

ポリ-L-リジンコート磁性粒子を用いたウイルスの新規濃縮法の開発

—occult hepatitis B 検出への応用—

高倉(岩田)明子¹⁾ 佐藤 功栄¹⁾ 吉川 昭¹⁾ 板橋 正子¹⁾ 五反田裕子¹⁾
田中 建志²⁾ 溝口 秀昭¹⁾

【背景】輸血後 HBV 感染のリスクは HBV-NAT の導入により減少したが, HBs 抗原陰性で微量の HBV 陽性血液を感染源とするオカルト HBV 感染が問題として残っている. このような例に対処するために HBV および HBs 抗原を濃縮することにより検出感度を上げる簡便な濃縮法を開発したので報告する.

【対象】HBc 抗体価が赤血球凝集阻止法 (HI 法) により 2²HI 価以上の値を示し, 酵素抗体法 (EIA 法) により, HBs 抗原が陰性, 20 プール NAT により HBV-DNA が検出できないという条件を満たした献血者由来の血漿, 計 78 検体を対象とした.

【方法】ポリ-L-リジンを表面にコートした磁性粒子を用いて, 二価金属イオン存在下で, HBV-DNA を 20 倍に濃縮, HBs 抗原を 8 倍に濃縮して測定した. HBs 抗原は EIA (AxSYM[®]: Abbott 社) にて, HBc 抗体は HI (日本赤十字社) にて測定した.

【成績】対象とした 78 検体のうち 16 検体で個別 NAT により HBV-DNA が検出された. 残りの個別 NAT 陰性の 62 検体のうちの 25 検体から HBV-DNA 濃縮後に新たに HBV-DNA が検出された. また, 対象とした 78 検体は, 濃縮前の通常検査ではいずれも HBs 抗原は陰性であったが, 濃縮後には 29 検体から新たに HBs 抗原が検出された.

【結論】本濃縮法は HBs 抗原, HBV-DNA の両者の検出感度を上げることにより, 個別 NAT によっても HBV-DNA が検出できなかった検体から HBV-DNA を, また通常の EIA では HBs 抗原が陰性の検体から新たに HBs 抗原を検出することが出来た.

キーワード: HBV 濃縮, HBs 抗原濃縮, Occult hepatitis B 感染 (オカルト HBV 感染)

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会推薦論文

緒 言

日本赤十字社血液センターでは, 血清学的検査によっては HBs 抗原が検出できない, B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染ごく初期 (HBV 感染のウィンドウ期) の例, および, HBc 抗体と共にごく微量の HBV が検出される例 (HBV のオカルト感染例¹⁾²⁾) を輸血用血液から排除するために, 現在は 20 人分の血清をプールして 1 検体として測定する核酸増幅検査 (Nucleic acid Amplification Test: NAT) (以下ミニプール NAT と略す) によるスクリーニングを実施し, 輸血後 HBV 感染の予防を行ってきた³⁾. しかし HBV 感染のウィンドウ期や HBV のオカルト感染例ではウイルス量が少なく, ミニプール NAT によっては HBV-DNA が検出されず, これらの血液を感染源とする HBV 感染がごく稀ながら発生しているこ

とが知られている⁴⁾. この解決策としては, 献血者個人毎の血清を NAT により検査する, いわゆる個別 NAT による HBV-DNA 検査の実施が考えられる. しかし費用対効果の観点から個別 NAT を実施に移すことが妥当であるか否かについては議論の余地がある. 個別 NAT に代わる方法としては, 検体量を増やしてウイルスを濃縮し, ごく微量の HBV を検出する方法が考えられる. 従来からのウイルス濃縮法の代表例としては超遠心による方法⁵⁾が挙げられるが, 濃縮に長時間を要することと同時に, 多数の検体を処理することが困難であることなどから, 日常検査に応用可能な方法とは言い難い. そこで我々は 2 価金属イオンを利用した簡便なウイルス濃縮法を HBs 抗原, および, HBV-DNA の検出に応用し, 良好な結果を得たので報告する.

