

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-24328

(P2005-24328A)

(43) 公開日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/532	GO 1 N 33/532	Z
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	K
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 8 1 D
GO 1 N 33/545	GO 1 N 33/545	B

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-188119 (P2003-188119)	(71) 出願人	000005821 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22) 出願日	平成15年6月30日(2003.6.30)	(74) 代理人	100072431 弁理士 石井 和郎
		(74) 代理人	100117972 弁理士 河崎 眞一
		(72) 発明者	重藤 修行 大阪府門真市大字門真1006番地 松下 電器産業株式会社内

(54) 【発明の名称】 フルクトシルアミノ酸標識物及びこれを用いたH b A 1 cの免疫的測定方法

(57) 【要約】

【課題】 H b A 1 c の従来の免疫的測定法である酵素免疫測定法は、免疫的測定の特徴である特異性は発揮できるものの、操作が煩雑で測定完了に3時間程度要するため、操作の容易性と測定時間の向上に対する課題があった。

【解決手段】 微粒子の表面上に、H b A 1 c の特徴的部位(エピトープ)の構造を有するフルクトシルアミノ酸が、少なくとも2つ以上結合したフルクトシルアミノ酸標識物、およびこれを用いたH b A 1 c の免疫的測定方法を提供する。

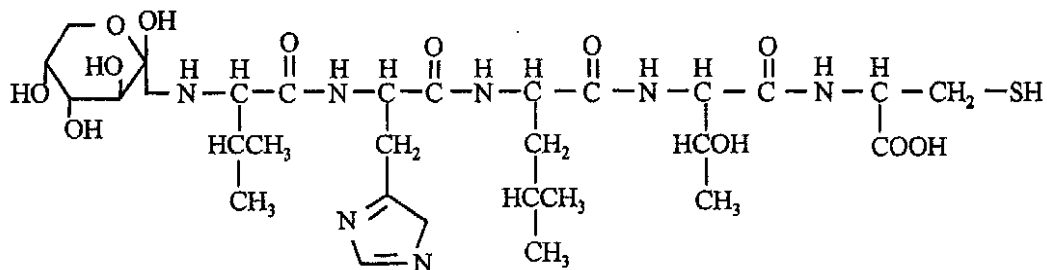
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微粒子と前記微粒子の表面に結合した 2 分子以上の化学式：

【化 1】



10

で示されるフルクトシルアミノ酸とを含むフルクトシルアミノ酸標識物。

【請求項 2】

前記微粒子の粒径が 1 nm 以上 10 μm 以下である請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸標識物。

【請求項 3】

前記微粒子が、ラテックスまたは金属コロイドである請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸標識物。

【請求項 4】

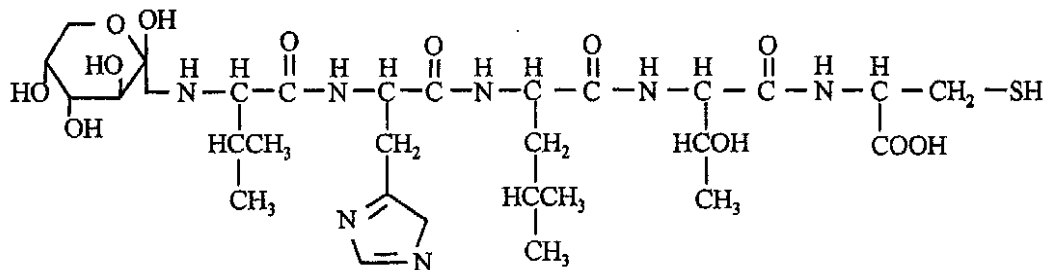
前記微粒子が、ポリペプチドまたはタンパク質である請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸標識物。

20

【請求項 5】

(a) 微粒子と、前記微粒子の表面に結合した 2 分子以上の化学式：

【化 2】



30

で示されるフルクトシルアミノ酸とを含むフルクトシルアミノ酸標識物を含む第 1 の懸濁液を調製する工程、

(b) 前記第 1 の懸濁液に、HbA1c に特異的に結合する抗 HbA1c 抗体を添加して第 2 の懸濁液を調製する工程、

(c) 前記第 1 の懸濁液に、HbA1c を含む試料液および前記 HbA1c に特異的に結合する抗 HbA1c 抗体を添加して第 3 の懸濁液を調製する工程、

(d) 前記第 2 の懸濁液および前記第 3 の懸濁液に光を照射し、前記第 2 の懸濁液からの散乱光の強度と前記第 3 の懸濁液からの散乱光の強度とを比較し、前記試料液に含まれる HbA1c の濃度を定量的に測定する工程

