

Fig. 2. Comparison among various HBsAg diagnostic kits. Variation in sensitivity of 10 diagnostic kits to HBsAg of genotypes A, B, and C. The mean value obtained by each diagnostic kit was divided by the corresponding value obtained by ARCHITECT HBsAg QT to normalize it. Then the calculated value for genotype B specimen was divided by the calculated value for genotype A to obtain the ratio of "genotype B vs. genotype A". In the same way, the ratio of "genotype C vs. genotype A" was calculated. For each diagnostic kit, therefore, the ratio for genotype A is always "1" and the ratios for genotypes B and C are expressed as the bar's height. Since we utilized ARCHITECT HBsAg QT as a tentative standard, the ratios of this kit are theoretically "1". If the ratio is close to "1", the variation in sensitivity to genotype B (or genotype C) would be minimum, whereas, if not, the variation would be substantial.

genotypes. In some kits, however, sensitivity was significantly diversified among the three HBV genotypes. When mAbs are utilized for both the "capture" and "detection" phases, it is recommended that at least one antibody recognizes an epitope that is conserved among HBV genotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the manufacturers who kindly supplied us with the HBsAg diagnostic kits and helped us in performing the assays.

REFERENCES

1. Le Bouvier, G. L. (1971): The heterogeneity of Australia antigen. *J. Infect. Dis.*, 123, 671-675.
2. Bancroft, W. H., Mundon, F. K. and Russel, P. K. (1972): Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.*, 109, 842-848.
3. Coleman, P. F., Chen, Y.-C. J. and Mushahwar, I. K. (1999): Immunoassay Detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J. Med. Virol.*, 59, 19-24.
4. Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1988): Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*, 69, 2575-2583.
5. Norder, H., Courouce, A. M. and Magnius, L. O. (1994): Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 198, 489-503.
6. Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F. and Rossau, R. (2000): A new

- genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.*, 81, 67-74.
7. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. and Magnius, L. O. (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.*, 83, 2059-2073.
8. Magnius, L. O. and Norder, H. (1995): Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*, 38, 24-34.
9. Chu, C. J. and Lok, A. S. F. (2002): Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*, 35, 1274-1276.
10. Fung, S. K. and Lok, A. S. F. (2004): Hepatitis B virus genotypes: Do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology*, 40, 790-792.
11. Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K., Tsubota, A., Suzuki, Y., Hosaka, T., Saito, S., Kobayashi, M., Suzuki, F., Akuta, N., Someya, T., Matsuda, M., Sato, J. and Kumada, H. (2003): Clinical feature of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. *J. Gastroenterol.*, 38, 656-662.
12. Mayerat, C., Mantegani, A. and Frei, P. C. (1999): Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral. Hepat.*, 6, 299-304.
13. Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2000): Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 118, 554-559.
14. Orito, E. and Mizokami, M. (2003): Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology*, 46, 408-412.
15. Kao, J. H., Wu, N. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2000): Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J. Hepatol.*, 33, 998-1002.
16. Wai, C. T., Chu, C. J., Hussain, M. and Lok, A. S. (2002): HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology*, 36, 1425-1430.
17. Kao, J. H., Liu, C. J. and Chen, D. S. (2002): Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J. Hepatol.*, 36, 303-304.
18. Zollner, B., Petersen, J., Puchhammer-Stockl, E., Kletzmayer, J., Sterneck, M., Fischer, L., Schrocter, R. and Feucht, H. H. (2004): Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology*, 39, 42-50.
19. Günther, S., Li, B.-C., Miska, S., Kruger, D. H., Meisel, H. and Will, H. (1995): A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J. Virol.*, 69, 5437-5444.
20. Food and Drug Administration, U. S. (2004): Guidance for Industry. A modified lot-release specification for hepatitis B surface antigen (HBsAg) assays used to test blood, blood components, and source plasma donations. April 2004.
21. European Union (1998): Common Technical Specifications (CTS) for products defined in Annex II, List A of Directive 98/79/EC: CTS for the manufacturer's release testing of reagents and reagent products for the detection, confirmation and quantification in human specimens of markers of HIV infection (HIV 1 and 2), HTLV I and II, and hepatitis B, C, D (Immunological assays only).

22. Ireland, J. H., O'Donnell, B., Basuni, A. A., Kean, J. D., Wallace, L. A., Lau, G. K. K. and Carman, W. F. (2000): Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology*, 31, 1176-1182.
23. Zaaijer, H. L., Vrieling, H. and Koot, M. (2001): Early detection of hepatitis B surface antigen and detection of HBsAg mutants: a comparison of five assays. *Vox Sang.*, 81, 219-221.
24. Levicnik-Stežinar, S. (2004): Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay. *Clin. Lab.*, 50, 49-51.
25. Moerman, B., Moons, V., Sommer, H., Schmitt, Y. and Stetter, M. (2004): Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin. Lab.*, 50, 159-162.

