

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5574977号
(P5574977)

(45) 発行日 平成26年8月20日(2014.8.20)

(24) 登録日 平成26年7月11日(2014.7.11)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/72	(2006.01)	GO 1 N 33/72		A
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48		A
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		V

請求項の数 6 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2010-542028 (P2010-542028)	(73) 特許権者	390037327
(86) (22) 出願日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		積水メディカル株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/006769		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(87) 国際公開番号	W02010/067612	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成22年6月17日 (2010.6.17)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成24年6月26日 (2012.6.26)	(74) 代理人	100068700
(31) 優先権主張番号	特願2008-316174 (P2008-316174)		弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成20年12月11日 (2008.12.11)	(74) 代理人	100077562
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		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】 糖化ヘモグロビン含有試料の前処理法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖化ヘモグロビン含有試料を、(A) グアニジン又はその塩と (B) 非イオン性界面活性剤及び / 又は亜硝酸塩とを含有する前処理液で処理することを特徴とする糖化ヘモグロビンの免疫学的測定用糖化ヘモグロビン含有試料の前処理法であって、

グアニジン又はその塩の使用濃度が 1 ~ 6 mol / L、非イオン性界面活性剤の使用濃度が 0.1 ~ 5%、亜硝酸塩の使用濃度が 1 ~ 50 mmol / L である前処理法。

【請求項2】

グアニジン又はその塩の使用濃度が 2.5 ~ 3.5 mol / L である請求項1記載の前処理法。

【請求項3】

(A) グアニジン又はその塩と (B) 非イオン性界面活性剤及び / 又は亜硝酸塩とを含有することを特徴とする、糖化ヘモグロビンの免疫学的測定用糖化ヘモグロビン含有試料前処理液であって、

グアニジン又はその塩の使用濃度が 1 ~ 6 mol / L、非イオン性界面活性剤の使用濃度が 0.1 ~ 5%、亜硝酸塩の使用濃度が 1 ~ 50 mmol / L である前処理液。

【請求項4】

グアニジン又はその塩の使用濃度が 2.5 ~ 3.5 mol / L である請求項3記載の前処理液。

【請求項5】

糖化ヘモグロビン含有試料を、(A) グアニジン又はその塩と(B) 非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩とを含有する前処理液で処理し、次いで抗糖化ヘモグロビン抗体を用いる免疫学的測定することを特徴とする糖化ヘモグロビン含有試料中の糖化ヘモグロビンの免疫学的測定方法であって、

グアニジン又はその塩の使用濃度が1～6 mol/L、非イオン性界面活性剤の使用濃度が0.1～5%、亜硝酸塩の使用濃度が1～50 mmol/Lである測定方法。

【請求項6】

グアニジン又はその塩の使用濃度が2.5～3.5 mol/Lである請求項5記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖化ヘモグロビン、特に糖化ヘモグロビンA1cを免疫学的手段により正確に測定する方法に関する。

【背景技術】

【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)は、臨床的に過去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。

20

【0003】

糖化ヘモグロビンの測定法としては、HPLC法及び免疫学的測定法が知られているが、免疫学的測定法においては、ヘモグロビンの糖化されている部位に特異的な抗体を用いる必要がある。ヘモグロビン鎖N末端の糖化部位は、タンパク質の表面に存在するのではなく内部に埋もれており、抗体が結合し難い場所に存在することが判明している。従って、当該エピトープ部位を認識する抗体を効率良く反応させるために、当該エピトープ部位を表面に露出化させる技術が開発されている(特許文献1)。

【0004】

エピトープ露出化手段としては、糖化ヘモグロビン含有試料をグアニジン、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使用するものや、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、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等により処理する手段(特許文献1～6)が知られている。

30

【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

【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

40

【特許文献6】特開2007-163182号公報

【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、従来のエピトープ露出化手段に関しては、例えばグアニジン処理は加熱処理が必要である。チオシアン酸は環境上有害な物質である。フェリシアニド等の酸化剤は着色しやすい等の保存安定性に問題がある。非イオン性界面活性剤単独では効果が十分でない等の問題があった。

従って、本発明の課題は、簡便な処理で、かつ保存安定性や環境面で問題がなく、かつ短時間で十分にエピトープを露出化できる、糖化ヘモグロビン含有試料の前処理手段及び

50

これを用いる糖化ヘモグロビンの免疫学的測定法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

そこで本発明者は、糖化ヘモグロビンの効率的かつ簡便なエピトープ露出化手段について検討したところ、グアニジンと非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩とを含有する溶液で、糖化ヘモグロビン含有試料を処理すれば、グアニジン、非イオン性界面活性剤及び亜硝酸塩をそれぞれ単独で用いた場合に比べて極めて優れたエピトープ露出化効果が得られ、加熱処理を施さなくても短時間で効率良く、糖化された部分が露出化され、糖化ヘモグロビンの正確な免疫学的測定が可能になることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、糖化ヘモグロビン含有試料を、(A)グアニジン又はその塩と(B)非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩とを含有する前処理液で処理することを特徴とする糖化ヘモグロビンの免疫学的測定用糖化ヘモグロビン含有試料の前処理法を提供するものである。

