

- Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4 : 469-473, 1997.
- 4) 西澤美香, 小島俊行, 川名 尚 : トキソプラズマ Avidity 測定用試薬「プラテリア トキソ IgG (TMB) Avidity 測定用補助試薬」の評価. 第 54 回日本感染症学会 東日本地方会総会 抄録.
 - 5) Katow S : Rubella virus genome diagnosis during pregnancy and mechanism of congenital rubella. *Intervirology*, 41 : 163-169, 1998.
 - 6) Mouly F, Mirlesse V, Meritet JF, et al : Prenatal diagnosis of fetal varicella-zoster virus infection with polymerase chain reaction of amniotic fluid in 107 cases. *Am J Obstet Gynecol*, 177 : 894-898, 1997.
 - 7) 「C 型肝炎ウイルス等の母子感染防止に関する研究」(主任研究者 白木和夫): 平成 15 年度 総括・分担研究報告書, 2004 年 3 月, 厚生労働科学研究費補助金, 肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野).
 - 8) 山崎一美, 白浜 敏, 辻 研一郎, 他 : 母児間感染抑制をめざした HBV ワクチンの効果-25 年後の実益-. 第 79 回日本感染症学会 抄録集. 感染症誌, 79 : 臨時増刊号, p218, 2005.
 - 9) Daiminger A, Bader U, Enders G : Pre-and periconceptional primary cytomegalovirus infection : risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOG*, 112 : 166-172, 2005.
 - 10) 宮本智子, 加藤真子, 曲山さち子, 他 : 看護学生における抗体保有率に関する研究-風疹ウイルス, トキソプラズマ, サイトメガロウイルス, 単純ヘルペスウイルスについて-. 日本母性衛生学会誌, 46 : 341-347, 2005.
 - 11) Demmler GJ : Screening for congenital cytomegalovirus infection : a tapestry of controversies. *J Pediatr*, 146 : 162-164, 2005.
 - 12) 喜多恒和, 他 : HIV 感染妊婦の実態調査とその解析および HIV 感染妊婦とその出生児に関するデータベースの構築. 平成 16 年度 HIV 母子感染全国調査 研究報告書. 「HIV 感染妊婦の早期診断と治療および母子感染予防に関する臨床的・疫学的研究」班 (主任研究者 稲葉憲之) pp9-26.

産科領域における風疹対策

種 村 光 代

金 原 出 版 株 式 会 社



産科領域における風疹対策

種 村 光 代*

要 旨

2004年4月、厚生労働省より風疹の再流行予測が通知された。その9月には「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」がまとめられ、厚生労働省は風疹対策の強化を都道府県や医師会へ要請することとなった。緊急提言IIでは、風疹罹患（疑いを含む）妊娠女性への対応が示されている。その対応指針の主たる目的は、抗体陰性の妊婦を発見して感染予防の指導を行うとともに、分娩後の風しんワクチン接種を勧奨することである。一方、血清抗体価より風疹が疑われた妊婦への対応では、何よりも重要なのが問診である。母体に発疹や風疹患者との接触がなければ先天性風疹症候群は稀であり、職場や近隣での流行状況などについての問いかけが重要である。

はじめに

風疹とは、主に小児に認められる急性の発疹性ウイルス感染症であり、春先から初夏にかけて流行する。2,000～5,000人に一人くらいは、脳炎や血小板減少性紫斑病など重症になることがあるが、子供ではほとんど軽い病気である。しかし、成人では症状が長びいたり、関節痛がひどかったりするばかりか、妊娠初期の女性が罹患すると、難聴、心疾患、白内障、あるいは精神や身体の発達の遅れなどの障害をもった先天性風疹症候群の児が出生する可能性がある。

日本以外の欧米先進諸国の大半では、風しんワクチン接種の徹底により先天性風疹症候群患児の出生を危惧することは少なくなっている。先天性風疹症候群どころか、米国疾病対策セン

ター(CDC)は、2005年3月21日に、海外で感染してから米国に入国した「輸入症例」以外に風疹患者の発生はゼロになったとして「風疹の排除に成功した」と宣言している。ところが、いまだ日本は、メキシコ、ロシアに次ぐ米国への風疹の輸出国であるとされている。

I. 風疹再流行

もともと当施設では、1992年の流行頃より、妊娠女性の風疹についての相談を専門的に受け付けていた。しかし、一時期実施されていたMMRワクチンと女子中学生への風しんワクチン接種の効果のおかげか、2000～2003年頃は風疹の流行もかなり沈静化し、先天性風疹症候群

* Mitsuyo TANEMURA 名古屋市立大学大学院医学研究科生殖・発生医学

[連絡先] ☎ 467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市立大学大学院医学研究科生殖・発生医学

