免疫電気向流阻止法 Immunolectrosyneresis Inhibition による B 型肝炎抗原の検出

佐 治 博 夫 ・ 宮 島 淳 子 ・ 細 井 武 光

(京都府赤十字血液センター 所長：細井武光)

矢 原 靖 司

(京都第 1 赤十字病院検査部 部長：細井武光)

(受付：昭和48年 8 月18日)

THE IMMUNOELECTROSYNERESIS INHIBITION METHOD FOR THE DETECTION OF HEPATITIS B ANTIGEN

by

Hiroh SAJI, Junko MIYAJIMA, Takemitsu HOSOI

(*Kyoto Red Cross Blood Center*)

and Seiji YAHARA

(*Clinical Laboratories, Kyoto First Red Cross Hospital*)

The immunolectrosyneresis inhibition method (ESI) was devised at our laboratory. The procedure is based on the principle that the conventional electrosyneresis (ES) is carried out after the HB antigen might be contained in specimen serum absorbs the HB antibody contained in anti-HB serum reagent. The anti-HB serum reagent has a titer of 1: 16 against standard HB antigen reagent by the ES. One hundred μ l of the specimen serum is mixed with 10 μ l of the anti-HB serum and incubated for 30 minutes at 37°C. Then the mixture is used for the ES as the antiserum against the standard HB antigen reagent which has a titer of 1: 8 by the ES method, diluted from single donor serum contained high titer HB antigen. The absence of a pretipitation

line indicates that HB antigen is present in the specimen serum.

This method is easy to perform the HB antigen screening and overcomes the problem of the prozone phenomenon due to antigen excess. This is more sensitive than the conventional ES, and has ability to detect as many HB antigen as the complement fixation method (CF) does. And also, this method can eliminate the false positive reaction by the CF. The precipitation lines of this method always sharp and clear and the identification of HB antigen in the specimen is accurately performed.

It is suggested that ESI may be used together with the other method for the blood donor screening from a viewpoint of double check.

1972年4月以降、血液センターが献血者のB型肝炎抗原(HB_{ag})スクリーニングの方法として採用しているものは immunoelectrosyneresis (ES) である。ESはいくつかの利点と欠点をもっているが検出感度と抗原過剰による Prozone との相克が大きな問題点である¹⁾。すなわち、検出感度を上げようとする、prozone が生じて、高力価のHB_{ag}を見逃すし、prozone を生じさせない条件でESを行なうと、検出感度が落ちるということである。Prozone によって見逃され、保存血液として供給されたHB_{ag}陽性血液の実例も指摘されている²⁾。

われわれは、1971年12月からESに加えて検出感度の高い補体結合反応法(CF)を併用しダブル・チェックによって、献血者のHB_{ag}スクリーニングを行なっている³⁾がCFは主として抗血清の供給が十分でないという理由で普及しがたい。

われわれは、検出感度がよく、prozone の発現がなく、しかも容易に行なえる方法を検索していたが、1972年8月、免疫電気向流阻止法 immunoelectrosyneresis inhibition (ESI) を考案し、試みたところ、実用に供し得るものであったので報告する。

実験方法ならびに材料

1) 抗HB_{ag}血清

献血者から得た抗血清3種、輸血後の患者から得たもの3種、ヤギ由来(市販)、モルモット由来(市販)、ウサギ由来それぞれ1種を使用した。

2) 標準HB_{ag}液

高力価(CF titer 1:1024以上)のHB_{ag}陽性血清をペロナル緩衝液(VB)で希釈し、CF titer 1:64 (ES titer 1:8) になるよう調整する。ゲル内免疫拡散法で検討し、spurを生じない単独供血者HB_{ag}陽性血清を用いた。

3) HB_{ag}陽性血清および被検血清

京都府赤十字血液センターで1972年9月1日から、1973年5月7日までに献血した43,558人の献血者について、CFとESでHB_{ag}が検出された729例の血清を使用した。同時に、無作意に抽出した1,334人の献血者血清をも使用した。

4) ESI

(1) 抗HB_{ag}血清を、標準HB_{ag}に対しES titer 1:16になるようVBで希釈調整し、その0.01mlをマイクロプレートのホールにとる。(ES titer 1:8に調整しマイクロタイター用ドロッパーで1滴(0.025ml)滴下してもよい)

(2) 被検血清0.1mlを加え、マイクロミキサーでよく混和したあと、37°C30分放置する。

(3) これをES用ゲルプレートの陽極側の穴に入れる。

(4) 陰極側の穴には標準HB_{ag}液を入れ、ESを行ない、残留抗体の有無を見る。

(5) 陰性対照を同時に検査し、この沈降線と比較する。

(6) 沈降線が出現しないか、極く弱くしか出現しないものをHB_{ag}陽性とし、沈降線が、陰性対照と同様明瞭に出現するものをHB_{ag}陰性と判定する。

5) ES

ゲルはES titer 1:8の抗原と抗体が、穴と穴とのちょうど中央に、明瞭な沈降線を生じるよう調整する。一般に agarose 3: agar 7 の割合に混ぜ、1%の濃度にVB($\mu=0.05$ pH8.6)に溶かし使用した。ゲルの厚さは1.5mm、穴の直径は3mm、穴の間隔は3mmとした。泳動槽のVBはゲルの溶媒とおなじものとし、3mA/cm(7V/cm)40分泳動し、判定は泳動直後に行なった。使用した抗HB_{ag}血清はES titer 1:8—16でCF titer 1:1024以上のHB_{ag}に対しprozoneのないことを確かめてある。

6) CF

われわれの考案したマイクロタイター法^{4,5)}で行なった。補体2単位、抗HB_{ag}抗体2単位を使用し第一次反応は5°C1夜放置する。溶血系は溶血素5単位、感作ヒツジ血球1%浮遊液で第二次反応は37°Cで補体コントロールが所定の溶血を示す時間(一般に30分間)放置した。すべての溶媒はペロナル緩衝生理食塩水(VBS)を用いた。使用した抗HB_{ag}血清はCF titer 1:128—256の献血者由来、または、ウサギ由来のものである。

7) Solid phase radioimmunoassay (S-RIA)

ダイナボット社のAusria-125キットを用い、使用説明書の方法に従った。

実験成績

1) CF titer 1:16, 64, 256, 512, 1024の5例のHB_{ag}陽性血清を用い、ESおよびESI

で titration を行なった。結果は表1に示すとおりで、感度はESとCFの中間に位置し、ESの感度を1とするとESI 2-4, CF 4-32である。

43,558人の献血者をCFとESでスクリーニングしHB ag 陽性と判定した729例をESIで検査した。結果は、表2、図1に示すとおりで、CF

表1 CFとESとESIの感度比較 (Titration)

Sp. No.	Met.	dilution of sera								CF titer
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
1127	ES	W	—	—	—	—	—	—	—	1: 16
	ESI	—	—	W	+	+	+	+	+	
1157	ES	+	+	W	—	—	—	—	—	1: 64
	ESI	—	—	—	+	+	+	+	+	
1151	ES	≡	≡	≡	≡	+	+	W	—	1: 256
	ESI	—	—	—	—	—	—	—	W	
1125	ES	≡	≡	≡	≡	+	W	—	—	1: 512
	ESI	—	—	—	—	—	—	W	+	
1118	ES	≡	≡	≡	≡	+	+	—	—	1: 1024
	ESI	—	—	—	—	—	—	—	W	

感度指数 ES 1 : ESI 2~4 : CF 4~32

表2 CFとESとESIの感度比較 (Mass Sample) Kyoto 1972. 9. 1-1973. 5. 7.
検査数43,558

ES		+	—	+	—	計	ESI +
ESI		+	+	—	—		
CF titer	0	1		8		9	1
	4>	1	4	2	4	11	5
	1: 4	3	20		6	29	23
	1: 8	20	34		2	56	54
	1: 16	49	26			75	75
	1: 32	114	12			126	126
	1: 64	158	4			162	162
	1: 128	109	3			112	112
	1: 256	76				76	76
	1: 512	52				52	52
	1: 1024	21				21	21
計		604	103	10	12	729	707
%		1.39	0.24	/	/	1.67	1.62

≡: 検出限界 (検出率50%以上)

感度指数 ES 1 : ESI 4 : CF 16

2) 京都府赤十字血液センターで献血した

図1 CFとESとESIの感度の比較
(CF titer 別度数分布による)

Kyoto 1972. 9. 1~1973. 5. 7 検査数43,558
陽性数 729

の検出率 1.67% (721例), E S のそれは 1.40% (614例), E S I のそれは 1.62% (707例) であった. 検出率は E S よりも明らかに高く, C F に近い値を示している.

E S および E S I の検出限界を C F titer を基準として, H B ag を 50% 以上検出し得るところとすると, E S は C F titer 1 : 16, E S I は C F titer 1 : 4 である. 結局, E S の感度を 1 とすると, E S I は 4, C F は 16 ということになり, さきの titration による結果と一致する.

3) 京都府赤十字血液センターで献血した 1,334 人 (無作意抽出による) の献血者を C F と E S と E S I の 3 法で, スクリーニングした. E S I における沈降線は常に明瞭で, 沈降線阻止

る.

4) E S I も, 抗体阻止反応の通例として, 非特異的抗体吸着による偽陽性の可能性が考えられる. 抗抗体を含むと考えられる R A テスト陽性の血清 40 例について H B ag の E S I を行なったところ, いずれも H B ag 陰性と判定され, 偽陽性はなかった.

5) C F, E S, E S I の 3 法が不一致であったもの 50 例を抽出し, S-R I A で検討した. 結果は表 4 に示すとおりである. C F の成績が ? と示されているのは主に抗補体性を有する血清である.

表 4 E S と C F 不一致例の検討 (E S I と S-R I A によって) 50 例

C F	E S	例数	S-R I A	E S I	例数
+	-	32	+	+	31
			-	-	1
?	-	7	+	+	4
			-	-	3
?	+	2	+	+	1
			-	-	1
-	+	9	+	+	1
			-	-	8
計 50			+	-	0
			-	+	0
			+	+	37
			-	-	13

一致率 E S I : R I A = 100%
C F : R I A = 88%

結局, S-R I A と E S I の一致率は 100% で, S-R I A と C F の一致率は 88% であり, C F による非特異的 “拾い上げ” を確認できたが, E S I によるそれはなかった. 一方, 抗補体性を示すもののなかには H B ag 陽性のものがあり得ることも確認された.

考察

H B ag の検出法は, ゲル内沈降反応を応用した免疫拡散法や E S のように比較的感度の低い方法の他に, C F⁴⁾, 免疫粘着法 immune adherence

表 3 C F と E S と E S I の検出頻度の比較

E S	E S I	C F	例数	%
+	+	+	11	0.82
-	+	+	11	0.82
-	-	+	1	0.07
-	-	-	1311	98.28
E S +			11	0.82
E S I +			22	1.65
C F +			23	1.72
Total			1334	

は容易に観察でき, 判定は楽であり, 1 検査者の 1 日の検体処理量は 500 検体まで可能である. 結果は表 3 に示すとおりで, C F で 23 例 (1.72%), E S I で 22 例 (1.65%), E S で 11 例 (0.82%) が検出された. すなわち, この検体集団に関する限り, E S と E S I を併用すると, E S 単独の場合よりさらに 11 例 (0.82%) が拾い上げられ, C F との併用に比して 1 例 (0.07%) の見落としがあったことになる. この検体集団の前後 1 カ月間の H B ag 検出率は E S で 1.48%, C F で 1.68% であった. したがって H B ag の抗原力価の分布がこの検体集団では低い方へ片寄っていて, 必らずしも全体の傾向を示しているとはいえないが, 検出頻度は E S より良く, C F とほぼ同程度であるといえ

(IA)⁵⁾, 受身血球凝集阻止法, passive hemagglutination inhibition (PHI)^{6,7)}, および現在のところ最も高感度といわれる S-RIA^{8,9)} が用いられている。しかし, CF, IA, PHI, S-RIA, は経済的, 技術的ないくつかの理由で十分に普及している訳ではなく, 現在のところ主として E S が行なわれている。そして E S には, つぎのような問題点が指摘されている。

(1) 十分な検出感度が得られない。

(2) Prozone (抗原過剰による偽陰性) と検出感度の相克。

(3) ゲルの特性が, 検出条件を左右するが, 一定品質のゲルを入手することは困難である。

さらに, 血液センター業務においては, ダブル・チェック (反応機作の異なる2法によって検査する) が常識となっている現在, HB ag スクリーニングのように受血者に重大な影響を及ぼし得る検査が1法のみによって, しかもその方法がやや不完全といわれる方法によって, 行なわれている現状は反省すべき点である。この観点から, われわれは E S に CF を併用して HB ag のダブル・チェックを行なってきた。しかし CF に使用可能な抗体の入手は必ずしも容易ではなく, 検査に要する時間も 8~18 時間と長い。

われわれは CF と同じ程度の感度を有し, E S の問題点を解決し得る方法として E S I を考案した。

南アフリカの Milner ら¹⁰⁾ は inhibition crossover electrophoresis と称するわれわれの E S I と全く同じ機作の HB ag 検出法を報告している。彼らは標準 HB ag 液は共通抗原決定基 'a'¹¹⁾ のみをもつものでなければならないとしている。抗原 'a' のみを有する HB ag が入手可能かどうか¹²⁾ はさておき, それ以外の決定基をもつ抗原を使用すると HB ag の亜型¹²⁻¹⁴⁾ によっては偽陰性があり得るという彼らの指摘に関して, われわれの多数例についての検査成績は否定的である。これは使用した抗体が anti-'a' を多く含んでいた事, 最終力価を 1.5-2 単位におさえたこと, わが国の場合, HB ag の大多数が, 亜型 'ad' であること¹⁵⁾, など

によると考える。

しかし, わが国における 'ad-' の存在もすでに報告¹⁶⁾ されているので, 現在, 抗体の最終力価を 5-20 単位に増やし HB ag 亜型のスクリーニングを試みているが, 確かに, ある HB ag によっては偽陰性が生じ得ることを見だしている。

しかし, E S I を唯一の方法として HB ag のスクリーニングに採用するのではなく, ダブル・チェックの1方法として採用するならば, この欠点はむしろ利点に転ずることができる。すなわち亜型の発見のいとぐちが得られるわけである。

まとめ

免疫電気向流阻止法 immunoelectrosyneresis inhibition (ESI) は HB ag の検出法として, つぎのような価値をもっている。

1) 検出感度は E S の 2-4 倍, CF の $1/2-1/4$ である。

2) 検出頻度は E S より良く, CF と同等である。

3) Prozone (抗原過剰による偽陰性) を考えなくてよい。

4) 所要時間は E S より 40-60 分長くかかるが, CF より短時間に, また, 容易にできる。

5) 沈降線は常に最適比の状態で見われ, 沈降線阻止の観察は容易である。

6) E S が, 施行可能な施設ならば, いつでも採用できる。

7) 十分な特異性を有しており, CF より非特異的拾い上げは少ない。

8) 血液センター業務における HB ag のダブル・チェックの1方法として, 採用することが可能であり, 使用する抗血清と抗原の組合せによっては HB ag 亜型発見のいとぐちが得られる。

この論文の要旨は, 第16回日本輸血学会近畿地方会および第21回日本輸血学会総会で報告した。

文献

- 1) 佐治博夫, 大槻百合恵, 三好知子, 早坂由美子, 細井武光: Au 抗原および抗体検出法の再検討 — E S 法および CF 法について — 第15回日本臨床病理学会近畿支部総会抄録, 臨床病理, 20: 830, 1972.

- 2) 吉原なみ子, 元木央子: 日赤献血血液における Au 抗原再スクリーニングの陽性頻度, 第21回日本輸血学会抄録, 1973.
- 3) 大槻百合恵, 佐治博夫, 岸本雄吉, 宮島淳子, 三好知子, 細井武光: 献血者における Au 抗原および抗体の分布, 1年間のまとめと反省, とくに検出法による検出率の比較, 第15回日本臨床病理学会近畿支部総会抄録, 臨床病理, 20: 831, 1972.
- 4) Purcell, R.H., P.V. Holand, J.H. Walsh, D.C. Wong, A.G. Morrow & R.M. Chanock.: A complement-fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. Infect. Dis.* **120**: 383-386, 1969.
- 5) Mayumi, M., K. Okochi, & K. Nishioka.: Detection of Australia antigen by means of immune adherence hemagglutination test. *Vox Sang.* **20**: 178-181, 1971.
- 6) 今井光信, 高橋 隆, 田子勝彦, 橋本 喬: 受身赤血球凝集反応による Au 抗原の検出, 医学のあゆみ, 80: 758-759, 1972.
- 7) Shaffer, W.E.: Comparison of counter-electrophoresis and hemagglutination inhibition tests for hepatitis-associated antigen. *Vox Sang.* **22**: 366-370, 1972.
- 8) Lander, J.J. H.J. Alter & R.H. Purcell: Frequency of antibody to hepatitis-associated antigen as measured by a new radioimmunoassay technique. *J. Immunol.* **106**: 1166-1170, 1971.
- 9) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 稲垣真理子, 富岡 一: オーストラリア抗原・抗体の Radioimmunoassay. 小児科臨床, 24: 3044-3052, 1971.
- 10) Milner, L.V., J.L. Dobie. & B.G. Grobbelaar: An inhibition crossover electrophoresis technic for the detection of hepatitis-associated antigen. *Transfusion.* **12**: 273, 275, 1972.
- 11) Kim, C.Y. & J.G. Tillies: Immunologic and electrophoretic heterogeneity of hepatitis-associated antigen. *J. Infect. Dis.* **123**: 618, 626, 1971.
- 12) Le Bouvier, G.L., R.W. McCollum, W.J. Hierholzer, Jr., G.R. Irwin, S. Krugman, & P. Giles: Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus, *JAMA.* **222**: 928-930, 1972.
- 13) Bancroft, W.H., F.K. Mundon, & P.K. Russell: Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.* **109**: 842-848, 1972.
- 14) 今井光信, 猪股みな子, 山下 寛, 柳沢利喜雄, 津田文男, 西岡久寿樹, 後藤敦, 倉科周介, 真弓忠: オーストラリア抗原の抗原性, 臨床科学, 9: 347-352, 1973.
- 15) 石田名香雄: オーストラリア抗原の性状, 臨床科学, 9: 324-334, 1973.
- 16) 甲木和子, 前田光美, 日沼頼夫: オーストラリア抗原一重型(ad⁻)の検出, 医学のあゆみ, 85: 419-420, 1973.