

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/112339

発行日 平成20年12月11日 (2008. 12. 11)

(43) 国際公開日 平成18年10月26日 (2006. 10. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	V
GO 1 N 33/531 (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 63 頁)

出願番号	特願2007-521210 (P2007-521210)	(71) 出願人	000005821
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/307781		松下電器産業株式会社
(22) 国際出願日	平成18年4月12日 (2006. 4. 12)		大阪府門真市大字門真1006番地
(31) 優先権主張番号	特願2005-116870 (P2005-116870)	(74) 代理人	100081813
(32) 優先日	平成17年4月14日 (2005. 4. 14)		弁理士 早瀬 憲一
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(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 正敦
			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	北脇 文久
			大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 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

(57) 【要約】

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からなる変性試薬で処理して該試料溶液中のヘモグロビン誘導体を変性させた後、該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て免疫アッセイを行い、前記試料中のヘモグロビン誘導体量を測定する。これにより、ヘモグロビン誘導体の測定を行う際、変性試薬による免疫反応への影響を最低限におさえつつ、迅速かつ確実なヘモグロビンの変性を行うことができる。

【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で処理して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誘導体の測定方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、
前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させたヘモグロビン誘導体を、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アッセイを行い検出する、
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 3】

請求項 2 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糖化ヘモグロビンであり、
前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させた糖化ヘモグロビンを、該糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を用いて免疫アッセイを行い検出する、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 4】

請求項 2 または請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、
前記試料を、前記免疫アッセイを有意に妨害しない前記非イオン性界面活性剤濃度で処理する、
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 5】

請求項 1 ないし請求項 4 のいずれかに記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、
さらに、前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程を含み、
前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出する、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 6】

請求項 5 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、糖化ヘモグロビンである、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

30

【請求項 7】

血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための試薬組成物であって、
少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む、
ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の試薬組成物において、
前記試薬組成物は、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、
ことを特徴とする試薬組成物。

40

【請求項 9】

請求項 7 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、糖化ヘモグロビンであって、
前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体をさらに含む、
ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 10】

請求項 8 または請求項 9 に記載の試薬組成物において、
前記非イオン性界面活性剤濃度は、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする試薬組成物。

50

【請求項 1 1】

血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための測定キットであって、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤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 2】

請求項 1 1 に記載の測定キットにおいて、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保持してなる、ことを特徴とする測定キット。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の測定キットにおいて、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を保持してなる、ことを特徴とする測定キット。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の測定キットにおいて、前記非イオン性界面活性剤濃度は、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度である、ことを特徴とする測定キット。

【請求項 1 5】

血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための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誘導体を、非イオン性界面活性剤と酸化剤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誘導体を検出する検出部と、から構成される、ことを特徴とする分析デバイス。

20

【請求項 1 6】

請求項 1 5 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の変性された部位に対して特異的な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に、該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アッセイを行い検出する、ことを特徴とする分析デバイス。

30

【請求項 1 7】

請求項 1 5 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糖化ヘモグロビンであり、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を担持する免疫アッセイ部を有し、前記試料中の糖化ヘモグロビンを前記試薬組成物により変性した後に、該変性された糖化ヘモグロビンを、前記抗体を用いて免疫アッセイを行い検出する、ことを特徴とする分析デバイス。

40

【請求項 1 8】

請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の分析デバイスにおいて、前記試薬組成物に含まれる前記非イオン性界面活性剤濃度は、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度である、ことを特徴とする分析デバイス。

【請求項 1 9】

請求項 1 5 ないし請求項 1 8 のいずれかに記載の分析デバイスにおいて、前記試料添加部位に連結され、前記試料に含まれるヘモグロビンを検出する検出部をさらに含み、前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出する、

50

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の分析デバイス。

【請求項 20】

請求項 19 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、糖化ヘモグロビンである、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の分析デバイス。

【請求項 21】

請求項 15 ないし請求項 18 のいずれかに記載の分析デバイスと、
該分析デバイスの検出部位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、
ことを特徴とする分析システム。

10

【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、迅速かつ確実にヘモグロビンを変性させる技術に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヘモグロビン誘導体の一つである糖化ヘモグロビンは、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。糖化ヘモグロビンはヘモグロビン A_{1c} とも呼ばれ、赤血球の中に含まれるヘモグロビンにブドウ糖が結合したものであり、ヘモグロビンに対して糖化ヘモグロビンが存在する比率で数値化される。

20

【0003】

糖化ヘモグロビンの測定方法としては、免疫反応を利用する方法がある。この免疫反応を利用した測定方法は、最初に、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だし、次にヘモグロビンが非糖化ヘモグロビンであるか糖化ヘモグロビン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、ヘモグロビタンパク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（ヘモグロビンの変性）、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、免疫学的に糖化ヘモグロビン量を測定するものである。

30

【0004】

このヘモグロビンの変性方法に関しては、従来例として、例えばリチウム塩形態の陰イオンでヘモグロビンを変性させる方法がある（特許文献 1 参照）。詳述すると、血液試料中の特定のヘモグロビン誘導体を測定する分析方法において、（a）血液試料を溶解／変性試薬で処理して赤血球を溶解し、赤血球から放出された検出可能量の上記誘導体を変性し、（b）その結果生じた混合液を、その中に存在する変性型の上記ヘモグロビン誘導体の量に関してイムノアッセイにより試験する方法であって、上記溶血／変性試薬として赤血球を溶解し上記ヘモグロビン誘導体を変性することができるリチウム塩形態の陰イオンを用い、それによって溶血及び上記ヘモグロビン誘導体の変性を、イムノアッセイ工程を有意に妨害しないリチウム塩濃度で迅速に成し遂げることを特徴とする方法である。

40

【0005】

また、別の変性方法として、チオシアン化合物でヘモグロビンを変性させる方法がある（特許文献 2 参照）。詳述すると、この方法は、血液試料中の特定のヘモグロビン誘導体の相対量を測定するための分析方法であって、（a）血液試料を、（i）試料中において 0.5 ~ 6.0 M の濃度となる、血液試料中に存在する実質的にすべてのヘモグロビンを変性しうるチオシアネート塩と、（ii）血液試料中に存在する実質的にすべてのヘモグロビンをメトヘモグロビンの形態に転化させうる酸化剤とで処理して変性血液試料を得る工程、（b）変性血液試料中のメトヘモグロビンを定量する工程、（c）イムノアッセイによって、変性血液試料中の変性形態の特定のヘモグロビン誘導体を定量する工程、及

50

び（d）上記工程（b）及び（c）から得られる試験結果を関連させることを特徴とするものである。

【0006】

さらに、別の変性方法として、イオン性界面活性剤による変性を行う方法なども挙げられる（特許文献3参照）。詳述すると、この方法は、血液試料中のヘモグロビン誘導体の含量の測定法であって、（a）血液試料を、4～37の温度で、5～9.5のpHを有するイオン性洗剤を含む溶血試薬で10分間まで処理し、そして（b）ヘモグロビン誘導体を溶血させた血液試料中で免疫学的に測定することを特徴とするものである。

【特許文献1】特開平3-51759号公報

【特許文献2】特開平1-155268号公報

【特許文献3】特開平6-11510号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

前述したように、ヘモグロビンを変性させる方法は様々であるが、各方法とも一長一短がある。例えば、前記特許文献1や特許文献2に記載される、リチウム塩やチオシアン化合物を使用する方法においては、特に最適とされるチオシアン酸リチウムをはじめ、チオシアン酸カリウムやチオシアン酸アンモニウムなどの試薬が非常に潮解性が高い性質故に、その取り扱いに注意を要する。またこれらの試薬は、乾燥形態を保持することが困難であるため、例えばデバイスに担持する場合は、湿気により劣化する試薬とは別にしなければならないなど、工法上大きな制約を受ける。

【0008】

また、前記特許文献3に記載される、イオン性界面活性剤を使用する方法では、その強力なタンパク質変性効果故に、ヘモグロビン変性処理後の免疫反応系に悪影響を与えることから、ヘモグロビン変性溶液を緩衝液などで希釈し、希釈された後のヘモグロビン溶液を免疫反応試薬と混合させるといった、多段階の操作が必要とされる。このような煩雑な測定方法は、不便であり、更には希釈バラツキによって測定値に誤差を与えることがある。さらに、希釈操作が必要とされると、簡易な測定システムを構築することが困難になる。

【0009】

本発明はこれら従来の課題を解決するもので、ヘモグロビン誘導体量を測定する際に、変性試薬による免疫反応への影響を低減しつつ、ヘモグロビンの変性を迅速かつ確実に行える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。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記従来の課題を解決するために、本発明の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で処理して前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含むものである。

これにより、免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速にかつ確実なヘモグロビン変性効果を得ることができる。

【0011】

また、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させたヘモグロビン誘導体を、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アッセイを行い検出するものである。

これにより、ヘモグロビン誘導体を検出することができる。

【0012】

また、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させた糖化ヘモグロビンを、該糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を用いて免疫アッ

10

20

30

40

50

セイを行い検出するものである。

これにより、糖化ヘモグロビンを検出することができる。

【0013】

さらに、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、前記試料を、前記免疫アッセイを有意に妨害しない前記非イオン性界面活性剤濃度で処理するものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【0014】

また、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、さらに前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程を含み、前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出するものである。

10

これにより、試料中のヘモグロビン誘導体の存在比を得ることができる。

【0015】

さらに、前記ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンであるものである。

これにより、試料中の糖化ヘモグロビン誘導体の存在比を得ることができる。

【0016】

本発明の試薬組成物は、血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための試薬組成物であって、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含むものである。

これにより、免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速にかつ確実なヘモグロビン変性効果を得ることができる試薬を提供できる。

20

【0017】

また、本発明の試薬組成物は、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ものである。

これにより、前記試薬組成物と前記試料とを混合させるのみで、ヘモグロビン誘導体を検出することができる。

【0018】

また、本発明の試薬組成物は、前記ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンであって、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体をさらに含むものである。

これにより、前記試薬組成物と前記試料とを混合させるのみで、糖化ヘモグロビンを検出することができる。

30

【0019】

さらに、本発明の試薬組成物は、前記非イオン性界面活性剤濃度が、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度であるものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【0020】

本発明の測定キットは、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保持してなるものである。

これにより、免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速にかつ確実なヘモグロビン変性効果を得ることができる測定キットを提供できる。

40

【0021】

また、本発明の測定キットは、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保持してなるものである。

これにより、ユーザが専門的な知識を保有していなくても、簡便にヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【0022】

また、本発明の測定キットは、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を保持してなるものである。

これにより、ユーザが専門的な知識を保有していなくても、簡便に糖化ヘモグロビンの

50

測定が可能となる。

【００２３】

さらに、本発明の測定キットは、前記非イオン性界面活性剤濃度が、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度であるものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【００２４】

本発明の分析デバイスは、血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための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誘導体を、非イオン性界面活性剤と酸化剤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誘導体を検出する検出部と、から構成されるものである。

これにより、ヘモグロビンをより簡便且つ迅速に変性させることができる分析デバイスを提供できる。

【００２５】

また、本発明の分析デバイスは、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に、該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アッセイを行い検出するものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、該試料中のヘモグロビン誘導体を検出することができる。

【００２６】

また、本発明の分析デバイスは、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を担持する免疫アッセイ部を有し、前記試料中の糖化ヘモグロビンを前記試薬組成物により変性した後に、該変性された糖化ヘモグロビンを、前記抗体を用いて免疫アッセイを行い検出するものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、該試料中の糖化ヘモグロビンを検出することができる。

【００２７】

さらに、本発明の分析デバイスは、前記試薬組成物に含まれる前記非イオン性界面活性剤濃度が、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度であるものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【００２８】

また、本発明の分析デバイスは、前記試料添加部位に連結され、前記試料に含まれるヘモグロビンを検出する検出部をさらに含み、前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出するものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、ヘモグロビン誘導体の存在比を得ることができる。

【００２９】

さらに、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであるものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、糖化ヘモグロビンの存在比を得ることができる。

【００３０】

本発明の分析システムは、請求項１５ないし請求項１８のいずれかに記載の分析デバイスと、該分析デバイスの検出部位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ものである。

これにより、ユーザの手技の影響を受けにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【発明の効果】

【 0 0 3 1 】

本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法によれば、非イオン性界面活性剤と酸化剤とによって、血液成分を含む試料中のヘモグロビンの変性処理を行うようにしたので、該変性処理を迅速且つ確実に行うことができる。

【 0 0 3 2 】

また、特に、前記非イオン性界面活性剤は、ヘモグロビン誘導体を免疫アッセイにより測定する時に、免疫アッセイへの阻害効果が少ないため、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アッセイを構築することが可能となる。

10

【 0 0 3 3 】

また、前記ヘモグロビン誘導体と同時に、前記試料中のヘモグロビンを測定するようにすれば、前記ヘモグロビンに対する前記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 0 3 4 】

本発明の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。

【 0 0 3 5 】

また、前記試薬組成物は、液体状、固体状、液体を乾燥した状態のいずれでもよいが、固体状態にあれば、より安定した状態で長期間保持することが可能となる。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の測定キットによれば、その一部に、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む試薬組成物を保持し、前記試薬組成物と前記試薬とを混合することによってヘモグロビンを変性するようにしたので、より簡便に、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。

【 0 0 3 7 】

また、前記測定キットに、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るようにしたので、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 3 8 】

本発明の分析デバイスによれば、その一部に、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを担持するようにしたので、前記ヘモグロビンの変性処理を迅速且つ確実に行える、ユーザにとって煩雑な作業を削減した装置を提供できる。

30

【 0 0 3 9 】

また、前記分析デバイスの一部に、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を担持し、前記変性処理後に前記抗体を利用して免疫アッセイを行うようにしたので、前記ヘモグロビン誘導体を検出可能な、ユーザにとって煩雑な作業を削減した装置を提供できる。

【 0 0 4 0 】

本発明の分析システムによれば、前記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と、該分析デバイス専用の測定部とから構成するようにしたので、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を行うことができる。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 1 】

【 図 1 】 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。

【 図 2 】 図 2 は、本発明の実施の形態 4 における分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図 (a) はその分解斜視図であり、図 (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である。

【 図 3 】 図 3 は、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である。

50

【図４】図４は、本発明の実施の形態４における分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図（a）は、その分解斜視図であり、図（b）～（d）は、分析デバイスにおける変性処理手順を示す図である。

【図５】図５は、本発明の実施例１における、ブタ由来ペプシンで標準液を処理することによって得られるコントロール曲線を示す図である。

【図６】図６は、本発明の実施例１における、ブタ由来ペプシンで血液検体を処理した時間と、ヘモグロビン変性率との関係を示す図である。

【図７】図７は、本発明の実施例１における、各非イオン性界面活性剤と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図８】図８は、本発明の実施例１における、各非イオン性界面活性剤と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図９】図９は、本発明の実施例１における、各非イオン性界面活性剤のＣＭＣに対する濃度比と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図１０】図１０（a）は、本発明の実施例１における、各フェリシアン化カリウム濃度と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図であり、図１０（b）は、本発明の実施例１における、ヘモグロビン量に対するフェリシアン化カリウム量の比と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図１１】図１１は、本発明の実施例１における、各非イオン性界面活性剤と、イオン性界面活性剤とが、ラテックス凝集反応に及ぼす影響を説明する図である。

【図１２】図１２は、本発明の実施例１における、糖化ヘモグロビンを変性しラテックス凝集阻止反応を行った場合の測定結果と、従来方法により得た測定結果とを比較した図である。

【図１３】図１３は、本発明の実施例２における、ヘモグロビンＢテストワコーによるヘモグロビン測定結果を説明する図である。

【図１４】図１４は、本発明の実施例２における、血液検体Ａ、Ｂのヘモグロビン濃度と、糖化ヘモグロビン濃度と、糖化ヘモグロビンの存在比とを示す図である。

【図１５】図１５は、本発明の実施例２における、東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計による血液検体Ａ、Ｂの測定結果を示す図である。

【図１６】図１６は、本発明の実施例３における分析システムで、血液検体Ａ、Ｂを測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

【００４２】

- １００，３００ 分析システム
- １０１，３０１ 分析デバイス
- １０２ 光源
- １０３ ディテクタ
- １０４ 回転基板
- １０５ モータ
- １１０，３１０ 測定部
- ２０１ 下基板
- ２０２ 接着層
- ２０３ 希釈攪拌部
- ２０４ 希釈液保持部
- ２０５ 検出部Ａ
- ２０６ 検出部Ｂ
- ２０７ 流路
- ２０８ 定量部Ａ
- ２０９ 定量部Ｂ
- ２１０ 変性試薬
- ２１１ ラテックス試薬

10

20

30

40

50

- 2 1 2 凝集試薬
- 2 1 3 上基板
- 2 1 5 検体注入口
- 2 1 6 希釈液注入口
- 3 0 2 a 上部ケース
- 3 0 2 b 下部ケース
- 3 0 3 ラテックス試薬
- 3 0 4 試薬
- 3 0 5 溶液試薬用シール
- 3 0 6 注入口
- 3 0 7 ケース用シール
- 3 0 8 光源
- 3 0 9 受光部

