

200501144 A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等

レギュラトリーサイエンス総合研究事業

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水落 利明

平成18年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

主任研究者： 水落利明（感染研 血液・安全性研究部） ----- 1

## II. 分担研究者研究報告

1. HBV, HCV, HIV 感染の血清学的検査法の検討 ----- 5

水落利明（感染研 血液・安全性研究部）

2. 血液製剤の核酸増幅試験（NAT）の精度管理に関する研究 ----- 11

水沢左衛子（感染研 血液・安全性研究部）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の論文別刷 ----- 16

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
総括研究報告書

輸血用血液の安全性向上に関する研究

主任研究者： 水落利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室長

**研究要旨**：HBV 感染の血清学的検査法の最適化を検討する目的で、様々な遺伝子型 (genotype) の recombinant HBs 抗原を作成し、それらを用いて現在国内で販売されている10種類の高感度検査法の性能評価を行なった。その結果、HBV の遺伝子多型によって生じることが予想される HBs 抗原の抗原性変化によって、キットの抗原検出感度/特異性に影響が見られないことが確認された。同様に、HCV 感染、HIV-1 感染の血清学的検査法の性能評価をする目的で、様々な遺伝子多型に対応した HCV コア抗原、および HIV-1 p24 抗原を in vitro での発現系で作成した。今後は HBV、HCV、HIV-1 それぞれの感染に対する血清学的検査法の性能評価に用いるために、これらの抗原を用いたパネルの整備を行なう。また、HBV 遺伝子検出法における精度管理の観点から、NAT (遺伝子増幅法) 検査のコントロールサーベイを実施することが薬事・食品衛生審議会血液特別部会安全性調査会の指示により決定したことを受けて、本年度は HBV-NAT 検査に供する標準試料の検討および調整を行ない、各参加施設 (血液製剤製造販売業者、衛生検査所) に配布した。

[分担研究者]

水沢左衛子

(感染症・血液・安全性研究部・主任研究官)

[協力研究者]

鈴木 哲朗

(感染症・ウイルス第2部・室長)

巽 正志

(感染症・エイズ研究センター・室長)

## A. 研究目的

1997年以降、日本では全ての献血血液検査に核酸増幅検査法（NAT）が導入され、輸血用血液製剤及び献血由来の血漿分画製剤の、血液を介して伝播するウイルス汚染に対する防御対策は飛躍的に向上した。しかしながら、ウイルス感染直後には、ウイルス量が検出限界以下のウィンドウ期が存在することから、現在でも血液製剤によるウイルス感染が皆無とは言えない状況にある。また輸血以降の病院内感染あるいは社会的、家庭内感染の可能性も存在することから、受血者のウイルス感染が明らかになった場合に、その輸血との因果関係を明確にするためには様々な側面からの解析が必要となる。現在、血液媒介ウイルス（HBV, HCV, HIV）感染を含めた輸血関連副作用の遡及調査は、供給側である日本赤十字社血液センターと、使用者である医療機関に委ねられているが、ここに第3者機関である国立感染症研究所が参画することにより、独立性を保ちながらあくまでも科学的データに基づいた解析を行い、その情報を提供することができる。そこで、本研究では、その端緒となるべく、様々な標準品あるいはパネル検体を用いて、様々なキットの性能を比較検討し、現時点における最も感度・特異性に優れた検査法（抗原／抗体／遺伝子検出法）を探索する。特にウイルスの genotype や subtype の違いを考慮に

入れた検出性能の検討を行う必要があり、そのために本研究では、リコンビナント抗原を含め、性状の明らかなパネル検体の収集／作成およびそれらの解析を行う。これらの検討により、現時点においてウイルス汚染の有無に対する最も信頼できる判定を行うことが可能になり、臨床所見等との総合判断により、輸血副作用の原因解明に多大な貢献ができることが期待される。また、これらの検討から得られる知見は、今後の輸血前後での感染症マーカー検査方法の選択においても有用な情報となることが期待される。

## B. 研究方法および C. 研究結果

1) recombinant HBs 抗原の作製およびそれらの測定：HBV 感染者血漿は、日本赤十字社、台湾 FDA からの供与、および市販のものを用いた。それらの血漿からクローニングされた HBV 遺伝子配列を確認して genotype を決定し、発現ベクターに組み込み HuH-7 細胞に遺伝子導入した。細胞培養上清に HBs 抗原が存在することを、簡便測定法（イムノクロマト法）にて確認し、さらに ARCHITECT HBsAg QT (Abbott Japan 社) キットを用いて定量した。0.2 IU/ml, 1.0 IU/ml の 2 段階の濃度に希釈したものを測定に用いた。国内で承認を受けて販売されている 10 種類の HBs

抗原検出キットを用いてこれらの検体を測定した結果、全ての genotype (A-H) の HBs 抗原を、感度の差はあるものの検出することが確認された。

2) recombinant HCV コア抗原の作製： genotype 1a, 1b, 2a, 2b, および 3a の HCV 感染肝炎患者より HCV 遺伝子をクローニングし、各ウイルスのコア抗原をヒト肝由来細胞で発現させることができ、western blot により確認した。これらの抗原を用いて、国内で承認を受けて販売されている HCV コア抗原検出キットの性能評価を実施する準備が整った。

3) HIV-1 感染性分子クローンの樹立：さまざまな subtype/CRF (組換体) に対応する感染性分子クローンの効率的な樹立実験系が構築された。これらを用いてヒト細胞で産生させたウイルス粒子を用いて、国内で承認を受けて販売されている HIV-1 抗原/抗体同時検出キットの性能評価を実施する準備が整った。

4) HBV-NAT コントロールサーベイ：WHO 国際標準品に準拠して作製された HBV-DNA 国内標準品 (genotype C) を陰性血漿で希釈して 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 IU/ml の各検体 (分注量 0.7ml) を作製した。これらに陰性 (0 IU/ml) 検体を加えた 8 種類の検体によるパネルを作製した。なお、希釈に用い

た陰性血漿は、日本赤十字社より供与された新鮮凍結血漿を融解 (4 °C) して遠心操作 (8,000 rpm) を行なった上清をプールしたものである。これらのパネル検体は、血漿分画製剤の国内製造販売業者及び輸入販売業者の海外製造元、さらには HBV-NAT を実施している国内民間衛生検査所に配布し、測定結果を回収することとなっている。

