202020453

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202020453 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108135133　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 09 月 27 日

(51)Int. Cl.：　*G01N33/53　(2006.01)*　*G01N33/72　(2006.01)*

(30)優先權：2018/09/28　日本　JP2018-184017

(71)申請人：日商積水醫療股份有限公司 (日本) SEKISUI MEDICAL CO., LTD.　(JP)
日本

(72)發明人：大田美恵子 OTA, MIEKO (JP) ；宮崎修 MIYAZAKI, OSAMU (JP) ；妹尾理子 SEO, SATOKO (JP) ；山本光章 YAMAMOTO, MITSUAKI (JP) ；西尾朋久 NISHIO, TOMOHISA (JP)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：14 項　圖式數：0　共 28 頁

(54)名稱

糖化血紅素(%)之測定方法

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種糖化血紅素（%）測定方法及測定試劑，即便於包含血紅素之血液檢體中包含 HbC 或 HbS 等異常血紅素之情形時，亦可準確測定血液中之糖化血紅素（%）。

本發明提供一種藉由組合抗糖化血紅素單株抗體及針對抗糖化血紅素單株抗體之單株抗體這 2 種單株抗體，從而即便為包含異常血紅素之檢體亦可準確測定血液中之糖化血紅素（%）的方法及用以實施該方法之測定試劑。

無

202020453

202020453

【發明摘要】

【中文發明名稱】　糖化血紅素（%）之測定方法

【英文發明名稱】　METHOD FOR MEASURING GLYCATED HEMOGLOBIN (%)

【中文】

本發明之課題在於提供一種糖化血紅素（%）測定方法及測定試劑，即便於包含血紅素之血液檢體中包含HbC或HbS等異常血紅素之情形時，亦可準確測定血液中之糖化血紅素（%）。

本發明提供一種藉由組合抗糖化血紅素單株抗體及針對抗糖化血紅素單株抗體之單株抗體這2種單株抗體，從而即便為包含異常血紅素之檢體亦可準確測定血液中之糖化血紅素（%）的方法及用以實施該方法之測定試劑。

【英文】

無

【指定代表圖】　無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　糖化血紅素（%）之測定方法

【英文發明名稱】　METHOD FOR MEASURING GLYCATED HEMOGLOBIN (%)

【技術領域】

【0001】　本發明係關於一種利用免疫反應之糖化血紅素（%）之測定方法及測定試劑。更詳細而言，係關於一種使用多種單株抗體之糖化血紅素（%）之測定方法及測定試劑。

【先前技術】

【0002】　血紅素A1c（以下，有時僅表示為HbA1c）係如下糖化血紅素，其於由2條α鏈與2條β鏈所構成且具有異四聯體（heterotetramer）結構之血紅素之β鏈N末端之胺基酸殘基之α-胺基不經酵素鍵結有葡萄糖。已知該HbA1c之血中比率反映糖尿病之相對長期之血糖控制狀態，測定HbA1c於瞭解血糖控制狀態方面於臨床上極其有意義。作為HbA1c之免疫學測定方法，已知如下技術。

【0003】　專利文獻1中揭示有一種HbA1c（%）之測定方法，其使未致敏之乳膠與包含之HbA1c之樣本反應，其次，使抗HbA1c抗體反應，測定吸附有HbA1c之乳膠之經由抗HbA1c抗體之凝集。於該測定方法中，單株抗體僅使用1種針對HbA1c之抗體。

【0004】　專利文獻2中揭示有一種凝集免疫分析法，其使樣本中之HbA1c吸附於乳膠等不溶性載體粒子，並與抗HbA1c單株抗體（第一抗體）反應，其後，進一步使選擇性地與該單株抗體結合之第二抗體反應，選擇性地凝集不溶性載體粒子。於該分析法中，使用2種抗體，但單株抗體僅係第一抗體之抗HbA1c單

株抗體，第二抗體係與抗HbA1c單株抗體結合之多株抗體，並非單株抗體。

【0005】 又，作為現有之製品，已知由包含乳膠之第1試劑與包含抗人HbA1c單株抗體及抗小鼠IgG抗體之結合物之第2試劑所構成的HbA1c（%）測定試劑（非專利文獻1、非專利文獻2）。根據本測定試劑，血液中之HbA1c吸附於乳膠，上述抗體之結合物與吸附於乳膠之HbA1c發生免疫反應，以濁度求出此時產生之乳膠之凝集。

【0006】 但是，已知正常之血紅素如上所述係由2條α鏈與2條β鏈所構成之異四聯體，但是一部分非洲人或美國黑人之血液中存在β鏈之一部分變異之異常血紅素。具體而言為血紅素（Hb）之β鏈之自N末端起第6個Glu變異成Val之HbS、或同樣第6個Glu變異成Lys之HbC等。保持具有此種變異序列之異常血紅素而具有HbS症狀、HbC症狀者於日本人中極少，但仍以一定比率存在。而且，藉由現有之HbA1c測定方法測定此種異常血紅素症狀之患者血液後，可知HbA1c（%）之測定值（嚴格而言為糖化HbS、糖化HbC等糖化血紅素（%）之測定值）與HPLC法相比高值化，無法進行準確之測定（參照下述實施例中之比較例2）。

【0007】 專利文獻3中記載有如下方法，以無關糖化血紅素之形態而檢測出樣本中之所有糖化血紅素、即檢測出糖化人血紅素A、糖化人血紅素S、糖化人血紅素C為目的，利用脯胺酸特異性內酞酶消化經內酞酶處理之含人血紅素之樣本，對獲得之糖化五肽之水準進行定量，藉此檢測存在於樣本中之糖化血紅素。利用脯胺酸特異性內肽酶之含有血紅素A、血紅素S及血紅素C之樣本之消化係利用在血紅素A、血紅素S及血紅素C各情形時均同樣產生糖化五肽這一情況。

上述糖化五肽之定量係利用使用小鼠單株抗HbA1c抗體之凝集抑制測定法進行。但是，本方法需要2種肽酶處理步驟，操作繁瑣。

先前技術文獻

專利文獻

【0008】　專利文獻1：日本特開平6-66795號公報

專利文獻2：日本特開平6-167495號公報

專利文獻3：日本特表2011-503632

非專利文獻

【0009】　非專利文獻1：Rapidia（註冊商標）Auto HbA1c隨附文件

非專利文獻2：Determiner（註冊商標）LHbA1c隨附文件

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0010】　本發明之課題係提供一種糖化血紅素（%）測定方法及測定試劑，即便於包含血紅素之血液檢體中包含HbS或HbC等異常血紅素之情形時，亦可不受其影響而準確測定血中之糖化血紅素（%）。

