

(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
2017年12月7日(07.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/209001 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01)

坂西 千紗(SAKANISHI Chisa); 〒3290114 栃木
県下都賀郡野木町野木 1 4 3 栄研化学株
式会社 野木事業所内 Tochigi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/019736

(22) 国際出願日: 2017年5月26日(26.05.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2016-107343 2016年5月30日(30.05.2016) JP

(71) 出願人: 栄研化学株式会社(EIKEN KAGAKU
KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1108408 東京
都台東区台東4丁目19番9号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 安居 良太(YASUI Ryota); 〒3290114 栃
木県下都賀郡野木町野木 1 4 3 栄研化学株
式会社 野木事業所内 Tochigi (JP). 油井 恵
(YUI Megumi); 〒3290114 栃木県下都賀郡野
木町野木 1 4 3 栄研化学株式会社 野木事
業所内 Tochigi (JP). 牧之段 満(MAKINODAN
Mitsuru); 〒3290114 栃木県下都賀郡野木町
野木 1 4 3 栄研化学株式会社 野木事業
所内 Tochigi (JP). 関 泰宏(SEKI Yasuhiro);
〒3290114 栃木県下都賀郡野木町野木 1 4 3
栄研化学株式会社 野木事業所内 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki
et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二
丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A
(明治安田生命ビル) 9階 創英国際特
許法律事務所 Tokyo (JP).

(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,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: ANTI-HUMAN HEMOGLOBIN MONOCLONAL ANTIBODY OR ANTIBODY KIT, INSOLUBLE CAR-
RIER PARTICLE TO WHICH ANTI-HUMAN HEMOGLOBIN MONOCLONAL ANTIBODY IS IMMOBILIZED,
AND MEASUREMENT REAGENT AND MEASUREMENT METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体若しくは抗体キット、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、及びこれらを用いた測定試薬若しくは測定方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an anti-human hemoglobin monoclonal antibody or antibody kit for easily detecting and measuring a hemoglobin-haptoglobin complex with specificity in a specimen, an insoluble carrier particle to which the monoclonal antibody is immobilized, and a measurement reagent and measurement method for detecting and measuring a hemoglobin-haptoglobin complex in a specimen with specificity using the same. This anti-human hemoglobin monoclonal antibody is immobilized to insoluble carrier particles, and thereby does not react with free hemoglobin and free haptoglobin not forming a complex, and reacts specifically with a hemoglobin-haptoglobin complex.

(57) 要約: 本発明は、検体中のヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に簡便に検出、測定するための抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体若しくは抗体キット、および、そのモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、並びにこれらを用いて検体中のヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定するための測定試薬及び測定方法を提供することを目的とする。本発明の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体は、不溶性担体粒子に固定化することにより、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンおよび遊離ハプトグロビンとは反応せず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と特異的に反応するものである。

DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii)）

明 細 書

発明の名称：

抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体若しくは抗体キット、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、及びこれらを用いた測定試薬若しくは測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、不溶性担体粒子に固定化された場合、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を含む被験試料中のヘモグロビン－ハプトグロビン複合体と特異的に凝集反応を起こす抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体若しくは抗体キット、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、及びこれらを用いた、被験試料中のヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定するための測定試薬若しくは測定方法に関する。

背景技術

[0002] 出血を伴う消化器官の疾患として、炎症、腫瘍、癌等が知られている。そして、これらの疾患のスクリーニング検査として、糞便中のヘモグロビンの存在を調べる便潜血検査が行われている。そして、この検査は主に免疫測定法によって行われる（特開昭61-137064号公報）。

[0003] しかし、糞便中に含まれるヘモグロビンは、被験試料である糞便中に含まれる細菌を始めとした種々の要因によって、また、消化管内を移動する際にも分解されて、検出、測定が出来なくなる。それゆえ、糞便中のヘモグロビンの検出、測定は、下行結腸や直腸の出血の検査には有効であるが、上部消化管の出血を検査することは困難である。

[0004] そこで、糞便中に含まれる細菌を始めとした種々の要因によって分解を受けないヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を測定することが提案され、実施されている。しかしながら、この測定原理は、ヘモグロビンに特異的に結合する抗体とハプトグロビンに特異的に結合する抗体を組み合わせたサンドイッチ免疫測定法である（特開平2-193071号公報）。

- [0005] E L I S Aに代表されるサンドイッチ免疫測定法は、測定の過程において被験試料に含まれる被測定物以外のタンパク成分等を除去する洗浄工程を含むため、測定に要する時間が長くなる。そのため、短時間で多数の被験試料を検出、測定する必要がある検出、測定には適していない。
- [0006] また、ヘモグロビンおよびハプトグロビンの基本構造は四量体を形成しており、常法で得られたヘモグロビンに特異的に結合する抗体とハプトグロビンに特異的に結合する抗体を組み合わせ、短時間で多数の被験試料を検出、測定することが可能な凝集法による免疫測定法に適用すると、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のみならず、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンや遊離ハプトグロビンでも凝集反応を起こすため、精確な測定は困難である。
- [0007] そこで、凝集法による免疫測定法に適用することが可能で、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンや遊離ハプトグロビンを検出、測定せず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のみ検出、測定出来る抗体の作製およびその抗体を用いた凝集法による免疫測定法でヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定する免疫測定法の確立が期待されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 出血を伴う消化器官疾患のスクリーニング検査を行なうことは、重篤化する炎症、腫瘍、癌等を早期に発見するために重要な課題となっている。そこで、消化管内で分解を受けないヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を短時間で多数検体を検出、測定出来る試薬が求められている。
- [0009] それゆえ、本発明は、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンおよび遊離ハプトグロビンは検出、測定せず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に、短時間で多検体の検出、測定が出来る凝集法による免疫測定法に使用することが可能な抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、不溶性担体粒子

