

明 細 書

発明の名称：HBVの糖鎖修飾表面抗原タンパク質測定法

技術分野

[0001] 本発明は、B型肝炎ウイルス（HBV）の糖鎖修飾表面抗原タンパク質を特異的かつ簡便に測定するためのキットに関する。

背景技術

[0002] 全世界で約20億人の既感染者、約3億人の慢性感染患者が存在するB型肝炎ウイルス（HBV）は、慢性肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こし、肝癌の原因のうち20－30%を占め、年間88万人が死亡する感染症である（非特許文献1-5）。HBVに対するワクチンやも存在するが、未だに年間約3000万人が新たに感染し、450万人が慢性肝炎に対する治療を継続している（非特許文献1, 2）。HBV治療の目標は生命予後とQOLの改善であることは疑いの余地はないが、臨床における具体的な治療目標は、血中定量的HB表面抗原タンパク質（qHBsAg:quantitative hepatitis B surface antigen）の消失、である（非特許文献6-8）。しかしながら、現在のインターフェロン製剤、核酸アナログ製剤による治療によっても、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質（HBsAg:hepatitis B surface antigen）の消失に到ることはほとんどなく、新規治療の開発が改めて極めて活発になっている（非特許文献6-8）。

[0003] HBsAgのenvelopeタンパク質は、Sタンパク質（S-HBsタンパク質、S=small）、Mタンパク質（M-HBsタンパク質、M=middle）、Lタンパク質（L-HBsタンパク質、L=large）で構成されている。既存のHBsAg検出用診断薬は、全てのHBV粒子が有するSタンパク質（S-HBs）を認識することから、HBV感染の存在確認となる広い指標として日常診療には欠くことのできない検査薬となっている。

[0004] 他のウイルス同様にHBVも糖鎖を纏っていることは古くから知られていたが、近年のMS（質量分析）解析により、その糖鎖構造が明らかになってきた（非特許文献9、10）。S-HBsはアミノ酸146番目のアスパラギン（N146）に1個

のN型糖鎖が付加されるが、全てのN146に糖鎖が付加している訳ではなく、その糖鎖付加比率は明らかではない。また、そのN型糖鎖はシアル酸の修飾を受けていることが分かっている。S-HBsに付加するN型糖鎖は、HBV粒子を細胞外（血中を含む）に分泌する役割を担うことが実験的に証明されている（非特許文献11-13）。

[0005] 一方、臨床におけるN型糖鎖修飾の最大の問題点は、ヒトなど、ウイルス宿主の免疫からの回避に関わる点である（非特許文献14）。HBVは宿主細胞に侵入した後、宿主由来の糖鎖を纏った後に血中に放出されるため、宿主の免疫細胞からすると「自己」の糖鎖として免疫系による排除から免れる機構が考えられている。また、N型糖鎖のブランチ（糖鎖の枝）が広がることで、ウイルスの抗原認識部位を覆い隠してしまい、免疫系から認識されないようにする機構も考えられている。更に、ウイルス自体が変異により糖鎖付加位置を変化させる。例えば、アミノ酸130番目のグリシン（G130）がアスパラギンに置き換わり（G130N）、異所性に糖鎖を付加することがよく知られている。

[0006] 既存のHBVワクチン（Bimmugen、Heptavax）は、免疫源として「糖鎖修飾のない」S-HBsを使って製造されている。既存ワクチン接種患者血清では、S-HBsに対する抗体ができるが、その抗体が認識するエピトープは、糖鎖修飾のないS-HBs部分に結合するが、糖鎖修飾部分は認識していないことも示されている（非特許文献15）。そのようなS-HBsに対する抗体は、実験的には通常のHBVを中和することも示されている一方で、糖鎖変異株に対しては中和できなかったことも示されている（非特許文献16）。このように、S-HBsの糖鎖修飾の違いにより治療効果が大きく変わる、ということは、臨床的には大きな問題である。

[0007] 既存のHBsAg検出用の試薬で用いられているのは、「糖鎖修飾のない」S-HBsである。したがって、糖鎖を変異させたウイルスが既存の検査では検出されることなく陰性になったり（「オカルト感染」として実際に存在する）、また、糖鎖修飾機序による免疫回避を起こしている症例を正確に把握できずに、不十分な治療になってしまうケースも考えられる。糖鎖修飾S-HBs検出用の