[解決課題之技術手段]

【0011】　本發明者為了解決上述課題，進行了銳意研究，結果發現，藉由組合抗HbA1c單株抗體及針對抗HbA1c單株抗體之單株抗體，即便為異常血紅素檢體亦可準確測定血液中之糖化血紅素（%），從而完成了本發明。即，本發明具有以下構成。

（1）一種測定樣本中之糖化血紅素（%）之方法，其包括如下步驟：

藉由使不溶性載體與樣本接觸，而使樣本中之糖化血紅素吸附於不溶性載體之步驟；

藉由使吸附於不溶性載體之糖化血紅素與抗糖化血紅素單株抗體接觸，而形成抗糖化血紅素單株抗體、糖化血紅素及不溶性載體之複合體之步驟；以及

藉由使該複合體與對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體接觸，而使不

溶性載體凝集之步驟。

（2）如（1）記載之糖化血紅素（%）測定方法，其中，對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體為不與人IgG反應之抗體。

（3）如（1）或（2）記載之糖化血紅素（%）測定方法，其中，不溶性載體為乳膠。

（4）如（1）至（3）中任一項所記載之糖化血紅素（%）測定方法，其中，樣本為全血或血球。

（5）如（1）至（4）中任一項所記載之測定方法，其包括光學檢測凝集度之步驟。

（6）一種糖化血紅素（%）測定試劑，其包含至少以下2種單株抗體。

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體

（7）如（6）記載之糖化血紅素（%）測定試劑，其進而包含不溶性載體。

（8）如（7）記載之糖化血紅素（%）測定試劑，其包含第1試劑及第2試劑，且

第1試劑包含不溶性載體，第2試劑包含至少以下2種單株抗體。

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體

（9）如（6）至（8）中任一項所記載之測定試劑，其中，對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體為不與人IgG反應之抗體。

（10）如（6）至（9）中任一項所記載之糖化血紅素（%）測定試劑，其中，不溶性載體為乳膠。

（11）一種糖化血紅素（%）測定套組，其包含（6）至（10）中任一項所記載之糖化血紅素（%）測定試劑。

（12）一種單株抗體，其與結合於人糖化血紅素之單株抗體反應，且不與人IgG反應。

（13）一種包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之偏差降低方法，其包括使至少以下2種單株抗體與不溶性載體及樣本接觸之步驟。

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體

（14）一種包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之高值化抑制方法，其包括使至少以下2種單株抗體與不溶性載體及樣本接觸之步驟。

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體

[發明之效果]

【0012】 根據本發明，不僅於血液檢體包含正常之血紅素之情形時，即便於包含HbS或HbC等異常血紅素之情形時，亦能夠進行準確之糖化血紅素（%）之免疫測定。又，根據本發明，能夠提供一種試劑，其由於可不特別篩選異常血紅素檢體而皆同樣地進行測定，故而適於自動連續測定。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

【0013】 （抗糖化血紅素單株抗體）

本發明之單株抗體至少具有第1單株抗體及第2單株抗體，於糖化血紅素(%)之測定時組合其等使用。第1單株抗體只要為與人糖化血紅素特異性反應之單株抗體即可，可為任意單株抗體。與人糖化血紅素特異性反應係指與人糖化血紅

素反應，但與未糖化之人血紅素實質上不反應。

【0014】　本發明之第1單株抗體係識別HbA1c等糖化血紅素中之特異性β鏈N末端區域的單株抗體，但該β鏈N末端區域埋藏而存在於血紅素之高次結構中，因此為了利用抗糖化血紅素單株抗體免疫測定糖化血紅素，通常需要檢體之變性處理。然而，認為藉由使糖化血紅素吸附於乳膠等不溶性載體，糖化血紅素之結構產生變化，藉此糖化血紅素之β鏈N末端區域露出，能夠進行利用抗糖化血紅素抗體之免疫測定。

【0015】　（針對抗糖化血紅素單株抗體之單株抗體）

本發明之第2單株抗體只要為至少具有以下1）之性質之單株抗體即可，可為任意單株抗體。理想為進而具有2）之性質之單株抗體。

1）對抗糖化血紅素單株抗體反應

2）不與人IgG反應

【0016】　組合本發明之第1單株抗體及第2單株抗體之糖化血紅素（%）之測定方法係即便為樣本中正常血紅素之變異體HbS或HbC等異常血紅素檢體亦不易受該等變異之影響的糖化血紅素（%）之測定方法。本發明之糖化血紅素之測定對象包含此種異常血紅素經糖化之糖化HbS、糖化HbC及正常之糖化血紅素（HbA1c）全部。即，包含任一糖化血紅素之檢體均可獲得準確之糖化血紅素（%）測定值。

現有之使用IgG等多株抗體作為第二抗體之免疫凝集法中，有若存在異常血紅素則糖化血紅素（%）之測定值高值化而偏差正常值之問題。但是，藉由如本發明之測定方法將第二抗體設為針對抗糖化血紅素單株抗體之單株抗體，雖然原因不確定，但即便樣本中存在異常血紅素，亦能夠準確地測定糖化血紅素（%）。

本說明書中，於第1單株抗體及第2單株抗體依序進行與各自之抗原反應之

步驟之情形時，有時將第1單株抗體稱為1次抗體，將第2單株抗體稱為2次抗體。

【0017】　又，關於單株抗體與抗原之反應性，「反應」、「識別」、「結合」係以相同含義使用。

本發明之抗體與某化合物「不反應」係指與某化合物實質上不反應，例如於下述實施例中係指於利用抗原固相化ELISA之讀板儀之測定中未達0.1 Abs。

【0018】　用以獲取第1單株抗體之抗原為糖化血紅素即可，典型而言較佳為使用HbA1c，HbA1c可為HbA1c整體，亦可為其一部分。於下述實施例中，使用HbA1c作為糖化血紅素，使用HbA0作為未糖化之血紅素而獲取本發明之第1單株抗體。因此，將該情形時之抗糖化血紅素單株抗體特別稱為抗HbA1c單株抗體。

