

(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  
2020年4月2日(02.04.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/067396 A1

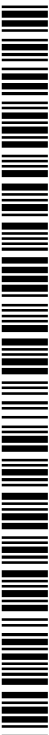
- (51) 国際特許分類:  
*G01N 33/53* (2006.01) *G01N 33/536* (2006.01) 新宿区荒木町20番地21インテック  
88ビル4階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/038076 (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,  
(22) 国際出願日: 2019年9月27日(27.09.2019) BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,  
(25) 国際出願の言語: 日本語 DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,  
(26) 国際公開の言語: 日本語 KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
(30) 優先権データ: NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
特願 2018-184017 2018年9月28日(28.09.2018) JP QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
(71) 出願人: 積水メディカル株式会社 (SEKISUI UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW).  
MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京  
都中央区日本橋二丁目1番3号 Tokyo (JP).  
(72) 発明者: 大田 美恵子(OTA Mieko); 〒1030027 東  
京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカ  
ル株式会社内 Tokyo (JP). 宮崎 修(MIYAZAKI  
Osamu); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁  
目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo  
(JP). 妹尾 理子(SEO Satoko); 〒1030027 東京  
都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メディカ  
ル株式会社内 Tokyo (JP). 山本 光章(YAMAMOTO  
Mitsuaki); 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁  
目1番3号 積水メディカル株式会社内 Tokyo  
(JP). 西尾 朋久(NISHIO Tomohisa); 〒1030027  
東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水  
メディカル株式会社内 Tokyo (JP).  
(74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所  
(MOEGI PATENT OFFICE); 〒1600007 東京都

(54) Title: GLYCATED HEMOGLOBIN (%) ASSAY METHOD

(54) 発明の名称: 糖化ヘモグロビン(%)の測定方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method and a reagent for glycosylated hemoglobin (%) assay that allow for accurate measurement of glycosylated hemoglobin (%) in blood even when abnormal hemoglobin such as HbC and HbS is included in a blood sample containing hemoglobin. Provided is a method for glycosylated hemoglobin (%) assay in which two types of monoclonal antibodies, which are an anti-glycosylated hemoglobin monoclonal antibody and a monoclonal antibody against an anti-glycosylated hemoglobin monoclonal antibody, are combined so that glycosylated hemoglobin (%) in blood can accurately be measured even when the sample includes abnormal hemoglobin. Also provided is an assay reagent for implementing said method.

(57) 要約: ヘモグロビンを含む血液検体に H b C や H b S などの異常ヘモグロビンが含まれている場合であっても、血液中の糖化ヘモグロビン (%) を正確に測定することができる、糖化ヘモグロビン (%) 測定方法及び測定試薬の提供を課題とする。抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体と、抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に対するモノクローナル抗体との2種類のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、異常ヘモグロビンを含む検体であっても血液中の糖化ヘモグロビン (%) を正確に測定できる方法及び該方法を実施するための測定試薬を提供する。



WO 2020/067396 A1

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正を受理した際には再公開される。（規則48.2(h)）

## 明 細 書

発明の名称：糖化ヘモグロビン（％）の測定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、免疫反応を利用した糖化ヘモグロビン（％）の測定方法及び測定試薬に関する。さらに詳しくは、複数のモノクローナル抗体を用いる糖化ヘモグロビン（％）の測定方法及び測定試薬に関する。

### 背景技術

[0002] ヘモグロビンA1c（以下、単にHbA1cと表すことがある）は、2本の $\alpha$ 鎖と2本の $\beta$ 鎖からなりヘテロテトラマー構造を有するヘモグロビンの $\beta$ 鎖N末端のアミノ酸残基の $\alpha$ -アミノ基にグルコースが非酵素的に結合した糖化ヘモグロビンである。このHbA1cの血中割合は糖尿病の比較的長期の血糖コントロール状態を反映することが知られており、HbA1cを測定することは血糖コントロール状態を知る上で臨床的に極めて有意義である。HbA1cの免疫学的な測定方法としては次のような技術が知られている。

[0003] 特許文献1には、未感作のラテックスとHbA1cを含む試料とを反応させ、次に、抗HbA1c抗体を反応させ、HbA1cが吸着したラテックスの抗HbA1c抗体を介した凝集を測定するHbA1c（％）の測定方法が開示されている。この測定方法ではモノクローナル抗体は、HbA1cに対する抗体1種類しか使われていない。

[0004] 特許文献2には、試料中のHbA1cを、ラテックスなどの不溶性担体粒子に吸着させ、抗HbA1cモノクローナル抗体（第一抗体）と反応させた後に、該モノクローナル抗体に選択的に結合する第二抗体を更に反応させて、不溶性担体粒子を選択的に凝集させる凝集イムノアッセイ法が開示されている。このアッセイ法では、抗体を2種類使っているが、モノクローナル抗体は第一抗体の抗HbA1cモノクローナル抗体のみで、第二抗体は抗HbA1cモノクローナル抗体に結合するポリクローナル抗体であってモノクロ

ーナル抗体ではない。

[0005] また、従来の製品としては、ラテックスを含む第1試薬と、抗ヒトHbA1cモノクローナル抗体及び抗マウスIgG抗体との結合物を含む第2試薬とからなるHbA1c(%)測定試薬が知られている(非特許文献1、非特許文献2)。本測定試薬によれば、血液中のHbA1cがラテックスに吸着し、ラテックスに吸着しているHbA1cに前記抗体の結合物が免疫反応し、このときに生ずるラテックスの凝集を濁度として求めている。

[0006] ところで、正常なヘモグロビンは前述のとおり、2本の $\alpha$ 鎖と2本の $\beta$ 鎖からなるヘテロテトラマーであるが、一部のアフリカ人やアメリカ黒人の血液には、 $\beta$ 鎖の一部が変異した異常ヘモグロビンが存在することが知られている。具体的にはヘモグロビン(Hb)の $\beta$ 鎖のN末端から6番目のGluがValに変異したHbSや、同じく6番目のGluがLysに変異したHbCなどである。そのような変異した配列を有する異常ヘモグロビンを保持するHbS症状、HbC症状を有する者は日本人では極めて少ないものの一定の割合でやはり存在する。そして、このような異常ヘモグロビン症状の患者血液を従来のHbA1c測定方法で測定したところ、HbA1c(%)の測定値(厳密には糖化HbS、糖化HbCなどの糖化ヘモグロビン(%)の測定値)がHPLC法に比べて高値化し、正確な測定が出来ないことが判明した(後記実施例中の比較例2参照)。

[0007] 特許文献3には、試料中のすべての糖化ヘモグロビンを、糖化ヘモグロビンの形態に関わりなく検出すること、すなわち、糖化ヒトヘモグロビンA、糖化ヒトヘモグロビンS、糖化ヒトヘモグロビンCを検出することを目的として、エンドペプチダーゼ処理されたヒトヘモグロビン含有試料をプロリン特異的エンドペプチダーゼで消化して、得られる糖化ペптаペチドのレベルを定量化することにより、試料中に存在する糖化ヘモグロビンを検出する方法が記載されている。プロリン特異的エンドペプチダーゼによる、ヘモグロビンA、ヘモグロビンS及びヘモグロビンCを含有する試料の消化は、ヘモグロビンA、ヘモグロビンS及びヘモグロビンCそれぞれの場合で同じ糖

