全自動化学発光免疫測定法を用いた献血者 HBs 抗原 スクリーニングの検討

佐藤進一郎 岸本 信一 伊原 弘美 酒谷 真一
加藤 俊明 池田 久實 関口 定美

北海道赤十字血液センター

(平成9年8月20日受付)

(平成9年11月5日受理)

EVALUATION OF HBs ANTIGEN SCREENING FOR BLOOD DONORS USING A FULLY AUTOMATED CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY

Shinichiro Sato, Shinichi Kishimoto, Hiromi Ihara, Shinichi Sakaya,
Toshiaki Kato, Hisami Ikeda and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center

Hepatitis B-type virus (HBV) screening at Japanese Red Cross Blood Centers is carried out by agglutination method. The risk of post-transfusion hepatitis B (PTHB) has markedly decreased, especially since the hemagglutination inhibition test (HI) for anti-HBc and the passive hemagglutination test (PHA) for anti-HBs were introduced to screening in addition to the reversed passive hemagglutination test (RPHA) for HBsAg in 1989. However, PTHB had not been completely eliminated even using the current system (RPHA, HI & PHA) which is rather complicated and time-consuming. We therefore evaluated the PRISM-HBsAg assay (Abbott), a fully automated assay based on chemiluminescence technology, in comparison with EIA-HBsAg (Auszyme overnight protocol, Dainabot) and our present HBV system.

Sensitivity of PRISM-HBsAg (0.08 ng/ml in ad panel and 0.06 ng/ml in ay panel) was higher than that of EIA-HBsAg (0.23 ng/ml in ad panel and 0.11 ng/ml in ay panel). In 87 HBV-DNA-positive panels that were RPHA-negative (or weakly positive) and HI-positive, 59 and 50 were positive with PRISM-HBsAg and EIA-HBsAg, respectively.

A total of 20,041 donor specimens were tested simultaneously by PRISM-HBsAg, EIA-HBsAg and RPHA. The number of disqualified samples was 98, 91, 71 and their determination ratio (disqualified samples/initially positive samples $\times$ 100) was 96.1%, 20.8% and 19.7%, respectively. These results show that the determination ratio of PRISM-HBsAg assay is clearly higher than that of EIA-HBsAg and RPHA. There were 19 RPHA-negative and PRISM-HBsAg-positive samples, 17 of which were HI-positive and disqualified according to the criteria of our present HBV system. Of 313 samples disqualified because of their high HI titer despite their negative PRISM-HBsAg and EIA-HBsAg, 10 were PCR-positive with DNA preparation concentrated from 10 ml samples. These results indicate that the sensitivity and specificity of PRISM-HBsAg assay are significantly higher than those of EIA-HBsAg and RPHA. However, anti-HBc screening is still necessary, because some HBV-DNA-positive samples with high anti-HBc activity are PRISM-HBsAg-negative.

Key words: HBV, post-transfusion hepatitis B, donor screening, chemiluminescence immunoassay

はじめに

1989年に血液センターは輸血後B型肝炎の減少を目的に、献血血液のHBVスクリーニングとしてそれまで行ってきたRPHA法(reversed passive hemagglutination test)によるHBs抗原検査に、新たにHI法(hemagglutination inhibition test)によるHBc抗体検査を加えたスクリーニングシステム(HBVシステム)を導入した^{1)~4)}。これにより輸血後B型肝炎の発生を激減させることに成功し、輸血によるHBV感染リスクは著しく減少した⁵⁾。しかし、現行HBVシステムの一次検査は自動化されているが、再検査は用手法で行わなければならないため手技が繁雑であり、特異性の問題から確定率(一次検査陽性数に占める検査不合格数の割合)が極端に低く、検査効率に難点がある。また、現行HBVシステム導入後も極めて僅かであるが輸血後B型肝炎の発生が報告されている⁵⁾⁶⁾。従って、さらに輸血用血液の安全性を高め、同時に現行検査法の問題点を改善するためには感度と特異性に優れ、完全に自動化された効率的なスクリーニング検査の導入が望ましい。今回、著者らは血液センターにおけるマルチチャンネル対応のウイルススクリーニングシステムとして開発された、全自動化学発光免疫測定装置PRISMシステム⁷⁾(Abbott)を用いて、献血者HBs抗原スクリーニングとしての有用性を検討したので報告する。

