

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-31250

(P2016-31250A)

(43) 公開日 平成28年3月7日(2016.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 J	2 G O 4 5
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 C	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 U	
GO 1 N 33/72 (2006.01)	GO 1 N 33/545 B	
	GO 1 N 33/53 V	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-152364 (P2014-152364)	(71) 出願人	000155023 株式会社堀場製作所 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地
(22) 出願日	平成26年7月25日 (2014.7.25)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀
		(74) 代理人	100163658 弁理士 小池 順造
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 標的タンパク質の測定試薬および該試薬を用いた測定方法

(57) 【要約】

【課題】ラテックス凝集法によって、全血を遠心分離することなく、標的タンパク質を測定する試薬を提供することである。

【解決手段】平均粒径が0.02 μm ~ 2.0 μmである不溶性担体粒子であって、該粒子1mg当たり1.0 μg ~ 110 μgの親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を含む、タンパク質の測定試薬など。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

平均粒径が $0.02\ \mu\text{m}$ ~ $2.0\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子であって、該粒子 $1\text{mg}$ 当たり $1.0\ \mu\text{g}$ ~ $110\ \mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を含む、標的タンパク質の測定試薬。

**【請求項 2】**

平均粒径が $0.05\ \mu\text{m}$ ~ $0.3\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子であって、該粒子 $1\text{mg}$ 当たり $2\ \mu\text{g}$ ~ $70\ \mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を含む、請求項 1 に記載の試薬。

**【請求項 3】**

不溶性担体粒子がスチレン、塩化ビニル、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類および酢酸ビニルからなる群から少なくとも 1 つ選択される分子の重合体または共重合体粒子、またはスチレン単位とブタジエン単位とを有する共重合体粒子である、請求項 1 または 2 に記載の試薬。

10

**【請求項 4】**

不溶性担体粒子がポリスチレン粒子である、請求項 3 に記載の試薬。

**【請求項 5】**

親水性高分子がデキストラン、アルブミン、カゼイン、セルロースおよびアルブミンからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の試薬。

**【請求項 6】**

親水性高分子がウシ血清アルブミンである、請求項 5 に記載の試薬。

**【請求項 7】**

標的タンパク質に特異的な免疫複合体を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の試薬。

20

**【請求項 8】**

標的タンパク質が糖化ヘモグロビンである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬。

**【請求項 9】**

以下の工程を含む、標的タンパク質の免疫学的測定方法：

( 1 ) 平均粒径が $0.02\ \mu\text{m}$ ~ $2.0\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子を $1\text{mg}$ 当たり $1.0\ \mu\text{g}$ ~ $110\ \mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆する工程、

( 2 ) 該不溶性担体粒子に全血試料を接触させる工程、

( 3 ) 該不溶性担体粒子に標的タンパク質に特異的な免疫複合体を接触させる工程、

( 4 ) 生成した凝集物の濁度を測定する工程。

30

**【請求項 10】**

該工程 ( 1 ) が、平均粒径が $0.05\ \mu\text{m}$ ~ $0.3\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子を $1\text{mg}$ 当たり $2\ \mu\text{g}$ ~ $70\ \mu\text{g}$ の高親水性高分子で被覆する工程である、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

不溶性担体粒子がスチレン、塩化ビニル、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類および酢酸ビニルからなる群から少なくとも 1 つ選択される分子の重合体または共重合体粒子、またはスチレン単位とブタジエン単位とを有する共重合体粒子である、請求項 9 または 10 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

不溶性担体粒子がポリスチレン粒子である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

親水性高分子がデキストラン、アルブミン、カゼインおよびセルロースからなる群から選択される、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 14】**

親水性高分子がウシ血清アルブミンである、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

標的タンパク質が糖化ヘモグロビンである、請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、全血試料中の標的タンパク質に対する測定試薬および該試薬を用いた全血試料中の標的タンパク質の測定方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

赤血球中のヘモグロビンに糖が結合した糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビン）、特にヘモグロビン鎖のN末端パリン残基が糖化されたヘモグロビンA1c（以下、「HbA1c」ということがある）は、その値が過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病の診断や糖尿病の経過観察に適した指標として広く使用されている。