化ペンタペプチドを生じさせることを利用したものである。

前記糖化ペンタペプチドの定量は、マウスモノクローナル抗HbA1c抗体を用いた凝集阻害測定法により行われる。しかし、本方法では2種類のペプチダーゼ処理工程が必要であり、操作が煩雑である。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0008] 特許文献1：特開平6-66795号公報  
特許文献2：特開平6-167495号公報  
特許文献3：特表2011-503632

### 非特許文献

- [0009] 非特許文献1：ラピディア（登録商標）オートHbA1c添付文書  
非特許文献2：デタミナー（登録商標）LHbA1c添付文書

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、ヘモグロビンを含む血液検体にHbSやHbCなどの異常ヘモグロビンが含まれている場合であっても、その影響を受けず、血中の糖化ヘモグロビン（%）を正確に測定することができる糖化ヘモグロビン（%）測定方法及び測定試薬の提供を課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者は上記課題を解決するために、鋭意検討した結果、抗HbA1cモノクローナル抗体と、抗HbA1cモノクローナル抗体に対するモノクローナル抗体を組み合わせることにより、異常ヘモグロビン検体であっても血液中の糖化ヘモグロビン（%）を正確に測定できることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の構成を有する。

（1）試料中の糖化ヘモグロビン（%）を測定する方法であって、不溶性担体と試料とを接触させることにより試料中の糖化ヘモグロビンを不溶性担体に吸着させる工程と、

不溶性担体に吸着した糖化ヘモグロビンと抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体とを接触させることにより抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体、糖化ヘモグロビン、及び不溶性担体の複合体を形成する工程と、当該複合体と抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体とを接触させることにより不溶性担体を凝集させる工程と、を含む前記糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。

(2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体が、ヒト IgG とは反応しない抗体である (1) に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。

(3) 不溶性担体がラテックスである (1) 又は (2) に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。

(4) 試料が全血又は血球である (1) ~ (3) のいずれかに記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。

(5) 凝集度合いを光学的に検出する工程を含む (1) ~ (4) のいずれかに記載の測定方法。

(6) 少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体を含む糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬。

1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体

2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体  
(7) さらに、不溶性担体を含む (6) に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬。

(8) 第1試薬と第2試薬を含む糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬であって、

第1試薬は、不溶性担体を含み、第2試薬は、少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体を含む (7) に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬。

1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体

2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体  
(9) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗

体が、ヒト IgG とは反応しない抗体である (6) ~ (8) のいずれかに記載の測定試薬。

(10) 不溶性担体がラテックスである (6) ~ (9) のいずれかに記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬。

(11) (6) ~ (10) のいずれかに記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬を含む糖化ヘモグロビン (%) 測定キット。

(12) ヒト糖化ヘモグロビンに結合しているモノクローナル抗体と反応し、かつ、ヒト IgG に反応しないモノクローナル抗体。

(13) 異常ヘモグロビンを含む試料中の糖化ヘモグロビン (%) 測定値の乖離低減方法であって、少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体、不溶性担体及び試料とを接触させる工程を含む前記乖離低減方法。

1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体

2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体

(14) 異常ヘモグロビンを含む試料中の糖化ヘモグロビン (%) 測定値の高値化抑制方法であって、少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体、不溶性担体及び試料とを接触させる工程を含む前記高値化抑制方法。

1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体

2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体

## 発明の効果

[0012] 本発明によれば、血液検体が正常なヘモグロビンだけではなく、HbSやHbCなどの異常なヘモグロビンを含む場合であっても、正確な糖化ヘモグロビン (%) の免疫測定が可能である。また、本発明によれば、異常ヘモグロビン検体を特に選別することなくいずれも同様に測定できることから自動連続測定に適した試薬を提供することが可能である。

## 発明を実施するための形態

[0013] (抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体)

本発明のモノクローナル抗体には、少なくとも第1のモノクローナル抗体と第2のモノクローナル抗体があり、糖化ヘモグロビン (%) の測定に際し

てはこれらを組み合わせて用いる。第1のモノクローナル抗体は、ヒトの糖化ヘモグロビンと特異的に反応するモノクローナル抗体であればいずれのモノクローナル抗体でもよい。ヒトの糖化ヘモグロビンと特異的に反応するとは、ヒト糖化ヘモグロビンには反応するが、糖化されていないヒトヘモグロビンには実質的に反応しないことを言う。

[0014] 本発明の第1のモノクローナル抗体は、HbA1cなどの糖化ヘモグロビンに特異的なβ鎖N末端領域を認識するモノクローナル抗体であるが、このβ鎖N末端領域はヘモグロビンの高次構造中に埋没して存在するため、抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体で糖化ヘモグロビンを免疫測定するためには検体の変性処理が通常必要となる。しかしながら、ラテックスなどの不溶性担体に糖化ヘモグロビンを吸着させることにより糖化ヘモグロビンの構造が変化することで、糖化ヘモグロビンのβ鎖N末端領域が露出し、抗糖化ヘモグロビン抗体による免疫測定が可能になると考えられている。

[0015] (抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に対するモノクローナル抗体)

本発明の第2のモノクローナル抗体は、少なくとも以下の1)の性質を有するモノクローナル抗体であればいずれのモノクローナル抗体でもよい。望ましくはさらに2)の性質を有するモノクローナル抗体である。

1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応する

2) ヒトIgGに反応しない

[0016] 本発明の第1のモノクローナル抗体と第2のモノクローナル抗体を組み合わせた糖化ヘモグロビン(%)の測定方法は、試料中に正常ヘモグロビンの変異体であるHbSやHbCなどの異常ヘモグロビン検体であってもこれらの変異による影響を受けにくい糖化ヘモグロビン(%)の測定方法である。本発明の糖化ヘモグロビンの測定対象には、このような異常なヘモグロビンが糖化された糖化HbS、糖化HbCと正常な糖化ヘモグロビン(HbA1c)のいずれも含まれる。すなわち、いずれの糖化ヘモグロビンを含む検体であっても、正確な糖化ヘモグロビン(%)測定値が得られる。

従来のような、第二抗体としてIgGなどのポリクローナル抗体を用いた

免疫凝集法では、異常ヘモグロビンが存在すると糖化ヘモグロビン（％）の測定値が高値化して正常値から乖離するという問題があった。しかし、本発明の測定方法のように、第二抗体を、抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に対するモノクローナル抗体とすることで、理由は定かではないが、試料中に異常ヘモグロビンが存在しても正確に糖化ヘモグロビン（％）を測定することが可能となった。

本明細書中、第1のモノクローナル抗体と第2のモノクローナル抗体は、それぞれの抗原と反応させる工程が順次行われる場合は、第1のモノクローナル抗体は1次抗体、第2のモノクローナル抗体は2次抗体と呼ぶことがある。

