

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6048923号
(P6048923)

(45) 発行日 平成28年12月21日(2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年12月2日(2016.12.2)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/576	(2006.01)	GO 1 N	33/576		B
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53		N
CO 7 K 16/08	(2006.01)	CO 7 K	16/08		

請求項の数 12 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2012-139189 (P2012-139189)</p> <p>(22) 出願日 平成24年6月20日 (2012.6.20)</p> <p>(65) 公開番号 特開2014-2117 (P2014-2117A)</p> <p>(43) 公開日 平成26年1月9日 (2014.1.9)</p> <p>審査請求日 平成27年5月12日 (2015.5.12)</p> <p>特許法第30条第2項適用 医学と薬学第66巻第6号 (2011(平成23)年12月25日) 自然科学社発行第1075-1081頁に発表</p> <p>特許法第30条第2項適用 2012年1月21日名古屋東急ホテルにおいて開催された名古屋ルミパルスフォーラムで発表</p> <p>特許法第30条第2項適用 2012年2月8日虎ノ門病院において開催された検査室への説明で発表</p>	<p>(73) 特許権者 306008724 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号</p> <p>(73) 特許権者 504136993 独立行政法人国立病院機構 東京都目黒区東が丘二丁目5番21号</p> <p>(74) 代理人 100088546 弁理士 谷川 英次郎</p> <p>(72) 発明者 八橋 弘 長崎県大村市久原2丁目1001-1 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター内</p> <p>(72) 発明者 金子 敦 東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レビオ株式会社内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 B型慢性肝炎の検出方法および検出キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトのB型肝炎ウイルスのコア抗原であるヒトHBc抗原を用いた免疫測定により、被検個体から分離された検体中のIgG型抗ヒトHBc抗体量を測定することを含む、B型慢性肝炎を検出するための方法であって、IgG型抗ヒトHBc抗体量の測定値が予め定められたカットオフ値以上であるかどうかを検出する、方法。

【請求項2】

前記カットオフ値が40 IU/mL以上の数値から選択される値である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記カットオフ値が40~470 IU/mLの範囲から選択される値である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記カットオフ値が80~320 IU/mLの範囲から選択される値である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記カットオフ値が100~200 IU/mLの範囲から選択される値である、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記被検個体がヒトである請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記被検個体が B 型肝炎の疑いのある患者である請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記被検個体が肝炎を患っている患者である請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記検体が血液、血清又は血漿である請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

ヒトの B 型肝炎ウイルスのコア抗原であるヒト HBc 抗原と、抗 IgG 抗体又はその抗原結合性断片とを含む、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法により B 型肝炎を検出するための B 型肝炎検出キット。 10

【請求項 11】

抗 IgM 抗体及びその抗原結合性断片のいずれも含まない請求項 10 記載のキット。

【請求項 12】

B 型肝炎検出の指標となる前記カットオフ値が記載された指示書をさらに含む請求項 10 又は 11 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】 20

本発明は、B 型肝炎の検出方法および検出キットに関する。

【背景技術】

【0002】

B 型肝炎は、現在、肝疾患の中で最も多い疾患であり、B 型肝炎ウイルス (HBV) がヒトに感染することにより引き起こされるウイルス性肝炎である。

【0003】

この B 型肝炎ウイルスの本体は、直径 42 nm の二重構造の球形粒子の形状をとっている「デーン (dane) 粒子」と称される粒子である。デーン粒子は、その表面が HBs 抗原と称される表面抗原で覆われており、さらに内部には、HBc 抗原 (コア抗原)、HBe 抗原、及びウイルス遺伝子をコードする環状二重鎖 DNA を含む直径 27 nm のコア構造が存在することが知られている。 30

【0004】

これら抗原や抗原に対する自己抗体は、ウイルス感染の診断のための標的とされてきた。特に、HBc 抗原に対する抗体 (以下、抗 HBc 抗体という) は、HBV 感染の初期から陽性化し、感染後長期間にわたり陽性であり続けることから、HBV 感染を広く検出できるマーカーとして用いられている。抗 HBc 抗体には IgM 型や IgG 型などがある。IgM 型の抗 HBc 抗体は B 型肝炎の感染初期に 3 ~ 12 ヶ月程度、一過性に高力価で出現し、IgG 型の抗 HBc 抗体は長期にわたり陽性となる。

【0005】

B 型肝炎と B 型肝炎はその臨床経過や予後が異なることから、B 型肝炎を診断する上で両者を鑑別することが重要である。一般的に、IgM 型の抗 HBc 抗体と IgG 型の抗 HBc 抗体を含む抗 HBc 抗体の総量 (以下、総 HBc 抗体という) は、B 型肝炎の場合には低力価であり、B 型肝炎の場合には高力価であることから、従来、B 型肝炎と B 型肝炎の鑑別には、総 HBc 抗体の高力価、低力価判定が応用されている。この方法により、ある程度、B 型肝炎と B 型肝炎の鑑別は可能であるが、正診率の更なる向上が求められていた。 40