#### D. 考察

国内で承認を受けて販売されている HBs 抗原検出キットが、現在までに世界中で報告されている全ての HBV genotype (A-H) 由来の HBs 抗原をもれなく検出できることが確認された。特にこれまで遺伝子系統樹からの推測で、genotype F と H の HBs 抗原については、従来キット (主に genotype A, B, C 由来の HBs 抗原検出を行なう目的で開発された) が感度良く検出できるかについて議論があった。しかし、本研究の結果から、少なくとも recombinant HBs 抗原に関しては、F, H を含めすべての genotype について検出できることが明らかになった。

HBV-NAT コントロールサーベイについては、現時点では検体配布が終了した段階で、各参加施設からの測定結果報告は次年度に持ち越されることとなる。測定結果については国立感染症研究所にお

いて解析し、その結果は薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会に報告される予定である。

#### E. 結論

Genotype の異なる HBV 由来の recombinant HBs 抗原を用いて、国内で使用されている HBs 抗原検出キットの、各 genotype HBs 抗原に対する感度を評価した。その結果、全ての genotype (A-H)由来の HBs 抗原を検出できることが確認された。

HBV-NAT のコントロールサーベイ実施に供する HBV-DNA 希釈系列パネルを作製し、国内外の各試験実施機関に配布した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

“Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial kits available in Japan.”

Mizuochi, T., Y. Okada, K. Umemori, S. Mizusawa, S. Sato, and K. Yamaguchi  
Jpn. J. Inf. Dis. 58:83-87, 2005.

「国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるHBV genotype由来HBs抗原の検出」

水落利明、岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、

佐藤進一郎、山口一成

臨床検査 第49巻第9号 p.1039-1042  
(2005年)

「C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製」

水沢左衛子、岡田義昭、山口照英ほか. 日本輸血学会誌 51巻 p.515-519 (2005年)

##### (2) 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

## 厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

### 分担研究報告書

#### HBV, HCV, HIV 感染の血清学的検査法の検討

主任研究者： 水落利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室長

**研究要旨**：国内で承認を受け販売されている、高感度の HBs 抗原検出キットが、日本国内での報告例が多い HBV genotype A, B, C の HBs 抗原のみならず、これまでに世界中で報告されている全ての HBV genotype 由来の HBs 抗原を感度良く検出できることが確認された。さらに、genotype の異なる HCV コア抗原および subtype の異なる HIV-1 抗原を in vitro で効率良く産生させる実験系を確立することができた。これらを用いて、各抗原検出キットの性能評価を行なうことが可能になった。さらに今後は遺伝子多型に対応した各抗原標準品パネルの作成が可能になると期待される。

#### A. 研究目的

輸血用血液製剤及び血漿分画製剤の投与により生じる輸血関連副作用を、献血の時点にまで遡って調査を行ない、その結果の解析及び評価を行なうシステムの構築は、輸血用血液の安全性向上に寄与することはもとより、病原体に汚染された血液製剤の投与を受けた受血者（患者）に必要な治療、保証を施す救済処置を実施する上にも、また更なる2次感染を防ぐためにも非常に重要な課題である。その目的で、特に血液を介して伝播するウイルスであるHBV, HCV, HIV-1の感染が疑われる輸血用血液製剤、及び血漿分画製剤について、ウイルス感染の血清学的診断法の最適化を目指した検討を行なうことが本研究の目的である。本研究により得られる知見は、今後

実施される輸血前後での感染症マーカー検査法の選択において有用な情報を提供することが期待される。

#### B. 研究方法

genotype 別 HBs 抗原検体：各 genotype の HBV 感染者血漿は、北海道赤十字血液センター、台湾 FDA よりの供与、あるいは市販の血漿を用いた。それらの血漿検体からクローニングされた HBV 遺伝子の配列を決定し、確認した後、各 genotype の recombinant HBs 抗原遺伝子を発現ベクターに組み込み、HuH-7 細胞に遺伝子導入し、培養上清を回収した。各 genotype の HBs 抗原濃度は、現在唯一「HBs 抗原定量キット」として承認されているアーキテクト・HBsAg QT（アボ

ットジャパン（株）を用いて測定し、それぞれの検体を 10 IU (International Unit)/ml の濃度に調整した。なお、検体の希釈には米国 BBI 社より購入した Multi marker negative matrix (Accurun 810)を用いた。そして、各検体を 1.0 IU/ml, 0.2 IU/ml の 2 段階に希釈して検査に供した。

HBs 抗原検出キット：HBs 抗原検出に使用したキットは、国内で販売されている 10 種類の高感度 HBs 抗原検出キット (EIA 法、CLIA 法、CLEIA 法) である (表 1)。

Genotype の異なる HCV コア抗原の作成：

Genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a の HCV に感染した肝炎患者より HCV 遺伝子をクローニングし、各 genotype のコア抗原を、ヒト肝由来細胞で発現させた。これらを用いて、国内で承認を受けて販売されている HCV コア抗原検出キットの性能評価をする準備が整った。

Subtype の異なる HIV-1 感染性分子クローンの樹立：様々な subtype (A, B, C, D, G) 及び CRF (組換体) (CRF01\_AE, CRF02\_AG) の HIV-1 感染性分子クローンを樹立した。これらの分子クローンによりヒト細胞で産生させたウイルス粒子を抗原とし、国内で承認を受けて販売されている HIV 抗原/抗体同時検出キットの性能評価をする準備が整った。

(倫理面への配慮)

本研究においては公的機関 (赤十字血液センター、台湾 FDA) より承認を受けて入手した血漿検体、及び市販の血漿検体を用いているために倫理面の問題はないと判断した。

## C. 研究結果

表 1 に示したそれぞれのキットにより、各 genotype 別検体を測定した結果を図 1 および図 2 に示した。HBs 抗原濃度が 1.0 IU/ml の場合 (図 1) にはいずれのキットも全ての genotype 由来の HBs 抗原も陽性と判定した。HBs 抗原濃度が 0.2 IU/ml の検体を用いた場合 (図 2) では、ひとつのキット (NO.8) を除き、全ての genotype 由来の HBs 抗原を陽性と判定した。以上の結果より、国内で承認を受けて販売されている 10 種類の高感度 HBs 抗原検出キットにおいては、全ての HBV genotype (A - H) 由来の HBs 抗原を陽性と判定することが確認できた。

## D. 考察

本研究で用いた 10 種類 of HBs 抗原検出キットにおいては、いずれの genotype の HBs 抗原検体 (1.0 IU/ml) も陽性と判定することができた (図 1)。しかしながら、低濃度である 0.2 IU/ml の検体を測定した場合では、一部のキット (NO.8) で、genotype E と F 由来の検体をカットオフ近辺ではあるものの陰性と判定した (図 2)。このキットの製造会社は最近、感度向上を目的に検出系に改良を加えた。それによって、genotype E, F の検体 (0.2 IU/ml) も陽性と判定することが示されている (私信)。

これまで、genotype F および H の HBV は遺伝子系統樹解析から、他の genotype の HBV とは若干類似性が低いことが示されており、そのために、これら 2 つの genotype 由来の



HBs抗原が、現存の検出キットで効率良く検出できるかどうかについては議論があった。しかし、本研究の結果から、これら2つの genotype由来のHBs抗原も、他の genotype由来のHBs抗原と同様に感度良く検出できることが示された。

#### E. 結論

国内で販売されている10種類の高感度HBs抗原検出キットを用いて、これまでに世界中で報告されている全てのHBV genotype (A - H) 由来の recombinant HBs 抗原について測定を行った。その結果すべてのキットにおいて、genotypeの違いにかかわらずHBs抗原を検出できることが確認された。

Genotype の異なる HCV コア抗原、及び Subtype の異なる HIV-1 感染性分子クローンが作成できたことから、今後 HCV コア抗原検出キット、及び HIV 抗原/抗体同時検出キットの性能評価が可能になる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

“Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial kits available in Japan. “

Mizuochi, T., Y. Okada, K. Umemori, S. Mizusawa, S. Sato, and K. Yamaguchi  
Jpn. J. Inf. Dis. 58:83-87, 2005.

「国内で販売されている10種類の高感度キットを用いたことなる HBV genotype 由来 HBs 抗原の検出」

水落利明、岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、佐藤進一郎、山口一成

臨床検査第49巻第9号 p.1039-1042  
(2005年)

##### (2) 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

表 1: 本研究に用いた HBs 抗原検出キット

No.	Method	Antibody (capture/detection)
1	CLIA	monoclonal/polyclonal
2	EIA	monoclonal/polyclonal
3	CLIA	monoclonal/polyclonal
4	EIA	monoclonal/polyclonal
5	EIA	monoclonal/monoclonal(x2)*
6	CLEIA	polyclonal/monoclonal(x2)*
7	CLEIA	monoclonal/monoclonal(x2)*
8	EIA	polyclonal/monoclonal
9	CLIA	monoclonal/monoclonal
10	CLIA	monoclonal/monoclonal

