



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201802472 A

(43) 公開日：中華民國 107 (2018) 年 01 月 16 日

(21) 申請案號：106117708

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 05 月 26 日

(51) Int. Cl. : G01N33/547 (2006.01)

G01N33/72 (2006.01)

(30) 優先權：2016/05/30 日本

特願 2016-107343

(71) 申請人：榮研化學股份有限公司 (日本) EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)
日本(72) 發明人：安居良太 YASUI, RYOTA (JP)；油井惠 YUI, MEGUMI (JP)；牧之段滿
MAKINODAN, MITSURU (JP)；関泰宏 SEKI, YASUHIRO (JP)；坂西千紗
SAKANISHI, CHISA (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：1 共 29 頁

(54) 名稱

抗人類血紅素單株抗體或抗體套組、抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子、及使用其等之測定試劑或測定方法

(57) 摘要

本發明之目的在於提供一種用以特異性且簡便地檢測、測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組，及其單株抗體固定化不可溶性載體粒子，以及用以使用其等特異性地檢測、測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體之測定試劑及測定方法。本發明之抗人類血紅素單株抗體係藉由固定化於不可溶性載體粒子，而不與未形成複合體之游離血紅素及游離結合球蛋白發生反應，且與血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生反應。



201802472

申請日: 106/05/26

【發明摘要】IPC分類: G01N 33/547 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)**【中文發明名稱】**

抗人類血紅素單株抗體或抗體套組、抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子、及使用其等之測定試劑或測定方法

【中文】

本發明之目的在於提供一種用以特異性且簡便地檢測、測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組，及其單株抗體固定化不可溶性載體粒子，以及用以使用其等特異性地檢測、測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體之測定試劑及測定方法。本發明之抗人類血紅素單株抗體係藉由固定化於不可溶性載體粒子，而不與未形成複合體之游離血紅素及游離結合球蛋白發生反應，且與血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生反應。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗人類血紅素單株抗體或抗體套組、抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子、及使用其等之測定試劑或測定方法

【技術領域】

本發明係關於一種於固定化於不可溶性載體粒子之情形時，與包含血紅素-結合球蛋白複合體之受驗試樣中之血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生凝集反應之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組，抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子，及用以使用其等特異性地檢測、測定受驗試樣中之血紅素-結合球蛋白複合體之測定試劑或測定方法。

【先前技術】

作為伴有出血之消化器官之疾病，已知炎症、腫瘤、癌等。而且，作為該等疾病之篩查，進行查驗糞便中血紅素之存在之糞便潛血檢查。而且，該檢查主要係藉由免疫測定法進行(日本專利特開昭61-137064號公報)。

然而，糞便中所含之血紅素因作為受驗試樣之糞便中所含之以細菌為首之各種因素而被分解，又，於消化道內移動時亦被分解，而變得無法進行檢測、測定。因此，糞便中之血紅素之檢測、測定係對於降結腸或直腸之出血之檢查有效，但難以檢查上部消化道之出血。

因此，業界提出了對不因糞便中所含之以細菌為首之各種因素而被分解之血紅素-結合球蛋白複合體進行測定，並加以實施。然而，其測定原理為將與血紅素特異性地結合之抗體和與結合球蛋白特異性地結合之抗體組合的三明治免疫測定法(日本專利特開平2-193071號公報)。

以ELISA(Enzyme-linked immune sorbent assay，酶聯免疫吸附測定)為代表之三明治免疫測定法於測定之過程中包括將受驗試樣所含之被測定物以外之蛋白質成分等去除之洗淨步驟，故而測定所需之時間變長。因此，不適用於必須於短時間內檢測、測定大量之受驗試樣之檢測、測定。

又，血紅素及結合球蛋白之基本結構係形成四聚物，若將利用常規方法所獲得之與血紅素特異性地結合之抗體和與結合球蛋白特異性地結合之抗體組合，並應用於利用可於短時間內檢測、測定大量之受驗試樣之凝集法的免疫測定法，則不僅血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，未形成複合體之游離血紅素或游離結合球蛋白亦發生凝集反應，故而難以進行精確測定。

因此，期望製作可應用於利用凝集法之免疫測定法，不檢測、測定未形成複合體之游離血紅素或游離結合球蛋白，而可僅檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體之抗體；及確立利用使用該抗體之凝集法的免疫測定法而特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體之免疫測定法。

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

為了儘早發現嚴重化之炎症、腫瘤、癌等，進行伴有出血之消化器官疾病之篩查成為重要課題。因此，謀求可於短時間內對大量檢體檢測、測定於消化道內不被分解之血紅素-結合球蛋白複合體之試劑。