【0006】

上記したように、IgM 型の抗 HBc 抗体は B 型肝炎の感染初期に一過性に高力価で出現するため、B 型肝炎の診断には IgM 型の抗 HBc 抗体の測定が臨床応用されている (非特許文献 1)。しかしながら本方法では、健常者と B 型肝炎患者とを区別 50

することができないため、B型慢性肝炎の診断のためには、IgM型抗HBc抗体の測定に加えてHBs抗原や総HBc抗体などを測定する必要があった。そのため、より簡便にB型急性肝炎とB型慢性肝炎を鑑別して、B型慢性肝炎を診断するための方法が求められていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】中尾 瑠美子ら、医学と薬学52(5)：847-858，2004

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

本発明の目的は、簡便かつ高精度にB型慢性肝炎か否かを判定する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、B型肝炎ウイルス感染に関する研究を重ねた結果、驚くべきことに、検体中のIgG型の抗HBc抗体を測定することによって、B型慢性肝炎をB型急性肝炎と区別して精度よく検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、ヒトのB型肝炎ウイルスのコア抗原であるヒトHBc抗原を用いた免疫測定により、被検個体から分離された検体中のIgG型抗ヒトHBc抗体量を測定することを含む、B型慢性肝炎を検出するための方法であって、IgG型抗ヒトHBc抗体量の測定値が予め定められたカットオフ値以上であるかどうかを検出する、方法を提供する。また、本発明は、ヒトのB型肝炎ウイルスのコア抗原であるヒトHBc抗原と、抗IgG抗体又はその抗原結合性断片とを含む、上記本発明の方法によりB型慢性肝炎を検出するためのB型慢性肝炎検出キットを提供する。

20

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、簡便かつ高精度にB型慢性肝炎か否かを判定する方法が提供される。本発明に係る方法を用いることにより、簡便且つ高精度に、B型急性肝炎と区別してB型慢性肝炎を診断することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】非B型肝炎患者、B型急性肝炎患者およびB型慢性肝炎患者由来の検体におけるIgG型抗HBc抗体測定値を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明では、被検個体から分離された検体中のIgG型抗HBc抗体量を測定し、該抗体量測定値を予め定められたカットオフ値と対比してB型慢性肝炎を検出する。下記実施例に示されるように、B型肝炎患者由来の検体中のIgG型抗HBc抗体の濃度は、非B型肝炎患者由来の検体中のその濃度よりも高く、さらに、B型慢性肝炎患者由来の検体中のIgG型HBc抗体の濃度は、B型急性肝炎患者由来の検体中のその濃度よりも高い。従って、B型慢性肝炎患者群とB型急性肝炎患者群とを十分な精度で区別できるIgG型抗HBc抗体量をカットオフ値として決めておけば、検体中のIgG型抗HBc抗体量の測定値が該カットオフ値以上か否かに基づいて被検個体がB型慢性肝炎か否かを判定することができる。本発明によれば、IgM型抗HBc抗体量や、IgM型抗HBc抗体を含む総HBc抗体量、つまりIgM型抗HBc抗体量を調べることなく、IgG型抗HBc抗体量に基づいてB型慢性肝炎を検出できる。

40

【0014】

抗体の測定方法自体は周知の常法である。本発明においては、IgG型の抗HBc抗体

50

を特異的に検出することができる方法であれば、いかなる手法を用いてもよい。例えば、化学発光免疫測定法（C L I A法）、化学発光酵素免疫測定法（C L E I A法）、ラジオイムノアッセイ（R I A法）、E L I S A法、及び蛍光免疫測定法などの各種の免疫測定方法を用いることができるが、これに限定されるものではない。

【 0 0 1 5 】

例えば、2ステップサンドイッチ法に基づくC L E I A法を用いて検体中のI g G型抗H B c抗体を測定する場合、担体に固相化されたH B c抗原を用いる。固相化されたH B c抗原と検体中に含まれる抗H B c抗体を接触させることにより、H B c抗原と抗H B c抗体とを反応させ、H B c抗原を介してI g G型抗H B c抗体を含む抗H B c抗体を担体に結合させる。反応後、B / F分離を行い洗浄する。次いで、標識された抗I g G抗体を系内に添加し、H B c抗原に結合したI g G型抗H B c抗体と標識抗I g G抗体を反応させた後に、B / F分離を行い、洗浄により未反応の標識抗I g G抗体を除去する。その後、H B c抗原およびI g G型抗H B c抗体を介して担体に結合した標識抗I g G抗体からのシグナルを適当な方法で検出することにより、検体中に含まれるI g G型抗H B c抗体を特異的に測定することが可能となる。ここでは2ステップ法について説明したが、1ステップ法で行われてもよい。また、固相に抗I g G抗体を結合させ、標識されたH B c抗原を用いて測定を行なうこともできる。また、競合法によってI g G型抗H B c抗体を検出してよい。

【 0 0 1 6 】

I g G型抗H B c抗体の測定に使用するH B c抗原としては、抗H B c抗体と特異的に結合するものであればいかなるものであってもよい。市販のリコンビナントH B c抗原を用いることができるし、また、周知の遺伝子工学的手法によりリコンビナントH B c抗原を調製して用いることもできる。B型肝炎ウイルス感染細胞からH B c抗原を抽出して得ることもできる。

