

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/057293

発行日 平成23年3月10日 (2011. 3. 10)

(43) 国際公開日 平成21年5月7日 (2009. 5. 7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/72 (2006.01)	GO 1 N 33/72 A	2GO45
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2009-538928 (P2009-538928)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2008/003081
 (22) 国際出願日 平成20年10月29日 (2008.10.29)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-281074 (P2007-281074)
 (32) 優先日 平成19年10月30日 (2007.10.30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-284123 (P2007-284123)
 (32) 優先日 平成19年10月31日 (2007.10.31)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000005821
 パナソニック株式会社
 大阪府門真市大字門真1006番地
 (74) 代理人 100100000
 弁理士 原田 洋平
 (74) 代理人 100068087
 弁理士 森本 義弘
 (72) 発明者 田中 宏橋
 愛媛県東温市南方2131番地1 パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内
 (72) 発明者 田中 正教
 愛媛県東温市南方2131番地1 パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内

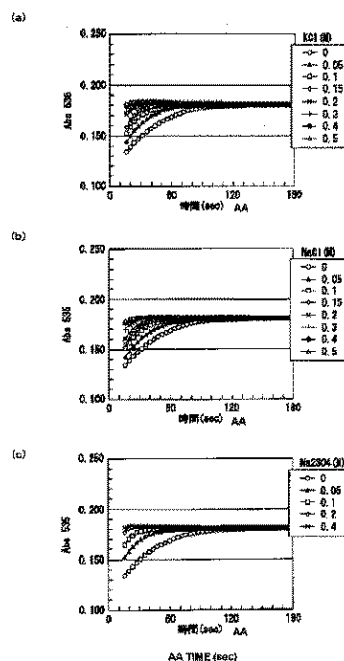
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定方法、測定キット

(57) 【要約】

試料液中のヘモグロビンを迅速かつ確実に変性させるとともに、迅速かつ正確なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定を実現する。ヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定方法、それに用いる試薬組成物、測定キット、分析デバイス、及び分析システムにおいて、血液成分を含む試料溶液を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理することによって試料溶液中のヘモグロビンを変性させ、ヘモグロビンを測定した後に、変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を使用する免疫法によって前記試料中のヘモグロビン誘導体量を測定する。

【図6】



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含む、
ことを特徴とするヘモグロビンの測定方法。

【請求項 2】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 1 に記載のヘモグロビンの測定方法。

【請求項 3】

血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理した後に、前記試料中のヘモグロビン測定を行い、
さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を用いてヘモグロビン誘導体の免疫測定を行う、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

10

【請求項 4】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 5】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

20

【請求項 6】

前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程と、
前記試料に含まれるヘモグロビン誘導体の免疫測定を行う工程と、
前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出する工程とを含む、
ことを特徴とする請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 7】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c である、
ことを特徴とする請求項 6 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 8】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、
少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む、
ことを特徴とする試薬組成物。

30

【請求項 9】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 8 に記載の試薬組成物。

【請求項 10】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、
少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含み、さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を含む、
ことを特徴とする試薬組成物。

40

【請求項 11】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 10 に記載の試薬組成物。

【請求項 12】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 10 に記載の試薬組成物。

50

【請求項 13】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A1c である、
ことを特徴とする請求項 10 に記載の試薬組成物。

【請求項 14】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる測定キットであって、
少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物を保持してなる、
ことを特徴とする測定キット。

【請求項 15】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 14 に記載の測定キット。

10

【請求項 16】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる測定キットであって、
少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物と、前記試薬組成物により変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体とを保持してなる、
ことを特徴とする測定キット。

【請求項 17】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 16 に記載の測定キット。

20

【請求項 18】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 16 に記載の測定キット。

【請求項 19】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A1c である、
ことを特徴とする請求項 16 に記載の測定キット。

【請求項 20】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる分析デバイスであって、
少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、
前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、
前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、を備えた、
ことを特徴とする分析デバイス。

30

【請求項 21】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 20 に記載の分析デバイス。

【請求項 22】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる分析デバイスであって、
少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、
前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、
前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、
変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を担持する免疫アッセイ部を有し、
前記試料中のヘモグロビン誘導体を前記試薬組成物により変性した後、前記変性されたヘモグロビン誘導体を、前記抗体を用いて免疫測定を行い検出する、
ことを特徴とする分析デバイス。

40

【請求項 23】

50

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の分析デバイス。

【請求項 2 4】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の分析デバイス。

【請求項 2 5】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c である、
ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の分析デバイス。

【請求項 2 6】

前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出する、
ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の分析デバイス。

10

【請求項 2 7】

前記分析デバイスの検出部において検出された、前記ヘモグロビン誘導体の量を測定する測定部とから構成される、
ことを特徴とする請求項 2 2 に記載の分析デバイス。

【請求項 2 8】

制御された数のリガンドを、分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に結合させる凝集試薬の製造方法であって、
前記リガンドを、官能基を有するリンカーを介して、前記タンパク質に結合させる、
ことを特徴とする凝集試薬の製造方法。

20

【請求項 2 9】

前記タンパク質が、グロブリン様タンパクである、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 3 0】

前記官能基を有するリンカーの長さが、15 以下である、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 3 1】

前記リンカーが、直鎖構造を有する、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 3 2】

前記リンカーが、平面構造を有する、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

30

【請求項 3 3】

前記リガンドが、特異的なタンパクを認識し、結合相手とする物質である、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 3 4】

前記リガンドが、ハプテンである、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 3 5】

前記凝集試薬が、タンパク質 1 個当たり、10 個以上のリガンドが結合した複合体である、
ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

40

【請求項 3 6】

請求項 2 8 ~ 3 5 のいずれかに記載の凝集試薬の製造方法によって生成される、
ことを特徴とする凝集試薬または生成物。

【請求項 3 7】

粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する測定方法において、

水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とを混合し、該試験試料中に含まれる分析対象物に前記抗分析対象物抗体を結合させる工程と、

50

前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とが混合された溶液と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試験試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる工程と、

前記抗分析対象物抗体と凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する工程とを含む、

ことを特徴とする分析対象物測定方法。

【請求項38】

前記分析対象物がヘモグロビンA1cであり、前記リガンドが、ヘモグロビンA1c中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、

ことを特徴とする請求項37に記載の分析対象物測定方法。

【請求項39】

前記凝集試薬を、抗原過多となる量のプロゾン領域で使う、

ことを特徴とする請求項37に記載の分析対象物測定方法。

【請求項40】

前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、

ことを特徴とする請求項37に記載の分析対象物測定方法。

【請求項41】

前記凝集塊を計数することによって検出する、

ことを特徴とする請求項37に記載の分析対象物測定方法。

【請求項42】

粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する試験キットにおいて、

水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、

抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬と、を保持する、

ことを特徴とする試験キット。

【請求項43】

前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体及び前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、

ことを特徴とする請求項42に記載の試験キット。

【請求項44】

粒子凝集制御イムノアッセイによって試験試料中の分析対象物を測定する分析デバイスにおいて、

前記試験試料を注入する試料注入部と、

前記試料注入部に連結され、前記注入された試料に、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる凝集部と、

前記凝集部に連結され、前記抗分析対象物抗体と前記凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する測定部と、を備えた、

ことを特徴とする分析デバイス。

【請求項45】

前記分析対象物が、ヘモグロビンA1cであり、前記リガンドが、ヘモグロビンA1c中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、

ことを特徴とする請求項44に記載の分析デバイス。

【請求項46】

10

20

30

40

50

前記凝集試薬を、抗原過多となる量のプロゾン領域で担持した、
ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 7】

前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体または、前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 8】

前記測定部で、前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、
ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 9】

前記測定部で、前記凝集塊を計数することによって検出する、
ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 5 0】

前記測定部と前記凝集部とが一体に形成された、
ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液試料中のヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定方法、それに用いる試薬組成物、測定キット、分析デバイス、及び分析システムに関するものであり、より迅速かつ正確にヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を測定する技術に関するものである。

【0002】

また、本発明は、タンパク質に生物学的物質を結合させる方法に関するものである。得られるリガンドタンパク質複合体は、イムノアッセイにおける凝集試薬として有用である。

【背景技術】

【0003】

ヘモグロビン誘導体の一つであるヘモグロビン A 1 c は、食事による血糖値変動の影響を排除した通常時の血糖レベルの判定が可能なこともあって、生活習慣病の早期発見のためによく測定される項目である。ヘモグロビン A 1 c は、赤血球の中に含まれるヘモグロビンにグルコースが結合したものであり、ヘモグロビンに対してヘモグロビン A 1 c が存在する比率 (%) で、数値化される。よって、ヘモグロビン A 1 c が存在する比率を測定するためには、ヘモグロビンとヘモグロビン A 1 c を個別に測定する必要がある。ヘモグロビンの測定は、ヘモグロビン特有の光吸収特性を利用して、415 nm 近傍の波長もしくは 540 nm 近傍の波長で測定する方法が一般的である。540 nm 近傍の波長で測定する方法としては、シアンメトヘモグロビン法や S L S ヘモグロビン法が広く知られている。また、ヘモグロビン A 1 c を免疫法で測定する為には、血液試料を溶血させることによって、赤血球からヘモグロビンを外に取り出した後、ヘモグロビンが非糖化ヘモグロビンであるかヘモグロビン A 1 c であるかを判別するために、ヘモグロビンの立体構造を変化させることによって、ヘモグロビンの糖化された部分をその立体構造の中から外に露出させる処理が必要である。これを変性と呼ぶが、さらに、糖化された部分を特異的に認識する抗体と反応させることによって、免疫学的にヘモグロビン A 1 c 量を測定することが可能となる。

【0004】

なお、本発明の先行技術文献としては、国際公開第 2006 / 112339 号パンフレット (WO2006 / 112339 A1) が公開されており、ヘモグロビン A 1 c 測定時の変性方法に関しても、この中に記載されている。この方法は血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して前記試料中のヘモグロビンを変性させるようにしたヘモグロビン誘導体の測定方法である。

【0005】

10

20

30

40

50

また、近年、臨床検査において、各種疾病の進行度合いを検査するために、様々な検査方法が利用されてきており、血液等の生物学的試料と分析試薬とを反応させ、生物学的試料中の様々な成分を定量可能な大型の自動分析装置が実用化されており、医療分野においては無くてはならない存在となっている。そのような背景の中、近年市場からは、低コスト、試料液の少量化、短時間測定、装置の小型化、多項目同時測定など、より高精度で、より運用の自由度が高い分析装置や分析方法の登場が望まれている。

【0006】

運用の自由度が高い分析装置や分析方法の一つとして、抗原抗体反応を基本とした測定原理が一般的に知られており、免疫比濁法、免疫比濁法、ラテックス免疫凝集法、免疫凝集阻止法、ラテックス免疫凝集阻止法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、免疫クロマト法などのイムノアッセイがある。

10

【0007】

粒子凝集反応に基づくイムノアッセイにおいて、生物学的試料中の特定の成分に対する定性的または定量的な測定は、遊離状態の抗分析対象物抗体または、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体の凝集の有無及びその程度によって決められる。この水懸濁性粒子として最も一般的に使用されているのはラテックス粒子と呼ばれるものである。

【0008】

粒子凝集反応に基づくイムノアッセイのうち、免疫学的粒子凝集阻止反応を利用する測定方法が知られている。抗分析対象物抗体とこの抗体に特異的な凝集試薬とを混合すると、凝集試薬が抗分析対象物抗体を認識し、凝集が起こるのであるが、ここに分析対象物が存在すると、この凝集が阻害されるので、この凝集の程度を光学的に測定または計数することによって、分析対象物を定量的に検出することができる。この測定方法は、様々な分析対象物に適用可能であり、広く利用できる。凝集反応において、凝集試薬の濃度は反応に大きな影響を及ぼす。

20

【0009】

なお、イムノアッセイで用いる凝集試薬に関する先行技術文献情報として、リガンド-ポリマー複合体の製造方法が知られており、一般的によく用いられている（例えば、特開平1-155272号公報参照）。具体的には、生物学的試料中の特定の成分、特にヘモグロビンA1cを測定するために用いる凝集試薬であるリガンド-ポリマー複合体に関して公開されており、ポリアスパラギン酸などのポリマー材料上にリガンドを共有結合させるリガンド-ポリマー複合体について記載されている。図14は、従来のリガンド-ポリマー複合体である凝集試薬のイメージ図であり、従来の凝集試薬4は、ポリペプチド（担体）5、リンカー2、リガンド3から成る。リガンド3に、リンカー2を介して、ポリペプチド（担体）5を結合させることによって製造する。

30

【特許文献1】国際公開第2006/112339号パンフレット

【特許文献2】特開平1-155272号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

前述したヘモグロビン誘導体を測定する方法は、免疫反応に悪影響を及ぼさない非イオン性界面活性剤と酸化剤を使用することが特徴である。この方法では、ヘモグロビンを変性した後に、まずヘモグロビン誘導体に対する抗体を標識したラテックス試薬を混合し、次に凝集多価抗原と混合させることによって、ヘモグロビン誘導体を測定することが可能である。ここで、ヘモグロビン中にヘモグロビン誘導体が存在する比率を正確に測定する為には、血液試料中の全ヘモグロビンを確実に変性した後でヘモグロビンを測定し、免疫法によるヘモグロビン誘導体の測定を行うことが必要である。とりわけ、より迅速なヘモグロビン誘導体の測定を実現する為には、最初の工程であるヘモグロビンの変性を効率良く短時間で進める必要があるが、過度にたんぱく変性効果が強い試薬を使用することによって、後に続く免疫測定で使用される抗体にダメージを与えることがあってはならない。

40

【0011】

50

しかしながら、前述の従来技術である国際公開第2006/112339号パンフレット(WO2006/112339A1)に記載の方法によれば、非イオン性界面活性剤と酸化剤は、抗体へのダメージが無いものの、ヘモグロビンを変性させる工程に約3分間を要していた。これはペプシンや、イオン性界面活性剤などによる一般的なヘモグロビン誘導体の測定方法におけるヘモグロビン処理時間と比較しても、ごく平均的な時間である。しかしながら、より迅速なヘモグロビン誘導体の測定を行う為にはヘモグロビンの変性工程の時間を短縮する必要があった。

【0012】

また、前記特開平1-155272号公報に記載の方法によれば、制御しうる数のリガンドとポリマー材料との結合によって生成されるリガンド-ポリマー複合体では、そのリガンド-ポリマー複合体を用いたイムノアッセイによる生物学的試料中の特定成分の測定において、反応性における感度向上や高い再現性についての技術向上がなされているものの、その測定に要される時間や、リガンド-ポリマー複合体の室温保存については考慮されていなかった。つまり、従来のリガンド-ポリマー複合体を用いたイムノアッセイでは、凝集反応速度が遅いため、測定に長い時間を要する。また、室温での保存が不安定なため、冷蔵での保存が必要となる。

10

【0013】

本発明は、免疫反応に悪影響を与えることなく、より迅速かつ確実にヘモグロビンを変性することにより、迅速かつ正確にヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体を測定し、ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体の存在する比率を測定するヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定方法、それに用いる試薬組成物、測定キット、分析デバイス、及び分析システムを提供することを目的とするものである。

20

【0014】

また、本発明は、前記従来の課題を解決するもので、免疫反応に悪影響を与えることなく、イムノアッセイによる生物学的試料中の特定成分に対する測定時間の短縮と凝集試薬の保存安定性の向上を実現することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

前記従来の課題を解決するために、本発明は免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速かつより確実なヘモグロビンの変性効果を有するものである。

30

【0016】

特に本発明の請求項1にかかるヘモグロビンの測定方法は、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含むことを特徴とするものである。

【0017】

また、本発明の請求項2にかかるヘモグロビンの測定方法は、請求項1に記載のヘモグロビンの測定方法において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0018】

また、本発明の請求項3にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理した後に、前記試料中のヘモグロビン測定を行い、さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を用いてヘモグロビン誘導体の免疫測定を行うことを特徴とするものである。

40

【0019】

また、本発明の請求項4にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項3に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0020】

また、本発明の請求項5にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項3に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免

50

疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

【0021】

また、本発明の請求項6にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項3に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程と、前記試料に含まれるヘモグロビン誘導体の免疫測定を行う工程と、前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出する工程とを含むことを特徴とするものである。

【0022】

また、本発明の請求項7にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項6に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビンA1cであることを特徴とするものである。

10

【0023】

また、本発明の請求項8にかかる試薬組成物は、血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含むことを特徴とするものである。

【0024】

また、本発明の請求項9にかかる試薬組成物は、請求項8に記載の試薬組成物において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0025】

また、本発明の請求項10にかかる試薬組成物は、血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含み、さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を含むことを特徴とするものである。

20

【0026】

また、本発明の請求項11にかかる試薬組成物は、請求項10に記載の試薬組成物において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0027】

また、本発明の請求項12にかかる試薬組成物は、請求項10に記載の試薬組成物において、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

30

【0028】

また、本発明の請求項13にかかる試薬組成物は、請求項10に記載の試薬組成物において、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビンA1cであることを特徴とするものである。

【0029】

また、本発明の請求項14にかかる測定キットは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる測定キットであって、少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物を保持してなる、ことを特徴とするものである。

40

【0030】

また、本発明の請求項15にかかる測定キットは、請求項14に記載の測定キットにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0031】

また、本発明の請求項16にかかる測定キットは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる測定キットであって、少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩と

50

を含む試薬組成物と、前記試薬組成物により変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体とを保持してなる、ことを特徴とするものである。

【0032】

また、本発明の請求項17にかかる測定キットは、請求項16に記載の測定キットにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0033】

また、本発明の請求項18にかかる測定キットは、請求項16に記載の測定キットにおいて、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

10

【0034】

また、本発明の請求項19にかかる測定キットは、請求項16に記載の試薬組成物において、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビンA1cであることを特徴とするものである。

【0035】

また、本発明の請求項20にかかる分析デバイスは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる分析デバイスであって、少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、を備えたことを特徴とするものである。

20

【0036】

また、本発明の請求項21にかかる分析デバイスは、請求項20に記載の分析デバイスにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0037】

また、本発明の請求項22にかかる分析デバイスは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる分析デバイスであって、少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を担持する免疫アッセイ部とを有し、前記試料中のヘモグロビン誘導体を前記試薬組成物により変性した後、前記変性されたヘモグロビン誘導体を、前記抗体を用いて免疫測定を行い検出することを特徴とするものである。

30

【0038】

また、本発明の請求項23にかかる分析デバイスは、請求項22に記載の測定キットにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0039】

また、本発明の請求項24にかかる分析デバイスは、請求項22に記載の分析デバイスにおいて、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

40

【0040】

また、本発明の請求項25にかかる分析デバイスは、請求項22に記載の分析デバイスにおいて、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビンA1cであることを特徴とするものである。

【0041】

また、本発明の請求項26にかかる分析デバイスは、請求項22に記載の分析デバイスにおいて、前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出することを特

50

徴とするものである。

【 0 0 4 2 】

また、本発明の請求項 2 7 にかかる分析システムは、請求項 2 2 に記載の分析デバイスと、前記分析デバイスの検出部において検出された、前記ヘモグロビン誘導体の量を測定する測定部とから構成されることを特徴とするものである。

【 0 0 4 3 】

また、前記課題を解決するために、本発明の請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法は、制御された数のリガンドを、分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に結合させる凝集試薬の製造方法であって、前記リガンドを、官能基を有するリンカーを介して、前記タンパク質に結合させる、ことを特徴とする。

【 0 0 4 4 】

また、本発明の請求項 2 9 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記タンパク質が、グロブリン様タンパクである、ことを特徴とする。

【 0 0 4 5 】

また、本発明の請求項 3 0 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記官能基を有するリンカーの長さが、1 5 以下である、ことを特徴とする。

【 0 0 4 6 】

また、本発明の請求項 3 1 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リンカーが直鎖構造を有する、ことを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

また、本発明の請求項 3 2 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リンカーが平面構造を有する、ことを特徴とする。

【 0 0 4 8 】

また、本発明の請求項 3 3 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リガンドが、特異的なタンパクを認識し、結合相手とする物質である、ことを特徴とする。

【 0 0 4 9 】

また、本発明の請求項 3 4 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リガンドがハプテンである、ことを特徴とする。

【 0 0 5 0 】

また、本発明の請求項 3 5 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記凝集試薬が、タンパク質 1 個当たり、1 0 個以上のリガンドが結合した複合体である、ことを特徴とする。

【 0 0 5 1 】

また、本発明の請求項 3 6 に記載の凝集試薬または生成物は、請求項 2 8 ~ 3 5 のいずれかに記載の凝集試薬の製造方法によって生成される、ことを特徴とする。

【 0 0 5 2 】

また、本発明の請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法は、粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する測定方法において、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とを混合し、該試験試料中に含まれる分析対象物に前記抗分析対象物抗体を結合させる工程と、前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とが混合された溶液と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試験試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる工程と、前記抗分析対象物抗体と凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する工程とを含む、ことを特徴とする。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

また、本発明の請求項 38 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 37 に記載の分析対象物測定方法において、前記分析対象物がヘモグロビン A1c であり、前記リガンドが、ヘモグロビン A1c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、ことを特徴とする。

【0054】

また、本発明の請求項 39 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 37 に記載の分析対象物測定方法において、前記凝集試薬を抗原過多となる量（プロゾーン領域）で使う、ことを特徴とする。

【0055】

また、本発明の請求項 40 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 37 に記載の分析対象物測定方法において、前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、ことを特徴とする。

10

【0056】

また、本発明の請求項 41 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 37 に記載の分析対象物測定方法において、前記凝集塊を計数することによって検出する、ことを特徴とする。

【0057】

また、本発明の請求項 42 に記載の試験キットは、粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する試験キットにおいて、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬と、を保持する、ことを特徴とする。

20

【0058】

また、本発明の請求項 43 に記載の試験キットは、請求項 42 に記載の試験キットにおいて、前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体及び前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、ことを特徴とする。

【0059】

また、本発明の請求項 44 に記載の分析デバイスは、粒子凝集制御イムノアッセイによって試験試料中の分析対象物を測定する分析デバイスにおいて、前記試験試料を注入する試料注入部と、前記試料注入部に連結され、前記注入された試料に、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる凝集部と、前記凝集部に連結され、前記抗分析対象物抗体と前記凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する測定部、とを備えたことを特徴とする。

30

【0060】

また、本発明の請求項 45 に記載の分析デバイスは、請求項 44 に記載の分析デバイスにおいて、前記分析対象物が、ヘモグロビン A1c であり、前記リガンドが、ヘモグロビン A1c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、ことを特徴とする。

40

【0061】

また、本発明の請求項 46 に記載の分析デバイスは、請求項 44 に記載の分析デバイスにおいて、前記凝集試薬を抗原過多となる量（プロゾーン領域）で担持した、ことを特徴とする。

【0062】

また、本発明の請求項 47 に記載の分析デバイスは、請求項 44 に記載の分析デバイスにおいて、前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体または、前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、ことを特徴とする。

【0063】

また、本発明の請求項 48 に記載の分析デバイスは、請求項 44 に記載の分析デバイス

50

において、前記測定部で、前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、ことを特徴とする。

【0064】

また、本発明の請求項49に記載の分析デバイスは、請求項44に記載の分析デバイスにおいて、前記測定部で、前記凝集塊を計数することによって検出する、ことを特徴とする。

【0065】

また、本発明の請求項50に記載の分析デバイスは、請求項44に記載の分析デバイスにおいて、前記測定部と前記凝集部とが一体に形成された、ことを特徴とする。

【発明の効果】

【0066】

本発明によれば、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを使用することによって、ヘモグロビンの変性をより迅速かつ確実に行うことができる。

【0067】

また、特に非イオン性界面活性剤は、ヘモグロビン誘導体を免疫法で測定する時に、免疫測定への阻害効果が少ないことが大きな特徴である。この特徴によって、例えば、イオン性界面活性剤でヘモグロビンを変性処理した時に必要とされる、変性処理溶液の希釈操作が不要になり、希釈バラツキによって、測定精度が低下する問題を排除することが可能である。また、希釈操作を必要としないので、より簡素な形態の免疫測定系を構築することが可能となる。

【0068】

また、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを同時に測定することによって、ヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比率を算出することが可能である。

【0069】

また、試薬組成物の形態は液体状、固体状、液体を乾燥した状態のいずれでもよいが、試薬組成物とヘモグロビン誘導体を含む試料液とを混合することによって、ヘモグロビン誘導体を変性し、かつ測定することが可能である。

【0070】

また、ヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬や、採血器具、使用説明書などを詰め合わせた測定キットの形状をとることによって、専門的な知識を保有していなくとも、より簡便なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【0071】

