

Fig. 1. わが国における肝癌による死亡の推移およびその成因別の推移

傾向にあることがわかる。

日本肝癌研究会から報告された肝癌患者における HBs 抗原陽性率の年次推移をもとに、肝癌の成因について、その割合を死亡率に換算して示す (Fig. 1)。1970 年代以降 1990 年代後半まで、B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染に起因する肝癌死亡の増減はみられず、人口 10 万人対 3~5 人の値を示していることから、1975 年代後半から増加した肝癌死亡に寄与しているのは HBV の持続感染によらない (HBs 抗原陰性、非 A 非 B 型) の肝癌であることが明らかとなっている。

HCV 感染の特異的な診断が可能になった 1992 年以降については、非 A 非 B 型肝炎のほとんどは HCV の持続感染に起因する肝癌であることがわかる。1990 年代 (1994~1995 年²⁾) における集計結果では、肝癌の 96% は肝細胞由来の癌であり、その原因の 17% は HBV の持続感染に由来し、また、76% は HCV の持続感染に由来していた。

しかし 2000 年代 (2002~2003 年²⁾) に入り、HBV 由来の割合には変化がないものの、HCV 由来の割合がやや減少し (70%)、不明の原因 (非 A 非 B 非 C 型) に由来する割合が微増傾向にある。その理由については、現在のところ不明である。

地域別にみた肝癌死亡の推移●

1993 年から 2006 年における悪性新生物の「肝」 (肝および肝内胆管の悪性新生物) による死亡率¹⁾ が高い順に 10 位までの県をみると、14 年間に 10 位以内にランクされる県全体の 7 割を、中国・四国・九州に位置する県が占め、近畿を含めると、ほとんどすべてを占める。県ごとの年齢構成を調整していない粗死亡率での比較ではあるが、肝癌による死亡が高頻度に起こっている地域が西日本に偏在していることを示している。

三浦らによる全国市町村別のベイズ法による肝癌標準化死亡比の推移³⁾ から、二つの時期の分布図を並べて示す (Fig. 2)。

男性について人口 10 万人あたりの肝癌死亡が 12 人程度にとどまり、HBV 由来の肝癌が約半数を占めていた時期 (1971~1975 年) の分布図と、HCV 由来の肝癌が全体の 70% を占めるにいたった時期 (1996~2000 年) の分布図とを比較すると、肝癌死亡の高い地域は駿河湾沿岸、大阪湾沿岸、中国地方の瀬戸内海沿岸、そして九州北部に顕在化していることがわかる。

一方、肝発癌の年齢について、11,326 人の原発性肝癌の診断時の年齢を集計したもの⁴⁾ による

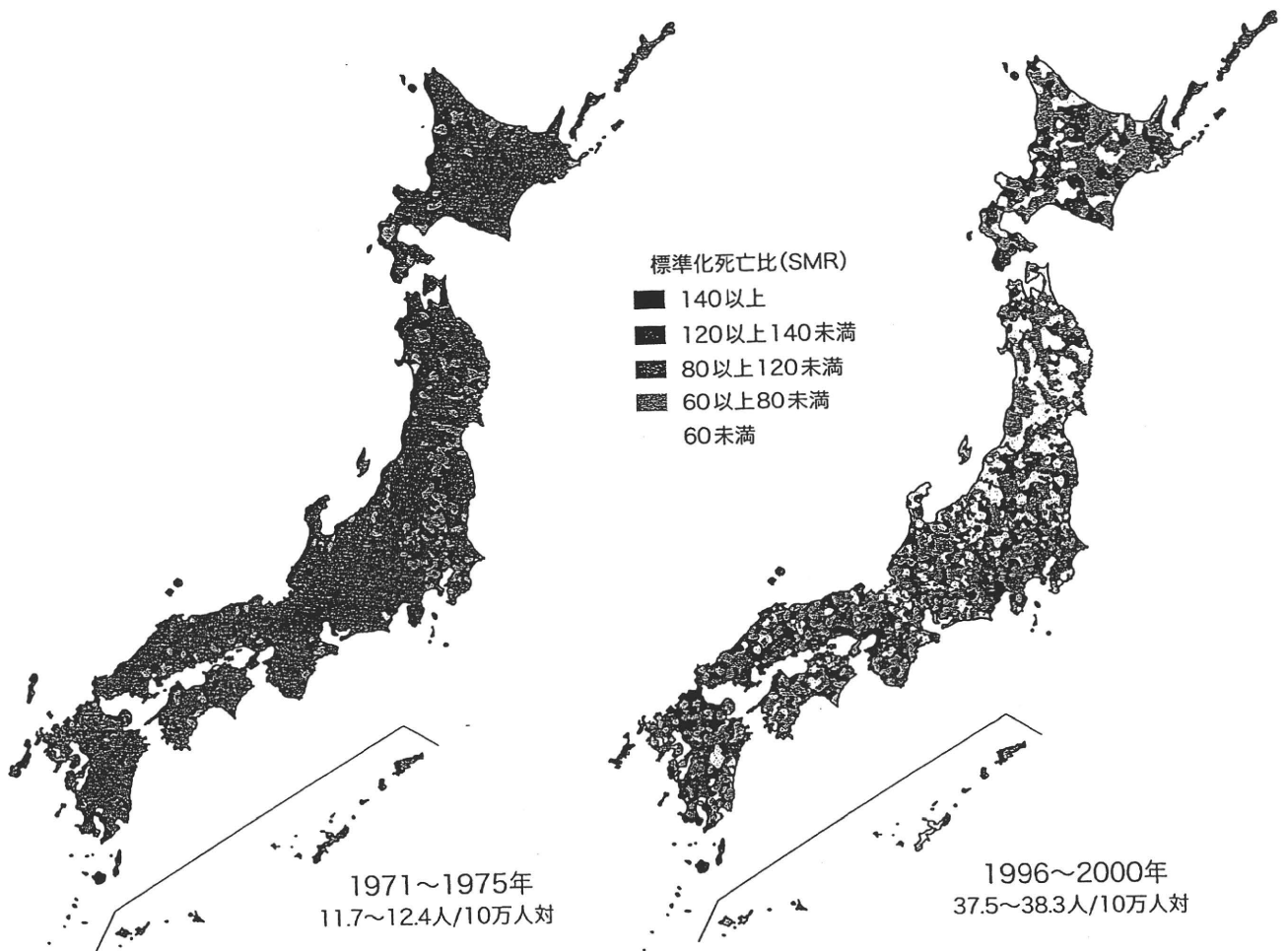


Fig. 2. 市町村別にみた肝癌標準化死亡比(ベイズ法)の推移(男性)

と、男性では45歳を過ぎる年齢から、女性では男性より5~10年遅れた年齢から、肝発癌と診断される患者数の急激な増加がみられる。また、6年間分の死亡小票をもとにした調査⁵⁾から、慢性肝疾患(肝硬変、肝癌)による死亡率は男性では50歳代以降から、女性では60歳代以降から高くなっていることが明らかとなっている。

さらに、臨床診断の基準を揃えたHCVキャリア942人を対象とし、マルコフ過程モデルを用いて40歳を起点とした肝発癌率を推計すると、男性では50歳を過ぎるころから、女性では60歳を過ぎるころから肝発癌率が上昇しはじめ、70歳の時点における肝発癌率は男性では約38%、女性では約20%に上る成績が得られている⁶⁾(Fig. 3)。

性、年齢、地域別にみた肝炎ウイルス(HBV, HCV)の感染率⁷⁾

わが国の一般集団における肝炎ウイルス感染率は、日本赤十字社血液センターの初回供血者の資料をもとにして算出することができる。全国の初回献血者3,485,648人(1995~2000年)を対象とした、8地域別(基幹血液センターの所在地を中心に分割)、出生年別(2000年時点の年齢換算)HBs抗原陽性率、HCV抗体陽性率の成績⁷⁾をFig. 4に示す。

HBs抗原陽性率を全体でみると0.6%であり、50歳代を中心とした前後の年齢層では1.5%と高い値を示している。8地域のいずれも同じ傾向が認められ、とくに北海道は、30~50歳代の集団では2~4%と、高い値を示している。

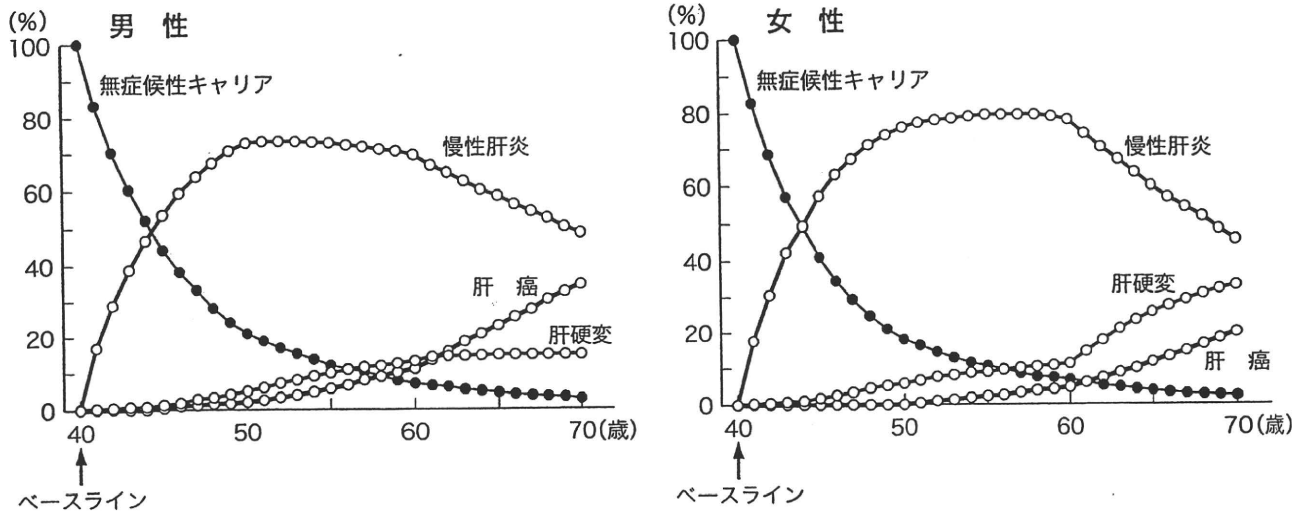


Fig. 3. HCV キャリアの生涯肝発癌率——各病態への累積罹患率(抗ウイルス療法を行わない場合)

