」に包含される。

【００２５】

例えば、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、本発明の免疫測定試薬と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、この検量線に検体の測定値を当てはめれば、検体中のHbA1c量を定量することができる。

【００２６】

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。

【００２７】

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。

【００２８】

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。

【００２９】

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。

【００３０】

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β鎖N末端領域であるので、このHbA1cのβ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、抗HbA1cモノクローナル抗体を用いることが好ましい。

【００３１】

上記の免疫原として用いるHbA1cのβ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。

【００３２】

免疫原として用いるHbA1cのβ鎖N末端領域は、ヘモグロビンβ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α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。糖化処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β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β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日間撹拌することにより、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。

【００３３】

カラム：TSKgel、ODS-120A（4.6×250mm、東ソー社製）
機器：島津HPLCシステム
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

【００３４】

得られた糖化ペプチド（HbA1cのβ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。

【００３５】

カラム：TSKgel、ODS-120A（21.5×300mm、東ソー社製）
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

【００３６】

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。

【００３７】

上記の通りに製造したHbA1cのβ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、適当なキャリアータンパク質（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。

【００３８】

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、HbA1c特異抗体として好ましく用いることができる。

【００３９】

以上、測定対象物としてHbA1cを例に本発明の免疫測定試薬の使用方法を説明したが、未感作ラテックス粒子を用いての免疫測定が可能な物質である限り、本発明の免疫測定試薬はいかなる物質の測定に用いることもできる。

【実施例】

【００４０】

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。

【００４１】

＜検討１＞

公知のHbA1c免疫測定キットに含まれる未感作ラテックス試薬（以下R1試薬）及び抗HbA1c抗体液（以下R2試薬）をそれぞれ１０ｍＬチューブに約５ｍＬ分注した。チューブを－20℃の冷凍庫で一夜保存し、R1試薬及びR2試薬を凍結させた。これらを室温に放置して解凍し、試薬の状態を目視で確認した。

【００４２】

R1試薬はラテックスが白色の凝集沈殿を起こしており、沈殿後の液は透明になっていた。免疫測定試薬としては明らかに使用不能の状態だった。一方、R2試薬には外見上の変化は無かった。そこで、凍結・解凍０回のR2試薬及び凍結・解凍１回のR2試薬を、凍結・解凍０回のR1試薬と共に日立7170自動分析機にセットし、HbA1c標準品を測定して検量線を描かせたところ、検量線は一致した。これにより、抗体液は凍結解凍を経ても測定性能に影響しないことが確認された。従って、凍結による劣化からの保護の検討はラテックス試薬について行なった。

【００４３】

＜検討２＞

R1試薬にベタイン（トリメチルグリシン）を3w/v％～10w/v％の範囲で１％刻みに加えて、凍結・解凍の影響を調べた。各濃度のベタインを加えたR1試薬を３等分し、1本を4℃に保存した。他の2本を、検討１同様に一晩－20℃の冷凍庫に保存し、翌日室温放置により解凍した。ラテックスが凝集沈殿しているものは無かったが、チューブの底部に白色のラテックス濃度が高くなっていたので、軽く転倒混和した。2本のうちの1本を4℃に保存し、残りの1本を一晩－２０℃に保存した。翌日、室温で解凍し、軽く転倒混和した。

