

[報告]

高力価域における各種抗HBs抗体価試験間の測定値の乖離

日本赤十字社血漿分画センター

植木英敏, 八木沢綾子, 南 裕,
猪股秀昭, 江村博行, 竹内次雄, 脇坂明美

Discrepancy of Anti-HBs titers among 4 commercially available Anti-HBs assays in the test area with high titer

Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center

Hidetoshi Ueki, Ayako Yagisawa, Yutaka Minami,
Hideaki Inomata, Hiroyuki Emura, Tsugio Takeuchi and Akemi Wakisaka

抄 錄

【背景・目的】血漿分画センターで製造しているHBIG製剤に使用する原料血漿は、全国の血液センターにてCL4800(CLEIA)による抗HBs抗体価が20,000mIU/mL以上の血漿である。今まで、血漿分画センターでは受入れ試験にEIAを用いてきたが、EIAとCLEIAの抗HBs抗体価には大きな乖離が見られることや、国家検定で使用されているELISAにおいても同様な乖離が見られたため、その結果を報告する。

【方法】HBIG原料血漿426本を、EIA、CLIAおよびELISAで抗HBs抗体価を測定し、CLEIAを含め互いに比較した。

【結果】測定法が同じ酵素法によるEIAとELISAでは、比較的良い相関が見られ、同じ化学発光によるCLIAとCLEIAでも、良い相関が見られた。一方、EIAとCLIAでは、メーカーおよび試薬に使用されているHBs抗原が同じであるにも関わらず、相関は悪かった。

【結論】4つのHBs抗体価試験法による抗体価の乖離は、試薬に使用されているHBs抗原サブタイプ(以下試薬抗原サブタイプ)の違いよりも、試験法(測定原理)による違いが大きく影響していると思われた。

Key words: HBIG, Anti-HBs, subtype

はじめに

日本赤十字社は献血時のスクリーニング検査にCLEIA(CL4800・富士レビオ)を2008年より順次導入した。これに伴って、抗HBs抗体価試験の試験方法も、従来のPHAからCLEIAに変更された。現在は、全国の血液センターからCLEIAで20,000mIU/mL以上の血漿がHBIG原料血漿用と

して血漿分画センターに送付されてくる。血漿分画センターではこの血漿に対してEIAによる受け入れ試験を行ってきたが、CLEIAとの抗体価の乖離が大きく、送付血漿の約70%はEIA価10,000mIU/mL未満となり一般原料に転用されている。国内自給率が3%に満たないHBIG製剤においてこの問題は深刻である。

また、国立感染症研究所で使用されているELISAとの間にも大きな乖離が認められたことから、試験法(または試験試薬)によって抗体価の乖離が著しく大きいことが判明した。

これまで、抗HBs抗体価試験については、試験法、試薬の違いにより、抗体価の乖離が認められるという事は以前より報告^{1), 2)}されていたが、測定値は主に試験法の定量限界点である1,000mIU/mL以下のものであった。

そのため、我々が扱う抗HBs抗体価高力価域の検体について、この乖離の原因を探る目的で、EIAの後継機であるCLIAを含め、現在市販されている4法(CLEIA, EIA, CLIA, ELISA)による抗HBs抗体価の測定法の比較検討を行い、改善へ向けての一助としたい。

材料および方法

全国の血液センターからHBIG原料血漿として血漿分画センターに送付された血漿426本(CLEIAで20,000mIU/mL以上)を、EIA(アキシム・アボットジャパン)、CLIA(アーキテクト・アボットジャパン)およびELISA(エンザイグノストAnti-HBs II・シーメンスヘルスケア)で抗HBs抗体価を測定し、互いに比較した。

測定方法は各メーカーの測定マニュアルに従い、抗HBs抗体価を算出した。測定の定量限界域から外れた場合は、添付文書に従って希釈し、測定を行い最終抗体価(エンドタイマー)まで求めた。ただし、日本赤十字社のスクリーニングにおけるCLEIAの抗HBs抗体価は、日本赤十字社のシステム上99,999mIU/mLまでしか表示されないため、これを越えた場合の測定値は100,000mIU/mLとした。

また、希釈時の同時再現性については、各試験において、すべてCV%値が10%以内であることから、測定における値の信頼性は高いと考え、測定回数はすべて1回とした。

結果

CLEIA(CL4800)で20,000mIU/mL以上とされたHBIG原料血漿をEIA(アキシム)、CLIA(アーキテクト)およびELISA(エンザイグノスト)で抗

HBs抗体価を測定し、その値を2次元散布図に点記(プロット)して、互いに比較した。

1. ELISA(エンザイグノスト)とCLEIA(CL4800) (図1a)

ELISA(エンザイグノスト)とCLEIA(CL4800)の間は相関係数 $r=0.19$ と相関に乏しかった。ELISAは国立感染症研究所が国家検定で使用している試験法であり、CLEIAは日本赤十字社が献血時のスクリーニングに使用している試験法である。これに合せて血漿分画センターは平成23年7月よりHBIG原料血漿の受入試験にELISAを採用している。CLEIA価 20,000mIU/mL以上の検体がHBIG原料血漿として血液センターから送付されて来るが、その30%程度しかELISA価10,000mIU/mL以上にならない。今後は、このELISAとCLEIAの相関が一番重要なとなるが、今回の検討の中では最も相関が悪い結果であった。

2. ELISA(エンザイグノスト)とEIA(アキシム) (図1b)

次にELISA(エンザイグノスト)と、これまで血漿分画センターでHBIG原料血漿の受入試験に用いてきたEIA(アキシム)の相関を見た。相関係数 $r=0.63$ と比較的相関が良い結果であった。抗体価が極端に大きく乖離する検体があるため、算出された近似直線の傾きは0.23となるが、散布図上の大半の点は原点を通る斜め45度線周囲にプロットされた。

3. ELISA(エンザイグノスト)と CLIA(アーキテクト) (図1c)

続いてELISA(エンザイグノスト)とCLIA(アーキテクト)の相関を図1cに示した。グラフからも見て取れるように、相関係数 $r=0.23$ と相関性は低く、それぞれの抗体価は大きく乖離している。ELISA価では10,000mIU/mL以下ながらCLIA価が100,000mIU/mL以上となる抗体価が10倍以上も違う検体も多数見られた。

4. EIA(アキシム)とCLEIA(CL4800) (図1d)

図1dにEIA(アキシム)とCLEIA(CL4800)の相関

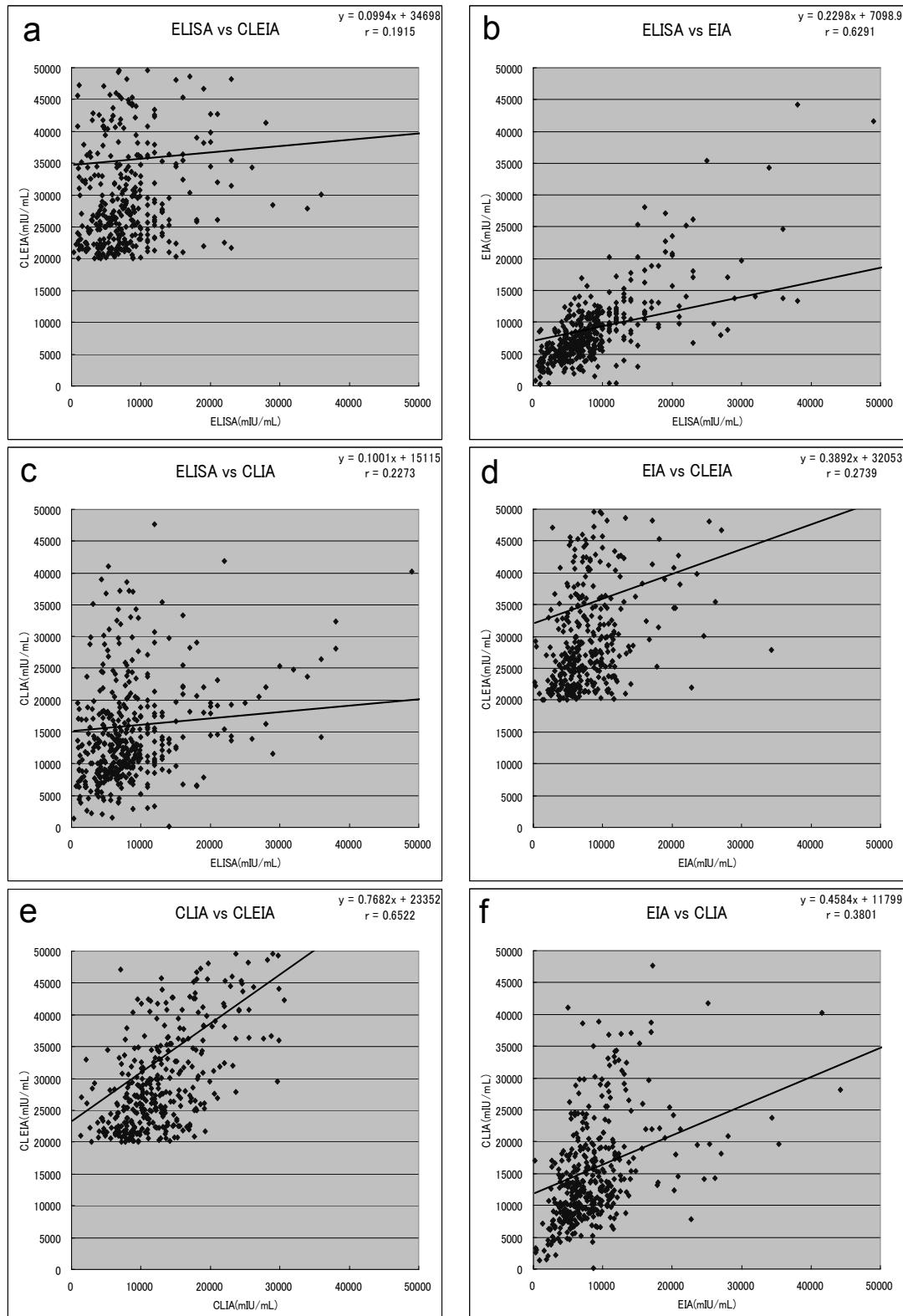


図 1 各試験法間における相関図

表1 各試験方法に対する相関係数と平均抗体価

	対ELISA	対ELA	対CLIA	対CLEIA	平均抗体価
ELISA		0.6291	0.2273	0.1915	11,769.0 mIU/mL
EIA			0.3801	0.2739	9,803.7 mIU/mL
CLIA				0.6522	16,293.2 mIU/mL
CLEIA					35,867.9 mIU/mL

表2 各試験法の比較

試験方法	ELISA	EIA	CLIA	CLEIA
試薬	エンザイグノスト Anti-HBs II	オーサブ・ ダイナパック	アーキテクト・ オーサブ	ルミパルスプレスト HBsAb-N
試薬・機器	シーメンス・ ヘルスケア		アボット・ジャパン	
メーカー				富士レビオ
機械	BEP III	アキシム	アーキテクト	CL4800
アッセイ	1ステップ サンドイッチ法	2ステップ サンドイッチ法		1ステップ サンドイッチ法
試薬抗原 サブタイプ	人由来ad+ay	リコンビナントad+ay		人肝細胞由来 培養adr
B/F分離 基質	固相プレート ChromogenTMB	フィルター 4MUP	磁性粒子	磁性粒子
標準品			WHO標準準拠	AMPPD
測定値	吸光度 (OD)	蛍光強度 (RATE)	化学発光 (RLU)	化学発光 (PMTカウント)
測定レンジ	0 ~ 100mIU	0 ~ 1000mIU	0 ~ 1000mIU	0 ~ 2000mIU
抗体価算出方法	α -法	4PLC	4PLC	スプライン曲線

を示した。図1aのELISA(エンザイグノスト)とCLEIA(CL4800)の相関と同様 $r=0.27$ と非常に低い。但し血液センターは、CLEIAで20,000mIU/mL以上となった検体のみをHBIG原料血漿として血漿分画センターへ送るため、CLEIAで20,000mIU/mL未満の検体の相関は分からない。また、この図から、EIAと比較して、CLEIAの抗体価が非常に高く測定されていることが示される。平成23年7月以前の血漿分画センターのHBIG原料血漿受入試験法はEIAであり、HBIG原料血漿として送付されてきたCLEIA価20,000mIU/mL以上の約70%はEIA価で10,000mIU/mL未満となり、一般原料へ転用されていた。

5. CLIA(アーキテクト)とCLEIA(CL4800) (図1e)

CLIA(アーキテクト)とCLEIA(CL4800)の相関(図1e)は、相関係数 $r=0.65$ と今回調べた試験法間

の中では最も高い相関が見られた。

6. EIA(アキシム)とCLIA(アーキテクト)(図1f)

最後にEIA(アキシム)とCLIA(アーキテクト)について相関を見た(図1f)。CLIAはEIAより概ね高い値を示し、相関係数 $r=0.38$ と低い相関が見られた。

考察

まず、結果で示した各試験方法間の相関係数と平均抗体価を表1にまとめた。相関係数は押しなべて低いが、ELISAとEIA および CLIAとCLEIAの間には比較的の相関が見られた。また、各試験方法の抗体価を見るために、全検体の抗体価の平均値(平均抗体価)を算出したところ、CLEIAの抗体価が他の試験法の抗体価の約3倍高いことが分かった。

次に測定値の乖離が試薬や試験法の違いに起因

表3 CLEIA価階層毎のELISA価平均値および相関係数

CLEIA価階層 (mIU/mL)	本数	ELISA価平均 (mIU/mL)	ELISA価 $\geq 10,000\text{mIU/mL}$ の本数 (合格率)	相関係数
20,000 ~ 25,000	129	9,225	25 (19.4%)	0.1457
25,001 ~ 30,000	100	8,456	24 (24.0%)	0.0963
30,001 ~ 35,000	52	8,781	13 (25.0%)	-0.0507
35,001 ~ 40,000	30	10,283	15 (50.0%)	0.1667
40,001 ~ 45,000	30	8,488	7 (23.3%)	0.1536
45,001 ~ 50,000	17	9,647	6 (35.3%)	0.2121
50,001 ~ 55,000	14	11,014	5 (35.7%)	0.3092
55,001 ~ 60,000	13	10,669	3 (23.1%)	0.0987
60,001 ~ 100,000	41	36,620	19 (46.3%)	-0.0580
計	426	11,769	117 (27.5%)	0.1915

するかを見るために各試験法の特徴を表2にまとめた。当初、EIAとCLIAは同じアボット・ジャパン社の機器であり、試薬抗原サブタイプについてもad+ayと同じリコンビナント抗原を使用していることから、相関性があるものと考えた。文献³⁾からも両者の抗体価については、ワクチン検体かつ1,000mIU/mL以下の低力価域においては、相関性のあるデータが示されている。しかし、今回の高力価域の検討では、両者の相関は非常に低い結果となった。この理由としては、B/F(結合/遊離)分離の違いや試薬に使用されている担体(粒子)の大きさの違い、そして測定系の違いが考えられる。また、CLIAとCLEIAについては、試薬抗原サブタイプが違うことから、相関性が低いと予想していたが、今回の試験法間の中では一番良い相関を示した。両法はEIAとCLIAとは逆に、試薬抗原サブタイプは違うが同じ化学発光法であることや、B/F分離に磁性粒子を使用していることが相関の高い要因であると考えられた。この事から高力価域における抗HBs抗体価の乖離は、試薬に使用されているHBs抗原サブタイプの違いよりも試験法(試験原理)の違いが大きく影響するように思われた。加えて、高力価域においての測定は、希釈測定が必要であるにもかかわらず、希釈直線性が悪いため(成績不提示)、通常域の測定よりも抗体価が乖離するものと考えられた。

表1にて相関性が最も悪かったELISAとCLEIAについてであるが、血漿分画センターでの受け入れ方法がELISAとなつたため、今後、この相関が

とても重要になってくる。今回、CLEIAを抗体価ごとの階層に分け、ELISAの本数、平均抗体価、10,000mIU/mL以上の本数と合格率および相関係数を表3に示した。CLEIA価35,000~55,000mIU/mLでの合格率は若干高いが、いずれの階層においてもおおむね30%前後で、CLEIA価が高い階層においても合格率は上がらなかった。相関係数からも分かるとおり、CLEIA価に拘わらず両者には全く相関性がなかった。CLEIA抗体価が他の試験法の約3倍であった理由の1つに、CLEIAが試薬抗原サブタイプにadrを使用しているため、日本人に多く見られるadrの抗原に対する抗体が、試薬の共通抗原「a」以外の「d」あるいは「r」に対して強く反応し、抗体価を上げた可能性も考えられる。これも測定値の乖離の要因の一つとなる。

また、今回使用した検体の約80%が抗HBc抗体陽性検体(自然感染検体と推定される)であるため、抗HBs抗体の特異性や使用している試薬キットとの反応性が悪いという可能性も考えられた。

これらを総合的に考えると、抗体価の乖離については、乖離要因は1つではなく、さまざまな要因が複雑に影響しているものと考えられる。各メーカーはWHO標準に準拠しているが、あくまでも各試薬でWHO標準を測定した時にその濃度の抗体価になるように設定しているだけである。我々の検討のように多種のパネルを測定した場合は、同じような結果になることが予想される。このことを避けるためには、各試薬で検量線を作成

する際に、WHO標準だけでなく、数種類の試薬抗原サブタイプ別パネルを用意して、どの試薬も同じ抗体価になるように試薬を作るしかないと思

われる。現実的にはとても難しい問題であるが試薬メーカーの努力に期待したい。

文 献

- 1) 水落 利明、他：国内で販売されている抗HBs抗体定量用体外診断用医薬品の評価：国内標準品を用いた検討、臨床検査 52：111-115,2008
- 2) 小方 則夫：国際基準共有に向けたB型肝炎ウイルス感染防御HBs抗体評価標準化の必要性：本邦に

て汎用されるHBs抗体測定法の特性乖離、臨床病理 54：960-965,2006

- 3) 藤原 拓樹 他：全自動化学発光免疫測定装置 ARCHITECTによるHBs抗体価測定の基礎的検討、医学と薬学 第42巻 4：623-627,1999