

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 340890

(P2002 - 340890A)

(43)公開日 平成14年11月27日(2002.11.27)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D V
	33/543	521	33/543	521
	33/559		33/559	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2001 - 148048(P2001 - 148048)

(22)出願日 平成13年5月17日(2001.5.17)

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 上村 八尋

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 日裏 久英

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

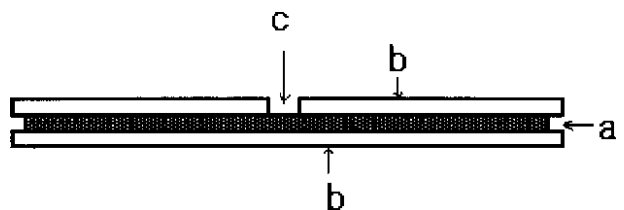
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質の測定方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 試料中の糖化タンパク質の相対含量を迅速かつ簡易に把握する方法を提供する。

【解決手段】 抗糖化タンパク質抗体を固定化した吸水性基材に被検試料を滴下すると、該吸水性基材に試料中の水分、タンパク質および抗原抗体反応で得られた免疫複合体が拡散することに着目し、これらの物質の拡散の度合いを測定することにより、容易に試料中の糖化タンパク質の相対含量を把握することが可能となった。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検物質であるタンパク質混合液を乾燥した吸水性基材に滴下し、同心円状に拡散した検体中の水分およびタンパク質の各拡散度を測定する手段を用いることを特徴とする検体中の2種以上のタンパク質の相対濃度を測定する方法。

【請求項2】 上記吸水性基材がニトロセルロース膜、セルロースアセテート膜、ガラス繊維膜、シリカプレートの内いずれかであることを特徴とする請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】 2種以上のタンパク質が、アルブミンと糖化アルブミンまたはヘモグロビンと糖化ヘモグロビンであることを特徴とする請求項1または2に記載の測定方法。

【請求項4】 透明なプラスチックのカセット内に抗体を固定化した吸水性基材をおくことを特徴とする請求項1～3のいずれか1に記載の測定方法に使用する測定用デバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 検体中の2種以上のタンパク質の相対濃度を簡易かつ迅速に測定する方法、ならびにこれらの測定に使用する測定用デバイスに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、2種以上のタンパク質の各々の割合を同時に測定するには、電気泳動法やHPLC等の手法により行うことが一般的であり、操作が煩雑であった。しかし、免疫比濁法、ラテックス凝集法、EIA法などの操作が比較的容易な手法では、同時に測定する方法はなく、各々特異的な試薬で別々に定量し、割合を算出しなければならなかった。

【0003】 2種以上のタンパク質の割合を調べることに、特に実用化が望まれるのは、糖尿病診断のための臨床検査領域であるといえる。

【0004】 糖尿病を罹患した個体は、膵臓が、炭水化物代謝を調節するに十分な量の活性ホルモンインスリンを血流中に分泌しないので、概して異常に高い血糖レベルを有している。この異常に高い血糖レベルが長期間継続すると、個体は、網膜症、腎症、神経障害および心臓血管疾患を含む糖尿病の慢性合併症を引き起こす。

【0005】 血糖状態を観察するための1つの一般的な医療試験は、血中グルコースレベルの直接測定である。グルコースレベルの長期にわたる推移を観察するには、糖化タンパク質(glycated protein)またはタンパク質結合グルコース(PBG)の濃度の測定が有用である。血清タンパク質(例えば、アルブミン、グロブリン、トランスサイレチン等)やヘモグロビンは、非酵素条件下でグルコースと反応して、糖化タンパク質を生成する。反応の程度は、血液のグルコース濃度に直接依存する。

【0006】 開発された最初の糖化タンパク質試験の1

つは、グリコヘモグロビン(糖化ヘモグロビン)である。糖化ヘモグロビンは、長時間にわたって血液中に残留する傾向をもっているため、血液中の糖化タンパク質の優れた指標となる。糖化ヘモグロビンは3つの成分、即ちHbA1a、HbA1b、HbA1cからなっている。特にHbA1cレベルが、測定の前6～8週間の血中グルコース治療の有効性を反映するので、特にHbA1cの測定が一般に行われている。他のこのような試験は、総糖化血清タンパク質または特定の糖化血清タンパク質(糖化アルブミン等)の測定により行われる。糖化アルブミンは、およそ2～3週間の期間にわたる中期間の血糖症を反映する。