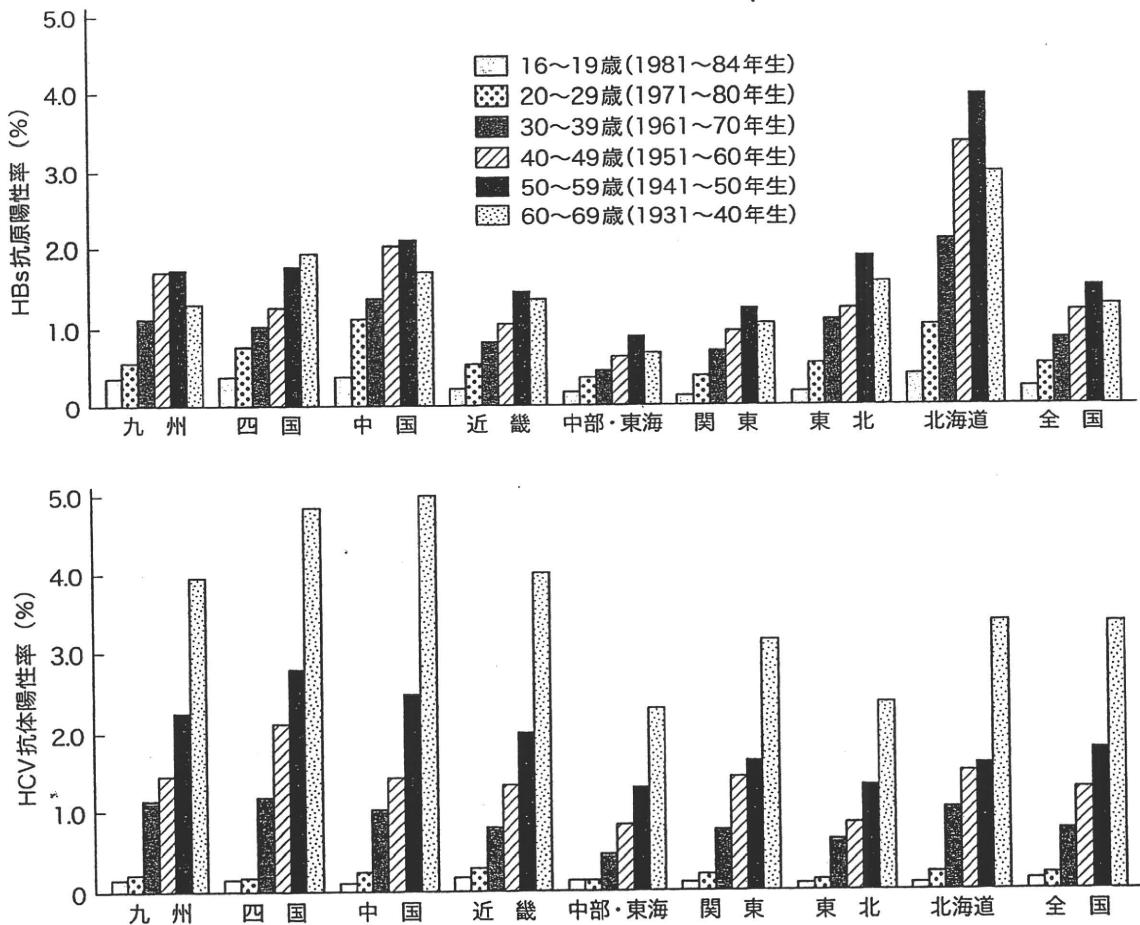


Fig. 4. 初回供血者集団における地域別, 年齢階級別にした HBs 抗原陽性率, HCV 抗体陽性率
 「日本赤十字社 初回供血者」
 1995.1-2000.12 3,485,648 人
 2000 年の時点の年齢に換算

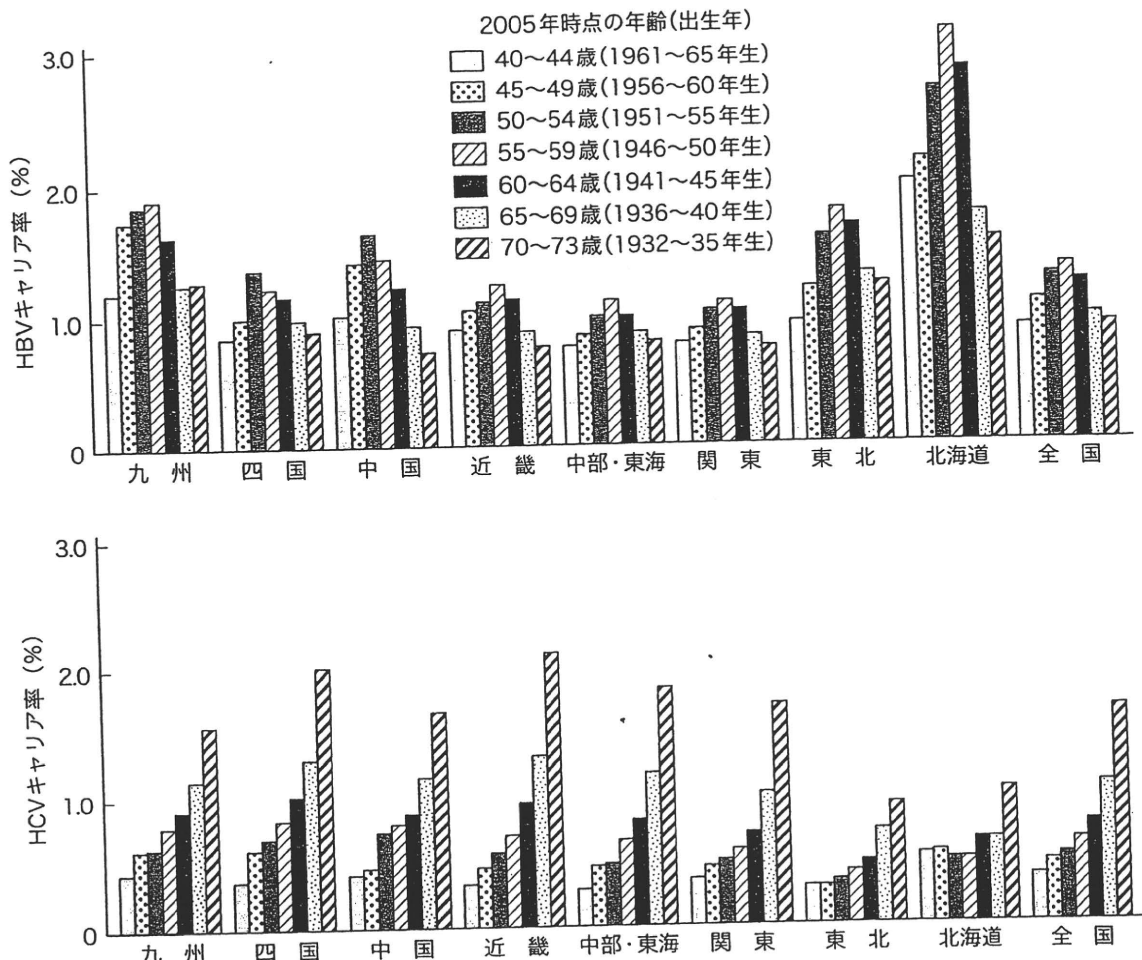


Fig. 5. 節目検診受診者における地域別、年齢階級別に見た HBV キャリア率, HCV キャリア率
[肝炎ウイルス検診 2002-2006 年度]

HCV 抗体陽性率を全体で見ると 0.5% であるが、年齢が高い集団で高い値を示す傾向がみられる。すなわち 20 歳代以下(1980 年以降の出生群)では 0.2% 以下ときわめて低い値を示すが、60 歳以上の年齢集団では 3% を超える高い値を示している。この傾向はいずれの地域にも認められ、とくに肝癌多発地域である西日本では、50 歳以上の年齢層における HCV 抗体陽性率が 2% を超えており、他の地域・年齢層に比べて高い値を示している。

これまで述べてきたことから、肝癌好発年齢を迎える 40 歳代を超える高年齢層における HCV キャリア率が他の年齢層よりも高い値を示していることが、肝癌死亡が増加したことの原因の一つと考えられる。一方、40 歳以下の若い年齢集団に

おけるキャリア率は、高い年齢集団と比べ低い値を示しており、加えて、一般集団における HCV の新規感染率は低率にとどまっている^{8,9)}ことから、わが国における肝癌発生の主な成因は縮小してきていると理解できる。また、女性の肝発癌年齢は、男性より数年遅いことから、男性が 2002 年に肝癌による死亡のピークを迎えたあとも、女性に関してはまだ増加傾向を示していると現時点では考えられる。

病因論に基づいた肝癌対策

「肝炎ウイルス検診」(節目検診, 節目外検診)は、自覚症状がないまま社会に潜在している肝癌のリスク集団としての HBV キャリア, および HCV キャリアを組織的にみつけだし、それぞれの地域

単位で健康管理と適切な治療を行うことにより、肝癌による死亡を減らすことを目的としたものである¹⁰⁾。

厚生労働省がまとめた結果によれば、2002年から実施された節目、節目外検診の両者を併せ5年のあいだに、HBVキャリア100,983人(受診者計8,704,587人、キャリア率1.2%：ただし40~74歳)、HCVキャリア99,950人(同8,634,509人、1.2%)が見出されたことが明らかとなっている。このうち、節目検診受診者のキャリア率について、2005年時点における5歳刻みの年齢と地域別に再集計¹¹⁾し、Fig.5に示す。

対象者の年齢が40~73歳であり、2005年時点の年齢換算により示しているが、節目検診受診者集団の年齢階級および地域別にみた感染率の傾向は、初回供血者集団の資料と同様に認められている。すなわち、HBs抗原陽性率をみると、2005年時点の年齢換算で50歳後半から60歳代前半の年齢層で高い値を示していること、北海道では他の地域と比べて、いずれの年齢層においてもHBs抗原陽性率が高い値を示すことである。一方、HCVキャリア率については、いずれの地域においても、高年齢層で高い値を示し、とくに、近畿以西の西日本の高年齢層では高い値を示す傾向がある。

これらの成績は、統一された測定法、判定基準により得られた、大規模な集団における貴重な資料といえる。また、初回供血者集団と併せ、この二つの成績から、わが国の一般集団における肝炎ウイルス感染率の全体像が明らかになったものと考えられる。地域や年齢で異なるキャリア率を背景に、医療や行政の実情に応じたキャリア対策を地域ごとに講じることが、戦略的な肝炎・肝癌の撲滅に肝要であるといえる。

おわりに●

わが国の肝癌は、肝炎ウイルスの持続感染を母地として発生するものが大部分を占めることから、肝炎ウイルスキャリアの対策は、ひいては肝

癌の発生を抑制する対策といえる。キャリア対策は大きく四つに分けられる。

- ① (感染を知らないまま)潜在しているキャリア対策。
- ② 患者として、すでに通院・入院しているキャリア対策。
- ③ (感染を知ったが)受診しないでいるキャリア対策。
- ④ 感染予防対策：ハイリスク集団および、次世代キャリアの新規発生の予防。

対象を拡大した肝炎ウイルス検査の推進(職域および家族など)や検査機会の拡大(①)、また、治療状況の把握と早期発見のプロトコール作成および医療費助成の運用や効果の検証が望まれる(②)。また、検診や献血、医療機関受診時の検査などで感染していることを知ったが、受診しないままにしているキャリアに対しては、早急に現状把握を行い、その問題点の解明が急がれる(③)。最後に、次世代のキャリアの新規発生を予防するための対策は、将来の肝癌撲滅をめざすうえで重要である(④)。

