

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/111620

発行日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(43) 国際公開日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	B 4 B 0 6 3
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	L
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

出願番号 特願2006-513634 (P2006-513634)	(71) 出願人 399115851 株式会社先端生命科学研究所 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/009158	
(22) 国際出願日 平成17年5月19日(2005.5.19)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-149682 (P2004-149682)	(74) 代理人 100087918 弁理士 久保田 耕平
(32) 優先日 平成16年5月19日(2004.5.19)	(72) 発明者 大植 千春 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 榎 昇 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内
	(72) 発明者 木村 達治 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内
	Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ10 QR52 QR64 QS20 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎ウイルスの検出方法

(57) 【要約】

血清中のB型肝炎ウイルス(HBV)抗原を検出または定量する方法、ならびにこれらの検出および定量に用いられる極めて簡易で操作性が高い検体処理方法の提供。

B型肝炎ウイルス(HBV)を含む検体を、(1)酸性化剤、および(2)蛋白質変性剤、またはアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を分子中に有している両性界面活性剤または陽イオン界面活性剤を含有する処理剤で処理することにより、HBV抗原の遊離とHBV抗原に結合する抗体の破壊を行うことを特徴とするHBV含有検体の処理方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B 型肝炎ウイルスを含む検体を、

(1) 酸性化剤、および

(2) 界面活性剤および / または蛋白質変性剤

を含有する処理剤で処理することにより、B 型肝炎ウイルス抗原の解離と B 型肝炎ウイルス抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とする B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。

【請求項 2】

前記界面活性剤および / または蛋白質変性剤にさらに還元剤を添加してなる請求項 1 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。 10

【請求項 3】

前記界面活性剤が、アルキル基および第 3 級アミンもしくは第 4 級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、アルキル基および第 3 級アミンもしくは第 4 級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤、ならびに非イオン性界面活性剤からなる群より選択される少なくとも一種の界面活性剤である請求項 1 または 2 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。

【請求項 4】

前記界面活性剤のアルキル基の炭素数が炭素数 12 個以上である請求項 3 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。 20

【請求項 5】

前記酸性化剤が、塩酸、硫酸、酢酸、トリクロロ酢酸またはトリフルオロ酢酸である請求項 1 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。

【請求項 6】

前記炭素数 12 個以上のアルキル基および第 3 級アミンもしくは第 4 級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤が、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート (N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート (N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート (N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、または N-オクタデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート (N-Octadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate) である請求項 3 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。 30

【請求項 7】

前記炭素数 12 個以上のアルキル基および第 3 級アミンもしくは第 4 級アンモニウム塩を分子中に有している陽イオン界面活性剤が、デシルトリメチルアンモニウムクロライド (Decyltrimethylammonium Chloride)、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Dodecyltrimethylammonium Chloride)、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Tetradecyltrimethylammonium Chloride)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Hexadecyltrimethylammonium Chloride)、デシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Decyltrimethylammonium Bromide)、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Dodecyltrimethylammonium Bromide)、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Tetradecyltrimethylammonium Bromide)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Hexadecyltrimethylammonium Bromide)、ラウリルピリジニウムクロライド (Lauryl pyridinium Chloride)、テトラデシルピリジニウムクロライド (Tetradecyl pyridinium Chloride)、またはセチルピリジニウムクロライド (Cetyl pyridinium Chloride) である請求項 3 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。 40

【請求項 8】

前記非イオン界面活性剤がポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエス 50

テル類、Bridj35、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、MEGA-10、またはデカノイル - N - メチルグルタミドである請求項 3 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。

【請求項 9】

前記蛋白質変性剤が、尿素またはチオ尿素である請求項 1 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。

【請求項 10】

前記還元剤が、システイン、システアミン、ジメチルアミノエタンチオール、ジエチルアミノエタンチオール、ジイソプロピルアミノエタンチオール、またはジチオスレートールである請求項 2 に記載した B 型肝炎ウイルス含有検体の処理方法。

【請求項 11】

B 型肝炎ウイルス抗原の免疫学的検出方法であって、
 (1) 請求項 1 または 2 に記載の B 型肝炎ウイルス含有検体の処理を行う工程、および
 (2) B 型肝炎ウイルス抗原に結合するプローブを用いて B 型肝炎ウイルス抗原を検出する工程
 を含む B 型肝炎ウイルス抗原の免疫学的検出方法。

【請求項 12】

B 型肝炎ウイルス抗原を検出するために、検体を処理する処理剤中に下記の (1) の酸性化剤とおよび (2) の群から選択される少なくとも 1 種の物質を含む診断薬または診断薬キット。

(1) 酸性化剤。

(2) アルキル基および第 3 級アミンもしくは第 4 級アンモニウム塩を分子中に有している両性界面活性剤、アルキル基および第 3 級アミンもしくは第 4 級アンモニウム塩を分子中に有している陽イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、ならびに蛋白質変性剤。

【請求項 13】

前記 (2) の物質にさらに還元剤を添加してなる請求項 12 に記載の診断薬または診断薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血中の B 型肝炎ウイルス (以下、「HBV」という。) 抗原を高感度で検出または定量するための、HBV 含有検体の処理方法および該処理方法を用いる HBV 抗原の検出または定量方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

HBV は、輸血後肝炎の原因ウイルスとして最初に同定されたウイルスであり、手術時の輸血によって感染する。そのため、輸血用血液のスクリーニングにとって、血液の HBV 感染の有無を診断することが極めて重要である。

かかる HBV 感染の診断法としては、検体中に存在する HBV に対する抗体を検出する抗体検出法、HBV の抗原を検出する抗原検出法、または HBV の遺伝子を検出する方法がある。

【0003】

かかる検出方法のうち HBV 遺伝子の検出方法には、NAT (核酸増幅法) や DNA プローブ法があり、現在広く臨床現場で用いられている。また、NAT 検査の普及により、HBV DNA 量と HBV キャリアの病態との関連が注目され、抗ウイルス剤による治療後のモニタリングには NAT 検査が主に利用されてきている。

【0004】

PCR 法および TMA 法等の前記 NAT 検査法は、遺伝子断片を検出するには高感度な検出方法である。しかしながら、検体中から HBV ゲノム DNA を抽出する際、用手法において処理時間が 2 時間も必要であり、複数回の操作工程を含むなど煩雑である。加えて、このように操作が複雑であるために、コンタミネーションの機会が増え、偽陽性検体の生じる可能性