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¹⁾/岡田義昭¹⁾/梅森清子¹⁾/水沢左衛子¹⁾/佐藤進一郎²⁾
山口一成¹⁾

[SUMMARY] 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, HBV (B 型肝炎ウイルス) genotype A, B, C 由来の HBs 抗原 (HBV ウィルス外被抗原) の検出を行った。すべてのキットにおいて, genotype の違いにかかわらず HBs 抗原 (0.2 IU/ml) は陽性と判定された。しかし, キットによっては genotype 間での検出感度に明らかな差が見られるものがあった。ミュータント (変異) HBs 抗原検出における問題点と比較してその原因を考察した。

[KEYWORDS] HBV, genotype, HBs 抗原検出キット

■ 緒言

HBs 抗原の血清学的検出は, HBV 感染の簡便, 迅速かつ重要な指標である。この HBs 抗原をコードする HBV には, その遺伝子配列から, 現在までに 8 種類の遺伝子型 (genotype) が存在することが報告されている¹⁾。そしてこのような genotype の違いにより肝炎病態, および抗ウイルス薬剤への反応性が異なる可能性が指摘されている^{2,3)}。現在日本国内で検出される HBV の genotype は, C が約 70%, B が約 30% であり, ほとんどがこれら両者に由来しているが, 頻度は低いながら genotype A の HBV も検出される。本来この genotype A は, アフリカ, 北米, 南米, ヨーロッパ諸国に多くみられる遺伝子型であるが, 近年この genotype A の HBV 感染が, 特に都市部の急性肝炎患者で増加傾向にある⁴⁾。

表 1 各 HBs 抗原検出キットにおける測定法と抗体の由来。各キットの原理/方法, および使用抗体

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)*
6	CLEIA	polyclonal/monoclonal (×2)*
7	CLEIA	monoclonal/monoclonal (×2)*
8	EIA	polyclonal/monoclonal
9	CLIA	monoclonal/monoclonal
10	CLIA	monoclonal/monoclonal

CLIA: chemiluminescent immunoassay (蛍光免疫法)

EIA: enzyme immunoassay (酵素免疫法)

CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay (蛍光酵素免疫法)

* (×2): 異なる 2 種類のモノクローナル抗体を使用

現在日本国内で販売されている HBs 抗原検出キットは 30 種類を越えるが, これまで HBV genotype の異なる HBs 抗原の反応性を, これら種々のキットで検討した報告はなく, 特に genotype A の HBV によりコードされる HBs 抗原の反応性についての知見が求められている。今回, 国内で販売されている 10 種類の高感度 (EIA, CLIA, CLEIA) HBs 抗原検出キットを用い, genotype A, B, C の各検体 (recombinant 抗原を含む) の測定を試みたのでその結果を報告する。

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

- 1) MIZUOCHI Toshiaki, OKADA Yoshiaki, UMEMORI Kiyoko, MIZUSAWA Saeko, YAMAGUCHI Kazunari: Department of Research on Blood and Biological Products National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 (〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1)
- 2) SATO Shinichiro: Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo 北海道赤十字血液センター検査部

