

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4292670号  
(P4292670)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月17日(2009.4.17)

(51) Int.Cl.		F 1	
<b>GO 1 N 33/576</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/576	B
<b>GO 1 N 33/531</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/531	B
<b>C 1 2 Q 1/70</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/70	

請求項の数 1 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2000-35654 (P2000-35654)</p> <p>(22) 出願日 平成12年2月8日(2000.2.8)</p> <p>(65) 公開番号 特開2001-221802 (P2001-221802A)</p> <p>(43) 公開日 平成13年8月17日(2001.8.17)</p> <p>審査請求日 平成19年1月12日(2007.1.12)</p>	<p>(73) 特許権者 000003300 東ソー株式会社 山口県周南市開成町4560番地</p> <p>(72) 発明者 新谷 晃司 神奈川県横浜市瀬谷区瀬谷4丁目16-1 0-303</p> <p>審査官 三木 隆</p> <p>(56) 参考文献 特開平10-239317 (JP, A) 特開昭62-272157 (JP, A) 特開平07-198721 (JP, A) 特開昭61-296270 (JP, A) 特開平11-258241 (JP, A)</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 抗HBc抗体の免疫測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的試料中の抗HBc抗体を競合法により免疫学的に検出するための方法において、免疫反応を生じさせる際にアルギニンまたはアルギニン塩を共存させることで妨害物質による擬陽性の発生を防止する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術の分野】

本願発明は、B型肝炎ウイルス(以下HBVと略す)の感染により生体内で産生される、HBVの芯(コア;以下HBcと略する)に対する抗体(以下抗HBc抗体と略す)の検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

HBVは直径42nmの二重構造をもつ球形粒子で、外皮(エンベロープ)と芯(コア)から成ることが知られている。HBc抗原は、このHBcを形成する抗原のことであり、抗HBc抗体は、HBc抗原に対する抗体である。

【0003】

ヒト等にHBVが感染すると抗HBc抗体が産生されるが、HBc抗体はHBV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。HBc抗体にはIgM型とIgG型の2タイプがあり、急性B型肝炎では発症後12週までIgM型抗HBc抗体

の陽性が認められる。一方 I g G 型抗 H B c 抗体は、I g M 型抗 H B c 抗体が陰性となった後も、長期に渡って低力価から中力価の陽性を呈すると報告されている（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 Post graduates, 24 (2), 106 - 108, 1986 年）。また抗 H B c 抗体は、B 型肝炎表面抗原（以下 H B s 抗原と略する）が出現した後、血清中に出現するが、急性 B 型肝炎においては H B s 抗原が消失した後から H B s 抗原に対する抗体（以下抗 H B s 抗体）が出現するころまで持続する。

【0004】

これらの事実から、抗 H B c 抗体は、H B s 抗原や抗 H B s 抗体血清中に見出されない時期に H B V 感染を知見するうえで重要なマーカーとすることができる（H. Iisukara, Correlation between anti-HBc titer and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg, Vox Sang, 63, 107 - 111, 1992 年）。また更には、急性 B 型肝炎時には抗 H B c 抗体の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 型肝炎を識別するうえでも重要なマーカーである（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 年）。

【0005】

このように抗 H B c 抗体の検出は、B 型肝炎の病態把握・感染予防に重要であり、輸血後の感染防止を目的とする輸血用血液のスクリーニング検査にも利用されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

抗 H B c 抗体の検出は、従来、主として競合イムノアッセイにより行われている。この方法は、H B c 抗原中の抗 H B c 抗体との結合部位に対して試料中の抗 H B c 抗体と検出可能な標識物で標識した一定量の抗 H B c 抗体（以下標識抗 H B c 抗体と略す）とを競合させるものであり、H B c 抗原と結合した標識抗 H B c 抗体の割合は、試料中の抗 H B c 抗体の濃度に反比例し、阻害率（陰性コントロールと試料の測定値の差から算出）として現わされる。