[0017] また、モノクローナル抗体と抗原との反応性について、「反応する」、「認識する」、「結合する」は、同義の意味で用いられる。

本発明の抗体と、ある化合物が「反応しない」とは、ある化合物と実質的に反応しないことをいい、例えば、後述する実施例では、抗原固相化ELISAのプレートリーダーによる測定で0.1 Abs未満をいう。

[0018] 第1のモノクローナル抗体を取得するための抗原は、糖化ヘモグロビンであればよく、典型的にはHbA1cが好ましく用いられ、HbA1cは、HbA1c全体であってもよく、その一部であってもよい。後述する実施例では、糖化ヘモグロビンとしてHbA1c、糖化していないヘモグロビンとしてHbA0を用いて本発明の第1のモノクローナル抗体を取得した。したがって、その場合の抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体を特に、抗HbA1cモノクローナル抗体という。

また、第2のモノクローナル抗体を取得するための抗原として認識される第1のモノクローナル抗体はモノクローナル抗体全体であってもよく、その一部であってもよい。

[0019] 本発明の抗体は、抗原としてキャリア蛋白に糖化ペプチド（f-VHLT、f-VHLTPEEKYYC：fはフルクトシル化を意味する）を結合させた物質（以下、糖化ペプチド結合蛋白という）をリン酸緩衝生理食塩水な

どの溶媒に溶解し、この溶液を動物に投与して免疫することによりに容易に製造できる。キャリア蛋白としては、ウシ血清アルブミン、スカシ貝ヘモシアニン、卵白アルブミンなどを用いてもよい。必要に応じて前記溶液に適宜のアジュバントを添加した後、エマルジョンを用いて免疫を行ってもよい。アジュバントとしては、油中水型乳剤、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲルなどの汎用されるアジュバントのほか、生体成分由来のタンパク質やペプチド性物質などを用いてもよい。例えば、フロイントの不完全アジュバント又はフロイントの完全アジュバントなどを好適に用いることができる。アジュバントの投与経路、投与量、投与時期は特に限定されないが、抗原を免疫する動物において所望の免疫応答を増強できるように適宜選択することが望ましい。

[0020] 免疫に用いる動物の種類も特に限定されないが、哺乳動物が好ましく、例えばマウス、ラット、ウサギなどを用いることができ、より好ましくはマウスを用いることができる。動物の免疫は、一般的な手法に従って行えばよく、例えば、抗原の溶液、好ましくはアジュバントとの混合物を動物の皮下、皮内、静脈、又は腹腔内に注射することにより免疫を行うことができる。免疫応答は、一般的に免疫される動物の種類及び系統によって異なるので、免疫スケジュールは使用される動物に応じて適宜設定することが望ましい。抗原投与は最初の免疫後に何回か繰り返し行うことが好ましい。

[0021] モノクローナル抗体を得る場合、引き続き以下の操作が行われるが、それに限定されることはなく、モノクローナル抗体それ自体の製造方法については、例えば、Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)) に記載の方法に準じて行うことができる。

[0022] 最終免疫後、免疫した動物から抗体産生細胞である脾臓細胞あるいはリンパ節細胞を摘出し、高い増殖能を有するミエローマ細胞と細胞融合させることによりハイブリドーマを作製することができる。細胞融合には抗体産生能（質・量）が高い細胞を用いることが好ましく、またミエローマ細胞は融合する抗体産生細胞の由来する動物と適合性があることが好ましい。細胞融合

は、当該分野で公知の方法に従って行うことができるが、例えば、ポリエチレングリコール法、センダイウイルスを用いた方法、電流を利用する方法などを採用することができる。得られたハイブリドーマは公知の方法に従って増殖させることができ、産生される抗体の性質を確認しつつ所望のハイブリドーマを選択することができる。ハイブリドーマのクローニングは、例えば限界希釈法や軟寒天法などの公知の方法により行うことが可能である。

[0023] 第1のモノクローナル抗体を取得する方法について説明する。

第1のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、産生される抗体が実際の測定に用いられる条件を考慮し、効率的に行うことができる。例えば、ELISA法、RIA法等により、HbA1cに反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより得られる。具体的には、まず、培養上清中のモノクローナル抗体を、固相化した糖化ペプチド結合蛋白と反応させ、次いで固相化したHbA0と反応させる抗原固相化ELISA法などにより、HbA1cに対し高い反応性を示し、かつ、HbA0とは反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することなどにより得ることができる。

[0024] このようにして選別されたハイブリドーマを大量培養することにより、所望の特性を有するモノクローナル抗体を製造することができる。大量培養の方法は特に限定されないが、例えば、ハイブリドーマを適宜の培地中で培養してモノクローナル抗体を培地中に産生させる方法や、哺乳動物の腹腔内にハイブリドーマを注射して増殖させ、腹水中に抗体を産生させる方法などを挙げることができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法などを適宜組み合わせて行うことができる。

[0025] 次に、第2のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、第1のモノクローナル抗体である抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより行われる。また、非特異的反応を低減するためには、上記工程の後に、さらに、ヒトIgG

との反応性がマウス IgG よりも低い抗体を選択する工程を追加することが好ましい。

具体的には、まず、培養上清中のモノクローナル抗体から、抗原固相化 ELISA 法などにより、抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に対し高い反応性を示すハイブリドーマを選択する工程、及びヒト IgG との反応性がマウス IgG よりも低いものを選択する工程の 2 つの工程を経て得ることができる。

[0026] 本発明の抗体としては、抗体分子全体のほかに抗原抗体反応活性を有する抗体の機能性断片を使用することも可能であり、前記のように動物への免疫工程を経て得られたもののほか、遺伝子組み換え技術を使用して得られるものや、キメラ抗体を用いることも可能である。抗体の機能性断片としては、例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b$  が挙げられ、これらの機能性断片は前記のようにして得られる抗体をタンパク質分解酵素（例えば、ペプシンやパインなど）で処理することにより製造できる。

[0027] また、本発明の第 2 のモノクローナル抗体は、不溶性担体上に固定された固定（固相）化抗体として使用したり、後述する当業者に周知慣用の標識物質で標識した標識抗体として使用することができる。このような固定化抗体や標識抗体はいずれも本発明の範囲に包含される。例えば、不溶性担体にモノクローナル抗体を物理的に吸着させ、あるいは化学的に結合（適当なスペーサーを介してもよい）させることにより固定化抗体を製造することができる。不溶性担体としては、ポリスチレン樹脂などの高分子基材、ガラスなどの無機基材、セルロースやアガロースなどの多糖類基材などからなる不溶性担体を用いることができ、その形状は特に限定されず、板状（例えば、マイクロプレートやメンブレン）、ビーズあるいは微粒子状（例えば、ラテックス粒子）、筒状（例えば、試験管）など任意の形状を選択できる。

[0028] 本発明の第 2 のモノクローナル抗体を結合可能な標識物質で標識して標識抗体とすることにより、試料中の糖化ヘモグロビン（%）を測定することができる。また、本発明の第 2 のモノクローナル抗体と結合可能な標識抗体、

