

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5852329号
(P5852329)

(45) 発行日 平成28年2月3日(2016.2.3)

(24) 登録日 平成27年12月11日(2015.12.11)

| | |
|-------------------------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 V |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 1 |
| | GO 1 N 33/543 5 1 5 H |
| | GO 1 N 33/543 5 1 5 D |
| | GO 1 N 33/543 5 4 1 Z |

請求項の数 6 (全 26 頁)

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|-------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2011-122538 (P2011-122538) | (73) 特許権者 | 390037327 |
| (22) 出願日 | 平成23年5月31日 (2011.5.31) | | 積水メディカル株式会社 |
| (65) 公開番号 | 特開2012-251789 (P2012-251789A) | | 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 |
| (43) 公開日 | 平成24年12月20日 (2012.12.20) | (74) 代理人 | 110000084 |
| 審査請求日 | 平成26年2月18日 (2014.2.18) | | 特許業務法人アルガ特許事務所 |
| | | (74) 代理人 | 100077562 |
| | | | 弁理士 高野 登志雄 |
| | | (74) 代理人 | 100096736 |
| | | | 弁理士 中嶋 俊夫 |
| | | (74) 代理人 | 100117156 |
| | | | 弁理士 村田 正樹 |
| | | (74) 代理人 | 100111028 |
| | | | 弁理士 山本 博人 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H b A 1 c の免疫学的測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の工程(A)、(B)、(C)及び(D)を含むH b A 1 c のイムノクロマト測定方法。

(A) 赤血球を含有する測定試料を、ヘモグロビン鎖のN末端をタンパク質表面に露出させる性質を有する界面活性剤で処理する工程

(B) 工程(A)で得られた測定試料を、水と接触した際に水に溶解して拡散しない状態にある環状多糖類と接触させる工程

(C) 工程(B)で得られた測定試料を、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体あるいは粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体のいずれかと接触させる工程

(D) 工程(C)において形成された、前記粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体及び/又は前記粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体と、H b A 1 c との免疫複合物を検出する工程

【請求項2】

前記環状多糖類が、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、ヒドロキシアルキル化(α , β , γ)シクロデキストリン、スルホアルキル化(α , β , γ)シクロデキストリン、モノクロトリアジニル(α , β , γ)シクロデキストリン、クラスターシクロデキストリン、修飾クラスターシクロデキストリン及びシクロアミロースからなる群より選択される、請求項1に記載のイムノクロマト測定

方法。

【請求項 3】

前記ヘモグロビン鎖のN末端をタンパク表面に露出させる性質を有する界面活性剤が、スクロースモノウレート、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤及び両性界面活性剤からなる群より選択される、請求項 1 に記載のイムノクロマト測定方法。

【請求項 4】

前記粒子が、金属コロイド粒子又はラテックス粒子である、請求項 1 に記載のイムノクロマト測定方法。

【請求項 5】

水と接触した際に水に溶解して拡散しない状態にある環状多糖類が、固相に化学結合されたものであるか、又は環状多糖類の水不溶性ポリマーである、請求項 1 に記載のイムノクロマト測定方法。

10

【請求項 6】

前記固相が、イムノクロマト用テストストリップにおけるサンプルパッドである、請求項 5 に記載のイムノクロマト測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、簡便かつ正確なHbA1cの免疫学的測定方法及び測定試薬に関する。

【背景技術】

20

【0002】

血中のヘモグロビンに糖が結合した糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビン）、特にヘモグロビン鎖のN末端バリン残基が糖化されたヘモグロビンA1c（以下、「HbA1c」ということがある）は、その値が過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病の診断や糖尿病の経過観察に適した指標として広く使用されている。

【0003】

HbA1cの測定方法としては、HPLC法、キャピラリー電気泳動法、酵素法及び免疫学的測定法等が知られている。免疫学的測定法においては、HbA1cの糖化されている部位（ヘモグロビン鎖N末端）に特異的な抗体を用いてHbA1cを測定するが、当該糖化部位はヘモグロビタンパク質の表面に存在するのではなく、ヘモグロビタンパク質の内部に埋もれており、生理的な条件下では抗体が結合し難い場所に存在することが判明している。このような性状より、当該糖化部位をエピトープとして認識する抗体を効率良く反応させて測定を行うために、当該エピトープをヘモグロビタンパク質の表面に露出させる技術が以前より開発されている（特許文献1）。

30

【0004】

当該エピトープをヘモグロビタンパク質表面に露出させる手段としては、ヘモグロビン鎖N末端をタンパク質表面に露出させる成分（以下「N末端露出剤」ということがある）を使用してヘモグロビンを処理する方法やヘモグロビンをラテックス粒子に吸着させてヘモグロビンを処理する方法が報告されている。N末端露出剤を使用する露出方法としては、グアニジン、チオシアン酸、あるいはチオシアン酸リチウム塩をそれぞれ単独で糖化ヘモグロビン含有試料と混合して露出させる方法や、チオシアン酸とフェリシアニド等の酸化剤の組み合わせ、グアニジンと非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩との組み合わせ、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等を使用して露出させる方法（特許文献1～7）が知られている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開昭61-172064号公報

【特許文献2】特開平01-155268号公報

【特許文献3】特開平03-51759号公報

50

【特許文献4】特開平06-11510号公報

【特許文献5】特開2001-33442号公報

【特許文献6】特開2007-163182号公報

【特許文献7】国際公開2010-067612号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、これら従来のN末端露出剤を使用して糖化部位エピトープを露出させる処理方法に関しては、以下のような課題があった。例えば特許文献1に記載のグアニジンを使用してN末端を露出させる方法は加熱が必要で操作が煩雑であったり、特許文献2及び特許文献3に記載のチオシアン酸は環境上有害な物質であったり、フェリシアニド等の酸化剤は着色しやすく保存安定性に欠ける等の課題があった。また、本発明者らの検討により、先行技術文献に記載されたN末端露出剤（カオトロピック剤、還元剤、有機溶媒や界面活性剤）の中には、文献中に記載された条件で用いても十分なエピトープの露出効果が得られないものも存在することが明らかになった。このような場合に、十分なエピトープの露出効果を得ようとしてN末端露出剤を高濃度を使用すると免疫学的測定の前に希釈が必要となって操作が煩雑になる。また、エピトープの露出効果が十分であっても抗原抗体反応を阻害するため、免疫学的測定に使用できないN末端露出剤が含まれることも明らかになった。さらに本発明者らは、N末端露出剤として界面活性剤を用いてエピトープを露出させる処理をした後の測定試料（以下、「検体」あるいは「血液試料」ということがある）を、金コロイド粒子や着色ラテックス粒子を検出用の標識物質として使用するイムノクロマトグラフ法（以下、「粒子イムノクロマト法」ということがある）による測定系に適用した場合、使用するN末端露出剤の種類によっては粒子で標識された抗体（以下、「粒子標識抗体」ということがある）どうしが凝集してメンブレン上を展開せず、正確な測定ができないという新たな課題を見出した。この粒子標識抗体の凝集は、さまざまな界面活性剤で観察され、界面活性剤の性質や化学構造等の属性のみからは予測や回避することが困難なものであった。従って、本発明の課題は、新規なHbA1cの免疫学的測定方法、具体的には、簡便な測定系である粒子イムノクロマト法に適用可能な、HbA1cの糖化部位（ヘモグロビン鎖N末端）の露出処理及び当該処理方法を使用するHbA1cの免疫学的測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、HbA1cの糖化部位を効率的かつ簡便に露出させることができ、かつ、抗HbA1c抗体とHbA1cとの抗原抗体反応を阻害しないN末端露出剤を再検討し、両者を同時に達成することができるN末端露出剤を得ることができた。しかし、それらのN末端露出剤においても粒子標識抗体どうしが凝集して正確に測定できないという課題が残ったことから、さらに検討を重ねた。その結果、N末端露出剤で処理した血液試料を、水不溶性の状態にある環状多糖類と接触させた後に粒子標識抗体と反応させたところ、当該粒子標識抗体どうしが凝集することなく、メンブレン上を良好に展開し、前記課題を解決できることを見出した。すなわち本発明者らは、糖化部位が検出可能な程度に十分に露出され、抗原抗体反応も阻害せず、さらに粒子標識抗体どうしの凝集もなく、粒子イムノクロマト法によりHbA1cを簡便かつ正確に測定できる方法を見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、以下に関するものである。

[1] 次の工程(A)、(B)、(C)及び(D)を含むHbA1cのイムノクロマト測定方法。

(A) 赤血球を含有する測定試料を、ヘモグロビン鎖のN末端をタンパク質表面に露出させる性質を有する界面活性剤で処理する工程

(B) 工程(A)で得られた測定試料を、水不溶性の状態にある環状多糖類と接触させる

工程

(C) 工程 (B) で得られた測定試料を、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体あるいは粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体のいずれかと接触させる工程

(D) 工程 (C) において形成された、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体及び/又は粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体と、Hb A1c との免疫複合物を検出する工程

[2] 環状多糖類が、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、ヒドロキシアルキル化(α , β , γ)シクロデキストリン、スルホアルキル化(α , β , γ)シクロデキストリン、モノクロトリアジニル(α , β , γ)シクロデキストリン、クラスターシクロデキストリン、修飾クラスターシクロデキストリン及びシクロアミロースからなる群より選択される、[1]のイムノクロマト測定方法。

[3] ヘモグロビン鎖のN末端をタンパク質表面に露出させる性質を有する界面活性剤が、スクロースモノラウレート、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤及び両性界面活性剤からなる群より選択される、[1]のイムノクロマト測定方法。

[4] 粒子が、金コロイド粒子又はラテックス粒子である、[1]のイムノクロマト測定方法。

[5] 水不溶性の状態にある環状多糖類が、固相に化学結合されたものであるか、又は環状多糖類の水不溶性ポリマーである、[1]のイムノクロマト測定方法。

[6] 固相が、イムノクロマト用テストストリップにおけるサンプルパッドである、[1]のイムノクロマト測定方法。

[7] 環状多糖類を水不溶性の状態で含有しているサンプルパッド又は環状多糖類の水不溶性ポリマーを具備することを特徴とする、Hb A1c のイムノクロマト測定用のテストストリップ。

