



〈特集：企業セミナー（第33回年次学術集会より）〉

新しい高感度B型肝炎ウイルスコア関連抗原測定法 (ルミパルスプレスト[®] iTACT[®] HBcrAg)の基礎性能と臨床応用

八木 慎太郎

Fundamental performance and clinical utilities of Lumipulse[®] iTACT[®] HBcrAg, a novel highly sensitive immunoassay for hepatitis B core-related antigen.

Shintaro Yagi

Summary Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) measurement provides information on the total amounts of HBeAg, HBcAg, and p22cr, protein products of two distinct mRNA types transcribed from cccDNA. These proteins are released into the bloodstream and would indicate intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) activity. Lumipulse[®] HBcrAg was introduced as a reagent, although certain problems emerged concerning its HBV carrier detection sensitivity after HBeAg seroconversion and the necessity for a time-consuming and laborious pretreatment procedure. To overcome these obstacles, we developed LumipulsePresto[®] iTACT[®] HBcrAg, without any off-board pretreatment procedure exhibiting approximately 10-fold higher sensitivity and specificity than Lumipulse[®] HBcrAg. iTACT HBcrAg is anticipated to broaden the scope of HBcrAg clinical applications. This includes early HBV reactivation detection in patients undergoing steroid treatment for rheumatoid diseases and individuals subjected to immunosuppressive therapy. Furthermore, iTACT HBcrAg is poised to reduce clinical-laboratory workloads to expedite clinical timelines by allowing premedical assessment, reducing patient burden.

Key words: iTACT, Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis B core-related antigen (HBcrAg), Hepatitis B e antigen (HBeAg), Hepatitis B core antigen (HBcAg)

I. 緒言

B型肝炎ウイルス (HBV) はB型肝炎の原因ウイルスであり、成人が感染した場合、急性肝炎を発症するが、そのほとんどは免疫機構によって排除され、慢性化することはほとんどない。しかし、出産時、乳幼児期に感染した場合に高頻度に持続感染し、10年から20年にわたる長期

の免疫寛容期を経た後、慢性肝炎を発症する。発症後、約9割の症例は、B型肝炎e抗原 (HBe抗原) セロコンバージョンに伴った肝炎の沈静化 (非活動性キャリア) が起こり、さらに年率1%でB型肝炎s抗原 (HBs抗原) セロクリアランス (HBs抗原消失) を起こし、血液検査所見、肝組織所見ともに改善する。

一方、HBe抗原セロコンバージョンに至らな

富士レビオ株式会社、研究開発本部
株式会社先端生命科学研究所、研究開発部
〒192-0031 東京都八王子市小宮町51

R&D Division, FUJIREBIO INC.
R&D department, Advanced Life Science Institute, Inc.
51 Komiya-machi, Hachioji, Tokyo, 192-0031, Japan

かった患者、及びセロコンバージョン後にHBVが再活性化した慢性肝炎患者では、肝炎の長期化に伴い、年率2%で肝硬変に移行し、肝細胞がん、肝不全などの重篤な病変に進展する。これらの進展を抑えるため、慢性肝炎患者には、核酸アナログ製剤（NA剤）等を用いた治療が加えられる。治療の最終目標は「肝炎の活動性と肝線維化進展の抑制による慢性肝不全の回避ならびに肝細胞癌発生の抑止、およびそれらによる生命予後ならびにQOLの改善」とされ、治療最終目標のサロゲートマーカーはHBs抗原消失とされる¹⁾。

B型肝炎の自然経過、慢性肝炎の治療、予後のモニタリングには、HBV活動の指標として、HBe抗原、HBs抗原、HBV DNA量が広く用いられてきたが、B型肝炎コア関連抗原（HBcrAg）はそこに加わった新たな指標である。HBcrAg量とは、HBV感染肝臓細胞内のcovalently closed circular DNA (cccDNA) から転写される2種類のmRNAから翻訳され、血中に放出される蛋白質、HBe抗原、HBコア抗原（HBc抗原）とp22crの総量である^{2,3)}。

HBcrAg量は血中HBV-DNA量と相関し、肝内cccDNA量とも相関する^{2,4)}。HBV活動のうち、肝中cccDNA活性を表すことから、「核酸アナログ治療中の再燃の予測や治療中止時期の決定の血

清マーカー」とされている。さらに「自然経過、核酸アナログ治療中の発がんリスクの指標」、「HBe抗原消失例やHBs抗原消失例における発がんリスク低下の指標」、「HBV DNA陰性化後は、HBcrAgの陰性化が目標になる」と、治療目標としてのHBcrAg利用が日本肝臓学会ガイドラインに示されている⁵⁾。

HBcrAgの測定には、これまでルミパルス®HBcrAg（以下、G-HBcrAgと記す）が用いられてきたが、HBe抗原セロコンバージョン後の検出感度、測定前処理が手法で時間がかかるなどの課題があった。これらの課題に対し、約10倍の感度上昇と、全自動機器による前処理を可能としたルミパルスプレスト®iTACT® HBcrAg（以下、iTACT HBcrAgと記す）が開発され⁵⁾、2022年6月に薬事承認されている。本稿ではHBcrAgとは何か、新たに開発されたiTACT HBcrAgの特徴とその臨床的有用性と、高感度化によってもたらされた新たな臨床的有用性について紹介する。