因此，本發明之目的在於提供一種抗體，該抗體可用於利用凝集法之免疫測定法，不檢測、測定未形成複合體之游離血紅素及游離結合球蛋白，而可特異性地於短時間內對多檢體檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人為了解決上述問題進行努力研究，結果發現如下抗體，從而完成了本發明：藉由使上述抗體與不可溶性載體粒子結合，而不與未形成複合體之游離血紅素及游離結合球蛋白反應，且與血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生反應。

即，本發明包括以下構成。

(1)一種抗人類血紅素單株抗體，其係抗人類血紅素單株抗體，且藉由將單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

(2)如(1)之抗人類血紅素單株抗體，其係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)。

(3)一種抗體套組，其包含兩種以上之抗人類血紅素單株抗體，且藉由將兩種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

(4)如(3)之抗體套組，其中兩種以上之抗人類血紅素單株抗體係選自由5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)、

及SU112所組成之群中之至少兩種以上。

(5)如(1)至(4)中任一項之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組，其中抗人類血紅素單株抗體係源自小鼠。

(6)一種抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其係藉由將一種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，且單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

(7)如(6)之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中一種以上之抗人類血紅素單株抗體係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)之一種。

(8)如(7)之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中一種以上之抗人類血紅素單株抗體係選自由5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)、及SU112所組成之群中之至少兩種以上。

(9)如(6)至(8)中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中抗人類血紅素單株抗體係源自小鼠。

(10)如(6)至(9)中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中將單株抗體固定化之不可溶性載體粒子係乳膠粒子或金屬膠體粒子。

(11)一種用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體之免疫學測定試劑，其包含如(6)至(10)中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子。

(12)一種抗人類血紅素單株抗體，其係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、或79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)。

(13)一種用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體之免疫學測定方法，其使用如(1)至(5)中任一項之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組、如(6)至(10)中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子、如(11)之免疫學測定試劑、或如(12)之抗人類血紅素單株抗體。

(14)一種免疫學測定方法，其係使用藉由將一種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體者，且單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

(15)如(14)之免疫學測定方法，其中一種以上之抗人類血紅素單株抗體係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)之一種。

(16)如(14)之免疫學測定方法，其中一種以上之抗人類血紅素單株抗體係選自由5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-

02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)、及SU112所組成之群中之至少兩種以上。

(17)如(14)至(16)中任一項之免疫學測定方法，其中抗人類血紅素單株抗體係源自小鼠。

(18)如(14)至(17)中任一項之免疫學測定方法，其中將抗人類血紅素單株抗體固定化之不可溶性載體粒子係乳膠粒子或金屬膠體粒子。

[發明之效果]

本發明藉由使用將上述抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而製作之免疫學測定試劑，可不受到受驗試樣中所含之未形成複合體之游離血紅素及/或游離結合球蛋白之影響，而特異性地測定血紅素-結合球蛋白複合體。

而且，藉此可將與血紅素相比而於檢體中之穩定性較優異之血紅素-結合球蛋白複合體作為受驗物質，簡便且於短時間內進行伴有出血之消化器官疾病之篩查。

【圖式簡單說明】

圖1係利用ELISA法與乳膠凝集法對檢體進行測定時之相關圖。

【實施方式】

本發明之一實施形態之抗人類血紅素單株抗體係藉由將單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應的抗

人類血紅素單株抗體。

本發明之另一實施形態之抗人類血紅素單株抗體係一種抗體套組，具體而言係包含兩種以上之抗人類血紅素單株抗體之抗體套組，且藉由將兩種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

本發明之血紅素-結合球蛋白複合體係藉由血紅素與結合球蛋白所形成之較游離血紅素穩定之複合體。若於血管中因某些原因而紅血球遭到破壞，血紅素於血中游離，則游離之血紅素被氧化，由此會發生氧化性血管損傷毒性。因此，已知結合球蛋白與游離之血紅素迅速地形成複合體，由此使其毒性中和。已知其後血紅素-結合球蛋白複合體經由網狀內皮系統細胞之受體而被迅速地納入並經分解處理，但血紅素-結合球蛋白複合體本身較血紅素穩定。

著眼於作為血紅素-結合球蛋白複合體為穩定之結構物之性質，藉由特異性地檢測、測定糞便中所含之血紅素-結合球蛋白複合體，可掌握消化道中之出血情況。

作為進行血紅素-結合球蛋白複合體之檢測、測定之方法，較佳為免疫學測定方法，作為於短時間內對大量之檢體進行篩查之方法，進而較佳為免疫凝集反應方法。作為免疫凝集反應方法，較佳為使用載體粒子、例如可進行高感度測定之均質系粒子載體之方法。

又，就特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體之觀點而言，作為用於免疫學測定方法之抗體，單株抗體較合適。本發明構建如下方法：藉由將可用於免疫凝集反應方法而檢測、測定血紅素-結合球蛋白複

