

高感度 HBsAg 測定試薬の改良による偽陽性抑制効果の検討

¹⁾ 札幌医科大学附属病院 検査部, ²⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座, ³⁾ 同 腫瘍内科学講座米澤 仁¹⁾ 田中 信悟¹⁾²⁾³⁾ 八鍬 佑貴¹⁾ 高橋 聡¹⁾²⁾

(令和元年 5 月 16 日受付)

(令和元年 10 月 16 日受理)

Key words: HBs antigen, high sensitivity, false positive

要 旨

近年、高感度 HBs 抗原測定試薬が開発され、その有用性が報告されている。しかし、その高感度化の弊害として特異性の低下（偽陽性）が危惧されている。偽陽性を避けるため、低値陽性例には HBs 抗体を用いた抑制試験でその真偽を確認することが推奨されているが、実施している施設は多くない。従って、高感度 HBs 抗原測定試薬を導入しているが抑制試験を実施していない施設では、HBs 抗原偽陽性例が増加している可能性がある。2018 年 4 月、特異性の向上を目的として高感度 HBs 抗原測定試薬「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」の改良が行われた。今回、本試薬の性能について検討を行ったので報告する。

対象は改良前「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」にて偽陽性と判定された 7 検体とした。本検討における偽陽性の基準は「HBs 抗原定量値がカットオフ（0.005IU/mL）以上かつ抑制試験にて陰性」とした。測定には全自動化学発光酵素免疫測定システム「ルミパルス L 2400」を使用した。

改良後試薬を用いて HBs 抗原値を測定した結果、改良前試薬で偽陽性とされた 7 検体中 5 検体で HBs 抗原はカットオフ値（0.005IU/mL）未満であった。検出限界は 0.0015IU/mL であり、改良前と比較して同等であった。偽陽性の原因として非特異反応の可能性について検討したところ、標識アルカリフォスファターゼに対する非特異反応と考えられる検体を認めた。改良前試薬での測定期間における月別偽陽性発生率は平均 0.26% であったが、改良後試薬へ移行後は平均 0.09% と低下傾向を認めた。

以上から、改良後「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」を用いることで偽陽性率の低下が期待でき、抑制試験数および偽陽性の「誤報告」を減少できる可能性がある。

〔感染症誌 94 : 97~101, 2020〕

序 文

HBs 抗原（Hepatitis B virus surface antigen）は B 型肝炎ウイルス（HBV）の外被（エンベロープ）に存在する抗原である。血中にはウイルスの本体である Dane 粒子のほかに HBV 不完全粒子（中空粒子）、小型球形粒子、桿状粒子が存在し、いずれも肝細胞内の covalently closed circular DNA（cccDNA）から産生され、表面に HBs 抗原を有する¹⁾。従来、HBs 抗原の測定には定性試験が行われ、HBV 感染の診断のみに用いられてきたが、近年複数の高感度定量試薬が開発され、予後や治療効果判定、さらに HBV 再活性化予防における有用性が報告されている²⁾。

以上のように、高感度 HBs 抗原測定の重要性は増

しているが、その高感度化の弊害として特異性の低下（偽陽性）が危惧されている。偽陽性を避けるため、低値陽性例には HBs 抗体を用いた抑制試験でその真偽を確認することが推奨されているが、実施している施設は多くない。従って、高感度 HBs 抗原測定試薬を導入しているが抑制試験を実施していない施設では、HBs 抗原偽陽性例が増加している可能性がある。また、抑制試験を実施している施設でも繰り返し HBs 抗原の測定を行う必要があるため、費用の面で負担となっている。

「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」は従来の約 10 倍高感度の HBs 抗原定量試薬とされ、これまで数多くの臨床的有用性が報告されている^{3)~8)}。しかし、他の高感度 HBs 抗原測定試薬を含めても、高感度化によって危惧される特異性の低下や偽陽性の増加に主眼をおいた報告は少ない。2018 年 4 月、特異性の向上