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

以下に、本発明のヘモグロビン変性方法の実施の形態を、詳細に説明する。

(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、ヘモグロビン誘導体の測定方法について説明する。

20

【0044】

前記ヘモグロビン(以後、「Hb」とも表記。)とは、 α 鎖と非 α 鎖(β 、 γ 、 δ 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って、そのヘモグロビンのうち、約90%がHbA($\alpha_2\beta_2$)、約3%がHbA2($\alpha_2\delta_2$)、約1%がHbF($\alpha_2\gamma_2$)である。そして、前記HbAには、 β 鎖アミノ酸末端に糖が結合していないHbA0と、糖が結合したHbA1とがあり、さらに、該HbA1の中には、HbA1a、HbA1b、HbA1c(以後、「糖化ヘモグロビン」とも表記。)があり、これらの糖が結合したHbA1をヘモグロビン誘導体と呼ぶ。

【0045】

ヘモグロビン誘導体を決めるポイントとしては、アミノ酸残基やペプチド末端が修飾された領域が存在するかどうかである。例えば、前記HbA1aは、 β 鎖N末端がリン酸化糖で修飾されており、前記HbA1bは、 β 鎖N末端がアルデヒド化されており、前記HbA1cは、 β 鎖N末端が糖化されている。

30

【0046】

このように、本実施の形態1のヘモグロビン誘導体は、前述したようなヘモグロビンの一部の領域の構造が異なるものをいうものとする。

【0047】

なお、これら以外にも、ヘモグロビン誘導体には様々な種類があり、例えばアルコールの乱用によるアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加物、尿毒症患者の血液中に存在する尿素-ヘモグロビン付加物、また、アスピリン-ヘモグロビンコンプレックスや、カルボキシメチル化ヘモグロビン等、その種類は多岐に亘る。

40

【0048】

ヘモグロビン誘導体としては、特に、ヘモグロビタンパクの反応性アミノ基と、グルコースとの非酵素反応によって生成される糖化ヘモグロビンが有用な測定項目として挙げられているが、その測定項目はこれに限定されるものではない。

【0049】

前述したように、ヘモグロビンの一部の領域の構造のみが異なっている、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

50

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。

【００５０】

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を用いて行う。

【００５１】

本実施の形態１における変性の程度については、４次構造を構成するサブユニット構造が解離する程度、３次構造を構成する疎水結合、水素結合、ファンデルワールス力、イオン結合を解離する程度、２次構造を構成する α -ヘリックスや β シートの構造を変化させる程度、あるいは、ヘモグロビンが直鎖状の構造になる程度のいずれであってもよい。

【００５２】

一般的に、タンパク質は生体内で機能性物質として存在するが、それは、タンパク質がこれらの構造から形成される精密な立体構造を保っているからである。従って、構造を変化させるということは、少なからずタンパク質の機能が変わり、その性質が変わるといえる。これには、機能が低下したことも、或いは機能が向上したことも含まれる。

【００５３】

本実施の形態１における非イオン性界面活性剤とは、電荷をもたない疎水性基と電荷をもたない親水性基とからなる化合物で、一般的には、膜タンパク質を可溶化することを目的として使用されるものであり、その性質としては、目的とするタンパク質の可溶化能力が高く、該たんぱく質を変性・失活させず、且つ免疫アッセイ等の活性測定系で妨害作用を示さないこと等が要求される。

【００５４】

このような非イオン性界面活性剤の一例としては、

N, N - Bis (3 - D - gluconamidopropyl) cholamide (以下「BIGCHAP」と表記)

N, N - Bis (3 - D - gluconamidopropyl) deoxycholamide (以下「deoxy - BIGCHAP」と表記)、

n - Decyl - β - D - maltopyranoside (以下「n - Decyl - β - D - maltoside」と表記)

n - Dodecyl - β - D - maltopyranoside (以下「n - Dodecyl - β - D - maltoside」と表記)

n - Heptyl - β - D - thioglucopyranoside (以下「n - Heptyl - β - D - thioglucoside」と表記)

n - Octanoyl - N - methylglucamide (以下「MEGA - 8」と表記)

n - Nonanoyl - N - methylglucamide (以下「MEGA - 9」と表記)

n - Decanoyl - N - methylglucamide (以下「MEGA - 10」と表記)

n - Nonyl - β - D - thiomaltopyranoside (以下「n - Nonyl - β - D - thiomaltoside」と表記)

n - Octyl - β - D - glucopyranoside (以下「n - Octyl - β - D - glucoside」と表記)

n - Octyl - β - D - maltopyranoside (以下「n - Octyl - β - D - maltoside」と表記)

n - Octyl - β - D - thioglucopyranoside (以下「n - Octyl - β - D - thioglucoside」と表記)

β - D - Fructopyranosyl - α - D - glucopyranoside monodecanoate (以下「Sucrose monocaprato」と表記)

記)

β - D - Fructopyranosyl - α - D - glucopyranoside monododecanoate (以下「Sucrose monolaurate」と表記)

Sucrose monocholate

などが挙げられる。

【0055】

このような膜タンパク質を可溶化する非イオン性界面活性剤には、特に、該たんぱく質を変性・失活させないという特徴があり、いずれも、タンパク質に対する変性効果は少ない。しかし、前述したような特徴を持つ非イオン性界面活性剤に、さらに酸化剤を組み合わせ、且つ該組み合わせた試薬それぞれについて、適切な濃度を選択することにより、ヘモグロビンを積極的に変性させることができることを見出した(後述の実施例1(d)参照)。したがって、本実施の形態1では、血液検体を、迅速且つ確実、さらに効果的に変性させることができる。

10

【0056】

本実施の形態1における変性試薬が効果的にヘモグロビンを変性させうる条件は、該非イオン性界面活性剤の種類によって異なる。これは、非イオン性界面活性剤の臨界ミセル濃度(以下「CMC」と表記)によるものであり、ヘモグロビンは、酸化剤の存在下、少なくともCMC以上、より好適には、CMCの約2倍以上の濃度で効果的に変性する(後述の実施例1(e)参照)。

20

【0057】

例えば、Sucrose monolaurateのCMCが0.02%の場合、ヘモグロビンは、0.05%の濃度で変性可能であるが、Sucrose monocaprinateのCMCが0.13%の場合は、ヘモグロビンは0.25%以上の濃度が必要である。

【0058】

また、前記酸化剤の濃度については、全てのヘモグロビンを酸化するだけの濃度が必要で、例えば500倍に希釈した血液中のヘモグロビンを変性させる場合、0.1%以上のフェリシアン化カリウムが必要である(後述の実施例1(f)参照)。

【0059】

このように、酸化剤で処理することで変性効果が向上するのは、まず酸化剤により、ヘモグロビンがメト化され、それにより、非イオン性界面活性剤による変性効果が受けやすくなったためと考えられる。

30

【0060】

酸化剤としては、ヘモグロビンをメトヘモグロビンの形態に変化させうるだけの電荷を保有する物質から選択されることが可能であり、その一例としては、一般的に使用される、 $K_3Fe(CN)_6$ (フェリシアン化カリウム)の他、 KIO_3 、 $KClO_3$ 、 K_2CrO_4 、 $NaNO_2$ 、 $K_3Co(NO_2)_6$ などが挙げられるが、ヘモグロビンの酸化作用があれば、これらに限定しない。

【0061】

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酸化剤を含む非イオン性界面活性剤溶液を調整して、ヘモグロビン誘導体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酸化剤を含む非イオン性界面活性剤溶液に対して、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)効果も兼ねている必要がある。

40

【0062】

さらに、非イオン性界面活性剤で処理する方法には、酸化剤と非イオン性界面活性剤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

50

ピ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。

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。

【 0 0 6 3 】

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で処理して、試料中のヘモグロビン誘導体を変性させた後、該変性されたヘモグロビン誘導体を用いて試料中のヘモグロビン誘導体の測定を行う。なお、本実施の形態 1 において、ヘモグロビン誘導体の測定方法とは、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ることによる免疫アッセイ、もしくはグルコースのシス・ジオールと親和性をもつホウ酸アフィニティを用いる方法等がある。

10

【 0 0 6 4 】

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及び酸化剤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アッセイを行えることにある。すなわち、本実施の形態 1 では、ヘモグロビンの変性工程において、非イオン性界面活性剤を用いることにより、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。

20

【 0 0 6 5 】

本実施の形態 1 における免疫アッセイとは、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。

【 0 0 6 6 】

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、糖化ヘモグロビンであり、その測定方法としては、糖化ヘモグロビンの変性された部位、すなわち変性により構造外部に露出される糖化ヘモグロビンの糖化部位、に対して特異的な抗体を利用した免疫アッセイが用いられる。前記糖化ヘモグロビンとは、HbA1c 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。具体的には、HbA1c を、非イオン性界面活性剤及び酸化剤と作用させて変性させた後に、該 HbA1c 特有のβ鎖N末端のアミノ酸が糖化された糖化部位に対して特異的な抗体を用いて、免疫アッセイを行う。

30

【 0 0 6 7 】

そして一般的に、このようなヘモグロビン誘導体は、臨床検査の分野では、ヘモグロビン量に対する比で求められるため、ヘモグロビン誘導体の測定方法には、試料に含まれるヘモグロビン量を測定する工程と、該試料に含まれるヘモグロビン誘導体量を測定する工程と、該測定したヘモグロビン量に対するヘモグロビン誘導体量の比を算出する工程とを含む。

40

【 0 0 6 8 】

この試料に含まれるヘモグロビン量を測定する工程は、現在、臨床検査で用いられるヘモグロビン定量法でよく、例えば、シアンメトヘモグロビン法、もしくは、SLS-ヘモグロビン法その他、ヘモグロビンの415nmの吸収を測定する方法がある。また、これは、ヘモグロビンに対する抗体を用いた免疫アッセイであってもよい。

【 0 0 6 9 】

また、この工程で測定されるヘモグロビン量は、全ての赤血球を完全に溶血することによって得られる、試料中に含まれる全ヘモグロビン量ではなく、一部の赤血球を溶血させた部分ヘモグロビン量であってもよい。ヘモグロビン誘導体は、前述したように、ヘモグ

50

ロビン量に対する比で算出されるからである。

【 0 0 7 0 】

さらに、前記ヘモグロビン誘導体が H b A 1 c である場合に限っていえば、I F C C (国際臨床化学連合) レファレンス法で使用される算出法を用いてもよい。即ち、H b A 0 と H b A 1 c との和に対する H b A 1 c の比率で算出される方法である。以下、I F C C レファレンス法について詳述すると、まず、血液試料を生理食塩水で洗浄後、血球を遠心分離で得て、37 で4時間インキュベートし、不安定型 H b A 1 c を除去する。次に、ヘモグロビン濃度を 6 g / d L に調整し、エンドプロテアーゼと酢酸アンモニウム緩衝液 (p H 4 . 0) にて、37 で18時間処理する。この溶液を H P L C に注入し、糖化6鎖ペプチド及び6鎖ペプチドを得て、エレクトロスプレーイオン化法によりピーク面積を求めるものである。

10

【 0 0 7 1 】

このように、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で処理して、ヘモグロビンを変性させるようにすれば、安全性を確保しつつ、ヘモグロビンの変性を迅速かつ確実に行うことができる。

【 0 0 7 2 】

ところで、ヘモグロビンを変性するために、従来のように、酵素やイオン性界面活性剤等の試薬を用いると、その強力なタンパク質変性効果故に、抗体に対する影響も大きく、特に濃度が高いほど抗体活性を低下させる傾向があることから、安定な免疫アッセイ系を構築することはできなかった。このため、従来では、変性処理が終了後に、該ヘモグロビン誘導体溶液を、免疫アッセイを有意に妨害しない濃度にまで希釈する処理が必要であった。

20

【 0 0 7 3 】

しかし、本実施の形態1で変性処理に使用する非イオン性界面活性剤は、免疫測定への影響が小さいため(後述の実施例1 (g) 参照)、ヘモグロビン誘導体は変性させるが、免疫アッセイに使用する抗体は有意に変性させないようにすることができ、この結果、一つの測定系内に、ヘモグロビン誘導体と抗体と非イオン性界面活性剤とを共存させることが可能となる。このため、本実施の形態1では、希釈操作を必要としない1ステップ測定が実現でき、操作性をはるかに向上させることが可能となる。

【 0 0 7 4 】

そして前述した15種類の非イオン性界面活性剤のうち、特に、より免疫反応に対する影響は小さいものとして、

n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e
M E G A - 1 0
n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e
S u c r o s e m o n o c a p r a t e
S u c r o s e m o n o l a u r a t e

などが挙げられる(実施例1 (g) 参照)。

【 0 0 7 5 】

これら5種類の非イオン性界面活性剤は、特に、ヘモグロビンの変性を十分行うことが可能な濃度であっても、免疫反応に対する影響は小さく、濃度が変化しても免疫反応への影響が一定であるので、非常に安定な免疫測定系を構築することが可能である。

40

【 0 0 7 6 】

もちろん、変性処理に、前記5種類の非イオン性界面活性剤以外の非イオン性界面活性剤を使用しても、従来使用していたイオン性界面活性剤等と比較すると、はるかに免疫測定系への影響は少ないため、安定な免疫測定系を構築することができる(後述の実施例1 (h) 参照)。

【 0 0 7 7 】

以上のように、本実施の形態1の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で処理し、前記試料中のヘモグロビンを変

50

性させる工程を含むようにしたので、迅速且つ確実に変性させることができる。また、前記非イオン性界面活性剤は、免疫アッセイへの阻害効果が少ないため、変性処理後に免疫アッセイ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。

【 0 0 7 8 】

さらに、本実施の形態 1 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で処理する際、使用する非イオン性界面活性剤の濃度を、その臨界ミセル濃度以上、より好適には、CMC の約 2 倍以上の濃度にするようにしたので、ヘモグロビンの変性効果をより向上させることができる。

【 0 0 7 9 】

(実施の形態 2)

以下、本実施の形態 2 では、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む、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説明する。

【 0 0 8 0 】

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を含む試薬組成物は、簡易に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。

【 0 0 8 1 】

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。

【 0 0 8 2 】

なお、乾燥させた試薬組成物は、一般的に溶液状態のものよりも保存性が良く、長期の保存が可能である。

【 0 0 8 3 】

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。

【 0 0 8 4 】

さらに、前記試薬組成物にタンパク質が含まれる場合は、その安定性を高めるために、該試薬組成物に糖を加えることが有効であり、また、免疫反応を促進させるために、該試薬組成物にポリエチレングリコールなどの免疫反応促進剤を含有させることも可能である。

【 0 0 8 5 】

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。

【 0 0 8 6 】

また、本実施の形態 2 の場合、免疫測定への影響がかなり小さい非イオン性界面活性剤を用いているため、免疫アッセイに用いる抗体と非イオン性界面活性剤とを一つの系の中で共存させる、すなわち、試薬組成物の中に前記抗体を含むようにしてもよい。

【 0 0 8 7 】

前記試薬組成物に抗体を含める場合の試薬組成物の作製工法としては、風乾、熱乾燥であっても十分安定性は確保できるが、真空凍結乾燥を使用する方法が最も望ましく、該試薬組成物を安定に保つことができる。特に、抗体はタンパク質であるので、糖を付加することが試薬組成物の安定性の向上につながる。

【 0 0 8 8 】

以上のように、本実施の形態２のヘモグロビン誘導体を測定するための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。

【００８９】

また、前記試薬組成物は、液体状、固体状、液体を乾燥した状態のいずれでもよいが、特に、固体状態にあれば、より安定した状態で長期間保持することが可能となる。

【００９０】

さらに、前記試薬組成物が、前記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すれば、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るため、ユーザの操作性を向上できる。

10

【００９１】

（実施の形態３）

本実施の形態３では、少なくとも非イオン性界面活性剤及び酸化剤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誘導体を測定するための測定キットについて説明する。

【００９２】

測定キットとは、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誘導体を測定することができるようにしたものである。

20

【００９３】

測定キットでは、ヘモグロビン誘導体の変性、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と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を含む試薬であり、これによってヘモグロビン誘導体の変性を迅速且つ確実に行うことができる。

【００９４】

30

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及び酸化剤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できるようにしたものである。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アッセイを行い測定する免疫測定反応であれば、上記に限定しない。

40

【００９５】

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。

【００９６】

さらに、前記測定キットに、試料中のヘモグロビンを測定可能な試薬を容器に封入し、付加するようにしてもよい。このようにすれば、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。存在比の算出は、特に糖化ヘモグロビンを測定する場合に有用である。

。

【００９７】

50

ヘモグロビンを測定する方法としては、ヘモグロビンそのものの吸収を利用して、415 nm近傍のピーク波長を測定するか、あるいは540 nm近傍の波長を測定するシアンメトヘモグロビン法とSLS-ヘモグロビン法その他、ラテックス凝集法などが例として挙げられる。

【0098】

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て備えているようにしたので、あらかじめ定められた手順にのっとり、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量を測定することが可能であり、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誘導体の測定を行うことができる。より好適には、前記測定キットに、さらに試料中のヘモグロビン濃度を測定可能な試薬も付加しておけば、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でき、特に、糖化ヘモグロビンを測定する場合に有用である。

【0099】

(実施の形態4)

本実施の形態4では、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によって前記試料中のヘモグロビン誘導体を変性させる変性部と、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とから構成される、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説明する。

【0100】

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誘導体の測定が可能となる。

【0101】

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。

【0102】

測定工程としては、まず、血液検体と、非イオン性界面活性剤及び酸化剤とを反応させる変性工程の後、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を含む。

【0103】

非イオン性界面活性剤及び酸化剤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ものであってもよい。

【0104】

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。

【0105】

また、前記ヘモグロビン誘導体濃度を算出することに加え、ヘモグロビン濃度を算出することによって、ヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比を算出することが可能である。このヘモグロビン濃度の測定は、ヘモグロビンそのものの吸収を利用して、415 nm近傍のピーク波長を測定するか、あるいは540 nm近傍の波長を測定するシアンメトヘモグロビン法やSLS-ヘモグロビン法その他、ラテックス凝集法などが例に挙げられる。

【0106】

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。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

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バー（空間）と、該チャンバ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、測定の手順や試薬容量、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 0 8 】

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。

10

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 中、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。

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（ a ）はその分解斜視図であり、図（ b ）は、試薬を添加した状態を示す図である。

【 0 1 0 9 】

分析デバイス 1 0 1 は、下基板 2 0 1 と、上基板 2 1 3 と、表裏両面に接着効果を保有する接着層 2 0 2 とからなり、これらを貼り合わせるにより形成される。前記下基板 2 0 1 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 2 0 1 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 2 0 3 と、希釈液保持部 2 0 4 と、添加されたヘモグロビンの量を検出する検出部 A 2 0 5 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 B 2 0 6 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 2 0 1 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などのプラスチック樹脂が挙げられる。

20

【 0 1 1 0 】

また、接着層 2 0 2 には、前記希釈攪拌部 2 0 3、希釈液保持部 2 0 4、検出部 A 2 0 5、検出部 B 2 0 6 のパターン形状に加えて、それぞれを接続する流路 2 0 7 のパターン形状が切り抜かれている。さらに、前記検出部 A 2 0 5、及び検出部 B 2 0 6 の手前の流路 2 0 7 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 A 2 0 5、及び検出部 B 2 0 6 へ移送する液量を定量する定量部 A 2 0 8、及び定量部 B 2 0 9 を形成するものとする。接着層 2 0 2 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 2 1 3 は、透明な樹脂基板から構成されている。

30

【 0 1 1 1 】

前記分析デバイス 1 0 1 は、前記下基板 2 0 1 と前記接着層 2 0 2 とを貼り合せた後、前記上基板 2 1 3 を貼り合わせる前に、図 2（ b ）に示すように、前記下基板 2 0 1 の希釈攪拌部 2 0 3 に、非イオン性界面活性剤と酸化剤とからなる変性試薬 2 1 0 を、また前記下基板 2 0 1 と接着層 2 0 2 で形成した定量チャンバー B 2 0 9 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 2 1 1 を、さらに前記検出部 B 2 0 6 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 2 1 2 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 2 1 3 を、前記接着層 2 0 2 の上面に貼り合わせるにより、形成される。また、前記上基板 2 1 3 と前記接着層 2 0 2 と前記下基板 2 0 1 とを貼り合わせるにより形成される、該接着層 2 0 2 に切り抜かれた流路 2 0 7 の 2 つの開口部は、それぞれ、検体注入口 2 1 5 と希釈液注入口 2 1 6 となる。

40

50

【 0 1 1 2 】

次に、前記分析システム 1 0 0 の動作について説明する。

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 1 0 1 の検体注入口 2 1 5 より血液を 1 μ L 注入すると共に、希釈液注入口 2 1 6 より、希釈液を 5 0 0 μ L 注入する。これにより、血液は検体注入口 2 1 5 内側の流路内に、また希釈液は希釈液保持部 2 0 4 に保持される。

【 0 1 1 3 】

次に、前記回転基板 1 0 4 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 1 0 1 をセットし、モータ 1 0 5 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 2 0 3 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の作用により、溶血とヘモグロビン誘導体の変性を引き起こす。

10

【 0 1 1 4 】

次に、回転基板 1 0 4 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 2 0 7 を通じて、定量部 A 2 0 8 と定量部 B 2 0 9 まで移送させる。

【 0 1 1 5 】

前記定量部 B 2 0 9 に移送された試料液は、該定量部 B 2 0 9 において、予め保持されていたラテックス試薬 2 1 1 と混合し、ラテックス試薬 2 1 1 と該試料液中のヘモグロビン誘導体とが結合する。

【 0 1 1 6 】

この後、再度前記回転基板 1 0 4 をモータ 1 0 5 により所定の回転数で一定時間回転すると、定量部 A 2 0 8 に移送された試料液は検出部 A 2 0 5 へ、一方、前記定量部 B 2 0 9 でラテックス試薬 2 1 1 と混合された試料液は検出部 B 2 0 6 へ移送される。

20

【 0 1 1 7 】

前記検出部 B 2 0 6 に担持した凝集試薬 2 1 2 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、定量部 B 2 0 6 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。

【 0 1 1 8 】

また同時に、検出部 A 2 0 5 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

【 0 1 1 9 】

前記検出部 B 2 0 6 におけるラテックス凝集阻止反応の測定は、5 5 0 n m 付近の波長で測定可能であり、前記検出部 A 2 0 5 におけるヘモグロビンの測定は、4 1 5 n m 付近の極大吸収を測定する方法であっても、5 4 0 n m の吸収を測定する方法であっても良い。

【 0 1 2 0 】

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

【 0 1 2 1 】

ここでは一例として、分析デバイス 1 0 1 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。

【 0 1 2 2 】

50

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。

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 中、光源 308、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。

図 4 は、前記分析デバイス 301 の詳細な構成を示す図であり、図 (a) はその分解斜視図、図 (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

【0123】

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 302 b と、該下部ケース 302 b 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 302 a 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 302 a と下部ケース 302 b 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。

【0124】

前記下部ケース 302 b 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 4 (b) に示されるように、非イオン性界面活性剤と酸化剤からなる試薬に、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、試薬用シール 305 にて密封されて保持されている。

20

【0125】

前記上部ケース 302 a は、前記下部ケース 302 b 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 4 (b) 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。

【0126】

次に、前記分析システム 300 の動作について説明する。

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 302 b に、非イオン性界面活性剤、酸化剤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 302 b を密閉した後、図 4 (b) に示すように、該下部ケース 302 b と、前記ラテックス試薬が担持された上部ケース 302 a 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 $0.5 \mu\text{L}$ 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 302 a の上端に担持されたラテックス試薬 303 に、前記試薬 304 がつかないように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 540 nm の吸光度を測定するようにする。

30

【0127】

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 302 b 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。

40

【0128】

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、 550 nm 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。

【0129】

以上のように、本実施の形態 4 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あわせた分析

50

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誘導体の測定を行うことができる。

【0130】

(実施例1)

以下、ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンの代表的検査項目であるHbA1cであり、非イオン性界面活性剤と共に添加する酸化剤が、フェリシアン化カリウムである場合を一例に挙げて、様々な非イオン性界面活性剤の変性効果について検証する。

【0131】

(a) 糖化ヘモグロビン標準液の作製(コントロール液の作製)

糖化ヘモグロビン値を測定する試薬類一式は、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社より市販されているコバス試薬HbA1cを使用した。

【0132】

まずラテックス凝集試薬に対する糖化ヘモグロビンの応答特性を確認する為に、キット同封の24.6 μ Mの糖化ヘモグロビン標準液に対して、 $\times 1$ 倍、 $\times 2$ 倍、 $\times 4$ 倍、 $\times 8$ 倍、 $\times 16$ 倍、 $\times 32$ 倍、 $\times 64$ 倍、 $\times 128$ 倍の希釈系列を作製した。

【0133】

(b) ラテックス凝集阻止反応による糖化ヘモグロビン濃度と吸光度変化量との関係

前記(a)において作製した各濃度の糖化ヘモグロビン標準液2 μ Lに対して、100 μ Lの100 kU/Lのブタ由来ペプシン溶液を添加(51倍希釈)した後、3分間処理した。次に、この反応液102 μ Lのうち、14 μ Lを、560 μ Lの糖化ヘモグロビンの糖化部位に特異的に結合可能なラテックス試薬溶液を入れた光路長1 cmのプラスチックセルに加え、4分間反応させた。さらに、この反応液に0.5 μ g/mLの合成多価糖化ヘモグロビン抗原112 μ Lを加え、3分後に550 nmにおける吸光度の変化量を測定した。

【0134】

図5は、横軸に糖化ヘモグロビン濃度、縦軸を吸光度の変化量としてプロットとした図である。なお、糖化ヘモグロビン濃度をモルからmg/dLにするには、ヘモグロビン分子量を64500として計算を行った。

【0135】

(c) コントロール測定法においてヘモグロビン変性に要する処理時間の確認

ブタ由来ペプシンで3分間処理する方法によって、血液中の糖化ヘモグロビン全てを変性させ、測定できているかを確認するために、血液検体に対して最長25分までの変性処理を行い、ラテックス凝集阻止反応における吸光度値を測定した。この操作は、前記(b)に記載した同じ方法で行った。

【0136】

図6は、横軸を変性の処理時間、縦軸をヘモグロビン変性率としてプロットした図である。なお、各処理時間におけるヘモグロビン変性率は、血液検体をブタ由来ペプシンで25分間処理したときに算出された糖化ヘモグロビン濃度を100%として算出した。

【0137】

図6によると、処理時間が3分以上では、算出された糖化ヘモグロビン濃度は、ほとんど変化が確認されなかったことから、3分でヘモグロビン全てが分解処理を受けていることが判明した。よって、ブタ由来ペプシンで血液を3分間処理することによって、全ての糖化ヘモグロビンが検出可能であるものとし、ヘモグロビンの変性試験のコントロール処理法とした。

【0138】

(d) 複数種類の非イオン性界面活性剤における、血液中のヘモグロビンの変性効果の確認

以下に示す、10種類の非イオン性界面活性剤について、それぞれのヘモグロビン変性効果を確認した。

n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e

10

20

30

40

50

n - D o d e c y l - β - D - m a l t o s i d e
 n - H e p t y l - β - D - t h i o g l u c o s i d e
 M E G A - 8
 M E G A - 9
 M E G A - 10
 n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e
 n - O c t y l - β - D - g l u c o s i d e
 S u c r o s e m o n o c a p r a t e
 S u c r o s e m o n o l a u r a t e

【0139】

10

変性方法は、0.1～9%までの濃度の前述した10種類の非イオン性界面活性剤と、0.25%フェリシアン化カリウム（酸化剤）とを含む水溶液100 μ Lを作製し、2 μ Lの血液検体を添加（51倍に希釈）した後、25℃にて3分間放置した。次に、反応液102 μ Lのうち14 μ Lを、糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス試薬溶液560 μ Lと4分間反応させた。その後、112 μ Lの凝集試薬と反応させ、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。

【0140】

20

変性の確認は、まずブタ由来ペプシンで処理した同じ血液検体のラテックス凝集阻止反応時における吸光度値から、血液検体中の糖化ヘモグロビン濃度を算出し（コントロール値）、次に前述した10種類の各非イオン性界面活性剤で同じ血液検体を処理した場合におけるラテックス凝集阻止反応の吸光度値から、血液中の糖化ヘモグロビン濃度を求めた。さらに、前記ペプシン処理したコントロールに対して、前記各非イオン性界面活性剤で処理した血液検体は、何%の糖化ヘモグロビンが検出されているかを求め、これを、ヘモグロビンの変性割合とした。

【0141】

図7は、横軸に非イオン性界面活性剤濃度を、縦軸に変性割合をプロットしたものを示す図である。

図7によると、非イオン性界面活性剤の種類によって変性効果が高い非イオン性界面活性剤濃度は異なるが、いずれもコントロールであるペプシン処理と同等のヘモグロビン変性効果を確認することができた。

30

【0142】

（e）非イオン性界面活性剤が血液中のヘモグロビンを効率的に変性させうる、非イオン性界面活性剤濃度の確認

以下に示す、5種類の非イオン性界面活性剤について、それぞれのヘモグロビン変性効果を確認した。

S u c r o s e m o n o c a p r a t e
 S u c r o s e m o n o l a u r a t e
 n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e
 n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e

【0143】

40

変性方法は、0.05%から0.5%までの濃度の前述した5種類の非イオン性界面活性剤と、0.25%フェリシアン化カリウム（酸化剤）とを含む水溶液1mLを作製し、2 μ Lの血液検体を添加（501倍に希釈）した後、25℃にて3分間放置した。次に、反応液1002 μ Lのうち140 μ Lを、糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス溶液560 μ Lと4分間反応させた。その後、112 μ Lの凝集試薬と反応させ、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。変性の確認は、前記d）と同様、まずブタ由来ペプシンで処理した同じ血液検体のラテックス凝集阻止反応時における吸光度値から、血液検体中の糖化ヘモグロビン濃度を算出し（コントロール値）、次に前述した10種類の各非イオン性界面活性剤で同じ血液検体を処理した場合におけるラテックス凝集阻止反応の吸光度値から、血液中の糖化ヘモグロビン濃度を求め、前記ペプシンで変性した

50

ものをコントロールとして、各非イオン性界面活性剤の変性率を求めた。

【0144】

図8は、横軸に非イオン性界面活性剤濃度を、縦軸に糖化ヘモグロビンの変性割合をプロットした図であり、図9は、横軸に各非イオン性界面活性剤のCMC（臨界ミセル濃度）と該非イオン性界面活性剤濃度との比を、縦軸に糖化ヘモグロビンの変性割合をプロットした図である。

【0145】

図8によれば、図7に示したものと同様、ヘモグロビン変性効果が高い非イオン性界面活性剤濃度は種類によって異なるが、図9に示したように、各非イオン性界面活性剤のCMCに対する非イオン性界面活性剤濃度で比較すると、いずれもCMCに対して、2倍以上の濃度において、変性効果が高まっていることを確認することが出来た。

10

【0146】

(f)ヘモグロビンの変性に必要な、酸化剤（フェリシアン化カリウム）の濃度の確認
非イオン性界面活性剤である、Sucrose monooctylateについて、フェリシアン化カリウムによる変性効果を確認した。

【0147】

変性方法は、0.5%のSucrose monooctylateについて、0、0.01、0.05、0.1、0.25、0.5%のフェリシアン化カリウムを含む水溶液1mLを作製し、2μLの血液検体を添加（501倍希釈）した後、25℃にて3分間放置した。

20

【0148】

次に、反応液1002μLのうち140μLを、糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス試薬溶液560μLと4分間反応させた。その後、112μLの凝集試薬と反応させ、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。なお、この試験においては、血液検体のヘマトクリット値（Hct）を20、45、70%に調整したものを使用した。

【0149】

変性の確認は、前記d)と同様、まずブタ由来ペプシンで処理した血液検体のラテックス凝集阻止反応時における吸光度値（コントロール値）から、血液検体中の糖化ヘモグロビン濃度を算出し、次に非イオン性界面活性剤で同じ血液検体を処理した場合におけるラテックス凝集阻止反応の吸光度値から、血液中の糖化ヘモグロビン濃度を求めた。そして、前記ペプシン処理したコントロールに対して、前記非イオン性界面活性剤で処理した血液検体は、何%の糖化ヘモグロビンが検出されているかを求め、これを、ヘモグロビンの変性割合とした。

30

【0150】

図10(a)は、横軸にフェリシアン化カリウム濃度を、縦軸にヘモグロビンの変性割合をプロットした図であり、図10(b)は、横軸にフェリシアン化カリウム量とヘモグロビン量との比を、縦軸にヘモグロビンの変性割合をプロットした図である。

【0151】

図10(a)によれば、非イオン性界面活性剤単独では、ヘモグロビン変性効果は弱い
が、非イオン性界面活性剤と同時に0.1%以上のフェリシアン化カリウムで同時に処理することにより、ヘマトクリット値が70%の血液検体であっても十分変性することがわかった。

40

【0152】

また図10(b)によれば、ヘモグロビン量に対してフェリシアン化カリウム量が2倍以上あれば、血液中のヘモグロビン全てを変性することが明らかであり、フェリシアン化カリウムの存在がヘモグロビンの変性に深く関与していることがわかった。

【0153】

(g)非イオン性界面活性剤がラテックス凝集反応（免疫アッセイ反応）に与える影響の確認

50

以下に示す 9 種類の各非イオン性界面活性剤が、ラテックス凝集反応に与える影響を確認した。

n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e
 n - H e p t y l - β - D - t h i o g l u c o s i d e
 M E G A - 8
 M E G A - 9
 M E G A 1 0
 n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e
 n - O c t y l - β - D - g l u c o s i d e
 S u c r o s e m o n o c a p r a t e
 S u c r o s e m o n o l a u r a t e

10

【0154】

変性方法は、前述のラテックス試薬溶液に、各非イオン性界面活性剤溶液を加えた後、凝集試薬を加え、3分後に550nmの吸光度の変化量を測定した。

【0155】

免疫アッセイ反応への影響の確認は、非イオン性界面活性剤の最終濃度が0.25～1.4%前後になるように加えた時のラテックス凝集反応の吸光度変化量と、非イオン性界面活性剤を加えなかった時のラテックス凝集反応の吸光度変化量とを比較した。

【0156】

また、同時に、前述と同様の方法により、特許文献3に記載されるイオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム(SLS)についても、0.1%と0.25%濃度において、ラテックス凝集反応への影響を確認した。

20

【0157】

図11は、横軸に界面活性剤の濃度を、縦軸にコントロールの吸光度変化量を100%とした時の、各非イオン性界面活性剤の吸光度変化量比をプロットした図である。

【0158】

図11によれば、イオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム(SLS)に関しては、濃度の増大によって極端なラテックス凝集反応の低下傾向を示したが、非イオン性界面活性剤は、ラテックス凝集反応への影響は緩やかであることがわかった。

