

(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2015-143640

(P2015-143640A)

(43) 公開日 平成27年8月6日(2015.8.6)

(51) Int.Cl.

GO1N 33/53 (2006.01)

F1

GO1N 33/53

V

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2014-16801 (P2014-16801)  
 (22) 出願日 平成26年1月31日 (2014.1.31)

(71) 出願人 302042678  
 株式会社 J-オイルミルズ  
 東京都中央区明石町8番1号  
 (71) 出願人 899000057  
 学校法人日本大学  
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
 (74) 代理人 100106448  
 弁理士 中嶋 伸介  
 (72) 発明者 吉宗 一晃  
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号  
 学校法人日本大学内  
 (72) 発明者 小林 夕香  
 東京都中央区明石町8番1号 株式会社 J-オイルミルズ内

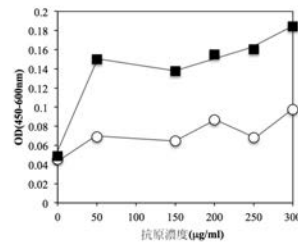
(54) 【発明の名称】 糖尿病の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 HbA1c の検出を簡便かつ精度高くなるために、レクチンを利用した検出方法、及びそれを利用した糖尿病の検出用診断薬又はキットを提供する。

【解決手段】 本発明の方法は、生体の血液から取得した検体に含まれる Hb1Ac に、ヒイロチャワンタケレクチン (AAL) 又は麴菌レクチン (AOL) を作用させることを特徴とする。本発明の糖尿病の検出用診断薬又はキットは、AAL 又は AOL を含む。

【選択図】 図 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生体の血液から取得した検体に含まれる H b 1 A c に、ヒヨロチャワンタケレクチン ( A A L ) 又は麩菌レクチン ( A O L ) を作用させることを特徴とする、糖尿病の検出方法。

**【請求項 2】**

前記検体は、ヒトから採取した赤血球であることを特徴とする、請求項 1 に記載の糖尿病の検出方法。

**【請求項 3】**

前記 A A L 又は前記 A O L は、標識されていることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の糖尿病の検出方法。

10

**【請求項 4】**

前記 A A L 又は前記 A O L 及び、1 種以上のレクチン又は抗体を用いて H b A 1 c を検出することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の糖尿病の検出方法。

**【請求項 5】**

前記 A A L 又は前記 A O L と抗 H b 抗体とを用いたアッセイにより H b A 1 c を検出することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の糖尿病の検出方法。

**【請求項 6】**

ヒヨロチャワンタケレクチン ( A A L ) 又は麩菌レクチン ( A O L ) を含む、糖尿病の検出用診断薬又はキット。

20

**【請求項 7】**

さらに、抗 H b 抗体を含む、請求項 6 に記載の糖尿病の検出用診断薬又はキット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、糖尿病の検出方法に関し、より詳細には、レクチンを使用して糖尿病を簡易かつ精度高く検出する方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

糖尿病は、血液中のグルコース濃度である血糖値が異常に高い状態を示す疾患である。年齢層別に見ると、40 歳以上で罹患率が高くなり、加齢に伴い増加傾向が高い疾患である。2011 年の統計によれば、日本の糖尿病人口は 1000 万人を超えており、糖尿病予備群を含めると 2000 万人を超える。先進国の中でも、日本は患者数が多い。しかし、糖尿病は、患者数の多い先進国だけでなく、患者数の増加率の高い新興国においても深刻な問題である。

30

**【0003】**

糖尿病は、発症に自己免疫機序の関与が考えられている 1 型糖尿病と、カロリーの過剰摂取や運動不足に基づく肥満状態の継続により、インスリン分泌低下と感受性低下を原因として発症する 2 型糖尿病とに大別される。患者の大部分は 2 型糖尿病である。

**【0004】**

2 型糖尿病では、血糖値が 1 型糖尿病ほど上昇することはないが、高血糖状態が長期にわたると、血中の高濃度グルコースが血管内皮タンパク質と糖化反応を生起し、微小血管を徐々に破壊する。その結果、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等の合併症を引き起こす。腎臓病では人工透析治療が必要になる等、糖尿病は患者の Q O L を損ない、医療コストを引き上げる端緒となる。

40

**【0005】**

生活習慣病の一種である糖尿病の発症やそれに基づく合併症を未然に防止するには、保険指導型の予防医療、すなわち、日常の健康診断や糖尿病検診での糖尿病マーカーに基づいた血糖コントロールが重要となる。

**【0006】**

50

現在行なわれている生化学検査には、血中や尿中のグルコース濃度を直接測定する方法、血中のグルコースがヘモグロビンに結合した糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビンともいう）の割合や血中のグルコースがアルブミンに結合した糖化アルブミン（グリコアルブミンともいう）の割合を測定する方法等がある。

