(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 12 月 4 日(04.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/192200 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/26 (2006.01) *G01N 33/49* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01) *G01N 33/72* (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/001063

(22) 国際出願日: 2014 年 2 月 27 日(27.02.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2013-114986 2013 年 5 月 31 日(31.05.2013) JP

(71) 出願人: パナソニックヘルスケア株式会社 (PANASONIC HEALTHCARE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒 7910395 愛媛県東温市南方２１３１番地１ Ehime (JP).

(72) 発明者: 遠藤　太志(ENDOH, Takashi). 重藤　修行 (SHIGETOH, Nobuyuki).

(74) 代理人: 鮫島　睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).

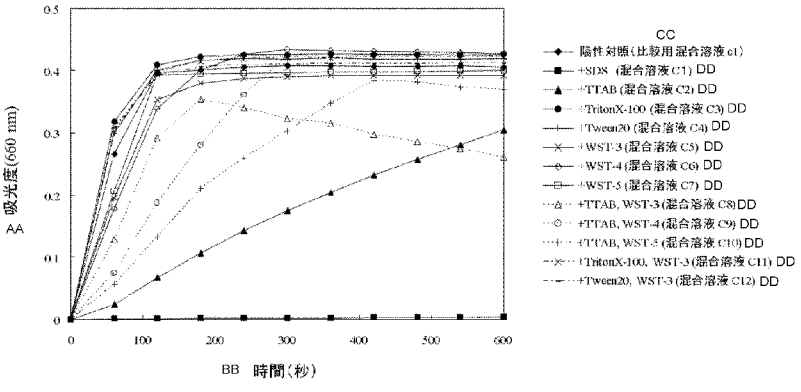
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) **Title**: METHOD FOR QUANTIFYING GLYCATED HEMOGLOBIN

(54) 発明の名称 : 糖化ヘモグロビンを定量する方法



AA Absorbance (660 nm)
BB Time (seconds)
CC Positive control (mixed solution (c1) for comparison)
DD Mixed solution

(57) **Abstract**: The present invention provides a method for quantifying glycated hemoglobin (HbA1c) contained in a sample, wherein the method comprises the following processes: (a) a process for mixing the sample with a protease in the presence of a composition of a cationic surfactant and a tetrazolium salt to obtain an aqueous glycated peptide solution containing a glycated peptide; (b) a process for mixing the aqueous glycated peptide solution obtained in process (a) with a fructosyl peptide oxidase to obtain hydrogen peroxide, the aqueous glycated peptide solution here containing said composition; and (c) a process for calculating the concentration of the glycated hemoglobin (HbA1c) on the basis of the amount of hydrogen peroxide solution obtained in process (b). The present invention also provides a method for quantifying glycated hemoglobin (HbA1c) contained in a sample, wherein the method comprises the following processes: (a) a process for mixing the sample with a protease and a fructosyl peptide oxidase in the presence of a composition of a cationic surfactant and a tetrazolium salt to obtain a hydrogen peroxide solution; and (b) a process for calculating the concentration of the glycated hemoglobin (HbA1c) on the basis of the amount of hydrogen peroxide obtained in process (a).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2014/192200 A1

本発明は、試料に含有される糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を定量する方法であって、以下の工程：（ａ）カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下において、前記試料をプロテアーゼと混合し、糖化ペプチドを含有する糖化ペプチド水溶液を得る工程、（ｂ）前記工程（ａ）において得られた糖化ペプチド水溶液をフルクトシルペプチドオキシダーゼと混合し、過酸化水素を得る工程、ここで、前記糖化ペプチド水溶液は前記組成物を含有するものである、および（ｃ）工程（ｂ）において得られた過酸化水素水の量に基づいて、前記糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の濃度を算出する工程を具備する方法を提供する。本発明はまた、試料に含有される糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を定量する方法であって、以下の工程：（ａ）カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下において、前記試料をプロテアーゼおよびフルクトシルペプチドオキシダーゼと混合し、過酸化水素水を得る工程、および（ｂ）工程（ａ）において得られた過酸化水素の量に基づいて、前記糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の濃度を算出する工程を具備する方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 糖化ヘモグロビンを定量する方法

技術分野

[0001] 本発明は、試料に含有される糖化ヘモグロビンを定量する方法に関する。

背景技術

[0002] 糖化ヘモグロビン（以下、「ＨｂＡ１ｃ」という）は、赤血球に含まれるヘモグロビンＡ（以下、「ＨｂＡ」という）にグルコースを非酵素的に結合することによって形成される糖化タンパク質の一種である。ＨｂＡ１ｃは、糖尿病マーカーとして用いられる。

[0003] 特許文献１は、酵素アッセイ法によって、ＨｂＡ１ｃを定量する方法を開示している。より具体的には、特許文献１に開示された方法は、以下の工程（ａ）および（ｂ）を有する：

（ａ）プロテアーゼを用いてＨｂＡ１ｃを分解し、フルクトシルペプチドを生成する工程、および

（ｂ）工程（ａ）において生成されたフルクトシルペプチドを、フルクトシルペプチドオキシダーゼ（以下、「ＦＰＯＸ」という）を用いて定量する工程。

[0004] 特許文献２も、フルクトシルペプチドを得る方法を開示している。この方法は、ＨｂＡ１ｃのようなタンパク質を含有する試料が、テトラゾリウム化合物の存在下においてプロテアーゼ処理に供されることを特徴とする。特許文献２は、さらに、テトラゾリウム化合物だけでなく界面活性剤がプロテアーゼ処理をより促進することを開示している。

[0005] 特許文献３も、フルクトシルペプチドを得る方法を開示している。この方法では、Ｈｂ１Ａｃが、イソチアゾリン誘導体および界面活性剤の存在下でプロテアーゼ処理に供される。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許出願公開第２００７／００３７２４３号

特許文献2：米国特許出願公開第２００３／０１８６３４６号

特許文献3：カナダ特許出願公開第２　８０６　２６１　Ａ号

特許文献4：米国特許第７，２３５，３７８号

特許文献5：米国特許第７，８５５，０７９号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 酵素アッセイ法では、工程（ａ）が速やかに実施されることが必要とされる。より詳細には、プロテアーゼによって引き起こされるＨｂＡ１ｃの分解速度をより向上させることが必要とされる。

[0008] さらに、工程（ａ）において用いられた試薬が、工程（ｂ）に悪影響を与えてはならない。より詳細には、工程（ａ）において用いられた試薬が、ＦＰＯＸを不活性化してはならない。

[0009] 本発明の目的は、糖化ヘモグロビンを速やかに定量する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、試料に含有される糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を定量する方法であって、以下の工程：

（ａ）カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下において、前記試料をプロテアーゼと混合し、糖化ペプチドを含有する糖化ペプチド水溶液を得る工程、

（ｂ）前記工程（ａ）において得られた糖化ペプチド水溶液をＦＰＯＸ（フルクトシルペプチドオキシダーゼ）と混合し、過酸化水素を得る工程、ここで、前記溶液は前記組成物を含有するものである、および

（ｃ）工程（ｂ）において得られた過酸化水素水の量に基づいて、前記糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の濃度を算出する工程

を具備する、方法に関する。

本発明は、試料に含有される糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を定量する

方法であって、以下の工程：

（ａ）カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下において、前記試料をプロテアーゼおよびＦＰＯＸ（フルクトシルペプチドオキシダーゼ）と混合し、過酸化水素水を得る工程、および

（ｂ）工程（ａ）において得られた過酸化水素の量に基づいて、前記糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の濃度を算出する工程

を具備する、方法に関する。

本発明の趣旨は、カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩を含有する、プロテアーゼを活性化するための組成物を含む。

発明の効果

[0011] 本発明は、糖化ヘモグロビンを速やかに定量する方法を提供する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1A]図１Ａは、試験例１の結果を示す。

[図1B]図１Ｂは、試験例１の結果を示す。

[図2A]図２Ａは、試験例２の結果を示す。

[図2B]図２Ｂは、試験例２の結果を示す。

[図3]図３は、試験例３の結果を示す。

[図4]図４は、試験例４の結果を示す。

[図5]図５は、試験例５の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の実施形態が、以下、説明される。

[0014] （実施形態１）

まず、実施形態１が説明される。

[0015] （工程（ａ））

工程（ａ）では、ＨｂＡ１ｃを含有する試料がカチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下においてプロテアーゼと混合される。好ましくは、試料は水溶液である。

[0016] ＨｂＡ１ｃはプロテアーゼによって分解され、糖化ペプチドを生成する。

糖化ペプチドの例は、フルクトシルペプチドである。フルクトシルペプチドの例は、フルクトシルバリンヒスチジン（以下、「Ｆｒｕ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ」という）である。このようにして、糖化ペプチドを含有する水溶液が得られる。

[0017] ＨｂＡ１ｃを含有する試料の例は、ヒト由来の血液である。ヒト由来の血液の希釈物もまた、ＨｂＡ１ｃを含有する試料に含まれる。

[0018] カチオン性界面活性剤の例は、第４級アンモニウム塩、アルキルアミン塩、またはピリジン誘導体である。好ましいカチオン性界面活性剤は、化学式$R_1R_2R_3R_4N^+X^-$により表される第４級アンモニウム塩である。