10

## 【0003】

HbA1cの測定方法としては、HPLC法、キャピラリー電気泳動法、酵素法及び免疫学的測定法等が知られている。免疫学的測定法においては、HbA1cの糖化されている部位（ヘモグロビン鎖N末端）に特異的な抗体を用いてHbA1cを測定するが、当該糖化部位はヘモグロビタンパク質の表面に存在するのではなく、ヘモグロビタンパク質の内部に埋もれており、生理的な条件下では抗体が結合し難い場所に存在することが判明している。このような性状より、当該糖化部位をエピトープとして認識する抗体を効率良く反応させて測定を行うために、当該エピトープをヘモグロビタンパク質の表面に露出させる技術が以前より開発されている。当該エピトープをヘモグロビタンパク質表面に露出させる代表的な手段としては、ヘモグロビンをラテックス粒子のような不溶性担体粒子に吸着させてヘモグロビンを処理する方法が報告されている（特許文献1）。ヘモグロビタンパク質を吸着させた該粒子は、露出したエピトープに対する抗体を用いることで反応液中において凝集するため、凝集した粒子による濁りを散乱光や透過光として光学的に検知することでヘモグロビタンパク質を定量することが可能である（ラテックス凝集法）。

20

## 【0004】

しかし、ラテックス凝集法によってヘモグロビタンパク質を定量する場合、全血をそのまま溶血させて赤血球からヘモグロビンを取り出し検体試料として用いると全血に含まれる血漿タンパク質の存在によって粒子に非特異的凝集が生じるため、濁度に基づく光学的検出が実施できないという課題があった。結果として、溶血処理する前に全血を遠心分離し、血漿成分を除去するという余分な工程が必要であった。この点、ウシ血清アルブミン（BSA）は、従来からタンパク質や細胞が接着しないという性質が知られていることから、ヘモグロビタンパク質以外のタンパク質による粒子の非特異的凝集を阻害する目的で、粒子表面をBSAで被覆しようとする試みが検討されている。しかし、BSAで粒子表面を被覆すれば、ヘモグロビタンパク質自体のエピトープの露出にも影響を及ぼすため、ラテックス凝集法においては全血をそのまま試料として使用できないという課題は未解決のままであった。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

40

【特許文献1】特許第2677753号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明は、ラテックス凝集法において全血を試料として標的タンパク質を検出するための試薬、および該試薬を用いた標的タンパク質の測定方法を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者らは、ラテックス粒子を特定の範囲のBSAで被覆した場合、該ラテックス粒子はHbA1cを吸着するが、吸着したHbA1cはエピトープ露出についてBSAの影響を受けないこ

50

とを見出した。さらに、HbA1cをラテックス粒子に吸着させる際に試料として全血試料を用いても、前記ラテックス粒子に凝集反応を生じさせる際に非特異的凝集を生じさせなかったことを見出した。本発明者らは、上記知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、不溶性担体粒子を特定の範囲の量の親水性高分子で被覆し、全血試料をそのまま用いて、該全血試料中に含まれる標的タンパク質を測定する方法および該方法に用いることができる試薬を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、

[ 1 ] 平均粒径が $0.02\ \mu\text{m}$ ~ $2.0\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子であって、該粒子1mg当たり $1.0\ \mu\text{g}$ ~ $110\ \mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を含む、標的タンパク質の測定試薬；

10

[ 2 ] 平均粒径が $0.05\ \mu\text{m}$ ~ $0.3\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子であって、該粒子1mg当たり $2\ \mu\text{g}$ ~ $70\ \mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を含む、[ 1 ]に記載の試薬；

[ 3 ] 不溶性担体粒子がスチレン、塩化ビニル、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類および酢酸ビニルからなる群から少なくとも1つ選択される分子の重合体または共重合体粒子、またはスチレン単位とブタジエン単位とを有する共重合体粒子である、[ 1 ]または[ 2 ]に記載の試薬；

[ 4 ] 不溶性担体粒子がポリスチレン粒子である、[ 3 ]に記載の試薬；

[ 5 ] 親水性高分子がデキストラン、アルブミン、カゼイン、セルロースおよびアルブミンからなる群から選択される、[ 1 ]~[ 4 ]のいずれか1つに記載の試薬；