1) 埼玉県赤十字血液センター

2) 東京女子医科大学

[受付日: 2007 年 8 月 2 日, 受理日: 2008 年 4 月 4 日]

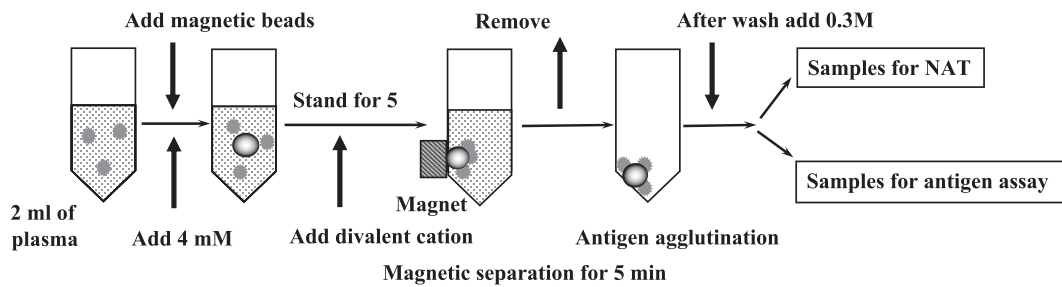


Fig. 1 An illustration Schematic diagram of the concentration method of HBV and HBsAg: Two milliliters plasma specimen was added to poly-L-lysine-coated magnetic beads (JSR Co., Tokyo, Japan) to make a concentration of 1 mg/ml. This was mixed with 30 μ l of 1.1 M zinc acetate solution and left to stand for 5 minutes, forming an aggregate of the virus and magnetic beads. This aggregate was placed on a magnetic stand for 5 minutes to magnetically separate the aggregate. The plasma fraction was then removed. After washing once with 1 ml of 2mM PBS, 50 μ l of 0.3 M EDTA was added to the separated aggregate to yield the virus or HBsAg concentrate.

対象と方法

対象

2003年3月から2007年1月までの間に献血された血液のうち、HBc抗体価が赤血球凝集阻止法(HI法)により2^{HI}価以上⁶⁾の値を示し、酵素抗体法(EIA法)により、HBs抗原が陰性、ミニプールNAT⁷⁾によりHBV-DNAが検出できないという条件を満たす献血者由来の血漿、計78検体を対象とした。

1) HBVとHBs抗原の濃縮

二価金属イオンの存在下でウイルスと凝集体を形成するポリ-L-リジンを表面にコートした直径1 μ mの磁性粒子(MRC社、東京)を用いて濃縮した。

HBVおよびHBs抗原の濃縮法の概略をFig.1に示した。すなわち、検体2mlにポリ-L-リジンをコートした磁性粒子2mgを添加し、これに1.1M酢酸亜鉛溶液を60 μ l混合して5分間静置し、ウイルスと磁性粒子表面のポリ-L-リジンとの凝集体を形成させた。これを磁気スタンド上に5分間静置し、血漿成分を除去した後に2mM PBS 1mlで1回洗浄後、0.3M EDTA溶液を濃縮液とした。

2) HBVの濃縮とHBV-DNAの測定

対象とした78検体のうち、個別NATによりHBV-DNAが検出された16検体を除く61検体を対象として20倍に濃縮後、HBV-DNAを測定した。

濃縮後の検体中のHBV-DNAはスマイテストEX-R&D試薬キット((株)医学生物学研究所、長野)を用いて、添付の操作手順書に従って抽出した。

HBV-DNAは、TaqManTM(ABI Prism 7700 Sequence Detector: PE Applied Biosystems, Foster City, CA)により増幅し、NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)の標準品を基に調整した日本赤十字社の標準品を用いて作製した標準曲線を用いて定量した。なお標準曲線から求めたHBVの定量限界

は100copies/ml以上で、定性的な95%信頼限界は60copies/mlであった⁷⁾。

3) HBs抗原の濃縮とHBs抗原の測定

対象とした78検体全例を対象として8倍に濃縮後、HBs抗原を測定した。

HBs抗原は、AxSYMTM(Abbott Laboratories: Abbott Park, IL)を用いて、添付の操作手順に従って測定した。

結果

1) HBV-DNAの検出

対象とした61検体のうち25検体でHBV-DNAが新たに検出された。これらの25検体のうち、HBV-DNA量が最小であった例は100copies/mlであった(Table 1, 検体No 1)。仮に、濃縮効率が100%であったと仮定すると、この検体中のHBV-DNA濃度は100copies/20mlとなり、通常の表示法に換算すると5copies/ml相当となる。