【0007】 全ヘモグロビンに対するHbA1cの比率は、健康な代謝のヒトでは3～6%である。糖尿病の患者では、HbA1cの比率は、その前の4～12週間の血液グルコース濃度のレベルに比例して12%の値まで増加することがあり、時として20%までも増加することがある。特に、全ヘモグロビン含量に対するHbA1cの相対比率の測定は、血糖調節の過程を監視するのに不可欠のパラメーターを与える。

【0008】 このHbA1cを測定する方法は、このようなグリコシル化タンパク質を、酵素を用いて処理し、そのプロテアーゼ処理検体をケトアミノオキダーゼで処理し、その反応生成物を測定する非酵素的グリコシル化タンパク質の測定法が特開平5-192193号公報に開示されている。その他の糖化ヘモグロビンの測定法として、電気泳動、等電点電気泳動および比色測定、並びにイオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィー等が報告されている。

【0009】 一方、特異的ポリクローナル抗体(米国特許第4,247,533号明細書)およびモノクローナル抗体(欧州特許公開第0316306号、同第0201187号明細書)の生産が記載された後、HbA1cを検出するための一連の免疫学的方法が開発された。欧州特許公開第0185870号明細書は、HbA1cを含むタンパク質の測定のための免疫学的方法を記載している。

【0010】 血液検体中のHbA1cの相対含量測定法として、血液検体を、5～9.5のpHを有するイオン性界面活性剤を含む溶血試薬で処理し、そしてHbA1cなどのヘモグロビン誘導体を溶血された血液検体中で免疫学的に測定する免疫学的検出法が報告されている(特開平6-11510号公報)。

【0011】 血糖濃度を間接的に評価するさらに別の方法は、フルクトサミン(fructosamine)濃度を分析することである。糖化タンパク質はまた、フルクトサミンまたはケトアミン(ketoamine)として知られる。血中タンパク質は、グルコースと血中タンパク質の利用可能なアミノ基(主に、リジン残基の α -アミノ基およびタンパク質の末端アミノ酸の ϵ -アミノ基)との間の非酵素反応により、インピボにおいて糖化される。グルコースは、タンパク質のアミノ基と結合し、シッフ塩基(すなわ

ち、グルコシルアミンまたはアルジミン)を形成する。これは、安定なケトアミンを形成する分子転位を受ける。当該分野では、このようなケトアミンは、総称的に「フルクトサミン」として公知である。タンパク質糖化およびフルクトサミン形成の程度は、血中グルコース濃度に直接比例する。血清または血漿のフルクトサミンレベルの測定は、糖尿病モニターするために有用である。なぜなら、血清または血漿中のフルクトサミン濃度はおよそ半月の期間にわたる血中グルコースレベルの平均を反映するからである。

【0012】しかしながら、未糖化ヘモグロビンに対する糖化ヘモグロビンの割合や、未糖化タンパク質に対するフルクトサミンの相対濃度を迅速かつ簡易に把握できる測定方法は報告されていない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、検体中の2種以上のタンパク質の相対濃度を迅速かつ簡易に測定する方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、被検物質であるタンパク質の混合液を乾燥した吸水性基材に滴下し、同心円状に拡散した検体中の水分およびタンパク質の各拡散度を測定する手段を用いると、容易に検体中の2種以上のタンパク質のそれぞれの割合を測定することが可能となることを見出し、本発明を完成した。

【0015】すなわち本発明は、

1. 被検物質であるタンパク質混合液を乾燥した吸水性基材に滴下し、同心円状に拡散した検体中の水分およびタンパク質の各拡散度を測定する手段を用いることを特徴とする検体中の2種以上のタンパク質の相対濃度を測定する方法、

2. 上記吸水性基材がニトロセルロース膜、セルロースアセテート膜、ガラス繊維膜、シリカプレートの内いずれかであることを特徴とする前項1に記載の測定方法、

3. 2種以上のタンパク質が、アルブミンと糖化アルブミンまたはヘモグロビンと糖化ヘモグロビンであることを特徴とする前項1または2に記載の測定方法、

4. 透明なプラスチックのカセット内に抗体を固定化した吸水性基材をおくことを特徴とする前項1~3のいずれか1に記載の測定方法に使用する測定用デバイス、からなる。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明は、2種以上のタンパク質の混合液のそれぞれのタンパク質の割合を測定する方法に関する。特に、血中グルコースレベルを容易に把握することができる。

