耳朶および歯肉穿刺法による HBs 抗原の検出法について

西 沢 光 生 中 川 清* 浅 野 正 男 佐 藤 正 俊
大 島 基 嗣 西 原 英 志 高 橋 利 次 斎 藤 毅

日本大学歯学部保存学教室

(主任：斎藤 毅教授)

* 日本ラジオアッセイ研究所

(昭和 62 年 1 月 7 日受付)

A Laboratory Study of HBsAg Detection Using Punctured Blood on Gingiva

Teruo NISHIZAWA, Kiyoshi NAKAGAWA, Masao ASANO, Masatoshi SATO,
Mototsugu OSHIMA, Hideshi NISHIHARA, Toshiji TAKAHASHI and Tsuyoshi SAITO

Department of Endodontics, Nihon University School of dentistry, * Nihon Radio assay laboratory
(Chief : Prof. Tsuyoshi SAITO)

Saliva and blood transmission are of particular interest to dental personnellas much of the workday is spent with the hands in contact with saliva and blood of patients.

It is important thing to detect patients who have HBV, however the medical histories do not reveal all carrier of HBV and serologic tests are not possible on all patient especially at dental clinic.

The purpose of this study is to estimate simplified detective method that samples are obtained from gingival and lobed blood using puncture and paper filter.

The detection is made by demonstrating the presens of HBsAg using R.P.H.A. analytical method, and the

results of blood samples were compared with serological result.

Twenty-two persons containing two HBsAg apsiative patients were carried out. And additional three positive patients were used for qualitative study.

Results are follows.

1. It is nessesary over five hours to desolve out HBsAg from paper filter, which contains punctured blood and has dried off at room temperature.

2. There is not any difference in quantitative detection of HBsAg among three samples namely serous, lobed and gingival blood.

3. There is little difference in qualitative detection (antigen value) between serous and gingival blood.

Key words : HB hepatitis, HBs antigen, Human serum, R.P.H.A. test, Gingival blood

要旨：歯科診療に関連する一連の処置は、血液や唾液を排除しての診療は不可能であり、歯科に来院する患者からの感染については十分な注意と予防が必要である。現在行われている HBs 抗原検出検査は、通常 R.P.H.A. 法を用いた血清検査であるが、静脈血の採血は歯科外来での応用には抵抗があるようである。

そこで本研究では、歯科外来で実施できる HBs 検出法として耳朶および歯肉穿刺口紙血を応用し検出法を検討した結果、次の結論を得た。

1. 口紙に吸着乾固させた血液を用い、その溶出液について R.P.H.A. 法に準じた検査方法で HBs 抗原の検出を行うことが可能であり、口紙血の溶出に 5 時間が必要であった。

2. HBs 抗原陽性者 2 名を含む 22 名について、耳朶および歯肉から採取した口紙血法と従来の血清法とを定性的に比較した結果、全例で一致した。

3. 定量検査をして口紙血を応用し HBs 抗原価の測定を行った結果、血清法と同様に測定が可能であった。

索引用語：HB 肝炎，HBs 抗原，HBs 抗原価，R.P.H.A. 法，歯肉穿刺血

緒 言

HBs ウィルスの保有者調査報告によると、医療関係者の肝炎罹患者は基礎系より臨床系にはるかに高く、歯科医師の罹患率は抗原と接触の機会が多い外科系医師と同様に高い傾向にあることが知られている¹⁾。

一般に歯科の臨床に於ては口腔内でエアースリンジやエアータービン等の切削器具を用いる為に、感染源としての唾液や血液を排除しての治療は難しく、一連の歯科治療行為に伴って医療従事者への感染の危険度は著しく高いものとなっている。そこでこの感染の危険性を取り除く為には、まず感染源を認知することが重要なポイントとなってくる^{2,3)}。日本歯科病院における HBs 抗原の認知システム⁴⁾は、まず、外来患者について問診により肝炎の疑いのある患者を抽出し、当該患者に対して中央検査室において静脈血より採取した血液について HBs 抗原ならびに関連の検査を行っている⁵⁾。すなわち、このシステムでは主に問診によって肝炎の疑いがある特定の患者に対し検査が実施されるもので、その他大多数の患者については知る方法がない。一方 HBs 抗原の検査を初め通常の臨床検査は、大学病院またはそれに準ずる大病院以外の診療所においては、繁雑さと歯科診療上という事由もあって、採血を含む一連の検査法がほとんど実施されていないのが現状である。そこで今回著者らは、その試料の採取方法ならびに検査方法の簡略化を目的として一般の歯科臨床でも簡便に採用できる一連の検査法を開発することを意図し、歯科臨床で患者の抵抗が少ない歯肉穿刺法により得られた血液を口紙に吸着させ、その微量の血液について含まれる HBs 抗原を検出し、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験対象：日本大学歯学部 臨床実習生 153 名について、それぞれ上膊正中静脈血 5ml を採血し、この血清を R.P.H.A. 法^{6,7)}によって HBs 検査を行った結果、抗原陽性者 2 名を検出した。