2) HBs抗原の検出

対象とした78検体のうち、29検体でHBs抗原が新たに検出された。この29検体のうち、10検体は個別NATによりHBV-DNAが陽性と判定されていた検体(検体No 17~26)、16検体は、濃縮後の測定で新たにHBV-DNAが検出された検体(No 1~16)、そして残りの3例は濃縮後の測定によってもHBV-DNAが検出されなかった検体(No 42~44)であった。なお、この3検体についてのHBs抗原検出結果の特異性は、HBs抗体を用いた吸収試験により確認した。

考察

ポリ-L-リジンを表面にコートした磁性粒子を用いて血漿検体中のHBVおよびHBs抗原の濃縮を行い、以下の結果を得た。検体を20倍に濃縮した後にNAT

Table 1 Detection of occult HBV by concentration of HBV DNA and HBsAg.

No	Sex	Age	ALT	HBsAg		HBcAb	HBV DNA	
				EIA (s/n) *1		HI (2 ⁿ)	copies/ml	
				Original	Con. (×8)	Original	Original Sample IDNAT (copies/ml)	Con. (×20) IDNAT (copies/20ml)
1	F	57	7	1.79	3.31	8	< 100	100
2	M	37	19	1.80	2.34	8	< 100	190
3	M	49	11	1.46	3.49	9	< 100	210
4	M	49	16	1.32	2.38	9	< 100	310
5	M	49	14	1.65	2.90	9	< 100	510
6	M	31	16	1.96	3.19	6	< 100	220
7	F	38	27	1.57	2.57	6	< 100	270
8	M	40	23	1.94	6.39	5	< 100	310
9	M	31	16	1.68	3.75	10	< 100	130
10	F	30	10	1.53	2.07	11	< 100	720
11	F	69	20	1.11	3.01	6	< 100	610
12	M	47	26	1.41	4.55	7	< 100	540
13	F	56	13	1.11	2.39	7	< 100	250
14	M	43	12	1.12	4.41	7	< 100	530
15	M	64	15	1.97	7.29	10	< 100	2200
16	F	54	11	1.72	4.85	7	< 100	120
17	F	51	18	1.42	2.09	10	120	nt *2
18	F	55	17	1.24	2.17	11	140	nt
19	M	30	19	1.19	3.72	6	140	nt
20	M	50	41	1.79	4.65	8	150	nt
21	M	29	28	1.94	4.62	6	160	nt
22	M	56	16	1.83	2.52	7	160	nt
23	F	47	15	1.52	4.38	6	210	nt
24	F	53	15	1.42	2.44	9	310	nt
25	M	46	38	1.14	2.61	8	330	nt
26	F	57	12	1.55	5.21	9	440	nt
27	M	47	87	1.58	1.87	10	860	nt
28	M	38	39	1.03	1.13	9	510	nt
29	F	55	10	1.24	1.51	8	380	nt
30	M	57	19	1.03	1.34	6	150	nt
31	M	62	13	1.53	1.97	11	130	nt
32	F	60	11	1.47	1.53	9	120	nt
33	F	39	16	1.40	1.72	6	> 100	850
34	F	35	15	1.77	1.54	10	> 100	790
35	M	56	37	1.15	1.74	7	> 100	780
36	M	31	17	0.98	0.97	8	> 100	400
37	M	39	45	0.73	1.35	5	> 100	400
38	M	37	26	1.77	1.98	6	> 100	390
39	F	49	11	0.91	1.54	10	> 100	360
40	F	21	8	1.06	1.13	8	> 100	150
41	F	50	13	0.76	1.32	10	> 100	130
42	M	30	21	0.88	3.43	5	Neg	Neg
43	M	58	22	1.15	2.44	9	Neg	Neg
44	M	33	50	1.70	2.76	7	Neg	Neg
45	M	37	70	0.98	0.96	6	Neg	Neg
46	M	50	30	1.22	1.12	6	Neg	Neg
47	M	27	38	1.22	1.22	7	Neg	Neg
48	M	58	33	0.72	1.15	10	Neg	Neg
49	M	56	12	1.44	1.38	5	Neg	Neg
50	F	56	26	0.78	1.15	9	Neg	Neg
51	M	57	14	0.77	0.76	5	Neg	Neg
52	M	45	14	1.18	1.19	7	Neg	Neg
53	F	48	18	1.02	1.15	5	Neg	Neg
54	M	46	17	1.34	1.49	8	Neg	Neg
55	M	22	12	0.83	1.19	7	Neg	Neg
56	M	39	23	1.21	1.09	6	Neg	Neg
57	M	49	22	0.92	1.63	5	Neg	Neg
58	M	20	23	0.84	1.24	5	Neg	Neg
59	M	31	23	0.64	1.05	11	Neg	Neg
60	M	37	43	0.90	1.04	7	Neg	Neg
61	M	49	27	1.12	1.17	7	Neg	Neg
62	M	44	44	1.12	0.96	6	Neg	Neg
63	M	35	15	1.02	1.07	5	Neg	Neg
64	M	43	23	1.06	0.87	6	Neg	Neg
65	M	28	21	1.11	1.26	6	Neg	Neg
66	F	26	14	1.55	0.97	7	Neg	Neg
67	M	40	11	0.75	1.07	7	Neg	Neg
68	M	48	21	0.88	0.78	6	Neg	Neg
69	M	35	31	1.13	1.14	6	Neg	Neg
70	F	26	11	0.87	0.75	8	Neg	Neg
71	M	31	14	0.93	1.04	7	Neg	Neg
72	M	32	24	1.06	1.15	6	Neg	Neg
73	F	30	11	0.83	0.86	5	Neg	Neg
74	M	41	16	1.63	1.45	7	Neg	Neg
75	M	57	11	0.90	0.94	7	Neg	Neg
76	M	55	27	1.62	1.16	7	Neg	Neg
77	M	38	18	1.17	1.04	5	Neg	Neg
78	F	29	10	0.91	1.04	7	Neg	Neg