【0007】

血中グルコース濃度の測定は、グルコース酸化酵素を含んだ診断用テープに血液を滴下して、グルコース酸化酵素とグルコースとの反応を自動分析器にかけて検出するものである。血糖値の基準値は、早朝空腹時血糖で70～109mg/dL、食後2時間血糖で140mg/dLである。早朝空腹時血糖値が126mg/dL、食後血糖値が200mg/mL以上であれば、糖尿病の疑いがある。しかし、一日の血糖値は健常人でも大きく変動し、食事の前と後では大きな差がある。血中グルコース測定法は、数時間～数日間にわたる平均血中グルコース濃度を反映しない。測定精度を高めるために、血中グルコース濃度を頻りに測定する必要があり、被験者に相当な負担となる。

10

【0008】

高血糖状態が長期間続くと、血管内の余分なグルコースは体内のヘモグロビンやアルブミンと結合する。アルブミンは血中タンパク質の主要成分である。グリコアルブミン検査は、アルブミンがどのくらいの割合でブドウ糖と結合しているかを調べる検査である。グリコアルブミンの数値は、過去約2週間の血糖コントロールを表す指標となる。

【0009】

ヘモグロビンは、赤血球の中に大量に存在し、身体の隅々まで酸素を運搬する役割を担うタンパク質である。血中でヘモグロビン（Hb）とグルコースが結合したものが糖化ヘモグロビンである。血糖値が高いほど、糖化ヘモグロビンが形成されやすく、糖尿病患者では糖化ヘモグロビンの割合が顕著に高い。

20

【0010】

後述するように、糖化ヘモグロビンの一種であるHbA1cは、糖化ヘモグロビン中の割合が高く、血糖の変化を最も反映しやすい。HbA1cは、半減期が約1ヶ月、寿命が約4ヶ月と長いため、HbA1cの測定値は、過去1～2カ月間の平均血糖値を反映する。また、HbA1c測定は、検査当日の食事制限がなく、被験者にとって負担が少ない。HbA1c測定法は、糖尿病患者の血糖コントロールの状態を知るのに極めて有効である。

30

【0011】

HbA1cの測定原理には、現在、HPLC（高速液体クロマトグラフ）法、免疫法（ラテックス法を含む）、酵素法等が知られている。

【0012】

HPLC法は、現在、最も汎用される方法である。溶血血液検体に含まれる各種ヘモグロビンの分離に、非多孔性陽イオン交換充填剤を充填した分離カラムを用いる。検体がカラム中を流れる際、種々のヘモグロビン成分は、それぞれが持つ電荷とカラム充填剤の官能基との相互作用によって分離され、正電荷の小さい順に溶出される。こうして分離されたHbA1cを測定する。HPLC法の利点は、高分解能であり、また、HbA1c以外にHbFも測定できることである。しかし、検査コスト高い、時間が要する等の欠点がある。

40

【0013】

免疫法は、HbA1c（抗原）の抗体を用いた測定法であり、HbA1cのみを選択的に測定することができる。ラテックス法は、溶血血液検体をラテックス粒子に吸着させ、HbA1cに特異的な抗体を添加し、ラテックス表面に吸着したHbA1cと特異的な凝集塊を形成させる方法である。ラテックスに吸着されるHbA1c量は、試料中に存在するヘモグロビンとHbA1cの比率に依存し、凝集塊は吸着したHbA1c量に依存するため、凝集塊を吸光度変化量として測定することで、血液検体中のHbA1c濃度を求めることができる。ラテックス法の利点は、自動分析装置を用いた大量処理が可能で検査コストが安い、HbA1cのみを測定可能であることである。しかし、HbA1cの測定精

50

度が低いという問題がある。

【0014】

酵素法は、溶血血液検体に含まれるHbA1cの鎖のN末端の糖化ジペプチドを特異的に分解するプロテアーゼを用いて、アミノ酸やペプチドに糖が結合した糖化アミノ酸や糖化ペプチドを生成させ、得られた糖化ペプチドにフルクトシルペプチドオキシダーゼ（非特許文献1）を作用させ、あるいは糖化アミノ酸にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させ、これらを発色系に導く方法である。酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ法は、自動分析装置を用いた大量処理が可能で検査コストが安い、HbA1cのみを測定可能であるという長所を有する。しかし、HbA1c分解操作が必要である、熱に弱い、糖化したe-Lysにも反応する点で特異性が低い、Kmが高い等の問題がある。

10

【0015】

上記の汎用法以外にも、糖尿病を検出する方法が提案されている。例えば特許文献1は、唾液中にDSL、ECL、PSA、WGA、UEA、MAL I、MAA、PNA、AAL、LTL、MAL II、JAC、LEL、SNA、PTL I、ACL、GSL I、VVA、BPL、WFL、SJA、MPL、GNL、HHL、CCA、NPL、STL、PHA-L、PHA-E、GSL I、DBA、HMA、EEA、LPA、及びPTL IIからなる群より選択されるレクチンを反応させ、レクチン反応体を分析することによって、う食、歯周病、肺疾患、呼吸疾患、心血管疾患、糖尿病、周産期障害、粘膜感染、口腔癌、咽頭癌、前癌性病変、関連する自己免疫疾患、HIV及び骨粗しょう症、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される疾患のリスクを予測、評価及び診断する方法を開示する。特許文献2では、血液、血清、骨髓液、尿、唾液等の体液、病理標本から抽出した組織可溶化物、生組織可溶化物、細胞可溶化物から選択される被検体由来サンプルに対して、ロータスレクチン、エンドウマメレクチン、レンズマメレクチン、ハリエニシダレクチン-I、コウジカビレクチン、ヒイロチャワンタケレクチン、キカラスウリレクチン-IIから成る群から選択されるレクチンとの相互作用測定を行って、前記レクチンと親和性を有する糖鎖の量を測定し、測定された糖鎖の量により糖尿病性腎症の進行度を検出することを特徴とする糖尿病性腎症の進行度の検出方法が提案されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】特表2007-526898