10

20

30

40

50

を増加させている。また、安定した定量値を得るためには熟練を要するという問題もある。近年、自動化機器の開発により、コンタミネーション対策や DNA抽出の処理時間の短縮がなされてきたが、依然として高価な機器を必要とするため、検体を多量処理する施設以外には一般に普及はしていない。さらに、DNAプライマーが標的遺伝子と一致しなければならぬため、プライマーを数種類も使用する必要があり、検査あたりのコストが免疫測定法と比較して高くなるといった問題点がある。

【0005】

HBV 遺伝子検査にはこのような問題があるため、ウイルス抗原検出法が注目されている。従来、HBV 抗原検査では、血液スクリーニングのためにHBs 抗原検出法が利用されており、HBVの増殖マーカーとしてはHBe抗原測定法が汎用されてきた。

10

【0006】

かかる抗原検査に加え、HBVコア抗原（HBc抗原）を直接検出する方法も開発された。Usudaら（Journal of Virological Methods, 72, 95-103, 1998）は、HBVコア（HBc）抗原に対して特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、血清中のHBc抗原を検出する方法を開発し、前記のウイルスゲノムを検出する NAT検査法と同様に臨床的有用性を持つことを示した。かかるHBc抗原検出系は、検出過程で増幅処理操作が加わらないため、コンタミネーションに対し比較的寛容である。

【0007】

しかしながら、前記方法にもいくつかの点で問題が残されている。測定のための検体処理の工程が繁雑であり、かつ時間がかかることからスクリーニングおよびモニタリングなどの用途に用いようとした際に問題となる。すなわち、検体（血清）の処理のために、ウイルス粒子の濃縮と血清成分の除去のためにHBsポリクローナル抗体処理（37℃、2時間）、遠心操作（10分間）、上清の除去、界面活性剤処理、アルカリ処理（35分間）、中和剤添加といった多段階処理工程を必要とする。かかる工程は、非常に熟練を要する作業であるため、再現性を得るためには熟練度が必要であり、また最低約3時間の処理時間が必要である。さらに遠心操作、上清除去等の工程があるために、自動化が困難で、かつ同時大量処理を困難にしており、操作面においても大量処理を必要とする用途に適していない。

20

【0008】

また押原らは、HBsポリクローナル抗体での処理を行わずに、アルカリ処理、プロナーゼ処理、非イオン界面活性剤であるノニデットP40（NP-40）およびメルカプトエタノールの添加によりHBc抗原の測定を行う方法を開発している（特開平8-50133）。しかしながらかかる方法も感度が低く、HBV-DNAとして2.2pg/mlの検出感度であり、DNAの量としては 10^5 から 10^6 コピー/ml程度と考えられる。

30

【0009】

前記HBc抗原検出法に加え、HBe抗原とHBc抗原を同時に測定するHBVコア関連抗原（HBcr抗原）の測定法（国際公開WO 02/14871 A1）やHBVのウイルス様粒子を形成するHBVのp22cr抗原（HBV p22cr抗原）の測定法（PCT/JP03/11389）が開発されてきている。これらの方法はHBc抗原の測定より高感度であるが、遺伝子測定法と比較すると未だ十分とは言えない状況にある。

40

【0010】

【特許文献1】特開平8-50133号 公報

【特許文献2】国際公開WO 02/14871 A1 公報

【特許文献3】PCT/JP03/11389 明細書

【0011】

【非特許文献1】Journal of Virological Methods, 72, 95-103, 1998

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

免疫測定法は操作が簡便で安価に測定できるが、増殖マーカーとして用いられている現

50

行のHBe抗原測定法では、HBe抗体の存在下では免疫複合体として存在するHBe抗原を測定することができない。また、HBc抗原測定法は、HBV DNA量と相関はあるものの、前記のように前処理が繁雑であり、さらに感度不足のため臨床試験に応用されていない。

【0013】

一方、HBVコア関連抗原の測定やHBV p22cr抗原の測定では、界面活性剤と熱（56-70）を用いて検体の前処理を行い、抗体やウイルス粒子を破壊した後に測定している。

しかしながら、かかる方法においても、検体をoff-boardで処理する必要があり、完全自動化は困難である。

【0014】

従って、本発明の課題は、B型肝炎のスクリーニングやB型慢性肝炎患者の治療におけるモニタリングなどに用いるため、HBV抗体の存在下においてもHBVコア関連抗原（HBeおよびHBc抗原）やHBV p22cr抗原等を定量するための前処理方法およびそれを用いた測定方法を提供することにある。すなわち、より短時間に簡便な前処理で、自動化などの大量処理システムに容易に適用可能なHBV抗原検出系を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

そこで、本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、（a）検体中のHBV抗原を短時間の簡単な操作のみで、プローブを用いた検出に適した状態にすることが可能なHBV含有検体の処理方法および（b）検体中のHBV抗原の検出のために、捕捉用プローブや検出用プローブと競合する宿主由来のHBV抗原に対する抗体を短時間で簡単な処理により、同時に不活化させ得る処理方法に着目した。また、（c）HBV抗原を測定するため、検体の酸性化剤による処理、および（d）該処理に加えて界面活性剤、蛋白質変性剤、還元剤の処理により、検体中に存在するHBV抗原を、ウイルス粒子または免疫複合体から遊離させることができ、同時に検体中に存在するHBVに対するヒト抗体も不活化され、そして、（e）該処理法により、抗体のようなプローブを用いた免疫測定法に最適な検体を提供することができることを見出した。さらに、（f）HBV抗原を含む検体中のHBV抗原をウイルス粒子から遊離し、同時に検体中に存在するHBVに対するヒト抗体をも不活化する処理剤によって検体を処理する工程を提供し、該処理工程を含むHBV抗原を免疫学的測定法によって検出および定量する方法、ならびに（g）該処理剤を含むHBV抗原の測定キットを提供できることを見出し、かかる知見に基づいて、本発明の完成に到達した。

【0016】

かくして、本発明によれば、次の1～3に示す、

1．HBVを含む検体を、

（1）酸性化剤、および

（2）界面活性剤および/または蛋白質変性剤

を含有する処理剤で処理することにより、HBV抗原の解離とHBV抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とするHBV含有検体の処理方法。

2．HBV抗原の免疫学的検出方法であって、

（1）前項1に記載のHBV含有検体の処理を行う工程、および

（2）HBV抗原に結合するプローブを用いてHBV抗原を検出する工程

を含むHBV抗原の免疫学的検出方法。

3．HBV抗原を検出するために検体を処理する処理剤中に下記の（1）の酸性化剤および

（2）の群から選択される少なくとも1種の物質を含む診断薬または診断薬キット。

（1）酸性化剤。

（2）アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を分子中に有している両性界面活性剤、アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を分子中に有している陽イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、ならびに蛋白質変性剤。

