

201034072A

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

我が国における新規ヒトレトロウイルスXMRVの検査法確立等

に関する研究（H22-医薬-指定-029）

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口功

平成23（2011）年3月

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

我が国における新規ヒトレトロウイルスXMRVの検査法確立等

に関する研究 (H22-医薬-指定-029)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口功

平成23(2011)年3月

研究組織

研究代表者	浜口 功	国立感染症研究所・血液・安全性研究部
研究分担者	岡田 義昭	国立感染症研究所・血液・安全性研究部
	古田 里佳	大阪府赤十字血液センター研究部
	富田 善彦	山形大学医学部腎泌尿器外科学教室
	宮沢 孝幸	京都大学ウイルス研究所・ウイルス感染症研究センター・病態解明チーム

目次

I. 総括研究報告

新規レトロウイルス XMRV の検出法の開発と性状解析 (浜口功、岡田義昭)	4
図 1 : XMRV の塩基配列の特徴とプライマーの位置	8
図 2 : XMRV の検出系と感染系の構築	8
図 3 : XMRV の標的細胞の検索	9
図 4 : 正常ヒト末梢血単核細胞への XMRV 感染	9

II. 分担研究報告

XMRV 抗体検出法の開発 (古田里佳)	10
国内における XMRV 分離の試み (宮沢 孝幸)	12
前立腺癌患者における XMRV 感染の検討 (富田善彦)	15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	16
---------------------	----

IV. 研究成果の別刷	18
-------------	----

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

新規レトロウイルス XMRV の検出法の開発と性状解析

研究代表者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長
研究分担者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

XMRV (Xenotropic Murine Leukemia virus-related virus) の核酸増幅法を用いた検出法の開発とウイルス学的性状の解析を行ない、下記の成果を得た。

1. XMRV 遺伝子を特異的に検出できる核酸増幅法を確立した。これによって血液や感染細胞から XMRV を検出できるようになった。
2. XMRV は cell free で宿主細胞に感染した。
3. XMRV は感染した細胞株に CPE (cytopathic effect) は誘導しなかったが、血液 (B 細胞、T 細胞、単球) 系、神経系、肝細胞系などの広範な細胞株に感染が認められた。感染した細胞から新たなウイルスが産生された。
4. mitogen 刺激により活性化したヒト末梢血単核球は、XMRV に感染した。

A. 研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤は、ヒトの血液を原料に製造される医薬品であり、血液を介して多種の病原体が感染する可能性がある。2006 年にヒト前立腺癌から発見されたレトロウイルス XMRV (Xenotropic Murine leukemia virus -related virus) は、2009 年に慢性疲労症候群から高率に検出されたという報告 (Science 326, 585- 589, 2009) によって注目を集めた。健康人からも 3.6% の頻度で検出されたことから血液製剤を介した感染が危惧され血液製剤の安全性確保のためにその解析が急務となった。本研究班の主な課題は、検

出法を確立することにあるが、XMRV の標的となる細胞の同定やウイルス学的性状も併せて解析することは、安全を確保するために重要である。XMRV の国内からの感染報告はないので、XMRV が持続感染しているヒト前立腺癌株 22RV1 を用いて研究を実施した。

B. 研究方法

1. XMRV ウイルスの調整

ヒト前立腺癌株 22RV1 をフラスコに撒き、コンフルレント時に培養液を交換し、24 時間後に培養上清を回収した。3000rpm で 10 分遠心し、細胞成分を取り除き、0.45 μ m のフィルターを

通した。1mL に分注し、使用するまで-80 度に凍結保温した。

2. 核酸増幅法による XMRV の検出

図 1 に示したように XMRV は他の xenotropic mouse leukemia virus と比較して gag 領域に特徴的な 24 塩基の欠損が存在する。欠損した塩基配列を跨ぐように sense primer を作製し、3 末側に 2 つの antisense primer を作製することによって single PCR や semi-nested PCR を行なった。精製した DNA 又は PCR を鋳型にして、核酸増幅法を行ない、増幅産物は 2%アガロールゲルの電気泳動によって XMRV 遺伝子の有無を解析した。

3. ストックしたウイルス液のウイルス量と感染価

1 で調整したウイルス液を培養液で 10 倍ずつの段階希釈を行ない、希釈したそれぞれの液から 100 μ L を取り、RNA を抽出した。RNA は 10 μ L に溶解し、5 μ L を RT-PCR に用いた。

