

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-515475

(P2017-515475A)

(43) 公表日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)	
C12Q	1/37	(2006.01)	C12Q 1/37	2G045
C12Q	1/28	(2006.01)	C12Q 1/28	2G054
GO1N	33/72	(2006.01)	GO1N 33/72	A 4B063
GO1N	33/49	(2006.01)	GO1N 33/49	Z
GO1N	21/78	(2006.01)	GO1N 21/78	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2016-566201 (P2016-566201)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月31日 (2015. 3. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年12月2日 (2016. 12. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/057024
 (87) 国際公開番号 W02015/169511
 (87) 国際公開日 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)
 (31) 優先権主張番号 102014106301.5
 (32) 優先日 平成26年5月6日 (2014. 5. 6)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 509126025
 ダイアシス ダイアグノスティック シス
 テムズ ゲーエムベーハー
 DIASYS DIAGNOSTIC S
 YSTEMS GMBH
 ドイツ、65558 ホルツハイム、アル
 テ シュトラーセ、9
 (74) 代理人 110001368
 清流国際特許業務法人
 (74) 代理人 100129252
 弁理士 昼間 孝良
 (74) 代理人 100155033
 弁理士 境澤 正夫

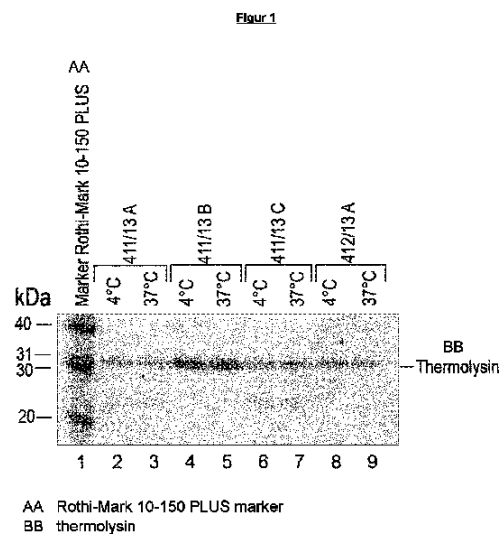
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HbA1c の酵素的定量法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、糖化ヘモグロビン (HbA1c) 量を決定する方法、即ち、サンプル中の赤血球を必要に応じて溶血し、その後放出されたヘモグロビンを必要に応じてタンパク質分解剤に接触させ、このように又は他の態様で得られた糖化ヘモグロビン分解物を定量する方法に関する。

【解決手段】このようなプロセス、並びに、このプロセスに使用可能な試薬であって、必要不可欠な化学化合物が十分に安定的であるという特徴を有するプロセス並びに試薬を提供するために、必要なタンパク質分解剤を、不活性化したプロテアーゼとして提供し、その後、その場で再活性化させることを提案する。本発明の特定の実施形態では、1~3の範囲の非常に低い pH でアンフォールドされるヘモグロビンを安定化するために、少なくとも1種の適切な安定化剤を溶血溶液中に含有させる。更に、本発明の当該実施形態においては、HbA1c量の決定に関しロイコ染料を使用し、本発明は、後者のロイコ染料を特定のホスフィン化合物及び/又はチオ化合物によって安定化することを提案する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の糖化ヘモグロビン (HbA1c) 量を決定する方法において、以下の方法工程：

- a) サンプル中の赤血球を溶血して、そこに含まれている HbA1c を放出させ、
- b) 方法工程 a) で放出させた HbA1c を、糖化ヘモグロビン分解物を生成するためのタンパク質分解剤に接触させ、
- c) 方法工程 b) で生成された糖化ヘモグロビン分解物を定量化することによって HbA1c 量を決定する

が実施される方法であって、

前記方法工程 b) で使用されるタンパク質分解剤は、少なくとも 2 つの異なる溶液を方法工程 a) で放出させた HbA1c に接触させるように製造され、

前記溶液の 1 つは、1 ~ 8 の範囲にある pH 値を有し、且つ、

i) プロテアーゼ、

ii) プロテアーゼ 1000 kU / l 当り 0.1 mmol / l ~ 2 mmol / l の、二価金属イオンに対するキレーター、及び

iii) 0.5 mmol / l ~ 10 mmol / l の Ca^{2+} 又は 0.5 mmol / l ~ 10 mmol / l の Mg^{2+}

を含有し、

キレーター : Ca^{2+} 又はキレーター : Mg^{2+} のモル比は、1 : 2 ~ 1 : 20 の範囲にあり、

他の前記溶液は、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$ ~ 5000 $\mu\text{mol} / \text{l}$ 含有することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$ ~ 5000 $\mu\text{mol} / \text{l}$ 含有する溶液が、溶血作用洗剤を含有し、方法工程 a) でサンプルに添加される溶血溶液である、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

方法工程 a) の前記溶血が、溶血溶液 (H) を添加することによって行われ、

該溶血溶液は、溶血作用洗剤及び 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル) ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を有し、且つ、1 ~ 3 の範囲にある pH 値を有することを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

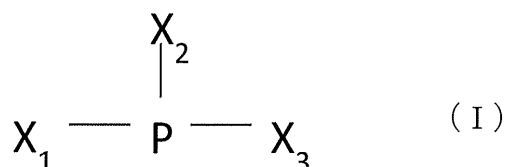
【請求項 4】

方法工程 c) で行われる糖化ヘモグロビン分解物の定量化は、この分解物をフルクトシルペプチドオキシダーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって酸化させて過酸化水素を生成し、生じた過酸化水素の量を決定することによって行われ、

過酸化水素の量は、ペルオキシダーゼ存在下のロイコ染料の発色反応から定量化され、

該ロイコ染料は、この染料の安定化のための一般式 (I) の化合物を含有する溶液内に調製されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【化 1】



10

20

30

40

50

(式中、Pはリン原子を示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して、置換又は無置換の直鎖又は分枝鎖 $C_1 \sim C_8$ アルキル残基、置換又は無置換のシクロヘキシル残基、及び置換又は無置換のフェニル残基から選択される。)

【請求項5】

前記ロイコ染料を含有する溶液が、この染料の安定化のために少なくとも1種のチオ化合物を含有することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記少なくとも1種のチオ化合物が、チオジグリコール、チオリンゴ酸、チオニコチンアミド、チオNAD及びこれらの混合物から選択されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

10

【請求項7】

方法工程c)でHbA1c量決定作業を行う前に、SH基捕捉剤を反応混合物に添加することを特徴とする請求項5及び6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

全ヘモグロビン濃度を決定する作業を、方法工程a)~c)の際又はこれらの方法工程間に行うことを特徴とする請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

サンプル中の糖化ヘモグロビン(HbA1c)量を決定する方法に使用される試薬キットにおいて、

該試薬キットが、少なくとも2つの異なる溶液を別個の容器に備え、

20

前記溶液の1つは、1~8の範囲にあるpH値を有し、且つ、プロテアーゼと、プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l~2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーターと、0.5mmol/l~10mmol/lの Ca^{2+} 又は0.5mmol/l~10mmol/lの Mg^{2+} とを含有し、

キレーター： Ca^{2+} 又はキレーター： Mg^{2+} のモル比は、1:2~1:20の範囲にあり、

他の前記溶液は、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを100 μ mol/l~5000 μ mol/l含有する

ことを特徴とする試薬キット。

【請求項10】

30

少なくとも以下の溶液を別個の容器に備えることを特徴とする請求項9に記載の試薬キット。

- 溶血作用洗剤と、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを100 μ mol/l~5000 μ mol/l含有する溶血溶液(H)、

- フルクトシルペプチドオキシダーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、ペルオキシダーゼとを含有する第一試薬溶液(R1)、及び

- プロテアーゼと、プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l~2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーターと、0.5mmol/l~10mmol/lの Ca^{2+} 又は0.5mmol/l~10mmol/lの Mg^{2+} と、ロイコ染料とを更に含有し、キレーター： Ca^{2+} 及びキレーター： Mg^{2+} のモル比が、1:2~1:20の範囲にある第二試薬溶液(R2)

40

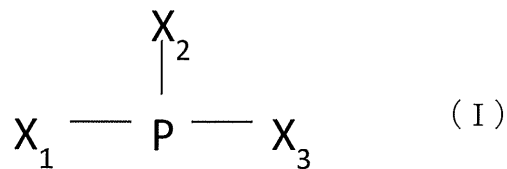
【請求項11】

前記溶液(H)が、溶血作用洗剤及び2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を含有し、且つ、1~3の範囲にあるpH値を有する溶血溶液であることを特徴とする請求項9及び10のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項12】

前記溶液(R2)が、染料の安定化のために少なくとも1種の一般式(I)の化合物を含有することを特徴とする請求項10及び11のいずれか一項に記載の試薬キット。

【化 2】



(式中、Pはリン原子を示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して、置換又は無置換の直鎖又は分枝鎖 $C_1 \sim C_8$ アルキル残基、置換又は無置換のシクロヘキシル残基、及び置換又は無置換のフェニル残基から選択される。)

10

【請求項 13】

前記溶液(R2)が、ロイコ染料を安定化するために少なくとも1種のチオ化合物を含有し、

該少なくとも1種のチオ化合物は、好ましくはチオジグリコール、チオリンゴ酸、チオニコチンアミド、チオNAD及びこれらの混合物から選択されることを特徴とする請求項10～12のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項 14】

前記溶液(R1)がSH基捕捉剤を含有し、

該SH基捕捉剤は、好ましくはN-エチルマレイミドであることを特徴とする請求項10～13のいずれか一項に記載の試薬キット。

20

【請求項 15】

請求項1～8のいずれか一項に記載の方法に使用されることを特徴とする請求項10～14のいずれか一項に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中の糖化ヘモグロビン(HbA1c)量を決定する方法、及びサンプル中の糖化ヘモグロビン(HbA1c)量を決定する方法に使用可能な試薬キットに関する。

30

【背景技術】

【0002】

IFCC(International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine、国際臨床化学連合)の定義によれば、糖化ヘモグロビン(HbA1c)とは、ヘモグロビンの鎖のN末端バリンにグルコースが結合することによって生成される安定した生成物をいう。ヘモグロビン総量に対するHbA1cの量(全ヘモグロビンの1モル当りのHbA1cのmmol)は、血液サンプルを採取する前直近の8週間における平均血糖値を示し、従って、「長期血糖」とも呼ばれる。HbA1c値は通常、20mmol/mol～42mmol/molの範囲内にあるべきことから、糖尿病の診断及び治療のための重要な指標である。

40

【0003】

HbA1c定量方法として、例えば、免疫アッセイ(例えば、免疫比濁法(TIA))及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が知られている。糖化ヘモグロビンのフルクトシルアミノ酸オキシドレダクターゼ(FAOD)との反応を定量化する酵素法も時には利用可能である。

【0004】

酵素調査法においては、他の全てのHbA1c法と同様に、第一工程で、血液サンプル中の赤血球を破壊し溶血して、そこに含まれているHbA1cを放出させる。次いで、放出された糖化ヘモグロビンを、タンパク質分解剤に接触させて糖化ヘモグロビン分解物を生成する。これらのタンパク質分解によって生成された分解物には、フルクトシル・バリン

