

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-298632

(P2005-298632A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード(参考)

C09B 67/44

C09B 67/44

A

4B063

C09B 57/00

C09B 57/00

J

4H056

C12Q 1/28

C12Q 1/28

C12Q 1/37

C12Q 1/37

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号

特願2004-115338 (P2004-115338)

(22) 出願日

平成16年4月9日(2004.4.9)

(71) 出願人 303046299

旭化成ファーマ株式会社

東京都千代田区神田美土代町9番地1

(72) 発明者 高妻 卓司

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

旭化成ファーマ株式会社

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ79 QR02 QR03 QR16

QR66 QS36 QX01

4H056 DD06 EA16 FA01

(54) 【発明の名称】試薬の安定性を改善する方法

## (57) 【要約】

【課題】 色素の安定化方法及びそれを用いた組成物、さらに安定化された糖化タンパク質の測定方法及び組成物を提供する。

【解決手段】 色素のモル数を1とした場合に、緩衝剤のモル数を50以上とするにより色素の劣化を防止する。

【効果】 色素のモル数を1とした場合に、緩衝剤のモル数を50以上とすることによる試薬の色素の安定化方法、組成物及び糖化タンパク質測定方法及び測定用組成物を提供することが可能になり、特に臨床検査に有用な色素の安定化方法及び組成物、あるいは糖化タンパク質測定方法及び定量組成物を提供する事が可能になる。

【選択図】 選択図なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

色素と緩衝剤を含有する組成物であって、色素のモル数を 1 とした場合の、緩衝剤のモル数が 50 以上であることを特徴とする組成物。

**【請求項 2】**

さらに酵素を含有することを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

液状であることを特徴とする請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

緩衝剤の濃度が 100 mM 以上であることを特徴とする請求項 3 の組成物。 10

**【請求項 5】**

色素の濃度が 1.0 mM 以上であることを特徴とする請求項 3 あるいは 4 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

緩衝剤が 3,3-ジメチルグルタル酸であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の組成物。

**【請求項 7】**

色素が 4 アミノアンチピリンであることを特徴とする請求項 1 ~ 6 いずれかに記載の組成物。

**【請求項 8】**

酵素、色素および緩衝剤を含有する組成物であって、色素が冷蔵で 6 ヶ月以上安定であることを特徴とする組成物。 20

**【請求項 9】**

色素の安定性を緩衝剤により改善する方法であって、色素のモル数を 1 とした場合の、緩衝剤のモル数が 50 以上とすることを特徴とする安定性改善方法。

**【請求項 10】**

酵素の存在下、色素の安定性を緩衝剤により改善する方法であって、色素のモル数を 1 とした場合の、緩衝剤のモル数が 50 以上とすることを特徴とする安定性改善方法。

**【請求項 11】**

緩衝剤の濃度が 100 mM 以上であることを特徴とする請求項 9 あるいは 10 に記載の方法。 30

**【請求項 12】**

色素の濃度が 1.0 mM 以上であることを特徴とする請求項 9 ~ 11 いずれかに記載の方法。

**【請求項 13】**

色素が 4 アミノアンチピリンである請求項 9 ~ 12 いずれかに記載の方法。

**【請求項 14】**

緩衝剤が 3,3-ジメチルグルタル酸である請求項 9 ~ 13 いずれかに記載の方法。

**【請求項 15】**

請求項 1 ~ 8 いずれかの組成物を用いて糖化タンパク質を測定する方法。 40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、色素の安定化方法及び組成物、さらにそれを用いた糖化タンパク質測定方法及び組成物に関し、特に臨床検査に有用な色素の安定化方法、糖化タンパク質測定方法及び定量組成物に関する。

**【背景技術】****【0002】**

糖尿病の診断及び管理を行う上で糖化タンパク質の測定は非常に重要であり、過去約 1 ~ 2 ヶ月の平均血糖値を反映する糖化ヘモグロビン (GHb)、過去約 2 週間の平均血糖値を反映 50

する糖化アルブミン(GA)及び、血清中の還元能を示す糖化タンパク質の総称であるフルクトサミン(FRA)等が日常的に測定されている。GHbはヘモグロビンの鎖N末端バリンのアミノ基が、GA、FRAはアルブミン、血清タンパク質のリジン残基のアミノ基がそれぞれ糖化されている。