また、本発明は、(A)グアニジン又はその塩と(B)非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩とを含有することを特徴とする、糖化ヘモグロビンの免疫学的測定用糖化ヘモグロビン含有試料前処理液を提供するものである。

さらに本発明は、糖化ヘモグロビン含有試料を、(A)グアニジン又はその塩と(B)非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩とを含有する前処理液で処理し、次いで抗糖化ヘモグロビン抗体を用いる免疫学的測定することを特徴とする糖化ヘモグロビン含有試料中の糖化ヘモグロビンの免疫学的測定方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明の前処理法によれば、短時間の簡便な処理により、試料中の糖化ヘモグロビン中の糖化部分が効率的に露出化される。従って、当該前処理された試料を用いて抗糖化ヘモグロビン抗体を用いた免疫学的測定すれば、正確に糖化ヘモグロビンが定量可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】競合ELISA法にて各試薬のエピトープ露出化効果を比較した結果を示す。

【図2】競合ELISA法にて本発明試薬のエピトープ露出化効果におけるpHの影響を調べた結果を示す。

【図3】競合ELISA法にて本発明試薬の保存安定性を調べた結果を示す。

【図4】本発明試薬を用いたサンドイッチELISAによるHbA1c濃度測定系、及びHbA0濃度測定系における検量線を示す。

【図5】イムノクロマト法によるHbA1cの測定法概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の糖化ヘモグロビン含有試料は、糖化ヘモグロビン測定用の被検試料であり、例えば血液、赤血球画分等が挙げられる。ここで、糖化ヘモグロビンとしては、ヘモグロビン鎖が糖化された糖化ヘモグロビンが好ましく、特にHbA1cが好ましい。

【0012】

また、本発明方法により露出化されるエピトープ部位は、ヘモグロビンの糖化された領域であり、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。

【0013】

本発明の前処理に用いられる前処理液には、(A)グアニジン又はその塩と(B)非イオン性界面活性剤及び/又は亜硝酸塩とが含まれる。本発明によれば、成分(A)と成分(B)とを併用することにより、成分(A)又は成分(B)をそれぞれ単独で用いた場合に比べて極めて優れたエピトープ露出化効果が得られる。

【0014】

10

20

30

40

50

成分(A)のグアニジンとしては、グアニジン自体を用いることもできるが、グアニジン塩を用いるのが、エピトープ露出化効果の点で特に好ましい。グアニジンの塩としては、グアニジン塩酸塩が好ましい。グアニジンの使用濃度は、エピトープ露出化効果、及び抗体の反応性の点から、 $1\text{ mol/L} \sim 6\text{ mol/L}$ 、特に $2.5\text{ mol/L} \sim 3.5\text{ mol/L}$ が好ましい。

【0015】

成分(B)の非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アルキルグリコシド、アルカノイル-N-メチルグルカミド、(アルキルカルバモイル)メチル-グルコピラノシド、アルキルグルコピラノシド、デオキシコール酸アミド類、サポニン等が挙げられる。より具体的には、ポリオキシエチレン $C_6 - C_{24}$ アルキルエーテル、ポリオキシエチレン $C_6 - C_{24}$ アルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル、ポリオキシエチレン $C_6 - C_{24}$ 脂肪酸エステル、シヨ糖 $C_6 - C_{24}$ 脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン $C_6 - C_{24}$ 脂肪酸エステル、 $C_6 - C_{24}$ アルキルグリコシド、 $C_6 - C_{24}$ アルカノイルメチルグルカミド、($C_6 - C_{24}$ アルキルカルバモイル)メチル-グルコピラノシド、 $C_6 - C_{24}$ アルキルグルコピラノシド、N,N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)デオキシコールアミド、サポニンが挙げられる。

【0016】

非イオン性界面活性剤の使用濃度は、エピトープ露出化効果の点、及び抗体の反応性の点から、 $0.1\% \sim 5\%$ 、特に $0.2\% \sim 1.5\%$ が好ましい。

【0017】

成分(B)の亜硝酸塩としては、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム等の亜硝酸アルカリ金属塩が挙げられる。

【0018】

亜硝酸塩の使用濃度は、エピトープ露出化効果の点、及び抗体の反応性の点から、 $1\text{ mmol/L} \sim 50\text{ mmol/L}$ 、特に $5\text{ mmol/L} \sim 15\text{ mmol/L}$ が好ましい。