50

(Fru - Val) 及びフルクトシル・バリン・ヒスチジン (Fru - Val - His) 又はより鎖長が長いフルクトシルペプチドが含まれ、これらは、糖化ヘモグロビンの鎖のアミノ末端から切断される。このフルクトシルアミノ酸又はフルクトシルペプチドは、酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOX) や酵素フルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX) といった酵素の活性によって酸化される。この酸化工程の結果、過酸化水素 (H_2O_2) が生成される。

【0005】

上記酸化工程によって生成された過酸化水素の量は、フルクトシル化したアミノ酸又はペプチドの量と相関している。それゆえ、この工程によって生成された過酸化水素の量は、サンプル中の HbA1c 量の目安とされる。従って、HbA1c 量の最終的な決定は、例えば発色反応に基づいて過酸化水素の量を定量化することによって行うことができるが、この発色反応は、測光法で評価され、過酸化水素の量と化学量論的に相関するものである。もっとも、原則的に、サンプル中の過酸化水素の量を定量化する他の任意の分析方法も同様に使用できる。

10

【0006】

過酸化水素を定量化するある方法においては、ロイコ染料還元体を過酸化水素で酸化する。しかしながら、この方法では、ロイコ染料が自動的に酸化することによって、不特定のブランク値のシグナルが生じ、且つ、スペクトル背景値が上昇して、検体シグナルの正確な測光が難しくなるという困難を伴う。他方で、ロイコ染料には通常、他の染料よりも高い分子吸収係数を有するという利点がある。また、多くのロイコ染料は、例えばピリルピンやヘモグロビンのような血液成分との相互作用による光学的な影響を一般的に無視できるほど高い吸収極大値を有している。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

化学試薬及び診断試薬の長期安定性が問題であり、特に、輸送、貯蔵及び/又は処理の際にこれらの試薬が特に高い温度又は特に低い温度及び/或いは激しい温度変化に曝される場合に解決困難な問題となる。このことが、上述のロイコ染料や、HbA1c 試験に使用される酵素及び他の試薬にも同様にあてはまることは理解されよう。

【0008】

しかしながら、同時に、検査する出発原料の安定性、並びに、反応の中間体及び最終生成物の安定性を確保することも、結果を確実に再現可能とするためには非常に重要である。

30

【0009】

従って、本発明者らは、サンプル中の糖化ヘモグロビン (HbA1c) 量を定量化する方法、並びに、この方法に使用可能な試薬を、反応に必要な不可欠な化学化合物が十分に安定した形態で存在するように提供することを目的とした。

好ましくは、本発明に係る方法及び本発明に係る試薬は、全ヘモグロビンの定量と HbA1c 量の決定を同時に可能とすることを目的とする。

【図面の簡単な説明】

40

【0010】

【図1】実施例におけるプロテアーゼの安定化、SDSゲル電気泳動に関する説明図である。

【図2a】実施例における 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル) ホスフェートポリマーを添加しない場合の True Cal HbA1c レベル 1 のグラフである。

【図2b】実施例における 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル) ホスフェートポリマーを添加した場合の True Cal HbA1c レベル 1 のグラフである。

【図2c】実施例における 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルア

50

ンモニウムエチル)ホスフェートポリマーを添加しない場合の低HbA1c、中ヘモグロビンのグラフである。

【図2d】実施例における2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマーを添加した場合の低HbA1c、中ヘモグロビンのグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明によって、上述の目的は、以下詳細に説明する種々の特徴によって達成される。また、これらの特徴は通常、以下の方法工程が実施される、サンプル中のHbA1c量を決定する方法を構成する共通点を有している：

10

a) サンプル中の赤血球を溶血して、そこに含まれるHbA1cを含むヘモグロビンを放出させ、

b) 方法工程a)で放出させたHbA1cを含むヘモグロビンを、糖化ヘモグロビン分解物を生成するためのタンパク質分解作用剤に接触させ、

c) 方法工程b)で生成された糖化ヘモグロビン分解物を定量化することによってHbA1c量を決定する。

【0012】

本発明との関連で使用されるサンプルという用語は、分析作業のために準備され、ヘモグロビン及び/又はHbA1cの分析される一部を含有する全ての原料を意味する。多くの場合、サンプルは、新鮮な全血サンプルである。もっとも、本発明では、例えば、保存血液、精製血液、凍結乾燥全血、赤血球濃縮物、溶血前の血液サンプル、ヘモグロビン標準溶液、HbA1c標準溶液、及び例えば合成HbA1c分解物のような合成ヘモグロビン分解物を含有する標準溶液のようなサンプルも含む。

20

【0013】

分析されるサンプル中にHbA1cが予め遊離して存在する場合、方法工程a)は必須ではない。また、合成ヘモグロビン又はHbA1c分解物を含有する標準溶液の場合に、方法工程b)も必須ではない。ヘモグロビン又はそこに本質的に含まれているHbA1c又はこれらの分解物が分析されるサンプル溶液中に予め存在していない場合、通常、工程a)の前又はその間にこれらを水溶液に入れる。

【0014】

赤血球の溶血は、基本的に、赤血球が完全に溶血すると当業者に知られている全ての機械的、化学的若しくは浸透溶血手段又は方法によって行うことができる。本発明に係る手段又は方法の1つとして、細胞膜を破壊して赤血球に含まれるヘモグロビンを周囲媒体に移動させ、赤血球を溶解させる溶血作用が考えられる。

30

【0015】

当業者に知られている溶血作用手段又は方法の例として、超音波処理、又は溶血洗剤若しくは強低張塩溶液を添加することがある。

【0016】

溶血作用洗剤を使用する本発明の実施形態では、溶血作用洗剤は、例えば、イオン性、アニオン性、及び両性洗剤の中から選択できる。ここで、本明細書において使用される洗剤という用語は、液体の表面張力又は2つの相の間の界面張力を低下させる物質を含むことを意味する。

40

【0017】

ある実施形態では使用される溶血作用洗剤は、例えば、以下の中から選択される：溶血性ポリエチレングリコール(PEGs)、溶血性グリコシド及びエステル、溶血性ポリオキシエチレンアルキルエーテル、溶血性ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、溶血性ポリオキシエチレングリコール、溶血性ポリオキシプロピレンポリオキシエチレントリブロックコポリマー(ポロキサマー、プルロニック)、n-ドデシル-D-マルトシド、n-ヘプチル-D-チオグリコシド、n-オクチル-D-チオグリコシド、サッカロースラウリン酸塩、サッカロースカプリン酸塩、サッカロースリノール酸塩

50

、サッカロースパルミチン酸塩、サッカロースコール酸塩、及び上記化合物の誘導体、及びこれらの混合物。

【0018】

原則として、当業者に知られている全てのタンパク質分解作用手段は、例えばプロテアーゼのようなものとみなす。ここで、本発明に係る手段は、ペプチド結合に対する加水分解によってタンパク質を切断するタンパク質分解効果を有する。

【0019】

タンパク質分解剤がプロテアーゼである実施形態では、原則として、真核生物又は原核生物から組み換えられて得られるプロテアーゼ、又は生物種から内因的に得られるプロテアーゼ、或いは生物成分由来のセリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、金属又は未知の種類のプロテアーゼ、例えば、アクロシン、アミノペプチダーゼB、プロメライン、カルpain I、カルボキシペプチダーゼA、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンK、キモトリプシン、コラゲナーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ4、ディスパーゼ、エラスターゼ、第I I a因子、第X a因子、フィシン、g p r - エンドペプチダーゼ、H I V - プロテアーゼ、カリクレイン、M B T P S 1、プロメライン、パpain、ペプシン、プラスミン、I V型プレピリンペプチダーゼ、プロリル-オリゴペプチダーゼ、プロテイナーゼK、プロテアソーム、レニン、セクレターゼ(- 、 - 及び - セクレターゼ)、テルモリシン(E C 3 , 4 , 2 4 , 2 7)、トロンピン、トリプシン、ウロキナーゼ、バシラス属種由来のプロテアーゼN、アスペルギルス属種由来のプロテアーゼP、ストレプトマイセス属種由来のプロテアーゼX I V、及びバシラス ステアロサーモフィラス由来プロテアーゼSから内因的に得られるプロテアーゼの全てから選択できる。

10

20

【0020】

本発明のある実施形態では、H b A 1 cを特異的に切断するプロテアーゼを使用する点において関連する利点があり得る。しかしながら、本発明では一般に、プロテアーゼが糖化ヘモグロビンと非糖化ヘモグロビンとの間の差異について特異的であることを要しない。従って、この点において、H b A 1 c及び非糖化ヘモグロビンを特異的に区別しないプロテアーゼを使用することも可能である。多くの実施形態では、同様の態様では特異的に作用しないプロテアーゼを使用することが明示的に望まれることもある。

【0021】

本発明の多くの特徴において、分解物を生じさせるプロテアーゼを使用する必要はない。しかしながら、本発明の多くの実施形態では、糖化ヘモグロビンの鎖のアミノ末端からフルクトシル・バリン・ヒスチジン又はフルクトシル・バリンを放出させるタンパク質分解活性を有するプロテアーゼが特に使用される。

30

【0022】

方法工程b)で生成された糖化ヘモグロビン分解物に対する、H b A 1 c量の決定は、基本的に、当業者に知られている全ての定量化手順によって(上述したように、例えばH P L C分析又は酵素定量法により)行うことができる。

【0023】

上述の方法の他に、本発明は、サンプル中のH b A 1 c量を決定する方法に使用される試薬キットも提案する。これらの試薬キットは、少なくとも2つの異なる溶液を別個の容器に備え、少なくとも2つの異なる溶液はそれぞれ以下詳細に説明する本発明の種々の特徴を実現する組成物からなることを特徴とする。

40

【0024】

特徴1 - プロテアーゼの安定化

第一の特徴によれば、本発明の上述の目的が、方法工程a) ~ c)が必要に応じて実施される、サンプル中のH b A 1 c量を決定する方法を提案する点において達成される。

【0025】

本発明のこの特徴によれば、方法工程b)で使用されるタンパク質分解作用剤は、少なくとも2つの異なる溶液をH b A 1 cに接触させることにより活性化する。このうちの1

50

つの溶液は1～8の範囲にあるpH値を有し、且つ、

i) 少なくとも1種のプロテアーゼ、

ii) プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l～2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーター、及び

iii) 0.5mmol/l～10mmol/lのCa²⁺又は0.5mmol/l～10mmol/lのMg²⁺

を含有する。ここで、キレーター：Ca²⁺又はキレーター：Mg²⁺のモル比は、1：2～1：20の範囲にある。他の溶液は、Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺及びZn²⁺から選択される二価金属イオンを100μmol/l～5000μmol/l含有する。

【0026】

また、以下のことを特徴とした、サンプル中のHbA1cを定量する方法に使用される試薬キットを提案する。即ち、この試薬キットは、少なくとも2つの異なる溶液を別個の容器に備える。このうち1つの溶液は、1～8の範囲にあるpH値を有し、且つ、上記成分i)～iii)を含有する。なおキレーター：Ca²⁺又はキレーター：Mg²⁺のモル比は、1：2～1：20の範囲にある。他の溶液は、Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺及びZn²⁺から選択される二価金属イオンを100μmol/l～5000μmol/l含有する。

【0027】

本発明のある実施形態では、プロテアーゼを含有する溶液のpH値は、少なくとも4及び/又は多くとも6である。本発明の他の実施形態では、プロテアーゼを含有する溶液のpH値は、4より大きく及び/又は6未満である。本発明の特定の実施形態では、この溶液のpH値は、4.5～5.5の範囲にあり、更に特定の実施形態では、4.9～5.1の範囲にある。

