

Immunochromatography Assay による HBs 抗原の測定 —RPHA との比較—

九州大学医学部附属病院総合診療部

柏木征三郎 林 純 野口 晶教
中島 孝哉 岸原 康浩

(平成 6 年 4 月 7 日受付)

(平成 6 年 5 月 9 日受理)

Key words: HBsAg, Immunochromatography Assay,
Selenium colloid, RPHA

要 旨

HBs 抗原の測定法として最近開発された Immunochromatography Assay を利用した DAI-NASCREEN・HBsAg (Dainabot 社) と従来の RPHA 法 (リバースセル, 目黒研) とを実際の臨床材料を用いて比較検討した。一部については RIA および IMx (Abbott 社) を測定し比較検討した。

一般住民 692 例の HBs 抗原は本法および RPHA ともに 24 例 (3.5%) に検出され, B 型慢性肝疾患患者 29 例では全例が両法ともに陽性であった。自己免疫疾患患者 30 例および HBV 感染事故者 8 例では両法とともに全例が陰性であった。

数年にわたり経過を観察中に HBs 抗原が消失した。HBs 抗原陽性例 6 例では、本法で陽性, RPHA 法で陰性例が 4 検体に認められ, 5 検体は両法で陰性化した 1 年後も RIA および IMx では陽性であった。

合計 809 検体の両法の一致率は 99.5%, 両法ともに陽性が 9.9%, 本法のみ陽性が 0.5%, 両法ともに陰性が 89.6%, RPHA のみ陽性例はなかった。

両法による HBs 抗原値の相関は回帰直線 $\log_2 Y = 0.676 \log_2 X + 1.7$, $r = 0.87$ ($p < 0.001$) と良好な相関が認められた。

本法は測定時間が 15 分と従来の RPHA に比べて短時間で、操作も簡単であった。

以上の結果により、本法は RPHA よりも感度がよく、操作も簡便で測定時間も短く有用な検査方法と考えられた。

序 文

HBs 抗原の測定法としては、すでに種々の検査法が開発されているが、逆受身赤血球凝集反応 (reversed passive hemagglutination, RPHA), Radioimmunoassay (RIA), Enzyme immunoassay (EIA) などが一般に用いられている^{1)~3)}。また、最近では自動免疫測定装置 (IMx) を利用し

別刷請求先: (〒812) 福岡市東区馬出 3-1-1

九州大学医学部附属病院総合診療部

柏木征三郎

た Micro Particle Immunoassay (MEIA) も普及してきている⁴⁾。

これらの検査法のうち、簡便迅速な方法として RPHA が広く用いられている。この RPHA は RIA あるいは EIA に比べて感度はやや落ちるが⁵⁾、手技が簡単で、特殊な設備あるいは機械などが必要ないこと、また測定時間も他の方法に比べて短いことなどから手軽に利用されている。しかし、RPHA でも測定には 2~3 時間を要することから、院内における HBV 感染事故の際や病院内

輸血の前検査には、より簡便迅速な検査方法が望まれる。

このような観点から、この RPHA よりも簡便で迅速な方法として、最近開発された HBs 抗原の検査方法としては初めての Immunochromatography Assay について、実際の臨床材料を用いて従来の RPHA と比較検討し良好な結果を得たので報告する。

材料と方法

I. 対象

1) 一般住民

1993年に採血された長崎県壱岐郡の一般住民692例（1歳から93歳、男性287例、女性405例）

2) 九大病院総合診療部受診者

- ・B 型慢性肝疾患患者：29例
- ・針刺し事故の医療従事者：8例
- ・自己免疫疾患患者：30例

3) HBs 抗原キャリアで HBs 抗原陰性化例

沖縄県八重山地区の HBs 抗原陽性例で1980年から1989年までの10年間の経過観察中⁶⁾に HBs 抗原が消失した6例(50検体)について経過を追って検討した。これら50検体については、RIA および IMx により測定し、比較検討した。以上合計765例、のべ809検体を対象とした。

II. 検査方法

Immunochromatography Assay はダイナスクリーン・HBsAg[®] (Dainabot 社製、以下 DAINA と略)、RPHA はリバースセル[®](目黒研製)、RIA は Ausria II-125[®]、IMx は IMxHBsAg・ダイナパック[®] (いずれも Abbott 社製) を用いた。検査に当たって判定は各々のキットに添付されている指示書に従った。

DAINA の測定方法はマイクロピペットあるいはダイリューター使用の2法があるが、今回はダイリューター使用法を用いた。また判定については、反応後の発色を-、W+、+、2+の4段階に分けW+以上を陽性とした。反応時間について指示書では15分であるが、反応時間を40分、1時間、2時間、overnightと延長し検討した。また、延長による陽性例も陽性として取り扱った。

対象は全例 DAINA および RPHA でスクリー

ニングを行い陽性例について各キット附属の確認試薬を用いて中和試験を行った。壱岐の一般住民の HBs 抗原陽性例(24例)および B 型慢性肝疾患患者(29例)合計53例については両方による定量試験を行った。

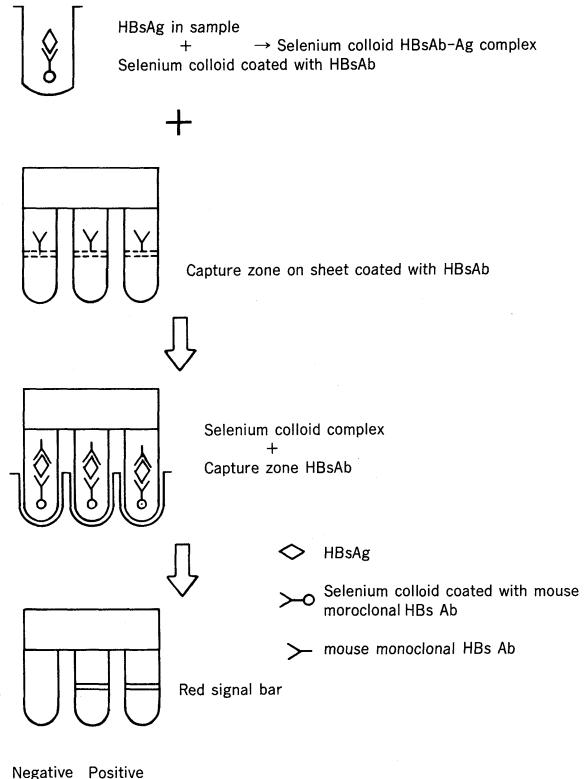
RIA は、一夜放置法を用い、本邦では cut off 以上でかつ cut off の5倍未満の検体については判定保留としているが、今回の検査では cut off 値以上を陽性と判定した。しかし、従来判定保留域とされる例については、複数回の測定および確認試験を行った。

血清は採血後-20°Cで保存した。

III. DAINA の原理

今回使用した DAINASCREEN HBsAg はサンドイッチイムノアッセイ法を用いた Immunochromatography Assay により HBs 抗原を測定するものである。Fig. 1 に示すように、ウエル内でセレンイウムコロイド標識抗 HBs マウスモノク

Fig. 1 Principle of Immunochromatography Assay



ローナル抗体と検体中の HBs 抗原を反応させ。その後、抗 HBs マウスモノクローナル抗体が固相された櫛の歯型のシートをウェル内に浸す。シート上に固相抗体・HBs 抗原・セレニウムコロイド標識抗体の結合物を形成させ、セレニウムコロイド由来の赤色のラインを目視により判定する。

成 績

1) 一般住民、B 型慢性肝疾患患者他の HBs 抗原検出率

本法および RPHA 法による壱岐の一般住民の HBs 抗原検出率は、両者とも 692 例中 24 例 (3.5%) であった。B 型慢性肝疾患患者では 29 例全例が両者ともに HBs 抗原陽性であった。また、自己免疫