【発明の効果】

【0009】

本発明の免疫学的測定方法によれば、短時間の簡便な処理により血液試料中のHb A1c 中の糖化部分を効率的に露出させることができ、抗原抗体反応の障害もなく、粒子標識抗体により検出する免疫学的測定法によってHb A1c を正確に測定することができる。すなわち本発明によれば、N末端露出剤でHb A1c の糖化部位を露出させた試料を測定前に希釈する操作が不要であり、界面活性剤の化学構造等の属性のみからは予測できない様々な要因によって起きる粒子標識抗体どうしの凝集を改善することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】抗体塗布部を1箇所有するイムノクロマトデバイスの模式構造図である。

【図2】従来法(酵素法)と本発明の測定方法の測定結果の相関図である。

【図3】抗体塗布部を2箇所有するイムノクロマトデバイスの模式構造図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明に用いる試料は、Hb A1c 測定用の被検試料であり、血液試料、例えば血液、赤血球画分等が挙げられる。また、本発明の測定対象は、血中のHb A1c である。

【0012】

本発明のHb A1c の免疫学的測定方法は、

(A) 赤血球を含有する測定試料を、ヘモグロビン鎖のN末端をタンパク質表面に露出させる性質を有する界面活性剤で処理する工程

(B) 工程(A)で得られた測定試料を、水不溶性の状態にある環状多糖類と接触させる工程

(C) 工程(B)で得られた測定試料を、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体あるいは粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体のいずれかと接触させる工程

10

20

30

40

50

(D) 工程(C)において形成された、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体及び/又は粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体と、Hb A1cとの免疫複合物を検出する工程を含む。

【0013】

工程(A)は、N末端露出剤により、Hb A1c中のエピトープを露出させる工程である。工程(A)により露出されるエピトープは、例えばヘモグロビン鎖の糖化されたN末端領域であり、より好ましくはヘモグロビン鎖のN末端バリンが糖化されたペプチドを含む領域である。

【0014】

工程(A)に用いられるN末端露出剤としては、非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤から上述のヘモグロビン鎖の糖化されたN末端領域を検出可能な程度に十分に露出させることができ、かつヘモグロビンのN末端を認識する抗体あるいはヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体とHb A1cとの抗原抗体反応を阻害しないことを限度として適宜選択可能である。これらのN末端露出剤は、単独で用いても良いし、2種類以上を組み合わせて用いても良い。

非イオン性界面活性剤としては、スクロースモノラウレートが挙げられる。

アニオン性界面活性剤としては、胆汁酸塩を除くアニオン性界面活性剤が使用可能であり、ラウリル硫酸ナトリウム等のアルキル硫酸塩、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム等のポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等のアルキルベンゼンスルホン酸塩、ラウロイルメチルアラニン、N-ラウロイルサルコシナトリウム塩等のアシルアミノ酸塩、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物ナトリウム塩、特殊ポリカルボン酸型高分子界面活性剤が挙げられる。ここで前記胆汁酸塩は、例えば、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム等をいう。

カチオン性界面活性剤としては、高級アルキルアミン類及び第4級アンモニウム塩が挙げられるが、エピトープ露出効果の点で第4級アンモニウム塩が好ましい。第4級アンモニウム塩としては、モノ長鎖アルキルトリメチルアンモニウム塩、ジ長鎖アルキルジメチルアンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化デカリニウム等が挙げられる。このうち、モノ長鎖アルキルトリメチルアンモニウム塩としては、塩化C₈-C₂₂アルキルトリメチルアンモニウム、臭化C₈-C₂₂アルキルトリメチルアンモニウム等が挙げられる。ジ長鎖アルキルジメチルアンモニウム塩としては、塩化ジ(C₈-C₂₂アルキル)ジメチルアンモニウム、臭化ジ(C₈-C₂₂アルキル)ジメチルアンモニウム等が挙げられる。より好ましい第4級アンモニウム塩の具体例としては、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム、塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化オクタデシルトリメチルアンモニウム、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、臭化オクタデシルトリメチルアンモニウム、塩化ジ(ドデシル)ジメチルアンモニウム、塩化ジ(テトラデシル)ジメチルアンモニウム、塩化ジ(ヘキサデシル)ジメチルアンモニウム、塩化ジ(オクタデシル)ジメチルアンモニウム、臭化ジ(ドデシル)ジメチルアンモニウム、臭化ジ(テトラデシル)ジメチルアンモニウム、臭化ジ(ヘキサデシル)ジメチルアンモニウム、臭化ジ(オクタデシル)ジメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、塩化デカリニウムが挙げられる。

両性界面活性剤としては、胆汁酸誘導体を除く両性界面活性剤が使用可能であるが、特にベタイン構造を持つものが好適に使用可能である。ベタイン構造を持つ両性界面活性剤としては、スルホベタイン12~16、ラウリルベタイン、2-アルキル-2-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリウムベタイン、ラウリルジメチルアミノオキサイド、ラウリン酸アミドプロピルジメチルアミノ酢酸ベタインが挙げられる。ここで胆汁酸誘導体とは、例えば、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロバ

10

20

30

40

50

ンスルホネート (CHAPS)、3 - [(3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシプロパンスルホネート (CHAPSO) 等、胆汁酸由来のアシル基が形成するアミド結合を介してスルホベタイン等の両性イオン基と結合している化合物をいう。

【0015】

N末端露出剤は、これを含有する水溶液 (以下、「検体前処理液」ということがある) として使用するのが好ましい。エピトープ露出効果の点及び抗体の抗原抗体反応性維持の点から、N末端露出剤含有検体前処理液中のN末端露出剤の濃度は、0.01 ~ 10質量% (以下、単に%で示す) が好ましく、さらに0.05 ~ 5% がより好ましく、0.1 ~ 3% が特に好ましい。検体前処理液は、チューブ等に分注して使用することはもちろん、別の態様として、メンブレン等に含浸・乾燥させて、イムノクロマトデバイスの一部にパッドとして組み込んで使用することも可能である。当該パッドは、後述するサンプルパッド、粒子標識抗体含有パッドよりも先に検体液と接触するよう配置される必要がある。

10

【0016】

検体前処理液には溶血剤が添加されていてよいが、N末端露出剤が溶血剤の役割を兼ねていてもよい。検体前処理液は適宜、アジ化ナトリウムのような防腐剤、EDTAのようなキレート剤、NaClやMgCl₂のような金属イオンを含んでいてもよいし、引き続きイムノクロマト測定時の非特異反応抑制を目的としてBSAやカゼイン等のタンパク質等を含んでいても良い。また、検体前処理液は、イムノクロマト測定時のメンブレン上での測定試料や粒子標識抗体の展開を良好にする目的で、界面活性剤を含んでいてもよく、当該界面活性剤のN末端露出能は問わない。当該界面活性剤は、非イオン性界面活性剤でも良い。

20

【0017】

また当該検体前処理液のpHは、4.0 ~ 9.0、さらに5.0 ~ 9.0、さらに6.0 ~ 8.0が好ましい。これらのpHに調整するには、適宜緩衝剤を添加してもよい。緩衝剤としては、クエン酸、フタル酸、酢酸、コハク酸、カコジル酸、マレイン酸、イミダゾール、コリジン、リン酸、Johnson-Lindsay等のユニバーサル緩衝剤、2 - モルホリノエタンスルホン酸 (以下、「MES」という)、ビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン (以下、「Bis-Tris」という)、ピペラジン - N, N' - ビス (2 - エタンスルホン酸) (以下、「PIPES」という) 等のグッド緩衝剤が用いられる。

30

【0018】

前記検体前処理液を用いて赤血球を含有する測定試料を処理するには、血液試料溶液に検体前処理液を添加し、攪拌すればよい。温度は、1 ~ 50、さらに10 ~ 40、さらに15 ~ 25 が好ましい。処理時間は10秒間 ~ 30分間、さらに30秒間から5分間が好ましい。

【0019】

血液試料中の糖化ヘモグロビン (HbA1c) は、前記処理 (工程 (A)) により、糖化部位が効率良くヘモグロビタンパク質表面に露出される。

【0020】

次に、本発明においては、前記試料を水不溶性の状態にある環状多糖類と接触させる (工程 (B))。工程 (B) は、検体前処理液で処理された測定試料が検出用の粒子標識抗体と接触する前に行う必要がある。

40

【0021】

工程 (B) に用いられる環状多糖類には、環状オリゴ糖および環状多糖が含まれる。環状オリゴ糖としては、シクロデキストリン又は修飾シクロデキストリンが好ましい。より具体的には、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、ヒドロキシアルキル化 (、又は) シクロデキストリン、スルホアルキル化 (、又は) シクロデキストリン、モノクロロトリアジニル (、又は) シクロデキストリン (モノクロロトリアジニル基は、「MCT」と略記されることがある) 等が挙げら

50

れる。環状多糖としては、クラスターシクロデキストリン、修飾クラスターシクロデキストリン、シクロアミロース等が挙げられる。このうち、シクロデキストリン又は修飾シクロデキストリンが好ましい。

【0022】

前記の環状多糖類は、水不溶性の状態で使用する。水不溶性の状態にあるとは、当該環状多糖類が水と接触した際に、環状多糖類を構成している環状オリゴ糖分子または環状多糖分子が水に溶解して拡散しない状態をいう。水不溶性の状態の具体例としては、例えば、通常イムノクロマト法において使用されるメンブレン等に環状多糖類が化学結合により固定化されている状態や、環状多糖類そのものがポリマーを形成している状態、多孔性の樹脂に練りこまれている状態等が挙げられる。当該メンブレンやポリマーは、例えば、イムノクロマト法においてデバイスの一部分を構成するパッド等として使用することが可能である。例えば、図1のサンプルパッド(b)の繊維に化学結合させたり、サンプルパッド(b)の上部または下部に接触するようシート状に加工した環状多糖類のポリマーを貼付したりすることができる。本発明においては、前記した環状多糖類を水不溶性の状態で含有しているサンプルパッド又は環状多糖類の水不溶性ポリマーを具備することを特徴とする、HbA1cのイムノクロマト測定用のテストストリップも提供される。