別刷請求先：(〒060-8543) 北海道札幌市中央区南 1 条西 16 丁目 291
札幌医科大学附属病院検査部 米澤 仁

を目的とした「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」の改良が行われた。本試薬の性能について改良前試薬との比較を含め、検討を行ったので報告する。

対象と方法

1. 対象

2016年7月から2018年4月までの間に、札幌医科大学附属病院検査部へHBs抗原測定依頼のあった検体から、改良前「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」にて偽陽性と判定された7検体を使用した。本検討における偽陽性の基準は「HBs抗原定量値がカットオフ(0.005IU/mL)以上かつ抑制試験にて陰性」とした。

本検討は札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会の承認を得て実施した(整理番号:302-107)。

2. 測定試薬, 測定機器

HBs抗原の測定について、試薬は「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」(富士レビオ株式会社)を用い、測定は全自動化学発光酵素免疫測定システム「ルミパルス L 2400」(富士レビオ株式会社)を使用した。「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」は特異性の向上を目的に2018年4月に改良が行われ、当院では2018年5月から日常検査において改良型を使用している。

HBs抗体の測定は「ルミパルスプレスト HBsAb-N」(富士レビオ株式会社)を使用し、10.0mIU/mL以上を陽性と判定した。HBc抗体の測定は「ルミパルス

プレスト HBcAB-III」(富士レビオ株式会社)を使用し、1.0 C.O.I.以上を陽性と判定した。

3. HBs抗体を用いた抑制試験

当院では「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ」の定量値で0.005~1.000IU/mLの検体については全例で抑制試験を実施している。試薬は「HBsAg-HQ 抑制試薬」(富士レビオ株式会社)を用い、添付文書⁹⁾に従い検体に10分の1量のHBs抗体液と対照液を加えたものを用意し、30分インキュベートした後にそれぞれの値を測定した。抑制率が50%未満の検体を陰性と判定した。

4. 検出限界

「ルミパルスプレスト HBsAg-HQ 用キャリブレーション」(富士レビオ株式会社)を専用希釈液で10段階希釈後、10重測定し2SD法で検出限界を求めた。

5. 吸収剤添加試験

吸収剤には不活化アルカリフォスファターゼ(ALP)を用いた。検体200μLに吸収剤と対照液を15μL添加・混和し、3,000rpmで10分間遠心後にそれぞれの値を測定した。

成 績

1. 改良後試薬での測定値の分布 (Fig. 1)

改良後試薬で検体を測定した測定値の分布を示す。0.01IU/mL以下は3,854例であり0.1IU/mL以上は211例であった。また、そのほかの陰性の範囲、0.005IU/mLから0.1IU/mLまでの低値陽性の範囲の分布は少数であった。

2. 各検体のHBVマーカーと抑制試験の結果 (Table 1)

改良前試薬で偽陽性と判定された7検体のHBs抗体、HBc抗体を測定した。No.3とNo.5でHBs抗体、HBc抗体ともに陽性であった。抑制試験では全検体で抑制率が50%未満であり陰性と判定した。

3. 改良前と改良後試薬によるHBs抗原値の比較 (Table 1)

