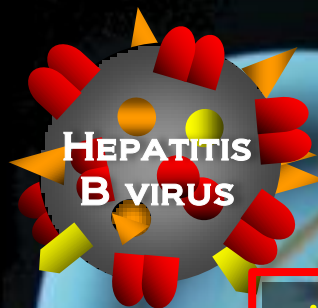


B型肝炎に係わる諸問題

免疫学的測定法を用いた肝炎ウイルス検査の 現状と問題点



抗原検出 ……HBs抗原検査法

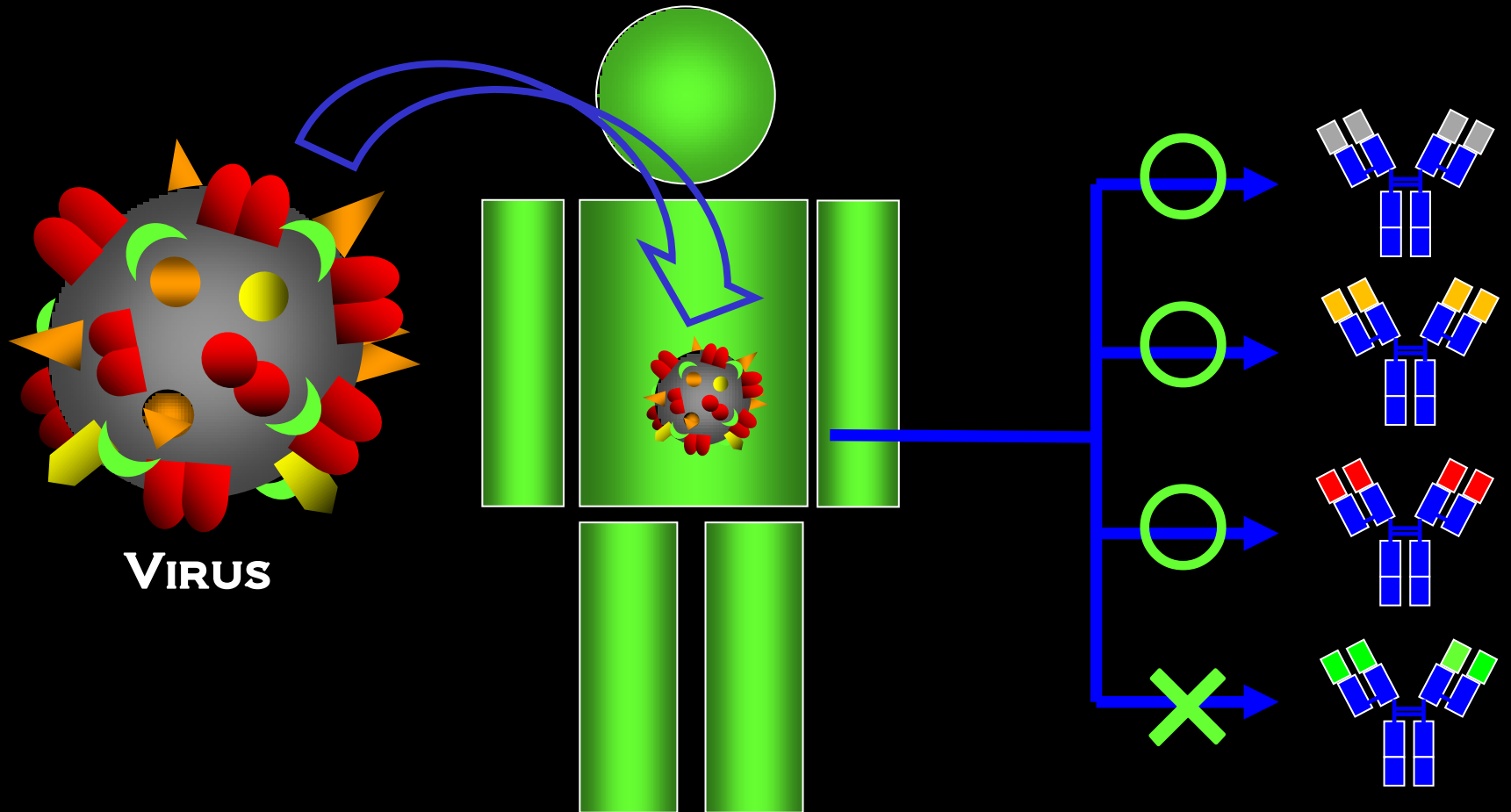
運用上の問題点

宿主の免疫応答

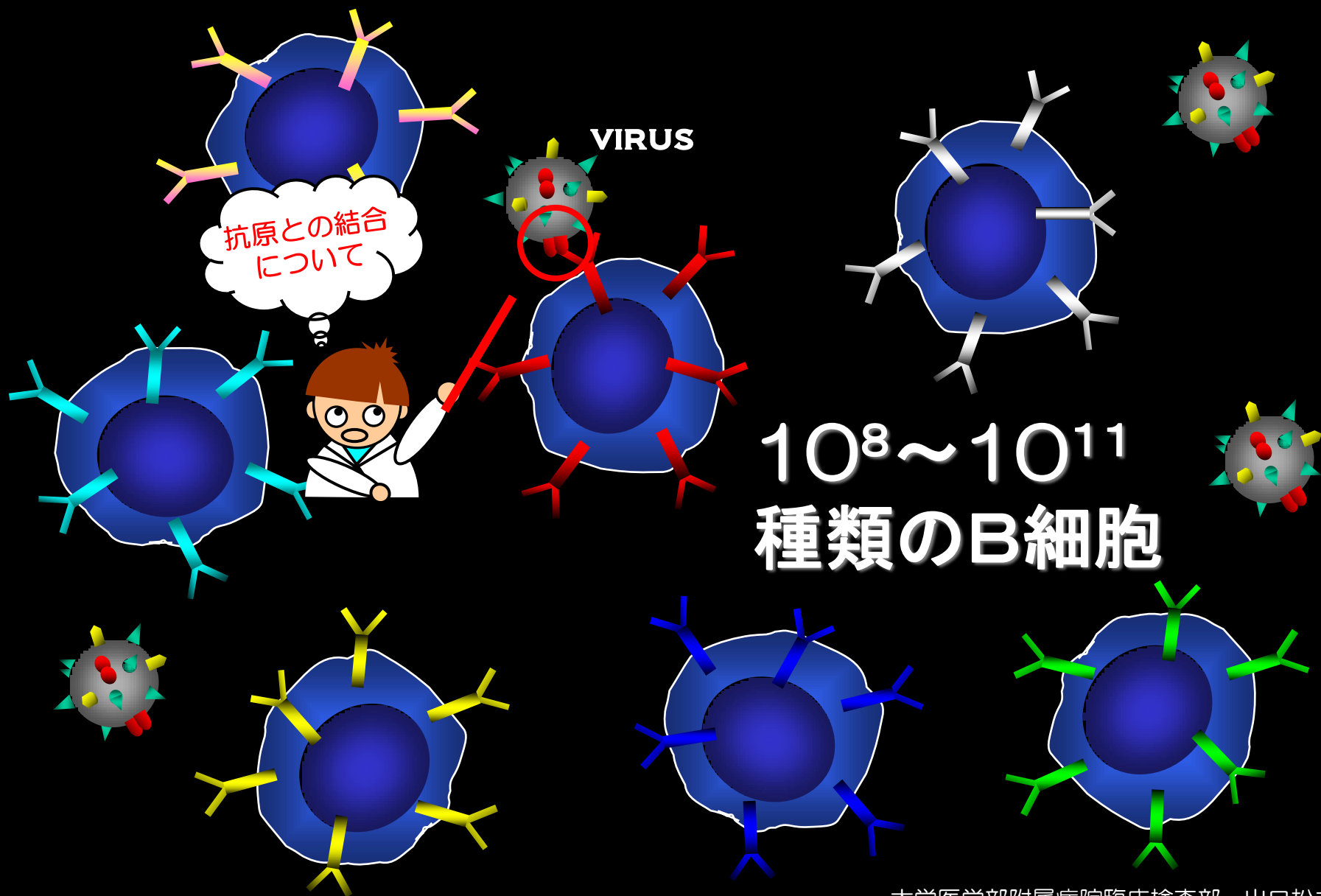
抗体検出 ……HBs抗体検査法

宿主の免疫応答 について

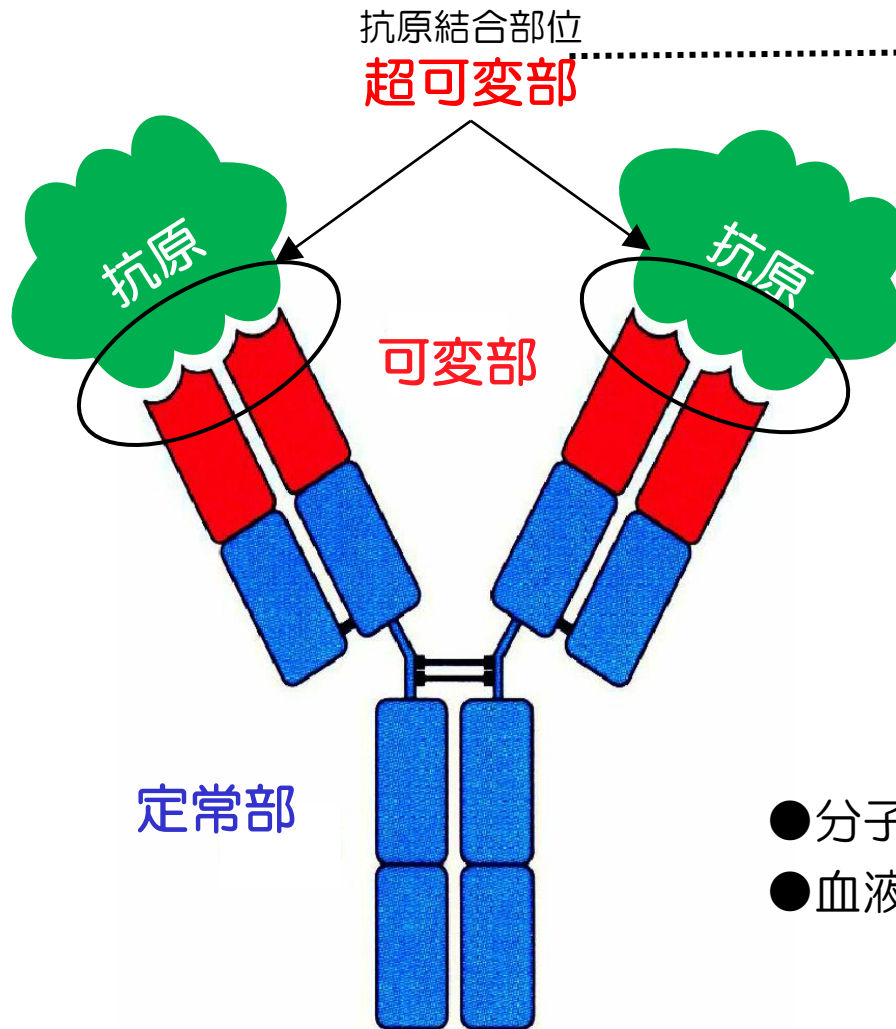
ウイルス等の非自己成分が生体に侵入すると・・・



抗体産生の始まりは、B細胞とVirusの出会い



抗体 (IgG) とは



- 理論上： 10^{11} 種類
- 5~40個のアミノ酸を抗原として認識

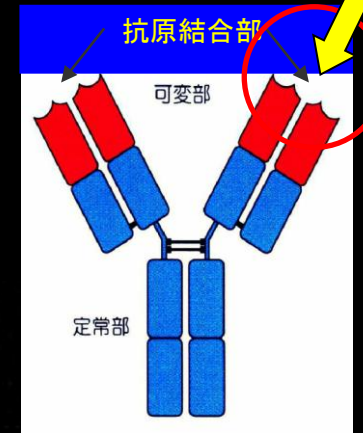
- 分子量：15~16万
- 血液濃度：8~16g/L
(800~1600mg/dL)



超可変部と抗原との結合 (空間充填描画法)

可変部における抗原結合部位を上から描いた図

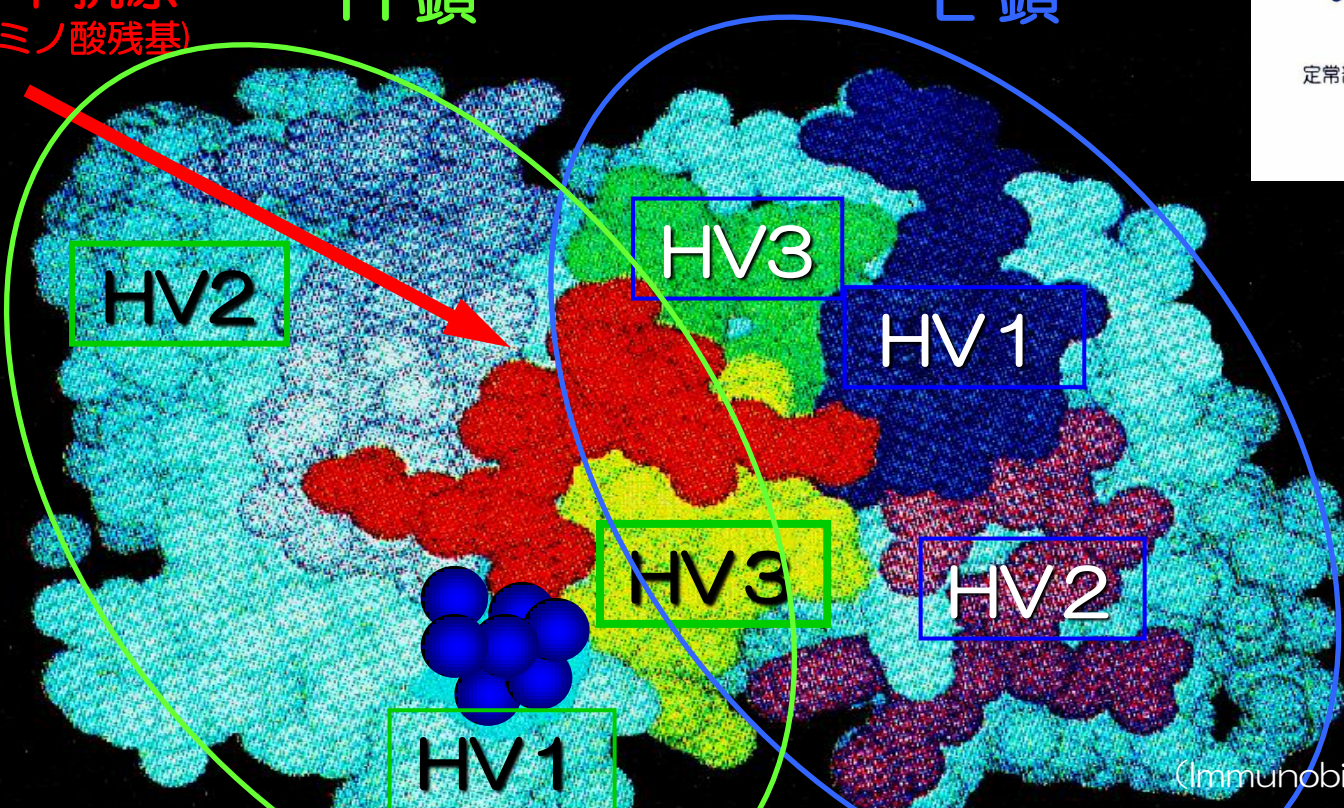
H鎖, L鎖共に3箇所の超可変部 (HV) を持つ



ペプチド抗原
(7個のアミノ酸残基)

H鎖

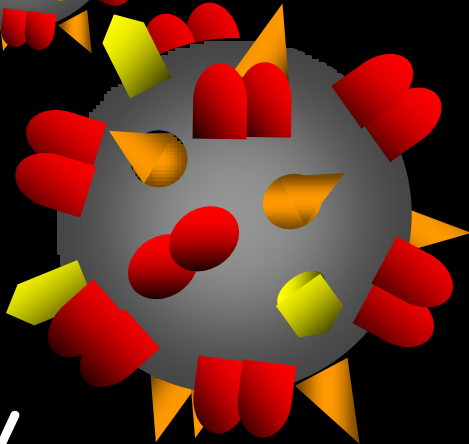
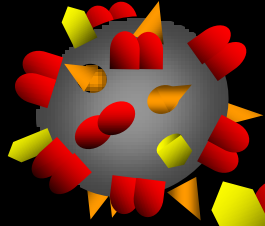
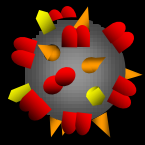
L鎖



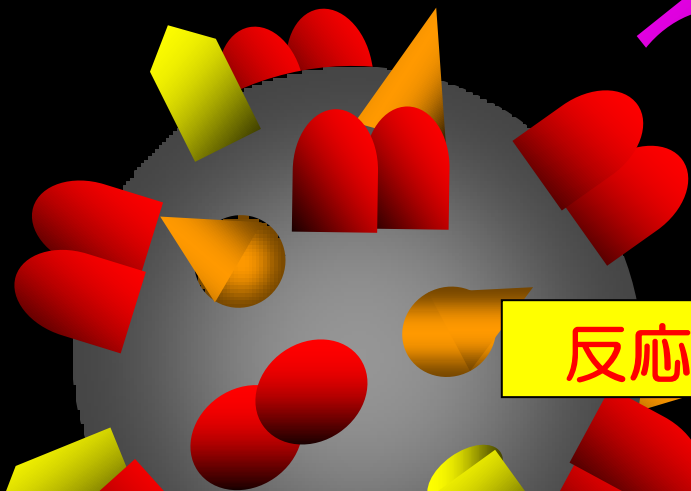
(Immunobiology 5th より)

**抗原との結合は、
6箇所の全ての超可変部位と結合する必要はない**

B細胞による抗原の認識（その1）



HBV



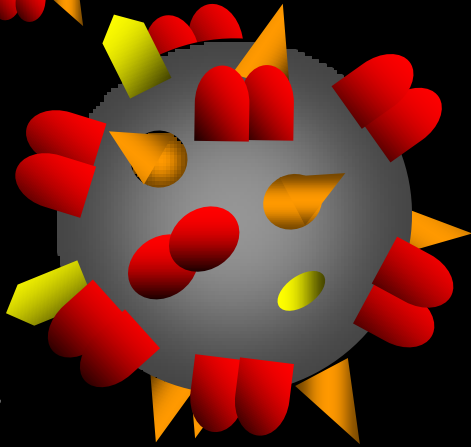
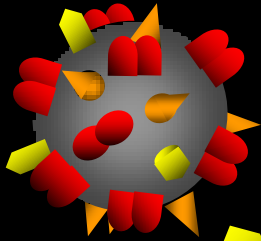
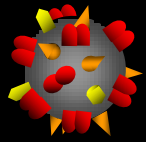
単クローンのレセプター