に結合させることによって、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンおよび遊離ハプトグロビンとは反応せず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と特異的に反応する抗体を見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち、本発明は、以下の構成からなる。

(1) 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体であって、モノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体。

(2) 5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268) または12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269) である、(1) の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体。

(3) 2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を含む、抗体キット。

(4) 2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268)、7C-7B-8E (NPMD受領番号NITE ABP-02270)、1-5G-3C (NPMD受領番号NITE ABP-02271)、12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269)、79-8G-3F (NPMD受領番号NITE ABP-02272)、およびSU112からなる群より選ばれる少なくとも2種類以上である、(3) の抗体キット。

(5) 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体がマウス由来である、(1) ~ (4) のいずれかの抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体または抗体キット。

(6) 1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒

子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子であって、モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

(7) 1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が、5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268) または12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269) の1種類である、(6) のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

(8) 1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が、5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268)、7C-7B-8E (NPMD受領番号NITE ABP-02270)、1-5G-3C (NPMD受領番号NITE ABP-02271)、12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269)、79-8G-3F (NPMD受領番号NITE ABP-02272)、およびSU112からなる群より選ばれる少なくとも2種類以上である、(7) のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

(9) 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体がマウス由来である、(6) ~ (8) のいずれかのモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

(10) モノクローナル抗体を固定化する不溶性担体粒子が、ラテックス粒子または金属コロイド粒子である、(6) ~ (9) のいずれかのモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

(11) (6) ~ (10) のいずれかのモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を含む、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定試薬。

(12) 5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268)、7C-7B-8E (NPMD受領番号NITE ABP-02270)、1-5G-3C (NPMD受領番号NITE ABP-02271)、12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269)、または79

－ 8 G－ 3 F（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 7 2）である、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体。

（ 1 3 ）（ 1 ）～（ 5 ）のいずれかの抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体または抗体キット、（ 6 ）～（ 1 0 ）のいずれかのモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、（ 1 1 ）の免疫学的測定試薬、あるいは、（ 1 2 ）の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を用いた、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定方法。

（ 1 4 ） 1 種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を用いた、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定方法であって、モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、免疫学的測定方法。

（ 1 5 ） 1 種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が 5 C－ 2 A（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 6 8）または 1 2－ 9 G－ C（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 6 9）の 1 種類である、（ 1 4 ）の免疫学的測定方法。

（ 1 6 ） 1 種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が 5 C－ 2 A（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 6 8）、 7 C－ 7 B－ 8 E（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 7 0）、 1－ 5 G－ 3 C（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 7 1）、 1 2－ 9 G－ C（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 6 9）、 7 9－ 8 G－ 3 F（NPMD 受領番号 N I T E A B P－ 0 2 2 7 2）、および S U 1 1 2 からなる群より選ばれる少なくとも 2 種類以上である、（ 1 4 ）の免疫学的測定方法。

（ 1 7 ）抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体がマウス由来である、（ 1 4 ）～（ 1 6 ）のいずれかの免疫学的測定方法。

（ 1 8 ）抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を固定化する不溶性担体粒子が、ラテックス粒子または金属コロイド粒子である（ 1 4 ）～（ 1 7 ）の

いずれかの免疫学的測定方法。

発明の効果

[0012] 本発明は、上記抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化して作製した免疫学的測定試薬を用いることにより、被験試料中に含まれる、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンおよび／または遊離ハプトグロビンの影響を受けることなく、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を特異的に測定することが可能となる。

[0013] そして、このことにより、ヘモグロビンと比較して検体中での安定性に優れているヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を被験物質として、出血を伴う消化器官疾患のスクリーニング検査を簡便かつ短時間で行なうことが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] E L I S A 法とラテックス凝集法で検体を測定したときの相関図

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の一実施形態の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体である。

[0016] 本発明の別の実施形態の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体は、抗体キットであり、具体的には2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を含む、抗体キットである。

[0017] 本発明におけるヘモグロビン－ハプトグロビン複合体は、ヘモグロビンとハプトグロビンにより形成された、遊離ヘモグロビンよりも安定な複合体である。血管中において何らかの理由により赤血球が破壊され、ヘモグロビン

が血中に遊離すると、遊離したヘモグロビンが酸化されることにより酸化的血管障害毒性が生じる。そこで、ハプトグロビンが遊離したヘモグロビンと速やかに複合体を形成することにより、その毒性を中和させることが知られている。その後、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体は細網内皮系細胞の受容体を介して速やかに取り込まれ分解処理されるが、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体自体はヘモグロビンに比べて安定であることが知られている。

[0018] ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体が安定な構造物である性質に着目して、糞便中に含まれるヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定することにより、消化管における出血を把握することが可能となる。

[0019] ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の検出、測定を行なう方法としては、免疫学的測定方法が好ましく、スクリーニング検査として多数の検体を短時間で行なう方法としては、免疫凝集反応方法がさらに好ましい。免疫凝集反応方法としては、担体粒子、たとえば、高感度測定が可能なホモジニアスな系の粒子担体を用いた方法が好ましい。

[0020] また、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定するという観点から、免疫学的測定方法に用いる抗体としては、モノクローナル抗体が適している。本発明は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を免疫凝集反応方法に用いて検出、測定することが可能なモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定する方法を構築する。