精度が高く、簡便かつ安価な糖化タンパク質の定量法としては酵素法(特許文献1~6、非特許文献1)が挙げられる。但し糖化タンパク質測定用の液状組成物についての報告は少なく、特許文献7に酵素類、特にプロテアーゼおよび糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化について記載があるのみである。

一方、一般に良く使用されている発色系色素、特にトリンダー型の色素は、色素単独の溶液においては安定であるから、これまで糖化タンパク質測定試薬中でこれらの発色色素が不安定になることは知られていなかった。そのため、当然、糖化タンパク質測定試薬中で不安定になった色素の安定化についての報告もなかった。

さらに特許文献8にはヘモグロビンA1cを測定する場合のフルクトシルアミン酸化酵素のフルクトシルバリン特異性を上げる目的で電解質200mM以上と共に存させることを特徴とするキットについて記載があり、活性の検出方法としてパーオキシダーゼ~4アミノアンチピリン系について記述がある。しかし特許文献8は試薬及び色素の安定化に関係なく、特に液体状態での安定性については記載がない。さらにプロテアーゼとの組み合わせについても詳細な記載がない。色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上であることを特徴とする色素の安定化方法及び組成物についてはこれまで知られていなかった。

10

20

30

40

50

### 【0003】

【特許文献1】特開平6-46846号公報

【特許文献2】特開平5-192193号公報

【特許文献3】特開平2-195900号公報

【特許文献4】特開平2-195899号公報

【特許文献5】W098/48043号公報

【特許文献6】W097/13872号公報

【特許文献7】W002/061119号公報

【特許文献8】特開2001-204494号公報

【非特許文献1】Kouzuma et.al. An enzymatic method for the measurement of glycated albumin in biological sample. Clinica Chimica Acta 324 (2002) 61-71

### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

### 【0004】

本発明は、臨床検査に用いる色素の安定性を改善する方法及び組成物、さらにそれを用いた糖化タンパク質測定方法及び組成物を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

### 【0005】

本発明者はこれまで液状で安定な糖化タンパク質測定試薬を開発する目的で、特に酵素であるプロテアーゼ及び糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化を行ってきた。しかしながら、液状の糖化タンパク質測定試薬は、酵素を安定化するのみでは冷蔵保存時の保存安定性が不十分であることを見出した。

そこで安定性に寄与している酵素以外の成分を検討した結果、発色色素、特に4アミノアンチピリンが変性してしまうことにより試薬が劣化してしまうことに原因があることを見出した。4アミノアンチピリンは一般的に液状で安定であるから、糖化タンパク質測定試薬中に含まれる場合など、特殊な環境下において起こる意外な現象であると考えられた。

そこで本発明者は色素の安定化を鋭意検討した結果、通常の安定化剤では安定化作用は小さく、意外なことに緩衝剤の濃度を増やすことにより効果的に色素の安定性が増加することを見出し本発明を成すに至った。また、さらに4アミノアンチピリンの濃度を1.0mM以上にすることでさらに効率的に試薬の安定化が出来ることを見出した。

## 【0006】

すなわち本発明は、

- 1) 色素と緩衝剤を含有する組成物であって、色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上であることを特徴とする組成物。
- 2) さらに酵素を含有することを特徴とする1)に記載の組成物。
- 3) 液状であることを特徴とする1)あるいは2)に記載の組成物。
- 4) 緩衝剤の濃度が100mM以上であることを特徴とする3)の組成物。
- 5) 色素の濃度が1.0mM以上であることを特徴とする3)あるいは4)に記載の組成物。
- 6) 緩衝剤が3,3ジメチルグルタル酸であることを特徴とする1)～5)いずれかに記載の組成物。
- 7) 色素が4アミノアンチピリンであることを特徴とする1)～6)いずれかに記載の組成物。
- 8) 酵素、色素および緩衝剤を含有する組成物であって、色素が冷蔵で6ヶ月以上安定であることを特徴とする組成物。
- 9) 色素の安定性を緩衝剤により改善する方法であって、色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上であることを特徴とする安定性改善方法。
- 10) 酵素の存在下、色素の安定性を緩衝剤により改善する方法であって、色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上であることを特徴とする安定性改善方法。
- 11) 緩衝剤の濃度が100mM以上であることを特徴とする9)あるいは10)に記載の方法。
- 12) 色素の濃度が1.0mM以上であることを特徴とする9)～11)いずれかに記載の方法。
- 13) 色素が4アミノアンチピリンである9)～12)いずれかに記載の方法。
- 14) 緩衝剤が3,3ジメチルグルタル酸である9)～13)いずれかに記載の方法。
- 15) 1)～8)いずれかの組成物を用いて糖化タンパク質を測定する方法