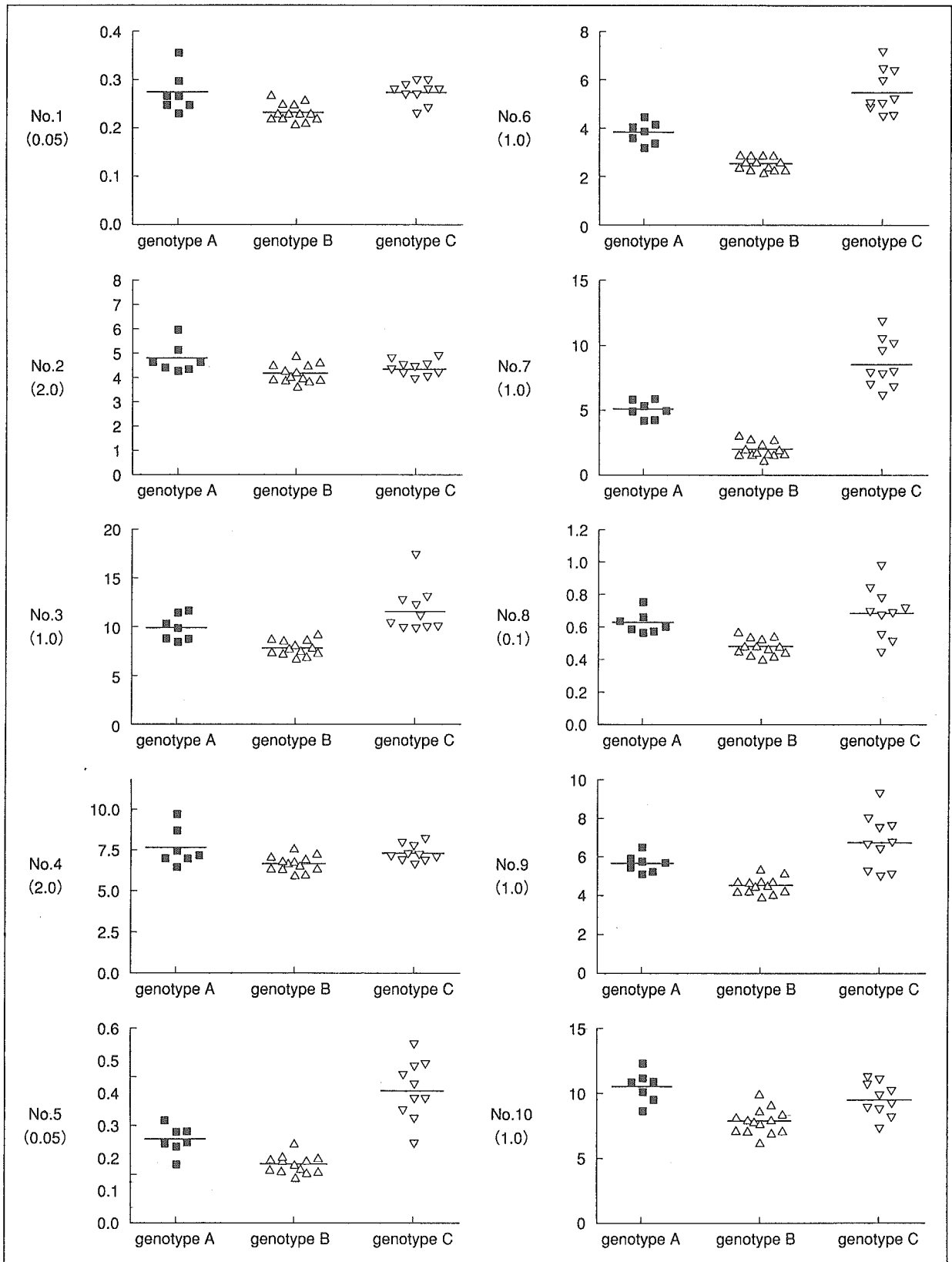


図1 各キットを用いた genotype 別 HBs 抗原量の測定結果

表1に示した10種類のキットを用いて0.2 IU/mlの濃度に調整した検体(genotype A:7検体, genotype B:13検体, genotype C:10検体)を測定した。図の中の直線は各測定値の平均値を示す。()内に示した数値は各キットにおいて、検体を陽性と判定するカットオフ値である。なお, genotype A, B について各1検体, genotype Cについては2検体の recombinant 抗原を測定したが, これらの検体がほかの native な検体に比較して, 特に異なった反応性を示すことはなかった。

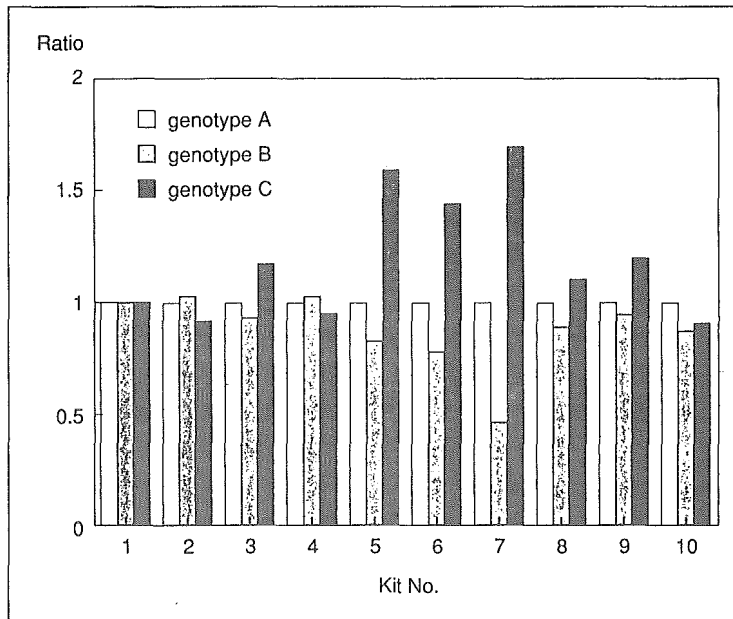


図2 各 HBs 抗原検出キットによる測定結果のまとめ
各測定値の平均値を、それぞれの genotype 別に ARCHITECT HBsAg QT での測定値(平均値)で除し標準化した。そして ARCHITECT HBsAg QT で測定した genotype A, B, C 各検体測定値(平均値)を基準(1.0)にして、それ以外のキットにおいて genotype B および genotype C の値を比(Ratio)で表した。したがって、genotype A での値は各キットにおいてすべて 1.0 であり、genotype B および C においては、この値が 1.0 に近いほど genotype 間での測定感度差が少ないことになり、逆に 1.0 からかけ離れるほど genotype 間での測定感度差が大きくなることとなる。

