

# 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 の診断は、臨床情報、ウイルス分離にて確定されるが、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および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、データの数値化や管理が必要とされている。

抗体を Latex 粒子など担体に結合した試薬を用いる LPIA(Latex Photometric Immunoassay)法は迅速かつ感度に優れ、各種免疫自動分析装置に使用可能である。そこで Influenza を LPIA 法にて迅速高感度に診断するため Latex 粒子および抗 Influenza 抗体結合 Latex 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 粒子はソーブ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℃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、ホモジナイザーを取り外しマグネティックスターラを 250rpm で作動させ Table 1 の条件で Polystyrene 粒子(PS), PS-Chloromethyl Styrene 粒子(CMS),PS-Methacrylate 粒子(PMMA)を重合した。ヒドロキノンにて反応を停止してからイオン交換水で洗浄し 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。

Table 1. Polymerization Recipes used to obtain the Latexes

|                                                   | PS   | CMS                         | PMMA                     |
|---------------------------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------|
| Styrene(g)                                        | 16.3 | 8.2                         | 16.3                     |
| Co-monomer (g)                                    |      | Chloromethyl<br>Styrene 4.3 | Methacrylic<br>Acid 0.81 |
| DDI Water (ml)                                    | 186  | 180                         | 180                      |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (g) | 0.13 | 0.065                       | 0.13                     |
| K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (g)  | 0.22 | 0.11                        | 0.22                     |
| Reaction time (h)                                 | 4.0  | 4.0                         | 6.0                      |
| Reaction temp. (k)                                | 353  | 333                         | 343                      |

### 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)および電導度滴定により求めた。

### 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、PS は物理的吸着、CMS は粒子表面 Chloromethyl 基による共有結合、PMMA 粒子は 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。反応性の評価は標準抗原として精製済み Influenza ウイルス A/Texas/1/77 H3N2 (Fitzgerald, USA)を界面活性剤を含む希釈液で処理し 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 法の臨床評価

臨床評価は 2005 年 2 月～3 月期に小児科 4 施設にて、鼻腔拭い液 185 検体、鼻腔吸引液 189 検体を元に行われた。比較対照法としてウイルス分離培養法、また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(BD)を使用した。

## 結果、考察

### (1) Latex 粒子の評価

作製した粒子の物性を Table 2.に示す。得られた粒子の粒径は  $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$  で Latex 凝集反応および LPIA 法に適した粒径範囲内だった。また粒径分布の C.V. は 19%以下であり AFM 像(Fig.1)でも均一な粒子であることが確認できた。各粒子とも 20mV 以上の負の電位を示した。電導度滴定から開始剤、モノマー由来の官能基が確認され、これらが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、抗原濃度  $0.1 \sim 25 \mu\text{g/ml}$  の間で検量線が得られた。PMMA は  $1.0 \mu\text{g/ml}$  以上の範囲で定量的な反応性を示したが全範囲において PS が最も反応性が高かった。

### (3) LPIA 法の臨床評価

LPIA 法を RT-PCR 法にて補正したウイルス分離培養法と比較した結果(Table 3.)、鼻腔拭い液は感度 93%、特異度 59%、一致率 62%、鼻腔吸引液は感度 93%、特異度 84%、一致率 85%、イムノクロマト法と比較した結果、鼻腔拭い液は感度 100%、特異度 60%、一致率 63%、鼻腔吸引液は感度 88%、特異度 84%、一致率 85% であった。LPIA 法による測定は同じ迅速診断法であるイムノクロマト法と比較して感度は遜色がないが特異度、一致率に違いが確認され、鼻腔拭い液はその差が大きかった。現状では鼻腔吸引液を検体として用いることで高い精度の結果が得られると考えられる。

## 結果

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、 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  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特異性に改善の余地があるものの測定時間 5 分間と迅速に結果が得られ、感度は良好であった。以上から LPIA 法による Influenza の迅速診断は有効だと考えられる。

Table 2. Physical property of Latex particle

| Latex | D( $\mu\text{m}$ ) | C.V.(%) | $\zeta$ (-mV) | $\sigma(\mu\text{C}/\text{cm}^2)$ |
|-------|--------------------|---------|---------------|-----------------------------------|
| PS    | 0.358              | 18.08   | 56.57         | 1.78                              |
| CMS   | 0.469              | 14.56   | 64.32         | 19.38                             |
| PMMA  | 0.239              | 18.33   | 30.63         | 12.73                             |

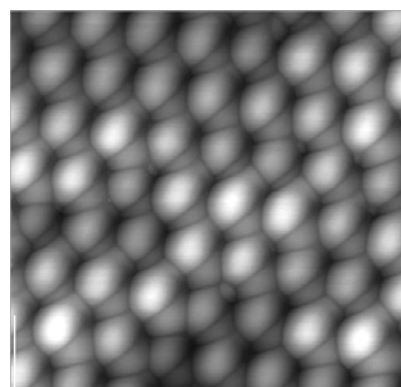


Fig.1 Latex particle image by AC-AFM using JSPM-5200 scanning probe microscopy

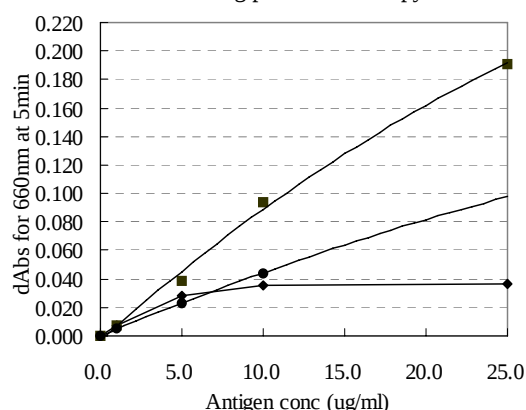


Fig.2 Immunoreponse of anti Influenza A coupled Latex reagent measured by SI-3510 660nm 5min antigen range  
Antigen: A/Texas/1/77 H3N2  $0.0 \mu\text{g/ml} \sim 25 \mu\text{g/ml}$

■ :PS ● :PMMA ◆ :CMS

Table 3. Evaluation of anti Influenza clinical specimens detected by LPIA and each testing method

|                  | LPIA vs Virus culture |      |
|------------------|-----------------------|------|
|                  | Aspirate              | Swab |
| Sensitivity      | 93%                   | 93%  |
| Specificity      | 84%                   | 59%  |
| Concordance rate | 85%                   | 62%  |

|                  | LPIA vs Immunochromato |      |
|------------------|------------------------|------|
|                  | Aspirate               | Swab |
| Sensitivity      | 88%                    | 100% |
| Specificity      | 84%                    | 60%  |
| Concordance rate | 85%                    | 63%  |