## 【発明の効果】

## 【0007】

本発明の安定性を改善する方法及び組成物は色素の安定化に効果を有し、特に糖化タンパク質の測定に用いる試薬を安定化する効果を有する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0008】

本発明について以下具体的に説明する。

本発明に使用しうる色素としては、酵素を用いた糖化タンパク質測定に使用しうる色素であればいかなる物を用いても良いが、例えば還元系の色素、例えば還元型補酵素またはテトラゾリウム化合物等及び酸化系の色素、例えばトリンダー型色素及びロイコ型色素等を用いることが出来、中でもトリンダー型色素及びロイコ型色素が好ましく、さらにはトリンダー型色素がさらに好ましく、トリンダー型色素の中でも、4アミノアンチピリンが最も好ましい。

トリンダー型の色素は水素供与体とカップラーから成る。本願において「色素」といった場合、水素供与体もカップラーもそれぞれ、「色素」の概念に含めるものとする。

カップラーとしては水素供与体と縮合して発色するものであればいかなるものを用いても良いが例えば4アミノアンチピリン若しくは3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)等を用いることが出来る。

## 【0009】

トリンダー型試薬の水素供与体としては、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等が使用可能であり、具体例として、N-(3-スルホプロピル)アニリンナトリウム1水(HALPS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3メチルアニリンナトリウム1水(TOPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム1水(MAOS)、N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム1水(HDAPS)、N

-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム(HDAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム1水(DAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリンナトリウム(ALPS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリンナトリウム1水(ADPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリンナトリウム2水(ADOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(T00S)、N,Nビス(4-スルホブチル)-3-メチルアニリン2ナトリウム(T0DB)；以上同人化学研究所社製)等が挙げられる。

## 【0010】

またロイコ型試薬の具体例としては、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)フェニルアミン(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(DA67)、2,2-アミノビス(3-エチルベンゾチアゾリノン-6-スルホン酸(ABTS)、ビス-(4-ジエチルアミノフェニル)-2-スルフォフェニルメタン(BSMP)、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)；以上和光純薬社製、3,3-ジアミノベンジジン・4HCl(DAB)、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(HPPA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシ-3-スルフォフェニル)トリジン・2Na・4H<sub>2</sub>O(SAT-3)、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン(TMBZ)、N-(3-スルフォプロピル)-3,3,5,5-テトラメチルベンジジン・Na(TMBZ-PS)、N,N',N,N-ヘキサ(3-スルフォプロピル)-4,4,4-トリアミノトリフェニルメタン・6Na(TPM-PS)(以上同人化学研究所社製)等が挙げられる。

テトラゾリウム化合物としてはニトロテトラゾリウムブルー、テトラゾリウムブルー、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム：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ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム：WST-3、2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム：WSR-8(以上同人化学研究所社製)に代表される各種テトラゾリウム塩を用いることが出来る。

## 【0011】

これらの色素の使用濃度としては、糖化タンパク質が測定できる濃度であればいかなる量用いても良いが、例えば下限は1.0mM以上、好ましくは1.5mM以上であり、上限は500mM以下であり好ましくは300mM以下である。

本発明に使用しうる緩衝剤としては、色素が安定になるもの、または酵素及び色素が共存している状態で色素が安定になる緩衝剤であればいかなるものを用いても良い。

緩衝剤の具体的な例としては、例えばグッドの緩衝剤、例えば3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(EPPS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(HEPPSO)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N-(2-アセトアミド)イミノジ酢酸(ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS)、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS0)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸(CHES)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPS0)、2-モルフィリノエタンスルホン酸(MES)、3-モルフィリノプロパンスルホン酸(MOPS)、2-ヒドロキシ-3-モルフィリノプロパンスルホン酸(MOPS0)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸(PIPES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)(POPS0)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、2-ハイドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS0)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノプロパンスルホン酸(TES)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(Tricine)およびトリスヒドロキシメチルアミノメタン(Tris)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N-(2-アセトアミド)イミノジ酢酸(A