また、さらにはヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬を担持した分析デバイスを設計し、専用の分析装置と組み合わせた分析システムを構築することによって、手技の影響を受けにくい、簡便かつ迅速なヘモグロビン誘導体の測定が可能である。

【0072】

また、本発明の凝集試薬によれば、タンパク質の高次構造により、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とが凝集する凝集反応速度が速くなり、凝集制御イムノアッセイの測定時間を短縮することができる。また、凝集試薬の保存安定性が向上し、室温での保存が可能となるので、冷蔵での保存が不要となる。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】本発明の実施の形態4における分析システムの構成を示す図

【図2】本発明の実施の形態4における、図1に示した分析システムで用いる分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図2(a)はその分解斜視図、図2(b)はその分析デバイスに試薬を添加した状態を示す斜視図

【図3】本発明の実施の形態4における分析システムの別の構成を示す図

【図4】本発明の実施の形態4における、図3に示した分析システムで用いる分析デバイ

10

20

30

40

50

スの詳細な構成を示す図であり、図4(a)はその分解斜視図、図4(b)~(d)は、分析デバイスにおける測定手順を示す図

【図5】それぞれ本発明の実施例1における、非イオン性界面活性剤と酸化剤に各種金属塩を添加することによるヘモグロビンの吸収特性の経時的な変化を示し、図5(a)は金属塩としてKClを添加した場合を示すもの、図5(b)は金属塩としてNaClを添加した場合を示すもの、図5(c)は金属塩として Na_2SO_4 を添加した場合を示すもの

【図6】それぞれ本発明の実施例1における、非イオン性界面活性剤と酸化剤に各種金属塩を添加することによるヘモグロビンの吸収特性の経時的な変化を示し、図6(a)は金属塩として MgCl_2 を添加した場合を示すもの、図6(b)は金属塩として MgSO_4 を添加した場合を示すもの、図6(c)は金属塩として CaCl_2 を添加した場合を示すもの

10

【図7】本発明の実施例1における、SLS-ヘモグロビン法と非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理する方法におけるヘモグロビンの吸収特性との関係を示す図

【図8】本発明の実施例2における、各金属塩が免疫反応に及ぼす影響を説明する図

【図9】本発明の実施例3における分析システムと自動糖化ヘモグロビン分析計で、血液検体A、Bを測定した結果を示す図

【図10】本発明の凝集試薬のイメージ図

【図11】凝集試薬濃度と吸光度変化の関係を示したグラフ

【図12】凝集試薬の種類による凝集速度の違いを示したグラフ

【図13】凝集試薬の種類による保存安定性の違いを示したグラフ

20

【図14】従来の凝集試薬のイメージ図

【発明を実施するための最良の形態】

【0074】

以下に本発明にかかるヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定方法を、詳細に説明する。

【0075】

(実施の形態1)

本発明の実施の形態1では、血液成分を含む試料を非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含む、ヘモグロビンの測定方法とヘモグロビン誘導体の測定方法について説明する。

30

【0076】

前記ヘモグロビン(以後、「Hb」とも表記。)とは、鎖と非鎖(、鎖)のグロビンがヘムと結合し、会合して形成される四量体構造を基本とするものである。特に糖が結合したHbA1や、飲酒によるアセトアルデヒド化Hb、透析患者などで見られるカルバミル化Hbなどその種類は多岐に亘る。その中でも、ヘモグロビンの鎖N末端に血液中のグルコースが結合したヘモグロビンA1cは、過去2~3ヶ月間の血液中のグルコース濃度を反映する指標として、広く知られている。このように、本実施の形態1のヘモグロビン誘導体とは、前述したようなヘモグロビンの一部の領域が修飾され、構造が異なるものをいうものとする。

【0077】

また、本実施の形態1のヘモグロビン誘導体を測定する際には、該ヘモグロビン誘導体のわずかに異なる領域を区別・認識して、それぞれのヘモグロビン誘導体を同定・定量する必要がある。そして、そのヘモグロビン誘導体の異なる部分、すなわちヘモグロビン誘導体の特異的な箇所をたんぱく質の構造内から構造外へ出す(露出させる)ことを、本実施の形態1では"変性"といい、また、そのたんぱく質の構造内から露出された部位を"変性された部位"という。

40

【0078】

そして、本実施の形態1では、この変性処理を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを用いて行う。ここで、酸化剤はヘモグロビンを変性させてメトヘモグロビンの形態に変化させる作用を持ち、非イオン性界面活性剤はメトヘモグロビンを変性させる作用を、

50

金属塩はこれらの作用を促進する効果がある。従って、本発明によるヘモグロビンの変性とは、ヘモグロビンがメトヘモグロビンの形態に変化していることも含む。

【0079】

また金属塩は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定において、重要な役割を果たす試薬でもある。すなわち、たんぱく質の立体構造や抗原抗体反応は、水素結合、静電気力、ファンデルワールス力、疎水結合に依存しており、それらを適切に機能させる為には、適切な金属塩濃度の溶媒を準備することが必要である。よって、ヘモグロビンの変性を促進する効果があり、かつ抗原抗体反応に適した金属塩濃度で、試料液を処理することが非常に重要である。

【0080】

前述の非イオン性界面活性剤と酸化剤については、国際公開第2006/112339号パンフレット(WO2006/112339A1)に記載されているものが使用可能である。また金属塩としては、Na、K、Mg、Caなどの金属イオンを含有する試薬が挙げられる。これらの試薬としては、NaCl、KCl、MgSO₄、Na₂SO₄、MgCl₂、CaCl₂などが挙げられるが、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩などの金属塩であれば、これらに限定されない。また、ここでは、アルカリ金属塩は第1族元素、アルカリ土類金属塩は第2族元素から構成される化合物を指す。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

【0081】

また、本実施の形態1において、"非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理"するとは、所望の変性効果を得るための条件を満たす非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む溶液を調整して、ヘモグロビンを含む検体に加える、あるいは、前記所望の変性効果を得るための条件を満たす非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む溶液に対して、血液検体を入れることをいう。なお、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む溶液に対して血液検体を加える場合、該非イオン性界面活性剤には、変性効果だけでなく、赤血球膜を破壊し、ヘモグロビンを溶出する(「溶血」という)効果も兼ねる。

【0082】

さらに、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理する方法には、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とからなる固形の試薬を、所望の変性効果を得るための条件を満たすように、前記ヘモグロビン誘導体を含む検体、もしくは血液検体に直接加える方法も含まれる。

【0083】

なお、前記"固形の"とは、乾燥物であってもよく、乾燥方法としては、風乾、熱乾燥、真空乾燥、真空凍結乾燥等が挙げられる。

【0084】

そして、前述したようにして、ヘモグロビン誘導体を含む検体あるいは血液検体を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理して、試料中のヘモグロビンを変性させた後、540nm近傍の波長で全ヘモグロビンを測定し、該変性されたヘモグロビン誘導体については、変性によりヘモグロビンの構造外に出した領域を認識する抗体を用いて免疫アッセイにより測定する。これにより、試料中のヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比率を算出することが可能となる。

【0085】

ここで、本実施の形態1におけるヘモグロビン誘導体の測定方法の大きなメリットは、免疫反応への影響を最小限におさえつつ、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理したヘモグロビン誘導体の変性部位に対する特異的な抗体を利用した免疫測定を行えることにある。すなわち、本実施の形態1では、該免疫反応への影響を最小限におさえつつ、ヘモグロビン誘導体を決める特異な領域(変性部位)を、ヘモグロビンの構造外に出すことができるので、より特異的な測定を実施でき、且つ、抗原抗体反応に伴う複合体の形成において、立体的な障害が少なくなるため、抗原抗体反応の反応効率も向上させること

10

20

30

40

50

ができる。

【0086】

本実施の形態1における免疫測定とは、抗原抗体反応を基本とした測定原理であればよく、一般的に知られている、免疫比濁法、免疫比濁法、ラテックス免疫凝集法、免疫凝集阻止法、ラテックス免疫凝集阻止法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、免疫クロマト法のいずれであってもよい。

【0087】

そして、前述したヘモグロビン誘導体においてよく測定がなされるのは、ヘモグロビンA1cであり、近年、三大成人病の一つとして問題になっている糖尿病患者を管理するための指標になるもので、1～3ヶ月間の長期血糖コントロールの目安となるものである。

【0088】

以上のように、本実施の形態1によるヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定方法によれば、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含むようにしたので、試料中のヘモグロビンを迅速且つ確実に変性させることができる。

【0089】

また、本実施の形態1では、有害性のある試薬を使用しないので、より安全なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。また、前記非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩は、免疫反応への阻害効果が少ないため、変性処理後に免疫反応によりヘモグロビン誘導体の量を測定する際、該変性処理後の溶液に対する希釈操作が不要となり、希釈による測定精度の低下を防止できるとともに、ユーザの操作性もはるかに向上させることができる。特に、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とからなる固形の試薬は、乾燥状態で安定な試薬であるので、分析デバイスとして使用するにも適している。

【0090】

(実施の形態2)

本実施の形態2は、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む、ヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体を測定するための試薬組成物についてのものである。ここで、ヘモグロビン誘導体の一例として、実施の形態1で説明したように、ヘモグロビンA1cについて測定をするものとする。

【0091】

この試薬組成物は、液体状であっても、固体の混合物であってもよく、前記液体状の試薬組成物を乾燥させたものであってもよい。この試薬組成物を、ヘモグロビンを含む試料溶液と混合するだけで、ヘモグロビンを変性させることが可能である。よって非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物は、簡易にヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体を測定するための最も基本的な要素になりうる。ここで、金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であるものとする。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

【0092】

また、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩は、液体状もしくは固体状のいずれの場合においても、混合状態もしくは個々の試薬単独で準備してもよい。少なくともヘモグロビンを測定する前にこれらの3種類の試薬が試料液に溶け込む構成であればよい。

【0093】

この試薬組成物を溶液状態で使用する場合は、冷蔵するか、遮光することによって、より試薬の安定性を向上させることが可能となる。

【0094】

なお、乾燥させた試薬組成物は、溶液状態の試薬組成物よりも保存性が良く、長期の保存が可能である。

【0095】

試薬組成物を乾燥させる場合には、風乾、熱乾燥、真空乾燥、真空凍結乾燥などの工法をとることが可能であり、特に凍結乾燥する場合は、該試薬組成物を凍らす容器の形状に

10

20

30

40

50

よって、さまざまなデザインの試薬組成物を作製することが可能である。また、真空凍結乾燥をすれば、溶解性をより向上させることができる。

【0096】

また、酸化剤としてフェリシアン化カリウムを使用する場合は、遮光すること、及び乾燥状態で保存することによって、より長期間安定な試薬組成物を作製することが可能となる。

【0097】

以上のように、本実施の形態2のヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定方法に用いる試薬組成物によれば、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含むようにしたので、前記ヘモグロビンの変性処理を迅速且つ確実に行うことができる。

10

【0098】

さらに、前記試薬組成物が、前記ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な抗体をさらに含むようにしたので、前記試薬組成物と前記試料とを混合させることでヘモグロビン誘導体を検出することができ、ユーザの操作性を向上できるという効果がある。

(実施の形態3)

本実施の形態3は、少なくとも非イオン性界面活性剤及び酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物を保持し、該試薬組成物によりヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を測定するための測定キットについてのものである。ここで、ヘモグロビン誘導体の一例として、実施の形態1で説明したように、ヘモグロビンA1cについて測定をするものとする。

20

【0099】

測定キットとは、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬や部材を詰め合わせたものを示す。具体的には、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬と、使用説明書、ランセットもしくは注射器等の採血用具、採血前後に必要な消毒用品、試薬の添加に用いるディスペンサやスポイトなどの秤量器具などの部材を詰め合わせたものであり、これらの試薬及び部材を用いて、検査対象となる試料を採血して定量希釈し、該試料の変性処理等を行った後、臨床用の自動測定機、もしくは分光光度計等を使用して、簡便にヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を測定することができるようにしたものである。

【0100】

測定キットでは、ヘモグロビンの変性、さらにはその測定までの方法が手順化されているので、使用説明書に従えば専門的な知識を保有していなくても簡便に使用することが可能である。また、前述のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬とは、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬であり、これによってヘモグロビンの変性を、迅速且つ確実にに行わせることができる。ここで、金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であるものとする。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

30

【0101】

さらに、前記測定キットは、ヘモグロビン誘導体に特異的な抗体を担持するものであってもよい。すなわち、ヘモグロビンを溶血・変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物と、ヘモグロビン誘導体を検出するための、前記ヘモグロビン誘導体の変性された部位に特異的な抗体を保有する試薬、例えばラテックス凝集阻止反応を使用する場合は、ラテックス標識抗体と凝集多価抗原である凝集試薬と、から構成される測定キットが考えられる。これらの試薬類をそれぞれ容器に封入し、ヘモグロビン誘導体の溶血及び変性操作、さらには免疫アッセイ操作を手順化することによって、より簡便にヘモグロビン誘導体を測定することができる。なお、ここではラテックス凝集阻止反応を例として挙げたが、ヘモグロビンを変性し、該変性されたヘモグロビン誘導体量を、該ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な抗体を用いて免疫測定する方法であれば、上記に限定しない。

40

【0102】

50

また、前記測定キットに保持させる前記試薬組成物と前記抗体とは、別々に保持してもよいし、該抗体を試薬組成物に含めて保持してもよい。

【0103】

以上のように、本実施の形態3の測定キットによれば、試料中のヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬の一部あるいは全てがそれぞれ容器等に封入されるようにしたので、あらかじめ定められた手順ののっとして、溶血とヘモグロビンの変性を行い、さらには変性したヘモグロビン誘導体を特異的に認識する試薬を用いて、変性したヘモグロビン誘導体量を測定することを可能としたものであり、ユーザが専門的な知識を保有していなくとも、より簡便にヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定を行うことができる。

10

【0104】

(実施の形態4)

本実施の形態4は、少なくとも試料を添加する試料添加部と、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とによって前記試料中のヘモグロビンを変性させる変性部と、該変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を担持し、ヘモグロビン誘導体を検出する検出部を有する、ヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体を測定するための分析デバイスについてのものである。ここで、ヘモグロビン誘導体の一例として、実施の形態1で説明したように、ヘモグロビンA1cについて測定をするものとする。

【0105】

分析デバイスについては、該分析デバイスを評価する測定装置とセットにして、分析システムの形態をとることが可能である。この形態をとることによって、より簡便かつ迅速にヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

20

【0106】

本実施の形態4の分析デバイスは、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを担持すると共に、ヘモグロビン誘導体の変性された部位に特異的な試薬と凝集試薬とを担持した形態をとるものであり、さらには、それらを別々な箇所にも担持した形態をとることも可能である。

【0107】

ここで、金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であるものとする。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

30

【0108】

測定の順序としては、まず、血液検体と、非イオン性界面活性剤及び酸化剤と金属塩とを反応させるヘモグロビンの変性工程の後、ヘモグロビンを測定し、該変性されたヘモグロビン誘導体と、該ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な試薬、例えばヘモグロビン誘導体に対する特異的な抗体をラテックスに標識したラテックス標識抗体及び凝集試薬、とを反応させる工程がある。

【0109】

非イオン性界面活性剤及び酸化剤と金属塩で処理した試料溶液に、前記ラテックス標識抗体と凝集試薬とを同時に反応させてもよいが、ラテックス標識抗体と反応させた後に凝集試薬と反応させる方法、もしくは凝集試薬と混合した後にラテックス試薬と反応させる方法であってもよい。

40

【0110】

そして、このように試薬を反応させた後に、反応液の吸光度の変化を測定することによって、ヘモグロビン誘導体の量を算出する。

【0111】

これによって、ヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比を算出することが可能である。

【0112】

50

分析デバイスの形状としては、前述した一連の反応、及び測定が、スムーズに進められることが重要である。

【0113】

分析デバイスの一例としては、例えば、遠心力と毛細管力を利用したものが考えられ、分析デバイス内に形成したチャンバー（空間）とチャンバーの間に形成した流路を通して、液体試料を自由に移送させることによって、測定の順序や試薬容量、反応時間等を制御することが可能である。そして、このような構成の分析デバイスを評価する装置の一例としては、前記分析デバイスを回転させ得る回転機構と、吸光度測定が可能な光学測定機能とを搭載したものが挙げられる。

【0114】

以下、図1、図2を用いて、前述した分析デバイス及び該分析デバイスを含む分析システムの一構成例について説明する。

【0115】

図1は、本発明の実施の形態4における分析システムの構成を示す図である。分析システム100は、分析デバイス101と、該分析デバイス101に対して光源102から光を照射し、透過光をディテクタ103で検出する測定部110と、該分析デバイス101をその一部をくり抜いた箇所に固定する回転基板104と、該回転基板104を回転させるモータ105とを備える構成となっている。なお、図1中、モータ105の駆動機構や、光源102、ディテクタ103につながる回路構成については割愛する。

【0116】

図2(a)、図2(b)は、前記分析デバイス101の詳細な構成を示す図であり、図2(a)はその分解斜視図であり、図2(b)は、試薬を添加した状態を示す図である。

【0117】

分析デバイス101は、下基板201と、上基板213と、表裏両面に接着効果を保有する接着層202とからなり、これらを貼り合わせることにより形成される。前記下基板201は、透明な樹脂基板が用いられ、射出成形等によって、精度よくさまざまな形状の空間を形成している。詳述すると、前記下基板201には、ヘモグロビン誘導体を変性させる変性部位である希釈攪拌部203と、希釈液保持部204と、添加されたヘモグロビンの量を検出する検出部A205と、該変性されたヘモグロビン誘導体の量を検出する検出部位である検出部B206とを形成するための凹部が、その上面に射出成形により形成されている。さらに、前記下基板201の樹脂の素材としては、光を透過する材質であればよく、一例として、ポリカーボネートやポリスチレンやアクリルなどのプラスチック樹脂が挙げられる。

【0118】

また、接着層202には、前記希釈攪拌部203、希釈液保持部204、検出部A205、検出部B206のパターン形状に加えて、それぞれを接続する流路207のパターン形状が切り抜かれている。さらに、前記検出部A205、及び検出部B206の手前の流路207は、その一部を広げるように切り抜かれており、これにより、前記検出部A205、及び検出部B206へ移送する液量を定量する定量部A208、及び定量部B209を形成するものとする。接着層202の接着効果を得る材料としては、接着剤の他、加熱によって接着可能なホットメルトシートなどが使用でき、前記上基板213は、透明な樹脂基板から構成されている。

【0119】

前記分析デバイス101は、前記下基板201と前記接着層202とを貼り合せた後、前記上基板213を貼り合わせる前に、図2(b)に示すように、前記下基板201の希釈攪拌部203に、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とからなる変性試薬210を、また前記下基板201と接着層202とで形成した定量チャンバーB209に、ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的に反応することが可能なラテックス試薬211を、さらに前記検出部B206にはヘモグロビン誘導体の特異的なエピトープ構造を複数結合させた合成多価抗原よりなる凝集試薬212を、それぞれ担持した後、真空凍結

10

20

30

40

50

乾燥により乾燥させ、さらにその後、前記上基板 213 を、前記接着層 202 の上面に貼り合わせる。また、前記下基板 201、前記接着層 202、前記上基板 213 の順に貼り合わせるにより形成される、該接着層 202 に切り抜かれた流路 207 の 2 つの開口部は、それぞれ、検体注入口 215 と希釈液注入口 216 となる。

【0120】

次に、前記分析システム 100 の動作について説明する。

【0121】

試料の分析においては、例えばディスペンサ等を使用して、分析デバイス 101 の検体注入口 215 より血液を 1 μ L 注入すると共に、希釈液注入口 216 より、希釈液を 500 μ L 注入する。これにより、血液は検体注入口 215 内側の流路内に、また希釈液は希釈液保持部 204 に保持される。

10

【0122】

次に、前記回転基板 104 の切り抜かれた箇所に、血液と希釈液とが注入された分析デバイス 101 をセットし、モータ 105 により所定の回転数で一定時間回転する。この回転により、希釈液と血液は前記希釈攪拌部 203 へ移送され混合されて希釈試料液となり、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩との作用により溶血し、その後ヘモグロビンの変性を引き起こす。

【0123】

次に、回転基板 104 の回転を停止することによって、該試料液を毛細管現象により流路 207 を通じて、定量部 A 208 と定量部 B 209 まで移送させる。

20

【0124】

前記定量部 B 209 に移送された試料液は、該定量部 B 209 において、予め保持されていたラテックス試薬 211 と混合し、ラテックス試薬 211 と該試料液中のヘモグロビン誘導体とが結合する。

【0125】

この後、再度前記回転基板 104 をモータ 105 により所定の回転数で一定時間回転すると、定量部 A 208 に移送された試料液は検出部 A 205 へ、一方、前記定量部 B 209 でラテックス試薬 211 と混合された試料液は検出部 B 206 へ移送される。

【0126】

前記検出部 B 206 に担持した凝集試薬 212 は、ヘモグロビン誘導体と結合していないラテックス試薬と結合し、ヘモグロビン誘導体の濃度に応じたラテックス凝集阻止反応が発生する。一定時間後に、検出部 B 206 の透過光測定を実施することによって、ラテックス凝集阻止反応を検出する。

30

【0127】

また同時に、検出部 A 205 を測定することによって、ヘモグロビンの吸収を測定し、ヘモグロビン濃度を算出できる。

【0128】

前記検出部 B 206 におけるラテックス凝集阻止反応の測定は、600 nm 近傍の波長で測定可能であり、前記検出部 A 205 におけるヘモグロビンの測定は 540 nm 近傍のヘモグロビン吸収を測定することで可能である。

40

【0129】

いずれにしても、あらかじめ決まった濃度のヘモグロビンと、ヘモグロビン誘導体の測定結果を基に、検量線を作成しておけば、その検量線を利用して、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の濃度をそれぞれ算出できるし、そのヘモグロビンの濃度とヘモグロビン誘導体の濃度を関連づけて、ヘモグロビン誘導体の存在比を算出することが可能である。

【0130】

ここでは一例として、分析デバイス 101 がチップ状であって、遠心力と毛細管力を利用した液体移送により、測定系の順序や試薬量、反応時間等を制御する分析デバイスを有する分析システムを一例に挙げたが、測定系の順序や試薬量、反応時間が制御できる形状であれば、この構成及び方法に限定されるものではなく、液体移送については、例えば、

50

ポンプを使用して圧力で液体移送する方法などを用いるようにしてもよい。また、前記分析デバイスは、例えば、クロマト形態でもよいし、より単純には、直方体のプラスチック製のセルの形状であっても、試薬の担持方法を工夫することによって十分使用できる。

【0131】

以下、図3及び図4を用いて、より単純な構成の分析デバイス及び該分析デバイスを用いた分析システムについて説明する。

【0132】

図3は、本実施の形態4における分析システムの別の構成を示す図である。分析システム300は、該分析デバイス301に対して、光源308から光を照射し、透過光を受光部309で検出する測定部310とを備える。なお、図3においては、光源308と受光部309とをつなげる回路構成、あるいは該分析デバイス301を前記分析システム中にセットするための構成については割愛する。

10

【0133】

図4(a)~(d)は、前記分析デバイス301の詳細な構成を示す図であり、図4(a)はその分解斜視図、図4(b)~(d)は前記分析デバイス301における、試薬の変性処理手順を示す図である。

【0134】

分析デバイス301は、血液検体が注入される注入口306を備えた下部ケース302bと、該下部ケース302bの開放された底面を密閉するための溶液試薬用シール305と、上部ケース302aと、前記注入口306を密閉するためのケース用シール307とからなり、前記上部ケース302aと下部ケース302bの互いの開放された底面を接着剤で貼り合わせるにより形成される。

20

【0135】

前記下部ケース302bは、底面が開放されたプラスチック製の直方体ケースであり、図4Bに示されるように、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩及び凝集試薬からなる試薬に、前記ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な抗体が添加された試薬304が、溶液試薬用シール305にて密封されて保持されている。

【0136】

前記上部ケース302aは、前記下部ケース302bとほぼ同じ形状の、底面が開放されたプラスチック製の直方体ケースであり、その上端には、図4Bに示されるように、ヘモグロビン誘導体に特異的に反応することが可能なラテックス試薬303が真空凍結乾燥されて担持されている。