わが国における肝癌の成因の動向や年代別感染率の推移など、疫学的背景をもとにした、近未来を見据えた対策が引き続き求められている。

文 献●

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部：平成18年人口動態統計，上巻，2006
- 2) 日本肝癌研究会：第5回~第17回全国原発性肝癌追跡調査報告，日本肝癌研究会事務局
- 3) 三浦宜彦：肝がん死亡の地理的分布 平成14年度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)C型肝炎の自然経過及び介入による影響等の評価を含む疫学的研究，分担研究報告書，p24-30，2003
- 4) 各務伸一：日本肝癌研究会の調査による肝がんの動向，肝がん白書，日本肝臓学会，p18-22，1999
- 5) 田中純子：肝炎ウイルス持続感染と慢性肝疾患死亡との関連：死亡小票に基づいた調査，厚生指標45：p8-12，1998
- 6) Tanaka J et al：Natural histories of hepatitis C virus infection in men and women simulated by the Markov model, J Med Virol 70：378, 2003
- 7) Tanaka J et al：Sex-and age-specific carriers of hepati-

- tis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. Intervirology 47 : 32, 2004
- 8) Sasaki F et al : Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. J Epidemiol 6 : 198, 1996
- 9) Tanaka J et al : Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004 Intervirology 51 : 33, 2008
- 10) 吉澤浩司：肝がんの発生予防に資する C 型肝炎検診の効果的な実施に関する研究，平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (21 世紀型医療開拓推進研究事業) 中間報告書，2000
- 11) 田中純子：肝炎ウイルス検診受診者 (2002.4~2007.3 受診群) を対象とした解析。平成 19 年度 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 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究，分担研究報告書，p1-6, 2008

INFORMATION

東京臨床糖尿病医会 第 125 回特別例会

- 日時** 2009 年 10 月 17 日 (土) 午後 3 時~午後 6 時 50 分まで
- 会場** 池袋メトロポリタンプラザ(オフィスタワー 12階 第 2 会議室)
(東京都豊島区西池袋 1-11-1 Tel 03-5954-1030)
- テーマ** 「糖尿病網膜症：インフォームド・コンセントとロービジョン・ケア (低視力患者のケア)」
- 司会** 福田敏雅 (福田眼科医院, 中野区)
- 会長** 相磯嘉孝 (あいそ内科, 板橋区)
- 参加申込** 官製ハガキに住所・氏名・電話番号・勤務先・職種を記入のうえ, 下記事務局まで郵送下さい。または, E-mail でも結構です。おって郵便振替用紙, 会場案内図等を送付させていただきます。
- 〒150-0031 東京都渋谷区桜丘町 9-17 親和ビル 103
東京臨床糖尿病医会事務局：深堀幸次
Tel 03-5458-5035 Fax 03-5458-6242 E-mail : ammc@jeans.ocn.ne.jp
- 参加費** 会員ドクター 2,000 円, 会員コメディカル 1,000 円, 一般 (医療従事者) 3,000 円
- その他** 本例会は日本糖尿病療養指導士「認定更新」のための単位 (2 群 1 単位) を申請中です。当医会は社団法人日本糖尿病学会「専門医」としての更新単位 (1 単位) を取得することができます。
- 本例会は日本医師会生涯教育制度「参加証明書」を配布いたします。
- 本例会は日本糖尿病協会の「療養指導医更新」のための「講習会」に認定されています。

がん予防に関する感染症学的アプローチ②

肝がん予防策としての ウイルス性肝炎対策の効果

田中 純子

肝がん死亡の年次推移とその成因

わが国における悪性新生物による死亡を部位別に見ると、「肝」（肝および肝内胆管の悪性新生物，人口動態統計¹⁾）による死亡は，1975年より増加の一途をたどり，1995年に初めて年間3万人を上回った。肝がんによる死亡は，2002年には人口10万人対27.5人とピークを示したのち，2007年ではやや減少し，人口10万人対26.6人となった。日本肝癌研究会による調査成績²⁾および人口動態統計資料をもとに算出した成因別に見た肝がん死亡の推移を見ると，1975年以降，現在に至るまでB型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染に起因する肝がんは増減がないままで推移しており，わが国で増え続けている肝がんはHBVの持続感染によらない(非A非B型)の肝がんであることが明らかとなっている。C型肝炎ウイルス(HCV)感染の診断が可能となった1992年以降について見ると，非A非B型の肝がんの95%以上はHCVの持続感染に起因する肝がん(C型の肝がん)であることが明らかになっている³⁾。

しかし2000年代(2002～2003年²⁾)に入り，HBV由来の肝がん死亡割合には変化がないものの，HCV由来の割合がやや減少し(70%)，不明の原因(非A非B非C型)に由来する肝がん死亡の割合が微増傾向にあるが，その理由については現在のところ不明である。

わが国の肝炎ウイルスの新規感染状況

HBV感染については，その主な感染経路である母子感染の予防が1986年出生の児より全国規模で実施されたことにより，1986年出生以降の若年齢層におけるHBVキャリア率は極めて低い値を示している。

一方，HCV感染の新規発生について見ると，これまでの血清疫学的調査より，わが国での水平感染および母子感染による新たなHCVキャリアの発生は特別な場合を除き，ほとんど認められない状態にあることが明らかとなっている^{4,5)}。

しかし，日本赤十字社HBV genotype研究グループによると⁶⁾，献血時の検査により見いだされたHBV陽性者の特性についての解析結果から，慢性化率の高いと考えられているHBV genotype Aによる感染例が都市部を中心に広がっていることが指摘されていること，また，血液透析施設等の観血的処置を日常的に行う医療現場では，HCVの感染のリスクは一般集団の数～数十倍であると報告⁵⁾されていることから，HBV，HCVともに感染動向調査および感染予防対策は引き続き十分に行っていく必要がある。

HCVキャリアの肝臓の病態とその推移， 生涯肝発がん率

広島県赤十字血液センターにおいて，献血時の

たなか じゅんこ：広島大学大学院医歯薬学総合研究科疫学・疾病制御学教授
連絡先：☎734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3

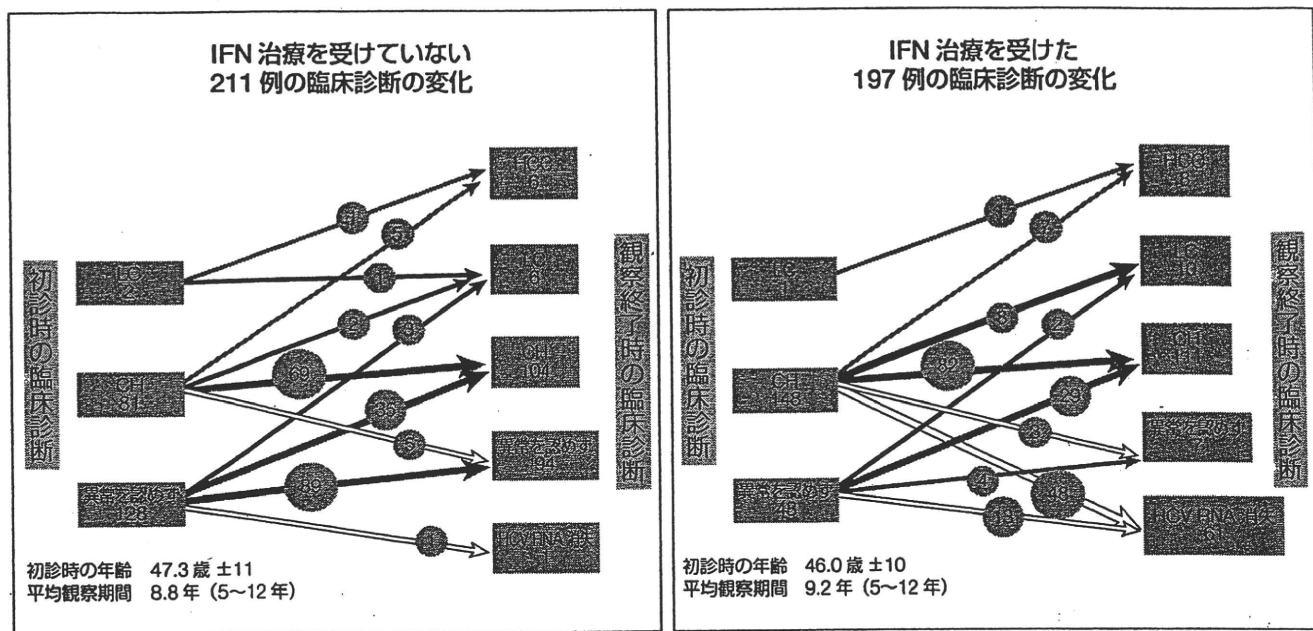


図1 5年以上の追跡が可能であった408例の病態推移
 INF：インターフェロン，LC：肝がん，CH：慢性肝炎，HCC：肝細胞がん

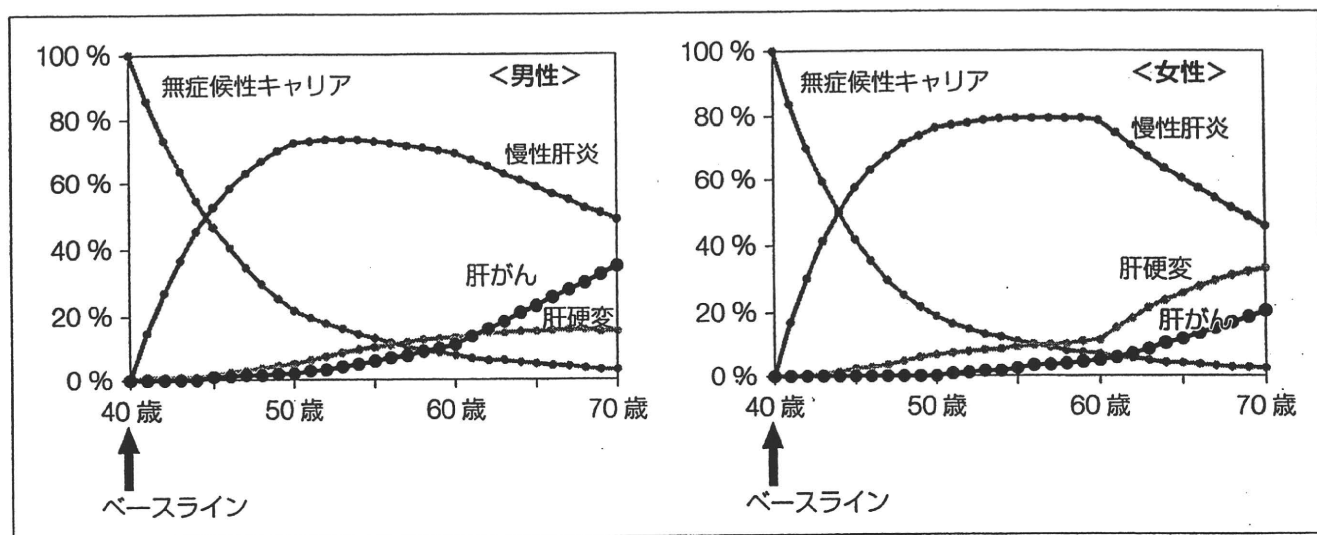


図2 HCV キャリアの生涯肝発癌率—各病態への累積罹患率(抗ウイルス療法を行わない場合)

検査を契機に発見されたHCVキャリア1,019例の前方視的追跡調査で得られた集計結果⁷⁾を見ると、病院初診時の臨床診断は、529人(51.9%)が慢性肝炎と診断され、肝硬変が5人(0.5%)、肝がんが1人(0.1%)と診断されていた。すなわち、自覚症状がなく献血により感染が判明したキャリアのうち、初診の段階で異常を認められないと診断された人は483人(47.4%)に過ぎなかった。