上記7検体に対して、改良後試薬を用いてHBs抗原値を測定した。7検体中5検体でHBs抗原はカッ

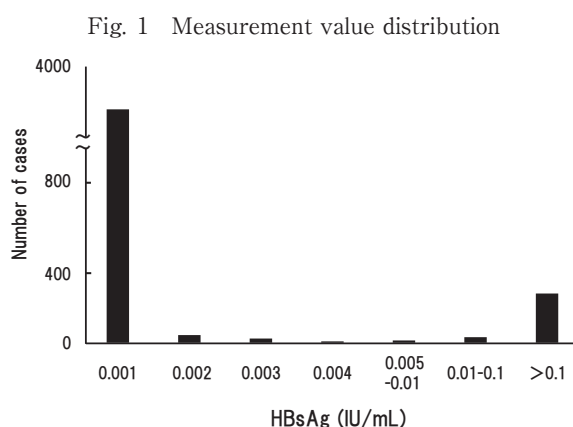


Table 1 The value of the HBV markers and the inhibition test

No.	HBsAg-Old (IU/mL)	HBsAb (mIU/mL)	HBcAb (C.O.I.)	inhibition rate (%) *	HBsAg-New (IU/mL)
1	0.006 (+)	0.1 (-)	0.1 (-)	0	0.002 (-)
2	0.044 (+)	0.1 (-)	0.1 (-)	7.5	0.002 (-)
3	0.010 (+)	463.2 (+)	21.3 (+)	0	0.001 (-)
4	0.006 (+)	5.0 (-)	0.3 (-)	0	0.003 (-)
5	0.008 (+)	135.4 (+)	129.0 (+)	0	0.009 (+)
6	0.014 (+)	1.0 (-)	0.1 (-)	0	0.002 (-)
7	0.330 (+)	0.1 (-)	0.1 (-)	5.7	0.133 (+)

* When the inhibition rate was less than 50%, the test was determined to be negative.

トオフ値 (0.005IU/mL) 未満であった。

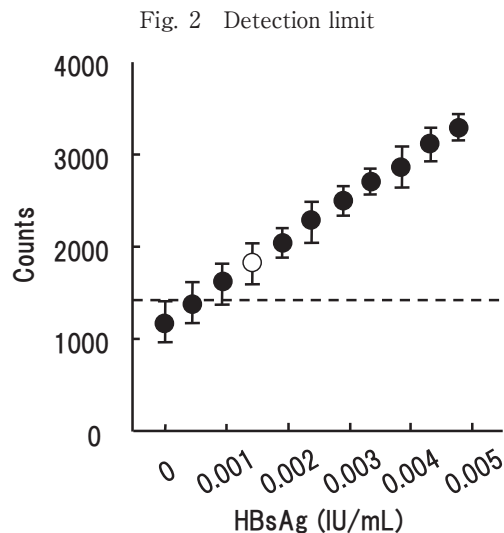
4. 検出限界 (Fig. 2)

0.0015IU/mL まで検出可能であった。

5. 吸収剤添加による解析 (Table 2)

改良後試薬においても陽性と判定された2検体 (No.5, No.7) および日常検査を改良後試薬へ移行後に偽陽性と判定された1検体 (No. 8) の計3検体について、非特異反応の可能性を検討した。No.7では対照が0.044IU/mLであるのに対し、不活化 ALP の添加により 0.028IU/mL と明らかな測定値の低下を認め、標識 ALP に対する非特異反応と考えた。No.5 と No.8 については、不活化 ALP 添加により測定値の低下を認めたが、対照との差はわずかであり、ALP ではない他の要因の影響と考えられた。

6. 月別偽陽性発生率 (Fig. 3)



日常臨床における改良後試薬の偽陽性抑制効果について検討するため、月別の偽陽性発生率を解析した。改良前試薬での測定期間 (2016 年 7 月～2018 年 4 月) における月別偽陽性発生率は平均 0.26% であったが、改良後試薬へ移行後の 2018 年 5 月からは平均 0.09% と低下傾向を認めた。

