公告本

(100年 2月 2日修(更)正本

發明專利說明書

中文說明書替換本(100年2月)

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：093133021

※ 申請日期：93. 10. 28.　　※IPC 分類：G01N 33/576 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

C型肝炎病毒之檢測方法

METHOD FOR DETECTION OF HEPATITIS VIRUS C

二、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

日商先端生命科學研究所股份有限公司

ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.

代表人：（中文/英文）

伊藤 哲雄

ITOH, TETSUO

住居所或營業所地址：（中文/英文）

日本國埼玉縣和光市丸山台2丁目10番23號

10-23, MARUYAMADAI 2-CHOME, WAKO-SHI, SAITAMA 351-0112, JAPAN

國　籍：（中文/英文）

日本　JAPAN

三、發明人：（共 3 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 青柳 克己

AOYAGI, KATSUMI

2. 飯田 久美子

IIDA, KUMIKO

3. 長田 直子

NAGATA, NAOKO

國　籍：（中文/英文）

1.-3.均日本　JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2003年10月28日；特願2003-367783

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☑ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

1. 食品工業發展研究所；2005年1月13日；BCRC 960222

2. 食品工業發展研究所；2005年1月13日；BCRC 960223

3. 食品工業發展研究所；2005年1月13日；BCRC 960224

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

1. 日本；獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心;2003年09月25日；FERM BP-08493

2. 日本；獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心;2003年09月25日；FERM BP-08494

3. 日本；獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心;2004年06月01日；FERM BP-10032

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種用以檢測或定量血清中之C型肝炎病毒(HCV)關聯抗原之方法，以及一種使用於該等檢測以及定量中極為簡便且操作性高之檢體處理法。

【先前技術】

HCV係由於體內病毒量少或未確立有活體外之增殖系，因此即使現在亦無法獲得使用有天然病毒粒子或純化病毒蛋白的免疫血清。人類血清中，根據個體差別而生成對應於抗原之不同抗體；又，亦存有一種雖然含有對應於某區域抗原之抗體，但完全未含有對應於其他區域抗原之抗體之個體。進而，因其係多株抗體，故而亦含有對應於HCV以外物質之抗體，必須充分考慮到交叉反應等從而判定HCV抗體檢查結果。

因HCV感染後不會立即生成抗體，故而於血液中出現抗體之前被稱為空窗期的期間，完全無法檢測出抗體。又，關於治療C型肝炎患者，雖然各種干擾素或核病毒素(Ribavirin)較為有效，但該治療方法之選擇以及經過觀察中僅測定抗體較不充分。於如此之狀況中，包含確定診斷且可檢測出病毒抗原以及基因的方法受到關注。

HCV基因檢測方法中，存有NAT(核酸擴增法)或DNA探針法，現已廣泛應用於臨床現場。NAT檢查法具有高靈敏度，但另一方面仍存有幾個難以解決的問題。例如，為了實施PCR(聚合酶連鎖反應)法，由於HCV為RNA病毒故而

必須逆轉錄至DNA，由於自RNA轉錄至DNA時容易產生損失，容易引起污染，必須設置特殊的擴增設備等並且操作較為繁雜，故而無法一次處理大量檢體，又，檢查成本亦較高等。即使其他NAT中，亦可列舉出必須設置特殊的擴增設備等且檢查成本亦較高等情形。DNA探針法之檢測靈敏度較低，至獲得結果為止約需要20小時(醫學與藥學31：961-970、1994)。

又，檢測HCV基因方法之較大問題點之一在於檢體中HCV RNA穩定性較低，還指出有由於血清取得步驟、中長期保存、凍結解凍操作而造成定量值降低等問題。可認為其原因在於：只要HCV粒子表面稍微產生傷痕，血液中之RNA分解酶就開始作用，亦容易分解HCV RNA。綜上所述，為可常規性使用，則必須細心注意其操作或保存事宜。

作為檢測HCV本身之方法，檢測除HCV RNA以外之HCV抗原的方法受到關注。

作為HCV抗原檢測法，如日本專利特開平8-29427所示，嘗試使用對於HCV核心抗原上之抗原決定部位具有特異性之單株抗體，自血清中檢測出核心抗原。該測定方法與PCR法相比，價格便宜且可於較短時間(約3小時)內獲得結果，而另一方面於幾點上具有較大的實用性問題。

即，為處理檢體(血清)，必須實施聚乙二醇處理(4℃下1小時)、離心操作(15分鐘)、去除上清液、尿素處理、鹼處理(30分鐘)以及添加中和劑等多階段處理步驟。考慮到如

此操作較為繁雜，故而為獲得再現性必須要求熟練度，又，因處理時間需要約2小時，故而無法一次處理大量檢體。

又，因將會實施離心操作、去除上清液等步驟，故而實施自動化非常困難。加之，因靈敏度低於PCR法10~100倍，故而臨床上有用性較低。於(Jounal of Hepatology 23：42-45、1995)中，作為HCV RNA量則於10^4~10^5拷貝/ml間存有檢測界限，於(醫學與藥學6：1065-1070、1996)中，使用102例C型慢性肝炎患者之治療前血清經過測定之結果：使用CRT(競爭性逆轉錄)-PCR法時，相對於陽性率100%實質上僅表示出與上述DNA探針法大致同等之陽性率(67%)。藉此，於靈敏度方面存有較大討論餘地。

日本專利第3176570號以及日本專利第3171827號中所示之兩個HCV抗原檢測法，該等方法不需要實施包含成為上述日本專利特開平8-29427中所示之HCV抗原檢測法缺點的離心操作等多階段處理步驟，從而可以僅於30分鐘內實施1~2個步驟之速度處理含有HCV之檢體，進而可以高靈敏度檢測HCV抗原。又，藉由操作之簡單化，從而可一次處理大量檢體並且再現性或精度亦較高。進而，該測定方法與NAT相比，價格便宜且可於短時間內獲得結果。

但是，作為臨床上有用性更高之測定方法，因考慮到靈敏度、特異性、再現性、操作性、短時間化以及低成本方面，故而必須以滿足該等全部要求為目標積極加以開發。

日本專利第3176570號以及日本專利第3171827號中所示

之兩個HCV抗原檢測法中，檢體之處理時間需要30分鐘，但業者希望將其進一步短時間化。

特別是，現在，推進醫院經營合理化之美國正急速擴大POCT(point of care testing，重點照護檢驗)檢查，從而可預測到今後以日本為首的國家將會於全球範圍內引進該檢查。其係一種方法，該方法因於患者近旁實行檢查，醫師可立即判斷檢查結果並且迅速實施治療，涉及治療過程或直至預後監控為止，非常有助於提高治療質量，故而受到關注。POCT與於中央檢查室中實行檢查之情形相比，可降低搬運檢體或設備所需之成本，對患者而言，只需來醫院一次，即可接受檢查與快速治療，從而可減輕患者負擔。今後，為對應於如此之要求，必須盡可能縮短檢體之處理時間。

進而，HCV感染患者血液內HCV粒子本身極少故而HCV抗原亦較少，因此業者希望能有更高靈敏度之檢測方法。

專利文獻1　日本專利特開平8-29427號公報

專利文獻2　日本專利第3176570號

專利文獻3　日本專利第3171827號

專利文獻4　日本專利特開平8-29427號公報

專利文獻5　日本專利第3176570號

非專利文獻1　醫學與藥學31：961-970、1994

非專利文獻2　Jounal of Hepatology 23：42-45、1995

非專利文獻3　醫學與藥學6：1065-1070、1996

【發明內容】

HCV於感染患者體內病毒粒子本身極少，因此包含於患者血液中之HCV抗原亦較少。又，可推定較多感染者(帶原者)經過10~30年將會轉變為肝硬化或肝癌，故而重要的是早期發現與早期治療。又，根據對於HCV感染者治療或預後之推定，重要的是把握病況，故而業者強烈希望測定更具意義的HCV關聯標記物(抗原)。又，作為臨床上有用性更高之測定方法，靈敏度、特異性、再現性、短時間化、操作性(全自動化)以及低成本成為有待解決之課題，必須以滿足該等全部要求為目標積極加以開發。

即，業者希望可更簡便且高收率地獲得血清中之HCV粒子、特別是HCV抗原的方法，其高靈敏度檢測以及定量法之開發。

故而，本發明之目的在於提供一種高靈敏度HCV抗原檢測以及定量法，其適用於使用可用於一般全自動測定機器等中之溫度，以更短時間(簡便)處理健康診斷等所謂篩選用途之多數個檢體。

即，提供一種HCV抗原檢測以及定量法，其係以同等或高於NAT之高靈敏度，於更短時間內簡便且無需使用高溫度而游離檢體中之HCV抗原的處理方法，藉此可適用於一般全自動測定機器者。又，本發明之目的在於提供一種特異性識別HCV抗原之單株抗體以及生成該單株抗體之融合瘤以及使用該等從而高靈敏度地檢測以及測定之方法。

[解決課題之手段]

因HCV於感染者血液中濃度(10^2~10^7拷貝/ml)極低，故

而為檢測出病毒抗原而要求有極高之靈敏度。一般，於使用用以捕捉作為標的之抗原之抗體作為探針為代表之免疫測定法等中，作為提高檢測靈敏度之方法，可考慮1)增加作為標的之抗原分子數，2)提高與標的抗原結合之探針結合性以及增加探針量，3)減少非特異性反應，以及4)增加使用於檢測之訊號強度，藉由組合該等方法從而可提高靈敏度。

現今，HCV本身構造雖然尚未明確，但根據類緣之黃病毒構造或一般病毒相關資訊，可推定血液中HCV粒子係於藉由含有包膜抗原(E1，E2)之外皮蛋白質所包圍之狀態中存在者，該包膜抗原(E1，E2)係藉由核心抗原填充基因組RNA，以包圍其之方式錨定至脂質膜者。又，亦報告有血液中HCV粒子係以與LDL(低密度脂蛋白質)等會合狀態存在之情形，進而考慮到血液中存在有對應於包膜抗原之源自宿主之抗體，從而可預測亦可作為HCV粒子與對應於包膜抗原之抗體相結合的免疫複合體存在之情形。

又，可預測血液中亦存在有大體對應於HCV抗原之源自宿主之抗體，檢測HCV抗原時，捕捉用探針與檢測用探針將會相互競爭之情形。只要本申請案中未特別加以限制，則所謂HCV抗原係指編碼HCV基因組RNA的蛋白質。即，包含可考慮為構造蛋白質之核心抗原、E1抗原、E2抗原，或包含可考慮為非構造蛋白質之NS2、NS3、NS4、NS5抗原等。

