

Latex 凝集反応を用いた Influenza の迅速診断

日大生産工(院) ○根本 浩史

日大生産工 神野 英毅

【緒言】

Influenza は *orthomyxovirus* 科に属する Influenza ウイルスが感染することで起きる、冬季に流行が集中する疾患である。その症状は咳、くしゃみなどの上気道炎症の他に、急激な発熱、頭痛、悪寒、全身倦怠感、筋肉痛などの全身症状を示し、進行が極めて早いことが知られている¹⁾。また乳小児や老人などが感染すると肺炎や脳炎、脳症など重篤な合併症を起しやすく、施設内などで爆発的な感染を引き起こすことから対策が望まれている。近年になり Influenza の治療薬として抗ウイルス薬である塩酸アマンタジンやザナミビルなどが保健適応となったがこれらはウイルス増殖期の感染後 4-8 時間以内でしか効果がないため迅速かつ高感度な診断が求められている²⁾。従来の Influenza 診断法としてウイルス培養法、免疫学的血清法、RT-PCR などがある。これらは正確だが確定までに速くて数日を必要とし、特別な設備が必要なため迅速診断にはならなかった。これに対し最近では迅速診断キットが開発され臨床現場で使用され効果を上げている。これらのキットは、EIA やイムノクロマトグラフィー法などの抗体抗原反応を利用している³⁾。一方、同じ迅速診断法の一つである Latex 凝集反応(LA)は簡便かつ迅速な診断ができ、Latex 近赤外比濁法(LPIA法)を用いることで高感度な測定が可能である。この方法は既に Ferritin や CRP などの測定で効果を上げており、多くの医療、研究機関で使われている。そこで本研究では Latex 凝集反応を用いて Influenza の迅速診断を行うことを目的として、

Influenza A 抗体吸着 Latex 試薬を作製し、その検出感度を検討した。

【実験】

1) Influenza A 抗体吸着 Latex 試薬の作製

粒径の異なる 2 種類の Polystyrene 製 Latex 粒子 (Sekisui N461 0.464 μm 、Seradyn PS μm) 及び CH_2Cl 修飾 Latex 粒子 (Estapor N9-020 0.22 μm) を使用し、Influenza A ウイルスモノクローナル抗体を物理吸着及び化学結合法を用いて吸着させた後、洗浄し Influenza 抗体吸着 Latex 試薬を作製した。試薬は測定直前まで冷蔵保存した。

2) 試薬の測定

測定には、Spotochem-IM SI-3510 (アークレイ) LPIA 測定装置を使用し 660nm の測定波長で 5 分間、吸光度変化量を求めた。反応緩衝液として Tris-HCl、EDTA2Na、BSA、NaCl を混合し、pH8.3 に調製したものに、反応増感剤として PEG20000 (PEG) を適量加えて使用した。抗原は既知の不活化 Influenza A ウイルスを使用し、核タンパクを抽出するため Octanoyl-N-methylglucamide (MEGA8)、Polyoxyethylen(20) Sorbitan Monolaurate (Tween 20)、Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether (Triton-X100) の 3 種類の非イオン性界面活性剤で処理した物を使用した。

【結果】

増感剤濃度の検討

今までの実験から PEG を加えることで Latex 凝集反応の反応性が高くなるが、濃度が高すぎると自己凝集による偽陽性反応を起こす。そこで至適 PEG 濃度を求めるため Latex

試薬をブランクで測定した結果を Fig.1 に示した。2.9%以下では吸光度変化量が負の値になったが、3.0%以上の濃度では自己凝集反応が確認された。そこで試薬の反応性を確保するために吸光度変化量が上昇する手前の濃度である 3.0%を至適増感剤濃度とした。

界面活性剤の検討

使用した抗体は主に Influenza A ウイルスの核タンパクにエпитープがあるため、核タンパクを抽出することで抗原性を高めることが出来ると考えられる。そこで3種類の界面活性剤を使用、及び未処理の抗原を測定した結果を Fig.2 に示した。MEGA8、Tween20、Triton-X100 の順に反応性が高かった。未処理の抗原は低かったが反応性を示した。これは、若干だがウイルスの表面にもエпитープがあったためだと考えられる。MEGA8 は最も分子量が低く疎水性も低いため Latex 凝集反応を阻害する因子が最も少ないと考えられ、反応性が高かったと考えられる。そこでリファレンス界面活性剤として MEGA8 を選択した。