又，作為用以獲取第2單株抗體之抗原而被識別之第1單株抗體可為單株抗體整體，亦可為其一部分。

【0019】　本發明之抗體可藉由如下方式容易地製造：使作為抗原之使糖化肽（f-VHLT，f-VHLTPEEKYYC：f意指果糖基化）結合於載體蛋白而成之物質（以下稱為糖化肽結合蛋白）溶解於磷酸鹽緩衝生理鹽水等溶劑，並向動物投予該溶液進行免疫。作為載體蛋白，可使用牛血清白蛋白、匙孔螺血藍蛋白、卵白蛋白等。亦可視需要向上述溶液添加適宜之佐劑後，使用乳液（emulsion）進行免疫。作為佐劑，除油中水型乳劑、水中油中水型乳劑、水中油型乳劑、脂質體、氫氧化鋁凝膠等通用之佐劑以外，亦可使用來自生物成分之蛋白質或肽性物質等。例如，可良好地使用弗氏不完全佐劑或弗氏完全佐劑等。佐劑之投予路徑、投予量、投予時期並無特別限定，理想為適當進行選擇以可於對抗原免疫之動物中增強所需之免疫應答。

【0020】　用於免疫之動物之種類亦無特別限定，較佳為哺乳動物，例如可使用小鼠、大鼠、兔等，更佳為可使用小鼠。動物之免疫依據一般方法進行即

可，例如可藉由將抗原之溶液、較佳為與佐劑之混合物注射至動物之皮下、皮內、靜脈或腹腔內而進行免疫。免疫應答通常視免疫之動物種類及系統而不同，因此理想為免疫排程根據使用之動物適當進行設定。抗原投予較佳為於最初之免疫後反覆進行數次。

【0021】　於獲得單株抗體之情形時，繼而進行以下操作，但並不限定於此，關於單株抗體本身之製造方法，例如可依據Antibodies, A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory Press,（1988））中記載之方法進行。

【0022】　最終免疫後，自免疫動物摘出抗體產生細胞即脾臟細胞或淋巴結細胞，與具有高增生能力之骨髓瘤細胞進行細胞融合，藉此可製作融合瘤。細胞融合較佳為使用抗體產生能力（質、量）較高之細胞，又，骨髓瘤細胞較佳為與融合之抗體產生細胞之來源動物具有相容性。細胞融合可依據該領域中公知之方法進行，例如可採用聚乙二醇法、使用仙台病毒之方法、利用電流之方法等。獲得之融合瘤可依據公知之方法進行增生，可確認產生之抗體之性質並選擇所需之融合瘤。融合瘤之選殖例如可藉由極限稀釋（limiting dilution）法或軟洋菜法等公知之方法進行。

【0023】　對獲取第1單株抗體之方法進行說明。

產生第1單株抗體之融合瘤之選擇可考慮產生之抗體用於實際測定之條件而有效率地進行。例如可藉由利用ELISA法、RIA法等選擇產生對HbA1c反應之抗體之融合瘤而獲得。具體而言，可藉由如下方式等獲得：利用首先使培養上清液中之單株抗體與固相化之糖化肽結合蛋白反應，其次與固相化之HbA0反應的抗原固相化ELISA法等，選擇產生對HbA1c顯示高反應性且不與HbA0反應之單株抗體之融合瘤。

【0024】　藉由大量培養如此篩選之融合瘤，可製造具有所需特性之單株抗體。大量培養之方法並無特別限定，例如可列舉：於適宜之培養基中培養融合

瘤，於培養基中產生單株抗體之方法；或向哺乳動物之腹腔內注射融合瘤進行增生，於腹水中產生抗體之方法等。單株抗體之純化例如可適當組合陰離子交換層析法、親和層析法、硫酸銨區分法、PEG區分法、乙醇區分法等而進行。

【0025】 其次，產生第2單株抗體之融合瘤之選擇係藉由選擇產生與第1單株抗體即抗糖化血紅素單株抗體反應之抗體之融合瘤而進行。又，為了降低非特異性反應，較佳為於上述步驟之後進一步追加選擇與人IgG之反應性低於小鼠IgG之抗體之步驟。

具體而言，可經過如下兩步驟獲得：首先，自培養上清液中之單株抗體藉由抗原固相化ELISA法等選擇對抗糖化血紅素單株抗體顯示高反應性之融合瘤；以及選擇與人IgG之反應性低於小鼠IgG者。

【0026】 作為本發明之抗體，除抗體分子整體以外，亦能夠使用具有抗原抗體反應活性之抗體之功能性片段，除如上所述經過對動物之免疫步驟而獲得者以外，亦能夠使用利用基因重組技術獲得者或嵌合抗體。作為抗體之功能性片段，例如可列舉F（ab'）2、Fab，該等功能性片段可藉由利用蛋白質分解酵素（例如胃蛋白酶或木瓜酶等）對如上所述獲得之抗體進行處理而製造。

【0027】 又，本發明之第2單株抗體可作為固定於不溶性載體上之固定(固相）化抗體使用，或作為經下述業者周知慣用之標記物質標記之標記抗體使用。此種固定化抗體或標記抗體皆包含於本發明之範圍。例如可藉由於不溶性載體上物理地吸附或化學地結合（可經由適當之間隔基）單株抗體而製造固定化抗體。作為不溶性載體，可使用由聚苯乙烯樹脂等高分子基材、玻璃等無機基材、纖維素或洋菜糖等多糖類基材等所構成之不溶性載體，其形狀無特別限定，可選擇板狀（例如微板或膜）、珠粒或者微粒子狀（例如乳膠粒子）、筒狀（例如試管）等任意形狀。