於包含HCV抗原之檢體中，藉由HCV抗原以及抗體可形

成有病毒粒子或免疫複合體。其中，例如為檢測HCV核心抗原，必須實施I)破壞HCV粒子，自HCV粒子游離核心抗原同時將核心抗原單分子化，II)使對應於源自宿主之HCV抗原的抗體不活化或去除，III)根據與對應於HCV抗原之抗體以外之其他血液中成分的相互作用從而游離核心抗原。為了去除對應於HCV抗原之抗體，雖然可藉由離心操作或親和性管柱操作等去除卻會增加處理步驟，故而希望實施不活化。

即，自HCV粒子、對應於HCV抗原之抗體以及其他血液中成分等，將包含於所規定之檢測系中加以限定之檢體量的核心抗原游離為最大限單分子狀態之情形，將會增加可與探針反應之抗原分子數。本發明中，藉由短時間且簡便之檢體處理，使其游離為最大限單分子狀態，可進一步提高與探針之反應性。

故而，本發明所提供之發明之一在於一種於短時間內藉由簡單操作，使檢體中之HCV核心抗原處理為適合於使用探針之檢測狀態之處理方法。進而，本發明之目的在於提供一種為了檢測檢體中之HCV核心抗原而於短時間內藉由簡單處理對應於HCV核心抗原之抗體同時使其非活化之處理方法，上述HCV核心抗原係與捕捉用探針或檢測用探針相互競爭且源自宿主者。

根據本發明，藉由使用所示之處理方法，使存在於檢體中之HCV核心抗原自病毒粒子或免疫複合體游離，藉由使對應於檢體中同時存在之HCV核心抗原的人類抗體同時不

活化，例如藉由使用有如抗體之探針的免疫測定法從而可容易且高靈敏度地檢測。

進而，本發明係提供一種處理檢體之步驟自含有HCV關聯抗原之檢體，成為適合於形成HCV核心抗體與探針，例如形成與抗體之免疫複合體的狀態，故而自病毒粒子游離，藉由使同時存在於檢體中之HCV關聯抗原所對應之人類抗體同時不活化之處理劑從而處理檢體者；提供一種藉由例如使用例如抗體之探針的免疫測定法，檢測以及定量所游離之HCV關聯抗原者；以及有關其中所用之檢查套組。

使用於檢測之探針例如抗體，其係特異性結合至HCV核心抗原者，只要係具有一定地高親和性者即可，但用以捕捉經過處理之檢體中HCV核心抗原的探針之一，較好是識別地結合HCV核心抗原之C端側。此處，所謂核心抗原之C端側，其係指自HCV核心抗原之胺基酸序列第81號至第160號序列或其一部分。特別是識別HCV核心抗原之胺基酸序列號之100-120、111-130之抗體，即識別100-130之抗體特別有用。

此處所述之探針若係對於HCV核心抗原具有較高特異性、親和性之分子，即可使用下述者：將小鼠、大鼠、土撥鼠、兔子、雞、山羊、綿羊以及牛等實驗動物實施免疫所獲得之多株抗體；自經過免疫之個體分離脾臟細胞等，與骨髓瘤細胞等融合，藉此獲得之融合瘤所生成之單株抗體；或藉由EB病毒使脾臟細胞、血液中白血球不死化之細

胞所生成的單株抗體；感染HCV之人類、黑猩猩等所生成之單株抗體；藉由將下述可變區域基因片段與免疫球蛋白正常區域基因片段組合所構成之重組抗體基因從而得以轉化的細胞所生成之重組抗體，上述可變區域基因片段係自小鼠、人類等之免疫球蛋白之cDNA、染色體DNA所獲得之可變區域基因片段，或藉由組合免疫球蛋白之cDNA、染色體DNA一部分與人工製作之序列所構成之可變區域基因片段，使用人工基因序列所構成之可變區域基因片段，或藉由基因重組方法將該等製作於材料上之可變區域基因片段；將上述可變區域基因片段與例如噬菌體之構造蛋白質融合所製成之噬菌體抗體；藉由將上述可變區域基因片段與其他合適基因片段例如myc基因之一部分等組合所構成之重組抗體基因從而得以轉化的細胞所生成之重組抗體；特異性結合至受體等蛋白質的分子或將其改變所獲得之探針；以及藉由其他組合化學技術所製作之探針等。

本發明中，作為上述探針之一，取得結合至HCV核心抗原之單株抗體。如下所述，可作成單株抗體。例如，於BALB/c小鼠等腹腔內或皮內，將包含HCV核心區域之融合多肽或多肽單獨作為抗原或作為與BSA、KLH等結合之抗原，與各種助劑混合後定期實行免疫。於血液中抗體價上升之時點，將本抗原作為追加免疫投藥至尾靜脈內，無菌性摘出脾臟後，與適當小鼠骨髓腫細胞株實施細胞融合從而獲得融合瘤。本方法係可根據Kehler與Milstein之方法(Nature 256：495-497、1975)加以實施。

將藉由上述方法所獲得之融合瘤細胞株於適當培養液中培養，其後選擇對於本抗原具有特異性反應之抗體生成融合瘤細胞株從而實施純系化。於抗體生成融合瘤之純系中，除截止(cut-off)稀釋法以外亦可利用軟瓊膠法(Eur. J. Immunol. 6：511-519、1976)等。並且，藉由蛋白質A等之管柱層析法等方法純化所生成之單株抗體。又，除上述單株抗體以外，亦可製作作為探針使用之分子。例如，關於重組抗體，詳細揭示於Hoogen boon概述等中(Trends in Biotechnology、15：62-70、1997)。

根據本發明所調製之單株抗體，其於酶連結免疫吸附分析法(ELISA)、酶ImmunoDOT分析法、放射免疫分析法、根據凝集之分析法或其他眾所周知之免疫分析法中可作為檢查試劑使用，用於檢測以及定量HCV核心抗原。又，檢測中使用有標識化抗體之情形時，作為標識化合物可使用例如螢光物質、化學發光物質、放射性物質、酶以及染色物質等。

例如，為檢測檢體(血清)中之源自HCV構造蛋白質而使用將三明治反應系作為原理之方法之情形時，應使用之診斷套組包含由固體支持體(例如微量滴定孔盤內壁)覆蓋之本發明之一種以上單株抗體以及與標識物質結合之一種以上單株抗體或其片段。可自由組合於固體支持體上固相化之單株抗體以及所標識之單株抗體，可選擇獲得高靈敏度之組合。

作為可使用之固體支持體，可列舉聚苯乙烯或聚碳酸

酯、聚丙烯、聚乙烯基製之微量滴定盤、試管、毛細管、小球(乳膠粒子或紅血球、金屬化合物等)、膜(脂質體等)以及過濾器等。

本發明中，藉由免疫測定法測定以酸化劑處理之檢體之核心抗原。此時，使用對應於HCV核心抗原之單株抗體加以測定。如實施例所示，將於固相化抗體中使用有兩種單株抗體以及於用以檢測之標識抗體中使用有兩種單株抗體的檢測系，與於固相化抗體中使用有三種單株抗體以及於用以檢測之標識抗體中使用有兩種單株抗體的檢測系進行比較。其結果為，於固相化抗體中使用有三種單株抗體以及於用以檢測之標識抗體中使用有兩種單株抗體的檢測系，其反應性提高。認為其效果在於：於固相化抗體中使用有三種單株抗體。因此，本發明亦提供一種使用有單株抗體之HCV核心抗原的免疫測定法。可表示出下述情形：於固相化抗體中，使用有三種可識別HCV核心抗原之C端側胺基酸序號100-120或111-130的抗體者，其反應性高於使用有兩種可識別HCV核心抗原之C端側胺基酸序號100-120或111-130的抗體者。

【實施方式】

作為本發明之檢體，包含全血、血漿、血清、尿液、唾液、腦脊髓液等生物學性體液以及肝組織等。

使存在於檢體中之抗體活性失活之條件，已知有鹼處理、酸處理等。若將血清等實施酸處理，則會非可逆地改性一部分源自血清之蛋白質等，根據不同情形將會生成沉

澱或白濁。因此，檢體經過酸處理後，處理檢體之移液操作中大多將會造成阻塞等障礙，又，測定時捕捉作為標的之抗原之抗體等探針所結合之載體或以固相狀態捲入有改性蛋白質等之沉澱被吸著，故而呈疑陽性。加之，因該等沉澱物中捲入有作為標的之抗原，減少可與探針結合之抗原量，故而產生所謂靈敏度降低之問題點。

本發明係藉由添加其他物質至酸化劑中之處理，可防止由於酸處理所造成之沉澱或白濁等非可逆之改性，或可防止疑陽性以及提高靈敏度。

此處，作為酸化劑，較好是鹽酸、硫酸、醋酸、三氟醋酸以及三氯醋酸等。特別是，較好是酸化劑濃度於處理時濃度為0.13 N以上、1 N以下，尤其好的是0.5 N~1 N。該情形時，添加有酸化劑之檢體係以pH值2.5以下實施處理，大部分檢體係以pH值2.0以下實施處理。

作為添加至酸化劑中之物質之一，可考慮界面活性劑。眾所周知有各種界面活性劑具有破壞蛋白質高次構造的作用，具有破壞病毒粒子膜或使對應於檢體中之標的抗原之抗體改性，或可溶化非溶性蛋白質之效果。但是，於如此之界面活性劑之存在條件下，作為標的之抗原構造抗原決定部位亦遭到破壞，與抗原捕捉用抗體等探針之結合變弱且靈敏度降低均成為較大問題。

又，另一方面界面活性劑之改性作用大多具有可逆性，存有藉由稀釋或透析等界面活性劑濃度變淡之處理，使暫時改性之構造恢復原狀之情形。該情形時存在有與捕捉作

為標的之抗原之探針或檢測用探針相互競爭之源自檢體之抗體，作為其結果，靈敏度將會明顯降低。即，即使添加界面活性劑，亦會具有如上所述之兩面性。又，界面活性劑根據該等構造或性質，可分類為幾種。離子型中存有陰離子性、陽離子性、兩性離子性以及非離子性界面活性劑等。

該等界面活性劑中，本發明者發現藉由組合使用酸化劑，以及特別是同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑，從而可消除沉澱物等酸處理所造成之問題點，檢體中抗體之可逆性改性等界面活性劑處理所造成之問題點，從而對於HCV抗原檢測具有較大靈敏度提高效果，因而完成本發明。

進而，發現尤其好的是由酸化劑與該界面活性劑所構成之處理劑中，添加TritonX100等聚氧乙烯異辛基苯基醚類或NP40等聚氧乙烯壬基苯基醚類等非離子性界面活性劑，或添加尿素、硫代尿素等蛋白質改性劑，或添加半胱胺酸、半胱胺、二甲胺基乙硫醇、二乙胺基乙硫醇以及二異丙胺基乙硫醇等還原劑。