10

20

30

40

50

DA)等を用いた緩衝剤、またはホウ酸、アンモニア、グリシン、炭酸、酢酸、リン酸、ジエタノールアミン、p-フェノールスルホン酸、2-アミノ-2-メチルプロパン-1,3-ジオール、カコジル酸、クエン酸、マレイン酸、ベロナール及び3,3ジメチルグルタル酸があげられる。

【0012】

好みしい緩衝剤の例としては、pH中性付近に緩衝作用をもつ緩衝剤、例えばEPPS、HEPE S、HEPPSO、ACES、ADA、BES、Bicine、Bis-Tris、CHES、DIPSO、MES、MOPS、MOPSO、PIPE S、POPSO、TAPS、TAPSO、TES、Tricine、Tris、ACES、ADA、ホウ酸、アンモニア、グリシン、リン酸、ジエタノールアミン、p-フェノールスルホン酸、2-アミノ-2-メチルプロパン-1,3-ジオール、カコジル酸、クエン酸、マレイン酸、ベロナール及び3,3ジメチルグルタル酸等であり、最も好みしくは3,3ジメチルグルタル酸である。

これらの緩衝剤の使用濃度としては、色素が安定になる濃度であればいかなる量を用いても良いが、例えば下限は100mM以上、好みしくは150mM以上であり上限は5.0M以下、好みしくは1.0M以下の濃度で用いればよい。

【0013】

本発明に使用しうる組成物としては、公知の組成物及び好みしくは糖化タンパク質測定用組成物と、本発明の色素と緩衝剤の組み合わせを用いればよいが、特に酵素、色素と緩衝剤の組み合わせが好みしい。

本発明に使用しうる酵素としては、いかなる酵素を用いても良いが、好みしくは糖化タンパク質の測定に必用な酵素であり、例えばプロテアーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、糖化アミノ酸に作用する酵素及びパーオキシダーゼ等であり、好みしくはプロテアーゼ、糖化アミノ酸に作用する酵素であり、最も好みしい酵素としてはプロテアーゼである。

本発明に使用しうるプロテアーゼは、被検液に含まれる糖化タンパク質に有効に作用し、かつ当該タンパク質由来の糖化アミノ酸及び/若しくは糖化ペプチドを有効に生成するものであればいかなるものを用いても良いが、例えば動物、植物由来のプロテアーゼ、バチルス(Bacillus)属、アスペルギルス(Aspergillus)、リゾバクテル(Rhizopus)、ペニシリウム(Penicillium)、ストレプトマイセス(Streptomyces)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)、クロストリジウム(Clostridium)、リソバクター(Lysobacter)、グリフィオラ(Gliifila)、酵母(Yeast)、トリチラチウム(Tritirachium)、サーマス(Thermus)、シュードモナス(Pseudomonas)、アクロモバクター(Achromobacter)等の微生物由来のプロテアーゼ等が挙げられる。バチルス(Bacillus)属の微生物由来のプロテアーゼとしては例えばズブチリシンやメタロプロテアーゼ等がある。

【0014】

また測定対象である糖化タンパク質がグリコアルブミンである場合にはバチルス属及びストレプトマイセス属の微生物由来プロテアーゼがヒトアルブミンに対する作用が大きい為より好みしい。また測定対象である糖化タンパク質が糖化ヘモグロビンで有る場合にはバチルス属、アスペルギルス属、ストレプトマイセス属、トリチラチウム属由来のプロテアーゼがヒトヘモグロビンに対する作用が大きい為により好みしい。

【0015】

本発明に用いることの出来るプロテアーゼの活性測定法はカゼイン-フォリン法を用いて測定した。

【0016】

本発明に使用しうる糖化アミノ酸に作用する酵素としては、前記プロテアーゼの作用により、被検液に含まれる糖化タンパク質から生成される糖化アミノ酸若しくは糖化ペプチドに有効に作用し、実質的に糖化タンパク質が測定できる酵素であれば如何なるものを用いても良いが、好みしくは、アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する糖化アミノ酸に作用する酵素、アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する糖化アミノ酸に作用する酵素等が挙げられる。

アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する糖化アミノ酸に作用する酵素の例としては、ギベレラ(Gibberella)属、アスペルギルス(Aspergillus)属カンジダ(Candida

10

20

30

40

50

) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フサリウム (Fusarium) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属又はデバリオマイゼス (Debaryomyces) 属由来の酵素等がある。

アミノ基が糖化されたアミノ酸によく作用する糖化アミノ酸に作用する酵素の例としては、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 由来の酵素が挙げられる。

さらに、プロテアーゼと共に存させた状態でも充分な活性を有し、かつ安価に製造可能な酵素の例としては、遺伝子組み替え型ケトアミンオキシダーゼ (KAOD; 旭化成ファーマ社製; 非特許文献 1 に記載) および加えて糖化パリン反応性を著しく低下させた変異型KAOD (KAOD-V; 旭化成ファーマ社製; 特許文献 2 に記載のFOD遺伝子を含有する形質転換微生物J M109 · pcmFOD5 (FERM BP-7848) が生産するKAOD) が挙げられる。尚糖化アミノ酸に作用する酵素の活性は前記非特許文献 1 記載の方法で測定した。

10

#### 【0017】

これらの酵素の使用濃度としては、糖化タンパク質が測定できる濃度であればいかなる量用いても良いが、例えばプロテアーゼの場合、通常下限は 10 U / m l 以上、好ましくは 100 U / m l 以上であり、最も好ましくは 500 U / m l であり、上限は  $1.0 \times 10^6$  U / m l 以下であり、好ましくは  $5.0 \times 10^5$  U / m l 以下であり、最も好ましくは  $3.0 \times 10^5$  U / m l 以下である。また、例えばケトアミンオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ及びパーオキシダーゼの場合は、通常下限は 0.5 U / m l 以上、好ましくは 1 U / m l 以上であり、上限は 1000 U / m l 以下、好ましくは 500 U / m l 以下である。

#### 【0018】

本発明に使用しうる色素と緩衝剤の組み合わせとしてはどのような組み合わせでもかまわないか、前記した色素及び緩衝剤を用いることが出来る。組み合わせる色素と緩衝剤の濃度の比率としては、色素が冷蔵液状保存で 6 ヶ月以上好ましくは 9 ヶ月以上安定であればいかなる濃度の比率を用いても良いが、例えば色素のモル数を 1 とした場合の緩衝剤のモル数が 50 以上であれば好ましく、色素のモル数を 1 とした場合の緩衝剤のモル数が 10 以上であればさらに好ましい。

本発明の糖化タンパク質の測定方法及び組成物としては本発明の安定性改善方法を用いて糖化タンパク質を測定する方法及び組成物であればいかなる方法及び組成物を用いても良い。さらに、本発明の糖化タンパク質測定用組成物としては、プロテアーゼを含むタンパク質分解試薬と糖化アミノ酸に作用する酵素を含む検出試薬から成る組成物を用いることが出来、どちらかの試薬に色素及び緩衝剤が、色素のモル数を 1 とした場合の緩衝剤のモル数が 50 以上になるように含有されているか、若しくはプロテアーゼ、糖化アミノ酸に作用する酵素、色素及び緩衝剤が色素のモル数を 1 とした場合の緩衝剤のモル数が 50 以上になるように同時に含まれていれば良い。これらの試薬は液状品及び液状品の凍結物あるいは凍結乾燥品として提供できるが、好ましい剤形は液状品である。液状品としては、例えば色素、緩衝剤を含有する水溶液や、色素、緩衝剤及び酵素を含有する水溶液、等が挙げられる。

30

#### 【0019】

具体的な本発明に使用しうる糖化タンパク質分解試薬組成のうち、タンパク質分解試薬としては、タンパク質分解反応が効率よく進行するように pH、緩衝剤及びプロテアーゼ濃度を決定し、その後、ASOx、プロテアーゼ安定化剤等を有効な濃度になるよう適宜調製して添加すればよい。