標識プロテインA又は、標識プロテインG等を使用することもできる。標識物質としては、例えば酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジン、又は放射性同位体、金コロイド粒子、着色ラテックスなどが挙げられる。標識物質と抗体との結合法としては、当業者に利用可能なグルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、又は過ヨウ素酸法などの方法を用いることができるが、固定化抗体や標識抗体の種類、及びそれらの製造方法は前記の例に限定されることはない。例えば、パーオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素を標識物質として用いる場合にはその酵素の特異的基質（酵素が西洋ワサビパーオキシダーゼの場合には、例えばオーフェニレンジアミンあるいは3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、ALPの場合には、p-ニトロフェニル・ホスフェートなど）を用いて酵素活性を測定することができ、ビオチンを標識物質として用いる場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的である。

[0029] 本明細書において、「不溶性担体」を「固相」、抗原や抗体を不溶性担体に物理的あるいは化学的に担持させることあるいは担持させた状態を「固定」、「固定化」、「固相化」、「感作」、「吸着」、「結合」と表現することがある。また、「検出」又は「測定」という用語は、糖化ヘモグロビンの存在の証明及び／又は定量などを含める意味で用いられる。

[0030] 本発明の抗体を用いる測定方法における検出対象の「試料」としては、糖化ヘモグロビンを含みうる試料であればいずれでもよく、主に生体（生物）由来の体液を挙げることができる。具体的には、血球または全血である。これらの試料はそのまま使用されることもあるが、検体希釈液で希釈されたり、その他の前処理を施されてから使用されることもある。

[0031] 本発明により提供される測定用試薬の態様としては、糖化ヘモグロビン（%）の測定ができる試薬であれば、特に限定されるものではない。以下、代表的な粒子凝集イムノアッセイ法であるラテックス免疫凝集法（以下、L T I A法という）を例にそれぞれを説明する。

[0032] <粒子凝集イムノアッセイ法：（L T I A法）>

試料中に存在する糖化ヘモグロビン（%）を検出するための測定用試薬はそれぞれ少なくとも以下の要素：

- (a) 第1のモノクローナル抗体
- (b) 第2のモノクローナル抗体
- (c) 不溶性担体粒子

が必要とされる。

[0033] 本測定用試薬はL T I A法に好適に使用できる。使用されるラテックス粒子は、感度向上などの所望の性能を得るため、粒径や種類を適宜選択することができる。ラテックス粒子としては、抗原であるH b A 1 cの吸着・結合に適したものであれば良い。例えば、ポリスチレン、スチレン-スルホン酸（塩）共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、アクリルニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体等が挙げられる。ラテックス粒子の形状は特に限定されないが、その平均粒子径は、ラテックス粒子表面のH b A 1 cと抗体との免疫反応及び抗体同士の凝集反応の結果生じる凝集体が、肉眼又は光学的に検出できるに十分な大きさを有することが好ましい。好ましい平均粒子径としては0.02～1.6  $\mu\text{m}$ であり、特に0.03～0.5  $\mu\text{m}$ が好ましい。また、金属コロイド、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子をラテックス粒子に代えて使用することもできる。これらの粒子は蛍光物質を含んでいてもよい。本発明の不溶性担体は未感作のものが好ましい。本発明のラテックス粒子を含む試薬は、適宜緩衝成分（緩衝液）を含む。

[0034] 本発明に用いることが出来る緩衝液としては、一般的に使用されるものであればよく、例えばトリス塩酸、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸、フタル酸、グルタル酸、マレイン酸、グリシン及びそれらの塩などや、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、

BES、MOPS、TES、HEPES等のグット緩衝液などが挙げられる。

[0035] 本発明の試薬は2試薬（2ステップ法）が望ましく3試薬（3ステップ法）とすることもできる。2試薬の場合は、不溶性担体を含む第1試薬と2種類のモノクローナル抗体を含む第2試薬に分けることが望ましい。また、（a）、（b）、（c）をそれぞれ別の試薬構成とする3試薬系（3ステップ法）に構成することもできる。

ラテックスの凝集の測定は、生じた凝集の程度を光学的あるいは電気化学的に観察することにより糖化ヘモグロビン（%）を測定できる。光学的に観察する方法としては、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度を光学機器で測定する方法（エンドポイント法、レート法等）が挙げられる。

試料を測定して得た吸光度等の測定値を、標準物質（糖化ヘモグロビン（%）が既知の試料）を測定して得た吸光度等の測定値と比較して、試料中に含まれていた測定対象物質の濃度（定量値）を算出する。なお、透過光又は散乱光などの吸光度等の測定は、1波長測定であっても、又は2波長測定（2つの波長による差又は比）であってもよい。測定波長は、400nmから800nmの中から選ばれるのが一般的である。

[0036] 本発明の試料中の測定対象物質の測定は、用手法により行ってもよいし、又は測定装置等の装置を用いて行ってもよい。測定装置は、汎用自動分析装置であっても、専用の測定装置（専用機）であってもよい。専用の測定装置として、微小流路（マイクロ流路）を利用して試料と試薬を混合し、反応させて検出を行うような以下のような検査用デバイス装置であってもよい。具体的には、水平な回転軸回りに回転操作される反応カセットを採用し、この反応カセットは、微小流路と、微小流路と連通し液体試料を微小流路に導入する注入孔とを具備しており、簡易に希釈液を導入できる手段を備えている。当該反応流路は、分析試薬を組み込んだ試薬域と、液体試料を分析試薬に接触させ、かつ液体試料が分析試薬とともに攪拌されることで、所定の反応を促すことが十分に行われるように、微小流路に沿って液体試料の重力によ

る流れを乱す手段とを具備している。このように構成された反応カセットが、回転および振動させられることにより、液体試料を微小流路を通じて流動させて分析試薬に接触させ、かつ液体試料が分析試薬とともに攪拌されることで、所定の反応を促し、液体試料中の検出可能な反応を測定するという仕組みの装置である。

[0037] また、本発明の測定は、2ステップ法（2試薬法）等の複数の操作ステップにより行う方法によって実施することが好ましい。

[0038] また、本発明によれば、血液検体が正常なヘモグロビンだけではなく、変異体であるHbSやHbCなどの異常なヘモグロビンを含む場合であっても、正確な糖化ヘモグロビン（%）の免疫測定が可能となった。したがって、本発明の測定方法は、異常ヘモグロビンを含む試料中の糖化ヘモグロビン（%）測定値の乖離低減方法でもあり、また、異常ヘモグロビンを含む試料中の糖化ヘモグロビン（%）測定値の高値化抑制方法でもある。

[0039] また、本発明において前記測定試薬を複数に分けて糖化ヘモグロビン（%）測定キットとすることもできる。または、他の構成とともに糖化ヘモグロビン（%）測定キットとすることもできる。また、当該他の構成としては、他に検出に必要な試薬、検体の希釈液、検体採取用の用具、または取り扱い説明書などが挙げられる。

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

[0040] [実施例] 本発明測定試薬の製造

### 1. 第1のモノクローナル抗体の取得

本発明の第一のモノクローナル抗体として、抗HbA1cモノクローナル抗体を以下のように製造した。

#### (1) 精製HbA0及び精製HbA1cの調製

HbA0及びHbA1cは、非特許文献（Melisenda J. McDonald et al, JBC, 253(7)、2327-2332、1978）記載のBio-Rex70（バイオラッド