一方、5年以上の追跡ができた408人のうち、インターフェロン治療を受けていない211人(平

均観察期間8.8年)の病態の変化をまとめると、初診時に慢性肝炎と診断された81人のうち2人が肝硬変へ、5人が肝がんへ進展していた。また、インターフェロン治療を受けた197人の病態の変化では、インターフェロン治療効果が今日ほど望めなかった1990年代後半においても、61人が治癒(キャリア状態から離脱)していることが判明した(図1)。

一方、臨床診断の基準を揃えたHCVキャリア942人を対象としてマルコフ過程モデルを用いた

数理モデルを当てはめ、40歳を起点とした肝発がん率を推計すると、抗ウイルス療法などの積極的治療を行わない場合には、男性では50歳を過ぎる頃から、女性では60歳を過ぎる頃から肝発がん率が上昇し始め、70歳時点における肝発がん率は、それぞれ男性では38%、女性では約20%に達するという成績が得られた⁸⁾(図2)。

これらの結果は、自覚症状がないまま、社会に潜在するHCVキャリアを組織的に見つけ出し、適切な健康管理や必要に応じた治療を行うことにより、肝がんによる死亡のリスクを減らすことが可能となることを示している。

肝炎ウイルス(HBV, HCV)キャリア率と 肝炎ウイルスキャリアの推計数

一般集団における肝炎ウイルスキャリア率は、日本赤十字血液センターの初回供血者の資料を基にして算出することができる。1995年1月から2000年12月までの6年間の全国の初回供血者348万5,648人の資料から見ると⁹⁾、HBs抗原陽性率は全体では0.6%であるが、50歳代を中心とした前後の年齢層で一峰性のピークを示し、15%の値を示している。また、HCV抗体陽性率は、全体では0.5%であるが、20歳代以下(1980年以降の出生群)では、0.2%以下と極めて低い値を示し、60歳以上の年齢集団では3%を超える高い値を示すという、年齢が高い集団で高い値を示す傾向が見られている。

初回供血者の資料をもとに、2000年時点の年齢に換算した年齢階級別のHBs抗原陽性率、HCV抗体陽性率(HCV抗体陽性者の中に占めるHCVキャリア率)と、国勢調査人口(2000年)を元に、キャリア数の推計を行った⁹⁾。その結果、15歳から69歳の人口約9,332万人の中に「自覚症状がないまま社会に潜在している」HBVキャリア数は、2000年時点で96.8万人(95%信頼区間:80.7-112.9万人)、HCVキャリア数は、88.5万人(同:72.5-104.5万人)と推計された。

なお、この中には、病・医院に通院もしくは入院しているキャリアや献血時の問診で肝炎ウイル

スに感染しているリスクのある人は予め除外されている。

病因論に基づいた「肝炎ウイルス検診」の 実施と見出されたキャリア数

これまでに示した疫学的背景より、HBVキャリアあるいはHCVキャリアを見出し、早期に適切な治療をすれば、肝炎の病期の進展を遅延、阻止でき、肝がんによる死亡を減らすことができると見込まれることが明らかとなったことから、2002年度より全国の40歳以上の住民検診受診者を対象とした「肝炎ウイルス検診」が5か年計画で実施に移された。

「肝炎ウイルス検診」は、40~70歳までの5歳刻みの節目の年齢にあたる人を対象とした「節目検診」と、一般の人に比べて肝炎ウイルスに感染しているリスクが高いと考えられる人を対象とした「節目外検診」とから成っており、HBVキャリアを見出すためのHBs抗原検査と、HCVキャリアを見出すためのHCV抗体検査、HCVコア抗原検査、HCV RNA検査の組み合わせによる検査が行われた。

厚生労働省から公表されている成績¹⁰⁾によれば、2002年度から2006年度末までの5年間に、HBVについては870万4,587人が、HCVについては863万4,509人が検査を受け、それぞれHBVキャリアは10万983人(キャリア率1.2%)、HCVキャリアは9万9,950人(キャリア率1.2%)が見出されている。検診受診時の実施年度別、受診時年齢別にキャリア率を見ると、HBVキャリア率は50歳代を中心に高い値を示すのに対して、HCVキャリア率は70歳代をピークとした高年齢層で高い値を示すという特徴が見られ、前項初回供血者集団の成績から示した年齢階級別のキャリア率と同様の傾向を示すことが明らかとなった(図3)。

5年間の「肝炎ウイルス検診」受診者は、約870万人であったが、これは40~74歳の年齢人口の約15%を占めるに過ぎず、今後は、職域およびその家族を含めた検診対象集団の拡大も視野

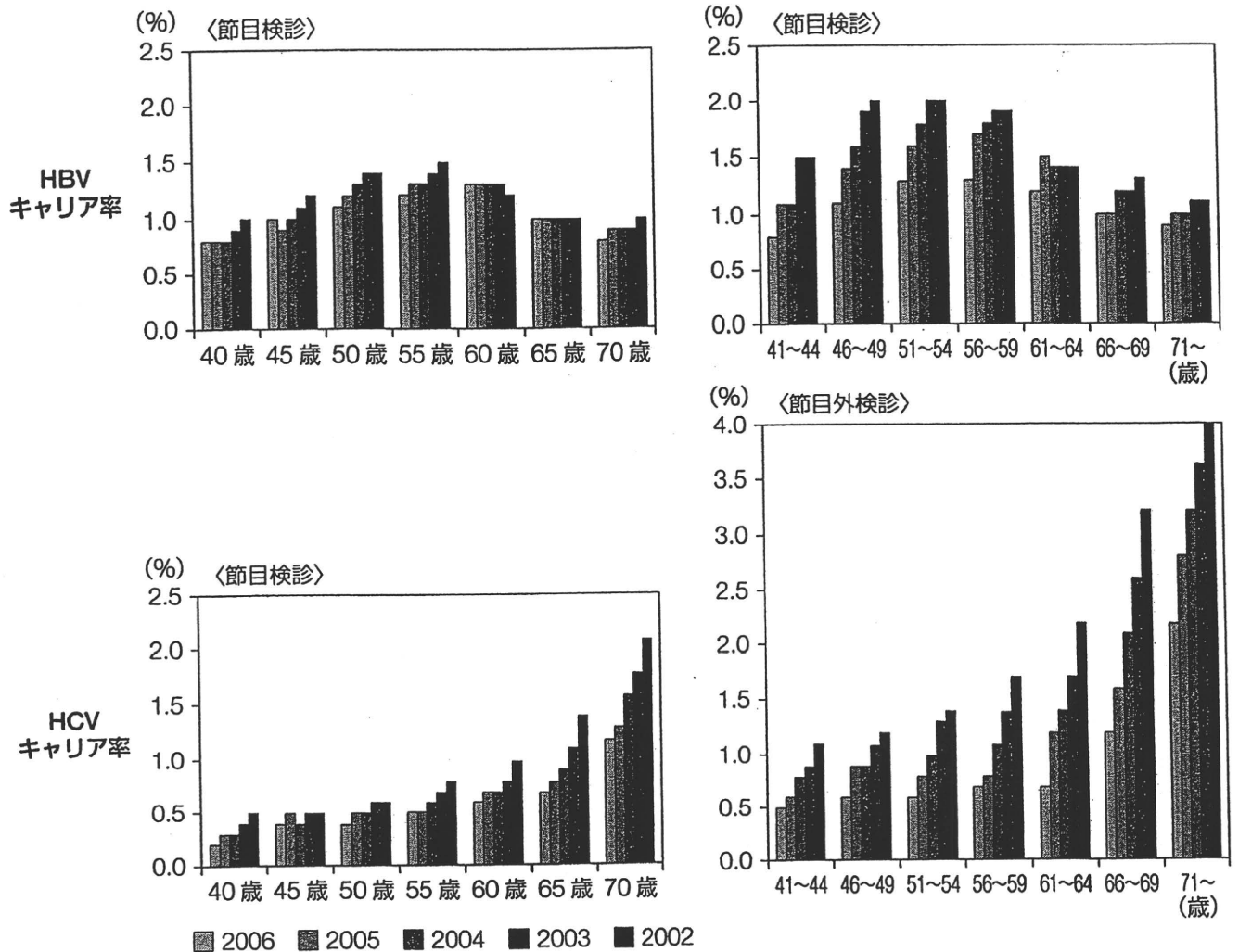


図3 節目・節目外別に見たHBVキャリア率, HCVキャリア率

に入れた検査を勧奨する対策が望まれている。

一方、「肝炎ウイルス検診」実施後の、社会に潜在するキャリア数をあらためて推測する目的で、2000年以後に得られた「節目検診受診者」集団と「初回供血者」集団(2001~2006年)の2つの大規模集団における年齢階級別のHBVキャリア率とHCVキャリア率を用いて(図4)、2005年時点の「社会に潜在しているHBVキャリアとHCVキャリア」数について推計を行った¹¹⁾。

その結果、HBVキャリアの推計数は、90万3,145人(95%CI:83.7-97.0万人)、HCVキャリアの推計数は、80万7,903人(95%CI:68.0-97.4万人)となった(全年齢層)。この「社会に潜在しているHBVキャリアとHCVキャリア」数の推計値は、2000年時点における推計数(40~74歳)と比べ、推計の対象とした年齢層が広がったことか

ら考えると、減少した値となった。その理由の背景としては、1990年代後半から行政・医師会等による啓発活動により急速にHCV感染等の知識が浸透したこと、そのため様々な検査の機会(診療、手術時における肝炎ウイルス検査、各地域における肝炎ウイルス検査など)が増えたこと、また、1990年代後半から2000年はじめにかけて、C型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスによる感染事例が報道に取り上げられたこと、全国の血液センターで一斉に(1999年10月より)輸血用血液の安全性確保のためのNAT(Nucleic acid amplification test)が導入されたことなどが契機となり、一般集団においても肝炎ウイルス検査に対する認識や知識が高まったことが考えられ、「肝炎ウイルス検診」とともに、肝炎ウイルス検査を様々な機会を受けた人が増えたことが、その理由

