

(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2011-106834

(P2011-106834A)

(43) 公開日 平成23年6月2日(2011.6.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	G
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 J
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	A

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2009-259273 (P2009-259273)	(71) 出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県周南市開成町4560番地
(22) 出願日	平成21年11月12日 (2009.11.12)	(72) 発明者	鎌田 陽子 神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社東京研究センター内
		(72) 発明者	新谷 晃司 神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式会社東京研究センター内

(54) 【発明の名称】 免疫測定方法

(57) 【要約】

【課題】競合イムノアッセイを含むHBc抗体の免疫測定において、HBc抗原中のHBc抗体との結合部位をブロックして免疫反応を妨害する妨害物質の影響を可能な限り抑制すること。

【解決手段】B型肝炎ウイルスコア抗原とそれに対する抗体との免疫反応を用いて生物学的試料中のB型肝炎ウイルスコア抗原又はそれに対する抗体を測定する免疫測定法において、B型肝炎ウイルスコア抗原を予めタンパク質変性剤によって処理することにより、前記課題を解決する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

B 型肝炎ウイルスコア抗原とそれに対する抗体との免疫反応を用いて生物学的試料中の B 型肝炎ウイルスコア抗原又はそれに対する抗体を測定する免疫測定法において、B 型肝炎ウイルスコア抗原を予めタンパク質変性剤によって処理することを特徴とする、免疫測定方法。

【請求項 2】

タンパク質変性剤がラウリル硫酸ナトリウム (S D S)、尿素、グアニジン塩酸塩等の蛋白質を変性できる試薬である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

予め蛋白質変性剤によって処理される B 型肝炎ウイルスコア抗原が大腸菌又は酵母を用いて製造された遺伝子組換え体であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願発明は、生体由来試料中の B 型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗原とそれに対する抗体 (以下、B 型肝炎ウイルスを「H B V」、B 型肝炎ウイルスコア抗原を H B c 抗原、B 型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体を H B c 抗体という) との免疫反応を用いて生物学的試料中の H B c 抗原又は H B c 抗体を測定する免疫測定法の改良に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

血液等の生体由来試料中に存在する抗体等の抗原性物質を、当該抗原性物質と免疫反応を生じる抗体や抗原を用いて測定する免疫測定法が公知であり、疾患と関連してその濃度が上昇等する抗原性物質を測定することにより、当該疾患の診断等が行われている。これまでに多種態様の抗原性物質が知られているが、以下では具体的に、H B V について説明する。

【0003】

H B V は、直径 4 2 n m の二重構造をもつ球形粒子で、エンベロープ (外皮) とコア (芯) から形成されている。H B c 抗体は、この B 型肝炎ウイルスのコア部分を形成する抗原 (H B c 抗原) に対する抗体である。

【0004】

H B c 抗体は、H B V 感染初期から感染後長期間にわたり血中に存在することが知られている。H B c 抗体には、I g M 型と I g G 型の 2 タイプがあり、急性 B 型肝炎では発症後 1 2 週まで I g M 型の陽性が認められ、I g M 型が測定されなくなった後も長期にわたり I g G 型の陽性が認められる (非特許文献 1) 。

【0005】

また H B c 抗体は、H B V の表面抗原 (H B s 抗原) が出現した後に測定され、急性 B 型肝炎においては H B s 抗原の消失後、H B s 抗体が出現するころまで継続して測定されるため、H B s 抗原、H B s 抗原に対する抗体 (H B s 抗体) が測定されないときの H B V 感染の測定の手がかりとなる (非特許文献 2) 。

【0006】

更に H B c 抗体は、急性 B 型肝炎時に抗体価が高くなることから、B 型慢性肝炎の急性発症と急性 B 型肝炎の診断識別に効果がある (非特許文献 3) 。

【0007】

以上のように H B c 抗体の測定は、B 型肝炎の病態把握・感染予防に有効とされ、輸血後の感染防止を目的に輸血用血液のスクリーニング検査としても実施されている。

【0008】

H B c 抗体の免疫測定は、いわゆる競合原理を利用する競合イムノアッセイが多い。これは、例えば水不溶性の担体に結合した H B c 抗原中の抗体結合部位に対して、酵素や化

