

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4196376号
(P4196376)

(45) 発行日 平成20年12月17日(2008.12.17)

(24) 登録日 平成20年10月10日(2008.10.10)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 8 1 D
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 K
GO 1 N 33/545 (2006.01) GO 1 N 33/545 B

請求項の数 2 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-188119 (P2003-188119)	(73) 特許権者	000005821 パナソニック株式会社 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
(65) 公開番号	特開2005-24328 (P2005-24328A)	(74) 代理人	100117972 弁理士 河崎 眞一
(43) 公開日	平成17年1月27日(2005.1.27)	(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
審査請求日	平成18年6月8日(2006.6.8)	審査官	海野 佳子

最終頁に続く

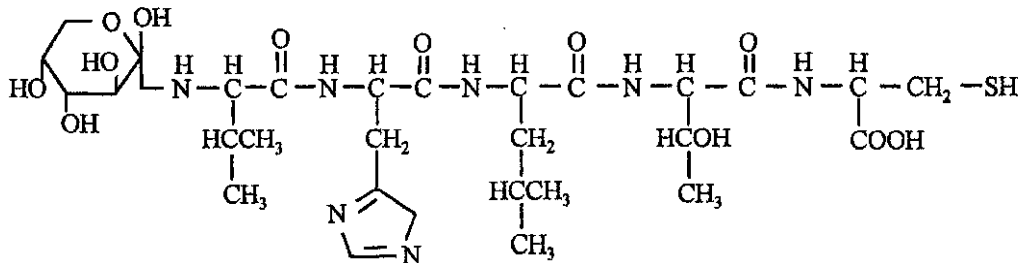
(54) 【発明の名称】 フルクトシルアミノ酸標識物を用いたHbA1cの免疫的測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(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】



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、および

(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

20

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 H b A 1 c の濃度を定量的に測定する工程

を含み、

前記微粒子が、チキン - グロブリンであることを特徴とする H b A 1 c の免疫的測定方法。

【請求項 2】

前記光および前記散乱光の波長が 200 ~ 900 nm である請求項 1 記載の H b A 1 c の免疫的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【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 (H b A 1 c) の免疫的検出に有用なフルクトシルアミノ酸標識物を用いた H b A 1 c の免疫的測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

H b A 1 c 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 H b A 0) 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、H b A 1 c 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、H b A 1 c を測定する方法の主流は H P L C 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、H b A 1 c を免疫的に測定する方法としては、抗 H b A 1 c 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 H b A 1 c の免疫的定量測定を可能とすることを目的とする。

30

【0009】

【課題を解決するための手段】

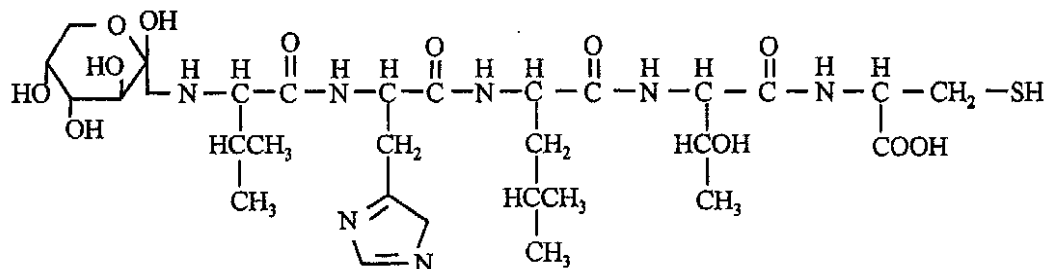
本発明は、フルクトシルアミノ酸標識物を用いた H b A 1 c の免疫的測定方法を提供する。この方法は、

(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】

40



【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、

50

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

(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 H b A 1 c の濃度を定量的に測定する工程を含み、前記微粒子が、チキン - グロブリンであることを特徴とする。

【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。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、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）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を用いた H b A 1 c の免疫的測定方法を提供する。

【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、チキン - グロブリンを用いることができるが、その粒径がおよそ100μm以下、好ましくは1nm以上、10μm以下の微粒子であるのが好ましい。なかでも、粒径が0.1μm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 H b A 1 c の免疫的測定方法は、上記フルクトシルアミノ酸標識物と抗 H b A 1 c 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 H b A 1 c 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 H b A 1 c 抗体とは、本来結合して凝集するが、同じ系内に H b A 1 c が存在すると、抗体は抗原である H b A 1 c と優先的に結合し、微粒子標識物と結合する抗体の量、すなわち凝集に関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 H b A 1 c の濃度を測定することができる。

【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】

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、H b A 1 c に特異的に結合する抗 H b A 1 c 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、H b A 1 c を含む試料液および前記 H b A 1 c に特異的に結合する抗 H b A 1 c 抗体を添加して第3の懸濁液を調製する工程、および(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 H b A 1 c の濃度を定量的に測定する工程を含み、前記微粒子が、チキン - グロブリンであることを特徴とする H b A 1 c の免疫的測定方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

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。

【 0 0 2 1 】

【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
に限定されるものではない。

【 0 0 2 2 】

【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 10
、測定に使用した光の波長は700nmとした。

【 0 0 2 3 】

(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、2
5ml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 50WX8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。

【 0 0 2 4 】

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。

【 0 0 2 5 】

(2) CGGのピリジルジチオプロピオニル化 (CGG-SPDP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、C
GG-SPDPを作製した。

200mg (1.33×10^{-3} mmol) のCGGを、15mlのリン酸バッファーサリ 30
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、0.0667 mmol、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2c
m×長さ80cm) でゲル濾過し、48mlのCGG-SPDP/PBS溶液を得た。

【 0 0 2 6 】

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CGG-SPD
P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。

【 0 0 2 7 】

前記CGG-SPDP/PBS溶液に、100mMのジチオスレイトール (DTT) 水 40
溶液25μl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。

【 0 0 2 8 】

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。

【 0 0 2 9 】

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 50
、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, C_{GG}) は、

$$(A_{280}, C_{GG}) = 8.07 - (8.18 \times 10^{-4} \times 5.1 \times 10^3) = 3.90$$

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 280 nm における分子吸光係数を 5.1×10^3 とした。

【0030】

したがって、C_{GG} の濃度 [C_{GG}]、および C_{GG} 1 分子当りに導入された S_{PDP} の分子数 [S_{PDP}] / [C_{GG}] は、

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

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

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

10

【0031】

(3) フルクトシルアミノ酸の C_{GG} 標識物の作製

上記(2)で得た微粒子である C_{GG} - S_{PDP} にフルクトシルアミノ酸を結合させた。13.6 ml の C_{GG} - S_{PDP} / P_BS 溶液に、12.3 mg (1.67×10^{-2} mmol、1.5 等量対 S_{PDP}) 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、343 nm における吸光度 (A₃₄₃) を測定した。A₃₄₃ = 5.91 であった。得られた上清をセファデックス G₂₅ 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_{GG} 標識物を得た。

【0032】

20

C_{GG} 1 分子当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 A₃₄₃ が 5.91 であることより、放出されたピリジン - 2 - チオンの 343 nm における分子吸光係数を 8.08×10^3 とし、その濃度 [ピリジン - 2 - チオン] を、

$$[\text{ピリジン - 2 - チオン}] = 5.91 / (8.08 \times 10^3) = 7.31 \times 10^{-4} \text{ (M)}$$

のように求めた。

【0033】

この濃度は、C_{GG} 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_{GG} の濃度は 1.96×10^{-5} M であったので、C_{GG} 1 分子当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_{GG}] は、

$$[\text{フルクトシルアミノ酸}] / [CGG] = 7.31 \times 10^{-4} / 1.96 \times 10^{-5} = 37.3$$