[0021] ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定する方法を構築するための抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体として、その由来は特に限定されないが、マウス由来の抗ヒトヘモグロビンマウスモノクローナル抗体が好ましい。

[0022] 抗ヒトヘモグロビンマウスモノクローナル抗体は、通常のモノクローナル抗体の作製方法によって作製できる。たとえば、マウスを使った以下の方法が挙げられる。具体的には、マウスにヒトヘモグロビンで免疫した後、肥大

化した脾臓を提出し、脾臓由来のB細胞を調製し、別に増殖させたマウスミエローマ細胞と電気融合法により細胞融合させ、B細胞とミエローマ細胞が融合して出来た細胞を選択培地を利用して増殖およびクローニングを行う。その結果発育したコロニーがヒトヘモグロビンに対する抗体を産生しているか否かを確認する。ヒトヘモグロビンに対する抗体を産生していると認められた細胞をクローニングし、抗ヒトヘモグロビンマウスモノクローナル抗体産生細胞株を得る。得られた抗ヒトヘモグロビンマウスモノクローナル抗体産生細胞株を培養し、その培養上清または培養細胞をマウスの腹腔内で増殖させて得られた腹水より抗体を精製し、抗ヒトヘモグロビンマウスモノクローナル抗体とする。

[0023] 次に、抗ヒトヘモグロビンマウスモノクローナル抗体を免疫凝集反応方法に適用するため、該抗体を不溶性担体粒子に固定化する。モノクローナル抗体を固定化するための不溶性担体粒子としては、一般的に使用されるラテックス粒子、シリカ粒子、金属コロイド粒子、磁性粒子、蛍光粒子、赤血球等が挙げられるが、これらに限定されることはない。

[0024] また、該不溶性担体粒子の粒子径としては、50～500nmが好ましく、75～350nmがさらに好ましいが、特にこの範囲に捉われることなく、使用することが可能である。

[0025] さらに、抗体を不溶性担体粒子に固定化する方法としては、公知の技術である、抗体と不溶性担体粒子を混合して不溶性担体粒子の表面に抗体を物理的吸着を行なうことにより不溶性担体粒子への抗体の固定化が可能である。

[0026] また、表面にアミノ基やカルボキシル基を導入した不溶性担体粒子を用いる場合には、グルタルアルデヒドやカルボキシイミド試薬を用いた化学結合によって不溶性担体粒子の表面への抗体の固定化が可能である。

[0027] これらの方法により得られた1以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が固定化された不溶性担体粒子は、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンおよび遊離ハプトグロビン、並びにヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含む混合物に付与し、遊離ヘモグロビンおよび遊離ハプトグロビンと

は凝集反応は認められず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体とは凝集反応を生ずることを確認し、本願発明の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体及び抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を得る。

[0028] すなわち、不溶性担体粒子に固定化することによりヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と特異的に凝集反応を生ずる抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が得られ、該抗体を不溶性担体粒子に固定化することによる抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が得られる。それによって、ヘモグロビン-ハグロビン複合体を特異的に反応する、該抗体又は該モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を含む測定試薬、ヘモグロビン-ハグロビン複合体を特異的に検出、測定する、該抗体又は該モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を用いた測定方法も得られる。

[0029] 本発明の一実施形態の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体として好ましくは、不溶性担体粒子に固定化した場合ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と特異的に凝集反応を起こす、NPMDに受領番号NITE ABP-02268として寄託された5C-2A、またはNPMDに受領番号NITE ABP-02269として寄託された12-9G-Cである。

[0030] また、本発明の別の実施形態の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体キットとして好ましくは、2種類以上のモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化した場合ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と特異的に凝集反応を起こす、NPMDに受領番号NITE ABP-02268として寄託された5C-2A、NPMDに受領番号NITE ABP-02270として寄託された7C-7B-8E、NPMDに受領番号NITE ABP-02271として寄託された1-5G-3C、NPMDに受領番号NITE ABP-02269として寄託された12-9G-C、NPMDに受領番号NITE ABP-02272として寄託された79-8G-3F、およびSU112（日本バイオテスト研究所）からなる群より選ばれる少なくとも2種類以上である。

[0031] 本発明の測定試薬は、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体又は抗体キット、あるいは、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を含み、その他、例えば、各種電解質、緩衝剤、安定化剤、界面活性剤、または増感剤等の成分を含んでもよい。

[0032] 本発明の測定方法は、1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を用いた、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定方法であり、該モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しないため、複合体を形成していない遊離ヘモグロビンおよび遊離ハプトグロビン、並びにヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含む混合物から、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のみ特異的に検出、測定することができる。

[0033] 本発明の測定方法は、上記モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子と検体（被験試料）とを混合して、凝集反応の有無によって、検体中のヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定する。検体は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含み得る試料であれば特に限定されないが、血液、便、尿、汗などであることが好ましく、便であることが特に好ましい。凝集反応の検出、測定方法は、一般的な方法であればよく、たとえば、吸光度の測定、散乱光強度の測定、目視による測定（スライド凝集法）等が挙げられる。

[0034] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0035] （実施例1 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体の作製）

（1）マウスへの免疫

7週齢のメスのB a l b / c および d d Y のマウス各5頭に対してヘモグロビンで免疫した。免疫プロトコールとしては、初回免疫としてアジュバン

トと混和したヘモグロビン溶液を背部皮下に $50 \mu\text{g}$ /マウスの用量で行なった。

[0036] 初回免疫の4週間後にアジュバントと混和したヘモグロビン溶液を背部皮下に $50 \mu\text{g}$ /マウスの用量で免疫し、さらにその4週間後にアジュバントと混和したヘモグロビン溶液を背部皮下に $50 \mu\text{g}$ /マウスの用量で免疫した。

[0037] 各々の免疫後に、 ^{125}I で標識したヘモグロビンを用いた2抗体法のRIA法で抗血清価を測定した。その結果、ddYのマウスの1頭で高い抗血清価が得られ、細胞融合に供した。なお、2回目の免疫後および3回目の免疫後の抗血清価に変動は認められなかった。

[0038] (2) 細胞融合

細胞融合を行なう3日前にヘモグロビン溶液を腹腔内に $50 \mu\text{g}$ /マウスの用量で最終免疫を行なった。細胞融合は、初回免疫より16週間経過したマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。

[0039] 調製した脾細胞とマウスミエローマNS-1細胞を電気融合法にて細胞融合を行ない、融合細胞選択培地に懸濁して96穴マイクロプレートに播種した。

[0040] (3) モノクローナル抗体産生細胞株のスクリーニング

細胞融合の10日後に ^{125}I で標識したヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を用いた2抗体法のRIA法で、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングした。

[0041] (実施例2 モノクローナル抗体の結合特異性)

(1) モノクローナル抗体の選定

細胞融合により得られた抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体45クローンおよび市販の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体SU112 (日本バイオテスト研究所) の合計46クローンを選定し、ヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との結合特異性を評価した。

[0042] 評価の方法としては、各々の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体をポ

リスチレンラテックス粒子に固定化し、ヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含む試料と反応させたときの凝集の度合いを比較した。

[0043] (2) モノクローナル抗体のポリスチレンラテックス粒子への固定化

各々のモノクローナル抗体を粒径 211 nm のポリスチレンラテックス粒子に固定化した。

[0044] 上記のポリスチレンラテックス粒子への抗体の固定化は、公知の技術を利用して実施した。すなわち、ポリスチレンラテックス粒子と抗体を混合して疎水性であるポリスチレンラテックス粒子の表面に抗体を物理的吸着を行なうことにより、ポリスチレンラテックス粒子への抗体の固定化を行なった。

[0045] (3) 試料の調製

ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の試料は、32.3 pmol/mL のヘモグロビンおよびそれと等モルのハプトグロビンを等液量で混和して作製した。ヘモグロビンのみの試料は、16.1 pmol/mL のヘモグロビンを含むものを使用した。

[0046] (4) ラテックス凝集の測定方法

96穴平底マイクロプレートのウェルを用いて凝集反応を行なった。具体的方法は、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) をマイクロプレートの各ウェルに 100 μ L 分注し、各々の抗体を固定化したポリスチレンラテックス粒子溶液を 50 μ L 添加した後に試料を 30 μ L 添加した。

[0047] サンライズレインボー (テカンジャパン社) を用いて試料の添加 10 秒後および 5 分 10 秒後に波長 660 nm で吸光度を測定し、その差を凝集の指標とした。

[0048] ヘモグロビンと反応させたときの凝集の度合いに比較して、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と反応させたときの凝集の度合いが高かった抗体又はその組合せを表 1 に示す。これらの抗体を特許微生物寄託センター (NPMID) に寄託した。表 1 に示されたモノクローナル抗体又はその組合せを用いることにより、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に測定する

ことが出来る試薬が期待される。5C-2A（NPMD受領番号NITE ABP-02268）および12-9G-C（NPMD受領番号NITE ABP-02269）のモノクローナル抗体は、単独で使用してもほとんどヘモグロビンの影響を受けることなく、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集することが認められた。また、1-5G-3C（NPMD受領番号NITE ABP-02271）とSU112（日本バイオテスト研究所）との組み合わせ、5C-2A（NPMD受領番号NITE ABP-02268）と79-8G-3F（NPMD受領番号NITE ABP-02272）との組み合わせ、5C-2A（NPMD受領番号NITE ABP-02268）と7C-7B-8E（NPMD受領番号NITE ABP-02270）との組み合わせ、5C-2A（NPMD受領番号NITE ABP-02268）と79-8G-3Fとの組み合わせ、12-9G-C（NPMD受領番号NITE ABP-02269）と79-8G-3F（NPMD受領番号NITE ABP-02272）との組み合わせも、ほとんどヘモグロビンの影響を受けることなく、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集することが認められた。

[0049] [表1]

モノクローナル抗体の組合せ		ヘモグロビン (Δ Abs. $\times 10000$)	ヘモグロビン- ハプトグロビン複合体 (Δ Abs. $\times 10000$)
1-5G-3C	SU112	0	710
5C-2A	単独	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	単独	280	1040
12-9G-C	79-8G-3F	0	550

[0050] （実施例3 ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との特異的反応（1））

（1）モノクローナル抗体固定化ラテックス溶液の調製

5C-2Aのモノクローナル抗体を、実施例2と同様の方法でラテックス粒子に固定化してラテックス溶液とした。

[0051] (2) ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体試料の調製

50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) 中に、11.4 pmol/mL のヘモグロビンおよび0.0、3.8、7.5、または11.3 pmol/mL のハプトグロビンを含む溶液を調製した。すなわち、ヘモグロビンおよびハプトグロビンが強固に結合する性質を持つことより、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体およびヘモグロビンが、理論上は、各々0.0および11.4 pmol/mL、3.8および7.6 pmol/mL、7.5および3.9 pmol/mL、ならびに11.3および0.1 pmol/mL 含む溶液を調製した。

[0052] (3) モノクローナル抗体固定化ラテックス粒子とヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との反応

モノクローナル抗体固定化ラテックス粒子とヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との反応を7170 S形自動分析装置 (日立ハイテクノロジー社製) を用いて確認した。測定方法は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体含有溶液15 μ L をH7170 Sの反応セルに加えた後に50 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) 100 μ L を加え、その後モノクローナル抗体固定化ラテックス溶液25 μ L を加えた後の440秒間の波長660 nmでの濁度変化量を求めた。

[0053] 0 pmol/mLとなるようにハプトグロビンを添加したときの濁度変化量を0と補正し、ハプトグロビンが11.3 pmol/mL含まれるように添加した溶液の濁度変化量を100%としたときの濁度変化率を表2に示す。

[0054] ハプトグロビンの添加濃度、すなわちヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の濃度の増加に伴い、ラテックス粒子に固定化したモノクローナル抗体との抗原抗体反応によって生じるラテックス凝集による濁度変化が増加する。また、ハプトグロビンの添加濃度が低いときにはラテックス凝集による濁度変化が低いことから、ハプトグロビンと結合していないヘモグロビンとの反応が認められないと推察された。これらより、5C-2Aのモノクローナル

抗体を用いることにより、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出することが可能となる。

[0055] [表2]

ヘモグロビン ($\mu\text{mol/mL}$)	ハプトグロビン ($\mu\text{mol/mL}$)	濁度変化量(%)
11.4	0.0	0.0
11.4	3.8	10.2
11.4	7.5	53.7
11.4	11.3	100.0

[0056] (実施例4 ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との特異的反応(2))

(1) モノクローナル抗体固定化ラテックス溶液の調製

1-5G-3C、7C-7B-8E、SU112、および79-8G-3Fのモノクローナル抗体を、実施例2と同様の方法でラテックス粒子に固定化してラテックス溶液とした。そして、1-5G-3CとSU112および7C-7B-8Eと79-8G-3Fの組合せのラテックス溶液を作製し、試験に供した。

[0057] (2) ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体試料の調製

13.0 $\mu\text{mol/mL}$ のヘモグロビンおよび0.0、9.4、11.3、または13.0 $\mu\text{mol/mL}$ のハプトグロビンを含む他は実施例3と同様の方法で調製した。すなわち、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体およびヘモグロビンが、理論上は、各々0.0および13.0 $\mu\text{mol/mL}$ 、9.4および3.6 $\mu\text{mol/mL}$ 、11.3および1.7 $\mu\text{mol/mL}$ 、ならびに13.0および0.0 $\mu\text{mol/mL}$ 含む溶液を調製した。

[0058] (3) モノクローナル抗体固定化ラテックス粒子とヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との反応

実施例3と同様の方法で濁度変化量を求めた。

0 $\mu\text{mol/mL}$ となるようにハプトグロビンを添加したときの濁度変化を量0と補正し、ヘモグロビンとハプトグロビンを等量に調製した、ハプトグロビンが13.0 $\mu\text{mol/mL}$ 含まれるように添加した溶液の濁度変化

量を100%としたときの濁度変化率を表3に示す。

[0059] 実施例3と同様の結果が得られた。すなわち、ハプトグロビンの添加濃度、すなわちヘモグロビンーハプトグロビン複合体の濃度の増加に伴い、ラテックス粒子に固定化したモノクローナル抗体との抗原抗体反応によって生じるラテックス凝集による濁度変化が増加した。このことより、1-5G-3CとSU112との組み合わせ、および7C-7B-8Eと79-8G-3Fとの組合せを用いることにより、ヘモグロビンーハプトグロビン複合体を特異的に検出することが可能となる。

[0060] [表3]

ヘモグロビン (pmol/mL)	ハプトグロビン (pmol/mL)	濁度変化量(%)	
		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

[0061] (比較例1 E L I S A法によるヘモグロビンおよびヘモグロビンーハプトグロビン複合体の測定)

実施例2において、ヘモグロビンと反応させたときには凝集反応がみられず、ヘモグロビンーハプトグロビン複合体との特異的な反応が確認された、5C-2Aと79-8G-3Fの組合せについて、E L I S A法でのヘモグロビンおよび

ヘモグロビンーハプトグロビン複合体との結合の特異性を評価した。

[0062] (1) モノクローナル抗体固定化ラテックス溶液の調製

5C-2Aを96穴マイクロプレートに固相化して固相化プレートとし、79-8G-3Fにホースラディッシュペルオキシダーゼを標識化して酵素標識化物とした。上記の96穴マイクロプレートへの抗体の固相化は、公知の技術を利用して実施した。すなわち、96穴マイクロプレートに抗体添加して疎水性である96穴マイクロプレートの表面に抗体を物理的吸着を行うこ

とにより、96穴マイクロプレートへの抗体の固相化を行った。

[0063] (2) ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体試料の調製

50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) 中に 12.6 pmol/mL のヘモグロビンおよび 12.6 pmol/mL のハプトグロビンを含む溶液を調製し、この溶液を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) で倍々希釈して、1.6、3.2、6.3 または 12.6 pmol/mL のヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含む試料を調製した。

[0064] (3) ELISA の測定方法

96穴マイクロプレートに標準液または検体 10 μ L を加え、3分間攪拌した後に、25°C で60分間静置した。静置後、界面活性剤含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて3回洗浄した。

[0065] 洗浄後、96穴マイクロプレートに酵素標識物 100 μ L を加え、3分間攪拌した後に、25°C で60分間静置した。静置後、界面活性剤含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて3回洗浄した。

[0066] 洗浄後、96穴マイクロプレートに 0.4 mg/mL オーフエニレンジアミン含有基質溶解液 100 μ L を加え、25°C で14分間静置した。静置後、3 N 硫酸を反応停止液として 100 μ L 添加した。

[0067] 測定は、サンライズレインボー (テカンジャパン社) を用いて測定波長 492/650 nm で行った。ラテックス等の不溶性担体に固定化することにより、ヘモグロビンと反応させたときには凝集反応がみられず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との特異的な反応が確認された、5C-2A と 79-8G-3F の組合せを用いた ELISA 法での測定結果を表4に示す。5C-2A と 79-8G-3F の組合せを用いた ELISA 法では、ヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体双方と反応しており、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出することはできなかった。

[0068]

[表4]

濃度* (pmol/mL)	ヘモグロビン (Δ Abs. $\times 10000$)	ヘモグロビン- ハプトグロビン複合体 (Δ Abs. $\times 10000$)
1. 6	6672	11165
3. 2	9632	16668
6. 3	12282	21758
12. 6	14382	24458

*:ヘモグロビンまたはヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の濃度

[0069] (実施例5 ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との特異的反応(3))

実施例2において、ヘモグロビンと反応させたときには凝集反応がみられず、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との特異的な反応が確認された、5C-2Aと79-8G-3Fの組合せについて、ラテックス凝集法でのヘモグロビンおよびヘモグロビン-ハプトグロビン複合体との結合の特異性を評価した。

[0070] (1) モノクローナル抗体固定化ラテックス溶液の調製

5C-2Aおよび79-8G-3Fのモノクローナル抗体を、実施例2と同様の方法でラテックス粒子に固定化してラテックス溶液とした。5C-2Aおよび79-8G-3Fのモノクローナル抗体を固定化したラテックス溶液を混合し、試験に供した。

[0071] (2) ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体試料の調製

50mM リン酸緩衝液(pH6.6)中に12.6pmol/mLのヘモグロビンおよび12.6pmol/mLのハプトグロビンを含む溶液を調製し、この溶液を50mM リン酸緩衝液(pH6.6)で倍々希釈して、1.6、3.2、6.3または12.6pmol/mLのヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を含む試料を調製した。

[0072] (3) ラテックス凝集法の測定方法

R1として50mM HEPES緩衝液(pH7.4)を用い、R2として上記のモノクローナル抗体固定化ラテックス溶液を用いた。測定は、日立

7170S形自動分析装置（日立ハイテクノロジー社製）を用いて行なった。測定方法は、標準液または検体15 μ Lを反応セルに加えた後に50 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）を100 μ L加え、その後モノクローナル抗体固定化ラテックス溶液を25 μ L加えた後の440秒間の波長660 nmでの濁度変化量を測定した。

[0073] （４）モノクローナル抗体固定化ラテックス粒子とヘモグロビン－ハプトグロビン複合体との反応

ELISA法では、ヘモグロビンおよびヘモグロビン－ハプトグロビン複合体双方との反応が確認された、5C-2Aと79-8G-3Fの組合せを用いたラテックス凝集法での測定結果を表5に示す。5C-2Aと79-8G-3Fの組合せは、ラテックス等の不溶性担体に固定化することにより、ヘモグロビンと反応させたときには凝集反応がみられず、ヘモグロビン－ハプトグロビン複合体との特異的に反応することが確認された。

[0074] [表5]

濃度* (pmol/mL)	ヘモグロビン (Δ Abs. $\times$ 10000)	ヘモグロビン－ ハプトグロビン複合体 (Δ Abs. $\times$ 10000)
1.6	-15	-2
3.2	-15	53
6.3	-1	199
12.6	11	652

*:ヘモグロビンまたはヘモグロビン－ハプトグロビン複合体の濃度

[0075] （実施例6 検体の測定（１））

従来法の一つのELISA法および本発明の方法を用いてヘモグロビン－ハプトグロビン複合体の測定を行なった。

[0076] （１）ELISA法によるヘモグロビン－ハプトグロビン複合体の測定

抗ヒトハプトグロビンモノクローナル抗体を96穴マイクロプレートに固相化して固相化プレートとし、抗ヒトヘモグロビンポリクローナル抗体にホースラディッシュペルオキシダーゼを標識化して酵素標識物とした。

[0077] 96穴マイクロプレートに50mM リン酸緩衝液(pH7.2)100 μ Lと標準液または検体10 μ Lを加え、5分間攪拌した後に、25℃で120分間静置した。静置後、界面活性剤含有50mM リン酸緩衝液(pH7.5)を用いて3回洗浄した。

[0078] 洗浄後、96穴マイクロプレートに酵素標識物100 μ Lを加え、5分間攪拌した後に、25℃で55分間静置した。静置後、界面活性剤含有50mM リン酸緩衝液(pH7.5)を用いて3回洗浄した。

[0079] 洗浄後、96穴マイクロプレートに0.4mg/mL オーフエニレンジアミン含有基質溶解液100 μ Lを加え、25℃で15分間静置した。静置後、2N 硫酸を反応停止液として100 μ L添加した。

[0080] 測定は、サンライズレインボー(テカンジャパン社)を用いて測定波長492/650nmで行ない、標準の測定結果から得られた検量線を基に検体の測定値を求めた。

[0081] (2) ラテックス凝集法によるヘモグロビン-ハプトグロビン複合体の測定
R1として50mM HEPES緩衝液(pH7.4)を用い、R2として実施例3のモノクローナル抗体固定化ラテックス溶液を用いた。

[0082] 測定は、JCA-BM2250(日本電子社)を用いて行なった。測定方法は、標準液または検体8 μ Lを反応セルに加えた後にR1を50 μ L加え、その後R2を16.7 μ L加えた後の471秒間の波長658nmでの濁度変化量を測定し、標準の測定結果から得られた検量線を基に検体の測定値を求めた。

[0083] (3) 測定結果

5検体をELISAおよびラテックス凝集法で測定した結果を表6に、測定間の相関図を図1に示す。

ラテックス凝集法による検体の測定結果は、ELISAによる検体の測定結果と同等で、相関係数は0.998と良好であった。なお、図1の数値の1はヘモグロビンとしての濃度が12.9 μ mol/mLを示している。

[0084]

[表6]

検体	ELISA法	ラテックス凝集法
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

[0085] これらの結果より、本発明を用いることにより、検体中のヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を精確に測定することが可能となり、病気の診断に寄与することが判った。

産業上の利用可能性

[0086] 本発明は、不溶性担体粒子に固定化することによりヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定することが出来るモノクローナル抗体若しくは抗体キット、およびそのモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、並びにこれらを用いて検体中のヘモグロビン－ハプトグロビン複合体を特異的に検出、測定するための測定試薬及び測定方法を提供するものである。この発明を糞便検体に適用することにより、消化器官での出血の有無を短時間で精度良く調べることが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] 抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体。
- [請求項2] 5C-2A（NPMD受領番号NITE ABP-02268）または12-9G-C（NPMD受領番号NITE ABP-02269）である、請求項1に記載の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体。
- [請求項3] 2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、前記2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を含む、抗体キット。
- [請求項4] 前記2種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が5C-2A（NPMD受領番号NITE ABP-02268）、7C-7B-8E（NPMD受領番号NITE ABP-02270）、1-5G-3C（NPMD受領番号NITE ABP-02271）、12-9G-C（NPMD受領番号NITE ABP-02269）、79-8G-3F（NPMD受領番号NITE ABP-02272）、およびSU112からなる群より選ばれる少なくとも2種類以上である、請求項3に記載の抗体キット。
- [請求項5] 前記抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体がマウス由来である、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体または抗体キット。
- [請求項6] 1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶

性担体粒子であって、前記モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

[請求項7] 前記1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が、5C-2A(NPMD受領番号NITE ABP-02268)または12-9G-C(NPMD受領番号NITE ABP-02269)の1種類である、請求項6に記載のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

[請求項8] 前記1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が、5C-2A(NPMD受領番号NITE ABP-02268)、7C-7B-8E(NPMD受領番号NITE ABP-02270)、1-5G-3C(NPMD受領番号NITE ABP-02271)、12-9G-C(NPMD受領番号NITE ABP-02269)、79-8G-3F(NPMD受領番号NITE ABP-02272)、およびSU112からなる群より選ばれる少なくとも2種類以上である、請求項6に記載のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

[請求項9] 前記抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体がマウス由来である、請求項6～8のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

[請求項10] 前記モノクローナル抗体を固定化する前記不溶性担体粒子が、ラテックス粒子または金属コロイド粒子である、請求項6～9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子。

[請求項11] 請求項6～10のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を含む、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定試薬。

[請求項12] 5C-2A(NPMD受領番号NITE ABP-02268)、

7C-7B-8E (NPMD受領番号NITE ABP-02270)、1-5G-3C (NPMD受領番号NITE ABP-02271)、12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269)、または79-8G-3F (NPMD受領番号NITE ABP-02272)である、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体。

[請求項13] 請求項1～5のいずれか1項に記載の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体または抗体キット、請求項6～10のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子、請求項11に記載の免疫学的測定試薬、あるいは、請求項12に記載の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を用いた、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定方法。

[請求項14] 1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を不溶性担体粒子に固定化することにより得られたモノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子を用いた、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体を特異的に検出するための免疫学的測定方法であって、前記モノクローナル抗体固定化不溶性担体粒子が、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体と凝集反応する反面、ヘモグロビンと凝集反応しない、免疫学的測定方法。

[請求項15] 前記1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268)または12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269)の1種類である、請求項14に記載の免疫学的測定方法。

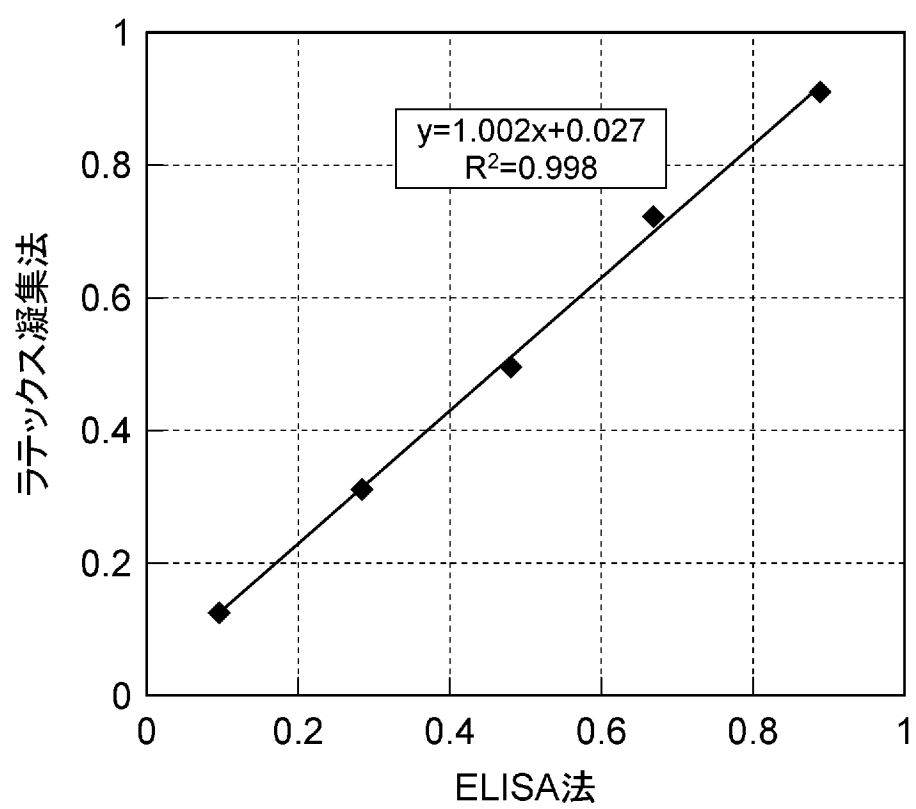
[請求項16] 前記1種類以上の抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体が5C-2A (NPMD受領番号NITE ABP-02268)、7C-7B-8E (NPMD受領番号NITE ABP-02270)、1-5G-3C (NPMD受領番号NITE ABP-02271)、12-9G-C (NPMD受領番号NITE ABP-02269)、79-8G-3F (NPMD受領番号NITE ABP-02272

）、およびSU112からなる群より選ばれる少なくとも2種類以上である、請求項14に記載の免疫学的測定方法。

[請求項17] 前記抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体がマウス由来である、請求項14～16のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法。

[請求項18] 前記抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を固定化する前記不溶性担体粒子が、ラテックス粒子または金属コロイド粒子である請求項14～17のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/019736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i

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, G01N33/545, G01N33/577, C07K16/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takashi MEGURO, "Measurement of Fecal Hemoglobin-Haptoglobin Complex as a New Diagnostic Tool of Lower Gastrointestinal Tract Diseases", Hokkaido Journal of Medical Science, 1994.07, vol.69, no.4, pages 995 to 1009, page 1006, right column, lines 5 to 7	1-18
A	Yasushi HAMAYA, "Performance of hemoglobin-haptoglobin complex detection in feces for colorectal cancer screening", Journal of Gastroenterological Cancer Screening, 2012, vol.50, no.3, pages 345 to 350, Review	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 July 2017 (25.07.17)

Date of mailing of the international search report
08 August 2017 (08.08.17)

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/JP2017/019736

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2015/0219658 A1 (SCHEBO BIOTECH AG), 06 August 2015 (06.08.2015), paragraph [0114] & WO 2014/008884 A1 & EP 2870477 A1 & KR 10-2015-0036388 A & CN 104781669 A	1-18
A	CHALKIAS, Athanasios, Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA, Am J Clin Oncol, 2011.12, Vol.34 No.6, Page.561-566, MATERIALS AND METHODS(Measurement of Fecal Hb- Hp Complex, MPO, and sIgA)	1-18
A	CN 101236210 A (Xuesheng WANG), 06 August 2008 (06.08.2008), (Family: none)	1-18
A	JP 2010-14586 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 21 January 2010 (21.01.2010), (Family: none)	1-18
A	JP 2001-221800 A (International Reagents Corp.), 17 August 2001 (17.08.2001), (Family: none)	1-18
A	WO 2010/013525 A1 (Nitto Boseki Co., Ltd.), 04 February 2010 (04.02.2010), & US 2011/0136261 A1 & EP 2309265 A1	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i

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))

Int.Cl. G01N33/53, G01N33/545, G01N33/577, C07K16/00

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/ BIOSIS (STN)

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
A	目黒高志, 便中Hb - Hp複合体測定による下部消化管疾患の新しい診断法の開発, 北海道医学雑誌, 1994.07, Vol.69 No.4, Page.995-1009, 1006 ページ右欄5行~7行	1-18
A	濱屋寧, ヘモグロビン - ハプトグロビン複合体を抗原にした検体検査による大腸がんスクリーニング能の検討, 日本消化器がん検診学会雑誌, 2012, Vol.50 No.3, Page.345-350, 考察	1-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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矛盾するものではなく、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

25.07.2017

国際調査報告の発送日

08.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三木 隆

2 J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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
A	US 2015/0219658 A1 (SCHEBO BIOTECH AG) 2015.08.06, [O 1 1 4] & WO 2014/008884 A1 & EP 2870477 A1 & KR 10-2015-0036388 A & CN 104781669 A	1-18
A	CHALKIAS, Athanasios, Patients with colorectal cancer are characterized by increased concentration of fecal hb-hp complex, myeloperoxidase, and secretory IgA, Am J Clin Oncol, 2011.12, Vol. 34 No. 6, Page. 561-566, MATERIALS AND METHODS (Measurement of Fecal Hb-Hp Complex, MPO, and sIgA)	1-18
A	CN 101236210 A (王学生) 2008.08.06, (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2010-14586 A (和光純薬工業株式会社) 2010.01.21, (ファミリ ーなし)	1-18
A	JP 2001-221800 A (国際試薬株式会社) 2001.08.17, (ファミリーな し)	1-18
A	WO 2010/013525 A1 (日東紡績株式会社) 2010.02.04, & US 2011/0136261 A1 & EP 2309265 A1	1-18