

《ノート》

HBs 抗原の定量的測定に関する基礎的検討

Fundamental Study on the Quantitative Assay of HBs-Ag

角田 隆巳* 小野 素明* 増田 計* 古川 保音*
 沢田 修** 森重 立身*** 森重 福美****

Takami KAKUDA*, Motoaki ONO*, Hakaru MASUDA*, Yosuto FURUKAWA*,
 Osamu SAWADA**, Tatumi MORISHIGE*** and Fukumi MORISHIGE****

*Department of Radiology, **Department of Surgery and ***Department of Internal Medicine
 Torikai Hospital, Fukuoka
 ****Department of Surgery, Tachiarai Hospital, Fukuoka

I. はじめに

近年、HB 関連ウイルスについて研究が進み肝炎との関係も明らかにされつつあり、最近では HBIG, インターフェロン, ワクチン等による治療や予防がなされ始めている^{1~3)}。

われわれは、B 型肝炎患者の治療指針や病態追跡のために、HBs 抗原の定量的測定を試みた。定量的測定には、標準血清を用いる方法と検体自身の倍数希釀による方法があるが、われわれは前者を採用した。この場合、現在市販中のキットを使用する限り、患者血清のほとんどが検量線の直線領域を逸脱するために多大の希釀を要する。したがって、検体の希釀に関する問題を中心にして HBs 抗原の定量化への基礎的検討を行い有意な結果を得たので報告する。

II. 方 法

測定は、RIA 法でダイナボット社の Ausria II-

* 福岡鳥飼病院放射線科 RI 室
 ** 同 外科
 *** 同 内科
 **** 太刀洗病院外科

受付：56年12月24日

最終稿受付：57年4月1日

別刷請求先：福岡市城南区鳥飼 6-8-5 (番 814)

福岡鳥飼病院放射線科 RI 室
 角田 隆巳

125 キットを利用し、これに日本オルガノン社から供与された Ad タイプ 10,000 ng/ml の標準血清を用いて施行した。キットの操作法はその使用説明書に従ったが、第二インキュベーションは一夜法を採用した。希釀溶液は、0.06M リン酸緩衝液 (pH 7.4) (PBS と略) を基調に、これに Ausria II-125 キットに添付されている陰性コントロール血清 (N. C. Ser. と略) を 1%, 5% または 10% の割合で、およびウシ胎児血清 (BSA と略) を 0.07% または 0.35% の割合で添加したものを使用した。

検量線は、[(倍数希釀された標準血清の各濃度の 1 分間当りのカウント数 (cpm 値))/(希釀溶液を陰性コントロールとした場合の cpm 値)] = Ratio で規格化した。

1. 検討事項

1) 検量線の作成に及ぼす希釀溶液の違いによる影響を検討するために、最初に陰性コントロールとしての希釀溶液間の cpm 値を比較した。次に、同一の希釀溶液で標準血清を希釀して、その希釀溶液を陰性コントロールとして規格化された検量線を作成し、この検量線の感度と直線性を検討した。

2) 低倍率から高倍率の希釀による希釀曲線の

Key words: HBs-antigen, radioimmunoassay, quantitative assay.

直線性を検討するために、標準血清を希釈したのと同一の希釈溶液を用いて、20～320 (Sample 1), 600～4,800 (Sample 2) および 8,000～64,000 倍希釈 (Sample 3) で検量線の直線領域に該当した3検体を用いて、希釈曲線を作成した。

3) 希釈溶液の違いによる定量値の最終濃度に与える影響を検討するために、100 (Sample 4), 1,000 (Sample 5) および 20,000 倍希釈 (Sample 6) で検量線の直線領域に該当した3検体を用いて、希釈溶液ごとに最終濃度を算出し比較検討した。

4) N. C. Ser. を 10% の割合で添加した PBS 希釈溶液で、20～320, 600～4,800 および 8,000～64,000 倍希釈で検量線の直線領域に該当した3検体を用いて、希釈倍率と最終濃度との関係を検討した。

III. 結 果

(1) 希釈溶液の違いによる検量線の作成に及ぼす影響

PBS 単独、N. C. Ser. を 1%, 5% または 10% の割合で添加した PBS および N. C. Ser. 単独の5種類の希釈溶液について、検量線の規格化条件の陰性コントロールとしての cpm 値を比較した (Table

Table 1 Net cpm of negative control

Diluent	Mean of net cpm (n = 5)
PBS	197±27
PBS added 1%-N.C. Ser.	151±39
PBS added 5%-N.C. Ser.	140±12
PBS added 10%-N.C. Ser.	125±21
N.C. Ser.	118±26

1). その結果、N. C. Ser. 添加 PBS 希釈溶液の cpm 値は、その添加量の増加に伴い減少傾向を示し、10% の割合で添加した場合は PBS 単独の場合に比べ約 40% 減少した。N. C. Ser. 単独と PBS 単独の場合を比較すると、その減少率はさらに増加した。