考 察

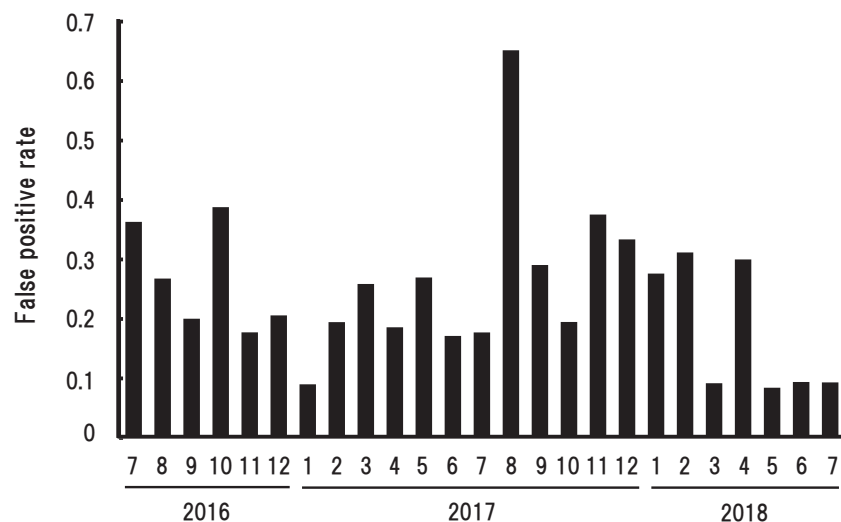
HBs 抗原検査は専門科に関係なく、入院時や手術前のスクリーニング検査として高頻度に行われている検査の1つである。肝疾患を専門としない多くの医師は HBs 抗原検査において陽性結果が報告された場合、HBs 抗原の定量値や測定試薬の種類 (カットオフ値) にかかわらず HBV 感染者と判断し、被検者本人にその説明をする場合が多いと思われる。本人が誤って B 型肝炎と思い込むことは容易に想像され、その後の QOL や人生計画に影響を及ぼす可能性がある。従って、HBs 抗原検査において偽陽性をなくすることは非常に重要であり、対策は急務と考えられる。

本検討では高感度 HBs 抗原測定試薬「ルミバルス HBsAg-HQ」改良前後の試薬を用いて同一検体の HBs 抗原値を測定し、偽陽性の発生について比較を行った。改善前試薬で偽陽性と判定された7検体中5検体で改

Table 2 The alterations in HBsAg value by addition of inactivated alkaline phosphatase (ALP)

No.	HBsAg-New (IU/mL)	inactivated ALP (IU/mL)	blank (IU/mL)
5	0.009	0.004	0.006
7	0.133	0.028	0.044
8	0.027	0.017	0.010

Fig. 3 Monthly false positive rate



善後は HBs 抗原値がカットオフ未満（陰性）と判定された（Table 1）。以上の結果から、試薬の改良により偽陽性の発現を抑制できる検体があることを確認できた。

次に、この陰性化の要因が改良後試薬の感度低下でないことを証明するため、検出限界について解析した（Fig. 2）。結果は 0.0015IU/mL であり、これまで同試薬で報告されてきたものと同等であった^{6)~8)}。改良後試薬のカットオフ値も改良前同様に 0.005IU/mL で設定されていることから、今回の改良は十分な感度を維持しながら、偽陽性検体の減少が期待できるものと考ええる。

改良後試薬でも偽陽性と判定された 3 検体について、標識物質として使用されている ALP に対する非特異反応の可能性を考え、不活化 ALP を添加して解析を行った（Table 2）。その結果、3 検体中 1 検体で ALP に対する非特異反応と判断できた。HBs 抗原測定時における非特異反応の原因として、インフルエンザワクチン接種後¹⁰⁾¹¹⁾、抗核抗体高値¹¹⁾および副甲状腺腺腫症例での腫瘍随伴症候群¹²⁾などの報告がある。不活化 ALP 添加においても HBs 抗原の低下を認めなかった 2 症例について、採血時に何らかの非特異反応を惹起する状態であったかについては確認できなかった。

本検討では改良前試薬で偽陽性検体のみを使用したため、陰性検体についての検討は実施されていない。改良前試薬で陰性と判断された検体の中にも改良によって偽陽性化する可能性が考えられる。そこで、月別の偽陽性発生率を調査して、実際に改良によって偽陽性抑制効果が得られたのかを検討した（Fig. 3）。改良前試薬で測定を開始した 2016 年 7 月から、改良後試薬に移行する 2018 年 4 月までは月別の偽陽性発生率が平均 0.26% 認められた。それに対し、改良後試薬に移行後の 2018 年 5 月からは平均 0.09% となり、今回の試薬改良による偽陽性抑制効果が確認できた。しかしながら、今回の改良でも偽陽性を完全に防ぐことはできず、当院での対策としては検査結果に抑制試験の結果を付記し、担当医に偽陽性の可能性があることを電話など用いて直接報告している。