【0028】

金属プロテアーゼの活性は、Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺又はZn²⁺のような二価金属イオンの存在に依存する。現時点において、54の金属プロテアーゼファミリーが15のクランに分類され、39のファミリーの属するクランMAに傑出して重要である。これら39のファミリーのうちたった19のファミリーが、いわゆる中性亜鉛金属プロテアーゼに関連していると言える。他の金属プロテアーゼは、マンガン又はコバルトに依存する。

【0029】

とりわけ、以下の金属プロテアーゼがクランMAに属している：膜アラニルアミノペプチダーゼ、ペプチジルジペプチダーゼA、チメットオリゴペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼF（ラクトコッカス属）、ミコリシン、免疫インヒビターA（Immuno-Inhibitor A）（バシラス属）、非中性ストレプトマイセスプロテアーゼ、レイシマノリシン、微生物コラゲナーゼ、コラゲナーゼcolA、マトリクスメタロペプチダーゼ1、セラリシン、フラギリシン、オートリシン（クラミドモナス）、アスタシン、リプロリシン、ネプリライシン、IgA特異的メタロエンドペプチダーゼ、テントキシリシン、テルモリシン、中性ブドウ球菌プロテアーゼ、カルボキシペプチダーゼtaq、炭疽菌致死因子、ドイトロリシン、ファンガリシン（Fungalysin）、細胞切断タンパク質ftsH、サイトファガリシン（Cytophagalyisin）、パッパリシン1、Ste24-エンドペプチダーゼ（サッカロミケス属）、HtpX-エンドペプチダーゼ（大腸菌）、アルカエリシン（Archaealysin）、ペプチダーゼblaR1、ペプチダーゼprtB、エンハンシン（Enhancin）、グリシルアミノペプチダーゼ（スフィンゴモナスカプスラータ）、ペプチダーゼIgA（クロストリジウムラモスム）、ペプチダーゼstcE（大腸菌）、ペプチジル-aspl-メタロエンドペプチダーゼ（緑膿菌）、及びImmA-ペプチダーゼ。

【0030】

プロテアーゼが長期間その活性形態にあると、自己消化によってこの酵素の大部分が破壊されてしまう恐れがある。この点、酵素の自己消化を回避できるのであれば、プロテアーゼの酵素活性を一時的に不活性化することが多くの場合望ましい。

【0031】

10

20

30

40

50

プロテアーゼの自己消化の問題自体は、当該技術分野において既に知られている。この問題を解決するために、当該技術分野では、例えば、キレーター（特に、SH基含有試薬）又は単純に過剰なEDTAによって、テルモリシンから亜鉛を除去したプロテアーゼテルモリシンが提案されている。

【0032】

しかし、本発明者らは、キレーターが過剰に存在すると、プロテアーゼの安定性に悪影響を与え得ることを発見した。これは、キレーターが、プロテアーゼから、触媒活性に必要な不可欠なコファクターを望んだように除去するだけでなく、大部分の Ca^{2+} 及び/又は Mg^{2+} も除去してしまうからである。なお、多くのプロテアーゼにおいて、その安定性及び構造完全性に Mg^{2+} 又は Ca^{2+} の存在が必要とされている。また、本発明者らは、特定のpH値の試薬区画に不活性形態のプロテアーゼを用意し、且つ、そのプロテアーゼを、第二試薬区画に用意した、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンによって再活性化することが、活性の多くを失うことなくプロテアーゼを長期保存する最良の形態であることを見出した。

10

【0033】

カルシウムイオン又はマグネシウムイオンがプロテアーゼのタンパク質構造の安定性に極めて重要であるので、キレーターを過剰に使用すると、結果的にプロテアーゼタンパク質が不安定になる。しかし、本発明者らは、大量の Ca^{2+} 及び/又は Mg^{2+} を用意することによってこのような不安定化の対策となり得ることを見出した。即ち、これにより、プロテアーゼの非活性化に必要な量のキレーターを使用しても、プロテアーゼのタンパク質構造の不安定化は起こらない。

20

【0034】

これに関連して特に重要なことは、使用されるカルシウムイオン又はマグネシウムイオンのキレーターの使用量に対するモル比である。このモル比によって、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンがキレーターとのキレート錯体から置換されることなく、プロテアーゼのタンパク質構造が安定化するのに十分な量のカルシウムイオン又はマグネシウムイオンが存在することが確保される。

【0035】

本発明で適切な二価金属イオンのキレーターの例としては、アセチルアセトン、ニトリロ三酢酸（NTA）、エチレンジアミン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、N-（2-ヒドロキシエチル）-エチレンジアミン-N,N,N'-三酢酸三ナトリウム塩（HEDTA）、シクロヘキサジアン四酢酸（CDTA）、エチレングリコール-ビス（アミノエチルエーテル）-N,N,N',N'四酢酸（EGTA）、2-（2-アミノエチルアミノ）エタノール、ジエチレントリアミン、イミノ二酢酸、トリエチレントラミン、トリエチレントラミン六酢酸（THA）、トリアミノトリエチルアミン、ニトリロ三酢酸、ビス（サリチリデン）エチレンジアミン、エチレンジアミノ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸、オキサレート、タータレート、シトラート、ジメチルグリオキシム、8-ヒドロキシキノリン、2,2'-ビピリジン、1,10-フェナントリン、ジメルカプトコハク酸、1,2-ビス（ジフェニルホスフィノ）エタンがある。

30

40

【0036】

Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンに対して使用されるキレーターは、カルシウムイオン又はマグネシウムイオンに対してよりも Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンに対して高い親和性で結合する。好ましくは、使用されるキレーターは、カルシウムイオン又はマグネシウムイオンの場合と比較して少なくとも 10^3 倍高い結合力で Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンに結合する。

【0037】

キレーター濃度は、プロテアーゼの量に応じて上記特定の範囲内から自由に選択できる

50

。一実施形態では、上記溶液は、プロテアーゼ1000kU/l当り0.5mmol/l~1.5mmol/lのキレーターを含有する。別の実施形態では、この溶液は、プロテアーゼ1000kU/l当り0.9mmol/l~1.1mmol/lのキレーターを含有する。

【0038】

カルシウムイオン又はマグネシウムイオンの量も、上記濃度範囲内から自由に選択できる。一実施形態では、カルシウムイオン又はマグネシウムイオンの濃度は、3mmol/l~8mmol/lの範囲にある。別の実施形態では、カルシウム濃度又はマグネシウム濃度は、4mmol/l~7mmol/lの範囲にある。

【0039】

金属イオンは、採用される試薬溶液において、任意の適切な塩の形態で使用できるが、選択した塩の形態が、バッチにおいて必要量の金属イオンを溶解することが条件となる。塩の形態の例としては、塩化物、硝酸塩、硫酸塩、ギ酸塩及び酢酸塩がある。バッチにおいて金属イオンである Ca^{2+} 又は Mg^{2+} が利用可能となる実施形態では、使用される試薬溶液中にその目的に応じて存在するカルシウム塩又はマグネシウム塩は、ある実施形態では、カルシウムの塩化物、硝酸塩、ギ酸塩、酢酸塩又はこれらに対応する Mg^{2+} 塩である。二価金属イオンが Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される実施形態では、使用される試薬溶液中に目的に応じて用意された金属塩は、例えば、塩化鉄、硝酸マンガ、ギ酸コバルト又は酢酸亜鉛でもよい。

【0040】

キレーター： Ca^{2+} 又はキレーター： Mg^{2+} のモル比は、各実施形態に応じて、1:2~1:20の範囲から自由に選択し得る。本発明のある実施形態では、キレーター： Ca^{2+} 及びキレーター： Mg^{2+} のモル比は、1:4~1:10の範囲にある。多くの実施形態では、キレーター： Ca^{2+} 及びキレーター： Mg^{2+} の比は、1:4~1:8の範囲にある。他の実施形態では、この比は、1:5~1:7の範囲にある。

【0041】

上述の態様の不活性プロテアーゼの再活性化は、本発明によれば、使用される各プロテアーゼの酵素活性に必要な不可欠な100 μ mol/l~5000 μ mol/lの金属イオン(Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 又は Zn^{2+})を溶液に添加することによって行われる。本発明者らは、キレーター及びカルシウムイオン又はマグネシウムイオンが同時に大量に存在しても、各二価金属イオンがこの特定量あれば、プロテアーゼのタンパク質構造における部位を再占拠するのに十分であることを見出した(この占拠はプロテアーゼの活性化に必要となる)。活性化溶液の金属イオン含有量は、関係する各実施形態に応じて特定の範囲内から自由に選択できる。ある実施形態では、金属イオンの含有量は500 μ mol/L~2000 μ mol/Lの範囲にある。他の実施形態では、金属イオンの含有量は、200 μ mol/l~400 μ mol/lの範囲にある。

【0042】

本発明の一実施形態では、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンの1種を含有する溶液は、方法工程a)でサンプルに添加される溶血溶液であり、この溶血溶液は、溶血洗剤を含有する。より具体的には、本発明の目的の1つは、HbA1c定量作業に使用される可能な限り多くの試薬を最少の試薬混合溶液として組み合わせることでもある。これに関連して、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択され、プロテアーゼのその後の活性化に必要とされる二価金属イオンは、プロテアーゼを含有するものとは別の試薬溶液に存在していてもよいことを見出した。例えば、本発明の多くの実施形態では、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンは、FP O X又はFA O Xが加えられた溶液(下記R1参照)にも、又は、HbA1c分析手順の開始時にも使用される溶血溶液にも存在している。

【0043】

本発明の一実施形態では、HbA1c定量に使用される各種試薬を、別個の容器に用意される以下の溶液形態で集める：

10

20

30

40

50

- 溶血洗剤と、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを $100\ \mu\text{mol}/\text{l} \sim 5000\ \mu\text{mol}/\text{l}$ 含有する溶血溶液 (H)、

- FPOX又はFAOXと、ペルオキシダーゼ (peroxidase) とを含有する第一試薬溶液 (R1)、及び

- プロテアーゼと、プロテアーゼ $1000\ \text{kU}/\text{l}$ 当り $0.1\ \text{mmol}/\text{l} \sim 2\ \text{mmol}/\text{l}$ の、二価金属イオンに対するキレーターと、 $1\ \text{mmol}/\text{l} \sim 10\ \text{mmol}/\text{l}$ の Ca^{2+} 又は Mg^{2+} と、ロイコ染料とを更に含有する第二試薬溶液 (R2)。ここで、キレーター : Ca^{2+} 及びキレーター : Mg^{2+} のモル比はそれぞれ、 $1 : 2 \sim 1 : 20$ の範囲にある。

【0044】

上記試薬キットは、以下の態様でHbA1c定量方法に使用できる。まず、必要に応じて、全血が溶血溶液と混合されたサンプルを準備する。次いで、この結果得られた溶血液に、第一試薬溶液 (R1) を添加する。この結果、第一試薬溶液に含まれるFPOXは、存在し得る内因性フルクトシルペプチドを分解しても、HbA1c定量に関係する末端がフルクトシル化したペプチドは分解しない。これは、このペプチドが、まだ放出されていないためである。