【００４４】

凍結・解凍が0回、1回、2回のR1試薬を並べて日立7170自動分析機にセットし、HbA1c標

準品を副波長800nm／主波長660nmで測定して検量線を描かせた。各標準品の2 point endのシグナルを表１に示す。

【００４５】

【表１】

Betaine濃度	凍結･解凍回数	シグナル（2 point end）				
		STD 0	STD L	STD M1	STD M2	STD H
3w/v%	0回	−9	135	546	1357	2290
	1回	21	377	1148	2316	3304
	2回	23	409	1214	2325	3223
4w/v%	0回	−10	131	511	1246	2096
	1回	9	182	633	1474	2458
	2回	12	197	677	1548	2553
5w/v%	0回	−10	123	478	1161	1959
	1回	−4	126	467	1140	1957
	2回	2	140	511	1218	2046
6w/v%	0回	−7	119	459	1115	1865
	1回	−10	118	450	1080	1840
	2回	−5	124	463	1101	1872
7w/v%	0回	−11	115	436	1030	1734
	1回	−6	114	433	1026	1735
	2回	−6	108	407	980	1687
8w/v%	0回	−7	110	404	953	1608
	1回	−10	108	401	950	1611
	2回	−6	105	387	929	1577
9w/v%	0回	−9	103	381	885	1487
	1回	−8	105	380	901	1496
	2回	−9	98	361	851	1454
10w/v%	0回	−8	97	356	825	1381
	1回	−11	98	356	825	1391
	2回	−8	93	339	796	1358

【００４６】

ベタイン濃度６w/v%前後で、凍結解凍を繰り返してもシグナルの数値が安定していることが確認された。ベタイン濃度が低くなると、凍結解凍の繰り返しによりシグナルが上昇する傾向があり、またベタイン濃度が高くなると、凍結解凍の繰り返しによりシグナルが低下する傾向がみられた。

【００４７】

＜検討３＞

検討２の結果より、R1試薬に加えるベタインの濃度は６w/v%付近が適当であると考えられた。そこで、ベタインを６w/v%又は７w/v%添加したR1試薬を調製し、各7本に分割し、1本を4℃に保存し、残り6本を－20℃に一晩保存した。翌日に全ての本数を取り出し、室温で解凍させ、軽く転倒混和し、1本を4℃に移し、残りを－20℃に一晩保存した。これを繰り返し、凍結・解凍の回数が0回から6回までのR1試薬を準備した。これらのR1試薬とR2試薬を日立7170自動分析機にセットし、検量線を描かせた。

【００４８】

図１は、ラテックス試薬R1にベタインを６w/v%加えたもので、凍結・解凍の回数6回までの検量線のシグナルの変化を示す。凍結・解凍3回までは、特に大きな変化は見られな

かったが、凍結・解凍4回目以降はシグナルの低下が見られた。ベタイン７w/v%の場合も同様の結果であった。

【００４９】

図２は、６w/v%ベタイン添加R1試薬の、凍結・解凍3回までの検量線を重ねて示したものである。シグナルの変化がほとんどないことから、ラテックス試薬が万一凍結したとしても、解凍させて使用すれば、凍結・解凍を経験していないR1試薬と同じ様に反応することが判明した。すなわち、厳しく要求される試薬の安定性を満たしていることになる。７w/v%ベタイン添加R1試薬においても、同様の結果が得られた。

【００５０】

＜検討４＞

公知のHbA1c免疫測定キットに含まれる未感作ラテックス試薬同等品（R1試薬）にベタインを５%から２５%になるように添加した。ベタイン添加によりラテックス濃度が低下するので、ラテックス原液を加えて調整した。このベタイン添加未感作ラテックス試薬の一部を－２０℃に２晩放置した後、室温に放置して解凍した。この解凍後、転倒混和したR1試薬と、冷蔵保存したR1試薬を並べて、日立７１７０自動分析機にセットして検量線を描かせた。なお、抗HbA1c抗体液（R2試薬）は、増感剤の量を少し増やしたものを使用した。

【００５１】

表２は副波長800nm／主波長660nmでの各標準品の2 point endのシグナルを示す。R1試薬の凍結の有無での差異は見られなかった。また、検量線を描かせてコントロールの測定を行ったところ、測定値も一定であった。

【００５２】

【表２】

ﾍﾞﾀｲﾝ添加	5%		10%		15%		20%		25%	
凍結の有無	無	有	無	有	無	有	無	有	無	有
STD (A1c%)										
0	-8	-13	-12	-14	-14	-16	-16	-18	-19	-21
4.2	214	219	176	176	142	143	116	117	87	84
6.9	801	807	624	618	480	488	369	375	274	266
9.7	1941	1961	1446	1451	1081	1085	813	807	583	568
13.3	3385	3417	2521	2524	1869	1878	1380	1396	985	966
測定値										
CTL Low	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
CTL High	10.0	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.2	10.1	10.3

