

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

HBs抗原定量の問題点

- 国立病院機構大阪南医療センターで発覚したHBs抗原測定値が
高濃度域において低値に乖離する現象について -

研究分担者 脇岡 泰三 国立病院機構大阪南医療センター 統括診療部長

研究要旨 B型慢性肝炎の病態の研究及び治療法の進歩により、HBs抗原の測定は、定性的な役割だけでなく、HBs抗原量の経時的測定がB型肝炎治療の効果判定・予測に有用なマーカーとして、近年注目されている。2013年末に、国立病院機構大阪南医療センターにおいて、HBs抗原測定値がHBs抗原高濃度域において顕著に低値に乖離するという現象を経験したので、その詳細を報告した。当院消化器科外来通院中のB型慢性肝炎患者において経時的に観測していたHBs抗原量が、今までそれほど大きな変動を示していなかった患者の多くにおいても前値に比して30%前後低下している現象に外来主治医が気づき臨床検査科に通報した。HBs抗原（定量）測定キットのロットが2013年10月18日にZS3002からZS3003へ変更になっていた。精度管理用の試薬ヴィラトロールL1,L2を用いた測定では、規程の範囲内に測定値はおさまっており、精度管理上の問題はなかった。しかし、ZS3003を用いたヴィラトロールL1,L2の測定値 1.79 ± 0.04 、 10.24 ± 0.32 IU/mLは、ZS3002を用いた測定値 2.06 ± 0.10 、 11.48 ± 0.59 IU/mLに比較して低値（ $p < 0.0001$ ）を示していた。2013年10月18日から2013年12月3日までの間にZS3003でHBs抗原量を測定したB型慢性肝炎患者42例のHBs抗原量測定値は 2340.98 ± 5181.08 IU/mLであった。一方、これらの患者の前回、前々回、前々前回のHBs抗原の測定値はそれぞれ 3570.56 ± 8516.18 、 3692.05 ± 8582.29 、 3407.41 ± 7128.30 IU/mLであり、これらに比して有意に低下していた（ $p=0.02$ 、 0.016 、 0.007 ；paired t-test）。以上より、HBs抗原測定キットのロットZS3003に問題があるものと考え、試薬キット製造会社に原因究明を要求した。

精査の結果、HBs抗原測定キット試薬構成成分の内、ALP標識抗HBsモノクローナル抗体（マウス）2種のうちの変異HBs抗原との反応をカバーするモノクローナル抗体Bの活性が低下していたことに起因することが判明した。製品出荷前の品質管理検査にてこの現象をとらえることができなかった原因は、製品管理用血清が、メジャーなHBs抗原と反応するモノクローナル抗体Aと主に反応しており、変異HBs抗原があまり含まれていない検体群であったために、変異HBsAgに反応するモノクローナル抗体Bの不良には反応しなかったことであることが、その後の調査により判明した。製品管理用血清

を充実させ製造時の検査体制の強化が求められた。患者のHBs抗原量の経時変化に関しては、その変化が患者血清中のHBs抗原量そのものの変化であると思われていたが、測定キットに反応しにくい変異HBs抗原の混合比率の変化を反映している場合もあると推測される。HBs抗原測定キットで使用されるHBs抗体には、より多くの変異HBs抗原に対応できるものであることが望まれる。

研究協力者

佐藤康子 国立病院機構大阪南医療センター
臨床検査科 医化学主任
渡邊清司 国立病院機構大阪南医療センター
臨床検査技師長

える。また、2011年11月にはペグインターフェロン 2aがB型慢性活動性肝炎に対しても追加承認されHBeAg陰性症例にもインターフェロン療法が実施できるようになり、治療法の選択肢が拡充された。

A. 背景

B型慢性肝炎の治療薬として、1985年にインターフェロン療法が認可され、13年前の2000年11月に核酸アナログ製剤のLamivudineが保険適応となり導入された。その後、2004年12月にAdefovir、2006年9月にEntecavirが導入されB型慢性肝炎患者の予後・QOLは飛躍的に改善してきたとい

HBs抗原は、HBcr抗原とともに、HBV感染肝細胞核内に存在するcccDNAから作成されるmRNAから合成される産物であり、progenomicRNAから逆転写酵素により作成されることから核酸アナログ製剤の直接の影響を受けるHBVDNA量と違って、肝細胞内のHBVの活動性を反映すると考えられている(図1)。

