

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

安全な血液を確保するためのウイルス
標準品の確立とその応用に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 16 (2004) 年 3 月

目次

I 総括研究報告書

主任研究者 岡田 義昭 P1-P6

II 分担研究報告書

1. 核酸増幅法のためのウイルス国内参照品の
確立とパネル血漿の整備に関する研究 P7-P15

岡田 義昭

2. B型肝炎の血清学的検査方法標準化に用いる
感度パネル確立の試み P16-P21

水落 利明

3. HEV検出系の確立と疫学的解析

池田 久實 P22-P24

III 研究成果の刊行に関する一覧表 P25

IV 研究成果の刊行物・別冊 P26-P31

厚生科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

総括研究報告書

安全な血液を確保するためのウイルス標準品の確立とその応用に関する研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 今年度の研究で下記の事項を明らかにした。

1.HBV の genotype A-G までの全長の遺伝子をクローニングし、塩基配列の解析と S 抗原の発現を確認した。

2.HCV の genotype 1a、1b、2b、3b、4a と WHO の国際標準品の 5 末からコアまでの遺伝子のクローンを得た。

3.新規の HBs 抗原国際標準品を対照にして HBs 抗原国内標準感度パネルの作製とその評価を実施した。

4.米国 FDA で用いている HBsAg Lot-Release Panel ("ng"表記)と HBs 抗原国内標準感度パネル検体 ("IU"表記) を用いて HBs 抗原量の表示"ng"と"IU"の比較・検討をおこなった。

5.HEV 検出のための Real-time RT-PCR用のプライマー・プローブのデザインをおこなった。

6. HEV の ORF1-2/3 領域をクローニングし、これを鋳型に RNA を合成し、5'で設計した検出系を用いて定量用スタンダードカーブを作成した。

7. ALT 高値献血者から HEV-RNA の検出・定量を実施し、ALT 値が 500 IU/L 以上を示した献血者血漿検体 64 例（男 46 名、女 18 名）検索したところ、9 例（14.1%）に HEV-RNA が確認され、HEV-RNA 量は $3.8 \times 10^3 \sim 8.3 \times 10^6$ copies/ml であった。

分担研究者 水落利明 国立感染症研究所
血液・安全性研究部
室長

池田久實 北海道赤十字
血液センター-所長

は良く知られている。国際間の人的交流によって多くの日本人が海外へ渡航し、また、海外の様々な地域から多くの人々が来日することなどから、従来日本に存在しなかった genotype のウイルスが国内で持ちこまれる危険性がある。これらの genotype が異なるウイルスに対しても国内に分布している genotype と同等の感度を得られるか、評価することは重要なことである。しかし、日本に存在しない genotype の血

A. 研究目的

現在、ウイルスに対して核酸増幅検査（以下 NAT）が導入され、血液の安全性確保に大いに貢献している。HBV や HCV はいくつかの genotype が存在すること

漿を十分な量確保することは困難である。そこで今年度は集めたパネル血漿を基にウイルス遺伝子のクローニングを行い、プラスミドパネルを整備した。

また、HBs 抗原も HBV 遺伝子と同様にいくつかの subtype が存在し、各国に適した標準品パネルを作成することが必要である。今年度は新規に作られた国際標準品を基準にして HBs 抗原国内標準感度パネルの確立を目指した。さらに、現在、最小検出感度の表記が ng/ml と IU/ml の 2 つが混在しているため、ng と IU の比較を行った。

また、これまで日本には存在していないと考えられていた E 型肝炎が輸血によって感染した症例が報告され、輸血の安全性を確保するために疫学的調査が望まれている。リスク評価に必要な迅速な E 型肝炎ウイルス（以下 HEV）検出系の確立を目指した。

B. 研究方法と結果

1-1. HBV genotype のパネル整備

HBV 陽性血漿は海外との共同研究や市販されているパネル血漿、研究室で陽性コントロールとして使用されていた血漿を用いた。ウイルス HBs 抗原血漿 100 μ l から DNA を抽出し、タカラ TaKaRa LA Taq™ を用いクローニング PCR を実施した。PCR 産物は pCR-XL-TOPO(invitrogen) に組み込みクローニングを行い、フレームがっているのか確認するために S 抗原の発現を確認した。

さらに、S 抗原陽性クローンは HBV の全長の塩基配列を解析し genotype を確認した。また、genotype C を基準にして一定量に調整した各 genotype のプラスミドを Taq-Man PCR 法にて定量し、各 genotype 間での感度を解析した。これらの方法を用いて genotype A から G までの HBs 抗原を発現するプラスミドを得ることができた。Genotype C を基準にして各 genotype 間での感度を定量 PCR にて解析した結果、用いたプライマーとプローブのセットでは genotype E と F の感度が悪いことが示された。

1-2. HCV のパネルの整備

昨年までに genotype の解析が終了した HCV 陽性血漿と英国の NIBSC (National Institute of Biological Standard and Control) から供与された HCV パネル血漿から RNA を抽出し、nested-PCR 法にて 5 末端の非翻訳領域から core の C 末端までを増幅した。PCR 産物は pCR-XL-TOPO(invitrogen) に組み込みクローニングを行った。genotype が確認されたプラスミドの濃度を測定し、Taq-Man PCR 法にて定量し、各 genotype 間での感度を解析した。塩基配列まで確認できたクローンは 1a、1b、2b、3b、4a と WHO の国際標準品由来のものであった。国際標準品由来のクローンを基本にして各クローンを Taq-Man PCR 法にて定量を行ったが、得られたクローン間では著明な差が認められ