立体構造を識別
5~40アミノ酸

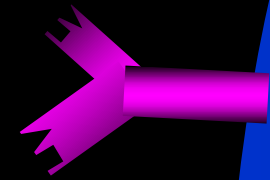
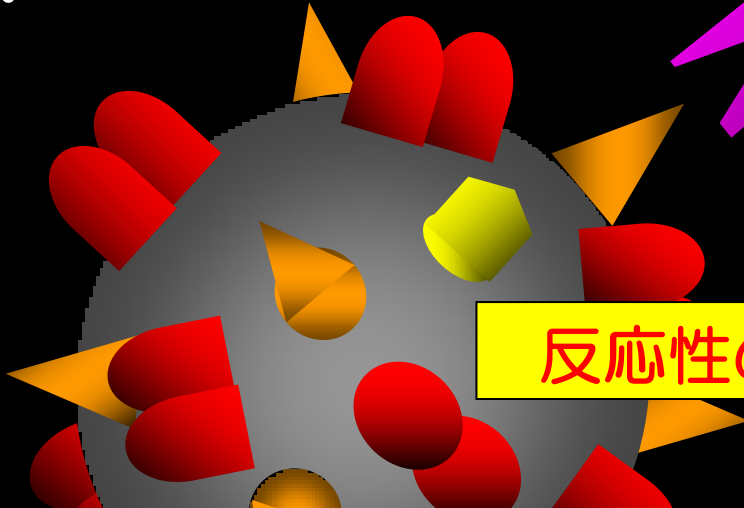
B細胞

反応性の高いHBV抗体が産生される

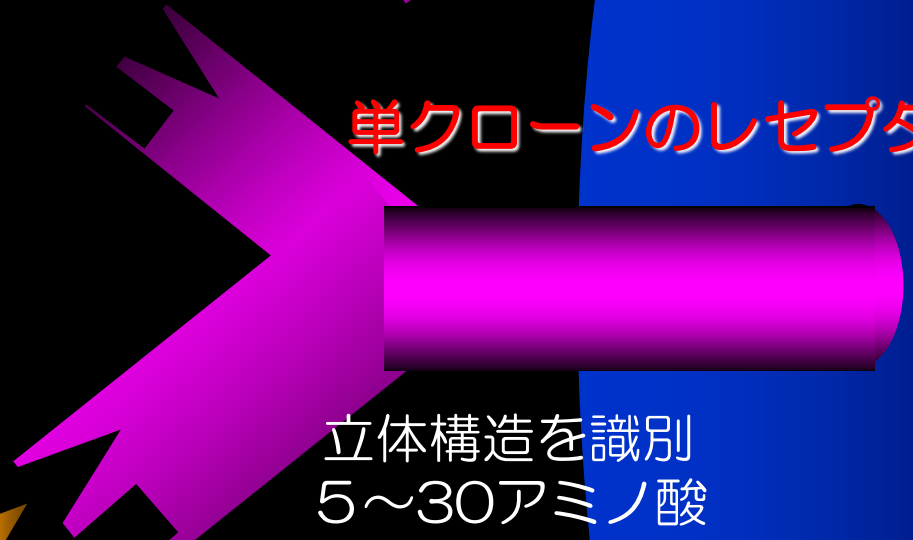
B細胞による抗原の認識（その2）



HBV



単クローンのレセプター



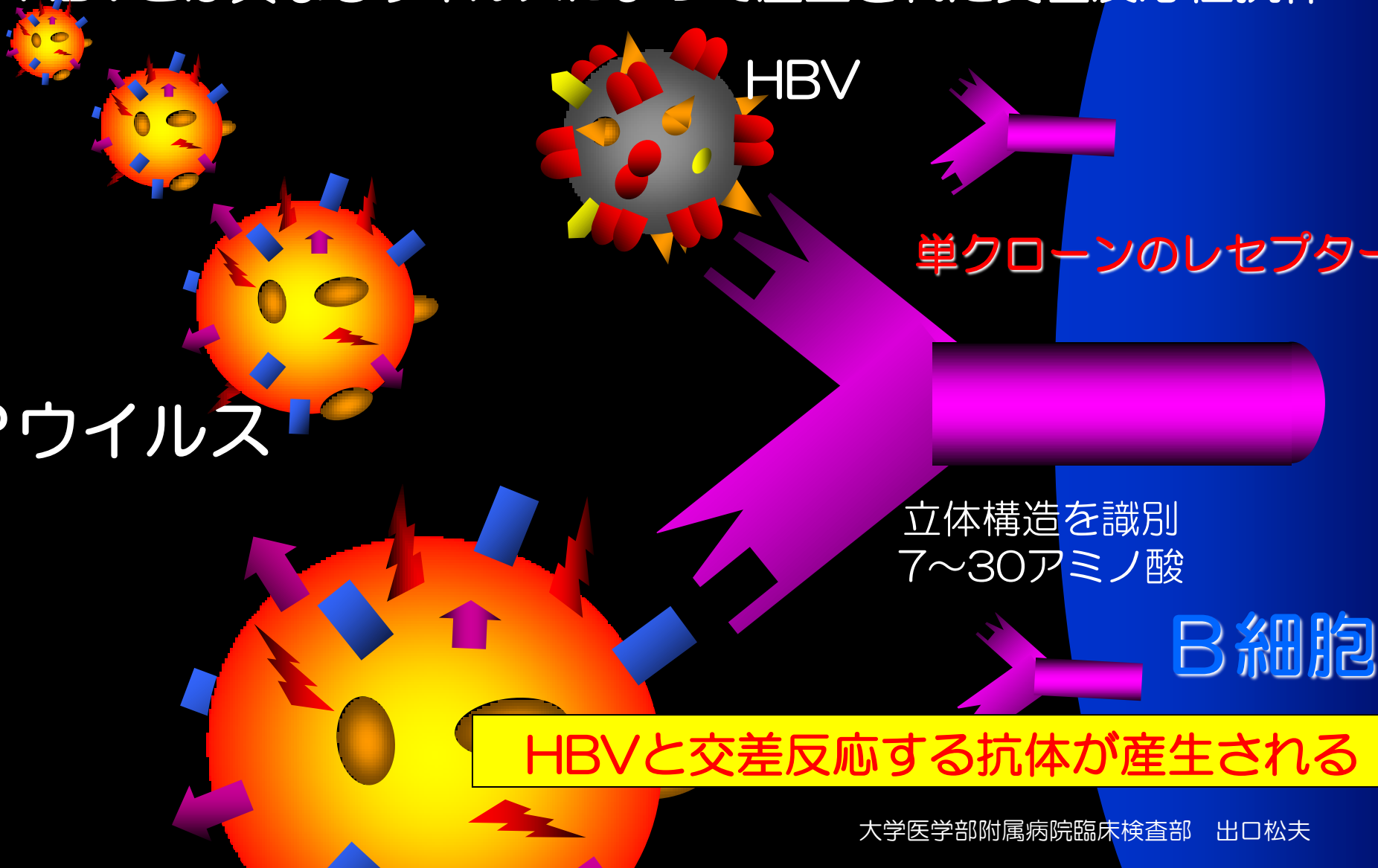
立体構造を識別
5~30アミノ酸

B細胞

反応性の低いHBV抗体が産生される

B細胞による抗原の認識（その3）

HBVとは異なるウイルスによって産生された交差反応性抗体



特異的反應と交差反應

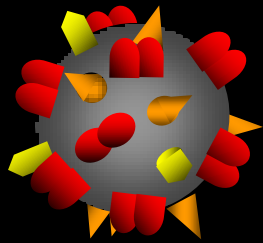
HBV患者

?ウイルス患者

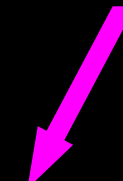
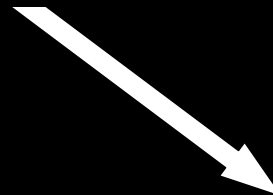
抗体

抗体

抗体



HBV

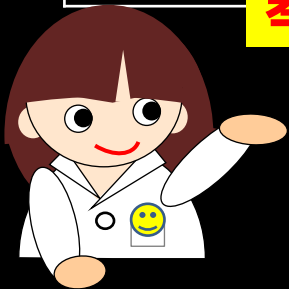
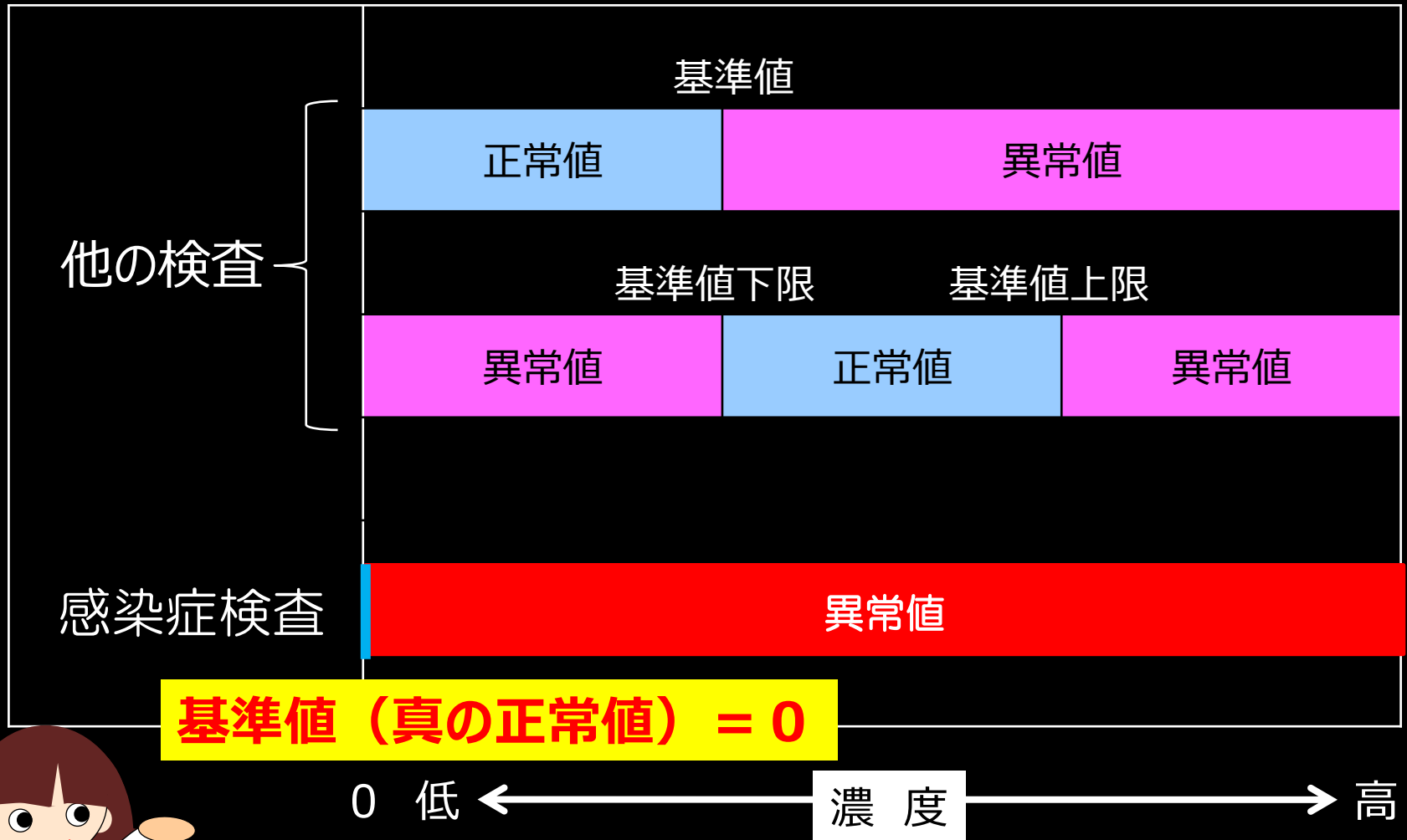


交差反應
(偽陽性)

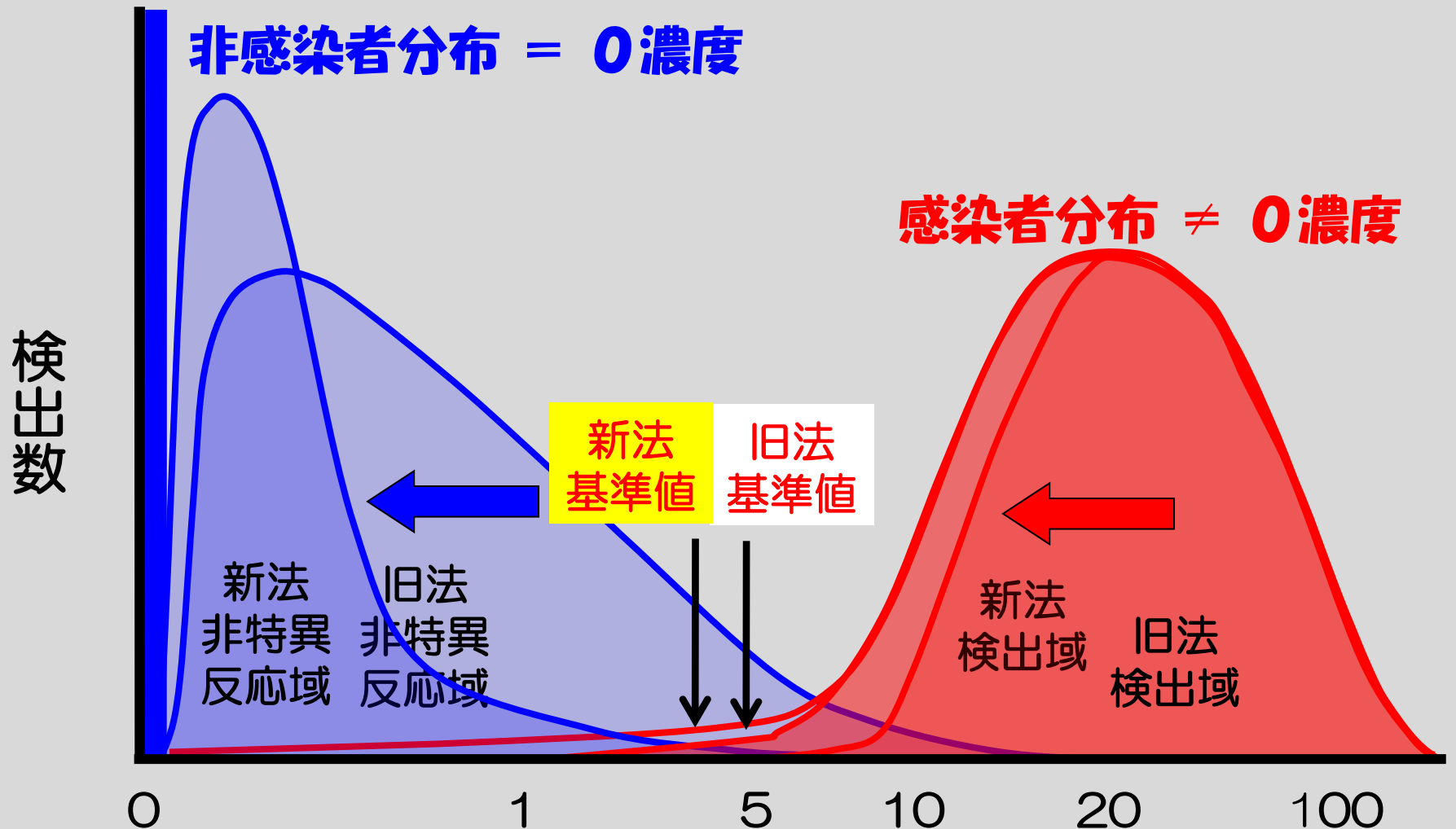
試薬の固相

抗原決定機を忠実に再現させた試薬を作製しても、交差反応性抗体が存在すれば、偽陽性となる。(特異的非特異反應)

感染症検査の基準値



感染症検査の基準値設定と偽陽性・偽陰性



① 感度の追求に終着点はない！

(測定値の分布域が極めて広くなる→検体間の汚染防止策が必要)

② 二つの山は必ず交差する。すなわち、偽陽性・偽陰性が無くなることはない！

各種検査項目における発光量

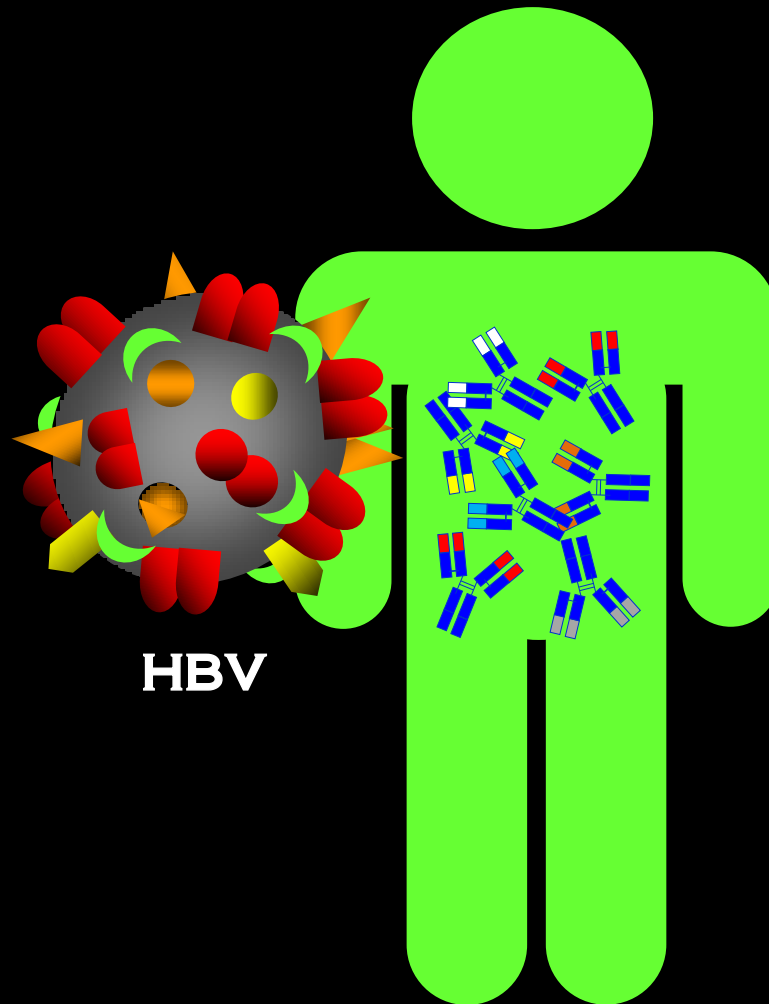
(A社:測定装置)