20

[ 6 ] 親水性高分子がウシ血清アルブミンである、[ 5 ]に記載の試薬；

[ 7 ] 標的タンパク質に特異的な免疫複合体を含む、[ 1 ]~[ 6 ]のいずれか1つに記載の試薬；

[ 8 ] 標的タンパク質が糖化ヘモグロビンである、[ 1 ]~[ 7 ]のいずれか1つに記載の試薬；

[ 9 ] 以下の工程を含む、標的タンパク質の免疫学的測定方法：

( 1 ) 平均粒径が $0.02\ \mu\text{m}$ ~ $2.0\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子を1mg当たり $1.0\ \mu\text{g}$ ~ $110\ \mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆する工程、

( 2 ) 該不溶性担体粒子に全血試料を接触させる工程、

( 3 ) 該不溶性担体粒子に標的タンパク質に特異的な免疫複合体を接触させる工程、

30

( 4 ) 生成した凝集物の濁度を測定する工程；

[ 10 ] 該工程( 1 )が、平均粒径が $0.05\ \mu\text{m}$ ~ $0.3\ \mu\text{m}$ である不溶性担体粒子を1mg当たり $2\ \mu\text{g}$ ~ $70\ \mu\text{g}$ の高親水性高分子で被覆する工程である、[ 9 ]に記載の方法；

[ 11 ] 不溶性担体粒子がスチレン、塩化ビニル、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類および酢酸ビニルからなる群から少なくとも1つ選択される分子の重合体または共重合体粒子、またはスチレン単位とブタジエン単位とを有する共重合体粒子である、

[ 9 ]または[ 10 ]に記載の方法；

[ 12 ] 不溶性担体粒子がポリスチレン粒子である、[ 11 ]に記載の方法；

[ 13 ] 親水性高分子がデキストラン、アルブミン、カゼインおよびセルロースからなる群から選択される、[ 9 ]~[ 12 ]のいずれか1つに記載の方法；

40

[ 14 ] 親水性高分子がウシ血清アルブミンである、[ 13 ]に記載の方法；

[ 15 ] 標的タンパク質が糖化ヘモグロビンである、[ 9 ]~[ 14 ]のいずれか1つに記載の方法；

などを提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、全血を予め遠心分離し、血漿成分を除去する工程を経ることなく、直接全血を試料として用いて、HbA1cを定量することができる。さらに、本発明によれば、血漿成分を除去する必要がないため、同時に血漿成分中のタンパク質も標的タンパク質に選択することができる。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】ヘモグロビン濃度と吸光度(660nm)との関係を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、平均粒径が $0.02\mu\text{m}$ ~ $2.0\mu\text{m}$ である不溶性担体粒子であって、該粒子1mg当たり $1.0\mu\text{g}$ ~ $110\mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を含む、標的タンパク質の測定試薬(以下、本発明の試薬)を提供するものである。

【0012】

本明細書において不溶性担体粒子とは、免疫学的測定試薬として一般的に用いられているものであれば特に制限されず、適宜色素で着色されてよい。

不溶性担体は、種々のモノマーを重合又は共重合させることによって得ることができる。ここで重合又は共重合させるモノマーとしては、例えばスチレン、クロロスチレン、  
-メチルスチレン、ジビニルベンゼン、ビニルトルエン等の不飽和芳香族類、例えばアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、マレイン酸、フマル酸等の不飽和カルボン酸類、  
例えばアクリル酸メチル、メタクリル酸メチル、アクリル酸エチル、メタクリル酸エチル、  
アクリル酸-n-ブチル、メタクリル酸-n-ブチル等のアクリル酸エステル類または  
メタクリル酸エステル類、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等のアクリル酸ニトリル  
類またはメタクリル酸ニトリル類、アクロレイン、メタクロレイン等のアクリル酸アル  
デヒド類またはメタクリル酸アルデヒド類、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-メ  
チロール-アクリルアミド、N-メチロール-メタクリルアミド、メチレンビスアクリル  
アミド、メチレンビスメタクリルアミド等のアクリル酸アミド類またはメタクリル酸アミ  
ド類、ブタジエン、イソプレン等の共役ジエン類、酢酸ビニル、ビニルピリジン、N-  
ビニルピロリドン、塩化ビニル、塩化ビニリデン、臭化ビニル等のビニル単量体等を挙げ  
ることができ、好ましくは、スチレン、塩化ビニル、酢酸ビニル、アクリル酸エステル類  
またはメタクリル酸エステル類等が挙げられ、より好ましくは、ポリスチレンである。ま  
た、共重合させるモノマーとしては、スチレン、ブタジエン、イソブチレン、イソプレン  
等から選択される2種以上の組み合わせが挙げられ、好ましくは、スチレンとブタジエン  
の組み合わせが挙げられる。これらのモノマーは、表面特性、比重等によって適宜選択さ  
れ、1種を単独で又は2種以上を混合して使用することができる。