の発生も年間1件程度までに減少していた。一方では、1994年のワクチン接種法の改正により1979年4月から1987年10月生まれの世代で風しんワクチン接種率が非常に低く、なおかつ流行が沈静化した時期に小児期を過ごしてきたため、自然感染もないまま未免疫で妊娠を迎えることになる。当施設では、2003年の夏から徐々に妊婦の風疹に関する問い合わせの件数が増え始め、風疹の流行のきざしかと危惧していたところ、とうとう、2004年4月に厚生労働省より風疹の流行予測が通知され、異例の注意喚起がなされた。

同時期より、風疹の再流行を憂う小児科や産婦人科の有志らにより、一般成人も含めた風しんワクチン接種をポスターなどで推奨する動きが出始めていた。しかし、残念ながらその夏に九州などの一部地域で局地的な大流行が発生した。9月には、厚生労働科学研究「風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究」（班長：平原史樹・横浜市立大学大学院医学研究科教授）により「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」¹⁾がまとめられ、厚生労働省は風疹対策の強化を都道府県や医師会へ要請している。しかし、2004年の1年間に先天性風疹症候群の赤ちゃんが10例出生したことは記憶に新しい。年間に発生する先天異常の症例数としては決して多くはないが、それ以前に比べれば約10倍の発生件数である。さらに、報告もれや軽症の障害、流産や死産も含めると、かなり多くの妊婦さんと赤ちゃんが風疹流行の影響を受けたであろうと推察されている。

II. 風しんワクチン接種の勧奨

「風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言」には、I 風疹予防接種の勧奨、II 風疹罹患（疑いを含む）妊娠女性への

対応、III 流行地域における疫学調査の強化について、詳しい説明がなされている。そもそも風疹が再流行しはじめた原因は、予防接種法の改正後に風しんワクチンの接種率が著しく低下したためと推察されている。そこで、まず第一に風しんワクチン接種の勧奨がされている。

冒頭に述べたように、風疹は小児の場合にはあまり重くない病気であるため、保護者にとっては風しんワクチン接種の必要性を感じにくい。そのため麻しんワクチン以上に接種もれが多く、医療従事者ですら軽視しがちであった。しかしながら、まれに脳炎や血小板減少性紫斑病などの合併症を起こすことがあるのも事実であり、予防接種はこのような風疹の重篤な合併症の予防や、まわりの成人が感染して重症になることも予防する。本人の健康上にも有用であるうえ、成人男性も含めて多くの人々が予防接種を受ければ、個人が風疹から守られるだけでなく、妊婦を含め、ほかの人に風疹をうつすことが少なくなり、社会全体が風疹から守られることになる。

III. 成人女性への風しんワクチン接種

極論すれば風疹の予防接種を行う第一の目的は、先天性風疹症候群を予防することである。日本では風疹の予防接種率が低いため、2004年のように各地で散発的な小流行が生じている。その結果、風疹に罹患したことがなかったり、予防接種でつけた免疫が弱くなってしまった妊婦が流行にまきこまれてしまう。風疹の予防接種を受けたことがない女性には、なるべく早く、妊娠を計画する前に予防接種を受けることを勧奨する必要がある。

風疹の流行地域では、たとえ風疹の既往歴があったとしても、風疹 HI が8~16倍程度では再感染する可能性や先天性風疹症候群の患児が出生する危険性を否定はできない。低免疫の

ケースに追加の予防接種を実施しても特別な副反応が起こるなどの問題はなく、むしろ風疹に対する免疫を強化する効果が期待されるため、積極的に勧奨すべきである。

ただし、妊娠中は風疹の予防接種を受けることはできない。妊娠可能な年齢の女性には、妊娠していない時期（月経中、またはその直後）に接種を行い、その後2カ月間の避妊指導が必要である。ただし、妊娠中に風しんワクチン接種を受けたために胎児に障害が出たという報告はこれまではない。万が一、接種後2カ月以内に妊娠した、あるいは妊娠中に誤って接種してしまったとしても、妊娠をあきらめる必要はない。

更に、接種を受けた者から妊婦に風しんワクチンのウイルスがうつる可能性もまずないと言ってよい。風しんワクチン接種後3週間以内に、咽頭から一過性にワクチンウイルスの排泄が認められることがあるが、ワクチンウイルスが周囲の人に感染したとの確かな報告はこれまでにない。むしろ、流行期になれば、接種を受けていない家族が自然に風疹に感染し、そこから妊婦が感染を受けるほうがリスクは高いと考えられる。

IV. 妊娠中の風疹抗体検査

風疹に関する緊急提言IIでは、風疹罹患（疑いを含む）妊娠女性への対応が示されている。なぜならば、第一番目に提言された風しんワクチン接種勧奨の効果が十分に現れるまでには、ある程度の期間が必要だからである。これから先、しばらくは続く可能性のある風疹の流行期に妊娠する女性たちへの対策が示されたのである。

ここで強調したいのは、「先天性風疹症候群の発生抑制」とはいうものの、胎児の診断や感染した胎児をあきらめることを推奨しているの

ではない点である。提言では妊娠初期の風疹抗体の測定が推奨されているが、その目的は抗体の陰性者を早期に発見して対策を講じることであり、先天性風疹症候群のスクリーニングを目的とはしていない。あくまでも抗体のない女性に対する妊娠中の感染予防指導と、分娩直後の風しんワクチン接種を重視している。

まずは、妊娠初期の女性にはできるだけ早期に全例、風疹についての問診と、抗体の検査を実施する（図1）。妊娠する前の検査でHI抗体が陽性であっても、時間の経過とともに免疫が低下していることは稀ではない。特に、低免疫（HI抗体価8~16）であった場合には、これまでにワクチン接種歴や既往歴があっても安心できないことをよく説明する必要がある。

実際には抗体検査よりも重要なのが問診である。発疹などの症状がない場合に、妊娠初期の1回の抗体測定だけで先天性風疹症候群の危険性を予知することはかなり難しい。まずは発疹などの風疹を疑う症状の有無をよく確認して、さらに風疹患者との接触がなかったかも詳しく問診してゆく。小児や風疹患者と接触する可能性の高い職業、例えば保母、教師、医療関係者などの場合には特に注意して問診を行う。風疹の流行に関する定点報告は小児科からの報告が主となっているため、成人患者が多くなっている最近の風疹流行は早期に察知されにくい。したがって、職場や近隣での流行状況などについても意識を促すような問いかけが必要である。

次に、妊婦の場合に測定すべき風疹抗体は、一般的には赤血球凝集抑制試験（HI抗体価）が望ましい。本来の感染症の診断であれば、発症直後と2~4週間後の血清を保存し（ペア血清）、同じ基準で同時に測定して抗体価の4倍以上の上昇あるいは下降が認められれば、その感染症に罹患したと推定される。しかし、妊婦全例を対象としたスクリーニングという観点からは、できるだけ少ない検査回数、低価格で効率的に判断できる方法がベストである。通常、風疹HI