が提供される。

【0017】

10

20

30

40

50

さらに、HBV含有検体の処理方法の好ましい実施態様として、次の1)または2)を挙げることができる。

すなわち、

1) HBVを含む検体を、

(1) 酸性化剤、および

(2) 蛋白質変性剤、アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤、または非イオン界面活性剤のいずれかを含有する処理剤

で処理することにより、HBV抗原の解離とHBV抗原に結合する抗体の不活化を行うHBV含有検体の処理方法。

10

2) HBVを含む検体を、

(1) 酸性化剤、および

(2) アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤、蛋白質変性剤、非イオン界面活性剤、または還元剤のいずれかの2種以上の組み合わせを含有する処理剤

で処理することにより、HBV抗原の解離とHBV抗原に対する抗体の不活化を行うことを特徴とするHBV含有検体の処理方法。

【発明の効果】

20

【0018】

本発明によれば、抗体などのプローブを用いて抗原を検出するいわゆる免疫学的測定方法に適した状態に、HBVのウイルス粒子から簡便に、短時間でウイルス抗原を遊離させ、HBV抗原に対する抗体を不活化することが可能となる。また、本発明によって示される方法によって、HBVを含む検体を処理することにより、抗体などのプローブを用いて抗原を検出するいわゆる免疫学的測定方法に従いHBV抗原を簡便、短時間でかつ高感度に検出および定量することが可能となる。さらに、本発明によれば、酸性化剤に加えて界面活性剤等の使用により酸処理による沈殿等の問題を解消し、蛋白質を効率よく破壊し、簡便、かつ短時間でウイルス抗原を遊離させ、著しく優れた感度向上効果を奏することが可能である。

30

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】検体処理において酸性化剤(塩酸)濃度による効果を検討した結果を示す図である。

【符号の説明】

【0020】

- - HBV抗原陽性検体(990277)
- - HBV抗原陽性検体(990544)
- - 健常人血清(Normal serum)
- - 健常人血漿(Normal plasma)

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

本発明に係るHBV抗原含有検体の処理方法における検体としては、全血、血漿、血清、尿、唾、脳脊髄液などの生物学的体液、および肝組織などを挙げることができる。

【0022】

HBVの感染性粒子は直径42nmの構造のDane粒子だと考えられている。その外皮のリポ蛋白がHBs抗原であり、内部の直径27nmのヌクレオカプシド(コア粒子)を形成する蛋白がHBc抗原である。この他に、HBVのヌクレオカプシド様の粒子を形成する蛋白としてHBV p22 cr抗原があるが、この分子がコア様粒子を形成し、その外側にHBs抗原を持っていると考えられる。

50

【0023】

B型肝炎の診断は、HBs抗原の検出またはHBe抗原の検出により行われるのが一般的である。しかしながら、これらは感染時期や感染粒子の量を正確に反映するものではない。このため、ウイルス粒子またはウイルス様粒子を形成しているHBc抗原、HBコア関連抗原やHBV p22cr抗原を測定することが必要である。

【0024】

検体中ではHBc抗原、p22cr抗原はウイルス粒子を形成する蛋白として存在しており、また抗HBV抗体によりHBe抗原などと免疫複合体の形成がみられる。この中で、HBc抗原、HBe抗原やHBV p22cr抗原を検出するためには、I) HBV粒子を破壊して、HBc抗原やHBV p22cr抗原をHBV粒子から遊離させると共に抗原をできるだけ単分子化する、II) 宿主由来のHBVのHBc抗原、HBe抗原に対する抗体を不活化または除去する、III) HBV抗原に対する抗体以外の他の血中成分との相互作用からHBc抗原、HBe抗原やHBV p22cr抗原を遊離させることが必要である。HBV抗原に対する抗体は、遠心操作やアフィニティーカラム操作などで除去できるが、処理工程が増えることから不活化することが望ましいと考えられる。

【0025】

検出系の中で限られた検体量に含まれているHBc抗原、HBe抗原やHBV p22cr抗原を、HBV粒子、HBV抗原に対する抗体、他の血中成分などから最大限単分子の状態に遊離させることが、プローブと反応可能な抗原分子数を増加させることとなる。短時間かつ簡易な検体処理により、抗原を最大限単分子の状態に遊離させ、プローブとの反応性を高めることが重要である。

【0026】

検体中に存在する抗体の活性を失活させる条件は、アルカリ処理、酸処理などが知られている。血清などを酸処理すると、一部の血清由来蛋白質などは不可逆的に変性し、場合によっては沈殿や白濁を生じることがある。このため、検体の酸処理後、処理検体のピペッティング操作では、詰まりなどの障害になることが多く、また、測定の際に標的とする抗原を捕捉する抗体などのプローブが結合している担体や固相に変性蛋白質などを巻き込んだ沈殿が吸着し、擬陽性を呈することがある。加えて、それらの沈殿物の中に標的とする抗原が巻き込まれ、プローブと結合可能な抗原量の減少のため、感度が低下するという問題も生じる。

【0027】

本発明は、酸性化剤に他の物質を添加することによって、酸処理による沈殿や白濁などの防止や、擬陽性の防止および感度の上昇を達成することができる。

ここで酸性化剤としては、塩酸、硫酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、トリクロル酢酸などが、適当である。特に、酸性化剤濃度は、処理時濃度で0.05N以上1 N以下が好ましく、さらに0.25 N~1 Nが好ましい。この場合酸性化剤を加えた検体はpH2.5以下、ほとんどの検体でpH2.0以下で処理していることになる。

【0028】

前記酸性化剤に添加する処理剤の1つとして界面活性剤が挙げられる。多種多様な界面活性剤が蛋白質の高次構造を壊す作用をもつことが知られており、ウイルス粒子膜の破壊、抗体の変性、不溶性蛋白質の可溶化などの効果がある。しかしながら、かかる界面活性剤の存在下では、標的とする抗原の構造エピトープも壊れ、抗原捕捉用抗体などのプローブとの結合が弱められ、感度が低下することが大きな問題となる。

【0029】

また、一方で界面活性剤の変性作用は可逆的であることが多く、希釈や透析などによって界面活性剤濃度を薄めることによって一時的に変性した構造が元に戻る場合がある。このことは、測定用プローブと競合してしまう検体由来の抗体が存在することとなり、結果として感度低下となることが明らかである。つまり、界面活性剤の添加は、以上のような二面性をもっている。また界面活性剤は、それらの構造や性質によって様々に分類される。例えば、イオン性および非イオンの界面活性剤があり、イオン性界面活性剤としてはさらに陰イオン、陽イオン、両性界面活性剤などが挙げられる。