30

【0137】

次に、前記分析システム300の動作について説明する。

【0138】

試料の分析においては、例えばディスペンサ等を使用して、下部ケース302bに、非イオン性界面活性剤、酸化剤、金属塩及び凝集試薬を含む試薬304を注入して、前記溶液試薬用シール305で該下部ケース302bを密閉した後、図4(b)に示すように、該下部ケース302bと、前記ラテックス試薬が担持された上部ケース302aとを接着剤で貼り合わせる。前記溶液試薬用シール305を剥がした後に、例えばディスペンサ等を使用して、前記注入口306より血液検体を0.5µL注入し、図4(c)に示すように、ケース用シール307で前記注入口306を密閉する。そして前記上部ケース302aの上端に担持されたラテックス試薬303に、前記試薬304がかからないよう前記血液検体と試薬304とを穏やかに混合して所定時間放置する。なお、ヘモグロビン濃度も算出する場合は、この時点で、前記分析デバイス301を図3に示すように分析システム300中にセットし、測定部310によって540nm近傍の吸光度を測定するようにする。

40

【0139】

次に、図4(d)に示すように、前記分析デバイス301の下部ケース302bが上方にくるようにし、前記ラテックス試薬303を血液検体が添加された試薬304中に混合

50

させ、所定時間放置する。

【0140】

所定時間経過後、前記分析デバイス301を、図3に示すように、分析システム300中にセットし、測定部310によって、600nm近傍の吸光度を測定することによって、ヘモグロビン誘導体の濃度を算出する。

【0141】

以上のように、本実施の形態4の分析デバイスによれば、ヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬を担持するようにしたので、手技の影響をうけにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定を行うことができる。

【0142】

また、本実施の形態4の分析システムによれば、前記分析システムと、該分析デバイス専用の測定部と組みあわせるようにしたので、手技の影響をうけにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定を行うことができる。

【0143】

(実施例1)

以下に、ヘモグロビン誘導体の代表的検査項目であるヘモグロビンA1cを測定する場合の実施例の詳細を記す。

【0144】

まず、ヘモグロビンの変性とヘモグロビン濃度の測定について説明する。

【0145】

精製水にて250倍に希釈した血液400 μ Lと、0.3%スクロースモノラウレート及び0.5%フェリシアン化カリウムに対して、0~1Mまでの種々の濃度のアルカリ金属塩を溶解させた変性試薬液400 μ Lとを光路長1cmのプラスチックセル内で攪拌し、535nmの波長にて、ヘモグロビンの経時的な吸光度変化を観察した。その結果を図5(a)~(c)、図6(a)~(c)に示す。この結果によれば、スクロースモノラウレートとフェリシアン化カリウムのみで血液処理を行う場合と比較して、金属塩を添加することにより、明らかにヘモグロビンの吸光度が安定するまでの時間が短縮されることが明らかになった。従来の方法では、ヘモグロビンの吸収特性が安定化するまでに2分近い時間が必要であったのに対し、図5(a)~(c)および図6(a)~(c)にそれぞれ示すように、KCl、NaCl、Na₂SO₄、MgCl₂、MgSO₄、CaCl₂を添加することにより、またその塩濃度が高くなるのに依存してヘモグロビンの吸収特性が安定化する時間が短縮される傾向が確認された。また、試薬の種類によって、ヘモグロビンの吸収を安定化させる時間に差があることが判明した。すなわち、図5(a)のKCl、図5(b)のNaCl、図5(c)のNa₂SO₄を添加した場合に示されるように、KとNaの一価の金属塩が30秒以内にヘモグロビンの吸収を安定化させるために0.2M以上の濃度を要したのに対し、図6(a)のMgCl₂、図6(b)のMgSO₄、図6(c)のCaCl₂を添加した場合に示されるように、Mgは0.1M、Caは0.05Mの濃度で30秒以内にヘモグロビンの吸収が安定化した。CaとMgは二価の金属塩であるが、一価の金属塩に対してより少ない濃度でヘモグロビンの吸収を安定化させる効果があることが判明した。

【0146】

また既知のヘモグロビン濃度の検体に対して、SLS-ヘモグロビン法である「ヘモグロビンB テストワコー」(和光純薬株式会社製)を使用して、535nmで測定したヘモグロビン濃度と、0.15%スクロースモノラウレートと0.25%フェリシアン化カリウムと0.2M NaClで同じ検体を処理して30秒後に535nmでヘモグロビンを測定した方法とを比較した結果、図7に示すように非常に良好な相関性を確認することができた。以上の結果から、スクロースモノラウレートとフェリシアン化カリウムに金属塩を加えることによって、迅速にヘモグロビンの変性が生じ、その結果ヘモグロビンの吸収特性が安定化される時間が短縮されるとともに、SLS-ヘモグロビン法と同等の正確なヘモグロビン測定が実現可能であることが判明した。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

(実施例 2)

次に、金属塩がラテックス凝集反応に与える影響を確認した。

【 0 1 4 8 】

0.15%のスクロースモノラウレートと0.25%フェリシアン化カリウムを含むラテックス試薬溶液に、それぞれ種々の濃度のKCl、NaCl、Na₂SO₄、MgCl₂、MgSO₄、CaCl₂を加えた後に、凝集多価抗原からなる凝集試薬を加え、1分後の550nmの吸光度の変化量を測定した。その結果を図8に示す。

【 0 1 4 9 】

この結果によれば、ラテックス凝集反応は金属塩の濃度が高いほど凝集反応性が高く、塩濃度が一定濃度以上になると凝集反応性が安定することが判明した。特にヘモグロビンの吸収特性が迅速に安定する各種塩濃度においては、凝集反応性が低下する傾向は確認されず、金属塩による免疫反応への悪影響は確認されなかった。以上の結果から、スクロースモノラウレートとフェリシアン化カリウムに金属塩を加えることによって、免疫測定系が阻害されることはなく、正確なヘモグロビン誘導体の測定が可能であることが判明した。

10

【 0 1 5 0 】

(実施例 3)

以下、図3に示す分析システムを用いた、ヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定について説明する。

20

(a) 分析デバイスの作製

まず、図4(a)に示すような底面が開放された、縦0.5cm×横0.5cm×高さ2cmのプラスチック製の上部ケース302aの上端に、図4(b)に示すように、ヘモグロビンA1cに特異的に結合可能なラテックス試薬と5%スクロースを含む溶液からなるラテックス試薬303を真空凍結乾燥により担持させる。

【 0 1 5 1 】

次に、図4(a)に示すような前記上部ケース302aと同じ形状のプラスチック製の下部ケース302bに、図4(b)に示すように、試薬304として、0.15%スクロースモノラウレートと0.25%フェリシアン化カリウムと0.15M塩化ナトリウムからなる溶液0.2mLと、凝集試薬として使用する合成多価ヘモグロビンA1c抗原とを注入し、溶液試薬用シール305にて密封した後、前記上部ケース302aと前記下部ケース302bとを、互いの開放された底面を合わせるように接着剤で張り合わせることで、分析デバイス301を形成した。

30

【 0 1 5 2 】

(b) 分析

まず、溶液試薬用シール305を剥がし、分析デバイス301の注入口306より0.5μLの血液検体を注入し、図4(c)に示すように、該注入口306にケース用シール307を貼ることによって、分析デバイス301を密閉する。

【 0 1 5 3 】

次に、前記上部ケース302aに担持されたラテックス試薬303に、試薬304がかからないよう穏やかに血液検体と試薬304とを混合し、この状態で30秒間放置後、図3に示すように、分析デバイス301を分析システム300内にセットし、前記測定部310によって、535nmの吸光度を測定する。

40

【 0 1 5 4 】

次に、図4(d)に示すように、分析デバイス301を反転させて、前記上部ケース302aのラテックス試薬303と試薬304とを混和させて溶かした後、図3に示すように、前記分析デバイス301を分析システム300の中にセットし、前記ラテックス試薬303を溶かしてから1分後に、測定部310によって550nmの吸光度を測定する。

【 0 1 5 5 】

測定部310については詳細な説明を省くが、光源308から分析デバイス301に光

50

を照射し、透過光を受光部 309 で検出する。なお、測定部 310 の一例としては、分光光度計の機能を用いれば十分使用可能であるので、詳細な説明は割愛する。なお、ここでは、535 nm によって、シアンメトヘモグロビンを測定し、550 nm によって、ラテックス凝集を測定している。この一連の測定動作を、2種類の血液検体 A 及び B について行う。

【0156】

この後、前記分析システム 300 を用いて、既知の濃度のヘモグロビン及びヘモグロビン A1c 溶液を利用してあらかじめ作成しておいたシアンメトヘモグロビンの検量線、及びヘモグロビン A1c のラテックス凝集阻止反応の検量線に、前述のようにして得た吸光度値を代入することによって、前記血液検体 A、B それぞれの、ヘモグロビン濃度及びヘモグロビン A1c 濃度を求めた。

10

【0157】

図9は、血液検体 A、B それぞれの、ヘモグロビン A1c 濃度及びヘモグロビン濃度、さらにヘモグロビン A1c の存在比を示す図である。

【0158】

図9に示すように、本分析システム 300 にて、ヘモグロビン A1c の占める割合を測定した結果は、血液検体 A で 4.9、血液検体 B で 10.3 であり、あらかじめ東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計 (HLC-723GHbV) にて、ヘモグロビン A1c の占める割合を測定した結果の、血液検体 A の 5.0、血液検体 B の 10.5 とそれぞれ非常に近く、本分析システム 300 によって、正確なヘモグロビン A1c 濃度の測定が可能であることが確認された。

20

【0159】

次に、本発明の凝集試薬製造方法及び凝集試薬を用いた分析対象物測定方法の実施の形態、及びその試験キット、分析デバイスについて、詳細に説明する。

(実施の形態 5)

本発明の実施の形態 5 では、凝集試薬製造方法及び凝集試薬を用いたヘモグロビン A1c 測定方法について説明する。

【0160】

A. リガンドの製造

本発明のリガンドは、特異的なタンパク質を認識し、それを結合相手とする物質であれば、いかなるものであってもよい。この代表的な例として、ハプテンが挙げられる。本実施の形態 5 では、ヘモグロビン A1c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドとして、バリン - ヒスチジン - ロイシン - トレオニン - システインの配列でアミノ酸を結合させたペプチド (以下、VHLTC という) を、凝集試薬のリガンドとして用いる。このリガンドを用いることによって、ヘモグロビン A1c 認識抗体に特異的に結合することができる。また、このリガンドを変えることによって、様々な抗体を特異的に認識するリガンドを作製することができる。

30

【0161】

B. 凝集試薬の製造

本発明の凝集試薬は、制御された数のリガンドを、分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に、官能基を有するリンカーを介して化学的に結合させたものである。また、この凝集試薬は、タンパク質 1 個当たり、10 個以上のリガンドが結合した複合体である。

40

【0162】

ここで、タンパク質は、6 万以上の分子量のものであれば、いかなるものであってもよい。この代表的なタンパク質の例としては、ガンマグロブリン、チログロブリン、アルブミンなどのグロブリン様タンパク質があげられるが、これらのタンパク質に限定されるものではない。より望ましくは、6 万 ~ 30 万程度の分子量のものがよい。

【0163】

ここで、タンパク質として、6 万以上の分子量のものが好ましい理由は、以下の通りである。すなわち、分子量が 6 万より小さいタンパク質は、リンカーが化学結合する部位で

50

あるアミノ基の数が少ない為、10個以上のリガンドが結合することができず、水懸濁性粒子の凝集反応性が低下するという欠点がある。これに対して、分子量が6万以上のタンパク質は、リンカーが化学結合する部位であるアミノ基の数が多いため、10個以上のリガンドが結合することができ、その結果として、水懸濁性粒子の凝集反応性が高いという利点があるからである。

【0164】

官能基を有するリンカーの長さは、15以下であることが望ましい。リンカーは、官能基を有するものであれば、いかなる所望のものであってもよく、直鎖構造あるいは平面構造を有するものであってもよい。代表的なリンカーの例としては、N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide (以下EMCSという)、Succinimidyl-trans-4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate (以下SMCCという)、N-succinimidy(4-iodoacetyl)aminobenzoate (以下SIABという)などが用いられる。

10

【0165】

図10は、本発明の実施の形態5における凝集試薬のイメージ図である。

【0166】

図10において、本発明の凝集試薬4は、分子量6万以上のタンパク質(担体)1、官能基を有するリンカー2、VHLTC(リガンド)3からなる。この凝集試薬4は、リガンド(VHLTC)3を、官能基を有するリンカー2を介して、タンパク質(担体)1に結合させることによって製造される。このとき、担体1個当たり、20個程度のリガンド3を結合させておく。このリガンド3が特異的な抗体を認識し、抗体と結合する。1つの凝集試薬の2つ以上のリガンド3に抗体が結合すると、これらの抗体同士が凝集試薬を介して結合し、次々に凝集していく。

20

【0167】

このようにして製造されたリガンド-タンパク質複合体は、イムノアッセイにおける凝集試薬として用いられる。

【0168】

C. ラテックス標識抗体の製造

ポリスチレンラテックス粒子に、抗human HbA1c抗体を過剰量加えて結合させ、さらに、ウシ血清アルブミン(以下BSAという)でブロッキングすることにより、ラテックス標識抗体を作製する。この抗human HbA1c抗体が、試験試料中のヘモグロビンA1c及び凝集試薬のリガンド(VHLTC)3を認識し、結合する。また、この抗体を変えることによって、様々な試験試料中の成分及び凝集試薬を認識するラテックス標識抗体を作製することができる。

30

【0169】

D. ラテックス免疫凝集阻止法を用いた被検試料中の分析対象物の測定

血液検体中のヘモグロビン及びヘモグロビンA1cを測定する為に、まず血液検体を希釈し、非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む変性試薬を用いて、希釈された血液検体と混合させ、血液検体中のヘモグロビンをメト化及び変性させる。このようにヘモグロビンをメト化することによって、ヘモグロビンを540nm付近の吸光度で測定することが可能となる。その後、前記希釈及び変性させた検体について、540nm近傍の波長で吸光度を測定し、全ヘモグロビン量をメトヘモグロビン法を用いて算出する。ただし、SLSヘモグロビン法などの、その他のヘモグロビン測定法を用いてもよい。

40

【0170】

次に、ヘモグロビンA1c測定の為に、変性させた検体を抗human HbA1c抗体を標識したラテックス標識抗体に加える。ここで、このラテックスに標識された抗human HbA1c抗体と、血液検体中のヘモグロビンA1cの変性された部位の間で抗原抗体反応が起こる。その後、ラテックス標識抗体と反応した検体に、凝集試薬を加えると、血液検体中のヘモグロビンA1cが結合していない、残りの抗human HbA1

50

c抗体に凝集試薬が結合する。その結果、凝集試薬が結合した部分で次々に凝集反応が起こり、凝集塊ができる。反応液中に発生する凝集塊の量は、ヘモグロビンA1cの濃度に反して発生するのであるが、この反応をラテックス免疫凝集阻止反応という。

【0171】

次に、一定時間後に、この反応液中に発生した凝集塊による濁度を光学的測定によって検出するために、測定部の吸光度(A)を測定する。また、凝集試薬を加える前に、あらかじめ、測定部のブランク吸光度(A1)も測定する。これらの吸光度の差(A - A1)により、吸光度変化を算出する。

【0172】

吸光度変化 = A - A1

この吸光度変化より、血液検体中のヘモグロビンA1c量を算出する。

【0173】

これらの結果より、血液検体中のヘモグロビンに対するヘモグロビンA1cの量、つまり存在比率の検出が可能となる。

【0174】

【数1】

$$\text{血液検体中のヘモグロビンA1c濃度(\%)} = \frac{\text{ヘモグロビンA1c濃度(mg/dL)}}{\text{ヘモグロビン濃度(mg/dL)}} \times 100$$

【0175】

このような本実施の形態5の凝集試薬によれば、制御された数のリガンドを、分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に、官能基を有するリンカーを介して化学的に結合させることにより製造したので、タンパク質の高次構造により、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体間の凝集反応速度を速めることができ、凝集制御イムノアッセイの測定時間を短縮することが可能となる。さらに、凝集試薬の保存安定性を向上させ、室温での保存が可能となるので、冷蔵での保存が不要となる。

【0176】

(実施の形態6)

本発明の実施の形態6では、少なくとも凝集試薬及びラテックス標識抗体及び変性試薬を保持し、これらの試薬によりヘモグロビンとヘモグロビンA1cを測定するための試験キットについて説明する。

【0177】

試験キットとは、ヘモグロビンとヘモグロビンA1cの測定に必要な試薬や部材を詰め合わせたものを示す。具体的には、ヘモグロビンとヘモグロビンA1cの測定に必要な試薬と、使用説明書、ランセットもしくは注射器等の採血用具、採血前後に必要な消毒用品、試薬の添加に用いるディスペンサやスポイト等の秤量器具などの部材を詰め合わせたものであり、これらの試薬及び部材を用いて、検査対象となる試料を採血して定量・希釈・変性等を行った後、臨床用の自動測定機、もしくは分光光度計等を使用して、簡便にヘモグロビンとヘモグロビンA1cを測定することができるようにしたものである。

【0178】

試験キットでは、採血から測定までの方法が手順化されているので、使用説明書に従えば専門的な知識を保有していなくても簡便に使用することが可能である。また、前述のヘモグロビンとヘモグロビンA1cの測定に必要な試薬とは、少なくとも凝集試薬及びラテックス標識抗体及び変性試薬を含む試薬であり、これによってヘモグロビンA1cの測定を迅速且つ確実に行うことができる。

【0179】

また、前記試験キットに保持させる前記ラテックス標識抗体と前記変性試薬とは、別々に保持してもよいし、該変性試薬をラテックス標識抗体に含めて保持してもよい。

【0180】

10

30

40

50

以上のように、本実施の形態 6 の試験キットによれば、試料中のヘモグロビン A 1 c の測定に必要な試薬の全てがそれぞれ容器等に封入されて備えるようにしたので、使用者はあらかじめ定められた手順にしたがって、ヘモグロビン及びヘモグロビン A 1 c の測定を容易に行うことができる。

【 0 1 8 1 】

(実施の形態 7)

本発明の実施の形態 7 では、少なくとも、分析試料を注入する注入口と、希釈液を保持する希釈液収容室と、注入された分析試料を希釈・変性させる希釈・変性室と、該希釈・変性されたヘモグロビンを検出するヘモグロビン測定室と、該希釈・変性された分析試料をラテックス標識抗体と反応させるラテックス反応室と、前記ラテックス標識抗体と反応した分析試料を凝集試薬と反応させる凝集室及び分析試料中の分析対象物を測定する測定室とから構成されるヘモグロビン及びヘモグロビン A 1 c を測定するための分析デバイスについて説明する。

10

【 0 1 8 2 】

分析デバイスについては、該分析デバイスを評価する測定装置とセットにして、分析システムの形態をとることが可能である。この形態をとることによって、より簡便かつ迅速にヘモグロビン A 1 c の測定が可能となる。

【 0 1 8 3 】

本実施の形態 7 の分析デバイスは、凝集試薬及びラテックス標識抗体及び変性試薬を別々な箇所に担持したものである。

20

【 0 1 8 4 】

以下に、本実施の形態 7 の分析デバイスの測定方法について説明する。

【 0 1 8 5 】

まず、血液検体と、変性試薬とを混合し、血液検体の希釈・変性を行い、その後、前記希釈及び変性させた血液検体について、所定の波長の光を照射して、全ヘモグロビンを測定する。次に、希釈・変性した血液検体とラテックス標識抗体とを混合し、抗原抗体反応を行い、測定部のブランク吸光度の測定を行う。その後、これらの混合溶液を凝集試薬と混合し、抗分析対象物抗体同士を凝集させ、その凝集により生じた凝集塊の吸光度を測定する。これらの測定によって、実施例の形態 5 に記載した式を用いて、ヘモグロビン A 1 c を算出する。これらのヘモグロビンとヘモグロビン A 1 c の測定によって、試料中のヘモグロビンに対するヘモグロビン A 1 c の量、つまり存在比率を算出することにより濃度検出が可能となる。

30

【 0 1 8 6 】

なお、血液検体の希釈・変性を行うと同時にラテックス標識抗体と抗原抗体反応をすることも可能である。

【 0 1 8 7 】

これらの分析デバイスの形状としては、前述した一連の反応、及び測定が、スムーズに進められることが重要である。

【 0 1 8 8 】

分析デバイスの一例としては、例えば、遠心力と毛細管力を利用したものが考えられ、分析デバイス内に形成した複数のチャンパー（空間）と該チャンパー間に形成した流路を通して、液体試料を自由に移送させることによって、測定の順序や試薬容量、反応時間等を制御することが可能である。そして、このような構成の分析デバイスを評価する装置の一例としては、前記分析デバイスを回転させ得る回転機構と、吸光度測定が可能な光学測定機能とを搭載したものが挙げられる。

40

【 0 1 8 9 】

以下、図 1、図 2 を用いて、前述した分析デバイス及び該分析デバイスを含む分析システムの一構成例について説明する。

【 0 1 9 0 】

図 1 は、分析システムの構成を示す図である。分析システム 100 は、分析デバイス 1

50

01と、該分析デバイス101に対して光源102から光を照射し、透過光をディテクタ103で検出する測定部110と、該分析デバイス101をその一部を削り抜いた箇所固定する回転基板104と、該回転基板104を回転させるモータ105とを備える構成となっている。なお、図1において、モータ105の駆動機構や、光源102、ディテクタ103につながる回路構成については割愛する。

【0191】

図2は、前記分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図2(a)はその分解斜視図であり、図2(b)は、試薬を添加した状態を示す図である。

【0192】

分析デバイス101は、下部基板201と、上部基板213とを、表裏両面に接着効果を保有する接着層202で貼り合わせるにより形成されたものである。基板の材料としては、透明な樹脂基板が用いられ、射出成形等によって、精度よくさまざまな形状の空間を形成している。詳述すると、前記下部基板201には、検体を希釈・変性させる部位である希釈・変性室203と、希釈液収容室204と、検体中のヘモグロビンを検出する検出部A205と、ヘモグロビンA1cを検出する検出部B206とを形成するための凹部が、その上面に射出成形により形成されている。なお、前記上部基板213及び前記下部基板201の樹脂の素材としては、ポリカーボネートやポリスチレンやアクリルなどのプラスチック樹脂など、光を透過する材質であれば、特にこれに制限されない。

【0193】

また、接着層202には、前記希釈・変性室203、希釈液収容室204、検出部A205、検出部B206のパターン形状に加えて、それぞれを接続する流路207のパターン形状が切り抜かれている。さらに、前記検出部A205、及び検出部B206の手前の流路207は、その一部を広げるように切り抜かれており、これにより、前記検出部A205、及び検出部B206へ移送する液量を定量する定量部A208、及び定量部B209を形成するものとする。接着層202の接着効果を得る材料としては、接着剤の他、加熱によって接着可能なホットメルトシートなどが使用できる。

【0194】

前記分析デバイス101は、前記下部基板201と前記接着層202とを貼り合わせた後、前記上部基板213を貼り合わせる前に、図2(b)に示すように、前記下部基板201の希釈・変性室203に、変性試薬210を、また前記下部基板201と接着層202で形成した定量チャンバーB209に、ラテックス標識抗体211を、さらに前記検出部B206には凝集試薬212を、それぞれ担持した後、乾燥させ、さらにその後、前記上部基板213を、前記接着層202の上面に貼り合わせるにより形成される。また、前記上部基板213と前記接着層202と前記下部基板201とを貼り合わせるにより形成される、該接着層202に切り抜かれた流路207の2つの開口部は、それぞれ、検体注入口215と希釈液注入口216となる。

【0195】

以下に、分析システム100の動作について説明する。

【0196】

試料の分析においては、例えばディスペンサ等を使用して、分析デバイス101の検体注入口215より血液を1 μ L注入すると共に、希釈液注入口216より、希釈液を500 μ L注入する。これにより、血液は検体注入口215内側の流路内に、また希釈液は希釈液収容室204に保持される。

【0197】

次に、前記回転基板104の削り抜かれた箇所に、血液と希釈液とが注入された分析デバイス101をセットし、モータ105により所定の回転数で一定時間回転する。この回転により、希釈液と血液とは前記希釈・変性室203へ移送され混合されて希釈試料液となり、変性試薬により、ヘモグロビンのメト化及び変性を行う。

【0198】

次に、回転基板104の回転を停止することによって、メト化及び変性された該試料液

10

20

30

40

50

を毛細管現象により、流路 207 を通じて、定量部 A 208 と定量部 B 209 に移送させる。

【0199】

前記定量部 B 209 に移送されたメト化及び変性された試料液は、該定量部 B 209 において、予め保持されていたラテックス試薬 211 と混合し、ラテックス試薬 211 と該試料液中のヘモグロビン A1c とが結合する。

【0200】

この後、再度前記回転基板 104 をモータ 105 により所定の回転数で一定時間回転すると、定量部 A 208 に移送されたメト化及び変性された試料液は検出部 A 205 へ、一方、前記定量部 B 209 でラテックス試薬 211 と混合された試料液は検出部 B 206 へ移送される。

