

Microsphere を用いた Influenza B 型ウイルスの高感度診断法の研究

日大生産工(院) ○根本 浩史

日大生産工 神野 英毅

緒言

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簡便で自動測定化がしやすいことから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。ここで Latex 粒子に抗体を結合した試薬を用いる Latex 免疫比濁法(LPIA 法)は迅速かつ感度に優れ、各種免疫自動分析装置にて使用可能である。

Orthomyxovirus 科に属する Influenza B 型ウイルスは、Influenza A 型ウイルスと比較すると感染時の症状は比較的軽く Pandemic は起こらないと考えられる。しかしながら、抗原変異を起しやすいことから毎年流行し、A 型と同時に流行することで正確な診断を困難にしている。通常診断で用いられるウイルス分離、遺伝子学的診断法は正確だが煩雑なことから、ウイルスの抗原性を判別する迅速診断キットがベット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、これらのキットは A 型の判別感度と比べると B 型の感度は低い傾向がある。

そこで Influenza B 型を LPIA 法にて迅速高感度に診断するため抗 Influenza 抗体結合 Latex 試薬を作製し検討を行った。

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 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 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、ホモジナイザを取り外しマグネテックスターラを 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	PMA
Styrene(g)	16.3	8.2	16.3
Co-monomer (g)		Chloromethyl Styrene 4.3	Methacrylic Acid 0.81
DDI Water (ml)	186	180	180
Na ₂ S ₂ O ₅ (g)	0.13	0.065	0.13
K ₂ S ₂ O ₈ (g)	0.22	0.11	0.22
Reaction time (h)	4.0	4.0	6.0
Reaction temp. (k)	353	333	343

2、アスパラギン酸スパーサーLatex 粒子の作製

PMMA 粒子を使用し、スパーサー分子としてアスパラギン酸を導入した。20mM pH6.0 リン酸緩衝液で 2 度洗浄した PMMA 粒子を用いてカルボジイミド法により L(+)-アスパラギン酸ナトリウムを結合した。結合後 20mM pH6.0 リン酸緩衝液で 2 度洗浄してアスパラギン酸スパーサー結合 Latex 粒子(ASP)とした。

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 B 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。反応性の評価は標準抗原として精製済み Influenza ウイルス B/Hong Kong/5/72(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

て採取した、鼻腔拭い液 185 検体、鼻腔吸引液 189 検体を使用した。比較対照法として MDCK 細胞(Fig.1)によりウイルス分離培養を行い、ウイルスの HA 遺伝子を対象とした RT-PCR 法にて結果補正をした。

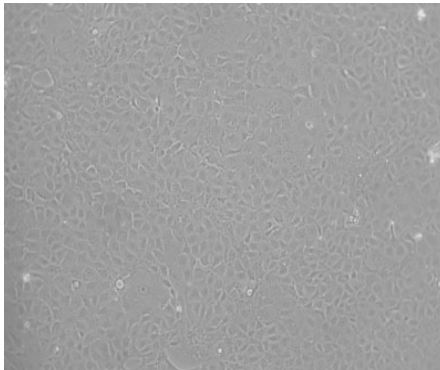


Fig.1 Photo image of Madin-Derby Canin Kidney epithelial-like cell line (x20)

結果、考察

(1) 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 10～50 μ g/ml の間で検量線が得られた。抗体を物理吸着した 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。これは、以前報告した Influenza A 抗体結合 Latex 試薬と同じ傾向だが反応感度は低く、およそ 10%程度であった。使用した粒子は均一性が高いため(Fig.3)結合抗体に改善の必要があると考えられる。

(3)LPIA 法の臨床評価

各臨床検体を LPIA 法で測定しウイルス分離培養法と比較した結果(Table 2.)、鼻腔吸引液は感度 83%、特異度 47%、一致率 65%、鼻腔拭い液は感度 98%、特異度 50%、一致率 66%であった。LPIA 法は鼻腔拭い液を検体とすることでイムノクロマト法の実感度およそ 80%と比較して良好な感度が得られたが、特異度、一致率が及ばず、前回報告した Influenza A 型ウイルスの測定と同じ傾向を示した。

結果

ソープフリー乳化重合により Latex 粒子を作製し、抗 Influenza B 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、10～50 μ g/ml の抗原濃度で検量線が得られた。またウイルス分離培養法との比較では報告済みの抗 InfluenzaA 抗体結合 Latex 試薬同様、非特異的反応が確認され改善の必要があると考えられる。

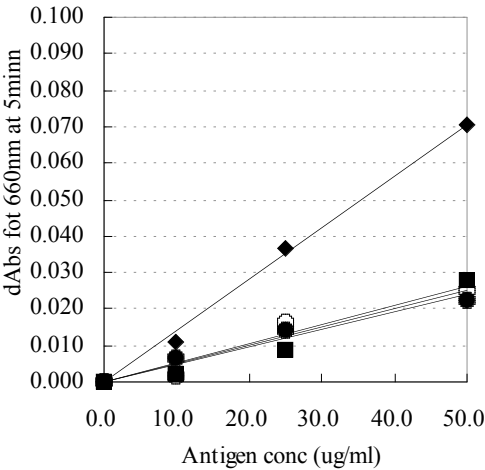


Fig.2 Immunoresponse of anti Influenza A coupled Latex reagent measured by SI-3510 660nm 5min antigen range

Antigen: B/Hong Kong/5/72 10 μ g/ml～50 μ g/ml
 ◆ : PS ■ : ASP ● :PMMA ○ :CMS

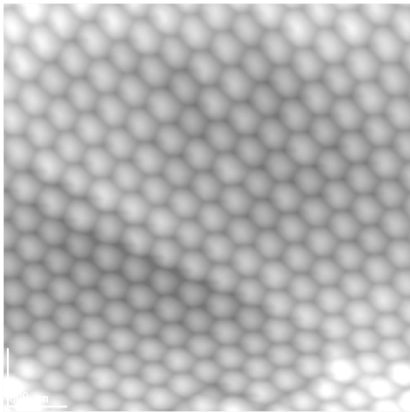


Fig.3 PMMA particle image by AC-AFM using JSPM-5200 scanning prove microscopy

Table 2. Clinical test of LPIA comparison with viral culture corrected by RT-PCR

	Aspirate	Swab
Sensitivity	83%	98%
Specificity	47%	50%
Concordance rate	65%	66%