

標準物質を用いた抗 HBs 抗体定量用体外診断薬の評価

百瀬 暖佳¹⁾ 加藤 孝宣²⁾ 浜口 功¹⁾

B型肝炎はB型肝炎ウイルス(HBV)感染によって引き起こされる感染症である。日本では、HBVキャリアからの出生児にB型肝炎ワクチンを接種することで母子感染の防止が図られてきたが、2016年よりB型肝炎ワクチンは定期接種に位置付けられている。ワクチン接種後に抗HBs抗体価が10mIU/ml以上に上昇した場合、HBVに対する感染防御抗体を獲得したとされる。抗HBs抗体価を測定する体外診断用医薬品は、各メーカーから様々なキットが販売されているが、キット間で測定値に差異が生じていることが問題となっていた。2008年に標準物質の1つである抗HBs抗体国内標準品を用いたキットの性能評価が実施された。その結果、キットによって測定値に3倍以上の差が生じている可能性が示され、キットの改良が行われた。また、新たなキットの市場導入もあったことから、2008年から現在までの抗HBs抗体キットの動向を調査するため、2種類の標準物質を用いて再評価を行った。その結果、測定値のキット間差は最大で2.1倍程度まで軽減しており、キット間差の軽減(標準化)が進んだものと考えられた。

キーワード：体外診断用医薬品、抗HBs抗体、性能評価

緒 言

ウイルス検出を目的とする体外診断用医薬品(診断薬)は、各メーカーから様々なキットが販売され、国内外で使用されている。診断薬の黎明期には使用するキットにより陰性/陽性判定や測定値に乖離が見られることが問題となっており、世界保健機関(WHO)により各測定項目に対応した国際的な標準物質(国際標準品)の整備が進められた。国際標準品を単一の標準物質とすることにより、各診断薬における測定値のキット間差の軽減がはかられ(標準化)、核酸等のウイルス本体を対象とした診断薬では標準化が進んだ¹⁾。一方で抗ウイルス抗体は抗体反応に個人差がある上、測定系も多様であることから、ウイルス核酸等を対象とした診断薬と比較して標準化が困難な場合が多い²⁾³⁾。

抗ウイルス抗体のうち、抗HBs抗体はB型肝炎ウイルス(HBV)の感染既往のマーカーであり、かつHBVに対する感染防御抗体(10mIU/ml以上)の指標ともなる⁴⁾。2016年から日本においてもB型肝炎ワクチンが定期接種化されており、抗HBs抗体キットの重要性は高まっている。一方で抗体測定系の標準化の難しさは抗HBs抗体キットにも当てはまり、キットによって抗体価に乖離がある事が報告されている^{5)~8)}。2008年に国内標準品を用いて実施された性能評価では、国内8キットの測定値に3倍以上の差が生じる場合があることが

示された⁹⁾。これを受けて一部のキットが改良された結果、乖離は1.4倍に縮小されたが、その後新たな抗HBs抗体キットが多く市場に導入された。抗体価の単位についても、2008年当時は管数や国際単位(IU)が混在していたが、新規に市場導入されたキットでは国際標準品に準拠したIU表記となっている。そこで、本研究ではWHO国際標準品、および国内標準品を用いて抗HBs抗体キットの再評価を行うことにより、その動向を検討することを目的とした。

方 法

1. 評価検体

第2次WHO抗HBs人免疫グロブリン国際標準品(WHO 2nd International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human (NIBSC Code : 07/164))は英国機関 National Institute for Biological Standards and Control より入手した¹⁰⁾。

第1次抗HBs人免疫グロブリン国内標準品は、国立感染症研究所にて整備したものをを用いた⁹⁾。なお、国内標準品は2017年に第2次国内標準品にロット更新され¹¹⁾、第1次国内標準品は現在交付されていないが、2008年時の評価結果との比較のために本研究では第1次国内標準品を用いた。各標準品の表示値を参考に400mIU/mlに調整し、25mIU/mlまで2倍の段階希釈を行った。

