

B型肝炎ウイルス抗原エピトープキット

イムニス[®] HBV ゲノタイプ EIA

EIAによるHBVゲノタイプ判定用キット

本試薬は、添付文書をよく読んでから使用してください。

【全般的な注意】

1. 本キットは体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 本添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
4. 本キット中の陽性コントロールは、HCV 抗体、HIV-1 抗体及び HIV-2 抗体について陰性を確認していますが、HBs 抗原陽性で感染性を有します。したがって、本品の取扱いにおいては、検体と同様に感染の危険性を考慮し、十分に注意してください。
5. 使用する機器の添付文書又は取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬

1. HBs 抗体固相プレート（8 ウェル × 12）…………… 2 枚（抗 HBs マウスモノクローナル抗体）
 2. 酵素標識抗体
 - ① 酵素標識抗体 m（緑）…………… 5 mL × 1 本（ペルオキシダーゼ標識抗 PreS2(m) マウスモノクローナル抗体）
 - ② 酵素標識抗体 k（黄）…………… 5 mL × 1 本（ペルオキシダーゼ標識抗 PreS2(k) マウスモノクローナル抗体）
 - ③ 酵素標識抗体 s（青）…………… 5 mL × 1 本（ペルオキシダーゼ標識抗 PreS2(s) マウスモノクローナル抗体）
 - ④ 酵素標識抗体 u（赤）…………… 5 mL × 1 本（ペルオキシダーゼ標識抗 PreS2(u) マウスモノクローナル抗体）
 3. 陰性コントロール…………… 1 mL × 1 本
 4. 陽性コントロール
 - ① 陽性コントロール m（緑）…………… 0.25 mL × 1 本
 - ② 陽性コントロール k（黄）…………… 0.25 mL × 1 本
 - ③ 陽性コントロール s（青）…………… 0.25 mL × 1 本
 - ④ 陽性コントロール u（赤）…………… 0.25 mL × 1 本
 5. 酵素基質液…………… 20 mL × 1 本（3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン、過酸化水素）
 6. 反応停止液…………… 20 mL × 1 本
 7. 洗浄原液（20 倍濃縮液）…………… 50 mL × 2 本
- 付属品：プレートシール…………… 6 枚

【使用目的】

HBs 抗原陽性血清中の PreS2 抗原エピトープの検出
 （B 型肝炎ウイルスゲノタイプ A, B, C, D の判定）

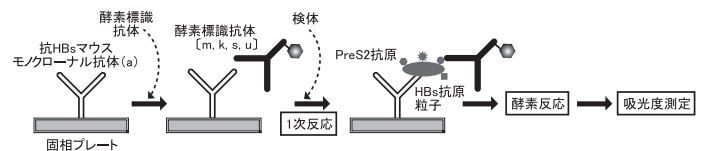
【測定原理】

B 型肝炎ウイルス（HBV）はその遺伝子配列の違いにより、A から H の 8 つの遺伝子型（ゲノタイプ）に分類されています^{1,2)}。日本においてはゲノタイプ A, B, C, D の 4 種でほとんどを占め、その他の遺伝子型は極めてまれです³⁾。

HBs 抗原の PreS2 領域には 4 種のモノクローナル抗体によって判別できるエピトープ m, k, s, u が存在し、ゲノタイプ A, B, C, D では、それぞれ su, m, ks, ksu のエピトープを持っています。このため、m, k, s, u の 4 つのエピトープの組み合わせ（セロタイプ）により、ゲノタイプ A, B, C, D を判定することができます^{4,5)}。

本試薬は、ワンステップのサンドイッチ酵素免疫測定法（EIA）を用いた HBV PreS2 抗原エピトープ検出に基づく、HBV ゲノタイプ判定試薬です。

HBs 抗体固相プレートの各ウェルに、PreS2 (m, k, s, u) エピトープそれぞれに特異的な酵素標識抗体 m, k, s, u を添加し、これに HBs 抗原を含む検体を加えると、「固相化抗 HBs 抗体 / HBs 抗原 / 酵素標識抗 PreS2 (m, k, s, u) 抗体」のサンドイッチ免疫複合体が形成されます。洗浄後、酵素基質を添加すると酵素反応により発色するので、この発色により各エピトープの有無を検出します。