材料および方法

1. HBs抗原検出感度試験用パネル

HBs抗原検出感度試験には、ad, ayパネル(Abbott)を各濃度に調整して使用した。

2. HBV-DNA陽性パネル

HI法陽性の献血者検体をPCR法で検査し、HBV-DNAが陽性を示した87例をHBV-DNA陽性パネルとして用いた。その内訳はRPHA法陰性の78例およびRPHA法弱陽性(RPHA価²³以下)の9例であった。

3. 高感度HBs抗原検査法

1) PRISMによるHBs抗原検査(PRISM-HBsAg)⁸⁾⁹⁾

PRISM-HBsAg(Abbott)は被検血清または血

漿100 μ lと抗HBsAgマウスモノクローナル抗体固相化マイクロパーティクル50 μ lを反応させ、37°Cで18分間インキュベート後、洗浄液300 μ lで2回洗浄してグラスファイバー膜上に移行させ、さらにアクリジニウム標識抗HBsポリクローナル抗体50 μ lを反応させ、37°Cで23分間インキュベートしてモノクローナル抗体・HBsAg・ポリクローナル抗体結合物をつくる。これを洗浄液200 μ lで1回、100 μ lで3回洗浄後、活性化剤を50 μ l加えて発光カウントを測定した。S/CO(sample counts/cutoff)が1.0以上を示した検体を陽性と判定した。一次検査で陽性を示した検体は、再検査として2重測定を行い、そのうち1回以上の陽性を示した場合に検査不合格とした。PRISMシステムによる確認試験は未だ開発されていないため、陽性検体はPCR法によるHBV-DNAの精査を行った。

2) EIA法によるHBs抗原検査(EIA-HBsAg)¹⁰⁾

EIA-HBsAgはAuszyme II試薬(Dainabot)を用いて添付の使用説明書に従って実施した。測定条件として一夜法と短時間法の2種類の方法があり、HBs抗原検出感度の評価には両プロトコルを、HBV-DNAの陽性パネルと献血者検体の測定にはすべて一夜法を用いた。一次検査で陽性を示した検体は確認試験としてHBs抗体を用いた中和試験を実施し、陽性を示した場合に検査不合格とした。

4. HBVスクリーニングシステム⁹⁾¹¹⁾

日赤血液センター業務標準に従い、献血者検体のHBVスクリーニングはHBs抗原検査(RPHA法)、HBc抗体検査(HI法)、HBs抗体検査(PHA法)の結果の組合せで判定した。さらに試験検討基準として、HBc抗体価が2⁴または2⁵の検体についてはHBs抗体価が検討用対照HBs抗体(100mIU/ml相当)未満で、かつHBe抗体(HI法)が陽性の場合に検査不合格とし、HBV-DNAの精査を行った。

5. HBV-DNA検査

各検査法で陽性を示した検体のHBV-DNA検査は、被検血漿各100 μ lから抽出したDNA検体

Fig. 1 Sensitivity of PRISM-HBsAg and EIA-HBsAg using ad and ay panels

を用いた。ただし、各検査法の結果が乖離した検体で100 μ lのPCR法が陰性の場合には、検体各1ml, 10mlをそれぞれ125,000g (max)で3時間、450,000g (max)で1時間の超遠心濃縮したものから抽出したDNA検体を用いた。HBV-DNAの抽出、増幅および検出はIizukaらの方法¹²⁾に準拠した。被検検体100 μ lをProteinase K/SDS、フェノール/クロロフォルム、冷エタノールで処理しDNAを抽出した。このDNA検体をテンプレートとして、HBV-DNAのS遺伝子領域の513base pairs (bp)を1st PCRのプライマー5'-TCGTGT-TACAGGCGGGGTTT-3' (nt #192~211:センス)および5'-CGAACCACTGAACAAATGGC-3' (nt #685~704:アンチセンス)を用いて35サイクルの増幅を行った。1st PCRで陰性を示した検体は、2nd PCRのプライマー5'-CAAGGTATGTT-GCCCGTTTG-3' (nt #455~474:センス)および5'-GGCACTAGTAACTGAGCCA-3' (nt #668~687:アンチセンス)を用いて25サイクルの増幅を行った。PCR産物は2% (wt/vol)のアガロースゲルによる電気泳動を行い、エチジウムブロミドで染色後、UV照射により1st PCRでは513bp, 2nd PCRでは233bpのバンドが検出された場合に陽性と判定した。

結 果

1. HBs抗原検査法の検出感度の評価

1) 感度試験用パネルを用いた評価

Table 1 Correlation between PRISM-HBsAg and EIA-HBsAg in HBV-DNA-positive panel sera

Assay		PRISM-HBsAg	
		+	-
EIA-HBsAg (overnight method)	+	50	0
	-	9	28

n = 87

ad, ayパネルにおける検出感度は、PRISM-HBsAgで0.08, 0.06ng/ml, EIA-HBsAg(一夜法)で0.23, 0.11ng/ml, EIA-HBsAg(短時間法)で0.50, 0.30ng/mlを示し (Fig. 1), PRISM-HBsAg > EIA-HBsAg (一夜法) > EIA-HBsAg (短時間法)の順であった。

2) HBV-DNA陽性パネルを用いた評価

HBV-DNA陽性パネル87例中、PRISM-HBsAgおよびEIA-HBsAg共に陽性は50例、PRISM-HBsAg単独陽性は9例、両法が陰性は28例存在した (Table 1)。両法が陰性の28例は、いずれもHI価が2⁵以上のPCR陽性検体であった (Fig. 2)。

2. 各検査法による同時並行検査

献血者20,041検体について、PRISM-HBsAg, EIA-HBsAg(一夜法)およびHBVシステムによる同時並行検査を実施した (Table 2)。一次検査陽性数(率)はPRISM-HBsAgの102 (0.51%)に比べ、EIA-HBsAgは437 (2.18%), RPHA法

Fig. 2 Distribution of HI titer for anti-HBc in HBV-DNA-positive panel sera

は361 (1.80%) と高い傾向を示した。また、HBV システムは HI 法陽性を含むため1,881 (9.39%) と著しく高い陽性率を示した。一方、検査不合格数は PRISM-HBsAg の98例に比べ、EIA-HBsAg は91例、RPHA 法は71例と若干低い傾向を示した。また、HBV システムは406例と高く、そのうち335例は HI 法陽性例であった。確定率は PRISM-HBsAg が96.1%と極めて再現性が高いのに対し、EIA-HBsAg は20.8%、RPHA 法は

19.7%、HBV システムは21.6%と明らかに低い傾向を示した。

3. 各検査法陽性検体の HBV-DNA 検査

各検査法で陽性を示した検体について HBV-DNA 検査を実施した (Table 2)。PRISM-HBsAg、EIA-HBsAg および RPHA 法が陽性を示した検体の HBV-DNA 陽性例はそれぞれ78, 77, 65例存在し、3種類の HBs 抗原検査法の中では PRISM-HBsAg が最も多くの PCR 陽性例を検出した。一方、HBV システム陽性検体の HBV-DNA 陽性例は87例存在し、HI 法による HBc 抗体検査は RPHA 法の感度不足を補うと共に PRISM-HBsAg 陰性の PCR 陽性例を検出した。

4. 各検査法陽性乖離検体の解析

各検査法での陽性例中に検出された HBV-DNA 陽性例を Fig. 3, HBV 関連検査結果をそれぞれ Table 3, 4 に示した。RPHA 法陰性で PRISM-HBsAg と EIA-HBsAg 共に陽性の19例は全例 EIA 法による中和試験で HBsAg 特異性が確認された。19例中17例は HBV システムによる HI 法陽性で、そのうち11例は検体100 μ l の PCR 法陽性であった (図示せず)。一方、19例中2例の HI 値は共に2¹と低く、HBV システムの判定基準では陰性であったが、そのうち1例 (# PE-2) は検体10m l 濃縮の PCR 法で陽性を示した (Table 3)。PRISM-HBsAg 単独陽性の8例中5例は HBV システム陽性でいずれも HI 値が高く、そのうち1例 (# PH-2) は検体100 μ l の PCR 法で陽性を示した (Table 3)。8例中3例は HI 法および HBV-DNA はすべて陰性であり (Table 3)、PRISM-HBsAg による偽陽性反応と考えられた。また、HBV システム単独陽性を示した313例

Table 2 Results of random donor screening simultaneously tested by PRISM-HBsAg, EIA-HBsAg, RPHA and HBV systems

	PRISM-HBsAg	EIA-HBsAg	RPHA	HBV system
Initially positive	102 (0.51%)	437 (2.18%)	361 (1.80%)	1,881 (9.39%)
Disqualified	98 (0.49%)	91 (0.45%)	71 (0.35%)	406 (2.03%)
Determination ratio*	96.1%	20.8%	19.7%	21.6%
HBV-DNA-positive	78	77	65	87

Determination ratio*: (Disqualified samples/Initially positive samples) $\times$ 100

n=20,041

() : No. of PCR-positive samples, n=20,041

Fig. 3 Results of random donor screening simultaneously tested by PRISM-HBsAg, EIA-HBsAg, RPHA and HBV systems

Table 3 Characteristics of discrepant samples for PRISM-HBsAg, EIA-HBsAg and HBV systems

Positive assay	n	Sample No.	PRISM-HBsAg	EIA-HBsAg	Anti-HBc HI titer (2 ⁿ)		PCR		
							100μl	1ml	10ml
PRISM-HBsAg HBV system	5	PH-1	+	-	+	5	-	-	-
		PH-2	+	-	+	7	+	+	+
		PH-3	+	-	+	8	-	-	-
		PH-4	+	-	+	5	-	-	-
		PH-5	+	-	+	6	-	N.D.	N.D.
PRISM-HBsAg	3	PM-1	+	-	-	-	-	-	-
		PM-1	+	-	-	-	-	-	-
		PM-1	+	-	-	-	-	-	-
PRISM-HBsAg EIA-HBsAg	2	PE-1	+	+	-	1	-	-	- ¹⁾
		PE-2	+	+	-	1	-	-	+

¹⁾ PCR result of 5ml sample, N.D.: not done

Table 4 Characteristics of HBV-DNA-positive samples which were also positive by the HBV system only

Positive assay	n	Sample No.	PRISM-HBsAg	EIA-HBsAg	Anti-HBc HI titer (2 ⁿ)		PCR		
							100μl	1ml	10ml
HBV system	10	HB- 1	-	-	+	7	+	+	+
		HB- 2	-	-	+	8	-	-	+
		HB- 3	-	-	+	7	-	-	+
		HB- 4	-	-	+	6	-	-	+
		HB- 5	-	-	+	4	-	-	+
		HB- 6	-	-	+	9	-	-	+
		HB- 7	-	-	+	7	-	-	+
		HB- 8	-	-	+	4	-	-	+
		HB- 9	-	-	+	7	+	+	+
		HB-10	-	-	+	8	-	-	+

中10例(2例は検体100 μ l, 8例は検体10ml濃縮)はPCR法で陽性を示した(Table 4)。この10例はPRISM-HBsAg陰性で、HI法によってのみ検出されたPCR陽性検体であった。

考 察

日本赤十字社の輸血後肝炎の防止に関する特定研究班は、1994～1995年の間に調査対象医療機関で輸血を受けた患者10,345名中6,458症例について輸血後肝炎発症の追跡調査を行った。その結果、確診例はいずれもALT値のみが変化した非B非C肝炎の31例(0.48%)で、疑診例はC型肝炎の4例(0.0621%)およびB型肝炎(0.015%)の1例であったと報告している¹³⁾。これらの成績は1989年に献血者検体スクリーニングに導入されたHBc抗体およびHCV抗体検査が、輸血後肝炎の減少に著しい効果をもたらしたことを裏付けている。しかし、輸血後B型肝炎の発生は完全にゼロになったわけではない。1994～1996年に医療機関から報告された副作用件数をもとに、日本赤十字社中央血液センターの医薬情報部がまとめた現在の輸血後B型肝炎の発生リスクは、159万分の1と推定されている。

最近の著者らの調査では、献血者のHBs抗原陽転率は0.00219% (約5万人に1例)の頻度で発生している(未発表データ)。これらのHBs抗原陽転率は若年者層が大部分を占め、性的な接触による水平感染が主と考えられる。このようなHBV感染初期の献血者がwindow periodに献血する可能性はHIVと同様に懸念される。従って、可能な限りwindow periodを短縮するためには、血清学的マーカーとして最も早期に血中に出現してくるHBs抗原を高感度法で検出する必要がある。

柴山らはHBc抗体スクリーニング導入前に、RPHA法陰性の血液で、輸血後B型劇症肝炎およびB型急性肝炎(重症型)を発症して死亡した2症例について解析し、その原因血はRIA法のHBsAgが陽性でHBc抗体が高力価を示す変異株であったと報告している¹⁴⁾。また、野澤らはHBc抗体スクリーニング導入後に発生した輸血後B型劇症肝炎症例を報告し⁶⁾、その原因血は

RPHA法陰性、EIA-HBsAg陽性、HI法価 2^8 、PHA価 2^2 であり、HBs抗原とHBs抗体が共存した無症候性のHBVキャリアの血液であったことを示した。この報告後、日赤血液センターではHBs抗原抗体共存例を排除するために、HBs抗体の陽性判定基準を引き上げて輸血用血液の出庫を行うように変更した。さらに1997年4月よりHI法の可否判定基準を 2^6 から 2^5 に変更し、輸血用血液の安全性向上に努めている。しかし、前述のようにHBs抗原価の低下した無症候性HBVキャリアではRPHA法が陰性を示す例が存在する。通常これらのキャリア血液はHI法で排除されるが¹⁵⁾¹⁶⁾、稀にHBs抗原価とHBc抗体価が共に低下したHBV-DNA陽性のキャリアが存在することがある。それらの検体を検出するためにも、HBsAg検査の高感度化は必要と考える。

今回検討したPRISM-HBsAgの検出感度はadパネルで0.08ng/ml、ayパネルで0.06ng/mlと最も高く、EIA-HBsAg(一夜法)の2～3倍、EIA-HBsAg(短時間法)の5～6倍の高感度を示した。また、現在スクリーニングに用いられているRPHA法の検出感度は約10～12ng/mlであり、PRISM-HBsAgと比較すると100倍以上の感度差がある。HBV-DNA陽性パネル87検体(RPHA法陰性78例、RPHA法弱陽性9例)を用いた検出数の比較では、PRISM-HBsAg陽性が59例、EIA-HBsAg陽性が50例と、9例の差が認められた。これらの結果より、PRISM-HBsAgの方が高感度であることが確認された。

次に多数検体における各検査法の感度、特異性を評価する目的で、献血者20,041検体について同時並行検査を行った。その結果、3種類のHBs抗原検査法の中でPRISM-HBsAgが最も多くのHBs抗原陽性例並びにHBV-DNA陽性例を検出した。またPRISM-HBsAgはHBVシステム陰性と判定された5例も陽性と判定した。この5例中3例は非特異反応と考えられたが、他の2例はEIA-HBsAgも陽性を示し、その特異性はEIA法の吸収試験で確認され、さらに1例は検体10ml濃縮のPCR法で陽性を示した。またこの2例は低力価のHBc抗体を保有していることや、その

後の追跡調査でも検査結果に変化が認められないことから、感染後長期に経過したウイルスキャリアの可能性が示唆された。さらに PRISM-HBsAg は EIA-HBsAg 陰性で HBV システム陽性 5 例を陽性と判定し、そのうち 1 例は検体 100 μ l の PCR 法で陽性を示した。従って、献血者の HBs 抗原スクリーニングを PRISM システムで高感度化することにより、現行 HBV システムや EIA-HBsAg では検出できない HBs 抗原陽性検体を検出することが可能であり、輸血用血液の安全性をさらに向上することができるものと考えられる。

一方、現行 HBV システムの HI 法だけで検出された HBc 抗体陽性の 313 例中 10 例は、PRISM-HBsAg が陰性を示す HBV-DNA 陽性検体であった。従って、献血者における HBc 抗体検査は HBs 抗原陰性の HBV-DNA 陽性検体を検出するために今後也不可欠と考えられた。しかし、一部の HBV-DNA 陽性検体を排除するために多数の HI 法陽性血が輸血に使用不可とされることは、安全性を最優先するとやむを得ないものと考ええる。

各検査法における確定率は、PRISM-HBsAg が 96.1% と他の二法 (20.6%, 19.7%) に比べて極めて高く、実際のスクリーニングに導入した場合は、現行 HBV システムの問題点である確定率の向上、効率性、複雑性などの改善が期待できる。今回の検討で PRISM-HBsAg は、感度、特異性共に優れていることが確認された。

今後の血液センターにおける HBV スクリーニングの効率化、システム化を考慮すると、PRISM システムを用いた HBs 抗原、HBc 抗体、HBs 抗体の 3 項目の組合せによる新たな検査基準の構築が必要と考える。

文 献

- 1) Japanese Red Cross Non-A Non-B Hepatitis Research Group: Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody in incidence of post-transfusion hepatitis. *Lancet*, 338: 1040—1041, 1991.
- 2) 関口定美, 加藤俊明: 輸血検査の自動化について. *総合臨床*, 35: 2749—2757, 1986.
- 3) 加藤俊明, 関口定美: 検査の自動化と今後の課題. 関口定美 編, 輸血研究の進歩, 富士書院, p. 110—122, 1990.
- 4) 関口定美, 加藤俊明: PK7200 による輸血検査の自動化の現状. 輸血・血液製剤療法ガイド増補版, 1995, p. 106—118.
- 5) Yoshida, M., Sekiyama, K., Sugata, F., et al.: Post-transfusion fluminant hepatitis B after screening for hepatitis B virus core antibody. *Lancet*, 339: 253—254, 1992.
- 6) 野沢靖美, 大戸 齊: HBc 抗体測定導入後に発生した輸血後 B 型肝炎の 1 例. *肝臓*, 34: 433—436, 1993.
- 7) Khalil, O., Zurek, T., Tryba J., et al.: Abott Prism: A multichannel heterogeneous chemiluminescence immunoassay analyzer. *Clin. Chem.*, 37(9): 1540—1547, 1991.
- 8) 関口定美, 佐藤進一郎: 化学発光免疫測定法による献血者 HBs 抗原スクリーニング. *医学のあゆみ*, 178(3): 188—189, 1996.
- 9) 加藤俊明, 関口定美: 全自動化学発光測定装置 PRISM による HBs 抗原検査. 血液センターにおける品質保証と GMP, 関口定美 編, 富士書院, p. 37—45, 1996.
- 10) 飯野四郎, 倉井清彦, 真弓 忠, 他: モノクローナル抗体を用いた HBs 抗原検出系についての検討. *肝・胆・膵*, 12(2): 297, 1986.
- 11) 加藤俊明, 伊原弘美, 池田久實, 他: 血液センターにおける HBV スクリーニングの現状, 関口定美 編, 輸血感染症の防止, 富士書院, p. 3—14, 1994.
- 12) 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.
- 13) 日本赤十字社輸血後肝炎の防止に関する特定研究班総括報告: 輸血後ウイルス肝炎の現状. 1993—1995, p. 7—14, 1996.
- 14) 柴山隆男, 田中 武, 林 星舟, 他: RPHA 法で HBs 抗原陰性血の輸血後, B 型肝炎肝炎及び B 型肝炎 (重症型) で死亡した 2 症例の解析. *肝臓*, 33: 787—793, 1992.
- 15) 伊原弘美, 加藤俊明, 池田久實, 他: 献血者 HBc 抗体スクリーニング法としての HI 法の評価. *日輸血会誌*, 36(1): 56—62, 1990.
- 16) 伊原弘美, 加藤俊明, 池田久實, 他: 二重 PCR 法による HBc 抗体陽性献血者からの HBV-DNA の検出. *日輸血会誌*, 38(3): 429—434, 1992.