【 0 0 1 7 】

H B cタンパク質のアミノ酸配列およびこれをコードするヌクレオチド配列は、NCBIのGenBank等のデータベースから入手することができるので、当業者であれば、周知の遺伝子工学的手法を用いてリコンビナントH B c抗原を容易に調製することができる。配列表の配列番号1および2に示した配列は、公知のH B c遺伝子およびこれにコードされるH B cタンパク質の配列の一例であり、GenBankにaccession No. AF324125.1で登録されている配列である。これまでに公知となっているH B cタンパク質のアミノ酸配列の大部分は、配列番号2のアミノ酸と95%程度以上の同一性を有するか、あるいは1~数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加されたアミノ酸配列を有しており、そのようなアミノ酸配列のH B cタンパク質であればI g G型抗H B c抗体測定のためのH B c抗原として好ましく使用可能である。もっとも、H B c抗原の配列はこれに限定されるものではなく、配列番号2のアミノ酸配列と同一性が95%未満のものや、N末端あるいはC末端にタグ配列等の余分なアミノ酸配列が付加されたものであっても、H B Vに感染した個体の体内で誘導される抗H B c抗体との反応性を有する限り、H B c抗原として使用可能である。本発明において、「H B c抗原」といった場合には、上記した各種のH B cタンパク質が包含される。

【 0 0 1 8 】

なお、アミノ酸配列の同一性とは、比較すべき2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように両アミノ酸配列を整列させ、一致したアミノ酸残基数を全アミノ酸残基数で除したものを百分率で表したものである。上記整列の際には、必要に応じて、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTAL W等の周知のプログラムを用いて行なうことができる。ギャップが挿入される場合、上記全アミノ酸残基数は、1つのギャップを1つのアミノ酸残基として数えた残基数となる。このようにして数えた全アミノ酸残基数が、比較する2つの配列間で異なる場合には、同一性(%)は、長い方の配列の全アミノ酸残基数で、一致したアミノ酸残基数を除いて算出される。ただし、比較すべき配列が他の任意の配

10

20

30

40

50

列（例えばタグ配列、リンカー配列、他のタンパク質の配列等）と連結された状態にある場合には、そのような任意の配列は除外して同一性が算出される。

【0019】

天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸（Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸（Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys）、酸性アミノ酸（Asp, Glu）、塩基性アミノ酸（Arg, Lys, His）、芳香族アミノ酸（Phe, Tyr, Trp）のように類似の性質を有するものにグループ分けできる。これらグループ内での置換であればタンパク質の性質が変化しないことが多いことが知られている。従って、配列番号2に例示した公知のHBcタンパク質とアミノ酸配列が一部相違するタンパク質であっても、これらグループ内での置換であれば、抗HBc抗体との結合性も維持される可能性が高い。

10

【0020】

固相担体は、免疫測定用に従来用いられているものであり、特に限定されない。例えば、プラスチックプレート、微粒子、繊維状物質等を用いることができる。これら担体の材質としては、従来公知のものを用いることができ、特に限定されないが、微粒子であれば、例えば、ガラスビーズ、ポリスチレン等の各種プラスチックビーズ、ラテックス粒子および各種フェライト粒子（例えば、特開平3-115862号公報参照）等を挙げることができる。また、繊維状物質としては、例えば、セルロース、ニトロセルロース、キトサン、ポリエチレングリコール重合体、シラン重合体等を構成成分とするものを挙げることができる。

20

【0021】

これら担体へのHBc抗原の固相化は、物理吸着、架橋剤を用いた化学結合等公知の方法を適宜用いることができる。

【0022】

本発明に使用する抗IgG抗体としては、IgG型の抗体に特異的に結合するものであればよく、抗IgG抗体又はその抗原結合性断片を用いることができる。検体の由来に適した抗IgG抗体が好ましく使用され、例えば、ヒト由来の検体を用いる場合は、抗ヒトIgG抗体またはその抗原結合性断片を用いることが好ましい。抗IgG抗体又はその抗原結合性断片の具体例としては、マウス、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；免疫した実験動物から脾臓細胞を分離し、ミエローム細胞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；免疫した実験動物から分離した脾臓細胞または血中白血球をEBウイルスによって不死化させた細胞が産生するモノクローナル抗体；組換え抗体；IgGへの結合性を有する上記抗体の断片（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv）など、IgG型抗体に高い特異性、親和性を示す分子であればいかなるものでも用いることができる。抗IgG抗体又はその抗原結合性断片は、市販品を用いてもよいし、周知の常法により抗IgG抗体又はその抗原結合性断片を作製して用いることもできる。

30

【0023】

抗IgG抗体若しくはその抗原結合性断片又はHBc抗原の標識に用いる標識物質としては、例えば酵素、蛍光物質、化学発光物質、染色物質、放射性物質などが挙げられる。酵素としては、アルカリホスファターゼ（ALP）、パーオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ等、公知のものを用いることができるが、これに限定されるものではない。高い検出感度の測定系を提供するためには、ALPを用いることが望ましい。