【0019】

非イオン性界面活性剤と亜硝酸塩は、それぞれ単独で使用してもよいし、併用してもよいが、併用するのが処理時間の短縮化、定量性の向上の点からさらに好ましい。

【0020】

また、本発明前処理液中の成分(A)と成分(B)の含有比(質量比)は、エピトープ露出化効果、及び抗体の反応性の点から特に限定されることは無く、上述した各成分の濃度範囲、すなわち、(A)が、 $1 \sim 6\text{ mol/L}$ 、(B)の非イオン性界面活性剤が、 $0.1 \sim 5\%$ 、また、(B)の亜硝酸塩が、 $1 \sim 50\text{ mmol/L}$ の範囲であればよい。

【0021】

本発明の前処理液は、前記成分(A)及び(B)を含有する水溶液として使用するのが好ましい。またこの水溶液のpHは、 $4.0 \sim 9.0$ 、さらに $4.5 \sim 7.0$ 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。

【0022】

本発明の前処理液を用いて、糖化ヘモグロビン含有試料を処理するには、糖化ヘモグロビン含有試料溶液に、前処理液を添加し、攪拌すればよい。温度は、 $15 \sim 50$ 、さらに $20 \sim 40$ が好ましい。処理時間は30秒間 \sim 30分間、さらに1分間から5分

10

20

30

40

50

間が好ましい。

【0023】

糖化ヘモグロビン含有試料中の糖化ヘモグロビンは、前記処理により、糖化部位が効率良く、露出化される。従って、この処理試料について、抗糖化ヘモグロビン抗体を用いる免疫学的測定をすれば、糖化ヘモグロビン含有試料中の糖化ヘモグロビン含有量が正確に定量できる。

【0024】

本発明方法における、糖化ヘモグロビンの測定法は、通常の免疫測定法であればいずれも採用できる。ここで免疫測定法としては、サンドイッチELISA法、競合ELISA法、イムノクロマト法、ラテックス凝集法、競合ラテックス凝集法等が挙げられる。以下、HbA1cの測定を例として説明する。

【0025】

例えば、サンドイッチELISA法で測定する場合には、精製したHbA1cを標準品として次のような方法でHbA1cを定量できる。すなわち、抗HbA1c抗体を固定化したELISAプレートに、本発明の前処理液で処理した検体試料を添加し反応させた後、酵素標識した抗ヘモグロビン抗体（以下、「抗Hb抗体」という）を反応させ、発色後の吸光度の変化から、試料中に存在するHbA1cを特異的に定量できる。

ラテックス凝集法で測定する場合には、精製したHbA1cを標準品として、次のような方法で定量することができる。すなわち、抗HbA1c抗体を不溶性担体であるラテックス粒子に感作し、本発明の前処理液で処理した検体試料、及び抗Hbモノクローナル抗体に接触させることにより、試料中のHbA1cを介して抗体感作ラテックス粒子同士が架橋し凝集を生じるため、この凝集度の変化から当該HbA1cを特異的に定量できる。

競合ラテックス凝集法で測定する場合には、精製したHbA1cを標準品として、次のような方法で定量することができる。すなわち、HbA1cの鎖N末端の糖化ペプチド、例えば糖化6残基ペプチド（f-VHLTPE（配列番号1））を不溶性担体であるラテックス粒子に感作し、本発明の前処理液で処理した検体試料、及び抗HbA1c抗体を接触させることにより、f-VHLTPE感作ラテックス粒子と抗HbA1c抗体による凝集反応に対して検体試料中のHbA1cが競合阻害を示すため、この競合阻害の変化から検体試料中のHbA1cを特異的に定量できる。

【0026】

ラテックス凝集法等における抗体感作ラテックス粒子のラテックス粒子としては、ラテックス凝集反応を利用した免疫学的凝集反応及び凝集阻止反応において、一般的に用いられている微粒子の担体であれば特に制限されないが、工業的に大量生産することができる有機系微粒子が好ましい。このような有機系微粒子としては、例えば、スチレン、塩化ビニル、アクリロニトリル、酢酸ビニル、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル等のビニル系モノマーの単独重合体又は共重合体；スチレン-ブタジエン共重合体、メチルメタクリレート-ブタジエン共重合体等のブタジエン系共重合体等が挙げられる。また、このような有機系微粒子に、カルボキシル基、第一級アミノ基、カルバモイル基、水酸基、アルデヒド基等の官能基が結合した反応性有機系微粒子も好ましく使用することができる。上記のラテックス粒子の中では、抗原又は抗体の吸着性に優れ、生物学的活性を長期間安定に保持できる点から、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体等のポリスチレン系ラテックス粒子が好ましい。

【0027】

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蛋白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0.02~1.6μmであり、特に0.03~0.5μmが好ましい。