【0028】 藉由將本發明之第2單株抗體利用可結合之標記物質標記而製成

標記抗體，可測定樣本中之糖化血紅素（%）。又，亦可使用能夠與本發明之第2單株抗體結合之標記抗體、標記蛋白A或標記蛋白G等。作為標記物質，例如可列舉：酵素、螢光物質、化學發光物質、生物素、抗生物素蛋白或放射性同位素、金膠體粒子、著色乳膠等。作為標記物質與抗體之結合法，可使用業者能夠利用之戊二醛法、順丁烯二醯亞胺法、二吡啶硫醚法或過碘酸法等方法，但固定化抗體或標記抗體之種類及其等之製造方法並不限定於上述例。例如，於使用過氧化酶或鹼性磷酸酶等酵素作為標記物質之情形時，可使用該酵素之特異性基質（於酵素為山葵過氧化酶之情形時，例如為o-苯二胺或者3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，於為ALP之情形時，為對硝基苯基磷酸酯等）測定酵素活性，於使用生物素作為標記物質之情形時，通常至少使抗生物素蛋白或者酵素修飾抗生物素蛋白反應。

【0029】　於本說明書中，有時將「不溶性載體」表現為「固相」，將使抗原或抗體物理或化學地載持於不溶性載體或者載持於不溶性載體之狀態表現為「固定」、「固定化」、「固相化」、「致敏」、「吸附」、「結合」。又，「檢測」或「測定」之用詞係以包含糖化血紅素之存在之證明及/或定量等之含義使用。

【0030】　作為使用本發明之抗體之測定方法中之檢測對象之「樣本」，只要為可包含糖化血紅素之樣本即可，主要可列舉來自活體（生物）之體液。具體而言，為血球或全血。存在直接使用該等樣本之情形，亦存在藉由檢體稀釋液進行稀釋、或實施其他預處理後使用之情形。

【0031】　作為由本發明提供之測定用試劑之態樣，只要為可測定糖化血紅素（%）之試劑即可，無特別限定。以下，以作為代表性之粒子凝集免疫分析法之乳膠免疫凝集法（以下稱為LTIA法）為例分別進行說明。

【0032】　＜粒子凝集免疫分析法：（LTIA法）＞

用以檢測存在於樣本中之糖化血紅素（%）之測定用試劑分別至少需要以下

之要素：

（a）第1單株抗體

（b）第2單株抗體

（c）不溶性載體粒子。

【0033】　本測定用試劑可良好地用於LTIA法。使用之乳膠粒子為了獲得感度提高等所需之性能，可適當選擇粒徑或種類。作為乳膠粒子，只要為適於作為抗原之HbA1c之吸附、結合者即可。例如可列舉：聚苯乙烯、苯乙烯-磺酸（鹽）共聚物、苯乙烯-甲基丙烯酸共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、氯乙烯-丙烯酸酯共聚物、乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物等。乳膠粒子之形狀無特別限定，其平均粒徑較佳為乳膠粒子表面之HbA1c與抗體之免疫反應及抗體彼此之凝集反應之結果產生之凝集體具有可肉眼或光學地檢測之充分之大小。作為較佳之平均粒徑，為0.02～1.6 μm，尤佳為0.03～0.5 μm。又，亦可使用由金屬膠體、明膠、脂質體、微膠囊、二氧化矽、氧化鋁、碳黑、金屬化合物、金屬、陶瓷或磁體等材質所構成之粒子代替乳膠粒子。該等粒子亦可含有螢光物質。

本發明之不溶性載體較佳為未致敏者。本發明之包含乳膠粒子之試劑適當包含緩衝成分（緩衝液）。

【0034】　作為可用於本發明之緩衝液，只要為通常使用者即可，例如可列舉：三羥甲基胺基甲烷鹽酸、硼酸、磷酸、乙酸、檸檬酸、琥珀酸、鄰苯二甲酸、戊二酸、順丁烯二酸、甘胺酸及其等之鹽等、或MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES等Good's緩衝液等。

【0035】　本發明之試劑理想為2試劑（2步驟法），亦可設為3試劑（3步驟法）。於2試劑之情形時，理想為分為包含不溶性載體之第1試劑及包含2種單株抗體之第2試劑。又，亦可構成將（a）、（b）、（c）分別設為不同之試劑構成之3試劑系（3步驟法）。

乳膠凝集之測定可藉由光學或者電化學地觀察產生之凝集之程度而測定糖化血紅素（%）。作為光學地觀察之方法，可列舉利用光學機器測定散射光強度、吸光度或透過光強度之方法（端點法、速率法等）。

將測定樣本所得之吸光度等測定值與測定標準物質（糖化血紅素（%）已知之樣本）所得之吸光度等測定值相比較，算出樣本中含有之測定對象物質之濃度（定量值）。再者，透過光或散射光等之吸光度等之測定可為1波長測定，或亦可為2波長測定（2個波長產生之差或比）。測定波長通常選自400 nm至800 nm之中。

【0036】 本發明之樣本中之測定對象物質之測定可藉由手工作業進行，或亦可使用測定裝置等裝置進行。測定裝置可為通用自動分析裝置，亦可為專用測定裝置（專用機）。作為專用測定裝置，可為如下所述之檢查用設備裝置，其利用微小流路（micro flow path）將樣本與試劑混合，進行反應而實施檢測。具體而言，採用繞水平之旋轉軸進行旋轉操作之反應卡匣，該反應卡匣具備微小流路及與微小流路連通且將液體樣本導入至微小流路之注入孔，具備可簡易地導入稀釋液之手段。該反應流路具備添加有分析試劑之試劑區域；以及藉由使液體樣本與分析試劑接觸，且將液體樣本與分析試劑一起攪拌，從而沿微小流路擾亂液體樣本之利用重力之流動以充分促進特定反應的手段。如此構成之反應卡匣係如下機制之裝置：藉由旋轉及振動，使液體樣本通過微小流路流動並與分析試劑接觸，且將液體樣本與分析試劑一起攪拌，藉此促進特定反應，測定液體樣本中之能夠檢測之反應。

【0037】 又，本發明之測定較佳為藉由2步驟法（2試劑法）等利用多個操作步驟進行之方法實施。

【0038】 又，根據本發明，不僅於血液檢體包含正常之血紅素之情形時，即便於包含變異體HbS或HbC等異常血紅素之情形時，亦能夠進行準確之糖化血

紅素（%）之免疫測定。因此，本發明之測定方法亦係包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之偏差降低方法，且亦係包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之高值化抑制方法。

【0039】　又，於本發明中亦可將上述測定試劑分成多份而製成糖化血紅素（%）測定套組。或，亦可與其他構成一起製成糖化血紅素（%）測定套組。又，作為該其他構成，可列舉其他檢測所需之試劑、檢體之稀釋液、檢體採取用用具或操作說明書等。