感染価は、ヒト前立腺癌株 LN-Cap を用い、24 穴プレートに細胞を 2×10^5 /well ずつ撒き、ストックしてあるウイルス液を 10 倍ずつの段階希釈し、希釈したウイルス液を 100 μ L/well 添加した。ウイルスと細胞の接着を高めるためにポリブデンを最終濃度 10 μ g/mL になるように加え、3 週間培養した。感染 3 週目に細胞から DNA を抽出し、上記プライマーを用いて PCR を行ない、XMRV 遺伝子が検出された最大希釈倍率を求め、これを 10 倍し 1mL の感染価とした。

4. ヒト細胞株を用いた XMRV の感受性の評価

CEM5 (T 細胞株)、Raji (B 細胞系)、U937 (単球細胞)、T-98g (glioma)、ONS-76 (meduroblastoma)、YKG (glioma)、LN-Cap (prostate cancer) を 2×10^5 /well ずつ 24 穴のプレートに撒き、XMRV を感染させた。感染 1 日目に PBS で 3 回洗浄し、添加したウイルスを取り除いた。週 2 回の継代を行ない、3 週間培養を行なった。3 週後に細胞と培養上清を回収し、DNA と RNA を精製した。上記プライマーを用いた single-PCR (32 サイクル) を行ない、XMRV 遺伝子の有無を解析した。

5. XMRV の gag 領域の塩基配列の解析

ウイルス液を作製した XMRV が持続感染している 22RV1 細胞と XMRV を感染させ約 3 ヶ月継代した LN-Cap と CEM5 細胞株から DNA を抽出し、を用いて gag 領域を増幅し、約 700 塩基の配列を解析した。

6. ヒト末梢血単核球への XMRV の感染

血液からフィコールを用いて分離したヒト末梢血単核球 (PBMC) にコンカナバリン A を最終濃度 10 μ g/mL 加え、T 細胞を活性化した。1 日後に XMRV を感染させ、感染 2 日目に細胞を回収し、DNA を精製し、XMRV 遺伝子の有無を核酸増幅法によって検索した。

C. 研究結果

1. XMRV ウイルスの調整

図 2 に示すように RT-nested PCR によって培養上清中には 10^8 希釈まで XMRV 遺伝子が検出された。また、細胞に上清を感染させた場合は、 10^7

希釈まで感染が確認できた。従って、得られた XMRV のストックウイルス液の感染価は、 10^8 /mL とした。以後この分注したウイルス液を用いて全ての実験を行なった。

2. ヒト細胞株を用いた XMRV の感受性の評価

血球系 (T、B、単球)、神経系、前立腺癌細胞株等、感染させた全ての細胞株から XMRV の遺伝子が、核酸増幅法によって検出できた (図 3)。また、感染 3 週後の CEM5、Raji、ONS76、LN-Cap の培養上清から RNA を抽出し、核酸増幅法を用いて XMRV 遺伝子を増幅したところ、 10^4 ~ 10^5 希釈まで増幅産物が確認できた (図 3)。これによって XMRV に感染した細胞は、感染しただけでなく感染した細胞から新たなウイルスが産生されていることが明らかとなった。

3. XMRV の gag 領域の塩基配列の解析

22RV1 と XMRV を感染させた CEM5 と LN-Cap から得られた gag 領域を比較したところ XMRV に特徴的な 24 塩基の欠損が、解析した 3 つの細胞から認められた。以上から 22RV1 細胞から産生された XMRV が CEM5 と LN-Cap に感染したことが塩基配列からも明らかとなった。既に登録されている VP62 の塩基配列と比較したところ、解析した約 700 塩基において全て一致していた。

4. ヒト末梢血単核球への XMRV の感染

ヒト末梢血から調整した単核球をコンカナバリン A 刺激にて活性化し、XMRV を感染させたところ図 4 に示すように XMRV の遺伝子が検出された。活性化した T 細胞に感染したもの