【0017】測定対象物は、血清タンパク質(例えばアルブミン、グロブリン、トランスサイレチン等)やヘモグロビンとこれらの各タンパク質に対する糖化タンパク

質である。該糖化タンパク質の量を未糖化タンパク質量と比較した相対値を得ることにより、糖尿病の病態が把握可能となる。該糖化タンパク質の例として、糖化ヘモグロビンやフルクトサミンが挙げられ、糖化ヘモグロビンの例としてより具体的にはHbA1c、またフルクトサミンの例として、糖化アルブミンが挙げられる。

【0018】本発明の主たる特徴点は、上記糖化タンパク質の相対値を得るに当り、1つの測定検体で、1回の測定により未糖化タンパク質と糖化タンパク質が同時に測定でき、該糖化タンパク質の相対値が得られる点にある。例えば、抗糖化タンパク質抗体を固定化して乾燥させた吸水性基材に被検検体を滴下すると、検体中の水分は該吸水性基材の毛細管現象により拡散する。また未糖化タンパク質および抗糖化タンパク質抗体と抗原抗体反応で得られた免疫複合体(糖化タンパク質)も、検体中に含まれる各分子数に応じて、各々拡散する。そこで、これらの物質の拡散の度合いを、目視または自動分析装置を使用して測定することにより、容易に検体中の糖化タンパク質の相対含量を把握することが可能となる。なお、糖化タンパク質量は未糖化タンパク質量に比べて少ないので、拡散の度合いは、検体滴下部位から同心円状に、糖化タンパク質、未糖化タンパク質、水分の順で拡散する。

【0019】本発明の測定法または測定用デバイスに使用される吸水性基材は、被検検体中の被検物質が固定された抗体と十分な反応を行なうことができるような吸水性基材が用いられる。好ましい具体例としては、不織布、濾紙、ガラス繊維布、ガラスフィルター、ニトロセルロース膜、セルロースアセテート膜、シリカプレート、多孔質材料などが挙げられ、特にニトロセルロース膜、セルロースアセテート膜、ガラス繊維膜、シリカプレートが好ましい。これらの基材は適度な吸水速度を有すると共に、水、タンパク質および免疫複合体の目視確認性に優れるものである。

【0020】吸水性基材の形状は、被検検体等を展開できる形状であれば特に限定されるものではないが、検体を滴下して該滴下部位から同心円状に免疫複合体等を拡散させるために、例えば、円形や正方形などの形状が好ましい。

【0021】本発明で使用する抗体は、上記吸水性基材の全体に固定化することが好ましい。該抗体を吸水性基材上に固定化する方法は、特に限定されるものではないが、従来から知られている抗体の物理吸着法や共有結合法によるのが好適である。

【0022】本発明の固定化する抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用することができる。検出対象の被検物質に応じて公知のものを適宜選択することができる。例えば、測定対象物がHbA1cの場合には、HbA1cのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用することが可能である(米国特許第4,247,

533号、欧州特許出願第0316306号および同第0201187号明細書)。

【0023】抗体を固定化した後の吸水性基材は、充分に洗浄した後、被検物質等の非特異的吸着を防ぐため、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(TweenTM20)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート(TweenTM80)、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(TritonTMX-100)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等の界面活性剤やウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、スキムミルク、カゼイン等のタンパク質や、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等の水溶性高分子のうち適当なものを選択してブロックすることが好ましい。

【0024】本発明の理解を深めるために、図を用いて説明するが、図面に示す形状に限定されるものではない。上記抗体を固定化した吸水性基材(a)を乾燥させ、透明なプラスチック製の膜(b)に挟み、該プラスチック膜の一部に検体滴下部位の孔(c)を設けて使用することができる。また、上記は1単位のカセットとして測定用デバイスとすることもできる。

【0025】吸水性基材(a)の大きさは、直径0.5~10cm、好ましくは1~3cmとするのが測定用デバイスとして使用するのに便利である。また、検体滴下孔(c)の大きさは、直径0.5~15mm、好ましくは1~3mmとするのが好適である。このようなデバイスに滴下される検体の量は、0.5~100 μ L、好ましくは1~50 μ Lとするのが、測定用デバイスとして使用するのに便利である。通常、このような少量の検体を使用すると、検体の液量に誤差が生じ、その結果として測定値にも誤差が生じる場合が多かった。しかし、本発明の方法は、検体使用量を正確に行わなくても、目的とするタンパク質量の正確な測定値を求めることができるばかりでなく、検体中のあるタンパク質(例えば糖化タンパク質)の他のタンパク質(例えば未糖化タンパク質)に対する相対値を求めることも可能である。したがって、1つの検体で測定し得る本方法を用いると、滴下検体量が測定ごとに異なっても、各測定ごとに目的とするタンパク質の絶対値および相対値が得られるという効果がある。

【0026】タンパク質の絶対値は、検体滴下孔(c)に検体を滴下後、約1分~60分間の間、室温で静置したのちにみられるリングを目視等により調べ、水分および各タンパク質により形成される同心円状の面積を計算することにより得られる。すなわち、水により形成されたリングの径は検体の容量を反映し、タンパク質によって形成されたリング径はタンパク質量を反映するので、これらのリング径をもとに補正することにより被検物質であるタンパク質量の絶対値を求めることが可能となる。また、リングの確認が容易になるように、pHインジケータを添加して水分のリングを明瞭に発色させることも

できる。

【0027】2種以上のタンパク質の相対値は、上述したように検体滴下孔(c)に検体を滴下後、室温で静置したのちにみられるリングを目視等により調べ、各同心円状の面積を計算することによって得られる。ヘモグロビンのように色素が結合しているタンパク質は、タンパク質の色素でリングの大きさが確認できる。また、リングの確認が容易になるようにBCPやBCGなどアルブミンと結合しやすい色素で検体を染色することもできる。例えば、未糖化タンパク質および抗糖化タンパク質抗体と抗原抗体反応で得られた免疫複合体(糖化タンパク質)の場合は、リングが二重の同心円状にあらわれ、外側のリングが未糖化タンパク質を示し、内側のリングが糖化タンパク質を示す。

【0028】具体的には、次式によって算出される。

糖化タンパク質の割合 = $B / A \times 100$

A: 未糖化タンパク質により形成されたリングの面積から求めた未糖化タンパク質量

B: 糖化タンパク質により形成されたリングの面積から求めた未糖化タンパク質量

【0029】

【実施例】以下、本発明を実施例を用いて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0030】

【実施例1】本実施例は、本発明の測定用デバイスに検体の液量を変えて滴下し、各検体の液量と形成されたリングの半径との関係を調べた例について説明する。

【0031】(測定検体)糖尿病患者から採血し、ロッシュ社製の溶血試薬を用いて処理したものを測定用検体として使用した。

【0032】(測定用デバイス)大きさが2cm \times 2cmのニトロセルロース膜を400 μ g/mLの抗HbA1cモノクローナル抗体溶液に室温で2時間浸漬し、PBS緩衝液で十分に洗浄したのち、1%のウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングし、凍結乾燥し、透明なプラスチック膜で挟んだものを測定用デバイスとした。

【0033】(測定)5、6および8 μ Lの検体を各々測定用デバイスの中央部の検体滴下孔に滴下し、そのまま、室温で60分間静置した。水分、未糖化ヘモグロビン(Hb)および抗HbA1cモノクローナル抗体と反応したHbA1c免疫複合体により形成された同心円状のリングについて、各々検体滴下孔から沈降線までの距離(半径)を測定した。リングは図1の同心円状に認められ、外側のリングは水により、中央のリングは未糖化ヘモグロビンにより、内側のリングはHbA1c免疫複合体により形成された。各半径の測定値を表1に示した。その結果、検体液量を変化させると水、未糖化HbおよびHbA1c免疫複合体により形成されたリングの半径も各々変化した。

【0034】

(表1) 各検体により形成されたリングの測定値(半径)

検体量(μL)	HbA1c半径(mm)	未糖化Hb半径(mm)
7.5	2.8	10.3
7.5	2.8	12.8

【0035】(結果)表1に示した未糖化HbおよびHbA1c免疫複合体により形成されたリングの半径の2乗値を水により得られた半径の2乗値で割った値を比較すると、検体の液量に関係なくほぼ一定の値が得られることがわかった(表2)。このことから、本発明の方法によ

(表2)

*り、正確な検体液量を求めなくとも、検体中の水およびタンパク質により形成されたリングの半径から算出して、タンパク質の測定値および2種以上のタンパク質の相対値が求められることがわかった。

【0036】

検体量(μL)	$(a)^2/(c)^2$	$(b)^2/(c)^2$	$(a)^2/(b)^2$
5	0.050	0.679	0.
6	0.051	0.692	0.
7	0.050	0.684	0.

【0037】
【実施例2】本実施例は、HbA1cの未糖化ヘモグロビンに対する相対値を求めた例について説明する。
【0038】(測定検体) 健康人または糖尿病患者から採血し、ロッシュ社製の溶血試薬を用いて処理し形成されたリングの半径を測定用検体として使用した。b: 未糖化Hbにより形成されたリングの半径(mm)
【0039】(測定用デバイスおよび測定方法) 実施例1と同様の方法で行った。
【0040】(結果) その結果、健康人のHbA1cの未糖化ヘモグロビンに対する割合は5.1%であり、糖尿病患者のHbA1cの未糖化ヘモグロビンに対する割合は7.4%であった。
【0041】
【実施例3】本実施例は、糖化アルブミンの未糖化アルブミンに対する相対値を求めた例について説明する。
【0042】(測定用デバイス) 測定用デバイスは、固定化抗体が抗ヒト糖化アルブミン・ウサギ抗体を用い、カゼイン液でブロッキングした他は、実施例1と同条件で調製したものを使用した。
【0043】(測定検体) 各血清にブロムクレゾールパープル(BCP)を0.75mMになるように添加したほかは、実施例1で使用した検体と同様に行った。該BCPの添加により、未糖化アルブミンは青色のリングを形成し、糖化アルブミン免疫複合体は、濃い青色のリングを形成した。測定は実施例1と同様の手法で行った。*

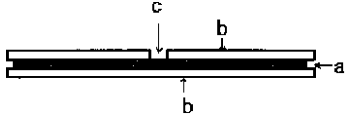
*【0034】(結果) その結果、健康人の糖化アルブミンの未糖化アルブミンに対する割合は3.8%であり、糖尿病患者の糖化アルブミンの未糖化アルブミンに対する割合は6.9%であった。
【実施例4】本実施例は、測定用デバイスのブロッキング剤として、フェノールフェタレイン(pHインジケータ)を含む液を用いたほかは、実施例1と同様に行った。
【0046】その結果、実施例1で得られた値と同等の結果が得られた。フェノールフェタレインをブロッキング剤に含めることで、水のリングが赤色となり、測定が容易となった。
【0047】
【発明の効果】以上説明したように、本発明の測定方法により、1つの検体で正確な検体液量を求めなくとも、検体中の水およびタンパク質により形成されたリングの半径から算出して、タンパク質の測定値および2種以上のタンパク質の相対値が容易に求められる。本発明の方法により糖化タンパク質の未糖化タンパク質に対する相対値を容易に把握でき、糖尿病診断を迅速かつ容易に進める事が可能となる。
【図面の簡単な説明】
【図1】本発明の測定用デバイスを、横断面から見た図である。(実施例1)
【図2】本発明の測定用デバイスを、上面から見た図で

ある。(実施例1)

【符号の説明】

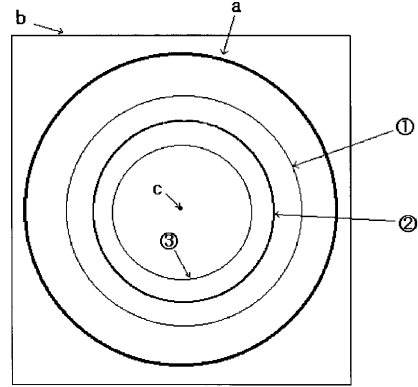
- a 吸水性基材
b 透明プラスチック膜

【図1】



- *c 検体滴下孔
水により形成されたリング
未糖化ヘモグロビンにより形成されたリング
* HbA1cにより形成されたリング

【図2】



フロントページの続き

- (72)発明者 渡津 吉史
兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際
試薬株式会社研究開発センター内

专利名称(译)	蛋白质测量方法		
公开(公告)号	JP2002340890A	公开(公告)日	2002-11-27
申请号	JP2001148048	申请日	2001-05-17
申请(专利权)人(译)	国际试剂有限公司		
[标]发明人	上村八尋 日裏久英 渡津吉史		
发明人	上村 八尋 日裏 久英 渡津 吉史		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/559		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.V G01N33/543.521 G01N33/559		
代理人(译)	庄司隆		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，可以快速，轻松地掌握标本中糖化蛋白的相对含量。解决方案：当样品滴在其中固定有抗糖蛋白抗体的吸水基材上时，通过抗原 - 抗体反应获得的水，蛋白质和免疫复合物在吸水基材中扩散。着眼于这种现象，当测量这些物质的扩散程度时，可以容易地掌握标本中糖化蛋白质的相对含量。