10

【0201】

前記検出部 B 206 に担持した凝集試薬 212 は、ヘモグロビン A1c と結合していないラテックス試薬と結合し、ヘモグロビン A1c の濃度に応じたラテックス凝集阻止反応が発生する。一定時間後に、検出部 B 206 の透過光測定を実施することによって、ラテックス凝集阻止反応を検出する。

【0202】

また同時に、検出部 A 205 を測定することによって、ヘモグロビンの吸収を測定し、ヘモグロビン濃度を算出できる。

【0203】

前記検出部 B 206 におけるラテックス凝集阻止反応の測定は、600nm 近傍の波長で測定可能であり、前記検出部 A 205 におけるヘモグロビンの測定は 540nm 近傍のヘモグロビン吸収を測定する方法が可能である。

20

【0204】

いずれにしても、あらかじめ決まった濃度のヘモグロビンと、ヘモグロビン A1c の測定結果を基に、検量線を作成しておけば、その検量線を利用して、ヘモグロビンとヘモグロビン A1c の濃度をそれぞれ算出でき、それらの濃度より、ヘモグロビン A1c の存在比を算出することが可能である。

【0205】

ここでは一例として、分析デバイス 101 がチップ状で、遠心力と毛細管力を利用した液体移送により、測定系の順序や試薬量、反応時間等を制御する分析システムを一例に挙げたが、測定系の順序や試薬量、反応時間が制御できる形状であれば、この構成及び方法に限定されるものではなく、液体移送については、例えば、ポンプを使用して圧力で液体移送する方法なども十分可能である。また、前記分析デバイスは、例えば、クロマトグラフィーを利用した形態でもよいし、より単純には、直方体のプラスチック製のセルの形状であっても、試薬の担持方法を工夫することによって十分使用できる。

30

【0206】

以上のように、本実施の形態 7 によれば、ヘモグロビン A1c の測定に必要な試薬を担持した分析デバイスを設計すると共に、該分析デバイス専用の測定部と組み合わせた分析システムを構築するようにしたので、手技の影響をうけにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン A1c の測定を行うことができる。

40

【0207】

(実施例 4)

以下に、凝集試薬の製造方法及びラテックス標識抗体の製造方法についての実施例の詳細を記す。

【0208】

凝集試薬の製造方法としては、担体としてチキンガンマグロブリン(以下、CGG という)、リンカーとして EMCS、リガンドとして VHLTC を用いた。EMCS の N 末端と VHLTC のシステインを結合し、さらに、EMCS の C 末端と CGG のアミノ基を結合させることにより、凝集試薬を製造した。このとき、CGG 1 個当たり、20 個程度の

50

V H L T C を結合した。

【 0 2 0 9 】

また、ラテックス標識抗体の製造方法としては、平均粒径 $0.12 \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス粒子（積水化学社製）に抗 human Hb A 1 c 抗体を過剰量加え、物理吸着によって結合した。該ラテックス粒子抗体複合体に 0.5% のウシ血清アルブミン（以下、B S A という）を加えてブロッキングし、ラテックス標識抗体を作製した。なお、ラテックスの粒径はこれに限らず、 $0.05 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m}$ のものであればいずれでもよい。

【 0 2 1 0 】

（実施例 5）

以下に、第 2 の凝集試薬の製造方法についての実施例の詳細を記す。

【 0 2 1 1 】

凝集試薬の製造方法としては、担体として I g Y（C G G の主成分である免疫グロブリン G のみを精製したもの）、リンカーとして E M C S、リガンドとして V H L T C を用いた。E M C S の N 末端と V H L T C のシステインを結合し、さらに、E M C S の C 末端と I g Y のアミノ基を結合させることにより、凝集試薬を製造した。このとき、I g Y 1 個当たり、20 個程度の V H L T C を結合した。この凝集試薬は担体として C G G を用いた場合と比べ、担体のロット間差が小さいため、ロット間差の小さい凝集試薬を製造することが可能となる。

【 0 2 1 2 】

（実施例 6）

以下に、ラテックス免疫凝集阻止法を用いた被検試料中の分析対象物の測定方法についての実施例の詳細を記す。

【 0 2 1 3 】

まず、精製水にて 250 倍希釈した血液 $400 \mu\text{L}$ と、 0.3% スクロースモノラウレート及び 0.5% フェリシアン化カリウムからなる変性試薬 $400 \mu\text{L}$ とを混合し、血液中のヘモグロビンをメト化及び変性させた。なお、ヘモグロビンのメト化及び変性させる工程で用いる試薬はこれらに限らず、非イオン性界面活性剤と酸化剤が含まれていれば、いかなるものでもよい。前記希釈及び変性させた血液について 535nm の波長で吸光度を測定し、全ヘモグロビン濃度を算出した。

【 0 2 1 4 】

次に、ヘモグロビン A 1 c 測定の為に、前記希釈・変性血液を真空凍結乾燥した実施例 1 のラテックス標識抗体に加え、抗原抗体反応をさせた。これを真空凍結乾燥した本発明の凝集試薬に加え、37 で凝集反応させた。なお、ラテックス標識抗体及び凝集試薬について、真空凍結乾燥を用いたが、乾燥物を作るものであればいかなる工法でもよく、風乾、熱乾燥、真空乾燥などの方法を用いることもできる。また、本発明の凝集試薬は免疫反応を妨害するような性質はなく、抗原抗体反応において従来の凝集試薬と根本的な変わりはない。

【 0 2 1 5 】

この凝集塊による濁度を光学的測定によって検出するために、 625nm の波長で吸光度（A）を測定した。また、凝集試薬を加える前の 625nm の波長での吸光度（A1）も測定した。これらの吸光度の差により、吸光度変化（A - A1）を算出した。

【 0 2 1 6 】

あらかじめ決まった濃度のヘモグロビンと、ヘモグロビン A 1 c の測定結果を基に、作成しておいた検量線を利用して、ヘモグロビンとヘモグロビン A 1 c の濃度をそれぞれ算出し、それらの濃度より、ヘモグロビン A 1 c の存在比を算出した。

【 0 2 1 7 】

（比較例）

担体として C G G、リンカーとして E M C S、リガンドとして V H L T C とで構成された本発明の凝集試薬と、担体としてポリリジン、リンカーとして E M C S、リガンドとし

10

20

30

40

50

てVHLTCとで構成された従来の凝集試薬とを用い、それぞれ比較実験を行った。

【0218】

(a) 凝集試薬の濃度と吸光度変化との関係

図11は、ラテックス標識抗体と凝集試薬とのラテックス凝集反応において、測定された吸光度変化と添加した凝集試薬の濃度との関係を示している。横軸は凝集試薬の濃度、縦軸は凝集試薬を加えてから1分後の吸光度変化である。図11によれば、従来の凝集試薬と本発明の凝集試薬とも、凝集試薬の濃度が高くなるにしたがって、凝集物が増加していき、吸光度の測定値が高くなっていくが、凝集試薬の濃度があるレベルを超えた場合、つまり吸光度変化の最大値を越えると、反応液中の抗原が過多の状態になるため、凝集形成が抑制され、見かけ上の吸光度の測定値が逆に低くなる。例えば、従来の凝集試薬では、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度範囲、また、本発明の凝集試薬では、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度範囲が、吸光度の測定値が低くなる領域となり、一般に、この領域をプロゾン領域と呼び、また、この現象はプロゾン現象と称される。この濃度域の凝集試薬を用いることによって、凝集試薬の濃度変動の反応性への影響を小さくすることができる。また、凝集試薬が過多となるため、凝集反応速度を速くすることができる。この結果より、本発明の凝集試薬のほうが、ダイナミックレンジが大きいことが判明した。ダイナミックレンジが大きいことによって、検量線の傾きが大きくなり、測定精度がよくなる。

10

【0219】

また、この時用いた凝集試薬の担体あたりのリガンド量は、本発明の凝集試薬(CGG)で $0.11\mu\text{mol}/\text{mg}$ 、従来の凝集試薬(poly-Lys)で $0.96\mu\text{mol}/\text{mg}$ であった。

20

(b) 各プロゾン領域の凝集試薬濃度における、凝集反応完了率と経時変化との関係

図12は、各プロゾン領域の濃度の凝集試薬を用いたラテックス凝集阻止反応において、凝集反応完了率の経時変化を示している。横軸は凝集試薬を加えてからの時間、縦軸は凝集試薬を加えて170秒後を100%凝集したと仮定した場合の凝集反応完了率である。図12に示すように、本発明の凝集試薬を用いた場合では、170秒後において吸光度が安定してきているが、従来の凝集試薬を用いた場合では、グラフの傾きからわかるように、170秒後においてもまだ反応が進み、吸光度が上昇している。170秒後を100%凝集したと仮定しても、明らかに、本発明の凝集試薬の方が、凝集速度が速く、凝集反応完了率が高いことがわかる。これは、例えば、凝集開始から60秒後において比較すると、従来の凝集試薬では、60%凝集反応が完了しているのに対し、本発明の凝集試薬では75%凝集反応が完了している。

30

【0220】

この結果より、本発明の凝集試薬を用いた方が、凝集反応速度が速く、短時間で反応が完了することが分かる。本発明の凝集試薬を用いたアッセイでは、凝集反応開始から3分以内に反応が完了している。一方、従来の凝集試薬では、同程度の凝集反応が完了する為には、約2倍の時間が必要である。

【0221】

(c) 凝集試薬の保存安定性

図13は、凝集試薬の保存安定性を示している。凝集試薬を真空凍結乾燥し、40環境下で保存した。この凝集試薬を用いて、ラテックス凝集阻止反応を行い、分光器を用いて吸光度を測定し、反応前との吸光度の差より、凝集試薬の反応性を確認した。横軸は保存日数、縦軸は凝集反応測定時のレファレンスとの吸光度変化比である。なお、レファレンスとして、-80に凍結保存した凝集試薬を用いた。図13に示すように、従来の凝集試薬では、3ヶ月保存後の吸光度変化がレファレンスの半分程度の吸光度変化しか示さないが、本発明の凝集試薬では、3ヶ月保存後もレファレンスと同程度の吸光度変化を示し、反応性が安定している傾向があることがわかる。

40

【0222】

この結果より、従来の凝集試薬では40、1ヶ月経過時点での反応性の低下が見られるのと比較して、本発明の凝集試薬では40、3ヶ月経過時点においても、保存が安定

50

であり、明らかに保存安定性がアップしていることが判明した。

【0223】

なお、本実験は日立製分光器（U2800）にて行った。

【産業上の利用可能性】

【0224】

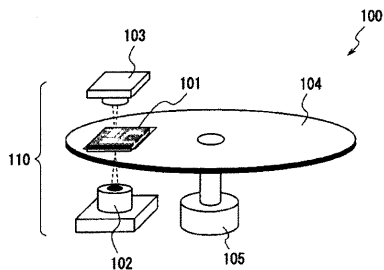
本発明によれば、迅速かつ確実に試料液中のヘモグロビンを変性させることができるので、迅速かつ正確なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【0225】

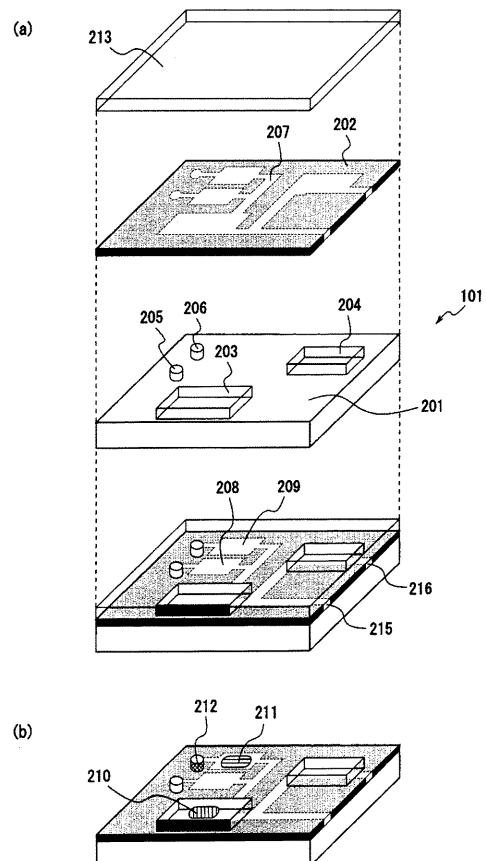
また、本発明によれば、凝集反応の時間を短縮することができるので、迅速かつ正確な測定が可能となるとともに、凝集試薬の保存安定性がアップする為、室温での保存が可能となる。室温での保存の実現により、免疫アッセイを利用した試料分析片の取り扱いが簡便になる。

10

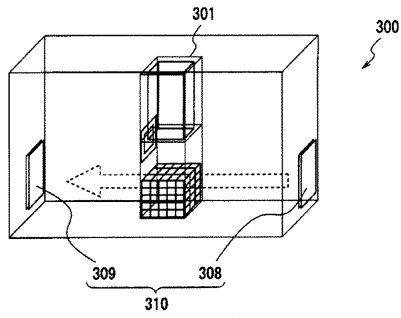
【図1】



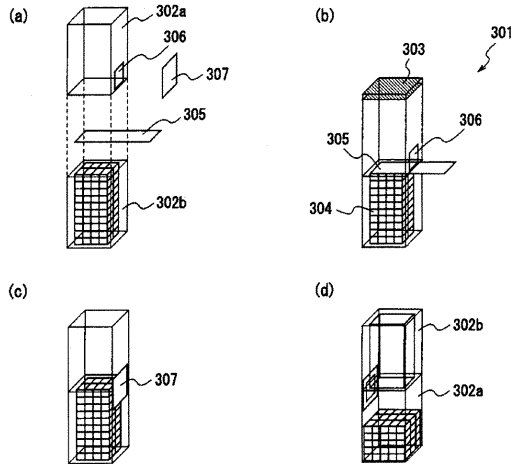
【図2】



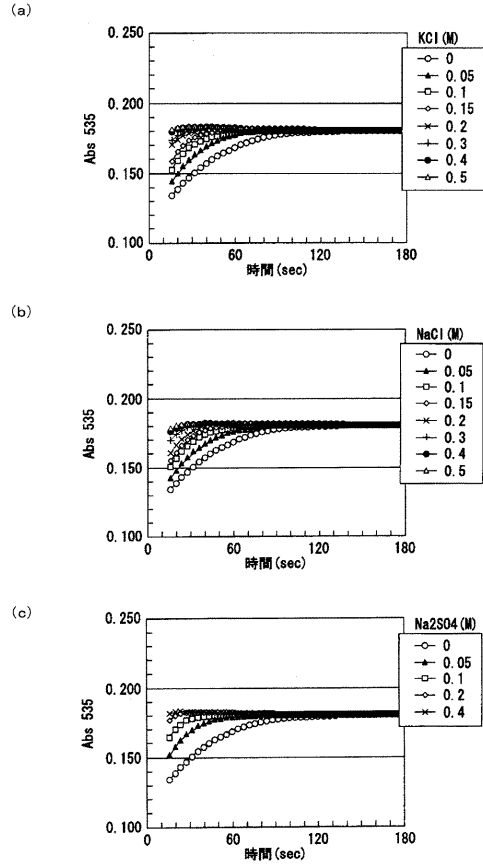
【 図 3 】



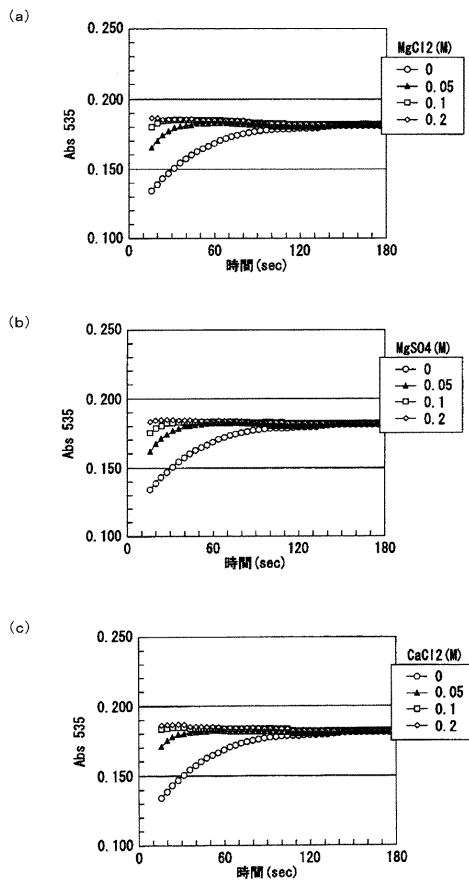
【 図 4 】



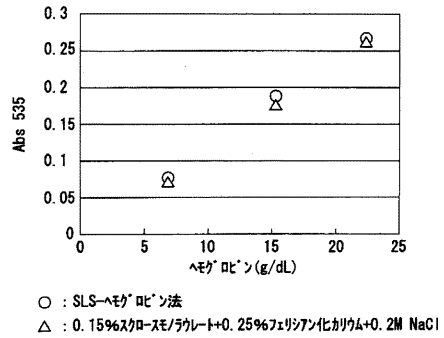
【 図 5 】



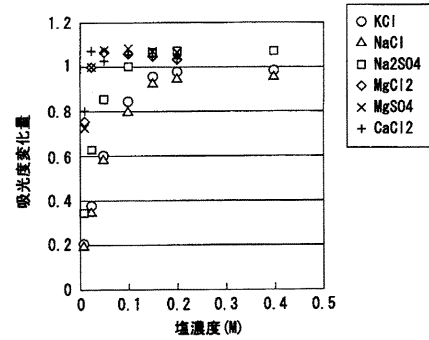
【 図 6 】



【 図 7 】



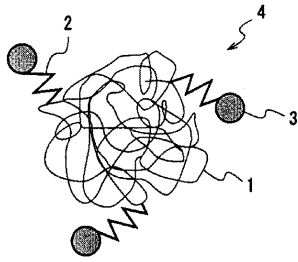
【 図 8 】



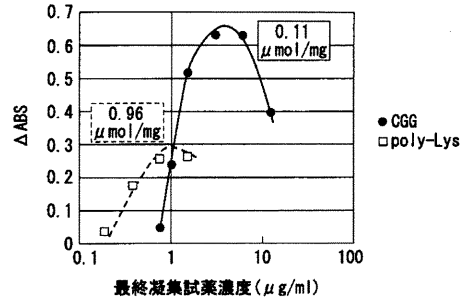
【 図 9 】

	検体A	検体B
ヘパロリン硫酸(g/dl)	0.66	1.32
ヘパリン(g/dl)	13.5	12.8
全ヘパリン中のヘパロリン硫酸の割合(%)	4.9	10.3
HLC-723GHbVで測定したヘパロリン硫酸値(%)	5.0	10.5

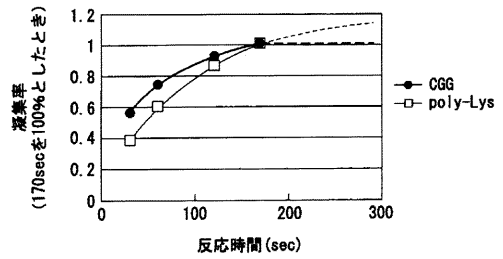
【 図 10 】



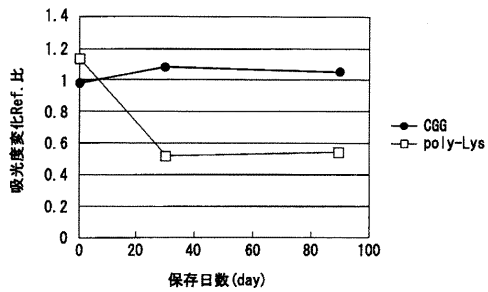
【 図 11 】



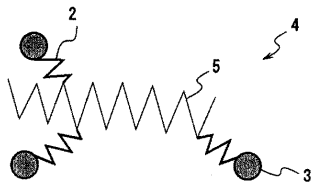
【 図 12 】



【 図 13 】



【 図 14 】



【手続補正書】

【提出日】平成22年1月19日(2010.1.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、血液試料中のヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定方法、それに用いる試薬組成物、測定キット、分析デバイス、及び分析システムに関するものであり、より迅速かつ正確にヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を測定する技術に関するものである。

【0002】

また、本発明は、タンパク質に生物学的物質を結合させる方法に関するものである。得られるリガンド-タンパク質複合体は、イムノアッセイにおける凝集試薬として有用である。

【背景技術】

【0003】

20

ヘモグロビン誘導体の一つであるヘモグロビンA1cは、食事による血糖値変動の影響を排除した通常時の血糖レベルの判定が可能なこともあって、生活習慣病の早期発見のためによく測定される項目である。ヘモグロビンA1cは、赤血球の中に含まれるヘモグロビンにグルコースが結合したものであり、ヘモグロビンに対してヘモグロビンA1cが存在する比率(%)で、数値化される。よって、ヘモグロビンA1cが存在する比率を測定するためには、ヘモグロビンとヘモグロビンA1cを個別に測定する必要がある。ヘモグロビンの測定は、ヘモグロビン特有の光吸収特性を利用して、415nm近傍の波長もしくは540nm近傍の波長で測定する方法が一般的である。540nm近傍の波長で測定する方法としては、シアンメトヘモグロビン法やSLSヘモグロビン法が広く知られている。また、ヘモグロビンA1cを免疫法で測定する為には、血液試料を溶血させることによって、赤血球からヘモグロビンを外に取り出した後、ヘモグロビンが非糖化ヘモグロビンであるかヘモグロビンA1cであるかを判別するために、ヘモグロビンの立体構造を変化させることによって、ヘモグロビンの糖化された部分をその立体構造の中から外に露出させる処理が必要である。これを変性と呼ぶが、さらに、糖化された部分を特異的に認識する抗体と反応させることによって、免疫学的にヘモグロビンA1c量を測定することが可能となる。

30

【0004】

なお、本発明の先行技術文献としては、国際公開第2006/112339号パンフレット(WO2006/112339A1)が公開されており、ヘモグロビンA1c測定時の変性方法に関しても、この中に記載されている。この方法は血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して前記試料中のヘモグロビンを変性させるようにしたヘモグロビン誘導体の測定方法である。

40

【0005】

また、近年、臨床検査において、各種疾病の進行度合いを検査するために、様々な検査方法が利用されてきており、血液等の生物学的試料と分析試薬とを反応させ、生物学的試料中の様々な成分を定量可能な大型の自動分析装置が実用化されており、医療分野においては無くてはならない存在となっている。そのような背景の中、近年市場からは、低コスト、試料液の少量化、短時間測定、装置の小型化、多項目同時測定など、より高精度で、より運用の自由度が高い分析装置や分析方法の登場が望まれている。

【0006】

運用の自由度が高い分析装置や分析方法の一つとして、抗原抗体反応を基本とした測定

50

原理が一般的に知られており、免疫比濁法、免疫比濁法、ラテックス免疫凝集法、免疫凝集阻止法、ラテックス免疫凝集阻止法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、免疫クロマト法などのイムノアッセイがある。

【 0 0 0 7 】

粒子凝集反応に基づくイムノアッセイにおいて、生物学的試料中の特定の成分に対する定性的または定量的な測定は、遊離状態の抗分析対象物抗体または、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体の凝集の有無及びその程度によって決められる。この水懸濁性粒子として最も一般的に使用されているのはラテックス粒子と呼ばれるものである。

【 0 0 0 8 】

粒子凝集反応に基づくイムノアッセイのうち、免疫学的粒子凝集阻止反応を利用する測定方法が知られている。抗分析対象物抗体とこの抗体に特異的な凝集試薬とを混合すると、凝集試薬が抗分析対象物抗体を認識し、凝集が起こるのであるが、ここに分析対象物が存在すると、この凝集が阻害されるので、この凝集の程度を光学的に測定または計数することによって、分析対象物を定量的に検出することができる。この測定方法は、様々な分析対象物に適用可能であり、広く利用できる。凝集反応において、凝集試薬の濃度は反応に大きな影響を及ぼす。

【 0 0 0 9 】

なお、イムノアッセイで用いる凝集試薬に関する先行技術文献情報として、リガンド - ポリマー複合体の製造方法が知られており、一般的によく用いられている（例えば、特開平 1 - 1 5 5 2 7 2 号公報参照）。具体的には、生物学的試料中の特定の成分、特にヘモグロビン A 1 c を測定するために用いる凝集試薬であるリガンド - ポリマー複合体に関して公開されており、ポリアスパラギン酸などのポリマー材料上にリガンドを共有結合させるリガンド - ポリマー複合体について記載されている。図 1 4 は、従来のリガンド - ポリマー複合体である凝集試薬のイメージ図であり、従来の凝集試薬 4 は、ポリペプチド（担体）5、リンカー 2、リガンド 3 から成る。リガンド 3 に、リンカー 2 を介して、ポリペプチド（担体）5 を結合させることによって製造する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 2 3 3 9 号パンフレット