次に、上記の希釈溶液のうち N. C. Ser. 単独を除いた (大量に集めるのが困難なため) 4 種類で標準血清を希釈して検量線を作成した (Fig. 1)。その結果、N. C. Ser. 添加 PBS 希釈溶液で標準血清を希釈した場合、その各濃度における cpm 値は、希釈溶液間でほとんど同じ値を示した。したがって、規格化された検量線は N. C. Ser. の添加量が多いほど感度が上昇した。しかし、N. C. Ser. 添加 PBS による検量線の直線性は、その添加量にほとんど影響されずいずれも良好な直線性が得ら

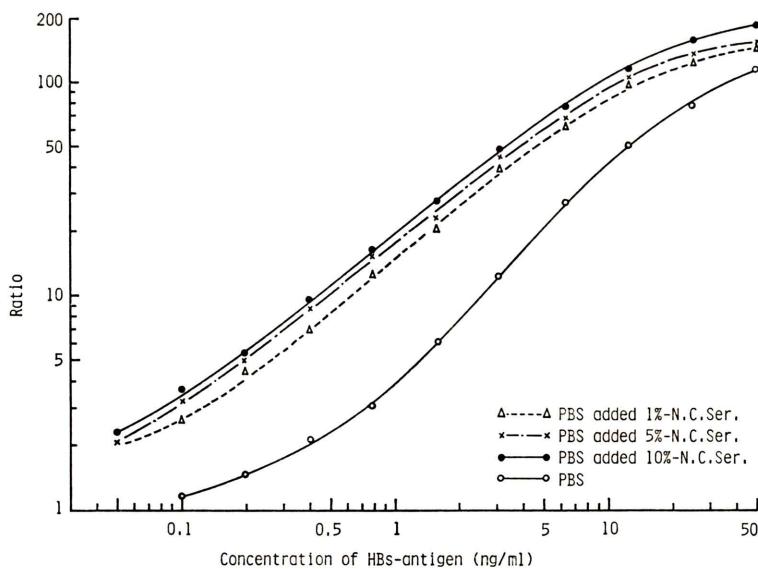


Fig. 1 Effect of diluent on standard curve.

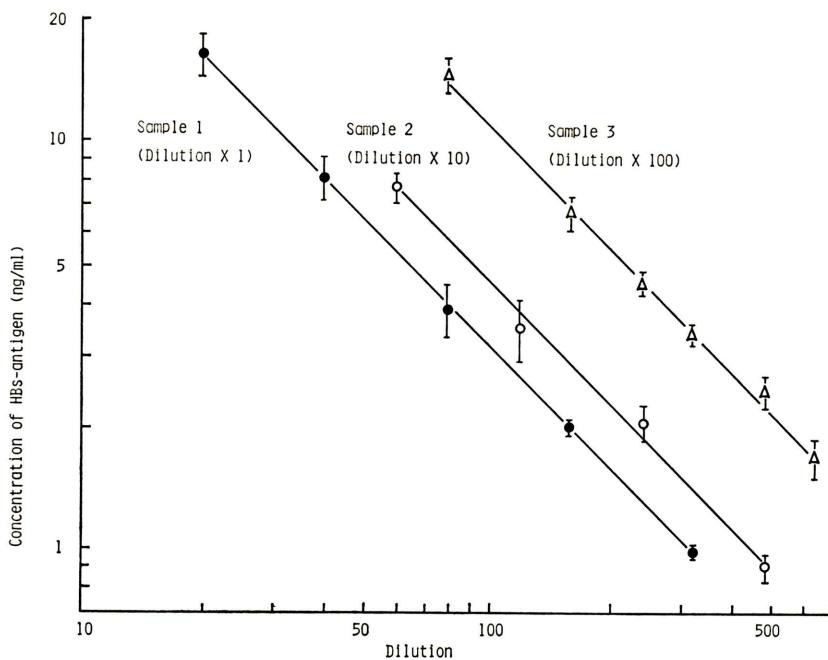


Fig. 2 Dilution curve.

Table 2 Influence on final concentration of HBs-Ag by dilution with different diluent.

Diluent	Case and diluted magnification		
	Final concentration of HBs-antigen (ng/ml)		
	Sample 4 × 100	Sample 5 × 1,000	Sample 6 × 20,000
PBS	72	9,082	82,420
PBS added 1%-N.C. Ser.	37	5,368	153,373
PBS added 5%-N.C. Ser.	33	5,631	178,267
PBS added 10%-N.C. Ser.	25	5,147	168,467
\bar{M}	32 ± 5	$5,382 \pm 198$	$166,702 \pm 10,239$
C.V.	15.6%	3.6%	6.1%

れた。また、N. C. Ser. 添加 PBS で作成した検量線は、PBS 単独の場合より感度・直線性とも向上した。

0.07% および 0.35% の割合で BSA を添加した PBS 希釀溶液を使用した場合、陰性コントロールとしての cpm 値は、両者の間にあまり差がなく、その値は N. C. Ser. 1% 添加 PBS の場合とほぼ同じ値を示した。また、標準血清をこの希釀溶液で希釀した場合の cpm 値は、各濃度とも N. C.

Ser. 添加 PBS の場合とほぼ同じ値を示した。したがって、検量線も N. C. Ser. 添加 PBS 希釀溶液の場合とほとんど重複し良好な直線性が得られた。

(2) 希釀曲線

N. C. Ser. を 1%, 5% および 10% の割合で添加した PBS 希釀溶液について、Sample 1, Sample 2 および Sample 3 を用い、それぞれの希釀曲線の平均値と偏差値を求めた (Fig. 2)。その結果、

Table 3 Influence on final concentration of HBs-Ag by serial dilution with PBS added 10%-N.C. Ser.

Patient	Dilution	Ratio	Diluted conc. (ng/ml)	Final conc. (ng/ml)	\bar{M} (C.V.)
S.T.	20	139.3	15.3	300	338 ± 38 (11.2%)
	40	92.3	7.4	296	
	80	61.3	4.5	344	
	160	39.7	2.5	400	
	320	20.7	1.1	352	
T.S.	600	109.0	9.4	5,640	5730 ± 299 (5.2%)
	1,200	67.6	5.0	6,000	
	2,400	39.2	2.5	6,000	
	4,800	21.8	1.1	5,280	
M.I.	8,000	138.7	15.0	120,000	$118,200 \pm 3,118$ (2.6%)
	16,000	90.8	7.2	115,200	
	24,000	70.4	5.1	122,400	
	32,000	52.2	3.6	115,200	
	48,000	47.6	3.1	148,800	
	64,000	39.8	2.6	166,400	

64,000倍までの希釈試験では、N.C. Ser. の添加量にはほとんど無関係に良好な直線性を示した。これらの希釈曲線は、PBS単独で希釈した場合に比べ直線領域の広さの点で数倍優れていた。

(3) 最終濃度算出に対する希釈溶液中の添加血清量の影響

PBS単独、N.C. Ser. を1%、5% および10% の割合で添加したPBSの4種類の希釈溶液について検討した(Table 2)。その結果、添加血清の量によって若干影響が認められた。すなわち、100倍希釈の例では添加量が多い程低値を示し、これらの間のC.V.は15.6%であった。1,000および20,000倍希釈の例では、5%添加の場合がわずかに高値を示したが、3者間のC.V.はそれぞれ3.6%と6.1%で比較的小さな影響を示した。

N.C. Ser. 添加 PBS 希釈溶液による最終濃度を、PBS単独によるそれと比較すると、100倍希釈の例で2/5、1,000倍希釈の例で3/5および20,000倍希釈の例で2倍の値を示した。このように、N.C. Ser. 添加 PBS 希釈溶液を用いた場合の定量値は、PBS単独に比べ低倍率の希釈を要した例は低値を示し、高倍率の希釈を要した例は高値を示した。

(4) 検体の希釈による最終濃度算出への影響

前項までの結果より、使用した希釈溶液のうち検量線の感度・直線性ともに向上したN.C. Ser. 10%添加 PBS 希釈溶液を用いて検討した(Table 3)。その結果、20~320倍および600~4,800倍の希釈を要した2例は、ともに安定した値を示し、最終濃度のC.V.はそれぞれ11.2%と5.2%であった。8,000~64,000倍の希釈を要した例も8,000~32,000倍までは安定した値を示し、C.V.は2.6%であった。

最後に、N.C. Ser. を10%の割合で添加した希釈溶液で同一検体を用いキット間のC.V.を検討したが、4回の測定では360 ng/mlを呈した検体が10%，500 ng/mlを呈した検体が14.2%および130,000 ng/mlを呈した検体が17.8%であった。

IV. 考 察

HBs抗原陽性例の経過観察には、RPHA法等による半定量的な方法が主流であるが、最近治療指針や病態追跡のためにタンパク濃度としてng/mlで表わすことが報告され始めた^{4~7)}。われわれも、この目的のためにRIA法やEIA法を用いてHBs抗原濃度の安定的測定について検討を重ね