即，本發明係提供一種含有HCV檢體之處理方法，其特徵在於：以處理劑處理含有HCV之檢體，藉此游離HCV抗原與破壞結合至HCV抗原之抗體，上述處理劑含有(1)酸化劑，(2)同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界

面活性劑，以及(3)蛋白質改性劑、非離子性界面活性劑或還原劑。

又，發現藉由添加(3)蛋白質改性劑、非離子性界面活性劑或還原劑，或代替該等而添加單糖類、二糖類、檸檬酸或檸檬酸鹽類，從而可增強本發明之效果。

作為同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑，較好是N-十二烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽、N-十四烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽以及N-十八烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽等。

又，作為同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、第三級胺或第四級銨鹽的陽離子性界面活性劑，較好的是癸基三甲基氯化銨、十二烷基三甲基氯化銨、十四烷基三甲基氯化銨、十六烷基三甲基氯化銨、癸基三甲基溴化銨、十二烷基三甲基溴化銨、十四烷基三甲基溴化銨、十六烷基三甲基溴化銨、月桂基氯化吡啶鎓、十四烷基氯化吡啶鎓以及鯨蠟基氯化吡啶鎓等。

如此之同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑濃度，較好是處理時濃度為0.1%以上、15%以下，尤其好的是0.5%~10%。

作為於酸化劑以及同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑

或陽離子性界面活性劑濃度存在下之非離子性界面活性劑，較好是TritonX100等聚氧乙烯異辛基苯基醚類或NP40等聚氧乙烯壬基苯基醚類或Tween80等聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯類等，較好是該等之濃度於處理時濃度為1%以上、7.5%以下，尤其好的是1%以上、5%以下。本發明揭示之百分率係以重量/質量×100%表示。

作為於酸化劑以及同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑濃度存在下之蛋白質改性劑，較好是尿素、硫代尿素等，較好是該等之濃度於處理時濃度為0.5 M以上，尤其好的是1 M以上、未達4 M，但於溶解性等不成為問題之情形時，例如於檢體處理用試管中預先添加粉末狀尿素等之情形時，亦可使用達10 M。

作為於酸化劑以及同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑濃度存在下之還原劑，較好是半胱胺酸、半胱胺、二甲胺基乙硫醇、二乙胺基乙硫醇以及二異丙胺基乙硫醇等，較好是該等之濃度於處理時濃度為0.25 mM以上、1000 mM以下，尤其好的是1.5 mM以上、200 mM以下。

作為添加至酸化劑以及同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑中之單糖類或二糖類，較好是麥芽糖、蔗糖、海藻糖、甘露糖、果糖、葡萄糖、山梨糖

醇、半乳糖以及右旋葡萄糖。又，添加至酸化劑以及同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑中的檸檬酸或檸檬酸鹽類，較好的是檸檬酸、檸檬酸水合物、檸檬酸鈉鹽以及檸檬酸鉀鹽。

作為添加於酸化劑中之其他物質，可考慮尿素等蛋白質改性劑。尿素等蛋白質改性劑，其具有藉由弱化氫離子結合而可部分破壞蛋白質高次構造之作用為已知，可破壞病毒粒子膜或使對應於檢體中之標的抗原的抗體改性。又，亦具有自作為非溶性區份之包涵體，使例如大腸菌中所表現之重組蛋白質可溶化等，使非溶性沉澱物可溶化之效果。但是，於尿素等蛋白質改性劑之存在條件下，作為標的之抗原構造抗原決定部位亦遭到破壞，使與抗原捕捉用抗體等探針之結合變弱，靈敏度降低均成為較大問題。

又，另一方面尿素等蛋白質改性劑之改性作用大多具有可逆性，存有藉由稀釋或透析等使蛋白質改性劑濃度變淡，從而將暫時改性之構造恢復原狀之情形。該情形時存在有與捕捉作為標的之抗原之探針或檢測用探針相互競爭之源自檢體之抗體，作為其結果，靈敏度明顯降低。即，添加尿素等蛋白質改性劑時，將會具有如上所述之兩面性。

本發明者發現藉由組合使用酸處理與蛋白質改性劑處理，從而可消除沉澱物等酸處理所造成之問題點，檢體中抗體之可逆性改性等蛋白質改性劑處理所造成之問題點，

因而完成本發明另一發明。

本發明者發現酸處理時添加1 M以上作為蛋白質改性劑之一之尿素，藉此可大幅度減少由於酸處理所造成之沉澱物形成。作為該蛋白質改性劑，較好是尿素、硫代尿素等。又，較好是蛋白質改性劑濃度於處理時濃度為1 M以上，尤其好的是1.5 M以上、8 M以下。進而，發現於由酸化劑與蛋白質改性劑構成之處理劑中，添加TritonX100等聚氧乙烯異辛基苯基醚類或NP40等聚氧乙烯壬基苯基醚類等非離子性界面活性劑，藉此可獲得提高靈敏度等效果。進而，亦可於由酸化劑與蛋白質改性劑構成之處理劑中添加還原劑。

綜上所述，本發明係提供一種含有HCV檢體之處理方法，其特徵在於：以處理劑處理含有HCV(C型肝炎病毒)之檢體，藉此游離HCV抗原與破壞結合至HCV抗原之抗體，上述處理劑含有(1)酸化劑，以及(2)蛋白質改性劑或同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑。

又，本發明係提供一種含有HCV檢體之處理方法，其特徵在於：以處理劑處理含有HCV之檢體，藉此游離HCV抗原與破壞對應於HCV抗原之抗體，上述處理劑含有下述(1)、(2)中至少一種以上物質以及(3)中至少一種以上物質。

(1)、(2)、(3)物質，其係(1)酸化劑、(2)蛋白質改性劑、

(3)非離子性界面活性劑或還原劑。進而，本發明之處理亦可於高溫下實行，但較好是20℃~50℃，尤其好的是25℃~42℃。

藉由使用本發明之處理方法，明確地可自包含與HCV具有相同構造之病毒粒子的檢體，使病毒抗原游離為適合於使用探針之測定方法之狀態。此處，所謂與HCV具有相同構造之病毒，係指形成具有包含填充基因組RNA、DNA之蛋白質、將其包圍之膜蛋白質與脂質膜構造之病毒粒子的病毒；或形成具有包含填充基因組RNA、DNA之蛋白質、將其包圍之脂質膜構造之病毒粒子的病毒；或形成具有包含內包基因組RNA、DNA之蛋白質以及脂質膜構造之病毒粒子的病毒。

例如，包含作為HCV類緣病毒之黃病毒類、人類免疫不全病毒等之逆轉錄病毒等。進而，包含作為如具有基因組DNA之B型肝炎病毒之基因組而具有DNA者，或雖然未具有包膜蛋白質但具有填充基因組DNA之蛋白質的人類細小病毒等。

實施例

下述實施例可例證本發明，但並非藉此限制本發明之範圍。

實施例1. 融合瘤之製作法

將藉由日本專利第3171827號揭示之方法所調製之融合HCV核心蛋白質(Trp C11)以6 M尿素溶解後，以包含0.15 M NaCl的10 mM磷酸緩衝液(pH值7.3)稀釋至終濃度為

0.2~1.0 mg/mL，與等量TiterMax混合，從而製成Trp C11懸浮液。將以Trp C11濃度成為0.1~0.5 mg/mL之方式所調製之該懸浮液投藥至4~6週齡BALB/c系小鼠腹腔內。兩週後實施相同免疫，進而約兩週後，以將Trp C11設為0.01 mg/mL之方式所調製之生理鹽水溶液投藥至尾靜脈內。

於最終追加免疫後第三天，自該免疫動物無菌性地摘出脾臟，以剪刀製成切片，進而使用網篩將脾臟分解為各個細胞，以RPMI-1640培養基洗淨三次。於8-氮雜鳥嘌呤存在條件下培養數日，將完全去除恢復突變體之對數增殖期的小鼠骨髓腫細胞株SP2/0Ag14以與上述相同之方式洗淨後，將該細胞1.8×10^7個與脾臟細胞1.0×10^8個加入至50 mL容積離心管中混合。實施200×g、5分鐘離心分離，去除上清液後添加在37℃保溫且含有50%聚乙二醇4000(PEG4000；Merck公司製造)的RPMI-1640培養基1 mL從而實施細胞融合。

融合細胞係藉由離心分離(200×g、5分鐘)去除PEG4000後，使用96孔盤，於含有次黃嘌呤、胺基喋呤以及胸腺啶(以下簡稱為HAT)的RPMI-1640培養基中培養1~2週，僅使融合瘤增殖。其後，於未包含HAT之培養基中培育，藉由ELISA法篩選約兩週後生成目的抗體之純系，從而獲得可生成具有所期望反應特異性之本發明之單株抗體的融合瘤。

關於所獲得之融合瘤，根據常法之截止稀釋法，篩選作為目的之抗體之生成株以及實施單一純系化，將所獲得之

融合瘤分別命名為HC11-14、HC11-10、HC11-15、HC11-3、HC11-11、HC11-7、HC11-9以及HC11-21。關於HC11-14(FERM BP-6006)、HC11-10(FERM BP-6004)、HC11-3(FERM BP-6002)、HC11-11(FERM BP-6005)以及HC11-7(FERM BP-6003)之融合瘤係於平成9年7月4日，關於HC11-15(FERM BP-6782)係於平成11年7月16日，關於HC11-9(FERM BP-08493)、HC11-21(FERM BP-08494)融合瘤係於平成15年9月25日，寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心(茨城縣築波市東1丁目1番地1中央第6)。最近，HC11-9、HC11-21之融合瘤係於2005年1月13日寄存於台灣食品工業研究所，寄存編號分別為BCRC 960223、BCRC 960224。

實施例2. 單株抗體之製作法

將藉由實施例1揭示之方法所獲得之融合瘤，移殖至以姥鮫烷等處理之小鼠腹腔內，取得於腹水中生成之單株抗體。該單株抗體之純化，係藉由結合蛋白質A的瓊脂糖(Sepharose)管柱從而分離IgG區份。

自上述8種融合瘤所生成之各種單株抗體，即C11-15、C11-14、C11-10、C11-7、C11-9、C11-11、C11-21以及C11-3 同型，使用小鼠Ig各同型套組(Zymed公司製造)用以證明C11-10、C11-7為IgG2a，C11-14、C11-3、C11-9、C11-21、C11-11以及C11-15為IgG1。對於所獲得之各種單株抗體，使用自源自HCV核心區域之序列重複合成每10個胺基酸的約20個胺基酸肽從而實施抗原決定部位解析。

C11-14、C11-10、C11-7以及C11-3識別揭示於日本專利第3171827號之序列。C11-9、C11-21分別識別 ^{21}DVKFPGGGQIVGGVYLLPRR^{40} 與 ^{100}PRGSRPSWGPTDPRHRSRNVG^{120}序列。即，C11-9係識別HCV核心抗原之胺基酸號21-40序列之單株抗體，C11-21係識別HCV核心抗原之胺基酸號100-120序列之單株抗體。

實施例4. 討論檢體處理條件

(討論處理條件)

1)酸化劑濃度：於HCV抗原陰性檢體或HCV抗原陽性檢體(#19、#86、#89、#92-4、#96)100 μL中添加各種鹽酸濃度之水溶液50 μL，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，使用下述所示之測定法實行討論。

於96孔微量盤(Costar High Binding Plate)中，以4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(等量混合c11-3與c11-7)，於4℃中培育一晚。

以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1從而培育2小時。去除阻斷液後，將含有中和劑之反應緩衝液100 μL與以各種檢體處理法所獲得之測定試料添加至各孔中攪拌並且於室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次，進而添加200 μL經過過氧化酶(HRP)標識之單株抗體(同量混合C11-10與C11-14)，於室溫下反應30分鐘。以

洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml之0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育30分鐘。

添加50 μL之5 N硫酸用以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度，將其結果示於圖1。再者，圖1所示之鹽酸濃度係以混合檢體(Sample)與處理劑後之處理時濃度表示。

HCV陽性檢體(＃19、＃86、＃89、＃92-4、＃96)即使以未含有鹽酸之溶液於37℃中培育10分鐘，亦幾乎無法檢測核心抗原活性，但根據處理時之鹽酸濃度0.167 N可確認核心抗原活性，以0.5~0.867 N為峰值。又，對於代替鹽酸而使用硫酸之情形加以討論，可獲得大致相同效果。

2)酸化劑共存下之各種界面活性劑濃度：於HCV抗原陰性檢體或HCV抗原陽性檢體(＃110、＃120、＃117、＃89)100 μL中，添加50 μL將各種界面活性劑溶解至1.5 N鹽酸濃度之水溶液，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，藉由1)中所述之方法加以討論(表1~表4)。

如表1~表4所示，可判斷出4例檢體中之2例存有具有高於各種檢體判定基準之反應性的界面活性劑添加效果。其結果為，若添加如鹽酸或硫酸之酸化劑與各種界面活性劑，則可確認有HCV核心抗原陽性檢體中之核心抗原免疫活性得到較大提高之界面活性劑。可確認添加效果者，係同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性

劑。

同分子中含有8個以下之碳數之單鏈烷基、與第四級銨鹽的界面活性劑，其無法確認有添加效果。又，同分子中含有10個之碳數之單鏈烷基與第二級胺的如MEGA-10之非離子性界面活性劑，其效果較為微弱。如TritonX100或Tween20之非離子性界面活性劑或如CHAPS之具有類固醇骨架之界面活性劑，其未顯示出反應性提高。幾乎無法確認十二烷基硫酸鈉(SDS)之效果，以2.5%以上之高濃度於與檢體之反應中生成白色沉澱。此外，雖然亦討論過N-月桂醯基肌胺酸鈉或脫氧膽酸等，但於與酸化劑共存條件下，其溶解性較為不良因而無法行討論。

於酸化劑中添加同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑，藉此可確認測定靈敏度之提高。自該酸化劑與界面活性劑之處理劑中除去酸化劑，僅以具有效果之界面活性劑實施處理，但其測定靈敏度大幅度降低。根據該情形可知：測定靈敏度之提高係以酸化劑為基礎，並且藉由添加界面活性劑從而得以大幅度提高。

表 1

添加於0.5 N HCl之洗劑	濃度 %	HCV核心抗原陽性樣本			
		#110	#120	#117	#89
無添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗劑添加效果之判定基準		0.053	0.217	0.209	0.547
月桂基氯化吡啶鎓	0.50	0.069	0.305	0.598	0.542
	1.25	0.086	0.362	1.120	0.611
	1.67	0.128	0.304	1.038	0.559
	2.50	0.025	0.232	0.823	0.660
	3.33	0.064	0.062	0.757	0.415
$[C_5H_5NCH_2(CH_2)_{10}CH_3]Cl$	5.00	0.010	0.015	0.123	0.227
鯨蠟基氯化吡啶鎓	0.50	0.057	0.159	0.222	0.342
	1.25	0.274	0.135	0.445	0.503
	2.50	0.106	0.405	0.768	0.586
癸基三甲基氯化銨	0.50	0.074	0.303	0.449	0.686
	1.25	0.139	0.355	1.241	0.904
	1.67	0.112	0.347	1.291	0.661
	2.50	0.180	0.375	0.660	0.464
	3.33	0.122	0.317	1.185	0.504
$[CH_3(CH_2)_9N(CH_3)_3]Cl$	5.00	0.101	0.228	0.953	0.462
十二烷基三甲基氯化銨	0.50	0.117	0.280	0.810	0.705
	1.25	0.159	0.306	1.416	0.771
	1.67	0.159	0.332	1.265	0.846
	2.50	0.199	0.445	0.672	0.921
	3.33	0.106	0.300	1.151	0.468
$[CH_3(CH_2)_{11}N(CH_3)_3]Cl$	5.00	0.054	0.206	0.746	0.253
十四烷基三甲基氯化銨	0.50	0.048	0.219	0.389	0.450
	1.25	0.130	0.282	0.965	0.636
	1.67	0.104	0.274	0.729	0.409
	2.50	0.102	0.326	0.818	0.552
	3.33	0.057	0.154	0.436	0.284
$[CH_3(CH_2)_{13}N(CH_3)_3]Cl$	5.00	0.035	0.108	0.472	0.225

表 2

添加於0.5 N HCl之洗劑	濃度 %	HCV核心抗原陽性樣本			
		#110	#120	#117	#89
無添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗劑添加效果之判定基準		0.053	0.217	0.209	0.547
十六烷基三甲基氯化銨	0.50	0.021	0.204	0.147	0.388
	1.25	0.188	0.180	0.624	0.537
	1.67	0.138	0.088	0.446	0.373
	3.33	0.066	0.144	0.316	0.182
$[CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3]Cl$	5.00	0.034	0.100	0.211	0.236
己基三甲基溴化銨	1.67	0.019	0.056	0.092	0.180
	3.33	0.018	0.032	0.087	0.122
$[CH_3(CH_2)_5N(CH_3)_3]Br$	5.00	0.015	0.028	0.082	0.085
辛基三甲基溴化銨	1.67	0.047	0.115	0.402	0.349
	3.33	0.039	0.078	0.429	0.317
$[CH_3(CH_2)_7N(CH_3)_3]Br$	5.00	0.007	0.063	0.322	0.198
癸基三甲基溴化銨	1.67	0.122	0.427	1.253	0.779
	3.33	0.143	0.441	1.308	0.730
$[CH_3(CH_2)_9N(CH_3)_3]Br$	5.00	0.153	0.341	1.126	0.657
十二烷基三甲基溴化銨	0.50	0.100	0.274	0.955	0.628
	1.67	0.147	0.259	1.206	0.597
	3.33	0.141	0.317	1.326	0.639
$[CH_3(CH_2)_{11}N(CH_3)_3]Br$	5.00	0.133	0.341	1.374	0.560
十四烷基三甲基溴化銨	1.67	0.105	0.146	0.499	0.567
	3.33	0.076	0.325	0.793	0.522
$[CH_3(CH_2)_{13}N(CH_3)_3]Br$	5.00	0.057	0.215	0.532	0.306
十六烷基三甲基溴化銨	1.67	0.178	0.063	0.293	0.285
	3.33	0.311	0.349	0.799	0.600
$[CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3]Br$	5.00	-0.109	0.298	0.610	0.369

表 3

添加於0.5 N HCl之洗劑	濃度 %	HCV核心抗原陽性樣本			
		#110	#120	#117	#89
無添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗劑添加效果之判定基準		0.053	0.217	0.209	0.547
3-[(3-氯醯胺基丙基)二甲基銨基]-1-丙烷磺酸鹽	1.67	0.022	0.014	0.049	0.081
	3.33	0.026	-0.009	0.016	0.060
	5.00	0.027	0.000	0.033	0.082
N-十二烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽 $CH_3(CH_2)_{11}N(CH_3)_2[(CH_2)_3SO_3]$	1.67	0.107	0.288	1.044	0.748
	2.00	0.059	0.278	0.853	0.705
	3.33	0.122	0.372	1.353	0.802
	5.00	0.115	0.360	1.335	0.860
	10.00	0.071	0.234	1.048	0.746
N-十四烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽 $CH_3(CH_2)_{13}N(CH_3)_2[(CH_2)_3SO_3]$	1.67	0.103	0.301	0.626	0.808
	3.33	0.146	0.376	1.149	0.890
	5.00	0.171	0.467	1.277	0.893
N-十六烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽 $CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_2[(CH_2)_3SO_3]$	1.67	0.135	0.198	0.301	0.577
	3.33	0.150	0.488	0.643	1.104
	5.00	0.147	0.459	0.877	1.471
N-十八烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽 $CH_3(CH_2)_{17}N(CH_3)_3[(CH_2)_3SO_3]$	1.67	0.086	0.147	0.195	0.483
	3.33	0.096	0.206	0.211	0.863
	5.00	0.067	0.189	0.259	1.448
MEGA10 正-癸醯基-N-甲基葡糖醯胺	1.67	0.048	0.058	0.163	0.333
	3.33	0.046	0.022	0.160	0.330
	5.00	0.033	0.006	0.148	0.422

表 4

添加於0.5 N HCl之洗劑	濃度 %	HCV核心抗原陽性樣本			
		#110	#120	#117	#89
無添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗劑添加效果之判定基準		0.053	0.217	0.209	0.547
TritonX-100	1.67	0.016	0.069	0.086	0.365
	3.33	0.026	0.047	0.149	0.380
	5.00	0.060	0.053	0.166	0.388
TritonX-114	1.67	0.030	0.097	0.164	0.364
	3.33	0.022	0.065	0.166	0.351
	5.00	0.169	0.023	0.139	0.169
Tween20	1.67	0.033	0.097	0.137	0.352
	3.33	0.035	0.087	0.142	0.368
	5.00	0.038	0.069	0.164	0.353
Tween80	1.67	0.033	0.118	0.176	0.436
	3.33	0.026	0.096	0.174	0.425
	5.00	0.017	0.078	0.148	0.461
十二烷基硫酸鈉	0.50	0.023	0.085	0.210	0.476
	1.25	-0.044	-0.085	0.130	0.237
十二烷基三甲基溴化銨 使用0.5 N H_2SO_4代替0.5 N HCl	1.67	0.146	0.150	0.808	0.469
	3.33	0.102	0.174	0.835	0.418
	5.00	0.030	0.134	0.633	0.290