CLIA: Chemiluminescent Immunoassay

EIA: Enzyme Immunoassay

CLEIA: Chemiluminescent Enzyme Immunoassay

\*(x2): Two different monoclonal antibodies

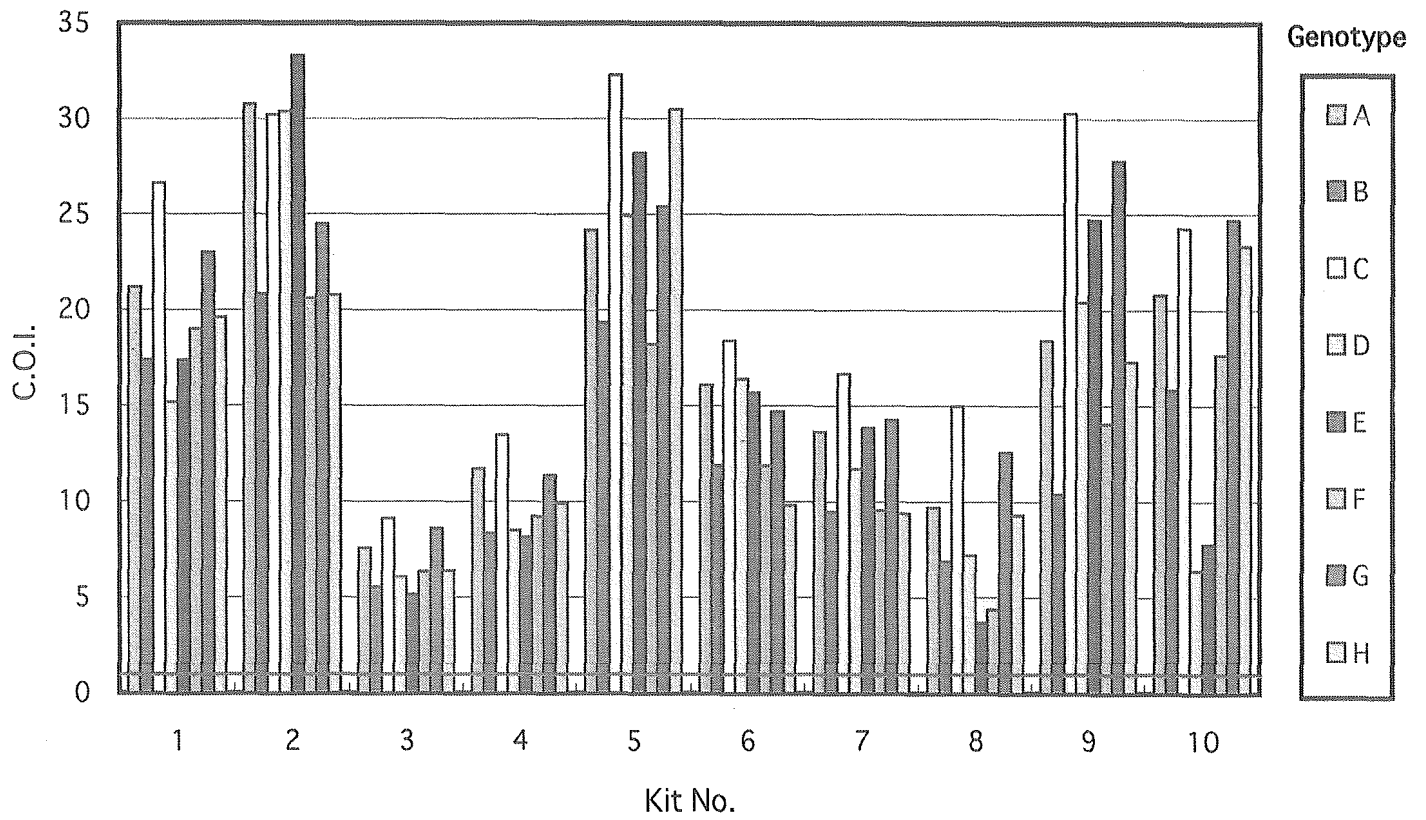


図 1 : Genotype の異なる HBs 抗原 (1.0 IU/ml) の検出

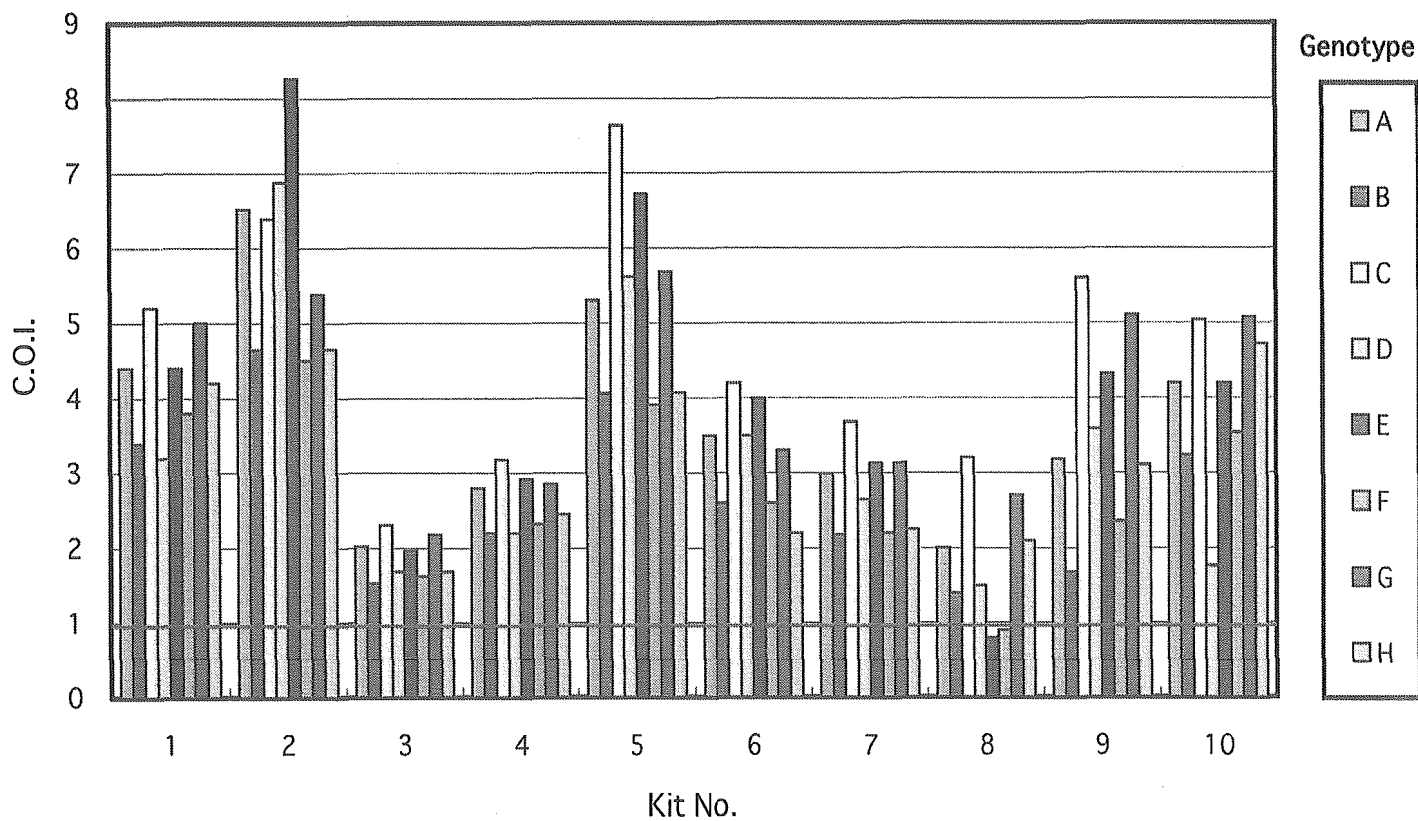


図 2 : Genotype の異なる HBs 抗原 (0.2 IU/ml) の検出

## 厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

### 分担研究報告書

#### 血液製剤の核酸増幅試験(NAT)の精度管理に関する研究

分担研究者：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

「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」及び「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」に基づいて血漿分画製剤製造販売業者等や民間の衛生検査所で実施している NAT の精度管理が求められるようになった。薬事・食品衛生審議会血液特別部会安全技術調査会の指示により HCV、HBV 及び HIV 検出のための NAT についてコントロールサーベイが実施されることになった。本年度は第 1 回目として HBV-NAT を対象とし、血漿分画製剤製造販売業者等においては、HBV 検出感度の目標を 4 課長通知に基づき 100 IU/mL とし、各施設が実施している試験が目標を達成していることの確認と実状を明らかにすること、衛生検査所においては輸血用血液製剤等の安全性を確認する上で各社の感度の現状を把握し、更なる安全性の向上を図るために感度の向上及び統一化を図ることを目的とする。HBV-DNA 国内標準品を用いて調製した感度パネルを参加施設に配布した。参加施設は検体受領後 50 日以内に測定結果を報告することになっている。

#### A. 研究目的

「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」（平成 16 年 7 月、NAT ガイドライン）及び「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」（平成 17 年 3 月、遡及調査ガイドライン）が発せられ、当該施設での NAT のバリディションと精度管理が求められるようになった。また、国際標準品に基づいた 3 つのウイルスの国内標準品が作製され、ウイルスパネの作製も進んでいることから、同一の標準試料を使用したコントロールサーベイの実施が可能になった。薬事・

食品衛生審議会血液特別部会安全技術調査会の指示に基づいて HCV、HBV 及び HIV 検出のための NAT についてコントロールサーベイの実施が同調査会委員である山口照英委員（国立医薬品食品衛生研究所部長）に付託され、同調査会の事務局である厚生労働省血液対策課が事務局を担当し、国立感染症研究所が検体の作製と配布及び結果の解析を担当することになった。

本サーベイでは次のことを目標とする。

①血漿分画製剤の原料のプールにおける NAT を実施している国内製造業者及び輸入販売業者の製造元（血漿分画製剤製造販売業者

等)、HBV検出感度の目標を4課長通知に基づき100IU/mLとし、各施設が実施している試験が目標を達成していることの確認と実状を明らかにする。

②衛生検査所においては、輸血用血液製剤等の安全性を確認する上で各社の感度の現状を把握することは不可欠であり、また、更なる安全性の向上を図るために感度の向上及び統一化を図る。