【0013】

不溶性担体の形状は粒子状であり、その平均粒径は粒子表面のタンパク質と測定対象物質との凝集反応の結果生じる凝集体が肉眼又は光学的に検出できるに十分な大きさが望ましい。そのような平均粒径は、通常 $0.02\mu\text{m}$ ~ $2.0\mu\text{m}$ であり、好ましくは $0.05\mu\text{m}$ ~ $0.3\mu\text{m}$ である。

【0014】

本明細書において不溶性担体粒子は、ラテックスであってもよい。ここでラテックスは、緩衝液中において不溶性担体粒子が懸濁されている懸濁液をいう。不溶性担体粒子を懸濁させる緩衝液は、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液、イミダゾール緩衝液またはトリス緩衝液が安定性の点から好ましい。ラテックスにおける不溶性担体粒子の濃度としては、通常、0.01~1.5重量パーセント、好ましくは、0.05~0.5重量パーセントである。

【0015】

既に述べた通り、全血試料を対象として未感作ラテックス凝集法を用いる場合、全血中に含まれる血漿タンパク質の存在によって粒子に非特異的凝集が生じるため、予め全血を遠心分離し、血漿成分を除去するという余分な工程が必要であった。BSAは、タンパク質や細胞を吸着しない性質が報告されており、血漿タンパク質による粒子の非特異的凝集を抑制することができるが、過剰量のBSAで粒子表面を被覆すれば標的タンパク質のエピト  
ープの露出まで抑えられ、さらに粒子表面への標的タンパク質の吸着が阻害されるので、  
標的タンパク質を測定することができないという問題があった。従って、当業者にとって

粒子をBSAで被覆するという発想は考えられなかった。

しかし、上記の課題を解決するべく、本発明者らは、ラテックス粒子を特定の範囲の量のBSAで被覆した場合、全血試料を遠心分離することなく用いて、HbA1cを測定することができることを見出した。本発明によって、全血を予め遠心分離し、血漿成分を除去する工程を経ることなく、HbA1cを定量することができる。さらに、血漿成分を除去する必要がないため、同時に血漿成分中のタンパク質も標的タンパク質に選択することができる。

以上の課題を解決すべく、本発明の平均粒径が $0.02\mu\text{m}\sim 2.0\mu\text{m}$ である不溶性担体粒子は、該粒子1mg当たり $1.0\mu\text{g}\sim 110\mu\text{g}$ の親水性高分子で被覆されている。

#### 【0016】

本明細書において親水性高分子とは、天然高分子または非天然高分子であって、親水性を有するものであればどのようなものであってもよい。そのような親水性高分子は、デキストラン、アルブミン（卵白アルブミン、血清アルブミン、ラクトアルブミン）、カゼイン、セルロース等が挙げられ、好ましくは血清アルブミンが挙げられ、特に好ましくはウシ血清アルブミンが挙げられる。

不溶性担体粒子は、平均粒径が $0.02\mu\text{m}\sim 2.0\mu\text{m}$ の該粒子1mg当たり、 $1.0\mu\text{g}\sim 110\mu\text{g}$ の前記親水性高分子で被覆される。好ましくは、本発明の不溶性担体粒子の平均粒径が $0.05\mu\text{m}\sim 0.3\mu\text{m}$ である場合は、該粒子1mg当たり、 $2\mu\text{g}\sim 70\mu\text{g}$ の前記親水性高分子で被覆される。

不溶性担体粒子を親水性高分子で被覆する方法としては、例えば、下記の実施例に記載の方法に従って実施することができる。具体的には、前記の平均粒径を有する不溶性担体粒子と前記親水性高分子を前記の緩衝液中で混合し、25～30、30分～4時間攪拌し、得られた混合液を4、15,000～20,000rpmで15分～1時間遠心分離し、上清を除去して得られた沈査に再度緩衝液を加え、不溶性担体粒子を再分散させて、親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子を作製することができる。