【0045】

この反応が実質的に完了した後、インキュベーション前の溶血液の全ヘモグロビン含有量に対して測光決定を行う。次いで、インキュベーション前の溶血液に第二試薬溶液 (R2) を添加して実際にインキュベーションを行う。そこに含まれているプロテアーゼアポ酵素 (例えば、テルモリシンアポ酵素) を、既に溶血溶液から組成物に加えられた二価金属イオン (例えば、亜鉛イオン) によって活性化し、とりわけ、N末端糖化ペプチドをヘモグロビンの鎖から切断する。そして、切断した糖化ペプチドをFPOXを用いて反応させる。ここで、糖化ペプチドをペプチド及びグルコソンへと切断すると過酸化水素が生成される。

【0046】

生じた過酸化水素の存在下で、既に第一試薬溶液 (R1) から組成物に導入されたペルオキシダーゼによってロイコ染料を発色酸化形態に酸化する。次いで、実際の測光法によるHbA1c定量作業を、第二試薬溶液 (R2) の添加後、すなわち、FPOXにより誘発される反応が起こる直前に、例えば直ちに (測定装置の性能に応じて、例えば10秒～30秒) 行うことができ、またその後 (各測定装置の性能に応じて、例えば2分～15分後)、R2の添加後、すなわち、過酸化水素により誘発されるロイコ染料の酸化が完了した後もう一度、行うことができる。最終的に、HbA1c含有量の決定は、これらの2つの測定の差を考慮し、HbA1cの含有量と既に定量されている全ヘモグロビンの商を計算して行われる。しかし、測定間隔は、採用される各分析器や光度計等に大きく依存する。それゆえ、2分～15分後の測定を直接一回のみ行うことも可能である。

【0047】

特徴2 - アンフォールド (aufgefalteten) ヘモグロビンの安定化

プロテアーゼの安定化の他、本発明者らは、サンプル中に含まれるHbA1cを含むヘモグロビンを可能な限りアンフォールドすること、及びこれをアンフォールド形態で安定化させることも目的として設定した。こうして、例えば、プロテアーゼによってヘモグロビンを最も効率的に消化し、そのヘモグロビンを測光法で測定可能な安定した形態にすることが可能となる。

【0048】

当該技術分野において、溶血液中のpH値が低下するとヘモグロビンはある程度アンフォールドすることが知られている。従来HbA1c量決定方法では、約5のpH値においてアンフォールディングを行う。しかしながら、pH値が大きく低下すると、このように処理されたヘモグロビンがその形態のまま大きく変性、凝集、沈殿して、もはやプロテアーゼによる消化に適切した形態にならない点で不利である。

【0049】

10

20

30

40

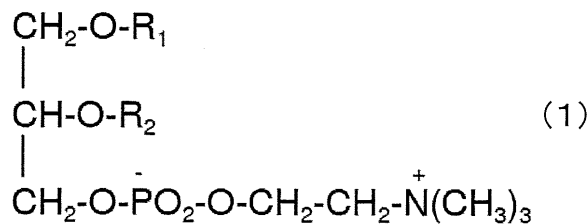
50

しかし、本発明者らは、非常に低い pH 値において、極めて速く効率的なアンフォールディング、及びアンフォールドヘモグロビンのその後の安定化が達成できる方式を見出した。本発明のこの特徴の目的から、以下のことを特徴とした、方法工程 a) ~ c) が必要に応じて実地される、サンプル中の H b A 1 c 量を決定する方法を提案する。即ち、この方法において、溶血溶液 (H) を添加することによって、方法工程 a) の溶血が行われる。この溶血溶液は、1 ~ 3 の範囲にある pH 値を有し、且つ、溶血洗剤及び少なくとも 1 種の安定化剤を含有する。この少なくとも 1 種の安定化剤は、ホスファチジルコリン、2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル) ホスフェートのポリマー又はコポリマー、或いはこれらの混合物から選択される。

【0050】

本明細書において使用されるホスファチジルコリンという用語は、一般式 (1) の化合物を意味する：

【化1】

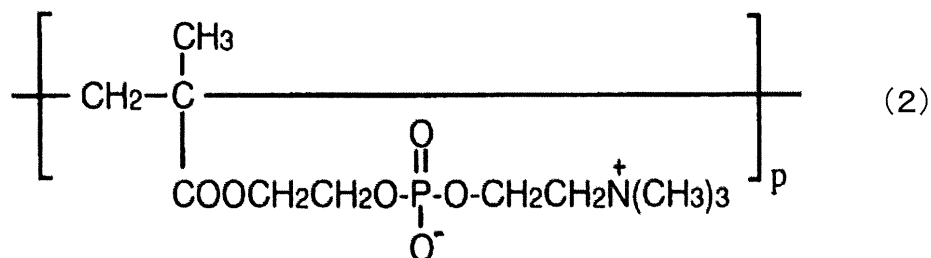


式中、R₁及びR₂は、完全飽和又は一価/多価不飽和の直鎖又は分枝鎖脂肪酸残基から選択される。多価不飽和脂肪酸残基がある実施形態では、これらは好ましくは、二重、三重又は四重不飽和であり、ある実施形態では、飽和度と関係なく、脂肪酸残基は、C 8 ~ C 22 の範囲にある鎖長をもつもの又は C 16 ~ C 22 の範囲にある鎖長をもつものから選択される (例えば、1、2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)。

【0051】

本明細書において使用される 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル) ホスフェートのポリマー又はコポリマーという用語は、一般式 (2) の反復単位をもつポリマー又はコポリマーを意味する：

【化2】



コポリマーの形態で存在する実施形態では、上記特定した一般式 (2) をもつ単位の他に、更に脂肪族又は芳香族残基でエステル化されたメタクリレート単位を含む。

【0052】

溶血溶液を加えた後の溶血液の pH 値は、溶血溶液のそれに対応している。このことは、溶血溶液の適切なバッファーによって達成される。本発明のこの特徴によれば、溶血液は 1 ~ 3 の範囲にある pH 値を有する。従って、溶血したサンプル (= 溶血液) の pH 値も、1 ~ 3 の範囲の pH 値に設定される。安定化洗剤を併用した溶血液が常に低い pH 値を有する結果、アンフォールドヘモグロビンを速く、効果的に分解できる。

【0053】

また、サンプル中の H b A 1 c 量を決定する方法に使用される以下の試薬キットを提案

10

20

30

40

50

する。即ち、この試薬キットは、溶血作用洗剤及び 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を有し、且つ、1 ~ 3 の範囲にある pH 値を有する少なくとも 1 つの溶血溶液を備える。

【0054】

pH 値が 1 ~ 3 の範囲に低下すると、ヘモグロビンが非常に速く且つ強くアンフォールドされる。しかしながら、既に述べたように、ヘモグロビンが変性、凝集、沈殿する恐れがある。これは、例えばトリクロロ酢酸を添加しても起こり得る。しかし、本発明者らは、溶血溶液が、2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル)、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を更に含有していれば、ヘモグロビンの変性、沈殿及び凝集は回避可能であることを見出した。

10

【0055】

本発明のこの特徴との関連で使用される、「アンフォールディング」という用語は、二次構造及び三次構造の部分的な溶解を意味するが、ヘモグロビンは沈殿しない。従って、本発明に従ってアンフォールドされたヘモグロビンは、変性したヘモグロビンとは対照的に、溶液中にとどまる。従って、本発明において使用される、変性したヘモグロビンという用語は、例えばトリクロロ酢酸処理によっても起こるような、タンパク質が沈殿且つ凝集する程度にタンパク質構造が溶解したヘモグロビンを意味する。

【0056】

上述のヘモグロビンの強いアンフォールディング及びそれと同時のアンフォールド生成物の安定化は、驚くべきことに、たった 5 秒 ~ 15 秒以内という速さで起こる。また、この効果は、2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物の存在下で、且つ、請求に係る 1 ~ 3 までの全ての pH 値範囲で達成できる。本発明のある実施形態では、この pH 値は 2 ~ 3 の範囲にある。一実施形態では、溶血溶液の pH 値は 2.4 ~ 2.6 の範囲にある。

20

【0057】

特徴 3 - ロイコ染料の安定化

本発明者らが設定した更なる目的は、ロイコ染料を使用するサンプル中の HbA1c 量の決定方法におけるそのロイコ染料の安定化である。

30

【0058】

本明細書において使用されるロイコ染料という用語は、少なくとも 1 つの酸化物質及び / 又はペルオキシダーゼ活性をもつ物質との反応により、無色のロイコ開始形態から測光法で測定可能な発色形態に変換する物質を意味する。本発明に適切なロイコ染料の例としては、N, N, N', N', N'', N'' - ヘキサ(3 - スルホプロピル) - 4, 4', 4'' - トリアミノトリフェニルメタンヘキサナトリウム塩 (TPM - PS)、N - (カルボキシメチルアミノカルボニル) - 4, 4' - ビス(ジメチルアミノ) - ジフェニルアミンナトリウム塩 (DA64)、10 - (カルボキシメチルアミノカルボニル) - 3, 7 - ビス(ジメチルアミノ) - フェノチアジンナトリウム塩 (DA67)、2, 2' - アジノビス(3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 (ABTS) 及びトリフェニルアミン、フェノチアジン、フェノキサジン、ベンジジン、トリアリルイミダゾール、o - フェニレンジアミン誘導体、トリフェニルメタン及びロイコ染料の上記特性をもつ o - トリジン誘導体、並びに、4 - アミノアンチピリンとフェノール化合物又は N, N - ジ置換アニリン化合物との組み合わせ及び 3 - メチルベンゾチアゾリノンヒドロゾン (MBTH) とアニリン化合物との組み合わせがある。更に、本発明に適切なロイコ染料の例としては、EP 0038205、EP 0124287 及び EP 0045220 に記載のジフェニルアミン誘導体がある。

40

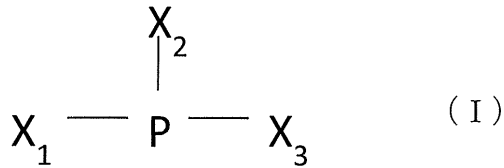
【0059】

本発明の特徴において、ロイコ染料の安定化は、サンプル中の HbA1c 量を決定する方法において行われる。この方法において、方法工程 a) ~ c) が実施され、糖化ヘモグ

50

ロビン分解物の定量化が方法工程 c)で行われる。ここで、F P O X 又は F A O X によって酸化させて、過酸化水素が生成し、生じた過酸化水素の量を決定する。過酸化水素の量は、ペルオキシダーゼ存在下のロイコ染料の発色反応に基づいて定量化する。また、ロイコ染料は、この染料の安定化のために一般式 (I) の化合物を含有する溶液内で生成される：

【化 3】



10

(式中、P はリン原子を示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して、置換又は無置換の直鎖又は分枝鎖 $C_1 \sim C_8$ アルキル残基、置換又は無置換のシクロヘキシル残基、及び置換又は無置換のフェニル残基から選択される。)

【0060】

本明細書の冒頭部において既に述べたように、ロイコ染料の原理は、検出される物質が存在により無色のロイコ開始形態から発色形態に変換するロイコ染料によってその物質が検出されることに基づいている。実際の検出反応の実施前にこの変換が予め起こらないことを確保する観点から、ロイコ染料が無色還元形態で安定していれば、これにより実際の検出反応に悪影響が及ぶことないため、有益である。

20

【0061】

本発明者らは、一般式 (I) の化合物を添加することによって、これにより実際の検出反応 (本件の場合、酵素ペルオキシダーゼの存在下での過酸化水素の検出) に悪影響を及ぼすことも阻害することもなく、ロイコ染料の有効な安定化が達成できることを見出した。