【 特許文献 2 】 特開平 1 - 1 5 5 2 7 2 号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

前述したヘモグロビン誘導体を測定する方法は、免疫反応に悪影響を及ぼさない非イオン性界面活性剤と酸化剤を使用することが特徴である。この方法では、ヘモグロビンを変性した後に、まずヘモグロビン誘導体に対する抗体を標識したラテックス試薬を混合し、次に凝集多価抗原と混合させることによって、ヘモグロビン誘導体を測定することが可能である。ここで、ヘモグロビン中にヘモグロビン誘導体が存在する比率を正確に測定する為には、血液試料中の全ヘモグロビンを確実に変性した後でヘモグロビンを測定し、免疫法によるヘモグロビン誘導体の測定を行うことが必要である。とりわけ、より迅速なヘモグロビン誘導体の測定を実現する為には、最初の工程であるヘモグロビンの変性を効率良く短時間で進める必要があるが、過度にタンパク変性効果が強い試薬を使用することによって、後に続く免疫測定で使用する抗体にダメージを与えることがあってはならない。

【 0 0 1 2 】

しかしながら、前述の従来技術である国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 2 3 3 9 号パンフレット（WO 2 0 0 6 / 1 1 2 3 3 9 A 1）に記載の方法によれば、非イオン性界面活性剤と酸化剤は、抗体へのダメージが無いものの、ヘモグロビンを変性させる工程に約 3 分間を要していた。これはペプシンや、イオン性界面活性剤などによる一般的なヘモグロビン誘導体の測定方法におけるヘモグロビン処理時間と比較しても、ごく平均的な時間である。

しかしながら、より迅速なヘモグロビン誘導体の測定を行う為にはヘモグロビンの変性工程の時間を短縮する必要があった。

【0013】

また、前記特開平1-155272号公報に記載の方法によれば、制御しうる数のリガンドとポリマー材料との結合によって生成されるリガンド-ポリマー複合体では、そのリガンド-ポリマー複合体を用いたイムノアッセイによる生物学的試料中の特定成分の測定において、反応性における感度向上や高い再現性についての技術向上がなされているものの、その測定に要される時間や、リガンド-ポリマー複合体の室温保存については考慮されていなかった。つまり、従来のリガンド-ポリマー複合体を用いたイムノアッセイでは、凝集反応速度が遅いため、測定に長い時間を要する。また、室温での保存が不安定なため、冷蔵での保存が必要となる。

10

【0014】

本発明は、免疫反応に悪影響を与えることなく、より迅速かつ確実にヘモグロビンを変性することにより、迅速かつ正確にヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体を測定し、ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体の存在する比率を測定するヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定方法、それに用いる試薬組成物、測定キット、分析デバイス、及び分析システムを提供することを目的とするものである。

【0015】

また、本発明は、前記従来の課題を解決するもので、免疫反応に悪影響を与えることなく、イムノアッセイによる生物学的試料中の特定成分に対する測定時間の短縮と凝集試薬の保存安定性の向上を実現することを目的とするものである。

20

【課題を解決するための手段】

【0016】

前記従来の課題を解決するために、本発明は免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速かつより確実なヘモグロビンの変性効果を有するものである。

【0017】

特に本発明の請求項1にかかるヘモグロビンの測定方法は、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含むことを特徴とするものである。

【0018】

また、本発明の請求項2にかかるヘモグロビンの測定方法は、請求項1に記載のヘモグロビンの測定方法において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

30

【0019】

また、本発明の請求項3にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理した後に、前記試料中のヘモグロビン測定を行い、さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を用いてヘモグロビン誘導体の免疫測定を行うことを特徴とするものである。

【0020】

また、本発明の請求項4にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項3に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

40

【0021】

また、本発明の請求項5にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項3に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

【0022】

また、本発明の請求項6にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項3に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程と、前記試料に含まれるヘモグロビン誘導体の免疫測定を行う工程と、前記ヘモグロビ

50

ン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出する工程とを含むことを特徴とするものである。

【0023】

また、本発明の請求項7にかかるヘモグロビン誘導体の測定方法は、請求項6に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビンA1cであることを特徴とするものである。

【0024】

また、本発明の請求項8にかかる試薬組成物は、血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含むことを特徴とするものである。

10

【0025】

また、本発明の請求項9にかかる試薬組成物は、請求項8に記載の試薬組成物において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0026】

また、本発明の請求項10にかかる試薬組成物は、血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含み、さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を含むことを特徴とするものである。

20

【0027】

また、本発明の請求項11にかかる試薬組成物は、請求項10に記載の試薬組成物において、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【0028】

また、本発明の請求項12にかかる試薬組成物は、請求項10に記載の試薬組成物において、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

【0029】

また、本発明の請求項13にかかる試薬組成物は、請求項10に記載の試薬組成物において、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビンA1cであることを特徴とするものである。

30

【0030】

また、本発明の請求項14にかかる測定キットは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる測定キットであって、少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物を保持してなる、ことを特徴とするものである。

【0031】

また、本発明の請求項15にかかる測定キットは、請求項14に記載の測定キットにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

40

【0032】

また、本発明の請求項16にかかる測定キットは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる測定キットであって、少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物と、前記試薬組成物により変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体とを保持してなる、ことを特徴とするものである。

【0033】

また、本発明の請求項17にかかる測定キットは、請求項16に記載の測定キットにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とする

50

ものである。

【 0 0 3 4 】

また、本発明の請求項 1 8 にかかる測定キットは、請求項 1 6 に記載の測定キットにおいて、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

【 0 0 3 5 】

また、本発明の請求項 1 9 にかかる測定キットは、請求項 1 6 に記載の試薬組成物において、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c であることを特徴とするものである。

【 0 0 3 6 】

また、本発明の請求項 2 0 にかかる分析デバイスは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる分析デバイスであって、少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、を備えたことを特徴とするものである。

【 0 0 3 7 】

また、本発明の請求項 2 1 にかかる分析デバイスは、請求項 2 0 に記載の分析デバイスにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【 0 0 3 8 】

また、本発明の請求項 2 2 にかかる分析デバイスは、血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる分析デバイスであって、少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を担持する免疫アッセイ部とを有し、前記試料中のヘモグロビン誘導体を前記試薬組成物により変性した後、前記変性されたヘモグロビン誘導体を、前記抗体を用いて免疫測定を行い検出することを特徴とするものである。

【 0 0 3 9 】

また、本発明の請求項 2 3 にかかる分析デバイスは、請求項 2 2 に記載の分析デバイスにおいて、前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であることを特徴とするものである。

【 0 0 4 0 】

また、本発明の請求項 2 4 にかかる分析デバイスは、請求項 2 2 に記載の分析デバイスにおいて、前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であることを特徴とするものである。

【 0 0 4 1 】

また、本発明の請求項 2 5 にかかる分析デバイスは、請求項 2 2 に記載の分析デバイスにおいて、前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c であることを特徴とするものである。

【 0 0 4 2 】

また、本発明の請求項 2 6 にかかる分析デバイスは、請求項 2 2 に記載の分析デバイスにおいて、前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出することを特徴とするものである。

【 0 0 4 3 】

また、本発明の請求項 2 7 にかかる分析システムは、請求項 2 2 に記載の分析デバイスと、前記分析デバイスの検出部において検出された、前記ヘモグロビン誘導体の量を測定する測定部とから構成されることを特徴とするものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

また、前記課題を解決するために、本発明の請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法は、制御された数のリガンドを、分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に結合させる凝集試薬の製造方法であって、前記リガンドを、官能基を有するリンカーを介して、前記タンパク質に結合させる、ことを特徴とする。

【 0 0 4 5 】

また、本発明の請求項 2 9 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記タンパク質が、グロブリン様タンパクである、ことを特徴とする。

【 0 0 4 6 】

また、本発明の請求項 3 0 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記官能基を有するリンカーの長さが、1 5 以下である、ことを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

また、本発明の請求項 3 1 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リンカーが直鎖構造を有する、ことを特徴とする。

【 0 0 4 8 】

また、本発明の請求項 3 2 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リンカーが平面構造を有する、ことを特徴とする。

【 0 0 4 9 】

また、本発明の請求項 3 3 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リガンドが、特異的なタンパクを認識し、結合相手とする物質である、ことを特徴とする。

【 0 0 5 0 】

また、本発明の請求項 3 4 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記リガンドがハプテンである、ことを特徴とする。

【 0 0 5 1 】

また、本発明の請求項 3 5 に記載の凝集試薬の製造方法は、請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法において、前記凝集試薬が、タンパク質 1 個当たり、1 0 個以上のリガンドが結合した複合体である、ことを特徴とする。

【 0 0 5 2 】

また、本発明の請求項 3 6 に記載の凝集試薬または生成物は、請求項 2 8 ~ 3 5 のいずれかに記載の凝集試薬の製造方法によって生成される、ことを特徴とする。

【 0 0 5 3 】

また、本発明の請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法は、粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する測定方法において、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とを混合し、該試験試料中に含まれる分析対象物に前記抗分析対象物抗体を結合させる工程と、前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とが混合された溶液と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試験試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる工程と、前記抗分析対象物抗体と凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する工程とを含む、ことを特徴とする。

【 0 0 5 4 】

また、本発明の請求項 3 8 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法において、前記分析対象物がヘモグロビン A 1 c であり、前記リガンドが、ヘモグロビン A 1 c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、ことを特徴とする。

【 0 0 5 5 】

また、本発明の請求項 3 9 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法において、前記凝集試薬を抗原過多となる量（プロゾーン領域）で使う、ことを特徴とする。

【 0 0 5 6 】

また、本発明の請求項 4 0 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法において、前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、ことを特徴とする。

【 0 0 5 7 】

また、本発明の請求項 4 1 に記載の分析対象物測定方法は、請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法において、前記凝集塊を計数することによって検出する、ことを特徴とする。

10

【 0 0 5 8 】

また、本発明の請求項 4 2 に記載の試験キットは、粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する試験キットにおいて、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬と、を保持する、ことを特徴とする。

【 0 0 5 9 】

また、本発明の請求項 4 3 に記載の試験キットは、請求項 4 2 に記載の試験キットにおいて、前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体及び前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、ことを特徴とする。

20

【 0 0 6 0 】

また、本発明の請求項 4 4 に記載の分析デバイスは、粒子凝集制御イムノアッセイによって試験試料中の分析対象物を測定する分析デバイスにおいて、前記試験試料を注入する試料注入部と、前記試料注入部に連結され、前記注入された試料に、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる凝集部と、前記凝集部に連結され、前記抗分析対象物抗体と前記凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する測定部、とを備えたことを特徴とする。

30

【 0 0 6 1 】

また、本発明の請求項 4 5 に記載の分析デバイスは、請求項 4 4 に記載の分析デバイスにおいて、前記分析対象物が、ヘモグロビン A 1 c であり、前記リガンドが、ヘモグロビン A 1 c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、ことを特徴とする。

【 0 0 6 2 】

また、本発明の請求項 4 6 に記載の分析デバイスは、請求項 4 4 に記載の分析デバイスにおいて、前記凝集試薬を抗原過多となる量（プロゾーン領域）で担持した、ことを特徴とする。

【 0 0 6 3 】

また、本発明の請求項 4 7 に記載の分析デバイスは、請求項 4 4 に記載の分析デバイスにおいて、前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体または、前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、ことを特徴とする。

40

【 0 0 6 4 】

また、本発明の請求項 4 8 に記載の分析デバイスは、請求項 4 4 に記載の分析デバイスにおいて、前記測定部で、前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、ことを特徴とする。

【 0 0 6 5 】

また、本発明の請求項 4 9 に記載の分析デバイスは、請求項 4 4 に記載の分析デバイスにおいて、前記測定部で、前記凝集塊を計数することによって検出する、ことを特徴とす

50

る。

【 0 0 6 6 】

また、本発明の請求項 5 0 に記載の分析デバイスは、請求項 4 4 に記載の分析デバイスにおいて、前記測定部と前記凝集部とが一体に形成された、ことを特徴とする。

【 発 明 の 効 果 】

【 0 0 6 7 】

本発明によれば、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを使用することによって、ヘモグロビンの変性をより迅速かつ確実に行うことができる。

【 0 0 6 8 】

また、特に非イオン性界面活性剤は、ヘモグロビン誘導体を免疫法で測定する時に、免疫測定への阻害効果が少ないことが大きな特徴である。この特徴によって、例えば、イオン性界面活性剤でヘモグロビンを変性処理した時に必要とされる、変性処理溶液の希釈操作が不要になり、希釈バラツキによって、測定精度が低下する問題を排除することが可能である。また、希釈操作を必要としないので、より簡素な形態の免疫測定系を構築することが可能となる。

10

【 0 0 6 9 】

また、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを同時に測定することによって、ヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比率を算出することが可能である。

【 0 0 7 0 】

また、試薬組成物の形態は液体状、固体状、液体を乾燥した状態のいずれでもよいが、試薬組成物とヘモグロビン誘導体を含む試料液とを混合することによって、ヘモグロビン誘導体を変性し、かつ測定することが可能である。

20

【 0 0 7 1 】

また、ヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬や、採血器具、使用説明書などを詰め合わせた測定キットの形状をとることによって、専門的な知識を保有していなくとも、より簡便なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【 0 0 7 2 】

また、さらにはヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬を担持した分析デバイスを設計し、専用の分析装置と組み合わせた分析システムを構築することによって、手技の影響を受けにくい、簡便かつ迅速なヘモグロビン誘導体の測定が可能である。

30

【 0 0 7 3 】

また、本発明の凝集試薬によれば、タンパク質の高次構造により、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とが凝集する凝集反応速度が速くなり、凝集制御イムノアッセイの測定時間を短縮することができる。また、凝集試薬の保存安定性が向上し、室温での保存が可能となるので、冷蔵での保存が不要となる。

【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

【 0 0 7 4 】

【 図 1 】 本発明の実施の形態 4 における分析システムの構成を示す図

40

【 図 2 】 本発明の実施の形態 4 における、図 1 に示した分析システムで用いる分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図 2 (a) はその分解斜視図、図 2 (b) はその分析デバイスに試薬を添加した状態を示す斜視図

【 図 3 】 本発明の実施の形態 4 における分析システムの別の構成を示す図

【 図 4 】 本発明の実施の形態 4 における、図 3 に示した分析システムで用いる分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図 4 (a) はその分解斜視図、図 4 (b) ~ (d) は、分析デバイスにおける測定手順を示す図

【 図 5 】 それぞれ本発明の実施例 1 における、非イオン性界面活性剤と酸化剤に各種金属塩を添加することによるヘモグロビンの吸収特性の経時的な変化を示し、図 5 (a) は金属塩として K C l を添加した場合を示すもの、図 5 (b) は金属塩として N a C l を添加

50

した場合を示すもの、図5(c)は金属塩として Na_2SO_4 を添加した場合を示すもの
 【図6】それぞれ本発明の実施例1における、非イオン性界面活性剤と酸化剤に各種金属塩を添加することによるヘモグロビンの吸収特性の経時的な変化を示し、図6(a)は金属塩として MgCl_2 を添加した場合を示すもの、図6(b)は金属塩として MgSO_4 を添加した場合を示すもの、図6(c)は金属塩として CaCl_2 を添加した場合を示すもの

【図7】本発明の実施例1における、SLS-ヘモグロビン法と非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理する方法におけるヘモグロビンの吸収特性との関係を示す図

【図8】本発明の実施例2における、各金属塩が免疫反応に及ぼす影響を説明する図

【図9】本発明の実施例3における分析システムと自動糖化ヘモグロビン分析計で、血液検体A、Bを測定した結果を示す図

10

【図10】本発明の凝集試薬のイメージ図

【図11】凝集試薬濃度と吸光度変化の関係を示したグラフ

【図12】凝集試薬の種類による凝集速度の違いを示したグラフ

【図13】凝集試薬の種類による保存安定性の違いを示したグラフ

【図14】従来の凝集試薬のイメージ図

【発明を実施するための形態】

【0075】

以下に本発明にかかるヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定方法を、詳細に説明する。

20

【0076】

(実施の形態1)

本発明の実施の形態1では、血液成分を含む試料を非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含む、ヘモグロビンの測定方法とヘモグロビン誘導体の測定方法について説明する。

【0077】

前記ヘモグロビン(以後、「Hb」とも表記。)とは、鎖と非鎖(、鎖)のグロビンがヘムと結合し、会合して形成される四量体構造を基本とするものである。特に糖が結合したHbA1や、飲酒によるアセトアルデヒド化Hb、透析患者などで見られるカルバミル化Hbなどその種類は多岐に亘る。その中でも、ヘモグロビンの鎖N末端に血液中のグルコースが結合したヘモグロビンA1cは、過去2~3ヶ月間の血液中のグルコース濃度を反映する指標として、広く知られている。このように、本実施の形態1のヘモグロビン誘導体とは、前述したようなヘモグロビンの一部の領域が修飾され、構造が異なるものをいうものとする。

30

【0078】

また、本実施の形態1のヘモグロビン誘導体を測定する際には、該ヘモグロビン誘導体のわずかに異なる領域を区別・認識して、それぞれのヘモグロビン誘導体を同定・定量する必要がある。そして、そのヘモグロビン誘導体の異なる部分、すなわちヘモグロビン誘導体の特異的な箇所をタンパク質の構造内から構造外へ出す(露出させる)ことを、本実施の形態1では"変性"といい、また、そのタンパク質の構造内から露出された部位を"変性された部位"という。

40

【0079】

そして、本実施の形態1では、この変性処理を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを用いて行う。ここで、酸化剤はヘモグロビンを変性させてメトヘモグロビンの形態に変化させる作用を持ち、非イオン性界面活性剤はメトヘモグロビンを変性させる作用を、金属塩はこれらの作用を促進する効果がある。従って、本発明によるヘモグロビンの変性とは、ヘモグロビンがメトヘモグロビンの形態に変化していることも含む。

【0080】

また金属塩は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定において、重要な役割を果たす試薬でもある。すなわち、タンパク質の立体構造や抗原抗体反応は、水素結合、静電気力、ファン

50

デルワールス力、疎水結合に依存しており、それらを適切に機能させる為には、適切な金属塩濃度の溶媒を準備することが必要である。よって、ヘモグロビンの変性を促進する効果があり、かつ抗原抗体反応に適した金属塩濃度で、試料液を処理することが非常に重要である。

【0081】

前述の非イオン性界面活性剤と酸化剤については、国際公開第2006/112339号パンフレット(WO2006/112339A1)に記載されているものが使用可能である。また金属塩としては、Na、K、Mg、Caなどの金属イオンを含有する試薬が挙げられる。これらの試薬としては、NaCl、KCl、MgSO₄、Na₂SO₄、MgCl₂、CaCl₂などが挙げられるが、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩などの金属塩であれば、これらに限定されない。また、ここでは、アルカリ金属塩は第1族元素、アルカリ土類金属塩は第2族元素から構成される化合物を指す。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

10

【0082】

また、本実施の形態1において、"非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理"するとは、所望の変性効果を得るための条件を満たす非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む溶液を調整して、ヘモグロビンを含む検体に加える、あるいは、前記所望の変性効果を得るための条件を満たす非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む溶液に対して、血液検体を入れることをいう。なお、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む溶液に対して血液検体を加える場合、該非イオン性界面活性剤には、変性効果だけでなく、赤血球膜を破壊し、ヘモグロビンを溶出する(「溶血」という)効果も兼ねる。

20

【0083】

さらに、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理する方法には、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とからなる固形の試薬を、所望の変性効果を得るための条件を満たすように、前記ヘモグロビン誘導体を含む検体、もしくは血液検体に直接加える方法も含まれる。

【0084】

なお、前記"固形の"とは、乾燥物であってもよく、乾燥方法としては、風乾、熱乾燥、真空乾燥、真空凍結乾燥等が挙げられる。

30

【0085】

そして、前述したようにして、ヘモグロビン誘導体を含む検体あるいは血液検体を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理して、試料中のヘモグロビンを変性させた後、540nm近傍の波長で全ヘモグロビンを測定し、該変性されたヘモグロビン誘導体については、変性によりヘモグロビンの構造外に出した領域を認識する抗体を用いて免疫アッセイにより測定する。これにより、試料中のヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比率を算出することが可能となる。

【0086】

ここで、本実施の形態1におけるヘモグロビン誘導体の測定方法の大きなメリットは、免疫反応への影響を最小限におさえつつ、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理したヘモグロビン誘導体の変性部位に対する特異的な抗体を利用した免疫測定を行えることにある。すなわち、本実施の形態1では、該免疫反応への影響を最小限におさえつつ、ヘモグロビン誘導体を決める特異な領域(変性部位)を、ヘモグロビンの構造外に出すことができるので、より特異的な測定を実施でき、且つ、抗原抗体反応に伴う複合体の形成において、立体的な障害が少なくなるため、抗原抗体反応の反応効率も向上させることができる。

40

【0087】

本実施の形態1における免疫測定とは、抗原抗体反応を基本とした測定原理であればよく、一般的に知られている、免疫比濁法、免疫比濁法、ラテックス免疫凝集法、免疫凝集阻止法、ラテックス免疫凝集阻止法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学免

50

疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、免疫クロマト法のいずれであってもよい。

【0088】

そして、前述したヘモグロビン誘導体においてよく測定がなされるのは、ヘモグロビンA1cであり、近年、三大成人病の一つとして問題になっている糖尿病患者を管理するための指標になるもので、1～3ヶ月間の長期血糖コントロールの目安となるものである。

【0089】

以上のように、本実施の形態1によるヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定方法によれば、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含むようにしたので、試料中のヘモグロビンを迅速且つ確実に変性させることができる。

【0090】

また、本実施の形態1では、有害性のある試薬を使用しないので、より安全なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。また、前記非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩は、免疫反応への阻害効果が少ないため、変性処理後に免疫反応によりヘモグロビン誘導体の量を測定する際、該変性処理後の溶液に対する希釈操作が不要となり、希釈による測定精度の低下を防止できるとともに、ユーザの操作性もはるかに向上させることができる。特に、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とからなる固形の試薬は、乾燥状態で安定な試薬であるので、分析デバイスとして使用するにも適している。

【0091】

(実施の形態2)

本実施の形態2は、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む、ヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体を測定するための試薬組成物についてのものである。ここで、ヘモグロビン誘導体の一例として、実施の形態1で説明したように、ヘモグロビンA1cについて測定をするものとする。

【0092】

この試薬組成物は、液体状であっても、固体の混合物であってもよく、前記液体状の試薬組成物を乾燥させたものであってもよい。この試薬組成物を、ヘモグロビンを含む試料溶液と混合するだけで、ヘモグロビンを変性させることが可能である。よって非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物は、簡易にヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体を測定するための最も基本的な要素になりうる。ここで、金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であるものとする。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

【0093】

また、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩は、液体状もしくは固体状のいずれの場合においても、混合状態もしくは個々の試薬単独で準備してもよい。少なくともヘモグロビンを測定する前にこれらの3種類の試薬が試料液に溶け込む構成であればよい。

【0094】

この試薬組成物を溶液状態で使用する場合は、冷蔵するか、遮光することによって、より試薬の安定性を向上させることが可能となる。

【0095】

なお、乾燥させた試薬組成物は、溶液状態の試薬組成物よりも保存性が良く、長期の保存が可能である。

【0096】

試薬組成物を乾燥させる場合には、風乾、熱乾燥、真空乾燥、真空凍結乾燥などの工法をとることが可能であり、特に凍結乾燥する場合は、該試薬組成物を凍らす容器の形状によって、さまざまなデザインの試薬組成物を作製することが可能である。また、真空凍結乾燥をすれば、溶解性をより向上させることができる。

【0097】

また、酸化剤としてフェリシアン化カリウムを使用する場合は、遮光すること、及び乾燥状態で保存することによって、より長期間安定な試薬組成物を作製することが可能とな

10

20

30

40

50

る。

【0098】

以上のように、本実施の形態2のヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定方法に用いる試薬組成物によれば、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含むようにしたので、前記ヘモグロビンの変性処理を迅速且つ確実に行うことができる。

【0099】

さらに、前記試薬組成物が、前記ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な抗体をさらに含むようにしたので、前記試薬組成物と前記試料とを混合させることでヘモグロビン誘導体を検出することができ、ユーザの操作性を向上できるという効果がある。

。

(実施の形態3)