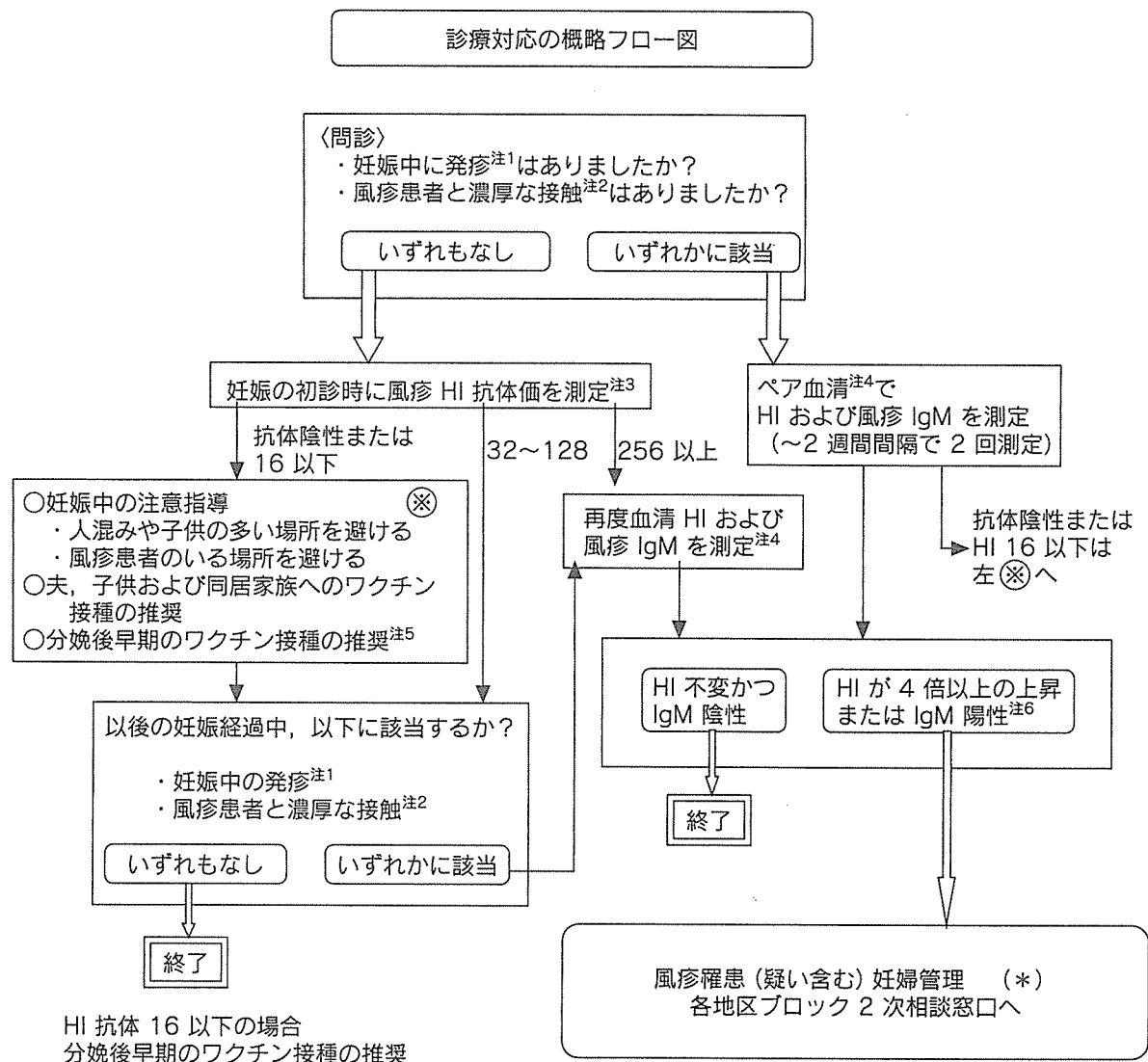


図1 妊娠女性への対応診療指針（注釈は原文参照）
（風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言，2004¹¹⁾）

抗体価が 256 以上を示す場合に追加の検査が必要であると判断されている。

風疹特異的 IgM 抗体は感染の初期だけに上昇するとされている。ただ、一般の妊婦全例に対して、はじめてから風疹特異的 IgM 抗体を測定するには注意を要する。風疹特異的 IgM 抗体には擬陽性もあったり、感染から 1 年以上も陽性を示す場合が存在する。結果によっては、必要以上の不安を妊婦に与えてしまう危険性も否定できない。したがって、問診や初回の HI 抗体価の検査で風疹が疑われた場合にのみ追加すれ

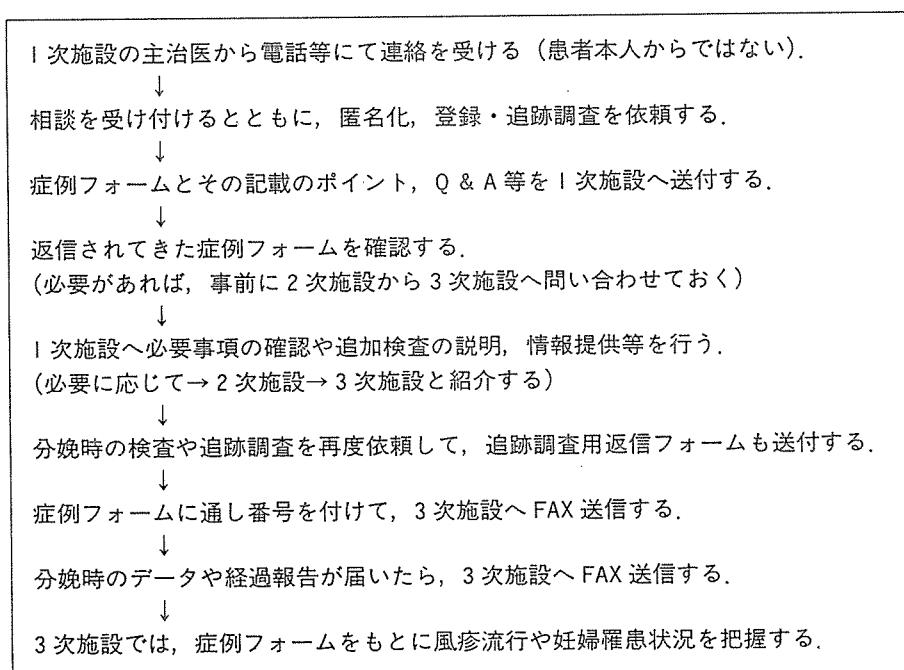
ばよい。

抗体検査を実施するうえで最も重要なことは、まずはできる限り妊娠の早期に測定することである。抗体陰性者への感染予防の指導のためには早いにこしたことはない。また、測定した以上は結果を早く確認すること、感染が疑われたら速やかに追加検査を検討することである。妊娠初期は 4 週間ごとの妊婦健診であるが、風疹の検査結果は早めに説明を受けるように指導することが望ましい。また、風疹罹患について判断する場合には、HI 抗体の推移も重要で

表 1 各地区ブロック 2 次相談窓口施設

北海道	北海道大学附属病院産科	水上尚典
東北	東北公済病院産婦人科	上原茂樹
	岩手医科大学周産期母子センター	室月 淳
関東	三井記念病院産婦人科	小島俊行
	帝京平成短期大学	川名 尚
	横浜市立大学附属病院産婦人科	平原史樹
	国立成育医療センター周産期診療部	久保隆彦
東海	名古屋市立大学病院産科婦人科	種村光代
北陸	石川県立中央病院産婦人科	干場 勉
近畿	国立循環器センター周産期科	池田智明
	大阪府立母子センター産科	末原則幸
中国	川崎医科大学附属病院産婦人科	中田高公
四国	国立香川小児病院産婦人科	夫 律子
九州	宮崎大学附属病院産婦人科	金子政時
	九州大学附属病院産婦人科	吉村宣純