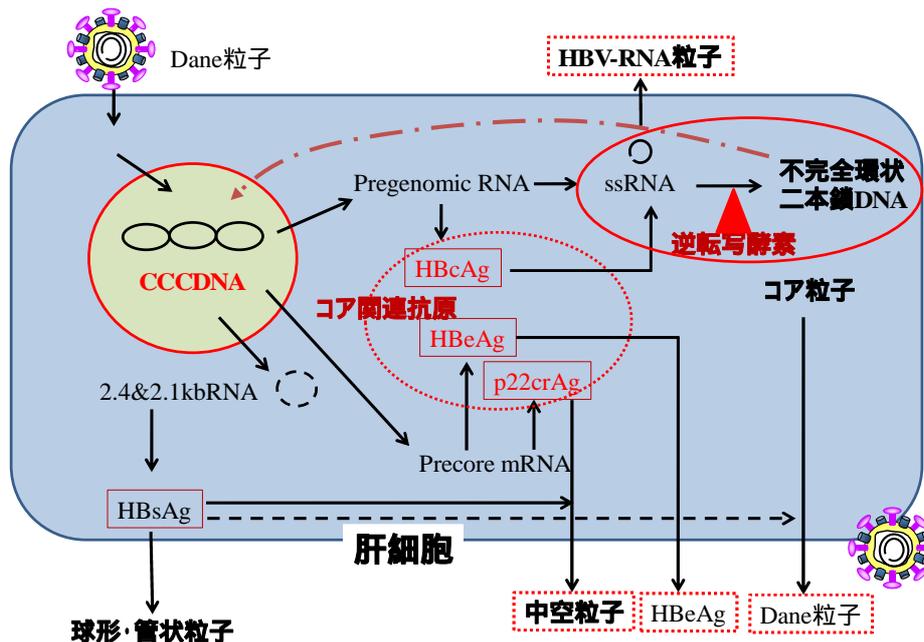


図1. B型肝炎ウイルスの感染・増殖

松本ら¹⁾は、核酸アナログ製剤で治療中のB型慢性肝炎患者でHBe抗原陰性かつ血中HBVDNAが検出感度以下の場合に、核酸アナログ製剤を中止した際の再燃リスクを中止時のHBs抗原量 (<80、80 <800、800 IU/ml)とHBcr抗原量 (<3.0、3.0 <4.0、4.0 log U/ml)でスコア化し、予測することが可能であると報告している。日本肝臓病学会のB型肝炎治療ガイドラインにおいても、このスコアリングシステムが採用されている。

一方、R.Moucariら²⁾は、HBe抗原陰性のB型慢性肝炎患者に対するPEG-IFN 2a治療において、HBs抗原量の早期低下により、SVRの達成(治療終了後24W時のHBVDNA陰性化)を予測できると報告している。このような状況下において、HBs抗原の測定は、HBs抗体やHBc抗体の測定と合わせて、HBVへの感染状況を判定したり、B型肝炎治療のエンドポイントであるHBs抗原の陰性化を確認するための定性的な役割だけでなく、HBs抗原の定量がB型肝炎治療の効果判定や効果予測に有用なマーカーとして近年注目されている。

我々も、B型慢性肝炎患者の診療において、その治療効果・予後予測の為、HBs抗原量の変化を重要視し、定期的に測定してきた。2013年11月になって突然、HBs抗原測定値が、高濃度域において顕著に低値に乖離するという現象を経験したので、その詳細を報告する。