■ 材料および方法

1. genotype 別 HBs 抗原検体

genotype B および C の検体は、北海道赤十字血液センターより供与された国内献血液(HBs 抗原陽性)の HBV genotype を塩基配列から決定して選択したものを用い、genotype A の検体は国際試薬(株)より購入した検体の HBV genotype を決定して選択したものを用いた。さらにそれぞれの genotype について、HBV 遺伝子導入して得られた recombinant HBs 抗原も検体に加えた。これらの 30 検体(genotype A : 7 検体, genotype B : 13 検体, genotype C : 10 検体)を、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、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, 0.04 IU/ml の 3 段階に希釈して検査に供した。

2. HBs 抗原検出キット

今回の HBs 抗原検出に使用したキットは、表 1 に

示した 10 種類である。

■ 結果

今回使用したすべてのキット(表 1)において、予備実験の結果から HBs 抗原濃度が 0.04 IU/ml から 1.0 IU/ml までの範囲においては、抗原濃度と測定値の間に良好な直線関係が得られた。そこで、欧米諸国で求めている HBs 抗原最小検出感度の基準を鑑み、0.2 IU/ml の抗原濃度における測定値を用いて図 1 に示すような、それぞれのキットによる各 genotype 別検体測定値のプロットを作成した。なお、各パネルで括弧内に示しているのは、各キットが検体を陽性と判断する基準の数値(カットオフ値)である。図 2 では、各キットでの genotype 別検体測定値を、ARCHITECT HBsAg QT で測定した各 genotype の検体測定値を基準(1.0 とした)にした比率で表現した。これらの数値が 1.0 に近いほど、genotype 間での測定値に差が少ないことを意味する。

■ 考察

今回の検討に用いた 10 種類の HBs 抗原検出キットにおいては、いずれの genotype の HBs 抗原検体

(0.2 IU/ml)も陽性と判定することができた(図1)。しかしながら、一部のキット(No.7)においては、genotype B由来の検体に対する反応性が他のgenotype(A, C)由来の検体に比較して明らかに低いことが示された。またNo.5, 6, 7においてはgenotype C由来のHBs抗原に対する反応性が、genotype A, B由来のHBs抗原に対する反応性よりも高いことが示された(図1, 2)。なお、No.5, 6, 7, 8, 9においては他のキットに比較してgenotype C検体の測定値に顕著なばらつきがみられた。これについては現在のところ原因は明らかになっていない。

以上のように、使用したキットによっては、genotypeが異なるHBs抗原に対する反応性に若干の差異がみられた。その原因として考えられるのは、キットに用いられているHBs抗原に対する抗体の違いが挙げられるだろう。抗原捕捉(capture)と抗原検出(detection)のどちらか一方にポリクローナル抗体を用いている場合、No.6のキットを除き、genotype間での感度差は少ないようである。しかし、両方にモノクローナル抗体を用いている場合では、No.5, 7にみられるように、genotype間での感度差が比較的大きいものと、No.9, 10のように差が少ないものとに区別された。これらの違いをより詳細に検討すると、No.9, 10のキットで用いられているモノクローナル抗体はHBs抗原の主要抗原である“a”抗原に存在する、S-S結合により構成される2つのloop(loop 1 : a. a. 124-137, loop 2 : a. a. 139-147)のそれぞれに対するモノクローナル抗体を使用していることが判明した。“a”抗原の中で、genotypeの違いにより変異する部位と各genotype間で保存されている部位とがあるが、特に変異の頻度が高いloop 2に対するモノクローナル抗体を用いた場合には、genotypeの違いにより検出感度に差が生じることが考えられ、おそらくNo.5, 7のキットがそれに該当することが予想される(しかし、モノクローナル抗体の認識するepitopeについての詳細な解析データは得られていない)。

以上の結果は、現在までに報告されていた「ミュータント(変異)HBs抗原」に対する種々のHBs抗原検出キットで知られている抗原検出感度の違いと類似している。やはり、モノクローナル抗体のみを使用しているキットでは、ある種の変異HBs抗原を検出できないことが報告されている⁵⁾。このような変異HBs抗原の出現頻度は決して高いものではないが、すべてのHBs抗原はある特定のgenotypeをもつHBVによってコードされていることから、その違いによって検出感度に差が生じるのであっては、正確な診断に支障をきたす懸念がある。今後はHBV genotype別のHBs抗原標準品パネルを確立し、genotypeの違いによるキットの検出感度差を管理する必要があるだろう。このような流れは国際的にもすでに議論されており、WHOにおいては現在のHBs抗原国際標準品(genotype A)に加えて、今後は他のHBV genotypeについてもHBs抗原国際標準品を整備する方向性が示されている(WHO Working Group on International Reference Preparations for testing Diagnostic Kits used for the detection of HBsAg and anti-HCV antibodies. Oct. 6-7, 2003)。