	0濃度と基準値における発光量 (発光差)			単位あたりの 発光量
HCV抗原	0.0 fmol/L	350	150	50/1.0 fmol
	基準値 3.0 fmol/L	500		
HBs抗原	0.00 IU/mL	500	300	60/0.01 IU
	基準値 0.05 IU/mL	800		
HIV-Sc	0.0 CS CO	200	1600	160/0.1 s/co
	基準値 1.0 CS CO	1800		
PSA	0.0 ng/mL	300	290700	1453/0.02 ng
	基準値 4.0 ng/mL	300000		
CEA	0.0 ng/mL	200	7800	1560/1.0 ng
	基準値 5.0 ng/mL	8000		
TSH	0.00 μ IU/mL	250	49750	1421/0.01 μ IU
	基準値下0.35 μ IU/mL	50000		

感染症試薬の基準値は、試薬性能の限界域も設けられている。
偽陽性・偽陰性が発生しやすい。



HBVに感染すると 何種類の抗体が出来るの？



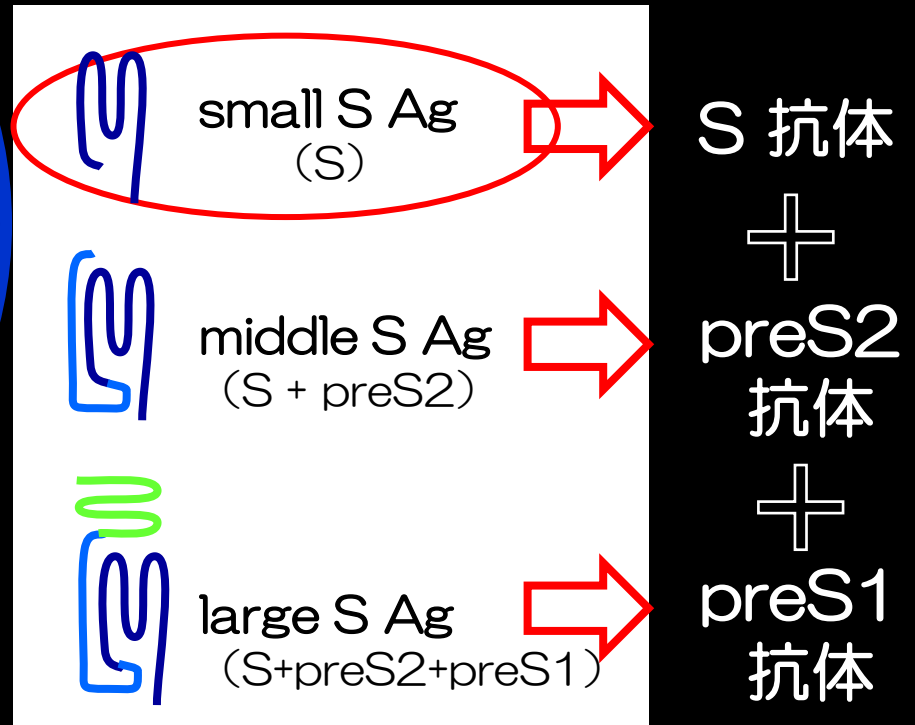
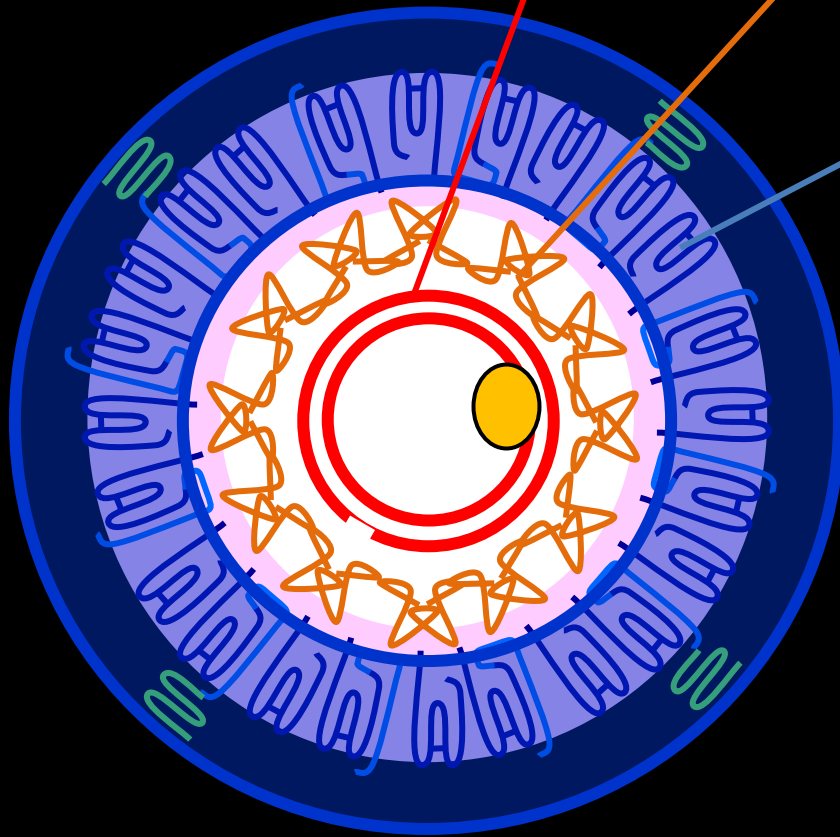
HBVの構造

HBV-DNA

HBc抗原

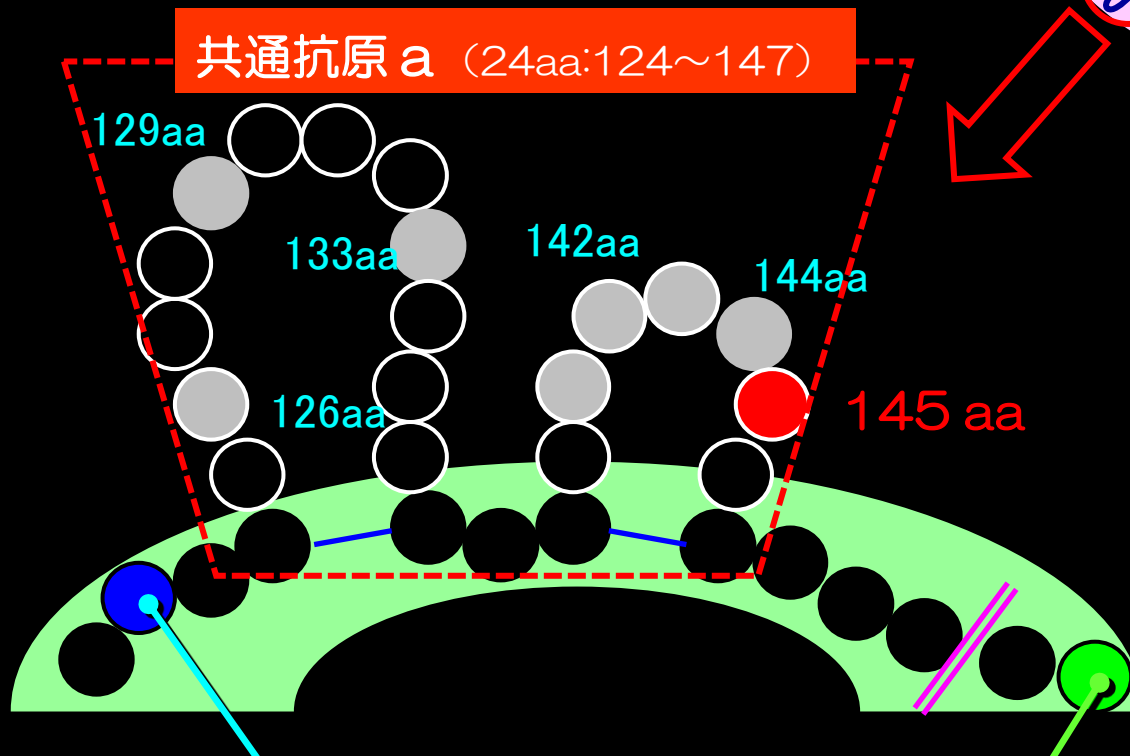
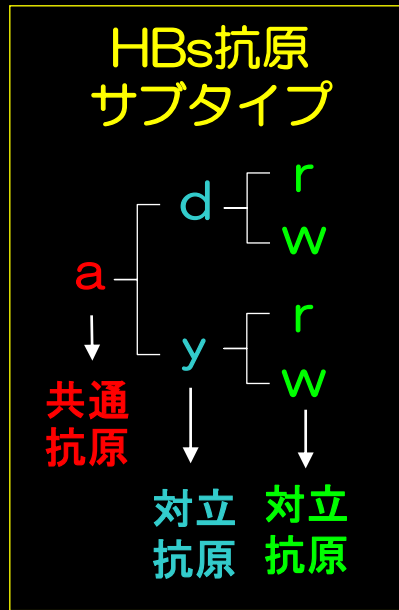
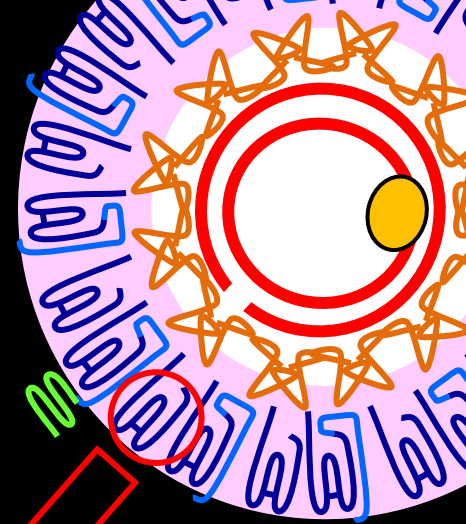
HBs抗原