10

20

30

40

50

学発光物質等といった検出可能な標識物質を結合したHBc抗体（以下、標識HBc抗体という）と生体由来試料中の測定されるべきHBc抗体とを競合的に反応させるものである。水不溶性担体と結合した標識HBc抗体の割合は、生体由来試料中の測定されるべきHBc抗体の量に反比例して増加するので、HBc抗体の量を阻害率（陰性コントロールと生体由来試料の測定値の差から算出）等して決定する。なお、免疫測定に用いられるHBc抗原は、HBVから変性剤（SDS）や還元剤（ジチオスレイトール、メルカプトエタノール）等を用いて調整する場合もあるが、一般的には大腸菌や酵母等を用いて製造した遺伝子組換え体を用いることが多い。

【0009】

上記のような競合イムノアッセイでは、生体由来試料中に含まれる物質によって免疫反応が妨害されると測定値が低くなり、算出されるHBc抗体量が増加して偽陰性と判断される危険がある。妨害の態様として考えられるのは、HBc抗原又はHBc抗体と複合体を形成する物質であるが、実際、 γ -グロブリン、アルブミン、 α 1-アンタイトリプシン等の種々の血清蛋白質に代表される血液中の成分がHBc抗原と複合体を形成し、HBc抗体との結合部位をブロックして免疫反応を妨害する可能性が報告されている（非特許文献4）。いずれにせよ、より正確な免疫測定を実施するためには、反応を妨害する物質の影響を可能な限り抑制することが重要である。

【0010】

【非特許文献1】西岡幹夫，B型肝炎ウイルス感染症における血中抗原抗体系とその解釈、*Medical Postgraduates*，24（2），106-108，1986）

【非特許文献2】H. Iisuka et al.，Correlation between anti-HBc titer and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg，*Vox Sang*，63，107-111，1992

【非特許文献3】三宅和彦・山中正己，慢性肝炎の診断の実際・血清生化学，免疫学的検査でどの程度まで診断できるか，*Medical Practice*，4（7），1080-1083，1987

【非特許文献4】今井光信，HBe抗原の本態，*肝胆膵*，9（4），487-489，1984

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

そこで本願発明が解決しようとする課題は、競合イムノアッセイを含むHBc抗体の免疫測定において、HBc抗原中のHBc抗体との結合部位をブロックして免疫反応を妨害する妨害物質の影響を可能な限り抑制することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願発明は、HBc抗原とHBc抗体との免疫反応を用いて生物学的試料中のHBc抗原又はHBc抗体を測定する免疫測定法において、HBc抗原を予めタンパク質変性剤によって処理することを特徴とする、免疫測定方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

本願発明は、HBc抗原とHBc抗体との免疫反応を用いて生物学的試料中のHBc抗原又はHBc抗体を測定する免疫測定、言い換えればHBc抗原とHBc抗体との免疫反応を利用する免疫測定であれば、いかなる態様の測定に対しても適用することができる。すなわち、前述した競合測定法はもとより、その他にも例えばHBc抗原を固定した担体と標識した抗ヒト抗体を使用するサンドイッチ測定方法、例えば標識物と結合したHBc抗体と担体に結合したHBc抗体との組合せによるHBc抗原のサンドイッチ測定方法、例えば抗ヒト抗体を固定した担体と標識したHBc抗原を使用するサンドイッチ測定方法

10

20

30

40

50

等にも適用することができる。また競合測定方法又はサンドイッチ測定方法のいずれにおいても、いわゆる1ステップ又は2ステップのいずれにも適用することができる。

【0014】

一般的に免疫測定では、例えばアルカリフォスファターゼ等の酵素を標識として使用するが、本願発明においても従来公知の種々の標識を利用することができる。例えば酵素、蛍光物質、ラジオアイソトープ、発光物質等を何らの制限なしに使用することができる。

【0015】

本願発明は、また更に、例えばビオチン - アビジン等の結合を利用して間接的に標識を結合するものであっても良い。

【0016】

一般的な免疫測定では、免疫反応の後に免疫反応複合体中に取り込まれた標識物と遊離の標識物を分離するために、いわゆるB/F分離を実施するが、そのため担体を利用する。従来から常用されている担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン又はデキストラン等の原料によって構成された、ビーズ、チューブ又はプレート状であるが、本願発明では担体を使用するか否かを含め、使用するとした場合のその形状や寸法等を自由に決定することができる。