なかった。

1-3.パルボウイルス B19 の標準品作製ための基礎的検討と製剤中に存在する抗体の影響についての解析

B19 陽性血漿（日本赤十字社から譲与）から DNA を抽出し、アニ-リングさせ二重鎖 DNA を作り、制限酵素で切断し、プラスミドにクローニングした。非構造タンパク (NA1)を含む部分的な B19 のクローンを得た。

分画製剤における B19 のリスクを評価するためにグロブリン製剤に存在する B19 抗体による中和活性を解析した。B19 陽性血漿を我々が確立した培養系を用いて感染性を評価したところ 10^8 感染価/ml であった。添加する B19 のウイルス量を 1000 感染価に調整し、中和活性を測定する系を確立した。特殊免疫グロブリンのように供血者が少ない製剤に関してはロットごとに中和活性が異なっていた。

2-1.HBs 抗原国内標準感度パネルの作製とその評価

新規の HBs 抗原国際標準品 (NIBSC code 00/588, subtype:adw2, genotype:A, 33IU/ampoule) を用いて HBs 抗原国内標準品 Lot#1 (1996 年に、HBs 抗原国際標準品を対照にして力価が 102 IU/ml と定められた) を、HBV, HCV, HIV それぞれのウイルス抗原/抗体/遺伝子が陰性である血漿により希釈して HBs 抗原国内標準感度パネルの作製を試みた。抗原濃度は 0.125IU/ml から 16.0 IU/ml の範囲であ

る。このパネル検体と上述の WHO reference panel とを Lumipulse HBsAg (富士レビオ)を用いて比較検討した。抗原量の測定結果は両者とも測定範囲においては良好な直線性を持ち、両者はほとんど一致していた。このパネルを用いて HBs 抗原検出キットの最小検出感度を測定し、"IU/ml"で表示することができると考えられる。

2-2.HBs 抗原量の表示："ng"と"IU"の比較

WHO は一貫して HBs 抗原量については"IU"表記を推奨してきたが、現実には "ng"が official に通用している。そこで米国 FDA で用いている HBsAg Lot-Release Panel ("ng"表記) と、上述の HBs 抗原国内標準感度パネル検体 ("IU"表記) とを、現在国内で販売されている定量性に優れた以下の 3 種類のキットを使用して、"IU"と"ng"との比較換算を行った。

1. A 社キット (2 step CLIA 法)
2. B 社キット (2 step CLEIA 法)
3. C 社キット (1 step CLIA 法)

結果どのキットを用いてもおよそ 1IU = 6ng という関係が成り立っていた。つまりこの結果は、やはり"IU"と"ng"とはかなり乖離したものであることを確認したものである。

3-1. Real-time RT-PCR 用のプライマー・プローブのデザイン

これまで全塩基配列が知られている HEV 株 39 種類 (Genotype I 18 株、Genotype II 1 株、Genotype III 11 株、

Genotype IV 9 株) に共通なゲノム領域を検索し、これをターゲットとするプライマー・プローブセットを ABI Primer Express によりデザインした。

一般的な Primer Express の検索条件では既知の全 HEV 株を網羅するプライマー・プローブセットの設定は困難であった。このため、検索条件を緩めるとともに複数のプライマー・プローブセットを用いることで HEV の検出系を作った。

3-2. HEV-RNA の標準品の合成・定量

HEV (Genotype IV) 陽性献血者血漿から抽出した RNA を鋳型として HEV ゲノム ORF1~2/3 領域 (約 600 nt) を RT-PCR 法で増幅させ TA cloning によりプラスミドに導入した。これを鋳型として in vitro 転写 (RNA 合成) を行った。合成した RNA を用いて希釈系列 ($10^1 \sim 10^9$ copies/20 μ L) を作製し、作成したプライマー・プローブセットによって Real-time RT-PCR 反応を行ったところ $10^1 \sim 10^9$ copies の範囲で良好なスタンダードカーブをとることが明らかになった。

3-3. ALT 高値献血者からの HEV-RNA 検出・定量

2000 年 4 月~2003 年 9 月(3.5 年)の期間の北海道赤十字血液センター管内で献血した 1,213,998 名中、ALT 値が 500 IU/L 以上を示した献血者血漿検体 64 例 (男 46 名、女 18 名) を対象に HEV-RNA の検出・定量を行った。9 例 (14.1%) に HEV-RNA が確認され、