以下，列舉實施例進一步詳細地對本發明進行說明，但本發明並不限定於該等。

實施例

【0040】　[實施例]本發明測定試劑之製造

1.第1單株抗體之獲取

如下所述製造抗HbA1c單株抗體作為本發明之第一單株抗體。

（1）純化HbA0及純化HbA1c之製備

HbA0及HbA1c係藉由非專利文獻(Melisenda J. McDonald et al, JBC, 253(7), 2327 - 2332, 1978）記載之使用Bio-Rex70（Bio-Rad公司）之離子交換層析法，自人紅血球溶血液進行純化，用於以後之實驗。

【0041】　（2）各種肽及糖化肽之製備

2種胺基序列之肽（VHLTC（序列編號1）及VHLTPEEKYYC（序列編號2）：字母表示胺基酸之單字母標記）係使用肽自動合成裝置藉由Fmoc法進行合成及純化。各肽之純度藉由HPLC確認為95%以上。又，各肽之分子量藉由質量分析（MALDI-TOF法）確認到與理論值相同。

藉由日本特開昭61-172064記載之方法將上述2種肽糖化，對糖化肽（f-VHLTC及f-VHLTPEEKYYC：f意指果糖基化）進行純化。即，使各序列之

肽分別與葡萄糖於無水吡啶中反應，合成糖化肽，藉由HPLC進行純化。各糖化肽之分子量藉由質量分析（MALDI-TOF法）確認到與理論值、即各肽之分子量加上162所得之分子量相同。

【0042】　（3）第1單株抗體之獲取

第1單株抗體即抗HbA1c單株抗體係如下所述進行製造。首先，使上述（2）中合成之糖化肽（f-VHLTPEEKYYC）與匙孔螺血藍蛋白結合，將其作為免疫原對小鼠進行免疫。於融合瘤之篩選中，選擇6株於抗原固相化ELISA中與糖化肽結合蛋白反應且不與純化HbA0反應之株。經過選殖，最終獲得於抗原固相化ELISA中與純化HbA1c反應且不與純化HbA0反應之單株抗體（抗體68207、68208、68210、68211、68213、68214）。

【0043】　2.第2單株抗體之獲取

如下所述製造針對抗HbA1c單株抗體之單株抗體作為本發明之第2單株抗體。

（1）免疫

將上述1.中獲得之3種不同之小鼠抗HbA1c單株抗體（68210、68211、68213：Sekisui Medical公司製造）作為免疫原，將大鼠作為宿主，藉由慣例進行免疫。最終免疫係於細胞融合之3～4天前進行，回收脾臟細胞及淋巴結細胞，藉由電融合法或PEG法與骨髓瘤細胞（SP2/O）融合。融合細胞於96孔盤中培養，自細胞融合起7～8天後回收培養上清液，進行下述所示之篩選。

【0044】　（2）篩選

於融合瘤之篩選中，選擇於抗原固相化ELISA中與小鼠IgG反應且不與人IgG反應之株。

（2-1）抗原固相化ELISA

（i）將作為固相化抗原之藉由PBS稀釋成1 μg/mL之小鼠抗HbA1c單株抗體

（68208或者68214）或人IgG以50 μL/well分注至ELISA用96孔盤，於室溫靜置2小時。

（ii）藉由0.05%Tween20-PBS（PBST）（400 μL/well）洗淨3次後，分注作為阻斷溶液之1%BSA-PBST（100 μL/well），於室溫靜置1小時。

（iii）去除阻斷溶液後，以50 μL/well分注經2倍稀釋之培養上清液，於室溫靜置1小時。

（iv）洗淨3次後，以50 μL/well分注經10000倍稀釋之HRP標記山羊抗大鼠多株抗體，於室溫靜置1小時。

（v）洗淨3次後，以50 μL/well分注OPD顯色液，於室溫靜置10分鐘。

（vi）以50 μL/well分注停止液，反應停止後藉由讀板儀測定吸光度（Abs.492 nm）。

【0045】 （2-2）結果

獲取共計13株（S07201R～S072013R）之融合瘤（表1）。

【0046】 [表1]

（Abs.）

免疫原	殖株名	篩選用抗原	
		小鼠IgG	人IgG
68210	S07201R	0.596	0.074
	S07202R	0.521	0.077
68211	S07203R	2.543	0.063
	S07204R	2.274	0.062
	S07205R	2.819	0.066
	S07206R	2.475	0.083
	S07207R	2.729	0.066
68213	S07208R	0.486	0.059
	S07209R	0.544	0.062
	S07210R	0.926	0.095
	S07211R	0.529	0.077
	S07212R	0.879	0.076
	S07213R	0.992	0.072

【0047】 （3）獲得抗體之反應性之確認

藉由極限稀釋法對藉由篩選所選擇之融合瘤進行單株化，藉由慣例投予至

小鼠腹腔，獲得腹水。自獲得之腹水純化出抗體，利用抗原固相化ELISA確認反應性。

（3-1）抗原固相化ELISA

使用68210、68213作為固相化抗原，除此以外，藉由與（2）篩選同樣之方法進行。

【0048】 （3-2）結果

獲得之13種抗體對於任一固相化抗原均對小鼠IgG（抗小鼠IgG單株抗體）顯示強於人IgG之反應性。

【0049】 [表2]

固相化抗原 / 一次抗體	小鼠IgG		人IgG
	68210	68213	
S07201R	1.392	0.994	0.063
S07202R	1.185	1.239	0.074
S07203R	1.612	1.432	0.067
S07204R	1.759	1.321	0.052
S07205R	1.662	1.168	0.056
S07206R	1.220	0.546	0.059
S07207R	1.669	1.210	0.054
S07208R	0.576	0.487	0.061
S07209R	0.648	0.672	0.057
S07210R	0.455	0.569	0.058
S07211R	0.308	0.364	0.051
S07212R	0.197	0.304	0.059
S07213R	0.793	0.939	0.053

（Abs.）

【0050】 3.免疫學測定方法

（1）實施例配方

（i）將第一試劑之組成示於以下。

10 mM EPPS（pH8.0）

乳膠粒子（平均粒徑約120 nm）

（ii）將第二試劑之組成示於以下。

10 mM Bis-Tris（pH6.0）

1次抗體（0.1 mg/mL 小鼠抗HbA1c單株抗體）（表3）

2次抗體（0.1 mg/mL 大鼠抗小鼠IgG單株抗體）（表3）

500 mM NaCl

0.05% Tween-20

0.09%疊氮化鈉

【0051】 [表3]