1) 国立感染症研究所血液・安全性研究部

2) 国立感染症研究所ウイルス第二部

〔受付日：2020年5月26日、受理日：2020年6月26日〕

表1 各キットにおける HBs 抗体価測定値の線形回帰分析における傾きと R² 値, および期待値に対する比率

No.	キット名	メーカー名	使用抗原サブタイプ*	測定原理	傾き**	R ² **	測定値/期待値の平均(%)**
1	E テスト「TOSOH」II (HBsAb)	東ソー株式会社	adr	IEMA	1.298 1.338	0.9982 0.9992	133.2 129.7
2	エクルーシス試薬 Anti-HBsII	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社	ad + ay	ECLIA	1.165 1.225	0.9991 0.9992	133.3 138.0
3	ビトロス HBs 抗体 II	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社	ad + ay	CLEIA	0.8828 0.9048	0.9991 0.9996	87.3 97.2
4	マイセル II anti-HBs	株式会社特殊免疫研究所	ad	PHA	1.000 1.000	1.000 1.000	100.0 100.0
5	オーサプ・アボット (アーキテクト)	アボットジャパン合同会社	ad + ay	CLIA	1.057 1.189	0.9965 0.9982	112.1 128.3
6	オーサプ・アボット (Alinity i)	アボットジャパン合同会社	ad + ay	CLIA	0.8966 1.064	0.9993 0.9995	97.3 115.1
7	ステイシア CLEIA HBs 抗体	株式会社 LSI メディエンス	ad	CLEIA	1.461 1.695	0.9997 0.9989	151.7 172.1
8	エンザイグノスト Anti-HBs II***	シーメンスヘルスケアダイアグノスティクス株式会社	ad + ay	ELISA	1.122 1.078	0.9953 0.9949	94.8 88.7
9	ケミルミ HBs 抗体 II	シーメンスヘルスケアダイアグノスティクス株式会社	ad + ay	CLIA	0.7152 0.8037	0.9984 0.9977	72.3 81.3
10	HISCL HBsAb 試薬	シスメックス株式会社	ad	CLEIA	1.169 1.127	0.9997 0.9986	122.0 113.4
11	ルミバルス HBsAb-N	富士レビオ株式会社	adr	CLEIA	0.8813 0.9937	0.9991 0.9997	95.7 101.4
12	ルミバルスプレスト HBsAb-N	富士レビオ株式会社	adr	CLEIA	0.8676 0.9287	0.9994 0.9994	92.4 96.5
13	ルミバルスプレスト HBsAb-III	富士レビオ株式会社	adr	CLEIA	0.9135 0.9663	0.9996 0.9995	90.1 94.3

*: 文献¹⁰⁾, および各キットの添付文書等.

** : 上段が国際標準品, 下段が国内標準品のデータ.

*** : 測定範囲外のため 400mIU/ml は線形回帰分析から除外.

標準品の希釈は, 抗 HBs 抗体陰性が保証され, かつ人血清に類似のものとして牛血清を用いた¹²⁾. 各検体はチューブに分注後, -80℃ に保管した.

2. 測定と解析

一般社団法人日本臨床検査薬協会を通し, 国内で市販されている抗 HBs 抗体キット(定量系のみ)の各メーカーへ測定を依頼した. 測定協力の同意が得られたメーカーへ評価検体を送付し, 3重測定にて抗 HBs 抗体価測定を行った. 今回評価を行ったキットは表1の9社13キットである. アクキュラシード HBs 抗体(富士フィルム和光純薬株式会社)は, 今回使用した希釈液の影響により試験不成立となったため, 解析から除外した.

測定値の解析は国立感染症研究所において行った. 3重測定を行った測定値の平均値を求め, 期待値に対してプロットし, 線形回帰分析を行った. キットの測定範囲外であった検体のデータは解析から除外した. また, 全キットで測定範囲内にあった 25~200mIU/ml の検体について, 期待値に対する測定値の比率(%)をそれぞれ算出し, その平均値を求め, キット間の測定値の乖離度を評価した. 有意差の解析には統計解析ソフト GraphPad Prism 8 (有限会社エムディーエフ)を使用し, マン・ホイットニーの U 検定を用いて P<0.05

を有意差ありの基準とした.

結 果

各キットにおける抗 HBs 抗体価の測定値をプロットし, 期待値に対する線形回帰分析を行った. 国際標準品では回帰直線の傾きが 0.7152~1.461 ($r^2=0.9953\sim 1.000$), 国内標準品では 0.8037~1.695 ($r^2=0.9949\sim 1.000$) となった(図1, 表1).

キット間の測定値の乖離度を検討するため, 期待値に対する測定値の比を 25~200mIU/ml の検体において算出し, それらの平均値を求めた(表1). 期待値に対する比率は国際標準品で 72.3~151.7% であり, キット間差は 2.1 倍以下であった. 同様に, 国内標準品では 81.3~172.1% であり, 測定値のキット間差は最大で 2.1 倍であった.

各キットが使用している抗 HBs 抗体捕捉用/検出用抗原のサブタイプ, 測定原理, 較正用基準物質が測定値に与える影響を検討した. 抗体捕捉/検出用の抗原が ad + ay 抗原の 6 キットの測定値は, 期待値に対する比で国際標準品が 72.3~133.3%, 国内標準品が 81.3~138.0% であった(表1). ad 抗原の 3 キットの測定値は国際標準品が 100.0~151.7% で国内標準品が 100.0~172.1%,

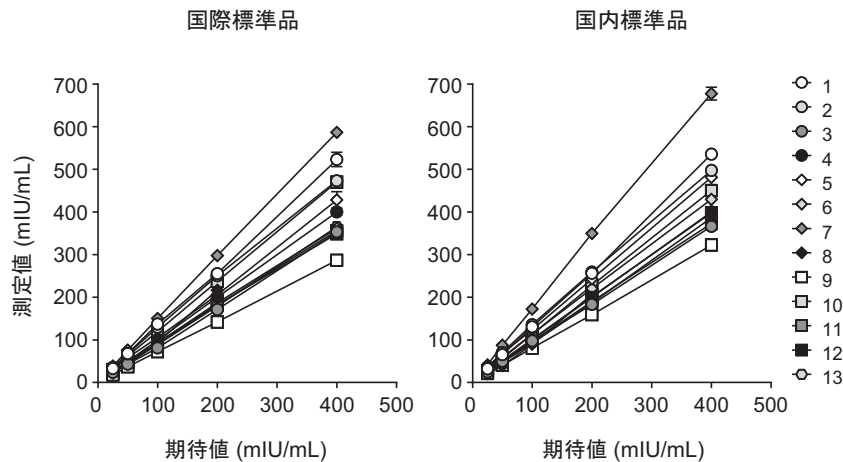


図1 各キットにおける抗HBs抗体価

国際標準品, および国内標準品を400~25mIU/mlまで2倍希釈し, 各ポイントにつき三重測定した平均値(±標準偏差)を期待値に対してプロットした. 番号は表中の各キットのNo.に相当する. キットの測定範囲外にあった検体は解析から除外した.

adr抗原の4キットの測定値は国際標準品が90.1~133.2%で国内標準品が94.3~129.7%であり, 測定値の差に明確なサブタイプ依存性は認められなかった(表1). 測定原理ではCLEIAが13キット中6キットと最も多く, 次いでCLIAが3キットであった. CLEIAとCLIAで測定値(対期待値比)を比較したところ, 国際標準品, 国内標準品ともにp値は0.9048であり, 有意差はなかった. また, 各キットが使用している較正用基準物質のロットについて, オーサブ・アボット(アーキテクト), オーサブ・アボット(Alinity i), ステイシアCLEIA HBs抗体, エンザイグノスト anti-HBs II, ルミパルスプレスト HBsAb-IIIの5キットが第2次を, それ以外が第1次国際標準品を使用している. 較正用基準物質のロットによる測定値(対期待値比)の差はいずれも $p=0.8329$ であり, 有意差はなかった.

考 察

2008年に国内標準品を用いて行った評価では, 評価対象となった6社8キットの測定値は期待値に対して50.1~169.2%を示し, その差は最大で3.4倍程度であった⁹⁾. 今回, 国内で市販されている9社13キットを用いて行った再評価では, 国内標準品の測定値は期待値に対して81.3~172.1%であり, キット間差は最大で2.1倍に減少していた. また, 国際標準品においてもキット間差は2.1倍以下であった. 未だキット間差は存在するものの抗HBs抗体価には収束の傾向がみられ, 2008年の調査時よりもキットの標準化が進んだものと考えられた.

評価に使用した国際標準品, および国内標準品は抗HBs抗体陽性検体を集めたプール検体から製造されたものであり, 測定値に影響を与える個々の検体由来

の因子は平均化されていると推定される. したがって, 今回の評価で見られた測定値の差は, 主にキットに起因している可能性が高いと考えられた. キットによる測定値の違いの要因として, まずは抗HBs抗体の捕捉/検出用抗原のサブタイプが挙げられる⁵⁾. 各キットのデータを検討したところ, 抗原のサブタイプによる測定値の差は明確でなく(図1, 表1), 測定値の違いを使用抗原のサブタイプのみで説明するのは難しいと考えられた. 次に, 各キットの測定原理の違いが抗HBs抗体価の測定値乖離の原因となる可能性が挙げられた⁵⁾⁷⁾. 検討した結果, CLEIA(6キット)とCLIA(3キット)の測定値に有意差は認められなかった. 表1に示す通り, 抗HBs抗体キットではCLEIAを測定原理とするキットが最も多い. CLEIAのみに限定した場合の測定値の差は1.7~1.8倍程度であり, 全キットでのキット間差を大きく改善するものではなかった. CLEIAを測定原理としていても捕捉用抗原の固相化方法や反応時間等はキットによって異なるため, 同じ測定原理のキットでも測定値にはある程度の差が生じうる事, この差は測定原理を起因とする差よりも大きい可能性が考えられた. また, 抗HBsキットは較正用標準物質として全キットが国際標準品を用いている. 国際標準品は2008年にロット更新されており, 標準品のロットの違いがキットによる測定値の差を生じている可能性も考えられたが, 今回の評価では測定値の明確な差は認められなかった. したがって, 抗HBs抗体価の測定値に影響を与えるキット側の要因は一つではなく, 抗体捕捉/検出用抗原のサブタイプ, 測定原理, 測定工程など, 様々な要因が複合的に関与しているものと考えられた.

抗HBs抗体価の測定に際して, 現在でもキット間差はあるものの, 2008年の調査から約10年間で抗HBs

抗体価のキット間差は収束の傾向が見られた。通常の検査で臨床検体の抗 HBs 抗体価を測定する場合は、キット側の要因に加えて検体側の因子も複雑に関与しているため、抗 HBs 抗体キットの完全な標準化は難しいであろう。ある程度のキット間差は許容されうるべきであるが、今後一層の標準化が進むことを期待したい。

結 論

国内で市販されている抗 HBs 抗体キットについて、国際標準品、および国内標準品を用いた性能評価を行った。評価した全 13 キットでの測定値の乖離は最大で 2.1 倍であり、2008 年から現在までの約 10 年の間に抗 HBs 抗体測定キットの標準化が進んだと考えられた。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：一般社団法人日本臨床検査薬協会、および測定にご協力頂いた各診断薬メーカーに深謝します。本活動は、AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業（課題番号：18mk0102070、19mk0201146、20mk0102146）の助成によって行われました。

文 献

- 1) Baylis SA, Chudy M, Nübling CM: Standardization of NAT for Blood-Borne Pathogens. *Transfus. Med. Hemother.*, 42: 211—218, 2015.
- 2) Dimech W, Grangeot-Keros L, Vauloup-Fellous C: Standardization of Assays That Detect Anti-Rubella Virus IgG Antibodies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 29: 163—174, 2016.
- 3) Bouthry E, Furione M, Huzly D, et al: Assessing Immunity to Rubella Virus: a Plea for Standardization of IgG (Immuno) assays. *J. Clin. Microbiol.*, 54: 1720—1725, 2016.
- 4) World Health Organization: Hepatitis B vaccines: WHO position paper - July, Wkly. Epidemiol. Rec., 92: 369—392, 2017.
- 5) 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 抗体測定法の特異性乖離—。 *臨床病理*, 54: 960—965, 2006.
- 6) Huzly D, Schenk T, Jilg W, et al: Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis B virus surface antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 1298—1306, 2008.
- 7) 植木英敏, 八木沢綾子, 南 裕, 他：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。 *血液事業*, 35: 41—46, 2012.
- 8) Raven S, Hautvast J, Steenbergen JV, et al: Diagnostic performance of serological assays for anti-HBs testing: Results from a quality assessment program. *J. Clin. Virol.*, 87: 17—22, 2017.
- 9) 水落利明, 小高千加子, 山口一成：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.
- 10) Ferguson M, Yu MW, Heath A: Calibration of the second International Standard for hepatitis B immunoglobulin in an international collaborative study. *Vox Sang.*, 99: 77—84, 2010.
- 11) 百瀬暖佳, 松岡佐保子, 落合雅樹, 他：多施設共同測定による第 2 次抗 HBs 人免疫グロブリン国内標準品の力価制定。 *日本輸血細胞治療学会誌*, 65: 771—773, 2019.
- 12) Knauer O, Volkens P, Nick S, et al: Report of the WHO collaborative study to establish the first international standard for detection of antibodies to hepatitis B virus e antigen (anti-HBe). WHO Expert Committee on Biological Standardization (2013: Geneva, Switzerland), WHO/BS/2013.2229, 2013.

EVALUATION OF *IN VITRO* DIAGNOSTIC KITS FOR ANTI-HBs QUANTITATIVE ASSAYS USING THE INTERNATIONAL STANDARD AND JAPANESE NATIONAL STANDARD.

Haruka Momose¹⁾, Takanobu Kato²⁾ and Isao Hamaguchi¹⁾

¹⁾Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

²⁾Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Abstract:

Hepatitis B is caused by hepatitis B virus (HBV) infection. Hepatitis B vaccine has been given to infants of HBV carriers to prevent mother-to-child transmission in Japan. In 2016, Hepatitis B vaccine was introduced into universal vaccination. An anti-HBs titer of 10 mIU/ml or higher after vaccination is considered to indicate the acquisition of protective immunity against HBV. Many *in vitro* diagnostics kits for anti-HBs are available to measure anti-HBs titer but observed titers may differ among kits. In 2008, anti-HBs quantification kits were evaluated using the Japanese National Standard for anti-HBs immunoglobulin. Results suggested greater than three-fold differences in observed titers among kits. Some kits were subsequently improved, and new anti-HBs kits have been introduced into the market. In this study, we re-evaluated anti-HBs quantification kits using two reference materials. The differences in observed titers among kits has decreased, to 2.1 times or less.

Keywords:

In Vitro Diagnostics, anti-HBs, evaluation