【0028】

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

10

20

30

40

50

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などが挙げられる。

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ヘモグロビンA0（以下、「HbA0」という）とHbA1cとが同時に測定できるので特に好適である。例えば図5に示す如く、抗HbA0抗体及び抗HbA1c抗体とをそれぞれ別の部位（Aライン及びBライン）に固定化したイムノクロマト支持体を用いる。本発明の前処理液で処理したHbA1c含有検体をサンプルパッドに滴下する。滴下された試料は、毛細管現象により展開され、Aラインに到達すると試料中のHbA0のみが反応し、Bラインに到達すると試料中のHbA1cのみが反応する。その他のヘモグロビンは反応せずにエンドパッドまで移動する。Aライン及びBラインの色の濃さ、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HbA0及びHbA1cがそれぞれ定量できる。ここで、HbA0の定量値をA、HbA1cの定量値をBとすると、 $HbA1c(\%) = (B / (A + B)) \times 100$ として、HbA1c(%)を求めることも出来る。

10

【0029】

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（特開昭61-172064号公報、特開平6-66796号公報）記載のもの等が使用可能である。

【実施例】

【0030】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

20

【0031】

実施例1（エピトープ露出効果の比較）

（I）材料と方法

（1）精製HbA0及び精製HbA1cの調製

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

【0032】

30

（2）各種ペプチド、及び糖化ペプチドの調製

各配列のペプチドは、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で95%以上であることを確認した。また、分子量は、質量分析装置（MALTI-TOF）にて理論値と同じであることを確認した。糖化ペプチドは、特許文献（特開昭61-172064号公報）記載の方法にて合成及び精製した。すなわち、各配列のペプチド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、質量分析装置（MALTI-TOF）で理論値、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。

【0033】

40

（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

上記（2）で調製したペプチド又は糖化ペプチドの内、C末端をシステイン（C）にして合成したものについて（例えば、VHLTC（配列番号2）、f-VHLTC）、次のようにキャリアタンパクに結合させた。すなわち、0.15mol/L NaCl含有20mmol/Lリン酸緩衝液pH7.2（以下、「PBS」という）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（OVA）（PIERCES社製）と1対1で混和後、室温で緩やかに回転させながら2時間インキュベートし、PBSで透析して使用した（VHLTC-OVA、f-VHLTC-OVA）。

【0034】

50

(4) 抗ヘモグロビン抗体、抗HbA1c抗体、及び抗HbA0抗体の調製

抗ヘモグロビン抗体は、上記(1)の精製HbA0を免疫原として定法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。抗HbA1c抗体は、特許文献(特開昭61-172064号公報)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、上記(2)で合成した糖化ペプチド(f-VHLTP E E K Y Y C(配列番号3))をスカシ貝ヘモシアニン(以下、KLHという)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、且つ精製HbA0と反応しない株を選択した。抗HbA0抗体は、上記(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、定法にて作製したマウスモノクローナル抗体を使用した。この時、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、且つ精製HbA1cと反応しない株を選択した。

10

抗HbA0抗体については、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

【0035】

(5) 検体処理方法

ヒト赤血球を1:50の比率で各処理液と混和し、25℃で10分間処理した。その後、その混合液を1%BSA-0.05%Tween20-PBS(以下、「1%BSA-PBST」という)で4倍(HbA1c濃度:64µg/mL)、40倍(HbA1c濃度:6.4µg/mL)、又は400倍(HbA1c濃度:0.64µg/mL)の各濃度に希釈し、後述する競合ELISAに供した。

20

【0036】

(6) 競合ELISA

a. 上記(3)で調製したf-VHLTC-OVAをPBSで1µg/mLの濃度に希釈後、50µL/wellずつ96穴プレートに分注し、4℃で一晩静置した。

b. 0.05%Tween20-PBS(以下、「PBST」という)400µL/wellで3回洗浄後、ブロッキング液(1%BSA-PBST)を100µL/well

30

ずつ分注し、室温で1時間静置した。

c. PBSTで3回洗浄後、上記(5)で調製した検体液を25µL/wellずつ分注した。

d. 続いて、1%BSA-PBSTで0.5µg/mLに希釈した抗HbA1c抗体を25µL/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

e. PBSTで3回洗浄後、HRP-GtF(ab')₂-Anti-Mouse Ig' s(Biosource社製)を1%BSA-PBSTで5000倍希釈した溶液を50µL/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

f. PBSTで3回洗浄後、オルトフェニレンジアミン塩酸塩を含む発色液(オルトフェニレンジアミン塩酸塩(東京化成社製)を2mg/mL、過酸化水素を0.02%の濃度でpH5.0のクエン酸緩衝液に溶解(以下、「OPD発色液」という)を分注し(50µL/well)、室温で10分間静置した。

40

g. 0.75mol/L硫酸を50µL/wellずつ分注して反応を停止した後、プレートリーダーで492nmの吸光度を測定した。

【0037】

(7) 阻害率の算出

上記(6)で得られた吸光度から、下記の式にて阻害率を算出し、各試薬のエピトープ露出化効果の指標とした。

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

A: 検体ブランクの吸光度

50

B：検体添加時の吸光度

【0038】

(II) 結果

(1) 各試薬の露出効果の比較

前処理液として、3 mol/L - グアニジン塩酸塩、1% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20)、10 mmol/L - 亜硝酸ナトリウムの各水溶液、6 mol/L - グアニジン塩酸塩と2% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートの1対1の混合液 (グアニジン + ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)、6 mol/L - グアニジン塩酸塩と20 mmol/L - 亜硝酸ナトリウムの1対1の混合液 (グアニジン + NaNO_2)、2% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートと20 mmol/L - 亜硝酸ナトリウムの1対1の混合液 (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート + NaNO_2)、及び5 mmol/L - MES 緩衝液 (pH 6.0) を用い、上記 (I) の (5) のように検体を処理後、競合 ELISA で露出化効果を比較した。その結果、図1に示すように、グアニジン + ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、及びグアニジン + NaNO_2 はグアニジン単独よりも著しく露出化効果が高いことが判明した。一方、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、亜硝酸ナトリウム、及びMES 緩衝液単独、及びポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート + NaNO_2 は露出効果がほとんどなかった。このことから、グアニジン塩酸塩水溶液にポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート又は亜硝酸ナトリウムを添加することにより、エピトープ露出効果が著しく高くなることが示唆された。

10

20

【0039】

(2) 界面活性剤の種類

前処理液として、3 mol/L - グアニジン塩酸塩水溶液に終濃度1%、0.5%、又は0.25%で各種非イオン性界面活性剤を添加した試薬を用い検体を処理後、競合 ELISA で各試薬のエピトープ露出化効果を比較した。その結果、表1に示すように、グアニジン塩酸塩単独の試薬に比べ、各界面活性剤を添加した試薬は著しくエピトープ露出化効果が高いことが判明した。このことから、グアニジン塩酸塩水溶液に非イオン性界面活性剤を添加することにより、エピトープ露出効果が高くなることが示唆された。

【0040】

【表 1】

界面活性剤	濃度 (%)	阻害率 (%)
グアニジン	—	40
ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル	1	71
	0.5	78
	0.25	68
6-D-(N-ヘプチルカルバモイル- α -D-グルコピラノシド (HECAMEG))	1	79
	0.5	56
	0.25	46
n-オクタノイル-N-メチルグルカミド (MEGA-8)	1	53
	0.5	53
	0.25	53
n-ノナノイル-N-メチルグルカミド (MEGA-9)	1	78
	0.5	67
	0.25	56
n-デカノイル-N-メチルグルカミド (MEGA-10)	1	72
	0.5	75
	0.25	55
n-オクチル- β -D-グルコピラノシド	1	72
ポリオキシエチレン (80) ポリオキシプロピレン (30) ポリオキシエチレン (80) (Pluronic F-68)	1	66
	0.5	46
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20)	1	79
	0.5	72
	0.25	59

界面活性剤	濃度 (%)	阻害率 (%)
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 80)	1	72
	0.5	65
	0.25	58
ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル (Nonidet P40)	1	76
	0.5	69
	0.25	66
ショ糖モノラウレート	1	71
	0.5	74
	0.25	70
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton X-100)	1	70
	0.5	67
	0.25	65
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton X-114)	1	70
	0.5	65
	0.25	60
n-ドデシル- β -D-マルトシド (DDM)	1	64
	0.5	71
	0.25	67
オクチル- β -D-チオグルコピラノシド	1	74
	0.5	74
	0.25	51
サポニン	1	60
	0.5	48

【 0 0 4 1 】

(3) pH の影響

前処理液として、終濃度で 3 mol / L のグアニジン塩酸塩及び 1 % のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20) を含む各 pH の緩衝液 (pH 4 . 5、pH 5 . 5 : クエン酸 - NaHPO₄、pH 6 . 0、pH 7 . 0 : KH₂PO₄ - Na₂HPO₄、pH 7 . 5、pH 8 . 0、pH 9 . 0 : Tris - HCl、それぞれ、20 mmol / L) を用い検体を処理後、競合 ELISA で各試薬のエピトープ露出化効果を比較した。その結果、図 2 に示すように、pH 4 . 5 ~ pH 7、特に pH 4 . 5 ~ pH 6 の酸性領域でエピトープ露出化効果が高いことが判明した。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

(4) 処理時間1分間での比較

検体処理時間を10分間から1分間に変えて各試薬のエピトープ露出化効果を比較した。前処理液として、5 mmol/L - MES (pH 6.0)、及び該緩衝液に次の各試薬、すなわち、3 mol/L - グアニジン塩酸塩、10 mmol/L - 亜硝酸ナトリウム、1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20)、3 mol/L - グアニジン塩酸塩 - 1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (グアニジン + ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)、3 mol/L - グアニジン塩酸塩 - 10 mmol/L - 亜硝酸ナトリウム (グアニジン + NaNO₂)、10 mmol/L - 亜硝酸ナトリウム - 1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート + NaNO₂)、又は、3 mol/L - グアニジン塩酸塩 - 10 mmol/L - 亜硝酸ナトリウム - 1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (グアニジン + NaNO₂ + ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート) を添加した試薬を用いた。赤血球1容に対し各前処理液50容の割合で混和後、25℃で1分間処理し、その後上記(I)の(5)と同様に検体を1%BSA - PBSTで希釈し、競合ELISAで露出化効果を比較した。その結果、表2に示すように、グアニジン + NaNO₂ + ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを添加した試薬が、最も露出効果の高いことが判明した。

10

【0043】

【表2】

処理液	阻害率 (%)
MES, pH6.0	0.0
グアニジン	2.9
NaNO ₂	0.0
ポリオキシエチレンモノラウレート(Tween20)	2.0
グアニジン+ポリオキシエチレンモノラウレート(Tween20)	30.5
グアニジン+NaNO ₂	28.7
NaNO ₂ +ポリオキシエチレンモノラウレート(Tween20)	1.4
グアニジン+NaNO ₂ +ポリオキシエチレンモノラウレート (Tween20)	37.9

20

30

【0044】

実施例2 (試薬の安定性)

(I) 材料と方法

本発明の前処理液の保存安定性を検討するため、前処理液 (1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20) - 10 mmol/L NaNO₂ - 3 mol/L グアニジン塩酸塩 - 5 mmol/L MES緩衝液、pH 6.0を4℃、又は37℃で8日間放置後、実施例1と同様にエピトープ露出効果を調べ、当日調製の同一処方試薬のエピトープ露出効果と比較した。

40

【0045】

(II) 結果

その結果、図3に示すように、エピトープ露出効果は、37℃で8日間放置した試薬でも当日調製の試薬と同等であった。このことから、本発明のエピトープ露出試薬は、保存安定性が良好であることが確認された。

【0046】

実施例3 (実用性の確認)

(I) 材料と方法

(1) 抗HbA1c抗体、抗ヘモグロビン抗体、及び抗HbA0抗体の調製

測定に用いた抗HbA1c抗体、抗ヘモグロビン抗体、及び抗HbA0抗体は、実施例

50

1の(3)と同様に調製した。

【0047】

(2) ビオチン標識抗ヘモグロビン抗体の調製

上記(1)の抗ヘモグロビン抗体を市販のビオチン標識試薬(PIERCE社、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin)を用い、次のように標識した。10mg/mLの濃度でPBSに溶解したビオチン標識試薬0.05mLを1mg/mLの濃度の抗ヘモグロビン抗体液1mLに添加し、室温で2時間反応させた。反応後、PBSで透析し測定に使用した。

【0048】

(3) 検体及び標準試料の調製

社内ボランティアよりEDTA-2Na入りの真空採血管(積水メディカル社製)に採血し、遠心分離により赤血球を分離した。この赤血球4 μ Lと本発明の前処理液(1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween20)-10mmol/L NaNO₂-3mol/L グアニジン塩酸塩-5mmol/L MES緩衝液、pH6.0)200 μ Lを混和した。25 $^{\circ}$ Cで10分間放置後、その混合液を3%スキムミルク-PBSTで段階希釈し、下記サンドイッチELISAの検体として使用した。尚、標準試料は、下記HPLC法により予めHbA1c濃度及びHbA0濃度を求めておいた別人の検体を用いた。

【0049】

(4) サンドイッチELISAによるHbA0濃度の測定

a. 抗HbA0抗体をPBSで5 μ g/mLの濃度に希釈した。これをELISAプレートに50 μ L/wellずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。

b. PBST(350 μ L/well)で3回洗浄後、1%BSA-PBSTを100 μ L/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

c. PBSTで3回洗浄後、上記(3)で処理した標準試料又は検体を50 μ L/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

d. PBSTで3回洗浄後、1%BSA-PBSTで1 μ g/mLの濃度に希釈したビオチン標識抗ヘモグロビン抗体を50 μ L/wellずつ分注し、室温で1時間静置した。

。

e. PBSTで3回洗浄後、1%BSA-PBSTで1 μ g/mLの濃度に希釈したHRP-Streptavidin(PIERCE社製)を50 μ L/wellずつ分注し、室温で30分間静置した。

f. PBSTで3回洗浄後、OPD発色液を分注し(50 μ L/well)、室温で10分間静置した。

g. 0.75mol/L硫酸を50 μ L/wellずつ分注して反応を停止した後、プレートリーダーで492nmの吸光度を測定した。

h. 各濃度の標準試料の吸光度をもとに検量線を作成し、それを用い検体の濃度を求めた。

【0050】

(5) サンドイッチELISAによるHbA1c濃度の測定

上記(4)と同様の方法で、抗HbA0抗体の代わりに抗HbA1c抗体を用いHbA1c濃度を測定した。

【0051】

(6) HbA1c値の算出

上記(4)及び(5)で求めたHbA0濃度及びHbA1c濃度をもとに下記計算式よりHbA1c値(HbA1cの含有率)を求めた。

<計算式>

HbA1c含有率(%) = HbA1c量(濃度) / (HbA1c量(濃度) + HbA0量(濃度)) × 100

【0052】

10

20

30

40

50

(7) HPLC法によるHbA1c値の測定

東ソー自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723G8を用い、全ヘモグロビン中のHbA1cの割合を測定した。

【0053】

(II) 結果

(1) 検量線

標準試料を用い、HbA0濃度測定系、及びHbA1c濃度測定系の検量線を作成した。図4に示すように、両測定系ともに各抗原濃度依存的に吸光度の上昇が確認された。

【0054】

(2) HPLC法による測定値との比較

本発明の前処理液を用い上記サンドイッチELISAで求めたHbA1c値とHPLC法で求めたHbA1c値を比較した。健常者5名より採取した検体を両方法でそれぞれHbA1c値を求めた。その結果、表3に示すように、両方法で求めたHbA1c値は概ね同じような値を示した。

【0055】

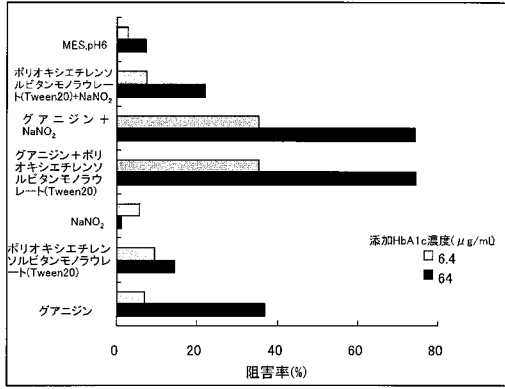
【表3】

No.	HbA1c (%)	
	東ソーHPLC	サンドイッチELISA
1	5.2	5.3
2	5.2	4.5
3	4.8	4.4
4	4.8	5.2
5	5.0	5.5