文 献

- 1) Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson B, et al : Genotype H ; a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J Gen Virol 83 : 2059-2073, 2002
- 2) Chu CJ, Lok ASF : Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. Hepatology 35 : 1274-1276, 2002
- 3) Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al : Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. J Hepatol 33 : 998-1002, 2000
- 4) Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, et al : Clinical feature of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. J Gastroenterology 38 : 656-662, 2003
- 5) Coleman PF, Chen YCJ, Mushahwar IK : Immunoassay Detection of hepatitis B surface antigen mutants. J Med Virol 59 : 19-24, 1999
(受稿 2005.3.21, 受理 2005.5.22)

原 著

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^{1)b)} 岡田 義昭^{1)a)b)} 堀内 善信^{2)b)} 田中 建志^{3)b)}
佐藤 功栄^{3)b)} 金子 健二^{4)a)b)} 佐々木祐子^{5)b)} 田中 利明^{6)a)}
伴野 丞計^{7)a)} 友水 健雄^{4)b)} 速水 照一^{5)a)b)} 土方美奈子^{8)b)c)}
平子 一郎^{9)a)b)d)} 真弓 忠^{10)a)} 三上 貢一^{11)a)b)e)} 三代 俊治^{8)a)b)}
宮本 誠二^{12)a)b)} 牟田 健吾^{12)b)} Thomas Weimer^{13)b)}
Todd Gierman^{14)b)} 小室 勝利^{1)a)} 山口 照英^{15)a)}

- ¹⁾国立感染症研究所血液・安全性研究部, ²⁾国立感染症研究所細菌第二部, ³⁾埼玉県赤十字血液センター,
⁴⁾日本製薬株式会社, ⁵⁾株式会社ベネシス, ⁶⁾バクスター株式会社バイオサイエンス事業部,
⁷⁾日本赤十字社血漿分画センター, ⁸⁾東芝病院研究部, ⁹⁾バイエル薬品株式会社, ¹⁰⁾自治医科大学,
¹¹⁾アベンティス ファーマ株式会社, ¹²⁾財団法人化学及血清療法研究所, ¹³⁾アベンティス ベーリング,
¹⁴⁾バイエルヘルスケア, ¹⁵⁾国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部,
^{a)}血液事業部会安全技術調査会 血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会
(委員長: 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英),
^{b)}NAT 国内標準品作製のための共同研究グループ
^{c)}現国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部,
^{d)}現シェリング・プラウ株式会社, ^{e)}現バイエル薬品株式会社

(平成 17 年 1 月 5 日受付)

(平成 17 年 5 月 6 日受理)

ESTABLISHMENT OF THE FIRST NATIONAL STANDARD FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY ASSAY FOR HCV RNA

Saeko Mizusawa^{1)b)}, Yoshiaki Okada^{1)a)b)}, Yoshinobu Horiuchi^{2)b)}, Takeshi Tanaka^{3)b)},
Koei Sato^{3)b)}, Kenji Kaneko^{4)a)b)}, Yuko Sasaki^{5)b)}, Toshiaki Tanaka^{6)a)},
Tsugikazu Tomono^{7)a)}, Takeo Tomomizu^{4)b)}, Shouichi Hayami^{5)a)b)}, Minako Hijikata^{8)b)c)},
Ichiro Hirako^{9)a)b)d)}, Makoto Mayumi^{10)a)}, Koichi Mikami^{11)a)b)e)}, Shunji Mishiro^{8)a)b)},
Seiji Miyamoto^{12)a)b)}, Kengo Muta^{12)b)}, Thomas Weimer^{13)b)}, Todd Gierman^{14)b)},
Katsutoshi Komuro^{1)a)} and Teruhide Yamaguchi^{15)a)}

- ¹⁾Department of Blood and Safety Research, The National Institute of Infectious Diseases,
²⁾Department of Bacteriology II, The National Institute of Infectious Diseases,
³⁾Japanese Red Cross Saitama Blood Center, ⁴⁾Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.,
⁵⁾Benesis Corporation, ⁶⁾Baxter Limited BioScience, ⁷⁾Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center,
⁸⁾Department of Medical Science, Toshiba General Hospital, ⁹⁾Bayer Yakuhin Ltd.,
¹⁰⁾Jichi Medical School, ¹¹⁾Aventis Pharma Co. Ltd.,
¹²⁾The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, ¹³⁾Aventis Behring Ltd., ¹⁴⁾Bayer Healthcare,
¹⁵⁾Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science,

^{a)}Subcommittee on Safety for Plasma-Derived Products

(Chairman : Teruhide Yamaguchi, National Institute of Health Sciences),

^{b)}Working Group on the Establishment of National Standards for Nucleic Acid Technology Assay,

Present address ; ^{c)}Department of Respiratory Diseases, Research Institute,

International Medical Center of Japan., ^{d)}Schering-Plough K.K., ^{e)}Bayer Yakuhin, Ltd.