本実施の形態3は、少なくとも非イオン性界面活性剤及び酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物を保持し、該試薬組成物によりヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を測定するための測定キットについてのものである。ここで、ヘモグロビン誘導体の一例として、実施の形態1で説明したように、ヘモグロビンA1cについて測定をするものとする。

【0100】

測定キットとは、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬や部材を詰め合わせたものを示す。具体的には、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬と、使用説明書、ランセットもしくは注射器等の採血用具、採血前後に必要な消毒用品、試薬の添加に用いるディスペンサやスポイトなどの秤量器具などの部材を詰め合わせたものであり、これらの試薬及び部材を用いて、検査対象となる試料を採血して定量希釈し、該試料の変性処理等を行った後、臨床用の自動測定機、もしくは分光光度計等を使用して、簡便にヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を測定することができるようにしたものである。

【0101】

測定キットでは、ヘモグロビンの変性、さらにはその測定までの方法が手順化されているので、使用説明書に従えば専門的な知識を保有していなくても簡便に使用することが可能である。また、前述のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬とは、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬であり、これによってヘモグロビンの変性を、迅速且つ確実にに行わせることができる。ここで、金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であるものとする。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

【0102】

さらに、前記測定キットは、ヘモグロビン誘導体に特異的な抗体を担持するものであってもよい。すなわち、ヘモグロビンを溶血・変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物と、ヘモグロビン誘導体を検出するための、前記ヘモグロビン誘導体の変性された部位に特異的な抗体を保有する試薬、例えばラテックス凝集阻止反応を使用する場合は、ラテックス標識抗体と凝集多価抗原である凝集試薬と、から構成される測定キットが考えられる。これらの試薬類をそれぞれ容器に封入し、ヘモグロビン誘導体の溶血及び変性操作、さらには免疫アッセイ操作を手順化することによって、より簡便にヘモグロビン誘導体を測定することができる。なお、ここではラテックス凝集阻止反応を例として挙げたが、ヘモグロビンを変性し、該変性されたヘモグロビン誘導体量を、該ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な抗体を用いて免疫測定する方法であれば、上記に限定しない。

【0103】

また、前記測定キットに保持させる前記試薬組成物と前記抗体とは、別々に保持してもよいし、該抗体を試薬組成物に含めて保持してもよい。

【0104】

以上のように、本実施の形態3の測定キットによれば、試料中のヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬の一部あるいは全てがそれぞれ容器等に封入され

10

20

30

40

50

るようにしたので、あらかじめ定められた手順ののっとして、溶血とヘモグロビンの変性を行い、さらには変性したヘモグロビン誘導体の特異的に認識する試薬を用いて、変性したヘモグロビン誘導体量を測定することを可能としたものであり、ユーザが専門的な知識を保有していなくとも、より簡便にヘモグロビンあるいはヘモグロビン誘導体の測定を行うことができる。

【 0 1 0 5 】

(実施の形態 4)

本実施の形態 4 は、少なくとも試料を添加する試料添加部と、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とによって前記試料中のヘモグロビンを変性させる変性部と、該変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を担持し、ヘモグロビン誘導体を検出する検出部を有する、ヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体を測定するための分析デバイスについてのものである。ここで、ヘモグロビン誘導体の一例として、実施の形態 1 で説明したように、ヘモグロビン A 1 c について測定をするものとする。

10

【 0 1 0 6 】

分析デバイスについては、該分析デバイスを評価する測定装置とセットにして、分析システムの形態をとることが可能である。この形態をとることによって、より簡便かつ迅速にヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【 0 1 0 7 】

本実施の形態 4 の分析デバイスは、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを担持すると共に、ヘモグロビン誘導体の変性された部位に特異的な試薬と凝集試薬とを担持した形態をとるものであり、さらには、それらを別々な箇所担持した形態をとることも可能である。

20

【 0 1 0 8 】

ここで、金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩であるものとする。また、金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度であるものとする。

【 0 1 0 9 】

測定の順序としては、まず、血液検体と、非イオン性界面活性剤及び酸化剤と金属塩とを反応させるヘモグロビンの変性工程の後、ヘモグロビンを測定し、該変性されたヘモグロビン誘導体と、該ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な試薬、例えばヘモグロビン誘導体に対する特異的な抗体をラテックスに標識したラテックス標識抗体及び凝集試薬、とを反応させる工程がある。

30

【 0 1 1 0 】

非イオン性界面活性剤及び酸化剤と金属塩で処理した試料溶液に、前記ラテックス標識抗体と凝集試薬とを同時に反応させてもよいが、ラテックス標識抗体と反応させた後に凝集試薬と反応させる方法、もしくは凝集試薬と混合した後にラテックス試薬と反応させる方法であってもよい。

【 0 1 1 1 】

そして、このように試薬を反応させた後に、反応液の吸光度の変化を測定することによって、ヘモグロビン誘導体の量を算出する。

40

【 0 1 1 2 】

これによって、ヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比を算出することが可能である。

【 0 1 1 3 】

分析デバイスの形状としては、前述した一連の反応、及び測定が、スムーズに進められることが重要である。

【 0 1 1 4 】

分析デバイスの一例としては、例えば、遠心力と毛細管力を利用したものが考えられ、分析デバイス内に形成したチャンバー（空間）とチャンバーの間に形成した流路を通して

50

、液体試料を自由に移送させることによって、測定の順序や試薬容量、反応時間等を制御することが可能である。そして、このような構成の分析デバイスを評価する装置の一例としては、前記分析デバイスを回転させ得る回転機構と、吸光度測定が可能な光学測定機能とを搭載したものが挙げられる。

【0115】

以下、図1、図2を用いて、前述した分析デバイス及び該分析デバイスを含む分析システムの一構成例について説明する。

【0116】

図1は、本発明の実施の形態4における分析システムの構成を示す図である。分析システム100は、分析デバイス101と、該分析デバイス101に対して光源102から光を照射し、透過光をディテクタ103で検出する測定部110と、該分析デバイス101をその一部をくり抜いた箇所に固定する回転基板104と、該回転基板104を回転させるモータ105とを備える構成となっている。なお、図1中、モータ105の駆動機構や、光源102、ディテクタ103につながる回路構成については割愛する。

10

【0117】

図2(a)、図2(b)は、前記分析デバイス101の詳細な構成を示す図であり、図2(a)はその分解斜視図であり、図2(b)は、試薬を添加した状態を示す図である。

【0118】

分析デバイス101は、下基板201と、上基板213と、表裏両面に接着効果を保有する接着層202とからなり、これらを貼り合わせることにより形成される。前記下基板201は、透明な樹脂基板が用いられ、射出成形等によって、精度よくさまざまな形状の空間を形成している。詳述すると、前記下基板201には、ヘモグロビン誘導体を変性させる変性部位である希釈攪拌部203と、希釈液保持部204と、添加されたヘモグロビンの量を検出する検出部A205と、該変性されたヘモグロビン誘導体の量を検出する検出部位である検出部B206とを形成するための凹部が、その上面に射出成形により形成されている。さらに、前記下基板201の樹脂の素材としては、光を透過する材質であればよく、一例として、ポリカーボネートやポリスチレンやアクリルなどのプラスチック樹脂が挙げられる。

20

【0119】

また、接着層202には、前記希釈攪拌部203、希釈液保持部204、検出部A205、検出部B206のパターン形状に加えて、それぞれを接続する流路207のパターン形状が切り抜かれている。さらに、前記検出部A205、及び検出部B206の手前の流路207は、その一部を広げるように切り抜かれており、これにより、前記検出部A205、及び検出部B206へ移送する液量を定量する定量部A208、及び定量部B209を形成するものとする。接着層202の接着効果を得る材料としては、接着剤の他、加熱によって接着可能なホットメルトシートなどが使用でき、前記上基板213は、透明な樹脂基板から構成されている。

30

【0120】

前記分析デバイス101は、前記下基板201と前記接着層202とを貼り合せた後、前記上基板213を貼り合わせる前に、図2(b)に示すように、前記下基板201の希釈攪拌部203に、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とからなる変性試薬210を、また前記下基板201と接着層202とで形成した定量チャンバーB209に、ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的に反応することが可能なラテックス試薬211を、さらに前記検出部B206にはヘモグロビン誘導体の特異的なエピトープ構造を複数結合させた合成多価抗原よりなる凝集試薬212を、それぞれ担持した後、真空凍結乾燥により乾燥させ、さらにその後、前記上基板213を、前記接着層202の上面に貼り合わせる。また、前記下基板201、前記接着層202、前記上基板213の順に貼り合わせることにより形成される、該接着層202に切り抜かれた流路207の2つの開口部は、それぞれ、検体注入口215と希釈液注入口216となる。

40

【0121】

50

次に、前記分析システム 100 の動作について説明する。

【0122】

試料の分析においては、例えばディスペンサ等を使用して、分析デバイス 101 の検体注入口 215 より血液を 1 μ L 注入すると共に、希釈液注入口 216 より、希釈液を 500 μ L 注入する。これにより、血液は検体注入口 215 内側の流路内に、また希釈液は希釈液保持部 204 に保持される。

【0123】

次に、前記回転基板 104 の切り抜かれた箇所に、血液と希釈液とが注入された分析デバイス 101 をセットし、モータ 105 により所定の回転数で一定時間回転する。この回転により、希釈液と血液は前記希釈攪拌部 203 へ移送され混合されて希釈試料液となり、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩との作用により溶血し、その後ヘモグロビンの変性を引き起こす。

10

【0124】

次に、回転基板 104 の回転を停止することによって、該試料液を毛細管現象により流路 207 を通じて、定量部 A 208 と定量部 B 209 まで移送させる。

【0125】

前記定量部 B 209 に移送された試料液は、該定量部 B 209 において、予め保持されていたラテックス試薬 211 と混合し、ラテックス試薬 211 と該試料液中のヘモグロビン誘導体とが結合する。

【0126】

この後、再度前記回転基板 104 をモータ 105 により所定の回転数で一定時間回転すると、定量部 A 208 に移送された試料液は検出部 A 205 へ、一方、前記定量部 B 209 でラテックス試薬 211 と混合された試料液は検出部 B 206 へ移送される。

20

【0127】

前記検出部 B 206 に担持した凝集試薬 212 は、ヘモグロビン誘導体と結合していないラテックス試薬と結合し、ヘモグロビン誘導体の濃度に応じたラテックス凝集阻止反応が発生する。一定時間後に、検出部 B 206 の透過光測定を実施することによって、ラテックス凝集阻止反応を検出する。

【0128】

また同時に、検出部 A 205 を測定することによって、ヘモグロビンの吸収を測定し、ヘモグロビン濃度を算出できる。

30

【0129】

前記検出部 B 206 におけるラテックス凝集阻止反応の測定は、600 nm 近傍の波長で測定可能であり、前記検出部 A 205 におけるヘモグロビンの測定は 540 nm 近傍のヘモグロビン吸収を測定することで可能である。

【0130】

いずれにしても、あらかじめ決まった濃度のヘモグロビンと、ヘモグロビン誘導体の測定結果を基に、検量線を作成しておけば、その検量線を利用して、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体の濃度をそれぞれ算出できるし、そのヘモグロビンの濃度とヘモグロビン誘導体の濃度を関連づけて、ヘモグロビン誘導体の存在比を算出することが可能である。

40

【0131】

ここでは一例として、分析デバイス 101 がチップ状であって、遠心力と毛細管力を利用した液体移送により、測定系の順序や試薬量、反応時間等を制御する分析デバイスを有する分析システムを一例に挙げたが、測定系の順序や試薬量、反応時間が制御できる形状であれば、この構成及び方法に限定されるものではなく、液体移送については、例えば、ポンプを使用して圧力で液体移送する方法などを用いるようにしてもよい。また、前記分析デバイスは、例えば、クロマト形態でもよいし、より単純には、直方体のプラスチック製のセルの形状であっても、試薬の担持方法を工夫することによって十分使用できる。

【0132】

以下、図 3 及び図 4 を用いて、より単純な構成の分析デバイス及び該分析デバイスを用

50

いた分析システムについて説明する。

【0133】

図3は、本実施の形態4における分析システムの別の構成を示す図である。分析システム300は、該分析デバイス301に対して、光源308から光を照射し、透過光を受光部309で検出する測定部310を備える。なお、図3においては、光源308と受光部309とをつなげる回路構成、あるいは該分析デバイス301を前記分析システム中にセットするための構成については割愛する。

【0134】

図4(a)~(d)は、前記分析デバイス301の詳細な構成を示す図であり、図4(a)はその分解斜視図、図4(b)~(d)は前記分析デバイス301における、試薬の変性処理手順を示す図である。

10

【0135】

分析デバイス301は、血液検体が注入される注入口306を備えた下部ケース302bと、該下部ケース302bの開放された底面を密閉するための溶液試薬用シール305と、上部ケース302aと、前記注入口306を密閉するためのケース用シール307とからなり、前記上部ケース302aと下部ケース302bの互いの開放された底面を接着剤で貼り合わせるにより形成される。

【0136】

前記下部ケース302bは、底面が開放されたプラスチック製の直方体ケースであり、図4Bに示されるように、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩び凝集試薬からなる試薬に、前記ヘモグロビン誘導体の変性された部位に対して特異的な抗体が添加された試薬304が、溶液試薬用シール305にて密封されて保持されている。

20

【0137】

前記上部ケース302aは、前記下部ケース302bとほぼ同じ形状の、底面が開放されたプラスチック製の直方体ケースであり、その上端には、図4Bに示されるように、ヘモグロビン誘導体に特異的に反応することが可能なラテックス試薬303が真空凍結乾燥されて担持されている。

【0138】

次に、前記分析システム300の動作について説明する。

【0139】

試料の分析においては、例えばディスペンサ等を使用して、下部ケース302bに、非イオン性界面活性剤、酸化剤、金属塩及び凝集試薬を含む試薬304を注入して、前記溶液試薬用シール305で該下部ケース302bを密閉した後、図4(b)に示すように、該下部ケース302bと、前記ラテックス試薬が担持された上部ケース302aとを接着剤で貼り合わせる。前記溶液試薬用シール305を剥がした後に、例えばディスペンサ等を使用して、前記注入口306より血液検体を0.5 μ L注入し、図4(c)に示すように、ケース用シール307で前記注入口306を密閉する。そして前記上部ケース302aの上端に担持されたラテックス試薬303に、前記試薬304がかからないよう前記血液検体と試薬304とを穏やかに混合して所定時間放置する。なお、ヘモグロビン濃度も算出する場合は、この時点で、前記分析デバイス301を図3に示すように分析システム300中にセットし、測定部310によって540nm近傍の吸光度を測定するようにする。

30

40

【0140】

次に、図4(d)に示すように、前記分析デバイス301の下部ケース302bが上方にくるようにし、前記ラテックス試薬303を血液検体が添加された試薬304中に混合させ、所定時間放置する。

【0141】

所定時間経過後、前記分析デバイス301を、図3に示すように、分析システム300中にセットし、測定部310によって、600nm近傍の吸光度を測定することによって、ヘモグロビン誘導体の濃度を算出する。

50

【0142】

以上のように、本実施の形態4の分析デバイスによれば、ヘモグロビン誘導体の測定に必要な試薬を担持するようにしたので、手技の影響をうけにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定を行うことができる。

【0143】

また、本実施の形態4の分析システムによれば、前記分析システムと、該分析デバイス専用の測定部と組みあわせるようにしたので、手技の影響をうけにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定を行うことができる。

【0144】

(実施例1)

以下に、ヘモグロビン誘導体の代表的検査項目であるヘモグロビンA1cを測定する場合の実施例の詳細を記す。

【0145】

まず、ヘモグロビンの変性とヘモグロビン濃度の測定について説明する。

【0146】

精製水にて250倍に希釈した血液400 μ Lと、0.3%スクロースモノラウレート及び0.5%フェリシアン化カリウムに対して、0~1Mまでの種々の濃度のアルカリ金属塩を溶解させた変性試薬液400 μ Lとを光路長1cmのプラスチックセル内で攪拌し、535nmの波長にて、ヘモグロビンの経時的な吸光度変化を観察した。その結果を図5(a)~(c)、図6(a)~(c)に示す。この結果によれば、スクロースモノラウレートとフェリシアン化カリウムのみで血液処理を行う場合と比較して、金属塩を添加することにより、明らかにヘモグロビンの吸光度が安定するまでの時間が短縮されることが明らかになった。従来では、ヘモグロビンの吸収特性が安定化するまでに2分近い時間が必要であったのに対し、図5(a)~(c)および図6(a)~(c)にそれぞれ示すように、KCl、NaCl、Na₂SO₄、MgCl₂、MgSO₄、CaCl₂を添加することにより、またその塩濃度が高くなるのに依存してヘモグロビンの吸収特性が安定化する時間が短縮される傾向が確認された。また、試薬の種類によって、ヘモグロビンの吸収を安定化させる時間に差があることが判明した。すなわち、図5(a)のKCl、図5(b)のNaCl、図5(c)のNa₂SO₄を添加した場合に示されるように、KとNaの一価の金属塩が30秒以内にヘモグロビンの吸収を安定化させるために0.2M以上の濃度を要したのに対し、図6(a)のMgCl₂、図6(b)のMgSO₄、図6(c)のCaCl₂を添加した場合に示されるように、Mgは0.1M、Caは0.05Mの濃度で30秒以内にヘモグロビンの吸収が安定化した。CaとMgは二価の金属塩であるが、一価の金属塩に対してより少ない濃度でヘモグロビンの吸収を安定化させる効果があることが判明した。

【0147】

また既知のヘモグロビン濃度の検体に対して、SLS-ヘモグロビン法である「ヘモグロビンB テストワコー」(和光純薬株式会社製)を使用して、535nmで測定したヘモグロビン濃度と、0.15%スクロースモノラウレートと0.25%フェリシアン化カリウムと0.2M NaClで同じ検体を処理して30秒後に535nmでヘモグロビンを測定した方法とを比較した結果、図7に示すように非常に良好な相関性を確認することができた。以上の結果から、スクロースモノラウレートとフェリシアン化カリウムに金属塩を加えることによって、迅速にヘモグロビンの変性が生じ、その結果ヘモグロビンの吸収特性が安定化される時間が短縮されるとともに、SLS-ヘモグロビン法と同等の正確なヘモグロビン測定が実現可能であることが判明した。

【0148】

(実施例2)

次に、金属塩がラテックス凝集反応に与える影響を確認した。

【0149】

0.15%のスクロースモノラウレートと0.25%フェリシアン化カリウムを含むラ

10

20

30

40

50

テックス試薬溶液に、それぞれ種々の濃度の KCl 、 $NaCl$ 、 Na_2SO_4 、 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ を加えた後に、凝集多価抗原からなる凝集試薬を加え、1分後の 550 nm の吸光度の変化量を測定した。その結果を図 8 に示す。

【0150】

この結果によれば、ラテックス凝集反応は金属塩の濃度が高いほど凝集反応性が高く、塩濃度が一定濃度以上になると凝集反応性が安定することが判明した。特にヘモグロビンの吸収特性が迅速に安定する各種塩濃度においては、凝集反応性が低下する傾向は確認されず、金属塩による免疫反応への悪影響は確認されなかった。以上の結果から、スクロースモノラウレートとフェリシアン化カリウムに金属塩を加えることによって、免疫測定系が阻害されることはなく、正確なヘモグロビン誘導体の測定が可能であることが判明した。

10

【0151】

(実施例 3)

以下、図 3 に示す分析システムを用いた、ヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定について説明する。

(a) 分析デバイスの作製

まず、図 4 (a) に示すような底面が開放された、縦 0.5 cm × 横 0.5 cm × 高さ 2 cm のプラスチック製の上部ケース 302 a の上端に、図 4 (b) に示すように、ヘモグロビン A 1 c に特異的に結合可能なラテックス試薬と 5% スクロースを含む溶液からなるラテックス試薬 303 を真空凍結乾燥により担持させる。

20

【0152】

次に、図 4 (a) に示すような前記上部ケース 302 a と同じ形状のプラスチック製の下部ケース 302 b に、図 4 (b) に示すように、試薬 304 として、0.15% スクロースモノラウレートと 0.25% フェリシアン化カリウムと 0.15 M 塩化ナトリウムからなる溶液 0.2 mL と、凝集試薬として使用する合成多価ヘモグロビン A 1 c 抗原とを注入し、溶液試薬用シール 305 にて密封した後、前記上部ケース 302 a と前記下部ケース 302 b とを、互いの開放された底面を合わせるように接着剤で張り合わせることで、分析デバイス 301 を形成した。

【0153】

(b) 分析

まず、溶液試薬用シール 305 を剥がし、分析デバイス 301 の注入口 306 より $0.5\text{ }\mu\text{L}$ の血液検体を注入し、図 4 (c) に示すように、該注入口 306 にケース用シール 307 を貼ることによって、分析デバイス 301 を密閉する。

30

【0154】

次に、前記上部ケース 302 a に担持されたラテックス試薬 303 に、試薬 304 がからないよう穏やかに血液検体と試薬 304 とを混合し、この状態で 30 秒間放置後、図 3 に示すように、分析デバイス 301 を分析システム 300 内にセットし、前記測定部 310 によって、 535 nm の吸光度を測定する。

【0155】

次に、図 4 (d) に示すように、分析デバイス 301 を反転させて、前記上部ケース 302 a のラテックス試薬 303 と試薬 304 とを混和させて溶かした後、図 3 に示すように、前記分析デバイス 301 を分析システム 300 の中にセットし、前記ラテックス試薬 303 を溶かしてから 1 分後に、測定部 310 によって 550 nm の吸光度を測定する。

40

【0156】

測定部 310 については詳細な説明を省くが、光源 308 から分析デバイス 301 に光を照射し、透過光を受光部 309 で検出する。なお、測定部 310 の一例としては、分光光度計の機能を用いれば十分使用可能であるので、詳細な説明は割愛する。なお、ここでは、 535 nm によって、シアンメトヘモグロビンを測定し、 550 nm によって、ラテックス凝集を測定している。この一連の測定動作を、2 種類の血液検体 A 及び B について行う。

50

【0157】

この後、前記分析システム300を用いて、既知の濃度のヘモグロビン及びヘモグロビンA1c溶液を利用してあらかじめ作成しておいたシアンメトヘモグロビンの検量線、及びヘモグロビンA1cのラテックス凝集阻止反応の検量線に、前述のようにして得た吸光度値を代入することによって、前記血液検体A、Bそれぞれの、ヘモグロビン濃度及びヘモグロビンA1c濃度を求めた。

【0158】

図9は、血液検体A、Bそれぞれの、ヘモグロビンA1c濃度及びヘモグロビン濃度、さらにヘモグロビンA1cの存在比を示す図である。

【0159】

図9に示すように、本分析システム300にて、ヘモグロビンA1cの占める割合を測定した結果は、血液検体Aで4.9、血液検体Bで10.3であり、あらかじめ東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計(HLC-723GHbV)にて、ヘモグロビンA1cの占める割合を測定した結果の、血液検体Aの5.0、血液検体Bの10.5とそれぞれ非常に近く、本分析システム300によって、正確なヘモグロビンA1c濃度の測定が可能であることが確認された。

【0160】

次に、本発明の凝集試薬製造方法及び凝集試薬を用いた分析対象物測定方法の実施の形態、及びその試験キット、分析デバイスについて、詳細に説明する。

(実施の形態5)

本発明の実施の形態5では、凝集試薬製造方法及び凝集試薬を用いたヘモグロビンA1c測定方法について説明する。

【0161】

A. リガンドの製造

本発明のリガンドは、特異的なタンパク質を認識し、それを結合相手とする物質であれば、いかなるものであってもよい。この代表的な例として、ハプテンが挙げられる。本実施の形態5では、ヘモグロビンA1c中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドとして、バリン-ヒスチジン-ロイシン-トレオニン-システインの配列でアミノ酸を結合させたペプチド(以下、VHLTCという)を、凝集試薬のリガンドとして用いる。このリガンドを用いることによって、ヘモグロビンA1c認識抗体に特異的に結合することができる。また、このリガンドを変えることによって、様々な抗体を特異的に認識するリガンドを作製することができる。

【0162】

B. 凝集試薬の製造

本発明の凝集試薬は、制御された数のリガンドを、分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に、官能基を有するリンカーを介して化学的に結合させたものである。また、この凝集試薬は、タンパク質1個当たり、10個以上のリガンドが結合した複合体である。

【0163】

ここで、タンパク質は、6万以上の分子量のものであれば、いかなるものであってもよい。この代表的なタンパク質の例としては、ガンマグロブリン、チログロブリン、アルブミンなどのグロブリン様タンパクがあげられるが、これらのタンパク質に限定されるものではない。より望ましくは、6万~30万程度の分子量のものがよい。