small S抗原のみの抗原性について



small S抗原の抗原性

現在、我が国で使用されているHBワクチンは、
リコンビナント small s 抗原である。



122aa ; d/y 抗原性

160aa ; w/r 抗原性

● : 最も変異の多い部位

● : 比較的変異の多い部位

small S抗原のループ構造と抗原決定基

L鎖

H鎖

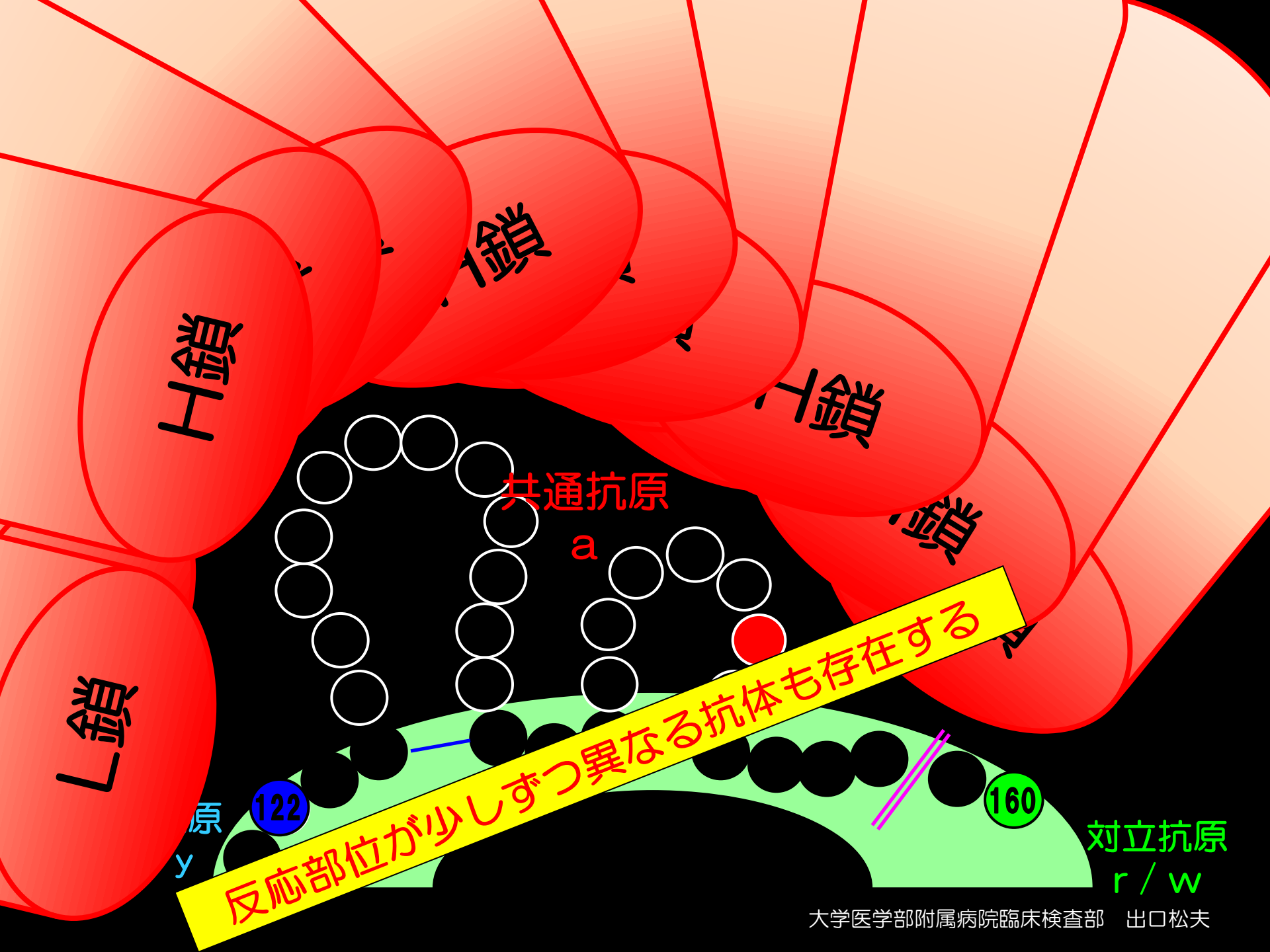
対立抗原
d/y

122

160

対立抗原
r/w

同一反応部位でも立体構造の認識範囲が異なる抗体も存在する



H鎖

H鎖

H鎖

H鎖

L鎖

共通抗原

a

抗原

122

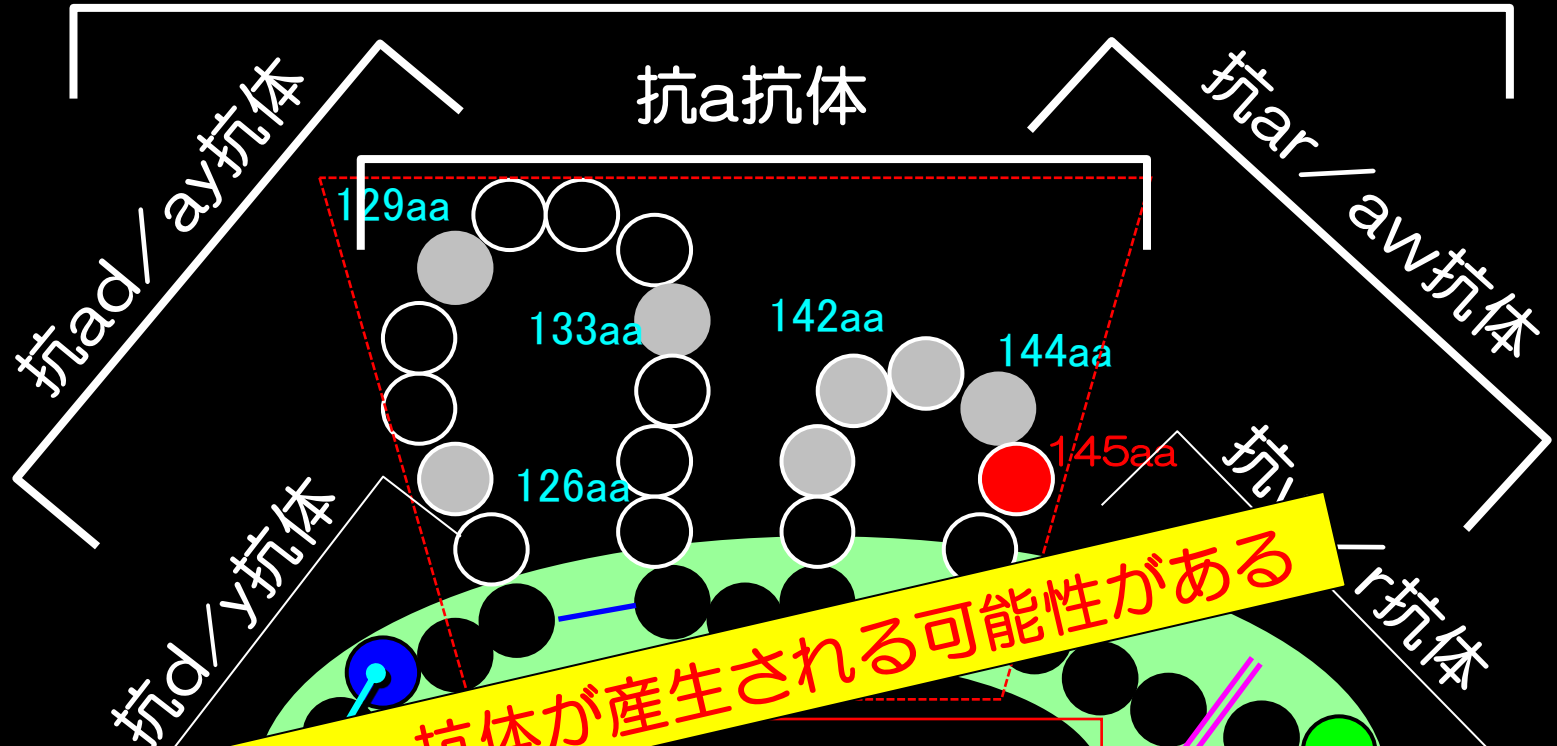
160

反応部位が少しずつ異なる抗体も存在する

対立抗原
r/w

small S抗原の抗原性とs抗体の種類

抗adr/adw/ayr/ayw 抗体



数十種類のs抗体が産生される可能性がある

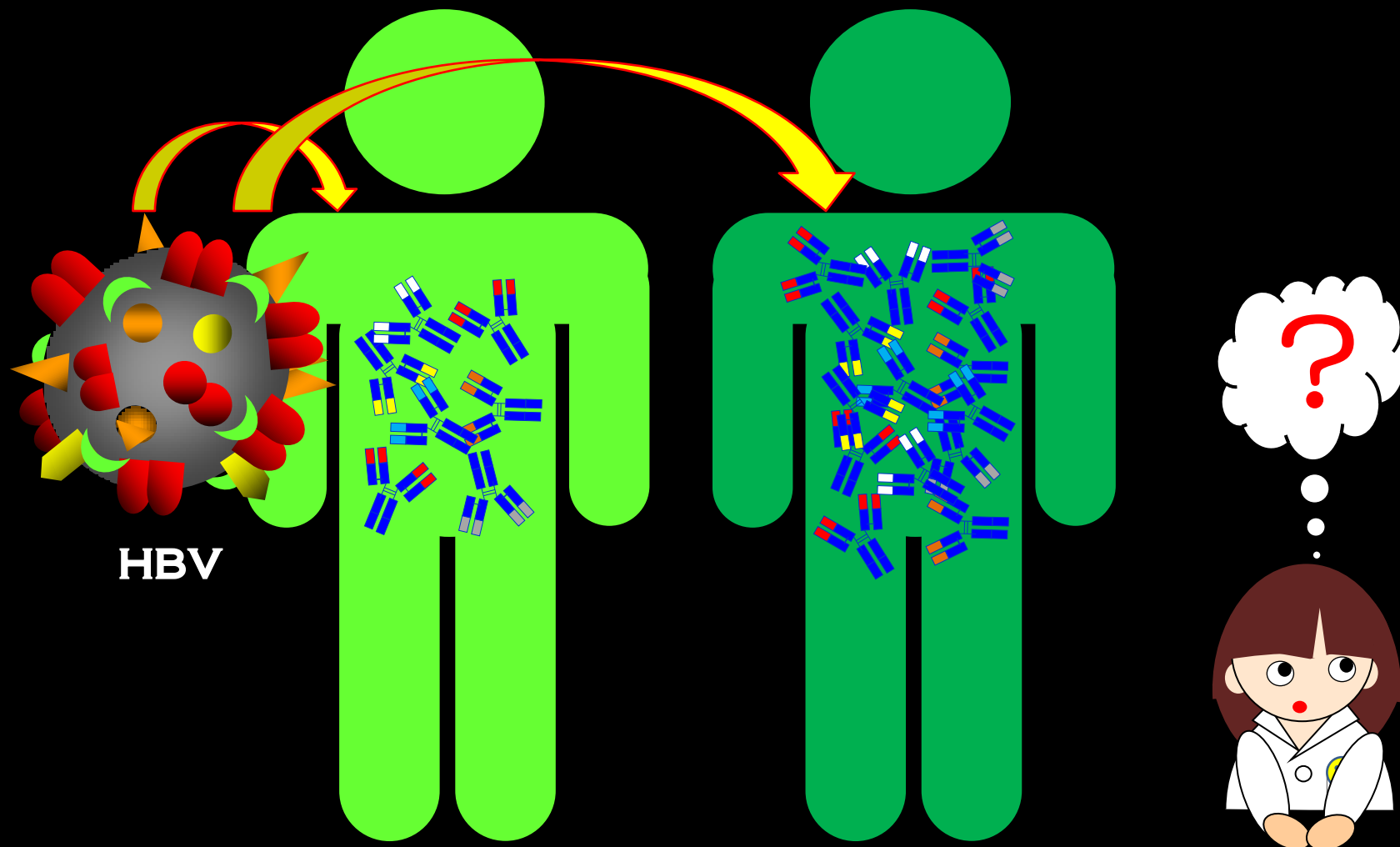
共通抗原 **a** (124~147aa)
抗原性：大

対立抗原 **d/y** (122aa付近)
抗原性：中

S抗原：226aa

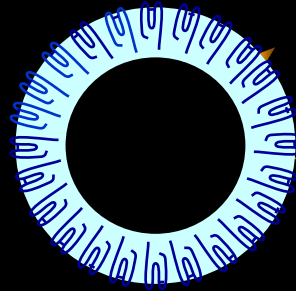
対立抗原 **w/r** (160aa付近)
抗原性：少

産生される抗体の種類・速度・量に 個人差はあるの？

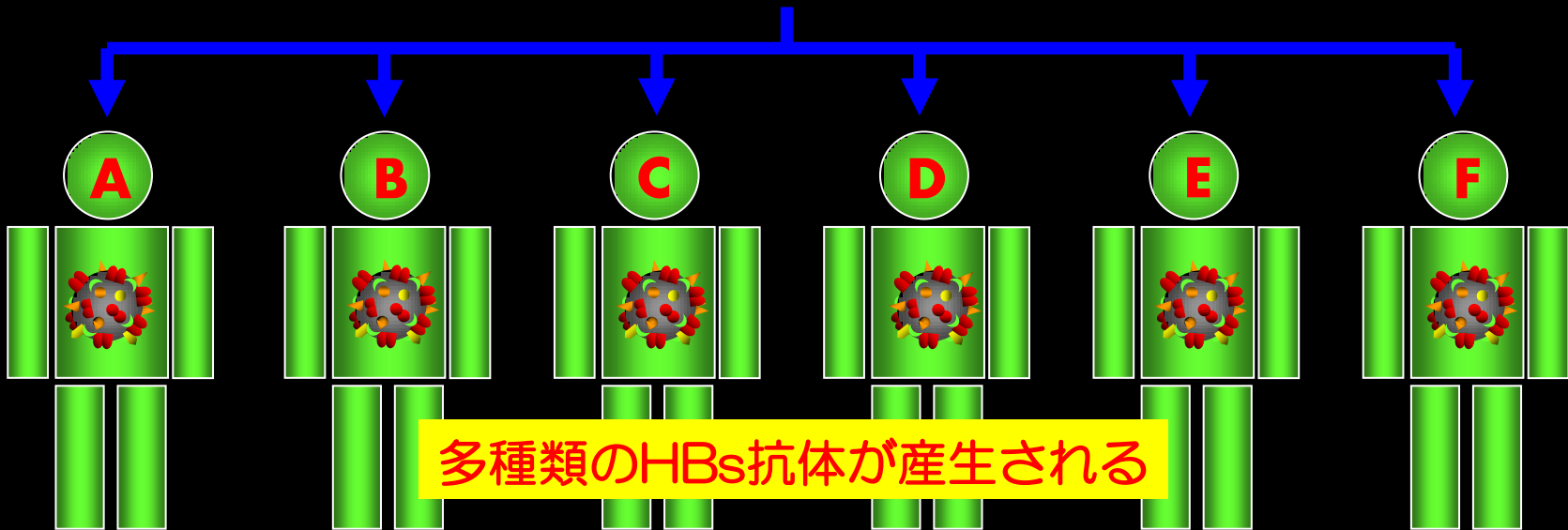


免疫応答に個人差はあるの？

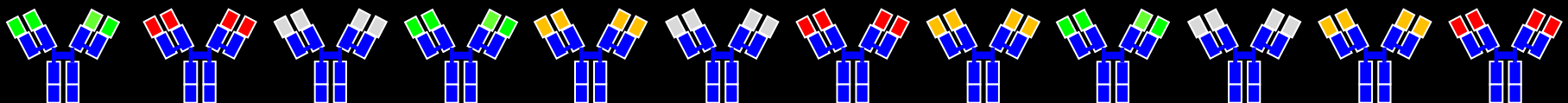
複数名に同一抗原を接種すると、同種類、同量の抗体を同時期に産生するのか？



HBワクチン
Samll Sリコンビナント

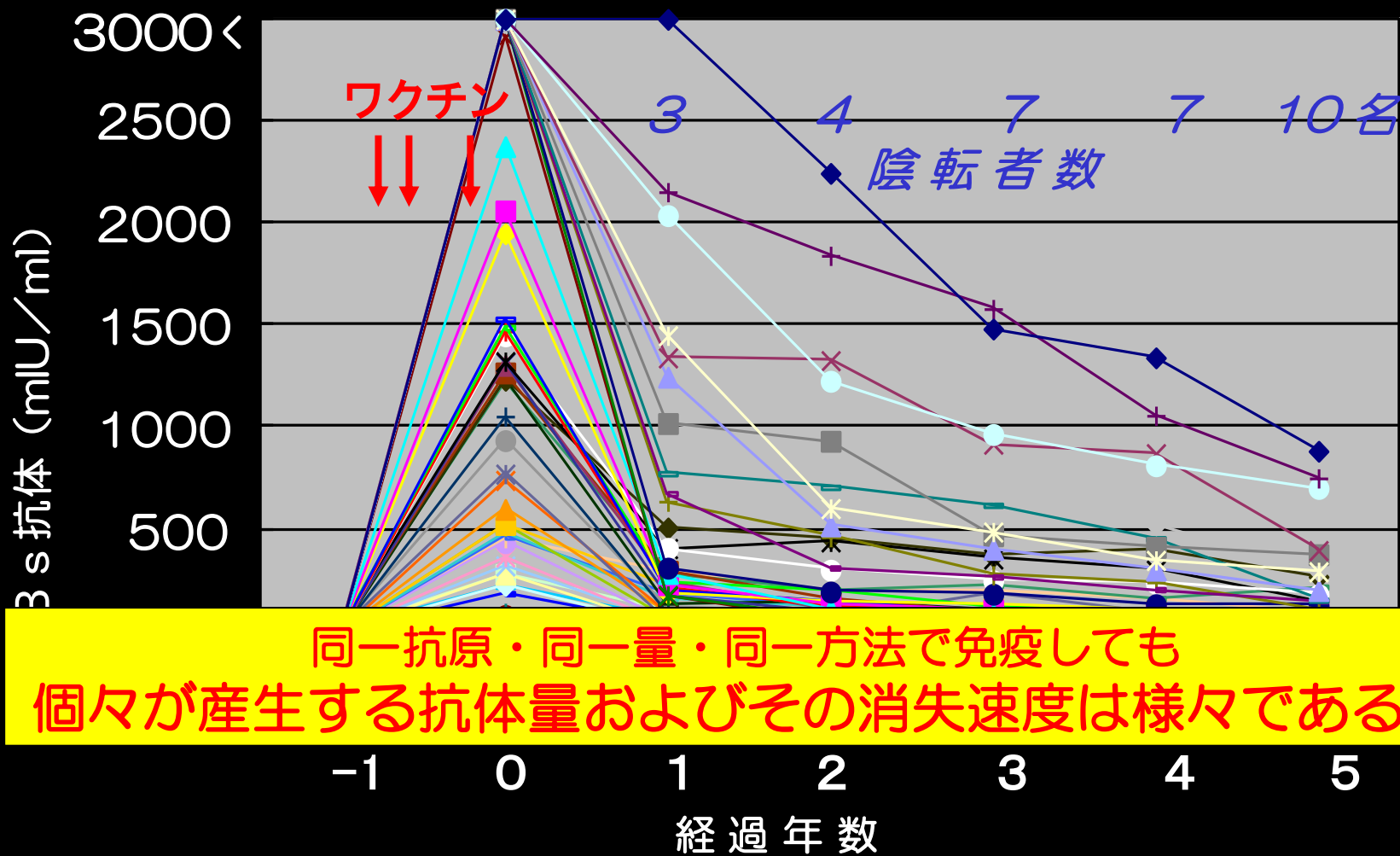


多種類のHBs抗体が産生される



HBワクチン接種者における獲得抗体価の推移

【対象】 同一のHBリコンビナントワクチンを50名に接種後、HBs抗体の獲得量および消失速度を観察した。



リコンビナントHBワクチン（エンジェリックスB：adw）接種時における HBs抗体測定試薬の反応性 1

反応性の異なる3種類のS抗体測定試薬を用いて、個々が産生する抗体の反応性（種類）を調べた。

症例SR

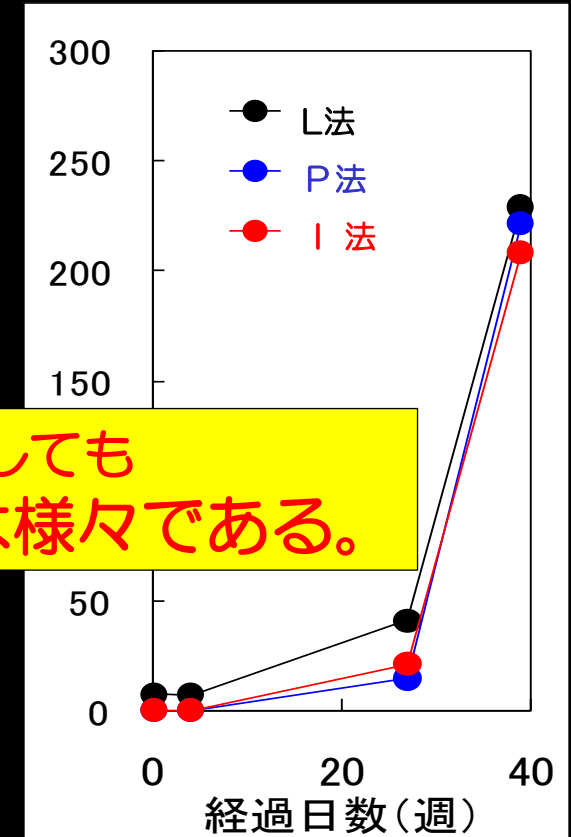
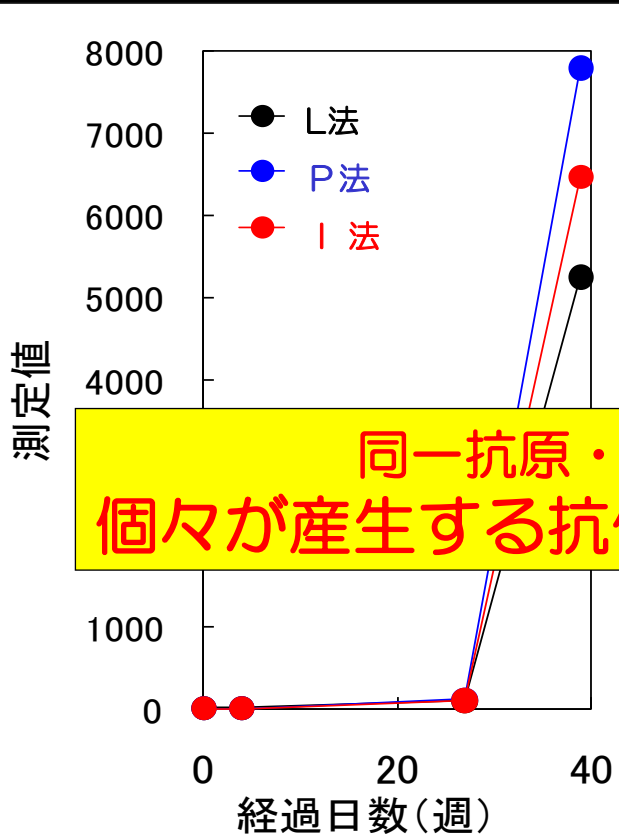
$P > IM > L$

症例YM

$IM > L > P$

症例FJ

$L \div P \div IM$



同一抗原・同一量・同一方法で免疫しても
個々が産生する抗体の反応性（種類）は様々である。

リコンビナントHBワクチン（ビームゲン：adr）接種時における HBs抗体測定試薬の反応性 1

反応性の異なる3種類のS抗体測定試薬を用いて、個々が産生する抗体の反応性（種類）を調べた。

症例SN

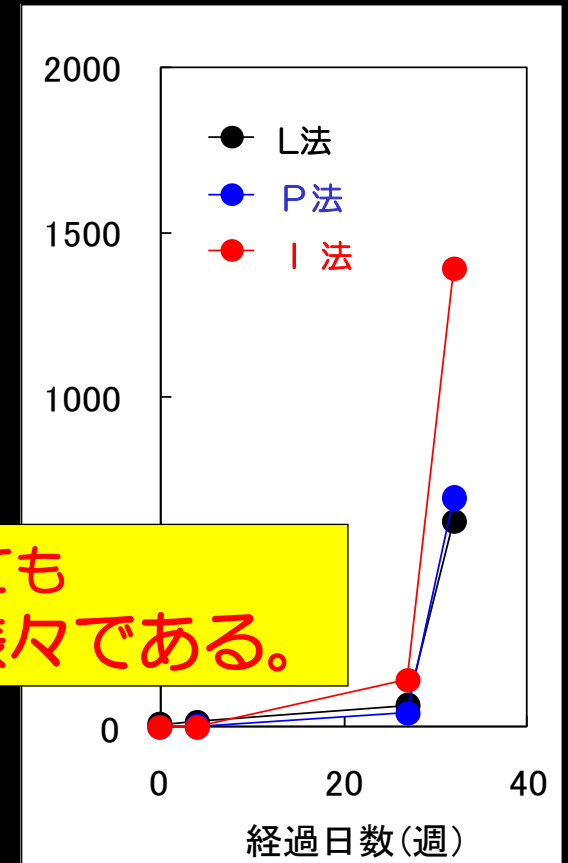
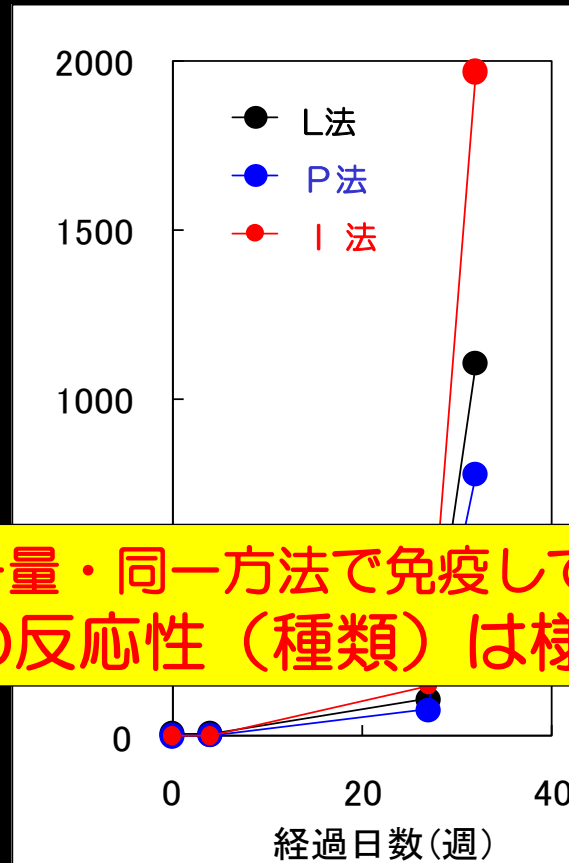
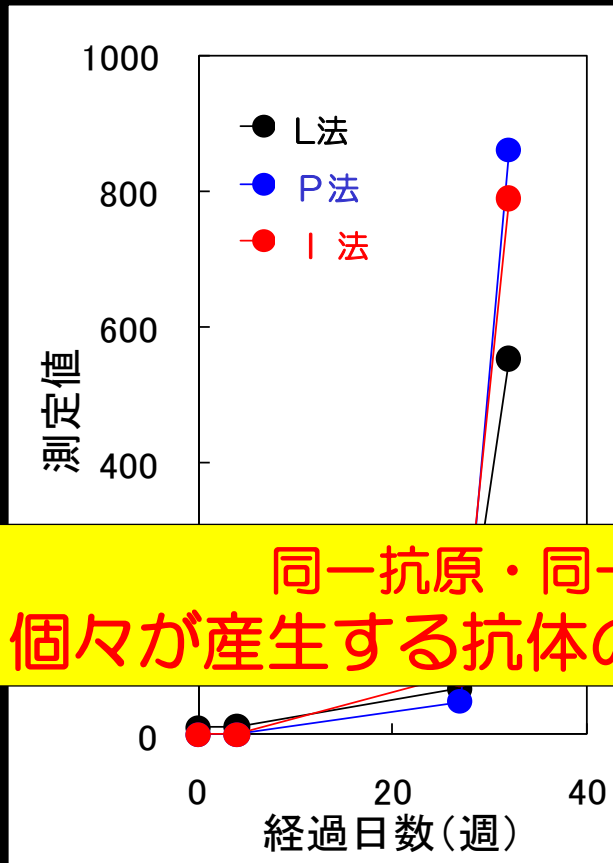
$P \doteq IM > L$