陽性サンプル中の HEV-RNA 量は $3.8 \times 10^3 \sim 8.3 \times 10^6$ copies/ml と測定された。

C. 考察

HBV や HCV には様々な genotype が存在し、国際間のヒトの交流によって日本に入ってくる恐れがある。これらの genotype に対して核酸増幅法の感度や特異性を評価、確認することは血液製剤の安全性向上に重要であり、パネル血漿の整備は必要となる。しかし、日本に存在しないような稀な genotype の血漿を十分な量だけ確保することは倫理的にも難しい。そのため、ウイルス遺伝子の全長又は 1 部分をプラスミドにクローニングすることによって、全く同一のウイルス遺伝子必要量を必要なだけ確保できる (もちろん同一ドナーの血液中にはいろいろな遺伝子変異を持ったウイルスが存在しているので標準品等で血液に置き換えることはできないが)。また、感度を比較する際に、重さと分子量が明らかな組み換えプラスミドを用いれば正確な感度を genotype 間で比較できる。今回、HCV に関しては プラスミドを鋳型にして合成した RNA は用いてないが genotype 1-6 まで整備した後には実施したいと考えている。

HBV の S 抗原に関しては、抗原国内標準感度パネルの作製によって市販されている S 抗原測定試薬の最小検出感度を IU/ml で表示できるようになると期待されている。これまで、国内においては ng

と IU で表示されていたが IU 表示に統一されるものと考えられる。これらは B 型肝炎の血清学的検査法の標準化に貢献するものと思われる。また、genotype のパネルは培養上清中に S 抗原が分泌されることから genotype 間での S 抗原の解析に有益だと考えられた。

HEV 検出のための Real-time RT-PCR の開発によって、ほぼ全ての HEV の genotype を検出可能になった。また、測定時間も nested-PCR 法に比較して短縮され、大量の検体を処理することも可能である。ALT 高値献血者を対象に HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA の陽性率も調べたが、それぞれ 1 例 (1.6%)、11 例 (17.2%)、7 例 (10.9%) であり、HEV は HBV に次いで高い陽性率を示した。これより HEV がこれまで原因不明とされていた ALT 高値献血者の重要な原因ウイルスであることが示唆された。

E. 結論

1. HBV の genotype A-G までの全長の遺伝子をクローニングし、S 抗原の発現を確認した。
2. HCV の genotype 1a、1b、2b、3b、4a と WHO の国際標準品の 5 末からコアまでの遺伝子のクローンを得た。
3. 新規の HBs 抗原国際標準品を対照にして HBs 抗原国内標準感度パネルの作製とその評価を実施した。
4. 米国 FDA で用いている HBsAg Lot-

Release Panel ("ng"表記)と、HBs 抗原国内標準感度パネル検体 ("IU"表記)を用いて HBs 抗原量の表示"ng"と"IU"の比較をおこなった。

5. HEV 検出のための Real-time RT-PCR 用のプライマー・プローブのデザインをおこなった。

6. HEV-RNA の標準品の合成と 5 で設計した検出系を用いて定量が得られることを確認した。

7. ALT 高値献血者から HEV-RNA の検出・定量を実施し、ALT 値が 500 IU/L 以上を示した献血者血漿検体 64 例 (男 46 名、女 18 名) 検索したところ、9 例 (14.1%) に HEV-RNA が確認され、HEV-RNA 量は $3.8 \times 10^3 \sim 8.3 \times 10^6$ copies/ml であった。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、他。血漿分画製剤の安全性；臨床マニュアルアルブミン。191-196、2003 年。東京

2. 学会発表

岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子；ヒト免疫グロブリン製剤におけるバルボウイルス B19 の解析、第 51 回日本ウイルス学会、2003 年

H. 知的所有権の出願・登録状況取得

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

核酸増幅法のためのウイルス国内参照品の確立とパネル血漿の整備に関する研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

協力研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

協力研究者 梅森清子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員

研究要旨 国際交流が頻繁になった今日では、日本には本来存在しない genotype の HBV や HCV が海外から持ち込まれる可能性がある。これらの genotype に対して核酸増幅法（以下 NAT と略）の感度を評価するために、HBV と HCV の各種 genotype を組み込んだプラスミドを作成した。定量的な NAT を実施したところ、HCV の genotype 間では感度に差が認められなかったが、HBV では genotype E と F に感度の低下が認められた。希少な genotype であっても評価に十分な量のプラスミドを安定的に、且つ必要な時に必要なだけ作製することが可能になった。これらは血液製剤の安全性確保に貢献すると考えられる。

A.研究目的

HBV や HCV は全世界に広く分布し、遺伝子的に HBV は genotype A から G までの 7 グループに分類（最近では genotype H も報告されているが）され、HCV は 1a から 11 までの genotype が存在すると言われている。国や地域によって存在する遺伝子型が異なることは良く知られているが、国際間の交流が頻繁になっている現在において、海外（主に米国）から原料血漿を輸入する場合や人的交流によって、日本には本来存在しない genotype のウイルスが侵入してくる可能性が高くなっている。原料血漿のウイルス試験として広く用いられている NAT がこれらの遺伝子型の異なる HBV や HCV を同等に検出

できるか評価することは重要である。しかし、倫理的に日本に存在しない遺伝子型のウイルス陽性血漿を評価に必要な量を確保することは困難なこともある。また、作成した標準品や参照品を更新する場合など、同一性を保持しているか確認することは容易ではない。さらに、genotype 間での感度評価では、血漿中でのウイルスの絶対量が測定できないために正確な感度の比較は困難である。プラスミドに組み込むことで質量からコピー数を計算できることから各 genotype 間での比較が可能になる。HBV や HCV の各 genotype をプラスミドに組み込むことで血漿由来の標準品や参照品を補助する目的でパネルを作成した。