【0159】

また、非イオン性界面活性剤のうち、特に、n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e、n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e、M E G A 1 0、S u c r o s e m o n o c a p r a t e、S u c r o s e m o n o l a u r a t eなどは、十分なヘモグロビン変性効果を保有する濃度においても、ラテックス凝集反応への影響が少ないことが確認できた。これは、ヘモグロビン変性溶液を、そのままラテックス凝集反応、もしくは、ラテックス凝集阻止反応における反応用の試薬組成としても、十分使用可能であることを示唆するものである。

30

【0160】

(h) 非イオン性界面活性剤存在下でのラテックス凝集阻止反応(免疫アッセイ反応)効果の確認

40

糖化ヘモグロビン濃度が異なる3種類の血液検体を準備した。

そして、まず、血液2 μ Lに対して100 μ Lの100kU/Lのブタ由来ペプシン溶液を添加(501倍希釈)した後、3分間処理し、この反応液102 μ Lのうち、14 μ Lを、560 μ Lの糖化ヘモグロビンの糖化部位に特異的に結合可能なラテックス標識抗体溶液を入れた光路長1cmのプラスチックセルに加え、4分間反応させた。さらにこの反応液に0.5 μ g/mLの合成多価糖化ヘモグロビン抗原112 μ Lを加え、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。同じ実験を各濃度の血液検体に対しても行った。

【0161】

次に、血液2 μ Lに対して100 μ Lの0.5% S u c r o s e m o n o c a p r a

50

t e 及び 0.25% フェリシアン化カリウム溶液を添加し、3 分間処理し、この反応液 102 μ L のうち、14 μ L を、560 μ L の糖化ヘモグロビンの糖化部位に特異的に結合可能なラテックス試薬、及び 0.5% Sucrose monocatechate、及び 0.25% フェリシアン化カリウム溶液を入れた光路長 1 cm のプラスチックセルに加え、4 分間反応させた。さらに、この反応液に 0.5 μ g/mL の合成多価糖化ヘモグロビン抗原 112 μ L を加え、3 分後に 550 nm における吸光度の変化量を測定した。ペプシンの場合と同様に、同じ実験を各濃度の血液検体に対しても行った。

【0162】

図 12 は、横軸に糖化ヘモグロビン濃度を、縦軸に吸光度の変化量をプロットした図である。

10

図 12 によれば、糖化ヘモグロビン濃度に応じた吸光度が得られていることから、0.5% Sucrose monocatechate、及び 0.25% フェリシアン化カリウム溶液でヘモグロビン誘導体の変性反応を行い、且つその変性試薬組成が含まれる状態でラテックス凝集阻止反応を行うことが可能であることがわかった。

【0163】

(実施例 2)

以下、ヘモグロビン誘導体の存在比を測定する方法について検証した。

(a) ヘモグロビン濃度のコントロールの測定

ヘモグロビンの測定は、和光純薬工業株式会社より販売されている「ヘモグロビン B - テストワコー」を使用した。これは SLS - ヘモグロビン法によりヘモグロビンを検出する方法である。

20

【0164】

まず、ヘモグロビンの標準曲線の作製を以下の手順にて行った。

3.5 mM ラウリル硫酸ナトリウム溶液 5 mL に対して、5 g/dL、10 g/dL、15.0 g/dL のヘモグロビン標準液を、それぞれ 20 μ L ずつ加えた反応液と、15.0 g/dL のヘモグロビン標準液 40 μ L とを加えた反応液を作製し、光路長 1 cm のセル内で 540 nm の吸光度を測定した。図 13 は、15 g/dL のヘモグロビン標準液を 40 μ L 加えた反応液のヘモグロビン濃度を 30 g/dL として、横軸にヘモグロビン濃度を、縦軸に吸光度をプロットした図であり、これをヘモグロビン濃度測定のコントロールとした。

30

【0165】

(b) 糖化ヘモグロビンの存在比の算出

次に、測定対象とする血液検体 A、B それぞれ 20 μ L を、3.5 mM ラウリル硫酸ナトリウム溶液 5 mL に対して加えた。この反応液の 540 nm における吸光度を測定し、図 13 の既知のヘモグロビン濃度に対する吸光度データから、前記血液検体 A、B のヘモグロビン濃度を求めた。次に、それぞれ 0.5% 濃度の Sucrose monocatechate / 0.25% フェリシアン化カリウム溶液 100 μ L に、前記 2 μ L の血液検体 A、B を加え、3 分間放置した。次に、反応液 102 μ L のうち、14 μ L を糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス溶液 560 μ L と 4 分間反応させた。その後、112 μ L の凝集試薬と反応させ、3 分後に 550 nm における吸光度の変化量を測定した。

40

【0166】

図 14 は、血液検体 A、B のヘモグロビン濃度、糖化ヘモグロビン濃度、及び、全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの占める割合を示す図である。

【0167】

また、図 15 は、前述した血液検体 A、B を、糖化ヘモグロビン測定の標準法とされる東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計 (HLC-723 GHbV) にて、糖化ヘモグロビンの占める割合を測定した結果である。

【0168】

図 14、15 を比較すれば、非常に相関性の高い結果を示していることがわかる。これに、0.5% Sucrose monocatechate / 0.25% フェリシアン化カリ

50

ウム溶液で血液検体を処理することによって、十分なヘモグロビンの変性が行われ、糖化ヘモグロビン濃度を算出することが可能であることが示唆された。

【0169】

なお、ここでは、非イオン性界面活性剤が、Sucrose monocatechateの場合のみについて実験結果を示したが、変性効果を有する他の非イオン性界面活性剤においても同様の結果を示す。

【0170】

(実施例3)

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

10

(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1cm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、糖化ヘモグロビン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。

【0171】

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、0.5% Sucrose monocatechate溶液及び0.25%フェリシアン化カリウムからなる溶液0.2mLと、合成多価糖化ヘモグロビン抗原とを注入し、溶液試薬用シール305にて密封した後、前記上部ケース301と前記下部ケース302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。

20

【0172】

(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。

【0173】

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混合し、この状態で3分間放置後、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、540nmの吸光度を測定する。

30

【0174】

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、3分間放置後、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3分後に、測定部310によって550nmの吸光度を測定する。

【0175】

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、540nmによって、シアンメトヘモグロビンを測定し、550nm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、前記血液検体A及びBについて行う。

40

【0176】

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溶液、及び糖化ヘモグロビン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、及び糖化ヘモグロビン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

50

糖化ヘモグロビン濃度を求めた。

【 0 1 7 7 】

図 1 6 は、血液検体 A , B それぞれの、糖化ヘモグロビン濃度及びヘモグロビン濃度、さらに糖化ヘモグロビンの存在比を示す図である。

【 0 1 7 8 】

図 1 6 によれば、本分析システム 3 0 0 にて、糖化ヘモグロビンの占める割合を測定した結果は、あらかじめ東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計 (H L C - 7 2 3 G H b V) にて、糖化ヘモグロビンの占める割合を測定した結果 (図 1 5 参照) と非常に近く、本分析システム 3 0 0 によって、正確な糖化ヘモグロビン濃度の測定が可能であることが確認された。

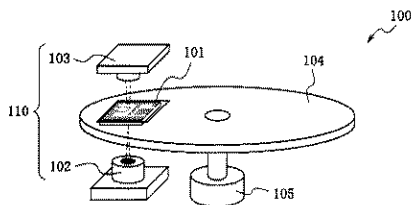
10

【 産業上の利用可能性 】

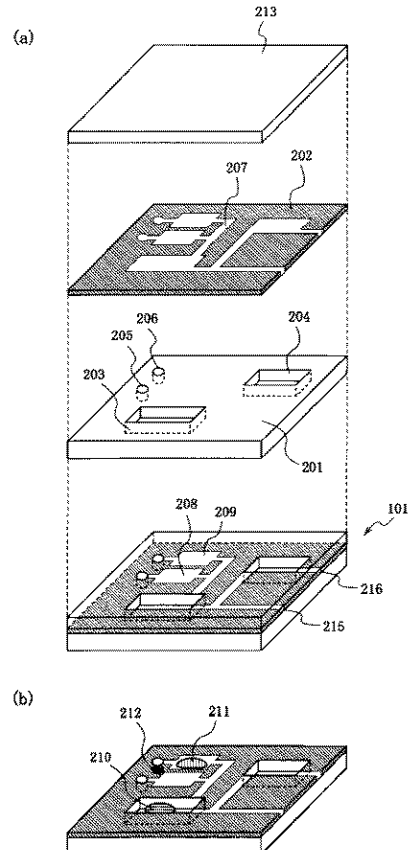
【 0 1 7 9 】

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、正確なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

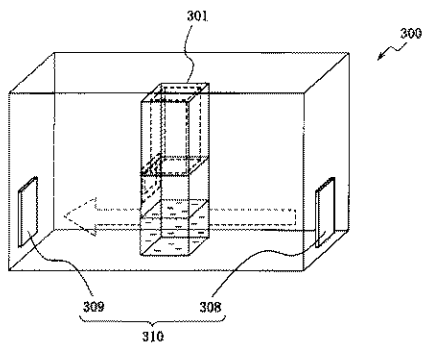
【 図 1 】



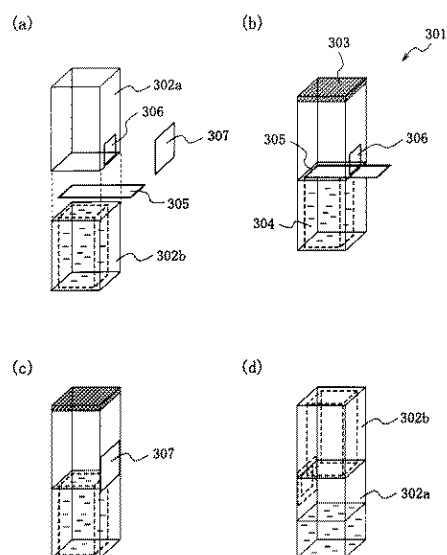
【 図 2 】



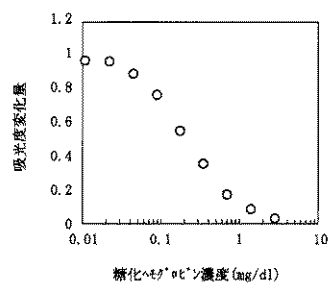
【図 3】



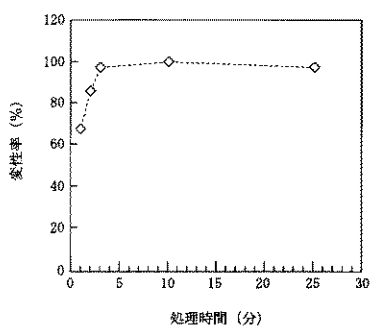
【図 4】



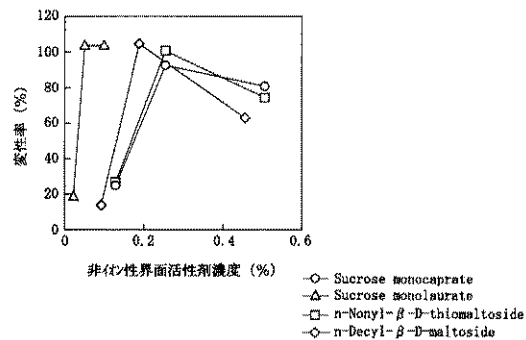
【図 5】



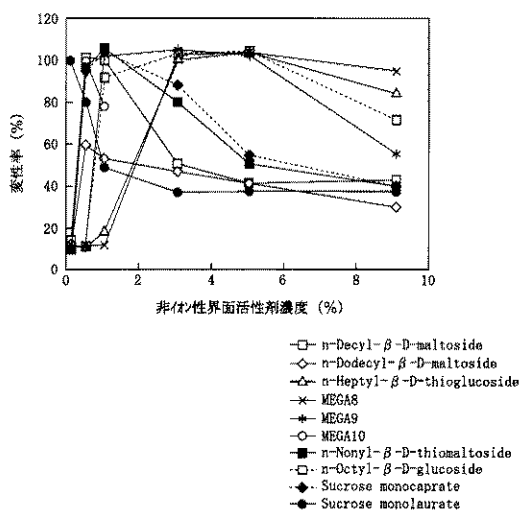
【図 6】



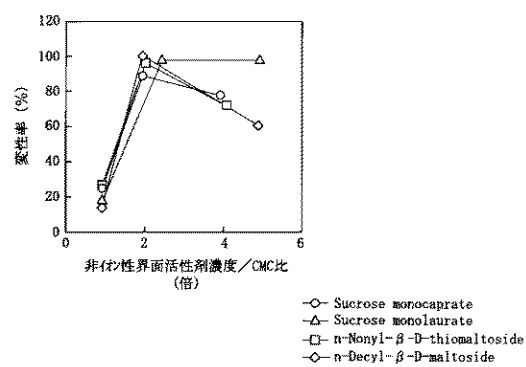
【図 8】



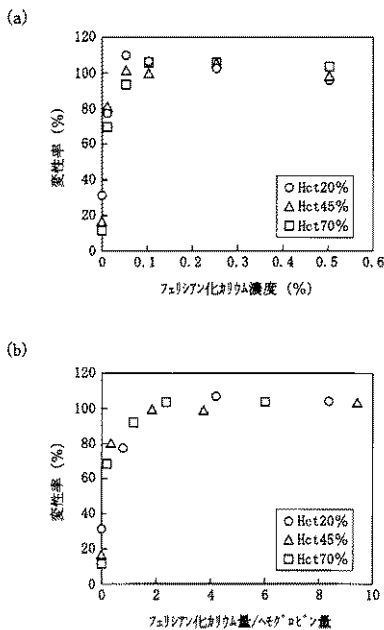
【図 7】



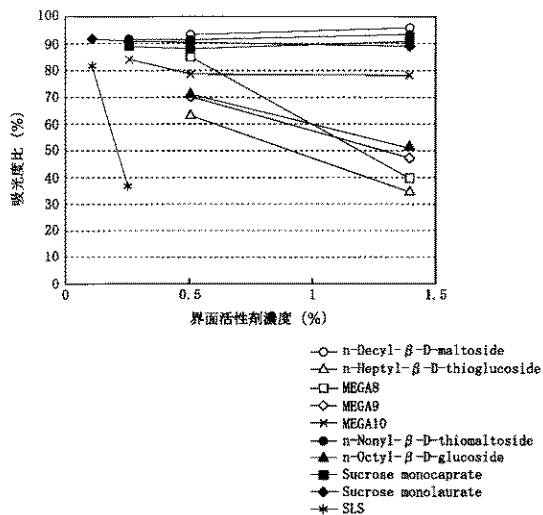
【図 9】



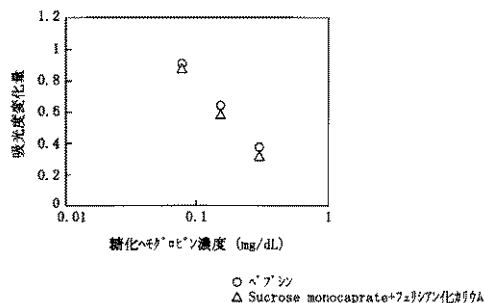
【図 10】



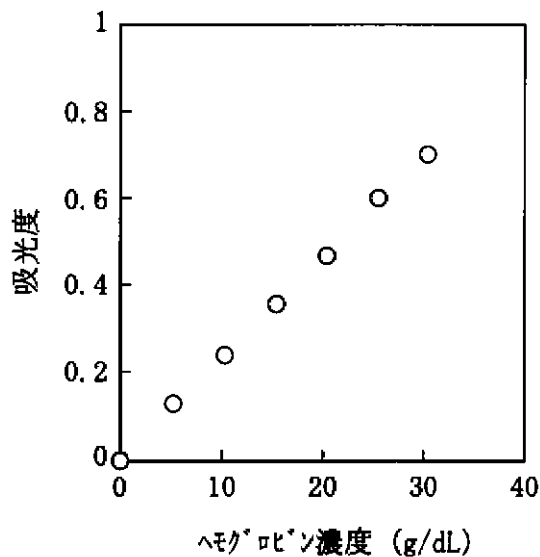
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【図 14】

	検体A	検体B
糖化ヘモグロビン濃度 (g/dL)	0.69	0.99
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.3	14.5
全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの割合 (%)	4.5	6.8

【図 15】

	検体A	検体B
全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの割合 (%)	4.5	6.7

【図 16】

	検体A	検体B
糖化ヘモグロビン濃度 (g/dL)	0.68	0.97
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.1	14.7
全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの割合 (%)	4.5	6.6

【手続補正書】**【提出日】**平成19年10月12日(2007.10.12)**【手続補正 1】****【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】****【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で処理して前記試料中のヘモグロビンを変性させる工程を含む、

10

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、

前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させたヘモグロビン誘導体を、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アッセイを行い検出する、

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、

20

前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、

前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させた糖化ヘモグロビンを、該糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を用いて免疫アッセイを行い検出する、

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 4】

請求項 2 または請求項 3 に記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、

前記試料を、前記免疫アッセイを有意に妨害しない前記非イオン性界面活性剤濃度で処理する、

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

30

【請求項 5】

請求項 1 ないし請求項 4 のいずれかに記載のヘモグロビン誘導体の測定方法において、

さらに、前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程を含み、

前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出する、

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 6】

請求項 5 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、糖化ヘモグロビンである、

ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の測定方法。

【請求項 7】

40

血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための試薬組成物であって、

少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む、

ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の試薬組成物において、

前記試薬組成物は、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、

ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の試薬組成物において、

50

前記ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンであって、
前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体をさらに含む、
ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 10】