と考えられた。株化された細胞だけでなく、正常細胞にも XMRV は感染することが示された。

D. 考察

XMRV は、前立腺癌組織から発見された新規のマウス白血病ウイルスに属するレトロウイルスである。核酸増幅法による XMRV 遺伝子検出系の確立を目的に本研究を実施した。ウイルスを得るために XMRV が持続感染している 22RV1 細胞株からウイルス液を調整することができた。これを用いることによって血液等の液状の検体から核酸増幅法による XMRV 検出法を開発することができた。さらに同一のウイルス液を多数分注し、凍結保存することによって核酸増幅法の感度や特異性も評価することが可能になった。また、XMRV をさまざまなヒト細胞株に感染させたところ、感染を試みた全ての細胞株から XMRV の遺伝子が検出でき、感染が成立したことが確認できた。これらの感染させた細胞の DNA を用いることで、DNA からでも XMRV の検出が可能になった。さらに、これらの XMRV を感染させた細胞から新たな XMRV が産生されることも確認できた。広範な組織由来の細胞株に感染したことは、輸血等によって体内にウイルスが侵入した場合、感染が広範囲の細胞に成立する可能性が示唆された。また、株化された細胞だけでなく、活性化した末梢血由来の T 細胞にも感染が認められた。生体内で高感受性の細胞群の特定は今後の課題であるが、輸血等の血液製剤に XMRV が混入すれば感染することが可能であると考えられた。また、XMRV に高感受性を示す LN-Cap を用いて感染価を求めることも可能になった。この細胞株を用いることによって血

液からの XMRV のウイルスの分離も不活化や除去法の評価にも応用できると考えている。

徳島、2010 年

E. 結論

XMRV を検出するための核酸増幅法を開発した。それを用いることによって血液や細胞からの XMRV 遺伝子の検出が可能になった。また、この検出系を用いて感受性を有する細胞株を検討したところ、血液系の細胞株以外に広範な細胞株に感染が成立することが明らかになった。また、活性化した末梢血由来の T 細胞にも感染が成立した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., Okada Y., and Yamaguchi K.: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a” determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. *Clinica chimica Acta*. 2010. vol. 411:605-606

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、浜口 功：新規レトロウイルス XMRV の検出法と性状解析、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年

2) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭：血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 58 回日本ウイルス学会、