【特許文献2】特開2010-256132

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】五味恵子等、「新規フルクトシルペプチドオキシターゼの開発とそれを用いた糖尿病診断法の構築」、2013年度生物工学会発表

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明の目的は、従来技術の方法と同様に、HbA1cの検出をすることにより、糖尿病を簡便かつ精度高く検出する方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明者等は、上記課題を鋭意検討した結果、以下の発明により解決できることを見出した。すなわち、本発明は、生体の血液から取得した検体に含まれるHb1Acに、ヒイロチャワンタケレクチン(AAL)又は麹菌レクチン(AOL)を作用させることを特徴とする、糖尿病の検出方法である。特許文献1や2には、AALやAOLと糖尿病や糖尿病合併症の記載があるものの、本発明のようにAAL又はAOLのみが生体の血液から取得した検体に含まれるHbA1cと作用して糖尿病の検出を可能とすることは教示されない。

50

## 【0020】

前記検体は、ヒトから採取した赤血球であることが好ましい。

## 【0021】

前記AAL又は前記AOLは、標識されていることが好ましい。

## 【0022】

本発明の方法は、前記AAL又は前記AOL、及び、1種以上のレクチン又は抗体を用いてHbA1cを検出することが好ましい。

## 【0023】

本発明の方法は、前記AAL又は前記AOLと抗Hb抗体とを用いたアッセイにより、HbA1cを検出することが好ましい。

10

## 【0024】

本発明は、また、ヒロチャワンタケレクチン(AAL)又は麹菌レクチン(AOL)を含む、糖尿病の検出用診断薬又はキットを提供する。

## 【0025】

本発明の糖尿病の検出用診断薬又はキットは、さらに、抗Hb抗体を含むことが好ましい。

## 【発明の効果】

## 【0026】

糖尿病が疑われるヒト等から採血して得られる検体にAAL又はAOLを作用させることを必須に含む本発明は、HbよりもHbA1cを優先して検出することができる。HbA1cは血中グルコース濃度と相関することが公知であるため、本発明によれば、被験者の糖尿病の検出や血糖コントロールが可能となる。

20

## 【0027】

本発明の検出方法は、従来技術の検出方法と比較して、コストが安い、安定性がある、ラテックス法と同様に測定が簡便である等の利点を有する。

## 【0028】

AAL又はAOLを含む本発明の糖尿病検出用診断薬又はキットによれば、糖尿病やそれに基づく合併症の検出、これらの疾病の治療、予後の観察等に有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0029】

30

【図1】Hb( )又はHbA1c( )とAALとの反応性との反応性を示す図である。AALは、Hb( )よりもHbA1c( )に対して高い反応性を示す。

【図2】抗Hb抗体で捕獲した抗原(Hb( )又はHbA1c( ))とAALとの反応性との反応性を示す図である。AALは、Hb( )よりもHbA1c( )に対して高い反応性を示す。

【図3】抗HbA1c抗体で捕獲した抗原(Hb( )又はHbA1c( ))とAALとの反応性との反応性を示す図である。AALは、抗HbA1c抗体で捕獲したHbA1c( )には反応しない。これは、HbA1cのエピトープが抗HbA1c抗体によって保護されると、AALが結合できないことを示唆する。

【図4】抗Hb抗体で捕獲した抗原(Hb( )又はHbA1c( ))とAOLとの反応性との反応性を示す図である。AOLは、Hb( )よりもHbA1c( )に対して高い反応性を示す。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【0030】

以下、本発明の糖尿病の検出方法の実施の形態をより詳細に説明する。本発明の糖尿病の検出方法には、ヒトを含む動物の生体の血液から取得した検体を使用する。後述するように、AALがHbA1cを検出する限界濃度は約50 $\mu$ g/mLである。したがって、検体の由来は、ヘモグロビンを多量に含んだ血液である必要がある。本発明の検出方法は、健康診断や糖尿病検診で採取した血液に適用することが好ましくは、特に好ましくは赤血球である。血液から赤血球を分離・精製する方法は、常法に基づく。

50

## 【0031】

健常者の血中ヘモグロビンの組成は、  
約90%のHbA0：鎖2本と鎖2本からなる成人型Hb、  
約7%のHbA1：HbA0の鎖にグルコース、リン酸化糖等が結合したHb、  
約2%のヘモグロビンA2：鎖2本と鎖2本からなるHb、及び  
約0.5%のHbF：鎖2本と鎖2本からなる胎児型Hb、  
で構成される。