40

例えばプロテアーゼタイプ X X I V (シグマ社製) を用いる場合には pH が 7 ~ 10 付近でタンパク質分解活性が強いため、反応の pH は 7 ~ 10 を選択できる。色素としては 4 アミノアンチピリンを用いることが出来、使用濃度としては溶液状態で例えば下限濃度 0.2 mM 以上好ましくは 0.3 mM 以上であり、上限濃度 1.0 M 以下、好ましくは 0.500 mM 以下で使用すればよい。また色素を安定化する緩衝液としては 3,3ジメチルグルタル酸を使用することが出来、4 アミノアンチピリンのモル数を 1 とした場合の 3,3ジメチルグルタル酸の濃度のモル数が 50 以上となるように使用する。このとき、3,3ジメチルグルタル酸の濃度は、100 mM 以上の濃度、例えば 200 mM であることが好ましい。

50

プロテアーゼの安定化剤としては、公知の安定化剤を用いればよいが、例えばDMSOを安定化剤として添加する場合には、下限濃度は5%以上、好ましくは10%以上であり上限の濃度は50%以下、好ましくは40%以下の濃度で添加すればよい。

本発明に使用しうる糖化アミノ酸定量試薬組成については、使用する糖化アミノ酸に作用する酵素の至適pHを考慮し反応が効率よく進行するようにpHを選択し、次に糖化アミノ酸に作用する酵素量を決定し、最後に糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤を添加すればよい。

#### 【0020】

例えば前記のKAOD若しくはKAOD-V(旭化成ファーマ社製)を使用する場合、最大活性の50%以上の活性を示す領域がpH6.5～10と広く、反応のpHは6.5～10を選択できる。

10

糖化アミノ酸に作用する酵素の安定化剤としては、例えばソルビトールを添加することができ、下限濃度は0.01%以上、好ましくは0.1%以上であり、上限の濃度は30%以下、好ましくは20%以下の濃度で添加すればよい。

さらに本発明に基づく糖化タンパク質を定量する酵素反応組成には、例えば界面活性剤、塩類や防腐剤などを適宜選択して添加しても良い。

界面活性剤としてはポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ポリビニルアルコール、等の0.01～10%、好適には0.05～5%、各種金属塩類、例えば塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マンガン、塩化コバルト、塩化亜鉛、塩化カルシウム等の1mM～5M、好適には10mM～1M、各種防腐剤、例えばアジ化ナトリウムの0.01～10%、好適には0.05～1%を適宜添加すれば良い。

20

#### 【0021】

本発明において、色素の安定性は、例えば以下のように判定する。色素と緩衝剤を含む組成物が、液状品でない場合、例えば液状品の凍結物あるいは凍結乾燥品である場合は、融解あるいは水の添加等により、液状品とする。安定性の判定において液状品は、液状品に含まれる色素濃度が、糖化タンパク質濃度測定に適用しうる色素濃度になるよう調整する。この調整された液状品(調整せずにそのまま糖化タンパク質濃度測定に使用しうるよう、液状品の状態で市販されている場合は、液状品が充填された容器を開封したものという)を、冷蔵(2～10)保存、好ましくは4～6、さらに好ましくは5で、1年保存する(あるいは、37、1週間保存の条件を代用してもよい)。この保存後の液状品と、調整直後の液状品を用いて、糖化アルブミンあるいは糖化ヘモグロビンを測定し、保存後と調整直後の液状品の感度をそれぞれ測定し、感度の低下を算出する。この感度の低下が、抑制された場合、本発明において、安定性が改善されるという。また、本発明において、色素が安定であるとは、保存後と調整直後の液状品の同一試料を測定した場合の感度の保持が80%以上好ましくは90%以上であることをいう。

30

#### 【0022】

本発明に使用しうる糖化タンパク質の測定方法としては、前記本発明の糖化タンパク質定量用組成物に被検液0.001～0.5mlを加え、37の温度にて反応させ、レートアッセイを行う場合には、反応開始後一定時間後の2点間の数分ないし数十分間、例えば3分後と4分後の1分間、または3分後と8分後の5分間における変化した補酵素、溶存酸素、過酸化水素若しくはその他生成物の量を直接または間接的に前記の方法で測定すれば良く、エンドポイントアッセイの場合には検出反応開始後一定時間後の変化した補酵素、溶存酸素、過酸化水素若しくはその他生成物の量を同様に測定すれば良い。この場合既知濃度の糖化タンパク質を用いて測定した場合の吸光度等の変化と比較すれば被検液中の糖化タンパク質の量を求めることができる。