【0007】

競合イムノアッセイでは、試料中に標識抗 H B c 抗体と H B c 抗原との免疫反応を妨害する物質（妨害物質が存在すると測定値が低くなり、見かけ上、試料中に抗 H B c 抗体が存在するか、或いは実際の存在量以上に存在するような結果、つまり偽陽性を生じてしまう）。

【0008】

これまでに血液中の  $\gamma$ -グロブリン、アルブミン、 $\alpha_1$ -アンタイトリプシン等の種々の血清蛋白質が H B c 抗原と複合体を形成し、抗 H B c 抗体との反応部分をブロックしてしまうことが報告されており（今井光信、H B e 抗原の本態、肝胆膵、9 (4), 487 - 489, 1984 年）、従来の抗 H B c 抗体測定においても前記擬陽性を防止するために種々の工夫がされている。

【0009】

本願発明は、抗 H B c 抗体を免疫学的に検出するにあたり、前記妨害物質による擬陽性の発生を防止するための簡便な方法を新たに提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために成された本願請求項 1 の発明は、生物学的試料中の抗 H B c 抗体を免疫学的に検出するための方法に係り、免疫反応を生じさせる際にグアニジル基を有する物質を共存させる方法である。そして本願請求項 2 の発明は、請求項 1 の発明に係り、前記グアニジル基を有する物質はアルギニン、プロタミン類、尿素、グアニジン塩酸塩から選ばれる 1 種以上であることを特徴とする。以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

10

20

30

40

50

本願発明は、グアニジル基を有する物質の共存下で免疫反応、即ちHBc抗原と抗HBc抗体（標識抗HBc抗体）を反応させるものである。グアニジル基を有する物質としては、例えばアルギニン、プロタミン類、尿素、グアニジン塩酸塩等を例示することができる。これら物質を単独で、或いは2種以上混合して使用することにより本願発明の効果を達成できるが、中でもアルギニンを使用することは、試薬コストや試薬の取扱が容易である等の面で好ましい。

【0012】

グアニジル基を有する物質の共存量は、使用する物質を用いた予備的実験により任意に設定し得るが、一例を示せば、アルギニンの共存量について述べれば重量/容量%で5%から10%程度とすることが例示できる。

10

【0013】

グアニジル基を有する物質は免疫反応を行う容器に予め凍結乾燥状態或いは液体状態で投入しておいても良いし、HBc抗原又は抗HBc抗体（標識抗HBc抗体）を容器に添加するのと同時に投入すれば良い。

【0014】

グアニジル基を有する物質を共存させることにより達成される効果は、抗HBc抗体（標識抗HBc抗体を含む）とHBc抗原との間で免疫反応を生じさせる操作を含む免疫測定であれば、いわゆる競合イムノアッセイであってもサンドイッチイムノアッセイであっても同様である。従って本願発明は、競合イムノアッセイの形態及びサンドイッチイムノアッセイの形態のいずれの形態で実施しても良い。いずれの場合にも、2つのタイプがあり、競合イムノアッセイを例に説明すれば、一つは試料と標識抗HBc抗体と一緒に混合して担体に結合したHBc抗原に対して競合させる方法（いわゆる1ステップアッセイ）であり、もう一つはまず担体に結合したHBc抗原と試料を反応させ、次いで標識抗HBc抗体を反応させる方法（2ステップアッセイ）である。

20

【0015】

また本願発明を実施する際には、最終的に形成される免疫複合体の検出のため標識を使用するが、標識としてはアルカリ性ホスファターゼ等の酵素、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープ等に代表される種々の標識を用いることができる。またこれら標識は、免疫反応を生じさせるための試薬成分と化学的に直接結合されていても、ビオチン-アビジン等の親和結合を形成する物質を利用して間接的に結合されていても良い。特に後者の場合は、当初から結合されていることを要せず、免疫反応の過程等で両者を結合させるようにしても良い。