【0062】

一般式 (I) の化合物の例としては、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスファチン (T C E P)、ビス (p - スルホナトフェニル) フェニルホスフィンニ水和物ニカリウム塩、1, 3, 5 - トリアザ - 7 - ホスフィンアダマンタン、トリス (3 - スルホナトフェニル) ホスフィン水和物ナトリウム塩、トリス (4, 6 - ジメチル - 3 - スルホナトフェニル) ホスフィン三ナトリウム塩水和物、トリス (ヒドロキシメチル) ホスフィン、ジ - t - ブチル (3 - スルホナトプロピル) ホスフィン、ジフェニル (m - スルホナトフェニル) ホスフィンニ水和物ナトリウム塩、及び [2 - ジシクロヘキシルホスフィノ) エチル] - トリメチルアンモニウムクロリドがあるが、本発明がこれらの化合物とのみ実施されることを意図するものではない。これらの化合物は、例として挙げただけである。

30

【0063】

或いは、ロイコ染料を安定化するために、チオ化合物、より具体的には、1つ又は複数のチオアルコール、チオエーテル、チオケトン又はこれらの混合物を添加することも可能である。このようなチオ化合物の例としては、チオジグリコール、チオリンゴ酸、チオニコチンアミド、チオ N A D 及びこれらの混合物があるが、例をこれらに特定する結果、本発明が限定されることを意図するものではない。

40

【0064】

上記チオ化合物は、単独でも、上記一般式 (I) の化合物と組み合わせても使用できる。それゆえ、本発明のある実施形態では、ロイコ染料を、この染料の安定化のために例えば T C E P のような少なくとも 1 種の一般式 (I) の化合物及び例えばチオジグリコールのような少なくとも 1 種のチオ化合物を含有する溶液内で生成する。

【0065】

それゆえ、本発明は、以下のことを特徴とした、サンプル中の H b A 1 c 量を決定する

50

方法に使用される試薬キットにも関する。即ち、この試薬キットは、ロイコ染料並びにロイコ染料の安定化のための少なくとも1種の一般式(I)の化合物及び/又は少なくとも1種のチオ化合物を含有する少なくとも1つの試薬溶液を備える。

【0066】

一実施形態では、一般式(I)の安定化剤化合物の濃度は、試薬溶液に含有されるロイコ染料1モル当り10mol~20molの範囲にある。特別の実施形態では、一般式(I)の安定化剤化合物の量は、ロイコ染料1モル当り10mol~15molの範囲にある。

【0067】

上述のサンプル中のHbA1c量を決定する方法において、例えば上記チオ化合物のようなSH基を含有する試薬が多くの場合使用される。しかしながら、このようなSH基含有化合物は実際のHbA1c検出反応に干渉しかねない。より具体的には、FPOX又はFAOXがフルクトシル化したアミノ酸又はペプチドを反応させる部位に干渉して、過酸化水素を形成し、この結果生じた過酸化水素が定量化されてしまう。この点、本発明者らは、上記検出反応を乱すSH基を可能な限り多く阻止しなければならないことを突き止めた。

10

【0068】

従って、本発明は、実際のHbA1c検出反応の最適化ために、例えばN-エチルマレイミド(NEM)のようなSH基捕捉剤を添加して、反応を乱すSH基を阻止することを提案する。それゆえ、SH基捕捉剤は、HbA1c検出反応を行う直前に遅くとも添加されるべきである。

20

【0069】

所定の実施形態では、SH基捕捉剤、例えばNEMを、溶血溶液に含有させる。代替実施形態では、SH基捕捉剤、例えばNEMを、チオアルコールによって安定化したロイコ染料が存在する試薬溶液とは別に維持された試薬溶液に含有させ、添加する。

【0070】

所望の場合、本発明に係る方法を、全ヘモグロビン濃度を方法工程a)~c)の際又はこれらの方法工程間に決定するように行うこともできる。それゆえ、本方法は、好ましくは、HbA1c濃度を相対量として、例えばmmol/molで、直接特定できるように全ヘモグロビン濃度を決定する工程を含む。

30

【0071】

試薬キットの特別の実施形態

本出願に記載の本発明の一実施形態では、少なくとも以下の3つの溶液を別個の容器に備える試薬キットが提供される：

- 溶血作用洗剤を含有する溶血溶液(H)、
- FPOX又はFAOXを含有する第一試薬溶液(R1)、及び
- プロテアーゼを含有する第二試薬溶液(R2)。ここで、

a) 溶血溶液(H)は、1~3の範囲にあるpH値を有し、且つ、2-(メタクリロイルオキシエチル)-2-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を有し、並びに/或いは

40

b) 溶血溶液(H)は、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを100 μ mol/l~5000 μ mol/l含有し、並びに、第二試薬溶液(R2)は、糖化ヘモグロビンの鎖のアミノ末端からフルクトシル・バリン・ヒスチジン又はフルクトシル・バリンを放出させるタンパク質分解活性を有するプロテアーゼを含有し、且つ、プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l~2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーター、及び0.5mmol/l~10mmol/lの Ca^{2+} 又は0.5mmol/l~10mmol/lの Mg^{2+} を含有し(キレーター： Ca^{2+} 及びキレーター： Mg^{2+} のモル比はそれぞれ、1:2~1:20の範囲にある)、並びに/或いは

c) 第二試薬溶液(R2)は、ロイコ染料、このロイコ染料の安定化のためのある割合

50

の一般式 (I) の化合物、及び / 又はロイコ染料の安定化のためのある割合の少なくとも 1 種のチオ化合物を含有する。

【 0 0 7 2 】

H b A 1 c の定量的決定が、検出反応で形成される過酸化水素に基づいて最終的に行われる実施形態では、上記試薬溶液の少なくとも 1 つがペルオキシダーゼを含有し、少なくとも他の試薬溶液がロイコ染料を含有する。これらの実施形態では、試薬溶液の 1 つが例えば N E M のような S H 基捕捉剤も選択的に含有する。ここで、S H 基捕捉剤は、ロイコ染料を含有していない 1 つの試薬溶液に含有される。

【 0 0 7 3 】

本発明の特別の実施形態では、試薬キットは、以下の成分を有する 3 つの試薬溶液を備える：

- 溶血作用洗剤と、2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2 - (トリメチルアンモニウムエチル) ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物と、上記必要量の $F e^{2+}$ 、 $M n^{2+}$ 、 $C o^{2+}$ 及び $Z n^{2+}$ から選択される金属イオンを調製するための金属塩と、例えば N E M のような S H 基捕捉剤とを含有する溶血溶液、

- F P O X 又は F A O X とペルオキシダーゼ (P O D) とを含有する第一試薬溶液 (R 1)、及び

- 糖化ヘモグロビンの鎖のアミノ末端からフルクトシル - バリン - ヒスチジン又はフルクトシル - バリンを放出させるタンパク質分解活性を有するプロテアーゼと、それぞれ上記必要量の $C a^{2+}$ 塩又は $M g^{2+}$ 塩及び二価金属イオンのキレーターと、ロイコ染料と、ロイコ染料の安定化のための一般式 (I) の化合物及び / 又はロイコ染料の安定化のためのチオ化合物とを含有する第二試薬溶液 (R 2)。

【 0 0 7 4 】

当初の開示目的のため、当業者であれば、本明細書、図面及び請求項からわかる全ての特徴は、他のある特徴との関連でのみ専門的な用語で説明されていても、本明細書に開示した他の特徴又は特徴群と個々に組み合わせることも任意の組み合わせで組み合わせることもできることを指摘する。ただし、明示的に除外されている場合、技術的にこのような組み合わせが不可能若しくは無意味である場合はこの限りではない。全ての考え得る特徴の組み合わせの包括的で明示的な代表例はここでは省略するが、このことは単に説明の簡潔さ及び読みやすさのためである。

【 0 0 7 5 】

更に、以下の実施例による実施形態が、本発明の例として設計される本発明の可能な実施形態の例とする説明にのみ資することは当業者にとって自明であることを指摘しておく。従って、当業者であれば、請求項に記載されたような本発明に係る特徴又は特徴の組み合わせを有する他の全ての実施形態も、本発明の保護の範囲内にあることが容易に理解されよう。全ての考え得る実施形態の包括的で明示的な代表例はここでは省略するが、このことは単に説明の簡潔さ及び読みやすさのためである。

【実施例】

【 0 0 7 6 】

1 . プロテアーゼの安定化

a) プロテアーゼの安定化、S D S ゲル電気泳動による分析：

プロテアーゼテルモリシンを液体として又は試薬中に 2 ~ 8 で又はより高温で保存すると、時間の経過と共に自己タンパク質分解によって分解する傾向が強い。これにより、長期間品質の均一性が求められる安定した液状試薬としてのプロテアーゼの使用が制限される。プロテアーゼテルモリシンは $Z n^{2+}$ に依存しており、本発明者らは、キレーターによってプロテアーゼを不活性化すると同時に $C a^{2+}$ 依存的な構造の安定化によってテルモリシン及び関連する金属プロテアーゼを臨床化学診断においてより活用できることを示すことができた。

【 0 0 7 7 】

プロテアーゼの安定化可能性を証明するために、異なる量又は比のキレーター及び $C a$

10

20

30

40

50

$^{2+}$ を、プロテアーゼテルモリシンを含有した試薬ベースマトリクスに導入した。今回試薬 2 に使用された E D T A 及びカルシウムの濃度を、以下の表 1 に示す。

【 0 0 7 8 】

【 表 1 】

表1:

バッチ	[μ mol/L]EDTA	[mmol/L]Ca $^{2+}$
E411/13A	12	0.6
E411/13B	1000	6
E411/13C	12	6
E412/13A	/	6

10

20

30

【 0 0 7 9 】

この結果得られたバッチ（上記表を参照）を分けて、それぞれ 4 及び 37 で 7 日間保存した。これらのバッチからそれぞれ同量のサンプルを取り出し、S D S - P A G E で使用するバッファーと混合し、タンパク質組成物を変性させて S D S - P A G E によって分離し、そしてクマシー染色によって視覚化した（図 1 参照）。

40

【 0 0 8 0 】

ゲルの他のバンドと比較してバンド 4 及び 5 に、非常に大量のプロテアーゼテルモリシンが明らかに見える。それゆえ、他の組成物よりもこの組成物において、プロテアーゼテルモリシンが、温度とは無関係に自己消化から顕著に良好に保護されている。E 4 1 1 / 1 3 B 番のバッチとの比較によって、自己消化から保護するために E D T A の存在が必要不可欠であることが示される。E 4 1 1 / 1 3 A 番及び E 4 1 1 / 1 3 C 番のバッチと E 4 1 1 / 1 3 B 番のバッチとの比較によって、ある最少量の E D T A が必要とされること、及びある最少量のカルシウムイオンも存在しなければならないことが示される。

50

【0081】

また、以下のデータによって、長期間4 及び37 でそれぞれ保存した場合の特定の組成物のテルモリシン安定化作用が証明される。

【0082】

b) HbA1c 試験系におけるプロテアーゼ安定化の分析。

図1に示すタンパク質分析レベルのプロテアーゼの安定化を、例えばHbA1c 試薬マトリクスで実施した。このため、例示プロテアーゼテルモリシンは同量としたが、カルシウムイオン及びEDTAは様々な組み合わせの濃度で試薬ベースマトリクス2に添加した。これらのバッチをそれぞれ分けて、直接測定(新規)又は試薬2を11日間2 ~ 8 で保存した(11日/2 ~ 8)。また、試薬2を7日間37 で保存後更に4日間2 ~ 8 で保存した(7日/37 + 4日/2 ~ 8)。

10

【0083】

次いで、これらの対応する試薬ベースマトリクス2を、BM6010c 臨床化学分析器系においてそれぞれ同一の溶血溶液及び同一の試薬1と共に測定した。

【0084】

校正にはダイアシスキャリブレーター-TruCal HbA1c ネット(製品番号13350)を使用した。異なる試薬マトリクス2によるHbA1c 定量において、表2に示す異なる温度にて時間の経過と共に測定及び評価を行い、保存した。ここで、mEは、mEで示されるキャリブレーターレベル2のキャリブレーターレベル1に対する差に対応する。

20

【0085】

ここで、測定の基礎となる基本的な組成は以下の通りである。個々の試験において、以下に示す表に特定されたように個々の成分(酢酸カルシウム/EDTA)を変化させた：

【0086】

溶血溶液：

グリシン、60 mol/l

N-エチルマレイミド、7.5 mmol/l

2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、50 g/L

塩化亜鉛、1200 µmol/L

pH値、2.5

30

【0087】

試薬溶液1：

ピストリス(BIS-TRIS)、100 mmol/L

NaCl、100 mmol/L

FPOX、0.8 kU/L 超

POD、50 kU/L 超

pH値、7.2

【0088】

試薬溶液2：

酢酸ナトリウム、20 mmol/l

NaCl、100 mmol/l

酢酸カルシウム、濃度については表2 参照

TCEP、0.1 mmol/l

DA-67、0.08 mmol/l

Titriplex/EDTA、濃度については表2 参照

プロテアーゼ(テルモリシン)、1000 U/ml

pH値、5.0

40

【0089】

ここで、測定の基礎となる使用態様は以下の通りである：

50

試薬 1 : 90 μ L
試薬 2 : 30 μ L
溶血サンプル : 15 μ L
溶血工程 : 5 μ L サンプル + 100 μ L 溶血溶液
波長 (H b A 1 c 定量) : 658 nm (主) / 805 nm (副)
測定サイクル : 22 / 23 ~ 41 / 42

【 0090 】

【表 2 A】

A) HbA1c校正シグナル									
溶血溶液が同じ条件での (Zn ²⁺ 無) 様々なR2変形例の考察事項									
保存条件→	新規			11日 / 2°C ~ 8°C			7日 / 37°C + 4日 / 2°C ~ 8°C		
	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE
TruCal HbA1c ネット→									
R2 ↓									
6mmol/l Ca 12 μmol/L EDTA	6.9	11.3	4.5	6.8	11.8	5.0	6.8	10.1	3.4
	6.7	11.3		7.0	11.9		6.8	10.3	
6mmol/l Ca 1mmol/l EDTA	6.6	11.1	4.5	6.8	11.3	4.7	6.8	10.5	3.4
	6.6	11.1		6.7	11.5		7.0	10.2	
0.5mmol/l Ca 12 μmol/L EDTA	6.5	11.1	4.7	6.5	11.1	4.6	6.3	10.3	4.0
	6.5	11.2		6.5	11.1		6.4	10.4	

表 2 A):

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

【表 2 B】

B) HbA1c校正シグナル 溶血溶液が同じ条件での (Zn ²⁺ 有) 様々なR2変形例の考察事項											
保存条件→	新規			11日/2℃~8℃			7日/37℃+4日/2℃~8℃				
	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE		
TruCal HbA1cネット→											
R2↓											
6mmol/l Ca 12 μmol/L EDTA	16.7	32.9	16.1	17.1	34.1	16.9	13.4	25.8		12.5	
	16.8	32.9		17.0	33.8		13.1	25.7			
6mmol/l Ca 1mmol/l EDTA	29.8	70.2	40.1	29.2	69.8	41.1	19.2	52.5		32.8	
	29.7	69.6		29.0	70.5		19.6	52.0			
0.5mmol/l Ca 12 μmol/L EDTA	30.1	71.2	41.6	21.2	46.8	25.7	12.4	26.4		14.1	
	29.8	71.9		20.8	46.7		12.3	26.5			

表 2 B):

10

20

30

40

【 0 0 9 2 】

【表 2 C】

C)各新規値と比較した経時的シグナル喪失の考察事項									
保存条件→	新規			11日/2℃~8℃			7日/37℃+4日/2℃~8℃		
	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE
TruCal HbA1cネット→									
R2↓									
6mmol/l Ca				0.5	1.3		-3.2	-7.0	
12μmol/L EDTA				0.2	0.9	0.8	-3.6	-7.2	-3.7
6mmol/l Ca				-0.6	-0.4		-10.6	-17.7	
1mmol/l EDTA				-0.7	0.9	0.9	-10.1	-17.6	-7.3
0.5mmol/l Ca				-8.9	-24.4		-17.8	-44.8	
12μmol/L EDTA				-9.0	-25.2	-15.9	-17.5	-45.4	-27.5

表2 C):

【 0 0 9 3 】

表 2 A) から、亜鉛イオンの非存在下では、カルシウムイオン及び EDTA の濃度とは無関係に H b A 1 c 定量はできないことが推察される。異なる保存条件におけるレベル 1 及びレベル 2 のシグナルの違いは、2 つのキャリブレーターの違いによるヘモグロビン濃度に起因する。

10

20

30

40

50

【0094】

これに対して、表2B)は、カルシウムイオンとEDTAとの比が異なる場合の垂鉛イオンの存在下でのテルモリシンの機能性を示す。表2C)は、異なる保存条件下における個々のキャリブレーションのmEの喪失を示す。6mmol/lのカルシウムイオンが存在したバッチでは両者とも、0.5mmol/lのカルシウムイオンが存在したバッチとは対照的に、シグナル喪失が顕著に小さい。

【0095】

具体的には、7日/37℃ + 4日/2~8℃の保存条件において、EDTA濃度が同じでも、2つのカルシウム濃度の差は有意である。ここで示された結果は、印象深いことに、様々な温度及び時間における、液体試薬マトリクス中での、不活性化して構造的に安定したテルモリシンの保存性、並びにその再活性化を証明する。

10

【0096】

2. アンフォールドヘモグロビンの安定化

前述のヘモグロビンの効率的なアンフォールディング及びこのアンフォールド形態の安定化も、ヘモグロビン(Hb)及びHbA1cの正確な測定に極めて重要である。溶血洗剤による溶血においてアンフォールドヘモグロビンを安定化させるために、例えば2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマーを例として以下の試験において溶血溶液ベースマトリクスに添加した。ここでは、pH値を1~3の範囲に設定した。

20

【0097】

添加剤を添加又は添加していない様々な溶血溶液の変形例を、同一の試薬1及び試薬2を用いて(1bで特定したような試薬組成物を使用した)日立912形臨床化学分析器で測定した。表に記載されているように対応させて修正した。溶血液の安定性を評価するために、溶血液を手動で生成し(50µLの全血液サンプル+1000µLの溶血溶液(添加剤である2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマーは有り又は無し)、直接測定した。次いで、溶血液を装置内で15~25℃の開放状態で保存し、溶血液の生成後最長240分まで様々な時点において測定した。そして、HbA1c定量シグナルを分析器で240分の期間にわたって測定し、それぞれ新たに確認されたHbA1c値と関連付けした。ここで、以下の使用態様を日立912形による測定の基礎とした：

30

試薬1：	240µL
試薬3：	80µL
溶血サンプル：	40µL
波長(HbA1c定量)：	660nm(主)/800nm(副)
測定サイクル：	18~31

【0098】

図2a~dに示す結果には、図2a~dの2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマーのない(添加せず)サンプルと比較して、2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマーのある(添加した)様々なサンプル原料の安定性が顕著に向上したことが示されている。詳細には、以下のバッチの結果を図2に示す：

40

図2a) 添加しない場合のTrueCal HbA1cレベル1

図2b) 添加した場合のTrueCal HbA1cレベル1

図2c) 添加しない場合の低HbA1c、中ヘモグロビン

図2d) 添加した場合の低HbA1c、中ヘモグロビン

【0099】

図示した結果から、上記条件下で溶血溶液に2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマーを添加すると、各新たに測定されたHbA1c定量の10%限界線(破線+/-10%)で特定されるヘモグロビン分子の安定化が顕著に改善することが明らかに示された。

50

【 0 1 0 0 】

3 . ホスフィンによるロイコ染料の安定化

試薬マトリクス中のロイコ染料の安定性を改善するため、様々な水溶性安定物質をこれらのロイコ染料安定化作用について確認した。ここで、安定化添加剤のない試薬組成物をネガティブ対照とした。また、1, 3, 5 - トリアザ - 7 - ホスファアダマンタンが構造的要件を満たさないため、この物質をコントロール物質とした。

【 0 1 0 1 】

以下の試薬調製物を例として生成した：

20 mM ビストリスバッファー (B I S - T R I S : ビス (2 - ヒドロキシエチル)
アミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン)

20 mM 酢酸 Na

100 mM NaCl

6 mM 酢酸 Ca

15 g / L トリトン X 405 (T r i t o n X 405)

0.08 mM DA67 (ロイコ染料)

1000 U / ml テルモリシン

1 mM EDTA

10

【 0 1 0 2 】

ここで、同濃度の異なる安定化剤を、上述の安定化剤のない試薬ベースマトリクスに添加した。ここで、安定化物質のないアリコートに対照とした。

20

【 0 1 0 3 】

各試薬組成物の660 nmにおける固有の吸収について、光度計を使用してそれぞれ測定した。各組成物について、開始直後 (新規) 及び4日間37 °C で保存後に測定した (ロードイング (l o a d i n g) 測定) 。ここで、660 nmの吸光度の経時的増加は、染料のロイコ形態からその発色体への変換の目安となり、従って、ロイコ形態の酸化による不安定化の目安となる。

上記特定条件下で、表3に示す結果が得られた。

【 0 1 0 4 】

【表 3】

表3: 660nmにおける固有の発色R2 (mE)

	0日目	4日目
安定化剤無し	17.7	455
TCEP	15.7	37.9
ビス(p-スルホナトフェニル)フェニルホスフィン二水和物ニカリウム塩	19.2	164
1,3,5-トリアザ-7-ホスファアアダマンタン	20.7	391
トリス(3-スルホナトフェニル)ホスフィン水和物ナトリウム塩 (<5%酸化物)	18.7	251
トリス(ヒドロキシメチル)ホスフィン	19.9	239
ジフェニル(m-スルホナトフェニル)ホスフィン二水和物ナトリウム塩	18.2	70
[2-ジシクロヘキシルホスフィノ)エチル]-トリメチルアンモニウムクロリド	18.6	307

10

20

30

40

【0105】

4. チオ化合物によるロイコ染料の安定化

複数のチオ化合物をこれらの染料安定化作用について確認した。このため、ロイコ染料 DA 67 を含有する試薬溶液 (マトリクス: NaCl、酢酸 Ca、トリトン X 405 + テルモリン、この点において、組成 3 参照) の固有の発色を、2 ~ 8 及び 37 で保存後調べた。この場合の 2 ~ 8 での保存について、表 4 に示す結果が得られた。

