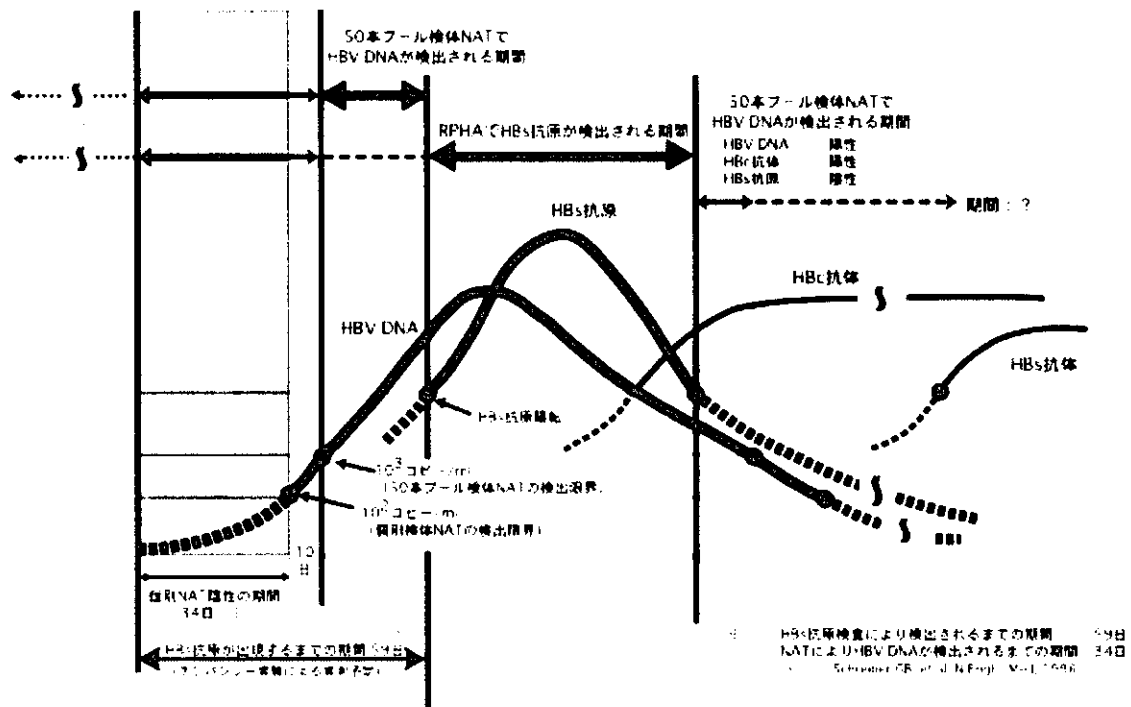


HBV急性感染の経過図



また、今日では、ごく稀ながら低力価のHBe抗体陽性（2⁵HI価未満）の献血者の血液が受血者にHBVを感染させる場合があることも明らかにされている。これらのことは、HBe抗体のみが検出される人（臨床的にはHBVの感染既往者とされる人）の肝内にはごく微量ながらHBVが存在すること、また、このような人の血液200 ml～400 mlの中に、ごく稀ながら、総量として感染価を上回るHBVが存在する可能性があることを意味している。

一般に、HBs抗原の検査は下記の目的のために実施される。すなわち、

- 1) 輸血用血液の安全性確保
- 2) 急性B型肝炎の診断
- 3) HBVキャリアの発見（HBV母子感染予防の対象妊婦の選定、B型肝炎ウイルス検診によるHBVキャリアの発見）

4) 医療関係者の感染予防

- 5) B型肝炎の自然経過の観察、および治療効果の判定

以下、それぞれの目的のために選択すべきHBs抗原検査法について順を追って考察を加える。

- 1) 輸血用血液の安全性の確保を目的としてHBs抗原検査を行なう場合、NATによるバックアップ体制が無かった時代には多少の偽陽性反応（言い換えれば、多少の無駄）があっても、安全性を優先する検査法を選択することが求められた。しかし、NATによるバックアップ体制が軌道に乗っている現在では、徒に検出感度のみを追求する必然性は無く、簡便、安価、かつ迅速度および特異度の高い現行の凝集法などを用いることにより、そ

の目的をはたすことが可能になっていると考えられる。

2) 急性B型肝炎の診断を目的としてHBs抗原検査を行なう場合、一般に急性B型肝炎の患者は肝炎の極期前後に医療機関を受診することが多いことから、受診時点ではHBs抗原量は多く、徒に検出感度のみを追求する必要はなく、むしろ病期(経過)を判定するための情報が必要となる。この目的のためには定量性のある検査法を選択することが必要となる。なお、感染の終了(臨床的治癒)を判定する際には、一般に他の血清学的マーカー(HBc抗体、HBs抗体)が併用されることから、この目的のためにも徒に高感度のHBs抗原検査法を選択する必然性はないと考えられる。

3) HBVキャリアの発見(HBV母子感染防止の対象妊婦の選定、B型肝炎ウイルス検診によるHBVキャリアの発見)を目的としてHBs抗原検査を行なう場合、一般にHBVキャリアではHBs抗原量が多いことから、この場合も徒に検出感度のみを追求する必要はなく、確実にHBVキャリアを見出すという目的を優先する。従ってこの目的のためには、特異度の高い検査法を優先して選択することが必要である。

特に、HBV母子感染防止の対象妊婦の選定を行なう場合、HBV量の多い(HBe抗原陽性、HBs抗原高力価の)HBVキャリアを見出すことを主たる目的とすることから、特異度が保障されている限り、市販されているいずれのHBs抗原検査法を用いてもその目的を達成することができると考えられる。なお、B型肝炎ウイルス検診の目的でHBs抗原検査を行なう場合、ごく稀にHBs抗原価の低いHBVキャリアも存在することが知られている。