合體之單株抗體固定化於不可溶性載體粒子，而特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體。

作為用以構建特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體之方法之抗人類血紅素單株抗體，其來源無特別限定，較佳為源自小鼠之抗人類血紅素小鼠單株抗體。

抗人類血紅素小鼠單株抗體可藉由通常之單株抗體之製作方法而製作。例如可列舉使用小鼠之以下方法。具體而言，利用人類血紅素對小鼠進行免疫後，提取肥大化之脾臟，製備源自脾臟之B細胞，藉由電融合法使其與另外增生之小鼠骨髓瘤細胞進行細胞融合，利用選擇培養基對B細胞與骨髓瘤細胞融合而成之細胞進行增生及選殖。確認結果所生長之菌落是否產生對人類血紅素之抗體。對確認到產生對人類血紅素之抗體之細胞進行選殖，獲得抗人類血紅素小鼠單株抗體產生細胞株。對所獲得之抗人類血紅素小鼠單株抗體產生細胞株進行培養，然後使該培養上清液或培養細胞於小鼠之腹腔內進行增生，自所獲得之腹水將抗體純化，將其作為抗人類血紅素小鼠單株抗體。

其次，為了將抗人類血紅素小鼠單株抗體應用於免疫凝集反應方法，而將該抗體固定化於不可溶性載體粒子。作為用以將單株抗體固定化之不可溶性載體粒子，可列舉一般所使用之乳膠粒子、二氧化矽粒子、金屬膠體粒子、磁性粒子、螢光粒子、紅血球等，但並不限定於該等。

又，作為該不可溶性載體粒子之粒徑，較佳為50~500 nm，進而較佳為75~350 nm，但即便並非處於該範圍內亦可使用。

進而，作為將抗體固定化於不可溶性載體粒子之方法，藉由作為公知技術之將抗體與不可溶性載體粒子混合並使抗體物理吸附於不可溶性載

體粒子之表面，可實現抗體向不可溶性載體粒子之固定化。

又，於使用表面導入有胺基或羧基之不可溶性載體粒子之情形時，可藉由使用戊二醛或羧醯亞胺試劑之化學鍵結而實現抗體向不可溶性載體粒子之表面之固定化。

將藉由該等方法而獲得之固定化有一種以上之抗人類血紅素單株抗體之不可溶性載體粒子賦予至包含未形成複合體之游離血紅素及游離結合球蛋白、以及血紅素-結合球蛋白複合體之混合物，而未確認到與游離血紅素及游離結合球蛋白發生凝集反應，且確認到與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，從而獲得本案發明之抗人類血紅素單株抗體及抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子。

即，可獲得藉由固定化於不可溶性載體粒子而與血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生凝集反應之抗人類血紅素單株抗體，可獲得藉由將該抗體固定化於不可溶性載體粒子而得之抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子。因此，亦可獲得使血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生反應之包含該抗體或該單株抗體固定化不可溶性載體粒子之測定試劑，及特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體之使用該抗體或該單株抗體固定化不可溶性載體粒子之測定方法。

作為本發明之一實施形態之抗人類血紅素單株抗體，較佳為於固定化於不可溶性載體粒子之情形時，與血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生凝集反應之以NITE ABP-02268為受領號碼且以NITE BP-02268為寄存號碼而寄存於NPMD之5C-2A、或以NITE ABP-02269為受領號碼且以NITE BP-02269為寄存號碼而寄存於NPMD之12-9G-C。

又，作為本發明之另一實施形態之抗人類血紅素單株抗體套組，較

佳為選自由於將兩種以上之單株抗體固定化於不可溶性載體粒子之情形時，與血紅素-結合球蛋白複合體特異性地發生凝集反應之以NITE ABP-02268為受領號碼且以NITE BP-02268為寄存號碼而寄存於NPMD之5C-2A、以NITE ABP-02270為受領號碼且以NITE BP-02270為寄存號碼而寄存於NPMD之7C-7B-8E、以NITE ABP-02271為受領號碼且以NITE BP-02271為寄存號碼而寄存於NPMD之1-5G-3C、以NITE ABP-02269為受領號碼且以NITE BP-02269為寄存號碼而寄存於NPMD之12-9G-C、以NITE ABP-02272為受領號碼且以NITE BP-02272為寄存號碼而寄存於NPMD之79-8G-3F、及SU112(日本Bio-test研究所)所組成之群中之至少兩種以上。

本發明之測定試劑包含抗人類血紅素單株抗體或抗體套組、或抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子，另外，例如亦可包含各種電解質、緩衝劑、穩定劑、界面活性劑、或增感劑等成分。