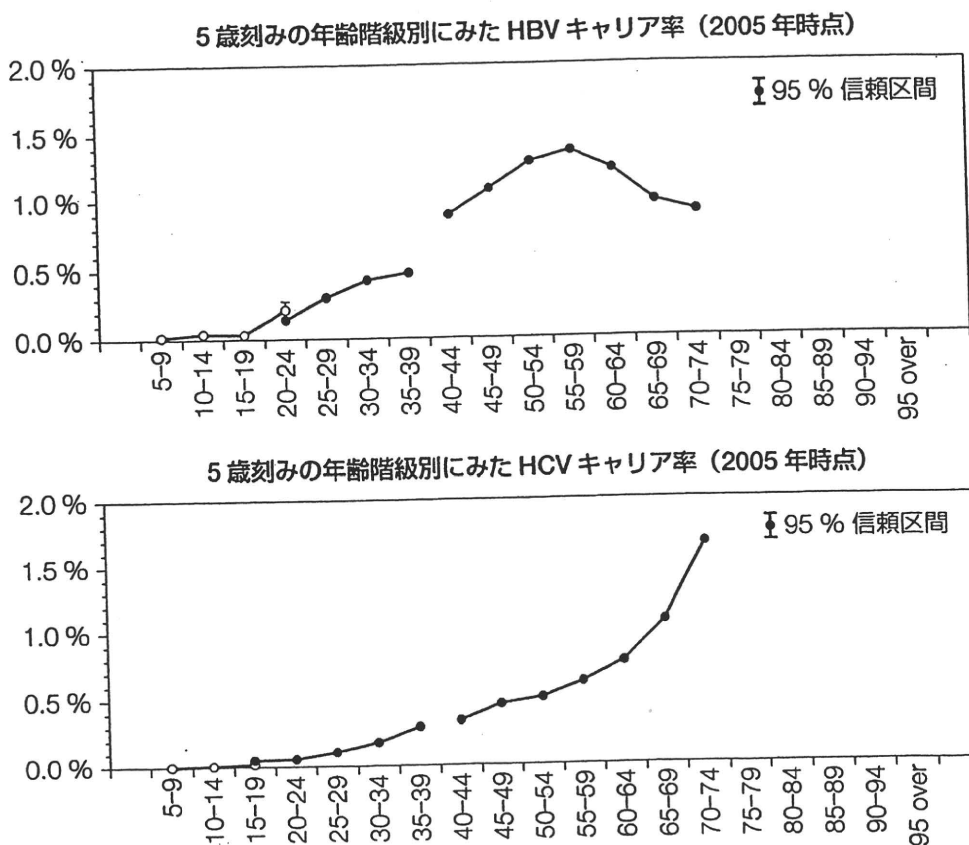


図4 大規模集団の成績を元に得られた年齢階級別に見た HBV キャリア率と HCV キャリア率

として挙げられる。

「肝炎ウイルス検診」実施後の 今後の肝がん予防対策

2008年度からは、健康増進法に基づく個別検診の形で「肝炎ウイルス検査」が存続されており、対象者も住民検診対象者だけでなく、職域集団、その家族など検査の機会の拡大を図って、行政(各都道府県)側の積極的な広報、啓発により、肝炎ウイルスキャリアの拾い上げが行われている。

また、「肝炎ウイルス検診」や現在進行中の「肝炎ウイルス検査」で見出された肝炎ウイルスキャリアに対して治療を推進するシステムとして、全国の各都道府県で肝炎対策協議会が設置され、肝炎拠点病院を中心とした治療ネットワークの構築が進行している¹²⁾。2008年度からは、7年間の時限的ではあるが、医療費助成制度が実施されており、見出されたキャリアの専門医療機関へ

の受診率、適切な治療の受療率の向上を、地域の実情にあわせてさらに推進していくことが、わが国の肝がんによる死亡の減少に導くことになると考えられる。

おわりに

今後の肝炎ウイルスキャリア対策としては、わが国における肝炎ウイルスの新規感染の動向調査・従来の感染防止対策を継続しつつ、「感染を知らないまま潜在しているキャリア」への対策、「患者としてすでに通院・入院しているキャリア」への対策、「感染を知ったが受診しないままでいるキャリア」への対策、という4つが考えられる。

わが国の肝がん対策をその病因論的視点、また疫学的視点から捉えると、これらの対策を推進することが、近未来のわが国の肝がん死亡の減少を目指す上で重要であると言える。

文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部：平成19年人口動態統計(上巻). 2007
- 2) 日本肝癌研究会：第5回～第17回全国原発性肝癌追跡調査報告. 日本肝癌研究会事務局, 1978～2003
- 3) Yoshizawa H: Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan; projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 62 (suppl 1): 8-17, 2002
- 4) Tanaka J, et al: Incidence rates of hepatitis B and C virus infections among blood donors in Hiroshima, Japan, during 10 years from 1994 to 2004. *Intervirolgy* 51: 33-41, 2008
- 5) Kumagai J, et al: Hepatitis C virus infection in 2,744 hemodialysis patients followed regularly at nine centers in Hiroshima during November 1999 through February 2003. *Journal of Medical Virology* 76: 498-502, 2005
- 6) Yoshikawa A, et al: Age- and gender-specific distributions of hepatitis B virus (HBV) genotypes in Japanese HBV-positive blood donors. *Transfusion* 49: 1314-1320, 2009
- 7) Mizui M, et al: Liver disease in hepatitis C virus carriers identified at blood donation and their out-
- comes with or without interferon treatment; study on 1019 carriers followed for 5-10 years. *Hepatology Research* 37: 994-1001, 2007
- 8) Tanaka J, et al: Natural histories of hepatitis C virus infection in men and women simulated by the Markov model. *Journal of Medical Virology* 70: 378-386, 2003
- 9) Tanaka J, et al: Sex- and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,648 first-time blood donors during 1995-2000. *Intervirolgy* 47: 32-40, 2004
- 10) 田中純子：肝炎ウイルス検診受診者(2002.4～2007.3受診群)を対象とした解析. 平成19年度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 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究報告書, pp 1-6, 2008
- 11) 田中純子：初回献血者集団および節目検診受診者における出生年別のキャリア率をもとにしたキャリア数推計の試み. 平成20年度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 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究, 報告書-2, 2008
- 12) 田中純子・他：肝炎ウイルスキャリア対策. 平成20年度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 肝炎状況・長期予後の疫学に関する研究報告書, pp 45-108, 2008

文部科学省認定・通信教育 「統計手法」を「仕事」に活かす。「統計実務講座」

統計の資格と実力



●特色●本講座のテキストに対応したエクセルを利用する学習方法をまとめた「エクセルデータ解析と統計解析プログラム集/CD付き」を特別に提供しますので初心者にも最適!

資格 — 「統計士」の資格が取得できる。
(「統計士」資格認定試験制度・詳細は資料で)

★統計の基本から統計的手法がマスターできる!
★いろいろな統計的手法が実際に活用できる!
★エクセルによる統計解析力をつける!

- データ解析に統計ソフト活用が欠かせない今日、統計の基本をマスターした人が求められています。
- 本講座なら、統計の基本から、回帰相関、推定検定、調査法、品質管理、実験計画法など、統計的手法が実例を通して身につきます。
- 企画・調査・医学・薬学・品質管理・看護・金融・証券・生保・損保関係者に最適です。
- 大学生・大学院生には、研究や就職に必須の講座・資格です。
- 修了後は、統計スペシャリストとして活躍できます。
- 指導委員＝芳賀敏郎・野澤昌弘先生他。
- 修了者には「統計士」の資格を認定。

●受講生募集中●
詳しい案内書
無料進呈
●ご希望の方は下記へ!

160-0015	東京都新宿区 大京町25の307	住所 〒	「統計」資料を希望
財団法人 実務教育研究所 公衆衛生係		氏名	

統計士になる

検索

財団法人

実務教育研究所

公衆衛生係

URL <http://www.jitsumu.or.jp>

TEL 03-3357-8153

E-MAIL jk@jm.md

〒160-0015 東京都新宿区大京町25の307

FAX 03-3358-7259

※上記の空メールがQRコードで



TRANSFUSION COMPLICATIONS

A novel hepatitis B virus surface antigen immunoassay as sensitive as hepatitis B virus nucleic acid testing in detecting early infection

Naoko Matsubara, Osamu Kusano, Yasuhiro Sugamata, Tetsuo Itoh, Masaaki Mizuii, Junko Tanaka, and Hiroshi Yoshizawa

BACKGROUND: The aim was to considerably enhance the sensitivity of hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) detection and investigate whether the window period for HBV detection could be reduced.

STUDY DESIGN AND METHODS: A high-sensitivity chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) was developed for quantitative HBsAg detection by a combination of monoclonal antibodies, each one for a specific epitope of HBsAg, and by improving the conjugation technique. The sensitivity of the assay was compared with that of the existing chemiluminescent immunoassay (CLIA). Commercially available seroconversion panels and samples of HBV-infected chimpanzees were tested with the developed prototype to assess whether the window period for HBsAg detection could be reduced to that for DNA detection.

RESULTS: Compared to the existing CLIA, the CLEIA prototype detected HBsAg with approximately 230-fold higher sensitivity and showed a reduced window period. HBsAg detection by the CLEIA prototype and HBV DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) occurred simultaneously. The mean time for the CLEIA prototype to first detect HBsAg was approximately 17.4 days less than that for the existing systems. Further, CLEIA prototype enabled HBsAg detection even in anti-HBs-positive seroconversion samples. In the inoculated chimpanzees the HBsAg and HBV DNA became detectable simultaneously and concentrations increased in parallel, whereas HBsAg remained detectable longer than HBV DNA in the declining phase of viremia.

CONCLUSION: The CLEIA prototype yielded results comparable with those of HBV DNA PCR. This novel high-sensitivity assay may be useful for early detection of HBV infection and monitoring patients with a history of infection.

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the main causes of chronic hepatitis. It is estimated that more than 2 billion people worldwide are infected with HBV, of which approximately 400 million people are chronically infected.¹⁻⁴ HBV is transmitted by exposure to infectious blood, for example, via accidental injection and transfusion of blood or sexual contact and from the mother to a newborn infant. The development of a persistent HBV infection depends on the age of the infection and immune status of the host.^{1,3-12} It is reported that 10 to 30 percent of individuals persistently infected with HBV develop liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HBV infection causes up to 80 percent of liver cancers.^{1,3,4,13-15}

HBV is a double-stranded DNA virus, composed of a nucleocapsid core coated with an envelope containing the

ABBREVIATIONS: CLEIA = chemiluminescent enzyme immunoassay; CLIA = chemiluminescent immunoassay; ER = endoplasmic reticulum.

From the R&D Division, Advanced Life Science Institute, Inc., Saitama; the Department of Laboratory Medicine, Japanese Red Cross, Hiroshima Blood Center, Hiroshima; and the Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan.

Address reprint requests to: Naoko Matsubara, Advanced Life Science Institute, Inc., 2-10-23 Maruyamadal, Wako-shi, Saitama 351-0112, Japan; e-mail: nnagata@alsi-i.co.jp.

This work was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants of the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan.

Experiments using chimpanzees had been performed before 2006 and the ethical approval for each experiment had been gained which was applied according to the form of the facilities.

Received for publication July 23, 2008; revision received October 3, 2008; and accepted October 9, 2008.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02026.x

TRANSFUSION 2009;49:585-595.

surface antigen (HBsAg). The diagnosis of HBV infection involves the detection of specific antigens and/or antibodies such as HBsAg, antibody to HBsAg (anti-HBs), antibody to HBV core antigen (anti-HBcAg), hepatitis Be antigen (HBeAg), and antibody to HBeAg. HBV DNA is considered to be followed after a few weeks by HBsAg during HBV infection. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) is currently used in the commercial HBsAg detection assays¹⁶⁻¹⁹ because of its simplicity and cost-effectiveness.

Despite the fact that many countries perform HBV DNA and HBsAg screening tests, posttransfusion HBV infection continues to occur.²⁰⁻²⁵ This is because a relatively long infectious window period remains before HBV DNA and HBsAg become detectable in serum.^{19-22,24-30} HBV has been reported to exist in the serum in distinct morphologic forms, the most abundant of which are small or tubular HBsAg particles.^{1,26} Empty HBsAg particles are composed of HBsAg and do not contain DNA. The number of these particles is 10,000 to 1,000,000 more than the number of Dane particles, which are infectious HBV particles containing HBV DNA. Because of the large number of empty HBsAg particles, the potential for theoretical detection of HBsAg may be greater.