[0019] 好ましくは、R_1は、８以上１８以下の炭素数を有するアルキル基である。好ましくは、R_2、R_3、およびR_4は、独立して低級アルキル基である。より好ましくは、R_2、R_3、およびR_4は、独立してメチル基またはエチル基である。メチル基がさらにより好ましい。Ｘはハロゲンを表す。好ましくは、Ｘは塩素または臭素を表す。

[0020] 好ましいカチオン性界面活性剤の例が以下に列記される。

トリメチルオクチルアンモニウムクロリド

トリメチルデシルアンモニウムクロリド

トリメチルドデシルアンモニウムクロリド

トリメチルテトラデシルアンモニウムクロリド

トリメチルセチルアンモニウムクロリド

トリメチルステアリルアンモニウムクロリド

トリメチルオクチルアンモニウムブロミド

トリメチルデシルアンモニウムブロミド

トリメチルドデシルアンモニウムブロミド

トリメチルテトラデシルアンモニウムブロミド

トリメチルセチルアンモニウムブロミド

トリメチルステアリルアンモニウムブロミド

[0021] 好ましいテトラゾリウム塩の例が以下に列記される。

２－（４－ヨードフェニル）－３－（４－ニトロフェニル）－５－（２，４－ジスルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム，モノナトリウム塩（ＷＳＴ－１）

２－（４－ヨードフェニル）－３－（２，４－ジニトロフェニル）－５－（２，４－ジスルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム，モノナトリウム塩（ＷＳＴ－３）

２－（２－ベンゾチアゾリル）－３－（４－カルボキシ－２－メトキシフェニル）－５－［４－［（２－ソジオスルホエチル）カルバモイル］フェニル］－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム（ＷＳＴ－４）

２，２’－（３，３’－ジメトキシ－４，４’－ビフェニリレン）ビス［３－（２－ベンゾチアゾリル）－５－［４－［Ｎ－［２－（ソジオオキシスルホニル）エチル］－Ｎ－（２－スルホエチル）カルバモイル］フェニル］－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム］（ＷＳＴ－５）

５－［２，４－ビス（ソジオオキシスルホニル）フェニル］－３－（２－メトキシ－４－ニトロフェニル）－２－（４－ニトロフェニル）－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム（ＷＳＴ－８）

２－（４－ニトロフェニル）－５－フェニル－３－［４－（４－スルホフェニルアゾ）－２－スルホフェニル］－２Ｈ－テトラゾリウム，モノナトリウム塩（ＷＳＴ－９）

２，５－ジ（４－ニトロフェニル）－３－［４－（４－スルホフェニルアゾ）－２－スルホフェニル］－２Ｈ－テトラゾリウム，モノナトリウム塩（ＷＳＴ－１０）

２－（４－ニトロフェニル）－５－（２－スルホフェニル）－３－［４－（４－スルホフェニルアゾ）－２－スルホフェニル］－２Ｈ－テトラゾリウム，ジナトリウム塩（ＷＳＴ－１１）

[0022] プロテアーゼの例は、サーモリシン、パパイン、キモトリプシン、スブチリシン、カスパーゼ、ペプシン、またはカテプシンＤである。サーモリシンおよびパパインが好ましい。

[0023] 後述される試験例１および試験例２に含まれる試料溶液Ａ８～Ａ１０およびＢ８～Ｂ１０において実証されているように、カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組合せが、ＨｂＡ１ｃの分解速度を顕著に向上させる。言い換えれば、カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の相乗効果が、ＨｂＡ１ｃの分解速度を顕著に向上させる。図１Ａ、図１Ｂ、図２Ａ、および図２Ｂを参照のこと。

[0024] 試験例１および試験例２にそれぞれ含まれる試料溶液Ａ１およびＢ１において実証されているように、ドデシル硫酸ナトリウム（以下、「ＳＤＳ」という）のようなアニオン性界面活性剤も、ＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。しかし、本発明では、アニオン性界面活性剤は用いられてはならない。その理由は、工程（ｂ）の説明において記述される。

[0025] 試験例１および試験例２にそれぞれ含まれる試料溶液Ａ２およびＢ２において実証されているように、カチオン性界面活性剤が単独で用いられた場合、ＨｂＡ１ｃの分解速度は向上されない。同様に、試験例１および試験例２に含まれる試料溶液Ａ５～Ａ７およびＢ５～Ｂ７において実証されているように、テトラゾリウム塩が単独で用いられた場合でも、ＨｂＡ１ｃの分解速度は向上されない。

[0026] 試験例１および試験例２に含まれる試料溶液Ａ３、Ａ４、Ｂ３、およびＢ４において実証されているように、カチオン性界面活性剤に代えて非イオン性界面活性剤が用いられた場合、ＨｂＡ１ｃの分解速度は向上されない。試験例１および試験例２に含まれる試料溶液Ａ１１～Ａ１６およびＢ１１～Ｂ１６において実証されているように、非イオン性界面活性剤がテトラゾリウム塩と組み合わせて用いられた場合でも、ＨｂＡ１ｃの分解速度は向上されない。

[0027] （工程（ｂ））

工程（ｂ）は、工程（ａ）の後に行われる。

[0028] 工程（ａ）において得られた糖化ペプチド水溶液は、フルクトシルペプチドオキシダーゼ（以下、「ＦＰＯＸ」という）と混合される。特許文献２に

開示されているように、糖化ペプチドはＦＰＯＸと反応して、過酸化水素が発生する。工程（ａ）と同様、工程（ｂ）においても、糖化ペプチド水溶液はカチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物を含有する。

[0029] 後述される試験例３～５に含まれる試料溶液Ｃ８～Ｃ１０、Ｄ８～Ｄ１０、およびＥ８～Ｅ１０において実証されているように、カチオン性界面活性剤のみが用いられた場合（試料溶液Ｃ２、Ｄ２、およびＥ２を参照のこと）と比較して、カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物が用いられた場合、糖化ペプチドはＦＰＯＸとより速やかに反応する。

[0030] アニオン性界面活性剤は、ＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。しかし、後述される試験例３、４、および５に含まれる試料溶液Ｃ１、Ｄ１、およびＥ１において実証されているように、アニオン性界面活性剤はＦＰＯＸを不活性化する。そのため、アニオン性界面活性剤が用いられた場合、ＨｂＡ１ｃを定量することはできない。

[0031] （工程（ｃ））

工程（ｃ）は、工程（ｂ）の後に行われる。

[0032] 工程（ｂ）において発生する過酸化水素の量は、特許文献４（特に第８欄、６～３７行目）および特許文献５（特に第１０欄、６３行目～第１１欄、７行目）に開示されているように、試料に含有されるＨｂＡ１ｃの量に比例する。これらの特許文献は、出典明示により本明細書に組み込まれる。以下のホームページもまた、工程（ｂ）において発生する過酸化水素の量が試料に含有されるＨｂＡ１ｃの量に比例することを開示している。

ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｅｋｉｓｕｉｍｅｄｉｃａｌ．ｊｐ／ｅｎｇｌｉｓｈ／ｂｕｓｉｎｅｓｓ／ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ／ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ／ｈｂａ１ｃ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ

[0033] 従って、過酸化水素の量を元に、予め得られた検量線を用いて、試料に含有されるＨｂＡ１ｃの量が算出される。このようにして、試料に含有されるＨｂＡ１ｃが定量される。言い換えれば、Ｈｂ１Ａｃ１の濃度が測定される。

[0034] （実施形態２）

次に、実施形態２が説明される。

[0035] （工程（ｄ））

工程（ｄ）では、ＨｂＡ１ｃを含有する試料がカチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下においてプロテアーゼおよびＦＰＯＸと混合され、過酸化水素を得る。好ましくは、試料は水溶液である。

[0036] （工程（ｅ））

工程（ｅ）は、工程（ｄ）の後に行われる。工程（ｅ）では、工程（ｄ）において得られた過酸化水素の量に基づいて、Ｈｂ１Ａｃが定量される。

[0037] 工程（ｄ）では、工程（ａ）および工程（ｂ）が同時に行なわれる。工程（ｅ）は、工程（ｃ）と同一である。よって、工程（ｄ）及び工程（ｅ）の詳細な説明は省略される。

[0038] （試験例）

（試料溶液の調製）

ヒト全血（ＢＩＯＰＲＥＤＩＣ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社製）を希釈して、１０倍希釈液を作成した。このようにして、ヘモグロビンを含む試料溶液を調製した。以下、この試料溶液は「試料溶液Ｐ」と呼ばれる。

[0039] （試験例１）

（試料溶液の調製）

以下の試料溶液Ａ１～Ａ１６を調製した。比較用試料溶液ａ１も調製した。

用いられた試薬の入手先は以下の通りである。

サーモリシン：和光純薬工業株式会社

ＳＤＳ：和光純薬工業株式会社

ＴＴＡＢ（テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド）：和光純薬工業株式会社

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００：和光純薬工業株式会社

Ｔｗｅｅｎ２０：和光純薬工業株式会社

ＷＳＴ－３：同仁化学研究所

ＷＳＴ－４：同仁化学研究所

ＷＳＴ－５：同仁化学研究所

（試料溶液Ａ１）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＳＤＳ　ＰＢＳ溶液：１０重量％

（試料溶液Ａ２）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

（試料溶液Ａ３）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

（試料溶液Ａ４）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

（試料溶液Ａ５）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－３　水溶液：２重量％

（試料溶液Ａ６）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ａ７）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ａ８）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ａ９）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ａ１０）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ａ１１）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ａ１２）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ａ１３）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ａ１４）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ａ１５）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ａ１６）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（比較用試料溶液ａ１）