本發明之測定方法係使用藉由將一種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體者，且該單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應，故而可自包含未形成複合體之游離血紅素及游離結合球蛋白、以及血紅素-結合球蛋白複合體之混合物中，僅特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體。

本發明之測定方法將上述單株抗體固定化不可溶性載體粒子與檢體(受驗試樣)混合，根據凝集反應之有無而特異性地檢測、測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體。檢體只要為可包含血紅素-結合球蛋白複合體之

試樣則無特別限定，較佳為血液、糞便、尿液、汗液等，尤佳為糞便。凝集反應之檢測、測定方法只要為一般之方法即可，例如可列舉吸光度之測定、散射光強度之測定、基於目視之測定(滑動凝集法)等。

以下列舉實施例具體地說明本發明，但本發明並不限定於該等實施例。

[實施例]

(實施例1 抗人類血紅素單株抗體之製作)

(1)對小鼠之免疫

利用血紅素對7週齡之雌性Balb/c及ddY小鼠各5隻進行免疫。作為免疫操作流程，以50 µg/小鼠之用量將與佐劑混和之血紅素溶液於背部皮下初次免疫。

於初次免疫4週後以50 µg/小鼠之用量將與佐劑混和之血紅素溶液於背部皮下免疫，進而再過4週後以50 µg/小鼠之用量將與佐劑混和之血紅素溶液於背部皮下免疫。

進行各免疫後，利用使用經¹²⁵I標記之血紅素之二抗體法的RIA(Radio immunoassay，放射免疫測定)法測定抗血清值。其結果為1隻ddY小鼠獲得較高之抗血清值，將其供於細胞融合。再者，第2次免疫後及第3次免疫後之抗血清值未見變動。

(2)細胞融合

於進行細胞融合3天前以50 µg/小鼠之用量將血紅素溶液於腹腔內進行最終免疫。細胞融合係自初次免疫經過16週之小鼠摘出脾臟，製備脾細胞。

藉由電融合法對所製備之脾細胞與小鼠骨髓瘤NS-1細胞進行細胞融

合，使其懸浮於融合細胞選擇培養基中並播種於96孔微量盤中。

(3)單株抗體產生細胞株之篩選

於細胞融合10天後利用使用經¹²⁵I標記之血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體之二抗體法的RIA法對抗人類血紅素單株抗體產生細胞進行篩選。

(實施例2 單株抗體之結合特異性)

(1)單株抗體之選定

選定藉由細胞融合而獲得之抗人類血紅素單株抗體45株及市售之抗人類血紅素單株抗體SU112(日本Bio-test研究所)合計46株，對與血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體之結合特異性進行評價。

作為評價之方法，將各抗人類血紅素單株抗體固定化於聚苯乙烯乳膠粒子，將使其與包含血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體之試樣發生反應時之凝集程度進行比較。

(2)單株抗體向聚苯乙烯乳膠粒子之固定化

將各單株抗體固定化於粒徑211 nm之聚苯乙烯乳膠粒子。

上述抗體向聚苯乙烯乳膠粒子之固定化係利用公知技術實施。即，將聚苯乙烯乳膠粒子與抗體混合並使抗體物理吸附於疏水性之聚苯乙烯乳膠粒子之表面，藉此進行抗體向聚苯乙烯乳膠粒子之固定化。

(3)試樣之製備

血紅素-結合球蛋白複合體之試樣係以等液量將32.3 pmol/mL之血紅素及與其為等莫耳之結合球蛋白混和而製作。僅血紅素之試樣係使用包含16.1 pmol/mL之血紅素者。

(4)乳膠凝集之測定方法

使用96孔平底微量盤之孔進行凝集反應。具體方法為將50 mM HEPES((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)，(4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙磺酸))緩衝液(pH值7.4)100 μ L分注於微量盤之各孔中，於添加50 μ L固定化有各抗體之聚苯乙烯乳膠粒子溶液後，添加30 μ L試樣。

使用Sunrise Rainbow(Tecan Japan公司)於試樣添加10秒後及5分10秒後以波長660 nm測定吸光度，將其差作為凝集之指標。

將與血紅素反應時之凝集程度相比，與血紅素-結合球蛋白複合體反應時之凝集程度較高之抗體或其組合示於表1。將該等抗體寄存於專利微生物寄存中心(NPMD)。期望藉由使用表1所示之單株抗體或其組合而可特異性地測定血紅素-結合球蛋白複合體之試劑。可確認5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)及12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)之單株抗體即便單獨使用亦幾乎不受血紅素之影響，而與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集。又，可確認1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)與SU112(日本Bio-test研究所)之組合、5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)與79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)之組合、5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)與7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)之組合、5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)與79-8G-3F之組合、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)與79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE

ABP-02272)之組合亦幾乎不受血紅素之影響，而與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集。

[表1]