試薬は現時点で未だ確立されていない。

S-HBsに付加する糖鎖の解析自体はMSで可能であり、事実MSによりその構造が明らかになってきた。しかし、臨床で実際に多数の患者血清を処理するには未だ時間とコストがかかりすぎ、実用的ではない。更に、患者血清には食事由来の膨大な糖鎖や、種々の臓器代謝由来の糖鎖が存在するため、糖鎖だけを網羅的に把握できたとしても、HBV由来の糖鎖を特定することは技術的にも困難である。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 1) WHO. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. March 2015.
- 2) WHO. Guidelines on hepatitis B and C testing. February 2017.
- 3) Terrault NA, Loch ASF, McMahon BJ et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. Hepatol 67: 1560, 2018.
- 4) European association for the study of the liver. EASL 2017 clinical practice guideline on the management of hepatitis B virus infection. J Hepatol 67: 370, 2017.
- 5) 日本肝臓学会 肝炎診療ガイドライン作成委員会。B型肝炎治療ガイドライン（第3.1版）。2019年3月。
- 6) Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G et al. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. J Hepatol 66: 1296, 2017.
- 7) Revill PA, Chisari FV, Block JM et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B. Lancet Gastroenterol Hepatol. 4: 545, 2019.
- 8) Cornberg M, Lok AS, Terrault NA et al. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B – Report from the 2019 EASL-AASLD HBV treatment endpoints conference. J Hepatol 72:

539, 2020.

9) Schmitt S et al. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *Journal of General Virology* (2004), 85, 2045-2053.

10) Wagatsuma T, Kuno A, Angata K et al. Highly sensitive glycan profiling of hepatitis B viral particle and a simple method for Dane particle enrichment. *Anal Chem* 90: 10196, 2018.

11) Lu X et al. Aberrant trafficking of hepatitis B virus glycoproteins in cells in which N-glycan processing is inhibited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94, 2380-2385.

12) Mehta A et al. α -Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Letters* (1998) 430, 17-22.

13) Ito K et al. Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site. *Journal of Virology* (2010) 128 50-12861

14) Dobrica M0, Lazar C, Branza-Nichita N. N-Glycosylation and N-Glycan Processing in HBV Biology and Pathogenesis. *Cells*. 2020 Jun 4; 9(6):1404. doi: 10.3390/cells9061404. PMID: 32512942; PMCID: PMC7349502.

15) Tajiri K et al. Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Research* (2010) 87, 40-49.

16) Hamada-Tsutsumi S et al. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS ONE* (2015) 10: e0118062.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、B型肝炎ウイルス（HBV）を特異的、簡便に、かつ高精度で測定する方法の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 糖鎖修飾S-HBsのような糖タンパク質の検出には、エピトープである糖ペプチドを検出する抗体（抗糖ペプチド抗体）が考えられるが、「自己糖鎖」を有するHBVに関しては未だ難しく、これまで検出用抗体に成功した試みがない。また、変異により糖鎖付加部分が変化するため、ある特定の糖ペプチド配列に対する抗体ができたとしても、その単独抗体だけで変異した糖鎖修飾S-HBsを検出できるとは限らない。一方、糖鎖の検出にはレクチンがよく使用されることから、N型糖鎖に対するレクチンと、S-HBs抗体とをコンビネーションで使用するにより、糖鎖修飾S-HBsが検出できるか否かを鋭意検討した。

[0011] 発明者らは、レクチンブロッキングの手法を用いた研究により、SSAレクチン（*Salvia sclarea* agglutinin）が、S-HBs上の α -2,6-シアル酸を認識することを発見した（非特許文献10）。そこで、レクチンと抗体のコンビネーションによるELISA系を作成し、実際の慢性B型肝炎患者血清を用いて、SSAレクチン陽性S-HBsの検出を試みたところ、予想に反して反応の特異性が低く、検出用としては不可であった。正常血清中に存在する糖鎖などのバックグラウンド成分に反応している可能性が考えられ、実際のヒト血清においてSSAレクチンで検出することは困難と示唆された。