40

#### 【0023】

また本発明の糖化タンパク質を測定する方法としては、別途タンパク質を定量して糖化タンパク質割合を求めることも出来る。例えばタンパク質が糖化アルブミンであれば、別途アルブミンを、またタンパク質が糖化ヘモグロビン若しくはヘモグロビンA1cである場合には別途ヘモグロビンを測定すればよい。アルブミンやヘモグロビンの測定は公知の方法を用いて行えば良い。

50

本発明の測定対象となる被検液は、少なくとも糖化タンパク質を含有する被検液であれば如何なるものを用いても良いが、好ましい被検液としては血液成分、例えば血清、血漿、血球、全血等が挙げられる。また分離された赤血球も、分離の条件によってはグロブリン成分が混入し測定値に影響を与える可能性があることから好ましい被検液として用いることができる。

本発明の糖化タンパク質定量組成物及び方法に於ける測定対象である糖化タンパク質としては、例えば糖化アルブミンまたは糖化ヘモグロビン（ヘモグロビン A 1 c）が挙げられるが、測定対象となる糖化タンパク質は何らこれらに限定されるものではなく、何れの糖化タンパク質を測定しても良い。

【実施例】

10

【0024】

本発明を実施例に基づいて説明する。

【実施例1】

安定化された糖化アルブミン測定用組成物

R-1 タンパク質分解試薬

150mM 3,3ジメチルグルタル酸（和光純薬社製）

8000U/ml プロテアーゼタイプXXIV（シグマ社製）

2.0mM 4-アミノアンチピリン（和光純薬社製）

20% ジメチルスルホキシド（和光純薬社製）

R-2 糖化アミノ酸検出試薬

20

150mM トリシン緩衝液（和光純薬社製）pH7.5

3.0mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(T00S、和光純薬社製）

15U/ml KAOD（旭化成ファーマ社製）

20U/ml パーオキシダーゼ（シグマ社製）

5% ソルビトール（和光純薬社製）

【0025】

【実施例2】

安定化された糖化ヘモグロビン測定用組成物

R-1 タンパク質分解試薬

30

150mM 3,3ジメチルグルタル酸（和光純薬社製）

8000U/ml プロテアーゼタイプXIV（シグマ社製）

2.0mM 4-アミノアンチピリン（和光純薬社製）

2.0mM 2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4ジスルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム：WST-3(同仁化学研究所社製）

20% ジメチルスルホキシド（和光純薬社製）

R-2 糖化アミノ酸検出試薬

150mM トリシン緩衝液（和光純薬社製）pH7.5

3.0mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(T00S、和光純薬社製）

40

15U/ml KAOD（旭化成ファーマ社製）

20U/ml パーオキシダーゼ（シグマ社製）

5% ソルビトール（和光純薬社製）

【0026】

【実施例3】

緩衝剤濃度が試薬の安定性に及ぼす影響

実施例1及び2に記載の糖化タンパク質測定用組成物を冷蔵（約5℃）で1年間保存した。作成直後と冷蔵保存1年後のコントロールの感度を測定した。

<糖化アルブミン測定試薬の反応手順>

37度にインキュベートされたR-1;240μlにコントロール血清（株式会社BML社製）8μl

50

を添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後にR-2;80μlを添加した。R-2添加前及び添加5分後の555nmの吸光度を測定した。また基質溶液の代わりに蒸留水を用いた測定をプランクとし、コントロール基質溶液から得られた吸光度変化からプランク試料の吸光度変化を差し引いた  $A_0$ を算出した。

＜糖化ヘモグロビン測定試薬の反応手順＞

37度にインキュベートされたR-1;240μlにHbA1c測定用実試料標準物質（1次キャリブレーターJDS HbA1c Lot2 福祉・医療技術振興会製）30μlを添加し、37℃で反応を開始し、正確に5分後にR-2;60μlを添加した。R-2添加前及び添加5分後の555nmの吸光度を測定した。また基質溶液の代わりに蒸留水を用いた測定をプランクとし、コントロール基質溶液から得られた吸光度変化からプランク試料の吸光度変化を差し引いた  $A_0$ を算出した。