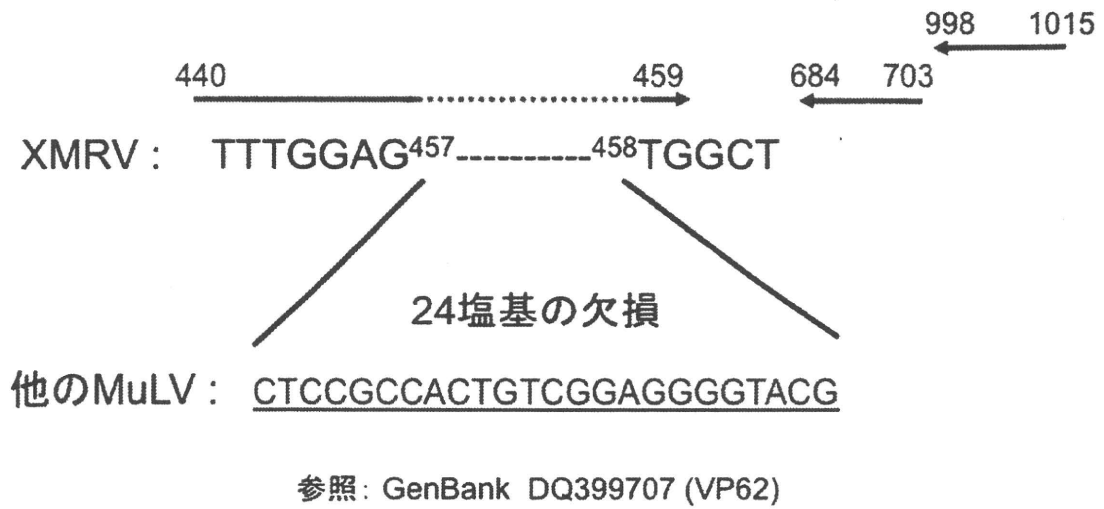


図1 XMRVの塩基配列の特徴とプライマーの位置

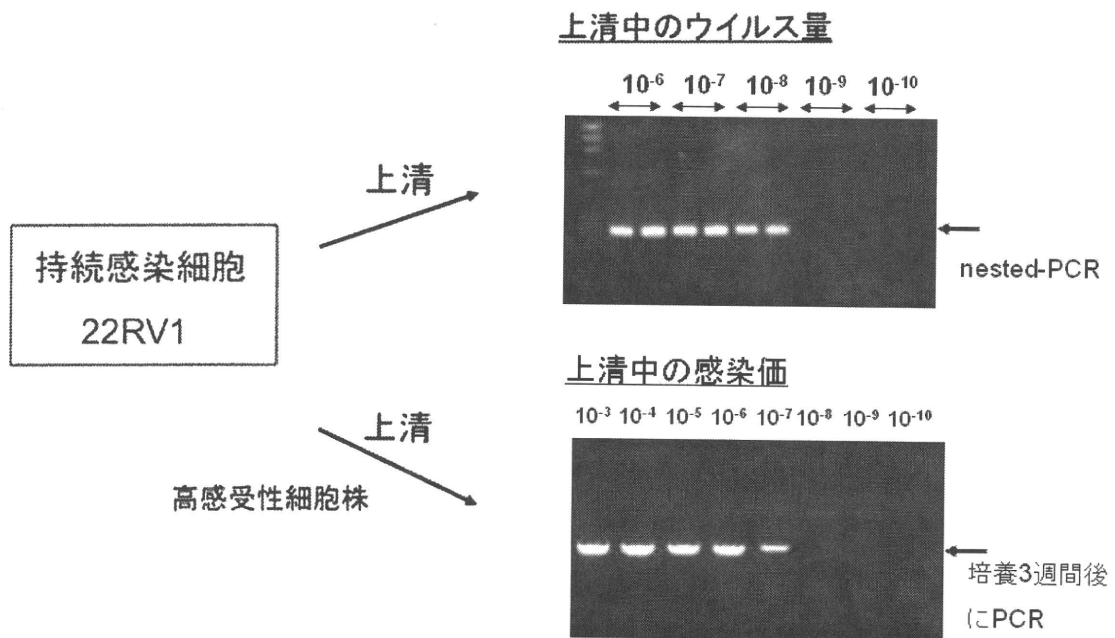


図2 XMRVの検出系と感染系の構築

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

XMRV 抗体検出法の開発

研究分担者：古田里佳 大阪府赤十字血液センター 研究部

研究要旨

新規ヒトレトロウイルスとして報告された Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) の本邦における流行を把握するために、XMRV 抗体検出法の開発を行った。構築した Western Blotting による抗体検出法を用いて献血ドナー500 人の検討を行ったところ Gag 抗体保有率は 1.6%であった。

A. 研究目的

2006年に前立腺がん患者から発見され、2009年には慢性疲労症候群患者の血中からも検出されたと報告された XMRV の本邦における流行状態を把握し、輸血事業におけるリスクを評価することを最終目標とする。当分担研究においては流行把握評価のための XMRV 抗体検出法の開発を目的とする。

B. 研究方法

ウイルスタンパク質発現を確認するために XMRV Env 領域に複数の合成ペプチドを作成し、これらを抗原にして XMRV Env ウサギポリクローナル抗体を作成した。抗体検出に用いる抗原用は、XMRV Env 発現ベクターを作成したが、細胞内ドメインにタグ有無どちらのベクターからも Env の発現量がきわめて少ないため、抗原として組換えタンパク質ではなく、ウイルス粒子そのものを用いる方法に転換し、世界最初に XMRV を分離した Dr. R. Silverman より XMRV 全長分子クローン pcDNA.3.1-VP62 の分与を受けた。この分

子クローンをヒト 293T 細胞に遺伝子導入して、その培養上清よりウイルス粒子を回収して、高速遠心によって濃縮したものを抗体検出用抗原とした。本抗原を用いて ELISA を作成したが十分な S/N 非が得られず、バックグラウンドが高かったため、抗体検出は Western Blot 法で行った。

C. 結果

予備的スクリーニングとして献血ドナー500 検体のスクリーニングでは、XMRV Gag capsid protein に対する抗体保有者が 8名同定され、抗体保有率は 1.6%であった。また、前立腺がん患者、慢性疲労症候群患者ではそれぞれ 3.0%、2.0%であり三群で抗体保有率に有為差は認められなかった。