のように求めることができた。

30

【0034】

《フルクトシルアミノ酸標識物を用いた H_bA_{1c} の測定》

MOPS 緩衝液 (最終体積 2 ml) に抗 H_bA_{1c} 抗体 (最終濃度 5.75×10^{-6} M) を加え、これに上記で作製したフルクトシルアミノ酸標識物 (最終濃度 5.62×10^{-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、MOPS 緩衝液 (最終体積 2 ml) に抗 H_bA_{1c} 抗体 (最終濃度 5.75×10^{-6} M) と H_bA_{1c} (最終濃度 10^{-7} M) とを加え、これに上記で作製したフルクトシルアミノ酸標識物 (最終濃度 5.62×10^{-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。

40

【0036】

以降、他の条件は同じにして、H_bA_{1c} の最終濃度がそれぞれ、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 8×10^{-4} M、 6×10^{-4} M、 4×10^{-4} M、 2×10^{-4} M、および 10^{-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_bA_{1c} 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。

50

【 0 0 3 7 】

【 発 明 の 効 果 】

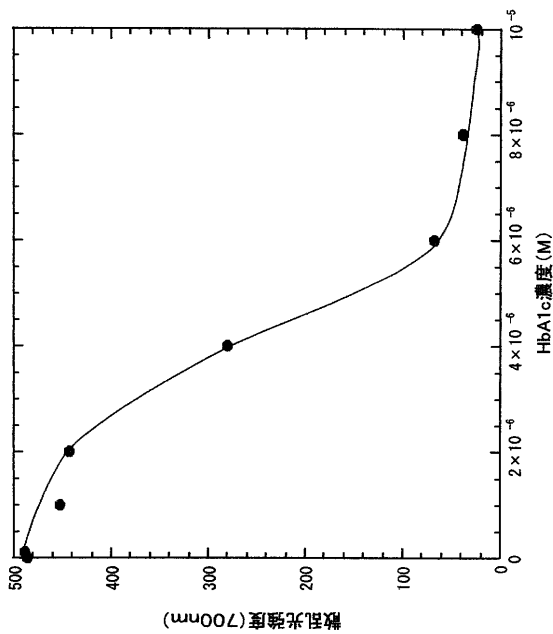
以上説明したように、本発明に係るフルクトシルアミノ酸標識物は、抗HbA1c抗体が結合するHbA1c上の特徴的部位（エピトープ）の構造を有するため、抗HbA1c抗体と弱く結合することができ、HbA1c測定の際の有用な擬似抗原となる。また、本発明のHbA1cの測定方法を用いれば、免疫的測定の特徴である特異性を活かしつつ、操作の容易性に加え、迅速性をも発揮できる効果がある。これにより、より簡単、迅速にHbA1cを測定することが可能となる。

【 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

【 図 1 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平06-225790(JP,A)
国際公開第02/088185(WO,A1)
特表2002-503882(JP,A)
特開2002-350307(JP,A)
特開平06-011510(JP,A)
特開平06-261782(JP,A)
重藤修行 他,「抗ベンゾイルメチルエクゴニン抗体の作製」,日本化学会講演予稿集,1991年 3月,Vol.61st,No.1,P.659

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/49
CAPlus(STN)
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	使用果糖基氨基酸标记物质的HbA1c免疫测定方法		
公开(公告)号	JP4196376B2	公开(公告)日	2008-12-17
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		
当前申请(专利权)人(译)	松下电器产业株式会社		
[标]发明人	重藤修行		
发明人	重藤 修行		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/532		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/53.K G01N33/545.B G01N33/532.Z		
代理人(译)	石井一夫 川崎慎一		
其他公开文献	JP2005024328A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种酶免疫测定法，它是HbA1c的常规免疫测定法，虽然它能够表现出作为免疫学测量特征的特异性，但操作复杂并且需要大约3小时才能完成测量，并且存在改善测量时间的问题。解决方案：该果糖基氨基酸标记的物质具有至少两个或更多个果糖基氨基酸，其具有结合在微粒表面上的HbA1c的特征位点（表位）的结构，以及使用该物质的HbA1c的免疫测定方法提供。【选择图】无