【 0 0 3 0 】

本発明者らは、酸性化剤と界面活性剤を組み合わせることで、沈殿物などの酸処理の問題点、検体中抗体の再活性化などの界面活性剤処理の問題点が解消され、HBV抗原の検出に関して大きな感度上昇効果を示すことを見出した。

特に界面活性剤のなかで、アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、またはアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤を用いることにより、顕著な効果を奏することを見出した。

さらに酸性化剤と、炭素数12個以上の一本鎖アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、または炭素数12個以上の一本鎖アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニア塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤を組み合わせることにより、著しく顕著な効果が得られる。

【 0 0 3 1 】

さらに、酸性化剤と前記界面活性剤からなる処理剤に、TritonX100などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類やTween20などのポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類などの非イオン界面活性剤の添加や、尿素、チオ尿素などの蛋白質変性剤の添加や、システイン、システアミン、ジメチルアミノエタンチオール、ジエチルアミノエタンチオール、ジイソプロピルアミノエタンチオール、ジチオスレイトールなどの還元剤の添加が、さらに好ましいことを見出した。

【 0 0 3 2 】

つまり本発明は、HBVを含む検体を、(1)酸性化剤、ならびに(2)アルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、またはアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、さらに蛋白質変性剤、および(3)還元剤を含有する処理剤で処理することによりHBV抗原の遊離とHBV抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とするHBV含有検体の処理方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

アルキル基および第3級アミンまたは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤としては、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート(N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート(N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート(N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-オクタデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート(N-Octadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)などが適当である。

【 0 0 3 4 】

また、アルキル基および第3級アミンまたは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤としては、デシルトリメチルアンモニウムクロライド(Decyltrimethylammonium Chloride)、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(Dodecyltrimethylammonium Chloride)、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド(Tetradecyltrimethylammonium Chloride)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド(Hexadecyltrimethylammonium Chloride)、デシルトリメチルアンモニウムブロマイド(Decyltrimethylammonium Bromide)、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(Dodecyltrimethylammonium Bromide)、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(Tetradecyltrimethylammonium Bromide)、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(Hexadecyltrimethylammonium Bromide)、ラウリルピリジニウムクロライド(Lauryl pyridinium Chloride)、テトラデシルピリジニウムクロライド(Tetradecyl pyridinium Chloride)、セチルピリジニウムクロライド(Cetyl pyridinium Chloride)などが適当である。

【 0 0 3 5 】

このようなアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤または陽イオン界面活性剤の処理時濃度は、0.1%以上15%以下が好ましく、さらに、0.5%~10%が好ましい。

酸性化剤、ならびにアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤または陽イオン界面活性剤に添加する非イオン界面活性剤としては、TritonX100などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類やNP40などのポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル類またはTween80などのポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類などが適当であり、それらの濃度は、処理時濃度で1%以上7.5%以下が好ましく、さらに1%以上5%以下が好ましい。

【0036】

酸性化剤、ならびにアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤または陽イオン界面活性剤に添加する蛋白質変性剤としては、尿素、チオ尿素などが適当であり、それらの濃度は、処理時濃度で0.5M以上が好ましく、さらに1M以上8M未満が好ましいが、溶解性などが問題とならない場合、たとえば検体処理用チューブに予め粉末で尿素を添加しておくなどの場合は、10Mまでは使用可能である。

【0037】

酸性化剤、ならびにアルキル基および第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤または陽イオン界面活性剤に添加する還元剤としては、システイン、システアミン、ジメチルアミノエタンチオール、ジエチルアミノエタンチオール、ジプロピルアミノエタンチオール、ジチオスレイトールなどが適当であり、それらの濃度は、処理時濃度で0.25mM以上1000mM以下が好ましく、さらに1.5mM以上200mM以下が好ましい。

【0038】

酸性化剤に添加する他の物質としては前記の如く、尿素などの蛋白質変性剤が挙げられる。かかる蛋白質変性剤は、水素イオン結合を弱めることにより、蛋白質の高次構造を部分的に壊す作用をもつことが知られており、ウイルス粒子膜の破壊や検体中の標的抗原に対する抗体を変性させることが可能である。また、例えば大腸菌で発現させた組換え蛋白質を、不溶性分画であるインクルージョンボディから可溶化させるなど、不溶性沈殿物を可溶化させる効果をもっている。しかしながら、尿素などの蛋白質変性剤の存在下では、標的とする抗原の構造エピトープも壊れ、抗原捕捉用抗体などのプローブとの結合が弱められ、感度が低下するという難点もある。

【0039】

また、一方で尿素などの蛋白質変性剤の変性作用は可逆的であることが多く、希釈や透析などによって蛋白質変性剤濃度を薄めることによって一時的に変性した構造が元に戻る場合がある。このことは、測定用プローブと競合してしまう検体由来の抗体が存在することとなり、結果として感度低下となることが明らかである。つまり、尿素などの蛋白質変性剤の添加には、以上のような二面性をもっている。

本発明者らは、酸処理と蛋白質変性剤処理を組み合わせることにより、沈殿物などの酸処理の問題点、検体中抗体の再活性化などの蛋白質変性剤処理の問題点が解消されることを見出し、本発明のもうひとつの発明を完成させるに至ったものである。

【0040】

本発明者らは、蛋白質変性剤のひとつである尿素を処理時1M以上を添加することによって、酸処理による沈殿物の形成を、大きく減少させることを見出した。この蛋白質変性剤としては、尿素、チオ尿素などが適当である。また蛋白質変性剤濃度は、処理時濃度で1M以上が好ましく、さらに1.5M以上8M以下が好ましい。さらに、酸性化剤と蛋白質変性剤からなる処理剤に、TritonX100などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類やTween20などのポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類などの非イオン界面活性剤を添加することにより感度の上昇などの効果があることを見出した。さらに酸性化剤と蛋白質変性剤からなる処理剤に還元剤を添加することも可能である。

10

20

30

40

50

【0041】

上述のことをまとめると、本発明は、B型肝炎ウイルス（HBV）を含む検体を、（１）酸性化剤、ならびに（２）アルキル基および第３級アミンもしくは第４級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤またはアルキル基および陽イオン界面活性剤、あるいは蛋白質変性剤を含有する処理剤で処理することによりHBV抗原の遊離とHBV抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とするHBV含有検体の処理方法を提供するものである。