Influenza 抗体吸着 Latex 試薬の反応性

上記から求めた測定条件を用いて各 Latex 試薬を測定した結果を Fig.3 に示す。各試薬とも抗原濃度の上昇に伴い Latex 凝集反応による吸光度変化量の上昇が確認され、Influenza 抗原濃度 0.5 ~ 10 μ g/ml の間で検量線が得られた。またこの抗原濃度範囲では未反応、過剰凝集反応などの測定検出限界は見られなかった。

【まとめ】

Influenza A 抗体吸着 Latex 試薬を作製し、Influenza 抗原濃度 0.5 ~ 10 μ g/ml の範囲で測定する事に成功した。今後は実検体を測定し試薬の特異性を求めたい。

【参考文献】

- 1) K. Odawara Infection Control, 11, 12 (2002), p19~23.
- 2) 加地 正英 からだの科学 228 号 (2002), p33.
- 3) M. Yamazaki Influenza, 4, 1 (2003), p43~50.

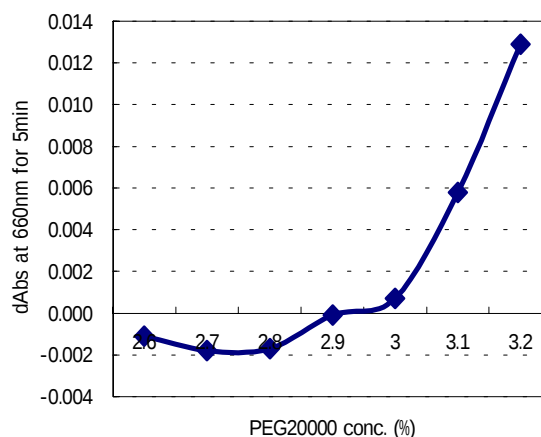


Fig.1 PEG20000濃度の違いにおける
Latex試薬のバックグラウンドの変化

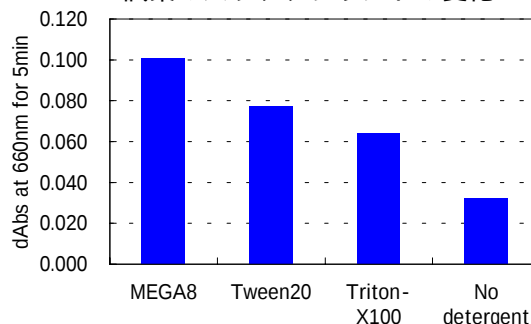


Fig.2 各界面活性剤の反応性
Influenza A ウイルスを各界面活性剤で処理し10 μ g/mlに調製、または反応緩衝液で同濃度に希釈した抗原を測定した。

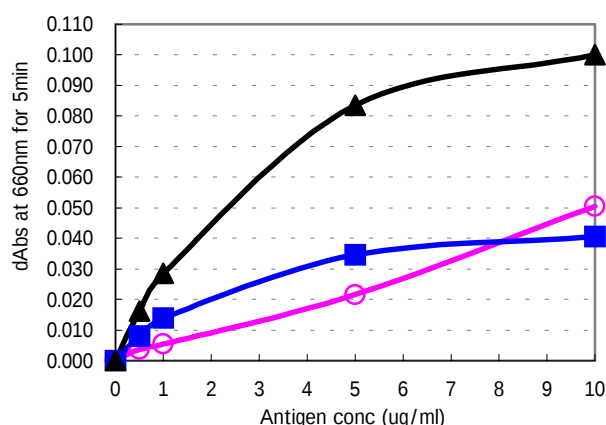


Fig3 各 Influenza A 抗体吸着 Latex 試薬の反応性
▲:Sekisui N461 0.464 μ m ■:Seradyn PS 0.302 μ m
○:Estopor K9-020 0.22 μ m
0.5 ~ 10 μ g/ml の抗原濃度範囲で測定した。