社)を用いるイオン交換クロマトグラフィーにより、ヒト赤血球溶血液から精製し、以降の実験に用いた。

[0041] (2) 各種ペプチド、及び糖化ペプチドの調製

2種類のアミノ配列のペプチド(VHLTC(配列番号1)及びVHLTPEEKYYC(配列番号2):アルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す)は、ペプチド自動合成装置を用いFmoc法により合成、及び精製した。各ペプチドの純度は、HPLCにより95%以上であることを確認した。また、各ペプチドの分子量は、質量分析(MALDI-TOF法)により理論値と同じであることを確認した。

前記2種類のペプチドを特開昭61-172064記載の方法にて糖化し、糖化ペプチド(f-VHLTC及びf-VHLTPEEKYYC:fは、フルクトシル化を意味する)を精製した。すなわち、各配列のペプチドそれぞれとグルコースを無水ピリジン中で反応させて糖化ペプチドを合成し、HPLCで精製した。各糖化ペプチドの分子量は、質量分析(MALDI-TOF法)により理論値、すなわち各ペプチドの分子量に162を加算した分子量と同じであることを確認した。

[0042] (3) 第1のモノクローナル抗体の取得

第1のモノクローナル抗体である抗HbA1cモノクローナル抗体は、以下のように製造した。まず、前記(2)で合成した糖化ペプチド(f-VHLTPEEKYYC)をスカシ貝ヘモシアニンに結合させ、これを免疫原としてマウスに免疫した。ハイブリドーマのスクリーニングでは、抗原固相化ELISAで糖化ペプチド結合蛋白と反応し、かつ精製HbA0と反応しない株を6株選択した。クローニングを経て、最終的に抗原固相化ELISAで精製HbA1cと反応し、かつ精製HbA0と反応しないモノクローナル抗体(抗体68207、68208、68210、68211、68213、68214)を得た。

[0043] 2. 第2のモノクローナル抗体の取得

本発明の第2のモノクローナル抗体として、抗HbA1cモノクローナル

抗体に対するモノクローナル抗体を以下のように製造した。

(1) 免疫

前記1. で得られた3種の異なるマウス抗HbA1cモノクローナル抗体(68210、68211、68213:積水メディカル社製)を免疫原とし、ラットを宿主として、定法にて免疫した。最終免疫は細胞融合の3~4日前に行い、脾臓細胞及びリンパ節細胞を回収し、電気融合法またはPEG法でミエローマ細胞(SP2/O)と融合した。融合細胞は96穴プレートで培養し、細胞融合から7~8日後に培養上清を回収して下記に示すスクリーニングを行った。

[0044] (2) スクリーニング

ハイブリドーマのスクリーニングでは、抗原固相化ELISAで、マウスIgGと反応し、且つヒトIgGと反応しない株を選択した。

(2-1) 抗原固相化ELISA

(i) ELISA用96穴プレートに固相化抗原としてPBSで $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したマウス抗HbA1cモノクローナル抗体(68208、あるいは68214)またはヒトIgGを $50\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で2時間静置した。

(ii) 0.05%Tween20-PBS(PBST)( $400\mu\text{L}/\text{well}$ )で3回洗浄後、ブロッキング液として1%BSA-PBST( $100\mu\text{L}/\text{well}$ )を分注し、室温で1時間静置した。

(iii) ブロッキング液を除去後、2倍希釈した培養上清を $50\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。

(iv) 3回洗浄後、10000倍希釈したHRP標識ヤギ抗ラットポリクローナル抗体を $50\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。

(v) 3回洗浄後、OPD発色液を $50\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、室温で10分間静置した。

(vi) 停止液を $50\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、反応停止後プレートリーダーで吸光度を測定した(Abs. 492nm)。

## [0045] (2-2) 結果

計13株(S07201R~S072013R)のハイブリドーマを取得した(表1)。

## [0046] [表1]

表1

免疫原	クローン名	(Abs.) スクリーニング用抗原	
		mouseIgG	humanIgG
68210	S07201R	0.596	0.074
	S07202R	0.521	0.077
68211	S07203R	2.543	0.063
	S07204R	2.274	0.062
	S07205R	2.819	0.066
	S07206R	2.475	0.083
	S07207R	2.729	0.066
68213	S07208R	0.486	0.059
	S07209R	0.544	0.062
	S07210R	0.926	0.095
	S07211R	0.529	0.077
	S07212R	0.879	0.076
	S07213R	0.992	0.072

## [0047] (3) 獲得抗体の反応性の確認

スクリーニングで選択したハイブリドーマを限界希釈法で単クローン化し、定法によりマウス腹腔に投与して、腹水を得た。得られた腹水から抗体を精製し、抗原固相化ELISAにて反応性を確認した。

## (3-1) 抗原固相化ELISA

固相化抗原として68210、68213を用いた以外は、(2)スクリーニングと同様の方法で行った。

## [0048] (3-2) 結果

得られた13種の抗体は、いずれの固相化抗原に対してもヒトIgGよりマウスIgG(抗マウスIgGモノクローナル抗体)に対して強い反応性を示した。

## [0049]

[表2]

表 2

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

(Abs.)

## [0050] 3. 免疫学的測定方法

## (1) 実施例処方

(i) 第一試薬の組成を以下に示す。

10mM EPPS (pH8.0)

ラテックス粒子 (平均粒径約120nm)

(ii) 第二試薬の組成を以下に示す。

10mM Bis-Tris (pH6.0)

1次抗体 (0.1mg/mL マウス抗HbA1cモノクローナル抗体) (

表3)

2次抗体 (0.1mg/mL ラット抗マウスIgGモノクローナル抗体)

(表3)

500mM NaCl

0.05% Tween-20

## 0. 09%アジ化ナトリウム

[0051] [表3]

表 3

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

[0052] (2) 測定方法

測定には、日立7170形自動分析装置を使用した。検体6、3 $\mu$ Lと第一試薬150 $\mu$ Lを反応セルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させた後、さらに第二試薬50 $\mu$ Lを反応セルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させ、2ポイントエンド法（測光ポイント19-34）、主波長660nm、副波長800nmで吸光度変化量を測定した。検量線は、標準品として協和メデックス社製 デタミナーキャリブレーターHbA1c液状試薬用を、メーカー指定の方法で調整して作製した。

[0053] (3) 比較例

(i) 比較例1：HPLC法（アークレイ社製アダムスHA-8180T）メーカーにより指定された方法で使用して、各種検体の糖化ヘモグロビン（%）の測定をおこなった。

(ii) 比較例2：2次抗体としてポリクローナル抗体を用いたLTA法  
(1)（協和メデックス社製デタミナーL HbA1c）

協和メデックス社製のデータミナーL HbA1cをメーカーにより指定された方法で使用して、各種検体の糖化ヘモグロビン（%）の測定をおこなった。測定の際、装置は日立7170形自動分析装置を使用した。