#### 【0017】

本発明の試薬は、さらに標的タンパク質に特異的な免疫複合体を含んでもよい。本明細書において標的タンパク質とは、全血（血球成分、血漿成分）に含まれるタンパク質であればどのようなものであってもよいが、例えば、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン、フルクトサミン等のヘモグロビタンパク質、腫瘍マーカー等の糖鎖結合タンパク質などが挙げられる。

#### 【0018】

糖化ヘモグロビンとしては、ヘモグロビンA1cが挙げられる。ヘモグロビンA1cとは、ヘモグロビンの鎖N末端のアミノ酸残基であるバリンの-アミノ基にグルコースが非酵素的に結合し、グリコシル化ヘモグロビンとなったものである。ヘモグロビンA1cの血中量は糖尿病の比較的長期の血糖コントロール状態を反映する。したがって、このヘモグロビンA1cを測定することは、血糖コントロール状態を知る上で臨床的に極めて有意義である。

#### 【0019】

腫瘍マーカーとしては、糖鎖部分がタンパク質内部に存在しているような腫瘍特異マーカーが想定される。この腫瘍マーカーの血中量は腫瘍の有無および進行状態を反映する。したがって、この腫瘍マーカーを測定することは、腫瘍の早期発見および治療方針を決定する上で臨床的に極めて有意義である。

#### 【0020】

標的タンパク質を特異的に認識する免疫複合体は、標的タンパク質を特異的に認識する一次抗体と該一次抗体を認識する二次抗体からなる。免疫複合体以外ではビオチン化一次抗体とアビジンの結合体も用いることができる。

#### 【0021】

標的タンパク質を特異的に認識する一次抗体は、該標的タンパク質やその抗原性を有する部分ペプチドを免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。本明細書において、一次抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mA

10

20

30

40

50

b) 等の天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、およびこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えばF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、sFv、dsFv、sdAb等が挙げられる(Exp. Opin. Ther. Patents, Vol.6, No.5, p.441-456, 1996)。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgG又はIgMであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはIgGである。また、本発明においては、該標的タンパク質を特異的に認識する抗体として、市販の抗体を使用することもまた好ましい。

10

**【0022】**

標的タンパク質を特異的に認識する一次抗体を認識する二次抗体は、前記一次抗体を特異的に認識する抗体であればよく、前記一次抗体の抗原性を有する部分ペプチド(例えば、Fc領域)を免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。本明細書において、二次抗体は、一次抗体と同様に、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、結合性断片等であってよく、抗体のクラスも、特に限定されない。また、本発明においては、二次抗体として、市販の抗体を使用することもまた好ましい。

**【0023】**

本発明の試薬に含まれる標的タンパク質を特異的に認識する免疫複合体は、一次抗体と二次抗体が予め複合体形成した状態で保存されていてもよいし、個別に存在する状態で保存され、使用する直前に免疫複合体として用時調製されてもよい。

20

**【0024】**

本発明の試薬は、前記免疫複合体に加えて、標的タンパク質を測定するための反応において必要な他の物質であって、共存状態で保存することにより反応に悪影響を及ぼさない物質をさらに含有することができる。あるいは、該試薬は、標的タンパク質を測定するための反応において必要な他の物質を含有する別個の試薬とともに提供されてもよい。当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液等が挙げられる。

**【0025】**

本発明はまた、前記の試薬を用いた標的タンパク質の免疫学的測定方法(以下、本発明の方法)を提供する。本発明の方法は以下の工程を含む:

30

- (1) 平均粒径が0.02 μm~2.0 μmである不溶性担体粒子を1mg当たり1.0 μg~110 μgの親水性高分子で被覆する工程、
- (2) 該不溶性担体粒子に全血試料を接触させる工程、
- (3) 該不溶性担体粒子に標的タンパク質に特異的な免疫複合体を接触させる工程、
- (4) 生成した凝集物の濁度を測定する工程。

**【0026】**

本発明の方法の工程(1)において、不溶性担体粒子、親水性高分子および不溶性担体粒子を親水性高分子で被覆する方法は、前記本発明の試薬における記載と同様であってよい。