Although the sensitivity of the HBsAg assay has been improved, reduction in the window period such that it is similar to that of DNA detection remains difficult.^{18,19,24,25,27-29,31} The window period for HBV detection has been estimated to be 35 to 76 days by individual sample nucleic acid testing (NAT), 41 to 90 days by minipool NAT, and 50 to 97 days by high-sensitivity HBsAg chemiluminescent immunoassay (CLIA).^{28,30} In this study, an unprecedented high-sensitivity prototype was developed and evaluated. The sensitivities of the newly developed prototype and the existing detection systems were compared. To investigate the prototype's ability to detect HBV infection in the early phase, we used the developed prototype to compare the time of appearance of HBsAg and HBV DNA in seroconversion panels. Subsequently, the detection ability of the developed prototype was compared with the detection abilities of the DNA detection and existing HBsAg detection systems.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Seroconversion panels were purchased from BioClinical Partners, Inc. (Franklin, MA; Panels 6277, 6278, 6279, and 6281), and Boston Biomedica, Inc. (West Bridgewater, MA; Panels PHM 902, PHM 903, PHM 908, PHM 909, PHM 910, PHM 911, PHM 912, PHM 914, PHM 915, PHM 916, PHM 919, PHM 920, PHM 922, and PHM 935B). The HBsAg sensitivity panel PHA 808 (Boston Biomedica, Inc.) was used for comparing the in-house and international units. The ninth sample obtained from PHA 808 was diluted 5- to

100-fold with a pooled negative serum sample and used for the dilution study. Individual samples that were negative for all viral markers were purchased from ProMedex, Inc. (Flushing, NY).

Chimpanzees

Sequential samples obtained from six chimpanzees infected with HBV reported previously were tested.³⁰ Chimp 246 was inoculated intravenously with fresh-frozen plasma units from blood donors acutely infected with genotype A (6.9×10^4 copies/mL), and Chimp 272, with genotype C (5.3×10^5 copies/mL). Chimps 279 and 280 were inoculated with pre-acute-phase plasma of Chimp 246, and Chimps 269 and 285 were inoculated with pre-acute-phase plasma of Chimp 272. After the inoculation, serum samples were obtained at intervals of 2 to 7 days in the early phase of infection and as required. The collected samples were assessed for HBsAg by the chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) prototype and for HBV DNA by polymerase chain reaction (PCR; TaqMan, Roche Diagnostics KK, Tokyo, Japan) with a sensitivity of 100 copies per mL.

Recombinant HBsAg

Recombinant HBsAg for the in-house standard was purchased from HyTest Ltd. (Turku, Finland). The recombinant HBsAg was serially diluted to produce the in-house standard. The concentration was expressed in international units (IUs; IU/mL or mIU/mL) by calibrating it against the World Health Organization (WHO) reference standard. The measured unit values were compared with the values measured by the existing quantitative HBsAg detection system (ARCHITECT, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), which was based on CLIA method.

Monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies (MoAbs) to HBsAg were obtained from established hybridomas by the following method. The recombinant antigen was mixed with an equal volume of Freund's adjuvant, and a dose of 10 to 20 μ g of the resultant mixture was intraperitoneally administered to 4- to 6-week-old BALB/c mice. A booster was intraperitoneally administered every 2 to 4 weeks, and a final immunization dose of 10 μ g was injected into the caudal vein. After 3 days, splenocytes were obtained from the immunized mice and fused with myeloma cells. The fusion cells were suspended in RPMI 1640 containing 10 percent fetal bovine serum, hypoxanthine, aminopterin, and thymidine and plated onto a 96-well cell culture plate. After approximately 10 days of culturing, when only the hybridomas were proliferated, clones producing the required antibody were selected.

Development of the CLEIA prototype for detecting HBsAg

A CLEIA prototype was constructed for testing the performance of the high-sensitivity HBsAg assay. This sandwich assay utilizes a 96-well microtiter plate (FluoroNunc Module Maxisorp surface; Nunc, Roskilde, Denmark) coated with MoAbs that recognize HBsAg. To detect HBsAg more effectively, MoAbs were selected for ELISA, since each antibody recognized a different HBsAg epitope. Three clones were used for solid antibodies, each of which recognized the determinant "a" as the constructive epitope, amino acids 111 to 130, and amino acids 31 to 50, respectively. For tracer antibodies, two clones were used, each of which recognized the determinant "a" as the constructive epitope in the different region of the solid antibody and amino acids 51 to 69, respectively. The conjugate formed comprised anti-HBs MoAbs labeled with alkaline phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which were linked to some mass molecules, for example, dextran, beta-galactosidase, and polymerized albumin by the modified method reported;³² these alkaline phosphatase-labeled antibodies enhanced the signals, avoiding aggregation and minimizing the detection limit. In the case using albumin, albumin (32 mg) was mixed with 100 μ L glutaraldehyde to produce the polymerized albumin. Next, 1.5 mol per L Tris buffer was added to stop the reaction, and it was incubated for at least 3 hours. The product was purified by gel permeation, and it was used as the linker between the enzyme and the antibody. The antibody was used after pepsin digestion to remove the Fc region, treated with 15 mmol per L mercaptoethylamine for 90 minutes, and conjugated with the polymerized albumin-linked enzyme using *N*-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). The product was purified by gel permeation and stored with preservative and carrier bovine serum albumin before use. For analyzing HBsAg in the serum or plasma, 75 μ L of the sample and 25 μ L of the reaction buffer (containing 100 mmol/L Tris buffer supplemented with 1% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulfate, and 1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; pH 7.2) were added to the antibody-coated microwells and incubated at 37°C for 60 minutes. After the wells were washed six times with a washing buffer (phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20), 100 μ L of alkaline phosphatase-conjugated anti-HBsAg MoAbs was added to the wells and incubated at room temperature for 30 minutes. After incubation, the microwells were washed again six times and incubated with 100 μ L CDP-Star with Emerald II (Tropix, Inc., Bedford, MA). After incubation at room temperature for approximately 15 minutes, the relative light units of the microwell samples were

measured. The results were expressed in IU values, which were determined according to the in-house standard curve.

Assessment of the CLEIA prototype

The selected HBsAg-positive samples were diluted with pooled normal serum, and the dilution linearity was assessed. On the basis of the in-house standard curve, linearity was defined relative to the calculated amount of HBsAg.

RESULTS

Performance of CLEIA for HBsAg detection

The amount of recombinant HBsAg was expressed in IU by calibrating it against the WHO reference standard. The dilution series of the recombinant HBsAg were analyzed for linearity and used as the in-house standard. The lowest concentration of the in-house standard was 4.6 mIU per mL with a signal-to-noise ratio of 22.5 (Fig. 1A). In the same assay, the analytical sensitivity of the CLEIA prototype was 0.05 mIU per mL. To confirm the consistency of the IU values, which was determined from the in-house standard values, the PHA 808 panel was tested. A high correlation was observed between the IU value determined from the in-house standard and that of the international standard mentioned in the data provided (Fig. 1B). The unit values of the existing quantitative HBsAg assay and those of the CLEIA prototype were also compared. One HBsAg-positive serum sample was determined to have a titer of 11.08 IU per mL according to the existing quantitative HBsAg CLIA; it was diluted with pooled normal serum and measured using both the existing CLIA and the CLEIA prototype. The sample was diluted serially from 5- to 3125-fold: the expected value was in the range of 2.2 to 3.5 mIU per mL, although the cutoff value of the existing CLIA was 50 mIU per mL. The data of the comparison between the existing CLIA and the CLEIA prototype are shown in Fig. 1C. The approximation formulas for the unit value were determined by the existing CLIA or the CLEIA prototype, and the expected unit values were $Y = 1.078X^{0.695}$ and $Y = 1.405X^{0.997}$, respectively.

Dilution linearity test

Three individual HBsAg-positive samples were diluted with pooled normal serum and assessed using the CLEIA prototype. Table 1 shows the dilution linearity of the CLEIA prototype in the range of 97.6 to 115.3 percent. The ninth sample of PHA808, which showed a value of 0.05 IU per mL according to the data provided, was also diluted for analyzing the dilution linearity at a low titer of HBsAg. The recovered values calculated using the dilution factor ranged from 96.4 to 113.8 percent (Table 1),

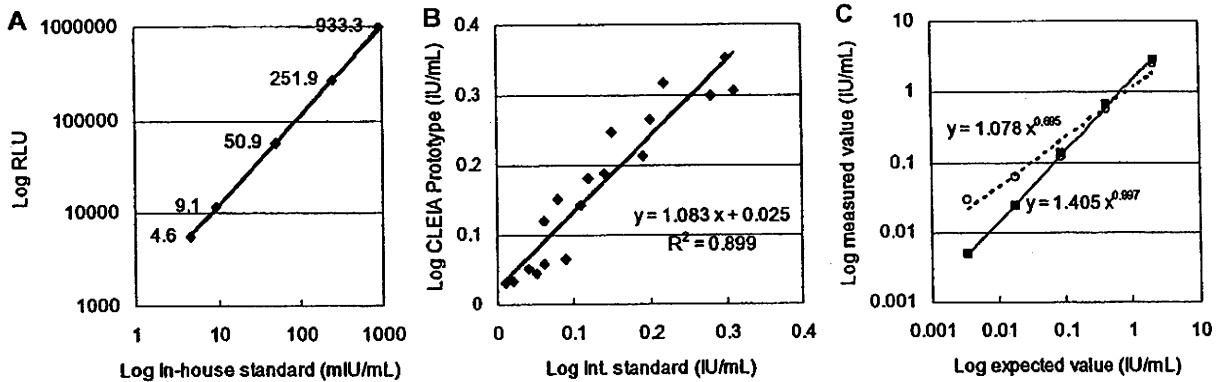


Fig. 1. The performance of the CLEIA prototype was evaluated and expressed in IU values. (A) The in-house standard (933.3-4.6 mIU/mL) determined using recombinant HBsAg was measured by the CLEIA prototype. (B) The concentrations of the HBsAg sensitivity panel PHA 808 (Boston Biomedica, Inc.) measured by the CLEIA prototype were compared with the provided data. The correlation coefficient is shown as $R^2 = 0.899$. (C) HBsAg-positive serum (11.08 IU/mL) was diluted with pooled normal serum and measured by the existing quantitative CLIA (O) and the CLEIA prototype (■).

TABLE 1. Dilution linearity for four HBsAg-positive samples

Sample	Dilution factor (DF)	Observed value (mIU/mL) × DF	Expected value (mIU/mL) × DF	Recovery rate (%)
HBsAg-positive 1*	Neat	35.0	35.0	100.0
	5	38.9		111.2
	25	37.2		106.4
HBsAg-positive 2*	Neat	67.8	67.8	100.0
	5	66.1		97.6
	25	78.2		115.3
HBsAg-positive 3*	Neat	264.7	264.7	100.0
	5	263.8		99.7
	25	281.0		106.2
No.9 from PHA808†	Neat	50.0	50.0	100.0
	5	51.2		102.4
	10	48.2		96.4
	20	61.4		122.7
	50	55.3		110.7
	100	56.9		113.8

* HBsAg-positive samples.

