

小児生活習慣病健診受診者 3,774 例を対象とした 肝炎ウイルス感染状況および、B 型肝炎ウイルス検査測定系の比較

研究代表者： 田中 純子¹⁾

研究分担者： 小山 富子²⁾、

研究協力者： 高橋 文枝³⁾、片山 恵子¹⁾、山本 周子¹⁾、永島 慎太郎¹⁾、山下 真未¹⁾

1) 広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 疫学・疾病制御学

2) 公益財団法人岩手県 予防医学協会 事業推進部 産業健診課

3) 公益財団法人岩手県 予防医学協会 医療技術部 臨床検査課

Working Group member :

オーソクリニカル・ダイアグノスティックス株式会社（木次 克彦、藤原 稔也）、

シスメックス株式会社（谷口 充、小田原 卓哉）、

株式会社 特殊免疫研究所（伊藤 行夫、須天 由貴子）、

富士レビオ株式会社（磯村 光男）

広島大学（田中 純子）

岩手予防医学協会（小山 富子）

研究要旨

2016 年 10 月から HBV 水平感染予防のために WHO 基準に沿った universal vaccination（生後 1 年以内に HB ワクチンを 3 回接種）が開始されることとなった。1986 年から実施されている HBV 母子感染予防対策の効果の再評価とともに、universal vaccination 導入前の現在の小児における HBV 感染状況を把握すること、及び B 型肝炎ウイルス検査試薬間の標準化を目的として本研究を行った。

今回の調査は、2016 年から 2 年間にわたり、大規模小児検体 3,774 例を対象とした、上市されている各種測定系の標準化の評価ワーキングとなった。

試薬間で一致した HBs 抗原陽性者は 0 例であり、小児における HBs 抗原陽性率は非常に低いことが明らかとなった。一方、試薬間で一致した HBsAb 陽性率は 0.61%(95%CI:0.36~0.97)、HBcAb 陽性率は 0.026%(95%CI:0.001~0.15)であった。試薬間での乖離が認められ、成人とは異なる小児特有の抗体反応がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

HBV 水平感染予防のために WHO 基準に沿った universal vaccination（生後 1 年以内に HB ワクチンを 3 回接種）が 2016 年 10 月より開始された。今後、わが国の HBV 感染状況が変化することが予想され、現在の小児における HBV 感染状況を確認しておく必要がある。1986 年から実施されている HBV 母子感染予防対策の効果の再評価とともに、universal vaccination 導入前の小児の HBV 感染状況を把握することを目的として本研究を行った。また、B 型肝炎

ウイルス検査各種測定系の比較評価を行った。

B. 対象と方法

【対象】2016 年 5 月から 2016 年 10 月の期間に岩手県予防医学協会が行った小児生活習慣病予防健診を受診し、本調査研究に対して保護者からの文書による同意が得られた児童のうち、受診時の血清が保存されている小学 4 年生 3,774 名を対象とした。

【方法】

保存血清を用いて HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体を測定した。また、必要な検体については HBV DNA の検出を実施した。

測定項目及び測定試薬は、以下の通り：

- HBs 抗原：CLEIA 法によるルミパルスプレスト® HBsAg-HQ (富士レビオ)及び HISCL™ HBs 抗原(シスメックス) と凝集法によるマイセル II HBsAg(特殊免疫研究所)の 3 試薬。
- HBs 抗体：CLEIA 法によるルミパルスプレスト®HBsAb-N (富士レビオ)、及び HISCL™ HBs 抗体(シスメックス)、凝集法によるマイセル II anti-HBs (特殊免疫研究所)の 3 試薬。
- HBc 抗体：CLEIA 法によるルミパルスプレスト®HBcAb-III (富士レビオ)及び HISCL™ HBc 抗体(シスメックス)の 2 試薬。
- HBV DNA の検出は S region 領域にプライマーを設定した nested PCR 及び Real time PCR により行った。

【評価方法および評価手順】

- ① Working Group meeting は、2016 年 8 月から計 4 回実施した。
- ② 第 1 回 Working Group meeting では、測定項目の提案と測定手順などを説明し、研究協力の有無を確認した。
- ③ 基本的に再測定は行わず、通常のスクリーニング測定 1 回を実施するよう申し合わせとした。
- ④ 第 1 回 Working Group meeting 後、3,774 検体を各社に送付し、各社で測定後、測定結果を研究班に提出した。
- ⑤ 各社測定後、2017 年 2 月、第 2 回 Working Group meeting において測定結果の公表を行い、試薬毎の陽性、定量結果などを検証し、齟齬のあった検体をすべて確認した。
- ⑥ 再測定検体については、各社毎に希望を募り、研究班は順次検体を各社に送付し、再測定後の結果を同様の手順で集積した。また、試薬製造工程の再確認を行い各社毎に最終判定結果を準備した。
- ⑦ 第 3 回 Working Group meeting2017 年 8 月では、再測定後の結果を含んだ試薬毎の陽性率