【0042】

さらに、本発明に係るHBV含有検体の処理方法における処理温度は、高温でも可能であるが、好ましくは20～50、さらに好ましくは25～42である。

また、本発明において酸性化剤と組み合わせる処理剤のうち、界面活性剤で最も好ましいものはアルキル基および第３級アミンまたは第４級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤あるいはアルキル基および第３級アミンまたは第４級アンモニア塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤であり、その他の処理剤としては蛋白質変性剤である。この２つの処理剤に非イオン界面活性剤を加え、それに還元剤を加えることにより、処理の効果の上昇が見られた（実施例４参照）。このことは処理剤の組み合わせが、処理の効果の上昇につながることを示したものである。例えば、酸性化剤と組み合わせる処理剤としては、アルキル基と、第３級アミンまたは第４級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤、アルキル基と、第３級アミンまたは第４級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤、蛋白質変性剤、非イオン界面活性剤、還元剤、または陰イオン界面活性剤などの処理剤がある。これらのうち２種以上の処理剤を組み合わせ、酸性化剤と同時に処理することにより、効率よくHBVを含む検体を処理することが可能である。

【0043】

本発明に係るHBV抗原の免疫学的検出方法は、HBV含有検体を酸性化剤と、界面活性剤および／または蛋白質変性剤とを含有する処理剤と接触させることにより、HBV抗原の解離とHBV抗原に結合する抗体の不活化を行なう工程（第一工程）とHBV抗原に結合するプローブを用いてHBV抗原を検出する工程（第二工程）とからなるものである。

前記第二工程において、検出に用いるプローブ、例えば抗体はHBV抗原に特異的に結合するものであるが、一定の高い親和性を示すものであればよい。例えば、前記第一工程で処理された検体中のHBVコア関連抗原を捕捉するプローブの一つはHB44、HB114、HB61などのモノクローナル抗体であることが望ましい。

【0044】

ここでいうプローブとは、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの実験動物を免疫して得られるポリクローナル抗体、免疫した個体から脾臓細胞などを分離し、ミエローマ細胞などと融合させることによって得られるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体、または脾臓細胞、血中白血球をEBウイルスによって不死化させた細胞の産生するモノクローナル抗体、HBVに感染しているヒト、チンパンジーなどが産生しているポリクローナル抗体、マウス、ヒトなどのイムノグロブリンのcDNA、染色体DNAから得られる可変領域遺伝子断片、またはイムノグロブリンのcDNA、染色体DNAの一部と人工的に作製した配列とを組み合わせることによって構成される可変領域の遺伝子断片などから遺伝子組み換えによって構成される、HBV抗原に高い特異性、親和性を示す分子である。

【0045】

本発明に係るHBV抗原の免疫学的検出方法において、HBV抗原は、例えば、前記の如きモノクローナル抗体との抗原抗体反応により免疫複合体となる。この免疫複合体は、２種の抗体によるサンドイッチ法などで形成される。この免疫複合体中に存在する標識酵素を発色法、化学発光法により、HBV抗原の存在をシグナルとして検出することができる。また、蛍光物質を直接抗体に結合させることなどにより、免疫複合体中に蛍光物質を取り込ませ、その蛍光をシグナルとして検出することもできる。

さらに、本発明は上述の免疫学的検出法を用い、HBVの感染を診断するキットを提供する。この診断キットは、HBVを含む検体を処理する処理剤中に、酸性化剤と蛋白質変性剤および/または界面活性剤を含む。またキットには、HBVの抗原に結合する、抗体のようなプローブを含む方が好ましい。

【実施例】

【0046】

以下、実施例により本発明について具体的に説明する。もっとも本発明は、これらの実施例等により限定されるものではない。

【0047】

実施例 1

酸性化剤濃度：HBV抗原陰性検体またはHBV抗原陽性検体（990277、990544、990623、990768）100 μ l に、各種濃度の塩酸水溶液100 μ lを添加して、室温で10分間インキュベーションを行い、その100 μ lを測定試料として、以下に記す測定法を用いて検討した。

96穴マイクロプレート（FluoroNunc Module, Maxisoap surface）に、抗HBVコア関連抗原モノクローナル抗体（HB44、HB114、HB61を2:1:1の比率で混合）を4 μ g/mlの濃度で100 μ lを加え、4℃で一晩インキュベートした。

【0048】

0.15M NaClを含む10mM リン酸緩衝液pH7.3で2回洗浄後、0.5%カゼインナトリウムを含む10mM リン酸緩衝液pH7.1を350 μ l加え2時間インキュベートした。ブロッキング液除去後、中和剤を含む反応緩衝液100 μ lと各々の検体処理法で得られた測定試料を各ウェルに加え攪拌しながら室温で2時間反応させ、0.05% Tween20を含む10mM リン酸緩衝液pH7.3（洗浄液）350 μ lで6回洗浄し、さらにアルカリホスファターゼ（ALP）標識したモノクローナル抗体（HB91とHB110の同量混合）100 μ lを添加して室温で30分間反応させた。洗浄液で6回洗浄し、基質溶液（TROPIX, CDP-star with Emerald II）100 μ lを加え20分間インキュベートした。

【0049】

ルミノメーター（DIA-IATRON, Luminous CT-9000D）で発光強度を測定し、その結果を図1に示す。尚、図1に示す塩酸濃度は、検体（Sample）と処理剤を混合後の処理時濃度で表した。

HBV抗原陽性検体（990277、990544）は、塩酸を含まない溶液で室温10分間インキュベーションを行ってもほとんどHBVコア関連抗原活性を検出できなかったが、処理時の塩酸濃度0.05Nよりコア関連抗原活性が認められ、0.25~1.0 Nでピークとなった。また、塩酸の代わりに硫酸を用いて検討したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0050】

実施例 2

酸性化剤共存下における各種界面活性剤濃度：HBV抗原陰性検体またはHBV抗原陽性検体（990277、990544、990768）100 μ l に、各種界面活性剤を溶解した1.0 N塩酸濃度の水溶液を100 μ l添加して、室温で10分間インキュベーションを行い、その100 μ lを測定試料として、実施例1で採用した方法で検討した。検討結果を表1~表5に示す。また、各表中、測定値の下線部は判定基準を超えたケースであることを示す。

【0051】

表1~表5によれば、3例の検体のうち少なくとも1例が、各々の検体の判定基準より高い反応性を示した界面活性剤を添加効果あり、と判断した。その結果、塩酸または硫酸のような酸性化剤とともに各種界面活性剤を添加すると、HBV抗原陽性検体中のコア関連抗原免疫活性が大きく上昇した界面活性剤が認められた。添加効果が認められたのは、アルキル基と、第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤またはアルキル基と、第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤であった。

【0052】

10

20

30

40

50

また、TritonX100やTween 20のような非イオン界面活性剤にも添加効果が認められた。陰イオン界面活性剤であるSodium dodecyl sulfate (SDS)、Lithium dodecyl sulfate (LDS)は、0.5%以上の濃度で検体との反応中に白濁したが中和剤を含む反応緩衝液を添加した後溶解し、効果を確認することができた。CHAPSのようなステロイド骨格を有する界面活性剤は、反応性の向上を示さなかった。他に、N-lauroyl sarcosine Naやデオキシコール酸なども検討したが、酸性化剤との共存では溶解性が十分でなかった。

【 0 0 5 3 】

酸性化剤にアルキル基と第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤またはアルキル基と第3級アミンもしくは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している陽イオン界面活性剤を添加することにより測定感度の上昇が認められた。この酸性化剤と界面活性剤の処理剤から酸性化剤を除き、効果のあった界面活性剤のみで処理を行ったが測定感度は大きく低下した。このことから測定感度の上昇は酸性化剤を基礎とし、界面活性剤を添加することにより大きく上昇するものと考えられた。

【 0 0 5 4 】

【表 1】

TAC 系		HBV 陰性サンプル		HBV 陽性サンプル		
		健常人血清		#990277	#990544	#990768
濃度(%)						
無添加	0	139		9083	2838	37054
洗剤効果の判定基準				13625	4257	55581
0.5N HClに添加した界面活性剤						
オクチルトリメチルアンモニウムクロライド (Octyltrimethylammonium Chloride) [CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Cl	0.5	110		8776	2594	25449
	1	104		6810	2161	18317
	2	63		4566	1457	11334
	5	81		1804	673	3003
デシルトリメチルアンモニウムクロライド (Decyltrimethylammonium Chloride) [CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Cl	0.5	118		7977	2224	19989
	1	83		5914	2136	14519
	2	94		7125	3167	11655
	5	90		4351	1386	7001
ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Dodecyltrimethylammonium Chloride) [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Cl	0.5	209		13014	<u>4413</u>	30270
	1	139		11494	<u>5355</u>	35331
	2	217		<u>16478</u>	3774	28240
	5	141		<u>10287</u>	<u>7048</u>	18743
テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Tetradecyltrimethylammonium Chloride) [CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Cl	0.5	200		<u>14941</u>	<u>5985</u>	37661
	1	208		<u>15517</u>	<u>6313</u>	33214
	2	177		<u>16628</u>	<u>4997</u>	35434
	5	224		12075	4233	26590
ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Hexadecyltrimethylammonium Chloride) [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Cl	0.5	182		<u>15908</u>	<u>8062</u>	42647
	1	198		<u>14148</u>	<u>6269</u>	32201
	2	220		<u>15228</u>	4207	30831
	5	260		12828	2494	21812
ラウリルピリジニウムクロライド (Lauryl pyridinium Chloride) [C ₅ H ₅ NCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃]Cl	0.5	230		9473	2510	24303
	1	246		11807	2335	20982
	2	217		10043	1932	13585
	5	264		7401	1970	14991

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

【 表 2 】

TAB 系

	濃度(%)	HBV 陰性サンプル	HBV 陽性サンプル		
		健康人血清	#990277	#990544	#990768
無添加	0	136	11014	2634	34595
洗剤効果の判定基準			15420	3688	48433
<u>0.5N HCl に添加した界面活性剤</u>					
ヘキシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Hexyltrimethylammonium Bromide) [CH ₃ (CH ₂) ₅ N(CH ₃) ₃]Br	0.5	253	12044	<u>4302</u>	27024
	1	249	10241	<u>4602</u>	28610
	2	214	7842	<u>4301</u>	22250
	5	107	5165	3577	13782
オクチルトリメチルアンモニウムブロマイド (Octyltrimethylammonium Bromide) [CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Br	0.5	136	11316	3528	32491
	1	103	8832	3424	23472
	2	198	6652	3268	16111
	5	57	2596	793	3769
デシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Decyltrimethylammonium Bromide) [CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Br	0.5	146	10862	2868	26087
	1	103	9975	3308	16957
	2	58	6988	2558	10411
	5	80	4466	2677	8274
ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Dodecyltrimethylammonium Bromide) [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Br	0.5	165	14345	3673	30367
	1	116	9962	<u>4581</u>	29491
	2	216	15309	5578	26777
	5	190	10204	<u>5402</u>	17091
テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Tetradecyltrimethylammonium Bromide) [CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Br	0.5	209	<u>16926</u>	<u>6645</u>	43841
	1	278	<u>16655</u>	<u>6869</u>	37064
	2	401	14375	<u>6827</u>	29279
	5	294	13023	3300	24118
ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (Hexadecyltrimethylammonium Bromide) [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Br	0.5	227	<u>18706</u>	<u>8451</u>	<u>56923</u>
	1	254	<u>19937</u>	<u>7813</u>	35855
	2	244	15221	<u>4128</u>	27210
	5	602	11052	2539	17021

10

20

30

【 0 0 5 6 】

【表 3】

APS 系		HBV 陰性サンプル		HBV 陽性サンプル		
		健常人血清		#990277	#990544	#990768
	濃度(%)					
無添加	0	148		9294	2175	38028
洗剤効果の判定基準						
0.5N HCl に添加した界面活性剤						
3-[3-(クロマイドプロフィル)ジメチル-アンモニオ]-1-プロパンスルホネート	0.5	192		10068	2306	28850
(3-[3-(Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate)	1	185		9429	1498	19808
	2	185		7823	1205	17336
	5	122		6911	881	14768
N-ドデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート	0.5	171		<u>17118</u>	<u>5251</u>	<u>43825</u>
(N-Dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)	1	170		<u>26990</u>	<u>7945</u>	<u>50648</u>
	2	116		<u>28246</u>	<u>7316</u>	<u>55167</u>
	5	143		<u>32885</u>	<u>9698</u>	<u>47512</u>
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]						
N-テトラデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート	0.5	135		<u>17307</u>	<u>5976</u>	<u>48591</u>
(N-Tetradecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)	1	123		<u>30527</u>	<u>9273</u>	<u>62242</u>
	2	212		<u>36256</u>	<u>8276</u>	<u>66746</u>
	5	121		<u>42918</u>	<u>16172</u>	<u>64794</u>
CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]						
N-ヘキサデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート	0.5	158		<u>26139</u>	<u>9224</u>	<u>73370</u>
(N-Hexadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)	1	113		<u>25348</u>	<u>7818</u>	<u>85287</u>
	2	170		<u>41969</u>	<u>9925</u>	<u>75342</u>
	5	161		<u>35782</u>	<u>11916</u>	<u>55028</u>
CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]						
N-オクタデシル-N, N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート	0.5	269		<u>21151</u>	<u>11844</u>	<u>67221</u>
(N-Octadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)	1	206		<u>20731</u>	<u>9871</u>	<u>57204</u>
	2	283		<u>24829</u>	<u>13125</u>	<u>73931</u>
	5	229		<u>34152</u>	<u>11351</u>	<u>77719</u>
CH ₃ (CH ₂) ₁₇ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]						