單株抗體之組合	血紅素 (Δ Abs. \times 10000)	血紅素-結合球蛋白複合體 (Δ Abs. \times 10000)
1-5G-3C SU112	0	710
5C-2A 單獨	290	1100
5C-2A 79-8G-3F	0	670
5C-2A 7C-7B-8E	390	940
7C-7B-8E 79-8G-3F	0	520
12-9G-C 單獨	280	1040
12-9G-C 79-8G-3F	0	550

(實施例3 與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應(1))

(1)單株抗體固定化乳膠溶液之製備

利用與實施例2同樣之方法將5C-2A之單株抗體固定化於乳膠粒子而製成乳膠溶液。

(2)血紅素-結合球蛋白複合體試樣之製備

製備於50 mM磷酸緩衝液(pH值6.6)中包含11.4 pmol/mL之血紅素及0.0、3.8、7.5、或11.3 pmol/mL之結合球蛋白之溶液。即，因具有血紅素及結合球蛋白牢固地結合之性質，故而製備理論上分別包含0.0及11.4 pmol/mL、3.8及7.6 pmol/mL、7.5及3.9 pmol/mL、以及11.3及0.1 pmol/mL之血紅素-結合球蛋白複合體及血紅素之溶液。

(3)單株抗體固定化乳膠粒子與血紅素-結合球蛋白複合體之反應

使用7170S型自動分析裝置(Hitachi High-Technology公司製造)確認單株抗體固定化乳膠粒子與血紅素-結合球蛋白複合體之反應。測定方法如下：將含有血紅素-結合球蛋白複合體之溶液15 μ L添加於H7170S之反應槽中後添加50 mM HEPES緩衝液(pH值7.4)100 μ L，其後添加單株抗體固定化乳膠溶液25 μ L，求出此後440秒間之波長660 nm下之濁度變化

量。

將以成為0 pmol/mL之方式添加結合球蛋白時之濁度變化量修正為0，將以包含11.3 pmol/mL之方式添加有結合球蛋白之溶液之濁度變化量設為100%，將此時之濁度變化率示於表2。

伴隨著結合球蛋白之添加濃度、即血紅素-結合球蛋白複合體之濃度之增加，因與固定化於乳膠粒子之單株抗體之抗原抗體反應而發生之乳膠凝集導致之濁度變化增加。又，因結合球蛋白之添加濃度較低時乳膠凝集導致之濁度變化較低，故而推測未見與未與結合球蛋白結合之血紅素之反應。據此，藉由使用5C-2A之單株抗體，可特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體。

[表2]

血紅素 (pmol/mL)	結合球蛋白 (pmol/mL)	濁度變化量(%)
11.4	0.0	0.0
11.4	3.8	10.2
11.4	7.5	53.7
11.4	11.3	100.0

(實施例4 與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應(2))

(1)單株抗體固定化乳膠溶液之製備

利用與實施例2同樣之方法將1-5G-3C、7C-7B-8E、SU112、及79-8G-3F之單株抗體固定化於乳膠粒子而製成乳膠溶液。然後，製作1-5G-3C與SU112及7C-7B-8E與79-8G-3F之組合之乳膠溶液並供於試驗。

(2)血紅素-結合球蛋白複合體試樣之製備

除了包含13.0 pmol/mL之血紅素及0.0、9.4、11.3、或13.0 pmol/mL之結合球蛋白以外，利用與實施例3同樣之方法進行製備。即，製備理論上分別包含0.0及13.0 pmol/mL、9.4及3.6 pmol/mL、11.3及1.7

pmol/mL、以及13.0及0.0 pmol/mL之血紅素-結合球蛋白複合體及血紅素之溶液。

(3)單株抗體固定化乳膠粒子與血紅素-結合球蛋白複合體之反應

利用與實施例3同樣之方法求出濁度變化量。

將以成為0 pmol/mL之方式添加結合球蛋白時之濁度變化量修正為0，將等量地製備血紅素與結合球蛋白並以包含13.0 pmol/mL之方式添加有結合球蛋白之溶液之濁度變化量設為100%，將此時之濁度變化率示於表3。

獲得了與實施例3同樣之結果。即，伴隨著結合球蛋白之添加濃度、即血紅素-結合球蛋白複合體之濃度之增加，因與固定化於乳膠粒子之單株抗體之抗原抗體反應而發生之乳膠凝集導致之濁度變化增加。據此，藉由使用1-5G-3C與SU112之組合、及7C-7B-8E與79-8G-3F之組合，可特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體。

[表3]

血紅素 (pmol/mL)	結合球蛋白(pmol/mL)	濁度變化量(%)	
		1-5G-3C + SU112	7-7B-8E + 79-8G-3F
13.0	0.0	0	0
13.0	9.4	49	69
13.0	11.3	68	73
13.0	13.1	100	100