を再度同様に検証した。1 社から、試薬製造工程の不備の報告があり、製造工程改訂後の lot による最終測定結果が提示された。

- ⑧ さらに、試薬間の結果が乖離している検体について、再測定の希望があった。この間、研究班では HBV DNA 測定を行った。
- ⑨ 第 4 回 Working Group meeting2017 年 11 月では、各社の最終判定結果と研究班の HBV DNA 測定結果を併せて公表した。また、研究班として、各社試薬のスクリーニング最終結果を報告した。
- ⑩ なお、2018 年夏までに各社に、報告書と共にすべての結果を共有する予定である。

【倫理的配慮】 この研究は広島大学疫学倫理審査委員会の承認を得、さらに各共同研究施設において倫理審査を行った。(第疫-E-456-1 号)

C. 結果

1. HBsAg 陽性率

初回測定(第 2 回 Working Group meeting 2017 年 2 月報告)では、解析対象検体 3,774 例のうち、3 試薬とも「陽性」と判定された検体は 0 例であった。マイセル II HBsAg による測定では、「陽性」検体は 0 例(0.00%)、CLIA 法のルミパルスプレスト® HBsAg-HQ による測定では、「陽性」は 31 例(0.82%)、HISCL™ HBs 抗原による測定では 2 例(0.05%)と 3 試薬間で乖離を認めた。

最終的(第 4 回 Working Group meeting 2017 年 11 月報告)では、再検の結果、ルミパルスプレスト® HBsAg-HQ による測定で、初回測定時に「陽性」であった 31 例中 30 例は、再測定および反応阻害試験による確認試験の結果、全例「陰性」と判定された。31 例中 1 例は、再検査時にも「陽性」値(0.058)を呈したが、確認試験により非特異的な反応と判定され、試薬メーカーは「陰性」と判定し、ルミパルスプレスト® HBsAg-HQ による「陽性」検体は 0 例(0.00%)であった。一方、HISCL™ による初回測定では「陽性」は 2 例であったが、再検査の結果、陽性値を再現した 1 例のみ「陽性」(0.026%)と判定された。

解析対象検体 3,774 例のうち、HBsAg 陽性検体はマイセル II HBsAg は 0 例、ルミパルスプレスト® HBsAg-HQ は 0 例、HISCL™ は 1 例(0.026%)と報告さ

れたが、再検時の測定値も陽性値を示したことから、研究班はルミパルスプレスト® HBsAg-HQ の 1 例を「陽性」と判定した。

このルミパルスプレスト® HBsAg-HQ の 1 例と HISCL™ による「陽性」判定の 1 例は異なる検体であった。HISCL™ による「陽性」の 1 例は、HBV DNA は検出されなかった。HBs 抗原陽性率は、0.0~0.026% であった。3 試薬間の一致率は 99.97% であった。

研究班の判定としては、各社の HBs 抗原陽性率を、0.00% (0 例/3,774)、0.026% (1*例/3,774)、0.026% (1 例/3,774) とした(図 1)。

2. HBsAb 陽性率

初回測定(第 2 回 Working Group meeting 2017 年 2 月報告)では、解析対象検体 3,774 例のうち、3 試薬とも「陽性」と判定された検体は 23 例であった。マイセル II anti-HBs による陽性検体は 29 例(0.77%)、ルミパルスプレスト®HBsAb-N による陽性 34 例(0.90%)、HISCL™ HBs 抗体による陽性 162 例(4.29%) であり、試薬間で大きな乖離を認めた。

初回測定時に乖離検体を多く認めた試薬に関して、試薬作製用原料の見直しが行われ、その結果、基準は満たしているものの、試薬作製用原料抗原ロットへの不純物混入割合がやや高かったことにより、疑陽性と判定されたことが確認された。試薬作製用原料抗原ロットの社内基準を改定したことにより、乖離が解消した。

最終的(第 4 回 Working Group meeting 2017 年 11 月報告)では、再測定の結果、各試薬の HBsAb 陽性率は、0.69%(26/3,774)、0.79%(30/3,774)、0.79%(30/3,774) であり、3 試薬とも「陽性」は 23 例、「陰性」は 3,736 例であり、一致率は 99.60%(3,759/3,774) であった。各試薬間の一致率は 99.68~99.79% であった(図 2)。

研究班と各社の陽性判定は同一であった。

3. HBcAb 陽性率

初回測定(第 2 回 Working Group meeting 2017 年 2 月報告)では、解析対象検体 3,774 例のうち、2 試薬とも「陽性」と判定された検体は 1 例であった。ルミパルスプレスト®HBcAb-III による陽性 14 例(0.37%)、HISCL™ HBc 抗体による陽性 24 例(0.64%) であった。2 試薬間の乖離を 36 例に認めた。

最終的(第 4 回 Working Group meeting 2017 年 11 月報告)では、再測定の結果、各試薬の HBcAb 陽性率は、0.37%(14/3,774)、0.42%(16/3,774) であり、解析対象検体 3,774 例のうち、2 試薬とも「陽性」と判定された検体は 1 例であり、28 例に乖離を認めた。2 試薬とも「陽性」は 1 例、「陰性」は 3,745 例であり、一致率は 99.26%(3,746/3,774) であった(図 3)。研究班と各社の陽性判定は同一であった。

D. 考察

3 試薬間で一致した HBs 抗原陽性者は 0 例であり、小児における HBs 抗原陽性率は非常に低いことが明らかとなった。初回測定時に「陽性」となった検体について再検査を行ったところ、陽性値の再現が認められない検体が多く認められた。HBs 抗原「陽性」の場合は、再測定による結果の再現の確認が必要であることが示唆された。また、HBsAg 陽性判定の 1 例について、1 社の測定判定と研究班の判定に齟齬を認めた。

HBs 抗体および HBc 抗体の測定に関しては、試薬間での乖離が認められた。解析対象検体 3,774 例のうち、試薬間で一致した HBsAb 陽性例は 23 例(0.61%)、HBcAb 陽性例は 1 例(0.026%) であった。これまで小児集団について大規模に HBs 抗体および HBc 抗体について測定する機会がなかったことから、成人とは異なる小児特有の抗体反応があることが示唆された。

なお、HBs 抗体測定において、初回測定時に乖離検体を多く認めた試薬に関して、試薬作製用原料の見直しが行われた結果、試薬作製用原料抗原ロットへの不純物混入により、疑陽性が多く見いだされたことが確認され、改良したことにより、再測定では他社との乖離は認められなかった。

E. 結論

今回の調査は、2016 年から 2 年間にわたり、大規模小児検体 3,774 例を対象とした、上市されている各種測定系の標準化の評価ワーキングとなった。

現在の小児の HBV 感染状況を把握することを目的として本研究を行った。HBs 抗原陽性例は 1 試薬の 1 例のみであったが、この 1 例には HBV DNA は検出されなかった。

試薬間で一致した結果から判定した HBsAg 陽性

率は 0.00%、HBsAb 陽性率は 0.61%、HBcAb 陽性率は 0.026%であった。また、成人とは異なる小児特有の抗体反応がある可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

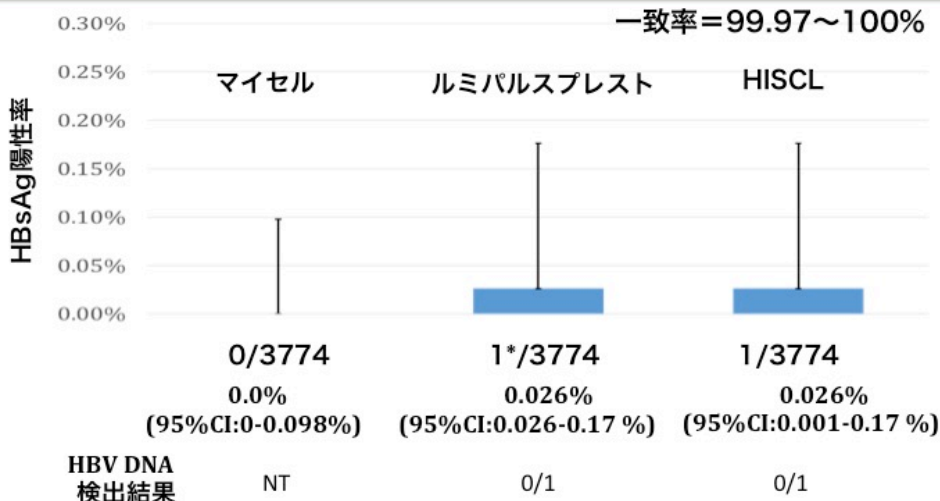
G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

小児健診受診集団3774例の【HBsAg】陽性率 0.0-0.026%



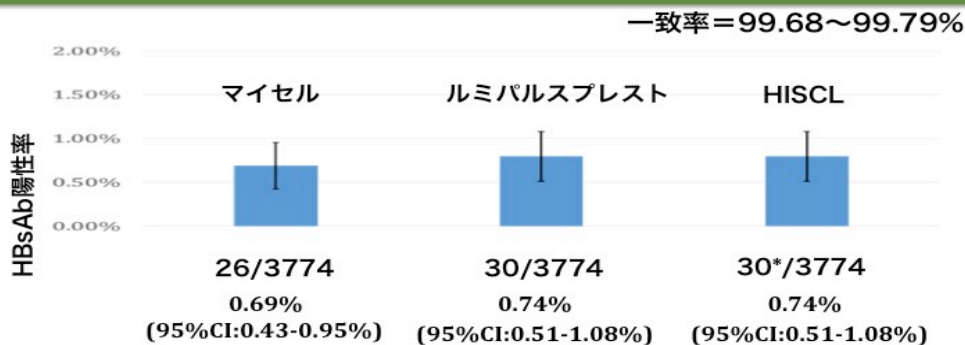
※HBsAg-HQで、再検時も陽性の値「0.058」を呈した1例(No2826)は、反応阻害試験により非特異な反応と判定された(富士レジオ)が、再現性のある陽性範囲の値を示したことから、研究班では「陽性」と判定。

○No2166は、再検後、陽性(0.1)から陰性(0.0)に変更したが、取説のとおり。

17

図 1.試薬別にみた HBsAg 陽性率

小児健診受診集団3774例の【HBsAb】陽性率 0.69-0.74%

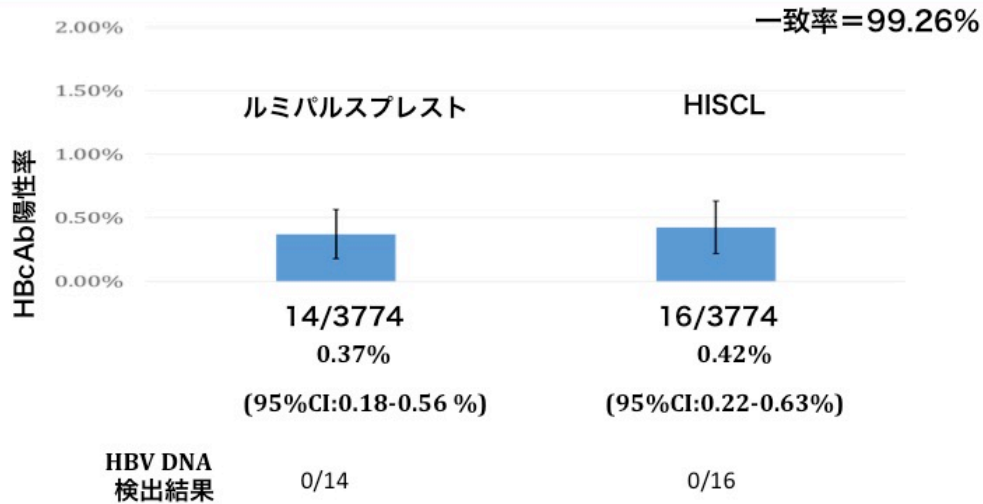


※HISCL HBsAbにおいて、初検時、陽性162例であったことから、原料抗原ロットの評価を行った。
その結果、試薬の原料抗原ロットに不純物の混入による不純バンドが認められ、偽陽性反応である可能性が高いことが判明した。
原料抗原の不純物の混入率は、規定内であったが、原料受け入れ試験の見直しを行うこととした。
以後、測定結果に乖離は見られないことから、再検結果の30例を「陽性」とする。

30

図 2.試薬別にみた HBsAb 陽性率

小児健診受診集団3774例の【HBcAb】陽性率 0.37-0.42%



- 二試薬ともに陽性は1例のみであった。
- 乖離例は、それぞれ、13例、15例となった。

図 3.試薬別にみた HBcAb 陽性率

