<原 著>

生物発光を用いた高感度免疫測定装置 BLEIA®-1200 による
HBs 抗原測定の有効性八橋 弘^{1)*} 中村 実可¹⁾ 釘山 有希¹⁾ 佐々木 龍¹⁾ 戸次 鎮宗¹⁾
橋元 悟¹⁾ 斐 成寛¹⁾ 大谷 正史¹⁾ 佐伯 哲¹⁾ 長岡 進矢¹⁾
小森 敦正¹⁾ 阿比留正剛¹⁾ 峰川 貴之²⁾ 神山 道信²⁾ 大熊 博²⁾

要旨：高感度検出が可能となる生物発光を用いた免疫測定装置 BLEIA®-1200 と専用の定量試薬 BLEIA® ‘栄研’ HBs 抗原が開発された。今回、この高感度 HBs 抗原測定系の基礎的検討および臨床検体を用いてその有用性を検討した。検討の結果、検出限界は 0.005 IU/ml と従来の市販定量試薬より 6~10 倍高感度であり、また良好な希釈直線性を示した。化学発光免疫測定法 (CLIA) との相関性については、 $r=0.983$ と良好で、治療経過例での検討でも並行した数値の推移を示した。急性 B 型肝炎症例においては、CLIA が陰性化した後も HBV-DNA と同じ期間陽性となった。また、CLIA 陰性の非 B 型肝炎 80 例中 1 例で乖離が認められたが、HBc 抗体が陽性であったことから既往感染例であり、この乖離は試薬間の感度差に起因すると考えられた。

以上の検討結果から、本試薬は従来の測定系に比して 6~10 倍高感度の検出能を有し、HBV 感染のスクリーニング、HBV 感染初期の早期診断、de novo 肝炎での HBs 抗原の早期検出に有用である可能性が示唆された。

索引用語： B型肝炎 HBs抗原 高感度免疫測定 生物発光 BLEIA®

はじめに

B 型肝炎ウイルス (HBV) は、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変および肝癌の原因ウイルスのひとつである¹⁾。B 型肝炎表面抗原 (HBs 抗原) は 1965 年に Blumberg らにより、オーストラリア抗原として発見され²⁾、HBV 感染のマーカーのみならず、輸血用血液のスクリーニング、抗ウイルス薬の有効性の評価や、母子感染の予防的治療にも貢献している。現在の HBs 抗原測定試薬は、感染後に血中の HBs 抗原濃度が検出感度に達するまでの期間 (ウィンドウ期) が長く、この期間を短縮可能な検出法である PCR による HBV-DNA 測定が導入され、ウィンドウ期の短縮が図られた³⁾。しかし、HBV-DNA の測定は、操作が煩雑で熟練した技術若しくは特

殊な設備が必要である上、患者からの採血量が多いことが問題となっている。

また、HBV は逆転写過程を介して増殖するため、変異しやすいウイルスとして知られており⁴⁾、遺伝子型 (genotype) および遺伝子の突然変異によるミュータントが多数存在し、それらに対応していない測定試薬があることが報告されている⁵⁾⁶⁾。

近年、化学療法、免疫療法、移植療法の進歩に伴い、多様な抗がん剤や免疫抑制剤を使用する機会が増加し、HBV の急激な増殖すなわち再活性化により致死的な重症肝炎が発症することが報告されており、HBs 抗原の測定は感染の診断のみならず de novo 肝炎の判定に有用である。そのため「免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策ガイドライン」⁷⁾では、スクリーニングに高感度な測定試薬で HBs 抗原を推奨している。

今回、生物発光を用いた高感度な免疫測定装置 BLEIA®-1200 の専用試薬である BLEIA® ‘栄研’ HBs 抗原 (以下、BLEIA) の基礎的検討および臨床検体を用いて評価を行ったので報告する。

1) 独立行政法人国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター

2) 栄研化学株式会社

*Corresponding author: yatsuhashi@nagasaki-mc.com

<受付日2014年3月24日><採択日2014年7月18日>

対象と方法

1. 対象

長崎医療センターにて診断または治療を受けた患者でインフォームド・コンセントを取得できた B 型肝炎患者 81 例 (急性肝炎 (AH) 症例 1 例, 慢性肝炎 (CH) 症例 44 例, 肝硬変 (LC) 症例 26 例, 肝細胞癌 (HCC) 症例 10 例および治療経過例 10 例 (53 検体)) と非 B 型肝炎患者 80 例 (自己免疫性肝炎 (AIH) 症例 11 例, CH 症例 50 例, 原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 症例 19 例) ならびに栄研化学にてインフォームド・コンセントを取得できたボランティア検体 (健康者) 283 例を対象とした。

2. HBs 抗原の測定

生物発光酵素免疫測定法による HBs 抗原の測定原理は 2 ステップサンドイッチ法を用いた免疫測定法である。標識酵素に使用しているホタルルシフェラーゼは、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の標識酵素に比べ量子効率が高く、ルシフェラーゼ様反応する物質はヒトの検体中には存在しないことから、非特異反応が起こりにくいという特徴がある。

測定方法は、検体中の HBs 抗原を磁性粒子に結合させた 3 種類のモノクローナル抗体を反応させ、未反応物を洗浄により除去した後、ホタルルシフェラーゼ標識したモノクローナル・ポリクローナル抗体混液を反応させ、免疫複合体を形成させる。次に未反応物を除去した後、発光試薬のルシフェリン、ATP、マグネシウムおよび溶存酸素が反応し、HBs 抗原の濃度を反映した発光が得られる。その発光値 (RLU) を用いて予

め既知濃度の HBs 抗原を測定して作成した検量線から検体中の HBs 抗原濃度を求める (Fig. 1, Fig. 2)。

対照法として、アクリジニウム標識の化学発光免疫測定法 (以下, CLIA) とルミスポット '栄研' HBs 抗原 (以下, LS) を添付文書に従い測定した。なお, BLEIA と CLIA の単位は IU/ml で, LS は ng/ml である。

3. 倫理面に関する配慮

本研究は、長崎医療センター、受託研究・治験審査委員会での審査承認および栄研化学社、社内倫理審査委員会に相当する審査手続き承認の後に実施し、個人情報保護に十分注意してデータの解析をおこなった。

結 果

1. 標準曲線および希釈直線性

WHO HBsAg International Standard (00/588, 33 IU/ml) をマルチマーカー陰性コントロール (Accurum 810, SeraCare life Science 社) で希釈して 0.005~3 IU/ml の濃度を作製し、標準曲線の検討を行った。その結果、BLEIA Standard と WHO Standard の濃度と発光値 (RLU) をプロットすると両者は重なった結果が得られ (Fig. 3), WHO Standard の表示濃度に対し、97.0~102.2% の一致率が得られた (Table 1)。

希釈直線性試験は、陽性検体を専用の検体希釈液にて希釈して測定した。その結果、128 倍まで理論値に対して $\pm 20\%$ の範囲内で、低濃度まで良好な希釈直線性が得られた (Table 2)。

2. 市販キットとの相関性

B 型肝炎患者の血清検体を CLIA, LS ならびに BLEIA

Fig. 1 Scheme of HBsAg quantification in BLEIA.

Fig. 2 Assay protocol of HBsAg quantification in BLEIA.

Fig. 3 Standard curves of BLEIA and WHO HBsAg.

を用いて測定した。スケールオーバーした検体は、各々の専用検体希釈液で希釈し測定した。その結果、CLIA に対しては、 $y = 2.773x - 516$ ($n = 94$) と 2 倍以上の値となるが、 $r = 0.983$ と良好な相関性を示した。また、LS

(ng/ml で表示)に対しても単位は違うが、 $y = 2.247x + 660$ ($n = 86$)、 $r = 0.996$ と良好な相関性を示した (Fig. 4)。

3. 治療経過観察例

(1) 急性肝炎症例

急性肝炎症例 (30 歳代女性、Genotype C) の経過症例を測定した結果、BLEIA は HBV-DNA や CLIA と同様な推移を示した。CLIA で感度以下となった 77 日目、92 日目、119 日目の 3 ポイントで BLEIA では陽性となり、HBV-DNA が検出された期間と同じ期間、検出された (Table 3, Fig. 5)。

(2) 治療経過例

当院を受診しエンテカビルを投与した B 型肝炎治療経過観察できた 10 症例 (Genotype C, CH 6 例, LC 4 例, 男 : 女 = 5 : 5, 平均年齢 51 歳) について、BLEIA と CLIA および LS と比較した。その結果、BLEIA

Table 1 Recovery test of the HBsAg using a WHO standard

WHO Standard (IU/ml)	BLEIA (IU/ml)	Recover (%)
0.005	0.0051	102.0%
0.010	0.0097	97.0%
0.030	0.0304	101.3%
0.100	0.1007	100.7%
0.300	0.2975	99.2%
1.000	1.0020	100.2%
3.000	3.0674	102.2%

Table 2 Dilution test of HBsAg

Dilution	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
	IU/ml	%	IU/ml	%	IU/ml	%
1	45.7840	100.0	7.9566	100.0	0.3886	100.0
1/2	22.1320	96.7	3.9877	100.2	0.2016	103.8
1/4	10.4960	91.7	1.9795	99.5	0.1003	103.2
1/8	5.3063	92.7	1.0160	102.2	0.0526	108.3
1/16	2.6553	92.8	0.5142	103.4	0.0261	107.5
1/32	1.3593	95.0	0.2667	107.3	0.0136	112.0
1/64	0.6863	95.9	0.1349	108.5	0.0069	113.6
1/128	0.3489	97.5	0.0701	112.8	0.0035	115.3

Fig. 4 Correlation between CLIA and BLEIA, and LS and BLEIA.

Table 3 Course of acute hepatitis B in a female patient in her thirties

Days	ALT (IU/l)	HBV-DNA (Log copies/ml)	HBsAg				HBc Ab (S/co)	HBs Ab (mIU/ml)
			CLIA (IU/ml)		BLEIA (IU/ml)			
0	12	5.5	1.48	+	2.154	+	0.6	0.0
7	12	5.8	6.36	+	24.815	+	0.4	0.0
13	19	6.3	19.19	+	74.043	+	0.3	0.0
28	16	7.7	827.48	+	2233.430	+	6.6	0.0
35	101	8.7	3274.48	+	15666.350	+	21.1	0.0
42	189	8.8	9193.41	+	41881.250	+	32.7	0.0
57	630	7.9	3739.85	+	9977.350	+	19.1	0.1
65	962	6.1	322.48	+	502.810	+	18.8	0.1
71	1141	4.2	6.93	+	10.729	+	17.2	0.1
77	310	3.5	0.04	−	0.008	+	18.7	0.0
92	24	3.3	0.02	−	0.010	+	19.3	0.0
119	13	2.5	0.01	−	0.017	+	16.9	0.0
177	10	ND	0.01	−	0.001	−	10.3	0.6
268	8	ND	0.01	−	0.001	−	10.6	6.8

ND: not detected

Fig. 5 Course of HBV markers for acute hepatitis B patient.

値はどの症例においても CLIA および LS と同様な推移を示した (Fig. 6).

4. 非 B 型肝炎疾患

CLIA で陰性であった非 B 型肝炎疾患 80 例および健康者 283 例を用いて、陰性分布を評価した。その結果、原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) 1 例を除き、0.005 IU/ml

未満であった (Fig. 7)。

BLEIA 陽性となった PBC 症例 1 例 (80 歳代女性) について、本検討前後に採血された検体を用いて HBs 抗原と他のマーカーを検討したところ、CLIA および HBV-DNA は陰性であったが、BLEIA ではカットオフ付近の値で推移した。なおこの症例の HBc 抗体は陽性

Fig. 6 Clinical courses of HBV markers in HBV-infected patients.

Fig. 7 Distribution of HBsAg concentration among non-HBV infected hepatic disease patients.

Table 4 Retrospective survey of an HBsAg positive primary biliary cirrhosis case

Date	ALT (IU/l)	HBV-DNA (Log copies/ml)	HBsAg				HBc Ab (S/co)	HBs Ab (mIU/ml)
			CLIA (IU/ml)		BLEIA (IU/ml)			
1992/10/15	22	—	<0.05	—	0.002	—	9.8	7.0
1993/1/6		—	<0.05	—	0.001	—		
1994/7/14		—	<0.05	—	0.003	—		
2003/9/8		—	<0.05	—	0.004	—		
2004/2/16		—	<0.05	—	0.003	—		
2005/5/2		—	<0.05	—	0.013	+		
2006/8/24		—	<0.05	—	0.004	—		
2007/1/15		—	<0.05	—	0.004	—		
2008/1/23		—	<0.05	—	0.007	+		
2009/3/5		—	<0.05	—	0.006	+		
2010/1/21	12	—	<0.05	—	0.006	+	9.3	7.0
2010/5/20		—	<0.05	—	0.005	+		
2010/8/19		—	<0.05	—	0.006	+		
2011/1/13		—	<0.05	—	0.006	+		
2011/5/31		—	<0.05	—	0.006	+		

であった (Table 4)。

考 察

今回検討した BLEIA® ‘栄研’ HBs 抗原は、固相に反応効率の良い磁性粒子を用い、さらに標識酵素には量子効率が高く、血清成分の影響を受け難いホタルルシフェラーゼを用いることで従来試薬に比べ高感度な試薬として開発された。本試薬の測定レンジは 0.005～

100 IU/ml で、従来の市販定量試薬より 6～10 倍高感度である。WHO Standard を用いて標準曲線を確認した結果、0.005 IU/ml まで WHO Standard と一致した定量性が得られた。また、専用希釈液による希釈試験では、低濃度まで良好な希釈直線性が得られた。一方、CLIA および LS との相関性は良好であったが、HBs 抗原濃度は CLIA に対して高い傾向にあった。

急性肝炎症例の回復期の 3 ポイントで CLIA と判定

が乖離した結果となったが、HBV-DNA が陽性であり、両測定系間での検出限界の差が判定の差となったと考えられた。

今回、B 型急性肝炎の回復期での両測定系の反応の違いを確認したが、B 型急性肝炎の潜伏期や感染初期、de novo 肝炎の発症前には、まず HBV-DNA が陽転化し、遅れて HBs 抗原が陽性化することが確認されている。従来の測定系よりも 6~10 倍高感度の検出能を有する本測定系を用いることで、これらの病態の早期診断にどの程度、貢献するかは、その時期の検体を用いての検討が必要となるが、Fig. 5 での HBs 抗原量の変化から推定すると、本測定系を用いることで、従来の測定系よりも、少なくとも数日から十数日早く診断ができる可能性がある。

また、非 B 型肝炎患者と健常者を合わせた 363 検体中、PBC 症例 1 検体において判定の乖離が見られた。感度と特異性を検討する為に、その症例の測定ポイントの前後に採血された検体も複数ポイント測定した結果、CLIA および HBV-DNA は全て陰性の結果であったが HBc 抗体が陽性であることから HBV 既往感染例と考えられた。この PBC 症例では、HBV-DNA は継続的に陰性であることから BLEIA による陽転化が真の陽性が偽陽性化なのか現時点では判断できないが、今後の経過観察が必要な症例と考えている。

2000 年以後、国内での B 型急性肝炎患者では、HBV Genotype A の感染者が増加しているが⁸⁾⁹⁾、いくつかの HBs 抗原測定系では、Genotype 間で HBs 抗原の反応性に違いがあることが指摘されている¹⁰⁾。加えて G145R などの変異株を有する HBV キャリアーも存在するが、このような変異に対応していない測定試薬があることも報告されている⁵⁾⁶⁾。本試薬は、固相用抗体に 3 種類のモノクローナル抗体を使用し、また標識抗体にはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を使用しているという。4 種のモノクローナル抗体はそれぞれ別のエピトープを認識し、標識抗体には広い反応性を有しているポリクローナル抗体が使用されている。今回は Genotype および変異株ごとの反応性の違いについては検討していないが、Minekawa らは、本測定系が Genotype 間に差がなく広い反応性を有し、また幅広く変異株も検出していることを確認、報告しており、その点も、本試薬で特記すべき点である¹¹⁾。

結 語

生物発光を用いた免疫測定装置 BLEIA®-1200 と定量

試薬 BLEIA® ‘栄研’ HBs 抗原の基礎的検討および臨床検体を用いてその有用性を検討した。本測定系と試薬は従来の測定系に比して 6~10 倍高感度の検出能を有し、HBV 感染のスクリーニング、HBV 感染初期の早期診断、de novo 肝炎での HBs 抗原の早期検出に有用である可能性が示唆された。

文 献

- 1) 岡本宏明. 肝炎ウイルスの分子医学的研究とその応用. モダンメディア 2009; 55 (2): 28—35
- 2) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “New” Antigen in Leukemia Sera. JAMA 1965; 191: 541—546
- 3) Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. N Engl J Med 1996; 334 (26): 1685—1690
- 4) Okamoto H, Imai M, Kametani M, et al. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. Jpn J Exp Med 1987; 57 (4): 231—236
- 5) Coleman PF. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. Emerg Infect Dis 2006; 12 (2): 198—203
- 6) Louisirirothanakul S, Khupulsup K, Akraekthalin S, et al. Comparison of the technical and clinical performance of the Elecsys HBsAg II assay with the Architect, AxSym, and Advia Centaur HBsAg screening assays. J Med Virol 2010; 82 (5): 755—762
- 7) 坪井博仁, 熊田博光, 清沢研道, 他. 免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎対策. 肝臓 2009; 50: 38—42
- 8) Tamada Y, et al. Hepatitis B virus strains of sub-genotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. Gut 2012; 61: 765—773
- 9) 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 2009; 47 (5): 1476—1483
- 10) Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, et al. Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV). J Virol Methods 2006; 136: 254—256
- 11) Minekawa T, Takehara S, Takahashi M, et al. De-

velopment of a Highly Sensitive Bioluminescent
Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Virus Sur-
face Antigen Capable of Detecting Divergent Mu-
tants. Clinical and Vaccine Immunology 2013; 20:

1255—1265

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

Utility of HBsAg measuring system by BLEIA®-1200, a highly sensitive immunoassay system

Hiroshi Yatsuhashi^{1)*}, Mika Nakamura¹⁾, Yuki Kugiyama¹⁾, Ryu Sasaki¹⁾, Shigemune Bekki¹⁾,
Satoru Hashimoto¹⁾, Sung-Kwan Bae¹⁾, Masashi Otani¹⁾, Akira Saeki¹⁾, Shinya Nagaoka¹⁾,
Atsumasa Komori¹⁾, Seigo Abiru¹⁾, Takayuki Minekawa²⁾, Michinobu Kamiyama²⁾, Hiroshi Okuma²⁾

The utility of BLEIA®-1200, an immunoassay system which performs highly sensitive measurement using bioluminescence and its dedicated reagent BLEIA® 'Eiken' HBsAg were reviewed. The detection limit was 0.005 IU/ml which was 6 to 10 times higher in sensitivity than the conventional quantitative reagents. The correlation with chemiluminescent immunoassay (CLIA) was favorable with $r=0.983$, and parallel shifts were seen in treatment progress. In acute hepatitis B infection, BLEIA® showed positive result as long as HBV-DNA was positive even after CLIA became negative. Although one case in CLIA negative non-B hepatitis patients gave a discrepant result in BLEIA®, it was determined as a case of previous HBV infection since HBcAb was positive. This discrepancy may have been due to the difference in reagent sensitivities.

BLEIA® reagent's utility is suggested in screening for HBV infection, early diagnosis in early phase in HBV infection, early detection in de novo hepatitis infection.

Key words: hepatitis B HBsAg high sensitive immunoassay bioluminescence BLEIA®

Kanzo 2014; 55: 521—529

---

1) Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagasaki Medical Center

2) Eiken Chemical Co., Ltd

*Corresponding author: yatsuhashi@nagasaki-mc.com