10

20

【 0 0 5 7 】

30

【表 4】

非イオン性		HBV 陰性サンプル		HBV 陽性サンプル		
		健康人血清		#990277	#990544	#990768
	濃度(%)					
無添加	0	180		10750	2494	39102
洗剤効果の判定基準				16125	3741	58653
0.5N HCl に添加した界面活性剤						
Triton X-100	0.5	233		14133	2817	35471
	1	174		14708	2871	33252
	2	181		14034	3128	39651
	5	160		<u>17943</u>	3504	38406
Triton X-114	0.5	170		11857	2856	27651
	1	188		12349	2412	27956
	2	160		12364	2874	29669
	5	155		12854	2166	33038
Tween 20	0.5	205		12619	2732	34325
	1	205		12781	2639	29741
	2	232		<u>18025</u>	3703	58099
	5	202		<u>35451</u>	<u>8842</u>	<u>95495</u>
Tween 60	0.5	240		11401	<u>4234</u>	49473
	1	194		<u>17189</u>	<u>4315</u>	<u>64879</u>
	2	245		<u>18620</u>	<u>10542</u>	<u>137707</u>
	5	209		<u>25964</u>	<u>7551</u>	<u>144107</u>
Tween 80	0.5	234		13184	3086	39029
	1	115		13639	3532	51167
	2	216		<u>20826</u>	<u>7126</u>	<u>98056</u>
	5	236		<u>43646</u>	<u>15778</u>	<u>173578</u>
Bridj 35	0.5	175		11862	2797	34825
	1	197		10424	2009	45445
	2	289		<u>16694</u>	2912	43862
	5	259		7897	2659	43319
MEGA-10	0.5					
	1	145		9680	2793	29472
	2	253		14129	<u>4328</u>	45222
	5	332		<u>20245</u>	<u>10125</u>	<u>85021</u>

【 0 0 5 8 】

【表 5】

陰イオン性

	濃度(%)	HBV 陰性サンプル	HBV 陽性サンプル		
		健康人血清	#990277	#990544	#990768
無添加	0	167	7793	2679	26761
洗剤効果の判定基準			11690	4019	40142

0.5N HCl に添加した界面活性剤

ソドウムドデシルサルファイト (Sodium Dodecyl Sulfate)	0.5	160	<u>12516</u>	3772	<u>53253</u>	10
	1	152	<u>18948</u>	<u>5767</u>	<u>84477</u>	
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na	2	204	<u>45240</u>	<u>13482</u>	<u>168004</u>	
	5	301	<u>31229</u>	<u>16960</u>	<u>168734</u>	
リチウムドデシルサルファイト (Lithium Dodecyl Sulfate)	0.5	196	<u>14409</u>	<u>4239</u>	<u>53651</u>	
	1	135	<u>20956</u>	<u>6324</u>	<u>46040</u>	
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Li	2	236	<u>29248</u>	<u>10044</u>	<u>89739</u>	
	5	448	<u>37765</u>	<u>23853</u>	<u>199795</u>	

20

【0059】

実施例 3

酸性化剤共存下における蛋白質変性剤：

HBV抗原陰性検体またはHBV抗原陽性検体（990277、990544、990768）100 μl に、蛋白質変性剤のひとつである尿素を1.0 N塩酸水溶液に溶解し、その100 μlを添加して、室温で10分間インキュベーションを行い、その100 μlを測定試料として、実施例1で述べた方法で検討した。各々のHBV抗原陽性検体の免疫活性を、HBV抗原陰性検体の免疫活性に対する比率（HBV抗原陽性検体の吸光度 / HBV抗原陰性検体の吸光度）を求め、表6に示した。

【0060】

尿素を添加すると、酸性化剤のみと比較して、約1.5～3倍に上昇する検体が確認された。また、酸性化剤のみの処理時において、血清蛋白質などが変性し沈殿や白濁を生じることがあり、ピペティング操作の障害や、沈殿物が大きな擬陽性の原因になることも多い。さらに、これらの沈殿物の中に目的とする抗原が巻き込まれることによる感度の低下も考えられる。尿素を処理時1M以上添加することによって、このような沈殿物形成を大きく減少させることができることが判明し、特に処理時1.5M以上8M以下の添加でより効果が認められた。尿素は約10M溶液までは溶解したが、保存条件による析出等の問題もあることから、溶液として使用する場合、処理時濃度は処理液量と検体量の比に依存してくる。

30

【0061】

40

【表 6】

S/N 比		HBV 陰性サンプル		HBV 陽性サンプル		
		健常人血清		#990277	#990544	#990768
	濃度(M)					
無添加	0	1.0		59.3	20.8	205.9
尿素	0.5	1.0		59.2	25.8	233.9
	1	1.0		86.4	39.6	258.1
	1.5	1.0		88.7	47.7	279.5
	2	1.0		81.1	46.2	225.6
	2.5	1.0		76.5	52.4	227.5
	3	1.0		75.9	58.9	200.8
	3.5	1.0		74.0	66.8	195.2

10

【0062】

実施例 4

酸性化剤、蛋白質変性剤、非イオン界面活性剤、アルキル基と第3級アミンまたは第4級アンモニウム塩を同分子中に有している両性界面活性剤の共存下における還元剤の検討

20

HBV抗原陰性検体 (Normal plasma) または 3 例のHBV抗原陽性検体 (990277、 990544、 990768) 100 μ l に、1.0N 塩酸、1.5M 尿素、5.0% TritonX100、1.5% C16APSを含む溶液に還元剤であるジチオスレイトール、システアミン塩酸、ジエチルアミノエタンチオール塩酸を混合した溶液100 μ lを添加して、室温で10分間インキュベーションを行い、その100 μ lを測定試料として、実施例1で述べた方法を用いて検討した(表7)。

【0063】

ここで用いた還元剤の濃度は、検体の処理時の濃度で表した。HBV抗原陰性検体 (Normal serum) では、還元剤を添加してもほとんどそのシグナルの変化は認められなかったが、HBV抗原陽性検体 990544 では、検体処理時5mM 以上の還元剤濃度からシグナルの上昇が認められ、ジエチルアミノエタンチオール塩酸濃度が10mM で2例(990544, 990768)の検体で30%以上の上昇が認められた。