## 【0032】

このうち、HbA1は、鎖に結合した糖の種類によって、さらに以下の4種類：  
HbA1a1：2つのグルコース6リン酸が付加したHb、  
HbA1a2：1つのグルコース6リン酸が付加したHb、  
HbA1b：グルコース以外の糖が付加したHb、及び  
HbA1c：b鎖N末端にグルコースが付加したHb  
に分かれる。

10

## 【0033】

4種類のうち最も多いものが、HbA1cである。Hbが糖化してHbA1c糖化を生成する反応は非酵素的に起こるので、総ヘモグロビンに対するHbA1cの割合は、血中グルコース濃度（血糖値）に依存する。これらのことを総合して、糖尿病治療における血糖コントロールの指標として、HbA1cの測定値が使用されている。健常者のHbA1cの基準値は、総ヘモグロビンの4.3～5.8%と規定されている。測定値が基準値を

20

## 【0034】

本発明の糖尿病の検出方法は、前記検体に、ヒヨコチャワンタケレクチン（*Aleuria aurantia* Lectin、AAL）又は麹菌レクチン（*Aspergillus oryzae* Lectin、AOL）を作用させることを必須に含む。AALは、分子量約36kDaの二つのサブユニットからなる二量体タンパク質である。AOLは分子量約35kDaの二つのサブユニットからなる二量体タンパク質である。本発明者等は、意外にも、AALやAOLがHbよりもHbA1cに親和性を有することを発見した。AALやAOLは、N-アセチルグルコサミンに-1,6結合したフコースや、N-アセチラクトサミンに-1,3結合したフコースに親和性を有することが知られて

30

## 【0035】

上記AALには、ヒヨコチャワンタケから抽出精製した天然由来のAAL、又は遺伝子組み換えのAAL（rAAL、例えば、株式会社J-オイルミルズ製の組換え遺伝子型のヒヨコチャワンレクチン）も使用可能である。上記AOLには、遺伝子組み換えのAOL（例えば、月桂冠株式会社製、東京化成工業株式会社販売）が使用可能である。

## 【0036】

前記AAL又は前記AOLは、予め、標識手段が組み込まれていることが好ましい。このようなレクチンを以下、標識レクチンということがある。すなわち、標識レクチンは、AAL又はAOLと標識手段とを少なくとも含み、検出可能に標識化されている。

40

## 【0037】

前記標識手段としては、特に制限なく、公知の標識方法を適用でき、例えば、標識化合物の結合、放射性同位元素による標識化等を挙げることができる。

## 【0038】

前記標識化合物としては、この用途に通常用いられるものであれば特に制限なく適用することができる。例えば、直接又は間接標識化合物、酵素、蛍光化合物等を挙げることができる。具体的には、ビオチン、ジゴキシゲニン、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、フルオレセインイソチオシアネート、CyDye等を挙げることができる。これらの標識化合物は、常法によりレクチンと結合することができる。

## 【0039】

50

AALやAOLは、HbA1c以外に、フコースを有するタンパク質等にも高い親和性を有する。これらのタンパク質を検出から排除するために、血液中の赤血球を単離することが好ましい。単離は、遠心分離等の公知の方法で行うことができる。さらに、赤血球に低張液（例えば水）を加えバーストさせたものを使用してもよい。また、同様の理由で、本発明の検出方法は、HbA1cと親和性を有する1種以上のレクチン又は抗体を用いて、HbA1cを一次スクリーニングすることが好ましい。

【0040】

前記スクリーニングのためのレクチンの例は、HbA1cとの反応性を有するものであれば特に制限されない。例えば、後述する比較例によってヘモグロビン（HbやHbA1cを含む）との親和性が明らかになったUAE-1（ハリエニシダレクチン）、HHA（アマリスレクチン）、MPA（オサジオレンジレクチン）、LCA（レンチルマメレクチン）、Lotus（ロータスレクチン）、ECA（デイゴマメレクチン）、及びDBA（ドリコスマメレクチン）が挙げられる。これらのレクチンを用いたレクチンクロマトグラフィーによって、血漿、血清等の検体からヘモグロビン（HbやHbA1cを含む）を精製する。

10

【0041】

前記抗体の具体例としては、抗Hb抗体が挙げられる。抗HbA1c抗体は、実施例2に示すように、一次スクリーニングした抗原抗体反応物がAALと反応しなくなるので使用できない。

【0042】

本発明の検出方法は、HbA1cを含む赤血球タンパク質に直接、AALやAOLを作用させる。より好ましくは、AALやAOLと抗Hb抗体とを用いたサンドイッチアッセイによりHbA1cを検出することが特に好ましい。

20

【0043】

サンドイッチアッセイでは、まず、得られた血液検体を抗Hb抗体と反応させて、Hb及びHbA1cと抗Hb抗体との結合体を得る。これらの結合体を、アフィニティークロマトグラフィー、免役沈降等で単離精製する。次いで、結合体にAAL（又はAOL）と反応させ、AAL（又はAOL）-HbA1c-抗Hb抗体結合体を得る。

