

## LPIA 法による Influenza 迅速診断法の研究

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 ウイルスが空気や飛沫などにより感染して発病する急性呼吸器感染症である。主に A 型と B 型が登記に流行するが、伝播性、感染性が高く、乳小児や老人などのリスク患者は死亡率が高いこと、施設内などで爆発的な感染を引き起こすことから迅速な診断が求められる。

Influenza の診断は、臨床情報、ウイルス分離にて確定されるが<sup>1)</sup>、現在では多くの臨床機関で Influenza 迅速診断キットが使用され早期診断、治療に貢献している。これらはイムノクロマト法や EIA などの抗原抗体反応を利用しており、簡便かつ迅速的に判定することができる。しかしながら、中規模以上の機関では検査が集中するため、検査の自動化、データの管理しやすさも求められている。

Latex 試薬を用いる Latex Photometric Immunoassay: LPIA 法は迅速かつ感度に優れ、各種 LPIA 自動分析装置に使用可能である。そこで Influenza を LPIA 法にて迅速的に診断するため抗 Influenza 抗体結合ラテックス試薬の検討を行った。

### 材料、実験方法

#### 1、Latex 粒子の作製

担体である Polystyrene latex 粒子はソープフリー乳化重合により作製した。200ml 4 つ口セパラフラスコに冷却コンデンサ、窒素供給管、マグネテックスターラ、NS-310E ハンディホモジナイザ(マイクロテックニチオン)を装着して恒温槽中にセットした。容器内を窒素ガスにて置換して、脱気済みイオン交換水、スチレンモノマーを加えた。40℃ に交換水、スチレンモノマーを加えた。40℃ に昇温してホモジナイザを作動させスチレンモノマーを乳化分散した後、

チオ硫酸ナトリウム、過硫酸カリウムによるレドックス開始剤を加え重合を開始した。1 時間反応後、ホモジナイザを取り外しマグネテックスターラを 250rpm で作動させ、70℃ で 3 時間反応させた。ヒドロキノンにて反応を停止して 40 日間透析により精製した。使用した試薬は全て和光純薬工業の特級を使用した。

#### 2、Latex 粒子の物性測定

精製した Latex 粒子は JSPM-5200 走査型プローブ顕微鏡(日本電子)にて AFM 像を撮影した。粒径および分散は N5 サブミクロン粒子アナライザ、LS13 320 粒度分布測定装置(ベックマン・コールター)を使用した。表面荷電は DELSA440 ゼータ電位測定装置(ベックマン・コールター)およびポリ塩化ジアリルジメチルアンモニウム(PDDACI)の吸着量をトルイジンブルーを指示薬としてポリビニル硫酸カリウム(PVSK)によるコロイド滴定により求めた。

#### 3、抗 Influenza 抗体結合 Latex 試薬の作製

精製した Latex 粒子を用いて、抗体は Influenza ウイルスの核タンパクに反応する抗 Influenza A モノクローナル抗体(Fitzgerald, USA)を使用し、物理吸着法により Latex 粒子上に固定化して抗 Influenza 抗体結合 Latex 試薬とした。反応性の評価は標準抗原として不活化 Influenza ウイルス(Fitzgerald, USA)を界面活性剤を含む希釈液にて希釈して使用し Spotochem-IM SI-3510 LPIA 測定装置(アークレイ)を使用し 660nm の測定波長で 5 分間、BSA(Sigma, USA)を含む Tris-HCl 緩衝液にて測定し Latex 凝集反応による吸光度変化量から反応性を求めた。

#### 4、LPIA 法を用いた Influenza 迅速診断法の臨床評価

臨床評価は 2005 年 2 月～3 月期に採取した

鼻腔拭い液 96 検体を検体抽出液に溶解しフィルターで濾して検体として使用した。比較対照法としてイムノクロマト法を用いた迅速診断キットであるキャピリア FluA,B(日本 BD)およびウイルス分離培養、RT-PCR を提携機関にて行われた。