感度変化の測定の結果は、初期の感度を100%とすると、グリコアルブミン試薬、糖化ヘモグロビン測定試薬の感度の残存は冷蔵保存1年後ではそれぞれ85%、77%であった。このことから糖化タンパク質の測定用物組成物が1年間の冷蔵保存で劣化したことが分かる。

【0027】

次にR-1、R-2のどちらが感度低下の原因かを検討する目的で、保存後のR-1、R-2と新しく作成したR-1、R-2を用いて、保存後のR-1、新品R-2の組み合わせ、新品のR-1、保存後R-2の組み合わせ、保存後のR-1、R-2の組み合わせ、新品のR-1、R-2の組み合わせでコントロールを測定した。測定結果は糖化アルブミン試薬の場合、新品R-1、R-2の組み合わせを用いた場合の感度を100%とすると保存後のR-1、R-2で85%、新品のR-1保存後のR-2の組み合わせで98%、保存後のR-1、新品R-2の組み合わせで87%の相対感度であった。このことからR-1の成分が劣化の原因であることが判明した。

さらに、R-1中の劣化の原因を突き止める目的でR-1各成分の添加実験をおこなったところ色素である4アミノアンチピリンの添加の場合のみ感度が回復した。このことからR-1の色素が劣化をしていることが判明した。

【0028】

[実施例4]

緩衝剤濃度が試薬の安定性に及ぼす影響

糖化アルブミン測定試薬のR1の緩衝剤3,3ジメチルグルタル酸の濃度を25mM、50mM、75mM、100mM、200mM、300mMに変化させ37℃-1週間試薬を放置し、コントロールの感度を測定した。尚本試薬の37℃-1週間の保存試験は冷蔵保存1年に相当することが知られている。結果を図1に示す。

図1から分かるように100mM以上の緩衝剤を用いることで試薬が飛躍的に安定になることが明白であった。これは試薬中の色素、この場合は4アミノアンチピリンが安定化されていると考えられた。この場合色素には2.0mMの4アミノアンチピリンを用い、緩衝剤濃度は100mM以上が好ましいことから、色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上であることが好ましいことが明白である。

また色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上である組成の37℃-1週間の保存後の残存感度が90%以上であり、キャリブレーション後のGA濃度には試験前後で変化なかったことから本安定化方法を用いた組成物は少なくとも冷蔵6ヶ月以上液体状態で、安定であると考えられた。また、本検討と同様の試験を糖化ヘモグロビン組成物に用いたところ同じく色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上である組成の試薬が飛躍的に安定になった。

【0029】

[実施例5]

4アミノアンチピリン濃度の安定性に及ぼす影響

糖化アルブミン測定試薬の4アミノアンチピリン濃度を0.5mM、1.0mM、2.0mM、5.0mMに変化させ37℃-1週間試薬を放置し、コントロールの感度を測定した。結果は残存感度がそれぞれ、80%、93%、94%、95%であり、4アミノアンチピリン濃度1.0mM以上で安定性が高いことが示された。これは試薬劣化の現象が保存時に色素が劣化していくことが原因であ

10

20

30

40

50

ることから、最初から4アミノアンチピリンを增量しておけば試薬性能としての劣化が減少するためと考えられた。ただし4アミノアンチピリンを增量だけでは完全に試薬を安定化するには至らなかった。本結果から分かるように色素の安定化を図る場合には色素のモル数を1とした場合の、緩衝剤のモル数が50以上であることに加えて4アミノアンチピリン濃度を1.0mM以上にすると良いことが明白であった。

また、本検討と同様の試験を糖化ヘモグロビン組成物で行ったところ、同じく1.0mM以上の4アミノアンチピリン濃度で安定性がよくなつた。

【産業上の利用可能性】

【0030】

本発明の安定化方法及び組成物は臨床検査の分野で好適に使用できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本発明の実施例4に基づく緩衝剤濃度と色素の安定性の関係を示した図である。

【図1】