The First WHO International Standard for HCV RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assay (96/790) was established in 1997. The aim of our collaborative study was the establishment of the Japanese National Standard for HCV RNA calibrated against the WHO International Standard. The candidate materials were evaluated in the following two steps. First, titers of two HCV positive plasma (119 and 122) diluted in cryosupernatant were evaluated, and plasma 122 was chosen as the source plasma for the candidate for the national standard. Then, candidate 122 was prepared by diluting the source plasma to approximately 10^5 international units (IU)/ml in cryosupernatant. The relative potency of the candidate was measured against the International Standard by the end-point method. Seven laboratories from three countries participated in the collaborative study. Four laboratories used the Roche Amplicor assay (Version 1) and 3 laboratories used in-house PCR methods. There was reasonable agreement among the mean estimates from the laboratories. The overall mean potency of the candidate relative to the International Standard was $10^{5.00}$ ($10^{4.80} \sim 10^{5.20}$) IU/ml. The sample was accepted as the first Japanese national standard and assigned a titer of 100,000 IU/ml. Each vial of the National Standard contains 0.5 ml of HCV plasma (genotype 1b) diluted in cryosupernatant and should be stored at -80°C .

Key words : HCV, The WHO International Standard, National Standard, Nucleic acid technology (NAT) assay, Blood safety

1. はじめに

供血者のC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗体スクリーニングを実施したにもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤によるHCVの感染が報告された。これは、HCVに感染してから抗体が検出されるまでのウィンドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた¹⁾²⁾。そこで、血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは1999年7月1日から原料血漿プールでHCV-RNAの核酸増幅検査(NAT)を実施することになった。すでにイギリスをはじめオランダ、ドイツ、イタリア、アメリカ合衆国の各国では標準品やランコントロールを作製しており、NATを実施する施設で使用されていたが、HCV-RNA量がコピー数やgenome equivalent等まちまちの単位で表示されていたので、標準品のHCV-RNA量やNAT法の感度を相互に比較することが出来なかった。イギリスのNIBSCによってHCV-RNA

の国際標準品作製のための国際共同研究が組織され、1997年10月にWHO国際標準品(96/790)が制定され、国際単位を用いて各国参照品の力価を比較することが可能になった³⁾⁴⁾。わが国においては厚生省告示第427号によって、平成13年3月1日から製造され、又は輸入される血液製剤の原料血漿についてB型肝炎ウイルスDNA、C型肝炎ウイルスRNA及びヒト免疫不全ウイルスRNAに対するNATを実施しなければならないことに改められた。実際にはそれ以前に日本赤十字社の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿プールについてHCV-RNAのNATが実施された。しかし、施設ごとにNAT法が異なり、自家標準品やキットの標準品の表示単位が統一されていなかったため、それぞれの施設での感度や精度を比較・評価することができなかった。国際単位で表示された広く認められた標準品を用いて感度や精度を測定することにより、施設間の比較や評価が可能になると考えられた。一方、国際標準品

はその配布数も限られており、国際標準品に対して較正された我が国独自の国内標準品の作製が望まれていた。そこで、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略）はHCV-RNA量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、第一次HCV-RNA国内標準品を作製したので報告する。国際標準品は genotype 1 であるが、国内標準品は我が国で最も頻度の高い genotype 1b とした。現在、さまざまなウイルスについて臨床や研究の場で NAT が実施されているが、国内標準品として定められたものはまだない。その意味で、本標準品は我が国で初めて作製されたウイルスの NAT のための国内標準品でもある。

2. 材料および方法

1) 国内標準品候補の原料血漿の選択

日本赤十字社より供与されたHBs抗原、抗HIV-1/2抗体、HBV-DNA、HIV-RNAのすべてが陰性で、HCV陽性の血漿の中から日本で最も高頻度に見られる genotype 1b の2つの血漿 (119と122) を標準品の原料候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約 10^5 国際単位 (IU)/ml に希釈して -80°C で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA 国際標準品とともに参加施設に配布した。各施設は測定ごとに新しいバイアルの候補品を脱クリオ血漿で希釈して10倍希釈系列 (10^{-1} から 10^{-7}) を調製することとし、日を替えて2回定性的な方法でエンドポイントの測定を実施した。一重測定を原則としたが、日常的に二重測定を実施している場合は二重測定した (第1回測定)。このとき使用した国際標準品は小分けして -80°C に凍結保存して第2回測定に用いた。

2) HCV-RNA 国内標準品候補の作製と評価

1) で選択した血漿122 (PHA力価 2^{14} , RNA量 $2\sim 3\times 10^6$ IU/ml, 容量185ml) をあらためて約 10^5 IU/ml に脱クリオ血漿で希釈、0.5ml ずつガラス瓶に分注し -80°C で凍結して、HCV-RNA 国内参照品候補122 (候補品) とし、参加施設に送付した。各施設は初回は10倍希釈系列で予備的なエンドポイントを測定し、より正確なエンドポイントの値を得るために2回目以降はそのエンドポイン

トをはさんで7段階の $10^{0.5}$ 希釈系列を測定ごとに調製し、日を替えて4回測定を実施した (第2回測定)。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA 国内標準品候補のWHO国際標準品に対する力価を推定した。

3) 参加施設と測定方法

日常的にHCV-NATを実施している9施設 (国内6施設、米国2施設、ヨーロッパ1施設) に候補品を配布し、7施設 (国内5施設、米国1施設、ヨーロッパ1施設) から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。

4) 測定値の分析

候補品、国際標準品についてそれぞれのエンドポイント濃度の対数値の平均を求め、その比を国際標準品に対する候補品の対数相対力価とする。施設ごとに国際標準品に対する候補品の対数相対力価とその95%信頼区間を推定した。7施設から得られた対数相対力価の加重平均を求めて候補品の対数相対力価を推定した。対数相対力価の真数は国際標準品に対する候補品の相対力価を現すので、真数の値を国際標準品の力価に乗じて候補品の力価を推定した。

3. 結果

1) 参加施設が実施した測定方法

血漿分画製剤製造所5施設 (国内3, 海外2)、公的機関1施設、その他1施設の合計7施設から結果が返送された。Table 1に参加施設を表すコード番号、抽出法、検出法を示す。4施設がアンプリコアHCV (Ver. 1) 変法、2施設が自家法のnested PCR法、1施設が自家法のsingle PCR法を用いて測定した。反応当たりの試料の量は40~400 μ lの血漿に相当した。

2) 原料血漿の選択

国内標準品は様々なNAT法に使用されるので、候補品にふさわしい原料を選択する目的で、第一回測定では2つのHCV陽性血漿119と122を希釈した試料を配布して測定した。大きな相違がなかったので、より多くの標準品の作製が可能のように容量の大きい血漿122を候補品の原料として選択した。血漿122のHCVコア領域の塩基

Table 1 Assays used in the collaborative study.

Laboratory	Assay	Extraction ^a	Eq. Vol. Amplified ^b
1	Amplicor	R&D	100
2	In-house single PCR	In-house NaI	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	Amplicor	R&D	100
5	Amplicor	QIAamp	400
6	In-house nested PCR	R&D	100
7	In-house nested PCR	R&D	100

a) R&D : Smi-test EX-R&D (Nippon Genetics Co. Ltd.)

Amplicor : Amplicor HCV version 1 (Roche)

QIAamp : QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

b) Eq. Vol. Amplified : the equivalent volume of sample that was amplified in an assay

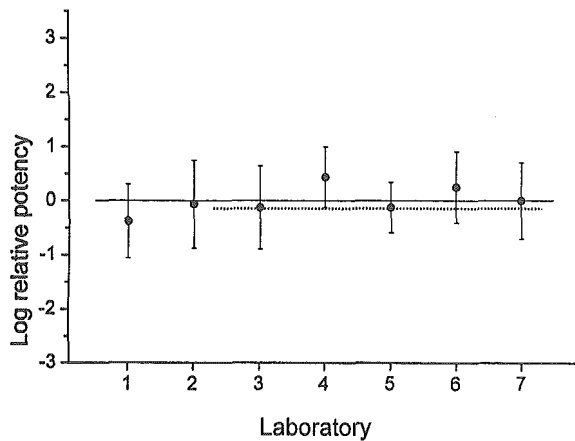


Fig. 1 Log relative potency of candidate 122 to the international standard (96/790). The laboratory code number and assay methods are explained in Table 1. The solid line indicates the mean log relative potency calculated from all data, $-0.001 (-0.204 + 0.201)$. The dotted line indicates the mean log relative potency calculated from the data excluding those of the laboratories 1 and 2, $+0.066 (-0.161 + 0.292)$.