従って、今後、HBs抗原力価の低い

HBVキャリアに的を絞った肝病態の解明をすすめることは大切である。その結果、これまでに多くの人々が想定しているように、ごく微量のHBs抗原が検出されるにすぎないHBVキャリアの肝炎の活動度が高くないこと、肝炎の病期(ステージ)の進行が一般のHBVキャリアに比べて速くないこと、言い換えればそのほとんどが無症候性のキャリアであることが立証されれば、B型肝炎ウイルス検診の目的でHBs抗原検査を行う場合にも徒に検出感度の高い検査法を選択する必然性は少なくなると考えられる。なお、2002年4月から開始された肝炎ウイルス検診の際のHBs抗原検査で、一部の地域において特異度を度外視して「高感度のHBs抗原検査法」を選択したことから、この検査法により「HBs抗原陽性」と判定された受診者が実際はHBVキャリアではなかった例が数多く見出され、特異度の高い検査法に変更する必要が生じたことを付記しておく。

4) 医療関係者への感染を予防することを目的としてHBs抗原検査を行なう場合(該当する血液が感染源となるか否かをその場ですばやく知る必要がある場合)、先ず第一に検査の迅速性が要求される。この場合、時にごく微量のHBs抗原陽性の血液が見逃される恐れもあることから、念の為に検出感度の高い検査法による検査を後刻追加して行なっておくことが望ましいと言える。但し、一般にごく微量のHBs抗原陽性の血液中に存在するHBV量は多くはない(感染性は高くない)ことを念頭に置いて合理的に対処すればよいと考えられる。

5) B型肝炎の自然経過の観察、治療効果の判定を目的としてHBs抗原検査を行なう場合には定量性のある検査法を選択することが望ましい。HBVの駆除を目的とした治療の効果判定を行なう場合に

は、定量性があり、かつ特異度、検出感度の高い検査法の選択が求められる。但し、図に示した経過からも明らかなように、HBs抗原検査はその感度をあげてもおのずと限界があることから最終的な判定を行う際には、他の方法（HBV DNAの検出など）を併用することが求められる。なお、肝炎の自然経過などを解析する目的でHBs抗原量の変動を追跡する際には、経過中の血清を保存し、経過観察中に収集した血清を一括して同時測定を行ない解析することが望ましい。

以上、HBs抗原検査の目的ごとの検査法の概略について総論的に記述したが、いずれの検査法を選択する場合でも、それぞれの検査法のHBs抗原の検出限界（検出感度）、および定量性の有無などをよく理解した上で利用することが肝要である。

このためには、それぞれの検査法の特徴を比較できる尺度が必要となる。なお、標準とすべき尺度は、これまで ng/ml と IU/ml の両者が統一されないまま利用されてきた。しかし、 ng/ml の表示は、標準品を作製する際に用いる精製HBs抗原の精製度、HBs抗原粒子表面へのIgGなどの血清タンパクの付着度の違い（これは原料血漿のLotにより異なる）により、標準品のLotごとに差異が生じ得ること、そもそもHBs抗原検出の精度は、HBs抗原量ではなく、HBs抗原活性を相対的に現わす尺度であることなどから、今後は、わが国においても国際標準に合わせた尺度（ IU/ml ）を利用できるシステムを確立することが望ましいと言える。

文献

- 1) Shreiber, G. B. et al
The risk of transfusion- transmitted viral infections.
N. Engl. J. Med 334: 1685-1690, 1996
- 2) Michalak, T. I. et al
Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis.
J. Chin. Invest. 93:230-239, 1994
- 3) Yotsuyanagi H. et al
Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B.
Hepatology 27:1377-1382, 1998
- 4) Uemoto, S. et al
Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B core antibody-positive donors in living related liver transplants.
Transplantation, 65:494-499, 1998

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

医療での HBs 抗原検出キットに関する研究

分担研究者 飯野四郎 医療法人社団静山会 清川病院 病院長

研究要旨：各種の HBs 抗原微量陽性あるいは陰性例（かつては陽性）について、ALT、HBV DNA などとの関係を検討した。臨床的には RPHA 法の検出感度でも十分と考えられたが、さらに、genotype や mutation などとの関係を精密に検討する必要がある。

A. 研究目的

過去に明らかな HBs 抗原陽性であった例でその後、HBs 抗原が RPHA 法で陰性あるいは低値陽性となった例の検体について、HBV DNA および他の鋭敏な方法による HBs 抗原を検査し、症例の病態との関係を検討する。

B. 研究方法

HBV 感染例から得られた冷凍保存検体数万検体の中から、過去においては HBs 抗原陽性が明らかであることが確認されていた症例で、RPHA 法で HBs 抗原が陰性あるいはごく低値陽性と判定された検体を選び出し、HBV DNA を PCR (Amplikor) 法、HBs 抗原をアーキテクト、アキシム、IMx 法で検査し、その症例の診断名、ALT 値、HBs 抗原・抗体、院内の RPHA および EIA 法による HBs 抗原の結果と比較検討した。また、3 例については HBs 抗原陰性化の過程をシリーズ検体で検討した。

なお、保存検体は患者の了解を得た上で研究用として保存されているものを用いた。

C. 研究結果

1. HBs 抗原陰性例

B 型急性肝炎治癒後の 5 例および HBV 無症候性キャリア (ASC) で HBs 抗原が陰性化した 6 例について検討した結果を表 1 に示した。

脂肪肝と画像上確認された 40 歳男性例以外の例

ではすべて ALT は正常値を示した。2 例の HBe 抗原・抗体陰性例を除いて、HBe 抗体陽性であった。HBV DNA は全例、 $10^{2.6}$ copies/mL 以下であった。1 例のみが、アーキテクトおよび IMx で弱陽性であった。

2. HBs 抗原弱陽性例

HBs 抗原が消失に近づいている HBV ASC10 例と B 型慢性肝炎 (CH) 2 例の結果を表 2 に示した。全例が院内検査で HBs 抗原は陽性であった。

画像検査で脂肪肝と診断されている以外の症例ではすべて ALT は正常値であった。CH の 2 例については、36 歳男性例は HBe 抗原陽性例、48 歳男性例は HBe 抗体陽性で、いずれも肝炎急性増悪後の HBs 抗原減少時であった。