10

【0023】

環状多糖類を、化学的に固相に結合させる方法としては、例えば、綿布を、反応基を導入したシクロデキストリン(MCT- -CD)水溶液に浸漬し、風乾・熱処理する方法(松田ら、広島県立東部工業技術センター研究報告 No.19 p.15-19、図1(2006))を応用することができるほか、架橋剤を介する方法、シクロデキストリンプレポリマーを紫外線で化学結合する方法、イソシアネートを用いて化学結合する方法等、定法によって作製することができる。また、環状オリゴ糖及び環状多糖のポリマーは、市販されているもの(例えば、-シクロデキストリンポリマー(コードNo.037-21611)、-シクロデキストリンポリマー(コードNo.034-21621)、-シクロデキストリンポリマー(コードNo.031-21631)、いずれも和光純薬社)を使用することができる。

20

【0024】

環状多糖類の使用濃度(使用量)は、正確なHbA1c測定結果を得る点から、測定試料反応液中のN末端露出剤(界面活性剤)の物質質量に対して1~20倍存在していることが好ましく、さらに1~10倍が好ましく、特に1~5倍が好ましい。メンブレン等に環状多糖類を化学結合させた場合の環状多糖類のメンブレンへの結合量は、例えば、“Textile Finishing with MCT- -Cyclodextrin (Acabado textil con MCT- -ciclodextrina)”と題されたJ.P. Moldenhauer, H. Reuscherの文献(http://revistavirtualpro.com/files/TIE09_200704.pdf)を参照して算出することができる。また、環状多糖類のポリマー(シート状やビーズ状)を使用する際には、測定試料中のN末端露出剤の物質質量を考慮し、シート状である環状多糖類のポリマーを使用する場合には、好適なシートの厚さや面積等を、ビーズ状である環状多糖類のポリマーを使用する場合には、好適な粒子数等を、計算あるいは実験的に求め使用する。

30

【0025】

測定試料と環状多糖類とを接触させる際の温度は、特に制限されず、1~50、さらに1~30、さらに15~25の温度が好ましい。試料と環状オリゴ糖又は環状多糖の接触時間は特に限定されず、30分間以内、特に5分間以内が好ましい。環状多糖類が化学結合しているメンブレン等を試料が数秒程度の極めて短時間で通過する場合であっても、効果は十分に得られる。

40

【0026】

本発明における工程(C)は、工程(B)で得られた測定試料を、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体あるいは粒子で標識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体のいずれかと接触させる工程であり、工程(D)は、工程(C)において形成された、粒子で標識されたヘモグロビンのN末端を認識する抗体及び/又は粒子で標

50

識されたヘモグロビンのN末端以外を認識する抗体と、HbA1cとの免疫複合物を検出工程である。これらの工程(C)及び工程(D)は、通常のイムノクロマト測定方法と同様にして行なわれる。

【0027】

イムノクロマト法で測定する場合には、HbA1c濃度(%)が既知の血液成分を標準品として、次のような方法でHbA1cを定量できる。図1を用いて説明する。まず、本発明の工程(A)で処理した測定試料液をサンプルパッド(b)に滴下する。滴下された測定試料液は、毛細管現象により、検出用の粒子標識抗ヘモグロビン抗体を担持した粒子標識抗体含有パッド(c)に引き込まれ、当該パッドを通過する間に、測定試料中のヘモグロビン(HbA1c、HbA0、HbF、HbS等)が、粒子標識抗体と抗原抗体反応

10

することで、複合体を形成する。当該複合体は、抗HbA1c抗体をライン状に塗布(固定化)した抗体固定化メンブレン(d)上を展開し、抗HbA1c抗体塗布部(e)に到達すると当該塗布部において測定試料中のHbA1cと抗原抗体反応してHbA1cを捕捉する。その他のヘモグロビンは捕捉されずに吸水パッド(f)まで移動する。HbA1cを捕捉したラインの標識粒子に由来する色の濃さ、反射強度、又は吸光度等をイムノクロマトリーダーで測定すれば、試料中のHbA1cが定量できる。

なお、抗ヘモグロビン抗体に対するHbA1cとその他のヘモグロビン(HbA0、HbF、HbS等)の結合比率は、検体中の比率と同じであるので、抗体固定化メンブレンに抗HbA1c抗体が十分量固定化されている場合、抗HbA1c抗体に捕捉されているHbA1cに結合した検出用粒子量は、検体中のHbA1c比率を反映するので、上述の

20

【0028】

当該抗体固定化メンブレンに固定化されている抗体は、抗HbA1c抗体単独でも良いし、HbA1c測定に影響を与えない前記抗HbA1c抗体とは別の抗体がHbA1cラインと独立して固定化されていてもよい。例えば、ヒト生体中に存在しない物質を粒子で標識して粒子標識抗体含有パッド(c)に添加し、当該物質を認識する抗体を抗HbA1c抗体と独立に塗布した場合、展開によって生じる当該物質のラインは、コントロールラインとして用いることができる。コントロールラインの強度は、個々の測定の妥当性を担保するものとして使用することができ、またHbA1cライン強度を必要に応じて補正するために使用することもできる。

30

【0029】

さらに、イムノクロマト法で測定する場合には、ヘモグロビンの鎖N末端が修飾されていないHbA1cとヘモグロビンA0(以下、「HbA0」という)とを同時に測定することができる。このとき、ともに濃度(μM)が既知のHbA1cとHbA0を含む血液成分を標準品として用いる。以下、図3を用いて説明する。まず、抗HbA1c抗体及び抗HbA0抗体とをそれぞれ別の部位(抗HbA1c抗体塗布部(e)及び抗HbA0抗体塗布部(f))に固定化した抗体固定化メンブレン(d)を用いる。本発明の工程(A)で処理した検体液をサンプルパッド(a)に滴下する。滴下された検体液は、毛細管現象により抗体固定化メンブレン(d)を展開され、抗HbA1c抗体塗布部(e)に到達すると試料中のHbA1cのみが反応し、抗HbA0抗体塗布部(f)に到達すると試

40

【0030】

ここで抗HbA1c抗体としては、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、例えば特許文献(特許文献1、特開平6-66796号公報)記載のもの等が使用可能である。

【0031】

50

本発明のイムノクロマト法に使用される検出標識は、免疫学的測定試薬として使用される微小粒子であり、金属コロイド粒子又はラテックス粒子が好ましい。金属コロイド粒子としては、例えば、金コロイド粒子、銀コロイド粒子、白金コロイド粒子、酸化鉄コロイド粒子、水酸化アルミニウムコロイド粒子等が挙げられ、特に、金コロイド粒子を好適に使用することができる。これらの金属コロイド粒子の平均粒径は1～500nm、特に強い色調が得られる10nm～150nm、より好ましくは20～100nmの範囲内であることがさらに好ましい。金属コロイド粒子として、例えば金コロイド粒子を用いる場合には、常法、例えば塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法により金コロイド粒子を調製することができるし、市販のものを用いてもよい。

【0032】

ラテックス粒子としては、免疫学的測定試薬として一般的に用いられているラテックス粒子であれば特に制限されず、適宜色素で着色されていてよい。ラテックス粒子は、種々のモノマーを重合又は共重合させることによって得ることができる。ここにモノマーとしては、例えばスチレン、クロルスチレン、 α -メチルスチレン、ジビニルベンゼン、ビニルトルエン等の重合性不飽和芳香族類、例えば(メタ)アクリル酸、イタコン酸、マレイン酸、フマル酸等の重合性不飽和カルボン酸類、例えば(メタ)アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸-n-ブチル、(メタ)アクリル酸-2-ヒドロキシエチル、(メタ)アクリル酸グリシジル、エチレングリコール-ジ-(メタ)アクリル酸エステル、(メタ)アクリル酸トリプロモフェニル等の重合性不飽和カルボン酸エステル類、(メタ)アクリロニトリル、(メタ)アクロレイン、(メタ)アクリルアミド、N-メチロール-(メタ)アクリルアミド、メチレンビス(メタ)アクリルアミド、ブタジエン、イソプレン、酢酸ビニル、ビニルピリジン、N-ビニルピロリドン、塩化ビニル、塩化ビニリデン、臭化ビニル等の不飽和カルボン酸アミド類、重合性不飽和ニトリル類、ハロゲン化ビニル類、共役ジエン類等を挙げるることができる。これらのモノマーは、標識物質として要求される表面特性、比重等によって適宜選択され、1種を単独で又は2種以上を混合して使用することができる。

【0033】

ラテックス粒子の形状は特に制限されないが、その平均粒子径は、ラテックス粒子表面のタンパク質と測定対象物質との凝集反応の結果生じる凝集体が肉眼又は光学的に検出できるに十分な大きさが望ましい。好ましい平均粒子径としては0.02～1.6 μ mであり、特に0.03～0.5 μ mが好ましい。

【0034】

ラテックス粒子に抗HbA1c抗体を感作する方法は、特に制限されず、公知の方法が使用できる。例えば、ラテックス粒子表面に物理的に吸着させる方法、官能基を有するラテックス粒子表面に共有結合させる方法、及び免疫学的結合によって感作する方法等が挙げられる。

【0035】

イムノクロマト法において、工程(B)は、サンプルパッド上で行うのが好ましい。すなわち、サンプルパッドに環状オリゴ糖又は環状多糖を固定化して、工程(A)を行った測定試料液を当該サンプルパッド上に滴下すれば、当該サンプルパッド上で工程(B)が行われる。工程(B)が行われた測定試料液は毛細管現象により、次の免疫反応の場に移動することになる。粒子標識抗体を含む「粒子標識抗体含有パッド」は、当該サンプルパッドよりも後に検体液と接触するよう配置して使用する。

【実施例】

【0036】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

【0037】

参考例1：抗ヘモグロビン抗体及び抗HbA1c抗体の調製

(I) 材料と方法

(1) 精製HbA0及び精製HbA1cの調製

10

20

30

40

50

HbA0及びHbA1cは、非特許文献(Melissenda J. McDonald et al, JBC, 253(7), 2327-2332, 1978)記載のBio-Rex70(バイオラッド社)を用いるイオン交換クロマトグラフィーにより、ヒト赤血球溶血液から精製し、以降の実験に用いた。

【0038】

(2) 各種ペプチド、及び糖化ペプチドの調製

2種類のアミノ配列のペプチド(VHLTC(配列番号1)及びVHLTPEEKYC(配列番号2):アルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す)は、ペプチド自動合成装置を用いFmoc法により合成、及び精製した。各ペプチドの純度は、HPLCにより95%以上であることを確認した。また、各ペプチドの分子量は、質量分析(MALDI-TOF法)により理論値と同じであることを確認した。

10

前記2種類のペプチドを特許文献1記載の方法にて糖化し、糖化ペプチド(f-VHLTC及びf-VHLTPEEKYC:fは、フルクトシル化を意味する)を精製した。すなわち、各配列のペプチドそれぞれとグルコースを無水ピリジン中で反応させて糖化ペプチドを合成し、HPLCで精製した。各糖化ペプチドの分子量は、質量分析(MALDI-TOF法)により理論値、すなわち各ペプチドの分子量に162を加算した分子量と同じであることを確認した。

【0039】

(3) ペプチド結合タンパク、及び糖化ペプチド結合タンパクの調製

ペプチド結合タンパク、及び糖化ペプチド結合タンパクは、前記(2)で調製したペプチド又は糖化ペプチドを、次のようにしてキャリアタンパクであるオブアルブミン(OVA)に結合させて調製した。すなわち、150mmol/L NaCl含有20mmol/L リン酸緩衝液(pH7.2)(以下、総称的に「PBS」ということがある)に5mg/mLの濃度に溶解したペプチド(VHLTC)、又は糖化ペプチド(f-VHLTC)を、5mg/mLの濃度で精製水に溶解したマレイミド活性型オブアルブミン(PIERCE社製)と1対1の容量比で混和後、室温で緩やかに反応容器を回転させながら2時間インキュベートして調製し、PBSで透析した後、使用した(VHLTC-OVA、f-VHLTC-OVA)。

20

【0040】

(4) 抗ヘモグロビン抗体及び抗HbA1c抗体の調製

抗ヘモグロビン抗体は、前記(1)の精製HbA0を免疫原として常法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。当該モノクローナル抗体は、抗原固相化ELISAで精製HbA1c及び精製HbA0のいずれとも反応する性質を有している。

30

抗HbA1c抗体は、特許文献1記載の方法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。すなわち、前記(2)で合成した糖化ペプチド(f-VHLTPEEKYC)をスカシ貝ヘモシアニンに結合させ、これを免疫原とした。ハイブリドーマのスクリーニングでは、抗原固相化ELISAで精製HbA1cと反応し、かつ精製HbA0と反応しない株を選択した。クローニングを経て、最終的に抗原固相化ELISAで精製HbA1cと反応し、かつ精製HbA0と反応しないモノクローナル抗体を得た。

40

【0041】

実施例1:N末端露出剤候補によるヘモグロビンのN末端露出と抗原抗体反応阻害の確認
(I)材料と方法

(1) 競合ELISA法による、N末端露出剤候補のN末端露出率確認試験

(a) 糖化ペプチド結合タンパク(f-VHLTC-OVA)をPBSで1µg/mLの濃度に希釈後、50µL/wellずつ96穴マイクロプレートに分注し、4で一晚静置した。

(b) 前記(a)のマイクロプレートを0.05%Tween20(登録商標)含有PBS(以下、「PBST」という)400µL/wellで3回洗浄後、ブロッキング液(1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBST、以下、「BSA-PBST」という)を100µL/wellずつマイクロプレートに分注し、室温で1時間静置し、f-VH

50

L T C - O V A 固定化プレートを作製した。

(c) E D T A 採血管で採取した血液を、10、3000rpmで5分間遠心して血球を分離し、当該血球を-70以下で凍結・融解することで赤血球を溶血させて、溶血赤血球とした(以降の各試験において溶血赤血球を検体とする場合、同様に調製した)。表1及び表2に記載のN末端露出剤候補を、表1及び表2に記載の濃度含有する5mmol/LMES緩衝液(pH6.0)を検体前処理液とし、前記溶血赤血球と前記検体前処理液を1対50の容量比でよく混合し、25で静置した。5分後、当該混合液を5mmol/LMES(pH6.0)で32倍に希釈し、検体液とした。なお、ネガティブコントロールは、表1及び表2に記載のN末端露出剤候補を含まない5mmol/LMES緩衝液(pH6.0)を検体前処理液として使用し、前記と同様の操作で溶血赤血球を処理し、ネガティブコントロール用検体液を調製した。

10

(d) 前記(b)のマイクロプレートにPBSTで3回洗浄後、前記(c)の各検体液を25μL/wellずつマイクロプレートに分注した。続いて、BSA-PBSTで1.0μg/mLに希釈した抗HbA1c抗体を25μL/wellずつマイクロプレートに分注し、室温で1時間振とうした。

(e) 前記(d)のマイクロプレートにPBSTで3回洗浄後、Polyclonal Goat Anti-mouse Immunoglobulins/HRP(Dako Denmark A/S社製)をBSA-PBSTで5000倍に希釈した溶液を50μL/wellずつマイクロプレートに分注し、室温で1時間振とうした。

(f) 前記(e)のマイクロプレートにPBSTで3回洗浄後、オルトフェニレンジアミン塩酸塩(東京化成社)を2mg/mL、過酸化水素を0.02%の濃度で含むクエン酸緩衝液(pH5.0)を50μL/wellずつマイクロプレートに分注し、室温で10分間静置した。

20

(g) 前記(f)のマイクロプレートに、1.5N硫酸を50μL/wellずつ分注して反応を停止させた後、プレートリーダーで492nmの吸光度を測定した。

【0042】

(2) N末端露出率の算出

前記(1)の競合ELISA法は、プレートに固定化された糖化ペプチドと検体液中のHbA1cによる競合阻害法である。検体前処理液中にN末端露出剤が存在しないためヘモグロビンのN末端が露出されないネガティブコントロールの場合には、測定系中で糖化ペプチドとHbA1cの競合が起こらないため、測定される吸光度が最大となる。一方、N末端露出剤によるN末端露出度合いの増加に伴い競合も増加し、測定される吸光度は減少する。前記(1)(g)にて測定された吸光度から、下記の式を用いて各N末端露出剤候補の露出率(競合の割合)を算出し、各N末端露出剤候補のN末端露出効果の指標とした。本露出率が大きいほどN末端露出効果が高いといえる。本実施例では、露出率が10%以上の場合を、「N末端露出効果あり」と判定する基準とした。

30

$$\text{露出率}(\%) = [(A - B) / A] \times 100$$

A : ネガティブコントロールの吸光度

B : 各検体液の吸光度

【0043】

(3) ELISA法による、N末端露出剤候補の抗原抗体反応阻害率確認試験

前記(1)競合ELISA法の手順(c)において、表1及び表2に記載の濃度でN末端露出剤候補を含む5mmol/LMES緩衝液(pH6.0)を溶血赤血球と混合することなく、そのまま検体液として使用した以外は、前記(1)と同様の手順で行った。

【0044】

(4) 抗HbA1c抗体に対する抗原抗体反応阻害率の算出

N末端露出剤候補が、抗HbA1c抗体とプレートに固定化された糖化ペプチドとの抗原抗体反応を阻害する場合、阻害度合いの増加に伴い測定される吸光度が減少する。測定された吸光度から、下記の式を用いて、各N末端露出剤候補の抗原抗体反応阻害率を算出し、各N末端露出剤候補の抗原抗体反応阻害効果の指標とした。本阻害率が大きいほど、

50

抗原抗体反応阻害効果が高いといえる。本実施例では、N末端露出剤候補が高濃度であることを考慮し、実用的な観点から抗原抗体反応が成立していると考えられる阻害率が70%未満の場合を、「抗原抗体反応を阻害しない」と判定する基準とした。

$$\text{阻害率}(\%) = [(C - D) / C] \times 100$$

C：ネガティブコントロールの吸光度

D：各検体液の吸光度

【0045】

(II) 結果

(1) 各N末端露出剤候補のN末端露出率及び抗原抗体反応阻害率の比較

前記(I)(2)及び同(4)により算出された各N末端露出剤候補のN末端露出率、及び抗原抗体反応阻害率を表1及び表2の各欄に示す。

10

【0046】

N末端露出剤候補として試験した界面活性剤の中で、前記露出率基準より「N末端露出効果あり」と判定されたものは、非イオン性界面活性剤では、シヨ糖脂肪酸エステル型のうちスクロースモノラウレート、アニオン性界面活性剤では、サルフェート型、スルホネート型、カルボン酸型、ポリカルボン酸高分子型、芳香族スルホン酸ホルマリン縮合物、カチオン性界面活性剤では、アンモニウム型、ベンザルコニウム型、両性界面活性剤では、胆汁酸誘導体を除くペタイン(スルホペタイン型、アルキルペタイン型、アミドペタイン型等)のカテゴリに属する界面活性剤であった(ここで、胆汁酸誘導体とは、胆汁酸由来のアシル基が形成するアミド結合を介してスルホペタイン等の両性イオン基と結合している化合物をいう)。この結果は、本実施例で使用した以外の抗HbA1c抗体を用いて試験した場合でも同様であった。なお、表1及び表2における界面活性剤のカテゴリは、通常使用される分類、例えば、界面活性剤分析研究会編(1987)、「新版界面活性剤分析法」、幸書房、吉田時行ら編(2000)、「新版界面活性剤ハンドブック」、工学図書株式会社、日本国特許庁ホームページ、「標準技術集(農薬製剤技術)データベース：界面活性剤、http://www.jpo.go.jp/shiryousonota/hyoujun_gijutsu/nouyaku/0005.html」等に記載された分類を基礎に、市販品のカタログ等の製品情報を考慮して分類したものである。

20

【0047】

N末端露出剤候補として試験した界面活性剤の中で、前記阻害率基準より「抗原抗体反応を阻害しない」と判定されたものは、いずれも前記「N末端露出効果あり」と判定された界面活性剤(スクロースモノラウレート、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤)であった。

30

以上より、本実施例で「N末端露出効果あり」と判定され、かつ「抗原抗体反応を阻害しない」と判定された前記界面活性剤群を「本発明のN末端露出剤」として選択した。

【0048】

N末端露出剤候補として試験した界面活性剤以外の成分のうち、本実施例の露出率及び阻害率の判定基準を同時に満たしたのは、カオトロピック剤(塩酸グアニジン、及び塩酸グアニジン・亜硝酸ナトリウム・ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20(登録商標))混合物)であった。タンパク変性剤として広く用いられる尿素の場合は、抗原抗体反応を阻害しない一方で、N末端露出効果を全く認めなかった。還元剤であるL-システイン、及びジチオスレイトールを用いた場合、N末端露出効果が認められたが、同時に抗原抗体反応も大きく阻害された。有機溶媒であるジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、及び2-ブタノールを用いた場合は、抗原抗体反応を阻害しない一方で、N末端露出効果はごく僅かであった。