(風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言, 2004¹⁾)



(FAX による通信を原則としている。)

図 2 各地区ブロック 2 次相談施設での対応

あるため、精査を行う場合には、風疹特異的 IgM 抗体だけでなく、HI 抗体の再検査も行うべきである。

V. 妊娠中の風疹予防対策

風疹抗体価が陰性であった、あるいは低免疫 (HI 抗体価 8~16) であった妊婦には、人ごみ、

2次施設名 ()		症例番号 ()	
風疹症例フォーム			
		平成	年 月 日
		(週	日)
貴施設症例番号 ()			
生年月日	年 月 日	年齢:	歳
住 所			
職 業 歴			
既 往 歴			
風疹既往歴:	あり	なし	不明
ワクチン歴:	あり (歳)	なし	不明
抗体測定歴:	あり	なし	不明
「あり」の場合:		歳, 測定値:	
月 経 歴	初経: 歳	周期: 日	持続: 日
産 科 歴	G ()	P ()	
子 ども	() 名		
子ども, 夫の風しんワクチン歴:			
	あり	なし	不明
貴施設初診日	年 月 日	妊娠週数:	w d
最終月経	年 月 日		
予 定 日	年 月 日		
現 病 歴			
発疹の有無:	あり	なし	不明
風疹患者との接触:	あり	なし	不明
周囲での流行の有無:	あり	なし	不明
抗体測定値:			
貴施設名			
主治医名			
連 絡 先			

図 3-a 問い合わせ用風疹症例フォーム

とくに子どもの多い場所を避けるように指導するべきである。また、妊婦自身は風しんワクチン接種は受けられないので、ご主人やお子さんへの予防接種を勧奨している。これは、風しんワクチン接種を受けても抗体獲得ができない女性たちの場合にも同じであり、妊娠を計画する前に家族に風しんワクチン接種を受けてもらうように説明している。

これらの症例に対する先天性風疹症候群予防

対策のためのもう一つの指導は、分娩後の風しんワクチン接種である。この場合、接種もれを防ぐためには、分娩直後の退院する前に接種をすることをお奨めしている。授乳に影響するようなこともない。実際のところ、出産直後は妊娠の可能性の少ない安全な時期である。出産直後はワクチンの効果が低い、あるいは副作用が強いという報告はないため、産科入院中でも可能である。ただし、授乳中だから妊娠しないと

貴施設症例番号 ()

患者氏名は匿名化して、貴施設ごとの症例通し番号を付けて下さい。

生年月日 年 月 日 年齢： 歳 重要。

住 所 市町村レベルまでで結構です。

職 業 歴 何を、いつから、いつまで。子どもとの接触の多寡について。

既 往 歴

風疹既往歴： あり なし 不明

いつ？ 周囲でも流行していたか、はっきりとした記憶があるか？

診断根拠（抗体測定は？）

ワクチン歴： あり（ 歳） なし 不明

多分とかおそろくではなく、明らかな記憶があるか、記録、証明の有無も確認する。

また、ワクチン後の抗体獲得の有無の確認は？

抗体測定歴： あり なし 不明

「あり」の場合： 歳、測定値：

数値の確認を、前医への問い合わせ、母子手帳の確認。

月 経 歴 初経： 歳 周期： 日 持続： 日

産 科 歴 G () P () 抗体測定歴は？

子 ども () 名 重要。

子ども、夫の風しんワクチン歴：

あり なし 不明

貴施設初診日 年 月 日 妊娠週数： w d

最終月経 年 月 日

予 定 日 年 月 日

現 病 歴

発疹の有無： あり なし 不明

ありの場合、発疹の時期、特徴、持続期間、他の症状の有無なども記載して下さい。

風疹患者との接触： あり なし 不明

ありの場合、いつ、どこで、どの程度の接触があったのか記載して下さい。

周囲での流行の有無： あり なし 不明

抗体測定値：

検査の日付と妊娠週数、検査会社名、検査方法、カットオフ値など。IgG よりも HI を、IgM は EIA 法を、原則的にペア血清で2回測定。

できれば施設内検査でなく企業で。

残血清検体の有無の確認を依頼してください。

図 3-b 風疹症例フォームの記載のポイント

いう保証はないので、出産後から数カ月たってしまった場合には、たとえ授乳中であっても避妊指導は不可欠である。

VI. 妊娠中に風疹を疑われたら

万が一、妊娠中に発疹が出てしまったり、風疹患者と接触した場合には、まずは電話で連絡

するように説明しておく。いきなり産婦人科に来院されてしまうと、周囲の他の妊婦さんへ感染させてしまう危険性があるためである。診察時間をずらしたり、内科や皮膚科と連携して確定診断を受けるように配慮する。

一方、妊婦自身には何も症状がなく、風疹患者との接触がなければ、抗体検査の結果から風疹の疑いがあると判断されても、過剰な心配は禁物である。周囲で風疹が流行していないかど

うかの再確認、ワクチン接種歴や既往歴の詳細などを注意深く問診しなおすこと、風疹抗体の再検査は必要であろう。しかしこのような症例からの先天性風疹症候群の発生は、流行地域を除けば極めて稀である。

先天性風疹症候群の出生も確かに問題であるが、このような風疹疑い症例での無用な人工妊娠中絶の増加も懸念されている。当施設でこれまでに胎児診断を実施した114例のうち、発疹あり、接触ありという症例では胎児の感染率は60%にも及んだが、いずれにも相当しなかった妊婦の場合は胎児の感染率はわずかに4.2%であった。胎内感染が陽性でも先天異常を示さない児もいるため、実際の先天性風疹症候群の発生率はもっと低いと予想される。さらにワクチン接種歴が明らかであった妊婦に至っては、胎児への感染率はゼロであった。

以上をふまえ、まずは主治医（第1次施設）から第2次専門施設（表1）に問い合わせ、追加すべき問診内容や検査について検討する（図2）。この際には、問い合わせ用の専用書式（図3-a, b）を用いて、主治医から妊婦への再問診を依頼している。そのうえで2次施設、場合によっては第3次専門施設からのコメントをもとに、主治医から妊婦への結果説明とカウンセリングを実施してもらっている。

VII. 胎児の検査

風疹と診断されて妊娠継続を迷う症例に対し

ては、十分なカウンセリングのうえで夫婦からの強い希望があれば胎児診断も考慮される。羊水や胎児血などを採取し、polymerase chain reaction (PCR) 法の応用によりウイルスのRNAを検出して胎児の診断を行う方法である³⁾。ただし、発疹や風疹患者との接触もなく、抗体検査のみで風疹を疑われた妊婦の場合、実際にはほとんど先天性風疹症候群の発生が認められていない。このような症例に対して、母児ともに侵襲性のある検査をするか否かは安易に決定されるべきではない。また本検査で胎児感染が陽性と判定されても、必ずしも先天性風疹症候群としての先天異常を示さない。感染のみにとどまるケースも少なくないのである。

当施設でも、たとえ胎児感染の結果が陽性であっても出産を決意されたご家族が多数存在する。検査後の専門医からのカウンセリングは不可欠であり、胎児診断はあくまでも妊娠継続を決断していただくための補助的な胎児の精密検査であると考えている。

文 献

- 1) 厚生労働科学研究「風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究」(班長：平原史樹)：風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言，2004
- 2) Tanemura M et al: Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction; A study of 34 cases diagnosed in fetuses. Am J Obstet Gynecol 174: 578-582, 1996

Short communication

Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H

Toshiaki Mizuochi*, Yoshiaki Okada, Kiyoko Umemori,
Saeko Mizusawa, Kazunari Yamaguchi

*Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen Musashi-Murayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan*

Received 26 January 2006; received in revised form 15 March 2006; accepted 21 March 2006

Available online 16 May 2006

Abstract

Genetic variability of the hepatitis B virus (HBV) constitutes one of the major challenges for diagnosis of HBV infection. It is plausible that amino acid substitutions in the “a” determinant of the HBV surface antigen (HBsAg) that affect antigenic sites, whether originating from genetic diversity or from mutations in the HBV strain itself, will affect the sensitivity of some diagnostic kits. In fact, recent studies have indicated that some diagnostic kits had false negative results with particular HBsAg mutants. There have been, however, few substantial studies evaluating sensitivities of diagnostic kits to the HBsAg encoded by different HBV genotypes. Our recent study found that 10 diagnostic kits available in Japan were able to detect HBsAg irrespective of whether it originated from HBV genotypes A, B or C, with the latter two genotypes being the dominant species in East Asia. In this study, we extended our previous efforts by assessing the ability of diagnostic kits to detect recombinant HBsAg derived from HBV genotypes A to H. Our results demonstrated that 9 out of 10 diagnostic kits evaluated were able to detect as low as 0.2 International Units (IU)/ml HBsAg, irrespective of HBV genotype. The genotypic differences in the HBV family thus appear to have little impact on the sensitivity of currently available HBsAg diagnostic kits.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HBsAg; Diagnostic kits; HBV genotype

Based on an intergroup divergence of 8% or more in the complete nucleotide sequence of approximately 3200 nucleotides, HBV has been classified into eight genotypes, designated as A to H (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1994; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002). The prevalence of specific genotypes varies geographically: genotypes A and D are widely distributed throughout the Old World, while genotypes B and C are dominant in East Asia. Furthermore, the distribution of HBV genotypes may vary over time and with population migration. It is therefore critical for diagnostic kits to be able to detect HBsAg encoded by various HBV genotypes with comparable sensitivity. Moreover, given the accumulating body of evidence that certain HBV genotypes correlate with disease features and treatment outcomes, including the severity of liver disease (Mayer et

al., 1999; Kao et al., 2000a; Orito and Mizokami, 2003), HBe antigen seroconversion (Chu et al., 2002; Ishikawa et al., 2002), and susceptibility to anti-viral drugs (Kao et al., 2000b; Wai et al., 2002; Kao et al., 2002; Zollner et al., 2004), from a treatment perspective the specificity and sensitivity of assays for sub-typing HBV genotypes is also critical. In our previous report (Mizuochi et al., 2005), we evaluated the sensitivity of 10 diagnostic kits to serum/plasma samples containing HBsAg as well as recombinant HBsAg encoded by HBV of genotypes A, B, and C. None of the diagnostic kits examined failed to detect HBsAg of genotypes A, B, and C at the concentration of 0.2 IU/ml. Furthermore, there was no difference between naturally derived antigens, i.e. serum/plasma samples, and recombinant antigens in the outcome of assays. In the present study, we sought to extend our previous study by evaluating the same diagnostic kits for their sensitivity to HBsAg encoded by HBV of all the genotypes reported to date, i.e. A to H.

Plasma specimens of HBV Genotypes A and D were obtained from International Reagents Corporation (Kobe, Japan).

Abbreviations: HBV, Hepatitis B virus; HBsAg, Hepatitis B virus surface antigen; IU, International unit

* Corresponding author. Tel.: +81 42 561 0771; fax: +81 42 562 7892.

E-mail address: miz@nih.go.jp (T. Mizuochi).

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) ^a
6	CLEIA	Polyclonal/monoclonal(×2) ^a
7	CLEIA	Monoclonal/monoclonal(×2) ^a
8	EIA	Polyclonal/monoclonal
9	CLIA	Monoclonal/monoclonal
10	CLIA	Monoclonal/monoclonal

CLIA: Chemiluminescent immunoassay; EIA: enzyme immunoassay; CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay.

^a (×2): Two different monoclonal antibodies.

Genotypes B and C were kindly supplied by Taiwan FDA and Japanese Red Cross, respectively. Genotypes E, F, G, and H were purchased from Teragenix Co. (Ft. Lauderdale, FL, USA). All the HBV full genomes except for genotype H were cloned into plasmids by the method described by Günther et al. (1995). All the plasmids containing HBV full genomes were able to produce HBsAg in culture supernatant by transfection into HuH-7 cells (Nakabayashi et al., 1982) with lipofectin reagent (Invitrogen Co., San Diego, CA, USA). The amount of HBsAg produced by each genotype of HBV is highly variable, depending on the promoter activity of each clone (data not shown). To minimize this variation among the genotypes, S genes were amplified by PCR from plasmids containing HBV full genomes and then cloned into the pEF6/V5-His (Invitrogen Co., San Diego, CA, USA) which has the elongation factor-1 α promoter to express the inserted S genes. The S gene of genotype H was amplified with DNA extracted from the plasma sample by PCR and cloned into the same plasmid. The genotypes of all the cloned S genes were determined by sequencing. Three micrograms plasmid of each genotype were transfected into 2×10^5 HuH-7 cells/well in a six-well culture plate (Asahi Technoglass Co., Chiba, Japan) with 10 μ g lipofectin reagent (Invitrogen Co., San Diego, CA, USA), and the cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂. Culture supernatants were harvested after 3 days and stored at –20 °C until use.

The concentration of each recombinant HBsAg sample was tentatively 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 sample was adjusted to 10 IU/ml with a multi-marker negative matrix (Accurun 810; BBI Co. Ltd., Boston, MA, USA). The samples were subsequently diluted to make two different concentrations (0.2 and 1.0 IU/ml). These test samples of various HBV genotypes were analyzed with 10 diagnostic kits as listed in Tables 1 and 2. Tests were performed according to the manufacturer's instruction and results were expressed as C.O.I. (cut-off index) as shown in Fig. 1A and B. All of the HBsAg samples, irrespective of their HBV genotype, tested positively in all assay kits at the concentration of 1.0 IU/ml (Fig. 1A). When the HBsAg samples at the lower concentration (0.2 IU/ml) were tested, 9 out of 10 kits gave positive

Table 2

HBsAg diagnostic kits used in this study listed in alphabetical order of manufacturers

Product name	Manufacturer
AxSYM HBsAg	Abbott Japan Co. Ltd.
IMx HBsAg	Abbott Japan Co. Ltd.
ARCHITECT HBsAg	Abbott Japan Co. Ltd.
PRISM HBsAg	Abbott Japan Co. Ltd.
ADVIA Centaur HBsAg Assay	Bayer Medical Ltd.
VIDAS HBsAg Ultra	bioMérieux Japan Ltd.
Monolisa HBsAg	Bio-Rad Fujirebio
Lumipulse II HBsAg	FUJIREBIO INC.
Vitros Immunodiagnosics	Ortho-Clinical
Products HBsAg Reagent Pack	Diagnostics K.K.
Elecsys HBsAg	Roche Diagnostics K.K.

Note: The order of kits in this table is not corresponding to that of Table 1.

results. Only one kit (No. 8) gave negative results for the HBsAg of genotypes E and F (Fig. 1B). This sensitivity (0.2–1.0 IU/ml) approaches the satisfactory criterion according to the “Guidance for Industry” issued by the FDA or the “CTS” (Common Technical Specification) defined by the EU. Only one kit failed to give positive results for the low concentration of HBsAg (0.2 IU/ml) encoded by the HBV of genotypes E and F (Fig. 1B). The results shown in this study thus confirmed the sensitivity of currently available diagnostic kits to HBsAg encoded by HBV of genotypes A to H.

Since HBsAg genotypes F and H are genetically distant from the other six genotypes (Norder et al., 2004), concerns have been raised as to the ability of the detection of these genotypes by currently available diagnostic kits. The data in this study

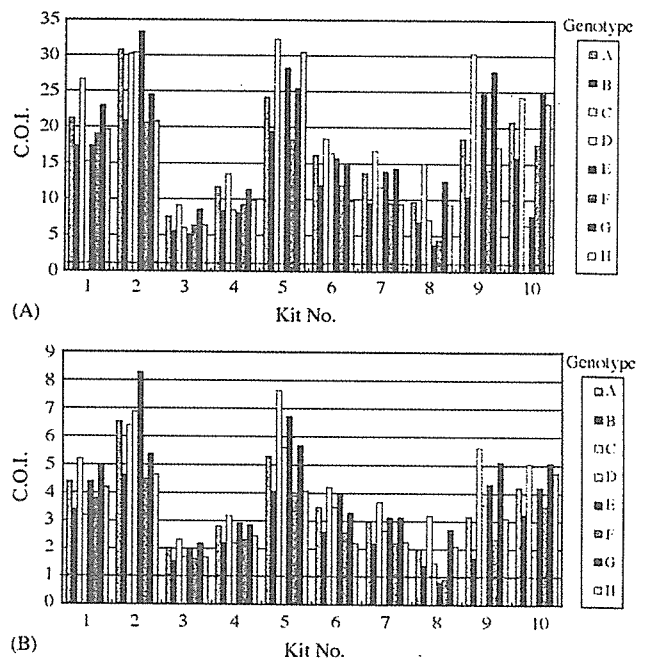


Fig. 1. Detection of recombinant HBsAg (A: 1.0 IU/ml, B: 0.2 IU/ml) derived from HBV of genotypes A to H were assayed by utilizing 10 diagnostic kits listed in Tables 1 and 2. Results were expressed as C.O.I. (cut-off index). The inserted horizontal lines indicate “C.O.I. = 1.0”.

show that 9 out of 10 kits tested are capable of detecting as low as 0.2 IU/ml HBsAg including HBV genotypes F and H, alleviating this concern.

Acknowledgments

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

References

- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B.H., Magnius, L.O., 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.* 83, 2059–2073.
- Chu, C.J., Hussain, M., Lok, A.S., 2002. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 122, 1756–1762.
- Günther, S., Li, B.-C., Miska, S., Kruger, D.H., Meisel, H., 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.
- Ishikawa, K., Koyama, T., Masuda, T., 2002. Prevalence of HBV genotypes in asymptomatic carrier residents and their clinical characteristics during long-term follow-up: the relevance to changes in the HBeAg/anti-HBe system. *Hepatol. Res.* 24, 1–7.
- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S., 2000a. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118, 554–559.
- Kao, J.H., Wu, N.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S., 2000b. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J. Hepatol.* 33, 998–1002.
- Kao, J.H., Liu, C.J., Chen, D.S., 2002. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J. Hepatol.* 36, 303–304.
- Mayerat, C., Mantegani, A., Frei, P.C., 1999. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral Hepat.* 6, 299–304.
- Mizuochi, T., Okada, Y., Umemori, K., Mizusawa, S., Sato, S., Yamaguchi, K., 2005. Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. *Jpn. J. Inf. Dis.* 58, 83–87.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42, 3858–3863.
- Norder, H., Courouce, A.M., 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.
- Norder, H., Courouce, A.-M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.-D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S., Magnius, L.O., 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289–309.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* 69, 2575–2583.
- Orito, E., Mizokami, M., 2003. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology* 46, 408–412.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R., 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* 81, 67–74.
- Wai, C.T., Chu, C.J., Hussain, M., 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.
- Zollner, B., Petersen, J., Puchhammer-Stockl, E., Kletzmayer, J., Sternecker, M., Fischer, L., Schroeter, R., Feucht, H.H., 2004. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 39, 42–50.