請求項 8 または請求項 9 に記載の試薬組成物において、
前記非イオン性界面活性剤濃度は、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする試薬組成物。

【請求項 11】

血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための測定キットであって、
少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤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。

10

【請求項 12】

請求項 11 に記載の測定キットにおいて、
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保持してなる、
ことを特徴とする測定キット。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の測定キットにおいて、
前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、
前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を保持してなる、
ことを特徴とする測定キット。

20

【請求項 14】

請求項 12 または請求項 13 に記載の測定キットにおいて、
前記非イオン性界面活性剤濃度は、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度である、
ことを特徴とする測定キット。

【請求項 15】

血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための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誘導体を、非イオン性界面活性剤と酸化剤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誘導体を検出する検出部と、から
構成される、
ことを特徴とする分析デバイス。

30

【請求項 16】

請求項 15 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の変性された部位に対して特異的な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に、該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アッセイを行い検出する、
ことを特徴とする分析デバイス。

【請求項 17】

請求項 15 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糖化ヘモグロビンであり、
前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を担持する免疫アッセイ部を有し、
前記試料中の糖化ヘモグロビンを前記試薬組成物により変性した後に、該変性された糖化ヘモグロビンを、前記抗体を用いて免疫アッセイを行い検出する、
ことを特徴とする分析デバイス。

40

【請求項 18】

請求項 16 または請求項 17 に記載の分析デバイスにおいて、
前記試薬組成物に含まれる前記非イオン性界面活性剤濃度は、前記免疫アッセイを有意に

50

妨害しない濃度である、
ことを特徴とする分析デバイス。

【請求項 19】

請求項 15 ないし請求項 18 のいずれかに記載の分析デバイスにおいて、
前記試料添加部位に連結され、前記試料に含まれるヘモグロビンを検出する検出部をさらに含み、

前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出する、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の分析デバイス。

【請求項 20】

請求項 19 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、糖化ヘモグロビンである、
ことを特徴とするヘモグロビン誘導体の分析デバイス。

10

【請求項 21】

請求項 15 ないし請求項 18 のいずれかに記載の分析デバイスと、
該分析デバイスの検出部位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、
ことを特徴とする分析システム。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、迅速かつ確実にヘモグロビンを変性させる技術に関するものである。

【背景技術】

【0002】

30

ヘモグロビン誘導体の一つである糖化ヘモグロビンは、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。糖化ヘモグロビンはヘモグロビン A1c とも呼ばれ、赤血球の中に含まれるヘモグロビンにブドウ糖が結合したものであり、ヘモグロビンに対して糖化ヘモグロビンが存在する比率で数値化される。

【0003】

糖化ヘモグロビンの測定方法としては、免疫反応を利用する方法がある。この免疫反応を利用した測定方法は、最初に、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だし、次にヘモグロビンが非糖化ヘモグロビンであるか糖化ヘモグロビン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、ヘモグロビンタンパク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（ヘモグロビンの変性）、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、免疫学的に糖化ヘモグロビン量を測定するものである。

40

【0004】

このヘモグロビンの変性方法に関しては、従来例として、例えばリチウム塩形態の陰イオンでヘモグロビンを変性させる方法がある（特許文献 1 参照）。詳述すると、血液試料中の特定のヘモグロビン誘導体を測定する分析方法において、（a）血液試料を溶解／変性試薬で処理して赤血球を溶解し、赤血球から放出された検出可能量の上記誘導体を変性し、（b）その結果生じた混合液を、その中に存在する変性型の上記ヘモグロビン誘導体の量に関してイムノアッセイにより試験する方法であって、上記溶血／変性試薬として赤

50

血球を溶解し上記ヘモグロビン誘導体を変性することができるリチウム塩形態の陰イオンを用い、それによって溶血及び上記ヘモグロビン誘導体の変性を、イムノアッセイ工程を有意に妨害しないリチウム塩濃度で迅速に成し遂げることを特徴とする方法である。

【 0 0 0 5 】

また、別の変性方法として、チオシアン化合物でヘモグロビンを変性させる方法がある（特許文献 2 参照）。詳述すると、この方法は、血液試料中の特定のヘモグロビン誘導体の相対量を測定するための分析方法であって、（ a ）血液試料を、（ i ）試料中において 0 . 5 ~ 6 . 0 M の濃度となる、血液試料中に存在する実質的にすべてのヘモグロビンを変性しうるチオシアネート塩と、（ ii ）血液試料中に存在する実質的にすべてのヘモグロビンをメトヘモグロビンの形態に転化させうる酸化剤とで処理して変性血液試料を得る工程、（ b ）変性血液試料中のメトヘモグロビンを定量する工程、（ c ）イムノアッセイによって、変性血液試料中の変性形態の特定のヘモグロビン誘導体を定量する工程、及び（ d ）上記工程（ b ）及び（ c ）から得られる試験結果を関連させることを特徴とするものである。

10

【 0 0 0 6 】

さらに、別の変性方法として、イオン性界面活性剤による変性を行う方法なども挙げられる（特許文献 3 参照）。詳述すると、この方法は、血液試料中のヘモグロビン誘導体の含量の測定法であって、（ a ）血液試料を、 4 ~ 3 7 の温度で、 5 ~ 9 . 5 の pH を有するイオン性洗剤を含む溶血試薬で 1 0 分間まで処理し、そして（ b ）ヘモグロビン誘導体を溶血させた血液試料中で免疫学的に測定することを特徴とするものである。

20

【特許文献 1】特開平 3 - 5 1 7 5 9 号公報

【特許文献 2】特開平 1 - 1 5 5 2 6 8 号公報

【特許文献 3】特開平 6 - 1 1 5 1 0 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

前述したように、ヘモグロビンを変性させる方法は様々であるが、各方法とも一長一短がある。例えば、前記特許文献 1 や特許文献 2 に記載される、リチウム塩やチオシアン化合物を使用する方法においては、特に最適とされるチオシアン酸リチウムをはじめ、チオシアン酸カリウムやチオシアン酸アンモニウムなどの試薬が非常に潮解性が高い性質故に、その取り扱いに注意を要する。またこれらの試薬は、乾燥形態を保持することが困難であるため、例えばデバイスに担持する場合は、湿気により劣化する試薬とは別にしなければならないなど、工法上大きな制約を受ける。

30

【 0 0 0 8 】

また、前記特許文献 3 に記載される、イオン性界面活性剤を使用する方法では、その強力なタンパク質変性効果故に、ヘモグロビン変性処理後の免疫反応系に悪影響を与えることから、ヘモグロビン変性溶液を緩衝液などで希釈し、希釈された後のヘモグロビン溶液を免疫反応試薬と混合させるといった、多段階の操作が必要とされる。このような煩雑な測定方法は、不便であり、更には希釈バラツキによって測定値に誤差を与えることがある。さらに、希釈操作が必要とされると、簡易な測定システムを構築することが困難になる。

40

【 0 0 0 9 】

本発明はこれら従来の課題を解決するもので、ヘモグロビン誘導体量を測定する際に、変性試薬による免疫反応への影響を低減しつつ、ヘモグロビンの変性を迅速かつ確実にに行える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。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

前記従来の課題を解決するために、本発明の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で処理して前記試料中のヘモグロビン

50

を変性させる工程を含むものである。

これにより、免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速にかつ確実なヘモグロビン変性効果を得ることができる。

【0011】

また、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させたヘモグロビン誘導体を、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アッセイを行い検出するものである。

これにより、ヘモグロビン誘導体を検出することができる。

【0012】

また、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記非イオン性界面活性剤と酸化剤とで処理して変性させた糖化ヘモグロビンを、該糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を用いて免疫アッセイを行い検出するものである。

これにより、糖化ヘモグロビンを検出することができる。

【0013】

さらに、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、前記試料を、前記免疫アッセイを有意に妨害しない前記非イオン性界面活性剤濃度で処理するものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【0014】

また、本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法は、さらに前記試料に含まれるヘモグロビンを測定する工程を含み、前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出するものである。

これにより、試料中のヘモグロビン誘導体の存在比を得ることができる。

【0015】

さらに、前記ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンであるものである。

これにより、試料中の糖化ヘモグロビン誘導体の存在比を得ることができる。

【0016】

本発明の試薬組成物は、血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための試薬組成物であって、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含むものである。

これにより、免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速にかつ確実なヘモグロビン変性効果を得ることができる試薬を提供できる。

【0017】

また、本発明の試薬組成物は、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ものである。

これにより、前記試薬組成物と前記試料とを混合させるのみで、ヘモグロビン誘導体を検出することができる。

【0018】

また、本発明の試薬組成物は、前記ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンであって、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体をさらに含むものである。

これにより、前記試薬組成物と前記試料とを混合させるのみで、糖化ヘモグロビンを検出することができる。

【0019】

さらに、本発明の試薬組成物は、前記非イオン性界面活性剤濃度が、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度であるものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【0020】

本発明の測定キットは、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

10

20

30

40

50

体を保持してなるものである。

これにより、免疫反応への影響を最小限に抑えつつ、迅速にかつ確実なヘモグロビン変性効果を得ることができる測定キットを提供できる。

【 0 0 2 1 】

また、本発明の測定キットは、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保持してなるものである。

これにより、ユーザが専門的な知識を保有していなくても、簡便にヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明の測定キットは、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を保持してなるものである。

これにより、ユーザが専門的な知識を保有していなくても、簡便に糖化ヘモグロビンの測定が可能となる。

【 0 0 2 3 】

さらに、本発明の測定キットは、前記非イオン性界面活性剤濃度が、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度であるものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【 0 0 2 4 】

本発明の分析デバイスは、血液成分を含む試料中のヘモグロビン誘導体を測定するための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誘導体を、非イオン性界面活性剤と酸化剤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誘導体を検出する検出部と、から構成されるものである。

これにより、ヘモグロビンをより簡便且つ迅速に変性させることができる分析デバイスを提供できる。

【 0 0 2 5 】

また、本発明の分析デバイスは、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に、該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アッセイを行い検出するものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、該試料中のヘモグロビン誘導体を検出することができる。

【 0 0 2 6 】

また、本発明の分析デバイスは、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであり、前記糖化ヘモグロビンの変性された部位に対して特異的な抗体を担持する免疫アッセイ部を有し、前記試料中の糖化ヘモグロビンを前記試薬組成物により変性した後に、該変性された糖化ヘモグロビンを、前記抗体を用いて免疫アッセイを行い検出するものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、該試料中の糖化ヘモグロビンを検出することができる。

【 0 0 2 7 】

さらに、本発明の分析デバイスは、前記試薬組成物に含まれる前記非イオン性界面活性剤濃度が、前記免疫アッセイを有意に妨害しない濃度であるものである。

これにより、変性処理後に希釈操作が必要なくなり、希釈による測定精度の低下防止に加え、ユーザの操作性をはるかに向上させることができる。

【 0 0 2 8 】

また、本発明の分析デバイスは、前記試料添加部位に連結され、前記試料に含まれるヘモグロビンを検出する検出部をさらに含み、前記ヘモグロビンに対する前記ヘモグロビン誘導体の存在比を算出するものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、ヘモグロビ

10

20

30

40

50

ン誘導体の存在比を得ることができる。

【 0 0 2 9 】

さらに、前記ヘモグロビン誘導体が糖化ヘモグロビンであるものである。

これにより、検出対象である試料を添加することで、より簡便且つ迅速に、糖化ヘモグロビンの存在比を得ることができる。

【 0 0 3 0 】

本発明の分析システムは、請求項 1 5 ないし請求項 1 8 のいずれかに記載の分析デバイスと、該分析デバイスの検出部位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ものである。

これにより、ユーザの手技の影響を受けにくい、簡便且つ迅速なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【発明の効果】

【 0 0 3 1 】

本発明のヘモグロビン誘導体の測定方法によれば、非イオン性界面活性剤と酸化剤とによって、血液成分を含む試料中のヘモグロビンの変性処理を行うようにしたので、該変性処理を迅速且つ確実に行うことができる。

【 0 0 3 2 】

また、特に、前記非イオン性界面活性剤は、ヘモグロビン誘導体を免疫アッセイにより測定する時に、免疫アッセイへの阻害効果が少ないため、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アッセイを構築することが可能となる。

【 0 0 3 3 】

また、前記ヘモグロビン誘導体と同時に、前記試料中のヘモグロビンを測定するようにすれば、前記ヘモグロビンに対する前記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 0 3 4 】

本発明の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。

【 0 0 3 5 】

また、前記試薬組成物は、液体状、固体状、液体を乾燥した状態のいずれでもよいが、固体状態にあれば、より安定した状態で長期間保持することが可能となる。

【 0 0 3 6 】

本発明の測定キットによれば、その一部に、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む試薬組成物を保持し、前記試薬組成物と前記試薬とを混合することによってヘモグロビンを変性するようにしたので、より簡便に、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。

【 0 0 3 7 】

また、前記測定キットに、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るようにしたので、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 3 8 】

本発明の分析デバイスによれば、その一部に、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを担持するようにしたので、前記ヘモグロビンの変性処理を迅速且つ確実に行える、ユーザにとって煩雑な作業を削減した装置を提供できる。

【 0 0 3 9 】

また、前記分析デバイスの一部に、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を担持し、前記変性処理後に前記抗体を利用して免疫アッセイを行うようにしたので、前記ヘモグロビン誘導体を検出可能な、ユーザにとって煩雑な作業を削減した装置を提供できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

本発明の分析システムによれば、前記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と、該分析デバイス専用の測定部とから構成するようにしたので、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を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 4 1 】

以下に、本発明のヘモグロビン変性方法の実施の形態を、詳細に説明する。

(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、ヘモグロビン誘導体の測定方法について説明する。

【 0 0 4 2 】

前記ヘモグロビン（以後、「Hb」とも表記。）とは、 α 鎖と非 α 鎖（ β 、 γ 、 δ 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って、そのヘモグロビンのうち、約 90% が Hb A ($\alpha_2\beta_2$)、約 3% が Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$)、約 1% が Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) である。そして、前記 Hb A には、 β 鎖アミノ酸末端に糖が結合していない Hb A0 と、糖が結合した Hb A1 とがあり、さらに、該 Hb A1 の中には、Hb A1a、Hb A1b、Hb A1c（以後、「糖化ヘモグロビン」とも表記。）があり、これらの糖が結合した Hb A1 をヘモグロビン誘導体と呼ぶ。

【 0 0 4 3 】

ヘモグロビン誘導体を決めるポイントとしては、アミノ酸残基やペプチド末端が修飾された領域が存在するかどうかである。例えば、前記 Hb A1a は、 β 鎖 N 末端がリン酸化糖で修飾されており、前記 Hb A1b は、 β 鎖 N 末端がアルデヒド化されており、前記 Hb A1c は、 β 鎖 N 末端が糖化されている。

【 0 0 4 4 】

このように、本実施の形態 1 のヘモグロビン誘導体は、前述したようなヘモグロビンの一部の領域の構造が異なるものをいうものとする。

【 0 0 4 5 】

なお、これら以外にも、ヘモグロビン誘導体には様々な種類があり、例えばアルコールの乱用によるアセトアルデヒド - ヘモグロビン付加物、尿毒症患者の血液中に存在する尿素 - ヘモグロビン付加物、また、アスピリン - ヘモグロビンコンプレックスや、カルボキシメチル化ヘモグロビン等、その種類は多岐に亘る。

【 0 0 4 6 】

ヘモグロビン誘導体としては、特に、ヘモグロビタンパクの反応性アミン基と、グルコースとの非酵素反応によって生成される糖化ヘモグロビンが有用な測定項目として挙げられているが、その測定項目はこれに限定されるものではない。

【 0 0 4 7 】

前述したように、ヘモグロビンの一部の領域の構造のみが異なっている、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。

【 0 0 4 8 】

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を用いて行う。

【 0 0 4 9 】

本実施の形態 1 における変性の程度については、4 次構造を構成するサブユニット構造が解離する程度、3 次構造を構成する疎水結合、水素結合、ファンデルワールス力、イオ

10

20

30

40

50

ン結合を解離する程度、2次構造を構成する α -ヘリックスや β シートの構造を変化させる程度、あるいは、ヘモグロビンが直鎖状の構造になる程度のいずれであってもよい。

【0050】

一般的に、タンパク質は生体内で機能性物質として存在するが、それは、タンパク質がこれらの構造から形成される精密な立体構造を保っているからである。従って、構造を変化させるということは、少なからずタンパク質の機能が変わり、その性質が変わるといえる。これには、機能が低下したことも、或いは機能が向上したことも含まれる。

【0051】

本実施の形態1における非イオン性界面活性剤とは、電荷をもたない疎水性基と電荷をもたない親水性基とからなる化合物で、一般的には、膜タンパク質を可溶化することを目

10

【0052】

このような非イオン性界面活性剤の一例としては、

N, N-Bis (3 - D - g l u c o n a m i d o p r o p y l) c h o l a m i d e
(以下「BIGCHAP」と表記)

N, N-Bis (3 - D - g l u c o n a m i d o p r o p y l) d e o x y c h o l
a m i d e (以下「deoxy-BIGCHAP」と表記)、

n - D e c y l - β - D - m a l t o p y r a n o s i d e (以下「n - D e c y l -
 β - D - m a l t o s i d e」と表記)