II. HBV 生活環と HBV マーカー

HBVの生活環とHBVバイオマーカーをFig. 1に示す。HBVが肝細胞表面の、胆汁酸輸送体（Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide: NTCP）に結合し、細胞内に取り込まれ、不完全二重鎖

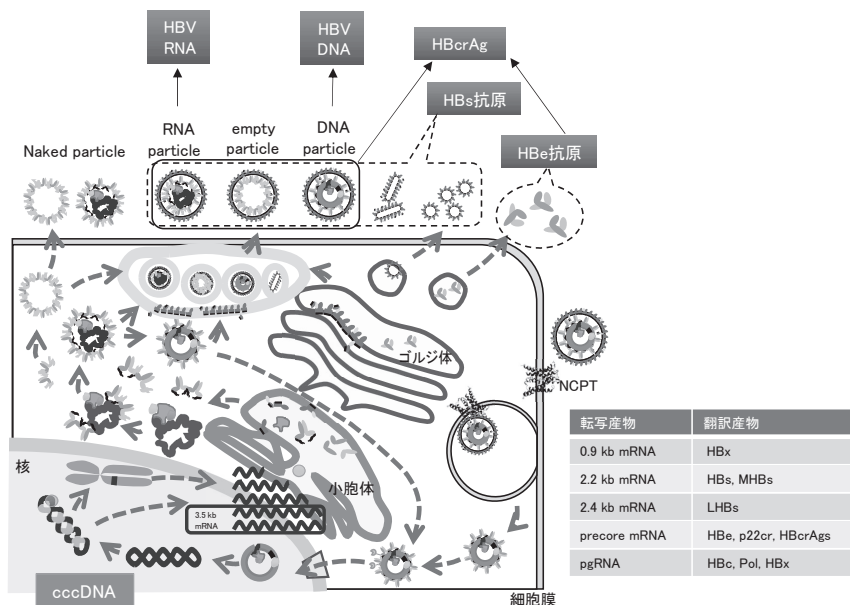


Fig. 1 HBV生活環とHBVバイオマーカー
HBVの生活環とHBVの活動性指標となるバイオマーカー、HBV DNA、HBs抗原、HBe抗原、HBcrAgの産生機構を模式的に図示した。

の環状ゲノムDNAは、核内に移行したのち完全二重鎖のcccDNAとなる。そこにさらにヒストンなどが結合することで、宿主ゲノム同様にミニ染色体として核内に存在し続ける。宿主のシステムにより、4種類のmRNAが転写され、それらにコードされているHBV蛋白質が翻訳・産生される。転写された不完全二重鎖の環状DNAのもととなるプレゲノムRNA (pgRNA)と逆転写酵素であるポリメラーゼ複合体は、HBc抗原により覆われたキャプシドを形成し、キャプシドはさらに、脂質二重膜にアンカーしている3種類のS抗原 (L-HBs, M-HBs, S-HBs) により覆われることでHBV RNA粒子となる。pgRNAはさらにポリメラーゼによって逆転写され、HBc抗原が脱リン酸化されることと相まって、感染性のあるHBV粒子 (Dane粒子) となり細胞外・血中に放出される⁹⁾。

HBV粒子を構成するHBc抗原、3種類のHBs抗原、ポリメラーゼ以外にも、HBe抗原、p22crが血中に放出され、特にHBe抗原、S-HBs抗原はウイルス粒子に比して100倍以上と大量に産生・放出される。S-HBs抗原はいわゆるオーストラリア粒子として知られ、HBs抗原測定系 (定性・定量) はこの粒子を主に検出・測定している。

HBV治療に広く用いられるNA剤は、HBVポリメラーゼ (逆転写酵素) の阻害剤であるため、加療中にHBV DNAの産生は押さえられ、感染性ウイルスの産生を抑制することにより、再感染

によるウイルス増殖を抑える効果があると考えられているが、cccDNAに対しての直接的な効果はない。そのため、NA剤治療中、血中HBV DNA量のモニタリングは治療効果判定に有効な指標であるが、NA剤治療によってHBV DNA量が検出感度以下に低下している際に、cccDNA活性を示す代替マーカーが必要となる。

cccDNA活性を示す代替マーカーとしては、cccDNAから転写・翻訳される産物を定量する、HBs抗原定量、HBV RNA量、HBcrAg量がある。このうち、HBs抗原は、宿主DNAに組み込まれたHBVゲノムからも産生され、血中に放出される。そのため、cccDNAが排除された後もHBs抗原が検出される場合があるためcccDNAの活動と乖離する場合がある。ただHBs抗原の産生と共にHBx抗原も産生され、がん化との関連が報告されているため、HBs抗原は、cccDNA排除後のがん化リスクの指標となる。一方、HBV RNAとHBcrAgは組込みHBVゲノムからは産生されないため、HBsAgよりも、cccDNA活性を直接的に示す代替マーカーとして有用である¹⁾。

III. HBcrAg の測定原理

HBcrAg測定原理をFig. 2に示す。HBcrAgは、肝中cccDNAのコアプロモーターから転写されるpgRNAと、プレコア (PcP) プロモーターから転写されるprecore mRNAのHBVコア遺伝子翻訳産

