(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4430677号
(P4430677)

(45)発行日　平成22年3月10日(2010.3.10)　(24)登録日　平成21年12月25日(2009.12.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/08	(2006.01)	C07K	16/08	ZNA
C12Q 1/70	(2006.01)	C12Q	1/70	
G01N 33/576	(2006.01)	G01N	33/576	B
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C

請求項の数 12　(全 32 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-536401 (P2006-536401)
(86)(22)出願日　平成17年9月21日 (2005.9.21)
(86)国際出願番号　PCT/JP2005/017420
(87)国際公開番号　WO2006/033368
(87)国際公開日　平成18年3月30日 (2006.3.30)
審査請求日　平成18年10月18日 (2006.10.18)
(31)優先権主張番号　特願2004-274852 (P2004-274852)
(32)優先日　平成16年9月22日 (2004.9.22)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　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
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉　道明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原の検出法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原の２６番目から８０番目に相当するアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体。
【請求項２】
配列番号１のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体。
【請求項３】
変性剤で変性させたＢ型肝炎ウイルスｓ抗原の２６番目から８０番目に相当するアミノ酸配列からなるまたは配列番号１に示されたアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として得られる、Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原を認識することのできる請求項１または２に記載の抗体。
【請求項４】
請求項１～３の何れかに記載の抗体を用いる、Ｂ型肝炎ウイルスまたはＢ型肝炎ウイルスｓ抗原の検出法。
【請求項５】
変性剤の共存下で行う、請求項４に記載の検出法。
【請求項６】
変性剤が界面活性剤である、請求項４または５に記載の検出法。
【請求項７】
変性剤が（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ｓ抗原の解離とＢ型肝炎ウイルスｓ抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とする請求項４または５に記載の検出法。
【請求項８】
変性剤が（１）アルカリ剤、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ｓ抗原の解離とＢ型肝炎ウイルスｓ抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とする請求項４または５に記載の検出法。
【請求項９】
変性剤が（１）アルカリ剤、および（２）界面活性剤および／または蛋白質変性剤および／または還元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ｓ抗原の解離とＢ型肝炎ウイルスｓ抗原に結合する抗体の不活化を行うことを特徴とする請求項４または５に記載の検出法。
【請求項１０】
さらにＢ型肝炎ウイルスｓ抗原以外のＢ型肝炎ウイルス抗原に対する抗体を利用する、請求項４～６の何れかに記載の検出法。
【請求項１１】
請求項１～３の何れかに記載の抗体および変性剤を含む、Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原検出用試薬。
【請求項１２】
請求項１～３の何れかに記載の抗体、Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原以外のＢ型肝炎ウイルス抗原に対する抗体および変性剤を含む、Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原検出用試薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）のｓ抗原（ＨＢｓ抗原）の新規エピトープを認識するプローブ、および該プローブを用いたＨＢＶまたはＨＢｓ抗原の検出法に関する。
【背景技術】
【０００２】
ウイルス感染の診断は、主にウイルスやウイルス関連成分（蛋白や核酸）を検出する方法と、ウイルス感染により生体が産生する特異抗体を検出する方法とによって行われる。
【０００３】
通常、ＨＢＶ感染の有無は、ＨＢｓ抗原やＨＢｃ抗体の存在を確認することにより、知ることができる。また、ＨＢＶの感染性のみならず、ＨＢＶキャリアの病態や予後、治療の効果判定の指標としては、Ｂ型肝炎ウイルスｅ抗原（ＨＢｅ抗原）、該抗原に対する抗体、ＨＢＶのＤＮＡ（ＨＢＶ－ＤＮＡ）量の測定が用いられる。
【０００４】
ＨＢＶのウイルス粒子（ＨＢＶ粒子）を構成している抗原のうち、ＨＢｓ抗原は、感染性を有するＨＢＶ粒子表面の主要構成外被蛋白であり、ＨＢＶ－ＤＮＡを含むコア粒子を包み込んでいる肝細胞由来の脂質二重膜に包含されている。また、ＨＢＶ感染者の血液中には、ＨＢｓ抗原からなる感染性のない小型球形粒子や管状粒子も存在する。小型球形粒子は血中に最も多量に存在しており、ＨＢＶ粒子が１～数個に対して約１０００個の比率で観察される。現在市販されているＨＢｓ抗原検査薬は、主にこの小型球形粒子の形態にあるＨＢｓ抗原を検出するものである。
【０００５】
ＨＢｓ抗原は、全長２２６アミノ酸残基（アミノ酸番号：１～２２６）からなる脂質二重膜を４回貫通する膜蛋白である。ＨＢｓ抗原の膜貫通構造モデルは完全に解明されているわけではないが、Ｈｏｗａｒｄら（非特許文献１Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．Ｖｉｒａｌ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ａｎｄ Ｌｉｖｅｒ Ｄｉｓｅａｓｅ（ｅｄ ｂｙ Ｚｕｃｋｅｒｍａｎ ＡＪ，Ａｌａｎ Ｒ），ｐ１０９４－１１０１，Ｌｉｓｓ Ｉｎｃ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８．）は、ＨＢｓ抗原のＮ末側の１番から１１番目か

らなる脂質二重層の外側（ＥＲルーメン側）領域、１２番目から２８番目からなる脂質二重膜を貫通する疎水性の膜貫通領域、２９番目から８０番目からなる脂質二重層の内側領域、８１番目から９７番目からなる疎水性の膜貫通領域、９８番目から１５６番目からなる親水性のＥＲルーメン領域、そして１５７番目以降の２つの疎水性の膜貫通領域からなる、と提唱している（図１）。

【０００６】

従来法においてＨＢｓ抗原の検出に用いられる主要な共通抗原決定基ａは、ＥＲルーメン側すなわちウイルス粒子表面に局在している９８番目から１５６番目のアミノ酸に含まれる、アミノ酸番号１１０～１５６上に位置している。この共通抗原決定基ａは複雑な高次構造からなり、少なくとも４つのエピトープが存在すると報告されている（非特許文献２）。

【０００７】

一方、ＨＢＶはＤＮＡウイルスであるが、ウイルスの増殖時にＤＮＡからＲＮＡを複製し、さらにＲＮＡから逆転写酵素によりＤＮＡを合成するため、ＲＮＡ型のウイルスに匹敵するほどの変異を起こすことが知られている。そのため、ＨＢＶが感染している個体の中には、多種多様の変異をもった変異株が混在していると考えられている。このような状態で外部から中和抗体などの選択的な圧力が加わると、該圧力に感受性のＨＢＶ株が減少し、反対にこれに抵抗性あるいは非感受性の変異株が増加するような現象が起きる。近年問題となっているいわゆるエスケープ変異株は、前述の主要共通抗原決定基ａにおいてアミノ酸に置換や欠失、挿入が起こったことにより、変異前の抗原決定基ａを認識する抗体から逃れて感染を維持することができるようになった変異株である。

【０００８】

このエスケープ変異株の発生に関する問題点の一つは、変異前の抗原決定基ａを利用したワクチン接種によって誘導された抗体から逃れることができるために、持続感染を起こすことができることである。

【０００９】

またもう一つの問題点は、従来のＨＢｓ抗原検査法では、このエスケープ変異株が検出できなくなることである。一般に、共通抗原決定基ａのエスケープ変異株では、野生型共通抗原決定基ａに対するモノクローナル抗体との反応性が低下するので、従来のＨＢｓ抗原検査法で使用される野生型の共通抗原決定基ａに対するモノクローナル抗体はエスケープ変異型のＨＢｓ抗原を認識できず、ＨＢＶ感染を見逃すことになってしまう。例えば、１４５番目のアミノ酸が野生株のＧｌｙからＡｒｇに変異した１４５Ａｒｇ変異株は、共通抗原決定基ａに対するモノクローナル抗体との反応性が著しく低下することが報告されている（非特許文献２）。また実際に、この従来のＨＢｓ抗原測定試薬を用いたＨＢＶのスクリーニング検査においてＨＢｓ抗原が陰性を示した血液を輸血することによって、Ｂ型肝炎の感染が起こったことが報告されている（非特許文献３）。

【００１０】

また、ＨＢＶの急性感染においては、感染初期においてＨＢｓ抗原が陽性であり、その後ＨＢｓ抗原が陰性化するが、ＨＢｓ抗体は陽性となるという現象が報告されている。ＨＢｓ抗体が陽性となるのは、ＨＢｓ抗原の共通抗原決定基ａに対する抗体が、感染者の体内で産生されるためである。この患者の共通抗原決定基ａに対する患者自身の抗体は、ＨＢｓ抗原検査薬に用いられているモノクローナル抗体が認識する共通抗原決定基ａと同じ領域に結合するため、両抗体間の競合によってＨＢｓ抗原検査薬の感度の低下を招き、検査薬による検出の妨害をするものと考えられる。

【非特許文献１】Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．Ｖｉｒａｌ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ａｎｄ Ｌｉｖｅｒ Ｄｉｓｅａｓｅ（ｅｄ ｂｙ Ｚｕｃｋｅｒｍａｎ ＡＪ，Ａｌａｎ Ｒ），ｐ１０９４－１１０１，Ｌｉｓｓ Ｉｎｃ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８８。