**【0027】**

本発明の方法の工程(2)において、前記工程(1)において得られた平均粒径が0.02 μm~2.0 μmである不溶性担体粒子であって、該粒子1mg当たり1.0 μg~110 μgの親水性高分子で被覆された不溶性担体粒子(好ましくは、平均粒径が0.05 μm~0.3 μmである不溶性担体粒子)と全血試料の接触は、例えば、後述の実施例の記載の方法に従って実施することができる。具体的には、全血試料中の血漿中に存在するタンパク質を標的とする場合は、前記工程(1)において得られた不溶性担体粒子を直接全血試料と混合、攪拌することによって、血漿中の標的タンパク質を前記不溶性担体粒子表面に吸着させることができる。また、全血試料中の血球中に存在するタンパク質を標的とする場合は、予め全血試料を精製水等で溶血させた後、該処理後の全血試料を前記工程(1)において得られた不溶性担

40

50

体粒子と混合、攪拌することによって、血球中の標的タンパク質を前記不溶性担体粒子表面に吸着させることができる。

【0028】

本発明の方法の工程(3)において、前記工程(2)において得られた標的タンパク質を吸着させた不溶性担体粒子と標的タンパク質に特異的な免疫複合体の接触は、例えば、後述の実施例に記載の方法に従って実施することができる。具体的には、前記工程(2)において得られた標的タンパク質を吸着させた不溶性担体粒子を該標的タンパク質に特異的な一次抗体および該一次抗体に特異的な二次抗体と混合、攪拌することによって、免疫複合体を介して標的タンパク質を吸着させた不溶性担体粒子同士を凝集させることができる。標的タンパク質に特異的な一次抗体および該一次抗体に特異的な二次抗体は、前記不溶性担体粒子と順次混合してもよいし、同時に混合してもよい。また、予め標的タンパク質に特異的な一次抗体および該一次抗体に特異的な二次抗体による免疫複合体を形成させた後、前記不溶性担体粒子と混合してもよい。

10

【0029】

本発明の方法の工程(4)において、前記工程(3)において得られた生成した凝集物の濁度の測定は、公知の方法に従って行うことができ、例えば、後述の実施例の記載の方法に従って実施することができる。具体的には、生成した凝集物に660nmの測定波長を照射し、吸光度を測定することができる。該吸光度は、予め作成された標的タンパク質の濃度と吸光度に関する標準曲線を基に、標的タンパク質の濃度を決定することができる。

20

【実施例】

【0030】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0031】

ラテックス試薬作製方法

粒子径0.15 $\mu$ mの10%ポリスチレンラテックス懸濁液(藤倉化成製)1容に16.7mMリン酸緩衝液(PH7.2)9容を加えて1%ラテックス懸濁液とした。これにラテックス粒子1mgあたりBSAが0.008mg添加されるようにBSA含有16.7mMリン酸緩衝液(PH7.2)を加え25で2時間攪拌した。その後、4、18000rpmで45分間遠心分離した。得られたラテックス沈査にトリス緩衝液(PH8.2)を加えてラテックス粒子を再分散させ0.1%BSA被覆ラテックス試薬を作製した。

30

測定方法

正常全血サンプルを遠心分離し、血球層と血漿層に分けた。血球層を赤血球過多の全血検体とみなし、先に分離した血漿で倍々希釈( $\times 1$ 、 $\times 2$ 、 $\times 4$ 、 $\times 8$ 、 $\times 16$ )を作った。これらをヘモグロビン濃度の異なる全血検体とみなし、それぞれ10 $\mu$ Lに対して、200 $\mu$ L、400 $\mu$ L、800 $\mu$ L、1mLの精製水を加えて溶血させた。このように溶血させた検体のそれぞれを被検試料とした。

生化学分析装置を用い、被検試料3.2 $\mu$ LとBSA被覆ラテックス試薬120 $\mu$ Lを混合し5分間攪拌後、抗HbA1cモノクローナル抗体と抗マウスIgGヤギ抗血清の免疫複合体を40 $\mu$ Lを加えて660nmの測定波長で吸光度を測定することによって、BSA被覆ラテックス試薬の凝集を確認した。