## 結果、考察

### (1) Latex 粒子の評価

作製した粒子および市販粒子である PS 0.302(Seradyne)の物性を Table 1.に示す。得られた粒子の粒径は 0.318  $\mu\text{m}$  及び 0.161  $\mu\text{m}$  であり Latex 凝集反応に適した粒径範囲内だった。粒径分布は市販のものに近いものが得られ、Fig.1 でも観察できる均一な粒子を確認できた。また、表面荷電の測定では粒子は負の移動度を示しており、PDDACI の吸着から粒子表面には開始剤由来の官能基が存在し粒子の分散安定性に寄与していることが示された。

### (2) 抗 Influenza 抗体結合 Latex 試薬の反応性

各 Latex 試薬を測定した結果を Fig.2 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 A 抗原 1 ~ 25  $\mu\text{g/ml}$  の間で検量線が得られた。またこの抗原濃度範囲では PSM7/7 が最も反応性が高く、測定間誤差も少なかった。

### (3)検体を用いた LPIA 法の臨床評価

ウイルス分離培養との比較では感度 89%、特異度 84%、一致率 84%、イムノクロマト法との比較では感度 100%、特異度 84%、一致率 86%であった(Table 2.)。感度に関しては市販品と同等な成績が得られているが測定条件によっては疑陽性が現れた。

## 結論

抗 Influenza 抗体結合 Latex 試薬を作製した。標準ウイルス抗原を用いた試験では特異的な反応を示し、1 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で検量線が作製できた。また LPIA 法を用いた臨床試験では測定時間 5 分間と迅速に結果が得られ、良好な感度が得られたことから LPIA 法による Influenza の迅速診断は有効だと考えられる。

Table 1. Physical property of Latex particle

	D( $\mu\text{m}$ )	C.V.(%)	(-mV)	$\sigma$ ( $\mu\text{mol/m}^2$ )
PSM7/7	0.358	18.08	56.57	31.14
PSS7/7	0.161	14.56	61.44	36.86
CM0.301	0.288	13.17	80.83	107.79

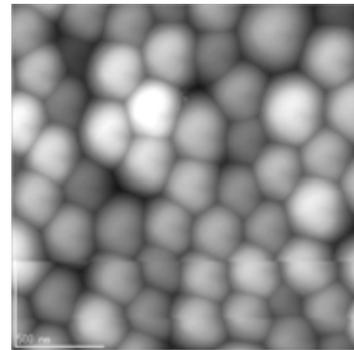


Fig.1 AFM photographs of Latex particle

Mode:AC-AFM 2.0  $\mu\text{m}$  x 2.0  $\mu\text{m}$  Sample:PSM7/7

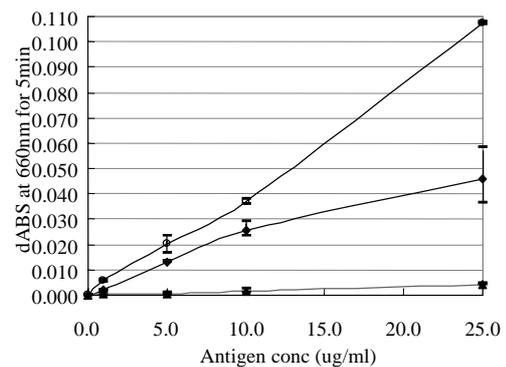


Fig. 2 Immunoresponse of anti Influenza A coupled latex reagent measured by SP-IM

SI-3510 660nm 5min N=5

: PSM7/7  $\blacklozenge$  : CM0.301  $\blacktriangle$  : PSS7/7

Table 2. Evaluation of Influenza clinical specimens detected by LPIA and each testing method

LPIA	Virus culture/PCR			sensitivity	specificity	concordance rate
	Positive	Negative	Total			
Positive	8	14	22	89%	84%	84%
Negative	1	73	74			
Total	9	87	96			

LPIA	Immunochromatography			sensitivity	specificity	concordance rate
	Positive	Negative	Total			
Positive	8	14	22	100%	84%	85%
Negative	0	74	74			
Total	8	88	96			

## 参考文献

- 1) Patrick J. Gavin and Richard B. Thomason, Jr. Clinical and Applied Immunology Reviews Vol4, (2004) P151-172