【0106】

【表 4】

表4:660nmにおける固有の発色R2 (mE)

	0日目	2日目	8日目	10日目
添加剤無し	50.1	136	344	463
0.1mM TCEP	20.4	23.4	48.1	106
0.2mM TCEP	14.2	18.7	41.6	97.4
2mM チオニコチンアミド	50.6	73.9	133.5	205
2mM チオニコチンアミド+0.2mM TCEP	9.6	17	41.5	91.8
4mM チオニコチンアミド	55.7	79.9	122	209
2mM チオNAD	74.3	138	215	292
4mM チオNAD	97.9	139	203	274
4mM チオニコチンアミド+0.1mM TCEP	26.7	36.3	55.5	106
2mM チオNAD+0.2mM TCEP	11.1	34.6	56.6	105
4mM チオNAD+0.1mM TCEP	21.3	46.3	68.3	128

【 0 1 0 7 】

37 での保存について、表5に示す結果が得られた。

10

20

30

40

【表 5】

表5:660nmにおける固有の発色R2 (mE)

	0日目	2日目	8日目	10日目
添加剤無し	50.1	610	2220	2513
0.1mM TCEP	20.4	23.4	66.2	646
0.2mM TCEP	14.2	18.7	31.9	295
2mM チオニコチンアミド	50.6	73.9	233	671
2mM チオニコチンアミド+0.2mM TCEP	9.6	17	41.5	29.7
4mM チオニコチンアミド	55.7	79.9	215	704
2mM チオNAD	74.3	138	366	1174
4mM チオNAD	97.9	139	305	893
4mM チオニコチンアミド+0.1mM TCEP	26.7	36.3	55.5	48.8
2mM チオNAD+0.2mM TCEP	11.1	34.6	56.6	51.5
4mM チオNAD+0.1mM TCEP	21.3	46.3	68.3	109

10

20

30

【0108】

5. チオ化合物と併用したTCEPによるロイコ染料の安定化

40

TCEPと併用した複数のチオ化合物をこれらの染料安定化作用について確認した。このため、ロイコ染料DA67を含有する試薬溶液(マトリクス:バッファ-NaCl、酢酸Ca、トリトンX 405+テルモリシン、この点において、組成3参照)の固有の発色を、2 ~ 8 及び37 で保存後調べた。この場合の2 ~ 8 での保存について、表6a及び6bに示す結果が得られた。

【0109】

【表 6 a】

表6a:660nmにおける固有の発色R2 (mE)

	0日目	2日目	8日目	10日目
添加剤無し	128	564	940	1124
2mM S-NAD	228	437	657	832
2mM チオニコチンアミド	73	189	268	319
2mM NAD	62	619	1248	1508
2mM チオ尿素	85	514	844	1056
1% 2.2 チオジグリコール	96	211	299	357
0.1mM TCEP	89	111	129	266
2.2 チオジグリコール+TCEP 0.1mM	83	92	104	170

10

20

30

40

【 0 1 1 0 】

【表 6 b】

表6b: 660nmにおける固有の発色R2 (mE)

	0日目	2日目	8日目	10日目
添加剤無し	115	323	848	1154
2mM アセチルNAD	169	1097	1869	2037
2mM チオリンゴ酸	91	114	158	197

10

20

30

40

【 0 1 1 1 】

3 7 での保存について、表 7 a 及び 7 b に示す結果が得られた。

【表 7 a】

表7a:660nmにおける固有の発色R2 (mE)

	0日目	2日目	8日目	10日目
添加剤無し	128	957	2583	2821
2mM S-NAD	228	437	662	1591
2mM チオニコチンアミド	73	189	292	862
2mM NAD	62	1220	2717	2940
2mM チオ尿素	85	514	594	2152
1% 2.2 チオジグリコール	96	211	494	1730
0.1mM TCEP	89	111	219	1350
2.2 チオジグリコール+TCEP 0.1mM	83	92	104	272

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

【表 7 b】

表 7b: 660nm における固有の発色 R2 (mE) (別のバッチ)

	0日目	2日目	8日目	10日目
添加剤無し	115	1183	2714	2885
2mM アセチルNAD	169	1097	2024	3209
2mM チオリンゴ酸	91	114	188	341

10

20

30

40

【0113】

6. チオジグリコール単独又は TCEP を併用した場合のシグナル安定化効果

チオジグリコール単独又は TCEP を併用した存在下で HbA1c 校正シグナルを調べた。

【0114】

試薬 2 ベースマトリクス (1 b で特定したような試薬組成物を使用し、表に記載されているように対応させて修正した) を、10 g/L の - チオジグリコールと混合した。このベースマトリクスの一部をそれぞれ異なる濃度の TCEP と混合した。

50

【0115】

これらの試薬2変形例をそれぞれ異なる溶血溶液及び試薬1と共に、BM6010cで測定した。このため、目的に応じたダイヤシスキャリプレート-TruCal HbA1c ネット(製品番号13350)を使用した。そして、各HbA1c定量の測定及び評価を行った。

【0116】

BM6010c測定の基礎となる使用態様は、この場合、以下の通りである：

試薬1：	90 μ L
試薬3：	30 μ L
溶血サンプル：	15 μ L
溶血工程：	5 μ Lサンプル + 100 μ L溶血溶液
波長(HbA1c定量)：	658 nm(主) / 805 nm(副)
測定サイクル：	22 / 23 ~ 41 / 42

ここで、表8に示す結果が得られた。

【0117】

【表 8】

HbA1c校正シグナル 同量のβ-チオジグリコールと様々なTCEP濃度の考察事項									
試薬バッチ	新規			7日/2℃~8℃			7日/37℃		
	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE	レベル1	レベル2	ΔmE
10g/L β-チオジグリコール TCEP無し	28.3	66.0	37.8	25.2	60.4	35.2	18.7	48.1	29.4
10g/L β-チオジグリコール 0.1mmol/L TCEP	26.9	66.1	39.2	23.7	56.5	32.8	22.5	56.2	33.7
10g/L β-チオジグリコール 0.2mmol/L TCEP	26.4	64.5	38.1	22.1	52.3	30.3	21.8	54.8	33.0
10g/L β-チオジグリコール 0.3mmol/L TCEP	25.9	64.3	38.4	19.6	48.8	29.2	22.5	56.2	34.8
10g/L β-チオジグリコール 0.4mmol/L TCEP	24.9	62.9	38.0	18.1	46.1	28.0	21.1	54.7	33.6
10g/L β-チオジグリコール 0.5mmol/L TCEP	24.5	61.8	37.3	16.6	42.4	25.8	20.5	54.6	34.0

表8

10

20

30

40

50

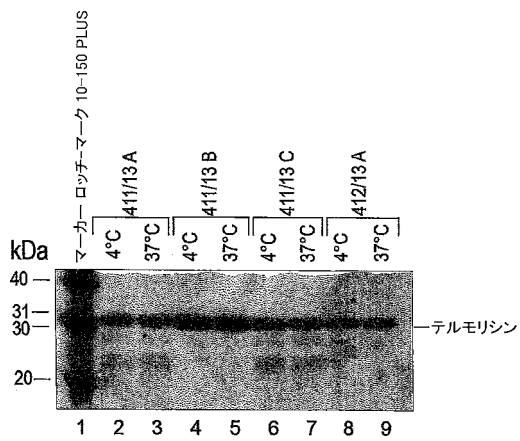
【0118】

7日/2 ~ 8 及び7日/37 のHbA1c定量において、チオジグリコールのみが使用されたときシグナルが低下したことは明らかである。他方で、示された結果は、異なるTCEP濃度におけるTCEPとチオジグリコールとが併用できることを明確に証明している。

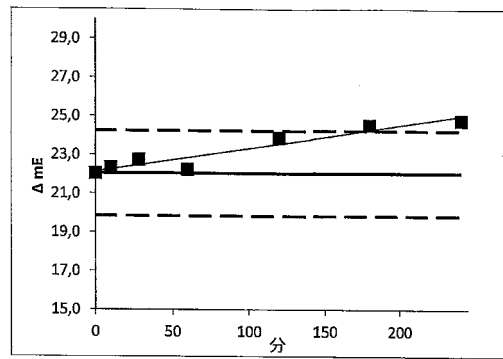
【符号の説明】

【 0 1 1 9 】
H 溶血溶液
R 1 第一試薬溶液
R 2 第二試薬溶液

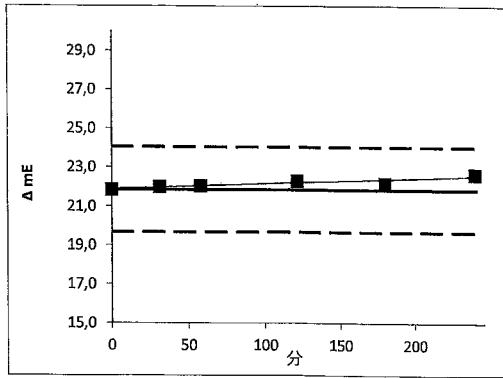
【 図 1 】



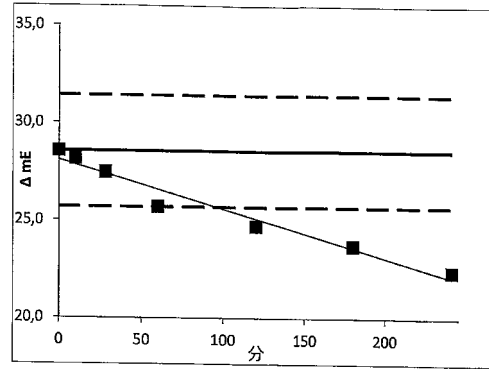
【 図 2 a 】



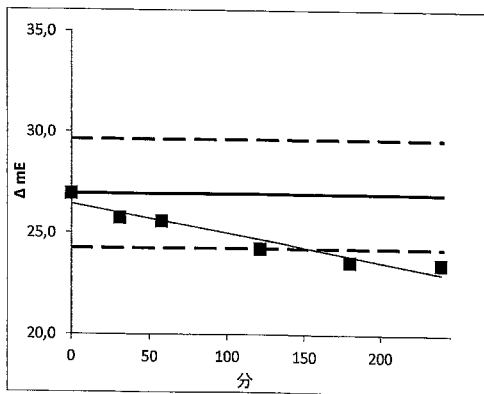
【 図 2 b 】



【 図 2 c 】



【 図 2 d 】



【手続補正書】

【提出日】平成28年2月23日(2016.2.23)

【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】

サンプル中の糖化ヘモグロビン(HbA1c)量を決定する方法において、以下の方法工程：

a) サンプル中の赤血球を溶血して、そこに含まれているHbA1cを放出させ、

b) 方法工程a)で放出させたHbA1cを、糖化ヘモグロビン分解物を生成するためのタンパク質分解剤に接触させ、

c) 方法工程b)で生成された糖化ヘモグロビン分解物を定量化することによってHbA1c量を決定する

が実施される方法であって、

前記方法工程b)で使用されるタンパク質分解剤は、少なくとも2つの異なる溶液を方法工程a)で放出させたHbA1cに接触させるように製造され、

前記溶液の1つは、1～8の範囲にあるpH値を有し、且つ、

i) 金属プロテアーゼ、

ii) 金属プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l～2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーター、及び

iii) 0.5mmol/l～10mmol/lのCa²⁺又は0.5mmol/l～10mmol/lのMg²⁺

を含有し、

キレーター：Ca²⁺又はキレーター：Mg²⁺のモル比は、1：2～1：20の範囲にあり、

他の前記溶液は、Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺及びZn²⁺から選択される二価金属イオンを100μmol/l～5000μmol/l含有する

ことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記Fe²⁺、Mn²⁺、Co²⁺及びZn²⁺から選択される二価金属イオンを100μmol/l～5000μmol/l含有する溶液が、溶血作用洗剤を含有し、方法工程a)でサンプルに添加される溶血溶液である、

ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

方法工程a)の前記溶血が、溶血溶液(H)を添加することによって行われ、

該溶血溶液は、溶血作用洗剤及び2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を有し、且つ、1～3の範囲にあるpH値を有する

ことを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

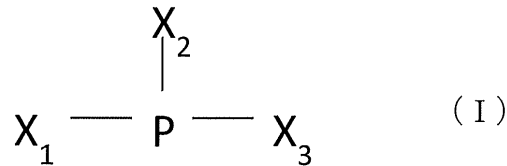
【請求項4】

方法工程c)で行われる糖化ヘモグロビン分解物の定量化は、この分解物をフルクトシルペプチドオキシダーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって酸化させて過酸化水素を生成し、生じた過酸化水素の量を決定することによって行われ、

過酸化水素の量は、ペルオキシダーゼ存在下のロイコ染料の発色反応から定量化され、

該ロイコ染料は、この染料の安定化のための一般式(I)の化合物を含有する溶液内に調製されることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【化 1】



(式中、Pはリン原子を示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して、置換又は無置換の直鎖又は分枝鎖 $C_1 \sim C_8$ アルキル残基、置換又は無置換のシクロヘキシル残基、及び置換又は無置換のフェニル残基から選択される。)

【請求項 5】

前記ロイコ染料を含有する溶液が、この染料の安定化のために少なくとも1種のチオ化合物を含有することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも1種のチオ化合物が、チオジグリコール、チオリンゴ酸、チオニコチンアミド、チオNAD及びこれらの混合物から選択されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

方法工程c)でHbA1c量決定作業を行う前に、SH基捕捉剤を反応混合物に添加することを特徴とする請求項5及び6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

全ヘモグロビン濃度を決定する作業を、方法工程a)~c)の際又はこれらの方法工程間に行うことを特徴とする請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

サンプル中の糖化ヘモグロビン(HbA1c)量を決定する方法に使用される試薬キットにおいて、

該試薬キットが、少なくとも2つの異なる溶液を別個の容器に備え、

前記溶液の1つは、1~8の範囲にあるpH値を有し、且つ、金属プロテアーゼと、金属プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l~2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーターと、0.5mmol/l~10mmol/lの Ca^{2+} 又は0.5mmol/l~10mmol/lの Mg^{2+} とを含有し、

キレーター： Ca^{2+} 又はキレーター： Mg^{2+} のモル比は、1:2~1:20の範囲にあり、

他の前記溶液は、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを100 μ mol/l~5000 μ mol/l含有することを特徴とする試薬キット。

【請求項 10】

少なくとも以下の溶液を別個の容器に備えることを特徴とする請求項9に記載の試薬キット。

- 溶血作用洗剤と、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 及び Zn^{2+} から選択される二価金属イオンを100 μ mol/l~5000 μ mol/l含有する溶血溶液(H)、

- フルクトシルペプチドオキシダーゼ又はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、ペルオキシダーゼとを含有する第一試薬溶液(R1)、及び

- 金属プロテアーゼと、金属プロテアーゼ1000kU/l当り0.1mmol/l~2mmol/lの、二価金属イオンに対するキレーターと、0.5mmol/l~10mmol/lの Ca^{2+} 又は0.5mmol/l~10mmol/lの Mg^{2+} と、ロイコ染料とを更に含有し、キレーター： Ca^{2+} 及びキレーター： Mg^{2+} のモル比が、1:2~1:20の範囲にある第二試薬溶液(R2)

【請求項 11】

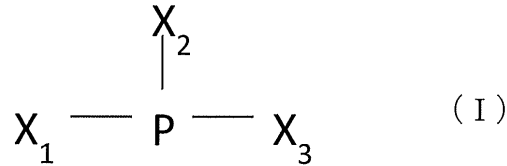
前記溶液(H)が、溶血作用洗剤及び2-(メタクリロイルオキシエチル)-2'-(-

トリメチルアンモニウムエチル)ホスフェートポリマー、ホスファチジルコリン又はこれらの混合物を含有し、且つ、1～3の範囲にあるpH値を有する溶血溶液であることを特徴とする請求項9及び10のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項12】

前記溶液(R2)が、染料の安定化のために少なくとも1種の一般式(I)の化合物を含有することを特徴とする請求項10及び11のいずれか一項に記載の試薬キット。

【化2】



(式中、Pはリン原子を示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して、置換又は無置換の直鎖又は分枝鎖 $C_1 \sim C_8$ アルキル残基、置換又は無置換のシクロヘキシル残基、及び置換又は無置換のフェニル残基から選択される。)

【請求項13】

前記溶液(R2)が、ロイコ染料を安定化するために少なくとも1種のチオ化合物を含有し、

該少なくとも1種のチオ化合物は、好ましくはチオジグリコール、チオリンゴ酸、チオニコチンアミド、チオNAD及びこれらの混合物から選択されることを特徴とする請求項10～12のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項14】

前記溶液(R1)がSH基捕捉剤を含有し、

該SH基捕捉剤は、好ましくはN-エチルマレイミドであることを特徴とする請求項10～13のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項15】

請求項1～8のいずれか一項に記載の方法に使用されることを特徴とする請求項10～14のいずれか一項に記載の試薬キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/057024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/72 ADD.		
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) G01N		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAKURABAYASHI I ET AL: "NEW ENZYMATIC ASSAY FOR GLYCOHEMOGLOBIN", CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, vol. 49, no. 2, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 269-274, XP009008806, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/49.2.269 the whole document	1-15
A	WO 2011/126067 A1 (TOYO BOSEKI [JP]; NISHIMURA KENGO [JP]) 13 October 2011 (2011-10-13) abstract	1-15
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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	
29 October 2015	09/11/2015	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hoese1, Heidi	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/057024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2 161 333 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 10 March 2010 (2010-03-10) the whole document -----	1-15
A	US 2013/115646 A1 (SOYA HARUYO [JP] ET AL) 9 May 2013 (2013-05-09) Par. [0094 - 0103], Ansprüche -----	1-14
A	WO 2013/118960 A1 (I SENS INC [KR]) 15 August 2013 (2013-08-15) abstract -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/057024

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011126067 A1	13-10-2011	JP 2015165827 A	24-09-2015
		WO 2011126067 A1	13-10-2011
EP 2161333 A1	10-03-2010	CA 2676509 A1	27-02-2010
		CN 101659950 A	03-03-2010
		EP 2161333 A1	10-03-2010
		EP 2607481 A1	26-06-2013
		ES 2445866 T3	05-03-2014
		HK 1141829 A1	05-12-2014
		JP 5634043 B2	03-12-2014
		JP 2010051314 A	11-03-2010
		KR 20100025480 A	09-03-2010
		SG 159481 A1	30-03-2010
		US 2010248326 A1	30-09-2010
		US 2012244598 A1	27-09-2012
		US 2013115646 A1	09-05-2013
CN 103069003 A	24-04-2013		
CN 104313121 A	28-01-2015		
EP 2604699 A1	19-06-2013		
KR 20130100972 A	12-09-2013		
US 2013115646 A1	09-05-2013		
WO 2012020745 A1	16-02-2012		
WO 2013118960 A1	15-08-2013	CN 104105968 A	15-10-2014
		EP 2813854 A1	17-12-2014
		JP 2015509361 A	30-03-2015
		KR 101207418 B1	04-12-2012
		US 2014370539 A1	18-12-2014
		WO 2013118960 A1	15-08-2013

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/057024

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/72 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	
	Betr. Anspruch Nr.	
A	SAKURABAYASHI I ET AL: "NEW ENZYMATIC ASSAY FOR GLYCOHEMOGLOBIN", CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, Bd. 49, Nr. 2, 1. Januar 2003 (2003-01-01), Seiten 269-274, XP009008806, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/49.2.269 das ganze Dokument	1-15
A	WO 2011/126067 A1 (TOYO BOSEKI [JP]; NISHIMURA KENGO [JP]) 13. Oktober 2011 (2011-10-13) Zusammenfassung	1-15
A	EP 2 161 333 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 10. März 2010 (2010-03-10) das ganze Dokument	1-15
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
29. Oktober 2015	09/11/2015	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Hoesel, Heidi	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2015/057024

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2013/115646 A1 (SOYA HARUYO [JP] ET AL) 9. Mai 2013 (2013-05-09) Par. [0094 - 0103], Ansprüche -----	1-14
A	WO 2013/118960 A1 (I SENS INC [KR]) 15. August 2013 (2013-08-15) Zusammenfassung -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/057024

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2011126067 A1	13-10-2011	JP 2015165827 A	24-09-2015
		WO 2011126067 A1	13-10-2011
EP 2161333 A1	10-03-2010	CA 2676509 A1	27-02-2010
		CN 101659950 A	03-03-2010
		EP 2161333 A1	10-03-2010
		EP 2607481 A1	26-06-2013
		ES 2445866 T3	05-03-2014
		HK 1141829 A1	05-12-2014
		JP 5634043 B2	03-12-2014
		JP 2010051314 A	11-03-2010
		KR 20100025480 A	09-03-2010
		SG 159481 A1	30-03-2010
		US 2010248326 A1	30-09-2010
		US 2012244598 A1	27-09-2012
		US 2013115646 A1	09-05-2013
CN 103069003 A	24-04-2013		
CN 104313121 A	28-01-2015		
EP 2604699 A1	19-06-2013		
KR 20130100972 A	12-09-2013		
US 2013115646 A1	09-05-2013		
WO 2012020745 A1	16-02-2012		
WO 2013118960 A1	15-08-2013	CN 104105968 A	15-10-2014
		EP 2813854 A1	17-12-2014
		JP 2015509361 A	30-03-2015
		KR 101207418 B1	04-12-2012
		US 2014370539 A1	18-12-2014
		WO 2013118960 A1	15-08-2013

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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

(72)発明者 ゴルカ、ギユンター
ドイツ、65520 バド カムベルグ ロベルト コッホ シュトラーセ 38

(72)発明者 渡津 吉史
日本国 651-2276 兵庫県神戸市西区春日台3-2-E103

(72)発明者 メッツマン、エルウィン
ドイツ、35041 マルブルグ シュレードルンウェッヘ 8

(72)発明者 ライン、アレクサンドラ
ドイツ、65582 ディエズ バザルトリング 23

(72)発明者 ミューラー、ホルガー
ドイツ、65582 ディエズ ハイムケーラーゲードルング 15

(72)発明者 グリムラー、マティアス
ドイツ、65604 エルツ アンラーゲンウェッヘ 17

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB02 CA25 DA48
2G054 AA07 AB02 BA02 BB01 BB13 CA07 CA25 CB10 CE02 CE10
EA04 EB01 EB02 EB03 GB01 GB05 JA01 JA08 JA11
4B063 QA01 QA18 QQ03 QR03 QR16 QR50 QX02

【要約の続き】

【選択図】図1