本年度は第1回目としてHBV-NATを対象とし、その後、血漿分画製剤製造販売業者等はHCV-NAT及びHIV-NATを順次対象とする。また、genotype等のパネル血漿を用いたサーベイに関してもこれらの結果を踏まえて順次実施していく。

## B. 研究方法

全体の流れを図1にまとめた。

1) 参加施設：血漿分画製剤製造販売業者等、並びにHBV-NATを実施している民間の衛生検査所。臨床検査薬メーカーはオブザーバーとして参加する。

2) 検体：HBV-DNA国内標準品(Genotype C)を血漿で希釈して作製したブラインド化されたパネルで、次の通り濃度の異なる7検体と陰性血漿1本の8検体からなる。10000、3000、1000、300、100、30、10(IU/mL)及び陰性血漿。分注量0.7mL。新鮮凍結血漿を4℃で融解、8000rpmで遠心した上清をプールして希釈用血漿として用いた。

3) 測定方法：日をかえて3回測定する。測定日ごとに新しい検体を融解して使用する。同じ検体の測定は1回限りとし、再測定及び多重測定は行わない。

4) 試験法：製造販売業者等は、NATガイドラインに基づいてバリデートされ現に実施している試験法により測定する。衛生検査所は、輸血前後の検査で現に実施している試験法により測定する。

5) 結果の記載方法：試験法が定性試験の場合は陽性/陰性を記載する。試験法が定量試験の場合はウイルス濃度を記載する。

6) 結果の提出：各参加機関は、試料の受領後50日以内に測定結果を厚生労働省医薬食品局血液対策課に提出する。

7) 結果の解析：国立感染症研究所において解析する。コントロールサーベイ参加施設のウイルス検出感度を推定することを目的としているので国内標準品作製と同様な統計処理をして各施設の感度を推定する。

8) コントロールサーベイ結果の報告：解析結果を打合会で確認したのち、薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会に報告する。参加施設には自身の結果の評価を通知する。

9) 病原体の取扱い：検体の配布は国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従った。

(倫理面への配慮)

本研究においては国内標準品と日本赤十字血液センターより承認を受けて入手した血漿とを用いているために倫理面の問題はないと判断した。

## C. 結果

1) 血漿で希釈した検体の適性

血漿分画製剤製造販売業者が測定する検体は血漿で希釈するのが適当である。一方、民間の衛生検査所が使用する体外診断薬キットは血清試料で承認を得ているので、血漿で希釈した検体で血清と同等の感度を得られるか検

討が必要であった。そこでHBV-DNA国内標準品と希釈用プール血漿を供与して、診断薬メーカー2社には各自のキットで、衛生検査所1社には両方のキットでHBV-DNA国内標準品を血清及び血漿で希釈した試料をそれぞれ測定して比較してもらった。血漿と血清とで定量性・検出限界に差が認められなかったため、血漿分画製剤製造販売業者等と衛生検査所は血漿で希釈した同一の検体を使用することになった。

## 2) 検体の作製と配布

研究方法2)に従って検体を調製し、-80度で凍結保存した。検体を参加施設に配布した。検体受領後50日以内に測定結果が返送され、国立感染症研究所で結果の解析を行うことになっている。

## D. 考察

本研究はNATコントロールサーベイとしてわが国において初めて実施されるものであり、血漿分画製剤製造販売業者等と衛生検査所とで同一濃度の検体を測定することが適当であったか等、今後のサーベイを順次実施する上でこの結果を生かすことが期待できる。またサーベイの結果から血漿分画製剤製造販売業者等においては、HBV検出感度の目標(100IU/mL)を達成していることの確認と実状を明らかにすることが出来る。また、衛生検査所も含めて、試験法自体の性能や施設ごとのばらつきがどの程度であるかを明らかに出来る。これらの結果を参考にして試験法の改良や施設の手技の向上と統一化を図ることが期待できる。また、分担研究者は原料血漿プールのNATの感度と精度のより一層の向上を目的として大容量(7mL)試料を処理できる自動核酸抽出装置と自動核酸

増幅検出装置を組み合わせて検討を行っている。

## E. 結論

NATガイドライン及び遡及調査ガイドラインに基づいてHBV-NATを対象としたコントロールサーベイを実施した。

## F. 健康危険情報

該当しない。

## G. 研究発表

(1) 邦文発表： 水沢左衛子，岡田義昭，山口照英ほか. C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製：日本輸血学会誌，51巻 515-519頁，2005