【非特許文献２】岡本宏明　日本臨床　分子肝炎ウイルス病学　基礎・臨床・予防　下巻Ａ，Ｂ，Ｄ，Ｅ型肝炎ウイルス編、ｐ２１２－２２２、平成７年１０月２６日発行。

【非特許文献３】Ｔｈｉｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｌａｎｃｅｔ，　ｉｉ，　１２７３－１２７６，　１９８８。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１１】
野生型の共通抗原決定基ａに対するモノクローナル抗体を用いた従来のＨＢｓ抗原検査薬は、共通抗原決定基ａ上のエスケープ変異株を検出できないため、この検査薬の使用によって陰性と判定された血液が輸血に用いられることにより、Ｂ型肝炎の感染を引き起こす可能性がある。本願発明の課題は、このようなＨＢＶのエスケープ変異株も検出することのできるプローブおよび該プローブを用いたＨＢｓ抗原測定法を開発することである。
【００１２】
また、本願発明は、ＨＢｓ抗体陽性の感染者検体であっても、共通抗原決定基ａに対する患者自身の抗体によって妨害されずにＨＢｓ抗原を測定できるようなプローブおよび該プローブを用いたＨＢｓ抗原測定法を開発することである。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明者らは、配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるペプチド上に存在するエピトープを認識する抗体をプローブとして用いることにより、前記課題を解決することに成功した。
【００１４】
即ち本発明は、Ｂ型肝炎ウイルスｓ抗原の２６番目から８０番目に相当するアミノ酸配列からなるペプチド上に存在するエピトープを認識するプローブに関し、特に配列番号１のアミノ酸配列からなるペプチド上に存在するエピトープを認識するプローブに関する。
【００１５】
また、本発明は前記プローブを用いる、Ｂ型肝炎ウイルスまたはＢ型肝炎ウイルスｓ抗原の検出法に関する。
【００１６】
本明細書では、２２６個のアミノ酸残基からなるＨＢｓ抗原のＮ末端のアミノ酸残基を１番として、同抗原中の部分アミノ酸配列の位置を表している。ここで、ＨＢＶ遺伝子のＳ領域には、Ｐｒｅ－Ｓ１、Ｐｒｅ－Ｓ２ならびにＳ遺伝子が存在しており、これらはＰｒｅ－Ｓ１＋Ｐｒｅ－Ｓ２＋Ｓ遺伝子に支配されている３８９～４００個のアミノ酸残基からなるＬａｒｇｅＳ蛋白、Ｐｒｅ－Ｓ２＋Ｓ遺伝子に支配されている２８１個のアミノ酸残基からなるＭｉｄｄｌｅ蛋白、およびＳ遺伝子に支配される２２６個のアミノ酸残基からなるＳｍａｌｌＳ蛋白をコードしている（三田村圭二、日本臨床　分子肝炎ウイルス病学　基礎・臨床・予防、下巻、１３～２７頁、平成７年１０月２６日発行）。一般にＨＢｓ抗原と記載した場合はＳｍａｌｌＳ蛋白を意味し、本明細書でも、特に断りのない限りその様に表すこととする。但し本発明の検出法は、ＬａｒｇｅＳ蛋白、Ｍｉｄｄｌｅ蛋白、ＳｍａｌｌＳ蛋白の何れの蛋白質であっても検出することができるため、検出されるＢ型肝炎ウイルスｓ抗原（ＨＢｓ抗原）は、上記の３種の蛋白を含む。
【００１７】
本発明のプローブは、配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるペプチド上のエピトープを認識することのできるプローブであり、典型的には該エピトープを特異的に認識することのできるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。より具体的には、２００４年９月９日に国際微生物寄託機関である独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に、受領番号ＦＥＲＭ　ＡＢＰ－１０１１５、－１０１１６ならびに－１０１１７として寄託されているハイブリドーマ細胞株である１Ｃ１０、４Ａ３または６Ｇ６のいずれかにより産生されるモノクローナル抗体である。
【００１８】
配列番号１に示されるアミノ酸配列は、ＨＢｓ抗原の２６番目から８０番目までのアミ

ノ酸配列、すなわち、ＨＢｓ抗原の脂質二重膜の内側に存在する親水性領域に相当する。当該エピトープはＨＢＶウイルス粒子、小型球形粒子あるいは管状粒子の内側に位置するため、ＨＢｓ抗原の共通抗原決定基ａを含むＥＲルーメン側に位置する領域とは異なり、前述のエスケープ変異株を誘導し得る外部からの中和抗体などの選択圧力を受けない。よって、従来法における共通抗原決定基ａと比較すると、同エピトープ上の変異は選択圧を受けにくく、従って特定の変異株のみが優勢となってＨＢｓ抗原測定試薬に反応しない変異株のみが増加するという現象は、本発明におけるエピトープについて言えば殆ど生じないと考えられる。

【００１９】

また、本発明のプローブは、これを用いてＨＢｓ抗原を検出する場合に、患者自身のＨＢｓ抗原に対する抗体の妨害を殆ど受けることがない。これは、本発明のプローブが認識するエピトープが、ＨＢＶ粒子、小型球形粒子ならびに管状粒子において、いずれもそれらの内側に位置しているため、ＨＢｓ抗原の共通抗原決定基ａと比較すると感染者の体内で免疫原として作用する可能性が低く、患者自身の同エピトープに対する抗体の産生が抑えられるためと推察される。

【００２０】

この様に、本発明のプローブを用いることにより、共通抗原決定基ａについてのエスケープ変異が生じたＨＢｓ抗原をも、確実に検出することができる。

【００２１】

なお、検体中のＨＢＶ粒子、小型球形粒子あるいは管状粒子に存するＨＢｓ抗原を本発明のプローブを用いて検出するには、脂質二重層や球形もしくは管状粒子の内側に局在しているＨＢｓ抗原の２６番目から８０番目までのアミノ酸配列上のエピトープを、プローブと接触可能な状態にさせることが必要となる。

【００２２】

本発明のもう一つの態様は、この検体中のＨＢｓ抗原を本発明のプローブを用いて検出する際に、脂質二重層あるいは蛋白質の凝集体を変性させることのできる変性剤、典型的には界面活性剤、カオトロピックイオンなどの蛋白質変性剤、特に界面活性剤を、検体に加えることを含む、検体中のＨＢＶまたはＨＢｓ抗原の検出法である。

【００２３】

本発明は、変性剤を用いることによって、ＨＢＶ粒子、小型球形粒子ならびに管状粒子を変性させ、それらの内側に存するＨＢｓ抗原の２６番目から８０番目までのアミノ酸配列からなる領域、すなわち、ＨＢｓ抗原の脂質二重膜の内側に存在する親水性領域を露出させるものである。ここで用いることのできる変性剤は、ＨＢＶウイルス粒子の脂質二重膜を破壊し、また小型球形粒子ならびに管状粒子におけるＨＢｓ抗原間の結合（凝集）を分離させる一方で、プローブ自体を不活性化させない変性剤であり、典型的にはドデシル硫酸ナトリウム等の界面活性剤を使用することができる。

【００２４】

また、本発明は、本発明のプローブと、変性剤と、ＨＢｓ抗原以外のＨＢＶ抗原を特異的に認識し得るプローブを利用する、ＨＢＶウイルスの検出法、ならびにかかる構成を備えた、即ち本発明のプローブ、変性剤およびＨＢｓ抗原以外のＨＢＶ抗原に対するプローブを含む、ＨＢＶの検出用試薬も提供する。

【００２５】

本発明のプローブに加え、ＨＢｓ抗原以外のＨＢＶウイルス抗原、例えばＨＢｃｒ抗原（国際公開特許ＷＯ００２／１４８７１号パンフレット）を測定することにより、ＨＢｓ抗原のみの検出では誤ってＨＢＶ陰性と判定され得るＨＢＶ感染者の検体も、確実にＨＢＶ陽性として捉えることができる。

【００２６】

ＨＢｓ抗原は、前述した通り、ＲＮＡウイルスに匹敵するほど高頻度の変異を起こすことが知られている。そのため、ＨＢｓ抗原の２６番目から８０番目のアミノ酸配列において、配列番号１のアミノ酸配列とは異なる配列となる変異ＨＢｓ抗原も存在する。

【００２７】
しかし、かかる変異を有するＨＢｓ抗原であっても、そのアミノ酸配列が特定されれば、本明細書の開示に従ってそれらを大腸菌で発現させ、精製することは可能である。また、その精製された変異ＨＢｓ抗原に対するプローブを取得し、これによりＨＢｓ抗原を検出することも可能である。従って、本発明において、ＨＢｓ抗原の２６～８０番目のアミノ酸残基に相当する配列は配列番号１に示されるそれに限定されるものではなく、よって本発明は、配列番号１に示されたアミノ酸配列からなるペプチド上のエピトープを認識するプローブに限定されるものでも、また該プローブを用いた検出法に限定されるものでもない。

【発明の効果】

【００２８】
本発明のプローブならびにこれを用いたＨＢＶウイルスまたはＨＢｓ抗原の検出法は、従来のＨＢｓ抗原検出法では検出できなかったＨＢｓ抗原の共通抗原決定基ａにおけるエスケープ変異株等を感度よく検出し、ＨＢＶ感染を確実に判定することができる。また、ＨＢｓ抗原の共通抗原決定基ａに対する患者自身の抗体がＨＢｓ抗原の検出を阻害している場合にも、本発明の検出法によりＨＢＶ感染を確実に判定することができる。

【００２９】
本発明のプローブと競合する患者自身の抗体が存在し、ＨＢｓ抗原の検出を阻害している場合でも、酸性化剤またはアルカリ剤と変性剤を組み合わせた前処理を行うことにより、ＨＢＶ感染を確実に判定することができる。

【００３０】
また、ＨＢＶの他の抗原を認識するプローブと組合わせて、ＨＢｓ抗原とＨＢＶの他の抗原を同時に測定することにより、より確実にＨＢＶ感染を検出することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３１】
本発明のプローブは、ＨＢｓ抗原の２６番目から８０番目に相当するアミノ酸配列、例えば配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるペプチド上のエピトープを特異的に認識するものであれば、どのようなものでも利用できるが、典型的には該ペプチドあるいはＨＢｓ抗原を抗原として得られる抗体、特にモノクローナル抗体が有用である。

【００３２】
配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、該ペプチドをコードする遺伝子を用いた組換え遺伝子手法あるいは化学合成法などによって調製することができ、かかる調製操作は、自体公知の種々の方法あるいは機器等を用いて得ることができる。

【００３３】
配列番号１のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片は、ＨＢＶ患者血清からウイルス遺伝子を分離して、ＰＣＲにより目的遺伝子を増幅することにより調製することができる。さらに、ＰＣＲ作製時に付加されたリンカー由来の制限酵素部位もしくはその遺伝子断片が挿入されたプラスミド由来の制限酵素部位などを利用し、発現ベクターにクローニングすることができる。

【００３４】
この発現ベクターを大腸菌などの宿主に形質転換で導入し、その大腸菌を培養し、脂質二重膜の内側に位置するＨＢｓ（２６～８０）の抗原を得ることができる。培養によって得られた菌体から目的蛋白を採取精製する方法は慣用の技術、例えば細胞の超音波破壊、遠心分離、各種クロマトグラフィーなどの操作により達成し得る。すなわち、上記のような方法で目的蛋白を効率よく発現させた場合、多くの蛋白は菌体内で不溶性顆粒を形成する。この特徴を利用して、菌体を生理食塩水などの生理的条件の緩衝液に懸濁した後、超音波処理により細胞を破砕し、菌体破砕物を遠心分離し、不溶性分画を回収する。回収された不溶性画分を６Ｍ尿素で抽出し、ゲルろ過により高純度のｔｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）抗原とした後、免疫原として利用することができる。

【００３５】

本発明のプローブ、例えばポリクローナル抗体は、例えばラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの動物に、上記ＨＢｓ（２６～８０）抗原もしくはポリペプチド（以下、本抗原）を単独あるいはＢＳＡ，ＫＬＨなどと結合させた抗原として、フロイント完全アジュバントなどのアジュバントと混合して定期的に免疫し、血清を採取することで作製することができる。特定の認識部位を持つポリクローナル抗体を得るためには、目的とする領域の部分ペプチドを免疫源に用いる方法がある。

【００３６】

ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製はよく知られている。例えばＢＡＬＢ／ｃマウスなどの腹腔内あるいは皮下に、本抗原を単独あるいはＢＳＡ，ＫＬＨなどと結合させた抗原として、フロイント完全アジュバントなどのアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で、最終免疫として本抗原を尾静脈内に投与し、無菌的に脾臓を摘出した後、適当なマウス骨髄腫細胞株と細胞融合し、ハイブリドーマを得る。本方法は、ＫｏｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎの方法（Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５－４９７，１９７５）に従って行なうことができる。

【００３７】

上記方法により得られたハイブリドーマを適当な培養液中で培養し、その後、本抗原に対して特異的な反応を示す抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択してクローン化する。抗体産生ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法のほか軟寒天法（Ｅｕｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：５１１－５１９，１９７６）などを利用することができる。このハイブリドーマを培地中またはマウス腹腔で培養し、培地中や腹水中にモノクローナル抗体を産生させることができる。

【００３８】

そして、血清中のポリクローナル抗体、培地中や腹水中に産生されたモノクローナル抗体はプロテインＡカラムクロマトグラフィーなどの方法により精製することができる。ポリクローナル抗体は、担体固定化抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの方法により、特定の抗原に反応する抗体のみを精製することが可能であり、同様にして特定の抗原に反応しない抗体を得ることもできる。

【００３９】

上記のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体以外にも、プローブとして用いる分子は作製することが出来る。例えば組換え抗体については、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｎの総説などに詳しく記載されている（Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１５：６２－７０，１９９７）。

【００４０】

本発明で用いる変性剤は、ＨＢＶ粒子の脂質二重膜の構造を破壊できる、あるいはＨＢｓ抗原からなる小型球形粒子ならびに管状粒子におけるＨＢｓ抗原間の結合（凝集）を分離することができる変性剤であれば、すべてのものが利用できる。例えば、尿素や酸性化剤、アルカリ剤などが利用できるが、特に界面活性剤が有効である。界面活性剤には非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤などがあるが、脂質二重膜の構造を破壊できる界面活性剤はすべて利用できる。例えば、Ｔｗｅｅｎ２０やＮｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０などの非イオン性界面活性剤は、界面活性作用はそれほど強くないが、脂質二重膜の構造を十分破壊し、本発明におけるエピトープを露出させることができる。

【００４１】

また、ＳＤＳやＳａｒｃｏｓｙｌのような陰イオン性界面活性剤は界面活性作用が強いと考えられているが、このような界面活性剤も本発明におけるエピトープを露出させることができる。強い界面活性剤による処理を行うと、蛋白の構造エピトープを破壊し、構造エピトープを認識する抗体と抗原が結合できなくなる場合もあるが、この場合は、ＨＢｓ抗原の連続エピトープを認識するプローブを利用することで、抗原の測定は可能である。

【００４２】

また、変性剤には、検体中に存在するＨＢｓ抗原を効率よく遊離させることのみならず

、ＨＢｓ抗原にモノクローナル抗体が容易に結合できるようにする役割がある。

【００４３】

本発明では、上記のように界面活性剤で変性された抗原に対し、特異的に結合するプローブを用いることが特に好ましい。プローブとして抗体を用いる場合には、このような変性処理によって露出し、変性した本発明におけるエピトープに結合できるプローブであることが必要である。

【００４４】

例えば、特定の界面活性作用の強い界面活性剤を用いる場合には、その界面活性剤により露出、変性されるエピトープに対するモノクローナル抗体を選択することが必要である。そのため、あらかじめ界面活性剤にて変性処理を行ったＨＢｓ抗原の２６～８０番目に相当するアミノ酸配列、例えは配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いて動物を免疫し、さらに抗体の選択にも該ペプチドを利用することが望ましい。

【００４５】

抗体のスクリーニング時には、変性処理したペプチド抗原を固相化し、界面活性剤を含む溶液中で反応するモノクローナル抗体をスクリーニングすることにより、本発明のイムノアッセイに適した抗体を得ることもできる。このような抗体は、スクリーニング溶液中に界面活性剤を含むため、モノクローナル抗体自体は界面活性剤の変成作用に対して耐性の抗体が取得できる。

【００４６】

変性剤で処理された試料中のＨＢｓ抗原は、エンザイムーリンクイムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、酵素イムノドットアッセイ、ラジオイムノアッセイ、凝集に基づいたアッセイ、あるいは他のよく知られているイムノアッセイ法で検出することが可能である。また、検出に標識抗体が使用される場合は、標識としては例えば蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、酵素などが使用される。

【００４７】

例えば、検体中のＨＢｓ抗原を検出するためにＥＬＩＳＡのサンドイッチ反応系を原理とした方法を用いる場合、次のような工程で行う。まず固体支持体（例えばマイクロタイターウェルの内壁）に脂質二重膜の内側に位置するエピトープを認識する抗体などを結合させる。次に非特異的な反応を除くため、牛血清アルブミンなどでブロッキングを行う。この支持体に界面活性剤などで処理した検体を添加、固相化された抗体によりＨＢｓ抗原が捕捉される。この捕捉されたＨＢｓ抗原に対する標識抗体などを反応させることにより、ＨＢｓ抗原を検出することができる。固体支持体に結合させる抗体は脂質二重膜の内側に位置するエピトープに結合する抗体であればすべて利用可能である。また標識抗体はＨＢｓ抗原に結合するものならばすべてのものが利用できる。この組み合わせは自由であり、高感度、高特異性の得られる組み合わせを選択できる。

【００４８】

上記の使用できる固体支持体としてはポリスチレンやポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニール製のマイクロタイタープレート、試験管、キャピラリー、ビーズ（ラテックス粒子や赤血球、金属化合物など）、膜（リポソームなど）、フィルターなどが挙げられる。本発明におけるＨＢｓ抗原を測定できる検体には、全血、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液などの生物学的体液、および肝組織などの組織が含まれる。

【００４９】

本発明においては、検体中のＨＢｓ抗原を煩雑な操作を伴わずに、プローブ例えばモノクローナル抗体と結合反応させるのに適した状態に処理する方法が重要である。つまり、検体中に含まれるＨＢｓ抗原の脂質二重膜を可溶化させることにより、本来ウイルス粒子表面に露出していないエピトープを露出させることが重要である。

【００５０】

（実施例）

以下の実施例は本発明を例証するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例１】
【００５１】
ｔｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）抗原の発現および精製
（Ａ）ＴｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）抗原発現プラスミドの構築
ＨＢｓ（２６～８０）領域に相当する発現プラスミドは以下の方法で構築した。ＨＢＶ患者血清１００μｌをＤＮＡ抽出液１００μｌ［１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．４）が１０μｌ，２５０ｍＭ　ＥＤＴＡが８μｌ，１０％ＳＤＳが４０μｌ，５Ｍ　ＮａＣｌが８μｌ，２０ｍｇ／ｍｌ　ＰｒｏｔｅｉｎａｓｅＫが１０μｌ，ｔＲＮＡ（５μｇ／μｌ）が１μｌ，滅菌水が２３μｌ］と混合させ、５４℃、３０分間保温した。２００μｌのフェノール・クロロホルム（１：１）溶液を加えて混合し、１５Ｋｒｐｍで５分間の遠心分離の後、上清を取り出し１５０μｌのイソプロパノールと７μｌの５Ｍ　ＮａＣｌを加えて－２０℃１時間静置した。１５Ｋｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離し、沈殿物を７０％エタノールでリンスし、１５Ｋｒｐｍ、４℃で再度５分間遠心分離した。沈殿物を自然乾燥させ、２０μｌの滅菌水に溶解させてＨＢＶ　ＤＮＡ溶液とした。
【００５２】
このＨＢＶ　ＤＮＡ溶液の５μｌを２つのプライマー（５′－ＧＡＡＴＴＣＣＴＣＡＣＡＡＴＡＣＣＡＣＡＧＡＧＴＣＴＡ－３′（配列番号：２），５′－ＧＧＡＴＣＣＴＴＡＡＡＡＣＧＣＣＧＣＡＧＡＣＡＣＡＴＣＣＡＧＣＧ－３′（配列番号：３）を用いＰＣＲを行なった。ＰＣＲはＧｅｎｅＡｍｐＴＭ（ＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ，　Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ製）のキットを用いＤＮＡ変性９５℃１分、アニーリング５５℃１分、ＤＮＡ合成７２℃１分の条件で行い、得られたＤＮＡ断片を０．８％アガロースゲル電気泳動により分離し、グラスパウダー法（ＧｅｎｅＣｌｅａｎ）で精製した。この増幅されたＨＢｓ（２６～８０）遺伝子断片０．５μｇを制限酵素反応液２０μｌ〔５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５），１０ｍＭ　ＭｇＣｌ２，１ｍＭ　ジチオスレイトール、１００ｍＭ　ＮａＣｌ，１５単位のＥｏｏＲＩおよび１５単位のＢａｍＨＩ酵素〕中で３７℃１時間消化し、その後０．８％アガロースゲル電気泳動を行い、約１８０ｂｐのＥｏｏＲＩ－ＢａｍＨＩ断片を精製した。
【００５３】
次に発現ベクターであるｐＡＴｔｒｐＥのＤＮＡ０．５μｇを制限酵素反応液２０μｌ〔５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５），１０ｍＭ　ＭｇＣｌ２，１ｍＭ　ジチオスレイトール、１００ｍＭ　ＮａＣｌ，１５単位のＥｏｏＲＩおよび１５単位のＢａｍＨＩ酵素〕中で３７℃で１時間消化し、その反応液に水３９μｌを加え、７０℃で５分間熱処理した後にバクテリアアルカリ性ホスファターゼ（ＢＡＰ）１μｌ（２５０単位／μｌ）を加えて３７℃で１時間保温した。
【００５４】
この反応液にフェノールを加えてフェノール抽出を行い、得られた水層をエタノール沈殿し、沈殿物を乾燥した。得られたＥｏｏＲＩ－ＢａｍＨＩ処理ベクターＤＮＡ０．５μｇと上述のＨＢｓ（２６～８０）１８０ｂｐ断片を１０×リガーゼ用緩衝液〔６６０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５），６６ｍＭ　ＭｇＣｌ２，１００ｍＭジチオスレトール、１ｍＭ　ＡＴＰ〕５μｌ，Ｔ４リガーゼ　１μｌ（３５０単位／μｌ）に水を加えて５０μｌとし、１６℃で一晩保温し、連結反応を行なった。発現プラスミドｐＡＴｔｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）を得るために、この連結反応液を用いて大腸菌ＨＢ１０１を形質転換した。
【００５５】
形質転換に用いる感受性大腸菌株は塩化カルシウム法〔Ｍａｎｄｅｌ，　Ｍ．とＨｉｇａ，　Ａ．，　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．，　５３，　１５９－１６２　（１９７０）〕により作られる。形質転換大腸菌を２５μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢプレート（１％トリプトン、０．５％ＮａＣｌ，１．５％寒天）上に塗布し、３７℃に一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを１白金耳取り、２５μｇ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ培地に移し、一晩３７℃で培養した。

【００５６】
１．５ｍｌの菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドＤＮＡのミニプレパレーションをアルカリ法〔Ｍａｎｎｉａｔｉｓら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ， （１９８２）〕により行なった。得られたプラスミドＤＮＡ１μｇを制限酵素反応液２０μｌ〔５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５），１０ｍＭ ＭｇＣｌ２，１ｍＭ ジチオスレイトール、１００ｍＭ ＮａＣｌ，１５単位のＥｏｏＲＩおよび１５単位のＢａｍＨＩ酵素〕中で３７℃１時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって、約１８０ｂｐのＥｏｏＲＩ－ＢａｍＨＩ断片が生じるｐＡＴｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）発現プラスミドを選別した。

【００５７】
（Ｂ）ＴｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）抗原の発現および精製
発現プラスミドｐＡＴｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）をもつ大腸菌ＨＢ１０１株を５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む3ｍｌの２ＹＴ培地（１．６％トリプトン、１％酵母エキス、０．５％ＮａＣｌ）に接種し、３７℃で９時間培養する。この培養液１ｍｌを５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを含む１００ｍｌのＭ９－ＣＡ培地（０．６％ＮＡ２ ＨＰＯ４ ，０．５％ＫＨ２ ＰＯ４ ，０．５％ＮａＣｌ，０．１％ＮＨ４Ｃｌ，０．１ｍＭ ＣａＣｌ２，２ｍＭ ＭｇＳＯ４，０．５％カザミノ酸、０．２％グルコース）に植え継ぎ、３７℃で培養した。ＯＤ６００＝０．３の時に終濃度４０ｍｇ／ｌになるようにインドールアクリル酸を加え、さらに１６時間培養した。この培養液を５Ｋｒｐｍ、１０分間遠心分離して菌体を集めた。

【００５８】
菌体に２０ｍｌの緩衝液Ａ〔５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０），１ｍＭ ＥＤＴＡ，３０ｍＭ ＮａＣｌ〕を加えて懸濁し、再び遠心分離を行なって発現菌体２．６ｇを得た。得られた菌体を緩衝液Ａ １０ｍｌ中に懸濁し、超音波破砕により大腸菌膜を破砕した後に遠心分離を行い、ｔｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）融合抗原を含む不溶性画分を得た。

【００５９】
この不溶性画分を８Ｍ尿素，１０ｍＭジチオスレイトール，１ｍＭ ＥＤＴＡを含むＰＢＳ３ｍｌに溶解し、６Ｍ尿素存在下セファクリルＳ３００ＨＲカラムにてゲルろ過を行い、ｔｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）融合抗原をほぼ単一に精製した。

【実施例２】
【００６０】
ハイブリドーマの作製
前記方法により調製したポリペプチド［ｔｒｐＥ－ＨＢｓ（２６～８０）］を６Ｍ尿素溶解後、０．１５Ｍ ＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）（ＰＢＳ）に終濃度が０．２～１．０ｍｇ／ｍｌとなるように希釈し、等量のフロイントアジュバントと混和し、４～６週令のＢＡＬＢ／ｃマウスに１０－２０μｇ腹腔内投与した。２－４週間ごとに同様の追加免疫を行い、さらにＰＢＳに溶解したＨＢｓ １０μｇを最終免疫として尾静脈内に投与した。

【００６１】
最終免疫後３日目にこのマウスより脾臓を無菌的に摘出し、ハサミおよび金属メッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、ＲＰＭＩ－１６４０培地で３回洗浄した。対数増殖期のマウス骨髄腫細胞株Ｓｐ２／０Ａｇ１４をＲＰＭＩ－１６４０培地で３回洗浄後、該細胞と脾臓細胞を１：５の細胞数比で混合した。２００×ｇ、５分間遠心分離後、上清を除去し、細胞塊を緩やかに混合しながら５０％ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）４０００（メルク社）を含むＲＰＭＩ－１６４０培地１ｍｌをゆっくりと加え、さらにＲＰＭＩ－１６４０培地１０ｍｌを加えて細胞融合させた。

【００６２】
融合細胞は、遠心分離（２００×ｇ、５分間）によってＰＥＧを除いた後、１０％ウシ胎児血清およびヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（ＨＡＴ）を含むＲＰＭ

Ｉ－１６４０培地に懸濁し、９６ウエル細胞培養プレートに播種した。約１０日間培養してハイブリドーマのみを増殖させた後、目的の抗体を産生するクローンをＥＬＩＳＡ法により検索し、所望の反応特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【００６３】

得られたハイブリドーマについて、限界希釈法により単一クローン化を行い、抗体産生ハイブリドーマを樹立した。得られたハイブリドーマを６Ｇ６、４Ａ３、１Ｃ１０と命名した。これらのハイブリドーマ細胞は、２００４年９月９日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託した。

【実施例３】

【００６４】

モノクローナル抗体の作製および解析

実施例２に記載の方法により得られたハイブリドーマを、あらかじめプリスタンを腹腔投与しておいたＢＡＬＢ／ｃマウス腹腔に移植し、腹水中に産生されてくるモノクローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体は、プロテインＡセファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりＩｇＧフラクションを分離精製した。

【００６５】

得られたモノクローナル抗体について、ＴｒｐＥ－ＨＢｓ（２６－８０）抗原及びＨＢｓ領域由来の配列によって合成した２０アミノ酸からなる合成ペプチドを用いてエピトープ解析を行なった結果、表１に示すとおりＨＢｓ抗原のうち脂質二重膜の内側に位置するエピトープ（アミノ酸番号：２６～８０）を認識するモノクローナル抗体であることがわかった。

【００６６】

【表１】

表１

		モノクローナル抗体名		
（ポリ）ペプチド名	アミノ酸番号	４Ａ３	６Ｇ６	１Ｃ１０
ＨＢＳ－１	１－２０	－	－	－
ＨＢＳ－２	１１－３０	－	－	－
ＨＢＳ－３	２１－４０	－	－	－
ＨＢＳ－４	３１－５０	＋	－	－
ＨＢＳ－５	４１－６０	－	＋	－
ＨＢＳ－６	５１－７０	－	＋	＋
ＨＢＳ－７	６１－８０	－	－	－
ＨＢＳ－８	７１－９０	－	－	－
ＴｒｐＥ－ＨＢｓ（２６－８０）	２６－８０	＋	＋	＋

【００６７】

抗マウスＩｇ各アイソタイプ抗体を用いたアイソタイプタイピングキット（Ｚｙｍｅｄ社）により、それぞれのモノクローナル抗体の（サブ）クラスを同定した。その結果、表２に示す通り６Ｇ６、４Ａ３はＩｇＧ１、κであり、ＩＣ１０はＩｇＧ２ａ、κであった。

【００６８】

本発明におけるアミノ酸番号３１－７０の領域に存在する抗原エピトープを認識する抗

体はこれまで報告がなく、６Ｇ６、４Ａ３、１Ｃ１０モノクローナル抗体はそれぞれ新規のエピトープを認識していることが分かった。

【００６９】

【表２】

表２

クローン名	サブクラス	推定認識部位（アミノ酸番号）
４Ａ３	ＩｇＧ１，κ	３１－５０
６Ｇ６	ＩｇＧ１，κ	５１－６０
１Ｃ１０	ＩｇＧ２ａ，κ	５１－７０

【実施例４】

【００７０】

界面活性剤を用いた検出法の検討

抗ＨＢｓ抗原モノクローナル抗体６Ｇ６を終濃度が６μｇ／ｍｌになるように０．１５Ｍ　ＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）で希釈し、９６ウエルマイクロプレート（ヌンク社製）１ウエルにつき８０μｌづつ分注した。４℃で一晩静置後、０．１５Ｍ　ＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）０．３５ｍｌを用いて２回洗浄し、０．５％カゼイン－Ｎａを含む１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）（以下ブロッキング液）、０．３５ｍｌを添加し、さらに室温で２時間静置した。