編號	1次抗體	2次抗體
實施例1	68210	S07201R
實施例2	68211	S07201R
實施例3	68213	S07201R
實施例4	68207	S07205R
實施例5	68211	S07204R
實施例6	68211	S07206R
實施例7	68211	S07210R
實施例8	68211	S07211R
實施例9	68211	S07212R
實施例10	68213	S07203R
實施例11	68213	S07210R
實施例12	68213	S07211R
實施例13	68213	S07212R
實施例14	68213	S07213R
實施例15	68214	S07209R
實施例16	68214	S07210R
實施例17	68211	S07203R

【0052】 （2）測定方法

測定係使用日立7170型自動分析裝置。將6.3 μL之檢體及150 μL之第一試劑添加至反應單元，於37℃反應5分鐘後，進而將50 μL之第二試劑添加至反應單元，於37℃反應5分鐘，藉由2端點法（測光點19-34）於主波長660 nm、副波長800 nm測定吸光度變化量。校準曲線係藉由製造商指定之方法調整作為標準品之Kyowa Medex公司製造之Determiner Calibrator HbA1c液狀試劑用而製作。

【0053】 （3）比較例

（i）比較例1：以由製造商指定之方法使用HPLC法（Arkray公司製造之

ADAMS HA-8180T），測定各種檢體之糖化血紅素（%）。

（ii）比較例2：使用多株抗體作為2次抗體之LTIA法

（1）（Kyowa Medex公司製造之Determiner L HbA1c）

以由製造商指定之方法使用Kyowa Medex公司製造之Determiner L HbA1c，測定各種檢體之糖化血紅素（%）。測定時，裝置係使用日立7170型自動分析裝置。

【0054】 （4）參考例：使用多株抗體作為2次抗體之LTIA法（2）（Sekisui Medical公司製造）

使用實施例2所示之第一試劑、及除添加作為1次抗體之68210 0.06mg/mL、作為2次抗體之山羊抗小鼠IgG多株抗體（Fc特異性抗體：蛋白精製工業公司製造）0.05 mg/mL以外與實施例2為同一組成之第二試劑，測定各種檢體之糖化血紅素（%）。測定時，裝置係使用日立7170型自動分析裝置。

【0055】 [試驗例1]血球檢體之糖化血紅素（%）之測定

（1）正常檢體之糖化血紅素（%）之測定

確認到相對於作為現有製品之比較例2（Kyowa Medex公司製造之Determiner L HbA1c），於參考例及實施例1～17中可高精度地測定正常檢體之糖化血紅素（%）。

將藉由EDTA採血管採血之任意正常血液檢體（自獲得同意之志願者獲取）以800 G離心分離5分鐘，藉由純化水將獲得之下層之血球層稀釋100倍，測定所得者之糖化血紅素（%）。將測定50個檢體時各試劑相對於Determiner L HbA1c之相關式及相關係數示於表4。

相關係數皆良好，表示於參考例、實施例1～17中對於正常檢體可高精度地測定糖化血紅素（%）。

【0056】 [表4]

編號	相關係數r^2
參考例	0.9963
實施例1	0.9980
實施例2	0.9949
實施例3	0.9904
實施例4	0.9904
實施例5	0.9975
實施例6	0.9930
實施例7	0.9967
實施例8	0.9959
實施例9	0.9971
實施例10	0.9958
實施例11	0.9970
實施例12	0.9972
實施例13	0.9974
實施例14	0.9975
實施例15	0.9890
實施例16	0.9959
實施例17	0.9935

【0057】 （2）各異常Hb檢體之糖化血紅素（%）之測定

對於市售之異常Hb檢體（自Bizcomjapan購買）測定糖化血紅素（%）。該等為血球檢體，採血後，藉由離心分離而分離血球層後，於-70℃以下進行冷凍保存。

（2-1）含HbS之檢體之糖化血紅素（%）之測定

比較例1所示之HPLC法即Arkray公司製造之ADAMS HA-8180T於變種模式（Variant mode）下可對血球及全血檢體檢測異常Hb即HbS及HbC。使用之含有HbS之血球檢體之HbS（%）為33.2%。

藉由HPLC法測定上述含有HbS之檢體之糖化血紅素（%）時為6.2%。又，將藉由實施例1～10、比較例2、參考例之試劑測定上述含有HbS之檢體所得之糖化血紅素(%)與藉由HPLC法測定時之糖化血紅素(%)的差(糖化血紅素(%))示於表5。

於使用多株抗體作為2次抗體之比較例2中，測定值為6.9%，相對於HPLC法，值提高了0.7%。又，於組合多株抗體作為2次抗體之參考例中，測定值為6.7%，相對於HPLC法亦確認到值提高了0.5%。

另一方面，於組合本發明之單株抗體作為2次抗體之實施例1～10中，測定值為5.9%～6.4%，與HPLC法之差異為-0.2%～0.2%。於包含變異Hb即HbS之血球檢體中，可謂於使用單株抗體作為2次抗體之情形時，測定精度提高。

【0058】 [表5]

測定方法		與比較例1（HPLC法）之差 糖化血紅素（%）
比較例1	HPLC法	0.0
比較例2	Determiner L HbA1c	0.7
參考例	本公司製造之試劑：多株抗體	0.5
實施例1	本公司製造之試劑：單株抗體	-0.1
實施例2	本公司製造之試劑：單株抗體	-0.2
實施例3	本公司製造之試劑：單株抗體	-0.1
實施例4	本公司製造之試劑：單株抗體	-0.1
實施例5	本公司製造之試劑：單株抗體	0.2
實施例6	本公司製造之試劑：單株抗體	0.1
實施例7	本公司製造之試劑：單株抗體	0.1
實施例8	本公司製造之試劑：單株抗體	0.0
實施例9	本公司製造之試劑：單株抗體	0.0
實施例10	本公司製造之試劑：單株抗體	0.2

【0059】 （2-2）含HbC之檢體之糖化血紅素（%）之測定

藉由HPLC法測定使用之含有HbC之血球檢體之HbC（%）時，為31.8%～40.9%。

藉由HPLC法測定上述含有HbC之檢體之糖化血紅素(%)時，為4.8～5.9%。

又，將藉由比較例2、參考例、實施例1之試劑測定上述含有HbC之檢體所得之糖化血紅素(%)與藉由HPLC法測定時之糖化血紅素(%)的差(糖化血紅素(%))示於表6。

藉由使用多株抗體作為2次抗體之比較例2測定上述檢體時，相對於HPLC法

之差高達0.9～3.1%，藉由比較例2之試劑無法準確測定含有HbC之血球檢體之糖化血紅素（%）。於參考例中，相對於HPLC法之差為0.5～1.7%，相較於比較例2可準確地測定糖化血紅素（%）。

進而，於組合本案發明之單株抗體作為2次抗體之實施例1中，相對於HPLC法之差為-0.4～-0.2%，於含有HbC之血球檢體中亦可以較高之精度測定糖化血紅素（%）。

【0060】 [表6]

檢體編號	HbC%	與比較例1（HPLC法）之差 糖化血紅素（%）		
		比較例2	參考例	實施例1
		Determiner L HbA1c	本公司製造之試劑 多株抗體	本公司製造之試劑 單株抗體
HbC-1	31.8	0.9	0.5	-0.4
HbC-2	35.7	1.7	0.7	-0.2
HbC-3	40.9	2.9	1.7	-0.2
HbC-4	35.2	1.9	1.0	-0.3
HbC-5	40.2	2.3	0.8	-0.4
HbC-6	35.2	2.0	1.1	-0.2
HbC-7	40.5	3.1	1.3	-0.2
HbC-8	35.6	2.2	1.0	-0.3

【0061】 進而，將藉由實施例8～17之試劑測定檢體編號HbC-1所得之結果示於表7。比較例1～2、參考例、實施例1之測定結果與表6相同。HbC-1之糖化血紅素（%）於藉由比較例1之HPLC法測定之情形時為5.8%。於藉由使用多株抗體作為2次抗體之比較例2測定該檢體時，測定值相對於HPLC法之差為0.9%，高於參考例或本發明之方法，藉由比較例2之試劑無法準確測定含有HbC之檢體之糖化血紅素（%）。於參考例中，測定值相對於HPLC法之差為0.5%，相較於比較例2可準確地測定。進而，於組合本案發明之單株抗體作為2次抗體之實施例8～17中，測定值相對於HPLC法之差為-0.1～0.3%，於含有HbC之檢體中亦可以較高之精度測定糖化血紅素（%）。

【0062】 [表7]

測定方法		與比較例1（HPLC法）之差 糖化血紅素（%）
比較例1	HPLC法	0
比較例2	Determiner L HbA1c	0.9
參考例	本公司製造之試劑：多株抗體	0.5
實施例8	本公司製造之試劑：單株抗體	-0.1
實施例9	本公司製造之試劑：單株抗體	0.1
實施例10	本公司製造之試劑：單株抗體	0.2
實施例11	本公司製造之試劑：單株抗體	0.2
實施例12	本公司製造之試劑：單株抗體	0.0
實施例13	本公司製造之試劑：單株抗體	-0.1
實施例14	本公司製造之試劑：單株抗體	0.3
實施例15	本公司製造之試劑：單株抗體	0.0
實施例16	本公司製造之試劑：單株抗體	0.2
實施例17	本公司製造之試劑：單株抗體	0.1

【0063】 [試驗例2]全血檢體之糖化血紅素（%）之測定

（1）正常檢體之糖化血紅素（%）之測定

確認到相對於作為現有製品之比較例2（Kyowa Medex公司製造之Determiner L HbA1c）之血球檢體之糖化血紅素之測定值，於比較例3及實施例3、4、8、9、11-13、15中對全血之正常檢體可高精度地測定糖化血紅素（%）。

測定於試驗例1（1）正常檢體之測定中使用之藉由EDTA採血管採取之任意正常血液檢體之糖化血紅素（%）。各檢體不進行離心分離而以全血狀態直接使用，藉由純化水稀釋50倍進行製備。關於測定50個檢體時之各試劑之全血檢體之測定結果，將相對於藉由Determiner L HbA1c測定血球檢體時之測定值之相關係數示於表8。比較例2之試劑與使用其他試劑之情形相比，相關係數最低，對於全血檢體無法高精度地測定糖化血紅素（%）。另一方面，於參考例、實施例3、4、8、9、11-13、15中，相關係數均良好，表示對全血之正常檢體可高精度地測定糖化血紅素（%）。

【0064】 [表8]

編號	1次抗體	2次抗體	相對於比較例2（血球檢體測定時）之相關（相關係數r^2）
比較例2	Determiner L HbA1c		0.9683
參考例	68210	多株抗體	0.9782
實施例3	68213	S07201R	0.9831
實施例4	68207	S07205R	0.9827
實施例8	68211	S07211R	0.9865
實施例9	68211	S07212R	0.9892
實施例11	68213	S07210R	0.9856
實施例12	68213	S07211R	0.9875
實施例13	68213	S07212R	0.9876
實施例15	68214	S07209R	0.9878

【0065】 （2）各異常Hb檢體之糖化血紅素（%）之測定

將市售之異常Hb檢體（自Bizcomjapan購買）用於測定。該等為全血檢體，採血後，於-70℃以下冷凍保存。

（2-1）含HbS之檢體之糖化血紅素（%）之測定

藉由HPLC法測定使用之含有HbS之全血檢體之HbS（%）及糖化血紅素（%）時，分別為28.8～37.1%及4.6～6.5%。

將藉由比較例2、參考例、實施例3、4、11、13、15之試劑進行測定時之測定值及測定值相對於HPLC法之差 糖化血紅素（%）示於表9。

藉由比較例2之試劑測定之情形時之含量相對於HPLC法，值提高了0.5～1.4%，測定精度不良。

其次，藉由參考例之試劑進行測定之情形時之含量相對於HPLC法，值提高了0.3～0.6%，但較比較例2良好。

相對於此，藉由實施例3、4、11、13、15之試劑進行測定之情形時之測定值與HPLC法的差為-0.1～0.3%，較小，測定精度良好。又，於使用本發明之單株抗體作為2次抗體之情形時，與使用多株抗體作為2次抗體之情形（參考例）相比測定精度進一步提高。