[0012] そこで、発明者らは、実際の慢性B型肝炎患者血清を用いて、レクチン-抗体のコンビネーションを独自にデザインすることから始めて鋭意調べたところ、驚くべきことにコムギ胚芽凝集素（WGAレクチン（wheat germ agglutinin））と抗体とのコンビネーションによれば、特異的に検出し得ることが明らかになった（図1）。この発見は、S-HBsに付加している糖鎖がWGAに結合することを意味し、全く予測できないことであった。

[0013] さらに、別の患者集団の治療前後の血清を用いて、WGA-S-HBsのコンビネーションで測定したところ、いずれも測定可能であり、しかも治療前後の変化

も測定できたことから、治療効果の把握にも有用であることが示唆された（図2）。

- [0014] 上述と同じ患者集団の血清を用い、全体のS-HBsの中で、糖鎖修飾S-HBsがどの程度存在するかの比率を、「糖鎖修飾されたS-HBs/S-HBs」の比で求めた。以降、この比率をGlyco-S/S比と記す。治療前のGlyco-S/S比も非常に簡便に定量でき（図3）、従来のMSなどと比較しても、糖鎖比を連続性のある定量数値で測定できることが明らかになった。すなわち、分子である糖鎖修飾された表面抗原タンパク質の値は、レクチンと抗体とを使用する検出により求められ、分母である表面抗原タンパク質の値は、レクチンを使用しない抗体検出により求められる。
- [0015] qHBsAgの「消失」が治療ゴールであるが、現在の治療だけでは消失達成は難しく、数十年規模の長期観察になる。そのため、治療効果判定の指標としては、sHBsAgの「低下」が用いられている。とりわけ、log 10で1以上の低下は、臨床的に大きな意義のある低下とされ、新薬開発における薬効のエンドポイントとして世界規模で使われている（非特許文献7）。
- [0016] 上述と同じ患者集団の血清を用い、治療前のGlyco-S/S比と、治療後のHBsAg低下度の相関を調べたところ、治療前のGlyco-S/S比が高いほど、S-HBsタンパク上の糖鎖修飾が多く、HBsAg低下度が低い、すなわち、治療抵抗性であるという驚くべき結果を得た（図3）。Glyco-S/S値が、少なくとも0.5以上、すなわち半分以上糖鎖がついている場合、治療効果は低減するとみなせる。
- [0017] これまで、S-HBsの糖鎖修飾が免疫回避に重要であることは知られていたが、どの程度の糖鎖修飾が施されているのか、また、その程度により免疫治療効果・抵抗性への影響があるのか、は全く分かっていなかった。本発明は、従来のMSなどの手法によらず、免疫学的手法でS-HBsの糖鎖含量・比率を定量的に測定しうるものである。これまで定性的、かつ、時間とコストのかかる糖鎖修飾の検出を、簡便・迅速に定量することで、これまでほとんど分かっていなかった糖鎖修飾度と治療効果、とりわけ、免疫療法における治療効果の評価や予測に資する。また、変異・糖鎖修飾の変化によりこれまで見逃さ

れていた感染も検出可能であり、臨床への貢献度が極めて高いものである。

[0018] より具体的には、本発明は以下の〔１〕～〔１１〕を提供するものである。

〔１〕 Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）を検出する方法であって、試料を、表面抗原タンパク質に結合する抗体及びレクチンと接触させる工程を含む、方法。

〔２〕 Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質が、Ｓタンパク質である、〔１〕に記載の検出方法。

〔３〕 レクチンが、コムギ胚芽凝集素である、〔１〕又は〔２〕に記載の検出方法。

〔４〕 ＥＬＩＳＡ法による測定の工程を含む、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の検出方法。

〔５〕 Ｂ型肝炎ウイルスの検査、予防又は治療を計画するための、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の検出方法。

〔６〕 Ｂ型肝炎ウイルスの検査、予防又は治療のための医薬をスクリーニングするための、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の検出方法。

〔７〕 さらに、糖鎖修飾された表面抗原タンパク質／表面抗原タンパク質を算出する工程を含む、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の検出方法。

〔８〕 試料が、核酸アナログ製剤治療を受けている又は受けていた患者に由来する、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の検出方法。

〔９〕 試料が、血中ＨＢＶ－ＤＮＡの抑制が確認された患者に由来する、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の検出方法。

〔１０〕 Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質に結合する抗体およびレクチンを含む、Ｂ型肝炎ウイルスの糖鎖修飾表面抗原タンパク質を検出するためのキット。

〔１１〕 〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の方法を含む、Ｂ型肝炎の治療又は予防方法。

発明の効果

- [0019] 慢性B型肝炎（CHB）患者において、全てのHBV粒子が保有するS-HBsの糖鎖修飾は、宿主からの免疫回避に関わり、HBsAg消失を目指す治療の大きな障壁となっている。しかも、変異により糖鎖付加部位も変化することが、一層治療を難しくしている。従来のMSでは糖鎖構造の同定は可能であるが、時間とコストがかかるため、実際の臨床血清サンプルを大量に解析するには不向きである。また、膨大な量の血中糖鎖を網羅的に見ることはできるが、それゆえ逆に疾患に関わる糖鎖を選択的に決定することが困難である。
- [0020] 本発明の免疫学的手法、すなわち抗原-抗体反応及び糖鎖-レクチン反応によれば、S-HBsの中でもN型糖鎖に被覆されたS-HBsを迅速簡便、かつ定量的に検出できること、さらには、実際の患者血清において、S-HBs上の糖鎖修飾の程度（含量、あるいは、S-HBsにおける糖鎖修飾S-HBsの比率）が、治療反応に有意に関わることが初めて明らかになった。
- [0021] CHB患者のS-HBsを修飾する糖鎖は、個々の患者由来の糖鎖である。本発明によれば、糖鎖修飾S-HBsの程度を簡便・定量的に把握できるため、治療方針の決定や、とりわけ免疫機序の新薬の患者層別化や治療効果の診断、すなわち、個別化医療にも有用である。また、従来の「糖鎖のついていない」HBsAgを検出する検査薬で見逃されていたような変異を有する患者を発見できるため、潜在的な水平感染の減少にも貢献することが期待される。

図面の簡単な説明

- [0022] [図1]図1は、種々のレクチンとHBs抗原に対する抗体のコンビネーションELISAの結果を示す。Y軸はELISAの吸光度を示す。SSAではN型糖鎖修飾S-HBsに特異的な陽性シグナルとしては検出できなかったが、WGAを用いたコンビネーションで非常にクリアな検出ができた。
- [図2]図2は、核酸アナログ製剤治療前後のCHB患者（n=4）血清におけるN型糖鎖修飾S-HBs（Glyco-S）の量を、WGA-S-HBsのコンビネーションELSIAで測定した結果を示す。Y軸はELISAの吸光度を示す。Before：治療前、48W：治療48週後。
- [図3]図3は、核酸アナログ製剤治療前後のCHB患者（n=20）における治療前

のGlyco-S/S比と、治療後のHBsAg低下度の相関のプロットを示す。Y軸は比率を、X軸は、治療48週後におけるqHBsAgの低下度（logU/mL）を示す。-1以上の低下が、治療効果ありと判定される。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者は、B型肝炎ウイルス（HBV）の糖鎖修飾表面抗原タンパク質を特異的、かつ簡便に測定する方法、より特にはS-HBsタンパク質に結合する抗体と、S-HBsタンパク質に付加されている糖鎖と結合するレクチンとのコンビネーションを使った、免疫学的手法による検出及び定量方法を作成し、糖鎖修飾S-HBsを定量的に測定できることを見出した。

[0024] 本発明において、「B型肝炎」とは、HBVとも表現され、慢性B型肝炎、急性B型肝炎、劇症B型肝炎のいずれであってもよく、「B型肝炎ウイルス」とは、それらのB型肝炎を発症させる能力を有するウイルスを意味する。

[0025] 本発明において、検出対象は「B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質」であればよく、特にB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質のうち、Sタンパク質、Mタンパク質又はLタンパク質であればよく、好ましくはSタンパク質である。「糖鎖修飾S-HBs」とは、糖鎖を含むHBV表面抗原タンパク質のうち、糖鎖修飾されたSタンパク質をいう。

[0026] 本発明における抗体は、B型肝炎ウイルス表面抗原を認識する抗体であればよく、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。また、本発明の抗体は、当該技術分野における慣用の方法により作成することができるいかなる抗体であってもよく、市販の抗体でもよい。

[0027] 本発明におけるレクチンは、N結合糖鎖結合型レクチンであれば、植物レクチン、C型レクチン、ガレクチン、シグレックなどいかなるレクチンであってもよいが、好ましくはコムギ胚芽凝集素である。また、本発明のレクチンは、当該技術分野における慣用の方法により作製することができるいかなるレクチンであってもよく、市販のレクチンでもよい。

- [0028] 本発明における抗体およびレクチンは、当該技術分野で知られる一般的な方法により、作製することもできる。
- [0029] 本発明は、表面抗原タンパク質に結合する抗体およびレクチンを試料と接触させる工程を含む、B型肝炎ウイルス、特にB型肝炎ウイルスの糖鎖修飾された表面抗原タンパク質の検出方法を提供する。
- [0030] 表面抗原タンパク質に結合する抗体及びレクチンと試料との接触は、それぞれを同時、逐次又は連続的に接触させてよく、好ましくはELISA法により操作され、結合が測定される。
- [0031] 本発明の上記糖鎖修飾S-HBs測定試薬の作製方法及び検出方法は、当該技術分野における慣用の方法であればよい。S-HBs抗体やWGAレクチンの作製、及びこれを用いたELISA法、化学発光法は、当該技術分野における一般的な免疫学的検査方法を、当業者により適宜実施することが可能である。また、本発明を種々の測定機器へ適宜適合させることも、当業者であれば容易に可能である。さらにフィンガー・スティック法などにより簡便迅速検査キットを作製することも、当業者であれば容易に可能である。
- [0032] 本発明において検査の対象となるのは、HBVに感染している個体すべてである。HBV治療薬で治療を継続している患者はもちろんのこと、治療を中止して経過を観察されている患者、無症候性キャリア、すべてに適用される。
- HBV感染能力の把握により、治療効果の判定、治療薬の選択、治療方針の決定、治療の継続・中止の判断、など、HBV診療全般に用いることができる。
- [0033] 本発明において検査の対象となるのは、HBV感染のリスクが高い健常者に対しても用いることができる。具体的には、ヘルスケアワーカー、HBV感染者の家族などが該当する（WHO guidelines on hepatitis B and C testing 2017、にリストアップされている集団すべて）。
- [0034] 本発明において検査の対象となるのは、献血ドナーに対しても用いることができる。水辺感染の予防などに貢献する。
- [0035] 本発明において検査の対象となるのは、妊婦に対しても用いることができる。垂直感染の予防などに貢献する。

- [0036] 本発明において検査の対象となるのは、外科手術の術前検査や、内視鏡検査の検査前検査などに対しても用いることができる。実施する検査や手術により水平感染のリスクが生じるか否かを判定するのに貢献する。
- [0037] 本発明において検査の対象となるのは、脂肪肝などの肝障害を呈した患者に対して用いることができる。肝障害の陰にHBV感染がオーバーラップしていたり隠れていたりする患者を鑑別することにより、治療方針の修正と患者QOLの向上に貢献する。
- [0038] 本発明において検査の対象となるのは、全成人である。従来技術では、HBV感染と診断できるのは、真のHBV感染者の10%にしか過ぎないと報告されていることから（文献：Polaris Observatory Collaborators Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modeling study. Lancet Gastroenterol Hepatol 3: 383-403, 2018）、全成人に対して、オプション的に検査をすることも非常に有意義である。
- [0039] 本発明における前記対象、患者、感染者に由来する試料は、いかなる生体試料であってもよく、B型肝炎ウイルスへの感染が疑われる被検体の血液、血清、唾液、精液、膣分泌液、傷口滲出液をはじめとする体液あるいは組織抽出物が挙げられるが、試料取得及び取り扱いの簡便性を考慮すると、血液、血清、唾液が好ましい。
- [0040] 本発明の検出方法によれば、有利には、慢性B型肝炎ウイルスの患者、インターフェロン製剤や核酸アナログ製剤を含む治療薬の開始前、開始後、開始から1週間、2週間、4週間、8週間、16週間、48週間後、48週後以降のHBV患者、血中HBV-DNAの抑制が確認された患者、HBs抗原が消失した患者、生涯においてHBs抗原が消失しない患者、開発段階の新薬の投与前後の患者に由来する試料における糖鎖修飾H-HBsを検出することができる。試料は、いかなる生体試料であってもよい。試料が、核酸アナログ製剤治療を受けている又は受けていた患者に由来するばあいには、特に有利である。
- [0041] 本発明は、前記抗体およびレクチンを試料と接触させる工程を含む、HB

Vの予防又は治療を計画するためのデータの提供方法に関する。本発明によれば、症状の再発生や、感染性の有無といった、従来技術では困難であった、HBVの予防又は治療を計画するための指標となるデータを提供することができる。

[0042] 本発明は、さらに前記抗体およびレクチンを試料と接触させる工程を含む、HBVの予防又は治療のための医薬をスクリーニングする方法に関する。本発明によれば、S-HBsに付加するN型糖鎖の程度を反映し得るより正確な指標に基づいて、HBVの予防又は治療のための候補となる医薬をスクリーニングすることができる。

[0043] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0044] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0045] <実施例 1>

[0046] HBs抗原タンパク質に対する精製抗体 (HBsAgGi) をプレートに固相化し、これにより補足したHBs抗原を検出するために用いる最適なレクチンを検討するためのサンドイッチELISA系を構築した。

1) BSA (5 μ g /mL)/PBSで希釈したHBsAgGi (5 μ g /mL) をNunc Immobilizer Amino Plateにウェル当たり0.1 mL添加し、室温にて4時間振盪して抗体を固定した。PBS-Tで2回洗浄後、TBSをウェル当たり0.3 mL添加し4℃で一晩静置しブロッキングした。

2) PBS-Tでウェルを洗浄後、糖鎖の付加された組換えHBs抗原タンパク質をSample dilution buffer (3% BSA/TBS-T)で400 ng/mLに希釈し、ウェル当たり0.1 mL添加し、室温にて2.5時間振盪して抗原を抗体固相化プレートに捕捉させた。血清の影響を確認するために5% Normal human serum (NHS)を添加した組換えHBs抗原も同様に処理した。

3) PBS-Tでウェルを4回洗浄後、PBS-Tで希釈した以下のレクチンと室温に

て2時間振盪して反応させた。

Jacalin-biotin (1 $\mu\text{g/mL}$), MAL II-biotin (1 $\mu\text{g/mL}$), RCA120-biotin (1 $\mu\text{g/mL}$), SNA-biotin (1 $\mu\text{g/mL}$), SSA-biotin (1 $\mu\text{g/mL}$), WGA-biotin (1 $\mu\text{g/mL}$)

4) PBS-Tでウェルを4回洗浄後、PBS-Tで希釈したPeroxidase-conjugated Streptavidin (1/20000希釈)、あるいはSSA-HRP (2 $\mu\text{g/mL}$)と室温にて1時間振盪して反応させた。

5) PBS-Tでウェルを4回洗浄後、1Step Ultra TMB-ELISAをウェル当たり0.1 mL添加し5分間反応させた後、1 mol/L 硫酸を50 μL 添加し反応を停止した。反応停止後速やかにプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。

結果を図1に示す。本試験により、固相化した抗体に反応することなく、また、サンプルに添加したNHSの影響を受けることのなかったWGAレクチンを検出用レクチンとして選択した。

[0047] 上記Lectin-ELISA法を用いて、実際のHBV感染患者の治療前後の血清を測定した。

<患者属性>

CHB（慢性患者血清）：

未治療（核酸アナログによる治療暦の無い）の慢性B型肝炎（HBs抗原陽性が6か月以上持続）患者（n=4）を対象に、核酸アナログ治療前（0週）と治療後48週の血清を用いた。

1) BSA (5 $\mu\text{g/mL}$)/PBSで希釈したHBsAg抗体（Hyb-824, 5 $\mu\text{g/mL}$ ）をNunc Immobilizer Amino Plateにウェル当たり0.1 mL添加し、室温にて2時間振盪して抗体を固定した。PBS-Tで2回洗浄後、TBSをウェル当たり0.3 mL添加し4℃で一晩静置しブロッキングした。

2) PBS-Tでウェルを洗浄後、患者検体（治療前、治療48週後）をSample dilution buffer (3% BSA/TBS-T)で1/20希釈及び1/100希釈し、ウェル当たり0.1 mL添加し、室温にて1.5時間振盪して抗原を抗体固相化プレートに捕捉させた。（コントロールとして組換えM-HBs抗原や精製HBs抗原も1% NGS あるいは

5% NGSを含むSample dilution buffer (3% BSA/TBS-T)で希釈しプレートに捕捉させた。)

3) PBS-Tでウェルを4回洗浄後、PBS-Tで1 $\mu\text{g/mL}$ に希釈したWGA-biotin (VL)と室温にて1.5時間振盪して反応させた。

4) PBS-Tでウェルを4回洗浄後、PBS-Tで希釈したPeroxidase-conjugated Streptavidin (1/20000希釈)と室温にて1時間振盪して反応させた。

5) PBS-Tでウェルを4回洗浄後、1Step Ultra TMB-ELISAをウェル当たり0.1 mL添加し6分間反応させた後、1 mol/L 硫酸を50 μL 添加し反応を停止した。反応停止後速やかにプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。

結果を図2に示す。治療前の検体において、新規Lectin-ELISA法は糖鎖修飾HBs抗原を感度よく検出した。治療後の検体において、その変化を鋭敏に測定することが可能であった。これにより、本発明におけるLectin-ELISA法は患者血清中のHBV粒子の(付加された糖鎖の)状態を検出し、かつ、治療効果による変化を測定することができる方法であることが判明した。

[0048] 上述と同様の患者属性において、未治療(核酸アナログによる治療暦の無い)の慢性B型肝炎(HBs抗原陽性が6か月以上持続)患者(n=20)を対象に、核酸アナログ治療前(0週)と治療後48週の血清を用い、糖鎖修飾S-HBsを測定し、既存のHBsAg(S-HBs)と比較した。結果を図3に示す。治療前ベースラインの糖鎖修飾S-HBsとS-HBsの比(Glyco-S/S)と治療前後のHBsAgの変化値(LogU/mL)との相関をピアソン解析で調べたところ、治療前のGlyco-S/S比が低いほどHBsAgの低下度も低い、という有意な相関を認めた($p=0.0158$, $r=0.5317$)。すなわち、S-HBsタンパク質の糖鎖修飾の割合が小さいほど、治療反応が良好である、と考察できる。

[0049] 上記結果より、本発明によれば、血中の糖鎖修飾S-HBsを定量的に検出できることがわかる。さらには、糖鎖修飾S-HBs/S-HBsの比率を調べることで、HBVの予防又は治療又は診断のための指標を得ることができる。

産業上の利用可能性

[0050] 本発明の糖鎖修飾S-HBs測定法によれば、免疫学的手法で血中糖鎖修飾S-HB

sを定量的に測定できることが判明した。これらの結果により、糖鎖修飾S-HBs測定法はHBV感染症の治療に貢献する診断に有用であることが認められる。

請求の範囲

- [請求項1] B型肝炎ウイルス（HBV）を検出する方法であって、試料を、表面抗原タンパク質に結合する抗体及びレクチンと接触させる工程を含む、方法。
- [請求項2] B型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質が、Sタンパク質である、請求項1に記載の検出方法。
- [請求項3] レクチンが、コムギ胚芽凝集素である、請求項1又は2に記載の検出方法。
- [請求項4] E L I S A法による測定工程を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の検出方法。
- [請求項5] B型肝炎ウイルスの検査、予防又は治療を計画するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の検出方法。
- [請求項6] B型肝炎ウイルスの検査、予防又は治療のための医薬をスクリーニングするための、請求項1～5のいずれか一項に記載の検出方法。
- [請求項7] さらに、糖鎖修飾された表面抗原タンパク質／表面抗原タンパク質を算出する工程を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の検出方法。
- [請求項8] 試料が、核酸アナログ製剤治療を受けている又は受けていた患者に由来する、請求項1～7のいずれか一項に記載の検出方法。
- [請求項9] 試料が、血中HBV-DNAの抑制が確認された患者に由来する、請求項1～8のいずれか一項に記載の検出方法。
- [請求項10] B型肝炎ウイルスの糖鎖修飾表面抗原タンパク質に結合する抗体およびレクチンを含む、B型肝炎ウイルスの糖鎖修飾表面抗原タンパク質を検出するためのキット。
- [請求項11] 請求項1～9のいずれか一項に記載の方法を含む、B型肝炎の治療又は予防方法。