【0164】

ここで、タンパク質として、6万以上の分子量のものが好ましい理由は、以下の通りである。すなわち、分子量が6万より小さいタンパク質は、リンカーが化学結合する部位であるアミノ基の数が少ない為、10個以上のリガンドが結合することができず、水懸濁性粒子の凝集反応性が低下するという欠点がある。これに対して、分子量が6万以上のタンパク質は、リンカーが化学結合する部位であるアミノ基の数が多いため、10個以上のリガンドが結合することができ、その結果として、水懸濁性粒子の凝集反応性が高いという利点があるからである。

10

20

30

40

50

【0165】

官能基を有するリンカーの長さは、15以下であることが望ましい。リンカーは、官能基を有するものであれば、いかなる所望のものであってもよく、直鎖構造あるいは平面構造を有するものであってもよい。代表的なリンカーの例としては、N-(6-Maleimidocaproxy)succinimide (以下EMCSという)、Succinimidy-*trans*-4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate (以下SMCCという)、N-succinimidy(4-iodoacetyl)aminobenzoate (以下SIABという)などが用いられる。

【0166】

図10は、本発明の実施の形態5における凝集試薬のイメージ図である。

10

【0167】

図10において、本発明の凝集試薬4は、分子量6万以上のタンパク質(担体)1、官能基を有するリンカー2、VHLTC(リガンド)3からなる。この凝集試薬4は、リガンド(VHLTC)3を、官能基を有するリンカー2を介して、タンパク質(担体)1に結合させることによって製造される。このとき、担体1個当たり、20個程度のリガンド3を結合させておく。このリガンド3が特異的な抗体を認識し、抗体と結合する。1つの凝集試薬の2つ以上のリガンド3に抗体が結合すると、これらの抗体同士が凝集試薬を介して結合し、次々に凝集していく。

【0168】

このようにして製造されたリガンド-タンパク質複合体は、免疫アッセイにおける凝集試薬として用いられる。

20

【0169】

C. ラテックス標識抗体の製造

ポリスチレンラテックス粒子に、抗human HbA1c抗体を過剰量加えて結合させ、さらに、ウシ血清アルブミン(以下BSAという)でブロッキングすることにより、ラテックス標識抗体を作製する。この抗human HbA1c抗体が、試験試料中のヘモグロビンA1c及び凝集試薬のリガンド(VHLTC)3を認識し、結合する。また、この抗体を変えることによって、様々な試験試料中の成分及び凝集試薬を認識するラテックス標識抗体を作製することができる。

30

【0170】

D. ラテックス免疫凝集阻止法を用いた被検試料中の分析対象物の測定

血液検体中のヘモグロビン及びヘモグロビンA1cを測定する為に、まず血液検体を希釈し、非イオン性界面活性剤と酸化剤を含む変性試薬を用いて、希釈された血液検体と混合させ、血液検体中のヘモグロビンをメト化及び変性させる。このようにヘモグロビンをメト化することによって、ヘモグロビンを540nm付近の吸光度で測定することが可能となる。その後、前記希釈及び変性させた検体について、540nm近傍の波長で吸光度を測定し、全ヘモグロビン量をメトヘモグロビン法を用いて算出する。ただし、SLSヘモグロビン法などの、その他のヘモグロビン測定法を用いてもよい。

【0171】

次に、ヘモグロビンA1c測定の為に、変性させた検体を抗human HbA1c抗体を標識したラテックス標識抗体に加える。ここで、このラテックスに標識された抗human HbA1c抗体と、血液検体中のヘモグロビンA1cの変性された部位の間で抗原抗体反応が起こる。その後、ラテックス標識抗体と反応した検体に、凝集試薬を加えると、血液検体中のヘモグロビンA1cが結合していない、残りの抗human HbA1c抗体に凝集試薬が結合する。その結果、凝集試薬が結合した部分で次々に凝集反応が起こり、凝集塊ができる。反応液中に発生する凝集塊の量は、ヘモグロビンA1cの濃度に反して発生するのであるが、この反応をラテックス免疫凝集阻止反応という。

40

【0172】

次に、一定時間後に、この反応液中に発生した凝集塊による濁度を光学的測定によって

50

検出するために、測定部の吸光度 (A) を測定する。また、凝集試薬を加える前に、あらかじめ、測定部のブランク吸光度 (A₁) も測定する。これらの吸光度の差 (A - A₁) により、吸光度変化を算出する。

【0173】

吸光度変化 = A - A₁

この吸光度変化より、血液検体中のヘモグロビン A_{1c} 量を算出する。

【0174】

これらの結果より、血液検体中のヘモグロビンに対するヘモグロビン A_{1c} の量、つまり存在比率の検出が可能となる。

【0175】

【数1】

$$\text{血液検体中のヘモグロビンA1c濃度(\%)} = \frac{\text{ヘモグロビンA1c濃度(mg/dL)}}{\text{ヘモグロビン濃度(mg/dL)}} \times 100$$

このような本実施の形態5の凝集試薬によれば、制御された数のリガンドを、分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に、官能基を有するリンカーを介して化学的に結合させることにより製造したので、タンパク質の高次構造により、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体間の凝集反応速度を速めることができ、凝集制御イムノアッセイの測定時間を短縮することが可能となる。さらに、凝集試薬の保存安定性を向上させ、室温での保存が可能となるので、冷蔵での保存が不要となる。

【0176】

(実施の形態6)

本発明の実施の形態6では、少なくとも凝集試薬及びラテックス標識抗体及び変性試薬を保持し、これらの試薬によりヘモグロビンとヘモグロビン A_{1c} を測定するための試験キットについて説明する。

【0177】

試験キットとは、ヘモグロビンとヘモグロビン A_{1c} の測定に必要な試薬や部材を詰め合わせたものを示す。具体的には、ヘモグロビンとヘモグロビン A_{1c} の測定に必要な試薬と、使用説明書、ランセットもしくは注射器等の採血用具、採血前後に必要な消毒用品、試薬の添加に用いるディスペンサやスポイト等の秤量器具などの部材を詰め合わせたものであり、これらの試薬及び部材を用いて、検査対象となる試料を採血して定量・希釈・変性等を行った後、臨床用の自動測定機、もしくは分光光度計等を使用して、簡便にヘモグロビンとヘモグロビン A_{1c} を測定することができるようにしたものである。

【0178】

試験キットでは、採血から測定までの方法が手順化されているので、使用説明書に従えば専門的な知識を保有していなくても簡便に使用することが可能である。また、前述のヘモグロビンとヘモグロビン A_{1c} の測定に必要な試薬とは、少なくとも凝集試薬及びラテックス標識抗体及び変性試薬を含む試薬であり、これによってヘモグロビン A_{1c} の測定を迅速且つ確実に行うことができる。

【0179】

また、前記試験キットに保持させる前記ラテックス標識抗体と前記変性試薬とは、別々に保持してもよいし、該変性試薬をラテックス標識抗体に含めて保持してもよい。

【0180】

以上のように、本実施の形態6の試験キットによれば、試料中のヘモグロビン A_{1c} の測定に必要な試薬の全てがそれぞれ容器等に封入されて備えるようにしたので、使用者はあらかじめ定められた手順にしたがって、ヘモグロビン及びヘモグロビン A_{1c} の測定を容易に行うことができる。

【0181】

(実施の形態7)

本発明の実施の形態7では、少なくとも、分析試料を注入する注入口と、希釈液を保持

10

20

30

40

50

する希釈液収容室と、注入された分析試料を希釈・変性させる希釈・変性室と、該希釈・変性されたヘモグロビンを検出するヘモグロビン測定室と、該希釈・変性された分析試料をラテックス標識抗体と反応させるラテックス反応室と、前記ラテックス標識抗体と反応した分析試料を凝集試薬と反応させる凝集室及び分析試料中の分析対象物を測定する測定室とから構成されるヘモグロビン及びヘモグロビン A 1 c を測定するための分析デバイスについて説明する。

【 0 1 8 2 】

分析デバイスについては、該分析デバイスを評価する測定装置とセットにして、分析システムの形態をとることが可能である。この形態をとることによって、より簡便かつ迅速にヘモグロビン A 1 c の測定が可能となる。

10

【 0 1 8 3 】

本実施の形態 7 の分析デバイスは、凝集試薬及びラテックス標識抗体及び変性試薬を別々な箇所に担持したものである。

【 0 1 8 4 】

以下に、本実施の形態 7 の分析デバイスの測定方法について説明する。

【 0 1 8 5 】

まず、血液検体と、変性試薬とを混合し、血液検体の希釈・変性を行い、その後、前記希釈及び変性させた血液検体について、所定の波長の光を照射して、全ヘモグロビンを測定する。次に、希釈・変性した血液検体とラテックス標識抗体とを混合し、抗原抗体反応を行い、測定部のブランク吸光度の測定を行う。その後、これらの混合溶液を凝集試薬と混合し、抗分析対象物抗体同士を凝集させ、その凝集により生じた凝集塊の吸光度を測定する。これらの測定によって、実施例の形態 5 に記載した式を用いて、ヘモグロビン A 1 c を算出する。これらのヘモグロビンとヘモグロビン A 1 c の測定によって、試料中のヘモグロビンに対するヘモグロビン A 1 c の量、つまり存在比率を算出することにより濃度検出が可能となる。

20

【 0 1 8 6 】

なお、血液検体の希釈・変性を行うと同時にラテックス標識抗体と抗原抗体反応をすることも可能である。

【 0 1 8 7 】

これらの分析デバイスの形状としては、前述した一連の反応、及び測定が、スムーズに進められることが重要である。

30

【 0 1 8 8 】

分析デバイスの一例としては、例えば、遠心力と毛細管力を利用したものが考えられ、分析デバイス内に形成した複数のチャンパー（空間）と該チャンパー間に形成した流路を通して、液体試料を自由に移送させることによって、測定の順序や試薬容量、反応時間等を制御することが可能である。そして、このような構成の分析デバイスを評価する装置の一例としては、前記分析デバイスを回転させ得る回転機構と、吸光度測定が可能な光学測定機能とを搭載したものが挙げられる。

【 0 1 8 9 】

以下、図 1、図 2 を用いて、前述した分析デバイス及び該分析デバイスを含む分析システムの一構成例について説明する。

40

【 0 1 9 0 】

図 1 は、分析システムの構成を示す図である。分析システム 1 0 0 は、分析デバイス 1 0 1 と、該分析デバイス 1 0 1 に対して光源 1 0 2 から光を照射し、透過光をディテクタ 1 0 3 で検出する測定部 1 1 0 と、該分析デバイス 1 0 1 をその一部を切り抜いた箇所に固定する回転基板 1 0 4 と、該回転基板 1 0 4 を回転させるモータ 1 0 5 とを備える構成となっている。なお、図 1 において、モータ 1 0 5 の駆動機構や、光源 1 0 2、ディテクタ 1 0 3 につながる回路構成については割愛する。

【 0 1 9 1 】

図 2 は、前記分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図 2 (a) はその分解斜視図

50

であり、図2(b)は、試薬を添加した状態を示す図である。

【0192】

分析デバイス101は、下部基板201と、上部基板213とを、表裏両面に接着効果を保有する接着層202で貼り合わせるにより形成されたものである。基板の材料としては、透明な樹脂基板が用いられ、射出成形等によって、精度よくさまざまな形状の空間を形成している。詳述すると、前記下部基板201には、検体を希釈・変性させる部位である希釈・変性室203と、希釈液収容室204と、検体中のヘモグロビンを検出する検出部A205と、ヘモグロビンA1cを検出する検出部B206とを形成するための凹部が、その上面に射出成形により形成されている。なお、前記上部基板213及び前記下部基板201の樹脂の素材としては、ポリカーボネートやポリスチレンやアクリルなどのプラスチック樹脂など、光を透過する材質であれば、特にこれに制限されない。

10

【0193】

また、接着層202には、前記希釈・変性室203、希釈液収容室204、検出部A205、検出部B206のパターン形状に加えて、それぞれを接続する流路207のパターン形状が切り抜かれている。さらに、前記検出部A205、及び検出部B206の手前の流路207は、その一部を広げるように切り抜かれており、これにより、前記検出部A205、及び検出部B206へ移送する液量を定量する定量部A208、及び定量部B209を形成するものとする。接着層202の接着効果を得る材料としては、接着剤の他、加熱によって接着可能なホットメルトシートなどが使用できる。

【0194】

前記分析デバイス101は、前記下部基板201と前記接着層202とを貼り合わせた後、前記上部基板213を貼り合わせる前に、図2(b)に示すように、前記下部基板201の希釈・変性室203に、変性試薬210を、また前記下部基板201と接着層202で形成した定量チャンバーB209に、ラテックス標識抗体211を、さらに前記検出部B206には凝集試薬212を、それぞれ担持した後、乾燥させ、さらにその後、前記上部基板213を、前記接着層202の上面に貼り合わすことにより、形成される。また、前記上部基板213と前記接着層202と前記下部基板201とを貼り合わせるにより形成される、該接着層202に切り抜かれた流路207の2つの開口部は、それぞれ、検体注入口215と希釈液注入口216となる。

20

【0195】

以下に、分析システム100の動作について説明する。

30

【0196】

試料の分析においては、例えばディスペンサ等を使用して、分析デバイス101の検体注入口215より血液を1 μ L注入すると共に、希釈液注入口216より、希釈液を500 μ L注入する。これにより、血液は検体注入口215内側の流路内に、また希釈液は希釈液収容室204に保持される。

【0197】

次に、前記回転基板104の切り抜かれた箇所、血液と希釈液とが注入された分析デバイス101をセットし、モータ105により所定の回転数で一定時間回転する。この回転により、希釈液と血液とは前記希釈・変性室203へ移送され混合されて希釈試料液となり、変性試薬により、ヘモグロビンのメト化及び変性を行う。

40

【0198】

次に、回転基板104の回転を停止することによって、メト化及び変性された該試料液を毛細管現象により、流路207を通じて、定量部A208と定量部B209に移送させる。

【0199】

前記定量部B209に移送されたメト化及び変性された試料液は、該定量部B209において、予め保持されていたラテックス試薬211と混合し、ラテックス試薬211と該試料液中のヘモグロビンA1cとが結合する。

【0200】

50

この後、再度前記回転基板 104 をモータ 105 により所定の回転数で一定時間回転すると、定量部 A 208 に移送されたメト化及び変性された試料液は検出部 A 205 へ、一方、前記定量部 B 209 でラテックス試薬 211 と混合された試料液は検出部 B 206 へ移送される。

【0201】

前記検出部 B 206 に担持した凝集試薬 212 は、ヘモグロビン A 1c と結合していないラテックス試薬と結合し、ヘモグロビン A 1c の濃度に応じたラテックス凝集阻止反応が発生する。一定時間後に、検出部 B 206 の透過光測定を実施することによって、ラテックス凝集阻止反応を検出する。

【0202】

また同時に、検出部 A 205 を測定することによって、ヘモグロビンの吸収を測定し、ヘモグロビン濃度を算出できる。

【0203】

前記検出部 B 206 におけるラテックス凝集阻止反応の測定は、600nm 近傍の波長で測定可能であり、前記検出部 A 205 におけるヘモグロビンの測定は 540nm 近傍のヘモグロビン吸収を測定する方法が可能である。

【0204】

いずれにしても、あらかじめ決まった濃度のヘモグロビンと、ヘモグロビン A 1c の測定結果を基に、検量線を作成しておけば、その検量線を利用して、ヘモグロビンとヘモグロビン A 1c の濃度をそれぞれ算出でき、それらの濃度より、ヘモグロビン A 1c の存在比を算出することが可能である。

【0205】

ここでは一例として、分析デバイス 101 がチップ状で、遠心力と毛細管力を利用した液体移送により、測定系の順序や試薬量、反応時間等を制御する分析システムを一例に挙げたが、測定系の順序や試薬量、反応時間が制御できる形状であれば、この構成及び方法に限定されるものではなく、液体移送については、例えば、ポンプを使用して圧力で液体移送する方法なども十分可能である。また、前記分析デバイスは、例えば、クロマトグラフィーを利用した形態でもよいし、より単純には、直方体のプラスチック製のセルの形状であっても、試薬の担持方法を工夫することによって十分使用できる。

【0206】

以上のように、本実施の形態 7 によれば、ヘモグロビン A 1c の測定に必要な試薬を担持した分析デバイスを設計すると共に、該分析デバイス専用の測定部と組み合わせた分析システムを構築するようにしたので、手技の影響をうけにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン A 1c の測定を行うことができる。

【0207】

(実施例 4)

以下に、凝集試薬の製造方法及びラテックス標識抗体の製造方法についての実施例の詳細を記す。

【0208】

凝集試薬の製造方法としては、担体としてチキンガンマグロブリン(以下、CGG という)、リンカーとして EMCS、リガンドとして VHLC を用いた。EMCS の N 末端と VHLC のシステインを結合し、さらに、EMCS の C 末端と CGG のアミノ基を結合させることにより、凝集試薬を製造した。このとき、CGG 1 個当たり、20 個程度の VHLC を結合した。

【0209】

また、ラテックス標識抗体の製造方法としては、平均粒径 0.12 μm のポリスチレンラテックス粒子(積水化学社製)に抗 human HbA1c 抗体を過剰量加え、物理吸着によって結合した。該ラテックス粒子抗体複合体に 0.5% のウシ血清アルブミン(以下、BSA という)を加えてブロッキングし、ラテックス標識抗体を作製した。なお、ラテックスの粒径はこれに限らず、0.05 μm ~ 1.0 μm のものであればいずれでもよ

10

20

30

40

50

い。

【0210】

(実施例5)

以下に、第2の凝集試薬の製造方法についての実施例の詳細を記す。

【0211】

凝集試薬の製造方法としては、担体としてIgY(CGGの主成分である免疫グロブリンGのみを精製したもの)、リンカーとしてEMCS、リガンドとしてVHLTCを用いた。EMCSのN末端とVHLTCのシステインを結合し、さらに、EMCSのC末端とIgYのアミノ基を結合させることにより、凝集試薬を製造した。このとき、IgY1個当たり、20個程度のVHLTCを結合した。この凝集試薬は担体としてCGGを用いた場合と比べ、担体のロット間差が小さいため、ロット間差の小さい凝集試薬を製造することが可能となる。

10

【0212】

(実施例6)

以下に、ラテックス免疫凝集阻止法を用いた被検試料中の分析対象物の測定方法についての実施例の詳細を記す。

【0213】

まず、精製水にて250倍希釈した血液400 μ Lと、0.3%スクロースモノラウレート及び0.5%フェリシアン化カリウムからなる変性試薬400 μ Lとを混合し、血液中のヘモグロビンをメト化及び変性させた。なお、ヘモグロビンのメト化及び変性させる工程で用いる試薬はこれらに限らず、非イオン性界面活性剤と酸化剤が含まれていれば、いかなるものでもよい。前記希釈及び変性させた血液について535nmの波長で吸光度を測定し、全ヘモグロビン濃度を算出した。

20

【0214】

次に、ヘモグロビンA1c測定のために、前記希釈・変性血液を真空凍結乾燥した実施例1のラテックス標識抗体に加え、抗原抗体反応をさせた。これを真空凍結乾燥した本発明の凝集試薬に加え、37で凝集反応させた。なお、ラテックス標識抗体及び凝集試薬について、真空凍結乾燥を用いたが、乾燥物を作るものであればいかなる工法でもよく、風乾、熱乾燥、真空乾燥などの方法を用いることもできる。また、本発明の凝集試薬は免疫反応を妨害するような性質はなく、抗原抗体反応において従来の凝集試薬と根本的な変わりはない。

30

【0215】

この凝集塊による濁度を光学的測定によって検出するために、625nmの波長で吸光度(A)を測定した。また、凝集試薬を加える前の625nmの波長での吸光度(A1)も測定した。これらの吸光度の差により、吸光度変化(A-A1)を算出した。

【0216】

あらかじめ決まった濃度のヘモグロビンと、ヘモグロビンA1cの測定結果を基に、作成しておいた検量線を利用して、ヘモグロビンとヘモグロビンA1cの濃度をそれぞれ算出し、それらの濃度より、ヘモグロビンA1cの存在比を算出した。

【0217】

(比較例)

担体としてCGG、リンカーとしてEMCS、リガンドとしてVHLTCとで構成された本発明の凝集試薬と、担体としてポリリジン、リンカーとしてEMCS、リガンドとしてVHLTCとで構成された従来の凝集試薬とを用い、それぞれ比較実験を行った。

40

【0218】

(a)凝集試薬の濃度と吸光度変化との関係

図11は、ラテックス標識抗体と凝集試薬とのラテックス凝集反応において、測定された吸光度変化と添加した凝集試薬の濃度との関係を示している。横軸は凝集試薬の濃度、縦軸は凝集試薬を加えてから1分後の吸光度変化である。図11によれば、従来の凝集試薬と本発明の凝集試薬とも、凝集試薬の濃度が高くなるにしたがって、凝集物が増加して

50

いき、吸光度の測定値が高くなっていくが、凝集試薬の濃度があるレベルを超えた場合、つまり吸光度変化の最大値を越えると、反応液中の抗原が過多の状態になるため、凝集形成が抑制され、見かけ上の吸光度の測定値が逆に低くなる。例えば、従来の凝集試薬では、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度範囲、また、本発明の凝集試薬では、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度範囲が、吸光度の測定値が低くなる領域となり、一般に、この領域をプロゾン領域と呼び、また、この現象はプロゾン現象と称される。この濃度域の凝集試薬を用いることによって、凝集試薬の濃度変動の反応性への影響を小さくすることができる。また、凝集試薬が過多となるため、凝集反応速度を速くすることができる。この結果より、本発明の凝集試薬のほうが、ダイナミックレンジが大きいことが判明した。ダイナミックレンジが大きいことによって、検量線の傾きが大きくなり、測定精度がよくなる。

10

【0219】

また、この時用いた凝集試薬の担体あたりのリガンド量は、本発明の凝集試薬 (CGG) で $0.11 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 、従来の凝集試薬 (poly-Lys) で $0.96 \mu\text{mol}/\text{mg}$ であった。

(b) 各プロゾン領域の凝集試薬濃度における、凝集反応完了率と経時変化との関係

図12は、各プロゾン領域の濃度の凝集試薬を用いたラテックス凝集阻止反応において、凝集反応完了率の経時変化を示している。横軸は凝集試薬を加えてからの時間、縦軸は凝集試薬を加えて170秒後を100%凝集したと仮定した場合の凝集反応完了率である。図12に示すように、本発明の凝集試薬を用いた場合では、170秒後において吸光度が安定してきているが、従来の凝集試薬を用いた場合では、グラフの傾きからわかるように、170秒後においてもまだ反応が進み、吸光度が上昇している。170秒後を100%凝集したと仮定しても、明らかに、本発明の凝集試薬の方が、凝集速度が速く、凝集反応完了率が高いことがわかる。これは、例えば、凝集開始から60秒後において比較すると、従来の凝集試薬では、60%凝集反応が完了しているのに対し、本発明の凝集試薬では75%凝集反応が完了している。

20

【0220】

この結果より、本発明の凝集試薬を用いた方が、凝集反応速度が速く、短時間で反応が完了することが分かる。本発明の凝集試薬を用いたアッセイでは、凝集反応開始から3分以内に反応が完了している。一方、従来の凝集試薬では、同程度の凝集反応が完了する為には、約2倍の時間が必要である。

30

【0221】

(c) 凝集試薬の保存安定性

図13は、凝集試薬の保存安定性を示している。凝集試薬を真空凍結乾燥し、40℃環境下で保存した。この凝集試薬を用いて、ラテックス凝集阻止反応を行い、分光器を用いて吸光度を測定し、反応前との吸光度の差より、凝集試薬の反応性を確認した。横軸は保存日数、縦軸は凝集反応測定時のレファレンスとの吸光度変化比である。なお、レファレンスとして、 -80°C に凍結保存した凝集試薬を用いた。図13に示すように、従来の凝集試薬では、3ヶ月保存後の吸光度変化がレファレンスの半分程度の吸光度変化しか示さないが、本発明の凝集試薬では、3ヶ月保存後もレファレンスと同程度の吸光度変化を示し、反応性が安定している傾向があることがわかる。

40

【0222】

この結果より、従来の凝集試薬では40℃、1ヶ月経過時点での反応性の低下が見られるのと比較して、本発明の凝集試薬では40℃、3ヶ月経過時点においても、保存が安定であり、明らかに保存安定性がアップしていることが判明した。

【0223】

なお、本実験は日立製分光器 (U2800) にて行った。

【産業上の利用可能性】

【0224】

本発明によれば、迅速かつ確実に試料液中のヘモグロビンを変性させることができるので、迅速かつ正確なヘモグロビン及びヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