症例SE

$IM \gg L > P$

症例KT

$IM \gg P \doteq L$



同一抗原・同一量・同一方法で免疫しても
個々が産生する抗体の反応性（種類）は様々である。

宿主免疫応答 まとめ

- ① ヒトは微生物に感染すると、数十～数百種類の抗体を産生する。また、一部の抗体は他の微生物由来の抗原と交差反応する可能性がある。
- ② 同一抗原を複数人に接種しても、個々が産生する抗体の反応性（種類）および量は、様々である。また、消失する速度も様々である。

5種化学発光法によるHBs抗体測定値の比較

職員検診検体250例を用いて、5種化学発光法の判定値を比較した。

使用抗原	磁性体粒子化学発光法				
	A法 リコンビナント	C法 精製	L法 培養	E法 精製	S法 精製
陰性	50	38	35	53	48
陽性	200	212	215	197	202

185例 (74%)

34例 (14%)

全法陽性

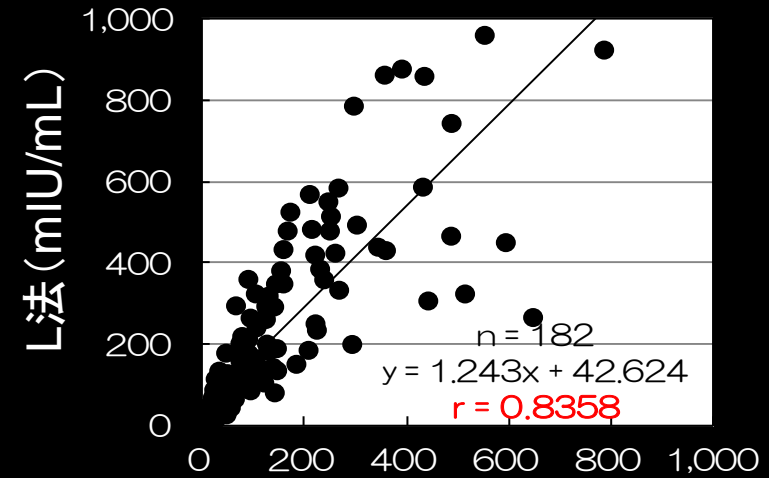
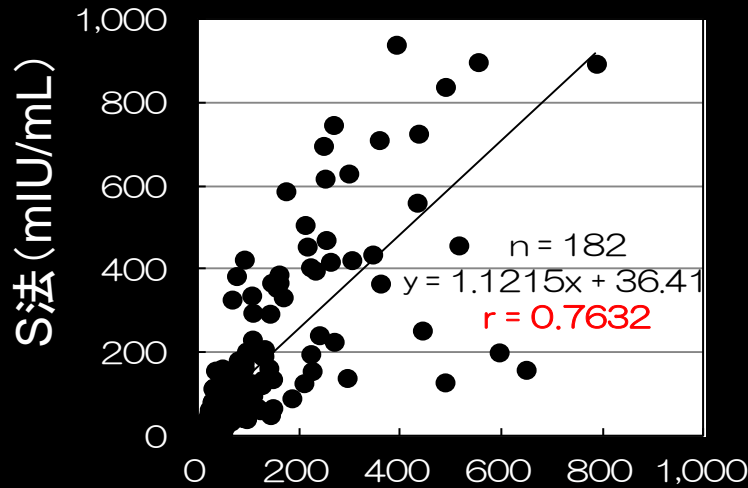
不一致

全法陰性

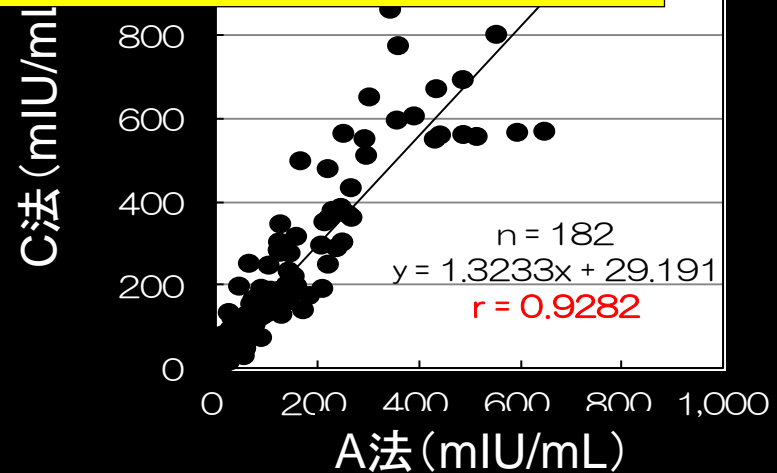
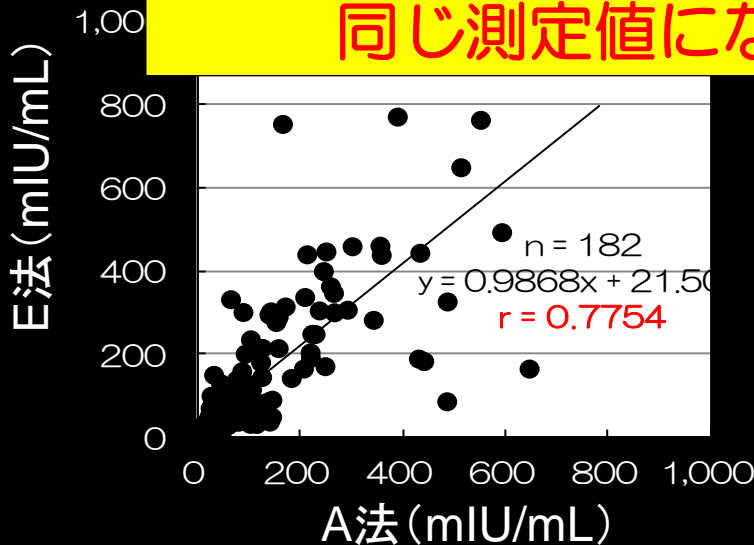
31例 (12%)