3)酸化劑共存條件下之蛋白質改性劑：

HCV抗原陰性檢體或HCV抗原陽性檢體(#86、#96、#117、#89)100 μL中，添加50 μL之使作為蛋白質改性劑之一之尿素溶解至1.5 N鹽酸濃度之水溶液，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，藉由1)中所述之方法

加以討論(表5)。

若添加作為蛋白質改性劑之一之尿素，僅將酸化劑作為對照組，則可確認約提高1.4倍~2倍之檢體。又，僅酸化劑之處理時，血清蛋白質等經改性且生成沉澱或白濁，則大多成為移液操作之障礙或沉澱物呈現較大疑陽性之原因。進而，亦考慮到由於該等沉澱物中捲入有作為目的之抗原而造成靈敏度降低。於藉由添加處理時為1 M以上之尿素，從而判明可大幅度減少此沉澱物形成，特別是於藉由添加處理時為1.5 M以上、8 M以下之尿素，而可進一步確認效果。尿素可溶解至約成為10 M溶液為止，但考慮到由於保存條件所造成之析出等問題，故而作為溶液使用之情形時，處理時濃度應該依據處理液量與檢體量之比值而定。

表5

	對照		
HCl(N) 尿素(M)	0.5 -	0.5 2.67	
	吸光度	吸光度	對應於對照之%
正常血清	0.012	0.011	91.3
HCV抗原陽性檢體			
#117	0.111	0.267	240.5
#89	0.256	0.357	139.5
#96	0.403	0.594	147.4
#86	0.575	0.614	106.8

4)討論於酸化劑與同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑之共存條件下的非離子性界面活性劑：

於HCV抗原陰性檢體(正常血漿)或3例HCV抗原陽性檢體(#120、#117、#97)100 μL中，添加於含有1.0 N鹽酸與5.0%十二烷基三甲基溴化銨(略稱為C12TAB)的溶液中混合有作為非離子性界面活性劑之Triton X100的溶液100 μL，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，藉由1)中所述之方法加以討論(圖2)。

如圖2所示之作為非離子性界面活性劑之TritonX100濃度，係以處理檢體時之濃度表示。HCV抗原陰性檢體(正常血漿)中，即使添加TritonX100亦幾乎無法確認其訊號變化；但HCV抗原陽性檢體(#120、#117、#97)中，添加有處理檢體時為1%~7.5%濃度時，可確認有反應性提高之情形。特別是，TritonX100為1%~5%濃度時具有特別高之反應性。

5)討論於酸化劑與同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑之共存條件下的蛋白質改性劑：

於HCV抗原陰性檢體(正常血漿)或4例HCV抗原陽性檢體(#120、#118、#117、#97)100 μL中，添加於含有1.0 N鹽酸與5.0%C12TAB之溶液中混合有作為非離子性界面活性劑之Triton X100的溶液100 μL，於37℃中培育10分鐘，

將其100 μL作為測定試料，藉由1)中所述之方法加以討論，求得各種HCV抗原陽性檢體之免疫活性相對於HCV抗原陰性檢體之免疫活性比率(HCV抗原陽性檢體之吸光度/HCV抗原陰性檢體之吸光度)，表示於表6。

表6

		HCV抗原陽性檢體			
尿素(M)	正常血漿	#97	#117	#118	#120
0.0	1.0	22.3	23.1	3.4	9.7
0.5	1.0	31.7	35.1	4.5	13.7
1.0	1.0	28.0	45.0	4.3	11.4
1.5	1.0	52.8	77.3	8.3	21.9
2.0	1.0	65.2	82.4	7.8	25.4
2.5	1.0	94.6	96.2	9.7	30.4
3.0	1.0	155.8	142.0	13.8	36.7
3.5	1.0	232.3	216.3	16.0	49.3

表6所示之作為蛋白質改性劑之一之尿素(Urea)濃度，係以處理檢體時之濃度表示。HCV抗原陽性檢體(#120、#117、#97)免疫活性相對於HCV抗原陰性檢體(正常血漿)免疫活性的比值，由於添加0.5 M尿素從而可確認有顯著提高，隨著增加尿素濃度至少提高至添加3.5 M尿素為止。這次討論中，若將上述處理液中之尿素濃度設為8 M，則因溶解性不良故而上述處理時無法討論尿素濃度為4 M以上之情形。

以如此方式，藉由作為蛋白質改性劑所使用之試劑共

存，可確認有HCV核心抗原之免疫活性提高之情形。當然，若使用尿素以外之蛋白質改性劑亦可達成該等共存效果，則可確認相同情形。

6)討論於酸化劑與同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑之共存條件下的還原劑：

於HCV抗原陰性檢體(正常血漿)或3例HCV抗原陽性檢體(#120、#117、#97)100 μL中，添加於含有1.0 N鹽酸與5.0%C12TAB之溶液中混合有作為還原劑之二乙胺基乙硫醇鹽酸之溶液100 μL，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，藉由1)中所述之方法加以討論(表7)。

此處所使用之作為還原劑之二乙胺基乙硫醇鹽酸濃度，係以處理檢體時之濃度表示。於HCV抗原陰性檢體(正常血漿)中，即使添加二乙胺基乙硫醇鹽酸亦幾乎無法確認有其訊號變化，但於HCV抗原陽性檢體(#120、#117、#97)中，根據處理檢體時為0.25 mM以上還原劑濃度，可確認有訊號提高，特別是還原劑濃度為10 mM以上時，可確認3例檢體均有30%以上之提高，於#117中藉由添加20 mM還原劑從而可使訊號增加至2倍以上。

表 7

二乙胺基乙硫醇鹽酸鹽	正常血漿	HCV抗原陽性檢體 #120		#117		#97	
(mM)	OD	OD	對應於對照之%	OD	對應於對照之%	OD	對應於對照之%
0(對照)	0.034	0.382	100%	0.927	100%	0.473	100%
0.25	0.045	0.436	114%	1.258	136%	0.538	114%
0.50	0.029	0.454	119%	N.T	N.T	0.543	115%
1.0	0.037	0.483	126%	N.T	N.T	0.611	129%
1.5	0.033	0.503	132%	1.222	132%	0.692	146%
10.0	0.024	0.507	133%	1.303	141%	0.687	145%
15.0	0.030	0.550	144%	1.831	198%	0.729	154%
20.0	0.022	0.549	144%	1.930	208%	0.752	159%
30.0	0.023	0.509	133%	N.T	N.T	0.774	164%
40.0	0.024	0.557	146%	1.462	158%	0.723	153%
50.0	0.033	0.570	149%	1.650	178%	0.748	158%

N.T：未試驗

實施例5. 使用本發明處理法與先前處理法(1)的HCV核心抗原之檢測

於日本專利第3171827號或青柳等之報告(Journal of Clinical Microbiology，37：1802-1808，1999)中，以含有高濃度十二烷硫酸鈉等陰離子性界面活性劑與兩性離子性界面活性劑之處理液實施30分鐘熱處理，藉此顯示出可以

高靈敏度檢測HCV核心抗原。使用該檢體處理法以及本發明處理法檢測各檢體中之HCV核心抗原，從而加以比較。

<測定使用本發明處理法之HCV核心抗原>

將檢體100 μL與處理液(1 N HCl、7% C12TAB、3.5% N-十六烷基1-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽、7% TritonX100、2 M尿素、10 mM二乙胺基乙硫醇鹽酸)100 μL混合，於37℃中實施10分鐘前處理。

於96孔微量盤(Costar high binding plate)之各孔中，以4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(等量混合c11-3與c11-7)，於4℃中培育一晚。以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1，培育2小時。去除阻斷液後，將含有中和劑之反應緩衝液100 μL與經過處理之測定試料100 μL添加至各孔中。

加以攪拌並且於室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20的10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次。添加200 μL經過HRP標識之單株抗體(同量混合C11-10與C11-14)液，於室溫下反應30分鐘。以洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml之0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育30分鐘。添加50 μL之5 N硫酸以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度。

<測定使用先前處理法(1)之HCV核心抗原>

將檢體100 μL與處理液(15% SDS、2% CHAPS、0.3% TritonX100、2 M尿素)50 μL混合，於56℃中處理30分鐘。其後，恢復至室溫後作為測定試料使用。

於96孔微量盤(Costar high binding plate)之各孔中，以4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(等量混合c11-3與c11-7)，於4℃中培育一晚。以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1，培育2小時。去除阻斷液後，將反應緩衝液100 μL與經過處理之測定試料100 μL添加至各孔中。

加以攪拌並且室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次。添加200 μL經過HRP標識之單株抗體(同量混合C11-10與C11-14)，於室溫下反應30分鐘。以洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml的0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育30分鐘。添加50 μL之5 N硫酸以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度。

將使用上述兩種前處理法檢測HCV核心抗原之結果示於表8以及表9中，將該等相關性示於圖3。如表8以及表9所示，可確認本發明處理法與先前法相比，其30例HCV-RNA陽性檢體中之反應性提高1.85~6.7倍，平均提高3.6倍之反應性。特別是，於5例檢體(No. 9、11、24、25、30)

中，雖然無法以先前法檢測，但可藉由本發明處理法容易地檢測出HCV核心抗原，可具有更高靈敏度。又，相關係數成為0.894，表示出較高相關性。

表8

處理法	先前處理法	本發明處理法	
健康人檢體	吸光度	吸光度	本發明處理法相對於先前處理法
NS1	0.026	0.035	
NP1	0.012	0.026	
S222	0.019	0.005	
S223	0.010	0.008	
S225	0.011	0.008	
S226	0.089	0.022	
S229	0.082	0.017	
S236	0.085	0.010	
S237	0.023	0.017	
S239	0.023	0.023	
平均值	0.038	0.017	0.45

表 9

處理法	先前處理法	本發明處理法	
HCV-RNA陽性檢體	吸光度	吸光度	本發明處理法相對於先前處理法
1	0.110	0.408	3.71
2	0.330	1.461	4.43
3	0.265	0.778	2.94
4	0.246	0.936	3.80
5	0.931	1.967	2.11
6	0.369	1.792	4.86
7	0.174	0.500	2.87
8	0.220	0.961	4.37
9	0.023	0.066	2.87
10	0.320	1.121	3.50
11	0.011	0.074	6.73
12	0.265	1.643	6.20
13	0.074	0.221	2.99
14	0.563	1.987	3.53
15	0.357	1.304	3.65
16	0.064	0.275	4.30
17	0.573	1.595	2.78
18	0.068	0.357	5.25
19	0.439	0.928	2.11
20	0.181	0.419	2.31
21	0.055	0.199	3.62
22	0.054	0.137	2.54
23	0.041	0.131	3.20
24	0.020	0.037	1.85
25	0.026	0.067	2.58
26	0.055	0.217	3.95
27	0.332	1.088	3.28
28	0.119	0.544	4.57
29	0.319	0.990	3.10
30	0.020	0.082	4.10
平均值			3.60

實施例6. 藉由單株抗體組合所達成之反應性

將檢體100 μL與前處理液(1 N HCl、7% C12TAB、7% TritonX100、2 M尿素、10 mM二乙胺基乙硫醇鹽酸)100 μL混合，於37℃中實施10分鐘前處理。

於96孔微量盤(Costar high binding plate)之各孔中，以4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(等量混合c11-3、c11-7以及c11-21)，於4℃中培育一晚。以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1，培育2小時。去除阻斷液後，將含有中和劑之反應緩衝液100 μL與經過前處理法之測定試料100 μL添加至各孔中。

加以攪拌並且室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次。添加200 μL經過HRP標識之單株抗體(同量混合C11-9與C11-14)液，於室溫下反應30分鐘。以洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml的0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育30分鐘。添加50 μL之5 N硫酸以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度，與實施例5之使用本發明處理法檢測HCV核心抗原所獲得之結果相比較(表11以及表12)。

除c11-3、c11-7以外以固相狀態添加c11-21，以及直接利用c11-14作為酶標識抗體，代替c11-10而使用c11-9之情形時，反應性平均提高約1.31倍，特別是No.19中提高至

1.65倍(表12)。可認為其效果在於：於固相抗體中使用有三種可識別HCV核心抗原之C端側胺基酸序號100-120以及111-130之抗體。即，以固相狀態使用三種可識別HCV核心抗原之胺基酸序列之100-130之抗體，其與以固相狀態使用兩種可識別HCV核心抗原之胺基酸序列之100-130之抗體相比，更容易捕捉核心抗原且可提高測定值。

實施例7. 藉由單株抗體組合所達成之反應性

將檢體100 μL與前處理液(1 N HCl、7% C12TAB、7% TritonX100、2 M尿素、10 mM二乙胺基乙硫醇鹽酸)100 μL混合，於37℃中實施10分鐘前處理。

於96孔微量盤(Costar high binding plate)之各孔中，以合計4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(分別等量混合c11-3&c11-7或c11-3&c11-7&c11-11或c11-3&c11-7&c11-21)，於4℃中培育一晚。以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1，培育2小時。去除阻斷液後，將含有中和劑之反應緩衝液100 μL與經過前處理法之測定試料100 μL添加至各孔中。

加以攪拌並且室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次。添加200 μL經過HRP標識之單株抗體(同量混合C11-9與C11-14)液，室溫下反應30分鐘。以洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml的0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育

30分鐘。添加50 μL之5 N硫酸以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度，討論以固相狀態所使用之抗體添加效果(表10)。

除c11-3、c11-7以外以固相狀態添加c11-11或c11-21，藉此可提高HCV-RNA陽性檢體之反應性。可認為其效果在於：於固相抗體中使用有三種可識別HCV核心抗原之C端側胺基酸100-120以及111-130之抗體。即，以固相狀態使用有三種可識別HCV核心抗原之胺基酸序列100-130之抗體，其與以固相狀態使用有兩種可識別HCV核心抗原之胺基酸序列100-130之抗體相比，更容易捕捉HCV核心抗原，故而可提高測定值。

又，將以下述兩種組合測定多數個HCV-RNA陽性檢體之結果示於表11以及表12中：實施例6中，以固相狀態將c11-3&c11-7(等量混合)固相化之孔盤與使用c11-14&c11-10作為酶標識抗體之組合(抗體組合1)；將c11-3&c11-7&c11-21(等量混合)固相化之孔盤與使用c11-14&c11-9作為酶標識抗體之組合(抗體組合2)。於HCV-RNA陽性檢體中，抗體組合2相對於抗體組合1，反應性平均提高約1.31倍，No.19中提高至1.65倍。

表 10

固相	C11-3&c11-7	C11-3&c11-7&c11-11	C11-3&c11-7&c11-21
標識抗體	C11-9&c11-14		
	吸光度	吸光度	吸光度
健康人血漿	0.013	0.020	0.001
健康人血清1	0.018	0.014	0.016
健康人血清2	0.017	0.016	0.016
健康人平均值	0.016	0.017	0.011
HCV-RNA陽性檢體	吸光度	吸光度	吸光度
119	0.970	1.824	1.837
121	0.850	1.740	1.688
111	0.112	0.156	0.167
113	0.018	0.033	0.026
122	0.063	0.168	0.090

表 11

固相標識抗體	抗體組合(1) c11-3&c11-7 c11-10&c11-14	抗體組合(2) c11-3&c11-7&c11-21 c11-9&c11-14	
			抗體組合(2)/ 抗體組合(1)
健康人檢體	吸光度	吸光度	
NS1	0.035	0.040	
S223	0.008	0.008	
S226	0.022	0.019	
S239	0.023	0.027	
平均值	0.022	0.024	1.07

表 12

固相標識抗體	抗體組合(1) c11-3&c11-7 c11-10&c11-14	抗體組合(2) c11-3&c11-7&c11-21 c11-9&c11-14	
			抗體組合(2)/抗體組合(1)
HCV-RNA陽性檢體	吸光度	吸光度	
1	0.408	0.591	1.45
2	1.461	1.636	1.12
3	0.778	1.088	1.40
4	0.936	1.327	1.42
5	1.967	2.683	1.36
6	1.792	2.300	1.28
7	0.500	0.670	1.34
8	0.961	1.311	1.36
9	0.066	0.076	1.15
10	1.121	1.493	1.33
12	1.643	2.156	1.31
13	0.221	0.327	1.48
14	1.987	2.633	1.33
15	1.304	1.762	1.35
16	0.275	0.357	1.30
17	1.595	2.317	1.45
18	0.357	0.349	0.98
19	0.928	1.531	1.65
20	0.419	0.587	1.40
21	0.199	0.179	0.90
22	0.137	0.205	1.50
24	0.037	0.036	0.97
25	0.067	0.090	1.34
26	0.217	0.250	1.15
27	1.088	1.473	1.35
29	0.990	1.342	1.36
平均值			1.31

實施例8. 討論酸化劑之必要性

將檢體(健康人血清以及3例HCV核心抗原陽性檢體)100 μL與去除酸化劑之處理液(7% C12TAB、3.5% N-十六烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽、7% TritonX100、2 M尿素、10 mM二乙胺基乙硫醇鹽酸)100 μL混合，於37℃中實施10分鐘前處理。於96孔微量盤(Costar high binding plate)之各孔中，以4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(等量混合c11-3與c11-7)，於4℃中培育一晚。以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1，培養2小時。

去除阻斷液後，將含有中和劑之反應緩衝液100 μL與經過處理之測定試料100 μL添加至各孔中。加以攪拌並且室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次。添加200 μL經過HRP標識之單株抗體(同量混合C11-10與C11-14)液，於室溫下反應30分鐘。以洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml的0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育30分鐘。添加50 μL之5N硫酸以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度。將該結果示於表13中。

表 13

前處理時鹽酸濃度 (N)	0.00	0.13	0.25	0.38	0.50	0.63	0.75	1.00
健康人血清	0.125	0.018	0.016	0.011	0.007	0.008	0.013	0.006
HCV核心抗原陽性檢體								
#110	0.023	0.106	0.177	0.251	0.257	0.338	0.388	0.488
#120	0.153	0.078	0.389	0.587	0.738	0.832	0.918	0.545
#117	0.022	0.092	0.864	1.904	2.237	2.433	2.573	2.534

根據表13可瞭解各HCV陽性檢體(#110、#120、#117)即使於37℃中以未含有鹽酸之溶液培育10分鐘，亦幾乎無法檢測出核心抗原活性，但藉由處理時之鹽酸濃度0.13 N從而可確認出核心抗原活性，以0.5~1.0 N可再確認出非常高之核心抗原活性。

實施例9. 融合瘤之製作法(2)

將具有源自HCV 基因型1b之核心之1~173號序列的重組HCV核心蛋白質(I-C173)溶解於6 M尿素後，以終濃度成為0.2~1.0 mg/mL之方式稀釋於含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液(pH值7.3)中，與等量TiterMax混合。將該混合液投藥至4~6週齡BALB/c系小鼠腹腔內。每兩週實施3次同樣免疫，進而其後兩週後，將以成為0.01 mg/mL之方式調製有I-C173之生理鹽水溶液投藥至尾靜脈內。最終追加免疫後第四天，自該免疫動物身上無菌性地摘出脾臟，以剪刀切片進而使用網篩將脾臟分解為各個細胞，以RPMI-1640培養基洗淨三次。於8-氮雜鳥嘌呤存在條件下培養數

日，將完全去除恢復突變體之對數增殖期的小鼠骨髓腫細胞株SP2以與上述相同方式洗淨後，將該細胞3.26×10^7個與脾臟細胞2.28×10^8個加入至50 mL容積離心管中混合。實施200×g、5分鐘離心分離，去除上清液後，添加在37℃保溫之含有50%聚乙二醇4000(PEG4000；Merck公司製造)的RPMI-1640培養基1 ml，實施細胞融合。融合細胞係藉由離心分離(200×g、5分鐘)去除PEG4000後，使用96孔盤於含有HAT之RPMI-1640培養基中培育1~2週，僅增殖融合瘤。其後，於未包含HAT之培養基中使其發育，約兩週後藉由ELISA法篩選生成目的抗體之純系，獲得生成具有所期望反應特異性之本發明單株抗體的融合瘤。

關於所獲得之融合瘤，根據常法之截止稀釋法，實施作為目的之抗體之生成株篩選以及單一純系化，將所獲得之融合瘤命名為OT3，於平成16年6月1日寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄託中心(茨城縣築波市東1丁目1番地1中央第6)。(FERM BP-10032)。同一融合瘤於2005年1月13日寄存於台灣食品工業發展研究所寄存編號為BCRC 96022。

實施例10. 單株抗體之製作(2)

將藉由實施例5揭示之方法所獲得之融合瘤移殖至經過姥鮫烷等處理之小鼠腹腔內，取得腹水中生成之單株抗體。該單株抗體之純化係藉由結合有蛋白質A的瓊脂糖(Sepharose)管柱分離IgG區份。自上述融合瘤所生成之單株抗體即AOT3同型，使用小鼠Ig各同型套組(Zymed公司

製造)可證明其為IgG2b。對於所獲得之各單株抗體，使用藉由源自HCV核心區域序列所合成之20個肽從而實施抗原決定部位解析。AOT3可特異性識別[101]RGSRPSWGPTDPRHRSRNVG[120]序列。又，AOT3對於該序列具有高於c11-21之反應性。

實施例11. 討論檢體處理條件(2)

(討論處理條件)

1)麥芽糖濃度：於HCV抗原陰性檢體或HCV抗原陽性檢體100 μL中，添加含有各種濃度麥芽糖之前處理劑(1 N HCl、3.5% C12TAB、3% N-十六烷基1-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽(C16APS)、3% N-十八烷基1-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙烷磺酸鹽(C18APS)、7% TritonX100、3 M尿素、20 mM二乙胺基乙硫醇鹽酸)100 μL，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，使用下述所示之測定法實行討論。

於96孔微量盤(Costar High Binding Plate)中，以4 μg/ml濃度添加200 μL抗HCV核心抗原單株抗體(以1：2：1比率混合c11-3、c11-7、AOT3)，於4℃中培育一晚。以含有0.15 M NaCl之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3洗淨兩次後，添加350 μL含有0.5%酪蛋白鈉的10 mM磷酸緩衝液pH值7.1，培育2小時。去除阻斷液後，將含有中和劑之反應緩衝液100 μL與藉由各檢體處理法所獲得之測定試料添加至各孔中攪拌並且室溫下反應1小時，以350 μL含有0.05% Tween20之10 mM磷酸緩衝液pH值7.3(洗淨液)洗淨6次，進

而添加200 μL經過過氧化酶(HRP)標識之單株抗體(同量混合C11-9與C11-14)，於室溫下反應30分鐘。以洗淨液洗淨6次後，添加200 μL基質溶液(含有2 mg/ml鄰苯二胺、30%過氧化氫水溶液0.9 μL/ml的0.1 M檸檬酸磷酸緩衝液、pH值5.0)培育30分鐘。添加50 μL之5N硫酸以停止酶反應，以微盤分析儀(CORONA MTP32)測定492 nm(參考波長630 nm)之吸光度，將其結果示於表14。再者，表7所示之麥芽糖濃度係以檢體(Sample)與前處理劑混合後之前處理時之濃度表示。

可確認各HCV陽性檢體在添加有麥芽糖之前處理時濃度高於2.5%具有核心抗原活性，即使為10%以上亦可得以確認。又，如此之添加效果係除麥芽糖以外，藉由蔗糖、果糖、甘露糖以及海藻糖亦可得以確認。

2)檸檬酸濃度：於HCV抗原陰性檢體或HCV抗原陽性檢體100 μL中，添加含有各種濃度檸檬酸之前處理劑(1 N HCl、3.5% C12TAB、3% C16APS、3% C18APS、7% TritonX100、3 M尿素、5% 麥芽糖、20 mM二乙胺基乙硫醇鹽酸)100 μL，於37℃中培育10分鐘，將其100 μL作為測定試料，使用1)中所示之方法實行討論(表15)。但是，藉由於前處理劑中添加有檸檬酸之處理，僅使經過前處理之檢體液pH值產生若干變化，因此以成為中性之方式從而適時變更反應緩衝液100 μL中之中和劑濃度。再者，表15所示之檸檬酸濃度，係以檢體(Sample)與前處理劑混合後之前處理時之濃度表示。

如表15所示，可確認各HCV陽性檢體在添加有檸檬酸之前處理時濃度高於0.05 M具有高的核心抗原活性，即使為0.2 M以上亦可得以確認。又，如此之添加效果亦可藉由含有檸檬酸鈉鹽之各種檸檬酸鹽類得以確認。

表14

		HCV抗原陽性檢體			
甘露醇	健康人血清	#123		#114	
(%)	OD	OD	對照之%	OD	對照之%
0(對照)	0.007	0.059	100%	0.057	100%
2.5	0.016	0.081	137%	0.096	168%
5.0	0.012	0.122	207%	0.159	279%
7.5	0.022	0.162	275%	0.251	440%
10.0	0.025	0.336	569%	0.503	882%

表15

		HCV抗原陽性檢體			
檸檬酸	健康人血清	#123		#114	
(M)	OD	OD	對照之%	OD	對照之%
0(對照)	0.016	0.122	100%	0.159	100%
0.05	0.013	0.582	477%	0.927	583%
0.10	0.035	0.854	700%	1.032	649%
0.15	0.028	0.676	554%	0.852	536%
0.20	0.024	0.200	164%	0.341	214%

[產業上之可利用性]

藉由本發明，以適合於檢測抗原作為抗體等之探針之所

謂免疫測定法之狀態，可自HCV等病毒粒子簡便地且於短時間內游離病毒抗原。又，根據本發明所示之方法，可藉由處理含有HCV等病毒粒子之檢體，使用抗體等探針從而檢測抗原之所謂免疫測定法，於短時間內簡便且高靈敏度地檢測以及定量病毒抗原。又，可藉由本發明於短時間內簡便地游離病毒抗原。

又，因藉由本發明所獲得之有用的單株抗體可特異性識別C型肝炎患者血清中之HCV抗原，故而可製作出使用有分別表示C型肝炎之檢體處理法與免疫測定方法且可辨別檢體中有無HCV等病毒的套組、用以定量之套組以及診斷藥。進而，利用藉由本發明所獲得之單株抗體以及使用有極為簡便處理法之HCV檢測及定量方法，藉此可簡單且操作性良好地確定診斷出C型肝炎。

【圖式簡單說明】

圖1係表示檢體處理中討論藉由酸化劑(鹽酸)濃度所達成之效果的結果圖。使用有健康人檢體(normal)以及五種HCV-抗原陽性檢體。

圖2係表示檢體處理中討論藉由非離子性界面活性劑(TritonX100)添加濃度所達成之效果的結果圖。使用有健康人檢體(正常血漿)以及三種HCV-抗原陽性檢體。

圖3係表示HCV-抗原陽性檢體中，測定本發明之檢體處理後其游離之核心抗原活性之數值與藉由先前法測定檢體處理後其游離之核心抗原活性之數值的相關圖。

序列表

<110>先端生命科學研究所股份有限公司
<120>C型肝炎病毒之檢測方法
<130>P911

<140> 093133021
<141> 2004-10-28

<150>JP 2003-367783
<151>2003-10-28
<160>2
<210>1
<211>20
<212>PRT
<213>C型肝炎病毒
<220>
<221>
<222>(21)..(40)
<223> C型肝炎病毒核心抗原之胺基酸序列之部分序列

<400>1
Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu
1 5 10 15
Leu Pro Arg Arg
20

<210>2
<211>21
<212>PRT
<213>C型肝炎病毒
<220>
<221>
<222>(100)..(120)
<223> C型肝炎病毒核心抗原之胺基酸序列之部分序列

<400>2
Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg
1 5 10 15
Ser Arg Asn Val Gly
20

五、中文發明摘要：

本發明之目的在於提供一種含有HCV檢體之處理方法等，該方法特徵在於：以處理劑處理含有HCV(C型肝炎病毒)之檢體，藉此游離HCV抗原與破壞結合至HCV抗原之抗體；上述處理劑含有(1)酸化劑，以及(2)蛋白質改性劑或同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的兩性離子性界面活性劑或陽離子性界面活性劑。

六、英文發明摘要：

Method for treatment of HCV-containing test sample characterized by treating a test sample containing HCV (hepatitis C virus) with a treating agent comprising (1) an acidifying agent, and (2) a protein modifier, or a cationic surfactant or amphoteric surfactant containing a single chain alkyl group having 10 or more carbon atoms and a tertiary or quaternary ammonium salt in the same molecule, so as to liberate HCV antigen and destroy antibodies binding to the HCV antigen.

十、申請專利範圍：

1. 一種含有HCV之檢體之處理方法，其係處理含有HCV(C型肝炎病毒)之檢體，以使HCV抗原游離，然後破壞結合至HCV抗原之抗體者；該處理方法之特徵在於：以處理劑處理上述檢體，該處理劑含有：

   (1)酸化劑；以及

   (2)同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的陽離子性界面活性劑。

2. 如請求項1之方法，其中上述處理劑係進而含有下述(3)、(4)、(5)中之任一者：

   (3)蛋白質改性劑、非離子性界面活性劑或還原劑；

   (4)單糖類或二糖類；以及

   (5)檸檬酸或檸檬酸鹽類。

3. 如請求項1或2之方法，其中上述酸化劑為鹽酸、硫酸、醋酸、三氯醋酸以及三氟醋酸或檸檬酸。

4. 如請求項1或2之方法，其中上述同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的陽離子性界面活性劑為癸基三甲基氯化銨、十二烷基三甲基氯化銨、十四烷基三甲基氯化銨、十六烷基三甲基氯化銨、癸基三甲基溴化銨、十二烷基三甲基溴化銨、十四烷基三甲基溴化銨、十六烷基三甲基溴化銨、月桂基氯化吡啶鎓、十四烷基氯化吡啶鎓以及鯨蠟基氯化吡啶鎓。

5. 如請求項2之方法，其中上述蛋白質改性劑為尿素或硫

代尿素。

6. 如請求項2之方法，其中上述非離子性界面活性劑為聚氧乙烯異辛基苯基醚類、聚氧乙烯壬基苯基醚類、或聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯類。

7. 如請求項6之方法，其中上述聚氧乙烯異辛基苯基醚類為TritonX100或TritonX114。

8. 如請求項6之方法，其中上述聚氧乙烯壬基苯基醚類為NP-40。

9. 如請求項6之方法，其中上述聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯類為Tween80。

10. 如請求項2之方法，其中上述還原劑為半胱胺酸、半胱胺、二甲胺基乙硫醇、二乙胺基乙硫醇或二異丙胺基乙硫醇。

11. 如請求項2之方法，其中上述單糖類或二糖類為麥芽糖、蔗糖、海藻糖、甘露糖、果糖、葡萄糖、山梨糖醇、半乳糖、右旋葡萄糖。

12. 如請求項2之方法，其中上述檸檬酸或檸檬酸鹽類為檸檬酸、檸檬酸水合物、檸檬酸鈉鹽、檸檬酸鉀鹽。

13. 一種HCV抗原之免疫學檢測方法，其係包含：

(1)實施如請求項1至12中任一項之處理步驟；以及

(2)使用結合於HCV抗原之探針檢測HCV抗原的步驟。

14. 一種診斷藥或診斷套組，其係用於處理檢體以檢測HCV抗原者；該診斷藥或診斷套組係包含下述(1)以及(2)之物質而成者：

(1)酸化劑；以及

(2)同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的陽離子性界面活性劑。

15. 如請求項14之診斷藥或診斷套組，其係進而含有下述(3)、(4)、(5)中之任一者：

(3)蛋白質改性劑、非離子性界面活性劑或還原劑；

(4)單糖類或二糖類；以及

(5)檸檬酸或檸檬酸鹽類。

16. 如請求項14或15之診斷藥或診斷套組，其中上述酸化劑為鹽酸、硫酸、醋酸、三氯醋酸或三氟醋酸。

17. 如請求項14或15之診斷藥或診斷套組，其中上述同分子中含有10個以上之碳數之單鏈烷基、與第三級胺或第四級銨鹽的陽離子性界面活性劑為癸基三甲基氯化銨、十二烷基三甲基氯化銨、十四烷基三甲基氯化銨、十六烷基三甲基氯化銨、癸基三甲基溴化銨、十二烷基三甲基溴化銨、十四烷基三甲基溴化銨、十六烷基三甲基溴化銨、月桂基氯化吡啶鎓、十四烷基氯化吡啶鎓、鯨蠟基氯化吡啶鎓。

18. 如請求項15之診斷藥或診斷套組，其中上述蛋白質改性劑為尿素或硫代尿素。

19. 如請求項15之診斷藥或診斷套組，其中上述非離子性界面活性劑為聚氧乙烯異辛基苯基醚類、聚氧乙烯壬基苯基醚類、或聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯類。

20. 如請求項19之診斷藥或診斷套組，其中上述聚氧乙烯異

辛基苯基醚類為TritonX100或TritonX114。

21. 如請求項19之診斷藥或診斷套組，其中上述聚氧乙烯壬基苯基醚類為NP-40。

22. 如請求項15之診斷藥或診斷套組，其中上述聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯類為Tween80。

23. 如請求項15之診斷藥或診斷套組，其中上述還原劑為半胱胺酸、半胱胺、二甲胺基乙硫醇、二乙胺基乙硫醇、二異丙胺基乙硫醇。

十一、圖式：

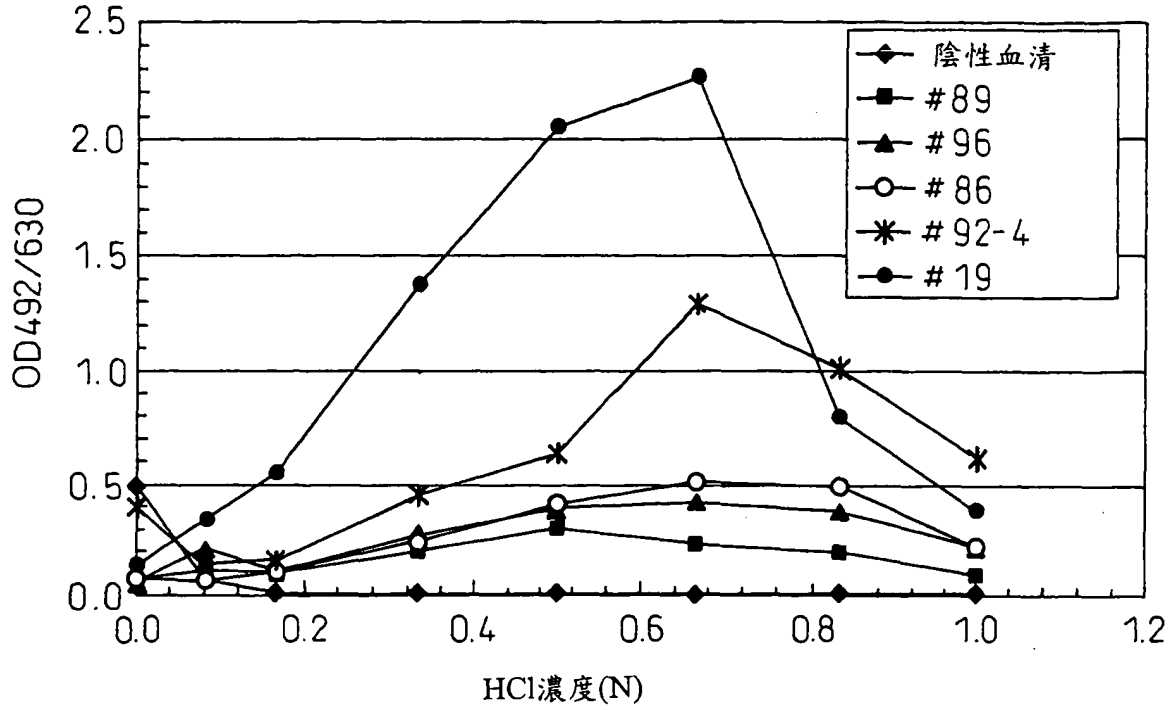

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD492/630
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
HCl濃度(N)
陰性血清
#89
#96
#86
#92-4
#19

圖 1

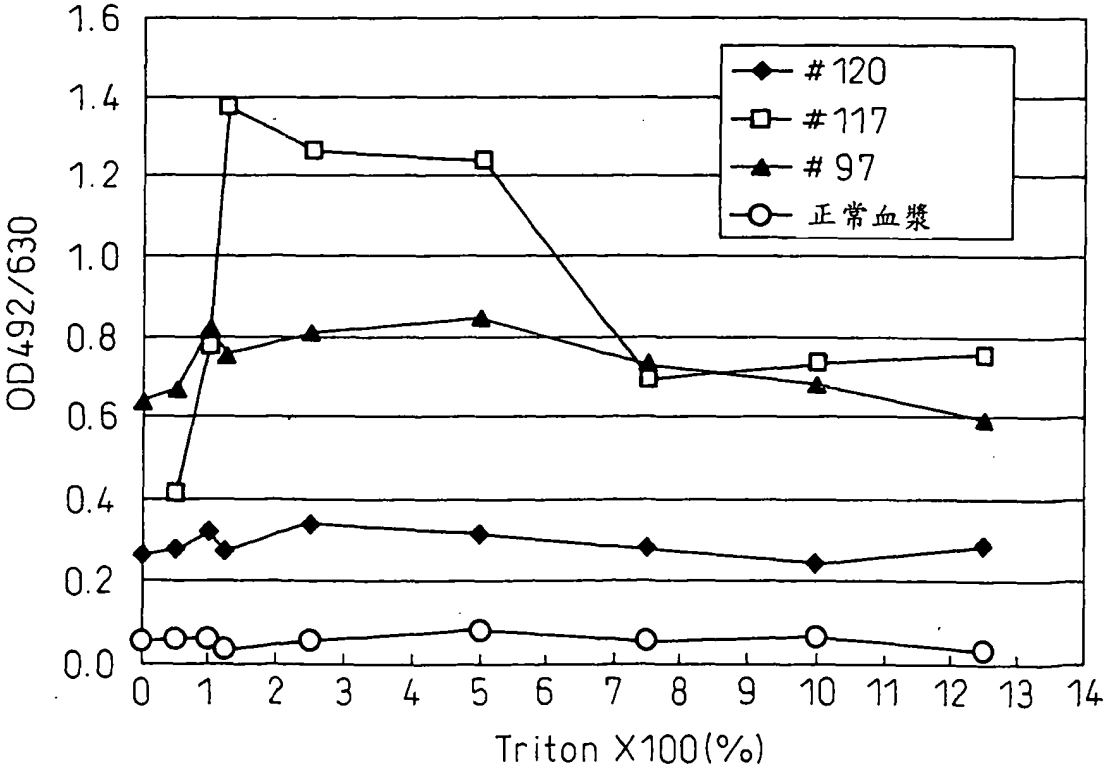

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD492/630
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Triton X100(%)
#120
#117
#97
正常血漿

圖 2

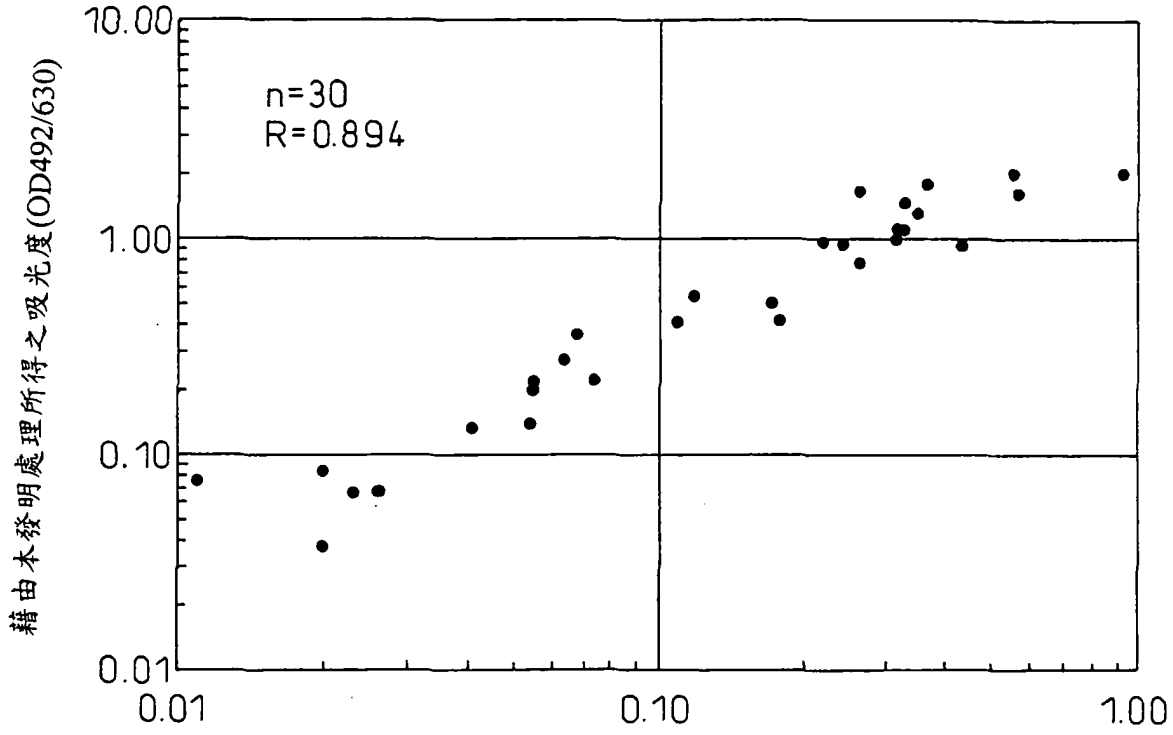

10.00
1.00
0.10
0.01
0.01
0.10
1.00
n=30
R=0.894
藉由本發明處理所得之吸光度(OD492/630)
藉由先前處理法(1)所得之吸光度(OD492/630)

圖 3

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)