50

【 0 2 2 5 】

また、本発明によれば、凝集反応の時間を短縮することができるので、迅速かつ正確な測定が可能となるとともに、凝集試薬の保存安定性がアップする為、室温での保存が可能となる。室温での保存の実現により、イムノアッセイを利用した試料分析片の取り扱いが簡便になる。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

10

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含む、
ことを特徴とするヘモグロビンの測定方法。

【 請求項 2 】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 1 に記載のヘモグロビンの測定方法。

【 請求項 3 】

血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理した後に、前記試料中のヘモグロビン測定を行い、
さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を用いてヘモグロビン誘導体の免疫測定を行う、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

20

【 請求項 4 】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

【 請求項 5 】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

30

【 請求項 6 】

前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程と、
前記試料に含まれるヘモグロビン誘導体の免疫測定を行う工程と、
前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出する工程とを含む、
ことを特徴とする請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

【 請求項 7 】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c である、
ことを特徴とする請求項 6 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法。

【 請求項 8 】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、
少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む、
ことを特徴とする試薬組成物。

40

【 請求項 9 】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 8 に記載の試薬組成物。

【 請求項 10 】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに試料を処理する試薬組成物であって、

50

少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含み、さらに変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を含む、

ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 1 1】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 1 0 に記載の試薬組成物。

【請求項 1 2】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 1 0 に記載の試薬組成物。

10

【請求項 1 3】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c である、
ことを特徴とする請求項 1 0 に記載の試薬組成物。

【請求項 1 4】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる測定キットであって、
少なくとも、ヘモグロビンを変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物を保持してなる、
ことを特徴とする測定キット。

【請求項 1 5】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 1 4 に記載の測定キット。

20

【請求項 1 6】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる測定キットであって、
少なくとも、ヘモグロビンとヘモグロビン誘導体を変性させる非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物と、前記試薬組成物により変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体とを保持してなる、
ことを特徴とする測定キット。

【請求項 1 7】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 1 6 に記載の測定キット。

30

【請求項 1 8】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする請求項 1 6 に記載の測定キット。

【請求項 1 9】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A 1 c である、
ことを特徴とする請求項 1 6 に記載の測定キット。

【請求項 2 0】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンを測定するときに用いる分析デバイスであって、
少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、
前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、
前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、を備えた、
ことを特徴とする分析デバイス。

40

【請求項 2 1】

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
ことを特徴とする請求項 2 0 に記載の分析デバイス。

【請求項 2 2】

血液成分を含む試料中のヘモグロビンとヘモグロビン誘導体とを測定するときに用いる分析デバイスであって、

50

少なくとも、前記試料を添加する試料添加部位と、
 前記試料添加部位に連結され、前記添加された試料中のヘモグロビンを、少なくとも非
 イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とを含む試薬組成物により変性させる変性部と、
 前記変性部に連結され、前記変性されたヘモグロビンを検出する検出部と、
 変性されたヘモグロビン誘導体の変性部位に対して特異的に結合する抗体を担持する免
 疫アッセイ部を有し、
 前記試料中のヘモグロビン誘導体を前記試薬組成物により変性した後、前記変性された
 ヘモグロビン誘導体を、前記抗体を用いて免疫測定を行い検出する、
 ことを特徴とする分析デバイス。

【請求項 23】

10

前記金属塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である、
 ことを特徴とする請求項 22 に記載の分析デバイス。

【請求項 24】

前記金属塩の濃度は、ヘモグロビン誘導体の免疫測定を有意に妨害しない濃度である、
 ことを特徴とする請求項 22 に記載の分析デバイス。

【請求項 25】

前記ヘモグロビン誘導体がヘモグロビン A1c である、
 ことを特徴とする請求項 22 に記載の分析デバイス。

【請求項 26】

前記ヘモグロビン中のヘモグロビン誘導体が存在する比率を算出する、
 ことを特徴とする請求項 22 に記載の分析デバイス。

20

【請求項 27】

前記分析デバイスの検出部において検出された、前記ヘモグロビン誘導体の量を測定す
 る測定部とから構成される、
 ことを特徴とする請求項 22 に記載の分析デバイス。

【請求項 28】

制御された数のリガンドを、分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に
 結合させる凝集試薬の製造方法であって、
 前記リガンドを、官能基を有するリンカーを介して、前記タンパク質に結合させる、
 ことを特徴とする凝集試薬の製造方法。

30

【請求項 29】

前記タンパク質が、グロブリン様タンパクである、
 ことを特徴とする請求項 28 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 30】

前記官能基を有するリンカーの長さが、15 以下である、
 ことを特徴とする請求項 28 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 31】

前記リンカーが、直鎖構造を有する、
 ことを特徴とする請求項 28 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 32】

40

前記リンカーが、平面構造を有する、
 ことを特徴とする請求項 28 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 33】

前記リガンドが、特異的なタンパクを認識し、結合相手とする物質である、
 ことを特徴とする請求項 28 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 34】

前記リガンドが、ハプテンである、
 ことを特徴とする請求項 28 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 35】

前記凝集試薬が、タンパク質 1 個当たり、10 個以上のリガンドが結合した複合体であ

50

る、

ことを特徴とする請求項 2 8 に記載の凝集試薬の製造方法。

【請求項 3 6】

請求項 2 8 ~ 3 5 のいずれかに記載の凝集試薬の製造方法によって生成される、
ことを特徴とする凝集試薬または生成物。

【請求項 3 7】

粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する測定方法において、

水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とを混合し、該試験試料中に含まれる分析対象物に前記抗分析対象物抗体を結合させる工程と、

前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と試験試料とが混合された溶液と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試験試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる工程と、

前記抗分析対象物抗体と凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する工程とを含む、
ことを特徴とする分析対象物測定方法。

【請求項 3 8】

前記分析対象物がヘモグロビン A 1 c であり、前記リガンドが、ヘモグロビン A 1 c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、

ことを特徴とする請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法。

【請求項 3 9】

前記凝集試薬を、抗原過多となる量のプロゾン領域で使う、

ことを特徴とする請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法。

【請求項 4 0】

前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、

ことを特徴とする請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法。

【請求項 4 1】

前記凝集塊を計数することによって検出する、

ことを特徴とする請求項 3 7 に記載の分析対象物測定方法。

【請求項 4 2】

粒子凝集制御イムノアッセイを行って試験試料中の分析対象物を測定する試験キットにおいて、

水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、

抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬と、を保持する、

ことを特徴とする試験キット。

【請求項 4 3】

前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体及び前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、

ことを特徴とする請求項 4 2 に記載の試験キット。

【請求項 4 4】

粒子凝集制御イムノアッセイによって試験試料中の分析対象物を測定する分析デバイスにおいて、

前記試験試料を注入する試料注入部と、

前記試料注入部に連結され、前記注入された試料に、水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体と、前記抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量 6 万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に

10

20

30

40

50

結合させてなる凝集試薬とを混合し、前記試料中に含まれる分析対象物と結合していない抗分析対象物抗体を前記凝集試薬により凝集させる凝集部と、

前記凝集部に連結され、前記抗分析対象物抗体と前記凝集試薬との反応により生じる凝集塊を検出し、前記試験試料中の分析対象物を定量する測定部と、を備えた、

ことを特徴とする分析デバイス。

【請求項 4 5】

前記分析対象物が、ヘモグロビン A 1 c であり、前記リガンドが、ヘモグロビン A 1 c 中のペプチド配列に対応する糖化ペプチドである、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 6】

前記凝集試薬を、抗原過多となる量のプロゾーン領域で担持した、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 7】

前記水懸濁性粒子に結合している抗分析対象物抗体または、前記凝集試薬が、乾燥状態で担持されている、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 8】

前記測定部で、前記凝集塊の濁度を光学的測定によって検出する、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 4 9】

前記測定部で、前記凝集塊を計数することによって検出する、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【請求項 5 0】

前記測定部と前記凝集部とが一体に形成された、

ことを特徴とする請求項 4 4 に記載の分析デバイス。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

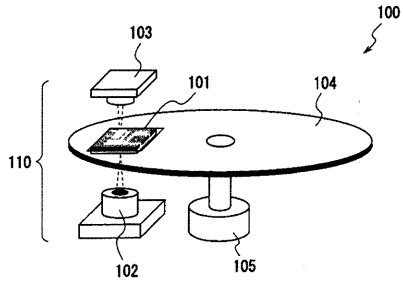
【補正の内容】

10

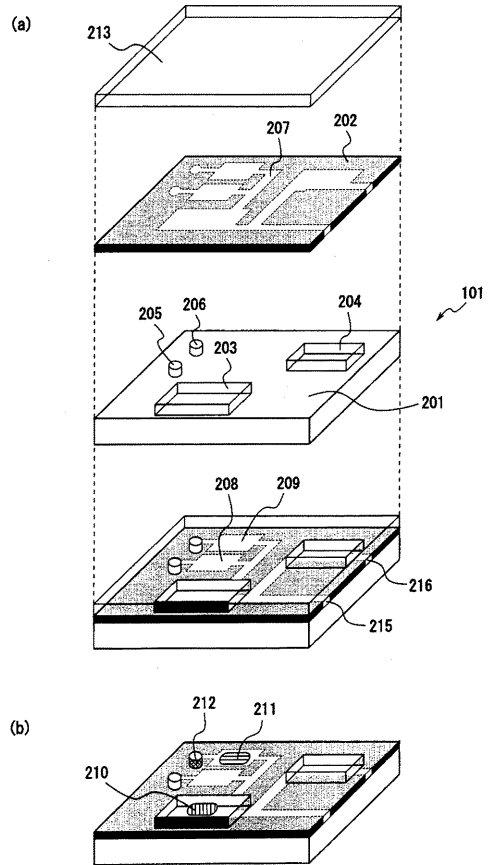
20

30

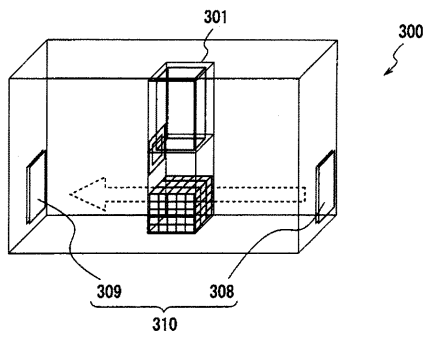
【図 1】



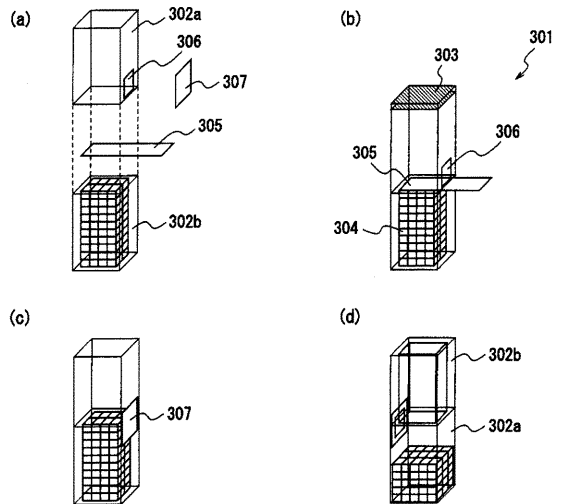
【図 2】



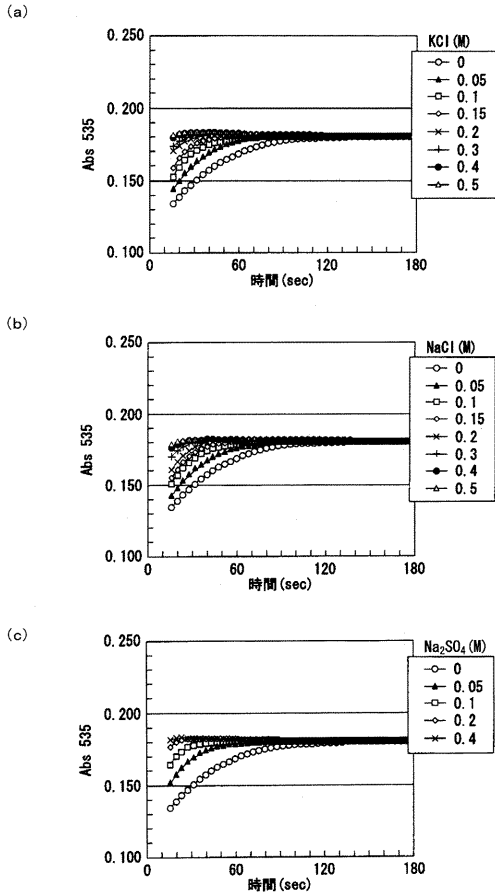
【図 3】



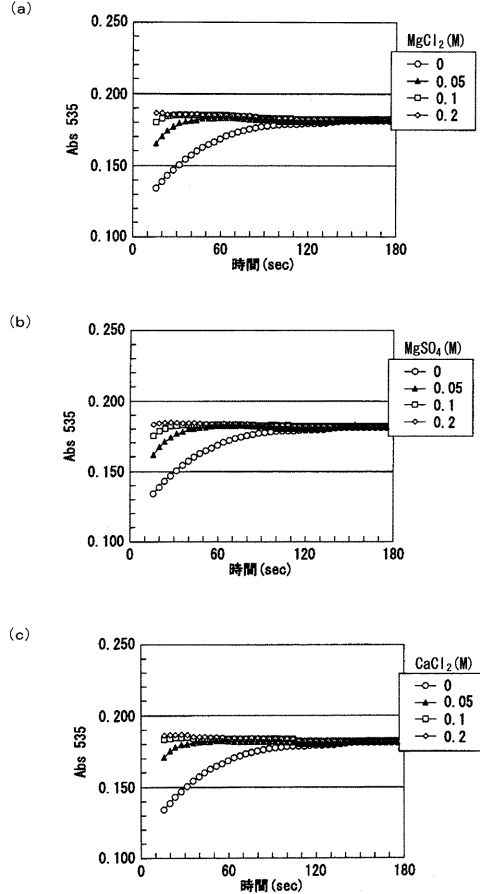
【図 4】



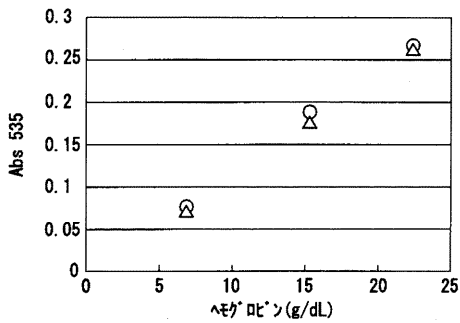
【 図 5 】



【 図 6 】



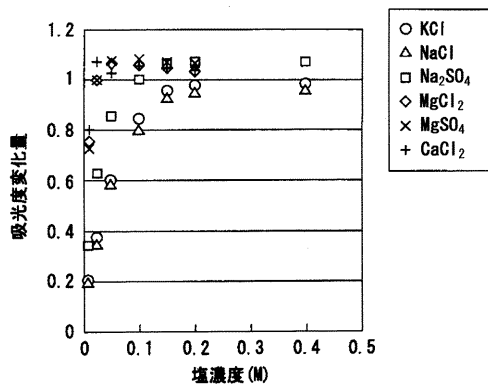
【 図 7 】



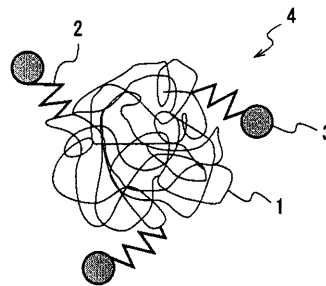
【 図 9 】

	検体A	検体B
ヘモグロビンA1c(g/dl)	0.66	1.32
ヘモグロビン(g/dl)	13.5	12.8
全ヘモグロビン中のヘモグロビンA1cの割合(%)	4.9	10.3
HLC-723GHbVで測定したヘモグロビンA1c値(%)	5.0	10.5

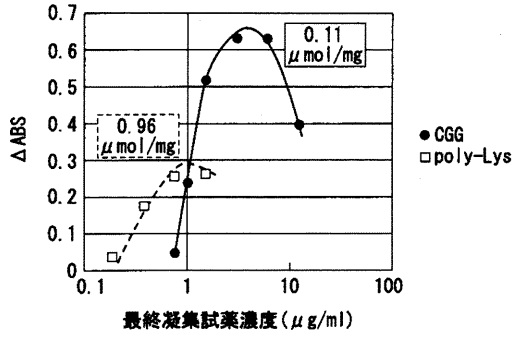
【 図 8 】



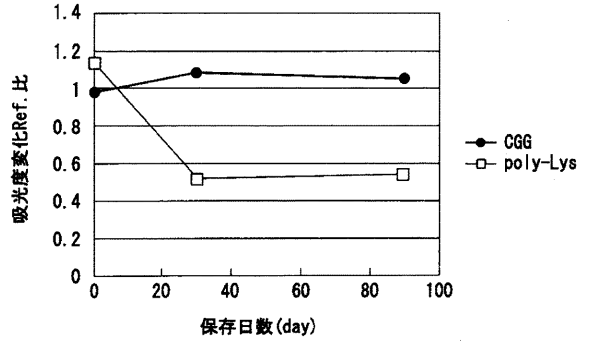
【 図 10 】



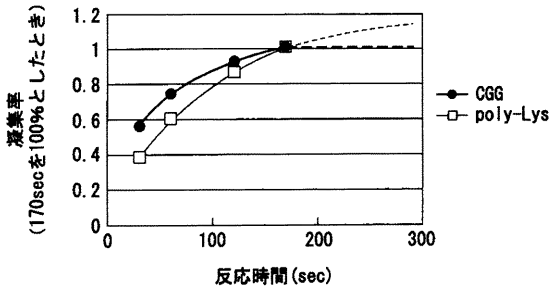
【 図 1 1 】



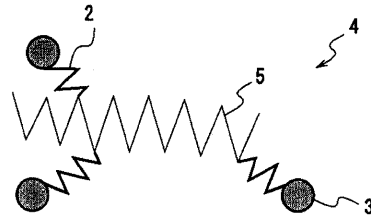
【 図 1 3 】



【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/003081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/531(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, G01N33/531		
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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/104815 A1 (Arkray, Inc.), 08 December, 2003 (08.12.03), Page 12, line 14 to page 13, line 4; page 18, lines 18 to 24; Claims & US 2005/0202399 A1 & EP 1515143 A1 & CN 1659441 A	1-27
A	JP 2002-340895 A (International Reagents Corp.), 27 November, 2002 (27.11.02), Claims; Par. Nos. [0012] to [0014] (Family: none)	1-27
<input checked="" 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 January, 2009 (15.01.09)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2009 (27.01.09)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/003081

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-114359 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 28 April, 2005 (28.04.05), Claims; Par. Nos. [0010], [0012] & US 2005/0145490 A1	1-27
A	JP 2006-058295 A (Axis-Shield Diagnostics Ltd.), 02 March, 2006 (02.03.06), Claims & US 2006/0030050 A1 & GB 417212 D & GB 507955 D & EP 1624307 A2 & CA 2514010 A	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/003081

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-27

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/003081

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The special technical feature of the invention of claim 1 resides in a hemoglobin measurement method which comprises the step of treating a sample containing a blood component with a nonionic surfactant, an oxidizing agent and a metal salt to denature hemoglobin in the sample.

On the other hand, the special technical feature of the invention of claim 28 resides in an aggregation reagent production method which comprises chemically binding a controlled number of ligands to a protein having a molecular weight of 60,000 or more and a high-order structure; the special technical feature of the invention of claim 37 resides in a method for measuring an analyte in a test sample by using an aggregation reagent which is produced by chemically binding a ligand having a site capable of specifically binding to an anti-analyte antibody to a protein having a molecular weight of 60,000 or more and a high-order structure via a linker having a functional group; the special technical feature of the invention of claim 42 resides in a kit for measuring an analyte in a test sample, which comprises an aggregation reagent produced by chemically binding a ligand having a site capable of specifically binding to an anti-analyte antibody to a protein having a molecular weight of 60,000 or more and a high-order structure; and the special technical feature of the invention of claim 44 resides in an analysis device for measuring an analyte in a test sample by using an aggregation reagent which is produced by chemically binding a ligand having a site capable of specifically binding to an anti-analyte antibody to a protein having a molecular weight of 60,000 or more and a high-order structure.

There is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features among those inventions. Therefore, those inventions cannot be regarded as being so linked as to form a single general inventive concept.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/003081	
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, G01N33/531(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, G01N33/531			
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 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009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)			
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 請求の範囲の番号	
A	WO 2003/104815 A1 (アークレイ株式会社) 2003.12.08, 第12頁第14行-第13頁第4行、第18ページ第18行-24行、クレーム等参照 & US 2005/0202399 A1 & EP 1515143 A1 & CN 1659441 A	1-27	
A	JP 2002-340895 A (国際試薬株式会社) 2002.11.27, 特許請求の範囲、【0012】～【0014】 (ファミリーなし)	1-27	
<input checked="" 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 15.01.2009		国際調査報告の発送日 27.01.2009	
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) 海野 佳子	2J 3906 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/003081

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 請求の範囲の番号
A	JP 2005-114359 A (松下電器産業株式会社) 2005.04.28, 特許請求の範囲、【0010】、【0012】等参照 & US 2005/0145490 A1	1-27
A	JP 2006-058295 A (アクシスーシールド ディアグノスティクス リミテッド) 2006.03.02, 特許請求の範囲等参照 & US 2006/0030050 A1 & GB 417212 D & GB 507955 D & EP 1624307 A2 & CA 2514010 A	1-27

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP2008/003081
<p>第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>特別ページを参照。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p> <p style="padding-left: 40px;">請求の範囲 1 - 2 7</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。</p>	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/003081

<第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見>について

請求の範囲1に係る発明の特別な技術的特徴は、血液成分を含む試料を、非イオン性界面活性剤と酸化剤と金属塩とで処理し、前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含むヘモグロビンの測定方法に関するものである。

一方、請求の範囲28に係る発明の特別な技術的特徴は、制御された数のリガンドを、分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に結合させる凝集試薬の製造方法に関するものであり、請求の範囲37に係る発明の特別な技術的特徴は、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、官能基を有するリンカーを介して分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に化学的に結合させてなる凝集試薬とを用いる、試験試料中の分析対象物測定方法であり、請求の範囲42に係る発明の特別な技術的特徴は、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に結合させる凝集試薬を含む試験試料中の分析対象物測定キットであり、請求の範囲44に係る発明の特別な技術的特徴は、抗分析対象物抗体に対する特異的な結合部位を有するリガンドを、分子量6万以上の高次構造を持つタンパク質に、化学的に結合させる凝集試薬を用いて、試験試料中の分析対象物を測定する分析デバイスである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係がないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/543	5 8 1 E
	G 0 1 N 33/543	5 8 7
	G 0 1 N 37/00	1 0 1

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

(72)発明者 浅原 千津

愛媛県東温市南方2 1 3 1 番地1 パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内

(72)発明者 北脇 文久

愛媛県東温市南方2 1 3 1 番地1 パナソニック四国エレクトロニクス株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA13 CA02 DA48 DA51 FA13 FB03

(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)	测量血红蛋白和血红蛋白衍生物的方法，测量试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2009057293A1	公开(公告)日	2011-03-10
申请号	JP2009538928	申请日	2008-10-29
申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	田中宏橋 田中正教 浅原千津 北脇文久		
发明人	田中 宏橋 田中 正教 浅原 千津 北脇 文久		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/721 G01N33/541 G01N33/543 G01N33/723 G01N33/726 Y10T436/105831 Y10T436/25125 Y10T436/2525 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N33/72.A G01N33/53.K G01N33/53.V G01N33/53.S G01N33/531.B G01N33/543.581.E G01N33/543.587 G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/CA02 2G045/DA48 2G045/DA51 2G045/FA13 2G045/FB03		
代理人(译)	原田洋平 森本弘		
优先权	2007281074 2007-10-30 JP 2007284123 2007-10-31 JP		
其他公开文献	JP5465008B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

它可快速可靠地使样品溶液中的血红蛋白变性，并快速准确地实现血红蛋白和血红蛋白衍生物的测量。一种测量血红蛋白和血红蛋白衍生物的方法，用于该方法的试剂组合物，测量试剂盒，分析装置和分析系统，包括用非离子表面活性剂，氧化剂和金属盐处理含有血液成分的样品溶液测量样品溶液中的血红蛋白并测量血红蛋白，然后使用特异性结合变性血红蛋白衍生物的变性位点的抗体通过免疫测定法测量样品中血红蛋白衍生物的量。

【図6】