D. 考察

検出された抗 Gag 抗体が XMRV 既往感染を意味するのか、あるいは他の抗原に対する交差反応性を見ているのか現時点で判断不能であるが、感染既往と仮定し

ても健常者と疾患群で抗体保有率に差がないことから、国内においてはこれら二疾患と XMRV 感染には関連は認められない。

E. 結論

抗体検出系においては Env 抗体検出のためのさらなる改良が必要である。また、国内の XMRV 流行を把握するためには抗体検査のみでは不十分であり、感染確定には核酸検査を平行して実施する必要がある。XMRV に対する献血ドナーの研究的核酸検査は平成 23 年度に開始予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, Furuta RA, Hori Y, Tanaka S, Fukumori Y, Hirayama F, Inoue M. Establishment of a cell line panel as an alternative source of platelet antigens for a screening assay of anti-human platelet antibodies. *Transfus Med.* 2011 Jan 6. doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01064.x. [Epub ahead of print]

Sato E, Furuta RA, Miyazawa T. An Endogenous Murine Leukemia Viral Genome Contaminant in a Commercial RT-PCR Kit is Amplified Using Standard Primers for XMRV. *Retrovirology.* 2010 ;7:110.

Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, Furuta RA, Hori Y, Fukumori Y, Tanaka S, Curtis BR, Inoue M, Hirayama F. Detection of antibodies against human platelet antigens 15a and 15b by using a cell line panel. *Br J Haematol.* 2010;151(4):402-4.

Koh Y, Taniue A, Ishii H, Matsuyama N, Amakishi E, Hayashi T, Furuta RA, Fukumori Y, Hirayama F, Yoshimura K,

Nagamine T, Tamai S, Nakano S. Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by an antibody specific for a newly identified allele of human platelet antigen-7. *Transfusion.* 2010;50(6):1276-84.

2. 学会発表

「Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) 抗体特異性の解析」第58回日本ウイルス学会総会

「レトロウイルス XMRV について」
第34回日本血液事業学会シンポジウム

「XMRV は第3のヒトレトロウイルスなのか」第9回沖縄感染症フォーラム

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

国内におけるXMRV分離の試み

研究分担者：宮沢孝幸 京都大学ウイルス研究所細胞生物学研究部門信号伝達
学研究分野

研究要旨

新規ヒトレトロウイルスであるXMRVが、前立腺ガン患者や慢性疲労性症候群（CFS）の患者に感染していることがアメリカで報告されている。One step RT-PCRキットを用いて、XMRVの*gag*遺伝子領域の一部の検出を試みたところ、陰性対照の検体で陽性のバンドが頻繁に検出された。我々はキット自体に内在性マウス白血病ウイルス（enMLV）のゲノムまたはXMRVが極少量混入していた可能性を考え、RT-PCRキットの品質評価を行った。その結果、一部の市販のOne step RT-PCRキットにenMLV由来のRNAが混入していることを確認した。汚染原は特定できなかったが、Hot Start PCRを可能にするために、Taqポリメラーゼにマウス由来のモノクローナル抗体が添加されていることから、そのモノクローナル抗体にenMLVのRNAが混入したと推察された。CFSや前立腺癌患者におけるXMRV感染の調査を行うときには、検査キットや酵素の品質評価が必須であると考えられた。

A. 研究目的

新規ヒトレトロウイルスであるXMRVが、前立腺ガン患者や慢性疲労性症候群（CFS）の患者に感染していることがアメリカで報告されている。国内におけるXMRV分離株を得るために、前立腺患者やCFS患者からのウイルス分離を行う。

B. 研究結果

国内におけるXMRV分離を目的として、慢性疲労症候群（CFS）患者の血漿中に異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス（XMRV）のウイルスRNAが存在するか否かを調査する前実験を行った。

One step RT-PCRキットを用いてXMRVの*gag*遺伝子領域の一部を検出しようとした試みたところ、陰性対照の検体で陽性のバンドが予想通りの大きさと頻繁に検出された。我々はそのキット自体に内在性マウス白血病ウイルス（MLV）のゲノムまたはXMRVが極少量混入していた可能性を考え、RT-PCRキットの品質評価を行った。

One step RT-PCRキットは日本でInvitrogen, TaKaRa, Promega, QIAGENの4社から購入した。XMRVや他のMLV関連ウイルスの*gag*遺伝子を増幅させるために、XMRV研究で広く使われているプラ

イマーセット (419F と 1154R、GAG-I-F と GAG-I-R) を使用した。増幅された産物の塩基配列を決定し、既知の内在性多指向性 MLV (PmERV)、CFS 患者から分離された XMRV や他の MLV 関連ウイルスの塩基配列と比較した。

その結果、1社の One step RT-PCR キットの酵素 mix に PmERV 由来の RNA が混入していることを確認した。RT-PCR により増幅された混入産物の *gag* 領域の一部は、第7染色体上の PmERV の配列とほぼ同一 (99.4%の相同性) であり、最近 CFS 患者から検出・同定された MLV 様ウイルスに極めて類似していた (96.9 ~ 97.6%)。その混入産物の *env* 配列の一部を決定したところ、PmERV の配列とほぼ同一 (99.6%) であった。

C. 考察

一部の市販の RT-PCR のキットには XMRV のプライマーで増幅しうる PmERV の RNA が混入していることが判明した。汚染原は特定できなかったが、Hot Start PCR を可能にするために、Taq ポリメラーゼにマウス由来のモノクローナル抗体が添加されていることから、精製モノクローナル抗体に PmERV の RNA が混入していたと推察される。

D. 結論

CFS や前立腺癌患者における XMRV 感染の調査を行うときには、研究者は PCR や RT-PCR 検査に着手する前に、XMRV ゲノムと同様に内在性 MLV ゲノムの混入の有無を注意深く評価すべきである。また、XMRV の検査においては、モノクローナル抗体

を使用していない Taq polymerase や RT-PCR キットを用いるべきである。

E. 健康危険情報

F. 研究発表

1. 論文発表

Miyazawa, T. Endogenous retroviruses as potential hazards for vaccines. *Biologicals* 38, 371-376, 2010.

Sato, E., Furuta, R.A., and Miyazawa, T. An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology* 7, 110, 2010.

2. 学会発表

Miyazawa T.: Potential risk of iatrogenic infection by endogenous retroviruses (ERVs): an infectious ERV contaminates some live vaccines for pets. The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institutes Network, Kanazawa, June 24-25, 2010.

Miyazawa T.: Risk of iatrogenic infection by endogenous retroviruses. The 17th East Asian Joint and 9th Cross-Strait Symposium on Biomedical Research, Taiwan, July 1-2, 2010.

佐藤英次、古田里佳、倉恒弘彦、庄嶋貴之、中富康仁、保井一太、宮沢孝幸：慢性疲労症候群患者血液における

xenotropic murine leukemia
virus-related virus の核酸調査 第 58
回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2
010年11月7日—9日

古田里佳、杉山武毅、宮沢孝幸、佐藤英
次、倉恒宏彦、中富康仁、保井一太、平
山文也 : Xenotropic murine leukemia

virus-related virus (XMRV) 抗体特異性
の解析 第58回日本ウイルス学会学術集
会、徳島、2010年11月7日—9日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）
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

前立腺癌患者におけるXMRV感染の検討

研究代表者 富田 善彦 山形大学医学部腎泌尿器外科学講座主任教授

研究要旨

前立腺癌患者より提供される、前立腺組織及び血液を用い、レトロウイルスXMRV感染の確認と、ウイルスの分離を行う。

A. 研究目的

世界的に新しいヒトレトロウイルスXeno tropic Murine Leukemia Virus-Related Virus(以下、XMRV)はヒト疾患との関連で注目されている。因果関係はいまだ不明であるが、慢性疲労症候群や前立腺癌に関与することが示唆されている。本研究では、XMRV感染の検査法確立と血液を介した感染の可能性を明らかにすることを目的とする。また、前立腺癌患者における感染を検討し、組織中のウイルス分離を行ってXMRV日本株の分離を目指す。

B. 研究方法

山形大学医学部附属病院において手術や検査で摘出された前立腺組織を用いる。病理診断のために作成された前立腺のパラフィンブロックを薄切した切片を免疫染色して評価する。またパラフィンブロッ

ク切片や、検査の際に同時採取し凍結保存した組織よりDNAを抽出してXMRVのゲノム検出を行う。前立腺癌患者血液(約10ml)を採取し、末梢血単核球を回収してXMRV感染のスクリーニングを行う。陽性の場合、前立腺癌細胞由来細胞株(LNCap, FGC)と共培養することでウイルス分離を試みる。

(倫理面への配慮)

検体提供例は、当研究責任者以下研究者(いずれも山形大学腎泌尿器外科学講座所属研究員)においてのみ連結可能な匿名化を行う。また、本研究内容を記した説明書をもって検体提供者へ十分な説明を行ったうえで、書面による同意を得たうえで検体提供を受ける。

C. 研究結果

1. 研究遂行にかかる検体採取・処理

システムの整備

前述のごとく、前立腺がん患者よりの検体を使用するため、同意の取得、検体の採取、その初期処理、貯蔵、共同研究者への送付につき、システムの整備を進めた。

山形大学医学部倫理委員会へ申請し倫理審査を受け承認を得て、患者への説明・同意文書を整備した。また、患者血液より、末梢血単核球を分離回収するための、試薬、手順等について整備した。

2. 患者検体採取の開始

これまでに4名の前立腺癌患者より検体の提供を受けた。血液検体については単核球分離を行った後、国立感染症研究所へ送付し解析される。また、今後も前立腺癌患者へ本研究への参加を求め、検体数を増やしていく予定である。

3. 免疫組織染色の準備

前立腺組織について免疫組織染色によりXMRV感染の有無を検討するために、染色法の準備・確認作業を行った。

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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

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
Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., <u>Okada Y.</u> , Yamaguchi K.	Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) "a", determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit.	Clinica chimica Acta	411	05-06	2010
Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, <u>Furuta RA</u> , Hori Y, Tanaka S, Fukumori Y, Hirayama F, Inoue M.	Establishment of a cell line panel as an alternative source of platelet antigens for a screening assay of anti-human platelet antibodies.	Transfus Med.		doi: 10.1111/ j.1365-3 148.2010 .01064.x .	2011

Sato E, <u>Furuta RA</u> , Miyazawa T.	An Endogenous Murine Leukemia Viral Genome Contaminant in a Commercial RT-PCR Kit is Amplified Using Standard Primers for XMRV.	Retrovirology.	7	110	2010
Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, <u>Furuta RA</u> , Hori Y, Fukumori Y, Tanaka S, Curtis BR, Inoue M, Hirayama F.	Detection of antibodies against human platelet antigens 15a and 15b by using a cell line panel.	Br J Haematol.	151	402-404	2010
Koh Y, Taniue A, Ishii H, Matsuyama N, Amakishi E, Hayashi T, <u>Furuta RA</u> , Fukumori Y, Hirayama F, Yoshimura K, Nagamine T, Tamai S, Nakano S.	Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by an antibody specific for a newly identified allele of human platelet antigen-7.	Transfusion. ;50(6):1276-84.	50	1276-1284	2010
<u>Miyazawa, T.</u>	Endogenous retroviruses as potential hazards for vaccines.	Biologicals	38	371-376	2010



Letter to the Editor

Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a” determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit

Dear editor:

Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) is one of the most important serological markers used in the diagnosis of HBV infection. HBV has been classified into 8 genotypes, designated A to H [1–4]. In our previous report [5], we evaluated the sensitivity of 10 commercially available diagnostic kits to recombinant HBsAg encoded by HBV of genotypes A to H. None of the diagnostic kits examined failed to detect HBsAg of all the genotypes (A to H) at a concentration of 1.0 IU/ml. When the HBsAg samples were tested at a lower concentration (0.2 IU/ml), 9 out of 10 kits gave positive results, i.e. cut-off index (COI) \geq 1.0, but 1 kit, Lumipulse II HBsAg, failed to give positive results for genotypes E and F. In this study, we compared the amino acid sequences of the HBsAg “a” determinant among HBV genotypes.

Amino acid-substituted HBsAg, i.e., S140T, for genotypes E and F were synthesized as follows: the S genes of genotypes E and F were cloned into the eukaryotic expression vector pEF6/V5-His (Invitrogen Co., San Diego, CA), as previously described [5]. We constructed the amino acid-substituted HBsAg mutants, S140T, by inverse PCR of the whole plasmids with KOD-plus polymerase (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) following the thermal cycler protocol; denaturation for 2 min at 94 °C and 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 6 min 30 s. Primers for PCR of the plasmid of genotype E were as follows: forward eS140T-Fw409-430, 5'-ATGTTGCTGTACAAAACCTTCGG-3'; reverse eS140T-Rv408-389, 5'-GAGGGAACATAGAGGTTC-3'. Primers for genotype F plasmid were as follows: forward fS140T-Fw409-430, 5'-CTGTTGCTGTACCAAACCTTCGG-3'; reverse fS140T-Rv408-389, 5'-GAGGGAACATAGAGGTTC-3'. Underlined characters in these DNA sequences refer to codon S140T in the S protein and boldface characters indicate the substituted nucleotide that was T in the wild-type sequence. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and isolated with the MinElute Gel kit (Qiagen GmbH, Germany), circularized using the Blunting Kination Ligation kit (Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan), and used to transform TOP 10 Chemically Competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen). The entire S gene regions of the resulting plasmids were sequenced to confirm that they had the desired substitution and no other mutation (data not shown). The above kits were used according to the respective manufacturer's instructions.

Huh-7 cells grown in two 6-well culture plates (Invitrogen) were transiently transfected with each HBsAg plasmid as previously described [5]. After 3 days of culture, approximately 40 ml of culture supernatant was harvested and filtered through a membrane filter with pore size of 0.45 μ m (Millex® Filter Unit; Millipore Co., Billerica, MA). The supernatants were concentrated with Amicon Ultra-15 K10 (Millipore Co.) to one-fifth of the volume. The concentration of each recombinant HBsAg sample was tentatively determined using (expressed in IU/ml) Architect HBsAg QT (Abbott Japan Co., Ltd., Chiba, Japan), which is the only

quantitative assay kit approved in Japan. The samples were diluted to make 2-fold serial dilutions at concentrations of 1.6 IU/ml to 0.1 IU/ml with a multi-marker negative matrix (Accurum 810; BBI Co. Ltd., Boston, MA). The test samples were measured with 2 diagnostic kits – Lumipulse II HBsAg and Lumipulse Presto HBsAg (Fujirebio Co. Ltd., Tokyo, Japan) – according to the manufacturer's instructions and the results were expressed as the COI.

Comparison of the amino acid sequences of the HBsAg “a” determinant among HBV genotypes revealed that the amino acid at position 140 was T (threonine) in all genotypes except E and F but was S (serine) in genotypes E and F (Fig. 1A). We therefore synthesized amino acid-substituted HBsAg, i.e., S140T, for genotypes E and F. As shown in Fig. 1B, S140T of both genotypes, E and F, tested positive, i.e., COI \geq 1.0, by the Lumipulse II HBsAg kit even at a low concentration (0.1 IU/ml) of HBsAg. These results indicated that a single amino acid substitution in the HBsAg “a” determinant affects the sensitivity of the Lumipulse II HBsAg kit. In response to these results, Fujirebio Inc., the manufacturer of the Lumipulse II HBsAg kit, improved the sensitivity of the kit by optimizing it for the amounts of the two types of monoclonal antibody used. As shown in Fig. 1C, the improved kit, named Lumipulse Presto HBsAg, was able to detect a concentration of HBsAg as low as 0.1 IU/ml regardless of the substitution at amino acid 140.

In this report, we demonstrate that a single amino acid substitution affects the sensitivity of an in vitro diagnostic kit for HBsAg detection. This issue has been of wide concern because it was well documented that some diagnostic kits failed to detect particular mutant HBsAg that have an amino acid substitution in the “a” determinant, such as a Gly/Arg mutation at amino acid 145, i.e., G145R [6–8]. Our study clearly verified the influence of amino acid substitution in the HBsAg “a” determinant on the detection capacity of a diagnostic kit by using the amino acid substitution technique.

The effect of an amino acid substitution on the sensitivity of diagnostic kits may not be restricted to detection kits for HBsAg. The phenomenon reported here should be borne in mind when using in vitro diagnostic kits not only for HBsAg but also for other analytes, such as HCV core Ag and HIV Ag. In fact, our recent study demonstrated that a single amino acid substitution within the HCV core antigen sequence reduced the sensitivity of a commonly used immunoassay [9].

In conclusion, we have verified that a particular amino acid residue in the HBsAg “a” determinant of a particular HBV genotype is critical for HBsAg detection sensitivity. Furthermore, it was demonstrated that optimization for the amounts of monoclonal antibodies improved the sensitivity of an HBsAg detection kit. These results indicate that caution should be exercised when detecting HBsAg of various genotypes as well as mutant HBsAg.

Acknowledgments

We thank Fujirebio Inc. who supplied the HBsAg kits and in performing the assays. This study was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.