配列を決定して genotype 1b であることを確認した。

3) 候補品 122 の国際標準品 (96/790) に対する力価の推定

あらためて候補品を送付し、7施設において $10^{0.5}$ 稀釈系列で測定した (第2回測定)。5施設で独立の4回の測定、2施設で各2回繰り返し測定を独立に4回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する候補品の対数相対力価を求め

Table 2 Estimated log potency of candidate 122 calibrated against the international standard (96/790). Overall (a) = the overall mean log potency calculated from all laboratories. Overall (b) = the overall mean log potency calculated from data excluding those of laboratories 1 and 2.

Laboratory	log ₁₀ IU/ml		
	Mean	Minimum	Maximum
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
Overall (a)	5.00	4.80	5.20
Overall (b)	5.07	4.84	5.29

た。なお、エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。また、不連続な陽性結果を含む場合は希釈率の高いほうをエンドポイントとした。施設毎に候補品の国際標準品に対する対数相対力価とその95%信頼区間を求め、全施設の測定結果を用いて候補品の国際標準品に対する対数相対力価を推定した。Fig. 1に示すように全施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log_{10} 10^{-0.001}$ であった。WHO国際標準品 (96/790) の力価は 10^5 IU/ml であるから、候補品の力価は $10^{5.00}$ ($10^{4.80 \sim 5.20}$) IU/ml、即ち 100,000 IU/ml

と推定された (Table 2).

参加7施設中, 施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった. また施設2では不連続な陽性結果が多く, 測定結果のばらつきが大きかった. そこで, この2施設を除く5施設の測定結果を用いて分析した結果, 5施設の結果は誤差の範囲で一致し, 国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{0.066}$ であった (Fig. 1). よって, 候補品の力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.84 \sim 5.29}$) IU/ml, 即ち 116,300 IU/ml と推定され, 全施設の結果を用いた分析結果と有意な相違は認められなかった (Table 2). 最尤法で本研究の測定値を分析すると候補品の推定力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.86 \sim 5.30}$) IU/ml となり, 2つの分析法による推定値はよく一致した.

以上の結果から, 候補品 122 の国際標準品に対する力価は $10^{5.00}$ IU/ml と推定され, 力価 100,000 IU/ml の国内標準品として 1999 年 12 月に小委員会承認された.

4. 考 察

一般に個々の施設で国際標準品に対する2次標準品を作製すると新たな誤差が生じるので, 異なる2次標準品を用いて測定した結果を相互に比較するのは困難である. HCV-RNA NAT 試験において異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理を実施するためには性状が詳しく調べてある広く認められた共通の標準品が必須である. 本共同研究によってわが国で初めて, 国際単位表示された HCV-RNA の国内標準品が制定された. 候補品の 95% 信頼区間は力価 $10^{5.00}$ IU/ml に対して $10^{4.80 \sim 5.20}$ IU/ml であった. また参加施設のなかの力価の最大は $10^{5.44}$ IU/ml (施設 4), 最小は $10^{4.63}$ IU/ml (施設 1) で $10^{0.81}$ 倍の相違であった (Table 2). これらの値はエンドポイントの測定を $10^{0.5}$ 倍希釈系列で実施したことを考慮すると十分に小さいといえる. これは本共同研究の参加施設を日常的に HCV-NAT を実施している信頼性の高い施設に限ったためと考えられる. 国内標準品は分与される予定であるので, 血液製剤の安全性確保のための NAT 試験法や診断薬の評価, 臨床

検査センターにおける HCV-RNA 検査の評価に広く用いられるようになれば, 相互の性能を容易に比較することが可能になり, 試験法・検査技術の向上が期待できる. 各施設で国内標準品を用いて繰り返し測定することにより有効検出限界の推定値を得ることが可能である. こうして得られた有効検出限界をもとに, たとえば 95% 陽性反応を得られる濃度と 50% 陽性反応を得られる濃度の標準品を常に測定に加えた測定結果を集積し, 継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ることが望まれる.

5. 結 論

血漿の HCV-RNA の NAT のための国内標準品を作製した. 国内標準品は HCV 抗体陽性の HCV genotype 1b 陽性血漿を脱クリオ血漿で希釈し, 0.5ml ずつバイアルに分注, -80°C で凍結保存したもので, その力価は 100,000 IU/ml である.

謝辞: 本研究で作製した国内標準品は国内献血血液から製造された. 本共同研究は厚生労働省科学研究費補助金「医薬安全総合研究事業, 血液製剤の安全性向上に必要な試験法評価法の開発と改良に関する研究」の助成により行われた.

文 献

- 1) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM, Nübling CM, Willkommen H, and Lower J: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet*, 345: 1173-1174, 1995.
- 2) Vrieling H, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang*, 68: 55-56, 1995.
- 3) Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang*, 76: 149-158, 1999.
- 4) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and The Collaborative Study Group: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. *Vox Sang*, 78: 217-224, 2000.