【0017】

本願発明で使用する蛋白質変性剤は、一般的に蛋白質変性剤として使用されるものであれば特に制限はなく、例えば種々の界面活性剤等であっても良い。中でもラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、尿素、グアニジン塩酸塩が特に好ましい蛋白質変性剤として例示できる。本願発明は、かかる蛋白質変性剤を使用して、生体由来試料中のHBc抗原又はHBc抗体を測定するための試薬として供されるHBc抗原を処理し、そして特に好ましくはかかる試薬中のHBc抗原の処理に加えて、生体試料中の測定されるべきHBc抗原についても前記蛋白質変性剤による処理を行うものである。

【0018】

蛋白質変性剤による処理としては、処理すべきHBc抗原に対して前記のような蛋白質変性剤を含む溶液を添加し、例えば室温条件下で2時間程度放置した後、溶液に適当な蛋白質を含む溶液を添加して蛋白質変性剤の濃度を低下(中和)させる、等の手法を採用することができる。使用する蛋白質変性剤の量(濃度)に特に制限はないが、後の過程で蛋白質の変性効果が残存しない程度にまで中和可能な濃度であれば良い。例えばSDSであれば、0.05%程度を使用することが例示できる。

【発明の効果】

【0019】

本願発明によれば、後の実施例で詳細に示したように、HBc抗原とHBc抗体との免疫反応を用いて生物学的試料中のHBc抗原又はHBc抗体を測定する場合に、HBc抗原又はHBc抗体と複合体を形成する物質により、HBc抗原中のHBc抗体と結合する部位がブロックされ、免疫反応が妨害されてしまう危険性を減少することができる。特に競合イムノアッセイでは、生体由来試料中に含まれる物質によって免疫反応が妨害されると測定値が低くなり、算出されるHBc抗体量が増加して偽陰性と判断される危険があるため、本願の免疫反応の妨害の可能性を減少できるという効果は、偽陰性が発生する可能性を抑制する上で効果的である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下に本願発明を更に詳細に説明するために実施例を記載するが、これら実施例は本願発明を限定するものではない。

【0021】

なお実施例では、免疫測定装置として市販の自動免疫測定装置(東ソー(株)製、AIA(登録商標)-1800)を用い、1ステップ競合法によりHBc抗体の測定を行った。

【0022】

10

20

30

40

50

具体的には、HBc抗体(2)を固定化した担体およびアルカリ性フォスファターゼにて標識されたHBc抗体(1)を含む溶液とHBc抗原を含む反応カップに試験試料(血清)を添加し37℃にて攪拌保温した(反応カップは、HBc抗体(1)とHBc抗原が凍結乾燥状態で封入したものである)。その後、未反応物をB/F分離により除去し、HBc抗原を介して担体に結合したHBc抗体(1)を、4メチルウンベリフェリリン酸塩を添加し、単位時間当たりの4メチルウンベリフェロンの生成(nM/秒)を蛍光測定した。本生成度はアルカリ性フォスファターゼ量に比例するものである。

【0023】

上記測定の結果は、陰性コントロール(試験試料中にHBc抗体が存在しない時の測定値)を基準にし、HBc抗体が存在することで抑制される度合(=INH%)で示した。

【0024】

【化1】

$$INH\% = \frac{\text{陰性コントロールの測定値} - \text{試験試料の測定値}}{\text{陰性コントロールの測定値} - \text{陽性コントロールの測定値}} \times 100$$

この計算で50%に等しいか又は50%より大きい値を示した場合は、便宜的に陽性と判断した。

【0025】

本実施例における陰性群は、B型肝炎の他のマーカーもB型肝炎の病歴もない供血者からインフォームドコンセントを得て採取したものであり、その中で50%以上の強いHBc抗体様の反応性を示したものを偽陽性群とした。