40

測定結果

検体の希釈倍率によらず、ヘモグロビン濃度が変わっても、ほぼ一定の吸光度を示しており、ヘモグロビン濃度の違いが測定値に影響しないことが確認できた。

また、ヘモグロビン濃度の変化に伴って、血漿濃度も変化しており、血漿の影響も受けにくいことがわかった(図1)。

【産業上の利用可能性】

【0032】

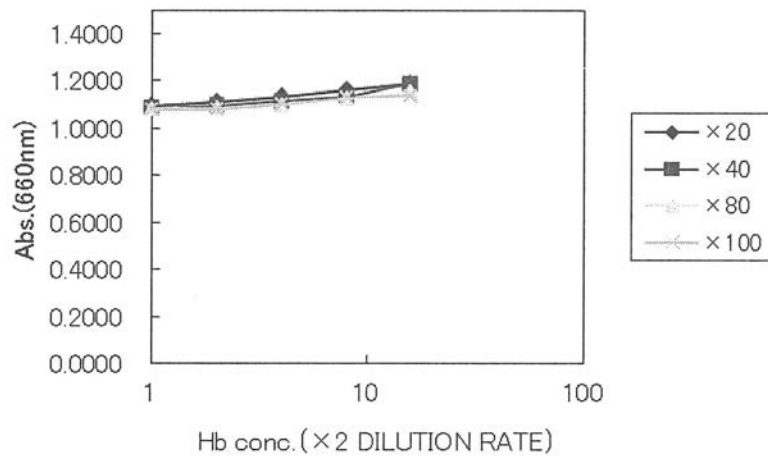
本発明のタンパク質測定試薬を用いることにより、全血を予め遠心分離し、血漿成分を除去する工程を経ることなく、直接全血を試料として用いて、HbA1cを定量することがで

50

きる。さらに、本発明によれば、血漿成分を除去する必要がないため、同時に血漿成分中のタンパク質も標的タンパク質に選択することができる。

【図1】

	Hb conc.(×2 DILUTION RATE)				
	1	2	4	8	16
×20	1.0962	1.1132	1.1334	1.1612	1.1891
×40	1.0855	1.0946	1.1147	1.1325	1.1863
×80	1.0822	1.0847	1.0979	1.1251	1.1517
×100	1.0790	1.0791	1.1005	1.1298	1.1371



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/72 A  
G 0 1 N 33/543 5 8 1 W

(74)代理人 100174296  
弁理士 當麻 博文

(72)発明者 岸岡 洋  
京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内

(72)発明者 入倉 大祐  
京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内

(72)発明者 内ヶ島 美岐子  
京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 株式会社堀場製作所内

Fターム(参考) 2G045 CA25 DA45 FA14 FB03 GC11

专利名称(译)	靶蛋白的测定试剂和使用该试剂的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016031250A</a>	公开(公告)日	2016-03-07
申请号	JP2014152364	申请日	2014-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
[标]发明人	岸岡洋 入倉大祐 内ヶ島美岐子		
发明人	岸岡 洋 入倉 大祐 内ヶ島 美岐子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/53 G01N33/72		
FI分类号	G01N33/543.581.J G01N33/543.581.C G01N33/543.581.U G01N33/545.B G01N33/53.V G01N33/72.A G01N33/543.581.W		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/DA45 2G045/FA14 2G045/FB03 2G045/GC11		
代理人(译)	高島肇 当麻 博文		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)	(21) 出願番号	特願2014-152364 (P2014-152364)	(71) 出願人	000155023
	(22) 出願日	平成26年7月25日 (2014. 7. 25)		株式会社堀場製作所 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地
要解决的问题提供一种测量目标蛋白质的试剂，无需通过乳胶凝集法离心全血。 溶液：不溶性载体颗粒，平均粒径为0.02μm至2.0μm，含有不溶性载体颗粒，每1 mg颗粒涂有1.0μg至110μg的亲水性聚合物。 【选择图】无	(74) 代理人	100080791	弁理士	高島 一
	(74) 代理人	100125070	弁理士	土井 京子
	(74) 代理人	100136629	弁理士	鎌田 光宣
	(74) 代理人	100121212	弁理士	田村 弥栄子
	(74) 代理人	100117743	弁理士	村田 美由紀
	(74) 代理人	100163658	弁理士	小池 順造
	最終頁に続く			