【００５３】

表３は、R1試薬のラテックス濃度を５０%増量したものを調製して使用した以外は、表２の検討と同様に行ったものである。ラテックス濃度を上げることにより、標準品の2 point endのシグナルは大幅に上昇しており、凍結の有無による差異も見られなかった。ベタイン添加５%では、設定したABSを超えたために検量線は描かなかったが、検量線を描いたところでは、コントロールの測定値も一定であった。

【００５４】

【表３】

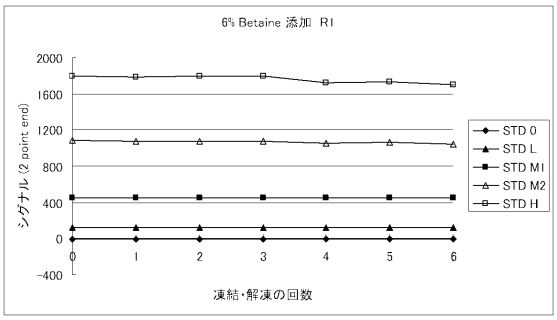
ﾍﾞﾀｲﾝ添加	5%		10%		15%		20%		25%	
凍結の有無	無	有	無	有	無	有	無	有	無	有
STD (A1c%)										
0	−31	−29	−33	−38	−33	−37	−38	−42	−45	−47
4.2	459	464	369	369	302	299	238	231	183	178
6.9	2004	2030	1454	1454	1084	1079	799	778	573	565
9.7	5406	5431	3822	3785	2676	2654	1850	1802	1257	1248
13.3	7918	8047	6101	6197	4485	4462	3162	3092	2136	2093
測定値										
CTL Low			6.0	6.0	6.0	5.9	6.0	6.0	5.9	6.0
CTL High			10.0	10.1	10.1	10.0	10.1	10.1	10.1	10.1

【００５５】

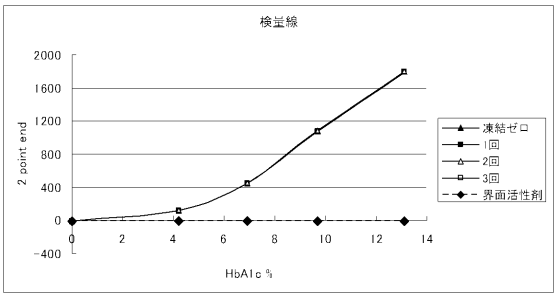
＜比較例＞

ベタインの代わりに、ラテックス試薬R1に界面活性剤であるTween 20を0.1v/v%添加したものを調製した。界面活性剤入りのR1試薬をチューブに採り、これを－20℃に一晩保存し、翌日、室温で解凍した。目視で観察すると、ラテックスの凝集沈殿は認められなかった。そこで、界面活性剤入りのR1試薬を用いて、日立７１７０で検量線を描かせた。その結果を検討３の結果とあわせて図２に示す。反応性が全く無かったことから、界面活性剤によりHbA1cのラテックス表面への物理吸着が妨げられたことは明白である。

【図１】



【図２】



【配列表】
2014132833000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/053686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/531(2006.01)i, *G01N33/545*(2006.01)i, *G01N33/72*(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)
G01N33/531, G01N33/545, G01N33/72

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)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(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.
Y	WO 2007/074860 A1 (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 05 July 2007 (05.07.2007), claims; example 1 & JP 5170742 B & US 2010/0167310 A1 & EP 1970704 A1 & CN 101351707 A	1-10
Y	JP 62-220866 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 29 September 1987 (29.09.1987), entire text (Family: none)	1-4,6-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
07 May, 2014 (07.05.14)	20 May, 2014 (20.05.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/053686