てきた⁸⁾。しかし、この方法には標準血清の供給および検体の希釈に関する問題があり、まだ実用段階には到っていない。前者は、万国共通の標準血清が無いために各施設間の定量値が必ずしも統一されていない点である。後者は、現在市販中のキットを使用する限り検量線の直線領域が短いために検体の多くは多大の希釈を要求するが、この希釈方法が確立されていない点である。本来、検体の希釈には反応系のタンパク濃度を考えると正常ヒト血清を用いるのが理想的と思われる。しかし、実際には大量の血清を要し供給不可能なために、血清以外の buffer を用いざるを得ない。われわれは、過去に PBS を希釈溶液に用い良好な検量線の得られることを報告した⁸⁾。しかし、実際の測定では高倍率希釈における希釈曲線の直線性に満足な結果が得られず、10,000 ng/ml 以上の高濃度では定量値のバラツキが大きくなつた。

他方、血清タンパクを添加した buffer を希釈溶液に用いると良好な検量線や希釈曲線の得られる報告があるが^{5,7)}、われわれの場合も PBS に血清を添加すると良好な直線性が得られた。しかし、PBS 単独と血清添加 PBS 希釈溶液について定量値を比較した結果、両者には若干差がありいずれが真の値であるかという問題が提起された。(1)項で示したように、陰性コントロールの cpm 値が希釈溶液中の添加血清量に影響を受ける点と血清添加 PBS 希釈溶液の方が希釈曲線の直線性が向上する点を考慮すると、後者が真の値を示していると考えられる。しかし、これを実証するには新たな標準血清を要し、それが入手困難な現状では希釈溶液を一定にしてアッセイ系を統一することで検体の希釈による影響を減少せざるを得ない。現状では、安定的に供給される点で、N. C. Ser. の利用が実際的である。また、(1)項で、希釈した標準血清の各濃度の cpm 値は希釈溶液間ではほとんど一定であることを示したが、これは反応系の血清タンパク濃度が充分存在するためと考えられる。したがって、PBS に添加すべき血清量は、検体間の定量値が安定する点と検量線の感度が上昇する点で多い程良いと思われるが、その他には

ほとんど影響がみられないので、供給量が少ないと考へると10%添加程度が実際的と思われる。そこで、われわれは N. C. Ser. を 10% の割合で添加した PBS を統一した希釈溶液として用いることにした。この方法で、一施設の HBs 抗原定量は充分可能であり経過観察にも充分使用し得ると考えられる。

N. C. Ser. 添加 PBS 希釈溶液で作成した検量線の直線領域は、ほぼ 0.1~10 ng/ml だから検体の 100 倍希釈では 10~1,000 ng/ml, 10,000 倍希釈では 1,000~10,000 ng/ml まで定量が可能である。したがって、未知検体は原液、100 倍および 10,000 倍希釈の 3 種類についてアッセイすれば大部分の症例は、その濃度を測定し得、二回目以降の測定は一種類のアッセイでほとんど定量可能であることが示唆された。

V. 結 語

- 1) 希釈溶液は、検量線や希釈曲線の直線性が向上する点で PBS 単独より血清を添加した PBS を用いた方が良好であった。
- 2) PBS に添加した血清量が異なると最終濃度算出に若干影響がみられた。
- 3) PBS に一定の割合で血清を添加し、希釈溶液を統一すると、検体の希釈による最終濃度算出への影響が殆んど認められず優れた再現性を示した。

文 献

- 1) Kohler PF, Dubois RS, Merrill DA, et al: Prevention of chronic neonatal hepatitis B virus infection with antibody to the hepatitis B surface antigen. N Eng J Med 291: 1378-1380, 1974
- 2) 白木和夫, 桜井迪郎, 衛藤 隆, 他: 抗 HB ヒト免疫グロブリンによる HB ウィルス垂直感染阻止に関する検討. 医学のあゆみ 116: 878-880, 1980
- 3) 矢野右人, 佐藤 彰, 古賀満明, 他: HB ウィルス母児間感染の防止. 診断と治療 69: 735-740, 1981
- 4) 湯本泰弘, 田中義淳, 難波経雄, 他: HBs 抗原, 抗体の量的変動よりみた慢性肝炎の検討. 核医学 16: 857-870, 1979
- 5) 辻 孝夫, 土屋正夫, 荒木清典, 他: EIA 法による HBs 抗原の検出と定量性——とくに Photo-Elisa I

型比色計による微量定量化の試みについて, 肝臓 **6**: 641, 1980

- 6) 鶴田初男, 金森勇雄, 中野 哲: ラジオイムノアッセイキットによる HBs antigen 定量的測定の検討. **RADIOISOTOPES** **30**: 31-34, 1981

- 7) 神田靖男, 星野茂角, 水島文子, 他: B型肝連抗

原・抗体検出方法の比較研究. **Immunology** **3**: 205-212, 1981

- 8) 角田隆巳, 小野素明, 増田計, 他: EIA 法および RIA 法による HBs 抗原の測定感度と定量的測定の検討. **基礎と臨床** **14**: 4944-4948, 1980