【実施例1】

【0026】

HBc抗原液をHBc抗原100~250μg/mL、0.05%(v/v)SDS、0.1M Tris HCl(pH9.5)となるよう調整し、十分に混合した後4℃において2時間以上放置した。反応を停止させるため、バッファーによりpH9.0に調整された5%BSA及び6%ペプタイドを含む溶液で10倍以上に希釈し、4℃にて保存した(使用するまでに1週間以上保存する場合-80℃にて保存)。以上のSDSによる処理を行ったものを抗原Bとし、行わないものを抗原Aとした。

【0027】

抗原A、抗原Bをそれぞれ用い先述したように反応試薬を作製し(それぞれ試薬A、試薬Bとする)、SDS処理の効果を以下の要領で評価した。

(a) 偽陽性群を含む陰性検体の測定

表1は、健常人検体26例(HBc抗体陰性検体20例と、HBc抗体陽性(偽陽性検体)検体6例)を測定した結果である。図1は、表1の結果から試薬A、Bの測定値分布をヒストグラムに示したものである。表1、図1からわかるように試薬Aで測定すると、50%以上のINH%を示していた偽陽性検体が試薬Bで測定すると30%付近のINH%を示すようになり、全体的にばらついていた値が0%付近に収束していることがわかる。抗原をSDSにより前処理することで陰性検体中の成分による影響が非常に小さくなり偽陽性検体がなくなるという効果が得られることが分かる。なお、本例で測定した擬陽性検体(6例)は、約1000人の健常人に由来する生体由来試料から、擬陽性を示したものを、インフォームドコンセントを得て収集したものである。

【0028】

10

20

30

40

【表 1】

	試薬A		試薬B	
	阻害率%	判定	阻害率%	判定
SAMPLE 1	87	+	31	-
SAMPLE 7	51	+	32	-
SAMPLE 17	58	+	38	-
SAMPLE 26	75	+	31	-
SAMPLE 42	46	-	16	-
SAMPLE 55	83	+	26	-
SAMPLE 84	38	-	12	-
SAMPLE 97	24	-	-5	-
SAMPLE 178	56	+	25	-
SAMPLE 91	22	-	17	-
SAMPLE 92	11	-	-3	-
SAMPLE 93	13	-	-1	-
SAMPLE 94	44	-	-7	-
SAMPLE 95	23	-	-4	-
SAMPLE 96	37	-	22	-
SAMPLE 97	33	-	4	-
SAMPLE 98	15	-	-1	-
SAMPLE 99	16	-	-3	-
SAMPLE 100	16	-	5	-
SAMPLE T12	25	-	11	-
SAMPLE T13	6	-	-7	-
SAMPLE T14	11	-	4	-
SAMPLE T15	1	-	0	-
SAMPLE T16	6	-	-4	-
SAMPLE T17	1	-	-3	-
SAMPLE T18	14	-	4	-

10

20

30

40

(b) HBc抗体陽性血清希釈列による比較

表2は、HBc抗体陽性血清を陰性血清で50倍、100倍、200倍、500倍に希釈して調整した希釈列を試薬A、Bで測定した結果である。表2からわかるように両試薬は同等の阻害率を示しており、HBc抗原をSDS処理することによっては試験の感度および検出能に影響を受けないことがわかる。

【0029】

【表 2】

	阻害率%	
	試薬A	試薬B (本法)
希釈なし	100	100
50 倍希釈	86	85
100 倍希釈	67	66
200 倍希釈	41	39
500 倍希釈	18	21

10

(c) 感度パネル (BOSTON BIOMEDICA, INC. Anti-HBc Total Mixed Titer Performance Panel) の測定
表 3 に、BOSTON BIOMEDICA, INC. Anti-HBc Total Mixed Titer Performance Panel (PHG201) を
試薬 A、B で測定した時の結果である。両試薬とも判定は完全に一致し、同等の阻害率を
示した。

20

【0030】

【表 3】

Panel I.D.	Matrix	PEI [注] (U/ml)	試薬A		試薬B (本法)	
			阻害率%	判定	阻害率%	判定
PHG201-01	Plasma	1	80	+	79	+
PHG201-02	Plasma	NEG	1	-	-12	-
PHG201-03	Plasma	3	91	+	90	+
PHG201-04	Plasma	1	74	+	62	+
PHG201-05	Plasma	6	97	+	94	+
PHG201-06	Plasma	12	98	+	98	+
PHG201-07	Plasma	>100	100	+	100	+
PHG201-08	Serum	>100	100	+	100	+
PHG201-09	Plasma	61	100	+	99	+
PHG201-10	Serum	>100	100	+	100	+
PHG201-11	Plasma	29	100	+	99	+
PHG201-12	Plasma	1	87	+	83	+
PHG201-13	Plasma	2	72	+	71	+
PHG201-14	Plasma	3	86	+	86	+
PHG201-15	Serum	>100	100	+	100	+
PHG201-16	Plasma	>100	100	+	100	+
PHG201-17	Plasma	>100	100	+	100	+
PHG201-18	Plasma	3	88	+	88	+
PHG201-19	Serum	81	100	+	100	+
PHG201-20	Serum	NEG	6	-	-3	-
PHG201-21	Plasma	15	97	+	96	+
PHG201-22	Serum	40	100	+	100	+
PHG201-23	Serum	5	98	+	95	+
PHG201-24	Plasma	1	51	+	52	+
PHG201-25	Serum	>100	100	+	100	+

30

40

PEI [注] : [U/mL : ポールエーリッヒ単位 (Paul Ehrlich Units) /mL]

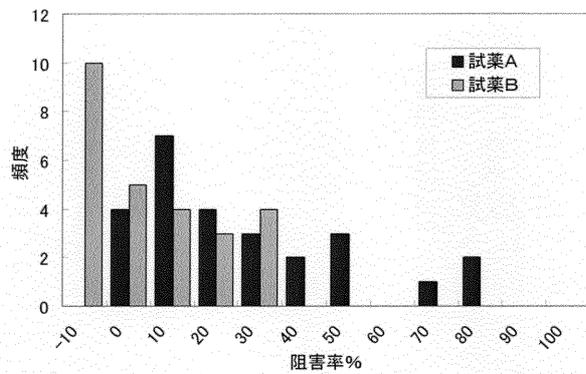
【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 3 1 】

【 図 1 】 実施例 1 の結果（試薬 A、B による抗体陰性検体の測定結果をヒストグラムに示した図）である。黒のバー（左側）は試薬 A、グレーのバー（右側）は試薬 B の結果を示す。

【 図 1 】



专利名称(译)	免疫测定		
公开(公告)号	JP2011106834A	公开(公告)日	2011-06-02
申请号	JP2009259273	申请日	2009-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	鎌田陽子 新谷晃司		
发明人	鎌田 陽子 新谷 晃司		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/569.G G01N33/53.N G01N33/543.501.J G01N33/531.A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：在含有竞争性免疫测定的HBc抗体的免疫测定中，通过使用HBc抗原中的HBc抗体阻断结合位点来抑制抑制剂对最大限度地抑制免疫反应的作用。解决方案：在使用肝炎B病毒核心抗原及其抗体的免疫反应测量生物样品或其抗体中的肝炎B病毒核心抗原的免疫测定中，用蛋白质修饰剂预处理肝炎B病毒核心抗原。 Z

	試薬 A		試薬 B	
	阻害率%	判定	阻害率%	判定
SAMPLE 1	87	+	31	—
SAMPLE 7	51	+	32	—
SAMPLE 17	58	+	38	—
SAMPLE 26	75	+	31	—
SAMPLE 42	46	—	16	—
SAMPLE 55	83	+	26	—
SAMPLE 84	38	—	12	—
SAMPLE 97	24	—	-5	—
SAMPLE 178	56	+	25	—
SAMPLE 91	22	—	17	—
SAMPLE 92	11	—	-3	—
SAMPLE 93	13	—	-1	—
SAMPLE 94	44	—	-7	—
SAMPLE 95	23	—	-4	—
SAMPLE 96	37	—	22	—
SAMPLE 97	33	—	4	—
SAMPLE 98	15	—	-1	—
SAMPLE 99	16	—	-3	—
SAMPLE 100	16	—	5	—
SAMPLE T12	25	—	11	—
SAMPLE T13	6	—	-7	—
SAMPLE T14	11	—	4	—
SAMPLE T15	1	—	0	—
SAMPLE T16	6	—	-4	—
SAMPLE T17	1	—	-3	—
SAMPLE T18	14	—	4	—