Table 1 Follow up studies for presence of HBsAg by 4 method tests

Case	Year Methods	1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 56yr. male	DAINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RPHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(S/N)	189.6	158.6	162.9	135.7	173.0	43.3	114.7	80.6	14.9	1.1
	IMX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	anti-HBe	(S/N)	255.9	180.6	231.4	204.2	207.1	174.0	128.0	46.7	31.1
2 65yr. female	DAINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RPHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(S/N)	121.5	120.1	122.6	112.3	74.1	106.0	14.1	0.6	1.1	0.6
	adr	IMX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	anti-HBe	(S/N)	205.1	190.3	127.8	100.4	68.1	37.8	11.1	1.1	1.2
3 59yr. male	DAINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RPHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(S/N)	217.1		190.4	136.3	159.6	140.1	34.9	4.4	1.1	1.1
	adw	IMX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	anti-HBe	(S/N)	251.4		220.3	216.3	166.4	239.4	24.1	5.4	1.3
4 51yr. male	DAINA	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	RPHA	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	RIA	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	(S/N)	200.1		97.9	136.9	107.5		34.4	2.1	1.3	1.1
	N.D.	IMX	+	+	+		+	+	+	+	+
	anti-HBe	(S/N)	184.1		165.9	158.1	143.3		47.4	2.7	1.5
5 59yr. male	DAINA		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RPHA		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RIA		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	(S/N)		131.3	142.2	83.2	17.0	1.7	0.6	0.6		
	adr	IMX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	anti-HBe	(S/N)		135.8	121.8	64.7	17.6	1.2	0.9	0.8	
6 35yr. female	DAINA			+	+	*	+	+	+	+	+
	RPHA			+	+		+	+	+	+	+
	RIA			+	+		+	+	+	+	+
	(S/N)			120.5	81.7	34.0	16.4	8.6	0.8		
	N.D.	IMX		+	+	+	+	+	+	+	+
	anti-HBe	(S/N)		90.3	18.0	40.3	11.6	14.4	1.5		

N.D. : HBsAg subtype was not detected. Cut off values were 2.0 in IMx and 2.1 in RIA.

*Incubation time were 40 minutes.

疾患患者30例およびHBV感染事故者の8例は両者ともに全例陰性であった。このように一般住民、B型慢性肝疾患患者、自己免疫疾患患者およびHBV感染事故者では両者間に不一致例はなかった。

2) 経過観察例

1980年から1989年の10年間にHBs抗原キャリアーとして経過観察中にHBs抗原消失例6例(男性4例、女性2例)のべ50検体について検査方法別に比較し、Table 1に示した。本法陽性でRPHA法陰性の例が4検体(case 1, 3, 5, 6)に認められた。5検体で両方法とも陰性にもかかわらず、RIAおよびIMxで陽性であった。このうち、Case 6の1検体は本法の反応時間を40分と延長することにより陽性となった。

3) 検出感度の比較

以上の結果から、DAINAとRPHA法との比較を考えると総計809検体の両者による一致率は99.5%であり、両者ともに陽性が9.9%、DAINAのみ陽性が0.5%、両者ともに陰性が89.6%であり、RPHAのみ陽性はなかった(Table 2)。すなわち、両者の不一致例はDAINAのみ陽性の4検体であり、いずれも八重山地区の経過観察者であった。これらはHBs抗原消失例の男性3例および女性1例でいずれもRIAおよびIMxでは陽性であった。また、スクリーニングでは陽性であったが、確認試験で陰性と判定された例はいずれも壱岐の一般住民であり、DAINA 2例(52歳および59歳女性)、RPHA 2例の(60歳男性、20歳女性)であった(Table 3)。このように本法では2例の非特異反応がみられたが、再検査および中和試験で排除された。

4) HBs抗原値—(本法とRPHA法との相関)

HBs抗原陽性53例(一般住民の陽性者24例およびB型肝疾患患者29例)について両法によるHBs抗原値の相関をFig. 2に示した。回帰直線 $\log_2 Y = 0.676 \log_2 X + 1.7$, $r = 0.87$ ($p < 0.001$)で、両法間に良好な相関が認められた。