40

を含むことを特徴とする HbA1c の免疫的測定方法。

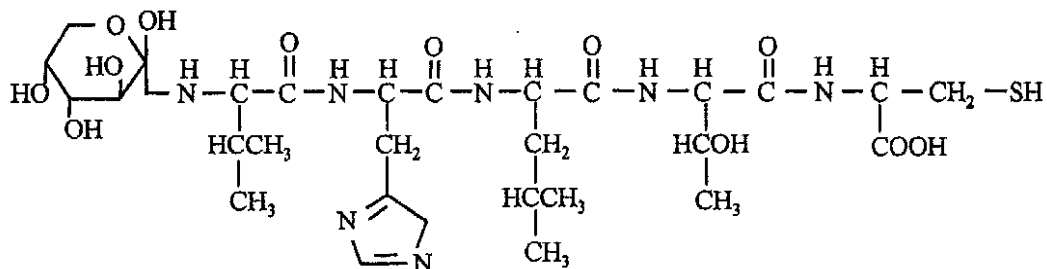
【請求項 6】

前記光および前記散乱光の波長が 200 ~ 900 nm である請求項 5 記載の HbA1c の免疫的測定方法。

【請求項 7】

微粒子と、前記微粒子の表面に結合した 2 分子以上の化学式：

【化 3】



で示されるフルクトシルアミノ酸とを含むフルクトシルアミノ酸標識物を用いたHbA1c免疫的定量測定装置。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糖尿病管理において有効なマーカーとなる糖化ヘモグロビン(HbA1c)の免疫的検出に有用なフルクトシルアミノ酸標識物、およびこの標識物を用いたHbA1cの免疫的測定方法および測定装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

HbA1cは血液中に存在するヘモグロビンの一種であり、糖尿病管理のマーカーとして有用である。しかし、その構造は、他のヘモグロビン(大部分はHbA0)の構造と非常に似かよっており、違いはアミノ酸鎖のN末端にフルクトースが結合しているか否かという点だけである。したがって、HbA1cの測定には、このわずかな違いを見分ける技術が必要である。 20

【0003】

現在、HbA1cを測定する方法の主流はHPLC法であるが、操作の容易性および特異性の観点からみると、抗原抗体反応を利用した免疫的測定の方が有利である。そして、HbA1cを免疫的に測定する方法としては、抗HbA1c抗体とこれに結合する酵素標識2次抗体とを用いた酵素免疫測定法が主流である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、上述の酵素免疫測定法においては、免疫的測定の特徴である特異性は発揮させることができるものの、操作が煩雑で、測定が完了するまでに3時間程度の時間を要するため、操作の容易性および測定時間に問題がある。そこで、本発明は、操作が用意で測定時間の短いHbA1cの免疫的定量測定を可能とすることを目的とする。 30