試料溶液Ｐ

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

[0040]　（サーモリシンを用いたＨｂＡ１ｃ分解反応）

試料溶液Ａ１～Ａ１６および比較用試料溶液ａ１の温度は、３７℃に１０分間維持され、反応を生じさせた。

[0041]　（分解反応進行状況の比較）

反応後、試料溶液Ａ１～Ａ１６および比較用試料溶液ａ１は、ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）供された。図１Ａおよび図１Ｂは、電気泳動パターンを示す。図１Ａおよび図１Ｂ中の「Ｍ」は、タンパク質マーカーを指し示す。

[0042] ＨｂＡ１ｃ分解の度合いは、電気泳動パターンに含まれるヘモグロビン分子領域に対応する６４．５ＫＤａ付近のバンドの色の濃さ（ｃｏｌｏｒ ｓｔｒｅｎｇｔｈ）に反映される。６４．５ＫＤａ付近のバンドの色の濃さが低下すると、より多くの量のＨｂＡ１ｃが分解している。

[0043] 図１Ａおよび図１Ｂに示される電気泳動パターンから明らかなように、比較用試料溶液ａ１と比較して、試料溶液Ａ１、Ａ８、Ａ９、およびＡ１０において、より多くの量のＨｂＡ１ｃが分解した。試料溶液Ａ２、Ａ５、Ａ６、およびＡ７と比較して、試料溶液Ａ８、Ａ９、およびＡ１０において、より多くのＨｂＡ１ｃが分解した。

[0044] ＳＤＳ（試料溶液Ａ１）、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物（試料溶液Ａ８）、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－４の組成物（試料溶液Ａ９）、ならびにＴＴＡＢおよびＷＳＴ－５の組成物（試料溶液Ａ１０）が、サーモリシンを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0045] ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物（試料溶液Ａ８）は、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（試料溶液Ａ２）およびＷＳＴ－３が単独で用いられる場合（試料溶液Ａ５）と比較して、サーモリシンを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0046] ＴＴＡＢとＷＳＴ－４の組成物（試料溶液Ａ９）は、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（試料溶液Ａ２）およびＷＳＴ－４が単独で用いられる場合（試料溶液Ａ６）と比較して、サーモリシンを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0047] ＴＴＡＢとＷＳＴ－５の組成物（試料溶液Ａ１０）は、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（試料溶液Ａ２）およびＷＳＴ－５が単独で用いられる場合（試料溶液Ａ７）と比較して、サーモリシンを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0048] （試験例２）

（試料溶液の調製）

試料溶液Ｂ１～Ｂ１６が調製された。比較用試料溶液ｂ１も調製された。

用いられた試薬の入手先は以下の通りである。

パパイン：ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

ＳＤＳ：和光純薬工業株式会社

ＴＴＡＢ（テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド）：和光純薬工業株式会社

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００：和光純薬工業株式会社

Ｔｗｅｅｎ２０：和光純薬工業株式会社

ＷＳＴ－３：同仁化学研究所

ＷＳＴ－４：同仁化学研究所

ＷＳＴ－５：同仁化学研究所

（試料溶液Ｂ１）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＳＤＳ　ＰＢＳ溶液：１０重量％

（試料溶液Ｂ２）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

（試料溶液Ｂ３）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

（試料溶液Ｂ４）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

（試料溶液Ｂ５）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－３　水溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ６）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ｂ７）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ８）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ９）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ｂ１０）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ１１）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ１２）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ｂ１３）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ１４）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

（試料溶液Ｂ１５）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

（試料溶液Ｂ１６）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

（比較用試料溶液ｂ１）

試料溶液Ｐ

パパイン　ＰＢＳ溶液：３００Ｕ／ｍＬ

[0049] （サーモリシンを用いたＨｂＡ１ｃ分解反応）

試料溶液Ｂ１～Ｂ１６および比較用試料溶液ｂ１の温度は、３７℃に１０分間維持され、反応を生じさせた。

[0050] （分解反応進行状況の比較）

反応後、試料溶液Ｂ１～Ｂ１６および比較用試料溶液ｂ１は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）に供された。図２Ａおよび図２Ｂは、電気泳動パターンを示す。図２Ａおよび図２Ｂ中の「Ｍ」は、タンパク質マーカーを指し示す。

[0051] ＨｂＡ１ｃ分解の度合いは、電気泳動パターンに含まれるヘモグロビン分子領域に対応する６４．５ＫＤａ付近のバンドの色の濃さ（ｃｏｌｏｒ　ｓｔｒｅｎｇｔｈ）に反映される。６４．５ＫＤａ付近のバンドの色の濃さが低下すると、より多くの量のＨｂＡ１ｃが分解している。

[0052] 図２Ａおよび図２Ｂに示される電気泳動パターンから明らかなように、比較用試料溶液ｂ１と比較して、試料溶液Ｂ１、Ｂ８、Ｂ９、およびＢ１０において、より多くの量のＨｂＡ１ｃが分解した。試料溶液Ｂ２、Ｂ５、Ｂ６、およびＢ７と比較して、試料溶液Ｂ９、Ｂ１０、およびＢ１１において、より多くのＨｂＡ１ｃが分解した。

[0053] ＳＤＳ（試料溶液Ｂ１）、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物（試料溶液Ｂ８）、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－４の組成物（試料溶液Ｂ９）、ならびにＴＴＡＢおよびＷＳＴ－５の組成物（試料溶液Ｂ１０）が、パパインを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0054] ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物（試料溶液Ｂ８）は、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（試料溶液Ｂ２）およびＷＳＴ－３が単独で用いられる場

合（試料溶液Ｂ５）と比較して、パパインを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0055] ＴＴＡＢとＷＳＴ－４の組成物（試料溶液Ｂ９）は、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（試料溶液Ｂ２）およびＷＳＴ－４が単独で用いられる場合（試料溶液Ｂ６）と比較して、パパインを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0056] ＴＴＡＢとＷＳＴ－５の組成物（試料溶液Ｂ１０）は、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（試料溶液Ｂ２）およびＷＳＴ－５が単独で用いられる場合（試料溶液Ｂ７）と比較して、パパインを用いるＨｂＡ１ｃの分解速度を向上させる。

[0057] （試験例３）

（試料溶液の調製）

試料溶液Ｃ１～Ｃ１２が調製された。比較用試料溶液ｃ１も調製された。用いられた試薬の入手先は以下の通りである。

ＦＰＯＸ－ＣＥ：キッコーマン株式会社

ＳＤＳ：和光純薬工業株式会社

ペルオキシダーゼ：和光純薬工業株式会社

ＫＮ－１１１（発色色素）：同仁化学研究所

ＴＴＡＢ（テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド）：和光純薬工業株式会社

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００：和光純薬工業株式会社

Ｔｗｅｅｎ２０：和光純薬工業株式会社

ＷＳＴ－３：同仁化学研究所

ＷＳＴ－４：同仁化学研究所

ＷＳＴ－５：同仁化学研究所

（試料溶液Ｃ１）

ＳＤＳ　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ２）

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ３）

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ４）

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ５）

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ６）

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ７）

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ８）

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ９）

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ１０）

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ１１）

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｃ１２）

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（比較用試料溶液ｃ１）

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

[0058] （糖化ペプチドのＦＰＯＸとの反応）

試料溶液Ｃ１～Ｃ１２および比較用試料溶液ｃ１の温度が３７℃で１０分間維持され、反応を生じさせた。

[0059] 反応後、試料溶液Ｃ１～Ｃ１２および比較用試料溶液ｃ１（９５マイクロリットル）に、５マイクロリットルのＦｒｕ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ　１ｍＭ　ＰＢＳ溶液（株式会社ペプチド研究所社より入手可能）が添加された。このようにして、混合溶液Ｃ１～Ｃ１２および比較用混合溶液ｃ１が得られた。

[0060] （ＦＰＯＸ活性の評価）

波長６６０ナノメートルでの混合溶液Ｃ１～Ｃ１２および比較用混合溶液ｃ１の吸光度が、吸光度計（ＴＥＣＡＮ　Ｇｒｏｕｐ社より入手可能、商品名Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　Ｐｒｏ）を用いて、１分毎に測定した。図３は、結果を示す。

[0061] 糖化ペプチドＦｒｕ－Ｖａｌ－ＨｉｓはＦＰＯＸと反応して、過酸化水素を発生させる。過酸化水素は、発色色素ＫＮ－１１１と反応し、発色色素ＫＮ－１１１を赤色に変化させる。従って、波長６６０ｎｍ（赤）での発色色素ＫＮ－１１１の吸光度を測定することによって、ＦＰＯＸ活性が評価される。