B. 現象

大阪南医療センター消化器科にて治療しているB型慢性肝炎患者の多くを外来にて診療している医師Hが、2013年11月第2週目の受診予定の患者データを診察前にチェッ

クしていたところ、HBs抗原量がそれほど大きな変動を示していなかった患者の多くにおいてもHBs抗原量が前値に比して30%前後低下していることに気付いた。第3週目になっても同様の傾向が持続した(図2)ことから、大阪南医療センター臨床検査科に対して、HBs抗原測定の精度管理に問題がないか確認を行った。2013年10月18日にHBs抗原(定量)測定キットのロットがZS3002からZS3003へ変更になっていたが、精度管理用の試薬ヴィラトロールL1,L2を用いた測定では、規程の範囲内に測定値はおさまっており、精度管理上は問題がないとのことであった。しかし、2013年10月18日以降に使用したZS3003を用いたヴィラトロールL1,L2の測定値 1.79 ± 0.04 、 10.24 ± 0.32 IU/mLは、それ以前に使用していたZS3002を用いた測定値 2.06 ± 0.10 、 11.48 ± 0.59 IU/mLに比較して有意に低値($p < 0.0001$)を示していた(表1)。2013年10月18日から2013年12月3日までの間に問題ロットであるZS3003でHBs抗原量を測定したH医師が経過観察中のB型慢性肝炎患者42例のHBs抗原量測定値の経時変化を図2に示す。この期間のHBsAg量は 2340.98 ± 5181.08 IU/mLであったのに対して、前回、前々回、前々前回のHBs抗原の測定値はそれぞれ 3570.56 ± 8516.18 、 3692.05 ± 8582.29 、 3407.41 ± 7128.30 IU/mLであり、これらに比して有意に低下していた($p = 0.02$ 、 0.016 、 0.007 ; paired t-test)。また、前回、前々回、前々前回のHBsAg量の測定値間には有意な変動はみられていなかった。以上より、HBs抗原測定キットのロットZS3003に問題があるものと考え、試薬キット製造会社に原因精査を要求した。

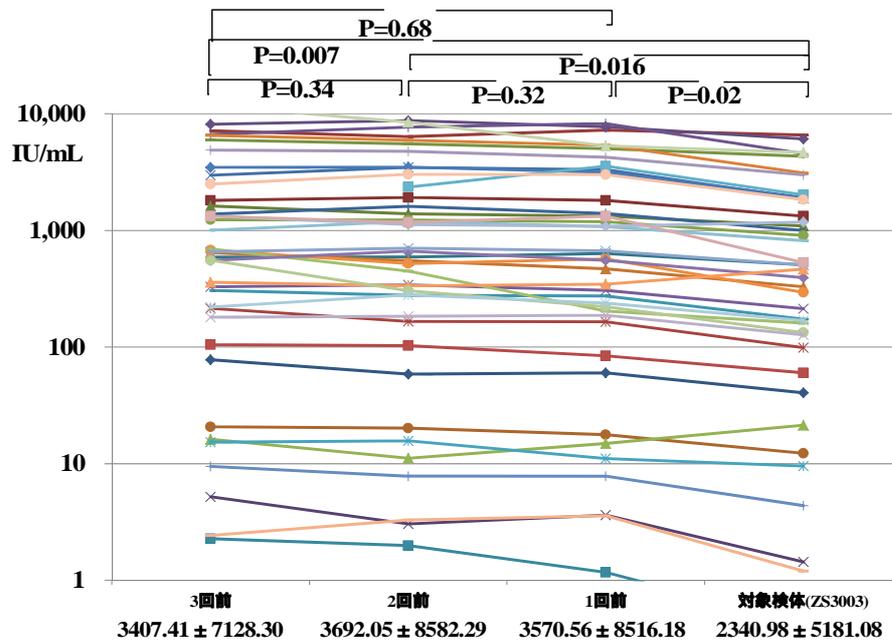


図2. 2013/10/18～2013/12/03の期間にHBs抗原を測定したB型慢性肝炎患者におけるHBs抗原量の経時変化 (n=42; paired t-test)

表1. 当院臨床検査科におけるHBs抗原測定に関する精度管理データ

精度管理日	ロット	L1	L2
2013/10/1	ZS3002	1.96	10.64
2013/10/2		1.98	11.00
2013/10/3		1.97	11.10
2013/10/4		1.99	10.88
2013/10/7		2.01	10.78
		2.19	11.97
		2.13	11.97
		2.14	12.02
		2.18	11.93
2013/10/8		2.16	12.06
		2.07	11.71
		2.15	12.14
2013/10/8		2.11	12.15
2013/10/9		2.04	11.44
2013/10/10		2.06	11.76
2013/10/11		2.10	11.79
2013/10/15		2.09	11.29
		1.81	10.38
2013/10/16		2.14	11.97
2013/10/17		1.86	10.63
mean (n=20)	2.06	11.48	
SD	0.10	0.59	