40

【0024】

標識物質として酵素を用いる場合、該酵素に対応した発色基質、蛍光基質又は発光基質等の基質を測定系内に添加し、酵素反応により生じる発色や発光等のシグナルを吸光度計やルミノメーター等を用いて測定すればよい。例えば、標識物質としてALPを用いる場合、3-(4-メトキシスピロ(1,2-ジオキセタン-3,2'-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}])デカン)-4-イル)フェニルホスフェート2ナトリウム（例えば商品名AMPD（登録商標））などの発光基質を用いることができる。標識物質としてピ

50

オチン又はハプテンが用いられる場合には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、染色物質、又は放射性物質などを結合したストレプトアビジン又はハプテン抗体などを用いればよい。

【0025】

抗IgG抗体の標識は、公知の共有結合法等により直接標識してもよいし、ビオチン-アビジン等他の結合対を用いて間接的に標識してもよい。

【0026】

IgG型抗HBc抗体を種々の濃度で含む濃度既知の標準試料について、HBc抗原を用いてIgG型抗HBc抗体の測定を行ない、標識からのシグナルの量と標準試料中のIgG型抗HBc抗体濃度との相関関係をプロットして標準曲線を作成しておく。IgG型抗HBc抗体濃度が未知の対象検体について同じ操作を行ない、標識からのシグナル量を測定し、測定されたシグナル量をこの標準曲線に当てはめることにより、検体中のIgG型抗HBc抗体を定量することができる。抗HBc抗体用のWHO第1国際標準品(WHO International Standard First International Standard for anti-Hepatitis B core antigen(anti-HBc), plasma, human. NIBSC code: 95/522)を用いて標準曲線を作成し、この標準曲線に基づいて被検個体由来の検体中のIgG型抗HBc抗体量を算出すれば、国際単位による濃度(IU/mL)で抗体量を表すことができる。あるいは、上記の国際標準品に対して校正された他の標準品を用いても、国際単位による濃度(IU/mL)で抗体量を求めることができる。

【0027】

本発明の方法では、上記のようにして検体中のIgG型抗HBc抗体量を測定した後、測定値を予め定められたカットオフ値と対比する。このカットオフ値は、被検個体がB型慢性肝炎であるか否かを判定する指標となる値であり、抗体量測定値がこのカットオフ値以上であった場合に被検個体がB型慢性肝炎であると判定することができる。つまり、IgG型抗HBc抗体量の測定値が予め定められた当該カットオフ値以上である場合にB型慢性肝炎が検出されることになる。

【0028】

B型慢性肝炎の指標となるカットオフ値は、次のようにして定めることができる。既知のB型急性肝炎患者群およびB型慢性肝炎患者群に由来する複数の検体(できる限り多数が望ましい)について、IgG型抗HBc抗体の免疫測定を行ない、上記のようにして作成した検量曲線にシグナル測定量を当てはめて各検体のIgG型抗HBc抗体量を算出し、抗体量の測定値を得る。得られた測定値に基づいて、B型急性肝炎患者群およびB型慢性肝炎患者群を十分な正診率で区別できる値を選択し、これをB型慢性肝炎の指標となるカットオフ値として使用することができる。

【0029】

抗HBc抗体用のWHO第1国際標準品または該国際標準品に対して校正された他の標準品を用いて作成した標準曲線に基づいて抗体量を算出すれば、カットオフ値を国際単位による抗体濃度(IU/mL)で表現することができる。国際単位で表現されたカットオフ値は、使用する測定系(試薬、装置)や実施する場所を問わず、国際的に共通して使用することができる。

【0030】

あるいは、カットオフ値は、抗体測定系毎に設定された計算式に基づいて求められる相対値(Cut Off Index (C.O.I.))として表すこともできる。相対値として算出する場合も、抗体濃度としてのカットオフ値を求めた場合と同様に、既知のB型急性肝炎患者群およびB型慢性肝炎患者群に由来する複数の検体について、検体中のIgG型抗HBc抗体を測定し、各測定系で設定された計算式に基づいてC.O.I.を算出する。そして、B型急性肝炎患者群およびB型慢性肝炎患者群を十分な正診率で区別できる値(C.O.I.)をカットオフ値として採用することができる。

【0031】

ある任意の値にカットオフ値を設定したとき、IgG型抗HBc抗体量がそのカットオ

10

20

30

40

50

フ値以上である個体を「B型慢性肝炎陽性」、そのカットオフ値未満である個体を「B型急性肝炎陽性」とすると、そのカットオフ値での正診率は $(B型急性肝炎全個体数 - B型急性肝炎陽性数 + B型慢性肝炎陽性数) / (B型急性肝炎全個体数 + B型慢性肝炎全個体数)$ で算出することができる。本発明におけるカットオフ値は、B型急性肝炎とB型慢性肝炎とを鑑別する際の正診率が80%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、若しくは100%となるように設定することができる。