化学発光法を原理とするHBs抗体定量測定における 測定法間の相関

大学医学部附属病院臨床検査部 出口松夫

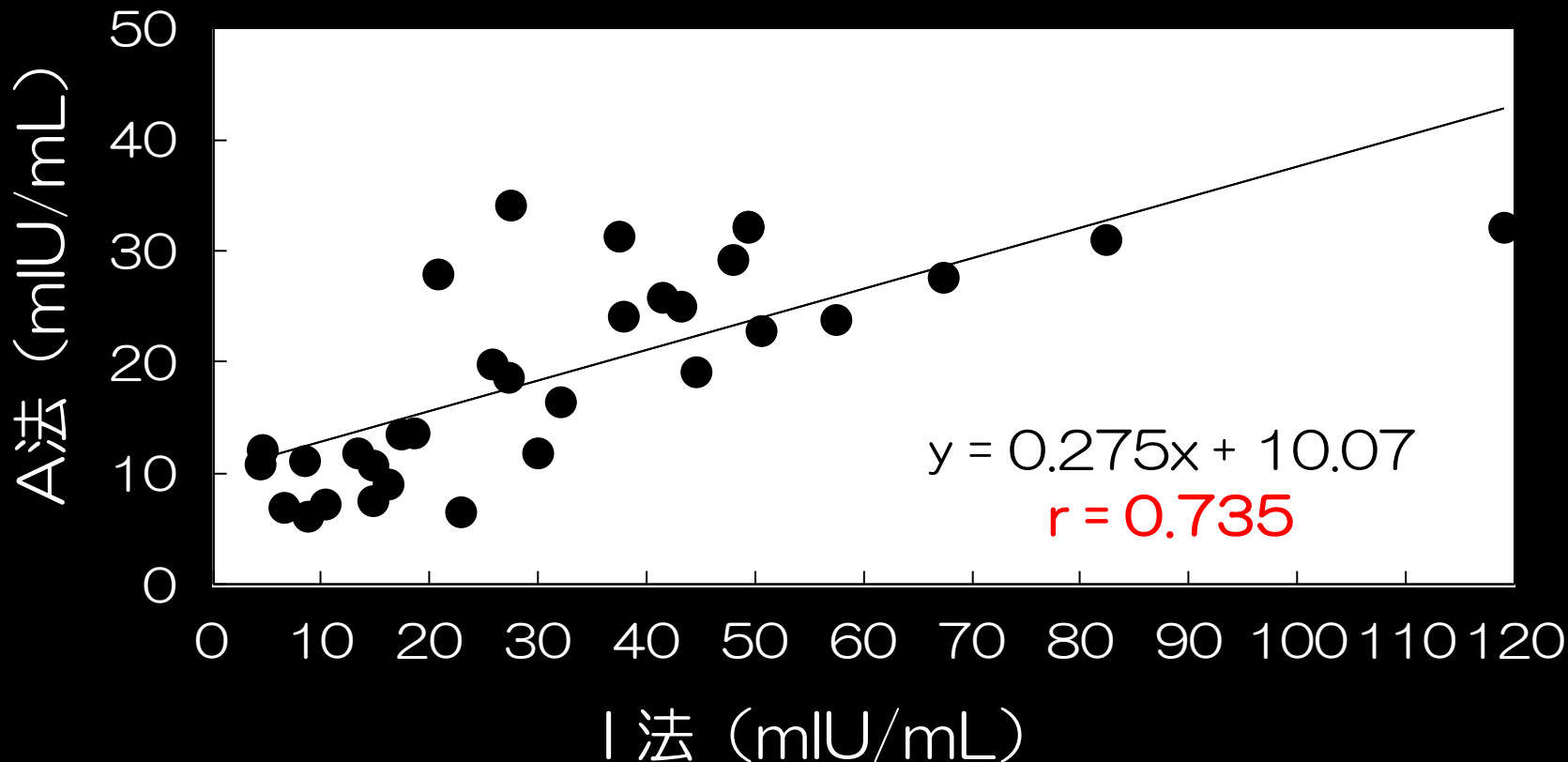


測定原理が同じ定量法だからといって、
同じ測定値になるとは限らない。

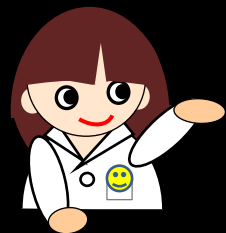


同じ抗原を用いると、同じ反応性が得られるか？

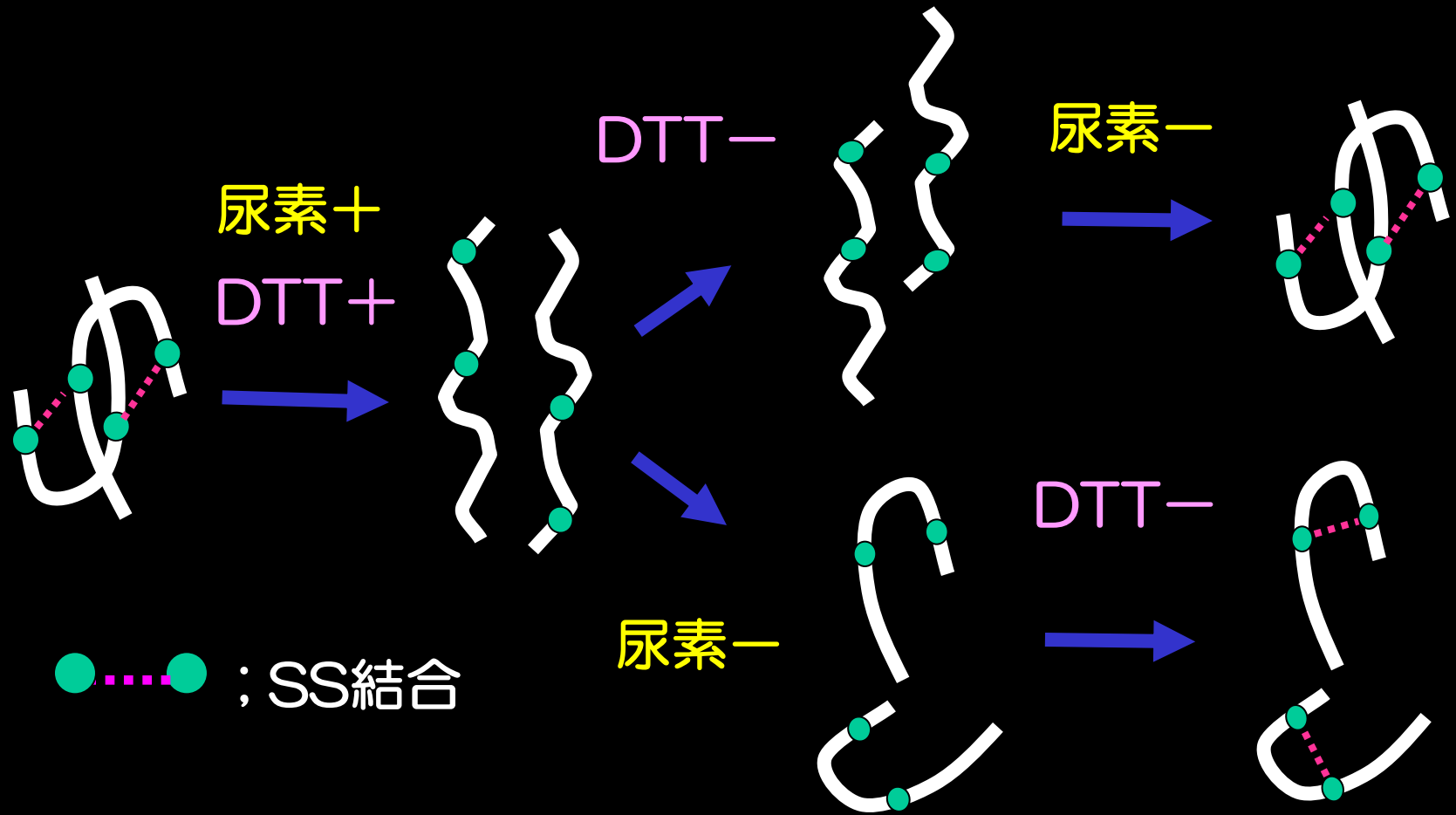
同一のリコンビナント抗原ad&ayを使用しているA法とI法の相関性を調べた。



同じ抗原を使用しているからといって、
同じ測定値になるとは限らない。

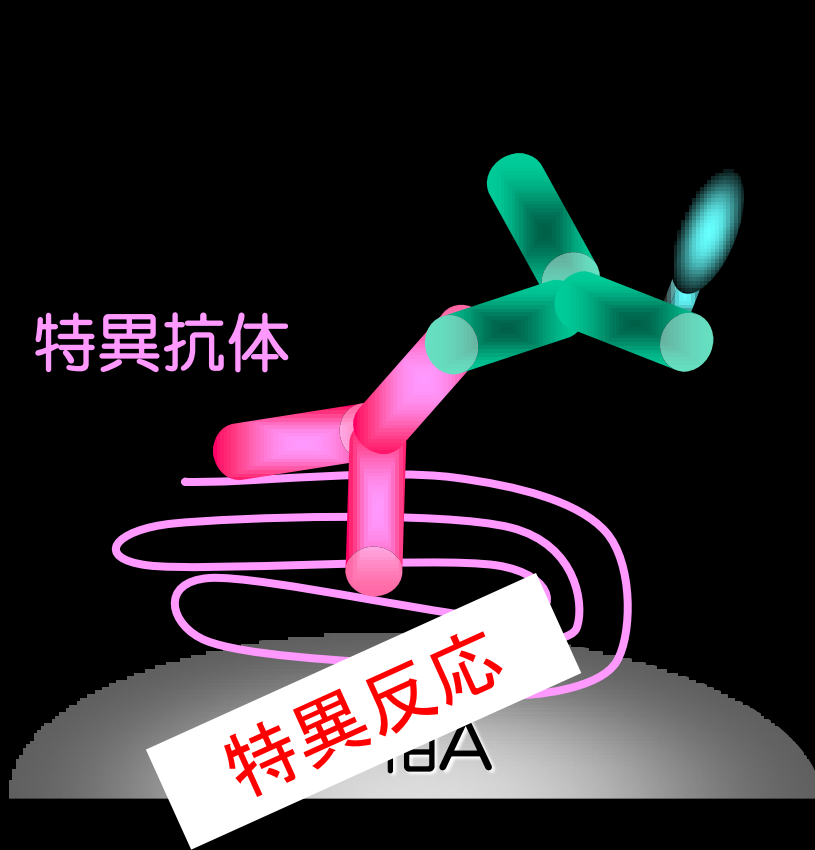


抗原構造の再構築例

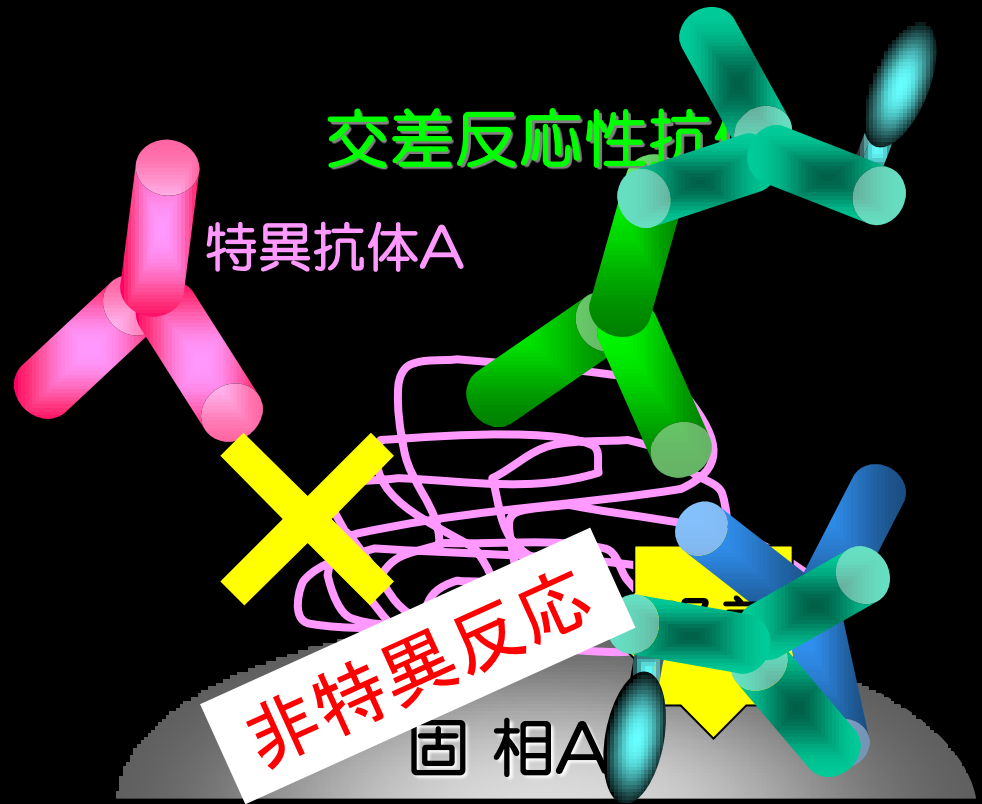


同一抗原を用いても、構築方法が異なれば抗原性は変わる

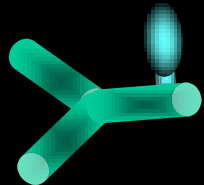
構築方法の異なる抗原に対する反応



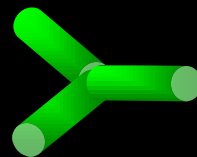
再構築の良い抗原



再構築の悪い抗原



標識抗ヒト抗体

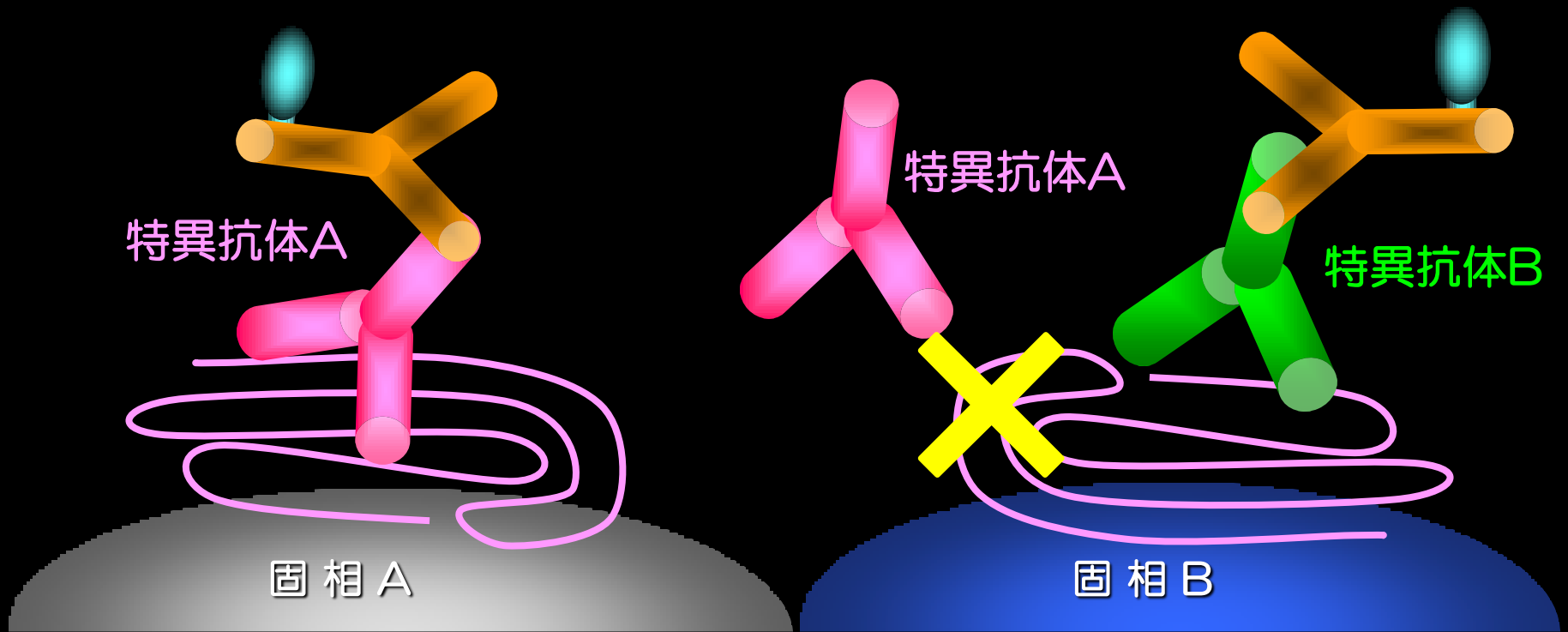


非特異抗体



検体成分

構築方法が同一でも、 固相が異なると反応性も異なる

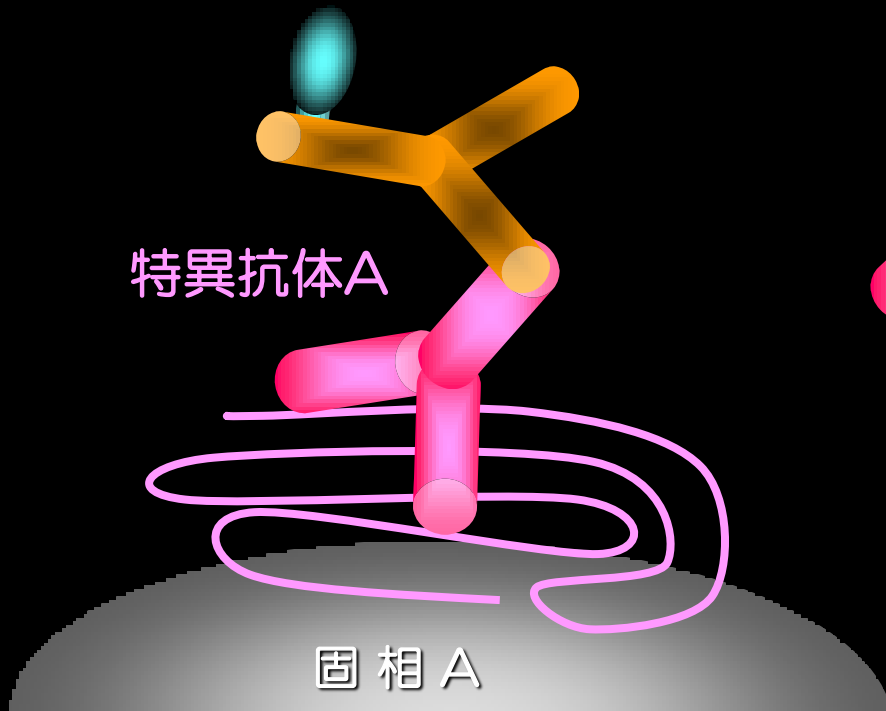


抗原の高次構造が自然な状態となり、
親水性部分が外側を向いている

同じ抗原でも固相が異なると、結合状
態も異なり、反応性が変化する



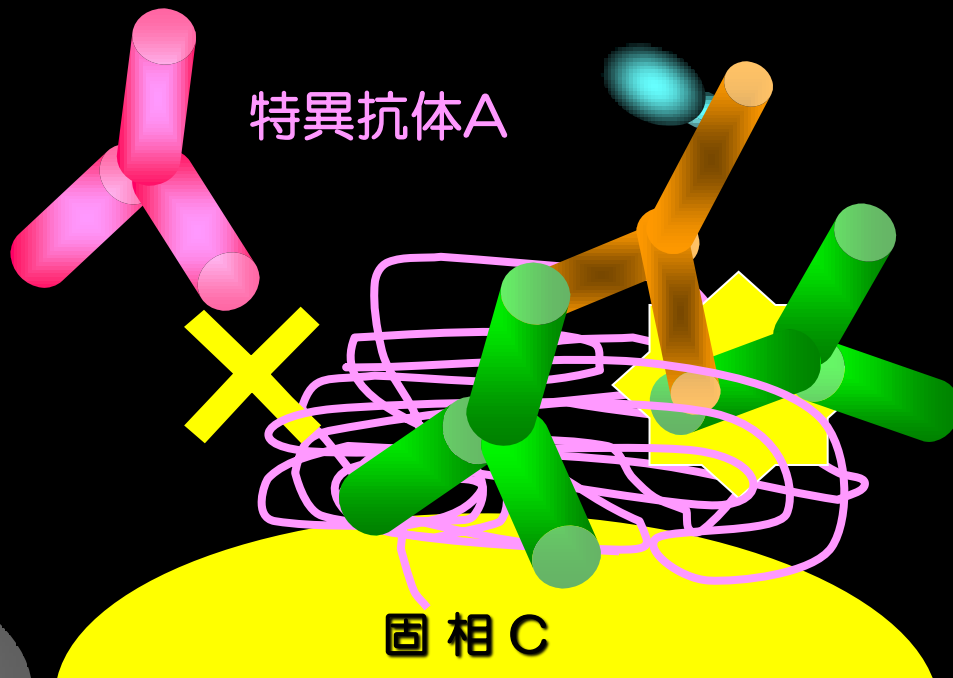
構築方法が同一でも、 固相が異なると反応性も異なる



抗原の高次構造が自然な状態となり、
親水性部分が外側に露出している

特異反応

特異抗体



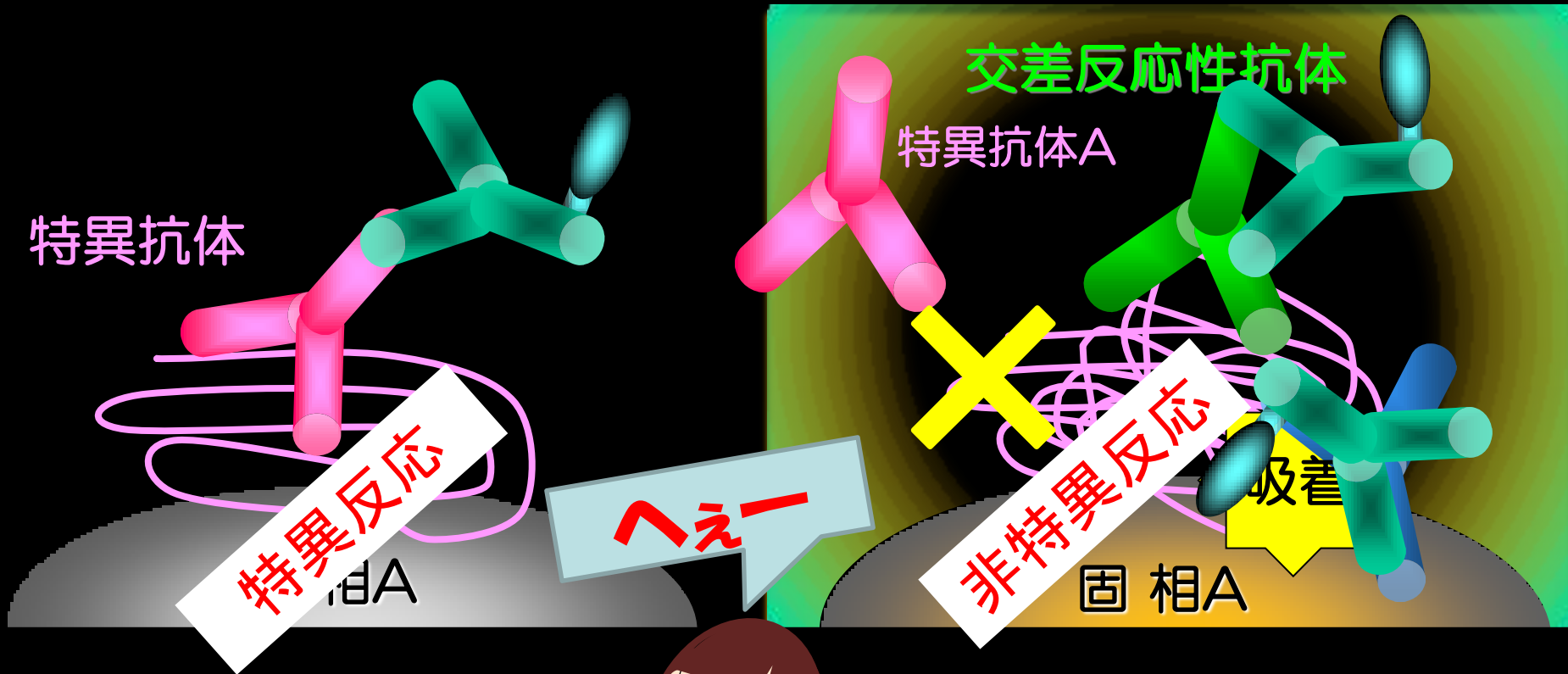
抗原の高次構造が壊れ、疎水性部分の
露出が起きている状態

**偽陰性・偽陽性
非特異反応**

非特異抗体

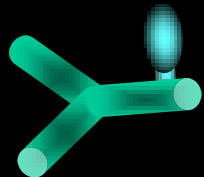
固体成分

液層の異なる条件での反応



良い固相・環境

悪い固相や環境



標識抗ヒト抗体



非特異抗体



検体成分

抗体測定試薬の使用抗原

各社が用いている使用抗原は全て同じ？

固相は全て同じ？

反応の場は全て同じ？

リガンドは？

ウイルス精製抗原

培養細胞由来抗原

標準化は極めて困難

酵母由来リコンビナント抗原

抗体抗原

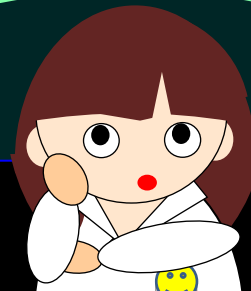
ガン細胞由来リコンビナント抗原

対立抗原
d / y

122

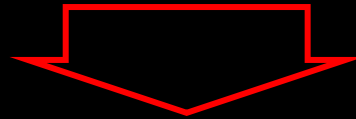
対立抗原
r / w

160



HBs抗体測定試薬 まとめ

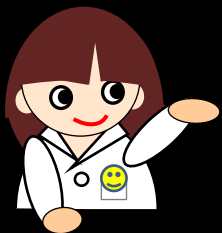
- ① 各試薬に用いられている抗原は様々であり、抗体との反応性も試薬によって大きく異なる。
- ② 同一抗原を使用した試薬でも、抗原の精製・構築方法、固相の材質、感作方法、反応の環境などが異なると、抗原の立体構造も異なり、抗体との反応性も異なる。



各HBs抗体測定試薬の反応性は多用であり、
測定値の統一化は極めて困難である。

市販HBs抗原測定試薬の 現状と問題点

- ① 検出感度の比較と日常検体における推定見逃し件数
- ② 測定値の信頼性



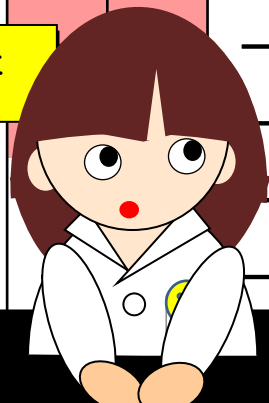
16種HBs抗原測定試薬の検出感度比較

(ng)	定性法				精密測定法												
	凝集 Q	ICA			L A R	FLEIA			CLEIA					CLIA			
		B	D	E		E	A	I	A	V	F	P	H	A	E	C	
15.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.0	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.0	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.0	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0.2	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
0.1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