【0044】

なお、サンドイッチアッセイは、まず、HbA1cを含む検体とAAL（又はAOL）とを反応させて、AAL（又はAOL）-HbA1c結合体を得、次いで、このAAL（又はAOL）-HbA1c結合体に抗Hb抗体を反応させて、AAL（又はAOL）-HbA1c-抗Hb結合体を得てもよい。

30

【0045】

HbA1cを認識する抗Hb抗体は、常法に基づいて得ることができる。一例として、抗原としてのHbを動物に免疫することにより得る方法がある。抗Hb抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。

【0046】

AAL（又はAOL）とHbA1cとの結合の検出には、ELISA（サンドイッチELISA等）、レクチンクロマトグラフィー、レクチンプロット、レクチン染色、レクチンチップ、凝集法、Biacore（登録商標）システム等の表面プラズモン共鳴法、等が挙げられる。特に、アビジン-ビオチン又はストレプトアビジン-ビオチン系を用いる検出が、感度が高い点で好ましい。

40

【0047】

ELISA法（直接吸着法）では、プレートに血液等の検体を添加し、固定化する。次いで、ビオチン標識したレクチンを添加して、反応させる。2次標識化合物としてHRP（ホースラディッシュパーオキシダーゼ）標識ストレプトアビジン溶液を添加して、アビジンとストレプトアビジンとを反応させる。次いで、HRP用発色基質を加えて発色させ、発色強度を吸光光度計（HRPの場合、波長450nm-600nm）で測定する。予め、既知の濃度のHbA1cを含む標準試料によって検量線を作成しておけば、HbA1

50

cの定量化も可能である。

【0048】

サンドイッチELISA法では、プレートに抗Hb抗体を添加し固定化してから、血清等の検体を添加する。次いで、ビオチン標識したレクチンを添加して、赤血球に含まれるHbA1cとレクチンとを反応させる。2次標識化合物としてHRP（ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ）標識ストレプトアビジン溶液を添加して、アビジンとストレプトアビジンとを反応させる。次いで、HRP用発色基質を加えて発色させ、発色強度を吸光度計（HRPの場合、波長450nm - 600nm）で測定する。予め、既知の濃度のHbA1cを含む標準試料によって検量線を作成しておけば、HbA1cの定量化も可能である。

10

【0049】

健常者は、総ヘモグロビン中に5%程度のHbA1cを含む。本発明の検出方法を用いて、予め、健常者のHbA1cの基準レベルを測定しておくことよい。健常者の数値を閾値として、糖尿病が疑われる患者から取得したHbA1c測定値が前記閾値よりも高ければ、糖尿病の疑いが濃厚である。

【0050】

レクチンクロマトグラフィーは、担体に固定化されたレクチンが糖鎖と特異的に結合する性質を利用したアフィニティクロマトグラフィーである。HPLCと組み合わせることでハイスループットを期待することができる。

【0051】

レクチンの固定化担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース、スターチ、ポリアクリルアミド等のゲル材が一般的である。これらには、市販のものを特に制限なく使用でき、例えばセファロース4Bやセファロース6B（共にGEヘルスケアバイオサイエンス社製）が挙げられる。レクチンクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、マイクロプレートやナノウエルにレクチンを固定化したものも含まれる。

20

【0052】

固定化するAALやAOLの濃度は、通常、0.001~100mg/mL、好ましくは0.01~20mg/mLである。担体がアガロースゲルの場合、それをCNBr等で活性化してからレクチンとカップリングさせる。活性化スペーサーを導入したゲルにレクチンを固定化してもよい。さらには、ホルミル基を導入したゲルにレクチンを固定化してからNaCNBH<sub>3</sub>で還元してもよい。また、NHS-セファロース（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）のような市販の活性化ゲルを使用してもよい。

30

【0053】

被検体をカラムにかけた後、洗浄の目的で緩衝液を流す。緩衝液の一例は、モル濃度が5~500mM、好ましくは10~500mMであり、pHが4.0~10.0、好ましくは6.0~9.0であり、NaCl含量が0~0.5M、好ましくは0.1~0.2Mであり、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、又は、MnCl<sub>2</sub>含量が0~10mM、好ましくは0~5mMの緩衝液である。

【0054】

アフィニティカラムの洗浄後、HbA1cの溶出は、糖鎖を有効に溶出できる中性の非変性緩衝液中で、塩化ナトリウム、ハプテン糖等の脱着剤を用いて行われる。この緩衝液は、上記と同様であってもよい。脱着剤の濃度は、好ましくは、1~500mM、特に好ましくは10~200mM濃度である。

40

【0055】

本発明は、またAALやAOLを含む、糖尿病の検出用診断薬又はキット（以下、本発明の診断薬という）を提供する。AALやAOLは、標識されていることが好ましい。

【0056】

上記診断薬又はキットには、適宜、標識（酵素とその発色基質、放射性同位元素、発光物質、蛍光物質、着色物質）、緩衝液、プレート、反応停止液等の診断薬キットに公知のものを含む。特に、生体の血液から取得した検体からHbA1cを抽出するための試薬（

50



例えば抗Hb抗体やHbA1cと親和性を有するレクチン)を含むことが好ましい。

【0057】

本発明の診断薬の用途として、糖尿病、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等の細小血管障害、脳血管障害、虚血性心疾患、糖尿病性壊疽等の大血管障害、高脂血症、冠動脈、能動脈や手足での動脈硬化症、慢性感染症、胆石症、白内障や血管新生緑内障による失明等の慢性合併症の検出、これらの疾病の治療、予後の観察が挙げられる。

【実施例】

【0058】

以下、本発明の実施例及び比較例を示して、本発明をより詳細に説明する。

〔実施1及び2、比較例1～31〕AALとHbA1cとの結合試験

10

1. 被検液の調製

精製したヒト由来HbA1c(BBI Solutions社より入手、以下、HbA1cという)、又はヒト由来Hb(SIGMA社より入手、以下、Hbという)を、ダルベッコPBS(和光純薬社製)でタンパク質濃度300 $\mu$ g/mlになるように溶解した(Hb液、又は、HbA1c液)。一方、ヒト赤血球(Lee BioSolutions, Inc.より入手、以下、RBCという)に等量の蒸留水を添加後、振盪混和して溶血させた。この試料を50mM酢酸緩衝液(pH5.0)中で37 $^{\circ}$ C、30分間、放置して変性させた。変性液のタンパク濃度をBCAタンパク質測定キット(Pierce社製)で測定し、タンパク質濃度300 $\mu$ g/mlになるようダルベッコPBSで希釈した(RBC液)。Hb液、HbA1c液、又はRBC液25 $\mu$ Lを、EIAプレート(グライナー社、ハーフエリア、平底、高結合、96穴)に入れ、4 $^{\circ}$ Cで17時間、静置した。

20

【0059】

ダルベッコPBS(和光純薬社製)にTween20を0.05v/v%加えたPBS-Tを150 $\mu$ L加えて洗浄した。ダルベッコPBSで溶解した1w/v%牛血清アルブミン(BSA溶液)を60 $\mu$ Lずつ入れ、37 $^{\circ}$ Cで60分間、静置した。PBS-Tを150 $\mu$ L加えて捨てる洗浄操作を3回繰り返した。

【0060】

2. ELISAを用いたレクチン反応の検出

表1に示す31種類のビオチン標識レクチンを1~20 $\mu$ g/mLとなるように1%BSA含有PBSで希釈したレクチン溶液を調製した。各レクチン溶液25 $\mu$ L加え、4 $^{\circ}$ Cで30分間静置した。PBS-Tを150 $\mu$ L加える洗浄操作を3回繰り返した。西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジンを1 $\mu$ g/mLに1%BSA含有PBSで調製した検出用試薬を25 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間、静置した。PBS-Tを150 $\mu$ L加えて捨てる洗浄操作を3回繰り返した。発色試薬としてTMB Peroxidase substrate system(KPL社製)を使用し、そのマニュアルに記載に従って、450nmと600nmの吸光度を測定し、その差OD(450-600nm)を計算し、標識抗体の結合量とした。

30

【0061】

HbA1c、Hb又はRBC(濃度300 $\mu$ g/mL)に対する各レクチンの反応性を、表1に示す。

40

【表 1】

	レクチン			OD(450-600nm)		
	略号	由来	入手先	HbA1c	Hb	RBC
実施例1	AAL	ヒロチャワンタケ	1*	0.24	0.09	0.61
実施例2	rAAL	ヒロチャワンタケレクチン 遺伝子組み換え体	1	0.34	0.06	—
実施例3	AOL	麹菌レクチン遺伝子組み換え体	2*	0.37	0.12	—
比較例1	UEA-1	ハリエニシダ	1	1.06	1.75	1.8
比較例2	HHA	アマリリス	1	1.05	1.46	1.43
比較例3	MPA	オサジオレンジ	1	1.00	1.72	1.76
比較例4	LCA	レンズマメ	1	0.79	0.85	1.73
比較例5	Lotus	ロータス	1	0.66	1.27	1.81
比較例6	ECA	デイゴマメ	1	0.61	1.58	1.82
比較例7	DBA	ドリコスマメ	1	0.41	0.68	1.79
比較例8	GEA	スノードロップ	1	0.14	0.44	0.59
比較例9	CGA	ナタマメ	1	0.12	0.44	2.05
比較例10	WGA	小麦胚芽	1	0.10	0.09	0.32
比較例11	PHA-L4	インゲンマメ	1	0.09	0.07	0.34
比較例12	TxLc-1	チューリップ	1	0.09	0.19	0.46
比較例13	SBA	大豆	1	0.08	0.07	0.1
比較例14	ConA	タチナタマメ	1	0.07	0.14	1.63
比較例15	RCA120	ヒマ	1	0.06	0.11	0.75
比較例16	ACA	ヒモゲイトウ	1	0.05	0.07	0.25
比較例17	ACG	ヤナギマツタケ	1	0.05	0.04	0.1
比較例18	BanLec	バナナ	1	0.05	0.05	0.09
比較例19	DSA	チョウセンアサガオ	1	0.05	0.08	0.49
比較例20	PHA-E4	インゲンマメ	1	0.05	0.09	0.79
比較例21	PNA	ピーナッツ	1	0.05	0.06	0.09
比較例22	VVA-G	ヘアリーベッチ	1	0.05	0.13	0.19
比較例23	ABA	マッシュルーム	1	0.04	0.04	0.1
比較例24	BPA	ムラサキモクワソウ	1	0.04	0.09	0.12
比較例25	HRL	サクラシメジ	1	0.04	0.04	0.27
比較例26	MAM	イヌエンジュ	1	0.04	0.12	0.24
比較例27	PTA-1	シカクマメ	1	0.04	0.06	0.11
比較例28	SSA	日本ニワトコ	1	0.04	0.15	0.59

1：株式会社 J - オイルミルズ

2：東京化成工業株式会社

【0062】

表 1 から、H b A 1 c に一定の親和性を有するレクチンは、実施例 1 ~ 3 の A A L、r

10

20

30

40

50

AAL及びAOL、並びに比較例1～7のUHA-1、HHA、MPA、LCA、Lotus、ECA及びDBAである。比較例のレクチンは、HbA1cよりもHbに高い親和性を有するため、糖尿病のマーカであるHbA1cを優先的に検出できない。一方、本願発明に使用するAAL等は、HbよりもHbA1cに高い親和性を有するため、HbA1cの優先的な検出が可能である。したがって、本発明の方法は、糖尿病マーカであるHbA1cの検出と、それに基づく糖尿病の検出が期待できる。

【0063】

AALやAOLは、HbよりもHbA1cに対して高い親和性を示すことから、AALは、HbになくHbA1cのみが有する糖鎖、すなわち、鎖のN末端アミノ基に結合したグルコースを認識している可能性が高い。AALやAOLは、従来、フコースとの親和性が高いレクチンであることが知られている。しかし、AALやAOLがフコースと関連しないHbA1cと高い親和性を有することは、従来知見から予測できない。また、阻害糖として、フコースを添加した場合、HbA1cとの結合が見られなくなることより、レクチンの糖結合部位との結合であることも明らかとなった。

10

【0064】

Hb液及びHbA1c液のタンパク質濃度を変更した以外は実施例1と同様の手順で行った結果を、図1に示す。図1は、AALとHbA1cとの反応性を示している。AALがHbA1cを検出するのに必要なHbA1c濃度(HbA1c検出限界濃度/陰性対照の標準偏差の3.3倍で算出)を測定したところ、50 $\mu$ g/mLであった。血液中のHb濃度が100mg/mLと高く、糖尿病患者やその予備群はその約5%を超える量がHbA1cに変性しているため、この検出限界濃度でも十分に血液検査が可能である。

20

【0065】

3. サンドイッチELISAを用いたレクチン反応の検出

レクチンの発見が動物血球を凝集させることに始まったように、Hb以外の血球成分と反応するレクチンも多い。AALレクチンが赤血球に含まれるHbA1c以外の成分と結合している可能性を調べる必要がある。それは、固定化抗Hb抗体に捕獲させたHb又はHbA1cとレクチンとの反応性を調べることで、夾雑タンパク質との反応を除くことができる。

【0066】

まず、抗Hbシーブポリクローナル抗体(Bethyl社より入手)又は抗HbA1cラビットポリクローナル抗体(Good Biotech社より入手)を、10 $\mu$ g/mLになるように0.1M炭酸緩衝液(pH9.5)で調製した。この溶液50 $\mu$ LをEIAプレートに入れ4で17時間、静置した。150 $\mu$ LのPBS-Tで洗浄し、BSA溶液を60 $\mu$ L入れ、37で60分間、静置した。PBS-Tを150 $\mu$ L加えて捨てる洗浄操作を3回繰り返した。

30

【0067】

Hb溶液(0~200 $\mu$ g/mL)は、ヒト由来Hb(SIGMA社より入手)を0~200 $\mu$ g/mLになるように、ダルベッコPBSで調製した。また、HbA1c溶液(0~200 $\mu$ g/mL)は、ヒト由来HbA1c(BBI Solutions社より入手)を0~200 $\mu$ g/mLになるようにダルベッコPBSで調製した。

40

【0068】

プレートにHb溶液、又は、HbA1c溶液を25 $\mu$ L添加し、37で60分間、予め固定化した抗体と反応させた。PBS-Tを150 $\mu$ L加える洗浄操作を3回繰り返した。ビオチン標識AAL(5 $\mu$ g/mLとなるように1%BSA含有PBSで調製)を25 $\mu$ L加え、4で30分間、静置した。PBS-Tを150 $\mu$ L加える洗浄操作を3回繰り返した。HRP標識ストレプトアビジンを1 $\mu$ g/mLに1%BSA含有PBSで調製した検出用試薬を25 $\mu$ L加え、37で30分間、静置した。PBS-Tを150 $\mu$ L加えて捨てる洗浄操作を3回繰り返した。

【0069】

発色試薬には上記TMB Peroxidase substrate system

50

を使用し、マニュアルに記載の通り、450nmと600nmの吸光度を測定しその差を標識抗体の結合量として計算した。結果を、図2及び図3に示す。

【0070】

図2は、抗Hb抗体で捕獲した抗原とAALとの反応性を示す。図2から、AALは、Hb( )よりもHbA1c( )に対して高い反応性を示すことがわかる。これは、表1の結果と一致する。

【0071】

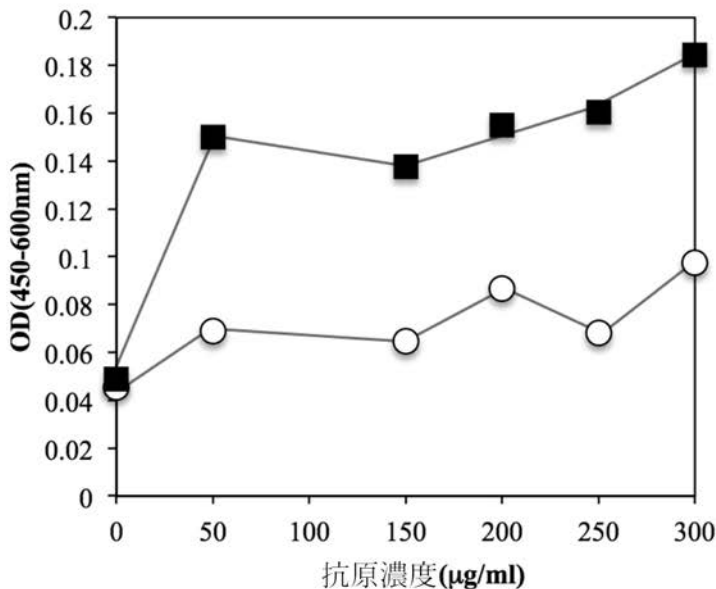
図3は、抗HbA1c抗体で捕獲した抗原とAALとの反応性を示す。図3に示すように、AALは、抗HbA1c抗体で捕獲したHbA1c( )には反応しない。これは、HbA1cのエピトープが抗HbA1c抗体によって保護されると、AALが結合できないことを示唆する。

10

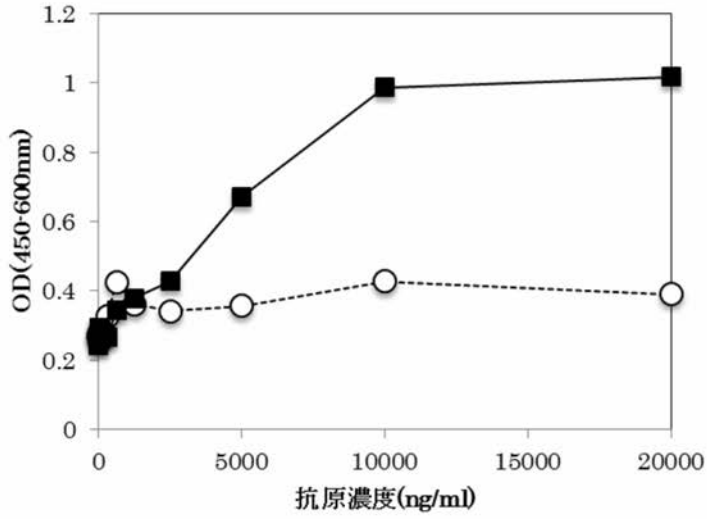
【0072】

ビオチン標識AALに代えてビオチン標識AOLを用いた以外はAALと同様の実験(抗Hbシーブポリクローナル抗体を使用)を行った。図4は、抗Hb抗体で捕獲した抗原とAOLとの反応性を示す。図4に示すように、AOLは、Hb( )よりもHbA1c( )に対して高い反応性を示す。これは、表1の結果と一致する。

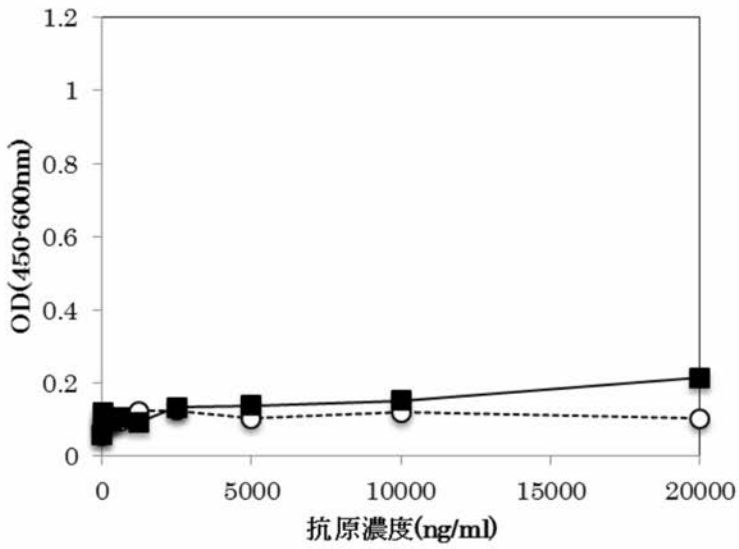
【図1】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