ASC の 2 例が HBe 抗原・HBe 抗体ともに陰性で他は HBe 抗体陽性であった。

全例で HBV DNA は $10^{2.6}$ copies/mL 以下であった。

HBs 抗原は院内検査ですべて陽性であり、うち 3 例では RPHA 法陽性であった。RPHA 法陽性例は、これら検体でみる限りにおいては、アーキテクトが cut off 値 (0.05) の約 200 倍以上、アキシムでは cut off 値 (2.00) の約 50 倍以上、IMx では cut off 値 (2.00) の約 100 倍以上であった。

3. HBs 抗原・RPHA 法陽性例

HBV DNA 陽性 ASC 5 例と CH 1 例の結果を表 3 に示した。

ASC では、57 歳女性の脂肪肝、CH と ASC の

境界にある48歳男性例でALTが異常値を示した。

HBV DNAはASCでは $10^{2.8} \sim 10^{3.6}$ であり、41歳男性CHでは $10^{5.4}$ と明らかに高値であった。

HBs抗原は院内のRPHAで全例弱陽性、アーキテクト、アキシム、IMxでもすべて明らかな陽性であり、RPHAとの関係では表2の結果とほぼ同様であった。

4. シリーズ検体での検討

ASCからの離脱例、B型急性肝炎の回復期、HBs抗原低値のHBe抗原陽性CHの3例についてシリーズ血清で検討した(表4)。

ASCの例では、HBe抗原陽性のCHの時期を経て徐々にHBV DNA、HBs抗原が減少し、最終的には観察期間の最後1年の間にHBs抗原キャリアから離脱している。

AH例では発症から約2ヶ月でALTがほぼ正常化し、HBs抗原は約6ヶ月で陰性化しつつあるが、HBV DNAは陽性のままで経過している。

CH例は、HBe抗原陽性であるにもかかわらず、RPHA法では1点を除いて陰性で、他の鋭敏な検出法においても低値である。

D. 考察

HBV DNAがPCR法によって鋭敏に検出できるようになって、血中HBV DNA量とHBVによる肝炎の関係がかなりまで明らかになっている。HBe抗原陰性のASCにおいては、HBV DNAが 10^3 以下のポイントが複数回連続して観察された例はその後に肝炎の再燃をみる可能性は、強力な免疫抑制を行わない限り、ほとんどないと考えられており、一方、 10^4 以上で経過する例では肝炎の再燃をみる可能性があると考えられている。

ただ、HBVによる肝炎の急性増悪後には、HBV DNAの低下、遅れてHBs抗原の減少がみられ、とくに激しい増悪をみた場合にはいずれも陰性化することがありうる。そのため1点のみの検出による判断では危険なこともありうる。

今回の検討は限られた小数例の検討であったが、ALTとHBV DNAの関係においては、上記のHBV DNAからの判断にほぼ一致する成績であった。

本題のHBs抗原とALTの関係については、CHの1例を除いては、ALTが異常の例ではRPHA法でHBs抗原すべて検出されており、次に、HBV DNA量とHBs抗原の関係では、HBV DNA量が問題となる 10^3 copies/ml以上の例ではRPHA法でHBs抗原はすべて陽性であった。RPHA法より100倍前後鋭敏である検出法では、当然すべて陽性であり、日常的に問題となるHBVキャリアを拾い出すには、ほどほどの検出感度の検出法で十分であると臨床的には考えられた。

スクリーニング法として、HBs抗原の検出感度を非常に鋭敏にした場合には、臨床的に問題のないHBVキャリアまで拾い出すことになり、不要の精密検査を行うことになり医療経済的には得策とは言えない。

一方、鋭敏な方法でなければ検出できないHBs抗原低値のHBV慢性肝疾患が存在することも確かであるが、この場合はALT異常からHBV感染を推定して、より肝炎との関係が深いHBV DNAを検出すれば臨床的には支障がないことである。

そのほか、HBV感染予防の点からHBV感染者を拾い出す目的としては、一次スクリーニング法としてはよいが、確定法としては遥かに感度不足であり、もっとも鋭敏なPCR法をもってしても、最少感染ウイルス量は $10 \sim 20$ copiesと想定されていることから、 50 copies/mLの感度ではかなり厳しいものと考えられる。

E. 結論

臨床的に考えてみた場合には、RPHA法程度のHBs抗原検出系でも十分であると考えられた。

今後、genotypeやmutationとの関係などさらに精密な検討を要すると考えられる。

F. 健康危険情報

近年、アフリカ・ヨーロッパ型のHBV、genotype Aが急速に性感染を通して、関東から日本全国に拡がりつつあり、genotype Aは成人感染においてもキャリア化する可能性があることから、キャリア撲滅という観点に立てば早急な対策が必要である。

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriya K, Shintani Y, Fujie H, et al: Serum lipid profile of patients with genotype 1b hepatitis C viral infection in Japan. *Hepatol Res* 25: 371-376, 2003
- 2) Okuse C, Yotsuyanagi H, Okazaki T, et al: Detection, using a novel method, of a high prevalence of cryoglobulinemia in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 27: 18-22, 2003
- 3) Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S For The Japan HBV Genotype Research Group : A Case-Control Study for Clinical and Molecular Biological Differences Between Hepatitis B Viruses of Genotypes B and C. *Hepatology* 33 : 218-223, 2001
- 4) Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, Mizokami M : Geographic Distribution of Hepatitis B Virus (HBV) Genotype in Patients With Chronic HBV Infection in Japan. *Hepatology* 34: 590-594, 2001
- 5) Iino S : Natural History of Hepatitis B and C Virus infections . *Oncology* 62, 18-23: 2002
- 6) Iino S : Prevention of and Measures against Needlestick Accidents. *JMAJ* 46: 156-160, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