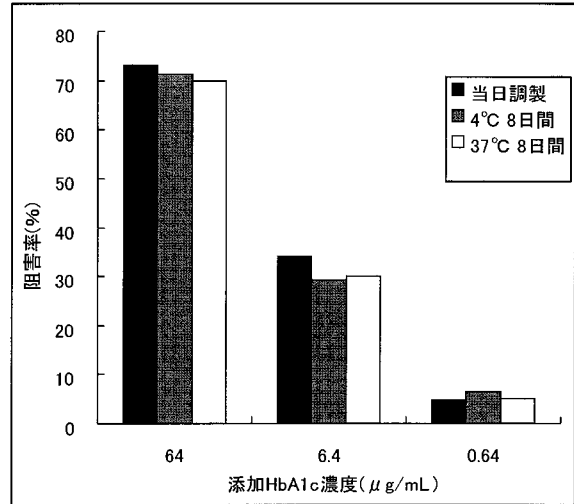
【0056】

以上の結果から、本発明の前処理液がHbA0濃度、HbA1c濃度、及びHbA1c値(HbA1cの割合)の定量測定に使用できることが確認された。

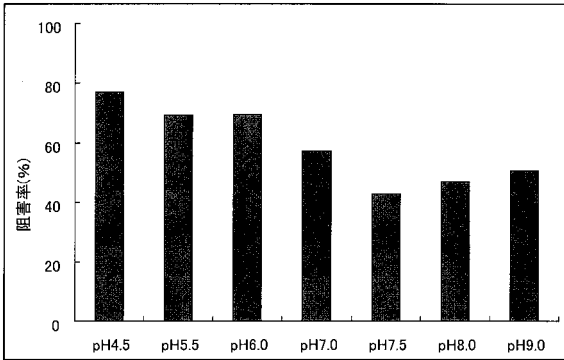
【図1】



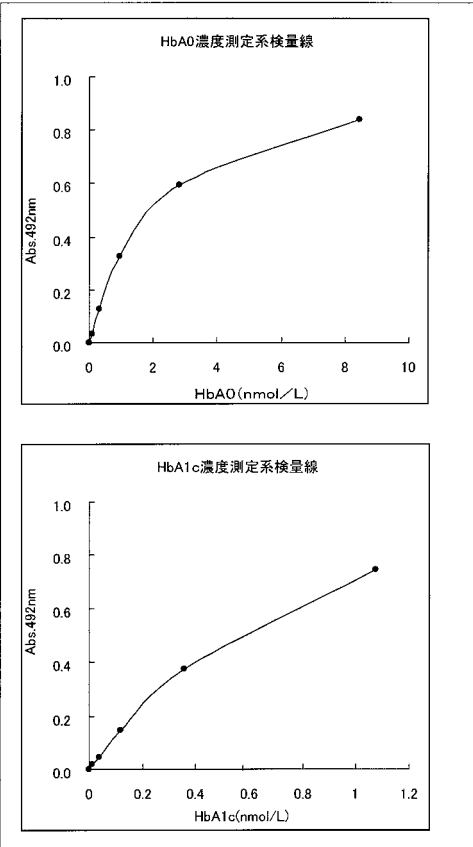
【図3】



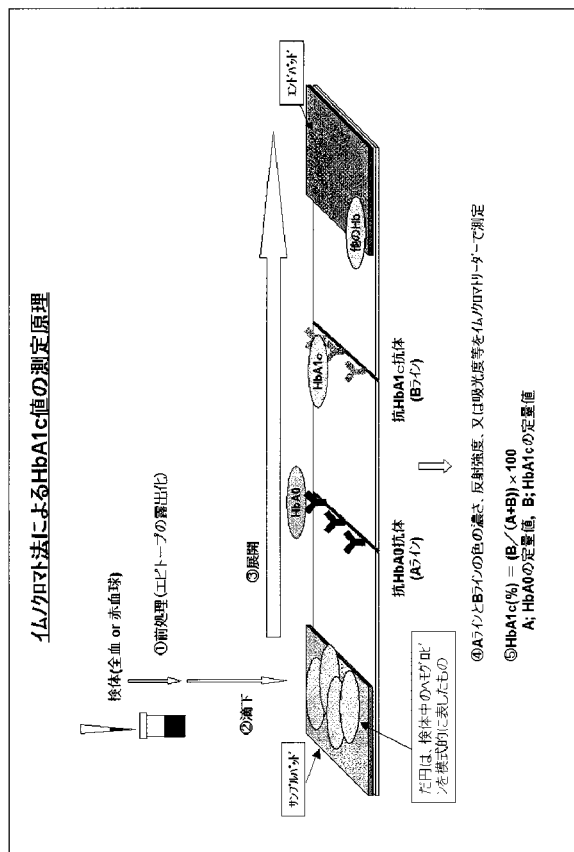
【図2】



【図4】



【図5】



【配列表】

0005574977000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 宮崎 修
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 藏下 俊祐
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 田久保 耕平
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地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 特公平07-023891(JP, B2)
国際公開第2002/021142(WO, A1)
特表2005-504512(JP, A)
特開2003-344397(JP, A)
国際公開第2002/061119(WO, A1)
特開2002-340899(JP, A)
特公昭58-044985(JP, B1)
米国特許出願公開第2002/0173043(US, A1)
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	含糖化血红蛋白样品的预处理方法		
公开(公告)号	JP5574977B2	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	JP2010542028	申请日	2009-12-10
[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	宫崎修 藏下俊祐 田久保耕平		
发明人	宫崎 修 藏下 俊祐 田久保 耕平		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/723 G01N2400/02 G01N2440/38		
FI分类号	G01N33/72.A G01N33/48.A G01N33/53.V		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008316174 2008-12-11 JP		
其他公开文献	JPWO2010067612A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供用于含糖化血红蛋白的样品的预处理装置和使用其的糖化血红蛋白的免疫学测量方法，其可以在短内容易地暴露于表位暴露而在储存稳定性和环境稳定性方面并且在短时间内没有任何问题。到。糖化血红蛋白的免疫学测定，其特征在于含有糖化血红蛋白的样品用含有 (A) 胍或其盐和 (B) 非离子表面活性剂和/或亚硝酸盐的预处理溶液处理。含有糖化血红蛋白的样品的预处理方法。

界面活性剤	濃度 (%)	阻害率 (%)	界面活性剤	濃度 (%)	阻害率 (%)
グアニジン	—	40			
ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル	1	71	ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 80)	1	72
	0.5	78		0.5	65
	0.25	68		0.25	58
6-D-(N-ヘプチルカルバモイル-α-D-グルコピラノシド (HECAMEG))	1	79	ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル (Nonidet P40)	1	76
	0.5	56		0.5	69
	0.25	46		0.25	66
n-オクタノイル-N-メチルグルカミド (MEGA-8)	1	53	シヨ糖モノラウレート	1	71
	0.5	53		0.5	74
	0.25	53		0.25	70
n-ノナノイル-N-メチルグルカミド (MEGA-9)	1	78	ポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテル (Triton X-100)	1	70
	0.5	67		0.5	67
	0.25	56		0.25	65
n-デカノイル-N-メチルグルカミド (MEGA-10)	1	72	ポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテル (Triton X-114)	1	70
	0.5	75		0.5	65
	0.25	55		0.25	60
n-オクタール-β-D-グルコピラノシド	1	72	n-ドデシル-β-D-マルトシド (DDM)	1	64
				0.5	71
				0.25	67
ポリオキシエチレン (80) ポリオキシプロピレン (30) ポリオキシエチレン (80) (Pluronic F-68)	1	66	オクタール-β-D-デオグロコピラノシド	1	74
	0.5	46		0.5	74
	1	79		0.25	51
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20)	0.5	72	サポニン	1	60
	0.25	59		0.5	48