(比較例1 利用ELISA法之血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體之測定)

關於實施例2中與血紅素反應時未見凝集反應，且可確認到與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應之5C-2A與79-8G-3F之組合，對ELISA法中之與血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體之結合之特異性進行評價。

(1)單株抗體固定化乳膠溶液之製備

將5C-2A固相化於96孔微量盤中作為固相化盤，對79-8G-3F進行辣根過氧化酶之標記化而製成酶標記化物。上述抗體向96孔微量盤之固相化係利用公知技術實施。即，將抗體添加於96孔微量盤中並使抗體物理吸附於疏水性96孔微量盤之表面，藉此進行抗體向96孔微量盤之固相化。

(2)血紅素-結合球蛋白複合體試樣之製備

製備於50 mM磷酸緩衝液(pH值6.6)中包含12.6 pmol/mL之血紅素及12.6 pmol/mL之結合球蛋白之溶液，利用50 mM磷酸緩衝液(pH值6.6)雙倍稀釋該溶液，製備包含1.6、3.2、6.3或12.6 pmol/mL之血紅素-結合球蛋白複合體之試樣。

(3)ELISA之測定方法

向96孔微量盤中添加標準溶液或檢體10 μ L，攪拌3分鐘後於25 $^{\circ}$ C下靜置60分鐘。靜置後使用含有界面活性劑之50 mM磷酸緩衝液(pH值7.4)洗淨3次。

洗淨後向96孔微量盤中添加酶標記物100 μ L，攪拌3分鐘後於25 $^{\circ}$ C下靜置60分鐘。靜置後使用含有界面活性劑之50 mM磷酸緩衝液(pH值7.4)洗淨3次。

洗淨後向96孔微量盤中添加0.4 mg/mL之含有鄰苯二胺之受質溶解液100 μ L，於25 $^{\circ}$ C下靜置14分鐘。靜置後添加3N硫酸100 μ L作為反應停止液。

測定係使用Sunrise Rainbow(Tecan Japan公司)以測定波長492/650 nm進行。將使用藉由固定化於乳膠等不可溶性載體而與血紅素反應時未見凝集反應，且可確認到與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應的5C-2A與79-8G-3F之組合的ELISA法中之測定結果示於表4。於使用5C-2A與

79-8G-3F之組合之ELISA法中，與血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體兩者發生反應，無法特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體。

[表4]

濃度* (pmol/mL)	血紅素 (Δ Abs. \times 10000)	血紅素-結合球蛋白複合體 (Δ Abs. \times 10000)
1.6	6672	11165
3.2	9632	16668
6.3	12282	21758
12.6	14382	24458

*：血紅素或血紅素-結合球蛋白複合體之濃度

(實施例5 與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應(3))

關於實施例2中與血紅素反應時未見凝集反應，且可確認到與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應之5C-2A與79-8G-3F之組合，對乳膠凝集法中之與血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體之結合之特異性進行評價。

(1)單株抗體固定化乳膠溶液之製備

利用與實施例2同樣之方法將5C-2A及79-8G-3F之單株抗體固定化於乳膠粒子而製成乳膠溶液。將固定化有5C-2A及79-8G-3F之單株抗體之乳膠溶液混合並供於試驗。

(2)血紅素-結合球蛋白複合體試樣之製備

製備於50 mM磷酸緩衝液(pH值6.6)中包含12.6 pmol/mL之血紅素及12.6 pmol/mL之結合球蛋白之溶液，利用50 mM磷酸緩衝液(pH值6.6)雙倍稀釋該溶液，製備包含1.6、3.2、6.3或12.6 pmol/mL之血紅素-結合球蛋白複合體之試樣。

(3)乳膠凝集法之測定方法

使用50 mM HEPES緩衝液(pH值7.4)作為R1，使用上述單株抗體固定化乳膠溶液作為R2。測定係使用日立7170S型自動分析裝置(Hitachi

High-Technology公司製造)進行。測定方法如下：將標準溶液或檢體15 μL 添加於反應槽中後添加50 mM HEPES緩衝液(pH值7.4)100 μL ，其後添加單株抗體固定化乳膠溶液25 μL ，測定此後440秒間之波長660 nm下之濁度變化量。

(4)單株抗體固定化乳膠粒子與血紅素-結合球蛋白複合體之反應

將使用在ELISA法中確認到與血紅素及血紅素-結合球蛋白複合體兩者之反應的5C-2A與79-8G-3F之組合的乳膠凝集法中的測定結果示於表5。關於5C-2A與79-8G-3F之組合，藉由固定化於乳膠等不可溶性載體，與血紅素反應時未見凝集反應，且確認到與血紅素-結合球蛋白複合體之特異性反應。

[表5]