また、世界的に原料血漿に混入する B19

の規制が検討されているので、国内標準品作製に向けた準備として B19-DNA 定量に必要なクローンの作製と血漿中に存在する抗体による中和活性の測定法を検討した。

B. 研究方法

1. HBV genotype のパネル整備

HBV 陽性血漿は海外との共同研究や市販されているパネル血漿、研究室で陽性コントロールとして使用されていた血漿を用いた。ウイルス HBs 抗原血漿 100 μ l から DNA を抽出し、100 μ l の蒸留水に溶解後、5 から 10 μ l を PCR の反応に添加した。PCR はタカラ TaKaRa LA Taq™ を用い添付文書の条件で 32 サイクルのロング PCR を実施した。HBV の全長を増幅するプライマーは Gunther S. (J.Virol.vol.69.5437-5444.1995) らの報告したものを改変し P1 (1821-1841) : GGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTAA TCA 、 P2 (1825-1806) : GGCTCTTCAAAAAGTTGGTGCTGG を用いた (図 1)。PCR 産物は全長と思われる約 3.2K のバンドを切り出し精製後、pCR-XL-TOPO(invitogen) に組み込みクローニングを行った (図 2)。フレームが正確にあっているのか確認するために S 抗原の発現を確認した。方法は HBV が組み込まれたプラスミドをリポフェクションを用いて HuH7 細胞にトランスフェクションし、2-3 日後の培養上清を集め、エスプライン HBsAg (富士レビオ) を用いて HBs 抗原の有無を解析した。さらに、

クローニングした HBV の全長の塩基配列を解析し genotype を確認した。genotype が確認されたプラスミドの濃度を測定し、105 コピー/assay になるように調整した各 genotype を genotype C を基準にして各 genotype のコピー数を Taq-Man PCR 法にて定量を行った。

2.HCV のパネルの整備

昨年までに genotype の解析が終了した HCV 陽性血漿と英国の NIBSC (National Institute of Biological Standard and Control) から供与された HCV パネル血漿から RNA を抽出し、genotype 特異的なプライマーで cDNA を合成後、nested-PCR 法にて 5 末端の非翻訳領域から core の C 末端までを増幅した。約 900 base 前後のバンドをゲルから切り出し、精製後 pCR-XL-TOPO(invitogen) に組み込み、クローニングを行った。陽性クローンは塩基配列を解析し、genotype を決定した。genotype が確認されたプラスミドの濃度を測定し、105 コピー/assay になるように調整した後、国際標準品由来のクローンを基本にして各クローンを Taq-Man PCR 法にて定量を行った。

3. パルボウイルス B19 の標準品作製ための基礎的検討と製剤中に存在する抗体の影響についての解析

B19 陽性血漿 (日本赤十字社から譲与) から DNA を抽出し、アニーリングさせ二重鎖 DNA を作り、制限酵素で切断し、

プラスミドにクローニングした。分画製剤における B19 のリスクを評価するためにグロブリン製剤に存在する B19 抗体による中和活性を解析した。また、抗体存在下でのウイルス除去膜の効果をグロブリン製剤に B19 陽性血漿を添加し、除去膜処理の前後でのウイルス量から評価した。

C. 研究結果

Gunther らの報告したプライマーを用いることで容易に全長の HBV がクローニング可能になった (図 1)。また、得られたプラスミドを HuH7 細胞にトランスフェクションしたところ、培養上清中に HBs 抗原を検出することができた。これらの方法を用いて genotype A から G までの HBs 抗原を発現するプラスミドを得ることができた (表 1)。S 抗原をコードする領域において、既存の報告されている各 genotype と比較すると A は 99.3%、B は 98.8%、C は 97.9%、D は 99.0%、E は 99.0%、F は 97.9%、G は 98.7% のホモロジ-があった。さらに、各遺伝子型に特徴的な塩基配列を検討したところ一致し、これらから genotype A から G までの HBV が得られたと考えられた。全領域での genotype の解析は現在実施している。Genotype C を基準にして各 genotype 間での感度を定量 PCR にて解析した結果、用いたプライマーとプローブのセットでは Genotype E と F の感度が悪いことが示された (図 3)。

HCV に関しては、塩基配列まで確認できたクローンは 1a、1b、2b、3b、4a と WHO の国際標準品のクローンが得られた。Genotype が確認されたプラスミドを 105 コピー/assay になるように調整し、国際標準品由来のクローンを基本にして各クローンを Taq-Man PCR 法にて定量を行った。得られたクローン間では著明な差が認められなかったことから感度に差がないものと考えられた。

パルポウイルス B19 の非構造タンパク (NA1) を含む遺伝子を部分的にクローニングした。また、B19 陽性血漿を我々が確立した培養系を用いて感染性を評価したところ 10^8 感染価/ml であった。添加する B19 のウイルス量を 1000 感染価に調整し、中和活性を測定する系を確立した。特殊免疫グロブリンのように供血者が少ない製剤に関してはロットごとに中和活性が異なっていた (図 4)。