【００７１】

ブロッキング液除去後、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ，　１％ＢＳＡ，　０．５％カゼイン－Ｎａを含む１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）に各界面活性剤を４％または８％になるように加えたもの４０μｌと測定試料４０μｌをそれぞれのウェルに加え、室温で１時間反応させ、洗浄液０．３５ｍｌで５回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ（ＰＯＤ）標識したモノクローナル抗体（５Ｃ３）８０μｌを付加して室温で３０分間反応させた。反応後、上記洗浄液０．３５ｍｌで６回洗浄し、基質（オルトフェニレンジアミン、以下ＯＰＤ）溶液８０μｌを加え室温で３０分間反応させた後、２Ｎ硫酸溶液８０μｌを添加し、波長６３０ｎｍの吸光度を対照として波長４９２ｎｍにおける吸光度（ＯＤ４９２）を測定した。

【００７２】

ＨＢｓ陽性血清を様々な界面活性剤を用いて測定した結果を表３に示した。ＨＢｓ抗原陽性血清を界面活性剤の入っていない緩衝液を用いて測定したところ、ＨＢｓ抗原を検出することはできなかったが、様々な種類の界面活性剤（陰イオン性、陽イオン性、両性、非イオン性）を加えた緩衝液を用いて測定したところ、十分なシグナルが得られ、ＨＢｓ抗原を明確に検出することができた。これにより各種の界面活性剤によってＨＢｓ抗原の脂質二重膜の内側に存在する新規エピトープが露出され、検出できることが明らかになった。

【００７３】

なお、ペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体である５Ｃ３は、ＨＢｓ抗原の全長である１～２２６番目のアミノ酸配列からなる抗原を実施例１に準じた方法で発現、精製し、その組換え抗原をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体である。この抗体が上記の組換えＨＢｓ抗原に結合することは確認された。しかし、該抗体と、実施例３と同様の方法でＨＢｓ抗原の１～２２６番目のアミノ酸配列を基に、１０アミノ酸ずつオーバーラップする２０アミノ酸からなる合成ペプチドとの結合を調べた結果、該抗体は何れの合成ペプチドとも反応しなかった。そのため、５Ｃ３はＨＢｓ抗原のアミノ酸配列の連

続エピトープではなく、構造エピトープを認識しているものと考えられる。

【００７４】

【表３】

表３

試薬名	極性	濃度(%)	陰性血清	陽性血清１	陽性血清２
無添加（コントロール）	―	―	0.004	0.005	0.010
C10TAC	陽イオン性	8	0.008	0.579	0.451
C14TAC	陽イオン性	8	0.025	2.222	1.466
ウラリルピリニジウムクロリド	陽イオン性	8	0.026	0.145	0.121
Tween20	非イオン性	8	0.006	0.552	0.541
Triton X100	非イオン性	8	0.004	0.895	0.629
NP40	非イオン性	8	0.005	0.640	0.528
MEGA10	非イオン性	8	0.012	1.051	0.738
Brij35	非イオン性	8	0.011	1.003	0.811
CHAPS	両性	8	0.015	0.053	0.040
C12APS	両性	4	0.007	1.523	1.232
Sarcosyl	陰イオン性	4	0.010	1.990	1.833
SDS	陰イオン性	4	0.029	1.401	1.198
無添加（コントロール）	―	―	0.014	0.019	0.021
C12TAB	陽イオン性	4	0.020	0.949	0.689
C14APS	両性	4	0.014	2.857	2.911
C16APS	両性	4	0.013	2.829	2.870
C18APS	両性	4	0.013	2.806	2.698
C8SO3	陰イオン性	4	0.016	0.740	0.223
C11SO3	陰イオン性	4	0.048	2.912	2.922
ヘキサデシル硫酸ナトリウム	陰イオン性	4	0.010	0.397	0.139

【実施例５】

【００７５】

ＨＢｓ抗原陰性検体の測定

ＨＢｓ抗原陰性であるが、ＨＢＶに感染していると考えられる検体を、実施例４の方法を改良した方法で測定した。

【００７６】

抗ＨＢｓ抗原モノクローナル抗体６Ｇ６を、最終濃度が６μｇ／ｍｌとなるように、０．１５ＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）で希釈し、９６ウエルマイクロプレート（ヌンク社製）１ウエルにつき１００μｌづつ分注した。４℃で一晩静置後、０．１５ＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）の０．３５ｍｌを用いて２回洗浄し、０．５％カゼインナトリウム、３％シュクロースを含む１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．３）（ブロッキング液）の０．３５ｍｌを添加し、さらに室温で２時間静置した。

【００７７】

ブロッキング液を除去した後、緩衝溶液（０．１５ＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのＥＤＴＡ

－２Ｎａ、０．２％のプロクリン、１％のＢＳＡ、０．１％のカゼインナトリウム、３％の馬血清、２％のマウス血清、１０％のＢｒｉｊ３５を含む、１００ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）の５０μｌと測定試料５０μｌとをそれぞれのウエルに加え、室温で１時間反応させた後、０．３５ｍｌの洗浄液で５回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体（５Ｃ３）１００μｌを付加して室温で３０分間反応させた。

【００７８】

反応後、上記の洗浄液０．３５ｍｌで６回洗浄し、基質（オルトフェニレンジアミン、以下ＯＰＤとする）溶液１００μｌを加えて室温で３０分間反応させた後、２Ｎ硫酸溶液を添加し、波長６３０ｎｍの吸光度を対照として、波長４９２ｎｍにおける吸光度（ＯＤ４９２）を測定した。

【００７９】

なお、検体はＩＩＣＪａｐａｎより購入した検体を用い、ＨＢｓ抗原及び抗ＨＢｓ抗体はＡＢＢＯＴＴ社のＣＬＩＡ法で、ＨＢＮ－ＤＮＡはジェン・プローブ社のＴＭＡ法により測定した。

【００８０】

【表４】

No.	HBV-DNA TMA LGE/ml	HBsAg(本願測定法) 8G6/5C3 Mean	判定	HBsAg CLIA IU/ml	判定	HBsAb CLIA mIU/ml	判定	HBeAg	HBeAb	HBcAb	HBcrAg HB44+/92 RLU	判定
1	8.1	2.772	+	2.28	+	115.7	+	-	+	+	965,534	+
2	6.7	2.819	+	0.02	-	541.8	+	-	+	+	152,531	+
3	6.6	0.005	-	0.01	-	773.0	+	-	+	+	252,891	+
4	6.8	2.646	+	1.42	+	174.1	+	-	+	+	337,807	+
5	6.4	2.682	+	0.01	-	545.6	+	-	+	+	312,615	+

【００８１】

表４に示した５つの検体は、ＴＭＡ法でＨＢＶ－ＤＮＡについて陽性である。また、ＡＢＢＯＴＴ社のＣＬＩＡ法ではＨＢｓ抗体も陽性であり、ＨＢＶ感染患者の血清であると考えられる。しかし、従来のＨＢｓ抗原測定法であるＡＢＢＯＴＴ社のＨＢｓＡｇＣＬＩ

Ａ法では、Ｎｏ．２、Ｎｏ．３、Ｎｏ．５については陰性と判定された。

【００８２】

これらＨＢｓ抗原陰性の３検体に対して、本発明の方法によって判定を行ったところ、Ｎｏ．２とＮｏ．５の検体においてＨＢｓ抗原を検出することができた。また、本発明の測定法とＡＢＢＯＴＴ社のＨＢｓＡｇＣＬＩＡ測定法のいずれでも抗原陰性と判定されたＮｏ．３の検体は、ＨＢｃｒＡｇ測定法で検出が可能であり、ＨＢｓ抗原とＨＢｃｒ抗原の同時測定は、より確実なＨＢＶ抗原の検出に有用である。

【実施例６】

【００８３】

１）酸性化剤濃度：

ＨＢＶ抗原陰性検体または抗ＨＢｓ抗体を含むＨＢＶ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）５０μＬに、各種濃度の塩酸水溶液５０μＬ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５０μＬを測定試料として、以下に記す測定法を用いて検討した。

【００８４】

抗ＨＢｓ抗原モノクローナル抗体６Ｇ６を、最終濃度が６μｇ／ｍｌとなるように、０．１５ＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で希釈し、９６ウエルマイクロプレート（ヌンク社製）１ウエルにつき１００μｌづつ分注した。４℃で一晩インキュベートした。

【００８５】

０．１５Ｍの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３５０μＬ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１００μＬ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）３５０μＬで６回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ（ＰＯＤ）標識したモノクローナル抗体（５Ｃ３）１００μＬ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（オルトフェニレンジアミン、以下ＯＰＤ）溶液１００μｌを加え３０分間インキュベートした後、２Ｎ硫酸溶液１００μｌを添加し、波長６３０ｎｍの吸光度を対照として波長４９２ｎｍにおける吸光度（ＯＤ４９２）を測定した。尚、表に示した塩酸濃度は、検体（Ｓａｍｐｌｅ）と処理済を混合後の処理時濃度で表した。

【００８６】

抗ＨＢｓ抗体を含むＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）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ＨＢｓ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ＨＢｓ抗原活性が認められ、０．２５～１．０Ｎでピークとなった（表５）。

【００８７】

【表５】

	HBV 陰性ｻﾝﾌﾟﾙ	HBV 陽性ｻﾝﾌﾟﾙ		
HCl 温度 (N)	健常人血清	#990493	#990640	#990650
0	0.002	0.002	0.002	0.005
0.05	0.003	0.210	0.045	0.163
0.1	0.003	0.425	0.055	0.223
0.25	0.001	0.565	0.079	0.369
0.5	0.001	0.541	0.097	0.301
0.75	0.000	0.550	0.100	0.393
1	0.003	0.450	0.085	0.333
1.5	0.003	0.550	0.084	0.281

【実施例７】

【００８８】

２）酸性化剤共存下における各種界面活性剤：

ＨＢＶ抗原陰性検体またはＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）３０μＬに、各種界面活性剤を１．０Ｎ塩酸濃度の水溶液に溶解したその３０μＬ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５０μＬを測定試料として、１）で前述した方法で検討した（表６～表９）。尚、表に示した塩酸濃度及び界面活性剤濃度は、検体（Ｓａｍｐｌｅ）と処理剤を混合後の処理時濃度で表した。

【００８９】

表６～表９に示したように、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、ＨＢｓ抗原陽性検体中のコア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、一本鎖アルキル基と、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イオン性界面活性剤または陽イオン性界面活性剤であった。

【００９０】

また、ＴｒｉｔｏｎＸ１００やＢｒｉｄｊ３５のような非イオン性界面活性剤にも添加効果が認められた。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、ＳＤＳ、Ｎ－ｌａｕｒｏｙｌ　ｓａｒｃｏｓｉｎｅ　Ｎａなどの陰イオン性界面活性剤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悪く検討できなかった。

【００９１】

酸性化剤に一本鎖アルキル基と第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イオン性界面活性剤または陽イオン性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、酸性化剤によりＨＢｓ抗原を検出する際の阻害物質である抗ＨＢｓ抗体を失活させ、且つ界面活性剤の添加により検体中のＨＢｓ抗原の脂質二重膜の内側に存在するエピトープが提示され、６Ｇ６との反応性が大きく向上するものと考えられた。

【００９２】

【表６】

表6
陽イオン性(TAC系)

		HBV陰性サンプル	HBV陽性サンプル		
		健常人血清	#990493	#990640	#990650
	濃度(%)				
無添加	0	0.006	0.541	0.097	0.254
界面活性剤効果の判定基準			0.812	0.146	0.381
0.5N HClに添加した界面活性剤					
Octyltrimethylammonium Chloride	0.5	0.014	0.648	0.146	0.268
[CH3(CH2)7N(CH3)3]Cl	1	0.018	0.783	0.194	0.327
	2	0.019	0.898	0.272	0.348
	5	0.012	1.285	0.419	0.624
Decyltrimethylammmonium Chloride	0.5	0.020	0.727	0.231	0.288
[CH3(CH2)9N(CH3)3]Cl	1	0.022	0.976	0.346	0.422
	2	0.011	1.232	0.391	0.525
	5	0.004	1.602	0.419	0.675
Dodecyltrimethylammmonium Chloride	0.5	0.034	0.797	0.261	0.324
[CH3(CH2)11N(CH3)3]Cl	1	0.030	0.941	0.303	0.386
	2	0.024	0.972	0.259	0.415
	5	0.006	0.990	0.234	0.392
Tetradecyltrimethylammmonium Chlorid	0.5	0.029	0.924	0.261	0.357
[CH3(CH2)13N(CH3)3]Cl	1	0.035	1.002	0.306	0.436
	2	0.015	1.032	0.216	0.409
	5	0.005	0.804	0.136	0.281
Hexadecyltrimethylammonium Chloride	0.5	0.032	0.933	0.254	0.425
[CH3(CH2)15N(CH3)3]Cl	1	0.031	0.974	0.271	0.458
	2	0.021	0.977	0.206	0.402
	5	0.005	0.811	0.164	0.279
Lauryl pyridinium Chloride	0.5	0.021	0.587	0.190	0.228
[C5H5NCH2(CH2)10CH3]Cl	1	0.013	0.716	0.236	0.309
	2	0.001	0.896	0.211	0.312
	5	0.001	0.847	0.168	0.249

【００９３】

【表７】

表7
陽イオン性(TAB系)

		HBV陰性サンプル	HBV陽性サンプル		
		健常人血清	#990493	#990640	#990650
	濃度(%)				
無添加	0	0.013	0.569	0.097	0.286
界面活性剤効果の判定基準			0.854	0.146	0.429
0.5N HClに添加した界面活性剤					
Octyltrimethylammonium Bromide	0.5	0.019	0.713	0.128	0.301
[CH3(CH2)7N(CH3)3]Br	1	0.022	0.836	0.165	0.347
	2	0.025	0.968	0.202	0.361
	5	0.012	1.381	0.314	0.639
Decyltrimethylammmonium Bromide	0.5	0.025	0.788	0.183	0.306
[CH3(CH2)9N(CH3)3]Br	1	0.026	1.051	0.260	0.462
	2	0.008	1.535	0.320	0.588
	5	0.005	1.784	0.465	0.800
Dodecyltrimethylammmonium Bromide	0.5	0.029	0.938	0.205	0.353
[CH3(CH2)11N(CH3)3]Br	1	0.037	1.153	0.303	0.445
	2	0.028	1.343	0.309	0.544
	5	0.011	1.402	0.317	0.496
Tetradecyltrimethylammmonium Bromide	0.5	0.034	0.994	0.210	0.366
[CH3(CH2)13N(CH3)3]Br	1	0.041	1.181	0.284	0.467
	2	0.020	1.272	0.237	0.443
	5	0.007	1.201	0.289	0.443
Hexadecyltrimethylammonium Bromide	0.5	0.034	1.080	0.208	0.429
[CH3(CH2)15N(CH3)3]Br	1	0.037	1.196	0.236	0.498
	2	0.037	1.321	0.226	0.472
	5	0.005	1.017	0.179	0.414

【００９４】

【表８】

表8
両イオン性

	濃度(%)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.008	0.533	0.097	0.240
界面活性剤効果の判定基準			0.799	0.146	0.359
0.5N HClに添加した界面活性剤					
3-[3-(Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate	0.5	0.009	0.606	0.115	0.248
	1	0.007	0.635	0.125	0.302
	2	0.001	0.547	0.076	0.246
	5	0.000	0.456	0.040	0.184
N-Dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate CH3(CH2)11N(CH3)2[(CH2)3SO3]	0.5	0.013	0.807	0.189	0.379
	1	0.009	1.073	0.246	0.455
	2	0.002	1.296	0.302	0.651
	5	0.000	1.365	0.410	0.695
N-Tetradecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate CH3(CH2)13N(CH3)2[(CH2)3SO3]	0.5	0.012	0.873	0.181	0.386
	1	0.010	1.076	0.245	0.477
	2	0.005	1.267	0.268	0.554
	5	0.000	1.362	0.356	0.558
N-Hexadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate CH3(CH2)15N(CH3)2[(CH2)3SO3]	0.5	0.015	1.013	0.209	0.502
	1	0.016	1.233	0.287	0.581
	2	0.014	1.290	0.256	0.575
	5	0.002	1.286	0.276	0.519

【００９５】

【表９】

表9
非イオン性

		HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
	濃度(%)				
無添加	0	0.005	0.459	0.070	0.210
界面活性剤効果の判定基準			0.689	0.105	0.315
0.5N HClに添加した界面活性剤					
Triton X-100	0.5	0.011	0.545	0.117	0.284
	1	0.009	0.675	0.163	0.356
	2	0.007	0.790	0.193	0.344
	5	0.003	0.827	0.201	0.382
Triton X-114	0.5	0.006	0.470	0.112	0.283
	1	0.005	0.554	0.149	0.372
	2	0.003	0.678	0.160	0.370
	5	0.001	0.489	0.118	0.258
Tween 20	0.5	0.009	0.437	0.086	0.251
	1	0.007	0.468	0.110	0.278
	2	0.008	0.647	0.118	0.341
	5	0.007	0.605	0.147	0.307
Tween 80	0.5	0.007	0.339	0.063	0.209
	1	0.007	0.312	0.068	0.220
	2	0.009	0.451	0.051	0.245
	5	0.007	0.498	0.063	0.240
Bridj 35	0.5	0.010	0.496	0.076	0.241
	1	0.010	0.526	0.097	0.291
	2	0.011	0.704	0.108	0.374
	5	0.020	0.907	0.173	0.434

【実施例８】

【００９６】

３）酸性化剤共存下における蛋白質変性剤：

ＨＢＶ陰性検体またはＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）３０μＬに、蛋白質変性剤である尿素またはグアニジン塩酸塩を１．０Ｎ塩酸濃度の水溶液に溶解し、その３０μＬ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５０μＬを測定試料として、１）で前述した方法で検討した。各々のＨＢｓ抗原陽性検体の免疫活性を表１０に示した。尚、表１０に示した塩酸濃度及び蛋白質変性剤濃度は、検体（Ｓａｍｐｌｅ）と処理剤を混合後の処理時濃度で表した。

【００９７】

蛋白質変性剤である尿素を添加すると、酸性化剤のみと比較して、約１．５～３倍、グアニジン塩酸塩を添加した場合は約２～３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、ピペッ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。尿素やグアニジン塩酸塩を処理時０．５Ｍ以上添加するによって、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、特に尿素は処理時１．５Ｍ以上４Ｍ以下、グアニジン塩酸塩は処理時２Ｍ以上３．５Ｍ以下の添加でより効果が認められた。

【００９８】

【表１０】

表10

	濃度(M)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.018	0.483	0.076	0.175
0.5N HClに添加した蛋白質変性剤					
Urea	0.5	0.015	0.555	0.085	0.204
	1	0.010	0.619	0.076	0.236
	1.5	0.006	0.636	0.090	0.248
	2	0.005	0.686	0.081	0.293
	2.5	0.005	0.725	0.100	0.335
	3	0.005	0.771	0.088	0.382
	3.5	0.003	0.830	0.116	0.443
	4	0.008	1.041	0.143	0.578
Guanidine-HCl	0.5	0.027	0.706	0.116	0.235
	1	0.024	0.802	0.146	0.270
	1.5	0.020	0.820	0.140	0.307
	2	0.014	0.943	0.179	0.385
	2.5	0.008	1.039	0.183	0.455
	3	0.005	1.113	0.235	0.504
	3.5	0.003	0.970	0.248	0.528

【実施例９】

【００９９】

４）酸性化剤共存下における還元剤の検討：

ＨＢＶ抗原陰性検体（Ｎｏｒｍａｌ　ｐｌａｓｍａ）または３例のＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）３０μＬに、１．０Ｎ塩酸を含む溶液に還元剤であるジチオスレイトール、２－メルカプトエチルアミン塩酸塩、２－ジエチルアミノエタンチオール塩酸塩を混合した溶液の３０μＬ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５０μＬを測定試料として、１）で述べた方法を用いて検討した（表１１）。

【０１００】

ここで用いられた還元剤濃度は、検体の処理時の濃度で表した。ＨＢＶ抗原陰性検体では、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、ＨＢｓ抗原陽性検体では、ジチオスレイトール濃度が１～５ｍＭで１例（＃９９０６４０）の検体で３０％以上の上昇が認められた。

【０１０１】

【表１１】

表11
還元剤

		HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493		#990640		#990650	
	濃度(mM)			対照に対する%		対照に対する%		対照に対する%
対照	0	0.012	0.446	100	0.073	100	0.159	100
0.5N HClに添加した還元剤								
Dithiothreitol	0.25	0.016	0.497	111	0.080	110	0.177	111
	0.5	0.014	0.487	109	0.083	114	0.184	116
	1	0.013	0.500	112	0.101	138	0.184	116
	2	0.012	0.453	102	0.124	170	0.174	109
	5	0.011	0.324	73	0.116	159	0.092	58
	10	0.007	0.082	18	0.040	55	0.033	21
	20	0.008	0.029	7	0.011	15	0.023	14
2-Mercaptoethylamine Hydrochloride	0.25	0.014	0.432	97	0.056	77	0.154	97
	0.5	0.009	0.429	96	0.064	88	0.144	91
	1	0.009	0.426	96	0.060	82	0.148	93
	2	0.008	0.411	92	0.069	95	0.129	81
	5	0.004	0.350	78	0.068	93	0.109	69
	10	0.001	0.278	62	0.075	103	0.074	47
	20	0.002	0.217	49	0.058	79	0.063	40
	50	0.000	0.140	31	0.037	51	0.033	21
2-Diethylaminoethanethiol Hydrochloride	0.25	0.015	0.429	96	0.066	90	0.165	104
	0.5	0.012	0.429	96	0.067	92	0.156	98
	1	0.013	0.456	102	0.066	90	0.166	104
	2	0.008	0.436	98	0.083	114	0.151	95
	5	0.008	0.397	89	0.081	111	0.129	81
	10	0.004	0.298	67	0.085	116	0.090	57
	20	0.008	0.259	58	0.079	108	0.078	49
	50	0.006	0.145	33	0.065	89	0.049	31

【実施例１０】

【０１０２】

５）アルカリ剤濃度：

ＨＢＶ抗原陰性検体または抗ＨＢｓ抗体を含むＨＢＶ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）５０μＬに、各種濃度の水酸化ナトリウム水溶液５０μＬ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５０μＬを測定試料として、以下に記す測定法を用いて検討した。

【０１０３】

抗ＨＢｓ抗原モノクローナル抗体６Ｇ６を、最終濃度が６μｇ／ｍｌとなるように、０．１５ＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．３）で希釈し、９６ウエルマイクロプレート（ヌンク社製）１ウエルにつき１００μｌづつ分注した。４℃で一晩インキュベートした。

【０１０４】

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３５０μＬ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１００μＬ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撹拌しながら室温で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）３５０μＬで６回洗浄し、さらにビオチン標識したモノクローナル抗体（ＨＢｓ１２４）１００μＬ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、ＰＯＤ標識したアビジンＤ　１００μＬ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（オルトフェニレンジアミン、以下ＯＰＤ）溶液１００μｌを加え３０分間インキュベートした後、２Ｎ硫酸溶液１００μｌを添加し、波長６３０ｎｍの吸光度を対照として波長４９２ｎｍにおける吸光度（ＯＤ４９２）を測定した。尚、表に示した水酸化ナトリウムの濃度は、検体と処理剤を混合後の処理時濃度で表した。

【０１０５】

なお、ビオチン標識したモノクローナル抗体であるＨＢｓ１２４は、ＨＢｓ抗原の全長

である１～２２６番目のアミノ酸配列からなる抗原を実施例１に準じた方法で発現、精製し、その組換え抗原をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体である。この抗体が上記の組換えＨＢｓ抗原に結合することは確認された。しかし、該抗体と、実施例３と同様の方法でＨＢｓ抗原の１～２２６番目のアミノ酸配列を基に、１０アミノ酸ずつオーバーラップする２０アミノ酸からなる合成ペプチドとの結合を調べた結果、該抗体は何れの合成ペプチドとも反応しなかった。そのため、ＨＢｓ１２４はＨＢｓ抗原のアミノ酸配列の連続エピトープではなく、構造エピトープを認識しているものと考えられる。

【０１０６】

抗ＨＢｓ抗体を含むＨＢＶ陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）は、水酸化ナトリウムを含まない溶液で室温１０分間インキュベーションを行なってもほとんどＨＢｓ抗原活性を検出できなかったが、処理時の水酸化ナトリウム濃度０．２５Ｎ～１ＮでＨＢｓ抗原に対するシグナルの上昇が認められた（表１２）。

【０１０７】

【表１２】

	HBV 陰性ｻﾝﾌﾟﾙ	HBV 陽性ｻﾝﾌﾟﾙ		
NaOH 温度 (N)	健常人血清	#990493	#990640	#990650
0	0.006	0.005	0.006	0.006
0.05	0.006	0.010	0.004	0.002
0.1	0.010	0.014	0.010	0.008
0.25	0.006	0.034	0.006	0.012
0.5	0.008	0.058	0.006	0.030
0.75	0.004	0.070	0.006	0.039
1	0.010	0.044	0.018	0.042
1.5	0.008	0.012	0.014	0.029

【実施例１１】

【０１０８】

６）アルカリ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ＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）３０μＬに、各種界面活性剤を１．０Ｎ水酸化ナトリウム濃度の水溶液に溶解したその３０μＬ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５０μＬを測定試料として、５）で前述した方法で検討した（表１３～表１７）。尚、表に示した水酸化ナトリウム濃度及び界面活性剤濃度は、検体（Ｓａｍｐｌｅ）と処理剤を混合後の処理時濃度で表した。

【０１０９】

表１３～表１７に示したように、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、水酸化ナトリウムのようなアルカリ剤とともに各種界面活性剤を添加すると、ＨＢｓ抗原陽性検体中のコア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、Ｓｏｄｉｕｍ　Ｄｏｄｅｃｙｌ　Ｓｕｌｆａｔｅ、Ｎ－ｌａｕｒｏｙｌ　ｓａｒｃｏｓｉｎｅ　Ｎａなどの陰イオン性界面活性剤、一本鎖アルキル基と、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イオン性界面活性剤または陽イオン性界面活性剤であった。

【０１１０】

また、ＴｒｉｔｏｎＸ１００、Ｔｗｅｅｎ　２０、Ｂｒｉｄｊ３５のような非イオン性界面活性剤、ＣＨＡＰＳのようなステロイド骨格を有する界面活性剤にも添加効果が認められた。

【０１１１】

アルカリ剤に陰イオン性界面活性剤または一本鎖アルキル基と第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イオン性界面活性剤または陽イオン性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。このアルカリ剤と界面活性剤の処理剤からアルカリ剤を除き、効果のあった界面活性剤のみで処理を行ったが、測定感度の上昇は認められなかった。アルカリ剤と界面活性剤の組み合わせによりＨＢｓ抗原測定の阻害物質である抗ＨＢｓ抗体を失活させ、検体中のＨＢｓ抗原の脂質二重膜の内側に存在するエピトープが提示され、６Ｇ６との反応性が大きく向上するものと考えられた。

【０１１２】

【表１３】

表13
陰イオン性

	濃度(%)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.015	0.032	0.002	0.009
界面活性剤効果の判定基準			0.160	0.010	0.045
0.5N NaOHに添加した界面活性剤					
Sodium Dodecyl Sulfate	0.5	0.014	0.225	0.137	0.152
$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	1	0.015	0.340	0.241	0.195
	2	0.016	0.457	0.371	0.308
	5	0.015	0.967	0.430	0.472
Lithium Dodecyl Sulfate	0.5	0.009	0.239	0.168	0.132
$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Li$	1	0.015	0.275	0.205	0.141
	2	0.007	0.468	0.416	0.272
	5	0.016	1.055	0.385	0.325
N-Lauroylsarcosine sodium salt	0.5	0.008	0.254	0.280	0.143
	1	0.004	0.391	0.354	0.274
	2	0.007	0.540	0.434	0.361
	5	0.007	0.769	0.618	0.482

【０１１３】

【表１４】

表14
陽イオン性(TAC系)

		HBV陰性サンプル	HBV陽性サンプル		
		健常人血清	#990493	#990640	#990650
	濃度(%)				
無添加	0	0.021	0.041	0.013	0.021
界面活性剤効果の判定基準			0.205	0.065	0.105
0.5N NaOHに添加した界面活性剤					
Octyltrimethylammonium Chloride	0.5	0.020	0.163	0.120	0.209
[CH3(CH2)7N(CH3)3]Cl	1	0.024	0.277	0.200	0.249
	2	0.021	0.409	0.147	0.167
	5	0.030	0.299	0.032	0.028
Decyltrimethylammmonium Chloride	0.5	0.022	0.402	0.287	0.342
[CH3(CH2)9N(CH3)3]Cl	1	0.022	0.418	0.151	0.131
	2	0.018	0.220	0.041	0.031
	5	0.025	0.067	0.023	0.019
Dodecyltrimethylammmonium Chloride	0.5	0.021	0.513	0.351	0.341
[CH3(CH2)11N(CH3)3]Cl	1	0.013	0.302	0.111	0.075
	2	0.019	0.069	0.028	0.041
	5	0.014	0.029	0.015	0.019
Tetradecyltrimethylammmonium Chlorid	0.5	0.016	0.550	0.402	0.426
[CH3(CH2)13N(CH3)3]Cl	1	0.013	0.359	0.184	0.100
	2	0.016	0.091	0.041	0.029
	5	0.015	0.061	0.017	0.024
Hexadecyltrimethylammonium Chloride	0.5	0.020	0.566	0.326	0.466
[CH3(CH2)15N(CH3)3]Cl	1	0.017	0.418	0.204	0.161
	2	0.021	0.179	0.041	0.036
	5	0.017	0.208	0.023	0.032
Lauryl pyridinium Chloride	0.5	0.011	0.029	0.043	0.094
[C5H5NCH2(CH2)10CH3]Cl	1	0.010	0.022	0.049	0.062
	2	0.011	0.028	0.030	0.029
	5	0.049	0.043	0.039	0.036

【０１１４】

【表１５】

表15
陽イオン性(TAB系)