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-66795 A (Fujirebio Inc.), 11 March 1994 (11.03.1994), claims & US 5470759 A & EP 573972 A2 & DE 69328273 D & ES 2146595 T & KR 10-0292136 B1	1-10
A	JP 63-39909 A (Behringwerke AG.), 20 February 1988 (20.02.1988), claims & US 4921915 A & EP 253254 A2 & DE 3622993 A & MX 169572 B & NO 872852 A & AT 67312 E & AU 7532987 A & CA 1313621 A & ES 2026487 T & NO 872852 A0	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０５３６８６

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. G01N33/531(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i, G01N33/72(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. G01N33/531, G01N33/545, G01N33/72

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

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(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
Y	WO 2007/074860 A1（第一化学薬品株式会社）2007.07.05, 特許請求の範囲、実施例１ & JP 5170742 B & US 2010/0167310 A1 & EP 1970704 A1 & CN 101351707 A	1-10
Y	JP 62-220866 A（日立化成工業株式会社）1987.09.29, 全文（ファミリーなし）	1-4,6-9

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 ０７．０５．２０１４	国際調査報告の発送日 ２０．０５．２０１４
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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） ２Ｊ ３３１６ 赤坂 祐樹 電話番号 ０３－３５８１－１１０１ 内線 ３２５２

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００９年７月）

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０５３６８６

C（続き）. 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
Y	JP 6-66795 A (富士レビオ株式会社) 1994.03.11, 特許請求の範囲 & US 5470759 A & EP 573972 A2 & DE 69328273 D & ES 2146595 T & KR 10-0292136 B1	1-10
A	JP 63-39909 A (ベーリングヴエルケ・アクチエンゲゼルシヤフト) 1988.02.20, 特許請求の範囲 & US 4921915 A & EP 253254 A2 & DE 3622993 A & MX 169572 B & NO 872852 A & AT 67312 E & AU 7532987 A & CA 1313621 A & ES 2026487 T & NO 872852 A0	1-10

フロントページの続き

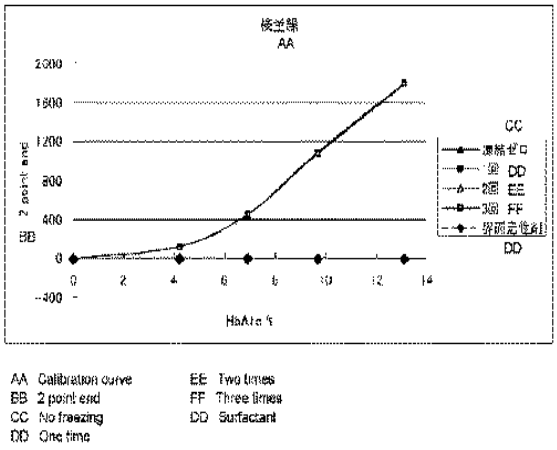
(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,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)	防止未分解的乳胶试剂变质的方法		
公开(公告)号	JPWO2014132833A1	公开(公告)日	2017-02-02
申请号	JP2015502870	申请日	2014-02-18
[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 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/723 G01N33/5306 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/543.581.J G01N33/545.ZNA.Z		
优先权	2013040337 2013-03-01 JP		
其他公开文献	JP6304231B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

这是一种使乳胶试剂在免疫测定试剂盒中的分散状态保持良好状态，防止由于温度变化而发生聚集和沉淀，以及防止试剂的测量性能下降的方法。 还公开了可以应用于上述免疫聚集测定试剂盒的新颖手段。 本发明的免疫测定试剂在溶剂中含有未敏化的胶乳颗粒和三甲基甘氨酸。 试剂中三甲基甘氨酸的浓度优选为5-10w / v％。 该试剂可以优选用作例如血红蛋白A1c的免疫测定试剂。



AA Calibration curve
BB 2 point end
CC No freezing
DD One time
EE Two times
FF Three times
DD Surfactant