[0062] 図３に示されるように、混合溶液Ｃ１以外の全ての混合溶液Ｃ２～Ｃ１２

および比較用混合溶液ｃ１において吸光度変化が観察された。その中でも、混合溶液Ｃ２を除き、吸光度変化は比較用混合試料ｃ１の吸光度変化と類似することが観察された。混合溶液Ｃ２の吸光度変化は、比較用混合試料ｃ１のそれと比べて緩やかであることが観察された。

[0063] 一方、試料溶液Ｃ１においては、吸光度変化は全く観察されなかった。

[0064] このように、アニオン性界面活性剤であるＳＤＳは、ＦＰＯＸを不活性化する（混合溶液Ｃ１の結果を参照のこと）。従って、ＳＤＳは、ＦＰＯＸを用いるＨｂＡ１ｃの本願定量方法に用いられない。一方、カチオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤は、ＦＰＯＸを不活性化しない（混合溶液Ｃ２～Ｃ１２および比較用混合溶液ｃ１の結果を参照のこと）。

[0065] 図３から明らかなように、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（混合溶液Ｃ２）と比較して、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－４の組成物、またはＴＴＡＢおよびＷＳＴ－５の組成物（混合溶液Ｃ８～Ｃ１０）が用いられた場合に、ＦＰＯＸは糖化ペプチドとより速やかに反応する。

[0066] （試験例４）

［試料溶液の調製］

試料溶液Ｄ１～Ｄ１６が調製された。比較用試料溶液ｄ１もまた、調製された。

用いられた試薬の入手先は以下の通りである。

ＦＰＯＸ－ＣＥ：キッコーマン株式会社

サーモリシン：和光純薬工業株式会社

ＳＤＳ：和光純薬工業株式会社

ペルオキシダーゼ：和光純薬工業株式会社

ＫＮ－１１１（発色色素）：同仁化学研究所

ＴＴＡＢ（テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド）：和光純薬工業株式会社

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００：和光純薬工業株式会社

Ｔｗｅｅｎ２０：和光純薬工業株式会社

ＷＳＴ－３：同仁化学研究所

ＷＳＴ－４：同仁化学研究所

ＷＳＴ－５：同仁化学研究所

（試料溶液Ｄ１）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＳＤＳ　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ２）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ３）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ４）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ５）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ６）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ７）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ８）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ９）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ１０）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ１１）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｄ１２）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（比較用試料溶液ｄ１）

サーモリシン　ＰＢＳ溶液：１５０，０００Ｕ／ｍＬ

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

[0067] （糖化ペプチドのＦＰＯＸとの反応）

試料溶液Ｄ１～Ｄ１２および比較用試料溶液ｄ１の温度が３７℃で１０分間維持され、反応を生じさせた。

[0068] 反応後、試料溶液Ｄ１～Ｄ１２および比較用試料溶液ｄ１（９５マイクロリットル）に、５マイクロリットルのＦｒｕ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ　１ｍＭ　ＰＢＳ溶液（株式会社ペプチド研究所社より入手可能）が添加された。このようにして、混合溶液Ｄ１～Ｄ１２および比較用混合溶液ｄ１が得られた。

[0069] （ＦＰＯＸ活性の評価）

波長６６０ナノメートルでの混合溶液Ｄ１～Ｄ１２および比較用混合溶液ｄ１の吸光度が、吸光度計（ＴＥＣＡＮ　Ｇｒｏｕｐ社より入手可能、商品名Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　Ｐｒｏ）を用いて、１分毎に測定した。図４は、結果を示す。

[0070] 糖化ペプチドＦｒｕ－Ｖａｌ－ＨｉｓはＦＰＯＸと反応して、過酸化水素を発生させる。過酸化水素は、発色色素ＫＮ－１１１と反応し、発色色素ＫＮ－１１１を赤色に変化させる。従って、波長６６０ｎｍ（赤）での発色色素ＫＮ－１１１の吸光度を測定することによって、ＦＰＯＸ活性が評価される。

[0071] 図４に示されるように、混合溶液Ｄ１以外の全ての混合溶液Ｄ２～Ｄ１２および比較用混合溶液ｄ１において吸光度変化が観察された。その中でも、混合溶液Ｄ２を除き、吸光度変化は比較用混合試料ｄ１の吸光度変化と類似することが観察された。混合溶液Ｄ２の吸光度変化は、比較用混合試料ｄ１のそれと比べて緩やかであることが観察された。

[0072] 一方、試料溶液Ｄ１においては、吸光度変化は全く観察されなかった。

[0073] このように、アニオン性界面活性剤であるＳＤＳは、ＦＰＯＸを不活性化する（混合溶液Ｄ１の結果を参照のこと）。従って、ＳＤＳは、ＦＰＯＸを用いるＨｂＡ１ｃの定量方法に用いられない。一方、カチオン性界面活性剤

および非イオン性界面活性剤は、ＦＰＯＸを不活性化しない（混合溶液Ｄ２～Ｄ１２および比較用混合溶液ｄ１の結果を参照のこと）。サーモリシンもまた、ＦＰＯＸを不活性化しない。

[0074] 図４から明らかなように、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（混合溶液Ｄ２）と比較して、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－４の組成物、またはＴＴＡＢおよびＷＳＴ－５の組成物（混合溶液Ｄ８～Ｄ１０）が用いられた場合に、ＦＰＯＸは糖化ペプチドとより速やかに反応する。

[0075] （試験例５）

（試料溶液の調製）

試料溶液Ｅ１～Ｅ１２が調製された。比較用試料溶液ｅ１もまた、調製された。

用いられた試薬の入手先は以下の通りである。

ＦＰＯＸ－ＣＥ：キッコーマン株式会社

パパイン：ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

ＳＤＳ：和光純薬工業株式会社

ペルオキシダーゼ：和光純薬工業株式会社

ＫＮ－１１１（発色色素）：同仁化学研究所

ＴＴＡＢ（テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド）：和光純薬工業株式会社

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００：和光純薬工業株式会社

Ｔｗｅｅｎ２０：和光純薬工業株式会社

ＷＳＴ－３：同仁化学研究所

ＷＳＴ－４：同仁化学研究所

ＷＳＴ－５：同仁化学研究所

（試料溶液Ｅ１）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＳＤＳ　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ２）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ３）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ４）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ５）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ６）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ７）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ８）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ９）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－４　ＰＢＳ溶液：０．５重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ１０）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＴＴＡＢ：１０重量％

ＷＳＴ－５　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ１１）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（試料溶液Ｅ１２）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

Ｔｗｅｅｎ２０　ＰＢＳ溶液：１０重量％

ＷＳＴ－３　ＰＢＳ溶液：２重量％

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

（比較用試料溶液ｅ１）

パパイン：３００Ｕ／ｍＬ

ＦＰＯＸ－ＣＥ　ＰＢＳ溶液：２８Ｕ／ｍＬ

ペルオキシダーゼ：２０Ｕ／ｍＬ

ＫＮ－１１１：２ｍＭ

[0076]　（糖化ペプチドのＦＰＯＸとの反応）

試料溶液Ｅ１～Ｅ１２および比較用試料溶液ｅ１の温度が３７℃で１０分間維持され、反応を生じさせた。

[0077]　反応後、試料溶液Ｅ１～Ｅ１２および比較用試料溶液ｅ１（９５マイクロリットル）に、５マイクロリットルのＦｒｕ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ　１ｍＭ　Ｐ

ＢＳ溶液（株式会社ペプチド研究所社より入手可能）が添加された。このようにして、混合溶液Ｅ１～Ｅ１２および比較用混合溶液ｅ１が得られた。

[0078] （ＦＰＯＸ活性の評価）

波長６６０ナノメートルでの混合溶液Ｅ１～Ｅ１２および比較用混合溶液ｄ１の吸光度が、吸光度計（ＴＥＣＡＮ　Ｇｒｏｕｐ社より入手可能、商品名Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　Ｐｒｏ）を用いて、１分毎に測定した。図５は、結果を示す。

[0079] 糖化ペプチドＦｒｕ－Ｖａｌ－ＨｉｓはＦＰＯＸと反応して、過酸化水素を発生させる。過酸化水素は、発色色素ＫＮ－１１１と反応し、発色色素ＫＮ－１１１を赤色に変化させる。従って、波長６６０ｎｍ（赤）での発色色素ＫＮ－１１１の吸光度を測定することによって、ＦＰＯＸ活性が評価される。

[0080] 図５に示されるように、混合溶液Ｅ１以外の全ての混合溶液Ｅ２～Ｅ１２および比較用混合溶液ｅ１において吸光度変化が観察された。その中でも、混合溶液Ｅ２を除き、吸光度変化は比較用混合試料ｅ１の吸光度変化と類似することが観察された。混合溶液Ｅ２の吸光度変化は、比較用混合試料ｅ１のそれと比べて緩やかであることが観察された。

[0081] 一方、試料溶液Ｅ１においては、吸光度変化は全く観察されなかった。

[0082] このように、アニオン性界面活性剤であるＳＤＳは、ＦＰＯＸを不活性化する（混合溶液Ｅ１の結果を参照のこと）。従って、ＳＤＳは、ＦＰＯＸを用いるＨｂＡ１ｃの定量方法に用いられない。一方、カチオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤は、ＦＰＯＸを不活性化しない（混合溶液Ｅ２～Ｅ１２および比較用混合溶液ｅ１の結果を参照のこと）。パパインもまた、ＦＰＯＸを不活性化しない。

[0083] 図５から明らかなように、ＴＴＡＢが単独で用いられる場合（混合溶液Ｅ２）と比較して、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－３の組成物、ＴＴＡＢおよびＷＳＴ－４の組成物、またはＴＴＡＢおよびＷＳＴ－５の組成物（混合溶液Ｅ８～Ｅ１０）が用いられた場合に、ＦＰＯＸは糖化ペプチドとより速やかに反

応する。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明は、糖尿病の診断に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 試料に含有される糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を定量する方法であって、以下の工程：

（ａ）カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下において、前記試料をプロテアーゼと混合し、糖化ペプチドを含有する糖化ペプチド水溶液を得る工程、

（ｂ）前記工程（ａ）において得られた糖化ペプチド水溶液をフルクトシルペプチドオキシダーゼと混合し、過酸化水素を得る工程、ここで、前記糖化ペプチド水溶液は前記組成物を含有するものである、および

（ｃ）工程（ｂ）において得られた過酸化水素水の量に基づいて、前記糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の濃度を算出する工程

を具備する、方法。

[請求項2] 請求項１に記載の方法であって、前記プロテアーゼが、サーモリシンおよびパパインからなる群から選択される、方法。

[請求項3] 請求項１に記載の方法であって、前記カチオン性界面活性剤が、第４級アンモニウム塩である、方法。

[請求項4] 請求項１に記載の方法であって、前記テトラゾリウム塩が、

２－（４－ヨードフェニル）－３－（２，４－ジニトロフェニル）－５－（２，４－ジスルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム，モノナトリウム塩、

２－（２－ベンゾチアゾリル）－３－（４－カルボキシ－２－メトキシフェニル）－５－［４－［（２－ソジオスルホエチル）カルバモイル］フェニル］－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム、および

２，２’－（３，３’－ジメトキシ－４，４’－ビフェニリレン）ビス［３－（２－ベンゾチアゾリル）－５－［４－［Ｎ－［２－（ソジオオキシスルホニル）エチル］－Ｎ－（２－スルホエチル）カルバモイル］フェニル］－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム］からなる群

から選択される、方法。

[請求項5] 請求項１に記載の方法であって、前記糖化ペプチドがフルクトシルペプチドである、方法。

[請求項6] 請求項５に記載の方法であって、前記フルクトシルペプチドが、フルクトシルーバリンーヒスチジンである、方法。

[請求項7] 試料に含有される糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）を定量する方法であって、以下の工程：

（ａ）カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩の組成物の存在下において、前記試料をプロテアーゼおよびフルクトシルペプチドオキシダーゼと混合し、過酸化水素水を得る工程、および

（ｂ）工程（ａ）において得られた過酸化水素の量に基づいて、前記糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）の濃度を算出する工程

を具備する、方法。

[請求項8] 請求項７に記載の方法であって、前記プロテアーゼが、サーモリシンおよびパパインからなる群から選択される、方法。

[請求項9] 請求項７に記載の方法であって、前記界面活性剤が、第４級アンモニウム塩である、方法。

[請求項10] 請求項７に記載の方法であって、前記テトラゾリウム塩が、

２－（４－ヨードフェニル）－３－（２，４－ｄｉニトロフェニル）－５－（２，４－ジスルホフェニル）－２Ｈ－テトラゾリウム，モノナトリウム塩、

２－（２－ベンゾチアゾリル）－３－（４－カルボキシ－２－メトキシフェニル）－５－［４－［（２－ソジオスルホエチル）カルバモイル］フェニル］－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム、および

２，２’－（３，３’－ジメトキシ－４，４’－ビフェニリレン）ビス［３－（２－ベンゾチアゾリル）－５－［４－［Ｎ－［２－（ソジオオキシスルホニル）エチル］－Ｎ－（２－スルホエチル）カルバモイル］フェニル］－２Ｈ－テトラゾール－３－イウム］からなる群

から選択される、方法。

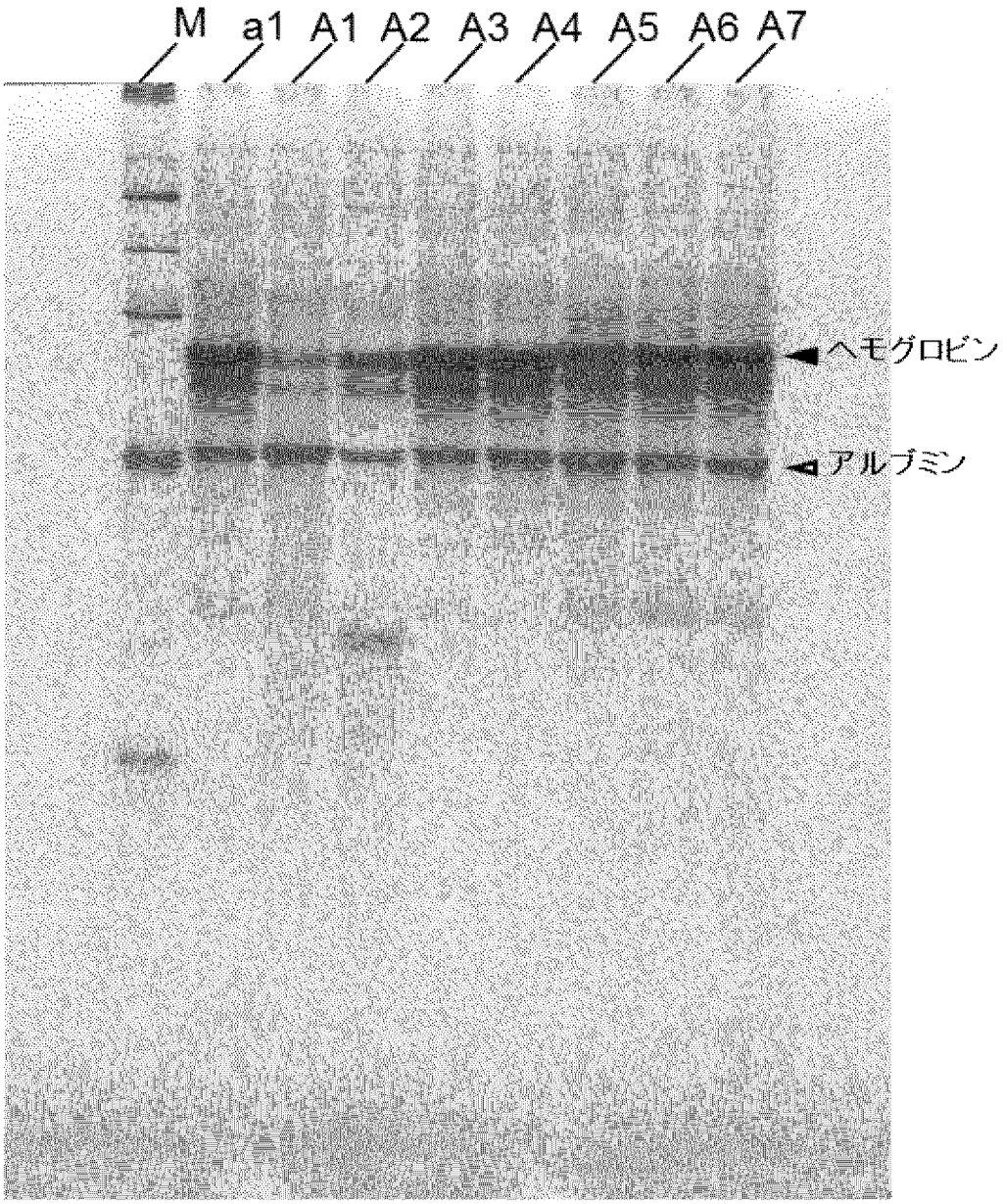
[請求項11] 請求項７に記載の方法であって、前記糖化ペプチドがフルクトシルペプチドである、方法。

[請求項12] 請求項１１に記載の方法であって、前記フルクトシルペプチドが、フルクトシルーバリンーヒスチジンである、方法。

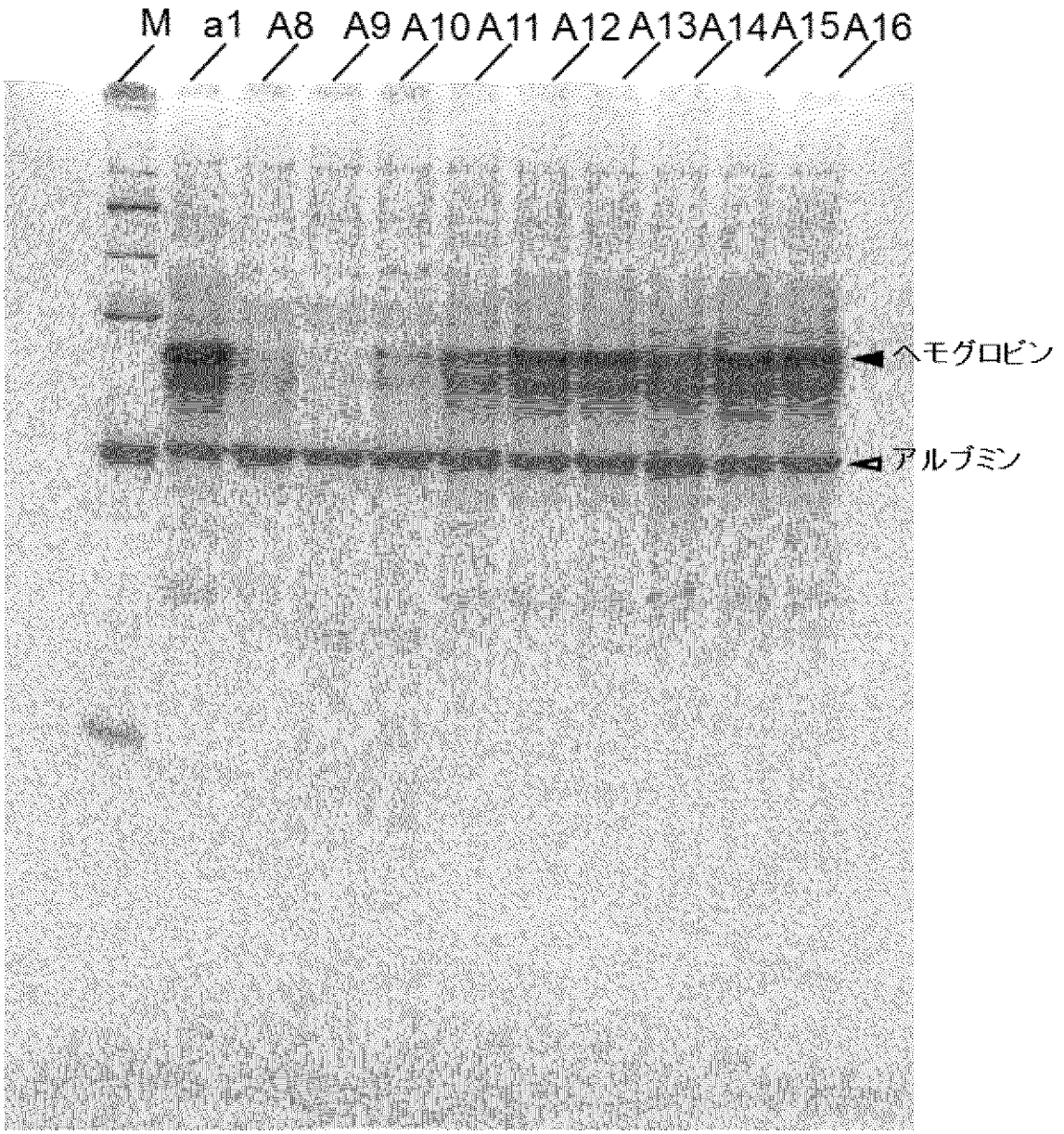
[請求項13] カチオン性界面活性剤およびテトラゾリウム塩を含有する、プロテアーゼを活性化するための組成物。

[請求項14] 請求項１３に記載の組成物であって、前記プロテアーゼが、サーモリシンおよびパパインからなる群から選択される、組成物。

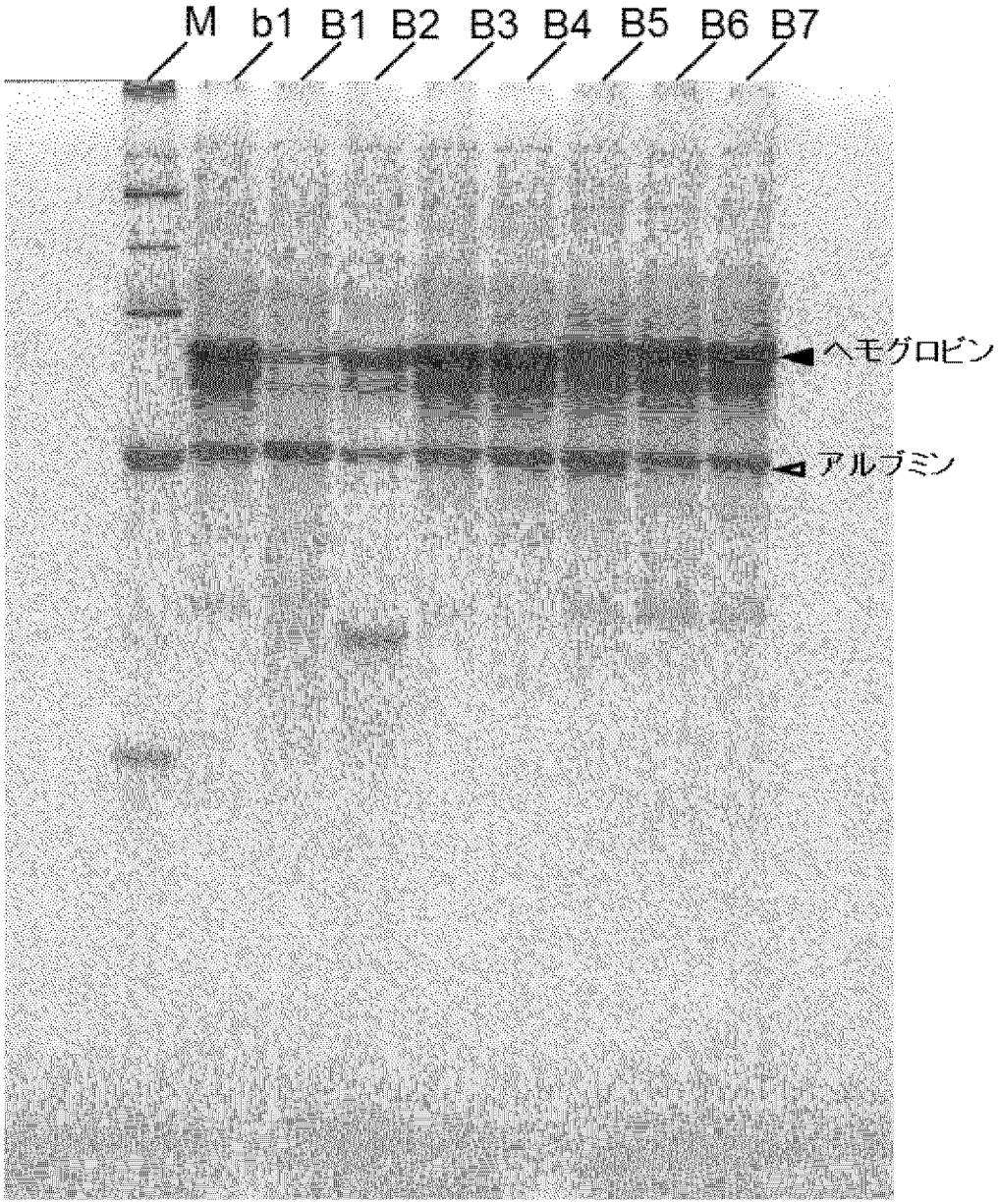
[図1A]



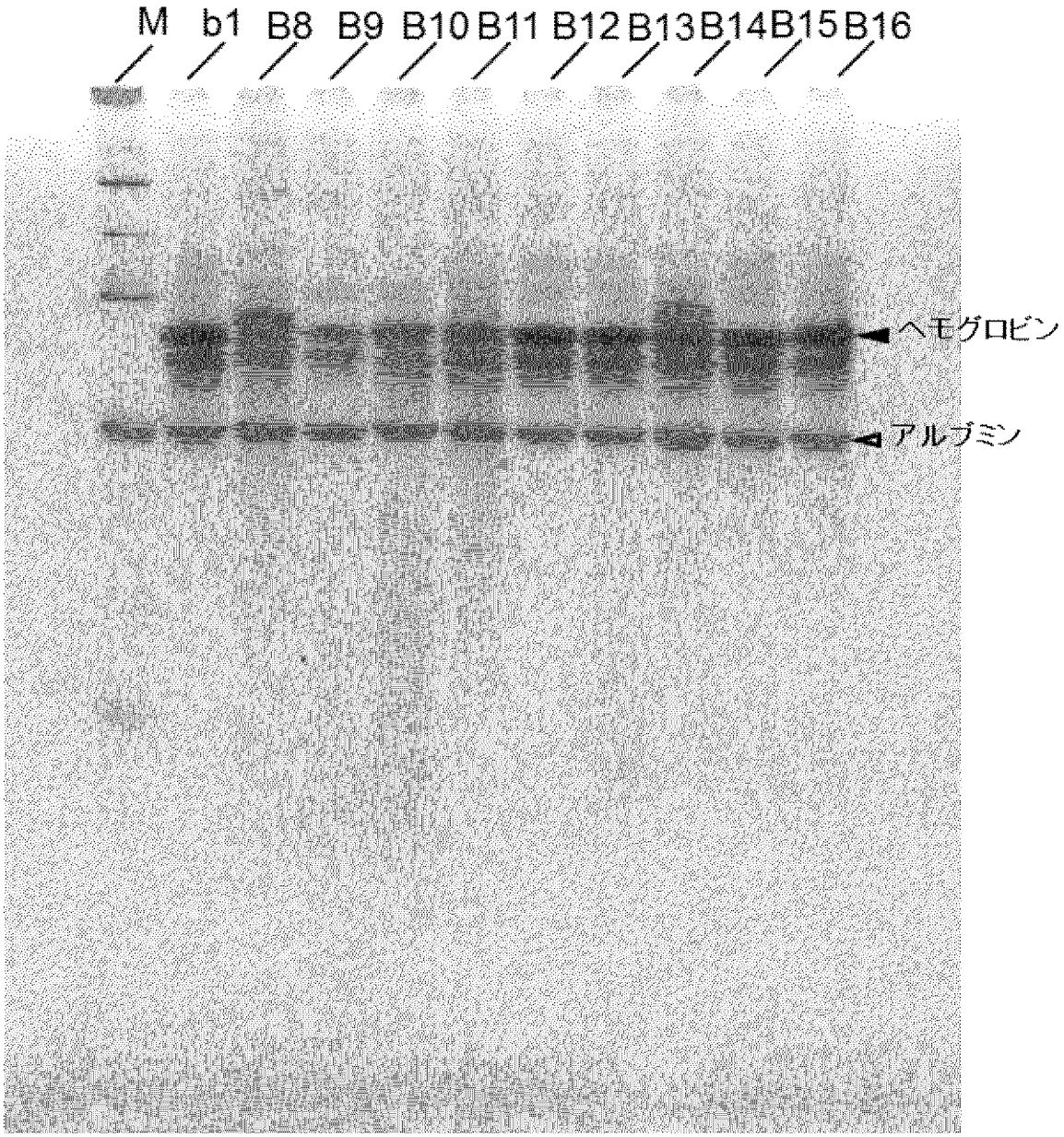
[図1B]



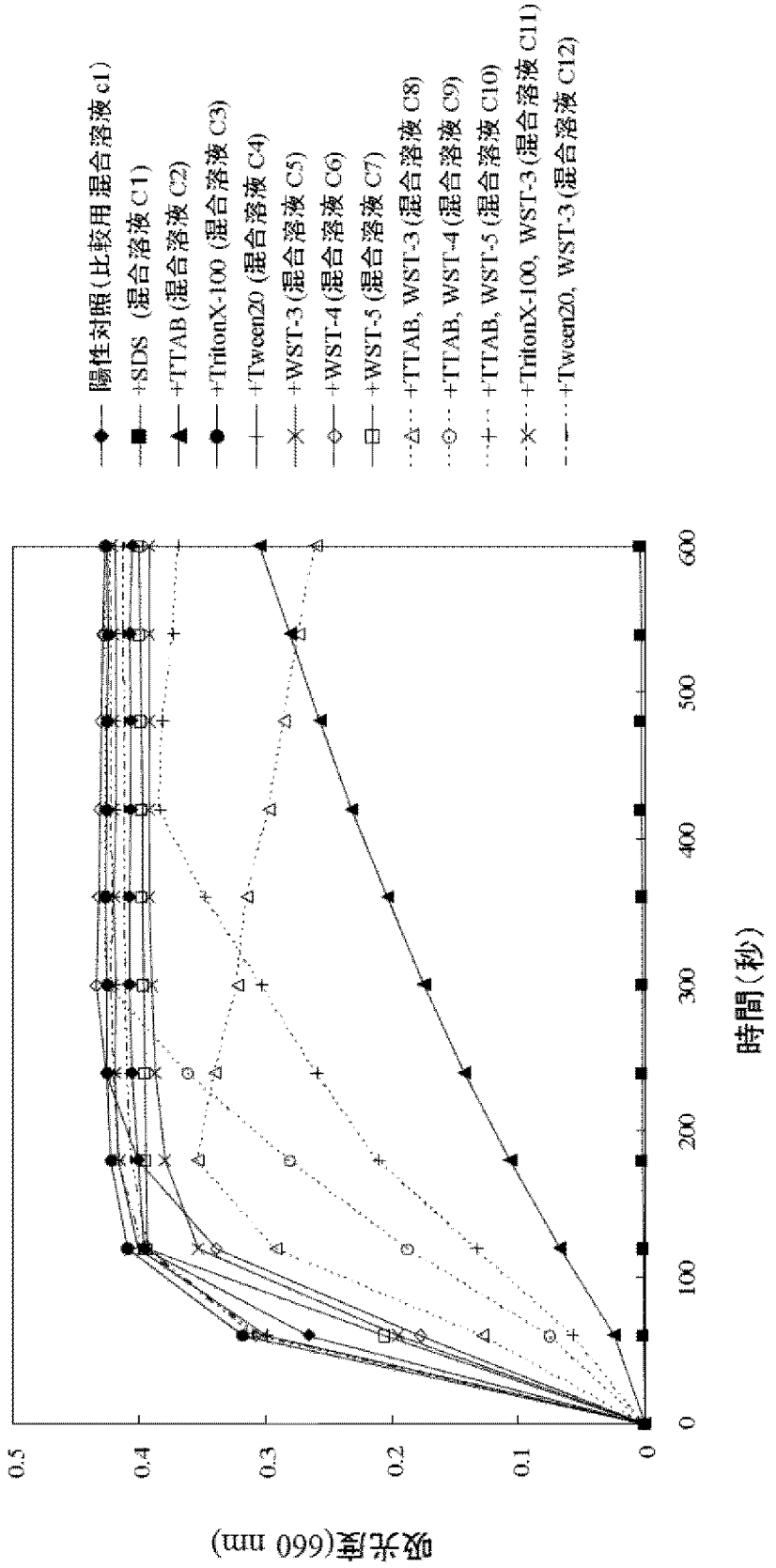
[図2A]



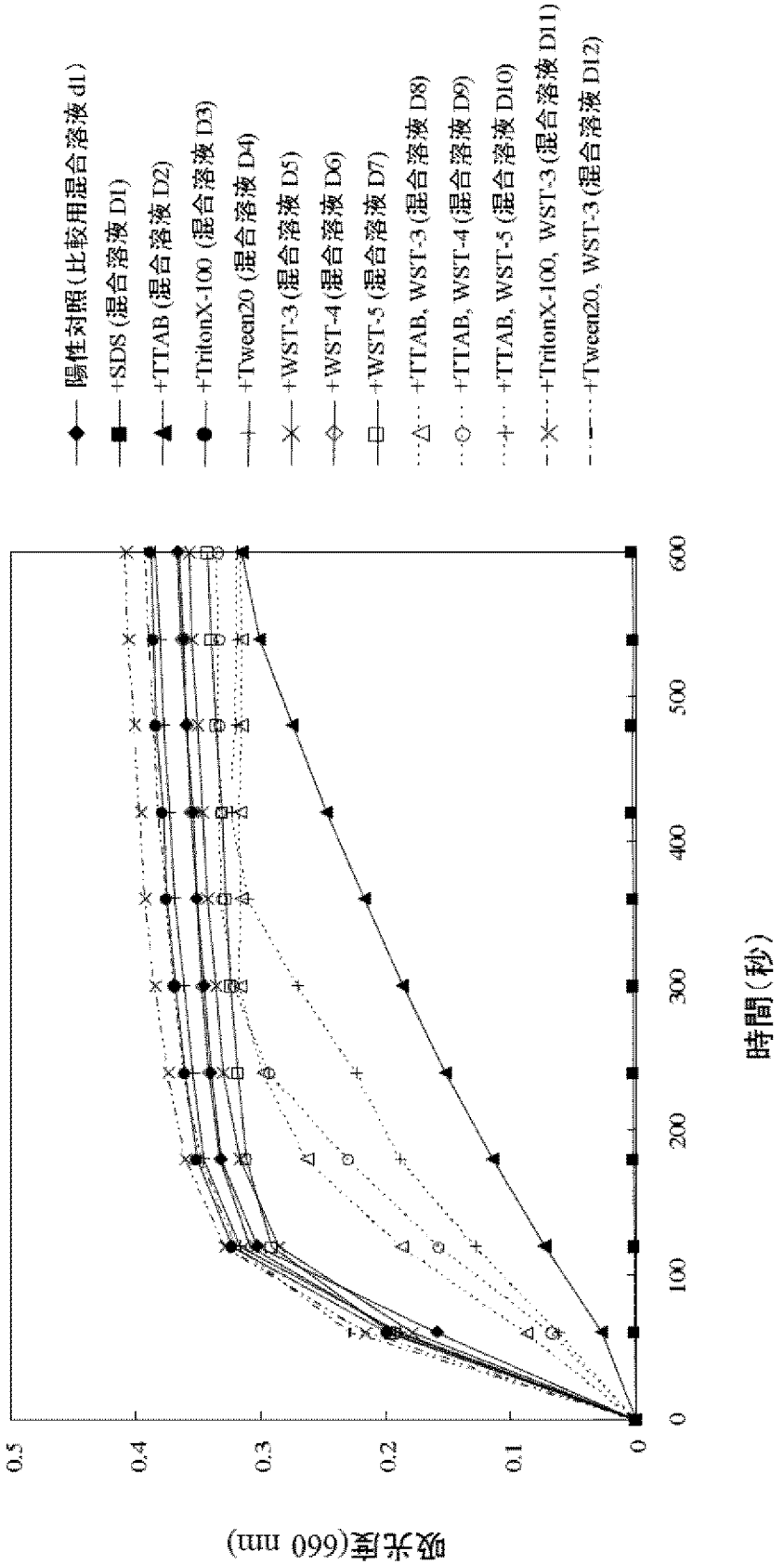
[図2B]



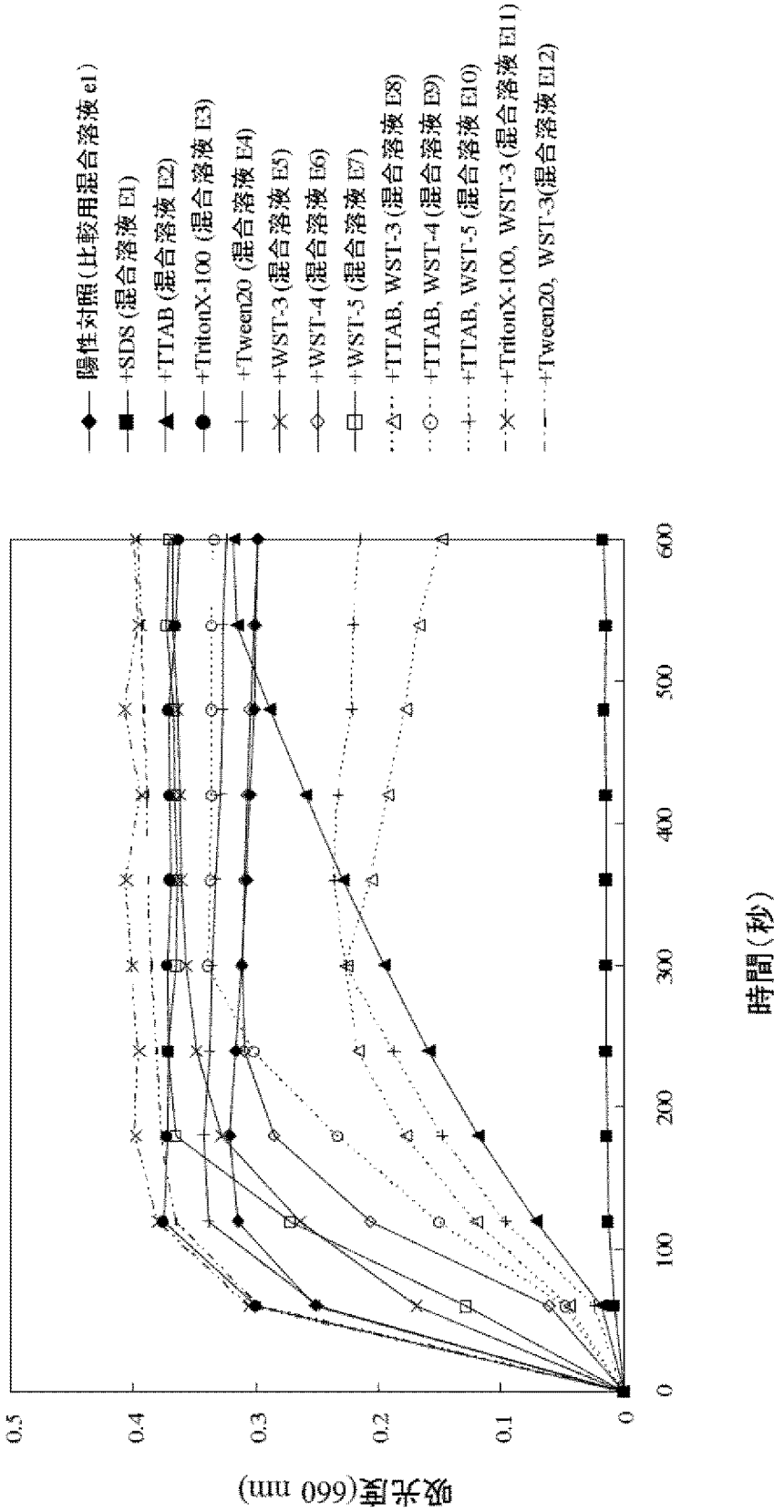
[図3]


陽性対照(比較用 混合溶液 c1)
+SDS (混合溶液 C1)
+TTAB (混合溶液 C2)
+TritonX-100 (混合溶液 C3)
+Tween20 (混合溶液 C4)
+WST-3 (混合溶液 C5)
+WST-4 (混合溶液 C6)
+WST-5 (混合溶液 C7)
+TTAB, WST-3 (混合溶液 C8)
+TTAB, WST-4 (混合溶液 C9)
+TTAB, WST-5 (混合溶液 C10)
+TritonX-100, WST-3 (混合溶液 C11)
+Tween20, WST-3 (混合溶液 C12)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
100
200
300
400
500
600
吸光度(660 nm)
時間(秒)

[図4]


陽性対照(比較用混合溶液 d1)
+SDS (混合溶液 D1)
+TTAB (混合溶液 D2)
+TritonX-100 (混合溶液 D3)
+Tween20 (混合溶液 D4)
+WST-3 (混合溶液 D5)
+WST-4 (混合溶液 D6)
+WST-5 (混合溶液 D7)
+TTAB, WST-3 (混合溶液 D8)
+TTAB, WST-4 (混合溶液 D9)
+TTAB, WST-5 (混合溶液 D10)
+TritonX-100, WST-3 (混合溶液 D11)
+Tween20, WST-3 (混合溶液 D12)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0
100
200
300
400
500
600
吸光度(660 nm)
時間(秒)

[図5]


陽性対照(比較用混合溶液e1)
+SDS (混合溶液E1)
+TTAB (混合溶液 E2)
+TritonX-100 (混合溶液 E3)
+Tween20 (混合溶液 E4)
+WST-3 (混合溶液 E5)
+WST-4 (混合溶液 E6)
+WST-5 (混合溶液 E7)
+TTAB, WST-3 (混合溶液 E8)
+TTAB, WST-4 (混合溶液 E9)
+TTAB, WST-5 (混合溶液 E10)
+TritonX-100, WST-3 (混合溶液 E11)
+Tween20, WST-3(混合溶液 E12)
吸光度(660 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
100
200
300
400
500
600
時間(秒)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/001063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/26(2006.01)i, *C12N9/50*(2006.01)i, *C12Q1/37*(2006.01)i, *G01N33/49*(2006.01)i, *G01N33/72*(2006.01)i

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)
C12Q1/26, C12N9/50, C12Q1/37, G01N33/49, G01N33/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2005/056823 A1 (ARKRAY, INC.), 23 June 2005 (23.06.2005), & EP 1693463 A1 & US 2007/0134754 A1	7-12/1-14
Y	WO 2002/027012 A1 (ARKRAY, INC.), 04 April 2002 (04.04.2002), & EP 1329512 A1 & US 2003/0186346 A1	1-14
Y	WO 2002/061119 A1 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA), 08 August 2002 (08.08.2002), & EP 1362925 A1 & US 2005/0101771 A1	1-14
Y	WO 2012/173185 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.), 20 December 2012 (20.12.2012), (Family: none)	1-14

☒ 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	Date of mailing of the international search report
07 April, 2014 (07.04.14)	15 April, 2014 (15.04.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/001063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/007760 A1 (ARKRAY, INC.), 22 January 2004 (22.01.2004), & EP 1522593 A1 & US 2005/0260735 A1	1-14
A	WO 2006/120976 A1 (ARKRAY, INC.), 16 November 2006 (16.11.2006), & EP 1878801 A1 & US 2009/0081718 A1	1-14
A	JP 2008-022828 A (Kao Corp.), 07 February 2008 (07.02.2008), (Family: none)	1-14
A	SAKURABAYASHI I., et al., New enzymatic assay for glycohemoglobin, Clin. Chem., 2003, vol.49, no.2, p.269-274	1-14

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／００１０６３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/26(2006.01)i, C12N9/50(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i, G01N33/49(2006.01)i, G01N33/72(2006.01)i

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.　C12Q1/26, C12N9/50, C12Q1/37, G01N33/49, G01N33/72

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

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)、WPI

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	関連する請求項の番号
X／Y	WO 2005/056823 A1 (ARKRAY, INC.) 2005.06.23 & EP 1693463 A1 & US 2007/0134754 A1	７－１２／１－１４
Y	WO 2002/027012 A1 (ARKRAY, INC.) 2002.04.04 & EP 1329512 A1 & US 2003/0186346 A1	１－１４

☑　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の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	国際調査報告の発送日
０７．０４．２０１４	１５．０４．２０１４

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）　４Ｂ　３７６５
池上　文緒
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	関連する請求項の番号
Y	WO 2002/061119 A1 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) 2002.08.08 & EP 1362925 A1 & US 2005/0101771 A1	１－１４
Y	WO 2012/173185 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 2012.12.20 (ファミリーなし)	１－１４
A	WO 2004/007760 A1 (ARKRAY, INC.) 2004.01.22 & EP 1522593 A1 & US 2005/0260735 A1	１－１４
A	WO 2006/120976 A1 (ARKRAY, INC.) 2006.11.16 & EP 1878801 A1 & US 2009/0081718 A1	１－１４
A	JP 2008-022828 A (花王株式会社) 2008.02.07 (ファミリーなし)	１－１４
A	SAKURABAYASHI I., et al., New enzymatic assay for glycohemoglobin, Clin. Chem., 2003, vol.49, no.2, p.269-274	１－１４