(2) 学会発表 なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得 なし

(2) 実用新案登録 なし

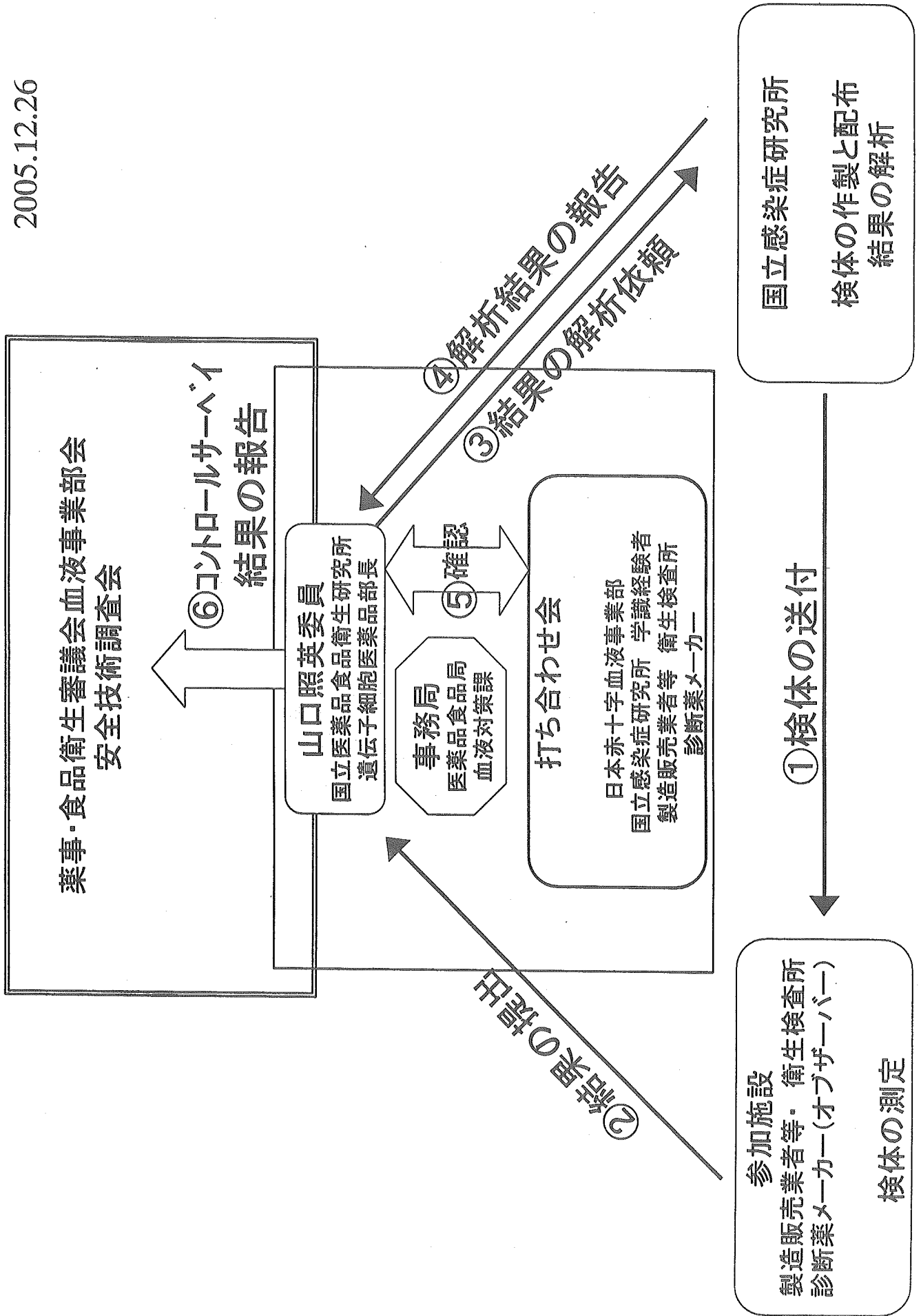
(3) その他 なし

## I. 謝辞

希釈用血漿プールの原料として日本赤十字社から新鮮凍結血漿を供与していただいた。本研究報告書はHBV-NAT等感染症検査法に係るコントロールサーベイ実施打合会で確認された実施要綱等に基づいている。

# 血液製剤の核酸増幅検査(NAT)のコントロールサーベイのフロー

2005.12.26





研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T.Mizuochi et al.	Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan	J.J.I.D.	58	83-87	2005
水落利明 他	国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるHBV genotype 由来HBs抗原の検出	臨床検査 (医学書院)	49	1039- 1042	2005
水沢左衛子 他	C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製	日本輸血学会誌	51	515-519	2005

## Original Article

# Reactivity of Genotypically Distinct Hepatitis B Virus Surface Antigens in 10 Commercial Diagnostic Kits Available in Japan

Toshiaki Mizuochi\*, Yoshiaki Okada, Kiyoko Umemori,  
Saeko Mizusawa, Shinichiro Sato<sup>1</sup> and Kazunari Yamaguchi

*Department of Research on Blood and Biological Products,  
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011 and  
<sup>1</sup>Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo 063-0002, Japan*

(Received December 14, 2004. Accepted January 19, 2005)

**SUMMARY:** Hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) is one of the most important serological markers of current HBV infection. However, there are significant antigenic variations of HBsAg caused by genotypic diversity as well as mutation of the HBV genome. It is predictable that amino acid substitutions occurring in the HBsAg "a" determinant of a particular HBV genotype will affect the sensitivity of some diagnostic kits, since all the diagnostic kits currently available utilize monoclonal and/or polyclonal antibodies against the "a" determinant. One possible concern is that there may be a significant variation in the sensitivity of HBsAg diagnostic kits to HBsAg encoded by HBV of different genotypes, which might result in a failure to detect HBsAg of a particular HBV genotype. In this study, we assessed the reactivity of HBsAg specimens derived from three different HBV genotypes (A, B, and C) that are prevalent in Japan by 10 commercially available EIA (enzyme immunoassay), CLIA (chemiluminescent immunoassay), and CLEIA (chemiluminescent enzyme immunoassay) diagnostic kits. Specimens included both clinical samples and recombinant HBsAg. Our results showed that all the diagnostic kits evaluated were able to detect HBsAg irrespective of HBV genotypes. At the same time, it is apparent that some, but not all of the kits showed clear differences in sensitivity to the three HBV genotypes.

## INTRODUCTION

Antigenic variation of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) "a" determinant should be taken into consideration when a diagnostic kit with high specificity/sensitivity is designed. Since all the diagnostic kits for detection of HBsAg utilize an antibody against the major epitope, i.e., the "a" determinant, amino acid substitution in this region would be accountable for diagnostic failures. There are three major causes of variations in HBsAg: differences in subtype, differences in genotype, and mutations. HBsAg is classified into four major serological subtypes, i.e., adr, adw, ayr, and ayw (1,2). The diagnostic kits currently available are able to detect all of them with only a slight sensitivity variation. There is, however, a significant variation in the sensitivity of diagnostic kits for detection of naturally occurring or vaccine-inducing mutants mainly in the "a" determinant region (3). Therefore, when designing diagnostic kits, if we employ a monoclonal antibody (mAb) that recognizes amino acid residues but is subject to mutation, the result will be a failure to detect the mutant HBsAg. For performing sensitive and accurate blood donor screenings, we need a robust assay system that does not overlook any positive specimens. Since the incidence of HBV mutation in specimens from the general population is rather low, this may not be a major problem. In contrast, genotypic variation in HBV could become a serious problem if some diagnostic kits fail to detect HBsAg of particular genotypes.