30

【0016】

本願発明の実施に当たっては、最終的に形成される免疫複合体に含まれる標識と該複合体に含まれずに遊離状態で存在する標識を分離するため、水不溶性担体を用いることが好ましい。水不溶性担体としてはガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、デキストラン等を材料とするビーズ、チューブ、プレート等、従来から使用されている担体や容器内壁を利用することが可能である。

【0017】

本願発明を実施するための試薬は、例えば水不溶性担体と結合したHBc抗原、標識抗HBc抗体そしてグアニジル基を有する物質とから構成することができる。ここで、HBc抗原を例えば抗HBc抗体を用いて担体と間接的に結合する構成を選択したり、前記したように標識と抗HBc抗体をビオチン-アビジン等で間接的に結合させる構成を選択しても良い。

40

【0018】

HBc抗原は、HBVから変性剤（SDS等）及び還元剤（ジオスレイトールやメルカプトエタノール等）を用いて調製しても良いし、大腸菌や酵母等を用いて遺伝子組換えの手法により調製しても良い。

【0019】

【発明の実施の形態】

50

以下実施例により本願発明を更に詳細に説明するが、本願発明はこれら実施例に限定されるものではない。なお以下の実施例は、市販の自動免疫測定装置（東ソー（株）製、商品名；A I A - 2 1）を用いて実施したものである。実施例で用いた抗H B c抗体検出用試薬は、まず容量1.2 mlの容器に、アルカリ性フォスファターゼ（A L P）で標識した50 μ lの Maus抗ヒトH B c抗体（モノクローナル抗体）溶液（抗体量で50 mg）を加えて凍結乾燥し、続いて50 μ lのヒトH B c抗原溶液（抗原量で5 ng）と、0.06 μ lの Maus抗ヒトH B c抗体（前記モノクローナル抗体とは異なるモノクローナル抗体）溶液（抗体量で60 ng）を固定化した直径約1.4 mmの球状担体（内部にフェライトを練り込んだもの）を加え、同様に凍結乾燥して調製したものである。

【0020】

10

実施例では、30 μ lのヒト血清を試料として用い、免疫反応は37℃で10分間行った。なお免疫反応に際しては、磁石により容器中の担体を運動させて反応液を攪拌した状態で生じさせた。

【0021】

免疫反応終了後、前記装置にていわゆるB/F分離操作を行い、前記担体と結合していない遊離成分を分離・除去し、A L Pの基質である4メチルウンベリフェリルリン酸塩を添加してその添加した瞬間から300秒までの300秒間に渡って基質分解物である4メチルウンベリフェロンの蛍光強度の増大から、その生成速度（n M / 秒）を測定した。

【0022】

また下記実施例では、陰性コントロール（抗H B c抗体を含まないヒト血清試料；抗H B c抗体以外のH B Vマーカーが検出されず、かつ、B型肝炎の病歴がない者であって、インフォームドコンセントの得られた者から得た血清）についての測定値と、陽性コントロール（市販の競合法によるE I A測定キット（コアザイム、商品名、ダイナボット（株）製）を用いて計算した値（該値 = （陰性コントロールの測定値 - 該コントロールを200倍希釈時の測定値） / （陰性コントロールの測定値 × 100））が100%程度となるほど高濃度のH B c抗体を含む、インフォームドコンセントの得られた者から得た血清）とを基準として、抗H B c抗体が存在したことにより抑制された割合（I N H %）により試料中の抗H B c抗体量を示した。即ち、I N H % = は下記式により表される。そしてこの計算式により50%以上の値を示した場合は陽性とした。

20

【0023】

30

【化1】

$$I N H \% =$$

陰性コントロールの測定値 — 試験試料の測定値

× 100

陰性コントロールの測定値 — 陽性コントロールの測定値

【0024】

40

実施例1

上記のようにして調製した反応容器（以下試薬（A）と略する）と、上記においてヒトH B c抗原溶液及び固定化抗ヒトH B c抗体を凍結乾燥する際に以下の操作において免疫反応時の濃度（重量 / 容量）が5%となるようにアルギニンをも添加した反応容器（以下試薬（B）と略する）を用いて、陰性コントロール1試料と抗H B c抗体が陰性である22試料について抗H B c抗体の検出を行った。なお結果は、陰性及び陽性コントロールについては5重測定、試料については2重測定した。

【0025】

結果を表1に示す。また表1の結果をヒストグラム化した図を図1に示す。

【0026】

50

【表 1】

## HBc 抗体陰性検体の測定結果

	試薬 A		試薬 B	
	測定値*	INH%	測定値*	INH%
陰性コントロール	26.426	-	23.012	-
陽性コントロール	0.078	-	0.067	-
3	27.587	-4	25.193	-9
47	30.410	-15	25.142	-9
62	21.944	17	23.253	-1
99	30.902	-17	25.034	-9
153	29.952	-13	25.085	-9
77	25.109	5	22.593	2
93	26.990	-2	24.153	-5
95	29.187	-10	24.502	-6
12	18.106	31	16.590	28
94	24.767	6	22.320	3
22	29.784	-13	22.604	2
30	17.153	35	22.285	3
72	23.328	12	22.685	1
B106	30.214	-14	26.495	-15
B113	29.514	-12	25.352	-10
T3	29.326	-11	25.335	-10
T25	24.251	8	22.258	3
B101	20.881	21	20.736	10
B104	14.010	47	16.057	30
T5	6.729	75	15.613	32
T19	13.106	50	16.591	28
TS	17.211	35	19.004	17

測定値：nM/s

## 【0027】

表 1、図 1 から分かるように、試薬 (A) によって 50% 以上の INH% を示していた検体 (T5 及び T19) が、試薬 (B) を用いた場合には 30 程度の INH% を示すようになり、全体的にばらついていた結果が 30% 以下に収束する。この結果から、免疫反応をアルギニン共存下で生じさせることにより偽陽性を抑制し得ることが分かる。

## 【0028】

10

20

30

40

50

## 実施例 2

実施例 1 で用いた陽性コントロールを陰性コントロールで 10 倍、50 倍、100 倍、500 倍又は 1000 倍に希釈した希釈列を調製し、実施例 1 と同様に試薬 (A) 及び試薬 (B) を用いて抗 HBc 抗体の検出を行った。結果を表 2 に示す。また表 2 の結果から得られる阻害曲線を図 2 に示す。

【0029】

【表 2】

HBc 抗体陽性血清の希釈列の測定結果

	試薬 A		試薬 B	
	測定値*	INH%	測定値*	INH%
陰性コントロール	26.426	-	23.012	-
陽性コントロール	0.078	-	0.067	-
1000 倍希釈液	22.508	15	19.707	14
500 倍希釈液	17.905	32	15.159	34
250 倍希釈液	10.178	62	9.169	60
100 倍希釈液	4.688	83	4.238	82
50 倍希釈液	1.903	93	2.233	91
10 倍希釈液	0.251	99	0.334	99

測定値：nM/s

【0030】

表 2、図 2 から分かるように、両試薬の阻害曲線は同等のものであり、試薬の感度や検出能はアルギニンの共存によって影響を受けない。

【0031】

## 実施例 3

陽性コントロール、陰性コントロール及び 14 試料を実施例 1 のように試薬 (A) 及び試薬 (B) を用いて測定し、その結果から試薬 (A) 及び試薬 (B) の測定値分布を求めた。結果を表 3、図 3 及び図 4 に示す。

【0032】

【表 3】

10

20

30

## H B c 抗体陽性検体の測定結果

	試薬A		試薬B	
	測定値*	I N H %	測定値*	I N H %
陰性コントロール	26.426	—	23.012	—
陽性コントロール	0.078	—	0.067	—
76	0.426	98	0.396	98
2-21	0.615	98	1.166	95
2-15	5.447	79	5.754	75
134	13.196	50	11.763	49
216	2.398	91	2.516	89
347	1.214	95	1.312	94
96	1.321	95	1.321	94
146	0.987	96	1.054	95
152	0.514	98	0.555	98
5	0.641	98	0.598	97
33	0.321	99	0.221	99
4	0.057	100	0.058	100
42	0.074	100	0.066	100
83	0.051	100	0.055	100

測定値：nM/s

## 【0033】

表3、図3及び図4から分かるように、試薬(A)は陰性・陽性試料の測定値分布に重複があるが、試薬(B)では両者の分布が明確に分離している。このことから、アルギニンを共存させることにより陰性試料の測定値分布が収束し、陰性と陽性の判別が明確になることが分かる。

## 【0034】

## 実施例4

実施例1と同様に、免疫反応時の濃度(重量/容量)が0、1、2、5、10又は15%となるようにアルギニンを添加した反応容器を用いて、陰性コントロール1試料と抗H B c抗体が陽性である15試料について抗H B c抗体の検出を行った。結果を表4、図5に示す。

## 【0035】

## 【表4】

10

20

30

40

HBc抗体陰性検体の測定結果

	アルギニン濃度 (%)					
	0	1	2	5	10	15
	INH%	INH%	INH%	INH%	INH%	INH%
B6	0	-6	-3	1	-1	-1
B13	-2	2	-2	3	0	-2
T3	2	3	5	7	3	2
T25	17	5	17	15	8	7
B1	36	32	29	20	19	18
B4	45	35	33	20	19	19
T5	75	37	39	13	11	10
T19	48	46	37	20	20	18
TS	35	34	36	24	20	22
T50	9	10	5	1	1	2
T161	35	33	30	25	22	20
T198	19	15	10	8	8	10
SK	-7	-5	-6	1	0	5
77	7	7	5	10	4	5
B113	3	1	4	1	2	4

10

20

30

## 【0036】

表4及び図5から分かるように、アルギニン濃度を上げることで全体的にばらついていた検出結果が30%以下に収束すること、かかる効果を得るためには5%以上のアルギニンを添加することが好適であること、が分かる。

## 【0037】

## 【発明の効果】

以上の説明から明らかなように、本願発明によりHBc抗原と抗HBc抗体(標識抗HBc抗体を含む)間の免疫反応の妨害を抑制し、最終的には検出結果が偽陽性と判別される恐れを減少することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、実施例1の結果をヒストグラム化した図である。

【図2】図2は、実施例2の結果(阻害曲線)を示した図である。

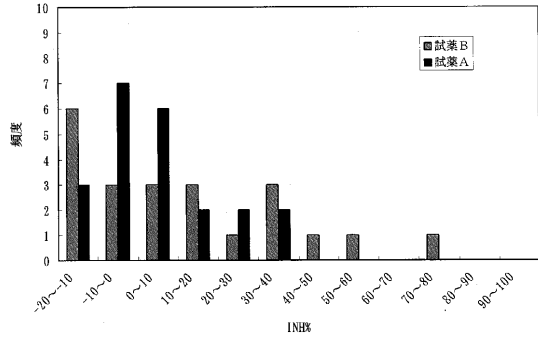
【図3】図3は、実施例3において試薬Aを用いたときのHBc抗体陰性検体および陽性検体の分布図である。