【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

- (1) 検体として血清を使用してください。
- (2) 溶血を避け、採血後速やかに血清分離を行ってください。
- (3) 可能な限り新鮮な検体を用いてください。冷蔵保存する場合は 1 週間以内とし、それ以上の保存が必要な場合は -20℃ 以下で凍結保存して、凍結融解の繰り返しは避けてください。凍結検体を使用する場合は、室内温度に戻し、よく混和してから使用してください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

- (1) 検体にヘモグロビン、ビリルビン F、ビリルビン C、乳ビ、リウマチ因子を添加して試験した結果、それぞれ 482 mg/dL, 18.2 mg/dL, 20.1 mg/dL, 1670 ホルマジン濁度, 50 IU/mL まで、判定に影響は認められませんでした。
- (2) 検体に抗凝固剤（1.34 mg/mL シュウ酸ナトリウム, 4 mmol/L EDTA-2 ナトリウム, 3.8 mg/mL クエン酸ナトリウム, 13 U/mL ヘパリンナトリウム）を添加して試験した結果、すべて判定に影響は認められませんでした。
- (3) 検体に以下の自己抗体陽性検体、HAMA 陽性検体 5 種を添加して試験した結果、いずれも判定に影響は認められませんでした。
 自己抗体：C-ANCA, P-ANCA, Jo-1, Microsomal (TPO), Mitochondrial (AMA), ANA (Scl-70), ANA (PM/Scl), ANA (Fibrillain), Parietal Cell, SS-A, ds-DNA, ss-DNA, Rheumatoid Arthritis (RF)
- (4) 検体に抗ウイルス化学療法剤を添加して試験した結果、ラミブジン、アデホビルピボキシル、エンテカビルの判定への影響は認められませんでした。

3. その他

- (1) 測定器具の精度を確認し、各器具の操作法に従い測定してください。
- (2) 検査に用いる器具は、清浄なものを使用してください。
- (3) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロピペットのチップを替え、コンタミネーションを避けてください。
- (4) 陰性コントロール及び陽性コントロール用ウェルは、測定ごとに設けてください。
- (5) 検体添加後は、マイクロプレートミキサー等で十分に混合してください。

** (6) 検査は 20 ~ 35℃ で行ってください。

- (7) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定になるように留意してください。また、ウェル内面が乾燥しないように注意してください。
- (8) 酵素反応停止後、30分以内に吸光度を測定してください。
- (9) 操作中、プレート強くこすったり、底面に触れたりしないでください。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法

(1) 洗浄液

洗浄原液を精製水で20倍に希釈します。
調製後、室温（1～30℃）で保存し、1箇月以内に使用してください。

○キットの試薬及び洗浄液は使用前に必ず室内温度に戻し、よく混和してください。

○プレートは8ウェルずつ分割が可能となっています。未使用のものは乾燥剤と共にアルミ袋に密封し2～10℃で保存してください。

2. 必要な器具・器材・試料等

- (1) マイクロピペット 20 μL、100 μL
- (2) プレート振盪機
- (3) マイクロプレートウォッシャー（又はポリ洗浄瓶）
- (4) マイクロプレートリーダー 主波長 440～460 nm（副波長 550～750 nm）

3. 測定（操作）法

測定に際しては、下図に例示したように、エピトープ m, k, s, u それぞれに対し、陰性コントロール2ウェル以上、陽性コントロール1ウェル以上を同じ反応条件で操作してください。1検体につき4ウェル用います。

〈検体割付例〉

検出エピトープ	m				k				s				u			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	NC	NC	NC	NC	S6	S6	S6	S6	S7	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S8
B	NC	NC	NC	NC	S7	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S9
C	PC m	PC k	PC s	PC u	S8	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S9	S10	S10	S10	S10
D	S1	S1	S1	S1	S9	S9	S9	S9	S10	S10	S10	S10	:	:	:	:
E	S2	S2	S2	S2	S10	S10	S10	S10	:	:	:	:	:	:	:	:
F	S3	S3	S3	S3	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
G	S4	S4	S4	S4	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
H	S5	S5	S5	S5	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

NC : 陰性コントロール
PC : 陽性コントロール
S1～S10… : サンプル1～10…

(1) 酵素標識抗体の添加

エピトープ m, k, s, u を検出するウェルにそれぞれ対応させて、酵素標識抗体 m、酵素標識抗体 k、酵素標識抗体 s、酵素標識抗体 u を、マイクロピペットでそれぞれ100 μL 添加します。

(2) コントロール及び検体の添加

陰性コントロール、陽性コントロール m, k, s, u、及び検体をそれぞれ所定のウェルにマイクロピペットで20 μL 添加します。

○割付表などを用い、プレートのウェルと各コントロール及び検体との対応をまちがえないようにしてください。

** (3) 1次反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、プレート振盪機を用い20～35℃で2時間振盪します。

(4) 洗浄

プレートシールをはがし、プレートウォッシャーを用いて「1. 試薬の調製方法(1)」で調製した洗浄液300 μLで5回洗浄します。

または、プレートシールをはがし、プレートを逆さまにするなどの方法によりウェル内容物を除いた後、ポリ洗浄瓶等を用いてプレートの各ウェルを洗浄液で満たし、プレートを逆さまにして洗浄液を振り流す洗浄操作を5回繰り返します。

最後に清浄なペーパータオル上でプレートを逆さまにして叩き、プレートから完全に洗浄液を除きます。

○洗浄操作中、プレートのウェル内面が乾燥しないように注意し、洗浄終了後は迅速に次の操作を行ってください。

(5) 酵素基質液の添加

酵素基質液 100 μL を、マイクロピペットで全ウェルに添加します。

** (6) 酵素反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、20～35℃の暗所で30分間静置します。

(7) 反応停止液の添加

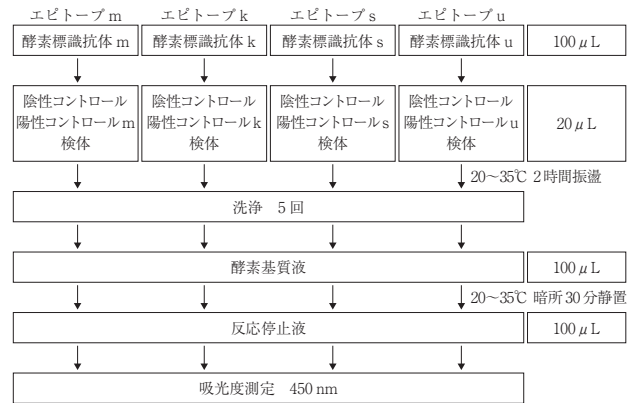
プレートシールをはがし、反応停止液をマイクロピペットで全ウェルに100 μL ずつ加え、青色の呈色が完全に黄色になるまで十分に混合します。

(8) 吸光度の測定

マイクロプレートリーダーで各ウェルの450 nm（440～460 nm）吸光度を測定します。2波長測定の場合の副波長は550～750 nm とします。

○反応停止後30分以内に測定してください。

** 〈測定手順概略〉



【測定結果の判定法】

1. 判定法

(1) 各エピトープの判定

1) カットオフ値の算出

カットオフ値 = 各エピトープの陰性コントロールの
平均値 + 0.05

2) 陰性、陽性の判定

陰性 (-) : 吸光度がカットオフ値未満の検体

陽性 (+) : 吸光度がカットオフ値以上の検体

* カットオフ値を基にカットオフインデックス (COI) を算出し、判定に用いることもできます。

COI = 検体の吸光度 / カットオフ値

陰性 : COI が1未満の検体

陽性 : COI が1以上の検体

(2) 再測定

吸光度がカットオフ値以上でも、他のエピトープの最大吸光度の1/10未満である場合は判定を留保し、以下の手順で再測定してください。

例 :

エピトープ	m	k	s	u
吸光度	0.040	3.500	3.500	0.100
カットオフ値	0.060	0.060	0.060	0.060

この場合、k, s, u はカットオフ値以上ですが、u は k, s の1/10未満なので、検体を10倍希釈して再測定を行います。

1) 検体の希釈 : 検体10 μL に洗浄液90 μL を加えて10倍希釈します。

*2) 測定法に従って操作を行い、各エピトープの陰性、陽性を判定します。検体を10倍希釈して測定し、上記の再測定基準に該当する場合は、本キットでは判定できないので「保留」としてください。

(3) ゲノタイプの判定

下記の表に従ってゲノタイプの判定を行います。

〔判定表〕

PreS2 エピトープ				PreS2 セロタイプ	HBV ゲノタイプ
m	k	s	u		
-	-	+	+	su	A
+	-	-	-	m	B
-	+	+	-	ks	C
-	+	+	+	ksu	D
				上記以外	保留

		イムニス HBV ゲノタイプ EIA によるゲノタイプ判定					計	一致率
		A	B	C	D	保留		
DNA 配列 解析	Genotype A	19				1	20	95.0%
	Genotype B		20			1	21	95.2%
	Genotype C			40		2	42	95.2%
	Genotype D				8		8	100.0%
計		19	20	40	8	4	91	95.6%

HBs 抗原陰性の C 型肝炎患者血清 44 例を本キットで測定した結果、44 例 (100%) がエピトープ m, k, s, u すべて陰性で、ゲノタイプ判定は保留となりました。

HBsAg 値が 3 IU/mL 以上の検体 376 例を本キットでゲノタイプを判定した結果、369 例 (98%) でゲノタイプの判定が可能でした。

*2. 判定上の注意

- HBs 抗原陽性の検体でも、エピトープ m, k, s, u が必ず検出されるとは限りません。また、検出されたエピトープが、判定表に示した 4 種類のセロタイプに該当しないことがあります。こうした場合は判定「保留」となり、本キットでは判定できません。これには、以下の原因が考えられます。
 - HBs 抗原が低濃度のため、エピトープ m, k, s, u がすべて陰性となることがあります。
 - エピトープを形成するアミノ酸配列の変異や欠失による抗原性の喪失により、本来陽性となるエピトープが検出されないことがあります。
 - 異なったゲノタイプの重感染の場合、非定型的なセロタイプを示すことがあります。
- 国内ではまれなゲノタイプ E, F, G, H の検体における測定結果は検証されていません。
- 自己免疫疾患患者の検体では、免疫反応の場合非特異的反応が起こりうるので、測定結果に基づく診断は他の検査や臨床症状等を考慮して総合的に判断してください。

〔臨床的意義〕

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、国内で約 140 万人が感染していると推測され、慢性肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こす重大な病因ウイルスです。HBV は、その遺伝子配列の違いにより A、B、C、D、E、F、G、H の 8 種類の遺伝子型 (ゲノタイプ) に分類されています^{1,2)}。日本で報告されているものは主としてゲノタイプ B と C ですが、東北地方と沖縄ではゲノタイプ B が比較的多く、その他の地域ではゲノタイプ C が圧倒的に多いとされています³⁾。ゲノタイプ A は比較的小さいのですが、近年、特に急性肝炎でゲノタイプ A が増加しており、問題となっています⁶⁾。また、限られた地域においては、ゲノタイプ D も存在します。国内ではゲノタイプ A, B, C, D 以外の遺伝子型は極めてまれです。

本品は、EIA による簡便、迅速な HBV ゲノタイプ判定法として開発されました。各ゲノタイプでアミノ酸配列の違いが大きい PreS2 領域に存在する 4 つの異なるエピトープ (m, k, s, u) に対するモノクローナル抗体を用い、このエピトープの組み合わせにより、ゲノタイプ A, B, C, D を判別するものです^{4,5)}。

HBV ゲノタイプの違いにより B 型肝炎の臨床症状や治療応答性が異なることが明らかにされています。例えば、成人の B 型肝炎ではゲノタイプ B, C では慢性化はまれですが、ゲノタイプ A では慢性化を起こしやすいことが報告されています^{7,8)}。また、慢性 B 型肝炎の HBV ゲノタイプの違いによりインターフェロン治療効果に差があり、ゲノタイプ B が C に比べて効果が高く、A が D に比べて効果が高いことが明らかにされました⁹⁾。さらに、HBV ゲノタイプの違いにより肝疾患の重症度と進行速度が異なることがわかってきました。多くの報告で、ゲノタイプ C は他のゲノタイプよりも肝癌を引き起こしやすいことが示されています¹⁰⁾。

このように、HBV ゲノタイプの判定は、B 型肝炎ウイルス感染の診断補助、及び病態把握、予後予測、治療効果の予測、治療法の選択に有用な情報を提供すると期待されます。

DNA 配列の比較によりゲノタイプ A, B, C, D と判明している検体、各 20, 21, 42, 8 例を本キットでゲノタイプ判定した結果、19, 20, 40, 8 例 (95.6%) が一致し、残り 4 例は判定保留でした。

〔性能〕

1. 感度試験

陰性コントロールを試料として 6 回測定するとき、m, k, s, u 各エピトープの平均吸光度は 0.1 以下です。

陽性コントロール m, k, s, u を試料として 6 回測定するとき、m, k, s, u 各エピトープの平均吸光度は 0.5 以上です。

2. 正確性試験

ゲノタイプ A の管理用検体*を試料として測定するとき、ゲノタイプ A と判定できます。

ゲノタイプ B の管理用検体*を試料として測定するとき、ゲノタイプ B と判定できます。

ゲノタイプ C の管理用検体*を試料として測定するとき、ゲノタイプ C と判定できます。

ゲノタイプ D の管理用検体*を試料として測定するとき、ゲノタイプ D と判定できます。

3. 同時再現性試験

ゲノタイプ A の管理用検体*を試料として 6 回同時に測定するとき、すべてゲノタイプ A と判定できます。

ゲノタイプ B の管理用検体*を試料として 6 回同時に測定するとき、すべてゲノタイプ B と判定できます。

ゲノタイプ C の管理用検体*を試料として 6 回同時に測定するとき、すべてゲノタイプ C と判定できます。

ゲノタイプ D の管理用検体*を試料として 6 回同時に測定するとき、すべてゲノタイプ D と判定できます。

4. 検出感度 (例示)

HBs 抗原濃度既知の検体を段階希釈して検出感度を検討した結果、本試薬の最小検出感度に相当する HBs 抗原量は、1.9 ~ 24.8 IU/mL (中央値 3.1 IU/mL) であり、それ以上の検体ではゲノタイプ判定が可能でした。

※ 管理用検体：HBs 抗原陽性で HBV-DNA 遺伝子解析法によりゲノタイプ A, B, C 又は D と確認されたヒト血清

〔使用上又は取扱い上の注意〕

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 本キットで取扱う検体、陽性コントロールは HBV の感染性を有するので、取扱いに注意してください。また、HCV、HIV などによる感染の危険性があるものとして取扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるために使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングは行わないでください。
- 試薬は皮膚や粘膜に接触させないように注意してください。もし皮膚にかかったときは多量の水で洗い流してください。必要があれば医師の手当等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 本品は貯蔵方法に従い保存してください。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- プレート、試薬容器が破損したキットは使用しないでください。
- 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。また、同一製造番号の試薬であっても、試薬を注ぎ足さないでください。プレートの再利用をしないでください。
- 使用後は試薬容器のふたを確実に閉めてください。また、試薬が微生物等に汚染されないよう注意してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 使用後の検体、試薬、検体に使用した器具類は廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行ってください。
 - 1) 0.05 w/v%ホルマリン溶液に37℃、72時間以上浸す。
 - 2) 2 w/v%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸す。
 - 3) 有効塩素濃度 1,000 ppm 以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸す。
 - 4) 121℃、20分間以上のオートクレーブ処理を行う。
- (2) 検体、廃液等が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1,000 ppm 以上、1時間以上浸漬）、グルタルアルデヒド（2 w/v%、1時間以上浸漬）等による拭き取りと消毒を行ってください。
- (3) 反応停止液は酸性なので、次亜塩素酸と混合しないでください。廃棄の際には十分注意して多量の水を流しながら行ってください。
- (4) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、医療廃棄物等の廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規制に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

凍結を避け、2～10℃で保存。

製造後1年間有効。(包装に表示の使用期限内に使用してください。)

【包装単位】

48テスト (CODE : 1A65)

【主要文献】

- 1) Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al: Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* **69**:2575-2583, 1988.
- 2) Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al: Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* **83**:2059-2073, 2002.
- *3) Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, et al: Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol.* **47**:1476-1483, 2009.
- 4) Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, et al: Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods* **80**:97-112, 1999.
- 5) 田中靖人、菅内文中、松浦健太郎、他：「イムニス HBV ゲノタイプ EIA」の基礎的・臨床的検討。 *臨床病理* **57** : 42-47, 2009.
- 6) Kobayashi M, Suzuki F, Arase Y, et al: Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J Gastroenterol* **39**:844-850, 2004.
- 7) Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, et al: Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan. *J Med Virol* **76**:33-39, 2005.
- 8) Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al: Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* **44**:326-334, 2006.
- *9) Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al: Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* **365**:123-129, 2005.
- 10) McMahon BJ: The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int* **3**:334-342, 2009.

【問い合わせ先】

株式会社 特殊免疫研究所 営業部
〒112-0004
東京都文京区後楽一丁目1番10号
日本生命水道橋ビル
TEL 03-3814-4081
FAX 03-3814-5957