20

n - D o d e c y l - β - D - m a l t o p y r a n o s i d e (以下「n - D o d e
c y l - β - D - m a l t o s i d e」と表記)

n - H e p t y l - β - D - t h i o g l u c o p y r a n o s i d e (以下「n - H
e p t y l - β - D - t h i o g l u c o s i d e」と表記)

n - O c t a n o y l - N - m e t h y l g l u c a m i d e (以下「MEGA - 8」
と表記)

n - N o n a n o y l - N - m e t h y l g l u c a m i d e (以下「MEGA - 9」
と表記)

n - D e c a n o y l - N - m e t h y l g l u c a m i d e (以下「MEGA - 10
」と表記)

30

n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o p y r a n o s i d e (以下「n - N o
n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e」と表記)

n - O c t y l - β - D - g l u c o p y r a n o s i d e (以下「n - O c t y l -
 β - D - g l u c o s i d e」と表記)

n - O c t y l - β - D - m a l t o p y r a n o s i d e (以下「n - O c t y l -
 β - D - m a l t o s i d e」と表記)

n - O c t y l - β - D - t h i o g l u c o p y r a n o s i d e (以下「n - O c
t y l - β - D - t h i o g l u c o s i d e」と表記)

β - D - F r u c t o p y r a n o s y l - α - D - g l u c o p y r a n o s i d e
m o n o d e c a n o a t e (以下「Sucrose monocapr ate」と表
記)

40

β - D - F r u c t o p y r a n o s y l - α - D - g l u c o p y r a n o s i d e
m o n o d o d e c a n o a t e (以下「Sucrose monolaurate」
と表記)

S u c r o s e m o n o c h o l a t e

などが挙げられる。

【0053】

このような膜タンパク質を可溶化する非イオン性界面活性剤には、特に、該たんぱく質
を変性・失活させないという特徴があり、いずれも、タンパク質に対する変性効果は少な

50

い。しかし、前述したような特徴を持つ非イオン性界面活性剤に、さらに酸化剤を組み合わせ、且つ該組み合わせた試薬それぞれについて、適切な濃度を選択することにより、ヘモグロビンを積極的に変性させることができることを見出した（後述の実施例 1（d）参照）。したがって、本実施の形態 1 では、血液検体を、迅速且つ確実、さらに効果的に変性させることができる。

【0054】

本実施の形態 1 における変性試薬が効果的にヘモグロビンを変性させうる条件は、該非イオン性界面活性剤の種類によって異なる。これは、非イオン性界面活性剤の臨界ミセル濃度（以下「CMC」と表記）によるものであり、ヘモグロビンは、酸化剤の存在下、少なくとも CMC 以上、より好適には、CMC の約 2 倍以上の濃度で効果的に変性する（後述の実施例 1（e）参照）。

10

【0055】

例えば、Sucrose monolaurate の CMC が 0.02% の場合、ヘモグロビンは、0.05% の濃度で変性可能であるが、Sucrose monocaprate の CMC が 0.13% の場合は、ヘモグロビンは 0.25% 以上の濃度が必要である。

【0056】

また、前記酸化剤の濃度については、全てのヘモグロビンを酸化するだけの濃度が必要で、例えば 500 倍に希釈した血液中のヘモグロビンを変性させる場合、0.1% 以上のフェリシアン化カリウムが必要である（後述の実施例 1（f）参照）。

20

【0057】

このように、酸化剤で処理することで変性効果が向上するのは、まず酸化剤により、ヘモグロビンがメト化され、それにより、非イオン性界面活性剤による変性効果が受けやすくなったためと考えられる。

【0058】

酸化剤としては、ヘモグロビンをメトヘモグロビンの形態に変化させうるだけの電荷を保有する物質から選択されることが可能であり、その一例としては、一般的に使用される、 $K_3Fe(CN)_6$ （フェリシアン化カリウム）の他、 KIO_3 、 $KClO_3$ 、 K_2CrO_4 、 $NaNO_2$ 、 $K_2Co(NO_2)_6$ などが挙げられるが、ヘモグロビンの酸化作用があれば、これらに限定しない。

30

【0059】

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酸化剤を含む非イオン性界面活性剤溶液を調整して、ヘモグロビン誘導体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酸化剤を含む非イオン性界面活性剤溶液に対して、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）効果も兼ねている必要がある。

【0060】

さらに、非イオン性界面活性剤で処理する方法には、酸化剤と非イオン性界面活性剤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。

40

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。

【0061】

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で処理して、試料中のヘモグロビン誘導体を変性させた後、該変性されたヘモグロビン誘導体を用いて試料中のヘモグロビン誘導体の測定を行う。なお、本実施の形態 1 において、ヘモグロビン誘導体の測定方法とは、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ることによる免疫アッセイ、もしくは

50

グルコースのシス・ジオールと親和性をもつホウ酸アフィニティーを用いる方法等がある。

【 0 0 6 2 】

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及び酸化剤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アッセイを行えることにある。すなわち、本実施の形態 1 では、ヘモグロビンの変性工程において、非イオン性界面活性剤を用いることにより、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。

10

【 0 0 6 3 】

本実施の形態 1 における免疫アッセイとは、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。

【 0 0 6 4 】

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、糖化ヘモグロビンであり、その測定方法としては、糖化ヘモグロビンの変性された部位、すなわち変性により構造外部に露出される糖化ヘモグロビンの糖化部位、に対して特異的な抗体を利用した免疫アッセイが用いられる。前記糖化ヘモグロビンとは、Hb 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。具体的には、Hb A1c を、非イオン性界面活性剤及び酸化剤と作用させて変性させた後に、該 Hb A1c 特有のβ鎖N末端のアミノ酸が糖化された糖化部位に対して特異的な抗体を用いて、免疫アッセイを行う。

20

【 0 0 6 5 】

そして一般的に、このようなヘモグロビン誘導体は、臨床検査の分野では、ヘモグロビン量に対する比で求められるため、ヘモグロビン誘導体の測定方法には、試料に含まれるヘモグロビン量を測定する工程と、該試料に含まれるヘモグロビン誘導体量を測定する工程と、該測定したヘモグロビン量に対するヘモグロビン誘導体量の比を算出する工程とを含む。

30

【 0 0 6 6 】

この試料に含まれるヘモグロビン量を測定する工程は、現在、臨床検査で用いられるヘモグロビン定量法でよく、例えば、シアンメトヘモグロビン法、もしくは、SLS-ヘモグロビン法その他、ヘモグロビンの415nmの吸収を測定する方法がある。また、これは、ヘモグロビンに対する抗体を用いた免疫アッセイであってもよい。

【 0 0 6 7 】

また、この工程で測定されるヘモグロビン量は、全ての赤血球を完全に溶血することによって得られる、試料中に含まれる全ヘモグロビン量ではなく、一部の赤血球を溶血させた部分ヘモグロビン量であってもよい。ヘモグロビン誘導体は、前述したように、ヘモグロビン量に対する比で算出されるからである。

40

【 0 0 6 8 】

さらに、前記ヘモグロビン誘導体がHb A1cである場合に限っていえば、IFCC（国際臨床化学連合）レファレンス法で使用される算出法を用いてもよい。即ち、Hb A0とHb A1cとの和に対するHb A1cの比率で算出される方法である。以下、IFCCレファレンス法について詳述すると、まず、血液試料を生理食塩水で洗浄後、血球を遠心分離で得て、37℃で4時間インキュベートし、不安定型Hb A1cを除去する。次に、ヘモグロビン濃度を6g/dLに調整し、エンドプロテアーゼと酢酸アンモニウム緩衝液（pH 4.0）にて、37℃で18時間処理する。この溶液をHPLCに注入し、糖化6

50

鎖ペプチド及び6鎖ペプチドを得て、エレクトロスプレーイオン化法によりピーク面積を求めるものである。

【0069】

このように、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で処理して、ヘモグロビンを変性させるようにすれば、安全性を確保しつつ、ヘモグロビンの変性を迅速かつ確実に行うことができる。

【0070】

ところで、ヘモグロビンを変性するために、従来のように、酵素やイオン性界面活性剤等の試薬を用いると、その強力なタンパク質変性効果故に、抗体に対する影響も大きく、特に濃度が高いほど抗体活性を低下させる傾向があることから、安定な免疫アッセイ系を構築することはできなかった。このため、従来では、変性処理が終了後に、該ヘモグロビン誘導体溶液を、免疫アッセイを有意に妨害しない濃度にまで希釈する処理が必要であった。

10

【0071】

しかし、本実施の形態1で変性処理に使用する非イオン性界面活性剤は、免疫測定への影響が小さいため（後述の実施例1（g）参照）、ヘモグロビン誘導体は変性させるが、免疫アッセイに使用する抗体は有意に変性させないようにすることができ、この結果、一つの測定系内に、ヘモグロビン誘導体と抗体と非イオン性界面活性剤とを共存させることが可能となる。このため、本実施の形態1では、希釈操作を必要としない1ステップ測定が実現でき、操作性をはるかに向上させることが可能となる。

20

【0072】

そして前述した15種類の非イオン性界面活性剤のうち、特に、より免疫反応に対する影響は小さいものとして、

n - Decyl - β - D - maltoside

MEGA - 10

n - Nonyl - β - D - thiomaltoside

Sucrose monocaprato

Sucrose monolaurate

などが挙げられる（実施例1（g）参照）。

【0073】

これら5種類の非イオン性界面活性剤は、特に、ヘモグロビンの変性を十分行うことが可能な濃度であっても、免疫反応に対する影響は小さく、濃度が変化しても免疫反応への影響が一定であるので、非常に安定な免疫測定系を構築することが可能である。

30

【0074】

もちろん、変性処理に、前記5種類の非イオン性界面活性剤以外の非イオン性界面活性剤を使用しても、従来使用していたイオン性界面活性剤等と比較すると、はるかに免疫測定系への影響は少ないため、安定な免疫測定系を構築することができる（後述の実施例1（h）参照）。

【0075】

以上のように、本実施の形態1の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、迅速且つ確実に変性させることができる。また、前記非イオン性界面活性剤は、免疫アッセイへの阻害効果が少ないため、変性処理後に免疫アッセイ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。

40

【0076】

さらに、本実施の形態1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で処理する際、使用する非イオン性界面活性剤の濃度を、その臨界ミセル濃度以上、より好適には、CMCの約2倍以上の濃度にするようにしたので、ヘモグロビンの変性効

50

果をより向上させることができる。

【 0 0 7 7 】

(実施の形態 2)

以下、本実施の形態 2 では、少なくとも非イオン性界面活性剤と酸化剤とを含む、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説明する。

【 0 0 7 8 】

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を含む試薬組成物は、簡易に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。

10

【 0 0 7 9 】

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。

【 0 0 8 0 】

なお、乾燥させた試薬組成物は、一般的に溶液状態のものよりも保存性が良く、長期の保存が可能である。

【 0 0 8 1 】

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。

20

【 0 0 8 2 】

さらに、前記試薬組成物にタンパク質が含まれる場合は、その安定性を高めるために、該試薬組成物に糖を加えることが有効であり、また、免疫反応を促進させるために、該試薬組成物にポリエチレングリコールなどの免疫反応促進剤を含有させることも可能である。

【 0 0 8 3 】

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。

30

【 0 0 8 4 】

また、本実施の形態 2 の場合、免疫測定への影響がかなり小さい非イオン性界面活性剤を用いているため、免疫アッセイに用いる抗体と非イオン性界面活性剤とを一つの系の中で共存させる、すなわち、試薬組成物の中に前記抗体を含むようにしてもよい。

【 0 0 8 5 】

前記試薬組成物に抗体を含める場合の試薬組成物の作製工法としては、風乾、熱乾燥であっても十分安定性は確保できるが、真空凍結乾燥を使用する方法が最も望ましく、該試薬組成物を安定に保つことができる。特に、抗体はタンパク質であるので、糖を付加することが試薬組成物の安定性の向上につながる。

40

【 0 0 8 6 】

以上のように、本実施の形態 2 のヘモグロビン誘導体を測定するための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。

【 0 0 8 7 】

また、前記試薬組成物は、液体状、固体状、液体を乾燥した状態のいずれでもよいが、特に、固体状態にあれば、より安定した状態で長期間保持することが可能となる。

【 0 0 8 8 】

さらに、前記試薬組成物が、前記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すれば、前記試薬組成物と前記試料とを混合させることで

50

ヘモグロビン誘導体を検出することができるため、ユーザの操作性を向上できる。

【 0 0 8 9 】

(実施の形態 3)

本実施の形態 3 では、少なくとも非イオン性界面活性剤及び酸化剤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誘導体を測定するための測定キットについて説明する。

【 0 0 9 0 】

測定キットとは、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誘導体を測定することができるようにしたものである。

【 0 0 9 1 】

測定キットでは、ヘモグロビン誘導体の変性、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と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を含む試薬であり、これによってヘモグロビン誘導体の変性を迅速且つ確実に行うことができる。

【 0 0 9 2 】

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及び酸化剤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できるようにしたものである。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アッセイを行い測定する免疫測定反応であれば、上記に限定しない。

【 0 0 9 3 】

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。

【 0 0 9 4 】

さらに、前記測定キットに、試料中のヘモグロビンを測定可能な試薬を容器に封入し、付加するようにしてもよい。このようにすれば、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。存在比の算出は、特に糖化ヘモグロビンを測定する場合に有用である。

【 0 0 9 5 】

ヘモグロビンを測定する方法としては、ヘモグロビンそのものの吸収を利用して、415 nm 近傍のピーク波長を測定するか、あるいは540 nm 近傍の波長を測定するシアンメトヘモグロビン法と S L S - ヘモグロビン法その他、ラテックス凝集法などが例として挙げられる。

【 0 0 9 6 】

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て備えているようにしたので、あらかじめ定められた手順にのっとり、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

ピン量を測定することが可能であり、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誘導体の測定を行うことができる。より好適には、前記測定キットに、さらに試料中のヘモグロビン濃度を測定可能な試薬も付加しておけば、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でき、特に、糖化ヘモグロビンを測定する場合に有用である。

【0097】

(実施の形態4)

本実施の形態4では、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によって前記試料中のヘモグロビン誘導体を変性させる変性部と、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とから構成される、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説明する。

10

【0098】

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誘導体の測定が可能となる。

【0099】

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。

【0100】

20

測定工程としては、まず、血液検体と、非イオン性界面活性剤及び酸化剤とを反応させる変性工程の後、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を含む。

【0101】

非イオン性界面活性剤及び酸化剤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ものであってもよい。

【0102】

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。

30

【0103】

また、前記ヘモグロビン誘導体濃度を算出することに加え、ヘモグロビン濃度を算出することによって、ヘモグロビンに対するヘモグロビン誘導体の存在比を算出することが可能である。このヘモグロビン濃度の測定は、ヘモグロビンそのものの吸収を利用して、415nm近傍のピーク波長を測定するか、あるいは540nm近傍の波長を測定するシアンメトヘモグロビン法やSLS-ヘモグロビン法その他、ラテックス凝集法などが例に挙げられる。

【0104】

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。

40

【0105】

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バー（空間）と、該チャンバ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。

【0106】

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

50

テムの一構成例について説明する。

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をその一部を切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。

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(a)はその分解斜視図であり、図(b)は、試薬を添加した状態を示す図である。

【0107】

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などのプラスチック樹脂が挙げられる。

【0108】

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。

【0109】

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からなる変性試薬210を、また前記下基板201と接着層202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により、形成される。また、前記上基板213と前記接着層202と前記下基板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。

【0110】

次に、前記分析システム100の動作について説明する。

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。

【0111】

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

10

20

30

40

50

転により、希釈液と血液は前記希釈攪拌部 2 0 3 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の作用により、溶血とヘモグロビン誘導体の変性を引き起こす。

【 0 1 1 2 】

次に、回転基板 1 0 4 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 2 0 7 を通じて、定量部 A 2 0 8 と定量部 B 2 0 9 まで移送させる。

【 0 1 1 3 】

前記定量部 B 2 0 9 に移送された試料液は、該定量部 B 2 0 9 において、予め保持されていたラテックス試薬 2 1 1 と混合し、ラテックス試薬 2 1 1 と該試料液中のヘモグロビン誘導体とが結合する。

10

【 0 1 1 4 】

この後、再度前記回転基板 1 0 4 をモータ 1 0 5 により所定の回転数で一定時間回転すると、定量部 A 2 0 8 に移送された試料液は検出部 A 2 0 5 へ、一方、前記定量部 B 2 0 9 でラテックス試薬 2 1 1 と混合された試料液は検出部 B 2 0 6 へ移送される。

【 0 1 1 5 】

前記検出部 B 2 0 6 に担持した凝集試薬 2 1 2 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、定量部 B 2 0 6 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。

【 0 1 1 6 】

また同時に、検出部 A 2 0 5 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。

20

【 0 1 1 7 】

前記検出部 B 2 0 6 におけるラテックス凝集阻止反応の測定は、550nm 付近の波長で測定可能であり、前記検出部 A 2 0 5 におけるヘモグロビンの測定は、415nm 付近の極大吸収を測定する方法であっても、540nm の吸収を測定する方法であっても良い。

【 0 1 1 8 】

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。

30

【 0 1 1 9 】

ここでは一例として、分析デバイス 1 0 1 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。

40

【 0 1 2 0 】

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。

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 3 0 0 は、該分析デバイス 3 0 1 に対して、光源 3 0 8 から光を照射し、透過光を受光部 3 0 9 で検出する測定部 3 1 0 とを備える。なお、図 3 中、光源 3 0 8、受光部 3 0 9 とをつなげる回路構成、あるいは該分析デバイス 3 0 1 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。

図 4 は、前記分析デバイス 3 0 1 の詳細な構成を示す図であり、図 (a) はその分解斜視図、図 (b) ~ (d) は前記分析デバイス 3 0 1 における、試薬の変性処理手順を示す

50

図である。

【0121】

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。

【0122】

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4(b)に示されるように、非イオン性界面活性剤と酸化剤からなる試薬に、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、試薬用シール305にて密封されて保持されている。

10

【0123】

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4(b)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。

【0124】

次に、前記分析システム300の動作について説明する。

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の吸光度を測定するようにする。

20

30

【0125】

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。

【0126】

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、550nm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。

【0127】

以上のように、本実施の形態4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あ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誘導体の測定を行うことができる。

40

【0128】

(実施例1)

以下、ヘモグロビン誘導体が、糖化ヘモグロビンの代表的検査項目であるHbA1cであり、非イオン性界面活性剤と共に添加する酸化剤が、フェリシアン化カリウムである場合を一例に挙げて、様々な非イオン性界面活性剤の変性効果について検証する。

【0129】

(a) 糖化ヘモグロビン標準液の作製(コントロール液の作製)

50

糖化ヘモグロビン値を測定する試薬類一式は、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社より市販されているコバス試薬 H b A 1 c を使用した。

【 0 1 3 0 】

まずラテックス凝集試薬に対する糖化ヘモグロビンの応答特性を確認する為に、キット同封の 2 4 . 6 μ M の糖化ヘモグロビン標準液に対して、 $\times 1$ 倍、 $\times 2$ 倍、 $\times 4$ 倍、 $\times 8$ 倍、 $\times 16$ 倍、 $\times 32$ 倍、 $\times 64$ 倍、 $\times 128$ 倍の希釈系列を作製した。

【 0 1 3 1 】

(b) ラテックス凝集阻止反応による糖化ヘモグロビン濃度と吸光度変化量との関係

前記 (a) において作製した各濃度の糖化ヘモグロビン標準液 2 μ L に対して、100 μ L の 100 k U / L のブタ由来ペプシン溶液を添加 (51 倍希釈) した後、3 分間処理した。次に、この反応液 102 μ L のうち、14 μ L を、560 μ L の糖化ヘモグロビンの糖化部位に特異的に結合可能なラテックス試薬溶液を入れた光路長 1 c m のプラスチックセルに加え、4 分間反応させた。さらに、この反応液に 0 . 5 μ g / m L の合成多価糖化ヘモグロビン抗原 112 μ L を加え、3 分後に 550 n m における吸光度の変化量を測定した。

【 0 1 3 2 】

図 5 は、横軸に糖化ヘモグロビン濃度、縦軸を吸光度の変化量としてプロットとした図である。なお、糖化ヘモグロビン濃度をモルから m g / d L にするには、ヘモグロビン分子量を 64500 として計算を行った。

【 0 1 3 3 】

(c) コントロール測定法においてヘモグロビン変性に要する処理時間の確認

ブタ由来ペプシンで 3 分間処理する方法によって、血液中の糖化ヘモグロビン全てを変性させ、測定できているかを確認するために、血液検体に対して最長 25 分までの変性処理を行い、ラテックス凝集阻止反応における吸光度値を測定した。この操作は、前記 (b) に記載した同じ方法で行った。

【 0 1 3 4 】

図 6 は、横軸を変性の処理時間、縦軸をヘモグロビン変性率としてプロットした図である。なお、各処理時間におけるヘモグロビン変性率は、血液検体をブタ由来ペプシンで 25 分間処理したときに算出された糖化ヘモグロビン濃度を 100 % として算出した。

【 0 1 3 5 】

図 6 によると、処理時間が 3 分以上では、算出された糖化ヘモグロビン濃度は、ほとんど変化が確認されなかったことから、3 分でヘモグロビン全てが分解処理を受けていることが判明した。よって、ブタ由来ペプシンで血液を 3 分間処理することによって、全ての糖化ヘモグロビンが検出可能であるものとし、ヘモグロビンの変性試験のコントロール処理法とした。

【 0 1 3 6 】

(d) 複数種類の非イオン性界面活性剤における、血液中のヘモグロビンの変性効果の確認

以下に示す、10 種類の非イオン性界面活性剤について、それぞれのヘモグロビン変性効果を確認した。

n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e
n - D o d e c y l - β - D - m a l t o s i d e
n - H e p t y l - β - D - t h i o g l u c o s i d e
M E G A - 8
M E G A - 9
M E G A - 10
n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e
n - O c t y l - β - D - g l u c o s i d e
S u c r o s e m o n o c a p r a t e
S u c r o s e m o n o l a u r a t e

10

20

30

40

50

【 0 1 3 7 】

変性方法は、0.1～9%までの濃度の前述した10種類の非イオン性界面活性剤と、0.25%フェリシアン化カリウム（酸化剤）とを含む水溶液100μLを作製し、2μLの血液検体を添加（51倍に希釈）した後、25℃にて3分間放置した。次に、反応液102μLのうち14μLを、糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス試薬溶液560μLと4分間反応させた。その後、112μLの凝集試薬と反応させ、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。

【 0 1 3 8 】

変性の確認は、まずブタ由来ペプシンで処理した同じ血液検体のラテックス凝集阻止反応時における吸光度値から、血液検体中の糖化ヘモグロビン濃度を算出し（コントロール値）、次に前述した10種類の各非イオン性界面活性剤で同じ血液検体を処理した場合におけるラテックス凝集阻止反応の吸光度値から、血液中の糖化ヘモグロビン濃度を求めた。さらに、前記ペプシン処理したコントロールに対して、前記各非イオン性界面活性剤で処理した血液検体は、何%の糖化ヘモグロビンが検出されているかを求め、これを、ヘモグロビンの変性割合とした。

【 0 1 3 9 】

図7は、横軸に非イオン性界面活性剤濃度を、縦軸に変性割合をプロットしたものを示す図である。

図7によると、非イオン性界面活性剤の種類によって変性効果が高い非イオン性界面活性剤濃度は異なるが、いずれもコントロールであるペプシン処理と同等のヘモグロビン変性効果を確認することができた。

【 0 1 4 0 】

（e）非イオン性界面活性剤が血液中のヘモグロビンを効率的に変性させうる、非イオン性界面活性剤濃度の確認

以下に示す、5種類の非イオン性界面活性剤について、それぞれのヘモグロビン変性効果を確認した。

Sucrose monocapr ate
 Sucrose monolaur ate
 n - Nonyl - β - D - thiomaltoside
 n - Decyl - β - D - maltoside

【 0 1 4 1 】

変性方法は、0.05%から0.5%までの濃度の前述した5種類の非イオン性界面活性剤と、0.25%フェリシアン化カリウム（酸化剤）とを含む水溶液1mLを作製し、2μLの血液検体を添加（501倍に希釈）した後、25℃にて3分間放置した。次に、反応液1002μLのうち140μLを、糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス溶液560μLと4分間反応させた。その後、112μLの凝集試薬と反応させ、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。変性の確認は、前記d）と同様、まずブタ由来ペプシンで処理した同じ血液検体のラテックス凝集阻止反応時における吸光度値から、血液検体中の糖化ヘモグロビン濃度を算出し（コントロール値）、次に前述した10種類の各非イオン性界面活性剤で同じ血液検体を処理した場合におけるラテックス凝集阻止反応の吸光度値から、血液中の糖化ヘモグロビン濃度を求め、前記ペプシンで変性したものをコントロールとして、各非イオン性界面活性剤の変性率を求めた。

【 0 1 4 2 】

図8は、横軸に非イオン性界面活性剤濃度を、縦軸に糖化ヘモグロビンの変性割合をプロットした図であり、図9は、横軸に各非イオン性界面活性剤のCMC（臨界ミセル濃度）と該非イオン性界面活性剤濃度との比を、縦軸に糖化ヘモグロビンの変性割合をプロットした図である。

【 0 1 4 3 】

図8によれば、図7に示したものと同様、ヘモグロビン変性効果が高い非イオン性界面活性剤濃度は種類によって異なるが、図9に示したように、各非イオン性界面活性剤のC

M C に対する非イオン性界面活性剤濃度で比較すると、いずれも C M C に対して、2 倍以上の濃度において、変性効果が高まっていることを確認することが出来た。

【 0 1 4 4 】

(f) ヘモグロビンの変性に必要な、酸化剤 (フェリシアン化カリウム) の濃度の確認
非イオン性界面活性剤である、S u c r o s e m o n o c a p r a t e について、フェリシアン化カリウムによる変性効果を確認した。

【 0 1 4 5 】

変性方法は、0 . 5 % の S u c r o s e m o n o c a p r a t e について、0、0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、0 . 2 5、0 . 5 % のフェリシアン化カリウムを含む水溶液 1 m L を作製し、2 μ L の血液検体を添加 (5 0 1 倍希釈) した後、2 5 にて 3 分間放置した。

10

【 0 1 4 6 】

次に、反応液 1 0 0 2 μ L のうち 1 4 0 μ L を、糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス試薬溶液 5 6 0 μ L と 4 分間反応させた。その後、1 1 2 μ L の凝集試薬と反応させ、3 分後に 5 5 0 n m における吸光度の変化量を測定した。なお、この試験においては、血液検体のヘマトクリット値 (H c t) を 2 0、4 5、7 0 % に調整したものを使用した。

【 0 1 4 7 】

変性の確認は、前記 d) と同様、まずブタ由来ペプシンで処理した血液検体のラテックス凝集阻止反応時における吸光度値 (コントロール値) から、血液検体中の糖化ヘモグロビン濃度を算出し、次に非イオン性界面活性剤で同じ血液検体を処理した場合におけるラテックス凝集阻止反応の吸光度値から、血液中の糖化ヘモグロビン濃度を求めた。そして、前記ペプシン処理したコントロールに対して、前記非イオン性界面活性剤で処理した血液検体は、何 % の糖化ヘモグロビンが検出されているかを求め、これを、ヘモグロビンの変性割合とした。

20

【 0 1 4 8 】

図 1 0 (a) は、横軸にフェリシアン化カリウム濃度を、縦軸にヘモグロビンの変性割合をプロットした図であり、図 1 0 (b) は、横軸にフェリシアン化カリウム量とヘモグロビン量との比を、縦軸にヘモグロビンの変性割合をプロットした図である。

【 0 1 4 9 】

図 1 0 (a) によれば、非イオン性界面活性剤単独では、ヘモグロビン変性効果は弱い
が、非イオン性界面活性剤と同時に 0 . 1 % 以上のフェリシアン化カリウムで同時に処理することにより、ヘマトクリット値が 7 0 % の血液検体であっても十分変性することがわかった。

30

【 0 1 5 0 】

また図 1 0 (b) によれば、ヘモグロビン量に対してフェリシアン化カリウム量が 2 倍以上あれば、血液中のヘモグロビン全てを変性することが明らかであり、フェリシアン化カリウムの存在がヘモグロビンの変性に深く関与していることがわかった。

【 0 1 5 1 】

(g) 非イオン性界面活性剤がラテックス凝集反応 (免疫アッセイ反応) に与える影響の確認

40

以下に示す 9 種類の各非イオン性界面活性剤が、ラテックス凝集反応に与える影響を確認した。

n - D e c y l - β - D - m a l t o s i d e

n - H e p t y l - β - D - t h i o g l u c o s i d e

M E G A - 8

M E G A - 9

M E G A 1 0

n - N o n y l - β - D - t h i o m a l t o s i d e

n - O c t y l - β - D - g l u c o s i d e

50

Sucrose monocapr ate

Sucrose monolaur ate

【0152】

変性方法は、前述のラテックス試薬溶液に、各非イオン性界面活性剤溶液を加えた後、凝集試薬を加え、3分後に550nmの吸光度の変化量を測定した。

【0153】

免疫アッセイ反応への影響の確認は、非イオン性界面活性剤の最終濃度が0.25~1.4%前後になるように加えた時のラテックス凝集反応の吸光度変化量と、非イオン性界面活性剤を加えなかった時のラテックス凝集反応の吸光度変化量とを比較した。

【0154】

また、同時に、前述と同様の方法により、特許文献3に記載されるイオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム(SLS)についても、0.1%と0.25%濃度において、ラテックス凝集反応への影響を確認した。

【0155】

図11は、横軸に界面活性剤の濃度を、縦軸にコントロールの吸光度変化量を100%とした時の、各非イオン性界面活性剤の吸光度変化量比をプロットした図である。

【0156】

図11によれば、イオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム(SLS)に関しては、濃度の増大によって極端なラテックス凝集反応の低下傾向を示したが、非イオン性界面活性剤は、ラテックス凝集反応への影響は緩やかであることがわかった。

【0157】

また、非イオン性界面活性剤のうち、特に、n-Decyl-β-D-maltosid、n-Nonyl-β-D-thiomaltoside、MEGA10、Sucrose monocapr ate、Sucrose monolaur ateなどは、十分なヘモグロビン変性効果を保有する濃度においても、ラテックス凝集反応への影響が少ないことが確認できた。これは、ヘモグロビン変性溶液を、そのままラテックス凝集反応、もしくは、ラテックス凝集阻止反応における反応用の試薬組成としても、十分使用可能であることを示唆するものである。

【0158】

(h) 非イオン性界面活性剤存在下でのラテックス凝集阻止反応(免疫アッセイ反応)効果の確認

糖化ヘモグロビン濃度が異なる3種類の血液検体を準備した。

そして、まず、血液2μLに対して100μLの100kU/Lのブタ由来ペプシン溶液を添加(51倍希釈)した後、3分間処理し、この反応液102μLのうち、14μLを、560μLの糖化ヘモグロビンの糖化部位に特異的に結合可能なラテックス標識抗体溶液を入れた光路長1cmのプラスチックセルに加え、4分間反応させた。さらにこの反応液に0.5μg/mLの合成多価糖化ヘモグロビン抗原112μLを加え、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。同じ実験を各濃度の血液検体に対しても行った。

【0159】

次に、血液2μLに対して100μLの0.5% Sucrose monocapr ate及び0.25%フェリシアン化カリウム溶液を添加し、3分間処理し、この反応液102μLのうち、14μLを、560μLの糖化ヘモグロビンの糖化部位に特異的に結合可能なラテックス試薬、及び0.5% Sucrose monocapr ate、及び0.25%フェリシアン化カリウム溶液を入れた光路長1cmのプラスチックセルに加え、4分間反応させた。さらに、この反応液に0.5μg/mLの合成多価糖化ヘモグロビン抗原112μLを加え、3分後に550nmにおける吸光度の変化量を測定した。ペプシンの場合と同様に、同じ実験を各濃度の血液検体に対しても行った。

【0160】

図12は、横軸に糖化ヘモグロビン濃度を、縦軸に吸光度の変化量をプロットした図で

ある。

図 1 2 によれば、糖化ヘモグロビン濃度に応じた吸光度が得られていることから、0.5% Sucrose monocrate、及び0.25%フェリシアン化カリウム溶液でヘモグロビン誘導体の変性反応を行い、且つその変性試薬組成が含まれる状態でラテックス凝集阻止反応を行うことが可能であることがわかった。

【0161】

(実施例 2)

以下、ヘモグロビン誘導体の存在比を測定する方法について検証した。

(a) ヘモグロビン濃度のコントロールの測定

ヘモグロビンの測定は、和光純薬工業株式会社より販売されている「ヘモグロビン B - テストワコー」を使用した。これは S L S - ヘモグロビン法によりヘモグロビンを検出する方法である。

【0162】

まず、ヘモグロビンの標準曲線の作製を以下の手順にて行った。

3.5mM ラウリル硫酸ナトリウム溶液 5 mL に対して、5 g / d L、10 g / d L、15.0 g / d L のヘモグロビン標準液を、それぞれ 20 μ L ずつ加えた反応液と、15.0 g / d L のヘモグロビン標準液 40 μ L とを加えた反応液を作製し、光路長 1 cm のセル内で 540 nm の吸光度を測定した。図 1 3 は、15 g / d L のヘモグロビン標準液を 40 μ L 加えた反応液のヘモグロビン濃度を 30 g / d L として、横軸にヘモグロビン濃度を、縦軸に吸光度をプロットした図であり、これをヘモグロビン濃度測定のコントロールとした。

【0163】

(b) 糖化ヘモグロビンの存在比の算出

次に、測定対象とする血液検体 A、B それぞれ 20 μ L を、3.5mM ラウリル硫酸ナトリウム溶液 5 mL に対して加えた。この反応液の 540 nm における吸光度を測定し、図 1 3 の既知のヘモグロビン濃度に対する吸光度データから、前記血液検体 A、B のヘモグロビン濃度を求めた。次に、それぞれ 0.5% 濃度の Sucrose monocrate / 0.25% フェリシアン化カリウム溶液 100 μ L に、前記 2 μ L の血液検体 A、B を加え、3 分間放置した。次に、反応液 102 μ L のうち、14 μ L を糖化ヘモグロビン抗体で標識したラテックス溶液 560 μ L と 4 分間反応させた。その後、112 μ L の凝集試薬と反応させ、3 分後に 550 nm における吸光度の変化量を測定した。

【0164】

図 1 4 は、血液検体 A、B のヘモグロビン濃度、糖化ヘモグロビン濃度、及び、全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの占める割合を示す図である。