Based on an intergroup divergence of 8% or more in the complete nucleotide sequence, HBV has been classified into eight genotypes, designated as A to H (4-7). The prevalence of specific genotypes varies geographically (8, 9). Genotypes B and C are prevalent in Japan, and only a small population contracts HBV of genotype A (9,10). Recently, however, there has been an increase in the number of acute hepatitis B patients infected with HBV of genotype A, especially in metropolitan areas in Japan (11). And there is an accumulating body of evidence that certain HBV genotypes correlate with the severity of liver disease (12-14) and with the susceptibility to anti-viral drugs (15-18). It is thus important to detect HBsAg derived from various HBV genotypes without a sensitivity divergence. To date, there has been no published study examining whether or not commercially available HBsAg diagnostic kits are able to detect genotypically distinct HBsAg - e.g., HBsAg derived from HBV genotypes A, B, and C - with equal efficacy. The lack of such information threatens to undermine our confidence in the reliability of these diagnostic kits. Accordingly, the objective of the present study was to compare the sensitivity of 10 diagnostic kits available in Japan to serum/plasma samples containing HBsAg as well as recombinant HBsAg derived from HBV of genotypes A, B, and C. None of the diagnostic kits examined here failed to detect HBsAg of genotypes A, B, and C at a concentration of 0.2 IU (international units)/ml. There were, however, obvious differences in the sensitivity to various HBV genotypes in some kits. Possible explanations for the reactivity differences found in genotypically distinct HBsAg in some diagnostic kits will be discussed.

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771 ext 335, Fax: +81-42-562-7892, E-mail: miz@nih.go.jp

## MATERIALS AND METHODS

**Specimens:** Serum samples from HBsAg-positive blood

donors were kindly provided by Hokkaido Red Cross Blood Center. They were genotyped by direct sequencing and found to be of either genotype B or C. Genotype A HBsAg-positive plasma samples were obtained from International Reagents Corporation (Kobe, Japan). Recombinant HBsAg of genotypes A, B, and C were obtained from culture supernatants of genotype-defined HBV gene-transfected HuH-7 cells. In brief, extracted HBV-DNA from HBsAg-positive plasma was amplified by using a TaKaRa LA PCR™ Kit (ver.2.1; TaKaRa, Tokyo, Japan) with sense primer **GGCTCTTCTTTTCA CCTCTGCCTAATCA** (1821-1841) and antisense primer **GGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG** (1825-1806), both of which were modified by Günther et al. (19). SapI sites sequences (bold letters) were added to remove HBV DNA from vector. The amplified HBV full genomes were cloned using a TOPO XL-PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) and their genotypes were determined by sequencing. The plasmids containing HBV full genomes were transfected into HuH-7 by lipofectin reagent (Invitrogen). Culture supernatants were harvested after 2 days and stored at -20°C until use.

**Diagnostic kits for HBsAg:** The 10 diagnostic kits utilized in this study are listed in Table 1. Tests were performed according to the manufacturer's instruction.

**Statistical analysis:** Statistical analyses were carried out using Student's *t* test.

## RESULTS

The HBsAg concentration of each specimen was first determined by utilizing ARCHITECT HBsAg QT (Abbott Japan Co., Ltd., Chiba, Japan), which is the only quantitative assay kit approved in Japan, and expressed in IU/ml. The concentration of each specimen was adjusted to 10 IU/ml with a multi-marker negative matrix (Accurun 810; BBI Co., Ltd., Boston, Mass., USA). Specimens were then diluted to make test samples of three different concentrations, i.e., 0.04, 0.2, and 1.0 IU/ml. These test samples derived from various HBV genotypes were then analyzed with 10 diagnostic kits, including ARCHITECT HBsAg QT, as shown in Table 1. In the preliminary experiments, each specimen was analyzed by 10 different diagnostic kits and the reactivity, which was expressed as IU/ml, COI (cut off index), or other measures depending on the kit utilized, was plotted along with the arbitrary HBsAg concentration pre-determined by ARCHITECT HBsAg QT. The measures were intentionally omitted

from the y-axes of Fig. 1 so that the kits could not be identified. Each curve showed a good linearity, at least in the range from 0.04 IU/ml to 1.0 IU/ml of HBsAg (data not shown). Therefore, values corresponding to the concentration of 0.2 IU/ml HBsAg were chosen and plotted for each genotype as shown in Fig. 1. It was concluded that all the HBsAg samples, irrespective of their genotypes, tested positive in every assay kit, at least at the concentration of 0.2 IU/ml. There were, however, considerable differences in the sensitivity to HBsAg of various HBV genotypes in some assay kits. For example, in kit no. 7, sensitivity to genotype B was significantly lower than those to genotypes A and C. Figure 2 summarizes the difference in sensitivity to various genotypes in each assay kit. Assay kits no. 1 to 4 and 8 to 10 showed a marginal variability in sensitivity to the HBsAg of the three different genotypes as the ratio against genotype A was close to 1.0 in each of these kits. In contrast, assay kits no. 5 to 7 showed a considerable variability in sensitivity to each genotype.

## DISCUSSION

In the present study, 10 highly sensitive diagnostic kits (EIA [enzyme immunoassay], CLIA [chemiluminescent immunoassay], and CLEIA [chemiluminescent enzyme immunoassay] kits) currently available in Japan were examined for their sensitivity to HBsAg encoded by HBV of three distinct genotypes, A, B, and C. It was concluded that all the kits examined were able to detect HBsAg of all the genotypes at the concentration of 0.2 IU/ml. This is a sufficient level of sensitivity according to the "Guidance for Industry" issued by the FDA (20) or the "CTS" (Common Technical Specification) defined by the EU (21). Our results thus validated the sensitivity of all the diagnostic kits to HBsAg of genotypes A, B, and C, which are dominant in Japan. However, it was concurrently demonstrated that some diagnostic kits showed a substantial difference in sensitivity to the three genotypes (Figs. 1 and 2, kit no. 5, 6, and 7). This apparent sensitivity difference may stem from the antibodies employed in the "capture" or "detection" phase in the diagnostic kits. As shown in Table 1, kits no. 1 to 4 employed a mAb for the "capture" phase and a polyclonal antibody (pAb) for the "detection" phase. These four kits showed little or no sensitivity differences to the three genotypes (Figs. 1 and 2). A similar result was obtained for kit no. 8, which employed a pAb for "capture" and a mAb for "detection". In the case of kit no. 7, however, there was a noticeable difference in sensitivity to the three genotypes. As shown in Table 1, kit no. 7 employed a mAb for both "capture" and "detection". Both of these mAbs may have had a poor affinity to the amino acid residues unique to genotype B. On the other hand, kits no. 5, 6, and 7 had a higher sensitivity to genotype C than to the other genotypes (Figs. 1 and 2), probably because the antibodies employed in these kits have a high affinity to the amino acid residues unique to genotype C. Kits no. 9 and 10 showed only a slight difference in sensitivity to the three genotypes (Figs. 1 and 2), despite the fact that both kits employed a mAb for both the "capture" and "detection" phases. The manufacturer's unpublished information revealed that they employed two mAbs with different epitope specificities. One of the mAbs recognizes the "loop 1" region (a.a. 124-137) of the "a" determinant, whereas the other recognizes the "loop 2" region (a.a. 139-147). Since the "loop 1" region is assumed to be more conserved among various genotypes than the