40

以上より、カオトロピック剤を「本発明のN末端露出剤」として選択した。

【0049】

本実施例の競合ELISA法によるN末端露出率確認試験において、吸光度の減少がN末端露出剤による抗原抗体反応阻害のためではないことを以下により確認した。選択された本発明の各N末端露出剤を含む検体前処理液を、溶血赤血球を添加せずに、直接、5m

50

m o l / L M E S 緩衝液 (p H 6 . 0) で 3 2 倍に希釈して検体液 (N 末端露出剤を含むが溶血赤血球を含まない) とし、ネガティブコントロール (N 末端露出剤を含まないが溶血赤血球を含む) と比較した。選択された本発明の N 末端露出剤のいずれを用いた場合においても N 末端露出効果に対して十分に小さいものであり、抗原抗体反応の阻害はなかった。この試験は、選択された本発明の N 末端露出剤濃度を前記 (I) (3) の 3 2 倍稀薄濃度に変更して、本実施例の E L I S A 法による抗原抗体反応阻害率確認試験を実施したものに相当する。

【 0 0 5 0 】

また、f - V H L T C - O V A に代えてヘモグロビンを固定化したプレートと後記する抗ヘモグロビン抗体を用い、本実施例 (I) 1 (3) 、及び同 (4) と同様の方法にて、10 選択された本発明の各 N 末端露出剤による抗原抗体反応阻害の有無を確認したところ、いずれの N 末端露出剤も「抗原抗体反応を阻害しない」と判定された。以上より、選択された本発明の N 末端露出剤によって抗ヘモグロビン抗体の認識部位が損なわれる、もしくは抗ヘモグロビン抗体との抗原抗体反応が阻害されることなく、抗 H b A 1 c 抗体等とのサンドイッチ法により検体中のヘモグロビンを検出可能であることを確認した。

【 0 0 5 1 】

【 表 1 】

| カテゴリー | N末端露出剤 | 商品名 | メーカー | 濃度 | 露出率 | 阻害率 |
|----------------------|-----------------------------------------------|-----|---------|----|-----|-----|
| 糖エステル型 | スクロースモノアラレート | | 同仁化学 | 1% | 28 | <1 |
| | スクロースモノカブレート | | 同仁化学 | 1% | <1 | 1 |
| | ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノアラレート | | MoBiTec | 1% | <1 | 88 |
| | ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノカブレート | | MoBiTec | 1% | <1 | 23 |
| | ポリオキシエチレンソルビトールモノアラレート | | 花王 | 1% | <1 | <1 |
| | メチル-6-O-(N-ヘプタシルカルバモイル)- α -D-グルコピラノシド | | MoBiTec | 1% | <1 | 40 |
| | ポリオキシエチレン(12)モノアラレート | | 花王 | 1% | 1 | 3 |
| | ポリオキシエチレン(9)アラリルエーテル | | 花王 | 1% | <1 | 5 |
| | ポリオキシエチレン(23)アラリルエーテル | | MoBiTec | 1% | 9 | <1 |
| | N,N-ビス-(3-D-グルコアミノプロピル)デオキシコロールアミド | | MoBiTec | 1% | 5 | 46 |
| 非イオン性界面活性剤 | n-オクタシル- β -D-グルコピラノシド | | MoBiTec | 1% | 5 | 21 |
| | n-ドデシル- β -D-マルトピラノシド | | 同仁化学 | 1% | <1 | <1 |
| | n-ノニル- β -チオマルトシド | | 同仁化学 | 1% | <1 | <1 |
| | ポリオキシエチレン(8)オクタシルフェニルエーテル | | MoBiTec | 1% | <1 | <1 |
| | ポリオキシエチレン(10)オクタシルフェニルエーテル | | MoBiTec | 1% | <1 | <1 |
| | ポリオキシエチレンエチルフェニルエーテル | | MoBiTec | 1% | <1 | <1 |
| | ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンアルキルエーテル | | 旭電化 | 1% | 4 | <1 |
| | ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンアルキルエーテル | | 花王 | 1% | 2 | 3 |
| | ポリオキシエチレンステアリルアミン | | 花王 | 1% | <1 | 17 |
| | オクタイル-N-メチルグルカミド | | MoBiTec | 1% | <1 | 63 |
| アルキルアミン型 | デカノイル-N-メチルグルカミド | | MoBiTec | 1% | <1 | 89 |
| | コール酸ナトリウム | | MoBiTec | 1% | <1 | 10 |
| | デオキシコール酸ナトリウム | | MoBiTec | 1% | <1 | 9 |
| | アラリル硫酸ナトリウム | | MoBiTec | 1% | 49 | 24 |
| | ポリオキシエチレンアラリルエーテル硫酸ナトリウム | | MoBiTec | 1% | 46 | 6 |
| | ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム | | 花王 | 1% | 54 | 12 |
| | ラウロイルメチルアラニン | | 花王 | 1% | 34 | 18 |
| | シアルキルスルホン酸ナトリウム | | 花王 | 1% | 28 | 68 |
| | N-ラウロイルサルコシジンナトリウム塩 | | MoBiTec | 1% | 30 | 4 |
| | β -ナフトレンスルホン酸ホルマリノ縮合物ナトリウム塩 | | 花王 | 1% | 36 | 21 |
| 特殊ポリカルボキシル酸型高分子界面活性剤 | | 花王 | 1% | 60 | 29 | |
| アニオン性界面活性剤 | 胆汁酸塩 | | | | | |
| | サルフェート型 | | | | | |
| | スルホネート型 | | | | | |
| | カルボン酸型 | | | | | |
| | 特殊型 | | | | | |

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

比較例 1 : 粒子イムノクロマト法による H b A 1 c 測定 (1)

(I) 材料と方法

(1) 未処理サンプルパッド

未処理サンプルパッドとして、セルロースメンブレン (ミリポア社、シュアウィック (登録商標) C 0 8 3) を用いた。

【 0 0 5 4 】

(2) 金コロイド粒子標識抗体含有パッドの作製

5 2 7 n m における吸光度が 1 . 0 0 . D . / m L である金コロイド粒子水溶液 (粒径 5 0 n m 、 p H 9 . 0) に対して、抗ヘモグロビン抗体を終濃度 1 . 5 μ g / m L となるよう添加し、室温で 1 0 分間攪拌した。さらに、当該金コロイド - 抗ヘモグロビン抗体混合液に、B S A を終濃度 0 . 3 % となるよう添加し、室温で 5 分間攪拌してブロッキング処理を行った。続いて、当該混合液を 1 0 にて 1 0 0 0 0 r p m で 4 5 分間遠心し、沈渣 (金コロイド粒子標識抗ヘモグロビン抗体) を得た。得られた金コロイド粒子標識ヘモグロビン抗体を、5 3 1 n m における吸光度が 4 . 0 0 . D . / m L となるよう 1 . 3 % (w / v) カゼインを含む 2 0 m m o l / L P B S (p H 7 . 0) を用いて懸濁し、金コロイド粒子標識抗体液とした。ガラス繊維シート (日本ポール社、N o . 8 9 6 4) を前記金コロイド粒子標識抗体液に浸漬し、液が垂れない程度に液切りした後、乾燥機で乾燥させて金コロイド粒子標識抗体含有パッドとした。

10

【 0 0 5 5 】

(3) ラテックス粒子標識抗体含有パッドの作製

1 % (w / v) の赤色ラテックス懸濁液 (ポリスチレンラテックス粒子、粒径 1 5 0 n m 、 2 0 m m o l / L トリス緩衝液 (p H 8 . 5)) に対して、抗ヘモグロビン抗体を終濃度 0 . 2 5 m g / m L となるよう添加し、4 で 2 時間攪拌した。さらに当該ラテックス - 抗ヘモグロビン抗体混合液に、B S A を終濃度 1 % となるよう添加し、4 で 1 時間攪拌してブロッキング処理を行ないラテックス粒子標識抗ヘモグロビン抗体を得た。得られたラテックス粒子標識抗ヘモグロビン抗体を、1 0 0 倍量 (v / v) の 2 0 m m o l / L リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) を用いて 3 回透析した後、ラテックス粒子に対してカゼインを終濃度 1 . 3 % (w / w) となるよう添加し、ラテックス粒子標識抗体液とした。ガラス繊維シート (日本ポール社、N o . 8 9 6 4) を前記ラテックス粒子標識抗体液に浸漬し、液が垂れない程度に液切りした後、乾燥機で乾燥させてラテックス粒子標識抗体含有パッドとした。

20

30

【 0 0 5 6 】

(4) 抗体固定化メンブレンの作製

1 0 m m o l / L リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) に対し、抗 H b A 1 c 抗体を 1 . 0 m g / m L 、スクロースを 2 . 5 % (w / v) となるように添加し、抗 H b A 1 c 抗体固定化試薬 (以下、「A 1 c 用抗体」ということがある) とした。ニトロセルロースメンブレン (ミリポア社、H F 1 8 0) 上に、当該抗 A 1 c 用抗体をライン状に塗布 (図 1 (e)) し、乾燥機で乾燥させたものを抗体固定化メンブレンとした (図 1 (d)) 。以下、A 1 c 用抗体が塗布されたライン (図 1 (e)) を「A 1 c ライン」ということがある。

【 0 0 5 7 】

(5) イムノクロマトデバイスの作製

プラスチック製粘着シート (a) に、前記 (4) で作製した抗体固定化メンブレン (d) を貼り、未処理サンプルパッド (b) 、前記 (2) 又は (3) で作製した 2 種類の粒子標識抗体含有パッド (c) 、及び吸水パッド (ワットマン社、B T S - S P 3 0 0) (f) を図 1 のように配置した。すなわち、前記 (4) で作製した抗体固定化メンブレン (d) において、測定試料の展開方向における上流側の末端近傍に、前記 (2) 又は (3) で作製した粒子標識抗体含有パッド (c) のいずれか一つを配置し、この粒子標識抗体含有パッド (c) に一部重なるように、未処理サンプルパッド (b) を配置した。また前記 (4) で作製した抗体固定化メンブレン (d) の測定試料の展開方向における下流側の末端に、当該メンブレンと一部重なるように吸水パッド (f) を配置した。各部材の配置後、

40

50

さらにその上から、透明プラスチックシール（g）で覆った。貼り合わせたシートは6 mm幅で裁断し、テストストリップとした。当該テストストリップの外寸は、6 mm×70 mm（幅×長さ）であった。測定の際は、プラスチック製の専用のハウジング（サンプル添加窓部及び検出窓部を有する、当該ハウジングは図1中には図示せず）に格納・搭載し、イムノクロマトデバイスの形態とした。

【0058】

（6）検体液の調製

実施例1で選択したN末端露出剤を、表3に記載の濃度になるように、0.3%BSA、0.05%プロクリン（登録商標）300を含む10 mmol/L トリス緩衝液（pH7.2）（以下、「BSA-Tris」ということがある）に溶解し、検体前処理液とした。続いて、各検体前処理液500 μLに溶血赤血球1 μLを添加してよく混合し、検体液とした。

10

【0059】

（7）測定

前記混合から30秒後、当該検体液150 μLを前記（5）で作製したイムノクロマトデバイスのサンプルパッドに滴下し、A1cラインへの各粒子標識抗体の集積（以下、「A1c検出ラインの形成」等ということがある）を確認した。さらに、滴下から15分後に、ハウジングよりテストストリップを取り出して、図1上段に記載の側面図における粒子標識抗体含有パッド（c）の終端と抗体固定化メンブレン（d）の接触部位の近傍（以下「標識パッド接点」という）における金コロイド粒子標識抗体又はラテックス粒子標識抗体の凝集を目視観察した。

20

【0060】

（11）結果

結果を表3に示す。実施例1で選択したN末端露出剤として、スクロースモノラウレート（非イオン性界面活性剤）、ラウリル硫酸ナトリウム（アニオン性界面活性剤）、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム（カチオン性界面活性剤）、ラウリルベタイン（両性界面活性剤）、塩酸グアニジン（カオトロピック剤）をそれぞれ含む検体前処理液を用いて溶血赤血球を処理した検体液を、未処理サンプルパッドに滴下し測定したところ、以下の結果であった。

【0061】

（1）金コロイド粒子標識抗体で検出した場合

ラウリル硫酸ナトリウムを含む検体液の場合を除き、A1c検出ラインの形成は再現性が不良であり、塩酸グアニジンを含む検体液の場合にはA1c検出ラインが形成されなかった。また、ラウリル硫酸ナトリウムを含む検体液の場合を除き、標識パッド接点における金コロイド粒子標識抗体の凝集が確認された。金コロイド粒子標識抗体の凝集の程度は、N末端露出剤として、塩酸グアニジン又は臭化ラウリルトリメチルアンモニウムを用いた場合が最も大きかったが、スクロースモノラウレート又はラウリルベタインを用いた場合にも明瞭に確認できた。

30

【0062】

（2）ラテックス粒子標識抗体で検出した場合

塩酸グアニジンを含む検体液の場合にはA1c検出ラインが形成されず、その他のN末端露出剤でもA1c検出ラインの形成は再現性が不良であった。また、いずれのN末端露出剤を含む検体液の場合でも、標識パッド接点におけるラテックス粒子標識抗体の凝集が確認された。ラテックス粒子標識抗体の凝集の程度は、N末端露出剤として、塩酸グアニジン、又は臭化ラウリルトリメチルアンモニウムを用いた場合が最も大きく、次いでラウリルベタイン又はラウリル硫酸ナトリウム、さらにスクロースモノラウレートを用いた場合の順であった。

40

【0063】

以上のように、N末端露出剤として、金コロイド粒子標識抗体の凝集を認めなかったラウリル硫酸ナトリウムを用いた場合でも、ラテックス粒子標識抗体の凝集が確認されたこ

50

とより、実施例 1 で選択した N 末端露出剤を含む検体液を粒子イムノクロマト法に広く適用しようとした場合、N 末端露出剤のカテゴリに拘わらず粒子標識抗体を凝集させ、粒子イムノクロマト法による測定系が成立しない場合があることが確認された。

【 0 0 6 4 】

【 表 3 】

| 検討 番号 | N末端露出剤 | | 金コロイド | | ラテックス | |
|----------|----------------------------------|--------|-------|----------|-------|----------|
| | カテゴリ:名称 | 濃度 | 粒子凝集 | A1cライン形成 | 粒子凝集 | A1cライン形成 |
| 1 | カオトロピック剤 :塩酸グアニジン | 3mol/L | +++ | - | +++ | - |
| 2 | 非イオン性界面活性剤 :スクロースモノラウレート | 1% | + | ± | + | ± |
| 3 | アニオン性界面活性剤 :ラウリル硫酸ナトリウム | 1% | - | + | ++ | - |
| 4 | カチオン性界面活性剤 :臭化ラウリルトリメチルアンモニウム | 1% | +++ | ± | +++ | ± |
| 5 | 両性界面活性剤 :ラウリルペタイン | 1% | + | ± | ++ | ± |

10

【 0 0 6 5 】

表 3 において、「 - 」は粒子標識抗体の凝集あるいは A 1 c 検出ラインの形成を認めず、「 + 」、「 ++ 」、「 +++ 」は + の数に応じて粒子標識抗体の凝集の程度が大きい、又は A 1 c 検出ラインの形成が明瞭であったことを示す。なお「 ± 」は、 A 1 c 検出ライン形成の再現性が不良であったことを示す。

20

【 0 0 6 6 】

比較例 2 : 環状多糖類による粒子標識抗体凝集の改善効果の確認 (1)

(I) 材料と方法

(1) 環状多糖類水溶液の作製

表 4 に示す環状多糖類のいずれかを、表 4 に記載の濃度含有する 5 mmol / L M E S 緩衝液 (pH 6 . 0) を調整し、環状多糖類水溶液を作製した。また、糖が環状に結合してなる環状多糖類と類似した構造を有するカリックスアレーン類 (フェノールが環状に結合してなる) も、前記と同様にその水溶液を調製し、参考条件として試験した。

【 0 0 6 7 】

(2) イムノクロマトデバイスの作製

30

比較例 1 (I) (1) に記載の未処理サンプルパッドと、同 (2) に記載の金コロイド粒子標識結合抗体含有パッドと、同 (4) に記載の抗体固定化メンブレンを用い、同 (5) に記載の方法と同様にしてイムノクロマトデバイスを作製した。

【 0 0 6 8 】

(3) 検体液の調製

臭化ラウリルトリメチルアンモニウム (実施例 1 で選択された N 末端露出剤 : カチオン性界面活性剤) を、 0 . 7 5 % (w / v) となるよう、 B S A - T r i s に溶解し、検体前処理液とした。続いて、当該検体前処理液 5 0 0 μ L に溶血赤血球 1 μ L を添加してよく混合し、検体液とした。前記混合から 3 0 秒後、当該検体液 8 0 μ L に、前記 (1) で調製した環状多糖類水溶液 5 0 μ L を混合し、環状多糖類含有検体液とし、直ちに測定に

40

使用した。別途、 - シクロデキストリンを 5 0 mmol / L となるよう、 B S A - T r i s に溶解し、 N 末端露出剤、及び溶血赤血球の添加は行わず、そのままコントロール用検体液として使用した。

【 0 0 6 9 】

(4) 測定

当該各環状多糖類含有検体液 1 5 0 μ L を、前記 (2) で作製したイムノクロマトデバイスのサンプルパッドに滴下し、 A 1 c 検出ラインの形成を確認した。さらに、滴下から 1 5 分後に、ハウジングよりテストストリップを取り出して、標識パッド接点における金コロイド粒子標識抗体の凝集を目視確認した。なお、参考条件として試験したカリックス

50

アレーン類は、臭化ラウリルトリメチルアンモニウムを含む検体液と混合すると検体液が白濁したことから、サンプルパッドへ滴下以降の操作を行わなかった。

【 0 0 7 0 】

(II) 結果

結果を表 4 に示す。いずれの環状多糖類含有検体液を測定した場合でも、環状多糖類非添加の検体液を測定した場合と比較して、A 1 c 検出ラインの形成が確認されるものの形成された検出ラインは明瞭ではなく、再現性もいまだ不良であった。また、標識パッド接点における金コロイド粒子標識抗体の凝集はいずれの環状多糖類を使用した場合でも、環状多糖類非添加の検体液を測定した場合と比較して改善されてはいたが、A 1 c 検出ラインの形成が不良であることより、その効果は実用上十分なものとはいえなかった。

10

また、N 末端露出剤、及び溶血赤血球を含んでいないコントロール用検体液を測定した場合には、環状多糖類非添加の検体液を測定した場合と比較して程度は小さいものの標識パッド接点に凝集が確認された。従来、シクロデキストリンは、微粒子の分散安定化効果が知られているため、シクロデキストリンと金コロイド粒子標識抗体の混合液であるコントロール用検体液の測定において、金コロイド粒子標識抗体の凝集が生じることはないものと考えられたが、意外にも金コロイド粒子標識抗体を凝集させる場合があることがわかった。以上より、単に環状多糖類を N 末端露出剤と共存させて測定を行っただけでは粒子イムノクロマト法には適用できないことが確認された。

なお、環状多糖類に代えて、シクロデキストリンの構成糖であるグルコースを用いて非環状糖水溶液を調製し、本比較例と同様に操作したが、粒子標識抗体凝集及び A 1 c 検出ラインの形成は、環状多糖類非添加の場合と同様であった。以上より、環状多糖であることが、粒子標識抗体凝集及び A 1 c 検出ライン形成の改善に有効であることが確認された。

20

【 0 0 7 1 】

【表 4】

| 検討番号 | 環状多糖類 | 濃度 | 検体液 | 金コロイド凝集 | A1cライン形成 |
|------|-----------------------------------------------------|-----------|------------------|---------|----------|
| 1 | α -シクロデキストリン (ナカライテスク、10005-82) | 100mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | + | ± |
| 2 | 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (和光純薬、326-84232) | 100mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | + | ± |
| 3 | γ -シクロデキストリン (和光純薬、039-10642) | 100mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | + | ± |
| 4 | シクロアミロース (江崎グリコ、308-32403) | 50mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | ++ | ± |
| 5 | カリックス[6]アレーン (同仁化学、C392) | 50mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | データなし | データなし |
| 6 | カリックス[8]アレーン (同仁化学、C393) | 50mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | データなし | データなし |
| 7 | α -シクロデキストリン (ナカライテスク、10005-82) | 50mmol/L | 検体前処理液のみ | ++ | ± |
| 8 | 環状多糖非添加 | 0mmol/L | 検体前処理液と 溶血赤血球 | +++ | - |