	濃度(%)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.007	0.031	0.005	0.011
界面活性剤効果の判定基準			0.155	0.025	0.055
0.5N NaOHに添加した界面活性剤					
Octyltrimethylammonium Bromide	0.5	0.008	0.134	0.094	0.180
[CH3(CH2)7N(CH3)3]Br	1	0.008	0.229	0.173	0.202
	2	0.009	0.403	0.152	0.135
	5	0.011	0.256	0.025	0.019
Decyltrimethylammmonium Bromide	0.5	0.011	0.385	0.290	0.332
[CH3(CH2)9N(CH3)3]Br	1	0.015	0.379	0.121	0.068
	2	0.010	0.250	0.025	0.021
	5	0.014	0.037	0.012	0.012
Dodecyltrimethylammmonium Bromide	0.5	0.009	0.521	0.343	0.364
[CH3(CH2)11N(CH3)3]Br	1	0.007	0.346	0.118	0.063
	2	0.010	0.077	0.023	0.026
	5	0.009	0.041	0.008	0.015
Tetradecyltrimethylammmonium Bromide	0.5	0.008	0.577	0.381	0.438
[CH3(CH2)13N(CH3)3]Br	1	0.008	0.419	0.190	0.099
	2	0.009	0.109	0.031	0.028
	5	0.010	0.126	0.013	0.017
Hexadecyltrimethylammonium Bromide	0.5	0.011	0.611	0.335	0.440
[CH3(CH2)15N(CH3)3]Br	1	0.011	0.437	0.234	0.183
	2	0.011	0.253	0.079	0.061
	5	0.011	0.067	0.013	0.019

【０１１５】

【表１６】

表16
両イオン性

	濃度(%)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.008	0.027	0.004	0.010
界面活性剤効果の判定基準			0.135	0.020	0.050
0.5N NaOHに添加し界面活性剤					
3-[3-(Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-	0.5	0.006	0.396	0.183	0.200
1-propanesulfonate	1	0.007	0.496	0.201	0.267
	2	0.008	0.660	0.204	0.359
	5	0.007	0.709	0.139	0.290
N-Dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-	0.5	0.010	0.251	0.247	0.122
1-propanesulfonate	1	0.008	0.292	0.288	0.140
CH3(CH2)11N(CH3)2[(CH2)3SO3]	2	0.012	0.330	0.188	0.147
	5	0.006	0.268	0.105	0.119
N-Tetradecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-	0.5	0.008	0.339	0.308	0.230
1-propanesulfonate	1	0.007	0.419	0.347	0.187
CH3(CH2)13N(CH3)2[(CH2)3SO3]	2	0.009	0.522	0.357	0.185
	5	0.008	1.037	0.451	0.218
N-Hexadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-	0.5	0.010	0.370	0.254	0.341
1-propanesulfonate	1	0.008	0.527	0.324	0.278
CH3(CH2)15N(CH3)2[(CH2)3SO3]	2	0.010	0.834	0.551	0.336
	5	0.005	1.110	0.451	0.257

【０１１６】
【表１７】

表17
非イオン性

	濃度(%)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.022	0.044	0.013	0.025
界面活性剤効果の判定基準			0.220	0.065	0.125
0.5N NaOHに添加した界面活性剤					
Triton X-100	0.5	0.021	0.305	0.174	0.108
	1	0.021	0.344	0.168	0.121
	2	0.019	0.367	0.185	0.166
	5	0.018	0.299	0.188	0.164
Triton X-114	0.5	0.023	0.293	0.128	0.111
	1	0.023	0.356	0.172	0.190
	2	0.020	0.404	0.173	0.250
	5	0.024	0.528	0.271	0.287
Tween 20	0.5	0.020	0.094	0.033	0.063
	1	0.017	0.215	0.070	0.093
	2	0.021	0.345	0.187	0.250
	5	0.017	0.274	0.117	0.173
Tween 80	0.5	0.017	0.104	0.038	0.081
	1	0.016	0.266	0.116	0.169
	2	0.020	0.379	0.212	0.215
	5	0.015	0.271	0.163	0.141
Bridj 35	0.5	0.021	0.317	0.190	0.143
	1	0.016	0.260	0.193	0.150
	2	0.020	0.301	0.255	0.151
	5	0.017	0.365	0.278	0.207

【実施例１２】
【０１１７】
７）アルカリ剤共存下における蛋白質変性剤：
ＨＢｓ抗原陰性検体またはＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）３０μＬに、蛋白質変性剤である尿素またはグアニジン塩酸塩を１．０Ｎ水酸化ナトリウム濃度の水溶液に溶解し、その３０μＬ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５０μＬを測定試料として、５）で前述した方法で検討した。各々のＨＢｓ抗原陽性検体の免疫活性を表１８に示した。尚、表１８に示した水酸化ナトリウム濃度及び蛋白質変性剤濃度は、検体（Ｓａｍｐｌｅ）と処理剤を混合後の処理時濃度で表した。
【０１１８】
ＨＢｓ抗原陽性検体３例において、蛋白質変性剤である尿素を添加した場合は、アルカリ性化剤のみと比較して、約８倍以上、グアニジン塩酸塩を添加した場合は約４．５倍以上に上昇することが確認された。また、アルカリ性化剤のみの処理の場合、中和時に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、ピペッ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。尿素やグアニジン塩酸塩を処理時１Ｍ以上添加するによって、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、特に尿素は処理時２Ｍ以上４Ｍ以下、グアニジン塩酸塩は処理時２Ｍ以上３Ｍ以下の添加でより効果が認められた。
【０１１９】

【表１８】

表18

		HBV陰性サンプル	HBV陽性サンプル		
		健常人血清	#990493	#990640	#990650
	濃度(M)				
無添加	0	0.015	0.032	0.002	0.009
0.5N NaOHに添加した蛋白質変性剤					
Urea	1	0.006	0.072	0.017	0.074
	2	0.005	0.168	0.048	0.186
	3	0.007	0.263	0.133	0.305
	4	0.004	0.267	0.179	0.334
Guanidine-HCl	0.5	0.008	0.037	0.017	0.070
	1	0.006	0.052	0.025	0.096
	2	0.006	0.121	0.065	0.147
	3	0.015	0.152	0.111	0.144

【実施例１３】

【０１２０】

８）アルカリ剤共存下における還元剤の検討：

ＨＢＶ抗原陰性検体または３例のＨＢｓ抗原陽性検体（＃９９０４９３、＃９９０６４０、＃９９０６５０）３０μＬに、１．０Ｎ水酸化ナトリウムを含む溶液に還元剤であるジチオスレイトール、２－メルカプトエチルアミン塩酸塩、ジエチルアミノエタンチオール塩酸塩、２－メルカプトエタノール、トリ（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩を混合した溶液の３０μＬ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５０μＬを測定試料として、５）で述べた方法を用いて検討した（表１９）。

【０１２１】

ここで用いられた還元剤濃度は、検体の処理時の濃度で表した。ＨＢＶ抗原陰性検体では、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、ＨＢｓ抗原陽性検体では、３例とも２－メルカプトエチルアミン塩酸塩、ジエチルアミノエタンチオール塩酸塩、２－メルカプトエタノールの濃度が２０ｍＭで約２～３倍のシグナルの上昇が認められた。より効果的であったのは、トリ（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩であり、濃度が２ｍＭでは１．５倍、１０ｍＭでは１５倍以上のシグナルの上昇が認められた。

【０１２２】

【表１９】

表19
還元剤

	濃度(mM)	HBV陰性サンプル 健常人血清	HBV陽性サンプル #990493	#990640	#990650
無添加	0	0.017	0.053	0.020	0.032
0.5N NaOHに添加した還元剤					
Dithothreitol	2	0.017	0.063	0.023	0.039
	5	0.016	0.058	0.019	0.041
	10	0.019	0.067	0.024	0.051
	20	0.019	0.089	0.025	0.050
2-Mercaptoethylamine Hydrochloride	2	0.027	0.074	0.028	0.043
	5	0.016	0.066	0.023	0.036
	10	0.017	0.086	0.038	0.058
	20	0.016	0.154	0.078	0.114
2-Diehylaminoethanethiol Hydrochloride	2	0.027	0.066	0.029	0.035
	5	0.023	0.052	0.031	0.043
	10	0.029	0.065	0.067	0.075
	20	0.022	0.094	0.307	0.197
2-Mercaptoethanol	2	0.027	0.082	0.033	0.047
	5	0.023	0.084	0.030	0.046
	10	0.025	0.109	0.041	0.058
	20	0.024	0.160	0.064	0.104
Tri (2-carboxyethl) phosphine Hydrochlorid	2	0.031	0.085	0.036	0.070
	5	0.028	0.141	0.042	0.104
	10	0.066	0.861	0.437	0.689
	20	0.131	0.495	0.534	0.479

【図面の簡単な説明】

【０１２３】

【図１】図１は、ＨＢｓ抗原の二次構造を模式的に示したものである。

【図１】

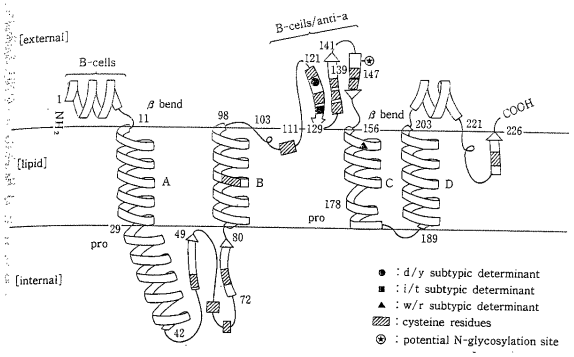


図１　HBs 抗原の二次構造（模式図）[4] 一部改変

【配列表】

0004430677000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ１２Ｐ 21/08 (2006.01) Ｃ１２Ｐ 21/08

(72)発明者 槇 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 福田 泰之
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
(72)発明者 小田 陽子
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 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
(72)発明者 草野 修
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

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特開平１１－２５３１８４（ＪＰ，Ａ）
特表平０８－５１０６３５（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０５８０５（ＪＰ，Ａ）
特表平０９－５０８２８４（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５１８０１３（ＪＰ，Ａ）
THE LANCET, １９９０年, Vol.336, P.325-329
Antiviral Res., ２００３年, Vol.60, P.75-78
Virus Res., ２００４年, Vol.99, P.63-68
J. Virol., １９９７年, Vol.71, No.6, P.4852-4856
HEPATOLOGY, ２０００年, Vol.31, No.5, P.1037-1044
Annu. Rev. Immunol., １９９５年, Vol.13, P.29-60

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C07K 16/08
C12Q 1/70
G01N 33/53
G01N 33/576
C12N 15/02
C12P 21/08
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)