

# 高分子微粒子を用いた Influenza のイムノアッセイに関する研究

日大生産工(院) ○根本 浩史

日大生産工 神野 英毅

## 緒言

高分子や金属コロイドなどの微粒子を用いた免疫学的測定法は、広い担体表面積を持ち、粒子の分離が容易なことから感度が高く、自動測定化が可能であり、タンパク質の検出や病原性微生物の診断に一般的に用いられている。このような測定法には、蛍光物質標識化抗体およびB/F分離を用いるCLEIA法や金コロイド標識化抗体等を用いるイムノクロマトグラフィ法があるが、Latex粒子に抗体を結合した試薬を用いて免疫反応によるLatex凝集を測定するLatex免疫比濁法は最も簡便であり、迅速かつ高感度な測定を特徴とするホモジニアスムノアッセイである。

*Orthomyxovirus*科に属するInfluenzaウイルスの診断は、確定診断としてウイルス分離、遺伝子学的手法が用いられるが煩雑であるため、ウイルスの抗原性を判別する迅速診断キットがベットのサイドで使用され早期診断および治療に貢献している。しかし、これらのキットの感度は低い傾向にある。

そこで抗Influenza抗体結合Latex試薬を作製しLatex免疫比濁法を用いてInfluenzaウイルスの迅速高感度測定を検討した。

## 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、マグネティックスターラ、NS-310E高速ホモジナイザ(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。容器内を窒素ガスにて置換し、脱気済みイオン交換水、スチレンモノマーを加え、40°Cに昇温し、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、レドックス開始剤のチオ硫酸ナトリウムおよび過硫酸カリウムを加え重合を開始した。反応開始後1時間経過した時点で、ホモジナイザを取り外しマグネティックスターラで攪拌して

重合を行った。Styreneモノマーを使用したPolystyrene粒子(PS)、Chloromethyl Styreneモノマーをシード共重合したPS-Chloromethyl Styrene粒子(CMS)、同じくメタクリル酸を用いたPS-Methacrylate粒子(PMMA)を作製し、各粒子はイオン交換水で洗浄し40日間透析により精製した。

### 2、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モノクローナル抗体(Fitzgerald, USA)を使用し、PSは物理的吸着、CMSは粒子表面Chloromethyl基による共有結合、PMMAおよびASPはCarboxyl基をWSCおよびNHSにて活性化させ共有結合を行いLatex粒子上に固定化して抗Influenza抗体結合Latex試薬とした。反応性の評価は精製済みInfluenzaウイルスA/Texas/1/77 H3N2、B/Hong Kong/5/72(Fitzgerald, USA)を界面活性剤を含む希釈液で処理して標準抗原とし、スライド凝集板によるLatex凝集反応の目視測定とSpotchem-IM SI-3510 LPIA測定装置(アークレイ)を使用したLPIA法により反応性を確認した。

### 3、Influenzaウイルスの遺伝子学的測定

LPIA法で陽性反応が確認できた4検体をRT-PCR法によりウイルスの存在を確認した。ウイルスRNAの抽出はQIAmp Viral RNA Mini Kit(Qiagen USA)をプロトコール通りに使用した。逆転写反応はReverTra Ace(TOYOBO)並びに付属のランダムプライマーを用いて、30°C10分、42°C60分、85°C5分で行った。PCRはKOD-Plus-(TOYOBO)を使用し、ウイルスHA遺伝子に対するプライマーを用いて、94°C2分に変性させた後、98°C15秒、45°C30秒、68°C2分のサイクルを35回行い、68°C10分を行い停止した。増幅産物は1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、臭化エチジウム液による染色にてバンドを確認した。

## 結果、考察

高速ホモジナイザを用いたソープフリー乳化重合によりFig.1に示すような均一な粒子が確認でき、得ら

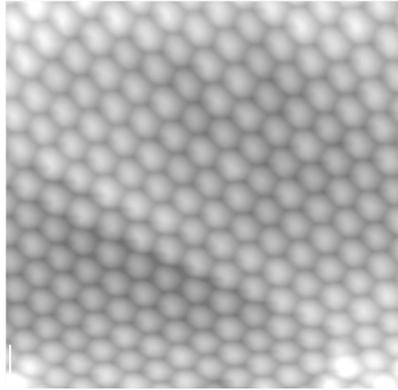


Fig.1 PMMA particle image by AC-AFM using JSPM-5200 scanning probe microscopy

れた粒子を用いた各 Latex 試薬を LPIA 法にて 5 分間測定した結果 (Fig. 2)、各試薬とも抗原濃度に比例して吸光度変化量の上昇が確認され、Influenza B ウイルス抗原濃度 10~50  $\mu\text{g/ml}$  の間で検量線が得られた。PS は良好な検量線が得られ、CMS, PMMA, ASP よりも反応性が高かった。最も反応が高かった PS をスライド凝集板に滴下して抗原希釈液、反応緩衝液と混合し、10 分間反応させた結果 (Fig. 3) 5 倍希釈まで明確な Latex 凝集が確認できた。スライド凝集板による試験は LPIA 法と比べて感度が劣るが光学的測定装置が不要であり、Latex 凝集反応を確認する最も簡便な方法であることから有用性は高いと考えられる。

ここで以前 LPIA 法にて測定を行い陽性反応が確認された検体を RT-PCR 法にて測定して結果を Fig. 4 に示した。検体 1 および 3 で 1kbp 付近に特異的なバンドが確認できたが 2 および 3 ではバンドは確認できず疑陽性検体だと考えられる。以前報告した臨床測定の結果では、鼻腔拭い液を検体に用いた LPIA 法の感度は 98% だったが特異度は 50% であり、特異性の改善が必要である。

#### まとめ

ソープフリー乳化重合により Latex 粒子を作製し、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 LPIA 法では 5 分間の測定時間で抗原濃度に比例した検量線が得られた。またスライド凝集板による測定ではより簡便に Latex 凝集反応を確認することができた。しかしながら、非特異的反応の問題があり改善の必要があると考えられる。

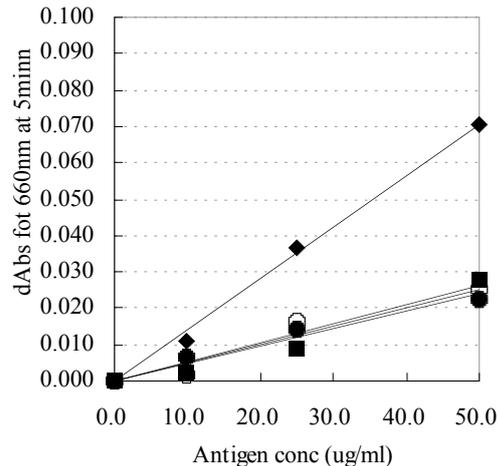


Fig.2 Immunoresponse of anti Influenza B coupled Latex reagent measured by SI-3510 660nm 5min antigen range

Antigen: B/Hong Kong/5/72 10  $\mu\text{g/ml}$ ~50  $\mu\text{g/ml}$

◆: PS ■: ASP ●: PMMA ○: CMS

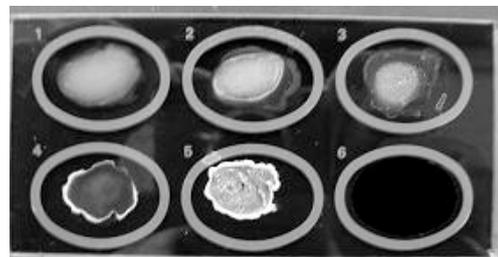


Fig.3 Latex agglutination test for the detection of Influenza A virus. The anti-Influenza A PS Latex reagent were agglutinated by standard antigen 0.66mg/ml  
1. Control (Buffer) 2. x10 dilution 3. x5 dilution  
4. x2 dilution 5. non dilution 6. Blank

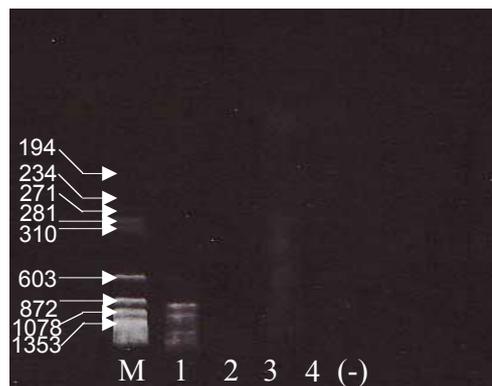


Fig. 4 Amplification of Influenza virus HA gene by RT-PCR

The following primer pairs are specific HA region  
A/H1(+) AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA  
A/H1(-) GCTATTTCTGGGGTGAATCT  
A/H3(+) AGCAAAAGCAGGGGATAATTC  
A/H3(-) TGCCTGAAACCGTACCAACC  
Lane M : Marker 4(wako) 1,2,3,4 : Influenza virus positive sample (-):Negative control

#### 参考文献

根本 浩史, 神野 英毅, “Microsphere を用いた Influenza B 型ウイルスの高感度診断法の研究”  
第二回日本大学大学院生産工学研究科生命工学リサーチセンター研究発表講演会講演概要, p41-42