表 1

検体番号	性・年齢	診断名	ALT (GPT)	Hbe抗体	HBV DNA	HBs抗原				
						RPHA	EIA (院内)	アーキテクト	アキシム	IMx
41	56M	PI	21	+	<2.6	-	-	0.00	0.70	0.62
6	40M	PI+FL	87	+	<2.6	-	-	0.00	0.62	0.76
7	27M	PI	10	+	<2.6	-	-	0.00	0.58	0.82
38	39F	PI	8	+	<2.6	-	-	0.00	0.69	1.14
23	21F	PI	17	-	<2.6	-	-	0.00	0.91	1.13
13	47M	ASC	12	+	<2.6	-	-	0.00	0.76	0.94
22	49F	ASC	14	-	<2.6	-	-	0.00	0.74	0.63
15	25F	ASC	12	+	<2.6	-	-	0.00	0.75	1.03
17	48M	ASC	18	+	<2.6	-	-	0.00	1.40	1.04
5	55M	ASC	18	+	<2.6	-	-	0.01	0.80	1.39
14	58M	ASC	17	+	<2.6	-	-	(+)0.05	1.77	(+)2.92

表 2

検体番号	性・年齢	診断名	ALT (GPT)	Hbe抗体	HBV DNA	HBs抗原				
						RPHA	EIA (院内)	アーキテクト	アキシム	IMx
21	41M	ASC	14	+	<2.6	-	+	0.19	4.93	7.40
25	67F	ASC	23	+	<2.6	-	+	0.41	6.32	7.73
39	57F	ASC	10	+	<2.6	-	+	0.50	8.26	17.13
12	55M	ASC+FL	40	-	<2.6	-	+	1.13	13.37	24.92
3	40F	ASC+FL	30	+	<2.6	-	+	1.24	16.32	36.67
4	52M	ASC	20	+	<2.6	-	+	1.46	22.18	39.40
24	56F	ASC	20	+	<2.6	-	+	1.66	27.99	51.18
18	33M	ASC+FL	45	-	<2.6	2 ²	=	9.57	87.61	169.01
1	59F	ASC	8	+	<2.6	-	+	17.81	169.55	250.58
20	52M	ASC+FL	75	+	<2.6	2 ⁴	=	53.54	325.61	337.48
11	36M	CH	27	(-)eAg	<2.6	-	+	1.93	25.75	72.17
9	48M	CH	147	+	<2.6	2 ⁴	=	102.59	383.03	484.02

表 3

検体番号	性・年齢	診断名	ALT (GPT)	Hbe抗体	HBV DNA	HBs抗原				
						RPHA	EIA (院内)	アーキテクト	アキシム	IMx
10	39M	ASC	13	+	2.8	2 ²	=	11.90	136.46	215.17
19	33M	ASC	19	+	3.0	2 ⁴	=	74.08	348.20	425.38
2	57F	ASC+FL	44	+	3.3	2 ⁴	=	14.07	153.48	48.90
8	32M	ASC	12	-	3.3	2 ²	=	50.03	288.77	340.18
40	48M	ASC or CH	37	+	3.6	2 ²	=	18.67	210.43	220.89
16	41M	CH	40	+	5.4	2 ⁴	=	72.43	245.64	294.63

表 4

検体番号	性・年齢	診断名	採血日	ALT (GPT)	HBe 抗原 抗体	HBV DNA	HBs抗原				
							RPHA	EIA (院内)	アーキテクト	アキシム	IMx
26	33M	ASC	10-6-1	29	HBe抗体	<2.6	2 ⁴	=	5.47	68.17	99.62
27		ASC	11-6-5	14	HBe抗体	<2.6	-	-	0.00	1.20	1.20
28		ASC+FL	13-7-28	52	HBe抗体	<2.6	-	-	0.00	0.68	0.66
42	28M	AH	13-4-13	43	HBe抗体	3.6	2 ⁴	=	53.38	376.33	343.15
43		AH	13-5-9	26	HBe抗体	4.0	2 ²	=	8.31	127.48	167.55
44		AH	13-6-11	19	HBe抗体	3.8	2 ²	=	1.35	24.52	34.43
45		AH	13-9-7	17	HBe抗体	3.3	-	+	0.18	4.15	5.05
29	48M	CH	11-1-23	139	HBe抗原	6.5	-	+	2.85	37.17	70.06
30		CH	11-2-13	109	HBe抗原	6.0	-	+	3.45	31.24	56.08
31		CH	11-3-27	75	HBe抗原	5.8	-	+	1.85	33.70	55.92
32		CH	11-4-17	79	HBe抗原	5.4	-	+	2.86	34.62	49.53
33		CH	11-7-10	82	HBe抗原	7.3	-	+	74.43	201.35	210.03
34		CH	11-8-28	175	HBe抗原	7.4	2 ³	+	58.42	151.25	182.76
35		CH	11-11-6	57	HBe抗原	5.3	-	+	1.51	27.44	43.53
36		CH	11-12-25	52	HBe抗原	5.5	-	+	7.04	105.39	114.59
37		CH	14-3-9	77	HBe抗原	7.1	-	+	92.63	220.91	237.91

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

B 型肝炎ウイルスの genotype パネルの作製と S 抗原の解析

分担研究者 小室勝利 国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長

協力研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

HBs 抗原測定試薬の評価に必要な HBV の genotype パネルの整備を目的に各種 genotype を組み込んだプラスミドを作成した。得られたプラスミドを肝細胞由来の HuH7 細胞にトランスフェクションすることで培養上清中に HBs 抗原を検出することができた。これによって日本には本来存在しない genotype の HBV を含め、遺伝子の型別に抗原性の全く同一な HBs 抗原を必要な時に必要なだけ作製することが可能になった。血漿由来の標準品等の評価に貢献すると考えられる。

A. 研究目的

HBV は全世界に広く分布し、遺伝子的に genotype A から G までの 7 グループに分類(最近では genotype H も報告されているが)され、国や地域によって存在する遺伝子型が異なることは良く知られている。一方、HBs 抗原の試験は肝炎等の診断や安全な血液製剤を得るためのスクリーニング検査としての広く実施されている。国際間の交流が頻繁になっている現在において、海外(主に米国)から原料血漿を輸入する場合や人的交流によって日本には本来存在しない genotype のウイルスが侵入してくる可能性が高くなっている。これらのことから市販されている診断薬がこれらの遺伝子型の異なる HBs 抗原を同等に検出できるか確認する必要がある。また、日本に存在

しない遺伝子型の HBs 抗原陽性血漿を評価に必要な量を確保することは倫理的に困難である。また、作成した標準品や参照品の在庫が少なくなり新たに作製する場合に、全く同一性を保持しているか確認することは容易なことではない。我々は PCR を使って HBV の全長をプラスミドにクローニングすることで、理論的には半永久的に同一のアミノ酸配列を持つ HBs 抗原を産生する系を確立することを目的にした。また、市販されているパネル血漿等から genotype A、B、C、D、E、F、G の HBs 抗原を産生するプラスミドのパネルの作製も目的にした。

B. 研究方法

HBs 抗原血漿 100 μ l から DNA を抽出し、

100 μ l の蒸留水に溶解後、5 から 10 μ l を PCR の反応に添加した。PCR はタカラ TaKaRa LA Taq™ を用い添付文書の条件で 32 サイクルのロング PCR を実施した。HBV の全長を増幅するプライマーは Gunther S.(J.Virol.vol.69.5437-5444.1995)らの報告したものを改変し、P1(1821-1841) :GGCTCTTCTTTTCACCTCTGCCTAATCA, P2(1825-1806) : GGCTCTTCAAAAAGTTGGTGCTGG を用いた。PCR 産物を電気泳動し、3.2K のバンドを切り出し精製後、pCR-XL-TOPO(invitogen)に組み込んだ。全長が組み込まれたプラスミドはリポフェクションを用いて HuH7 細胞にトランスフェクションし、2-3 日後に培養上清を集め、エスプライン HBsAg(富士レビオ)を用いて HBs 抗原の有無を解析した。また、購入した genotype のパネル血漿からも同様に全長をプラスミドに組み込み、培養上清中の HBs 抗原の発現を解析した。さらに、クローニングした HBV の全長の塩基配列を解析し genotype を確認した。

C. 研究結果

Gunther らの報告したプライマーを用いることで容易に HBV の全長をクローニングできた(図 1)。また、得られたプラスミドを HuH7 細胞にトランスフェクションし、2-3 日後の培養上清中に HBs 抗原を検出することができた(図 2)。これらの方法を用い

て genotype A から G までの HBs 抗原を発現するプラスミドを得ることができた(表 1)。S 抗原をコードする領域において、既存の報告されている各 genotype と比較すると A は 99.3%、B は 98.8%、C は 97.9%、D は 99.0%、E は 99.0%、F は 97.9%、G は 98.7% のホモロジがあった。さらに、各遺伝子型に特徴的な塩基配列を検討したところ一致し、これらから genotype A から G までの HBV が得られたと考えられた。全領域での genotype の解析は現在実施している。

D. 考察

国際間の交流が頻繁になっている現在において、これまで日本に存在しなかった genotype の HBV が海外から持ち込まれる可能性が高まっている。そのため、市販されている HBs 抗原測定試薬がこれらの genotype の異なる HBV を検出可能なのか、解析することは重要である。また、倫理的に評価するために必要な血漿を十分に得ることが不可能なこともある。さらに、血漿由来の標準品や参照品は有限であるから更新が必要なこともある。そのような場合に、全く同一な血漿を得ることは困難なこともある。我々が作成した HBV パネルは genotype 毎に全く同一な HBs 抗原を半永久的に作ることができ、また、プラスミドであるから安定性も高い。血漿由来の HBV はヘテロな HBV と考えられるので、均一な我々の抗原は血漿由来の標

準品等に置き換えることはできないが、均一性と必要な量を作製できる利点を生かし、血漿由来の標準品等を補うことができると考えている

E. 結論

HBV の genotypeA から G までの遺伝子パネルを作成し、均一な HBs 抗原を産生する系を確立した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

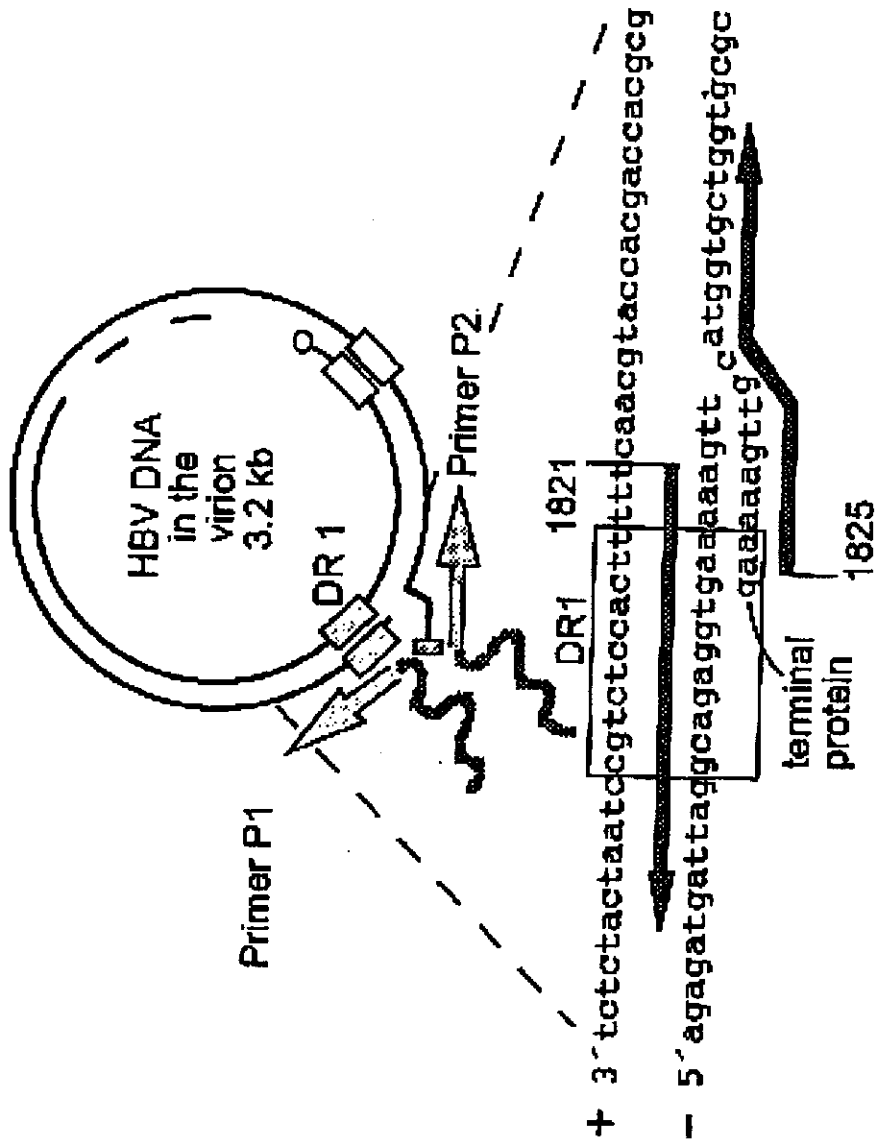


Fig.1 Design of Primers for HBV Full Genome Amplification

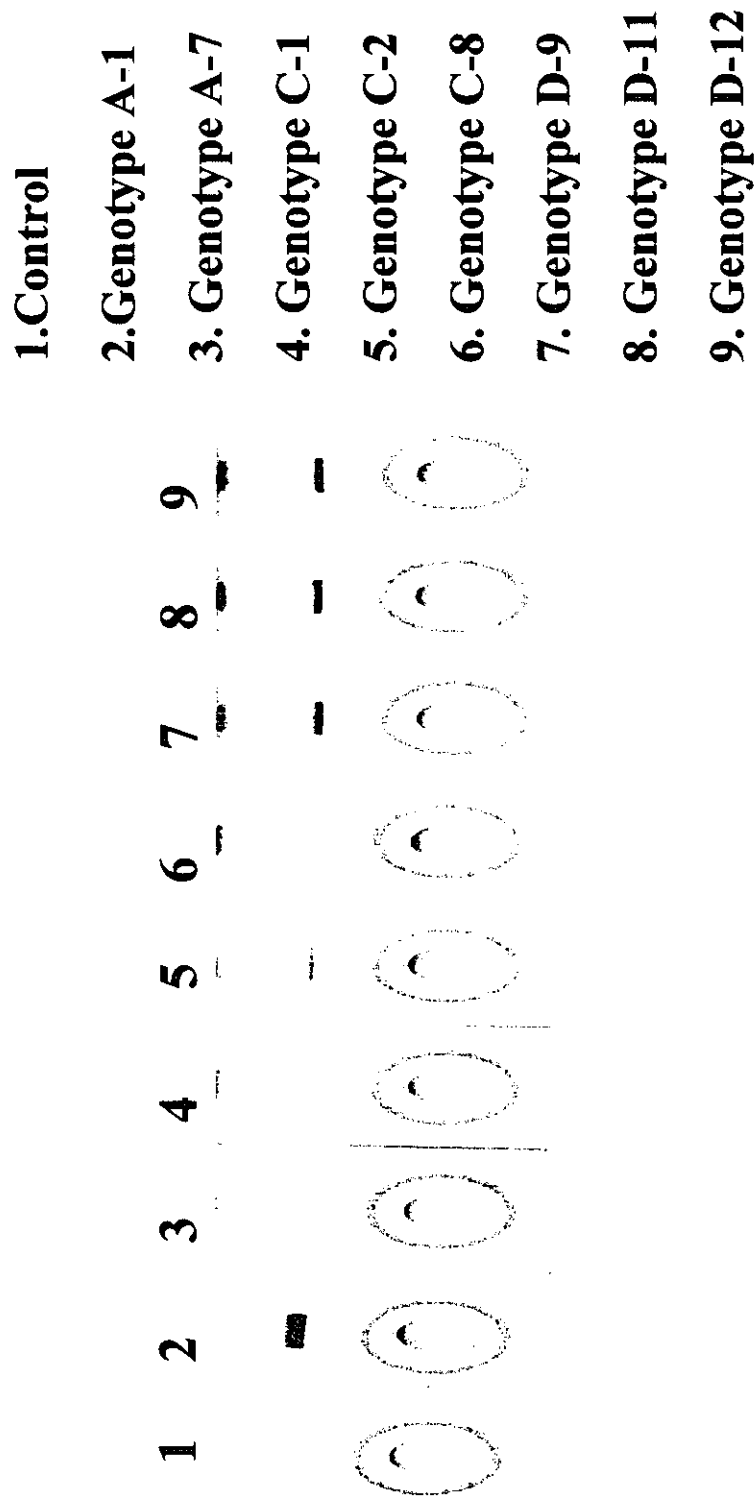


Fig.2 Detection of HBs-Ag in supernatants of transfected cells

表1 HBVパネルの作製

genotype	cloning	HBs-Ag	sequence
A	done	+	done
B	done	+	done
C	done	+	done
D	done	+	done
E	done	+	done
F	done	+	done
G	done	+	done

国際的動向を踏まえた体外診断薬の品質管理に関する研究
「風疹抗体検出キットの品質管理に関する研究」

研究協力者 岡部信彦, 多屋馨子, 佐藤 弘 (国立感染症研究所・感染症情報センター)

研究要旨 風疹の抗体測定方法として、従来、赤血球凝集抑制試験 (HI 法) が多く用いられてきたが、近年、酵素抗体法 (EIA 法) が普及してきたことから、両方法による測定結果の相関性について比較・検討した。2003 年 10 月に採取された血清、計 469 検体 (年齢 18~30 歳, 男性 361 名, 女性 108 名) を用いて測定を行った。その結果、両方法の抗体陽性率に差はみられなかったが、HI 抗体価 1:8 未満/EIA IgG 価(+)が 1 検体, HI 抗体価 1:8/EIA IgG 価(±)が 1 検体あった。また、HI 抗体価および EIA IgG 価の分布より作成した相関図では、正の相関が認められた (相関係数 0.928)。本調査において、HI 法と EIA 法との抗体検出感度に差はみられず、抗体価の分布において相関性も認められたが、EIA 法による測定結果を用いた感染防御抗体レベルの推定には、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

抗体の測定方法には、蛍光抗体法 (FA)、酵素抗体法 (EIA, ELISA)、補体結合反応 (CF)、中和試験 (NT)、赤血球凝集抑制試験 (HI) など様々なものがある。それぞれの試験で一長一短があるが、ある感染症に対して抗体検出感度の低い方法で測定した場合、偽陰性を生じ、既往歴なし、あるいは vaccine failure と判断され、不要なワクチン接種の勧奨や、実際の抗体保有率の把握ができない。また、操作が煩雑な測定法では、多数の検体を測定することは困難である。

風疹の抗体測定には、HI 法が標準法として多く選択される方法であるが、近年、EIA 法による測定が普及してきた。そこで、本調査では両方法による測定結果の相関性について比較・検討した。

B. 研究方法

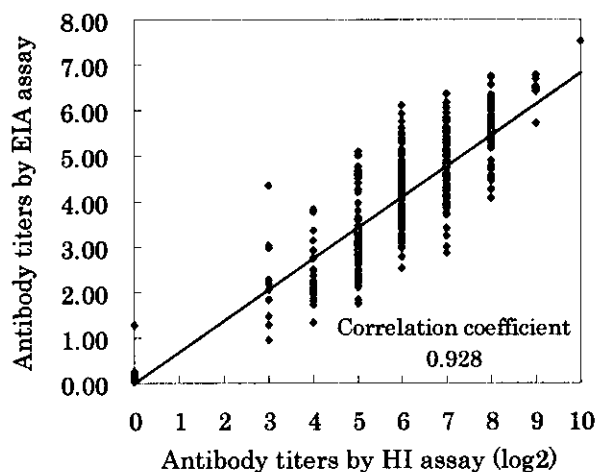
2003 年 10 月に埼玉県内の A 大学の学生および研修医から採取された血液、計 469 検体を調査材料とした。血液から血清を分離し、2つの測定方法により風疹に対する抗体の測定を行った。1 つめは赤血球凝集抑制試験 (HI 法) であり、抗原にはデンカ生研製の風疹 HA 抗原 (Baylor 株) を使用した。血清の前処理はカオリンで行い、ま

た、赤血球はガチョウ赤血球を使用した。方法・手順は「感染症流行予測調査事業検査術式」に準じて行った。2 つめは酵素抗体法 (EIA 法) であり、これは市販の風疹 IgG 抗体測定キット (デンカ生研) を用いて、添付文書に従い行った。判定は、HI 法で抗体価 1:8 以上、EIA 法で IgG 価 1.0 以上を風疹抗体陽性とした。

C. 研究結果

調査対象となった学生および研修医について、性別の内訳は男性 361 名、女性 108 名であり、年齢分布は 18 から 30 歳 (中央値 23 歳) であった。HI 法による風疹抗体陽性率は 85.7% (男性 83.1%, 女性 94.4%) であり、幾何平均抗体価は 74.2 (男性 72.7, 女性 79.0) であった。一方、EIA 法による風疹抗体陽性率は 85.7% と HI 法と同率であった。EIA 法で IgG 価(±)が 1 検体あり、HI 法では 1:8 の抗体価であった。また、EIA 法では陽性であったが、HI 法では陰性であったものが 1 検体あった。この 2 検体を除くすべての検体は HI 法と EIA 法で陽性・陰性の判定は一致した。HI 抗体価および EIA IgG 価の分布から相関図を作成したところ、正の相関が認められ、相関係数は 0.928 であった (Fig. 1)。

Fig. 1 Correlation between antibody titers against rubella by EIA and HI assays (n=469)



D. 考察

本調査における風疹抗体陽性率は、平成 12～14 年度感染症流行予測調査 (H12: 86.2%, H13: 87.5%, H14: 87.0%, 調査県の 18～30 歳の HI 法による抗体陽性率) と比較して、ほぼ同様の結果であった。また、予防接種歴・罹患歴に関する質問票により、本調査対象者より得られた結果から、2003 年 9 月 30 日までの経過措置の接種対象者 (1979 年 4 月 2 日から 1987 年 10 月 1 日生まれの未接種者) は 42 名存在し、このうち抗体陽性者は 31 名 (73.8%) であった。

風疹の抗体測定法として、HI 法は多く選択される標準法であり、また、特別な機器を必要としないという利点があるが、血清の前処理が必要なことや判定が主観的であるといった点もある。一方、EIA 法は抗体検出感度が高く、一度に多くの検体を測定できる利点がある。しかし、IgG 価(±)の場合の判断が困難であり、また HI 法よりも検査費用が高い。一般に、HI 抗体価 1:8 以下である場合、ワクチン接種を勧奨する目安となる。しかし、EIA 法においては、IgG 価から感染防御に有効な抗体を保有しているかどうかの判断は難しい。本調査のように多数の検体の測定を行う場合、EIA 法による測定が適しており、EIA 法による測定結果から感染防御抗体レベルを推定することは、非常に有効な手段となりうる。本調査において、HI 法と EIA 法との結果に相関性が認められたものの、同じ HI 抗体価の検体の EIA

IgG 価の分布にかなりのばらつきがみられたことから、EIA 法による測定結果からの感染防御に有効な抗体レベルの推定には、さらなる検討が必要である。

E. 結論

風疹の抗体測定を赤血球凝集抑制試験 (HI 法)、および酵素抗体法 (EIA 法) の 2 つの方法で行い、両方法による測定結果の相関性について比較・検討した。合計 469 検体の風疹抗体陽性率は、HI 法、EIA 法ともに 85.7% であった。HI 抗体価と EIA IgG 価との分布から、両方法との間に相関性が認められたが、感染防御に有効な抗体レベルを EIA 法により推定するには、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・多屋馨子, 岡部信彦: 風疹抗体の最新動向とワクチン接種. 日本医事新報. 4144. 17-23. 2003.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

商業検査施設の風疹抗体検査成績に関する研究

石川県立中央病院産婦人科 干場 勉

研究要旨

我が国における商業検査施設の風疹抗体検査の成績とその影響を過去の調査から検討した。1988年のHI抗体価は大手5社で2~16倍低く、IgM抗体は自家製キット使用の2社は低感度と偽陽性を示し、そのためか先天性風疹症候群発生数は1987年の方が1982年より増加していた。紹介患者のHI抗体価は1987年頃に異常低値だったが1990年頃には改善された。

A. 研究目的

我が国における過去の風疹抗体検査成績とその影響を検討する。

B. 研究方法

石川県立中央病院産婦人科外来での紹介医と当院のHI抗体価の比較を1987年前後で行う。1988年に大手5社に送付し検査されたHI抗体価とIgM抗体を検討する。風疹患者報告数と先天性風疹症候群（以下CRS）数、および中絶数の増減を比較し、検査データの影響を検討する。

（倫理面への配慮）

送付血清は匿名化していること。また採血血清は風疹診断精度向上のため、患者の同意を得て採取された。

C. 研究結果

当院のHIおよびIgM抗体検査成績は正当なものだったが、紹介医と当院との抗体価の比較では、1986~1988年では29例中12例（41%）が異常低値とされる4倍以上の低値を示し、特に128倍以上では56%に達した。抗体検査値の異常が知られた後の1989~1990年では異常低値は21例中3例（14%）に過ぎず、128倍以上では見られなかった。

大手5社のHI抗体価は4社が2~4倍低く、1社は3~16倍も低かった。IgM抗体は市販キット

使用3社では正常値を示したが、自家製キットを用いていた1社は低感度、1社は非特異的反応と思われる偽陽性を示した。

風疹患者報告数は当院では1982年と1987年ではほぼ同数であるにもかかわらず、CRS発生数は1987年の方が3倍弱の増加を示した。

D. 考察

外来患者の抗体価の比較は1987年頃全国的にHI抗体価検査が低値だったことを示し、これは大手5社の調査結果でも裏付けられた。また、IgM抗体検査成績不良の2社は自家製キットを用いており、その使用は不適切と考えられた。CRSが増加したのは低感度のHI抗体価やIgM抗体検査のために風疹の診断が正しくできなかったことも一因と考えられた。また、偽陽性のIgM抗体成績は無用な中絶を招いた可能性がある。外来患者抗体の改善は調査結果を伝達したことで各社が改善したためと考えられた。

E. 結論

1987年頃は商業検査施設の風疹HI抗体価検査の感度は低感度だった。IgM抗体では自家製キット使用で不良な成績を示していた。これら検査異常はCRS発生増加や無用な中絶を招いた可能性がある。当時はHI抗体価とIgM抗体の精度管理は系統的に行われていたわけではなく、全国的な精

度管理を持続して行っていく必要がある。

I. 健康危険情報

精度管理が十分なされていない検査で診断が行われると、CRS 発生や無用な中絶を増加させる可能性がある。

J. 研究発表

1. 論文

風疹抗体検査の問題点と商業検査機関の現代医療における意義

産婦人科の実際：干場 勉、朝本明弘、矢吹朗彦. 38:1171-1179, 1989

2. 学会発表

K. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案

なし

3. その他

国際的動向を踏まえた診断薬の品質管理に関する研究

主任研究者	国立感染症研究所免疫部	竹森利忠
分担研究者	藤田保健衛生大学小児科	浅野喜造
研究協力者	国立療養所南福岡病院小児科	岡田賢司
	国立療養所三重病院小児科	庵原俊昭

医療での風疹診断検出キットに関する評価

医療現場での風疹抗体検査の目的と検査上の問題点

1. 風疹抗体検査

日常臨床の現場では、診療科によって異なるが、以下のような目的で検査が行われている。

- (1) 発疹性疾患が風疹であるかどうかの診断
- (2) 将来妊娠・出産する可能性のある女性の抗体保有の有無
- (3) 次の妊娠を期待する出産直後の女性の抗体保有状況
- (4) 先天性風疹症候群の診断
- (5) 妊婦の抗体保有状況
- (6) 地域住民の血清疫学調査

2. 小児科での相談症例と風疹抗体検査の現状

症例1. 妊娠10週の妊婦。

妊娠6週でHI抗体価が1024倍、2回目は512倍と言われました。

IgM抗体はマイナスだそうです。

予防接種を受けたのは14歳で、現在24歳。

- 1) かかりつけの先生からは最初は諦めた方が良いと言われ、再検査で抗体価が下がっていて、IgM抗体検査で陰性だったので、希望はあると言われた。
最終判断はご夫婦に任せる。
- 2) お互いの両親に相談したら、少しでも気になる検査があり、100%確実でないなら、産まれてくる赤ちゃんの将来的なことも考えて、今回は諦めた方が良くはないかとも言われました。

妊娠を継続し子どもを生み育てていく楽しみや迷い、人工妊娠中絶のリスク、風疹検査の意義や検査の誤差範囲などを説明し、何度か検査（HI 抗体、IgM 抗体）を受けるようにお願いしました。以後 2 回の検査では HI 抗体価は 1028 倍、512 倍、IgM 抗体は陰性のままでした。妊娠を継続し、無事に出産しました。

症例 2

現在二人目を妊娠中（16 週）です。血液検査で **IgM** が陽性でした。

一人目の時、風疹抗体がなかったので子供が 1 歳を過ぎた **2 年前**に、子供と一緒に **予防接種**を受けました。

その後、抗体がついたかどうかの検査はしていません。

母子手帳に、風疹（±）IgM：1.15 HI ×128 と記入されています。

主治医の先生の話では、

- (1) 先天性風疹症候群の子供が生まれる可能性は低いですが 100%ないとは言い切れないとされています。
- (2) 予防接種以降風疹にかかったとは思えないのですが、IgM が陽性ということは、最近風疹にかかったことになるのでしょうか？
- (3) 主治医の先生は、風疹の抗体が 128 倍で、最近風疹にかかったとは考えにくいと言っています。風疹にかかっていなくても、IgM が陽性になることはあるのでしょうか？

○IgM 抗体の再検査の問題点

- ・ 外注先の民間検査機関における使用キット名が検査案内では不明。このため、検査担当者に電話で問い合わせをする必要がある。
- ・ 別の検査キットで再検査をお願いするとき、それをどの検査機関が採用しているかの情報がない。
- ・ 検査キット毎で、基準値や単位が異なり臨床現場は混乱している。

- 検査機関への要望：各検査機関の案内に採用している検査キットの情報を掲載していただきたい。