*1: Value of signal to noise (s/n): more than 2 is positive

*2: not tested

により HBV-DNA を検出・測定した結果, 原血漿の中に HBV-DNA 量に換算して最小限 5copies/ml 相当の HBV が存在する検体では HBV-DNA を検出することが可能となることが明らかとなった。この結果は, 検体の濃縮操作により, 個別 NAT による HBV-DNA の検出感度, 100copies/ml と比較して, 約 20 倍の感度上昇効果があったことを示しているといえる。検体を 8 倍濃縮した後に EIA 法により HBs 抗原を検出・測定した結果では, 濃縮によっても HBV-DNA が検出できなかった 3 検体で HBs 抗原が検出された。この 3 検体の HBs 抗原検出効果の特異性は確認されたが⁹, この 3 例の献血者の特性については現在のところ明らかではない。しかし HBV が存在している検体に著者らは, ポリエチルイミンによるウイルス濃縮法を既に報告してきた⁸⁾。しかし, この方法には, HBV-DNA, HBs 抗原を定量的に濃縮することができないという難点があった。この難点は, 凝集物からウイルス核酸を抽出する際に, 核酸が磁性粒子に吸着されてしまうこと, および磁性粒子自体の破壊産物, 遊離の金属イオン, 蛋白などが NAT 阻害 (核酸増幅過程の阻害) 要因となっていることに起因すると考えられた。本論文で提示したポリ-L-リジン をコートした磁性粒子を用いた濃縮法は, 最終濃度 4mM のリン酸緩衝液 (PB), 2 価の金属イオン (酢酸亜鉛), 磁性粒子の表面にコートした分子量 5~10 万の荷電物質 (ポリ-L-リジン) の共存下で凝集体を形成させることにより, 従来のポリエチルイミンによる濃縮法の難点を解消した。その結果, HBV-DNA および HBs 抗原を定量的に濃縮, 測定することが可能となった。

謝辞: AxSYM による HBsAg の測定に協力していただいた埼玉県赤十字血液センター検査部の石島あや子, 大村和代, 岡田優美子の各氏に感謝いたします。また貴重な御意見を頂きました国立医薬品食品衛生研究所の山口照英氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Allain JP: Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang*, 86: 83—91, 2004.
- 2) Yoshikawa A, Gotanda Y, Minegishi K, et al: Lengths of hepatitis B viremia and antigenemia in blood donors: preliminary evidence of occult (hepatitis B surface antigen-negative) infection in the acute stage. *Transfusion*, 47: 1162—1171, 2007.
- 3) Mine H, Emura H, Miyamoto M, et al: High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan. *J Virol Methods*, 112: 145—151, 2003.
- 4) Inaba S, Ito A, Miyata Y, et al: Individual nucleic amplification technology does not prevent all hepatitis B virus transmission by blood transfusion. *Transfusion*, 46: 2028—2029, 2006.
- 5) Bartolomé J, López-Alcorocho JM, Castillo I, et al: Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J Virol*, 81: 7710—7715, 2007.
- 6) Iizuka H, Ohmura K, Ishijima A, et al: Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang*, 63: 107—111, 1992.
- 7) Yugi H, Mizui M, Tanaka J, et al: Hepatitis B virus (HBV) screening strategy to ensure the safety of blood for transfusion through a combination of immunological testing and nucleic acid amplification testing—Japanese experience. *J Clin Virol*, 36: S56—S64, 2006.
- 8) Satoh K, Iwata A, Murata M, et al: Virus concentration using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads for improving the sensitivity of nucleic acid amplification tests. *J Virol Methods*, 114: 11—19, 2003.

DEVELOPMENT OF A NEW CONCENTRATION METHOD OF VIRUS USING POLY-L-LYSINE-COATED MAGNETIC BEADS: APPLICATION TO THE DETECTION OF OCCULT HBV

Akiko Iwata-Takakura¹⁾, Kouei Satoh¹⁾, Akira Yoshikawa¹⁾, Masako Itabashi¹⁾, Yuko Gotanda¹⁾, Takeshi Tanaka²⁾ and Hideaki Mizoguchi¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Saitama Blood Center

²⁾Tokyo Women's Medical University

Abstract:

Background: The risk of post-transfusion hepatitis B virus (HBV) infection has been reduced following the implementation of HBV nucleic acid amplification technology (NAT). However, the problem of HBV-DNA-positive and HBsAg-negative occult HBV infections remains to be solved. Here, in an attempt to resolve such problems, we report the development of a convenient method to concentrate HBV and HBs-antigen (HBsAg) in order to improve detection sensitivity.

Objects: Seventy-eight anti-HBc-positive ($\geq 2^5$: HI), HBsAg-negative and 20-pool NAT negative donations were examined.

Methods: Virus concentration is achieved by the enhancement of the agglutination of viruses using poly-L-lysine-coated magnetic beads in the presence of a bivalent metal. HBsAg and HBV-DNA levels were concentrated up-to 20-fold and 8-fold respectively.

HBsAg and anti-HBc were tested by enzyme immunoassay (EIA) (AxSYM: Abbott) and hemagglutination inhibition test (HI: Japanese Red Cross) respectively.

Results: Of 78 anti-HBc-positive and HBsAg-negative donors, 16 were HBV-DNA-positive by individual NAT and 62 were HBV-DNA-negative by individual NAT. Twenty five of 62 HBV-DNA-negative by individual NAT became HBV-DNA-positive by HBV concentration. Twenty nine of 78 donations which were HBsAg-negative by conventional EIA became HBsAg-positive by HBsAg concentration.

Conclusion: Our new method of concentrating HBV and HBsAg increased the sensitivities of EIA and HBV NAT and enabled us to detect HBV-DNA from individual-NAT-negative samples and HBsAg from conventional-EIA-negative samples.

Keywords:

Concentration of HBV, Concentration of HBsAg, Occult hepatitis B