[0054] (4) 参考例：2次抗体としてポリクローナル抗体を用いたL T I A法（2）（積水メディカル社製）

実施例2に示した第一試薬、および、1次抗体として68210を0.06 mg/mL、2次抗体としてヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（Fc特異的抗体：蛋白精製工業社製）0.05 mg/mLを添加した以外は実施例2と同一組成である第二試薬を用いて、各種検体の糖化ヘモグロビン（%）の測定をおこなった。測定の際、装置は日立7170形自動分析装置を使用した。

[0055] [試験例1] 血球検体の糖化ヘモグロビン（%）の測定

(1) 正常検体の糖化ヘモグロビン（%）の測定

既製品である比較例2（協和メデックス社製データミナーL HbA1c）に対して、参考例および実施例1～17において正常検体の糖化ヘモグロビン（%）を高精度に測定できていることを確認した。

EDTA採血管で採血された任意の正常血液検体（同意を得たボランティアより入手）を、800Gで5分間遠心分離し、得られた下層の血球層を精製水で100倍希釈したものの糖化ヘモグロビン（%）を測定した。50検体測定した際の、各試薬のデータミナーL HbA1cに対する相関式および相関係数を表4に示す。

いずれも相関係数は良好であり、参考例、実施例1～17において、正常検体について高精度に糖化ヘモグロビン（%）を測定できることが示された。

[0056]

[表4]

表 4

番号	相関係数 $r^2$
参考例	0.9963
実施例 1	0.9980
実施例 2	0.9949
実施例 3	0.9904
実施例 4	0.9904
実施例 5	0.9975
実施例 6	0.9930
実施例 7	0.9967
実施例 8	0.9959
実施例 9	0.9971
実施例 10	0.9958
実施例 11	0.9970
実施例 12	0.9972
実施例 13	0.9974
実施例 14	0.9975
実施例 15	0.9890
実施例 16	0.9959
実施例 17	0.9935

[0057] (2) 各異常Hb検体の糖化ヘモグロビン (%) の測定

市販の異常Hb検体 (ビジコムジャパンより購入) について糖化ヘモグロビン (%) を測定した。これらは血球検体であり、採血後、遠心分離により血球層を分離した後、 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存されたものである。

(2-1) HbS含有検体の糖化ヘモグロビン (%) の測定

比較例 1 に示したHPLC法であるアークレイ社製アダムスHA-8180Tは、バリエントモード (Variant mode) にて、血球および全血検体について、異常HbであるHbSとHbCを検出できる。使用したHbSを含有する血球検体のHbS (%) は、33.2%であった。

上記のHbSを含有する検体の糖化ヘモグロビン (%) をHPLC法で測定

したところ、6.2%であった。また、上記のHbSを含有する検体を実施例1～10、比較例2、参考例の試薬で測定した糖化ヘモグロビン(%)と、HPLC法で測定した際の糖化ヘモグロビン(%)との差(糖化ヘモグロビン(%))を表5に示す。

2次抗体としてポリクローナル抗体を使用している比較例2では、測定値は6.9%となり、HPLC法に対して0.7%も高値化した。また、2次抗体としてポリクローナル抗体を組み合わせた参考例においても、測定値は6.7%となり、HPLC法に対して0.5%の高値化が認められた。

一方、2次抗体として本発明のモノクローナル抗体を組み合わせた実施例1～10においては、測定値は5.9%～6.4%となり、HPLC法との差異は-0.2%～0.2%であった。変異HbであるHbSを含む血球検体において、2次抗体としてモノクローナル抗体を使用した場合に、測定精度が向上したと言える。

[0058] [表5]

表5

測定方法		比較例1 (HPLC法) との 差 糖化ヘモグロビン (%)
比較例1	HPLC法	0.0
比較例2	デタミナーL HbA1c	0.7
参考例	自社製試薬：ポリクローナル抗体	0.5
実施例1	自社製試薬：モノクローナル抗体	-0.1
実施例2	自社製試薬：モノクローナル抗体	-0.2
実施例3	自社製試薬：モノクローナル抗体	-0.1
実施例4	自社製試薬：モノクローナル抗体	-0.1
実施例5	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.2
実施例6	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.1
実施例7	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.1
実施例8	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.0
実施例9	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.0
実施例10	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.2

[0059] (2-2) HbC含有検体の糖化ヘモグロビン (%) の測定

使用したHbCを含有する血球検体のHbC (%) をHPLC法にて測定したところ、31.8%~40.9%であった。

上記のHbCを含有する検体の糖化ヘモグロビン (%) をHPLC法にて測定したところ、4.8~5.9%であった。また、上記のHbCを含有する検体を比較例2、参考例、実施例1の試薬で測定した糖化ヘモグロビン (%) と、HPLC法で測定した際の糖化ヘモグロビン (%) との差 (糖化ヘモグロビン (%)) を表6に示す。

上記の検体を、2次抗体としてポリクローナル抗体を使用している比較例2で測定したところ、HPLC法に対する差は0.9~3.1%と高く、比較例2の試薬ではHbCを含有する血球検体の糖化ヘモグロビン (%) を正確に測定することはできなかった。参考例においては、HPLC法に対する差は0.5~1.7%であり、比較例2より正確に糖化ヘモグロビン (%) を測定することができた。

さらに、2次抗体として本願発明のモノクローナル抗体を組み合わせた実施例1においては、HPLC法に対する差は-0.4~-0.2%であり、HbCを含有する血球検体においても糖化ヘモグロビン (%) を高い精度で測定することができた。

[0060]

[表6]

表 6

検体番号	HbC%	比較例1 (HPLC法)との差 糖化ヘモグロビン (%)		
		比較例2	参考例	実施例1
		デタミナーL HbA1c	自社製試薬 ポリクローナル抗体	自社製試薬 モノクローナル抗体
HbC-1	31.8	0.9	0.5	-0.4
HbC-2	35.7	1.7	0.7	-0.2
HbC-3	40.9	2.9	1.7	-0.2
HbC-4	35.2	1.9	1.0	-0.3
HbC-5	40.2	2.3	0.8	-0.4
HbC-6	35.2	2.0	1.1	-0.2
HbC-7	40.5	3.1	1.3	-0.2
HbC-8	35.6	2.2	1.0	-0.3

[0061] さらに、検体番号HbC-1について、実施例8~17の試薬で測定した結果を表7に示す。比較例1~2、参考例、実施例1の測定結果は、表6と同一である。HbC-1の糖化ヘモグロビン (%) は、比較例1のHPLC法で測定した場合、5.8%だった。この検体を、2次抗体としてポリクローナル抗体を使用している比較例2で測定したところ、HPLC法に対する測定値の差は0.9%と参考例や本発明の方法と比較して高く、比較例2の試薬ではHbCを含有する検体の糖化ヘモグロビン (%) を正確に測定することはできなかつた。参考例においては、HPLC法に対する測定値の差は0.5%であり、比較例2よりも正確に測定することができた。さらに、2次抗体として本願発明のモノクローナル抗体を組み合わせた実施例8~17においては、HPLC法に対する測定値の差は-0.1~0.3%であり、HbCを含有する検体においても糖化ヘモグロビン (%) を高い精度で測定することができた。

[0062]

[表7]

表 7

測定方法		比較例1 (HPLC法) との 差 糖化ヘモグロビン (%)
比較例 1	HPLC法	0
比較例 2	デタミナーL HbA1c	0.9
参考例	自社製試薬：ポリクローナル抗体	0.5
実施例 8	自社製試薬：モノクローナル抗体	-0.1
実施例 9	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.1
実施例 10	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.2
実施例 11	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.2
実施例 12	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.0
実施例 13	自社製試薬：モノクローナル抗体	-0.1
実施例 14	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.3
実施例 15	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.0
実施例 16	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.2
実施例 17	自社製試薬：モノクローナル抗体	0.1

## [0063] [試験例 2] 全血検体の糖化ヘモグロビン (%) の測定

## (1) 正常検体の糖化ヘモグロビン (%) の測定

既製品である比較例 2 (協和メデックス社製デタミナーL HbA1c) の血球検体の糖化ヘモグロビンの測定値に対して、比較例 3 および実施例 3、4、8、9、11-13、15 おいて全血の正常検体について高精度に糖化ヘモグロビン (%) を測定できていることを確認した。

試験例 1 (1) 正常検体の測定で使用した、EDTA採血管で採血された任意の正常血液検体の糖化ヘモグロビン (%) を測定した。各検体は、遠心分離することなく全血状態のまま使用し、精製水で 50 倍希釈して調製した。

50 検体測定した際の各試薬の全血検体の測定結果について、デタミナーL HbA1c で血球検体を測定した際の測定値に対する相関係数を表 8 に示す。

比較例 2 の試薬では、他の試薬を用いた場合と比較して相関係数が最も低く、全血検体について精度よく糖化ヘモグロビン (%) を測定できなかった。一方、参考例、実施例 3、4、8、9、11-13、15 においては、

いずれも相関係数は良好であり、全血の正常検体について高精度に糖化ヘモグロビン（％）を測定できていることが示された。

[0064] [表8]

表 8

番号	1次抗体	2次抗体	比較例2（血球検体測定時） に対する相関（相関係数 $r^2$ ）
比較例2	デタミナーL HbA1c		0.9683
参考例	68210	ポリクローナル抗体	0.9782
実施例3	68213	S07201R	0.9831
実施例4	68207	S07205R	0.9827
実施例8	68211	S07211R	0.9865
実施例9	68211	S07212R	0.9892
実施例11	68213	S07210R	0.9856
実施例12	68213	S07211R	0.9875
実施例13	68213	S07212R	0.9876
実施例15	68214	S07209R	0.9878

[0065] (2) 各異常Hb検体の糖化ヘモグロビン（％）の測定

市販の異常Hb検体（ビジコムジャパンより購入）を測定に使用した。これらは全血検体であり、採血後、 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存されたものである。

(2-1) HbS含有検体の糖化ヘモグロビン（％）の測定

使用したHbSを含有する全血検体のHbS（％）および糖化ヘモグロビン（％）をHPLC法にて測定したところ、それぞれ28.8～37.1％および4.6～6.5％であった。

比較例2、参考例、実施例3、4、11、13、15の試薬で測定した際の測定値およびHPLC法に対する測定値の差 糖化ヘモグロビン（％）を表9に示す。

比較例2の試薬で測定した場合の含量は、HPLC法対して0.5～1.4％高値化し、測定精度は不良であった。

次に、参考例の試薬で測定した場合の含量は、HPLC法に対して0.3～0.6%高値化したものの比較例2より良好であった。

これに対し、実施例3、4、11、13、15の試薬で測定した場合の測定値は、HPLC法との差が-0.1～0.3%と小さく、測定精度は良好であった。また、2次抗体として本発明のモノクローナル抗体を使用した場合、2次抗体としてポリクローナル抗体使用した場合（参考例）に比べて測定精度がさらに向上した。

[0066] [表9]

表9

検体番号	HbS含量 (%)	比較例1 (HPLC法) との差 糖化ヘモグロビン (%)						
		比較例2	参考例	実施例3	実施例4	実施例11	実施例13	実施例15
HbS-2	28.8	1.1	0.4	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.0
HbS-3	37.1	1.4	0.3	0.0	0.0	-0.1	-0.1	-0.2
HbS-4	33.5	0.5	0.5	-0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
HbS-5	34.8	0.9	0.6	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
HbS-6	32.7	0.6	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1

[0067] (2-2) HbC含有検体の糖化ヘモグロビン (%) の測定

使用したHbCを含有する全血検体のHbC (%) および糖化ヘモグロビン (%) をHPLC法にて測定したところ、それぞれ34.9%～39.4%および5.0～5.5%であった。

比較例2、参考例、実施例3、8、9、12、13の試薬で測定した場合の測定値のHPLC法に対する差（糖化ヘモグロビン (%)）を表10に示す。

まず、比較例2で測定した場合の測定値は、HPLC法に対して3.4～4.7%と大幅に高値化した。

次に、参考例では、HPLC法に対して0.9～1.1%高値化したものの比較例2より良好であった。

これに対し、実施例3、8、9、12、13の試薬は、HPLC法に対する差は0.1～0.4%と小さく、測定精度は良好であった。2次抗体として本発明のモノクローナル抗体を使用した場合に、測定精度が向上したと言

える。

[0068] [表10]

表10

検体番号	HbC含量 (%)	比較例1 (HPLC法) との差 糖化ヘモグロビン (%)						
		比較例2	参考例	実施例3	実施例8	実施例9	実施例12	実施例13
HbC-9	34.9	3.4	1.1	0.3	0.1	0.4	0.3	0.2
HbC-10	39.4	4.7	0.9	0.4	0.1	0.3	0.1	0.2

### 産業上の利用可能性

[0069] 本発明によれば、血液検体が正常なヘモグロビンを含む場合だけではなく、HbS、HbC等の異常なヘモグロビンを含む場合であっても、正確な糖化ヘモグロビン (%) の免疫測定が可能となった。

## 請求の範囲

- [請求項1] 試料中の糖化ヘモグロビン (%) を測定する方法であって、  
不溶性担体と試料とを接触させることにより試料中の糖化ヘモグロビンを不溶性担体に吸着させる工程と、  
不溶性担体に吸着した糖化ヘモグロビンと抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体とを接触させることにより抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体、糖化ヘモグロビン、及び不溶性担体の複合体を形成する工程と、  
当該複合体と抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体とを接触させることにより不溶性担体を凝集させる工程と、  
を含む前記糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。
- [請求項2] 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体が、ヒト IgG とは反応しない抗体である請求項 1 に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。
- [請求項3] 不溶性担体がラテックスである請求項 1 又は 2 に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。
- [請求項4] 試料が全血又は血球である請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定方法。
- [請求項5] 凝集度合いを光学的に検出する工程を含む請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の測定方法。
- [請求項6] 少なくとも以下の 2 種のモノクローナル抗体を含む糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬。  
1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体  
2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体
- [請求項7] さらに、不溶性担体を含む請求項 6 に記載の糖化ヘモグロビン (%) 測定試薬。

- [請求項8] 第1試薬と第2試薬を含む糖化ヘモグロビン（％）測定試薬であって、  
、  
第1試薬は、不溶性担体を含み、第2試薬は、少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体を含む請求項7に記載の糖化ヘモグロビン（％）測定試薬。  
1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体  
2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体
- [請求項9] 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体が、ヒトIgGとは反応しない抗体である請求項6～8のいずれかに記載の測定試薬。
- [請求項10] 不溶性担体がラテックスである請求項6～9のいずれかに記載の糖化ヘモグロビン（％）測定試薬。
- [請求項11] 請求項6～10のいずれかに記載の糖化ヘモグロビン（％）測定試薬を含む糖化ヘモグロビン（％）測定キット。
- [請求項12] ヒト糖化ヘモグロビンに結合しているモノクローナル抗体と反応し、かつ、ヒトIgGに反応しないモノクローナル抗体。
- [請求項13] 異常ヘモグロビンを含む試料中の糖化ヘモグロビン（％）測定値の乖離低減方法であって、少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体、不溶性担体及び試料とを接触させる工程を含む前記乖離低減方法。  
1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体  
2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体
- [請求項14] 異常ヘモグロビンを含む試料中の糖化ヘモグロビン（％）測定値の高値化抑制方法であって、少なくとも以下の2種のモノクローナル抗体、不溶性担体及び試料とを接触させる工程を含む前記高値化抑制方法。  
1) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体

2) 抗糖化ヘモグロビンモノクローナル抗体に反応するモノクローナル抗体

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/038076

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N 33/53(2006.01) i; G01N 33/536(2006.01) i  
 FI: G01N33/53 V; G01N33/536 F

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)

G01N33/53; G01N33/536

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016-031250 A (HORIBA, LTD.) 07.03.2016 (2016-03-07) entire text, in particular, see claims, paragraphs [0006], [0018]-[0023], etc.	1-14
X	JP 2013-076713 A (PANASONIC CORP.) 25.04.2013 (2013-04-25) entire text, in particular, see claims, paragraphs [0035]-[0050], [0080]-[0084], etc.	1-14
A	JP 10-010127 A (SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.) 16.01.1998 (1998-01-16) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14
A	JP 07-035752 A (SRL, INC.) 07.02.1995 (1995-02-07) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14
A	JP 2002-365290 A (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION) 18.12.2002 (2002-12-18) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search  
 29 January 2020 (29.01.2020)

Date of mailing of the international search report  
 10 February 2020 (10.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japan Patent Office  
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
 Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/038076

## 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 2002/095407 A1 (SRL, INC.) 28.11.2002 (2002-11-28) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14
A	WO 2002/018953 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) 07.03.2002 (2002-03-07) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14
A	JP 2013-511717 A (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 04.04.2013 (2013-04-04) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14
A	WO 2014/112318 A1 (FUJIREBIO INC.) 24.07.2014 (2014-07-24) entire text, in particular, see claims, etc.	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2019/038076

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2016-031250 A	07 Mar. 2016	(Family: none)	
JP 2013-076713 A	25 Apr. 2013	US 2010/0267048 A1 entire text, all drawings, in particular, claims, paragraphs [0177]-[0197], [0230]-[0234] US 9151765 B2 EP 2211175 A1	
JP 10-010127 A	16 Jan. 1998	(Family: none)	
JP 07-035752 A	07 Feb. 1995	(Family: none)	
JP 2002-365290 A	18 Dec. 2002	(Family: none)	
WO 2002/095407 A1	28 Nov. 2002	JP 3863493 B2 entire text, in particular, see claims, etc. US 2004/0058387 A1 entire text, in particular, see claims, etc. EP 1400808 A1	
WO 2002/018953 A1	07 Mar. 2002	JP 4733335 B2 entire text, in particular, see claims, etc. US 2003/0166302 A1 entire text, in particular, see claims, etc. EP 1314982 A1	
JP 2013-511717 A	04 Apr. 2013	JP 2016-28254 A entire text, in particular, see claims, etc. US 2011/0117670 A1 entire text, in particular, see claims, etc. US 2014/0073532 A1 US 2016/0068594 A1 US 2017/0176462 A1 US 2019/0018023 A1 WO 2011/062803 A2 EP 3043182 A1 EP 3301452 A1	
WO 2014/112318 A1	24 Jul. 2014	US 2015/0316541 A1 entire text, in particular, see claims, etc. EP 2947458 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/536(2006.01)i FI: G01N33/53 V; G01N33/536 F		
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）） G01N33/53; G01N33/536 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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
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	JP 2016-031250 A (株式会社堀場製作所) 07.03.2016 (2016-03-07) 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0006]、[0018] - [0023] 等参照	1-14
X	JP 2013-076713 A (パナソニック株式会社) 25.04.2013 (2013-04-25) 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0035] - [0050]、[0080] - [0084] 等参照	1-14
A	JP 10-010127 A (積水化学工業株式会社) 16.01.1998 (1998-01-16) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14
A	JP 07-035752 A (株式会社エスアールエル) 07.02.1995 (1995-02-07) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14
A	JP 2002-365290 A (国際試薬株式会社) 18.12.2002 (2002-12-18) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14
A	WO 2002/095407 A1 (株式会社エスアールエル) 28.11.2002 (2002-11-28) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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抵触するものではなく、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	29.01.2020	国際調査報告の発送日 10.02.2020
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  草川 貴史 2J 4075  電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
A	WO 2002/018953 A1 (協和メデックス株式会社) 07.03.2002 (2002 - 03 - 07) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14
A	JP 2013-511717 A (バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド) 04.04.2013 (2013 - 04 - 04) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14
A	WO 2014/112318 A1 (富士レビオ株式会社) 24.07.2014 (2014 - 07 - 24) 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照	1-14

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/038076

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-031250 A	07.03.2016	(ファミリーなし)	
JP 2013-076713 A	25.04.2013	US 2010/0267048 A1 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0177] - [0197], [0230] - [0234] US 9151765 B2 EP 2211175 A1	
JP 10-010127 A	16.01.1998	(ファミリーなし)	
JP 07-035752 A	07.02.1995	(ファミリーなし)	
JP 2002-365290 A	18.12.2002	(ファミリーなし)	
WO 2002/095407 A1	28.11.2002	JP 3863493 B2 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 US 2004/0058387 A1 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 EP 1400808 A1	
WO 2002/018953 A1	07.03.2002	JP 4733335 B2 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 US 2003/0166302 A1 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 EP 1314982 A1	
JP 2013-511717 A	04.04.2013	JP 2016-28254 A 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 US 2011/0117670 A1 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 US 2014/0073532 A1 US 2016/0068594 A1 US 2017/0176462 A1 US 2019/0018023 A1 WO 2011/062803 A2 EP 3043182 A1 EP 3301452 A1	
WO 2014/112318 A1	24.07.2014	US 2015/0316541 A1 全文、特に、[特許請求の範囲]等参照 EP 2947458 A1	