30

【0064】

【表 7】

還元剤	HBV 陰性サンプル		HBV 陽性サンプル			
	健康人血清		#990544			
	濃度(mM)	対照に対する%	対照に対する%	#990768		
対照	0	231	19467	9855	69138	100.0
0.5N HCl / 5% Triton X-100 / 1.5M Urea / 1.5% C16APS に添加した還元剤						
ジチオスレイトール (Dithiothreitol)	0.01	202	21074	7865	53087	77
	0.05	215	16755	7318	51370	74
	0.1	200	19439	7135	47065	68
	0.2	189	21361	9807	53818	78
	0.5	189	18538	8790	55879	81
	1	196	18238	13611	64518	93
	5	296	17429	26295	70368	102
2-アミノエタンチオール ハイドロクロライド (2-Aminoethanethiol Hydrochloride)	0.1	252	13812	7545	58117	84
	0.2	197	16516	5269	42168	61
	0.5	329	18105	10643	66214	96
	1	287	20352	9690	76393	110
	5	240	15830	11015	61630	89
	10	221	15632	15193	74164	107
2-ジエチルアミノエタンチオール ハイドロクロライド (2-Diethylaminoethanethiol Hydrochloride)	0.1	332	21571	9573	67205	97
	0.2	306	14409	10069	77701	112
	0.5	346	23030	11571	73442	106
	1	279	18300	8898	78826	114
	5	323	14745	15063	81674	118
	10	212	20377	15370	93213	135

10

20

30

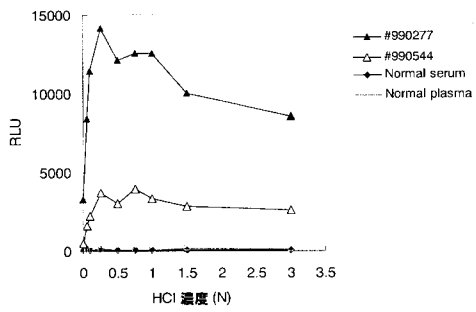
40

50

【 0 0 6 5 】

本発明は、血中のHBV抗原を高感度に検出または定量するための、簡便で操作性が高い検体処理方法およびそれを用いたHBVの検出または定量方法を提供するものであり、血液のHBV感染の有無を診断し、輸血用血液のスクリーニングを迅速適確に行なうことができる。また、診断薬キットを提供することもでき、HBV抗原の検出の能率化に寄与するところ極めて大きい。

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/009158
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/569, 33/48, 33/576 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) Int.Cl ⁷ G01N33/569, 33/48, 33/576 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 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-51940 A (Tonen Corp.), 26 February, 1999 (26.02.99), & WO 99/06836 A & EP 967484 A & CN 1239548 A & KR 2000068705 A	1-13
Y	JP 2000-105233 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 11 April, 2000 (11.04.00), (Family: none)	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 11 July, 2005 (11.07.05)		Date of mailing of the international search report 26 July, 2005 (26.07.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/009158									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ G01N33/569, 33/48, 33/576											
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. ⁷ G01N33/569, 33/48, 33/576											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005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)											
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 請求の範囲の番号									
Y	JP 11- 51940 A(東燃株式会社)1999.02.26 & WO 99/06836 A & EP 967484 A & CN.1239548 A & KR 2000068705 A	1-13									
Y	JP 2000-105233 A(積水化学工業株式会社)2000.04.11 (ファミリーなし)	1-13									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 「B」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 11.07.2005		国際調査報告の発送日 26.7.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 宮澤 浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 9407								

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	乙型肝炎病毒的检测方法		
公开(公告)号	JPWO2005111620A1	公开(公告)日	2008-03-27
申请号	JP2006513634	申请日	2005-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	大植千春 榎昇 木村達治		
发明人	大植 千春 榎 昇 木村 達治		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/569 G01N33/531 C12Q1/04 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/5761		
FI分类号	G01N33/576.B G01N33/569.L G01N33/531.B C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QR52 4B063/QR64 4B063/QS20		
代理人(译)	久保田耕平		
优先权	2004149682 2004-05-19 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种检测或定量血清中乙型肝炎病毒 (HBV) 抗原的方法, 以及一种用于检测或定量的简单且高度用户友好的样品处理方法。用于治疗包含乙型肝炎病毒 (HBV) 的样品的方法的特征在于, 通过用包含 (1) 酸化的处理剂处理包含HBV的样品来进行HBV抗原的释放与HBV抗原结合的抗体的破坏。(2) 蛋白质变性剂或在分子内具有烷基和叔胺或季铵盐的两性表面活性剂或阳离子表面活性剂。

TAC 系	濃度 (%)	HBV 陽性サンプル		HBV 陽性サンプル		
		健康人血清		#990277	#990544	#990768
無添加	0	139		9083	2838	37054
洗剤効果の判定基準				13625	4257	55581
0.5N HCl に添加した界面活性剤						
オクチルトリメチルアンモニウムクロライド (Octyltrimethylammonium Chloride) [CH ₂ (CH ₂) ₇ N(CH ₂) ₃]Cl	0.5	119	8776	2594	25449	
	1	104	6810	2161	18317	
	2	63	4568	1457	11334	
	5	81	1804	673	3003	
デシルトリメチルアンモニウムクロライド (Decyltrimethylammonium Chloride) [CH ₂ (CH ₂) ₉ N(CH ₂) ₃]Cl	0.5	118	7977	2224	19809	
	1	83	5914	2136	14519	
	2	94	7125	3167	11655	
	5	90	4351	1386	7001	
ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Dodecyltrimethylammonium Chloride) [CH ₂ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₂) ₃]Cl	0.5	209	13014	4413	30270	
	1	139	11494	5355	35331	
	2	217	16478	3774	28240	
	5	141	10287	7048	18743	
テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Tetradecyltrimethylammonium Chloride) [CH ₂ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₂) ₃]Cl	0.5	200	14941	5995	37661	
	1	208	15517	6312	33214	
	2	177	16828	4897	35434	
	5	224	12075	4233	26590	
ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド (Hexadecyltrimethylammonium Chloride) [CH ₂ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₂) ₃]Cl	0.5	162	15908	8062	42647	
	1	198	14148	6269	32201	
	2	220	15228	4207	30831	
	5	260	12828	2494	21812	
ラウリルピリジニウムクロライド (Lauryl pyridinium Chloride) [C ₁₂ H ₂₅ NCH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃]Cl	0.5	230	9473	2510	24303	
	1	248	11807	2335	20982	
	2	217	10043	1832	13585	
	5	264	7401	1970	14991	