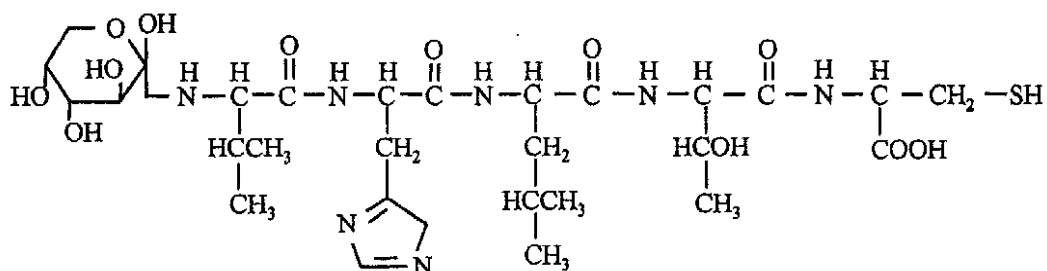
【0005】

【課題を解決するための手段】

上述のような問題を解決すべく、本発明は、微粒子と、前記微粒子の表面に結合した2分子以上の化学式：

【0006】

【化 4】



【0007】

40

50

で示されるフルクトシルアミノ酸とを含むフルクトシルアミノ酸標識物を提供する。

【0008】

前記フルクトシルアミノ酸標識物においては、前記微粒子の粒径が1nm以上10μm以下であるのが好ましい。

また、前記微粒子が、ラテックスまたは金属コロイドであるのが好ましい。

また、前記微粒子は、ポリペプチドまたはタンパク質でもよい。

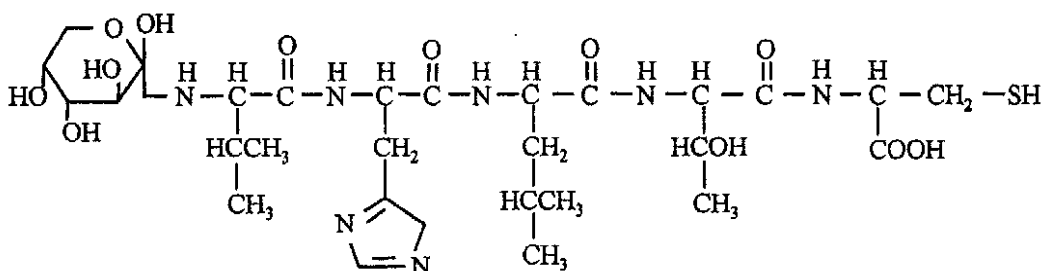
【0009】

さらに、本発明は、前記フルクトシルアミノ酸標識物を用いたHbA1cの免疫的測定方法も提供する。この方法は、

(a) 微粒子と、前記微粒子の表面に結合した2分子以上の化学式：

【0010】

【化5】



10

20

【0011】

で示されるフルクトシルアミノ酸とを含むフルクトシルアミノ酸標識物を含む第1の懸濁液を調製する工程、

(b) 前記第1の懸濁液に、HbA1cに特異的に結合する抗HbA1c抗体を添加して第2の懸濁液を調製する工程、

(c) 前記第1の懸濁液に、HbA1cを含む試料液および前記HbA1cに特異的に結合する抗HbA1c抗体を添加して第3の懸濁液を調製する工程、

(d) 前記第2の懸濁液および前記第3の懸濁液に光を照射し、前記第2の懸濁液からの散乱光の強度と前記第3の懸濁液からの散乱光の強度とを比較し、前記試料液に含まれるHbA1cの濃度を定量的に測定する工程を含むことを特徴とする。

30

【0012】

この免疫的測定方法においては、前記光および前記散乱光の波長が200~900nmであるのが好ましい。

【0013】

また、本発明は、前記フルクトシルアミノ酸標識物を用いたHbA1c免疫的定量測定装置にも関する。かかる免疫測定装置は、免疫反応を行わせる反応セルと、波長200nm~800nmの光を照射し得る光源と、前記波長の散乱光を検出し得る検出器と、検出した散乱光の強度をHbA1c濃度に変換する解析装置とで構成される。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、抗HbA1c抗体が結合するHbA1c上の特徴的部位(エピトープ)と同じ構造を有する化合物である上記化学式で示されるフルクトシルアミノ酸を、少なくとも2分子以上、微粒子の表面上に結合させて得られるフルクトシルアミノ酸標識物、これを用いたHbA1cの免疫的測定方法、および測定装置を提供する。

40

【0015】

本発明に係るフルクトシルアミノ酸標識物は、微粒子の表面上に上記化学式で示されるフルクトシルアミノ酸を少なくとも2分子以上結合させたものである。上限は特にないが、50分子程度であればよい。本発明における微粒子としては、種々のものを用いることができるが、その粒径がおよそ100μm以下の微粒子であるのが好ましい。例えば、ラテックス粒子、金属コロイド、およびタンパク質などが挙げられる。なかでも、粒径が0.

50

1 μm以下の粒子は、懸濁液中での分布が均一になりやすく、散乱光も測定しやすいため好ましい。

【0016】

また、本発明に係るHbA1cの免疫的測定方法および測定装置は、上記フルクトシルアミノ酸標識物と抗HbA1c抗体とが結合・架橋した際に凝集するという現象を利用し、その凝集度に応じて変化する照射光の散乱光強度を測定し、その測定値からHbA1cの濃度を免疫的に測定するものである。

【0017】

フルクトシルアミノ酸標識物と抗HbA1c抗体とは、本来結合して凝集するが、同じ系内にHbA1cが存在すると、抗体は抗原であるHbA1cと優先的に結合し、微粒子標識物と結合する抗体の量、すなわち凝集に關与する抗体の量が減少し、その結果、凝集度が低下する。したがって、これによる散乱光の強度も減少するため、この散乱光強度の減少度からHbA1cの濃度を測定することができる。

10

【0018】

ここで、測定に用いる光の波長は、200nm～900nmであるのが望ましい。なかでも、600nm～900nmの長波長領域の光は、混在する不純物の影響を受けにくいいため好ましい。

【0019】

また、本発明は、(a)微粒子と、前記微粒子の表面に結合した2分子以上の上記化学式で示されるフルクトシルアミノ酸とを含むフルクトシルアミノ酸標識物を含む第1の懸濁液を調製する工程、(b)前記第1の懸濁液に、HbA1cに特異的に結合する抗HbA1c抗体を添加して第2の懸濁液を調製する工程、(c)前記第1の懸濁液に、HbA1cを含む試料液および前記HbA1cに特異的に結合する抗HbA1c抗体を添加して第3の懸濁液を調製する工程、(d)前記第2の懸濁液および前記第3の懸濁液に光を照射し、前記第2の懸濁液からの散乱光の強度と前記第3の懸濁液からの散乱光の強度とを比較し、前記試料液に含まれるHbA1cの濃度を定量的に測定する工程を含むことを特徴とするHbA1cの免疫的測定方法をも提供する。

20

【0020】

前記光および前記散乱光の波長が200～900nmであるのが好ましい。

また、本発明は、前記フルクトシルアミノ酸標識物を用いたHbA1c免疫的定量測定装置にも関する。かかる免疫測定装置は、免疫反応を行わせる反応セルと、波長200nm～800nmの光を照射し得る光源と、前記波長の散乱光を検出し得る検出器と、検出した散乱光の強度をHbA1c濃度に変換する解析装置とで構成される。

30

【0021】

【実施例】

以下に、具体的な実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらのみ限定されるものではない。

【0022】

《実施例1：フルクトシルアミノ酸標識物の作製》

本実施例では、微粒子としてタンパク質であるチキン グロブリン(CGG)を用い、測定に使用した光の波長は700nmとした。

40

【0023】

(1)フルクトシルアミノ酸の製造

500mgの合成ペプチド(Val-His-Leu-Thr-Cys)と270mgのグルコースとを、25mlのピリジン/酢酸=1/1混合溶媒中に溶解し、遮光下室温で5日間攪拌した。真空下で溶媒を除去した後、残さを25mlの水に溶解して再び真空下で濃縮した。これを少量の水に溶解し、強酸性イオン交換樹脂であるDowex 50WX 8カラム(シグマ社製、直径3.5cm×長さ25cm)にチャージした。約2リットルの水で洗浄してグルコースを除去した後、1Nアンモニア水で生成物を溶出し、これを凍結乾燥した。

50

【0024】

これを0.1Mのトリエチルアンモニウム緩衝液(pH=8.2)に溶解し、アフィゲル601カラム(ファルマシア製、直径1.7cm×長さ20cm)にチャージした。1リットルの0.1Mのトリエチルアンモニウム緩衝液(pH=8.2)、ついで1リットルの水で洗浄し、最後に0.1%のギ酸で溶出して、これを凍結乾燥した。50mgのフルクトシルアミノ酸(フルクトース-Val-His-Leu-Thr-Cys)が得られた。

【0025】

(2)CGGのピリジルジチオプロピオニル化(CGGSPPDPの作製)

まず、微粒子であるCGGの前処理として、これをピリジルジチオプロピオニル化し、CGGSPPDPを作製した。 10

200mg(1.33×10^{-3} mmol)のCGGを、15mlのリン酸バッファーサリン(PBS)に溶解し、得られた溶液に、攪拌しながら1mlのSPDP/エタノール溶液(SPDP=20.8mg、0.0667mmol、50等量)を滴下した。その後、室温で30分間攪拌した。セファデックスG25Mカラム(ファルマシア社製、直径2cm×長さ80cm)でゲル濾過し、48mlのCGGSPPDP/PBS溶液を得た。

【0026】

CGG1分子あたりのSPDPの結合数を次のように決定した。得られたCGGSPPDPのPBS溶液のうち0.5mlを用い、280nmにおける吸光度を測定した。吸光度は、8.07であった。 20

【0027】

前記CGGSPPDP/PBS溶液に、100mMのジチオスレイトール(DTT)水溶液25 μ lを加え、5分間放置した後、343nmにおける吸光度を測定した。吸光度は、6.61であった。

【0028】

DTT還元によって放出されたピリジン-2-チオンの343nmにおける分子吸光係数を 8.08×10^3 として、ピリジン-2-チオンの濃度[ピリジン-2-チオン]は、
[ピリジン-2-チオン] = $6.61 / (8.08 \times 10^3) = 8.18 \times 10^{-4}$ (M)

のように求められた。この濃度は、CGGに導入されたSPDPの濃度に等しかった。 30

【0029】

また、SPDPの2-ピリジルジスルフィド基が280nmにおける吸光度に寄与するため、CGG濃度の計算には次のような補正を行った。CGGに起因する280nmにおける吸光度(A280, CGG)は、

(A280, CGG) = $8.07 - (8.18 \times 10^{-4} \times 5.1 \times 10^3) = 3.90$
のように求めることができた。ただし、2-ピリジルジスルフィド基の280nmにおける分子吸光係数を 5.1×10^3 とした。

【0030】

したがって、CGGの濃度[CGG]、およびCGG1分子あたりに導入されたSPDPの分子数[SPDP]/[CGG]は、 40

[CGG] = $3.90 / (1.99 \times 10^5) = 1.96 \times 10^{-5}$ (M)

[SPDP]/[CGG] = $8.18 \times 10^{-4} / (1.96 \times 10^{-5}) = 41.8$

のように求めることができた。ただし、CGGの280nmにおけるモル吸光係数を 1.99×10^5 とした。

【0031】

(3)フルクトシルアミノ酸のCGG標識物の作製

上記(2)で得た微粒子であるCGGSPPDPにフルクトシルアミノ酸を結合させた。13.6mlのCGGSPPDP/PBS溶液に、12.3mg(1.67×10^{-2} mmol、1.5等量対SPDP)のフルクトシルアミノ酸を加え、室温で3時間攪拌した後、343nmにおける吸光度(A343)を測定した。A343 = 5.91であった。 50

得られた上清をセファデックス G 25 カラム (ファルマシア社製、直径 2 cm × 長さ 80 cm) でゲル濾過し、22 ml のフルクトシルアミノ酸の C G G 標識物を得た。

【0032】

C G G 1 分子当たりのフルクトシルアミノ酸の結合数を次のように決定した。反応後の A 3 4 3 が 5 . 9 1 であることより、放出されたピリジン - 2 - チオンの 3 4 3 nm における分子吸光係数を $8 . 0 8 \times 1 0^3$ とし、その濃度 [ピリジン - 2 - チオン] を、
 $[ピリジン - 2 - チオン] = 5 . 9 1 / (8 . 0 8 \times 1 0^3) = 7 . 3 1 \times 1 0^{-4} (M)$

のように求めた。

【0033】

この濃度は、C G G に導入されたフルクトシルアミノ酸の濃度に等しかった。C G G の濃度は $1 . 9 6 \times 1 0^{-5} M$ であったので、C G G 1 分子当たりに導入されたフルクトシルアミノ酸の分子数 [フルクトシルアミノ酸] / [C G G] は、
 $[フルクトシルアミノ酸] / [C G G] = 7 . 3 1 \times 1 0^{-4} / 1 . 9 6 \times 1 0^{-5} = 3 7 . 3$

のように求めることができた。

【0034】

《実施例 2 : フルクトシルアミノ酸標識物を用いた H b A 1 c の測定》

M O P S 緩衝液 (最終体積 2 ml) に抗 H b A 1 c 抗体 (最終濃度 $5 . 7 5 \times 1 0^{-6} M$) を加え、これに実施例 1 で作製したフルクトシルアミノ酸標識物 (最終濃度 $5 . 6 2 \times 1 0^{-7} M$) を添加して懸濁液を得、5 分間放置した後、700 nm の光を照射してその散乱光強度を測定した。散乱光強度は 485 . 9 であった。

【0035】

次に、M O P S 緩衝液 (最終体積 2 ml) に抗 H b A 1 c 抗体 (最終濃度 $5 . 7 5 \times 1 0^{-6} M$) と H b A 1 c (最終濃度 $1 0^{-7} M$) とを加え、これに実施例 1 で作製したフルクトシルアミノ酸標識物 (最終濃度 $5 . 6 2 \times 1 0^{-7} M$) を添加して懸濁液を得、5 分間放置した後、700 nm の光を照射してその散乱光強度を測定した。散乱光強度は 489 . 1 であった。

【0036】

以降、他の条件は同じにして、H b A 1 c の最終濃度がそれぞれ、 $1 0^{-6} M$ 、 $1 0^{-5} M$ 、 $8 \times 1 0^{-4} M$ 、 $6 \times 1 0^{-4} M$ 、 $4 \times 1 0^{-4} M$ 、 $2 \times 1 0^{-4} M$ 、および $1 0^{-4} M$ の場合について同様に散乱光強度の測定を行った。散乱光強度はそれぞれ、453 . 3、443 . 5、280 . 4、68 . 8、39 . 3、24 . 6、11 . 3 であった。結果を図 1 に示した。図 1 に示すように、H b A 1 c の濃度が高くなるにしたがって凝集反応に対する障害が起こり、散乱光の強度が低下することを確認できた。

【0037】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明に係るフルクトシルアミノ酸標識物は、抗 H b A 1 c 抗体が結合する H b A 1 c 上の特徴的部位 (エピトープ) の構造を有するため、抗 H b A 1 c 抗体と弱く結合することができ、H b A 1 c 測定の際の有用な擬似抗原となる。また、本発明の H b A 1 c の測定方法を用いれば、免疫的測定の特徴である特異性を活かしつつ、操作の容易性に加え、迅速性をも発揮できる効果がある。これにより、より簡単、迅速に H b A 1 c を測定することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 H b A 1 c 濃度と散乱光強度との関係を示す図である。

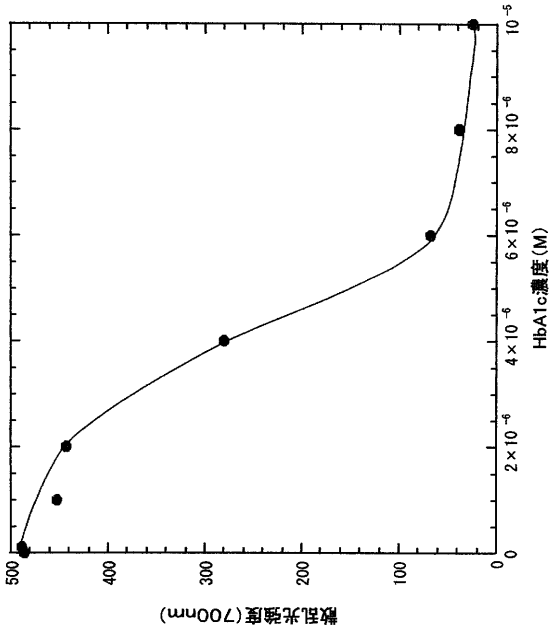
10

20

30

40

【 図 1 】



专利名称(译)	果糖基氨基酸标记的产物和使用其的HbA1c的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2005024328A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003188119	申请日	2003-06-30
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	重藤修行		
发明人	重藤 修行		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545		
FI分类号	G01N33/532.Z G01N33/53.K G01N33/543.581.D G01N33/545.B		
代理人(译)	石井一夫 川崎慎一		
其他公开文献	JP4196376B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：解决其中特异性是免疫测定的特征的问题是在酶免疫测定中开发的，这是HbA1c的常规免疫测定，但由于操作复杂并且需要约3小时才能完成免疫测定，所以它是这不仅有操作，还可缩短测量时间。解决方案：通过将具有HbA1c的特征区域（表位）结构的至少两种果糖基氨基酸结合到细颗粒的表面上，获得该果糖硅基酸标记的物质，并且还获得了使用它的HbA1c的免疫测定。之