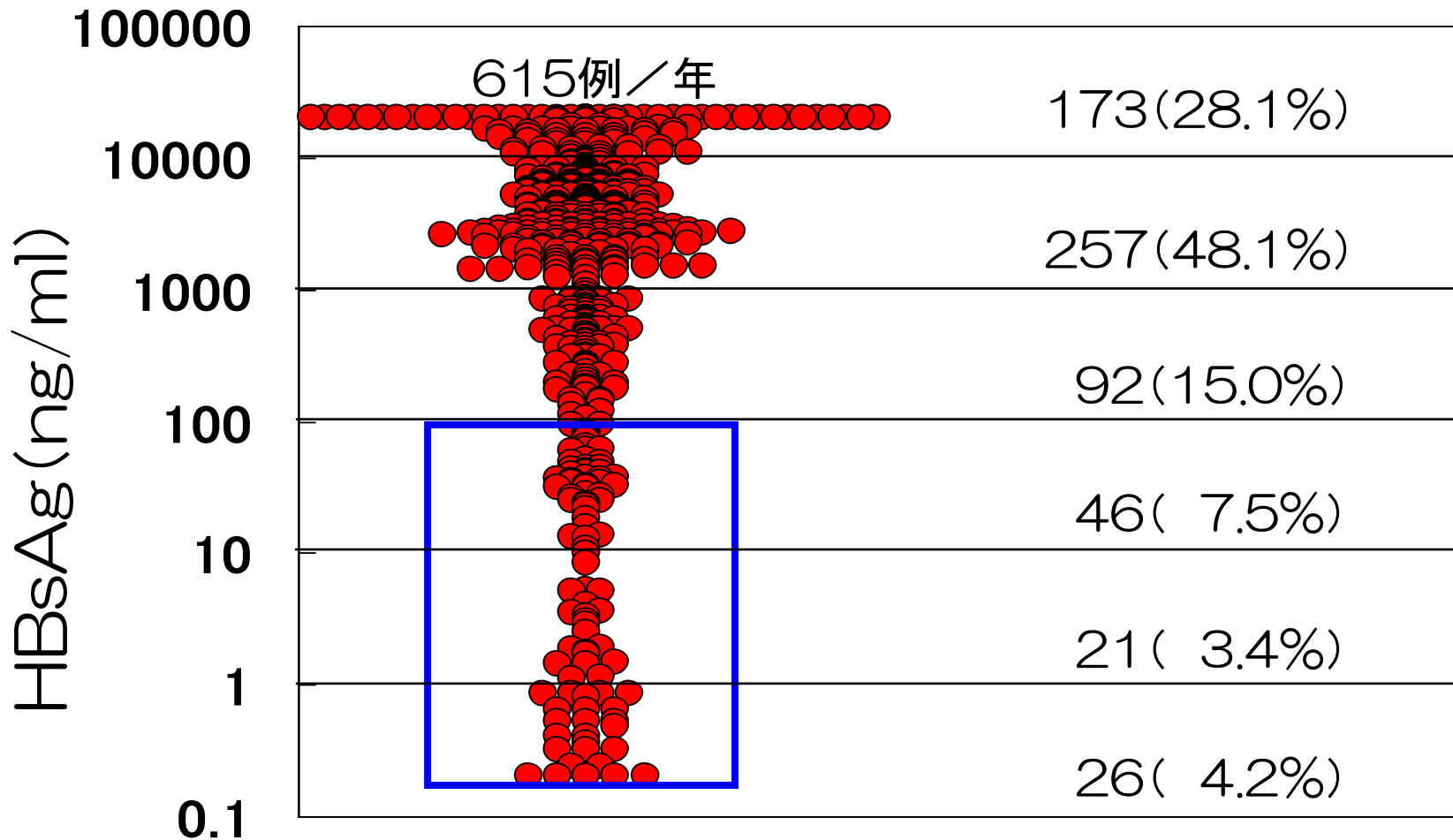
でも・・・
低濃度の検体が、
そんなに多く
存在するの？

感度差150倍

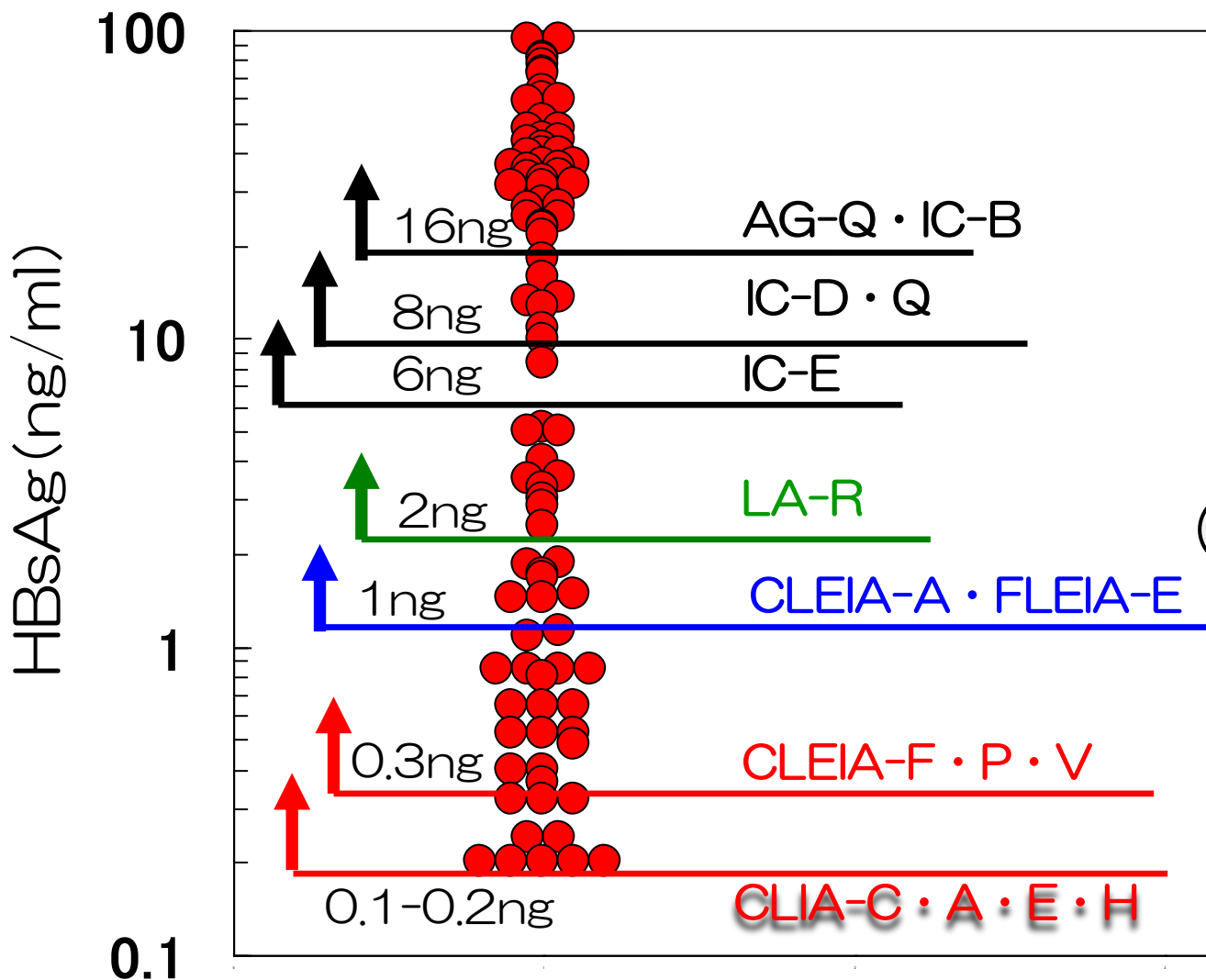
感度差20倍



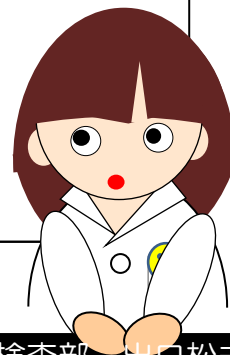
阪大病院における HBV感染者のHBs抗原濃度分布



当院におけるHBV感染者のHBs抗原濃度分布

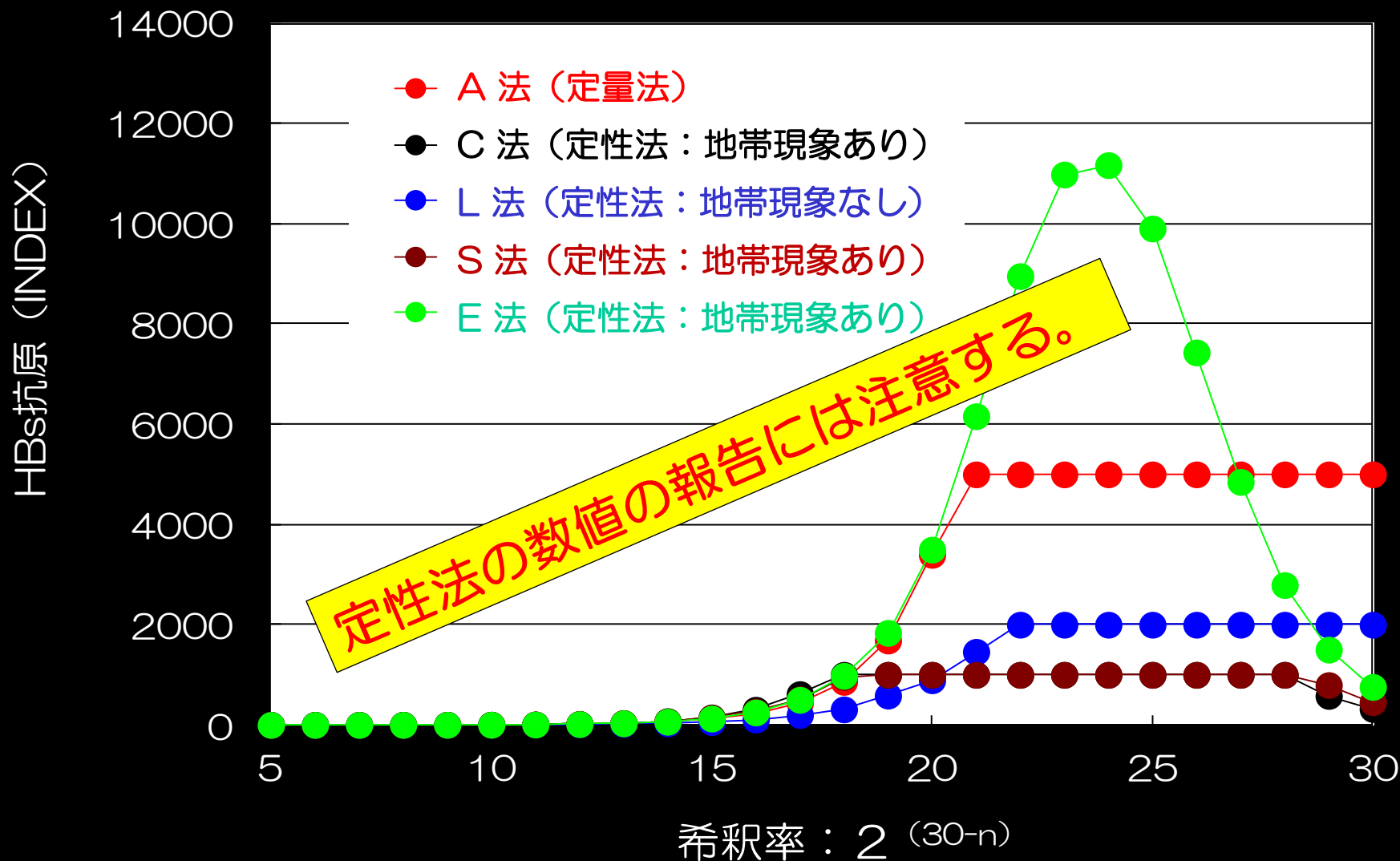


検出感度の低い
測定法をルーチン
で使うと、
どうなるの？

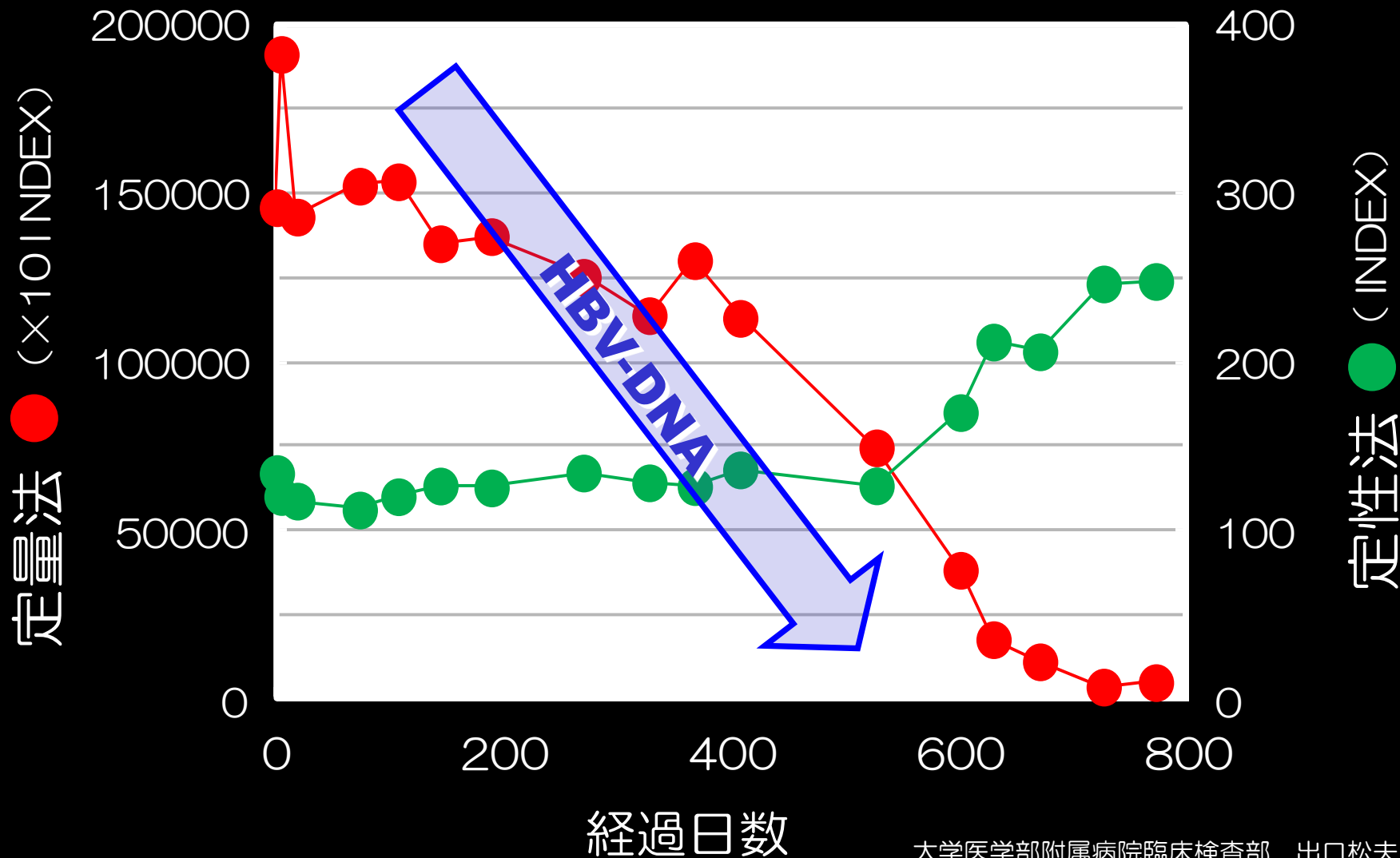


S抗原測定試薬の希釈直線性（測定値の信頼性）

S抗原高濃度プール血清（約50万ng）を2n希釈したものを試料とした。
すべての測定値は、基準値を1として算出した。



S抗原高濃度患者における 定性法と定量法の測定値の推移

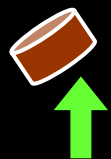
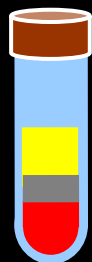
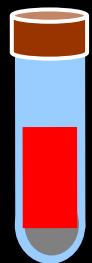
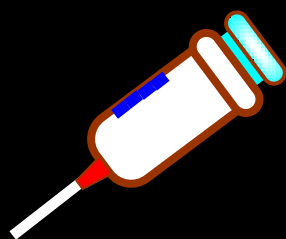


HBs抗原検査のポイント

- ① 可能なかぎり高感度な試薬を選ぶ。
(変異株を検出できる試薬を選ぶ)
- ② 定性法の測定数値については細心の注意を払う
- ③ コンタミネーション防止のために、細心の注意を払う

感染症検査において 正確な結果を得るためのポイント

本講演では
検体間汚染
コンタミ



① 採血
(時期)

② 静置/遠心
(条件)

③ 開栓分注
(方法)

④ 測定
(方法の選定)

⑤ 結果解釈

①から⑤までの操作、全てに注意すべきポイントがあります。

検体間のコンタミについて

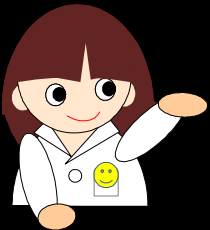
① 検体開栓時のコンタミ

- 自動開栓装置
- 用手法による開栓

② 検体分注時のコンタミ

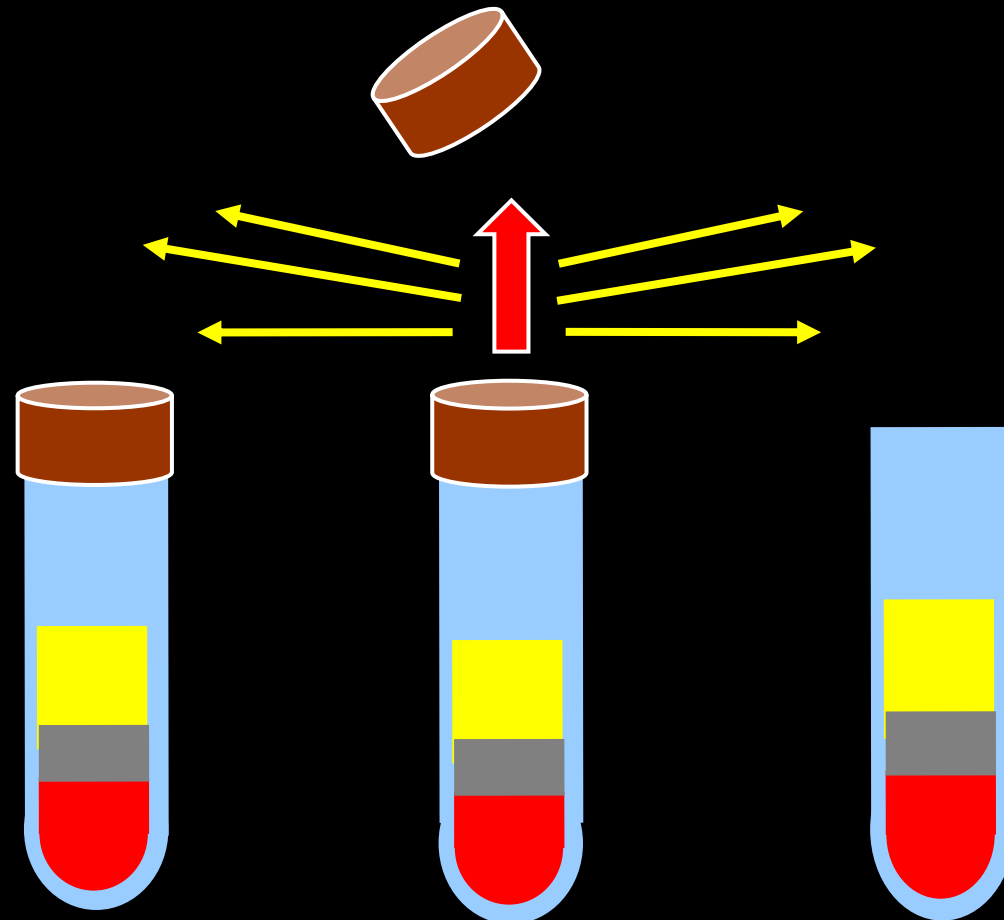
- 用手法による分注
- 自動分注装置

③ 分析装置内のコンタミ

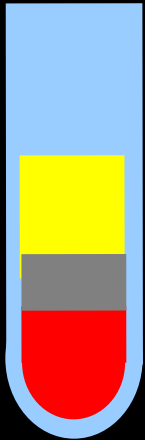


① 検体開栓時のコンタミ

HBs抗原測定時におけるコンタミの危険性



HBs抗原のコンタミについて

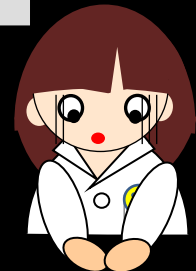
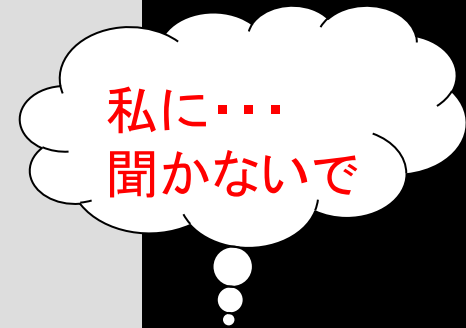
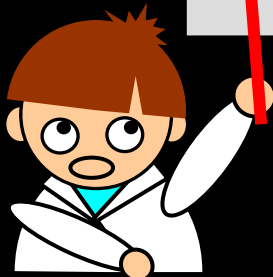