Table 1. HBsAg diagnostic kits used in this study

No.	Method	Antibody (capture/detection)
1	CLIA	monoclonal/polyclonal
2	EIA	monoclonal/polyclonal
3	CLIA	monoclonal/polyclonal
4	EIA	monoclonal/polyclonal
5	EIA	monoclonal/monoclonal(× 2) <sup>1)</sup>
6	CLEIA	polyclonal/monoclonal(× 2) <sup>1)</sup>
7	CLEIA	monoclonal/monoclonal(× 2) <sup>1)</sup>
8	CLEIA	polyclonal/monoclonal
9	CLIA	monoclonal/monoclonal
10	CLIA	monoclonal/monoclonal

CLIA: chemiluminescent immunoassay.

EIA: enzyme immunoassay.

CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay.

<sup>1)</sup>(× 2): Two different monoclonal antibodies.

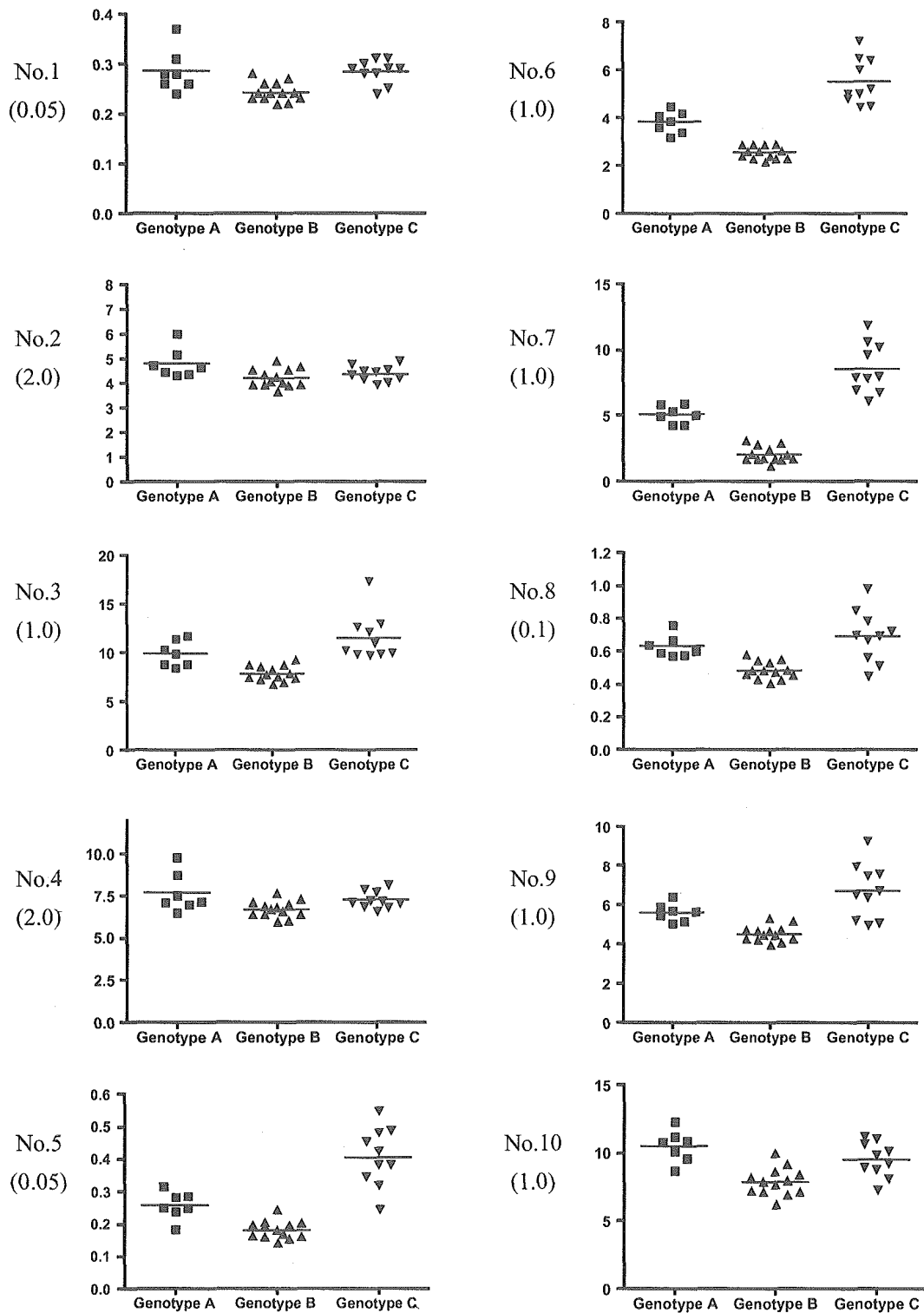


Fig. 1. HBV genotypic preferences of each test kit. Detection of HBsAg derived from HBV of genotypes A, B, and C. A total of 30 specimens containing HBsAg (0.2 IU/ml), including 7 samples of genotype A (■), 13 samples of genotype B (▲), and 10 samples of genotype C (▼), were assayed by utilizing 10 diagnostic kits listed in Table 1. Horizontal bars indicate the means of measured values. The number in the parenthesis is the cut-off value for each diagnostic kit to evaluate the reactivity of a specimen. Statistically significant ( $P < 0.1$ ) differences in the mean measures between two genotypes were noticed in the following kits. No. 5: B vs. C. No. 6: A vs. B and B vs. C. No. 7: A vs. B, B vs. C, and C vs. A.

“loop 2” region, kits no. 9 and 10 were able to detect all the genotypically distinct HBsAg with only minimal divergence.

These results are reminiscent of the previously published studies that pointed out the failure of some diagnostic kits in detecting mutant HBsAg (3,22-25). In those studies, monoclonal-based assays often failed to detect mutant

HBsAg, such as the G145R mutation in the “a” determinant region. It was also suggested that mutations affecting immunoassay performance occurred mainly in the “loop 2” region (3).

In conclusion, all the diagnostic kits examined in this study were able to detect HBsAg regardless of their HBV