本研究では、この抗原陽性者 2 名に陰性の実習生 20 名を加え、合計 22 名を実験対象とした。さらに口紙吸

図 1 PKU 先天性代謝異常検査用口紙

着血からの溶出時間および口紙血の保存性試験については上記抗原陽性者 2 名の他に抗原価の異なる HBs 抗原陽性者 3 名を加え、合計 5 名の抗原陽性者を実験に供した。

穿刺血採血用口紙：穿刺血の採血に使用した口紙は、甲状腺機能異常等の代謝異常のマスクリーニングに耳朶からの血液採取用として使用されている P.K.U. 先天性代謝異常検査用口紙（東洋口紙社製、以後口紙と略す）で、この口紙を図 1 に示すようにスティックとし、ホルダー部にビニールコートをして利用した。

HBs 抗原検出試薬：HBs 抗原の検出^{8,11)}は R.P.H.A. 法に準じセロディア HBs 検出キット（富士レボ社製 No. 817259、以下セロディアキットと略す）を使用した^{9,10)}。

2. 実験方法

(1) 採血法

まず対象者の上膊静脈血 5cc を採取し、R.P.H.A. 法の通法に従い、血清を HBs 抗原検査に供した。次いで、同一被検者の耳朶および歯肉にランセットを使用して出血させ、この血液を用意した口紙に吸着させ、以下の方法で処理し HBs 抗原の検査に供した。すなわち、血液を吸着させた口紙は、室温に放置、乾燥後、この口紙の血液吸着部を $\phi 4.2\text{mm}$ のパンチャー（三光医理化学株式会社製）で打ち抜き検査試料とした。口紙に吸着した血液量は、松本¹¹⁾によると $\phi 4.2\text{mm}$ の打ち抜き口紙 1 枚からの血清抽出量は H・T 40% の場合で、 $2.84 \pm 0.08\ \mu\text{l}$ との報告がされている。したがって希釈液 $100\ \mu\text{l}$ に口紙 2 枚を浸漬した溶液を用いると、HBs 抗原検出時の最小希釈血球倍数である 40 倍に近似するので、本研究では $100\ \mu\text{l}$ に $\phi 4.2\text{mm}$ の口紙 2 枚を用いることとした（図 2）。

(2) HBs 抗原の検出ならびに抗原価の測定法

まず静脈血の血清ならびに口紙血（全血）について抗原を検出した。

静脈血より得られた血清については通法通り、HBs 抗原検出にはセロディアキットを用い使用指示書に従っ

た。すなわち、血清検体をキッド内の血球希釈液で20倍に希釈し、その中から検査試料として25 μ lを採り、マイクロプレート上に滴下、抗体感作血球を含む溶液25 μ lを加えて反応させ、HBs抗原の検定は沈降反応を $\pm$ ・ $\pm$ ・ $\pm$ の3段階に分けて判定した。

さらに抗原陽性の場合には新たに20倍希釈の血清試料を25 μ l採り、血清希釈液で順次希釈倍を調整し、半定量試験に供した。すなわち、定性反応と同様に抗体感作血球を含む溶液25 μ lを各々の希釈倍した溶液に加え、逆受身凝集反応が起こらなくなるまで続け、その陽性の

図2 ロ紙吸着試料と $\phi 4.2$ mmパンチャーで2枚打ち抜き、試験管に100 μ lの血球希釈液を加え打ち抜いたのロ紙2枚投入する

表1 R.P.H.A. 法によるHBs抗原力価測定

検体 (N)	HBs 抗原力価
1	5120
2	2560
3	1280
4	320
5	40

表2 ロ紙血の経時的安定性試験

日数 検体 (N)	1	3	5	10	20	30	60	180
1	5120	5120	5260	5120	5120	5120	5120	1280
2	2560	2560	2560	2560	2560	2560	640	80
3	1280	1280	1280	640	1280	1280	640	40
4	320	320	320	320	320	320	80	40
5	40	40	40	40	40	40	40	—

限界点の希釈倍数を抗原力価とした。

ロ紙の場合、まず松本の方法に準じ血清希釈液100 μ lに $\phi 4.2$ mmのロ紙血2枚を投入し、キャップを閉めて外気を遮断して5時間放置して血液を溶出させた溶液を試料とした。次いで試料25 μ lを採り、血清の方法と同様にセロディアキットで反応させた。

(3) ロ紙血抽出試験

(本実験に先立ち)ロ紙ディスクに吸着した血液(以後ロ紙血と略す)の溶出に要する時間を検討した。すなわち、既知HBs抗原陽性者5名の静脈血をロ紙に吸着させ室温乾燥させた。次いでこのロ紙を1日放置後、 $\phi 4.2$ mmに打ち抜き、このディスク血2枚を希釈液100 μ lに浸漬し、1, 2, 3, 5, 12および24時間室温に放置後、抽出液について前項の条件に従って抗原の検出を行い、陽性のものについてはさらに抗原力価を求めた。

(4) 経時的安定性試験

ロ紙に吸着させた試料の経時的安定性を検討する目的で、ロ紙に吸着させた静脈血を1日、3日、5日、10日、20日、30日、60日、120日および180日まで室温で保管

図3 ロ紙吸着試料からのHBs抗原溶出時間

表 3 血清法とロ紙血法による抗原力価の測定

検 体 抗原力価(希釈倍数)		1	2	3	4	5
40	血 清	+	+	+	+	+
	ロ紙血	+	+	+	+	+
80	血 清	+	+	+	+	-
	ロ紙血	+	+	+	+	-
160	血 清	+	+	+	+	-
	ロ紙血	+	+	+	+	-
320	血 清	+	+	+	+	-
	ロ紙血	+	+	+	+	-
640	血 清	+	+	+	-	-
	ロ紙血	+	+	+	-	-
1280	血 清	+	+	+	-	-
	ロ紙血	+	±	±	-	-
2560	血 清	+	+	-	-	-
	ロ紙血	±	±	-	-	-
5120	血 清	+	-	-	-	-
	ロ紙血	±	-	-	-	-

+ : HBs 抗原陽性
 ± : HBs 抗原疑陽性
 - : HBs 抗原陰性

した後、前項の方法で12時間抽出させた血球希釈液について抗原価をR.P.H.A.法で測定した。

(5) 耳朶、歯肉ロ紙吸着試料の抗原検出法

従来の血清によるHBs抗原検出およびロ紙血の方法として耳朶および歯肉ロ紙血の抗原検出性を同一マイクロプレート上で比較検討する目的で、2名の陽性者を含む22名の被検者について、2枚のマイクロプレートを使用し、静脈血による血清と同1人の歯肉および耳朶血をランセットで穿刺し、これをロ紙吸着血とし、それぞれ第1項および第2項の方法に従って測定した。

成 績

1. 153名の静脈血を用いたR.P.H.A法によるHBs抗原陽性者2名および既知HB抗原陽性者3名の抗体価は表1に示した。

2. ロ紙血からのHBs抗原溶出時間

図3に示す様に、HBs抗原陽性者血液のロ紙からの溶

表 4 耳朶および歯肉穿刺血吸着法と血清法との比較

No.	血清	耳朶	歯肉	No.	血清	耳朶	歯肉
1	-	-	-	12	-	-	-
2	-	-	-	13	-	-	-
3	-	-	-	14	+	+	+
4	-	-	-	15	-	-	-
5	-	-	-	16	-	-	-
6	-	-	-	17	-	-	-
7	+	+	+	18	-	-	-
8	-	-	-	19	-	-	-
9	-	-	-	20	-	-	-
10	-	-	-	21	-	-	-
11	-	-	-	22	-	-	-

+ : HBs 抗原陽性
 - : HBs 抗原陰性

出時間は、定性反応に当る40倍希釈溶液は1時間で全例が陽性となり、その後序々に上昇を示し、3時間から5時間で最高値を示した。ロ紙血からのHBs抗原抽出に必要な反応時間は5時間以上が適当であった。

3. ロ紙吸着血液の保存安定性試験

試料の安定性試験の成績を表2に示した。表から明らかな様に抗原価は30日間ほぼ一定であり、以後、経時的に抗原価が低下し180日間で活性値は1/3に低下した。

4. ロ紙血による検出感度

HBs抗原患者5名についての静脈血で、従来の血清法とロ紙血法とを比較した抗原価の結果を表3に示した。高希釈倍で±、+との1管差程度の僅差であり、低希釈倍では一致例が多くみられ両法はほぼ同様の成績がみられ、ロ紙血による半定量法としての応用も可能であった。

5. 耳朶ロ紙血および歯肉ロ紙血の比較

耳朶および歯肉からのロ紙血によるHBs抗原の検出成績は、血清における定性反応と一致した(表4)。

考 察

肝炎ウィルスは、A型肝炎・B型肝炎と非A・非B型肝炎の3種類に分類されている^{12,13)}。B型肝炎ウィルスは、主として血液を媒体として感染するが、この他抗原保有者の尿・唾液・胆汁・糞便などにも存在することが

知られている¹⁴⁾。この為、歯科診療に関連する観血処置は勿論、唾液を排除しての歯科治療を実施する事は不可能であり、歯科に来院する患者からの感染については十分な注意と予防が必要である¹⁵⁾。すなわち、歯科医療に従事する医師および従業員は、HB 抗原と接する危険性は非常に高いと考えられている¹⁶⁾。HB ウィルスについての研究は多くなされており、その本態について次々と明らかにされているが、医療機関における認知システムは疑わしい患者についての血液検査によって初めて検出されるにすぎない⁴⁾。特に観血処置の多い歯科の医療内での認知システムは、未だ確立されていないのが実状である。また、歯科外来での静脈血の採血は、患者にとっても術者にとっても抵抗があり、現段階では臨床検査施設を有する大病院のみで行われており、一般開業医での HB 抗原検出はほとんど行われていないのが実状である。

そこで簡便な検査法が待たれるところであり、特に口腔内からの検体の採取で実施できれば、多くの歯科医師にとって福音となるものと思われる。そこで著者らは、口紙に吸着した程度の微量の血液によって HBs 抗原の検出法として耳朶穿刺血を試料とし、同時に歯肉穿刺血について検討を加えた。

現在、臨床検査法として利用されている検出法は、血清中に含まれる HBs 抗原検出法として、RIA 法より R.P.H.A 法が操作性、再現性が優れている¹⁰⁾ ことから(普及しており)著者らは、この R.P.H.A 法を準用した。

すでに微量の血液の採取法としては、口紙吸着血を用いられているが、この口紙として PKU 甲状腺代謝異常検査用口紙を使用した。著者らはこの口紙採血法の簡便さに着目し、これに若干の改良を加え、耳朶および歯肉からの採血を行った。特に歯肉から採血時には、蛋白が阻害因子になり得ることから、唾液の混入を極力避けて試料採取を行った。すなわち唾液の試料採取時には口内洗浄、簡易防湿を注意して行った。

耳朶および歯肉から採取した口紙血を用いた HBs 抗原検出法と従来の血清法を 22 名について比較検討したが、定性反応で 2 名の HBs 陽性者を同一マイクロプレート上で検査した結果、口紙血法と血清法共に同一の成績が得られた。口紙について、松本らによると口紙に吸着する血液量は、 $\phi 4.2\text{ mm}$ のパンチャーで打ち抜いた場合、口紙 1 枚からの血清抽出量は H.T. 40% の場合で、 $2.84 \pm 0.08\text{ }\mu\text{l}$ であり、R.P.H.A 法による血清希釈液を考慮した場合、HBs 抗原の最小希釈倍数である 40 倍が指示されており、これに相当する濃度として $100\text{ }\mu\text{l}$ の血清

希釈液に口紙 2 枚を投入し、抽出することが適当と考えられた。その結果、血清法とほとんど同じレベルで検出することができた。

口紙に吸着させ乾燥した試料の安定性試験で、約 3 ヶ月は検査可能であることから、医療機関と臨床検査施設などの距離が離れている場合でも簡封を用いた郵送手段により 郵送された試料について HBs 抗原の検出が可能であり、一般開業医のレベルでの HBs 抗原の認知が可能となり、十分臨床応用価値があるものと思われる。

さらに抗原力価を求めた場合についても、高希釈倍数で 1 管差という僅差であることから、口紙血を応用した HBs 抗原検出法は半定量検査も可能であった。しかし、本法は全血を用いているために、血清法に比べ反応液がやや赤色が強く、定量上の判定にやや難点があるものの低希釈倍での判定は容易であり、HBs 抗原スクリーニング法としては十分に臨床応用が可能な方法であると考ええる。

本法は、歯科診療行為の延長として容易に実施できる歯肉穿刺法により得られた口紙血から HBs 抗原を検出する簡便法であり、血清法に比べて損色ない検出性として認められた。これを歯科外来患者に応用した場合、医療従事者の健康管理、院内感染防止に対する有用性は高いものであり、さらには、疫学調査への応用も考えられる新しい方法として臨床応用が待たれるものである。

結 論

歯科臨床における簡便な HB 抗原検査法として、歯肉穿刺血の口紙吸着血を試料として R.P.H.A 法に準じて HBs 抗原の検出を行い検討した結果、次の結論を得た。

1. 口紙に吸着した血液を用い、R.P.H.A 法に準じて検査を行った結果、HBs 抗原の検出が可能であった。
2. 口紙に吸着した試料からの溶出には 5 時間以上を要し、また、乾燥口紙血は 30 日間、安定な成績であった。
3. 耳朶および歯肉から採取した口紙血法と従来からの血清法について HBs 抗原検出検査を行った結果、定性反応として全例一致した。
4. 定量検査として抗原価の異なる HBs 陽性静脈血を用い、口紙に吸着させた血液から抗原価を求めた結果、希釈倍数の低い(低い抗原価)場合は血清法と一致し、希釈倍数の高いもの(高い抗原価)で 1 管差という僅差であり、口紙血を用いた方法でも十分に HBs 抗原力価を求めることができた。

文 献

- 1) 厚生省肝炎研究連絡協議会：B型肝炎医療機関院内感染対策ガイドライン，初版，文光堂，東京，1982，4～7.
- 2) 厚生省肝炎研究連絡協議会：HBs 抗原の知識，2版，文光堂，東京，1986，1～13.
- 3) 久野吉雄：B型肝炎の臨床．日本歯科医師会雑誌，32：244～247，1979.
- 4) 斎藤 毅，工藤逸郎，森谷良彦，青島 健，杉浦正己：特殊感染対策ガイドライン，日本大学歯科病院院内感染対策委員会，3～7，1986.
- 5) 臨床検査医学事典編集委員会：臨床検査医学事典，3版，朝倉書店，1982，183～215.
- 6) 小松文夫，吉川昭美，矢野節子，佐藤ヒロミ，須田真由美，松田実枝子，武田重五郎：セロディアHBs法によるHBs抗原の検出率について．臨床検査：21巻：28-30，1977.
- 7) 市田文弘，河合 忠，川名林治，喜多村勇：慢性肝疾患の管理と指導．日本歯科医師会雑誌，92：168-175，1984.
- 8) 市田文弘：ウィルス肝炎：Virus Hepatitis，中尾享，川名林治，喜多村勇編，感染と臨床免疫学の進歩，近代出版，東京，1978，73-110.
- 9) 辻 好克：B型肝炎の抗原と抗体の検査法．臨床とウィルス，6：28-29，1978.
- 10) 西岡久寿弥：免疫学よりみた原発性肝癌の病因としてのHB抗原の可能性．日本臨床，32：60-63，1974.
- 11) 松本 勝，村田光範：乾燥ロ紙血法によるTBG測定，医学と薬学，8：828-832，1982.
- 12) George, S.S. : Oral Microbiology and infectious disease, Waverly Press, Baltimore, 1980, 413-420.
- 13) Harriet, S. G., Kenton, S. H., and Jacqueline, M. : Occupational hazards in dentistry, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1984, 50-59.
- 14) Stephen, T. S., Robert, C. F., Leslie, F. : Principles and practice of oral medicine, W.B. Sande Company, Philadelphia, 1984, 260-266.
- 15) 青山友三，市田文弘，志方俊夫，初谷宏一：歯列におけるウィルス性疾患の予防，クインテッセンス出版，東京，1985，72-116.
- 16) 久野吉雄：B型肝炎—その実態と対策，園山 昇，長田 保，小倉保己編 歯科における感染防止対策，医歯薬出版，東京，1983，79-98.