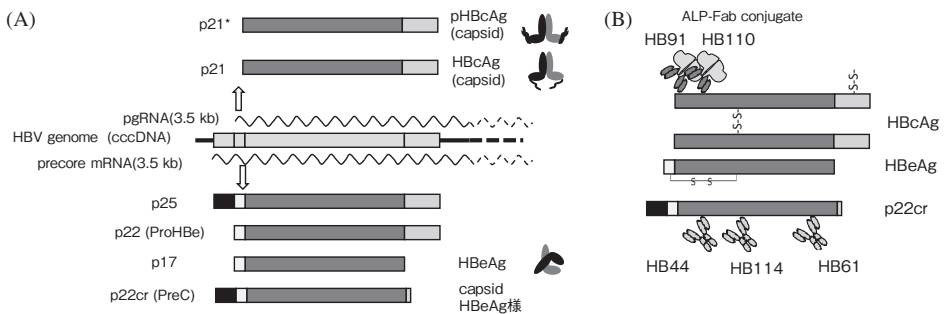


Fig. 2 HBcrAgの測定原理

HBcrAgはcccDNAから転写される2種類の3.5 kb mRNA (pgRNA、precore mRNA) から翻訳されるコア遺伝子産物の総量であり、そのうち血中に検出されるHBc抗原、HBe抗原、p22crを示している (A)。HBcrAg検出には、検体前処理によって高次構造を破壊することで提示される、この3種類の抗原に共通したペプチド配列を認識する3種類 (iTACTは非公開) の抗体で固相に捕捉した抗原を、2種類の共通配列を認識する酵素標識抗体 (iTACTは非公開) でサンドイッチし、結合した酵素活性を、発光基質と反応させることで計測し、得られた発光値を下に定量値を求める (B)。

物のうち、血中に放出されるものの総称で、pgRNAから産生されるHBc抗原（リン酸化の異なる複数の分子様態）と、precore mRNAから産生されるHBc抗原とシグナル配列を有すp22cr (PreC) の総称である。感染培養細胞上清からは他の産物（p25、Naked Particle）も検出されているが、それらもHBcAgに含まれる。

HBc抗原、HBc抗原、p22crは共通した149アミノ酸（遺伝子型によって異なる）配列を持ち、単量体としては非常によく似た構造であるが、HBc抗原とHBc抗原の違いは、2量体が異なる角度で結合した単量体であることと、HBc抗原2量体が容易にキャプシド様構造を形成することである。この高次構造の違いが抗原性の違いとなり、同じ配列を持つにもかかわらず、HBc抗原、HBc抗原と免疫学的に異なる抗原として同定、分類されている⁷⁾。

HBc抗原形成に関わる重要な分子様態としては、HBcにはないN末に10アミノ酸の配列中の7位に位置するシステインと、共通配列内にある61位システイン間のジスルフィド結合があり⁸⁾、in vitroでは、ジスルフィド結合を阻害させることによりキャプシド様粒子を形成することが報告されている⁷⁾。

HBc抗原はHBc抗原にはない、C末側の約30アミノ酸の核酸結合配列（C-terminal domain :

CTD）を持ち、このリン酸化がpgRNA、HBV DNAとの結合、およびキャプシド構造に重要な働きをしていることが示されている⁹⁾。

p22crはHBV DNAを含まない空粒子の構成成分として報告されたが³⁾、HBc抗原同様に粒子成分ではない分画にあることも報告されており¹⁰⁾、その構造については後述のように議論となっている。

これまでに報告されたプロトタイプ¹⁾のHBcAg ELISA、G-HBcAgとiTACT HBcAgの特徴をまとめた（Table 1）。必要検体量、前処理、測定機器、測定に要する時間などが異なっているが、最も測定に要する時間が短く、高感度な測定方法はiTACT HBcAgである。iTACTとはImmunoassay for Total Antigen including Complex via pretreatmentの略語であり、検体中に存在する異なる分子様式（抗原性の違い、血中分子や、特異的抗体、異好性抗体との複合体、ウイルス粒子などの複合体）で存在する分子を前処理で分離・抽出し、免疫測定を原理とする測定システムである¹¹⁾。プロトタイプELISA、G-HBcAgも広義にはiTACTに包含される。

HBcAgは異なる立体構造・抗原性を示すと共に多様の粒子中に存在し、検体中にはHBV抗体（HBc抗体、HBc抗体）が含まれる場合があり、抗原-抗体の複合体としても存在する。HBcAg

Table 1 HBcAg測定系の比較

	オリジン	G-HBcAg	iTACT-HBcAg	iTACT HBcAg (IVD)
検出原理	化学発光 ELISA		化学発光酵素免疫測定 (CLEIA)	
検体種			血清・血漿	
検体量 (μL)	100	150	35	50
前処理	50 μLの前処理液15% sodium dodecyl sulfate [SDS], 2% Tween 60)を加えた後70℃、30分の熱処理	150 μLの前処理液成分非公開)を加えた後、60 ±4℃、30分の熱処理	HCl, DEAET(2-(ジメチルアミン)エタナチオ塩)を含む90 μLの前処理液を加えた後、37℃、6.5分保温	135 μLの前処理液(成分非公開)を加えた後、37℃、6分保温
測定機器	的手法ELISA	ルミバルス® G1200, G600II	全自動 (機器上) ルミバルス® L2400	
Total volume of 1st reaction	50 μLの前処理済み検体を100 μLのブッファ溶液(pH 7.5)に加える	120 μLの前処理済み検体を230 μLの磁性粒子液に加える	120 μLの前処理済み検体に、30 μLの中和液を加えた後、50 μLの磁性粒子液を加える	185 μLの前処理済み検体に、75 μLの中和液を加えた後、40 μLの磁性粒子液を加える
Solid phase	モノクローナル抗体(HB44, HB61とHB114)を固定化したマイクロプレート	モノクローナル抗体(HB44, HB61とHB114)固定化した磁性粒子	モノクローナル抗体(非公開)を固定化した磁性粒子	モノクローナル抗体(非公開)を固定化した磁性粒子
Incubation	室温、2時間	37℃、10分	37℃、8分	
Wash	的手法	全自動		
2nd reaction	100 μLのモノクローナル抗体(HB91 and HB110) 標識アルカリフォスファターゼ希釈液を加え室温、1時間、反応させる	250 μLのモノクローナル抗体(HB91 and HB110) 標識アルカリフォスファターゼ希釈液を加え、37℃、10分反応させる	50 μLのモノクローナル抗体(非公開) 標識アルカリフォスファターゼ希釈液を加え、37℃、8分間反応させる	
Wash	的手法	全自動 (機器上)		
Detection	100 μLのCDP-star with Emerald IIを加え室温、20分反応	200 μLのAMPPD基質液を加え37℃、4分保温	200 μLのAMPPD基質液を加え37℃、4分保温	
文献	汎用プレートリーダー	製品添付文書	全自動測定 製品添付文書	

測定においては、界面活性剤を含む溶液中で血清・血漿検体を前処理することにより、立体構造を破壊し、また粒子中の抗原も抽出・可溶化し、さらに共通のエピトープを提示させることで異なる抗原の検出を可能としている。加えて、検体中のHBV抗体（HBe抗体、HBc抗体）も変性され、機能を失うため、HBV抗体の結合による競合阻害の影響なく抗原測定が可能となる。

IV. iTACT-HBcrAg とは

G-HBcrAgでは前処理は用手法で30分のインキュベーションが必要という課題があったが、iTACT-HBcrAgでは、前処理から測定までを、全自動、35分で行う（Table 1、Fig. 2）。全自動化にあたっては、界面活性剤+30分の熱処理からなる手法の前処理工程を、酸性化剤+界面活性剤+還元剤処理に変更し、さらに新たな前処理と装置に合わせた反応条件最適化を行うことにより、G-HBcrAgより感度が約10倍上昇し、特異性の向上も図ることが可能となった⁵⁾。

HBs抗原陽性血清検体、146例、血漿検体105例でG-HBcrAgとの測定値比較を行ったところ、

いずれの群でも回帰式の傾きが1.00の良好な相関（ $r=0.99$ ）を示した（Fig. 3A）。

iTACT-HBcrAgの検出限界（LOD）、定量限界（LOQ）はそれぞれ1.5 Log U/mL、1.8 Log U/mLであり、これをもとに測定範囲は2.1~7.0 Log U/mLに設定された（Fig. 3B、製品添付文書）。G-HBcrAgでのそれぞれの値は、2.5 Log U/mL、3.0 Log U/mL、3.0~6.8 Log U/mLであり（製品添付文書）、iTACT-HBcrAgでは感度の上昇、測定範囲の拡大が図れている。希釈直線性はこの測定範囲を含む領域で良好である。また低値での希釈直線性は、G-HBcrAgよりも良好であった⁵⁾。

本試薬のプロトタイプを用いた臨床研究では、HBs陰性の被感染者において、G-HBcrAgの出力値がLOQ以下の出力範囲（2.1~2.8 Log U/mL）にある検体は、iTACT-HBcrAgでは全てLOQ未満となり、特異性向上が確認された。一方、HBe抗原陰性の非活動性キャリアを用いた検討では、G-HBcrAgでは陽性率が75%であったのに対し、iTACT-HBcrAgでの陽性率は97.5%の向上が確認された⁵⁾。

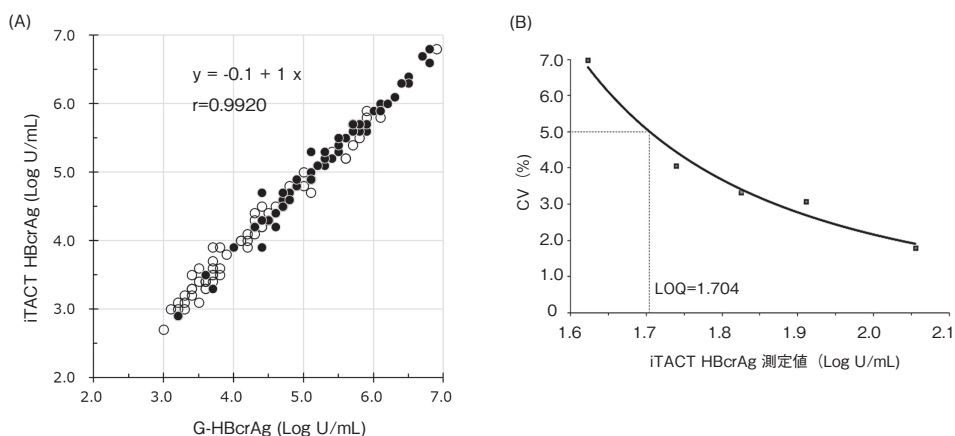


Fig. 3 iTACT-HBcrAgの基礎試薬性能

HBs抗原陽性の血清検体146例のG-HBcrAgとiTACT-HBcrAg定量値の相関図（A）。73例のHBe抗原陰性血清検体（○）と73例のHBe抗原陽性血清検体（●）のG-HBcrAgとiTACT-HBcrAg測定値をScattered-Plotした。Passing-Bablok法による回帰直線及び相関係数を図内に示した。iTACT-HBcrAgのLOQ検定結果（B）。LOQの算出はCLSIガイドラインEP17-A2に従って行った。

V. p22cr の分子様態

HBcrAg測定系はpgRNA、precore mRNAから翻訳されるコア遺伝子産物を全て捕捉し、さらに共通する配列を認識する抗体で検出する系であるが、検出する抗体を変更すると、HBcrAgの一部の分子種の測定が可能となる。例えば、HBc抗原のみが持つCTDを認識する抗体を検出に用いることでHBc抗原測定系の構築が可能となる¹²⁾。このようにして構築したHBc測定ELISAで得られるHBc抗原量は、血中HBV DNA量と高い相関を示すが、HBV DNA量と比したとき、その感度はHBcrAg量よりも低い。HBcrAgはHBc抗原陰転化後も検出されることから、HBc抗原、HBe抗原とは異なるHBcrAgがあるのではという仮説のもと、以下の検討を行った³⁾。

購入検体をショ糖密度勾配超遠心法で分画すると、HBe抗原、HBc抗原とは異なる分画にHBcrAgが検出される。この分画をHBcrAg抗体、HBc抗体を用いたウェスタンブロットで解析すると、HBc抗原 (p21) よりも分子量の大きいp22にHBc抗体が結合しないHBcrAgがあることが示された。p22に相当するバンドを切り出し、質量分析によるペプチド解析を行ったところ、興味深いことにHBe抗原には存在しない配列である-29~-11の配列が検出され、さらにCTDの150番以降のペプチドが検出された。分子量、検出されたアミノ酸配列から、p22の抗原は-29~-150番以降の配列を持つp22crと命名した。さらにp22crを多く含む分画を電子顕微鏡解析したところ、この分画には核酸を含まないウイルス様分子を含むこと、さらに抗HBs抗体で免疫沈降した時に、HBc抗原測定系では検出できない

HBcrAg抗原を多く含むことから、p22crが空粒子の成分であると結論づけた。

最近他の研究グループからもp22crが血中に検出できることが報告されたが、p22cr (PreC) は密度勾配超遠心法の分画で主にHBe抗原と同じ分画に検出され、空粒子の分画に濃縮されないことが報告された¹⁰⁾。さらに、最近我々は、リン酸化修飾されたHBc抗原特異的な測定系を構築し解析したところ、新たな知見を得ており (未公表データ)、p22crが存在するエビデンスは十分であるが、その分子様態については、さらなる解析が必要である。

VI. HBV バイオマーカーとしての HBcrAg とその臨床的有用性

HBcrAgのHBVマーカーとしての特徴の多くはB型肝炎ガイドライン (第4版) などにまとめられている。ここではそれらからHBcrAgのバイオマーカーとしての特徴を抜粋する。まず特徴の一つは、HBcrAgは血中DNA量、血中RNA量とも相関し、さらに肝内cccDNA量とも相関することである (Table 2)。さらに、HBcrAgと血中DNA量との相関遺伝子型で有意な差を認めない¹³⁾。

NA治療中の患者において、NA治療中止のための必要条件是、核酸アナログ治療開始後2年以上経過し、中止時血中HBV DNA (リアルタイムPCR法) が検出感度以下となり、中止時血中HBe抗原が陰性していることであるが、HBs抗原、HBcrAgが肝内cccDNAの活動を反映するマーカーであることから、これらの量が高い場合には、再活性化リスクがあるため治療を継続する

Table 2 B型肝炎治療ガイドラインに記された臨床的有用性

項目	Recommendation	エビデンスレベルと推奨グレード	注記
1-3 治療目標	HBe 抗原消失例、HBs 抗原消失例において、HB コア関連抗原量の低下・陰性化は発がんリスク低下の指標	レベル 5、グレード C1	V4改訂項目
	HB コア関連抗原の陰性化がHBVDNA 陰性化後の目標	レベル 2b、グレード B	V4改訂項目
2-4 HBコア関連抗原	HBコア関連抗原は肝組織中のcccDN量と相関～核酸アナログ治療中の再燃の予測や治療中止時期の決定	レベル6、グレードB	
	HBコア関連抗原は、自然経過、核酸アナログ治療中の発がんリスクの指標	レベル2b、グレードB	V4改訂項目
4-7-1.核酸アナログ治療中止の条件	核酸アナログ治療中止時の再燃リスクの予測	レベル4、グレードA	
6-3 再活性化	リウマチ性疾患・膠原病に対する免疫抑制療が月以降の3か月ごとのHBV DNA量測定の代用	レベル2a、グレードC1	V4改訂項目 iTACTのみ

ことが望ましいとされる (Table 2)。

さらにHBcAg量は、自然経過による肝発がん、特にHBe抗原陰性化後のリスクに関連し、NA治療開始後1年後のHBcAg量がその後の発がんとも関連することから、発がんリスクの指標としても利用可能と考えられている。このようなことをふまえ、HBV DNA陰性化後、HBcAg量の低下は治療目標の一つとなり得るとされる (Table 2)。

国内だけではなく、台湾、香港、欧州からもG-HBcAgを用いてHBcAg量の臨床的有用性が報告されているが¹⁴⁾、その一部はG-HBcAgの測定範囲外を基準値にしているものもあり、またG-HBcAgはHBe抗原陰性化群での検出率が低いことが課題である。

これまでの試薬 (G-HBcAg) の課題に対し、iTACT-HBcAgはG-HBcAgと高い相関性を示し、G-HBcAgより低値での希釈直線性、特異性の向上が確認されていることから、G-HBcAgで示されている臨床的有用性に関しては、同様の結果が得られると考えられる。ただ、G-HBcAgの感度が足りていないために、LOQより低値にカットオフを設定している研究で示されている有用性に関しては、iTACT HBcAgを用いた再検討が重要となる¹⁵⁾。

例えば、HBcAgの検出の有無 (3.0 Log U/mL) を指標とすることで、HBs抗原消失後の発がんリスクの層別化が可能とされていたが、iTACT-HBcAg測定を用いることにより、cut-off値を2.7 Log U/mLに設定可能となり、さらに精度の高い層別化が可能であることが示されている¹⁶⁾。

HBV再活性化のリスクがある既往感染者、リウマチ性疾患・膠原病に対するステロイド薬、免疫抑制薬などの免疫抑制療法例において、iTACT HBcAgによりHBcAgがHBV DNAよりも早期に検出される例が報告されている^{5, 17, 18)}。またNA治療に於いて、iTACT HBcAgによってHBcAgが消失した例では、再活性化が観察されなかった。これらの結果をふまえ、モニタリングにおける高感度HBcAgの利用がガイドラインの推奨に加えられた。

NA剤治療によりHBV感染性ウイルスを減少させ、新規のHBVウイルス感染を抑制するという治療戦略は、多くの患者に奏功し、臨床症状の緩和につながっている一方で、NA剤治療での

cccDNAの排除は難しいことから、最終治療目標とされるHBs抗原消失は依然として困難な目標である。cccDNAに直接作用する薬剤の開発は非常に難しい状況であるが、cccDNAから転写されるpgRNAや、pgRNAのキャプシド形成阻害による肝内再感染抑制によるcccDNA量低下を目指した治療薬候補が創出され、いくつかは臨床治験に移行している。これらの新たな治療薬の効果判定は、感染性ウイルス産生の指標であるHBV DNAではなく、cccDNAの活動を反映するバイオマーカーが有効である。そのため、cccDNA量 (活動性) と相関するHBs抗原、HBV RNAそしてHBcAgが治療効果判定の指標として検討されている¹⁹⁻²¹⁾。

VII. HBcAg RDT: Eliminate 2030

WHOは2030年までに肝炎を排除 (elimination) するための戦略を制定し、WHO加盟国がそれぞれの活動を進めている。HBVの排除のためには、広く診断を進め感染者を見つけ出し、ワクチン接種や治療を行う活動に取り組んでいる。しかしながら2019年に行われた中間フォローアップ結果をうけ、活動の優先順位付け (ゴール設定) が改めて行われ、母子垂直感染 (Mother to child transmission : MTCT) の抑制が第1優先課題とされた。MTCT防止には出産後のワクチン接種が有効であるが、出産が医療施設でほとんど行われない地域でのMTCT防止には、母体の血中感染性ウイルス量を低下させることが有効であるため、HBV感染している妊婦のうち、感染性ウイルス量 (HBV DNA量) が高値 (5.3 Log IU/mL=20 kIU/mL以上) を対象にNA剤投薬を行うプランが提唱されている。

具体的には、出産指導のために保健所等に来る妊婦全員を対象に、HBs抗原検査を行い、その陽性者の中から治療対象者を選択し投薬する方法の検討がなされ、簡易HBs抗原検査の陽性者のHBV DNAを定量し基準値以上の妊婦を選別する、HBV DNA定量ができない場合はHBe抗原測定 (ELISA同等の感度) での陽性者を対象にするのが有効であることが示された²⁰⁾。しかし、HBV DNA定量は高価であるのに加え、そもそも測定機器がない、もしくは妊婦が訪れる保健所の近くにないため、いずれの測定でも、測

定結果が戻るのに2週間~1ヶ月かかるという状況であり、HBV DNA定量に替わる指標が求められていた。

前述のようにHBcrAgはHBV DNAと相関することから、HBcrAgを指標とすることでの診断効率が検証され、HBcrAg定量値をもとに感染者を効率に層別化することが可能であることが報告された²⁹⁾。しかし、HBcrAg測定は、HBV DNA、HBe抗原測定と同じ課題、すなわち特殊な測定機器を利用するという問題があった。

そこで我々は熊本大学、パスツール研究所と共同で、イムノクロマト法をベースとすることで、特殊な機器、設備を利用することなく、HBcrAgを検出することが可能なキット、HBcrAg-RDT (Rapid diagnostic test)を開発した。HBcrAg-RDTは簡便な操作で前処理した検体(血清、血漿、全血、濾紙全血)を、抗HBcrAg抗体を塗布したメンブレンに展開し、抗HBcrAgで捕捉されたHBcrAgを、酵素免疫測定法を原理とし検出する試薬である (Fig. 4)。本試薬を用いた研究がガンビアで行われ、HBsAgを指標とした特異性は100%、HBV DNA量 (20 kIU/mL以上)での層別化の比較における高値判定一致率は

91.4%、低値判定一致率が86.3%と良好な結果を示した²⁹⁾。現在検証地域を広げた臨床研究が進められており、MTCT削減に向けた活動に貢献できることを期待している。

VIII. 結語

HBcrAgは、HBVの活動性の指標である、HBe抗原、HBs抗原、HBV DNA量に加わった第4の指標であり、日本発のバイオマーカーである。これまで国内のみならず、台湾、香港、欧州で臨床的有用性が示され、さらに新たな治療方法のモニタリングへの活用が検討されている。また、簡易検査法はElimination2030に向けた活動への適用を図っている。iTACT-HBcrAgは、これまでの試薬の課題であった操作性、感度性能を著しく向上させた試薬であり、これまでの試薬では判別、層別化が困難であった症例への適用拡大の可能性が示されている。また、全行程を全自動で行うため、短時間で結果を得ることが可能であり、検査室の負担を軽減するのみならず、院内検査を行うことで、診察前検査をも可能とし、患者負担の軽減につながることも期待される。

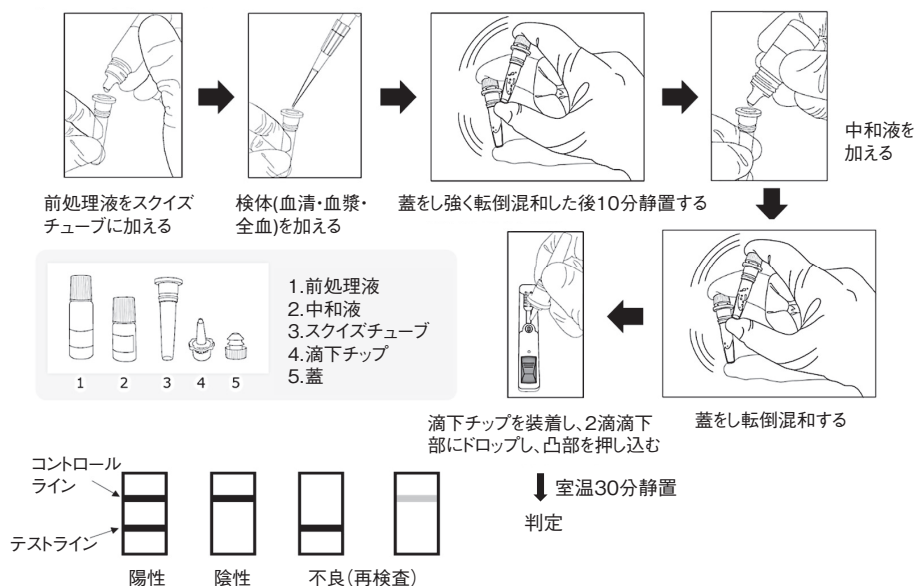


Fig. 4 HBcrAg-RDTによるHBcrAg検出手順
HBcrAg-RDTの検出手順を模式的に図示した。図中段左に検出カセット以外の構成物を示した。図下段にはコントロールライン、テストラインの呈色パターンによる判定基準を示した。

謝辞

iTACT-HBcrAgおよびHBcrAg-RDTの開発は多くの先生のご協力のもと開発されましたが、特に、開発初期より、ご指導いただいた熊本大学教授、田中靖人先生、名古屋市立大学病院臨床検査部部长、井上貴子先生、熊本大学客員教授、パスツール研究所の島川祐輔先生に深謝致します。本研究は、富士レピオ株式会社研究開発本部の多くのメンバーと株式会社先端生命科学研究所、研究開発部のメンバーの協力で行われた結果であり、研究開発に関わったメンバーに感謝致します。

利益相反は以下のとおり：著者は企業に所属しており、研究費および給与、発明等に関する報奨金等は富士レピオ株式会社、株式会社先端生命科学研究所より支給されています。

文献

- 朝比奈靖浩, 乾あやの, 黒崎雅之, 阪森亮太郎, 城下智, 鈴木文孝, 須田剛生, 田中篤, 田中靖人, 平松直樹, 南達也: B型肝炎治療ガイドライン(第4版). 2022.
- Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Maki N: Sensitive Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Virus Core-Related Antigens and Their Correlation to Virus Load. *J Clin Microbiol*, 40:439-445, 2002.
- Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Ohno S, Maki N: Hepatitis B Virus DNA-negative Dane Particles Lack Core Protein but Contain a 22-kDa Precore Protein without C-terminal Arginine-rich Domain. *J Biol Chem*, 280:21713-21719, 2005.
- Wong DK-H, Tanaka Y, Lai C-L, Mizokami M, Fung J, Yuen M-F: Hepatitis B Virus Core-Related Antigens as Markers for Monitoring Chronic Hepatitis B Infection. *J Clin Microbiol*, 45:3942-3947, 2007.
- Inoue T, Kusumoto S, Iio E, Ogawa S, Suzuki T, Yagi S, Kaneko A, Matsuura K, Aoyagi K, Tanaka Y: Clinical efficacy of a novel, high-sensitivity HBcrAg assay in the management of chronic hepatitis B and HBV reactivation. *J Hepatol*, 75:302-310, 2021.
- Niklasch M, Zimmermann P, Nassal M: The Hepatitis B Virus Nucleocapsid—Dynamic Compartment for Infectious Virus Production and New Antiviral Target. *Biomed*, 9:1577, 2021.
- DiMattia MA, Watts NR, Stahl SJ, Grimes JM, Steven AC, Stuart DI, Wingfield PT: Antigenic Switching of Hepatitis B Virus by Alternative Dimerization of the Capsid Protein. *Structure*, 21:133-142, 2013.
- Nassal M, Rieger A: An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J Virol*, 67:4307-4315, 1993.
- Luo J, Xi J, Gao L, Hu J: Role of Hepatitis B virus capsid phosphorylation in nucleocapsid disassembly and covalently closed circular DNA formation. *Plos Pathog*, 16:e1008459, 2020..
- Hong X, Luckenbaugh L, Mendenhall M, Walsh R, Cabuang L, Soppe S, Revill PA, Burdette D, Feierbach B, Delaney W, Hu J: Characterization of Hepatitis B Precore/Core-Related Antigens. *J Virol*, 95: e01695-20, 2021.
- 青柳克己: 検体前処理法を用いた免疫測定法のポテンシャル, *生物試料分析*, 43:114-126, 2020
- Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Maki N: New Enzyme Immunoassay for Detection of Hepatitis B Virus Core Antigen (HBcrAg) and Relation between Levels of HBcrAg and HBV DNA. *J Clin Microbiol* 41:1901-1906, 2003.
- Shimakawa Y, Vernoux L, Gabassi A, Mercier - Delarue S, Vincent JP, Simon F, Maylin S: Analytical validation of hepatitis B core - related antigen (HBcrAg) using dried blood spots (DBS). *J Viral Hepatitis* 28:837-843, 2021.
- Inoue T, Tanaka Y: The Role of Hepatitis B Core-Related Antigen. *Genes-basel* 10:357, 2019.
- Yagi S, Inoue T, Tanaka Y: Improved basic performance of iTACT-HBcrAg assay. *J Hepatol*, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.008> (Online ahead of print), 2023.
- Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Ultrasensitive Assay for Hepatitis B Core - Related Antigen Predicts Hepatocellular Carcinoma Incidences During Entecavir. *Hepatology Commun*, 6:36-49, 2021.
- Hagiwara S, Kusumoto S, Inoue T, Ogawa S, Narita T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Suzuki T, Matsuura K, Yagi S, Kaneko A, Aoyagi K, Iida S, Tanaka Y: Management of hepatitis B virus (HBV) reactivation in patients with resolved HBV infection based on a highly sensitive HB core - related antigen assay. *Hepatol Res*, 52:745-753, 2022.
- Suzuki T, Inoue T, Matsuura K, Kusumoto S, Hagiwara S, Ogawa S, Yagi S, Kaneko A, Fujiwara K, Watanabe T, Aoyagi K, Urata Y, Tamori A, Kataoka H, Tanaka Y: Clinical usefulness of a novel high-sensitivity hepatitis B

- core-related antigen assay to determine the initiation of treatment for HBV reactivation. *J Gastroenterol*, 57:486–494, 2022.
- 19) Inoue T, Watanabe T, Tanaka Y: Hepatitis B core-related antigen: a novel and promising surrogate biomarker to guide anti-HBV therapy. *Clin Mol Hepatology*, <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0434> (Online ahead of print), 2022.
 - 20) Watanabe T, Inoue T, Tanaka Y: Hepatitis B Core-Related Antigen and New Therapies for Hepatitis B. *Microorg*, 9:2083, 2021.
 - 21) Mak L-Y, Hui RW-H, Cheung K-S, Fung J, Seto W-K, Yuen M-F: Advances in determining new treatments for hepatitis B infection by utilizing existing and novel biomarkers. *Expert Opin Drug Dis*, 18:401–416, 2023.
 - 22) Boucheron P, Lu Y, Yoshida K, Zhao T, Funk AL, Lunel-Fabiani F, Guingané A, Tuillon E, Holten J van, Chou R, Bulterys M, Shimakawa Y: Accuracy of HBeAg to identify pregnant women at risk of transmitting hepatitis B virus to their neonates: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 21:85–96, 2021.
 - 23) Yoshida K, Desbiolles A, Feldman SF, Ahn SH, Alidjinou EK, Atsukawa M, Bocket L, Brunetto MR, Buti M, Carey I, Caviglia GP, Chen E-Q, Cornberg M, Enomoto M, Honda M, Siederdisen CHZ, Ishigami M, Janssen HLA, Maasoumy B, Matsui T, Matsumoto A, Nishiguchi S, Riveiro-Barciela M, Takaki A, Tangkijvanich P, Toyoda H, Campenhout MJH van, Wang B, Wei L, Yang H-I, Yano Y, Yatsushashi H, Yuen M-F, Tanaka E, Lemoine M, Tanaka Y, Shimakawa Y: Assay for Hepatitis B Core-related Antigen Identify Patients With High Viral Load: Systematic Review and Meta-analysis of Individual Participant Data. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 19:46-60, 2020.
 - 24) Shimakawa Y, Ndow G, Kaneko A, Aoyagi K, Lemoine M, Tanaka Y, Group P-RS, Cerceau T, Ceesay A, Hasegawa A, Yamamoto N, Vincent JP, Watanabe T, Baba M, Sanneh B, Baldeh I, Njie R, D' Alessandro U, Mendy M, Chemin I, Thursz MR: Rapid point-of-care test for hepatitis B core-related antigen to diagnose high viral load in resource-limited settings. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 21:1943-1946, 2022.