【0066】 [表9]

檢體編號	HbS含量（%）	與比較例1（HPLC法）之差 糖化血紅素（%）						
		比較例2	參考例	實施例3	實施例4	實施例11	實施例13	實施例15
HbS-2	28.8	1.1	0.4	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.0
HbS-3	37.1	1.4	0.3	0.0	0.0	-0.1	-0.1	-0.2
HbS-4	33.5	0.5	0.5	-0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
HbS-5	34.8	0.9	0.6	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
HbS-6	32.7	0.6	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1

【0067】 （2-2）含HbC之檢體之糖化血紅素（%）之測定

藉由HPLC法測定使用之含有HbC之全血檢體之HbC（%）及糖化血紅素（%）時，分別為34.9%～39.4%及5.0～5.5%。

將藉由比較例2、參考例、實施例3、8、9、12、13之試劑進行測定之情形時之測定值相對於HPLC法的差（糖化血紅素（%））示於表10。

首先，藉由比較例2進行測定之情形時之測定值相對於HPLC法，值大幅提高了3.4～4.7%。

其次，於參考例中，相對於HPLC法，值提高了0.9～1.1%，但較比較例2良好。

相對於此，實施例3、8、9、12、13之試劑相對於HPLC法之差為0.1～0.4%，較小，測定精度良好。可謂於使用本發明之單株抗體作為2次抗體之情形時，測定精度提高。

【0068】 [表10]

檢體編號	HbC含量（%）	與比較例1（HPLC法）之差 糖化血紅素（%）						
		比較例2	參考例	實施例3	實施例8	實施例9	實施例12	實施例13
HbC-9	34.9	3.4	1.1	0.3	0.1	0.4	0.3	0.2
HbC-10	39.4	4.7	0.9	0.4	0.1	0.3	0.1	0.2

[產業上之可利用性]

【0069】 根據本發明，不僅於血液檢體包含正常血紅素之情形時，即便於包含HbS、HbC等異常血紅素之情形時，亦能夠進行準確之糖化血紅素（%）之免疫測定。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種測定樣本中之糖化血紅素（%）之方法，其包括如下步驟：

藉由使不溶性載體與樣本接觸，而使樣本中之糖化血紅素吸附於不溶性載體之步驟；

藉由使吸附於不溶性載體之糖化血紅素與抗糖化血紅素單株抗體接觸，而形成抗糖化血紅素單株抗體、糖化血紅素及不溶性載體之複合體之步驟；以及

藉由使該複合體與對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體接觸，而使不溶性載體凝集之步驟。

【第2項】如請求項1所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體係不與人IgG反應之抗體。

【第3項】如請求項1或2所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，不溶性載體為乳膠。

【第4項】如請求項1至3中任一項所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，樣本為全血或血球。

【第5項】如請求項1至4中任一項所述之測定方法，其包括光學檢測凝集度之步驟。

【第6項】一種糖化血紅素（%）測定試劑，其包含至少以下2種單株抗體：

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【第7項】如請求項6所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其進而包含不溶性載體。

【第8項】如請求項7所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其包含第1試劑及第2試劑，且

第1試劑包含不溶性載體，第2試劑包含至少以下2種單株抗體：

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【第9項】如請求項6至8中任一項所述之測定試劑，其中，對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體係不與人IgG反應之抗體。

【第10項】如請求項6至9中任一項所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其中，不溶性載體為乳膠。

【第11項】一種糖化血紅素（%）測定套組，其包含請求項6至10中任一項所述之糖化血紅素（%）測定試劑。

【第12項】一種單株抗體，其與結合於人糖化血紅素之單株抗體反應，且不與人IgG反應。

【第13項】一種包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之偏差降低方法，其包括使至少以下2種單株抗體、不溶性載體及樣本接觸之步驟；

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【第14項】一種包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之高值化抑制方法，其包括使至少以下2種單株抗體、不溶性載體及樣本接觸之步驟；

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種測定樣本中之糖化血紅素（%）之方法，其包括如下步驟：

藉由使不溶性載體與樣本接觸，而使樣本中之糖化血紅素吸附於不溶性載體之步驟；

藉由使吸附於不溶性載體之糖化血紅素與抗糖化血紅素單株抗體接觸，而形成抗糖化血紅素單株抗體、糖化血紅素及不溶性載體之複合體之步驟；以及

藉由使該複合體與對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體接觸，而使不溶性載體凝集之步驟。

【第2項】如請求項1所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體係不與人IgG反應之抗體。

【第3項】如請求項1所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，不溶性載體為乳膠。

【第4項】如請求項2所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，不溶性載體為乳膠。

【第5項】如請求項1至4中任一項所述之糖化血紅素（%）測定方法，其中，樣本為全血或血球。

【第6項】如請求項1至4中任一項所述之測定方法，其包括光學檢測凝集度之步驟。

【第7項】如請求項5所述之測定方法，其包括光學檢測凝集度之步驟。

【第8項】一種糖化血紅素（%）測定試劑，其包含至少以下2種單株抗體：

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【第9項】如請求項8所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其進而包含不溶性載體。

【第10項】如請求項9所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其包含第1試劑及第2試劑，且

第1試劑包含不溶性載體，第2試劑包含至少以下2種單株抗體：

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【第11項】如請求項8至10中任一項所述之測定試劑，其中，對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體係不與人IgG反應之抗體。

【第12項】如請求項8至10中任一項所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其中，不溶性載體為乳膠。

【第13項】如請求項11所述之糖化血紅素（%）測定試劑，其中，不溶性載體為乳膠。

【第14項】一種糖化血紅素（%）測定套組，其包含請求項8至13中任一項所述之糖化血紅素（%）測定試劑。

【第15項】一種單株抗體，其與結合於人糖化血紅素之單株抗體反應，且不與人IgG反應。

【第16項】一種包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之偏差降低方法，其包括使至少以下2種單株抗體、不溶性載體及樣本接觸之步驟；

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。

【第17項】一種包含異常血紅素之樣本中之糖化血紅素（%）測定值之高值化抑制方法，其包括使至少以下2種單株抗體、不溶性載體及樣本接觸之步驟；

1）抗糖化血紅素單株抗體

2）對抗糖化血紅素單株抗體反應之單株抗體。