30

【 0 0 7 2 】

表 4 において、「+」、「++」は+の数に応じて粒子標識抗体凝集の程度が大きいか、又は A 1 c 検出ラインの形成が明瞭であったことを示す。なお「±」は、ライン形成の再現性が不良であったことを示す。

40

【 0 0 7 3 】

比較例 3 : 環状多糖類による粒子標識抗体凝集の改善効果の確認 (2)

(I) 材料と方法

(1) シクロデキストリン浸漬サンプルパッドの作製

精製水に、 α -シクロデキストリン (ナカライテスク、10005-82) 又はモノクロトリアジノ化シクロデキストリン (株式会社シクロケム、CAVASOL (登録商標) W7 MCT) を、10% (w / v) となるよう溶解し、環状多糖類水溶液を作製した。比較例 1 (I) (1) の未処理サンプルパッドを当該環状多糖類水溶液に 10 分間浸

50

漬した後、液が垂れない程度に液切りした後、室温で減圧乾燥し、2種類のシクロデキストリン浸漬サンプルパッドとした。

【0074】

(2) イムノクロマトデバイスの作製

比較例1(I)(1)に記載の未処理サンプルパッド又は前記(1)で作製した2種類のシクロデキストリン浸漬サンプルパッドと、比較例1(I)(2)に記載の金コロイド粒子標識結合抗体含有パッドと、比較例1(I)(4)に記載の抗体固定化メンブレンを用い、比較例1(I)(5)に記載の方法と同様にしてイムノクロマトデバイスを作製した。各デバイスに組み込んだサンプルパッドの種類により、デバイスA(未処理サンプルパッド)、デバイスB(α-シクロデキストリン浸漬サンプルパッド)、デバイスC(モノクロロトリアジノ化シクロデキストリン浸漬サンプルパッド)とした(表5)

10

【0075】

(3) 検体液の調製と測定

臭化ラウリルトリメチルアンモニウム(実施例1で選択されたN末端露出剤:カチオン性界面活性剤)を、0.75%(w/v)となるよう、BSA-Trisに溶解し、検体前処理液とした。続いて、当該検体前処理液500μLに溶血赤血球1μLを添加してよく混合し、検体液とした。当該検体液を比較例1(I)(7)と同様に測定した。

【0076】

(II) 結果

結果を表5に示す。デバイスA(未処理サンプルパッド)では、A1c検出ラインの形成を全く認めず、また標識パッド接点において金コロイド粒子標識抗体の凝集塊が密集した状態で確認され、比較例1及び2の結果を再現した。このように、N末端露出剤を含む検体液を、そのまま粒子イムノクロマト法に適用した場合、粒子標識抗体の凝集が生じ、測定系が成立しない。これに対しデバイスB(α-シクロデキストリン浸漬サンプルパッド)、デバイスC(モノクロロトリアジノ化シクロデキストリン浸漬サンプルパッド)では、A1c検出ライン形成の再現性は不良であったものの、標識パッド接点における金コロイド粒子標識抗体の凝集は、デバイスB、CともデバイスAに対して明らかに改善されていた。金コロイド粒子標識抗体の凝集が改善されながら、A1c検出ライン形成の改善が見られない理由の一つとして、シクロデキストリン溶液の粘性の影響が考えられる。すなわち、乾燥状態でサンプルパッドに含まれていたシクロデキストリンが、検体液の添加により再溶解し、サンプルパッドより漏出して抗体固定化メンブレンに到達し、当該メンブレン上を検体液と一緒に展開しようとするため、検体液の当該メンブレン上での展開が不均一になるか妨害され、検体液(特にHbA1cと粒子標識抗体の免疫複合体)がA1cラインまで均一かつ十分に到達することができなかったことが考えられる。

20

30

このように、環状多糖類は、N末端露出剤による金コロイド粒子標識抗体の凝集を抑制・改善する効果を有することが確認される一方で、その粘性の高さ等が原因となって粒子イムノクロマト法への適用の障害となることがわかった。

【0077】

【表5】

| デバイス | 環状多糖類 | 加工方法 | 金コロイド凝集 | A1cライン形成 |
|------|-----------------------|------|---------|----------|
| (A) | なし | なし | +++ | - |
| (B) | α-シクロデキストリン | 浸漬 | + | ± |
| (C) | モノクロロトリアジノ化βシクロデキストリン | 浸漬 | + | ± |

40

【0078】

表5において、「-」は粒子標識抗体の凝集あるいはA1c検出ラインの形成を認めず、「+」、「++」、「+++」は+の数に応じて粒子標識抗体の凝集の程度が大きい、又はA1c検出ラインの形成が明瞭であったことを示す。なお、「±」は、ライン形成の再現性が不良であったことを示す。

50

【0079】

実施例2：本発明の方法を用いた環状多糖類による粒子標識抗体凝集の改善効果の確認

(I) 材料と方法

(1) シクロデキストリン化学結合サンプルパッドの作製

精製水に、炭酸ナトリウムを4% (w/v)、モノクロロトリアジノ化シクロデキストリン(株式会社シクロケム、CAVASOL(登録商標)W7 MCT)を10% (w/v)となるよう溶解した。比較例1(I)(1)の未処理サンプルパッドを当該液に10分間浸漬した後、液が垂れない程度に液切りした後、室温で減圧乾燥させた。続いて150にて10分間加熱した後、精製水に浸漬して未反応原料を洗浄・除去し、さらに70で30分乾燥させて、シクロデキストリン化学結合サンプルパッドとした。

10

【0080】

(2) イムノクロマトデバイスの作製

比較例1(I)(1)に記載の未処理サンプルパッド又は前記(1)で作製したシクロデキストリン化学結合サンプルパッドと、比較例1(I)(2)又は比較例1(I)(3)に記載の2種類の粒子標識結合抗体含有パッドと、比較例1(I)(4)に記載の抗体固定化メンブレンを用い、比較例1(I)(5)に記載の方法と同様にしてイムノクロマトデバイスを作製した。

【0081】

(3) 検体液の調製と測定

実施例1で選択したN末端露出剤として、スクロースモノラウレート、ラウリル硫酸ナトリウム、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム、ラウリルベタイン、塩酸グアニジンを使用し、比較例1(I)(6)と同様の方法で検体液を調製した。測定は、比較例1(I)(7)と同様の方法で行った。

20

【0082】

(II) 結果

結果を表6に示す。

(1) 金コロイド粒子標識抗体で検出した場合

N末端露出剤として塩酸グアニジンを使用した場合を除き、A1c検出ラインの形成は明瞭に、かつ再現性よく確認された。また、標識パッド接点における金コロイド粒子標識抗体の凝集も、N末端露出剤として塩酸グアニジンを使用した場合を除き、顕著に改善され、目視で確認されることはなかった。

30

【0083】

(2) ラテックス粒子標識抗体で検出した場合

N末端露出剤として塩酸グアニジンを使用した場合を除き、A1c検出ラインの形成は明瞭に、かつ再現性よく確認された。また、標識パッド接点におけるラテックス粒子標識抗体の凝集は、ラウリル硫酸ナトリウム、臭化ラウリルトリメチルアンモニウム、ラウリルベタインで顕著に改善され、目視で確認されることはなかった。スクロースモノラウレートでは、未処理サンプルパッドを使用した場合と比較して凝集は減少していたが、わずかに観察される場合があった。塩酸グアニジンの場合には、ラテックス粒子標識抗体の凝集がなお確認された。

40

【0084】

以上より、サンプルパッドとしてシクロデキストリン化学結合パッドを組み込んだテストストリップを格納・搭載したイムノクロマトデバイスは、N末端露出剤として非イオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤のいずれを検体前処理に用いた場合にも使用することができ、検出用の標識粒子として金コロイド粒子、ラテックス粒子のいずれを用いた場合にも凝集の改善に有効であった。

なお、塩酸グアニジンを用いた場合、粒子凝集、及びA1cライン形成の改善効果が界面活性剤を用いた場合と比較して低かった理由の一つとして、N末端露出に必要な塩酸グアニジンの量(濃度)が界面活性剤群の量(濃度)よりも高いことが考えられる。これより、検体液中の塩酸グアニジンに対する環状多糖類

50

の量比を適切な範囲に調整することで本発明の効果を得ることができると推測される。

【0085】

【表6】

| 検討 番号 | N末端露出剤 | | 金コロイド | | ラテックス | |
|----------|----------------------------------|--------|-------|----------|-------|----------|
| | カテゴリ:名称 | 濃度 | 粒子凝集 | A1cライン形成 | 粒子凝集 | A1cライン形成 |
| 1 | カオトロピック剤 :塩酸グアニジン | 3mol/L | ++ | - | ++ | - |
| 2 | 非イオン性界面活性剤 :スクロースモノラウレート | 1% | - | + | + | + |
| 3 | アニオン性界面活性剤 :ラウリル硫酸ナトリウム | 1% | - | + | - | + |
| 4 | カチオン性界面活性剤 :臭化ラウリルトリメチルアンモニウム | 1% | - | + | - | + |
| 5 | 両性界面活性剤 :ラウリルベタイン | 1% | - | + | - | + |

10

【0086】

表6において、「-」は粒子標識抗体の凝集あるいはA1c検出ライン形成を認めず、「+」、「++」は+の数に応じて粒子標識抗体の凝集の程度が大きいか、又はA1c検出ラインの形成が明瞭であったことを示す。

【0087】

実施例3：本発明の方法を用いたHbA1cの定量的測定

(I) 材料と方法

20

(1) イムノクロマトデバイスの作製

実施例2(I)(1)に記載のシクロデキストリン化学結合サンプルパッド、比較例1(I)(2)に記載の金コロイド粒子標識結合抗体含有パッド、比較例1(I)(4)に記載の抗体固定化メンブレンを用い、比較例1(I)(5)に記載の方法と同様にしてイムノクロマトデバイスを作製した。

【0088】

(2) 比較測定

EDTA採血管で採取した血液を、10、3000rpmで5分間遠心して赤血球を分離した。酵素法によるHbA1c測定試薬「ノルディア(登録商標)N HbA1c」(積水メディカル株式会社)、「ノルディア(登録商標)N HbA1c用HbA1c前処理液」(積水メディカル株式会社)、及び汎用自動分析装置「BM9130」(日本電子株式会社)を用い、添付文書に従ってHbA1c(%) (検体中の総ヘモグロビン濃度に対するHbA1c濃度)を測定した。