HBs抗原濃度の高い患者って、

どれくらいの濃度

どれくらいの頻度

で存在するの？



HBs抗原検出とPCR法における検体間汚染

患者血中のHBs抗原濃度

高い患者 → 800万 (10^6) ng/mL

陰性患者 → 0.1 (10^{-1}) ng/mL未満

(最低検出感度)

高低差は 約 10^8

5万ng/mL以

陽性検体2

濃度 $\times 10^{\sim}$

どうして、
検体の扱いが
生化学検査など
と同じなの？

核酸増幅法 PCR

HBV-DNA

高陽性: 10^{11}

陰性: 20

高低差
 10^{10}

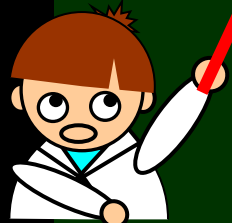
HCV-RNA

高低差
 10^9

HIV-RNA

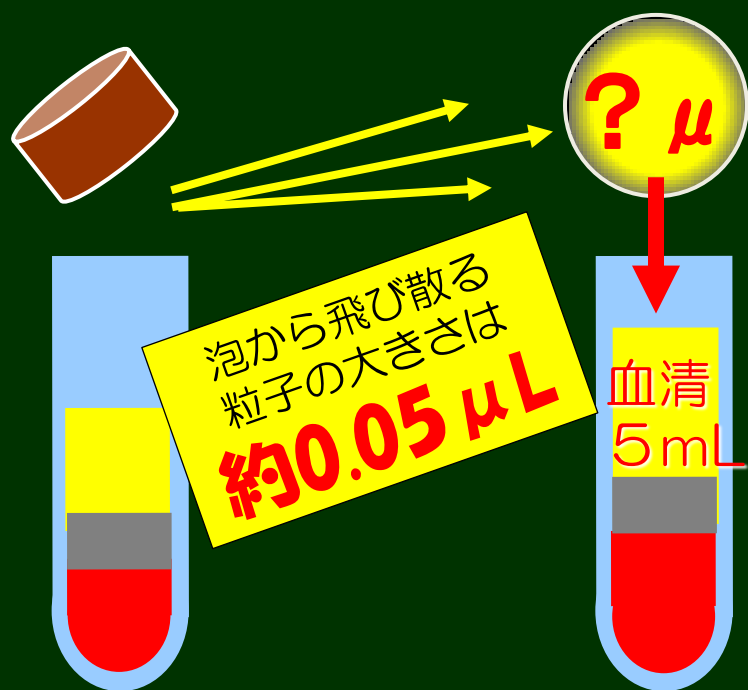
高低差
 10^8

同じ



S抗原陽性検体を陰性検体近くで開栓すると

5万ng/mLの陽性検体が陰性検体に飛散すると、
(濃度差 10^5 以上) . . .



陽性血液
5万ng

陰性血液
0.1ng未満

混入量 (μL)	陰性血 測定値
1	+ ; 10 ng
0.1	+ ; 1 ng
0.01	+ ; 0.1 ng

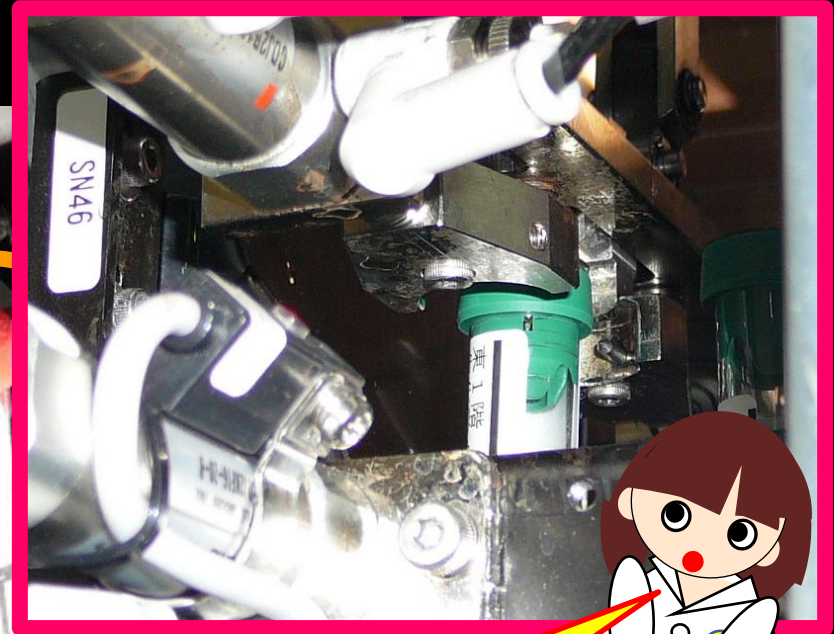
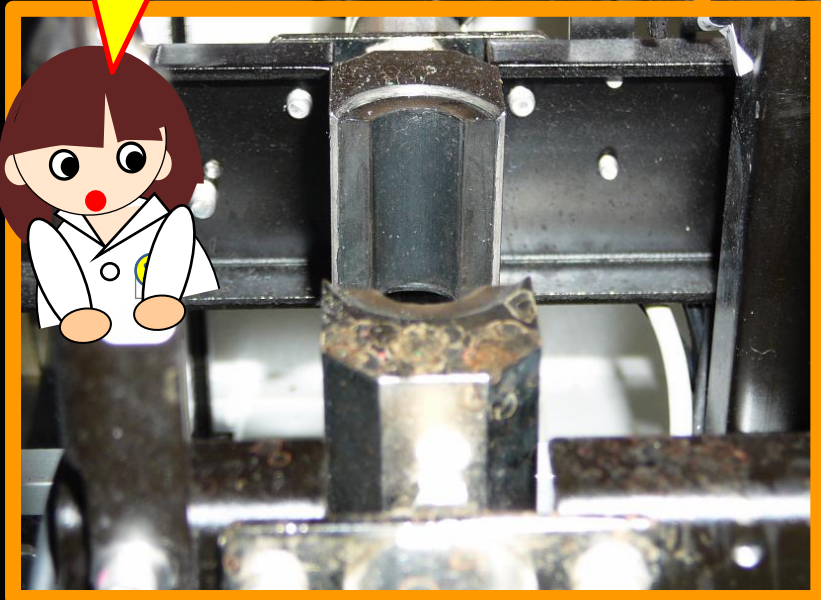
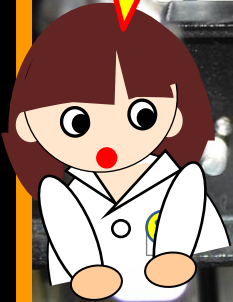
粒子径
数十 μm

エアロ
ゾル

●自動開栓装置によるコンタミ（I社）



イヤーン!



イヤーン!

● 検体自動分注装置でのコンタミ



フィルター付で安心！

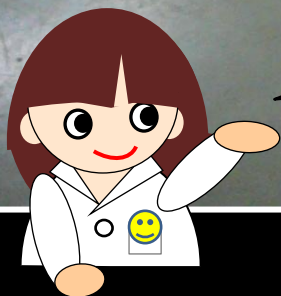
**感染症検査用分析装置を搬送ラインに
接続することは推奨できない。**

● 用手法による開栓時のコンタミ



こんな開法
はダメす！

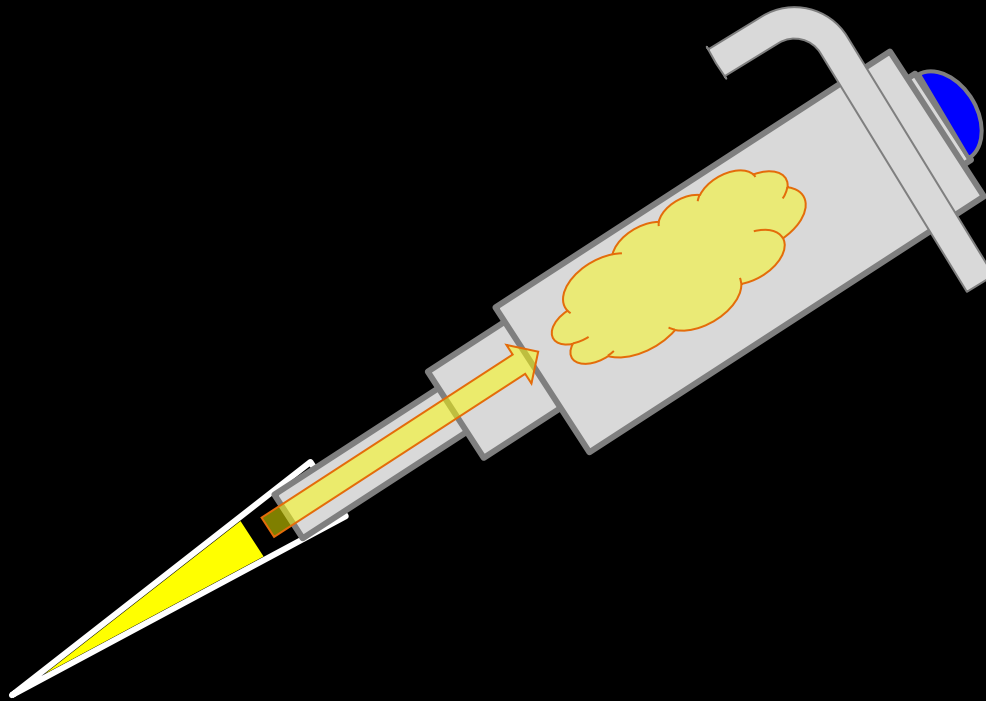




ごみ箱も工夫しましょう

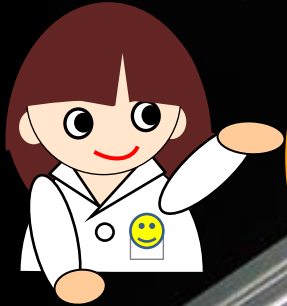
検体分注時のコンタミ

エアロゾルの発生によりエッペンドルフ内が汚染

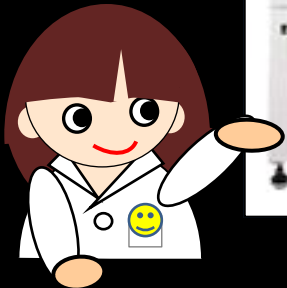


用手法による分注時のコンタミ

フィルター付チップ
が安心！



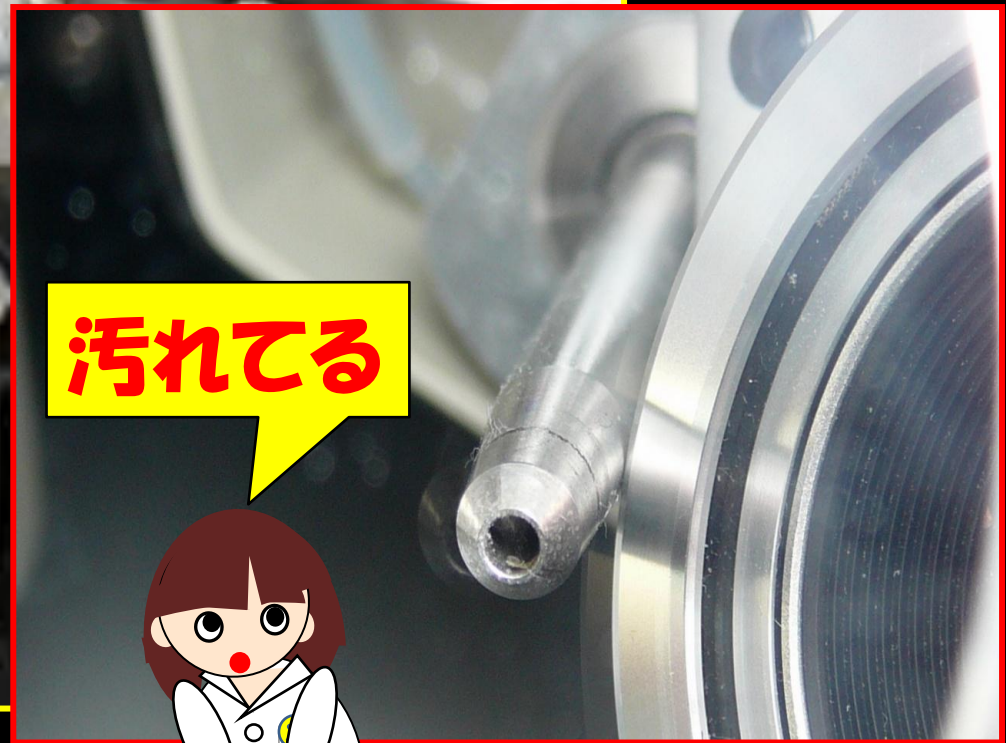
自動分析装置内によるコンタミ



各種測定機器における サンプルリング方法の比較

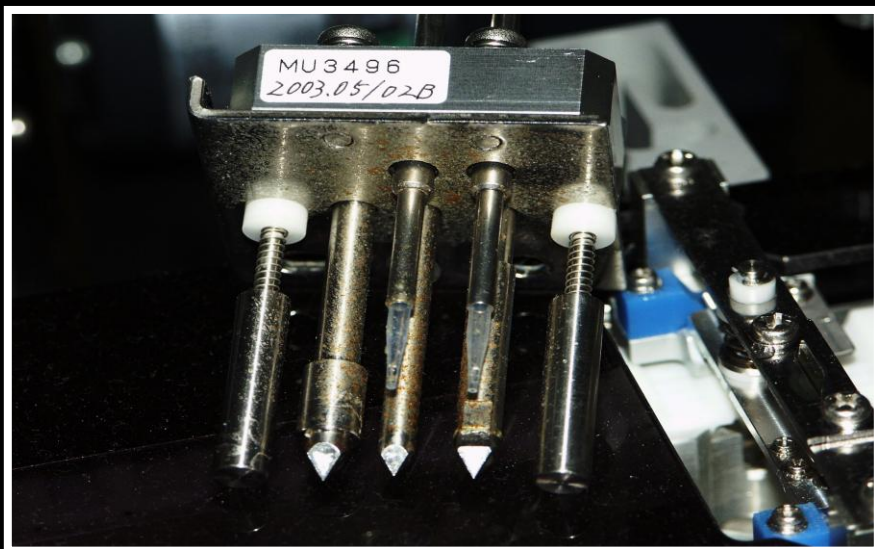
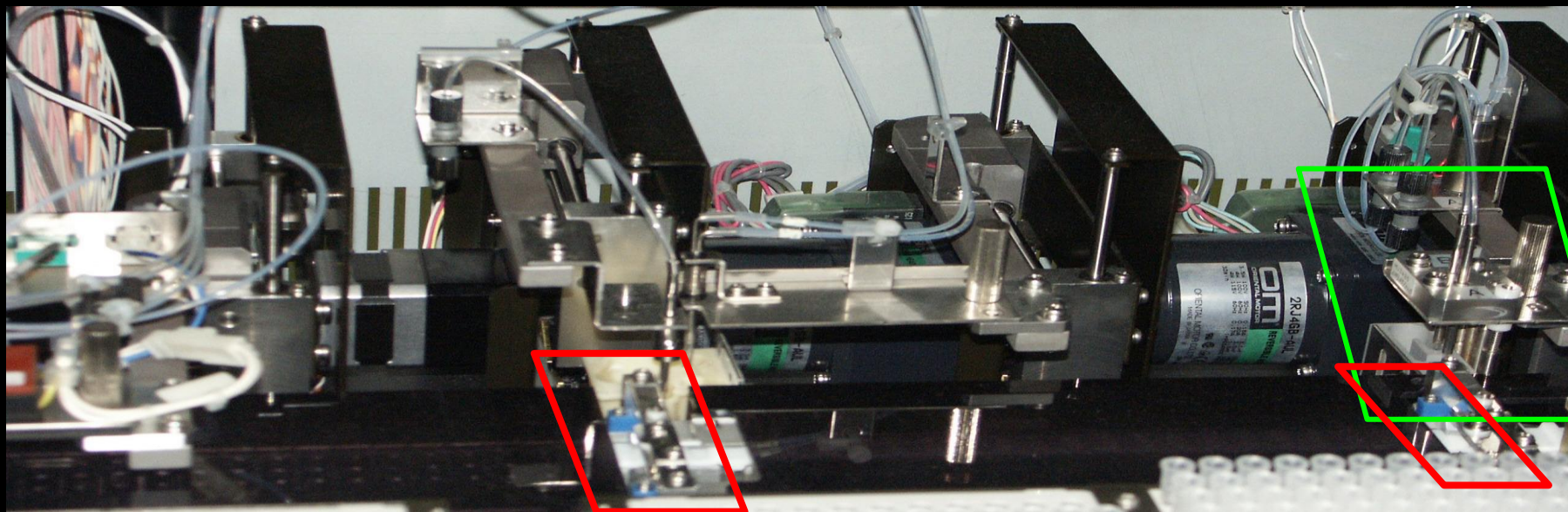
	サンプリング方法	コンタミの可能性
LF法	チップ交換	無し
LP法	チップ交換	無し
C 法	チップ交換	無し
H 法	チップ交換	無し
E 法	チップ交換	無し
S 法	チップ交換	無し
A 法	ノズル洗浄	有り (洗浄能力 $1/10^7$)

チップ交換式は大丈夫？



汚れてる

シールブレイクや攪拌時のコンタミ



キュベット移送アームによるコンタミ



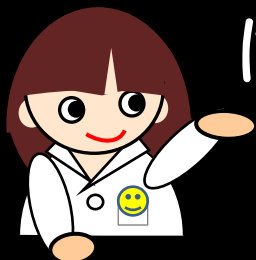
良い例



悪い例

感染症機器・試薬の選定と運用のポイント

1. 特異度・感度に優れたものを使用する。
2. 定性法による測定数値の報告には注意する
3. 検体採取から測定終了まで、検体間の汚染には細心の注意を払う。また、機器選定時
も考慮する。
4. 診察前検査や緊急検査など、測定値の信頼性を重視すれば、生化学検査との同時報告は不可能である。



測定結果の信頼性を高める近道は！

検査員が

「検査のプロ」としての自覚を持つ！

積極的に、チーム医療へ参加する。