【0032】

本発明で用いるカットオフ値は、具体的には、40 IU/mL以上の値でありうる。好ましくは、40~470 IU/mLの間の値、より好ましくは80~320 IU/mLの間の値、さらに好ましくは100~200 IU/mLの間の値である。カットオフ値が40~470 IU/mLの範囲から選択される場合、85.0%以上の正診率でB型急性肝炎とB型慢性肝炎を鑑別することができる(下記実施例参照)。また、カットオフ値が80~320 IU/mL、又は100~200 IU/mLの範囲から選択される場合、それぞれ90.0%以上、93.8%以上というさらに高い正診率でB型急性肝炎とB型慢性肝炎を鑑別することができる。従って、上記のようなカットオフ値と比較することにより、高精度にB型急性肝炎と区別してB型慢性肝炎を検出することができる。

10

【0033】

本発明ではさらに、健常者とB型肝炎患者(具体的にはB型急性肝炎患者)とを鑑別する第2のカットオフ値を設定することもできる。以下、第2のカットオフ値と区別して、上記したB型慢性肝炎か否かの指標となるカットオフ値を「第1のカットオフ値」という。第2のカットオフ値は、第1のカットオフ値と同様に、例えば次のようにして設定することができる。既知のB型急性肝炎患者群および非B型肝炎患者群に由来する複数の検体(できる限り多数が望ましい)について、IgG型抗HBc抗体の免疫測定を行ない、上記のようにして作成した標準曲線にシグナル測定量を当てはめて各検体のIgG型抗HBc抗体量を算出し、抗体量の測定値を得る。得られた測定値に基づいて、健常者群およびB型急性肝炎患者群を十分な正診率で区別できる値を選択し、これを健常者とB型肝炎患者(より具体的にはB型急性肝炎患者)を区別する指標となる第2のカットオフ値として使用することができる。

20

【0034】

第2のカットオフ値も、第1のカットオフ値と同様に、国際単位による抗体濃度(IU/mL)やC.O.I.で表現することができる。

30

【0035】

第2のカットオフ値は、健常者とB型急性肝炎患者とを鑑別する際の正診率が80%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、若しくは100%となるように設定することができる。具体的には、第2のカットオフ値は、0.7~0.9 IU/mLの範囲から選択される値であり得るが、これに限定されない。なお、この場合の正診率は、 $(健常全個体数 - 健常陽性数 + B型急性肝炎陽性数) / (健常全個体数 + B型急性肝炎全個体数)$ で算出することができる。

【0036】

本明細書において、「健常者」および「非B型肝炎患者」という語は、HBVに感染しておらず、B型肝炎を患っていない個体を指す。B型肝炎の既往歴のない健常者は、通常、HBs抗原および抗HBs抗体等をはじめとする各種HBVタンパク質および抗HBVタンパク質抗体が陰性である。第2のカットオフ値を決定する際は、健常者ないしは非B型肝炎患者に由来する検体を複数使用するが、健常者または非B型肝炎患者であることは、臨床症状および各種血液検査所見により判断することができる。例えば、下記実施例に記載されるように、肝炎症状がなく、HBs抗原陰性かつ抗HBs抗体陰性の個体に由来する検体を、第2のカットオフ値を決定する際の健常者検体ないしは非B型肝炎患者検体として使用することができる。

40

【0037】

50

なお、第1および第2のカットオフ値は、上述のように正診率に基づいて決定することができるが、これに限定されるものではなく、感度や特異度などの体外診断薬において一般的に用いられる他の指標に基づいて適宜決定することもできる。

【0038】

第1および第2のカットオフ値は、実施の都度定める必要はなく、IgG型抗HBc抗体の測定に使用する測定系が同一である限り、その測定系を用いて一旦定めたカットオフ値をその後に実施する際にもそのまま用いることができる。カットオフ値が国際単位で示されていれば、いかなる測定系を利用する場合であっても、同じカットオフ値を使用することができる。本発明では、例えば上記した国際単位による抗体濃度で示した好ましいカットオフ値をそのまま利用することができる。

10

【0039】

本発明で用いられる検体としては、全血、血漿、血清、尿、唾、脳脊髄液などの生物学的体液、および肝組織などが挙げられ、特に、全血、血清、血漿サンプルが好ましいが、これらに限定されない。

【0040】

被検個体は、哺乳動物であれば特に限定されないが、好ましくはヒトである。被検個体は、B型肝炎の疑いのある患者、又は肝炎（特にB型肝炎）を発症している患者であり得る。例えば、肝炎を発症している患者から分離された検体に対して本発明の方法を実施した場合、該患者がB型急性肝炎又はB型以外の肝炎を患っているときは、検体中のIgG型抗HBc抗体量は第1のカットオフ値以上とはならないため、このような場合でも本発明の方法によってB型慢性肝炎の検出が可能である。

20

【0041】

また、例えばB型肝炎を発症している患者ないしはB型肝炎の疑いのある患者に対して本発明の方法を実施すれば、第1のカットオフ値のみを用いて、該患者がB型急性肝炎かB型慢性肝炎かを鑑別することができる。具体的には、検体中のIgG型抗HBc抗体量が第1のカットオフ値以上であればB型慢性肝炎、第1のカットオフ値未満であればB型急性肝炎と診断することが可能である。

【0042】

第1のカットオフ値と併せて第2のカットオフ値を用いる場合には、健常者（主としてB型肝炎既往歴のない健常者）、B型急性肝炎およびB型慢性肝炎の3者の判別も可能であり得る。

30

【0043】

本発明はまた、上記本発明の方法にてB型慢性肝炎を検出するための検出キットも提供する。該キットは、HBc抗原と、抗IgG抗体又はその抗原結合性断片とを含み、検体中のIgG型抗HBc抗体を免疫測定法により測定する。免疫測定方法、HBc抗原、および抗IgG抗体又はその抗原結合性断片についての条件等は上記と同様である。例えば、HBc抗原は、プレートや粒子（例えば磁性粒子、ラテックス粒子など）などの固相に結合された形態であってもよく、抗IgG抗体又はその抗原結合性断片は、任意の標識物質で標識された形態であってもよい。あるいは、これとは逆に、抗IgG抗体又はその抗原結合性断片が固相に結合された形態であり、かつ、HBc抗原が標識された形態であってもよい。

40

【0044】

B型慢性肝炎検出キットには、B型慢性肝炎検出の指標となる第1のカットオフ値が記載された指示書もさらに含まれ得る。該指示書には、健常者とB型急性肝炎との判別の指標となる第2のカットオフ値も記載され得る。本発明の方法ではIgM型の抗HBc抗体を測定する必要がないため、本発明の検出キットには、抗IgM抗体及びその抗原結合性断片のいずれも含まれなくてよい。その他、該キットは、使用する標識物質に応じて適当な基質液や、検体希釈液、洗浄液等の、免疫測定キットに一般的に含まれている試薬類等も含んでいてよい。

【実施例】

50

【 0 0 4 5 】

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

【 0 0 4 6 】

実施例： I g G型抗 H B c 抗体の測定による B 型肝炎の鑑別

(1) H B c 抗原結合粒子の作製

リコンビナント H B c 抗原結合粒子を、次の通り調製した。

【 0 0 4 7 】

磁性フェライト粒子（日本ペイント社製）1 mgに、リコンビナント H B c 抗原（富士レピオ社製）1.5 μgを添加した。25℃で1時間ゆるやかに攪拌しながらインキュベートした。反応後、フェライト粒子を磁石で集めて反応液から分離し、粒子を緩衝液 A（50 mM トリス緩衝液 pH7.2、0.15% NaCl、0.1% アジ化ナトリウム、2% BSA）にて洗浄し、リコンビナント H B c 抗原結合粒子を得た。

10

【 0 0 4 8 】

(2) A L P 標識抗 I g G 抗体の作製

マウス抗ヒト I g G モノクローナル抗体（富士レピオ社製）とウシ小腸由来アルカリホスファターゼ（オリエンタル酵母社製）とをヨシタケらの方法（Yoshitake et al., J. Biochem. 1982, 92(5), p1413-1424）により結合させ、A L P 酵素標識抗体を調製した。

【 0 0 4 9 】

具体的には、脱塩処理したマウス抗ヒト I g G モノクローナル抗体（終濃度 3 mg/mL）とペプシン（終濃度 6 μg/mL）を 0.1M クエン酸バッファー（pH 3.5）中で混合し、37℃で1時間静置してペプシン消化を行った。反応を停止させた後にゲルろ過精製を行い、F C 領域を除去した抗ヒト I g G 抗体を得た。次に、2 -メルカプトエタノール（終濃度 10 mM）を添加して 37℃にて3時間静置し、チオール化を行った。更に脱塩処理し、抗ヒト I g G 抗体の F a b を得た。

20

【 0 0 5 0 】

一方、脱塩したアルカリホスファターゼと N - (4 - マレイミドブチリロキシ) - スクシンイミド (G M B S)（終濃度 0.3 mg/mL）を混合し、30℃で1時間静置してマレイミド化を行った。

【 0 0 5 1 】

脱塩した後、F a b とマレイミド化アルカリホスファターゼをモル比 1 : 1 の割合で混合し、25℃にて30分静置してカップリングを行った。カップリング液に 2 -メルカプトエタノール（終濃度 10 mM）を添加して 4℃にて一晩静置し、反応を停止させた。濃縮および脱塩後、1% BSA、1mM NaCl、0.1mM ZnCl₂ を含有する 100mM MES（pH 6.8）を加えて 200 μg/mL に調製し、A L P 標識抗 I g G 抗体溶液とした。

30

【 0 0 5 2 】

(3) I g G 型抗ヒト H B c 抗体の測定

標準曲線の作成に用いる基準試料は、抗 H B c 抗体用 W H O 第 1 国際標準品（WHO International Standard First International Standard for anti-Hepatitis B core antigen (anti-HBc), plasma, human NIBSC code: 95/522）を基に I g G 型抗 H B c 抗体濃度（I U / m l）を決定した B 型慢性肝炎患者由来検体を適宜希釈して準備した。

40

【 0 0 5 3 】

抗 H B c 抗体用 W H O 第 1 国際標準品相当で 0、1、20、50、100、200、400、600、800、1000 IU/ml の抗 H B c 抗体（I g G 型）濃度に調整した基準試料をルミパルス（登録商標）検体希釈液（富士レピオ社製）で 19 倍希釈した。希釈した各基準試料の 10 μL を、(1) で作製した H B c 抗原結合粒子溶液 0.25 mL に添加し、37℃で 10 分間反応させた。磁石を用いて B / F 分離し、洗浄後、(2) で調製した A L P 標識抗 I g G 抗体溶液を 0.25 mL 加え、再び 37℃で 10 分間反応させた。磁石を用いて B / F 分離し、洗浄後、化学発光基質である 3 - (2 ' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 " - ホスホリルオキシ) フェニル - 1、2 - ジオキセタン・2 ナトリウム塩（A M P P D（登録商標

50

)) を含むルミパルス (登録商標) 基質液 (富士レピオ社製) 200 μL を加え、37、5 分反応させて、発光量をルミノメーターで測定した。実際の測定は全自動化学発光酵素免疫測定システム (ルミパルス (登録商標) G1200 (富士レピオ社製)) にて行った。

【0054】

抗HBc抗体用WHO第1国際標準品の各濃度に相当する基準試料の測定結果から、スプライン曲線を作成し、標準曲線とした。

【0055】

(4) 検体測定

(3)に記載した測定方法に従って検体を測定した。測定対象は、長崎医療センターにて臨床症状および各種血液検査所見よりB型急性肝炎と診断された30例、B型慢性肝炎と診断された130例、およびHBs抗原・抗体ともに陰性である非B型肝炎の30例であった。検体として、-20にて保管した上記190例の血清を測定前に溶解して用いた。

10

【0056】

(3)に記載した方法により検体を測定し、(3)で作成した標準曲線に基づいて各抗体濃度 (IU/mL) を求めた。結果を図1及び表1に示す。なお、図1では、1000 IU/mL以上の濃度の検体は、1000 IU/mLとして表した。

【0057】

【表1】

20

カットオフ値 (IU/mL)	B型急性肝炎 陽性数	B型慢性肝炎 陽性数	正診率
30	24	129	84.4%
40	23	129	85.0%
70	17	127	87.5%
80	13	127	90.0%
90	8	126	92.5%
100	6	126	93.8%
110	6	126	93.8%
120	5	126	94.4%
190	1	122	94.4%
200	1	121	93.8%
210	1	120	93.1%
220	1	119	92.5%
250	1	119	92.5%
260	1	118	91.9%
310	1	117	91.3%
320	1	116	90.6%
330	1	114	89.4%
440	1	108	85.6%
450	1	107	85.0%
470	1	107	85.0%
480	1	106	84.4%

30

40

【0058】

その結果、驚くべきことに、IgG型抗HBc抗体の測定値は、急性肝炎患者が低値領域、慢性肝炎患者が高値領域に分布する傾向がみられた。

【0059】

図1および表1に示すように、40~470 IU/mLの範囲の値をカットオフ値としたとき、正診率85.0%以上でB型急性肝炎とB型慢性肝炎を鑑別することが可能であることが明らかとなった。また、80~320 IU/mLの範囲の値をカットオフ値としたときの正診率は90.0%以上、100~200 IU/mLの範囲の値をカットオフ値としたときの正診率は93.8%以上と、非常に高い正診率でB型急性肝炎とB型慢性肝炎を鑑別できることが明らかとなった。

【0060】

50

これらの結果から、検体中の I g G 型抗 H B c 抗体の濃度を測定することによって、高精度に B 型急性肝炎患者と B 型慢性肝炎患者とを鑑別することが可能であることが示された。本発明の方法によれば、簡便かつ高い精度で B 型慢性肝炎か否かを判定することができる。具体的には、検体中の I g G 型抗 H B c 抗体の濃度を測定し、測定された I g G 型抗 H B c 抗体濃度を、B 型慢性肝炎と B 型急性肝炎および非 B 型肝炎とを鑑別することができるカットオフ値と比較して、抗体濃度が該カットオフ値以上である場合は、検体は B 型慢性患者由来であると判定することができる。

【 0 0 6 1 】

さらに、図 1 に示すように、H B s 抗原・抗体ともに陰性である非 B 型肝炎患者由来の検体において、I g G 型抗 H B c 抗体はほとんど検出されず、その測定値を上記標準曲線に当てはめると、0.4 IU/mL 以下の数値となった。一方、B 型肝炎患者由来の検体における I g G 型抗 H B c 抗体の測定値は、18 IU/mL 以上の数値となり、0.5 ~ 17 IU/mL の範囲の値、例えば、0.7 ~ 0.9 IU/mL の値を第 2 のカットオフ値とすることにより、H B s 抗原・抗体ともに陰性である非 B 型肝炎患者と、B 型肝炎患者とを識別することができた。本結果から、I g G 型抗 H B c 抗体濃度における、上記の第 2 のカットオフ値は、非 B 型肝炎と B 型肝炎とを識別するための指標となりうることが示唆された。