30

【0089】

(3) 検体液の調製

臭化ラウリルトリメチルアンモニウム(実施例1で選択されたN末端露出剤:カチオン性界面活性剤)を、0.75%(w/v)となるよう、BSA-Trisに溶解し、検体前処理液とした。前記(2)で得られた赤血球1μLを、500μLの当該検体前処理液に添加し、よく混合して検体液とした。

【0090】

40

(4) 測定

前記混合から30秒後、当該検体液150μLを前記(1)で作製したイムノクロマトデバイスのサンプルパッドに滴下し、10分後のA1cライン吸光度(反射光)を、ラビッドピア(浜松ホトニクス)で測定した。

【0091】

(II) 結果

10人分の赤血球について、本発明のイムノクロマトデバイス及びノルディア(登録商標)N HbA1cで測定した結果を、表7、図2に示す。本発明のシクロデキストリン化学結合パッドを組み込んだイムノクロマトデバイスを用いた測定では、ノルディアN HbA1cを用いて測定したHbA1c(%)の濃度に依存した吸光度が測定された(相

50

関係数 $r = 0.964$)。以上より、本発明の方法によれば検体中の総ヘモグロビン濃度に対する HbA1c 濃度を測定できることが確認された。

【0092】

【表7】

| 検体番号 | ノルディアN HbA1c 測定値 (%) | 測定結果 吸光度 (mAbs) |
|------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 4.61 | 230 |
| 2 | 4.58 | 200 |
| 3 | 4.99 | 284 |
| 4 | 5.04 | 241 |
| 5 | 5.99 | 344 |
| 6 | 6.06 | 364 |
| 7 | 6.91 | 389 |
| 8 | 7.22 | 378 |
| 9 | 8.38 | 432 |
| 10 | 9.20 | 501 |

10

【0093】

参考例2：抗HbA0特異抗体の調製

(I) 材料と方法

(1) 材料

抗HbA0抗体は、前記参考例1(I)(3)で調製したペプチド結合タンパク(VHLTC-OVA)を免疫原として、常法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。ハイブリドーマのスクリーニングでは、抗原固相化ELISAで精製HbA0と反応し、かつ精製HbA1cと反応しない株を選択した。前記スクリーニングで選択された株についてクローニングを実施し、抗HbA0モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを独立行政法人産業技術総合研究所(2008年11月28日付け、日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1中央第6)に寄託した。寄託番号は以下のとおりである。

抗体番号：85201

受託番号：FERM BP-11187

【0094】

なお、精製HbA0固定化プレートと前記抗HbA0抗体を用い、実施例1(I)1(3)、及び同(4)と同様の方法にて、表1及び表2記載の各N末端露出剤による抗原抗体反応阻害の有無を確認したところ、いずれのN末端露出剤も「抗原抗体反応を阻害しない」と判定された。以上より、選択された本発明のN末端露出剤によって抗HbA0抗体の認識部位が損なわれる、もしくは抗HbA0抗体との抗原抗体反応が阻害されることなく、抗ヘモグロビン抗体とのサンドイッチ法により検体中のHbA0を検出可能であることを確認した。

【0095】

実施例4：本発明の方法を用いたHbA1cとHbA0の同時検出

(1) 抗体固定化メンブレンの作製

10 mmol/L リン酸緩衝液(pH7.0)に対し、参考例2で作製した抗HbA0抗体を1.0 mg/mL、スクロースを2.5% (w/v) となるように添加し、抗HbA0抗体固定化試薬(以下、A0用抗体という)とした。A1c用抗体は、参考例1(I)(4)に記載のA1c用抗体を使用した。前記2種の抗体固定化試薬を、ニトロセルロースメンブレン(ミリポア社、HF180)に、展開の開始方向からA1c用抗体(図3(e))、A0用抗体(図3(f))の順序で、ライン状に、相互に間隔をあけて塗布し、乾燥機で乾燥させたものを抗体固定化メンブレンとした(図3(d))。以下、A1c用抗体が塗布されたライン(図3(f))を「A0ライン」ということがある。

【0096】

(2) イムノクロマトデバイスの作製

20

30

40

50

抗体固定化メンブレンとして前記(1)で作製した抗体固定化メンブレンを使用した以外は、実施例3と同様の方法でイムノクロマトデバイスを作製した。

【0097】

(3) 検体液の調製

臭化ラウリルトリメチルアンモニウムを、0.75%(w/v)となるよう、BSA-Trisに溶解し、検体前処理液とした。続いて、当該検体前処理液500μLに溶血赤血球1μLを添加してよく混合し、検体液とした。

【0098】

(4) 測定

前記混合から30秒後、当該検体液150μLを前記(2)で作製したイムノクロマトデバイスのサンプルパッドに滴下し、A1cラインまたはA0ラインへの粒子標識抗体の集積(以下、「A1c又はA0検出ラインの形成」等ということがある)を確認した。さらに、滴下から15分後に、ハウジングよりテストストリップを取り出して、図3上段に記載の側面図における粒子標識抗体含有パッド(c)の終端と抗体固定化メンブレン(d)の接触部位の近傍(以下「標識パッド接点」という)における金コロイド粒子標識抗体又はラテックス粒子標識抗体の凝集を目視観察した。

10

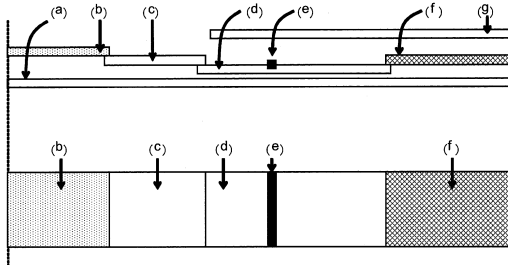
【0099】

(II) 結果

本発明のシクロデキストリン化学結合パッドを組み込んだイムノクロマトデバイスを用いた測定では、A1c検出ライン、HbA0検出ラインとも良好に形成が確認できた。また、標識パッド接点における金コロイド粒子の凝集も認めなかった。以上より、本発明の方法では粒子イムノクロマト法によるHbA1cとHbA0の同時検出が可能であり、従来達成されていなかった、HbA0を直接測定してHbA1c(%)を算出する方法を簡便に実施することが可能になった。

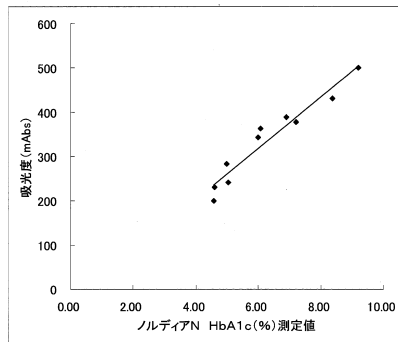
20

【図1】

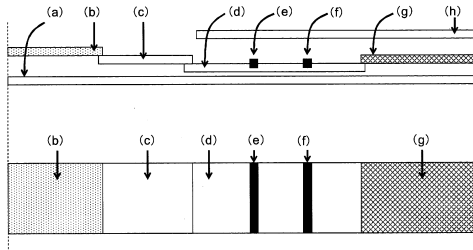


- (a) プラスチック製粘着シート
- (b) サンプルパッド
- (c) 粒子標識抗体含有パッド
- (d) 抗体固定化メンブレン
- (e) 抗HbA1c抗体塗布部
- (f) 吸水パッド
- (g) 透明プラスチックシール

【図2】



【図3】



- (a) プラスチック製粘着シート
- (b) サンプルパッド
- (c) 粒子標識抗体含有パッド
- (d) 抗体固定化メンブレン
- (e) 抗HbA1c抗体塗布部
- (f) 抗HbA0抗体塗布部
- (g) 吸水パッド
- (h) 透明プラスチックシール

【配列表】

0005852329000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 柏木 美恵子

茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3 - 1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2010/067612(WO, A1)

特開2007-003411(JP, A)

特開平08-248030(JP, A)

特開平05-209878(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

| | | | |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | HbA1c的免疫学测量方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP5852329B2 | 公开(公告)日 | 2016-02-03 |
| 申请号 | JP2011122538 | 申请日 | 2011-05-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 积水医疗株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 积水医疗有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 积水医疗有限公司 | | |
| [标]发明人 | 柏木美惠子 | | |
| 发明人 | 柏木 美惠子 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.V G01N33/543.521 G01N33/543.515.H G01N33/543.515.D G01N33/543.541.Z | | |
| 代理人(译) | 村田正树 | | |
| 其他公开文献 | JP2012251789A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种适用于免疫色谱作为简单测量系统的方法，并免疫和准确地测量HbA1c。解决方案：提供了一种用于HbA1c的免疫层析方法，包括方法（A），（B），（C）和（D）如下：用表面活性剂处理含有红细胞的测量样品的方法（A），所述表面活性剂具有在蛋白质表面上暴露血红蛋白β链的N-末端的性质；（A）中，将工序（A）中得到的测定样品与水不溶性环状多糖接触的工序（B）；（步骤（C）：使在步骤（B）中获得的测量样品与识别用颗粒标记的血红蛋白的N-末端的抗体或识别除血红蛋白标记的N-末端之外的抗体的颗粒接触的过程（C）；检测识别用颗粒标记的血红蛋白的N-末端的抗体和/或用该颗粒识别除血红蛋白标记的N-末端以外的抗体和HbA1c的免疫复合物的过程（D）。

| | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|-------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2011-122538 (P2011-122538) | (73) 特許権者 | 390037327 |
| (22) 出願日 | 平成23年5月31日 (2011.5.31) | | 積水メディカル株式会社 |
| (65) 公開番号 | 特開2012-251789 (P2012-251789A) | | 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 |
| (43) 公開日 | 平成24年12月20日 (2012.12.20) | (74) 代理人 | 110000084 |
| 審査請求日 | 平成26年2月18日 (2014.2.18) | | 特許業務法人アルガ特許事務所 |
| | | (74) 代理人 | 100077562 |
| | | | 弁理士 高野 登志雄 |
| | | (74) 代理人 | 100096736 |
| | | | 弁理士 中嶋 俊夫 |
| | | (74) 代理人 | 100117156 |
| | | | 弁理士 村田 正樹 |
| | | (74) 代理人 | 100111028 |
| | | | 弁理士 山本 博人 |