5) 日差および日間再現性

HBs抗原陽性検体について、本法の日差および日間の再現性を検討した(Table 4)。使用した

Table 2 Detection of the presence of HBsAg by DAINA and RPHA

DAINA	RPHA	No. tested	%
+	+	80	9.9
+	-	4	0.5
-	+	0	0
-	-	725	89.6
Total		809	100

Table 3 Results of confirmation by two methods

Method	Screening	Confirmation
DAINA	86	80(97.7%)
RPHA	82	84(97.6%)

Fig. 2 Correlation of HBsAg levels between DAINA and RPHA

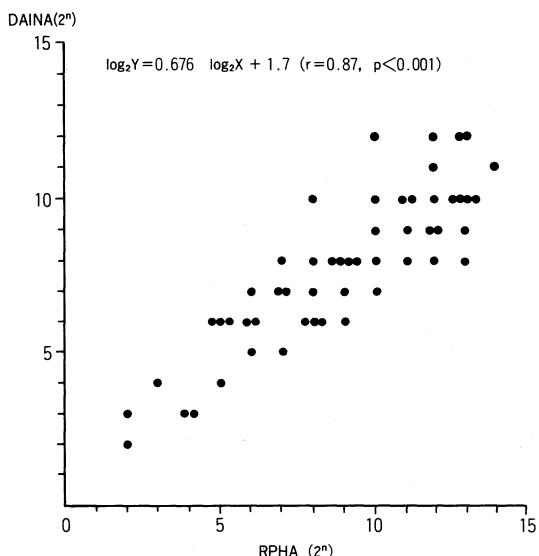


Table 4 Reproducibility test of DAINA using diluted serum

Panel	Day	1			2			3			
		Time	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E		+w	+w	+w	+w	+w	+w	+w	+w	+w	+w
F		+w	+w	+w	-	+w	-	+w	+w	+w	+w
G		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 5 Effect of incubation time

Case	HBsAg		Incubation time of DAINA				
	RIA	IMx	15m	40m	1h	2h	overnight
1	+	+	+	+	2+	+	2+
2	+	+	+	+	2+	+	2+
3	+	+	+	+	2+	+	2+
4	+	+	+	+	2+	+	+
5	+	+	+	+	2+	+	+
6	+	+	w+	+	+	w+	w+
7	+	+	w+	w+	w+	w+	w+
8	+	+	w+	+	w+	w+	w+
9	+	+	w+	+	+	w+	+
10	+	+	w+	w+	w+	w+	w+
11	+	+	w+	+	+	w+	+
12	+	+	w+	+	+	w+	+
13	+	+	-	w+	w+	ID	w+
14	+	+	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-

ID: It was difficult to read the red signal bar with opacity after 2 hours.

HBs 抗原陽性検体はメーカーより供与された高濃度の HBs 抗原陽性パネル検体 (A~G) であり、抗原量は不明であるが、A が最も高濃度、G は本法で陰性例と考えられた。その結果は、パネル F すなわち、最も抗原価が低い場合にはばらつきがみられたが、他のパネルでは良好な成績であった。

6) 反応時間の検討

本法は、固相シート上の発色により結果判定を行うことから、反応時間が結果に与える影響を見るために検体を選んで反応時間を15分、40分、1時間、2時間およびovernightと延長して発色を検討した (Table 5)。その結果は HBs 抗原 (+) 例および HBs 抗原陰性例では、反応時間を延長しても結果に影響はなかったが、15分後の判定において (w+) の例では40分および1時間後に (+) へとなる例があった。また、DAINA および RPHA 法陰性で、RIA および IMx 陽性例では反応時間を延長することにより 3 例中 1 例が (+) となった。この様に、本法の反応時間を延長することにより検出率が 0.1% 上昇した。また、発色が

薄く結果判定が困難な例では時間を延長すると発色が濃くなり判定が容易になった。これらは低タイマー例であり、確認試験および定量についても反応時間を延長することにより発色が濃くなる傾向がみられた。しかし、反応後 1 時間で発色がピークとなり 2 時間後には全体が不透明になり、結果がよみにくい例があった。これらはむしろ overnight の方が判定しやすかった。

考 察

B 型肝炎ウイルス研究の急速な進展に伴い、HBs 抗原の測定法も感度、特異性に優れたものが開発されている^{1)~4)}が、一般に RPHA 法が広く用いられている。この RPHA 法は RIA および EIA に比べて感度はやや低率であるが、簡便で迅速であるという利点がある⁵⁾。また、大量に処理も出来るがむしろ少量、たとえば 1 検体あるいは 2 検体などの緊急の検査に向いている。これらの測定法に加えさらに、簡便で感受性の高い HBs 抗原検出のための Immunochromatography Assay による HBs 抗原の新しい測定方法が開発された。

本法は、櫛型のシートに抗 HBs マウスモノクローナル抗体をコートし、櫛の歯型上にコートしたラインの発色により結果を判定する。この反応時間は 15 分と短時間であり、また各櫛の歯型は切り取ることで 1 検体からの測定が可能となっている。すなわち、本法の測定時間は全行程でも 25 分であり簡便迅速という RPHA の利点をより発展させた方法と考えられる。実際に、本試験中に HBV 感染事故者の前検査を行ったが、結果判定に素早く迅速に対処できた。

検出感度については、対象とした一般住民、B 型慢性肝疾患患者、自己免疫疾患患者 HBV 感染事故の際の前検査者および沖縄県八重山地区の経過観察例を含む 809 例の HBs 抗原の検出率は DAINA 10.4%、RPHA 9.9% であり、感度としては DAINA のほうがやや良好であると考えられた。これらの差であるが、2 法の最小検出感度は DAINA が 5ng/ml、RPHA が 50ng/ml とされており、今回の実際の臨床材料を用いた成績と一致していると考えられた。

両者による不一致例は、RPHA 陰性かつ

DAINA 陽性の 4 例であったが、いずれも RIA および IMx とともに陽性であり経過観察中に HBs 抗原が消失したと考えられる例であった。2 例は本法でもバンドが W+ と薄く陽性の判定が困難であった。また、1 例は反応時間を 40 分に延長することにより陽性となった。しかし、4 例ともに中和試験で 2 管以上の差がみられた。また、数時間にわたりあきらかに HBs 抗原陽性であり、RIA および IMx でも陽性であることなどから本法での陽性が支持された。すでに使用されている各種の検査方法の最小検出濃度は、サブタイプにより差が認められるといわれる⁷⁾。本法についてこれらの検討はなされていないが、今回の差についてもサブタイプを考慮にいれる必要があると思われた。しかし、この 4 例のうち、1 例は adw, 1 例は adr, 他の 2 例はサブタイプ検出不能な例であり、この差はサブタイプが原因ではなく、HBs 抗原が消失しつつある低タイマー例を検出出来なかつた感度の差であると考えられた。

先にわれわれは、IMx による HBs 抗原の検討において、経過観察例の RPHA で HBs 抗原が陰性化後も RIA も IMx で陽性の例があることから、HBs 抗原消失の判定は慎重にするべきであること、また加齢とともに低タイマー化する例がみられることに留意するべきであると報告した^{2,4)}。今回の検討では本法でも同様な成績が得られた。すなわち、同報告と同じ八重山地区の経過観察例 6 例について比較したが、本法および RPHA で陰性化後もなお数年間 RIA 及び IMx で陽性であるという成績であった。このことは、一般住民における使用は本法で十分と考えられるが、経過観察中に HBs 抗原が消失したと考えられる例では、より感度の高い RIA および IMx などによる詳しい検査が必要であるといえる。

このように低タイマー例において本法では検出不可能な例があること、あるいは発色が薄く結果判定が困難なことがあるが、反応時間を延長することにより、検出率が 0.1% 上昇あるいは発色が濃くなり判定が容易になる成績が得られた。この場合の延長時間は約 40 分から 1 時間でよく、特に低タイマー例での確認試験および定量試験には反応

時間延長がすすめられる。この反応時間延長により非特異反応が起こることが懸念されるが、RIA および IMx で確認された HBs 抗原陰性例および陽性例において、本法の反応時間を延長してもその判定結果に影響がなかった。また RIA および IMx により HBs 抗原値の低いことが確認された陽性例において、本法の反応時間を延長することで陽性と認められたことなどから、反応時間延長による非特異反応はないと考えられた。

次に定量性については、本法と RPHA に有意な相関が認められた。

また特異性については、本法のスクリーニングで陽性と判定された一般住民 2 例が再検査および確認後陰性と判定され、容易に排除出来た。また、非特異反応が懸念される HBs 抗原陰性の自己免疫疾患者についても全例陰性と判定された。

以上の成績から、本法は RPHA より感度がよく、RIA および IMx に比べてやや感度は落ちるもの、それ以上に操作も簡便で、測定時間も短く有用な方法と考えられた。また、使用器具が少ないことは医療設備が完備していない場所での検査に重宝すると考えられる。さらに、本法の迅速性を考えると HBs 抗原のみならず、他のウイルスマーカーへの今後の発展が期待される。

文 献

- WHO: Viral hepatitis. Tech. Rep. Ser. Ser., 570, 1975.
- 柏木征三郎, 林 純, 池松秀之, 他: 酵素免疫測定法による HBs 抗原の検出—RIA 法および RPHA 法との比較—. 感染症誌, 55: 155—160, 1981.
- 野口晶教, 柏木征三郎, 林 純, 他: モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法による HBs 抗原検出法の検討—RIA 法との比較—. 感染症誌, 61: 1252—1256, 1987.
- 柏木征三郎, 林 純, 野口晶教, 中島孝哉, 平田美樹: Microparticle enzyme immunoassay (MEIA) による HBs 抗原の検出—RIA および RPHA との比較—. 感染症誌, 65: 185—192, 1991.
- FAD: Department of Health, Education and Welfare reprot, June; 25, 1975.
- Kashiwagi, S., Hayashi, J., Ikematsu, H., Nomura, H., Kusaba, T., Shingu, T., Hayashida, K. & Kaji, M.: An Epidemiologic Study of Hepatitis B Virus in Okinawa and Kyushu,

- Japan. 118, p. 787-794, 1984.
7) 吉原なみ子：精製HBs抗原。サブタイプ(adr, adw)に関する市販キット11種の検出感度の比較検討。臨床検査, 23: 505-508, 1978.

Evaluation of Immunochromatography Assay Technique for Detection of Hepatitis B Surface Antigen

Seizaburo KASHIWAGI, Jun HAYASHI, Akinori NOGUCHI,
Koya NAKASHIMA & Yasuhiro KISHIHARA
Department of General Medicine, Kyushu University Hospital

A new immunochromatography assay technique (DAINASCREEN HBsAg, Dainabot) has been recently introduced for the detection of the presence of hepatitis B surface antigen (HBsAg). To evaluate the feasibility of using the DAINASCREEN HBsAg, we carried out comparison tests with this method and RPHA.

Results obtained were as follows:

In a test of 692 sera from inhabitants in Iki island, Nagasaki Prefecture, 24 (3.5%) were positive for HBsAg by both DAINA and RPHA. Twenty-four patients with hepatitis B were all positive in both methods. Thirty patients with autoimmune diseases and eight who had accidental needle exposure to the blood of patients with HBV infection were negative by both methods.

Six individuals were followed over a period of 10 years and all eventually eliminated HBsAg from their sera. In four patients, HBsAg remained positive by DAINA at one yearly check after it had become negative by RPHA. In five patients, HBsAg remained positive by RIA and IMs after DAINA and RPHA had become negative.

A good correlation was observed between DAINA and RPHA with a concordance rate of 99.5%. A good correlation of HBsAg titer between the two methods was observed and found to be significant ($r=0.87$, $p<0.001$).

HBsAg assay was able to be completed within 15 minutes by DAINA and the procedure was simple.

These results indicate that the sensitivity of DAINA is superior to RPHA and it is easy to use.