濃度* (pmol/mL)	血紅素 ($\Delta\text{Abs.}\times 10000$)	血紅素-結合球蛋白複合體 ($\Delta\text{Abs.}\times 10000$)
1.6	-15	-2
3.2	-15	53
6.3	-1	199
12.6	11	652

*：血紅素或血紅素-結合球蛋白複合體之濃度

(實施例6 檢體之測定(1))

使用先前方法之一的ELISA法及本發明之方法進行血紅素-結合球蛋白複合體之測定。

(1)利用ELISA法之血紅素-結合球蛋白複合體之測定

將抗人類結合球蛋白單株抗體固相化於96孔微量盤作為固相化盤，對抗人類血紅素多株抗體進行辣根過氧化酶之標記化而製成酶標記物。

向96孔微量盤中添加50 mM磷酸緩衝液(pH值7.2)100 μL 與標準溶液或檢體10 μL ，攪拌5分鐘後於25 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置120分鐘。靜置後使用含有界面活性劑之50 mM磷酸緩衝液(pH值7.5)洗淨3次。

洗淨後向96孔微量盤中添加酶標記物100 μL ，攪拌5分鐘後於25 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置55分鐘。靜置後使用含有界面活性劑之50 mM磷酸緩衝液(pH值7.5)洗淨3次。

洗淨後向96孔微量盤中添加0.4 mg/mL之含有鄰苯二胺之受質溶解液100 μL ，於25 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置15分鐘。靜置後添加2N硫酸100 μL 作為反應停止液。

測定係使用Sunrise Rainbow(Tecan Japan公司)以測定波長492/650 nm進行，根據由標準測定結果所得之校準曲線求出檢體之測定值。

(2)利用乳膠凝集法之血紅素-結合球蛋白複合體之測定

使用50 mM HEPES緩衝液(pH值7.4)作為R1，使用實施例3之單株抗體固定化乳膠溶液作為R2。

測定係使用JCA-BM2250(日本電子公司)進行。測定方法如下：將標準溶液或檢體8 μL 添加於反應槽中後添加R1 50 μL ，其後添加R2 16.7 μL ，測定此後471秒間之波長658 nm下之濁度變化量，根據由標準測定結果所得之校準曲線求出檢體之測定值。

(3)測定結果

將利用ELISA及乳膠凝集法測定5個檢體所得之結果示於表6，將測定期間之相關圖示於圖1。

利用乳膠凝集法之檢體之測定結果與利用ELISA之檢體之測定結果等同，相關係數為0.998而良好。再者，圖1之數值1表示以血紅素計之濃度為12.9 pmol/mL。

[表6]

檢體	ELISA法	乳膠凝集法
A	0.09	0.12
B	0.28	0.31

C	0.48	0.49
D	0.67	0.72
E	0.89	0.91

根據該等結果可知，藉由使用本發明可精確地測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體，有助於疾病之診斷。

[產業上之可利用性]

本發明提供一種藉由固定化於不可溶性載體粒子而可特異性地檢測、測定血紅素-結合球蛋白複合體之單株抗體或抗體套組，及其單株抗體固定化不可溶性載體粒子，以及用以使用其等特異性地檢測、測定檢體中之血紅素-結合球蛋白複合體之測定試劑及測定方法。藉由將該發明應用於糞便檢體，可於短時間內高精度地查驗消化器官有無出血。

【生物材料寄存】

Japan 日本；獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生物寄託中心 (National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMD))；2016/05/27；NITE BP-02268；

Japan 日本；獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生物寄託中心 (National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMD))；2016/05/27；NITE BP-02269；

Japan 日本；獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生物寄託中心 (National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMD))；2016/05/27；NITE BP-02270；

Japan 日本；獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生物寄託中心 (National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMD))；2016/05/27；NITE BP-02271；

Japan 日本；獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生物寄託中心

(National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository
(NPMD)) ; 2016/05/27 ; NITE BP-02272 ◦

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種抗人類血紅素單株抗體，其係抗人類血紅素單株抗體，且藉由將上述單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

【第2項】

如請求項1之抗人類血紅素單株抗體，其係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)。

【第3項】

一種抗體套組，其包含兩種以上之抗人類血紅素單株抗體，且藉由將上述兩種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

【第4項】

如請求項3之抗體套組，其中上述兩種以上之抗人類血紅素單株抗體係選自由5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)、及SU112所組成之群中之至少兩種以上。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組，其中上述抗人類血紅素單株抗體係源自小鼠。

【第6項】

一種抗人類血紅素單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其係藉由將一種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，且上述單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

【第7項】

如請求項6之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中上述一種以上之抗人類血紅素單株抗體係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)之一種。

【第8項】

如請求項6之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中上述一種以上之抗人類血紅素單株抗體係選自由5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)、及SU112所組成之群中之至少兩種以上。

【第9項】

如請求項6至8中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中上述抗人類血紅素單株抗體係源自小鼠。

【第10項】

如請求項6至9中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，其中將上述單株抗體固定化之上述不可溶性載體粒子係乳膠粒子或金屬膠體粒子。

【第11項】

一種用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體之免疫學測定試劑，其包含如請求項6至10中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子。

【第12項】

一種抗人類血紅素單株抗體，其係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、或79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)。

【第13項】

一種用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體之免疫學測定方法，其使用如請求項1至5中任一項之抗人類血紅素單株抗體或抗體套組、如請求項6至10中任一項之單株抗體固定化不可溶性載體粒子、如請求項11之免疫學測定試劑、或如請求項12之抗人類血紅素單株抗體。

【第14項】

一種免疫學測定方法，其係使用藉由將一種以上之抗人類血紅素單株抗體固定化於不可溶性載體粒子而獲得之單株抗體固定化不可溶性載體粒子，用以特異性地檢測血紅素-結合球蛋白複合體者，且上述單株抗體固定化不可溶性載體粒子與血紅素-結合球蛋白複合體發生凝集反應，但不與血紅素發生凝集反應。

【第15項】

如請求項14之免疫學測定方法，其中上述一種以上之抗人類血紅素單株抗體係5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)或12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)之一種。

【第16項】

如請求項14之免疫學測定方法，其中上述一種以上之抗人類血紅素單株抗體係選自由5C-2A(NPMD受領號碼NITE ABP-02268寄存號碼NITE BP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領號碼NITE ABP-02270寄存號碼NITE BP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領號碼NITE ABP-02271寄存號碼NITE BP-02271)、12-9G-C(NPMD受領號碼NITE ABP-02269寄存號碼NITE BP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領號碼NITE ABP-02272寄存號碼NITE BP-02272)、及SU112所組成之群中之至少兩種以上。

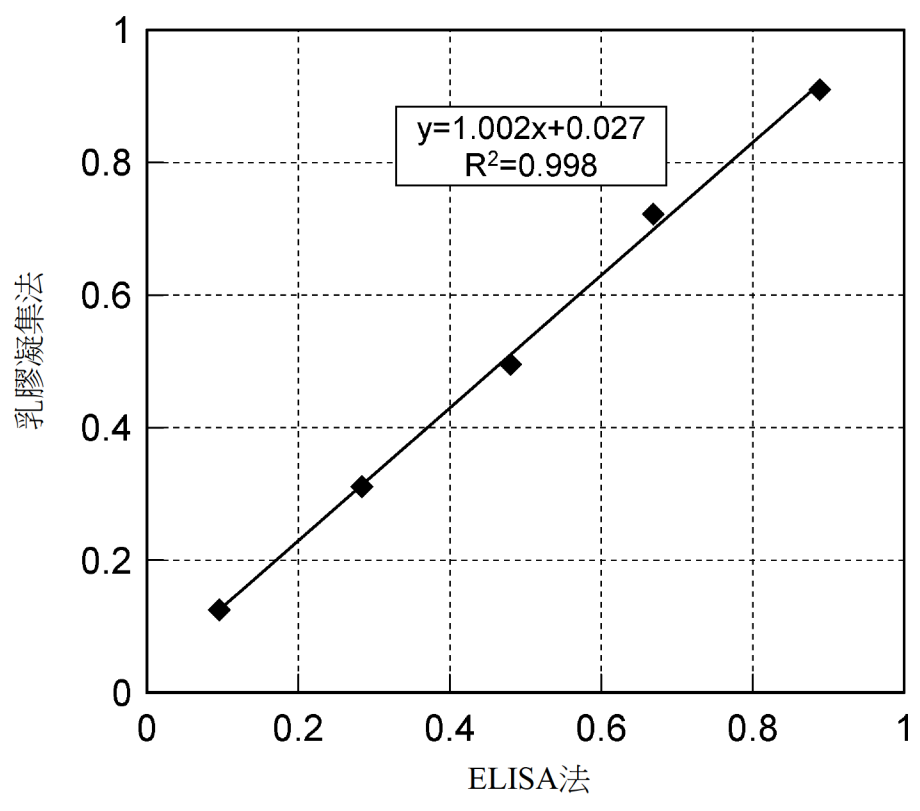
【第17項】

如請求項14至16中任一項之免疫學測定方法，其中上述抗人類血紅素單株抗體係源自小鼠。

【第18項】

如請求項14至17中任一項之免疫學測定方法，其中將上述抗人類血紅素單株抗體固定化之上述不可溶性載體粒子係乳膠粒子或金屬膠體粒子。

【發明圖式】



【圖1】