【0165】

また、図 1 5 は、前述した血液検体 A、B を、糖化ヘモグロビン測定の標準法とされる東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計 (H L C - 723 G H b V) にて、糖化ヘモグロビンの占める割合を測定した結果である。

【0166】

図 1 4、1 5 を比較すれば、非常に相関性の高い結果を示していることがわかる。これに、0.5% Sucrose monocrate / 0.25% フェリシアン化カリウム溶液で血液検体を処理することによって、十分なヘモグロビンの変性が行われ、糖化ヘモグロビン濃度を算出することが可能であることが示唆された。

【0167】

なお、ここでは、非イオン性界面活性剤が、Sucrose monocrate の場合のみについて実験結果を示したが、変性効果を有する他の非イオン性界面活性剤においても同様の結果を示す。

【0168】

(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0.5cm×横0.5cm×高さ1cm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、糖化ヘモグロビン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。

【0169】

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、0.5% Sucrose monooxalate 溶液及び0.25% フェリシアン化カリウムからなる溶液0.2mLと、合成多価糖化ヘモグロビン抗原とを注入し、溶液試薬用シール305にて密封した後、前記上部ケース301と前記下部ケース302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。

【0170】

(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。

【0171】

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混合し、この状態で3分間放置後、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、540nmの吸光度を測定する。

【0172】

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、3分間放置後、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3分後に、測定部310によって550nmの吸光度を測定する。

【0173】

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、540nmによって、シアンメトヘモグロビンを測定し、550nm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、前記血液検体A及びBについて行う。

【0174】

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溶液、及び糖化ヘモグロビン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、及び糖化ヘモグロビン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糖化ヘモグロビン濃度を求めた。

【0175】

図16は、血液検体A、Bそれぞれの、糖化ヘモグロビン濃度及びヘモグロビン濃度、さらに糖化ヘモグロビンの存在比を示す図である。

【0176】

図16によれば、本分析システム300にて、糖化ヘモグロビンの占める割合を測定した結果は、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、糖化ヘモグロビンの占める割合を測定した結果(図15参照)と非常に近く、本分析システム300によって、正確な糖化ヘモグロビン濃度の測定が可能であることが確

10

20

30

40

50

認された。

【産業上の利用可能性】

【0177】

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、正確なヘモグロビン誘導体の測定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】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。

【図2】図2は、本発明の実施の形態4における分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図(a)はその分解斜視図であり、図(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である。

10

【図3】図3は、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である。

【図4】図4は、本発明の実施の形態4における分析デバイスの詳細な構成を示す図であり、図(a)は、その分解斜視図であり、図(b)～(d)は、分析デバイスにおける変性処理手順を示す図である。

【図5】図5は、本発明の実施例1における、ブタ由来ペプシンで標準液を処理することによって得られるコントロール曲線を示す図である。

【図6】図6は、本発明の実施例1における、ブタ由来ペプシンで血液検体を処理した時間と、ヘモグロビン変性率との関係を示す図である。

20

【図7】図7は、本発明の実施例1における、各非イオン性界面活性剤と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図8】図8は、本発明の実施例1における、各非イオン性界面活性剤と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図9】図9は、本発明の実施例1における、各非イオン性界面活性剤のCMCに対する濃度比と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

【図10】図10(a)は、本発明の実施例1における、各フェリシアン化カリウム濃度と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図であり、図10(b)は、本発明の実施例1における、ヘモグロビン量に対するフェリシアン化カリウム量の比と、ヘモグロビンの変性率との関係を示す図である。

30

【図11】図11は、本発明の実施例1における、各非イオン性界面活性剤と、イオン性界面活性剤とが、ラテックス凝集反応に及ぼす影響を説明する図である。

【図12】図12は、本発明の実施例1における、糖化ヘモグロビンを変性しラテックス凝集阻止反応を行った場合の測定結果と、従来方法により得た測定結果とを比較した図である。

【図13】図13は、本発明の実施例2における、ヘモグロビンBテストワコーによるヘモグロビン測定結果を説明する図である。

【図14】図14は、本発明の実施例2における、血液検体A、Bのヘモグロビン濃度と、糖化ヘモグロビン濃度と、糖化ヘモグロビンの存在比とを示す図である。

【図15】図15は、本発明の実施例2における、東ソー社の自動糖化ヘモグロビン分析計による血液検体A、Bの測定結果を示す図である。

40

【図16】図16は、本発明の実施例3における分析システムで、血液検体A、Bを測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

【0179】

100, 300 分析システム

101, 301 分析デバイス

102 光源

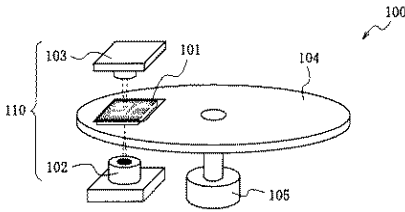
103 ディテクタ

104 回転基板

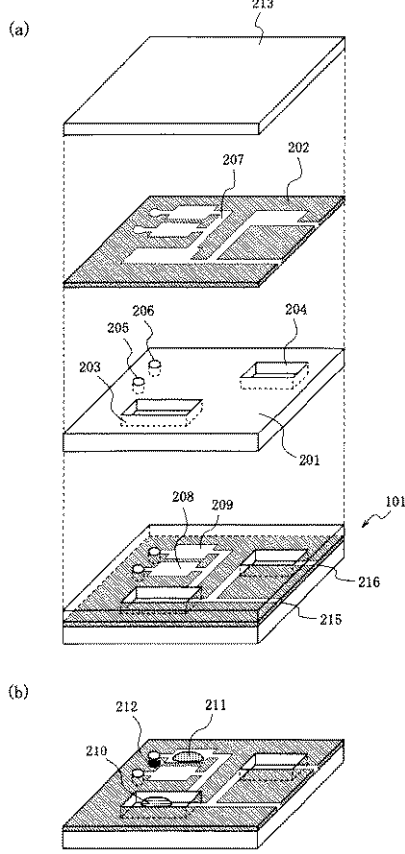
50

1 0 5	モータ	
1 1 0 , 3 1 0	測定部	
2 0 1	下基板	
2 0 2	接着層	
2 0 3	希釈攪拌部	
2 0 4	希釈液保持部	
2 0 5	検出部 A	
2 0 6	検出部 B	
2 0 7	流路	
2 0 8	定量部 A	10
2 0 9	定量部 B	
2 1 0	変性試薬	
2 1 1	ラテックス試薬	
2 1 2	凝集試薬	
2 1 3	上基板	
2 1 5	検体注入口	
2 1 6	希釈液注入口	
3 0 2 a	上部ケース	
3 0 2 b	下部ケース	
3 0 3	ラテックス試薬	20
3 0 4	試薬	
3 0 5	溶液試薬用シール	
3 0 6	注入口	
3 0 7	ケース用シール	
3 0 8	光源	
3 0 9	受光部	
【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	30
【補正の内容】		

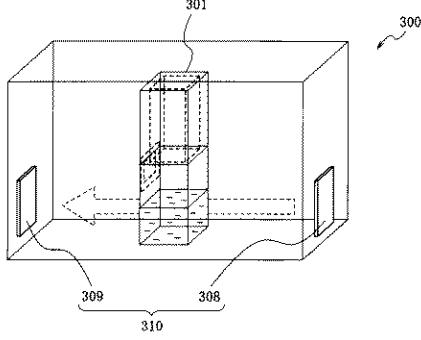
【図 1】



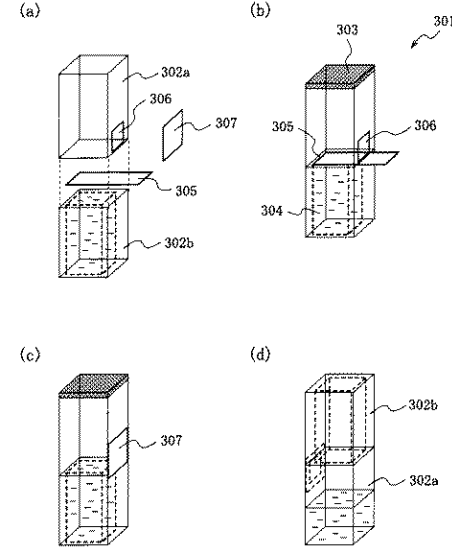
【図 2】



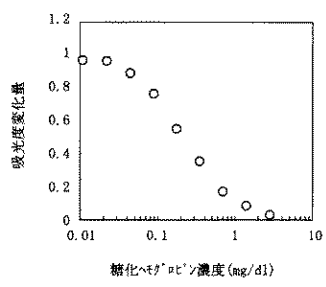
【図 3】



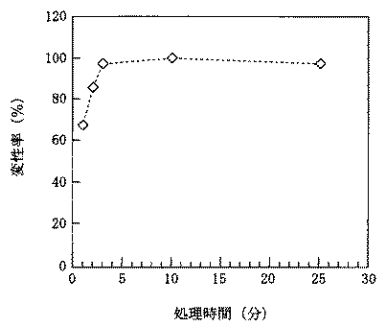
【図 4】



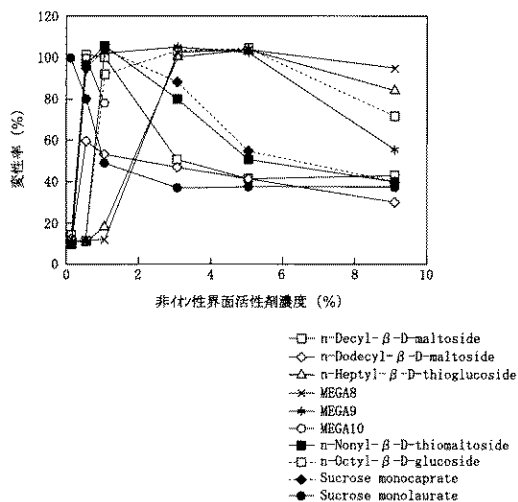
【図 5】



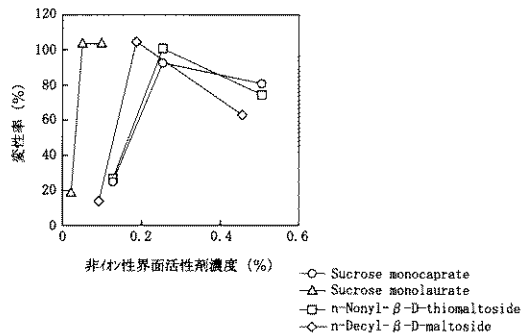
【図 6】



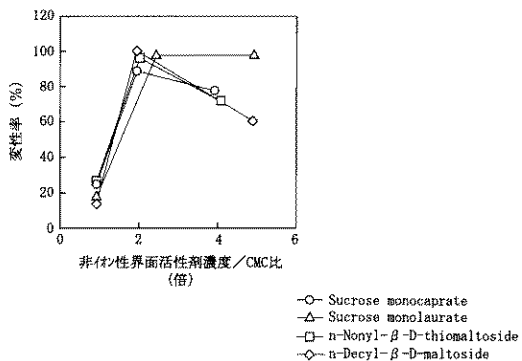
【図 7】



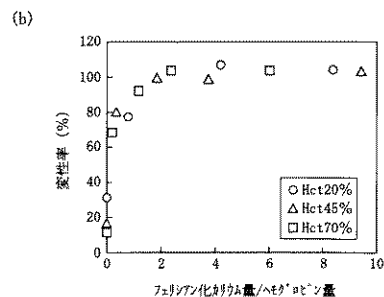
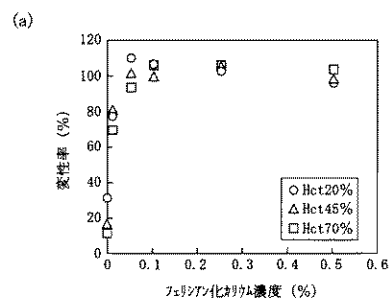
【図 8】



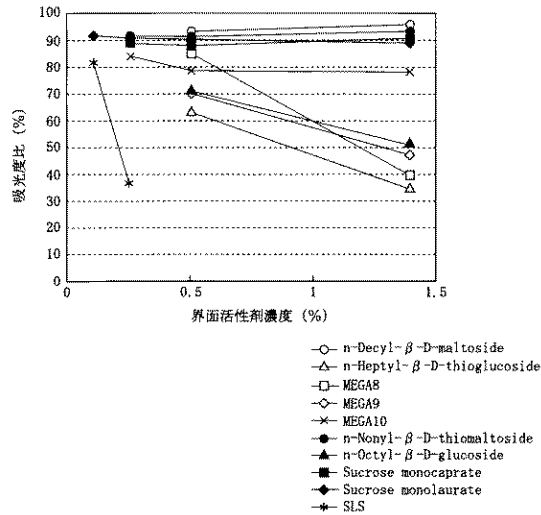
【図 9】



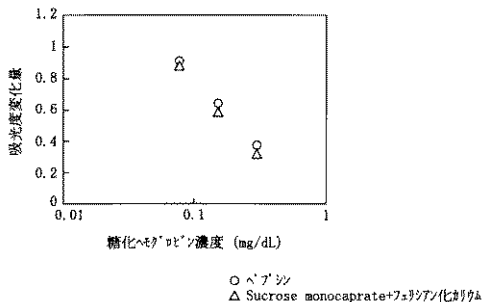
【図 10】



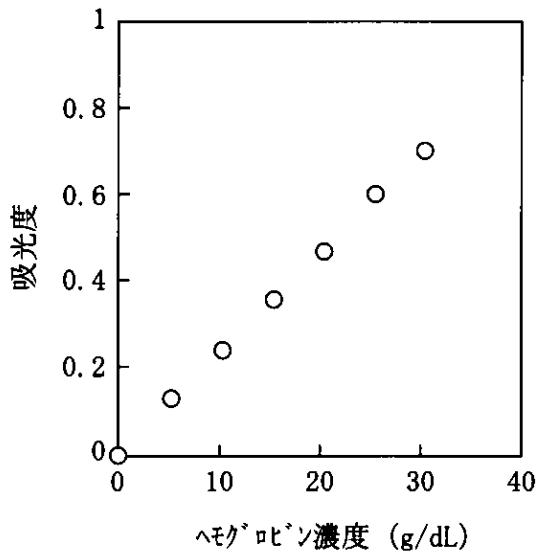
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【図 14】

	検体A	検体B
糖化ヘモグロビン濃度 (g/dL)	0.69	0.99
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.3	14.5
全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの割合 (%)	4.5	6.8

【図 15】

	検体A	検体B
全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの割合 (%)	4.5	6.7

【図 16】

	検体A	検体B
糖化ヘモグロビン濃度 (g/dL)	0.68	0.97
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.1	14.7
全ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビンの割合 (%)	4.5	6.6

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01), **G01N33/531**(2006.01)

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)

G01N33/48(2006.01) - **G01N33/98**(2006.01)

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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 A (Arkray, Inc.), 18 December, 2003 (18.12.03), Page 12, line 14 to page 13, line 4; page 18, lines 18 to 24; Claims & CN 1659441 A & EP 1515143 A & US 2005/202399 A	1-21
A	JP 2002-340895 A (International Reagents Corp.), 27 November, 2002 (27.11.02), Claims; Par. Nos. [0012] to [0014] (Family: none)	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 April, 2006 (28.04.06)

Date of mailing of the international search report
16 May, 2006 (16.05.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307781

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	JP 2005-114359 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 28 April, 2005 (28.04.05), Claims; Par. Nos. [0010], [0012] & US 2005/145490 A1	1-21
P,A	JP 2006-058295 A (Axis-Shield Diagnostics Ltd.), 02 March, 2006 (02.03.06), Claims & EP 1624307 A & GB 0417212 D & GB 0507955 D & US 2006/030050 A	1-21

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/307781	
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), G01N33/531(2006.01)			
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. G01N33/48(2006.01)~G01N33/98(2006.01)			
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 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）			
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 A（アークレイ株式会社）2003.12.18 第12ページ第14行-第13ページ第4行、第18ページ第18 行-24行、クレーム等参照 & CN 1659441 A & EP 1515143 A & US 2005/202399 A	1-21	
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】 （ファミリー無し）	1-21	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 28.04.2006		国際調査報告の発送日 16.05.2006	
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） 加々美 一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/307781
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
P, 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 2005/145490 A1	1-21
P, A	JP 2006-058295 A (アクシス—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 & EP 1624307 A & GB 0417212 D & GB 0507955 D & US 2006/030050 A	1-21

フロントページの続き

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

(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)	测量血红蛋白衍生物的方法，用于其的试剂组合物，测定试剂盒，分析装置和分析系统		
公开(公告)号	JPWO2006112339A1	公开(公告)日	2008-12-11
申请号	JP2007521210	申请日	2006-04-12
申请(专利权)人(译)	松下电器产业有限公司		
[标]发明人	田中宏橋 田中正教 北脇文久		
发明人	田中 宏橋 田中 正教 北脇 文久		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/72 G01N33/5302 G01N33/721		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/531.B		
优先权	2005116870 2005-04-14 JP		
其他公开文献	JP4957547B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

将含有血液成分样品溶液用包含非离子表面活性剂和氧化剂的变性剂处理，使样品溶液中的血红蛋白衍生物变性，然后利用对变性部位特异的抗体进行免疫测定测量血红蛋白衍生物在样品中的量。因此，在进行血红蛋白衍生物的分析时，能够使变性剂对免疫反应的不良影响最小化，并且能够迅速且可靠地进行血红蛋白的变性。

【図 1】