D. 考察

国際間の交流が頻繁になっている現在において、これまで日本に存在しなかった genotype の HBV や HCV が海外から持ち込まれる可能性が高まっている。そのため、NAT によってこれらの genotype の異なる HBV や HCV の感度を評価することは重要である。本来はウイルス陽性血漿を評価に用いるべきであるが、genotype によっては評価に必要な血漿を充分量確保することは倫理的に不可能なこともある。さらに、血漿由来

の標準品や参照品は有限であるから更新が必要なこともある。そのような場合に、全く同一な血漿を得ることは困難なことである。我々が作成した HBV と HCV のプラスミドパネルは genotype 毎に全く同一な HBV と HCV を半永久的に作ることができ、また、プラスミドであるから安定性も高い。さらに、プラスミドの重量を測定することで分子数を求められることから genotype 間の NAT の感度を比較することができる。我々が用いている PCR の定量系を検討したところ、HCV では著明な差はなかったが HBV では E と F に対する感度が悪いことが明らかになった。今後、塩基配列の解析による改良による感度向上や複数のプライマーとプローブのセットの追加によって各 genotype 間の感度の向上を図る必要がある。血漿に存在する HBV や HCV はウイルス学的にヘテロであると考えられるので、均一な我々のプラスミドパネルは血漿由来の標準品等に置き換えることはできないが、均一性と必要な量を作製できる利点を生かし、血漿由来の標準品等を補うことができると考えている。

B19 では、骨髓細胞を用いることなしに培養細胞によってグロブリン製剤中の中和活性が測定可能となったことは大きな意義を持つ。血漿中には多量の抗体が存在することから、原料血漿プールでの中和活性が評価可能になり、どの程度まで B19 の混入を防止すれば良いのか理論的

な解析ができるからである。また、B19 と抗体が結合することからウイルス除去膜による除去が容易になると予想され、評価のための B19 の定量系を検討している。

E. 結論

HBV の genotype A から G までの遺伝子パネルを作成し、genotype 間の NAT の感度を比較した。また、HCV では国際標準品の他、1a、1b、2b、3b、4a の 5 末から core までのクローンを得、genotype 間の NAT の感度を比較した。さらに、B19 では株化細胞を用いて中和活性を測定できる系を確立した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、他。血漿分画製剤の安全性；臨床マニュアルアルブミン。191-196、2003 年。東京

2. 学会発表

岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子；ヒト免疫グロブリン製剤におけるパルボウイルス B19 の解析、第 51 回日本ウイルス学会、2003 年

H. 知的所有権の取得状況

なし

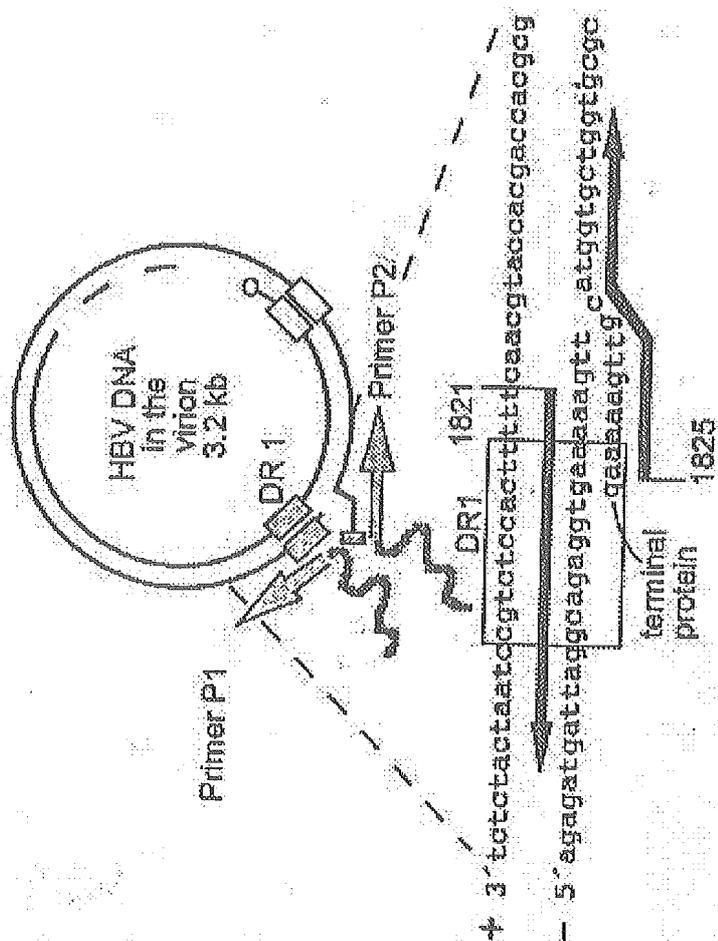


Fig.1 Design of Primers for HBV Full Genome Amplification

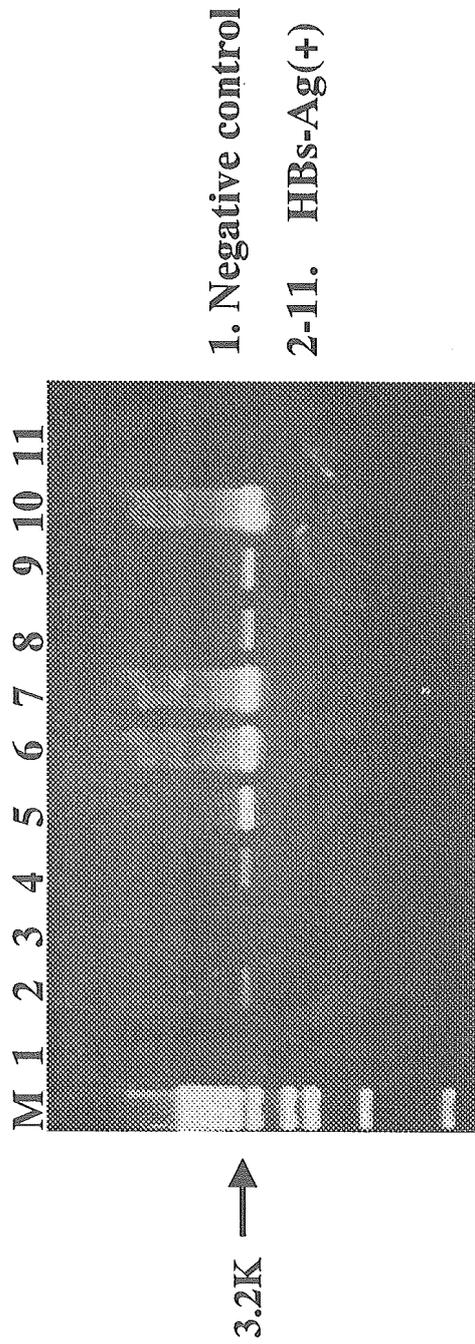


Fig.2 Amplification of HBV full genome by PCR

genotype	cloning	HBs-Ag	sequence
A	done	+	done
B	done	+	done
C	done	+	done
D	done	+	done
E	done	+	done
F	done	+	done
G	done	+	done

Table1. HBVパネルの作製

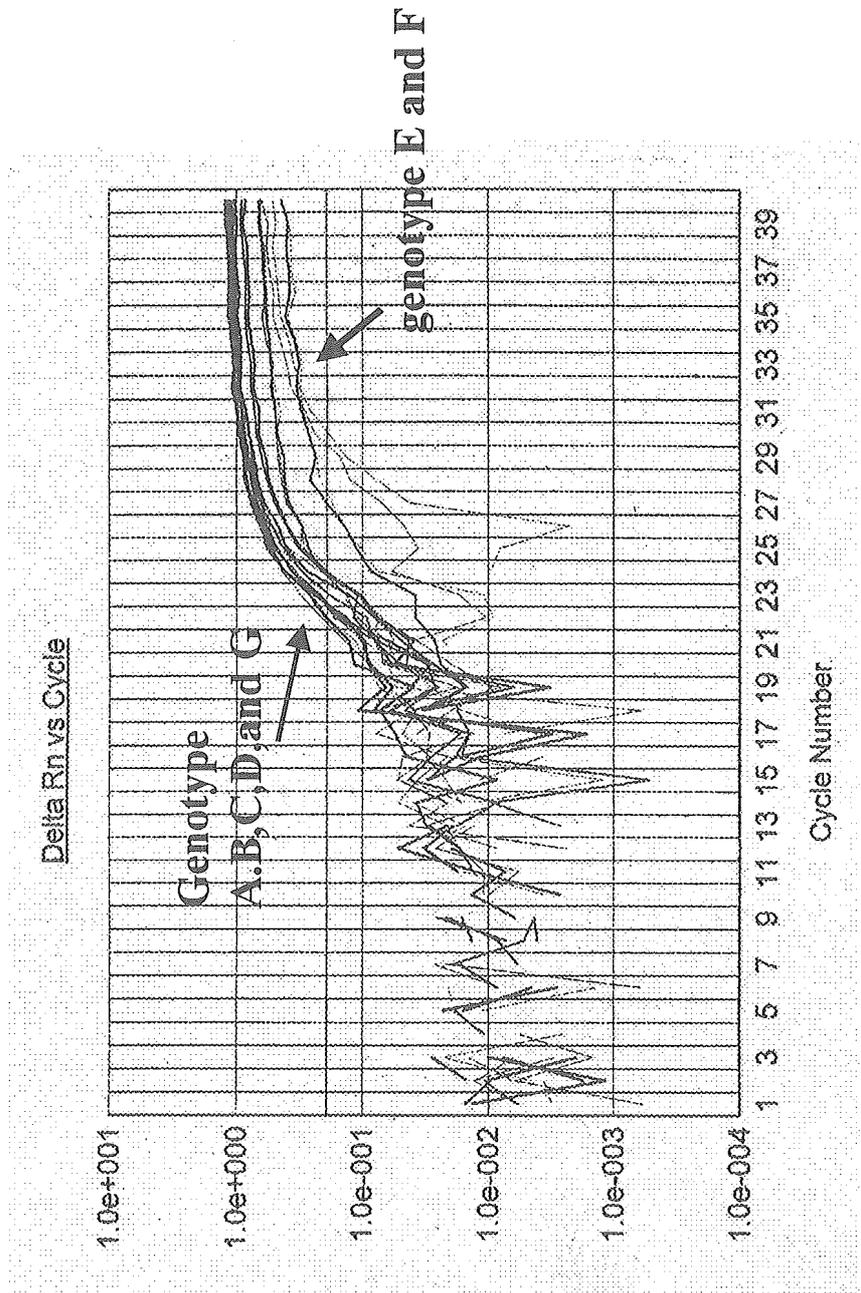


Fig.3 Amplification efficiency among HBV genotypes

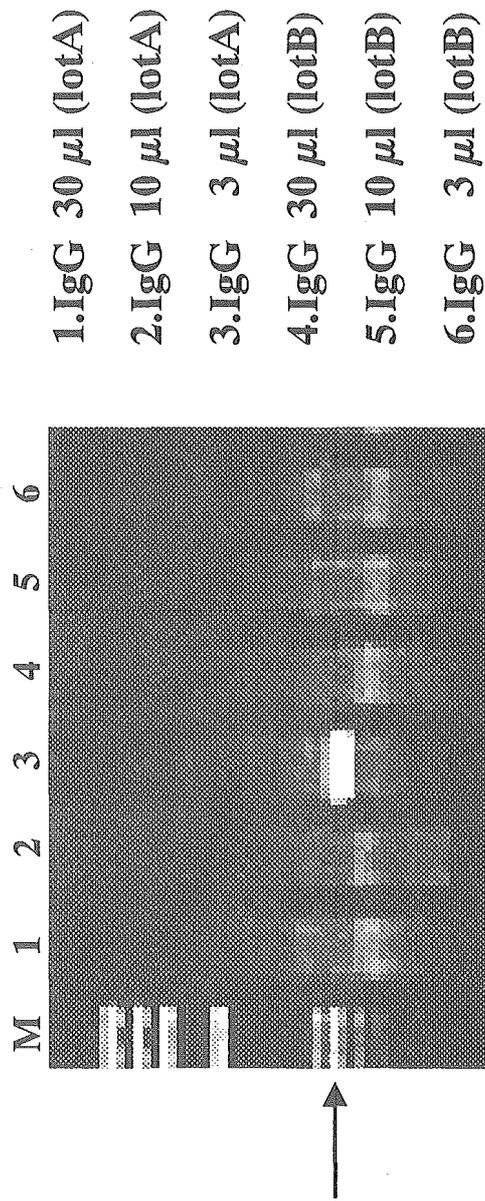


Fig.4 B19 neutralization by human IgG

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合事業）分担研究報告書
「B型肝炎の血清学的検査方法標準化に用いる感度パネル確立の試み」

分担研究者： 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室 水落利明

A. 研究目的

我が国における B 型肝炎ウイルス感染者の数は 100 万人とも 200 万人ともいわれ、全人口の数%にも及ぶ。近年 B 型肝炎ウイルスの検査において、mutant の出現、測定感度の不確実性等により、臨床的な問題が引き起こされていることが指摘され、さらに治療効果判定においても正確な検査法標準化が強く求められている。B 型肝炎ウイルス感染を迅速かつ正確に検査することは、輸血による感染防御において、またその診断／治療においても必須であることは言うまでもない。このような感染症の第一次スクリーニング検査として、血清学的検査が現在最も広く用いられている。これら検査法は原理／手技などの点で非常に多様であり、そのため現在国内で市販されているキットの種類は数十にもものぼっている。しかしながら、その感度の正確な把握が世界的に求められ、そのための準備が行われているところであるにもかかわらず、日本においては未だ取り組まれていないのが現状である。感度パネル検体の作製については、国によって HBs 抗原の subtype が異なることから、各国に適合した標準品パネルを作製することが急務である。本研究では、これらの検査方法を標準化することで、より

正確な検査結果を得ることができるという観点から、HBs 抗原国内標準感度パネルを確立することを目指している。さらに、現在 HBs 抗原検出キットにおける最小検出感度の表記において ng/ml と IU/ml の混在があることから、この問題を解決するうえでも、IU/ml 表記での国内標準感度パネルを確立する意義は大きい。

B. 研究方法

①HBs 抗原国内標準感度パネルの作製とその評価

WHO では新規に"WHO reference panel for HBsAg"の作成を試みた。これはおよそ 0.1IU/ml から 25IU/ml までの濃度範囲（現在世界各国で使用されているほとんどのキットの最小検出感度をカバーできる範囲）にまたがるパネルで、現在の国際標準品(NIBSC code80/549,subtype:ad,100IU/ ampoule)を基準にして値付けされたものである。このパネル検体の抗原量を、世界各国で汎用している HBs 抗原検出キットで測定するプロジェクト(WHO Working Group on Hepatitis and HIV Diagnostic Kits : Protocol for a collaborative study to characterize the candidate WHO reference panel for HBsAg)が進められ、本研究者も参画してデ

一夕を提供した。それらの結果をふまえて、新規の HBs 抗原国際標準品 (NIBSC code 00/588, subtype:adw2, genotype:A, 33IU/ampoule) が 2003 年 10 月に WHO で開かれた会議において提唱され、11 月の Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) で承認される運びとなった。

そこで、本研究では国立感染症研究所が保有する HBs 抗原国内標準品 Lot#1 (1996 年に、HBs 抗原国際標準品を対照にして力価が 102 IU/ml と定められた) を、HBV, HCV, HIV それぞれのウイルス抗原/抗体/遺伝子が陰性である BBI 社製 multi-marker negative control matrix (Accurun-1) により希釈して HBs 抗原国内標準感度パネルの作製を試みた。抗原濃度は 0.125IU/ml から 16.0 IU/ml の範囲である。このパネル検体と上述の WHO reference panel とを Lumipulse HBsAg (富士レビオ) を用いて比較検討した。

②HBs 抗原量の表示: "ng" と "IU" の比較

WHO は 1985 年に、英国内での標準品として定められていた HBs 抗原凍結乾燥品 (100 British units/ampoule) (Med. Lab. Sci. 38:335, 1981, Lancet August 14:391-392, 1982) を国際標準品として承認した (WHO Tech. Rep. Ser. 745:18, 1987)。それ以来一貫して HBs 抗原量については "IU" 表記を推奨してきた。しかし現実には米国はもとより、WHO のお膝元である EU においても HBs 抗原量の表記においては

"ng" が official に通用している。その主因として、"IU" と "ng" とがほとんど等価なものとして「誤解」されているために、敢えて "IU" へと移行させる必要を感じないことが挙げられる。実は、1985 年当時においては "1 IU" はほぼ "1 ng" (Abbott) に対応していたが、現時点においては "IU" と "ng" はもはや等価ではなくなっていることが指摘され始めている。例えば、国際的に評価の高い BBI (Boston Biomedica Inc.) パネルにおいて、HBsAg Sensitivity Panel (PHA 807) では、およそ 1 IU = 3 - 4 ng の換算となっている。そこで、本研究では米国 FDA で用いている HBsAg Lot-Release Panel ("ng" 表記) と、上述の HBs 抗原国内標準感度パネル検体 ("IU" 表記) とを、現在国内で販売されている定量性に優れた以下の 3 種類のキットを使用して、"IU" と "ng" との比較換算を行った。

1. A 社キット (2 step CLIA 法)
2. B 社キット (2 step CLEIA 法)
3. C 社キット (1 step CLIA 法)

C. 結果

① Fig.1 には HBs 抗原国内標準品をもとにして作製した国内標準感度パネル (0.125IU/ml から 16.0 IU/ml) と、WHO で新規に作製された参照パネル (0.1 IU/ml から 25 IU/ml) の抗原量を測定した結果を示した。両者とも測定範囲においては良好な直線性を持ち、また両者はほとんど一致していた。つまり、今回作製したパネルは、WHO パネルと非常に近似したものであると考えられた。したがって、このパネルを用いて HBs 抗原検出キッ

トの最小検出感度を測定し、"IU/ml"で表示することができると考えられる。

②表1では、3種類の測定キットを用いて、FDAのパネル("ng/ml"表示)と国内標準感度パネル("IU/ml"表示)とを同時に測定した結果を示した。なお、測定値はCOI(Cut off index)で表示している。その結果をまとめたものが表2である。この表から明らかなように、どのキットを用いてもおよそ1IU = 6ngという関係が成り立っていた。つまりこの結果は、やはり"IU"と"ng"とはかなり乖離したものであることを確認したものである。

D. 考察

以前より、HBs抗原量の"ng"表記は、各施設での抗原精製方法が異なることから、信頼性に欠けることが憂慮されていた(Vox. Sang. 65:249-250, 1993)。さらに"IU"と"ng"との相関が1:1ではない現状においては、抗原量を「IU表記」へと統一することが望ましいと考える。今後はここで紹介したWHO参照パネルを基準にして、少なくともEU内では各キットの検出感度表記が"IU"に統一されていくことが予想される。一方米国においてもEU各国にキットを輸出する際にはDirective 98/79/ECに従いCE(Conformite Europeenne)マークの表示が義務づけられる。EUでのCTS(Common Technical Specification)に"IU/ml"表記が用いられれば、当然米国のキットでさえも"IU"表記が用いられるようになるだろう。

以上の観点から、国際的整合性を考慮した上で、今後我が国で販売されるHBs抗原検

出キットの最小検出感度表記を"IU/ml"に統一していくことは当然の流れであり、それがB型肝炎の血清学的検査方法を標準化する上でも非常に重要なプロセスであることには疑いがない。その意味で、HBs抗原国内標準感度パネルを作製する意義は大である。本研究で試験的に作製したパネルは、上述したWHOで新規に作製したパネルと非常に相関性が高く、信頼できるものとする。現在、国内で販売されているHBs抗原検出キットにおいては、その「最小検出感度」の表示単位が統一されておらず、「ng」と「IU」が混在しているのが現状である(前述)。今後は「IU/ml」で表示されたHBs抗原国内標準感度パネルを用いて単位を統一することにより、各キットの検出感度を比較することが可能になるだろう。

E. 結論

HBs抗原国内標準感度パネルを試作し、それがWHO参照パネルとほぼ同一の性能を持つことを確認した。また"IU"と"ng"の相違について確認することができ、HBs抗原濃度表示を"IU/ml"に統一することの正当性を示すことができた。

F. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし