

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 A 1 c（以下、単に H b A 1 c と表すことがある）は、2本の α 鎖と2本の β 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 β 鎖N末端のアミノ酸残基の α -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 H b A 1 c 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、H b A 1 c 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。H b A 1 c 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 H b A 1 c を含む試料とを反応させ、次に、抗 H b A 1 c 抗体を反応させ、H b A 1 c が吸着したラテックスの抗 H b A 1 c 抗体を介した凝集を測定する H b A 1 c（％）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、H b A 1 c 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 H b A 1 c を、ラテックスなどの不溶性担体粒子に吸着させ、抗 H b A 1 c 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 H b A 1 c モノクローナル抗体のみで、第二抗体は抗 H b A 1 c 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Hb A1c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Hb A1c(%)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Hb A1cがラテックスに吸着し、ラテックスに吸着しているHb A1c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빈は前述のとおり、2本の α 鎖と2本の β 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、 β 鎖の一部が変異した異常ヘモグロ빈が存在することが知られている。具体的にはヘモグロ빈(Hb)の β 鎖のN末端から6番目のGluがValに変異したHb Sや、同じく6番目のGluがLysに変異したHb C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빈を保持するHb S症状、Hb C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빈症状の患者血液を従来のHb A1c測定方法で測定したところ、Hb A1c(%)の測定値(厳密には糖化Hb S、糖化Hb Cなどの糖化ヘモグロ빈(%)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빈を、糖化ヘモグロ빈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빈A、糖化ヒトヘモグロ빈S、糖化ヒトヘモグロ빈C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빈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、得られる糖化ペンタペプ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빈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빈A、ヘモグロ빈S及びヘモグロ빈Cを含有する試料の消化は、ヘモグロ빈A、ヘモグロ빈S及びヘモグロ빈C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 Ig G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 Ig G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、Hb SやHb C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０．１Ａｂｓ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（適当なスパ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、LTIA 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 μm であり、特に0.03～0.5 μm 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Hb SやHb C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Hb A1cモノクローナル抗体を以下のように製造した。

（１）精製Hb A O及び精製Hb A1cの調製

Hb A O及びHb A1cは、非特許文献（Melisenda J. McDonald et al、JBC、253(7)、2327-2332、1978）記載のBio-Rex 70（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 μ g/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 μ L/wellずつ分注し、室温で2時間静置した。

(ii) 0.05% Tween 20-PBS (PBST) (400 μ L/well) で3回洗浄後、ブロッキング液として1% BSA-PBST (100 μ L/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 μ L/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 μ L/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 μ L/wellずつ分注し、室温で10分間静置した。

(vi) 停止液を50 μ L/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. 492 nm)。

[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

固相化抗原 一次抗体	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 μ Lと第一試薬150 μ Lを反応セルに添加し、37℃で5分間反応させた後、さらに第二試薬50 μ Lを反応セルに添加し、37℃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660 nm、副波長800 nm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LTI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°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、バリエーションモード (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	H b C %	比較例 1 (H P L C 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 H b A 1 c	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
H b C - 1	3 1 . 8	0 . 9	0 . 5	- 0 . 4
H b C - 2	3 5 . 7	1 . 7	0 . 7	- 0 . 2
H b C - 3	4 0 . 9	2 . 9	1 . 7	- 0 . 2
H b C - 4	3 5 . 2	1 . 9	1 . 0	- 0 . 3
H b C - 5	4 0 . 2	2 . 3	0 . 8	- 0 . 4
H b C - 6	3 5 . 2	2 . 0	1 . 1	- 0 . 2
H b C - 7	4 0 . 5	3 . 1	1 . 3	- 0 . 2
H b C - 8	3 5 . 6	2 . 2	1 . 0	- 0 . 3

[0061] さらに、検体番号 H b C - 1 について、実施例 8 ~ 1 7 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。H b C - 1 の糖化ヘモグロビン (%) は、比較例 1 の H P L C 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、H P L C 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 H b C 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った。参考例においては、H P L C 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 ~ 1 7 においては、H P L C 法に対する測定値の差は - 0 . 1 ~ 0 . 3 % であり、H b C 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 H b A 1 c		0. 9 6 8 3
参考例	6 8 2 1 0	ポリクローナル抗体	0. 9 7 8 2
実施例 3	6 8 2 1 3	S 0 7 2 0 1 R	0. 9 8 3 1
実施例 4	6 8 2 0 7	S 0 7 2 0 5 R	0. 9 8 2 7
実施例 8	6 8 2 1 1	S 0 7 2 1 1 R	0. 9 8 6 5
実施例 9	6 8 2 1 1	S 0 7 2 1 2 R	0. 9 8 9 2
実施例 1 1	6 8 2 1 3	S 0 7 2 1 0 R	0. 9 8 5 6
実施例 1 2	6 8 2 1 3	S 0 7 2 1 1 R	0. 9 8 7 5
実施例 1 3	6 8 2 1 3	S 0 7 2 1 2 R	0. 9 8 7 6
実施例 1 5	6 8 2 1 4	S 0 7 2 0 9 R	0. 9 8 7 8

[0065] (2) 各異常 H b 検体の糖化ヘモグロビン（％）の測定

市販の異常 H b 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°C 以下で凍結保存されたものである。

(2-1) H b S 含有検体の糖化ヘモグロビン（％）の測定

使用した H b S を含有する全血検体の H b S（％）および糖化ヘモグロビン（％）を H P L C 法にて測定したところ、それぞれ 2 8. 8 ～ 3 7. 1 ％および 4. 6 ～ 6. 5 ％であった。

比較例 2、参考例、実施例 3、4、1 1、1 3、1 5 の試薬で測定した際の測定値および H P L C 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、H P L C 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 1 0

検体番号	H b C 含量 (%)	比較例 1 (H P L C 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 1 2	実施例 1 3
H b C - 9	3 4 . 9	3 . 4	1 . 1	0 . 3	0 . 1	0 . 4	0 . 3	0 . 2
H b C - 1 0	3 9 . 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、H b S、H b C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