HBs 抗原の測定における偽陽性の頻度について、道堯らは「アーキテクト HBsAg QT」（アボットジャパン、カットオフ値 0.05IU/mL）での結果を報告している¹³⁾。偽陽性の基準を HBe 抗体、HBe 抗原・抗体、HBV-DNA すべて陰性、後日採血された検体で HBs 抗原が陰性の全条件を満たす例とし、41,186 検体中 HBs 抗原陽性は 1,147 検体（2.8%）、そのうち 6 検体で偽陽性の基準を満たしたと報告している。この偽陽性検体は全て HBs 抗原 0.05IU/mL 以上 0.20IU/mL 未

満であり、0.20IU/mL 以上の検体では基準を満たす検体を認めなかった。以上から、HBs 抗原低値陽性例は偽陽性の可能性に留意し、また偽陽性率低下のために抑制試験が必要であると述べられている。

Deguchi らは改良前の「ルミパルス HBsAg-HQ」（カットオフ値 0.005IU/mL）で HBV 陰性（HBs 抗原/抗体、HBe 抗体すべて陰性）1,000 検体を用いた検討により、特異度を 99.7% と報告している⁸⁾。また、12,231 検体の測定結果において、再測定または抑制試験にて偽陽性と判定された検体を HBs 抗原 0.005~0.05IU/mL の範囲で 59 検体、0.05~0.5IU/mL の範囲で 3 検体認めたとしている。

本検討および他施設の報告から、HBs 抗原測定の高感度化に伴い偽陽性率の増加が懸念され、現時点では抑制試験で確認を行うことで「誤報告」を防ぐことが現実的な対応と考えられる。しかし、改良後「ルミパルス HBsAg-HQ」を用いることで偽陽性率の低下が期待でき、抑制試験施行数および偽陽性の「誤報告」を減少できる可能性がある。

謝辞：本稿を作成するにあたり貴重なご助言を戴いた当院検査部、浅沼康一先生、山田浩司先生に感謝申し上げます。

利益相反自己申告：共著者高橋聡は第一三共株式会社から講演料を、シノテスト株式会社から奨学寄附金を、アボットジャパン株式会社から受託研究費を受けている。

文 献

- 1) 西口修平：HBs 抗原の測定法と臨床的意義。肝臓 2014；55：310—24.
- 2) 日本肝臓学会編：B 型肝炎治療ガイドライン 第 3 版 [Internet]. 2017 年 8 月 Available from: https://www.jsh.or.jp/files/uploads/HBV_GL_ver3_Sep13.pdf.
- 3) Matsubara N, Kusano O, Sugamata Y, Itoh T, Mizui M, Tanaka J, *et al.* : A novel hepatitis B virus surface antigen immunoassay as sensitive as hepatitis B virus nucleic acid testing in detecting early infection. Transfusion 2009；49：585—95.
- 4) Seto WK, Tanaka Y, Wong DKH, Lai CL, Shinkai N, Yuen JC-H, *et al.* : Evidence of serologic activity in chronic hepatitis B after surface antigen (HBsAg) seroclearance documented by conventional HBsAg assay. Hepatol Int 2012；7：98—105.
- 5) Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, *et al.* : Application of a Newly Developed High-Sensitivity HBsAg Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Patients with HBsAg Seroclearance. J Clin Microbiol 2013；51：3484—91.
- 6) 戸来 孝, 川崎理一, 遠藤繁之, 米山彰子：ル

- ミパルス Presto II による高感度 HBs 抗原定量試薬の評価. 医学と薬学 2015 ; 72 : 1569—77.
- 7) 吉野直美, 山田依里, 圓田兼三, 馬場尚志, 飯沼由嗣 : 化学発光酵素免疫測定法試薬「ルミパルス HBsAg-HQ」の基本性能に関する検討. 医学検査 2016 ; 65 : 91—7.
 - 8) Deguchi M, Kagita M, Yoshioka N, Tsukamoto H, Takao M, Tahara K, *et al.* : Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. J Clin Lab Anal 2018 ; 32 : e22334.
 - 9) B型肝炎ウイルス表面抗原キット：ルミパルスプレスト HBsAg-HQ 抑制試薬 添付文書. 2013 年 6 月作成 (第 1 版).
 - 10) Bigham M, Ponnampalam A : Neutralization positive but apparent false-positive hepatitis B surface antigen in a blood donor following influenza vaccination. Transfus Apher Sci 2014 ; 50 : 92—4.
 - 11) Popp C, Krams D, Beckert C, Buenning C, Queirós L, Piro L, *et al.* : HBsAg blood screening and diagnosis: performance evaluation of the ARCHITECT HBsAg qualitative and ARCHITECT HBsAg qualitative confirmatory assays. Diagn Microbiol Infect Dis 2011 ; 70 : 479—85.
 - 12) Tang DM, Heller T, Koh C : The many faces of positive hepatitis B surface antigen. Hepatology 2016 ; 64 : 1379—81.
 - 13) 道堯浩二郎, 平岡 淳, 鶴田美帆, 相引利彦, 奥平知成, 山子泰加, 他 : HBs 抗原検査の偽陽性に関する検討—濃度別にみた判定困難例の頻度. 肝臓 2018 ; 59 : 641—6.

Evaluation of the Improved High-Sensitivity HBsAg Immunoassay System for Reducing False Positive Rates

Hitoshi YONEZAWA¹⁾, Shingo TANAKA¹⁾²⁾³⁾, Yuki YAKUWA¹⁾ & Satoshi TAKAHASHI¹⁾²⁾

¹⁾Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital, ²⁾Department of Infection Control and Laboratory Medicine and ³⁾Department of Medical Oncology, Sapporo Medical University School of Medicine

In recent years, a highly sensitive HBs antigen measurement reagent has been developed and its usefulness has been proposed. However, as a harmful effect of its high sensitivity, there is concern about a decrease in specificity (false positive findings). In order to avoid false positives, it is recommended to perform suppression tests using HBs antibody in a low value positive case, but many institutions have not followed this recommendation. Therefore, in institutions that have introduced a highly sensitive HBs antigen reagent but do not perform suppression tests, HBs antigen false positive cases may be increasing. In April 2018, the highly sensitive HBs antigen reagent “Lumipulse Presto HBsAg-HQ” was improved for the purpose of increasing the specificity. In this report, the performance of this reagent was examined including comparison with the reagent before improvement.

The subjects were seven specimens judged false positives based on “Lumipulse Presto HBsAg-HQ” before improvement. The criteria for false positives in this study were “HBs antigen quantitative value is not less than cut-off (0.005IU/mL) and negative in the inhibition test.” For the measurement, a fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay system “Lumipulse L 2400” was used.

As a result of measuring the HBsAg value using the reagent after the improvement, HBsAg was less than the cut-off value (0.005IU/mL) in 5 samples out of 7 specimens which were regarded as false positives before improvement. The detection limit was detectable up to 0.0015IU / mL, and no change was observed compared to before the improvement. We investigated the possibility of a nonspecific reaction, using one of the specimens considered to have nonspecific reactions to labeled ALP. The monthly false positive rate before improvement was 0.26 %, but the average tended to decrease to 0.09 % after the change.

In conclusion, it can be expected that the false positive rate was reduced by “Lumipulse Presto HBsAg-HQ” after improvement, so there is a possibility of reducing the number of suppression tests and “false reports”.