10

【 0 0 6 2 】

参考例：総 H B c 抗体の測定による B 型肝炎の鑑別

検体中の I g G 型抗 H B c 抗体および I g M 型抗 H B c 抗体を含む抗 H B c 抗体の総量を測定し、高力価、低力価判定を利用することにより、B 型急性肝炎と B 型慢性肝炎とを従来法で鑑別した。なお、総 H B c 抗体は、ルミパルスプレスト（登録商標）H B c A b（富士レビオ社製）を用いて競合法により測定した。検体は、上記（4）で用いた検体と同一検体を用いた。

20

【 0 0 6 3 】

その結果、総 H B c 抗体が 50 INH% の場合、最も高い正診率で B 型急性肝炎と B 型慢性肝炎とを鑑別することができ、その正診率は 71.3% であった。このことから、従来法である抗 H B c 抗体の総量を用いた B 型慢性肝炎と B 型急性肝炎の鑑別方法に比べて、I g G 型抗 H B c 抗体の量のみに基づく本発明の方法では、非常に高い正診率で B 型急性肝炎患者と B 型慢性肝炎患者とを鑑別できることがわかった。

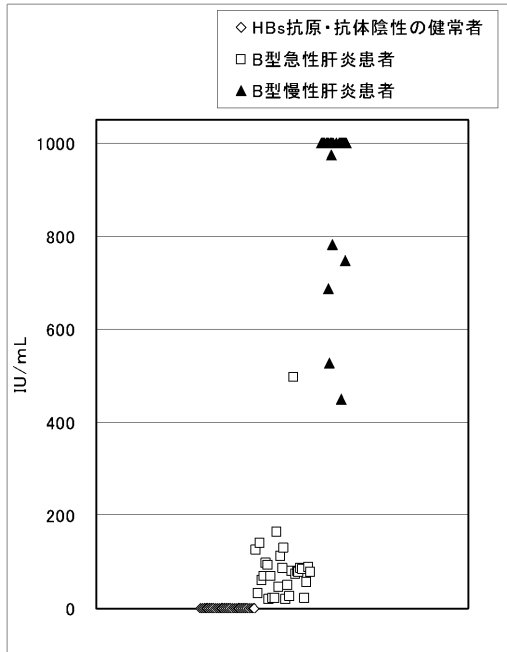
【 産業上の利用可能性 】

30

【 0 0 6 4 】

本発明の方法を用いることにより、簡便かつ高精度に B 型急性肝炎と B 型慢性肝炎とを鑑別し、B 型慢性肝炎か否かを判定することができる。そのため、本発明は H B V 感染の予防、診断および治療に有用である。

【 図 1 】



【 配列表 】

0006048923000001.app

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用 2012年2月9日ヒルトン東京において開催された東京ルミパルスフォーラムで
発表
特許法第30条第2項適用 2012年2月16日帝京大学溝口病院において開催された肝臓医カンファレンス
で発表
特許法第30条第2項適用 2012年2月18日ホテル ザ・マンハッタンにおいて開催された千葉ルミパル
スフォーラムで発表
特許法第30条第2項適用 2012年2月18日群馬ロイヤルホテルにおいて開催された群馬ルミパルスフ
ォーラムで発表
特許法第30条第2項適用 2012年2月23日市立札幌病院において開催された試薬変更案内で発表
特許法第30条第2項適用 2012年2月28日大阪赤十字病院において開催された消化器内科医局への説明
で発表
特許法第30条第2項適用 2012年2月29日静岡日赤病院において開催された院内勉強会で発表
特許法第30条第2項適用 2012年3月2日ホテルキャメロットジャパンにおいて開催された神奈川ルミパ
ルスフォーラムで発表
特許法第30条第2項適用 2012年3月8日慶応大学病院において開催された検査室への説明で発表
特許法第30条第2項適用 2012年3月12日東京医科大学病院において開催された検査室への説明で発表
特許法第30条第2項適用 2012年3月16日岡山済生会病院において開催された肝臓内科医局への説明で
発表
特許法第30条第2項適用 2012年3月22日慶応大学病院において開催された消化器内科医局への説明で
発表
特許法第30条第2項適用 2012年3月22日宮崎県臨床検査技師会において開催された技師会勉強会で発
表
特許法第30条第2項適用 2012年3月29日武蔵野赤十字病院において開催された検査室への説明で発表
特許法第30条第2項適用 2012年6月15日別府亀の井ホテル 別府において開催された大分別府ルミパ
ルスフォーラムで発表

(72)発明者 高橋 千明
東京都中央区日本橋浜町二丁目6番5号 富士レピオ株式会社内

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 特表平09-511577(JP,A)
特開2001-221802(JP,A)
米国特許出願公開第2003/0124651(US,A1)
中国特許出願公開第102062779(CN,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
A61K 39/00 - 49/04
C07K 1/00 - 19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)