† The ninth sample obtained from the purchased panel PHA 808. The sample was calibrated against the international standard as 0.05 IU per mL by the panel vendor (Boston Biomedica, Inc.). The assay results were provided by the panel vendor.

Performance in the commercially available seroconversion panels

A total of 18 commercially available seroconversion panels were tested using the CLEIA prototype. These panels were composed of serial specimens collected from individuals during a period of hepatitis B seroconversion. All the individuals became HBsAg-positive during the collection period, and two of the selected panels, namely, HBP 6281 and PHM 935B, were assessed as anti-HBs-positive according to the data supplied by the manufacturer. All panels were assessed as HBV DNA-positive before the appearance of detectable HBsAg when measured by the commercially available detection systems (data provided by the manufacturer). Serial specimens collected from 16 individuals during the hepatitis B seroconversion were tested using the

while all the five points were below the cutoff value of the existing CLIA.

Normal sample distribution measured by the CLEIA prototype

Using the CLEIA prototype, we measured 230 serum and 273 plasma samples obtained from normal individuals. The results of the 503 normal samples were analyzed to set the cutoff value of the CLEIA prototype (Fig. 2). The mean and mean + 10 standard deviations (SDs) were 0.10 and 0.22 mIU per mL, respectively, and the cutoff point was set at 0.22 mIU per mL.

CLEIA prototype. The detection time (days) for the CLEIA prototype was compared with that for the DNA detection and existing HBsAg detection systems (data provided). The mean number of days after which HBV DNA and HBsAg were first detected were 21.8 and 41.9 days, respectively, in the 16 panels; this implied a mean difference of 20.1 days (Table 2). The mean difference in the first HBsAg detection between the CLEIA prototype (24.5 days) and the existing systems (41.9 days) was 17.4 days. This showed that the CLEIA prototype was the most sensitive HBsAg detection assay compared with the other assays (data provided). The representative seroconversion panel with short sampling intervals was shown in Table 3. When

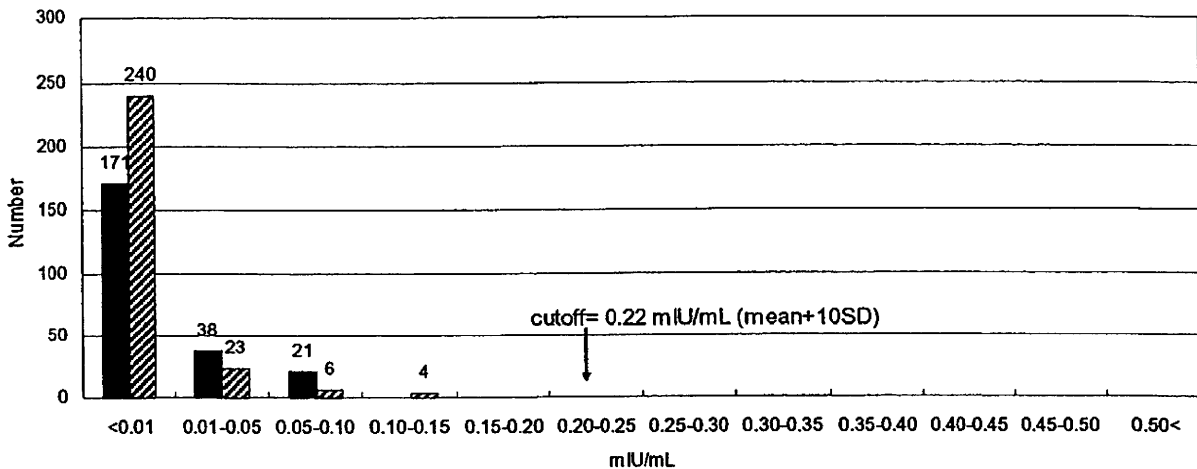


Fig. 2. The normal sample distribution was measured by the CLEIA prototype. To test the specificity of the CLEIA prototype, 230 serum samples (■) and 273 plasma samples (▨) obtained from HBV-negative individuals were measured. The highest values in the serum and plasma were 0.10 and 0.14 mIU per mL, respectively. The mean value in the 503 samples measured was 0.10 mIU per mL. The cutoff point was set at 0.22 mIU per mL as the mean + 10 SDs value.

TABLE 2. Comparison of the assay performances for HBV detection in seroconversion panels

Panels	Days to detection from the first bleed			Window reduction by the CLEIA prototype compared with		Earliest HBV detection
	DNA	Existing HBsAg*	Prototype	Existing HBsAg detection system	DNA detection system	
PHM 902†	57	71	57	14	0	DNA, prototype
PHM 903†	0	14	0	14	0	DNA, prototype
PHM 908†	0(+/-)	33	5	28	-5	DNA
PHM 909†	0	9	0	9	0	DNA, prototype
PHM 910†	18(+/-)	35	0	35	18	Prototype
PHM 911†	49	79	63	16	-14	DNA
PHM 912†	0	42	12	30	-12	DNA
PHM 914†	146	158	146	12	0	DNA, prototype
PHM 915†	0	33	0	33	0	DNA, prototype
PHM 916†	48	65	50	15	-2	DNA
PHM 919†	0(+/-)	19	0	19	0	DNA, prototype
PHM 920†	5(+/-)	26	26	0	-21	DNA
PHM 922‡	0	16	0	16	0	DNA, prototype
HBV 6277†	26	33	21	12	5	Prototype
HBV 6278†	0	12	0	12	0	DNA, prototype
HBV 6279†	0	26	12	14	7	Prototype
Mean	21.8	41.9	24.5	17.4	-2.7	

* The data provided for PHM 902 through PHM 922 (Boston Biomedica, Inc.) represent the results of an overnight assay performed by binding of the Auszyme MoAb to the HBsAg (Abbott Laboratories). The data for HBV 6277, HBV 6278, and HBV 6279 were provided by Zeptometrix Corp. (Buffalo, NY) and analyzed by PRISM HBsAg (Abbott Laboratories).

† The detection limit for the HBV DNA assay is 100 copies per mL.

‡ The detection limit for the HBV DNA assay is 10 copies per mL.

compared by signal-to-cutoff ratio, the CLEIA prototype showed approximately 110-fold higher sensitivity than PRISM (cutoff, 25 mIU/mL). In 8 of the 16 panels tested, HBsAg detection by the CLEIA prototype and HBV DNA detection by PCR (the limit of detection in the provided data was 100 copies/mL or less) occurred simultaneously. In 2 of the 16 panels tested, namely, PHM 910 and HBV 6277, the CLEIA prototype detected HBsAg earlier than PCR detected HBV DNA. In the remaining 6 panels, HBV

DNA detection by PCR occurred earlier than HBsAg detection by the CLEIA prototype. The difference in the window period for HBV DNA and HBsAg detection was only 2.7 days.

The two panels that became anti-HBs-positive were also tested (Fig. 3). In PHM 935B, DNA was not detected (the limit of detection in the provided data was 400 copies/mL) in the late phase of infection. It was indicated that the PRISM HBsAg assay (Abbott Laboratories), which

TABLE 3. The result of HBV 6279

Panel	DNA PCR	HBsAg (S/CO)	
		PRISM	Prototype
HBV6279-01	278	0.36	0.6
HBV6279-02	NEG	0.33	1.7
HBV6279-03	Not tested	0.24	3.2
HBV6279-04	75.3	0.38	11.8
HBV6279-05	529	0.53	32.8
HBV6279-06	5110	1.63	107.8

S/CO = signal-to-cutoff ratio.

showed the highest sensitivity in the data provided, detected the 246th sample that had become anti-HBs-positive. The CLEIA prototype exhibited a higher sensitivity than PRISM; it detected all the samples in PHM 935B, even those in the anti-HBs-positive phase. In HBV 6288, DNA (the limit of detection in the provided data was 100 copies/mL) and HBsAg measured by the CLEIA prototype alone detected HBV in the first sample. In the late phase of HBV 6288, both DNA and HBsAg measured by PRISM did not detect HBV in the sample that became anti-HBs-positive (data provided). In contrast, the CLEIA prototype detected the last sample that was anti-HBs-positive.

Detection of HBsAg in chimpanzee HBV infectious models

The first detection day for Chimp 246 (genotype A) was Day 17 for HBV DNA at 120 copies per mL and Day 15 for HBsAg measured by the CLEIA prototype at 0.24 mIU per mL (Fig. 4A). In the late phase of infection, HBV DNA was detected at approximately 100 copies per mL by Day 334. In contrast, HBsAg persisted longer than HBV DNA, which was detected by Day 377. In Chimp 272 (genotype C), HBV DNA was detected at 300 copies per mL on Day 6 after inoculation, and HBsAg was detected by the CLEIA prototype on Day 10 from inoculation (Fig. 4B). In the latter phase of infection, HBV DNA was detected on 100 copies per mL at Day 189, and HBsAg measured by the CLEIA prototype was detected on Day 182. The first detection days of DNA measured by qualitative nested PCR and HBsAg measured by AxSYM (Abbott Laboratories) or the CLEIA prototype were compared in the samples from six chimpanzees (Table 4). The mean number of days which HBV DNA and HBsAg measured by AxSYM or the CLEIA prototype were 28.5, 56.7, and 38.2 days, respectively. The mean difference in the first HBsAg detection between AxSYM and the CLEIA prototype was 18.5 days. The difference in the window period for HBV DNA measured by qualitative PCR and HBsAg measured by the CLEIA prototype was 9.7 days.

DISCUSSION

NAT can detect a low-titer HBV infection. It is considered to be a superior technique for the early detection of

HBV infection.^{24,25,28} However, despite the regular use of minipool NAT for blood donor screening, the risk of posttransfusion HBV infection persists.²⁰⁻²⁵ In this study, we developed an unprecedented high-sensitivity HBsAg detection prototype and investigated whether such an assay could reduce the risk of undesired HBV transmission.

For the development of the CLEIA prototype, we focused on the epitope that was the target region of the antibodies used for HBsAg detection. HBsAg is a four-transmembrane protein comprising 226 amino acid residues (amino acids 1-226). Although the transmembrane structure of HBsAg is not completely elucidated, it has been proposed that HBsAg is composed of an endoplasmic reticulum (ER) lumen region comprising amino acids at positions 1 to 11 from the N-terminal of HBsAg, a hydrophobic transmembrane region comprising amino acids at positions 12 to 28, a region inside the lipid bilayer comprising amino acids at positions 29 to 80, a hydrophobic transmembrane region comprising amino acids at positions 81 to 97, a hydrophilic ER lumen region comprising amino acids at positions 98 to 156, and two hydrophobic transmembrane regions comprising amino acids at positions 157 to 226.³³ A common determinant "a," which is used in the conventional methods for HBsAg detection, is contained in the amino acids at positions 110 to 156, particularly in the amino acids at positions 98 to 156 localized on the ER lumen side, that is, on the surface of the viral particle. It is indicated that the detection limit is improved when the MoAbs, each bound to a distinct epitope, are used in combination.³⁴ In this study, to detect the HBsAg more effectively, we used MoAbs that recognized HBsAg localized inside the lipid bilayer, on the ER lumen side, and at the position of the common determinant "a." To enhance the effect of antibodies that recognize the inner epitope, detergents were added in the reaction buffer. It is confirmed that detergents were necessary for the reaction of such antibodies in the preliminary experiment. Detergents might help to exposure the epitope localized inside the lipid bilayer, and this is one of the characters of the CLEIA prototype. Furthermore, we tried to increase the detection limit by improving the tracer.³² The improvement of the uniting ratio of the enzyme and antibody is the way to enhance the signal. However, especially for the high-molecular-weight molecule such as alkaline phosphatase, the high ratio conjugation often causes the aggregation. The aggregated tracers cause the high background and sometimes cause the low positive signal by covering the antigen-binding site of antibody with enzyme. In this report, we made the labeled tracer as a hydrophilic mass molecule and successfully prevented the aggregation. Although this is a simple method to improve sensitivity, which was only modified from the classical technique,³² it can be applied to many types of conjugation.

The detection limit and cutoff value for the CLEIA prototype were investigated by standardizing the unit

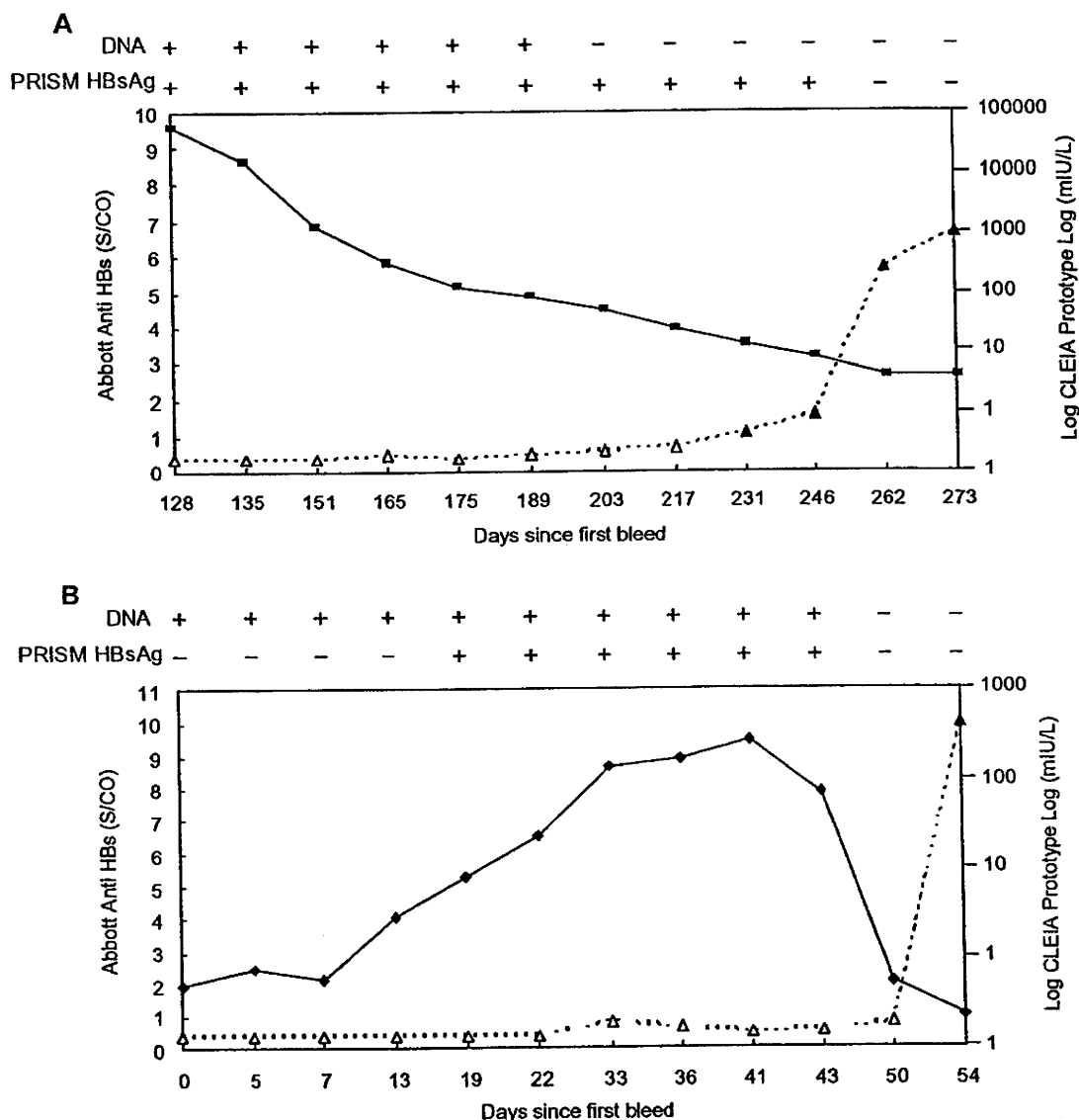


Fig. 3. The seroconversion samples that became anti-HBs-positive were measured by the CLEIA prototype. (A) PHM 935B (Boston Biomedica, Inc.). (B) HBV 6281 (Zeptomatrix Corp.). The results of the CLEIA prototype (■) were compared with the DNA and PRISM HBsAg data provided (Abbott Laboratories). + = detected HBV DNA or PRISM HBsAg; - = under the detection limit for DNA or PRISM HBsAg. The appearances of anti-HBs in the serum samples were monitored using IMx AUSAB kits (Abbott Laboratories) supplied by the panel vendors. It is indicated as signal-to-cutoff ratio (S/CO). (Δ) Anti-HBs-negative; (▲) anti-HBs-positive. For detecting HBV DNA, the Roche Amplicor HBV Monitor assay with a detection limit of 400 copies per mL was used in PHM 935B, and the PCR conducted by the vendor with a detection limit of 100 copies/mL was used in HBV 6281.

against the WHO standard. In comparison of the cutoff point, the sensitivity of the CLEIA prototype (0.22 mIU/mL) was approximately 230-fold higher than that of the quantitative HBsAg detection system, ARCHITECT (50 mIU/mL), and 114-fold higher than that of the qualitative HBsAg detection system, PRISM (25 mIU/mL). It is suggested that the CLEIA prototype greatly improved the detection limit not only by the combination of MoAbs but

also by the polymerization technique for conjugation. A dilution linearity test, which provides information about the precision of assay results for samples tested at different levels of dilution, was performed.

To evaluate whether the high-sensitivity HBsAg CLEIA prototype contributed to early detection of HBV, commercially available seroconversion panels were tested. The CLEIA prototype reduced the window period

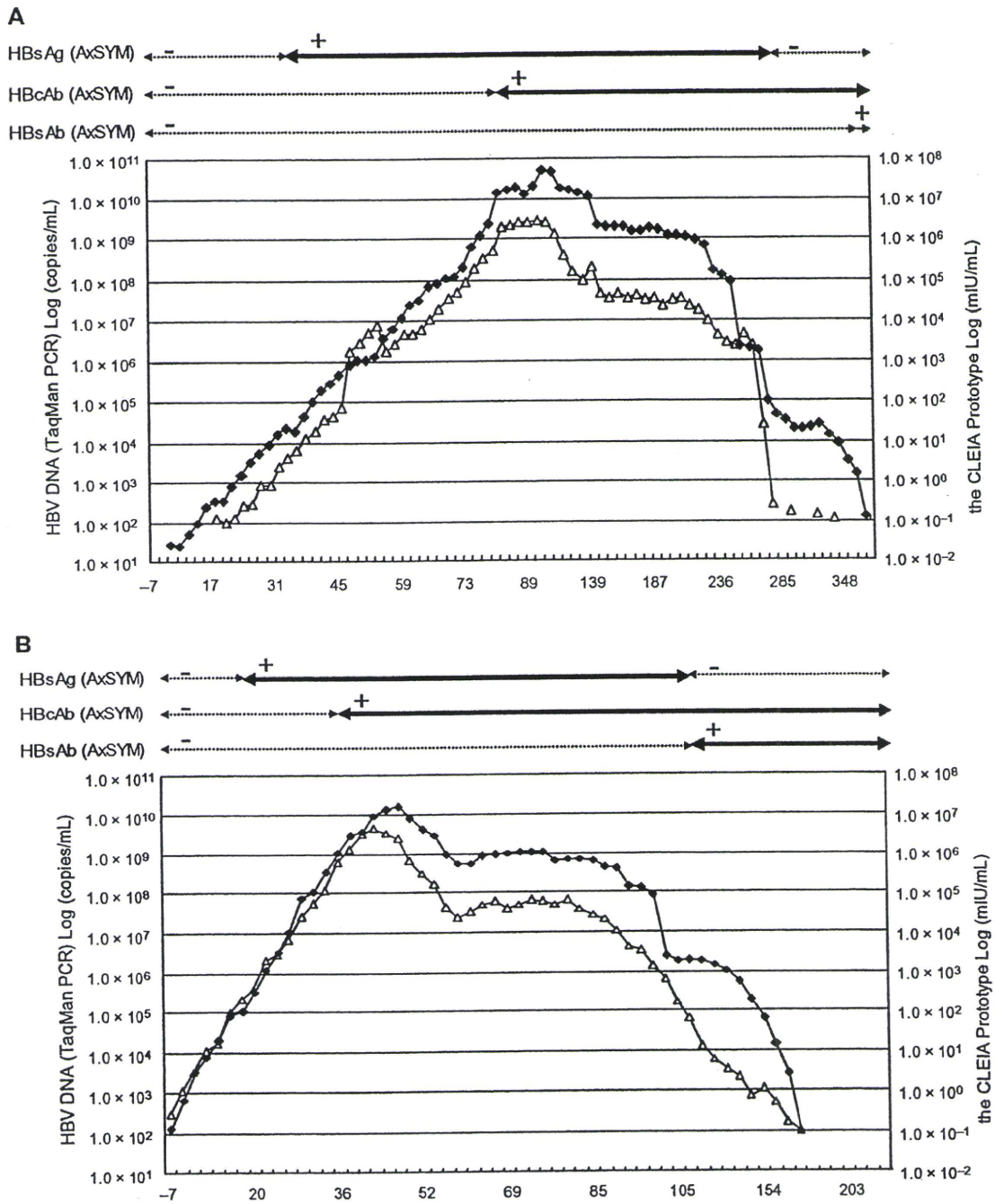


Fig. 4. The samples obtained from HBV-inoculated chimpanzees were tested by the CLEIA prototype. (A) The serum sample was collected from Chimp 246 between 1 week before inoculation and 410 days after inoculation of HBV. (B) The serum sample was collected from Chimp 272 between 1 week before inoculation and 238 days after HBV inoculation. (Δ) HBV DNA (TaqMan PCR); (◆) HBsAg measured by the CLEIA prototype. The data of HBsAg, HBcAb, and HBsAb measured by AxSYM (Abbott Laboratories) are shown above each graph (+ = detected; - = under the detection limit).

by 17.4 days compared with the existing CLIA; the reduced window period for HBsAg detection almost equaled that of DNA detection. In the tested 16 seroconversion panels, the results indicated that the CLEIA prototype detected

HBsAg earlier than DNA in Panels PHM910 and HBV6277. However, for panel HBV6277, it was interpreted by the vendor that DNA was reactive from the first blood sample whereas it was below the level of quantitation. In addition,