【図4】図4は、実施例3において試薬Bを用いたときのHBc抗体陰性検体および陽性検体の分布図である。

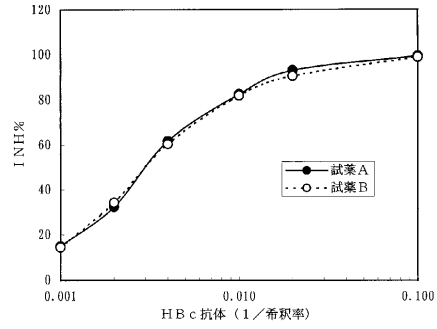
【図5】図5は、実施例4におけるHBc抗体陰性検体についての分布図である。

40

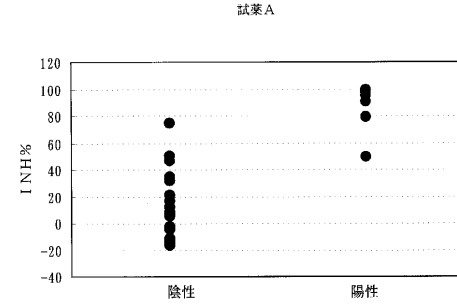
【 図 1 】



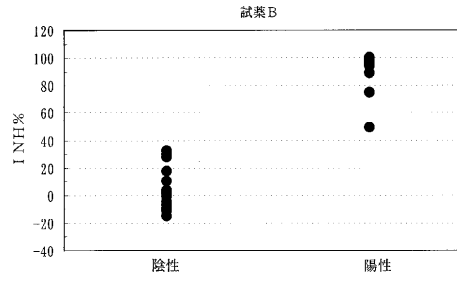
【 図 2 】



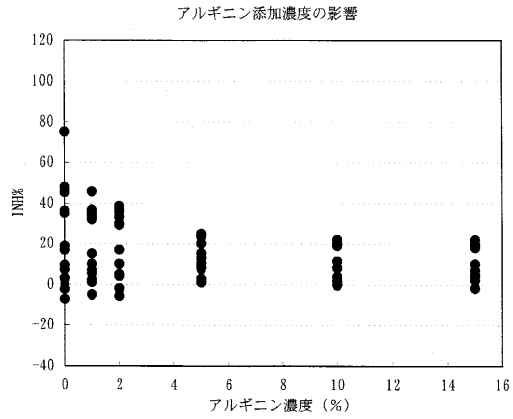
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 33/576

G01N 33/531

C12Q 1/70

专利名称(译)	抗HBc抗体的免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP4292670B2</a>	公开(公告)日	2009-07-08
申请号	JP2000035654	申请日	2000-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	东曹株式会社		
申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
当前申请(专利权)人(译)	Tosoh公司		
[标]发明人	新谷晃司		
发明人	新谷 晃司		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/531 C12Q1/70		
FI分类号	G01N33/576.B G01N33/531.B C12Q1/70		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR13 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR49 4B063/QR51 4B063/QR58 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS12 4B063/QS20 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
审查员(译)	三木隆		
其他公开文献	JP2001221802A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：当免疫学检测到抗HBc抗体时，新提供一种简单的方法来防止干扰物质产生假阳性。解决方案：在用于免疫检测生物样品中的抗HBc抗体的该方法中，当产生免疫反应时，使包含胍基的精氨酸，鱼精蛋白，尿素和盐酸胍中的一种或两种物质共存。。

	試薬A		試薬B	
	測定値*	I NH%	測定値*	I NH%
陰性コントロール	26.426	—	23.012	—
陽性コントロール	0.078	—	0.067	—
3	27.587	-4	25.193	-9
47	30.410	-15	25.142	-9
62	21.944	17	23.253	-1
99	30.902	-17	25.034	-9
153	29.952	-13	25.085	-9
77	25.109	5	22.593	2
93	26.990	-2	24.153	-5
95	29.187	-10	24.502	-6
12	18.106	31	16.590	28
94	24.767	6	22.320	3
22	29.784	-13	22.604	2
30	17.153	35	22.285	3
72	23.328	12	22.685	1
B106	30.214	-14	26.495	-15
B113	29.514	-12	25.352	-10
T3	29.326	-11	26.335	-10
T25	24.251	8	22.258	3
B101	20.881	21	20.736	10
B104	14.010	47	16.057	30
T5	6.729	75	15.613	32
T19	13.106	50	16.591	28
TS	17.211	35	19.004	17