

〈原著〉

化学発光酵素免疫法を用いたHBs抗原測定の B型慢性肝炎患者での評価

滝脇 正貴、宇治 義則、北島 勲

Evaluation of HBs antigen chemiluminescence enzyme immunoassay for chronic hepatitis B patients

Masaki Takiwaki, Yoshinori Uji and Isao Kitajima

Summary The PCR based method for HBV-DNA levels is widely used in the monitoring of hepatitis treatment. However, HBV-DNA levels fall immediately when treatment is initiated by nucleoside and nucleotide analogues such as lamivudine, adefovir, and entecavir. The HBs Antigen (HBsAg) levels are one of the important markers for monitoring hepatitis treatment. We evaluated the Chemiluminescence Enzyme Immunoassay (Sysmex HBsAg quantitative assay, Sysmex, Kobe, Japan) with chronic hepatitis B patients serum. All serum samples were obtained at Toyama University Hospital (Toyama, Japan) after receiving informed consent for this study. The HBsAg levels in serum were analyzed using an HISCL-2000 automated chemiluminescence immunoassay analyzer and HISCL HBsAg reagent (Sysmex, Kobe, Japan). The comparison study for HBsAg levels used were Architect 1000i (ABBOTT, USA), and for the PCR based method of HBV-DNA levels we used the Cobas PCR method (Roche). The basic analytical performance shown for the Sysmex HBsAg method was as follows: linearity 0.03 ~ 2500 IU/mL, within and-day-to day precision (CVs) was 2.3 ~ 3.2% (3.2 ~ 1115 IU/mL, N=15). Correlations between the Sysmex method (X) and the Architect method (Y) were very well ($Y = 1.78X - 60$, $r = 0.96$, $N = 38$). The concordance study between Sysmex HBsAg levels and HBV-DNA levels was judged to be negative in HBV-DNA levels by the Taqman PCR method were 100% equality for the HBV negative patient group ($N = 30$), and 11.6% equality for the HBV positive patient group ($N = 30$). Furthermore, two cases of a time course for the of treatment patients by nucleoside and nucleotide analogues within 5 months with HBsAg levels and HBV-DNA levels showing approximately similar decreasing curves. On the other hand, one case with long-term nucleoside and nucleotide analogues of treatment patients showed that HBV-DNA levels had decreased. In contrast, HBsAg levels had increased. Nucleoside and nucleotide analogues

富山大学附属病院 検査部
〒930-0194 富山市杉谷2630

受領日 平成23年11月10日
受理日 平成23年11月14日

Clinical Laboratory Center, Toyama University Hospital,
2630 Sugitani, Toyama, Toyama 930-0194, Japan

Correspondence: Yoshinori Uji,

Clinical Laboratory Center, Toyama University Hospital,
2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

treatment were decreasing HBV DNA levels in blood. Nevertheless, a covalently closed circular DNA (cccDNA) of the HBV replicative intermediate level does not change, therefore, HBsAg is detected. Furthermore, a recurrence of hepatitis is reported when HBV DNA levels fall below the detection limits, and interrupted a treatment. Our data suggested that both HBV DNA levels and HBs Ag levels are useful in the treatment of nucleoside and nucleotide analogues.

Key words: HBs antigen, HBV-DNA, CLEIA

I. 緒言

B型肝炎ウイルス (HBV) は世界の4億人以上が持続感染している慢性肝炎の原因ウイルスの一つである¹⁾。従来から、HBs抗原の測定は、HBV感染の早期マーカーとしてのスクリーニング検査に利用されている²⁾。また、B型慢性肝炎のHBVモニタリングには、ウイルスの活動性指標としてHBe抗原およびHBe抗体が用いられ、治療効果の判定にはHBV-DNA (リアルタイムPCR) が臨床の場において主に利用されている。

HBV治療薬として、核酸アナログ製剤を投与されている患者では、HBV DNAが速やかに低下することが知られており、HBV治療のモニタリングにはHBV DNAのみでは必ずしも十分ではない。HBs抗原はHBVの持続感染の間、血中に分泌されるエンベロップ蛋白であり、ウイルス複製のテンプレートとなるcovalently closed circular DNA (cccDNA) と関連し^{3,4)}、HBs抗原量の測定はウイルス複製のマーカーになり得ることが示唆される。

近年、HBs抗原測定は化学発光を用いた高感度測定が可能となり、治療モニタリング指標として期待されている⁵⁾。

今回、化学発光酵素免疫測定法を原理とした全自動免疫測定装置HISCL-2000i (Sysmex)⁶⁾によるHBs抗原測定法の基礎的検討と、慢性B型肝炎患者におけるHBs抗原の動向について検討し知見を得たので報告する。

II. 対象と方法

1. 対象

富山大学附属病院検査部にHBV-DNA TaqMan PCR測定の依頼があった入院および外来患者血

清で、インフォームドコンセントを得た78例を対象とした。尚、血清は測定まで-80℃にて保存した。

2. 方法

HBs抗原定量は全自動化学発光免疫測定装置HISCL-2000iおよびその専用試薬HISCL HBsAg試薬 (Sysmex) により測定した。測定原理は2ステップサンドイッチ法を用いた化学発光酵素

Table 1 Within and day to day precision

Within-run precision	(n=15)		
	Low	Medium	High
mean (IU/mL)	3.13	178.4	1115.5
SD	0.082	5.72	25.4
CV (%)	2.6	3.2	2.3

Between-day precision	(n=15)	
	Control 1	Control 2
mean (IU/mL)	4.25	25.55
SD	0.157	0.623
CV (%)	3.7	2.4

Table 2 Concordance study between HBsAg and HBV-DNA

HBV negative patients group				
		HBsAg		total
		positive	negative	
HBV DNA TaqMan negative PCR		0	30	30
Concordance rates : 100 %				

HBV positive patients group				
		HBsAg		total
		positive	negative	
HBV DNA TaqMan negative PCR		25	5	30
Concordance rates : 16.7 %				

免疫測定法 (CLEIA) である。測定範囲は0.03 ~2500 IU/mL、測定範囲を超えた検体については、添付の専用希釈液により希釈して測定した。比較検討には、全自動化学発光免疫測定装置 ARCHITECT-i 1000、および、その専用試薬アーキテクト・HBsAg QT (Abbott)、ウイルスの増殖の有無を判定するためのHBe抗原の測定にはアーキテクト・HBeAg QT (Abbott)、HBV DNA TaqMan PCRはコバスTaqMan HBV (ロシユダイアグノスティックス) を用いた。

Ⅲ. 結果

1. 再現性

HBs抗原濃度の異なる3種類のプール血清の同時再現性は、変動係数 (CV) 2.3~3.2% (3.2 ~1115 IU/mL, N=15)、コントロール血清 (2濃度) の日差再現性はCV 2.4~3.7%であった (Table 1)。

2. 他法との相関

HBs抗原陽性検体38例を用いたHISCLとARCHITECTとの相関は、 $y = 1.78x - 60.1$, $r = 0.96$ と良好であった (Fig. 1)。

3. HBV DNA TaqMan PCRとの判定一致率

HBV DNA TaqMan PCRが検出感度以下であった患者血清60検体を用いて、HBs抗原の測定値と比較した。判定一致率はHBV非感染者群 (n=30) で100%、HBV感染者群では16.7%であった (Table 2)。

4. 慢性B型肝炎患者における臨床評価

継続的な検体採取が可能であった核酸アナログ製剤 (エンテカビル) で治療中の慢性肝炎患者3症例について、HBV DNAとHBs抗原定量値のタイムコースを追跡した。

症例1は、治療開始とともに、HBV DNAは徐々に低下しHBs抗原も速やかに減少を示した。また、ALTは正常化し、HBe抗原も陰性化しており、ウイルスの増殖は沈静化しているものと考えられる (Fig 2, case 1)。

症例2は、核酸アナログ治療開始後、HBV DNAは速やかに低下し、ALTは正常化した。HBs抗原は高値に推移し、ほとんど変化がみられず、HBe抗原も陽性を示していることから、ウイルスの増殖は持続していると考えられる (Fig. 2, case 2)。

症例3は、長期間、核酸アナログ製剤を投与している症例である。HBV DNAは低値状態で推移しているが、HBs抗原は増加傾向を認め、HBe抗原は陽性であることから、ウイルスの増

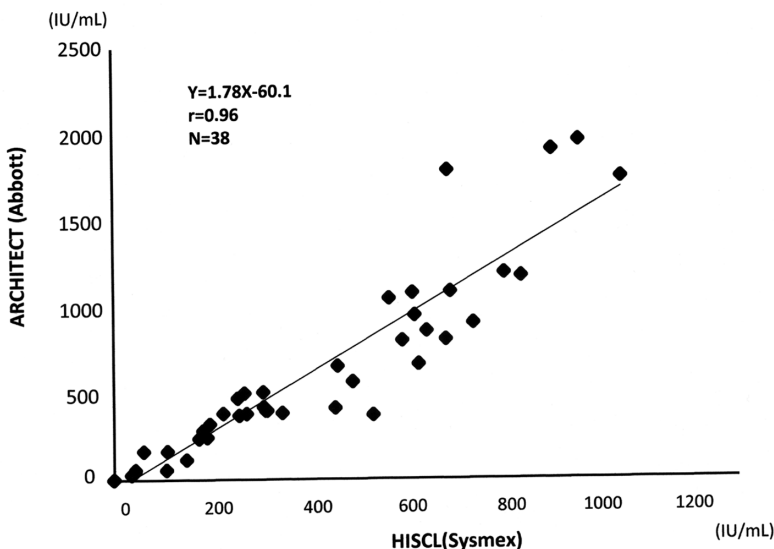


Fig. 1 Correlation between HISCL method and Architect method.

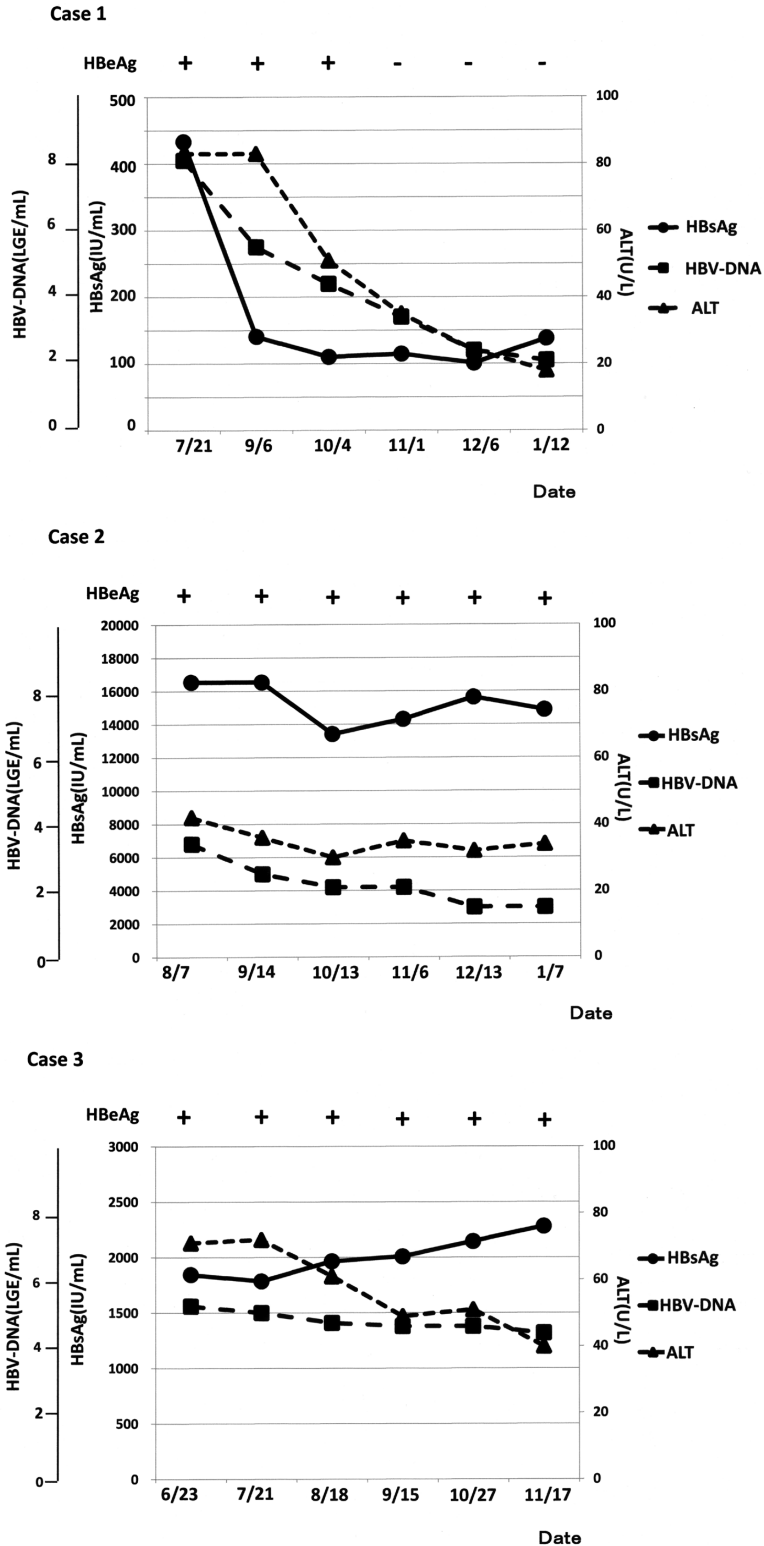


Fig. 2 Course of markers for chronic HBV-infected patients with nucleoside and nucleotide analogues therapy (case 1~3).

殖は持続しているものと考えられる (Fig 2、case 3)。

IV. 考察

化学発光酵素免疫測定法を原理とした全自動免疫測定装置HISCL-2000iによるHBs抗原定量は再現性、他法との相関ともに良好であった。本法は十分なダイナミックレンジを有し、分析時間も17分と短いことから、高感度で迅速かつ簡便な測定法である。また、HBV-DNAが検出感度以下の検体においても、HBs抗原は定量可能であり、HBV DNAとの一致率は16.7%とHBV DNAが検出限界以下になっても高感度に測定できることが明らかとなった。また、核酸アナログ製剤による治療中の症例の検討から、治療開始後HBV DNAは速やかに低下するが、HBe抗原が陽性でありHBs抗原量が高値を維持する症例や増加傾向を示す症例がみられHBs抗原測定の意義が示唆された。HBs抗原量とHBV DNAが乖離する原因としては、両者の産生経路の違いが考えられる。すなわち、ウイルス増殖の複製中間体であるcccDNAから4本のmRNAが転写され、DNAを含むウイルス粒子とは別のルートからHBs抗原は多量に分泌される⁹⁾。核酸アナログ製剤はウイルスの逆転写酵素を阻害するため、HBV DNAを含んだウイルス粒子は産生されない。ところが、HBs抗原の産生ルートは核酸アナログ製剤の影響を受けないため、肝細胞から血中への放出が続いている。HBs抗原量は自然経過中の症例においてはHBV DNA量と相関するが、核酸アナログ治療開始とともに両者には乖離現象がみられる⁷⁻⁸⁾。また、HBs抗原と同様に、ウイルスDNA粒子とは別ルートから産生されるマーカーとしてB型肝炎ウイルスコア関連抗原 (HBcrAg) が知られているが、HBcr抗原も核酸アナログ治療下ではHBV DNA量と乖離する⁹⁻¹⁰⁾。血清中のHBs抗原量は肝細胞中のウイルスのcccDNA量と相関し¹¹⁾、cccDNAは感染した肝細胞数を最も正確に反映するマーカーと考えられ、cccDNAの測定により核酸アナログ治療中止後の再発を予測できる¹²⁾。しかしながら、肝組織内のcccDNA量を測定するには、肝生検が必要なため日常診療に適用するには困難がある。そこで、cccDNAを直接測定しなくても、HBs抗

原量の測定がウイルス感染細胞のマーカーとして代用できる¹³⁻¹⁴⁾。今回の症例においても、HBV DNAは早期に低下するが、HBs抗原は非常に高いレベルで推移している症例もあり、この症例ではHBs抗原量がcccDNA量を反映しているものと考えられる。現在のB型慢性肝炎の治療ガイドラインでは、治療モニタリングにHBV DNA測定が推奨されているが、治療中止の基準は明確には示されていない。核酸アナログ治療によりHBV DNAが陰性化しても、治療中止により肝炎が高率に再発しており、治療効果の指標としてHBV DNA測定のみでは不十分であり、HBs抗原の測定は治療中のHBV増殖の有用な指標になると考えられ、HBV DNAとHBs抗原測定の同時測定により、HBVの動態をより包括的に評価できるものとする。

V. 結語

核酸アナログ製剤による治療により、HBV DNAは早期に低下するが、HBs抗原量は長期間にわたって定量測定可能であることから、HBs抗原定量測定は治療効果判定や、薬剤投与の中止など、治療モニタリングの指標として有用なマーカーであることが示唆された。核酸アナログ治療患者ではHBs抗原量、HBV DNA量の両者を経時的に把握することが重要である。

文献

- 1) Lok AS: Chronic hepatitis B. *New Engl J Med*, 346: 1682-1683, 2002.
- 2) Dienstag JL: Hepatitis B virus infection. *New Engl J Med*, 359: 1486-1500, 2008.
- 3) Wurstthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M et al.: Peginterferon alpha- 2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 44: 675-684, 2006.
- 4) Thompson AJ, Nguyen T, Iser D et al.: Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis Be antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intra-hepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology*, 51: 1933-1944, 2010.
- 5) Martinot-Peignoux M, Lada O, Cardoso AF et al.: QuantitativeHBsAg: a new specific marker for the diagnosis of HBsAg inactive carriage. *Hepatology*, 52: 1397, 2010.
- 6) 高木和美, 田中靖人, 長沼初枝ほか: 新規HBs抗原

- 定量試薬の臨床的意義. 臨床病理, 55: 619-625, 2007.
- 7) Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, Croagh C, Bell S, Desmond PV, et al.: Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. *J Hepatol*, 52: 508-513, 2010.
 - 8) Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, et al.: A decline in hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) predicts clearance, but does not correlate with quantitative HBeAg or HBV DNA levels. *Antivir Ther*, 13: 547-554, 2008.
 - 9) Shinkai N, Tanaka Y, Orito E, et al.: Measurement of hepatitis B virus core-related antigen as predicting factor for relapse after cessation of lamivudine therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*, 236: 272-276, 2006.
 - 10) Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, et al.: Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver Int*, 26: 90-96, 2006.
 - 11) Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wurstorn K, Petersen J, Lau G, et al.: Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*, 126: 1750-58, 2004.
 - 12) Chen Y, Sze J, He ML: HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol*, 10: 82-85, 2004.
 - 13) Yun-Fan: Clinical utility of hepatitis B surface antigen quantitation in patient with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 53: 2121-19, 2011.
 - 14) Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, et al.: Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5: 1462-68, 2007