精度管理日	ロット	L1	L2
2013/10/18	ZS3003	1.77	10.58
2013/10/21		1.78	9.87
2013/10/22		1.74	10.52
2013/10/23		1.76	9.81
2013/10/24		1.74	10.35
2013/10/25		1.77	10.53
2013/10/26		1.81	10.35
2013/10/28		1.78	10.36
2013/10/29		1.81	10.24
2013/10/30		1.82	10.03
2013/10/31		1.82	10.41
2013/11/5		1.74	9.52
2013/11/8		1.76	9.97
2013/11/15		1.82	10.54
2013/11/22		1.90	10.53
mean (n=15)	1.79	10.24	
SD	0.04	0.32	

L1: ヴィラトローラーL1
L2: ヴィラトローラーL2

L1	ZS3002	L2
P<0.0001	「	」
	ZS3003	P<0.0001

C . 原因究明

当院でのHBs抗原測定で前回より大きく測定値が低下していた6例の前回と今回の保存血清を提供し、問題ロットZS3003と良品ロットZS2007を用いて同時測定を行い比較検討してもらった(表2)。ZS2007でのHBs抗原の再検測定値 1921.23 ± 2378.74 IU/mLに対して問題ロットZS3003での再検測定値は 1159 ± 1401.18 IU/mLと低下し($p=0.02$)、低下率の平均は約35%であり、やはりこのロットに問題があることが明らかになった。

当院で使用しているHBs抗原測定キットは、固相側に2種類、標識側に2種類の合計4種類のマウスモノクローナル抗体を用いた化学発光酵素免疫測定(2ステップサンドイッチ法)であり、その反応フローを図3に示す。R1:ビオチン結合抗HBsモノクローナル抗体(マウス)を液相で検体中のHBs抗原と反応させ、その後R2:ストレプトアビジン結合磁性粒子を添加し、アビジン・ビオチン反応によって、R1と反応したHBs抗原を磁性粒子へトラップし、固相化したうえで洗浄することにより一次B/F分離を効率化している。その後R3:ALP標識抗HBsモノクローナル抗体(マウス)と液相で反応させた後、再度固相化して洗浄(2次B/F分離)液相化でR4:緩衝液、R5:化学発光基質を添加し、その発光強度を測定する。ロット間の格差が生じる可能性があるステップはR1からR3までの反応であると考えられることから、HBs抗原測定キット試薬構成品の組み合わせ試験が実施された(表3)。即ち、問題ロットの反応試薬のうち、R1,R2,R3のいずれかを良品ロットのものに置換した測定キットを作成し、良品ロット、問題ロットの測定値と比較検討された。R1,R2の反応試薬を良品ロットのものに置換した調整ロット1、2では、その測定値は問題ロットでの測定値とほぼ同等であったのに対してR3を良品ロットのものに置換した調整ロット3では、その測定値は良品

ロットでの測定値とほぼ同等にまで回復していた。このことから、R3:ALP標識抗HBsモノクローナル抗体(マウス)に問題があることが明らかとなった。

R3:ALP標識抗HBsモノクローナル抗体(マウス)は、メジャーなHBs抗原と反応するモノクローナル抗体Aと変異HBs抗原との反応をカバーするモノクローナル抗体Bの2種類の混合物であり、その後の検討から、問題ロットでは、変異HBs抗原との反応をカバーするモノクローナル抗体Bの活性が低かったことが判明した。また、検体を、モノクローナル抗体AとBの混合比率を変えた調整キットで測定してみると、その混合比率に相関してその測定値が増減するものと、ほとんど影響うけないものなどが見られることが明らかとなった。

今回の測定値が低値になる現象は、すべての検体で発生するものではなく、一部の検体、特に高濃度域で発生し、また、大きく低下している患者とそれほどでもない患者がいたが、患者血清中に含まれる変異したHBsAgの比率が患者ごとに違ったため、モノクローナル抗体Bの活性低下の影響の受け方に差がでたものと考えられた。

なお、製品出荷前の品質管理検査にてこの現象をとらえることができなかった原因が、製品管理用血清が、メジャーなHBs抗原と反応するモノクローナル抗体Aと主に反応しており、変異HBs抗原があまり含まれていない検体群であったために、変異HBsAgに反応するモノクローナル抗体Bの不良を検知することができなかったことにあると、その後の調査により判明した。

試薬キット製造会社では、モノクローナル抗体Aとモノクローナル抗体Bそれぞれに反応する管理用血清を充実させ、製造時の検査体制の強化を今後図ってゆくとのことであった。

表2. HBs抗原測定値変化の大きな症例(6例)の保存血清を用いた再検値

症例	採血日	当院での測定値			保存血清での再検値		ZS2007-ZS3003	
		ZS3001	ZS3002	ZS3003	ZS3003 (不換ロット)	ZS2007 (換品ロット)	低下量	低下率(%)
A	2013/8/6	8,229.89			3,514.51	5,712.31	2,197.80	38.5
	2013/11/5			4,562.87	3,326.55	5,994.55	2,668.00	44.5
B	2013/8/6	238.41			190.50	243.25	52.75	21.7
	2013/11/5			168.40	130.43	162.33	31.90	19.7
C	2013/8/9	4,248.06			2,743.98	4,559.44	1,815.46	39.8
	2013/11/8			2,992.50	2,494.86	3,975.55	1,480.69	37.2
D	2013/8/15		568.76		271.60	411.23	139.63	34.0
	2013/11/22			294.52	295.76	441.34	145.58	33.0
E	2013/8/23		164.26		76.81	121.60	44.79	36.8
	2013/11/15			98.69	60.37	88.51	28.14	31.8
F	2013/10/11		1,174.66		404.07	694.52	290.45	41.8
	2013/11/8			529.55	399.94	650.11	250.17	38.5
		mean (n=12)			1159.12	1921.23	762.11	34.8
		SD			1401.18	2378.74	984.49	7.5
					└ P = 0.02 ─┘			
精度管理			ヴィラトロール - L1		2.10	1.83	-0.27	-14.8
			ヴィラトロール - L2		11.72	10.78	-0.94	-8.7

図3. HBs抗原測定(HISCL)キットの反応フロー

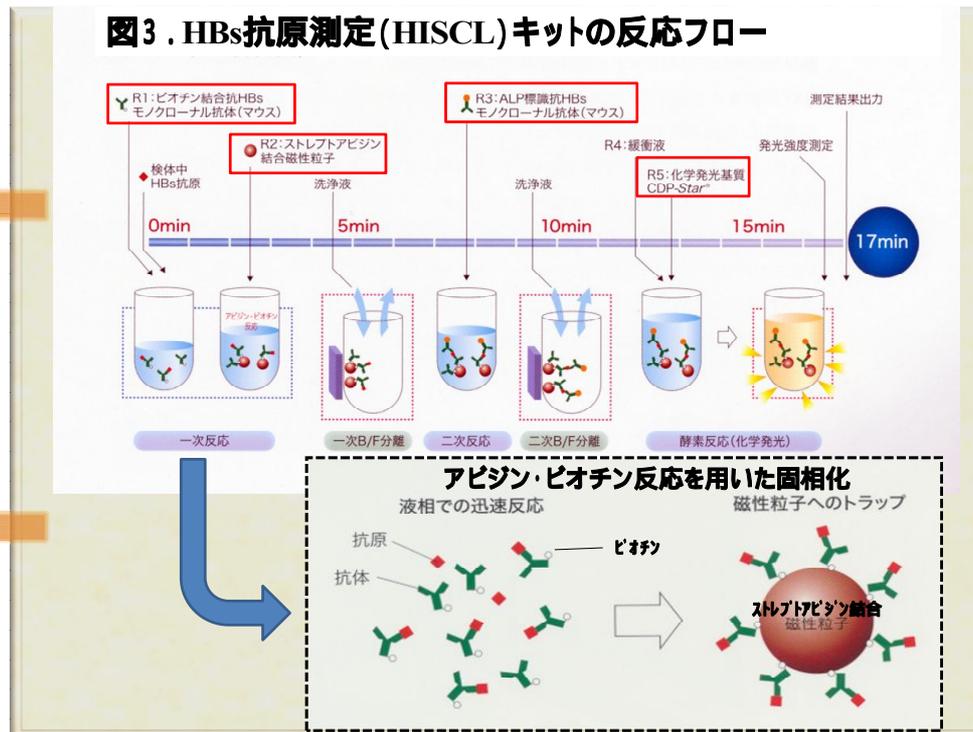


表3 . HBs抗原測定キット試薬構成部品組み合わせ試験

反応試薬	良品ロット	調整ロット1	調整ロット2	調整ロット3	不良ロット
R1	A1	A1	B1	B1	B1
R2	A2	B2	A2	B2	B2
R3	A3	B3	B3	A3	B3

R1: ビオチン結合抗HBsモノクローナル抗体(マウス)

R2: ストレプトアビジン結合磁性微粒子

R3: ALP標識抗HBsモノクローナル抗体(マウス)

D . 再検結果

2013年10月18日から2013年12月3日までの間に問題ロットであるZS3003を用いてHBs抗原量を測定したB型慢性肝炎患者の保存血清を良品ロットZS2007を用いて再測定した。各患者におけるこの測定値とそれまでのHBs抗原量測定値との比較を図4に示す。前回の測定値に比し、平均で12.3%低下

(-73.2% ~ +75.7%)したが、修正値 3252.07 ± 7562.25 は、前回、前々回、前々前回と比較しても有意な変化は見られなかった($p=0.11, 0.08, 0.67$; paired t-test)。対象となるHBs抗原量測定値は、ZS2007で測定されたものに電子カルテ上で修正を行った。

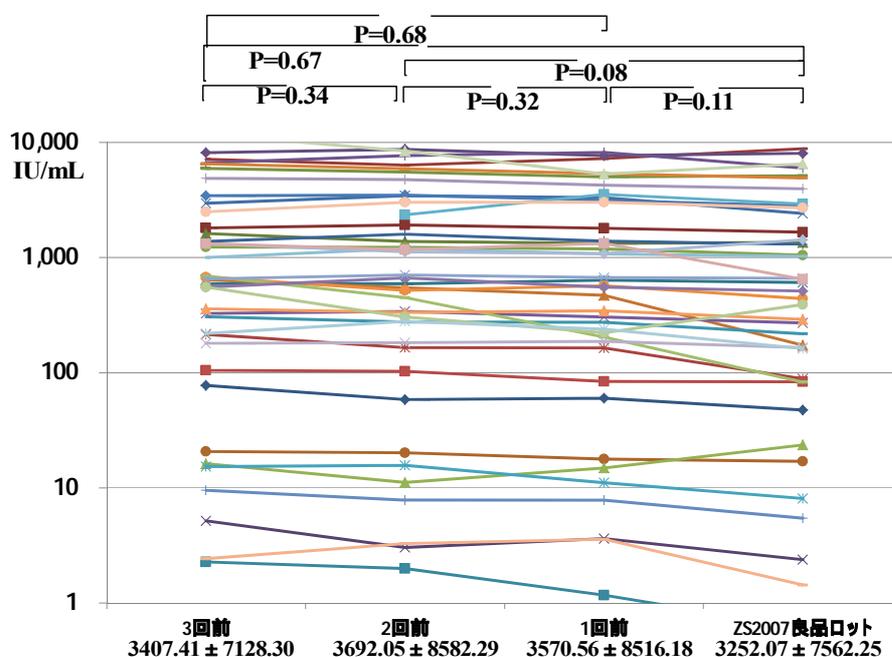


図4 . 2013/10/18~2013/12/03の期間にHBs抗原を測定したB型慢性肝炎患者におけるHBs抗原量の経時変化 修正後 (n=42; paired t-test)

E . 考察

HBs抗原は HBc抗原とともに、HBV感染肝細胞核内に存在するcccDNAから作成されるmRNAから合成される産物であり、progenomicRNAから逆転写酵素により作成されることから核酸アナログ製剤の直接の影響を受けるHBVDNA量と違って、HBs抗

原量は肝細胞内のHBVの活動性を反映すると考えられている。

この為、HBs抗原の測定は、HBs抗体やHBc抗体の測定と組合わせて、HBVへの感染状況を判定したり、B型肝炎治療のエンドポイントであるHBs抗原の陰性化を確認するための定性的な役割だけでなく、B型肝炎

治療の効果判定や効果予測にHBs抗原量が有用なマーカーとして近年注目されている。したがって、HBs抗原量の経時変化をフォローアップすることは臨床上大変重要である。

今回、我々は測定キットのロット変更後に、HBs抗原定量値が多くの患者で約20%前後減少していることに気づき、問題ロットの精査を試薬製造メーカーに求めた。ALP標識抗HBsモノクローナル抗体(マウス)2種のうち、変異HBs抗原との反応をカバーするモノクローナル抗体Bの活性が低下していたことに起因することが判明した。測定キットの不備、ロット間格差はあってはならない話で、出荷前に、企業として内部コントロールで、確認、管理すべき事柄であり、今までの管理体制がどうだったのか問われる事案である。実際、製品管理用血清は、変異HBs抗原をあまり含んでいない検体群であったために、メジャーなHBs抗原と反応するモノクローナル抗体Aと主に反応しており、変異HBsAgに反応するモノクローナル抗体Bの活性低下を検知することができなかった。製品管理用血清を充実させ製造時の品質管理体制の強化が求められた。HBs抗原測定キットは、いくつかのメーカーから発売されているが、それぞれにおいて、どのような製品管理がなされているのか確認する必要があると思われる。

なお、我々が使用していたHBs抗原測定キットでは、0IU/mLから2500IU/mLまで測定可能で、それよりも高濃度である場合には、自動的に血清を希釈して測定されるようにセッティングされている。キャリブレーションは、0、0.25、2.5、25、250、2500 IU/mLの6ポイントを用いて行われることになっているが、精度管理用に提供されている2種類の試薬ヴィラトロールL1,L2のHBs抗原濃度は2.0IU/mL、11.5IU/mLであり、その測定範囲と比較して極めて低いレンジに限定

されている。これは、歴史的にHBs抗原測定が、定性的意味合いを重要視してきたことに起因すると思われるが、高濃度域までの定量が重要視される現在では、測定限界である2500IU/mLでの精度管理も追加されるべきではないかと考える。高濃度領域での測定値のばらつきは、希釈により増幅される危険性があり、より注意が払われるべきであろう。

今回、問題ロットを使つての患者血清の測定では、その低下に患者間でばらつきがみられたことは、患者血清中のHBs抗原には、wild typeのHBVから産出されるHBs抗原だけでなく、PreS/S領域の変異を持ったHBVから産生されたいろいろな変異HBs抗原が存在していることを示している。測定キットで使用されているHBs抗体に反応しない変異HBs抗原が出現すれば、その患者のHBs抗原の測定は正確性を欠くものになってしまう。また、患者のHBs抗原量の経時変化に関しても、その変化が患者血清中のHBs抗原量そのものの変化であると思われていたが、測定キットに反応しにくい変異HBs抗原の混合比率の変化を反映している場合もあると推測される。HBs抗原測定キットで使用されるHBs抗体には、より多くの変異HBs抗原に対応できるものであることが望まれる。

F . 結語

2013年10月18日以後に当院で測定したHBs抗原値が、それまでの測定値に比して多くの患者で低値を呈した原因は、測定キットのロット変更によるものであり、当該ロットを構成するALP標識抗HBsモノクローナル抗体(マウス)のうち変異HBs抗原との反応をカバーするモノクローナル抗体Bの活性低下によるものであった。また、製品管理用血清が、メジャーなHBs抗原と反応するモノクローナル抗体Aと主に反応しており、変異HBs抗原があまり含まれていない検体群であったためこのモノクローナル抗体Bの活

性低下を検出することができなかった。

製品管理用血清を充実させ製造時の検査体制の強化が求められた。患者のHBs抗原量の経時変化に関しても、その変化が患者血清中のHBs抗原量そのものの変化であると思われるが、測定キットに反応しにくい変異HBs抗原の混合比率の変化を反映している場合もあると推測される。HBs抗原測定キットで使用されるHBs抗体には、より多くの変異HBs抗原に対応できるものであることが望まれる。

(文献)

- 1) A.Matsumoto, et al. Hepatol Res 2005; 32:173-84
- 2) R.Moucari,et al. Hepatology 2009;49: 1151-1157

G . 研究発表

なし。

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし。