

ラテックス免疫比濁法によるインフルエンザウイルスの 迅速的分離・定量の研究

Study on Rapid Separation and Measurement of Influenza Virus by
Latex Turbidimetric Immunoassay

根 本 浩 史*・小森谷 友 絵*・神 野 英 毅*

Hiroshi Nomoto · Tomoe Komoriya · Hideki Kouno

* 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 (〒275-8575 千葉県習志野市泉町1-2-1)
E-mail : kouno.hideki@nihon-u.ac.jp

ラテックス免疫比濁法(LTIA法)を用いて、検体中より迅速かつ高感度にインフルエンザウイルスを分離・定量するためラテックス試薬の検討を行った。各種のラテックス粒子に抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を感作してラテックス試薬を作製し、不活化ウイルス抗原および臨床検体を用いてその反応性を測定した。どの試薬においてもラテックス凝集反応による、吸光度の変化が確認できた。その結果、界面活性剤であるMEGA8によりウイルスを処理し、粒径358nmのポリスチレンを担体としたラテックス試薬が最も良好な結果を得た。臨床検体を用いた検討では、5分間と従来法より迅速的に検体中のインフルエンザウイルスを分離することができ、その感度はRT-PCR法を基準としておよそ9割以上と高感度であった。本法は簡便なホモジニアスイムノアッセイであることから臨床現場でのインフルエンザ治療、対策に対応することができ、インフルエンザのパンデミック期のような短時間に多数の感染者が出現する状況において有効な定量法として期待できる。

Key Words : Influenza virus, Latex agglutination reaction, Simple and rapid, Immunoassay

Received 14 June 2008 ; Accepted 26 May 2009

1. 緒 言

抗体タンパク質を固定化したクロマトグラフィー用担体は、例えばカラム等に充填することで対象となる物質の抗原抗体反応による吸着、分離を行うことができる。この方法は、免疫アフィニティークロマトグラフィー法として主に生体物質の分離に広く使用されている¹⁾。一方、高分子重合体からなるサブミクロンサイズのラテックス粒子に、この抗体タンパク質を感作したラテックス粒子は、抗原を含む溶液中にてより高い反応性、抗原回収効率を示す²⁾。ラテックス凝集反応は、この抗体感作ラテックス粒子同士が抗原を介して

凝集塊を形成する特徴を免疫測定に応用した方法である。そして、ラテックス免疫比濁法(Latex Turbidimetric Immunoassay : LTIA法)は凝集反応による吸光度変化から抗原の定量を行うことができる方法である(Fig.1)。LTIA法は、洗浄またはB/F(Bound/Free)分離を必要としないホモジニアスイムノアッセイであり、分注機能を備えた自動免疫測定装置を用いることで複数検体の迅速、定量的なハイスループット測定が可能である³⁾。本法は主に臨床医療分野にて、C反応性蛋白(CRP)や抗ストレプトリジン-O抗体(ASO)などの血中マーカータンパク質の定量、*C. difficile*やアストロウイルスなどの病原性微生物の分離に広く用い

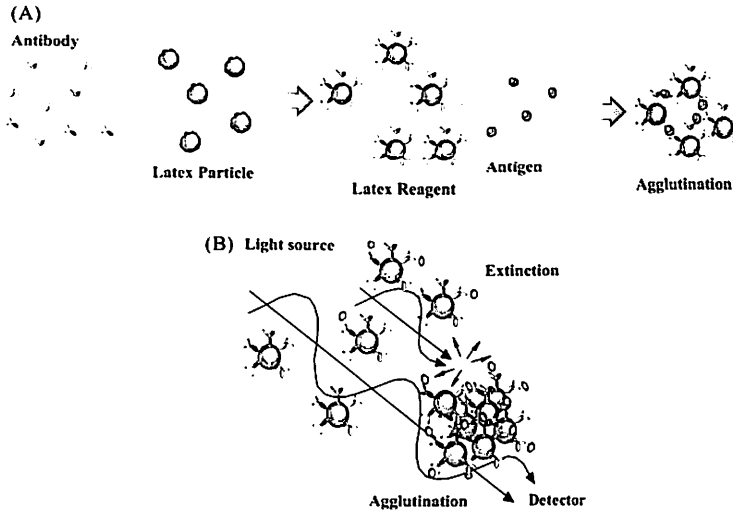


Fig.1 Principle of latex agglutination reaction (A), and latex turbidimetric immunoassay (LTIA : B)

られている⁴⁻⁶⁾。

近年、われわれの安全・安心を脅かしているRNAウイルスの一種であるインフルエンザウイルスは、主に冬期に爆発的に流行し、ヒトへ感染することで突然の発熱、頭痛、筋肉痛、乾いた咳などの急性呼吸器症状を引き起こす⁷⁾。また、老人や小児、乳幼児などは感染すると重篤な合併症を誘発しやすい。しかし、症状が現れてから48時間以内であれば、オセルタミビルのような抗インフルエンザ薬がインフルエンザ治療に有効なため、早期診断が重要である⁸⁾。そのために、簡便、迅速かつ高感度なインフルエンザウイルスの分離法が要求される。しかしながら、インフルエンザウイルス感染が疑われる患者の上気道からの採取検体には、目的ウイルスの他にも口腔、鼻腔内常在細菌や分泌タンパク質等が多く含まれているため⁹⁾、インフルエンザウイルスのみを速やかに分離・定量する必要がある。

われわれは、以前の報告にてLTIA法によりインフルエンザウイルスの迅速診断を検討し、その特徴と医学・臨床的意義を報告した¹⁰⁾。本研究では、このLTIA法に用いるラテックス試薬に着目し、検体中より迅速かつ高感度にインフルエンザウイルスを分離することを目的とした。担体であるラテックス粒子に特異性の高いモノクローナル抗体を感作することでインフルエンザウイルスの分離・定量に適したラテックス試薬を作製し、そ

の性能を検討したので報告する。

2. 材料と実験方法

2.1 抗インフルエンザウイルス抗体感作ラテックス試薬の作製

2.1.1 担体ラテックス粒子の合成

抗体を感作する担体となるラテックス粒子は、ポリスチレン粒子(PS)、ポリスチレンにクロロメチルスチレンをシード共重合して修飾した粒子(CMS)、メタクリル酸で修飾した粒子(PMAA)の3種類を用いた。これらの粒子の各物性と原子間力顕微鏡像をそれぞれTable 1およびFig. 2に示す。各ラテックス粒子は乳化剤を使用せず、Fig. 3に示すような高速ホモジナイザー(NS-310E, マイクロテック・ニチオン)を用いた合成装置と方法によって、Table 2に示した合成条件を元に合成した。なお、免疫反応性の比較に用いた粒径168 nm, 250 nm, 400 nm, 459 nmの各PSは同法

Table 1 Physical properties of latex particles

	D (nm)	A (cm ² /mg)	P.I.	ζ (-mV)	σ (μC/cm ²)
PS	358	159.6	0.094	56.57	1.78
CMS	469	121.8	0.085	64.32	19.38
PMAA	239	239.1	0.168	30.63	12.73

D: Diameter, A: Total surface area, P.I.: polydispersity, ζ: Zeta-Potential, σ: Active Surface group.

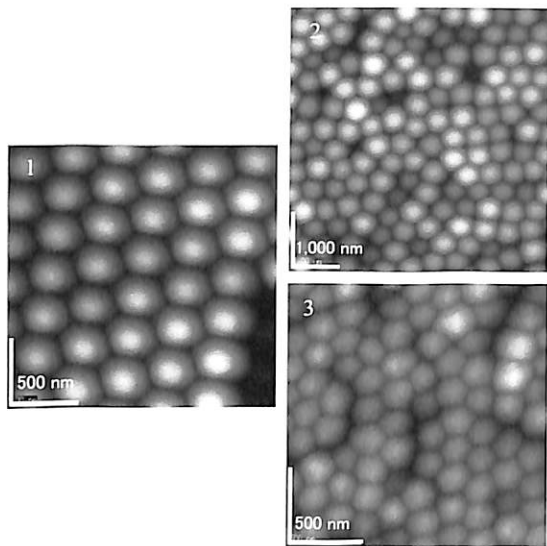


Fig.2 The image of synthesized latex particles by AC- AFM.
Photo number 1:PS 1.5×1.5μm, 2:CMS 2.5×2.5μm, 3:PMAA 1.5×1.5μm

により当研究室にて作製したものを、臨床検体の分離に用いた PS は積水化学工業から購入して使用した。

2. 1. 2 抗インフルエンザウイルス抗体溶液の調製

インフルエンザウイルスに対する抗体は、抗

Table 2 Polymerization condition used to obtain the latex particles

Type (Functional group)	PS	CMS (-CH ₂ Cl)	PMAA (-COOH)
Styrene(g)	16.3	8.2	16.3
Co-monomer (g / molar ratio)	—	Chloromethyl styrene (4.3 / 35.6%)	Methacrylic acid (0.8 / 5.7%)
DDI Water (ml)	180	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 (min)	360	360	480
Reaction temp (°C)	80	60	70

Influenza A nucleoprotein マウスモノクローナル抗体 (Fitzgerald, USA) を使用し、ラテックス粒子各 1mg に対して、およそ 0.5 μg/cm² になるようにそれぞれの緩衝液で調製して用いた。なお、各ラテックス粒子に感作された抗体量は、感作操作後の上清を遠心分離して 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過した後、BCA (Bicinchoninic Acid) 法により定量した。

2. 1. 3 PS(ポリスチレン粒子)ラテックス試薬の作製

20 mM pH 8.2 ホウ酸緩衝液 1.0 ml に PS を分散し、38°C で攪拌しながら同ホウ酸緩衝液にて調整した抗 Influenza A 抗体を 80μg 加えて 1 時間抗体

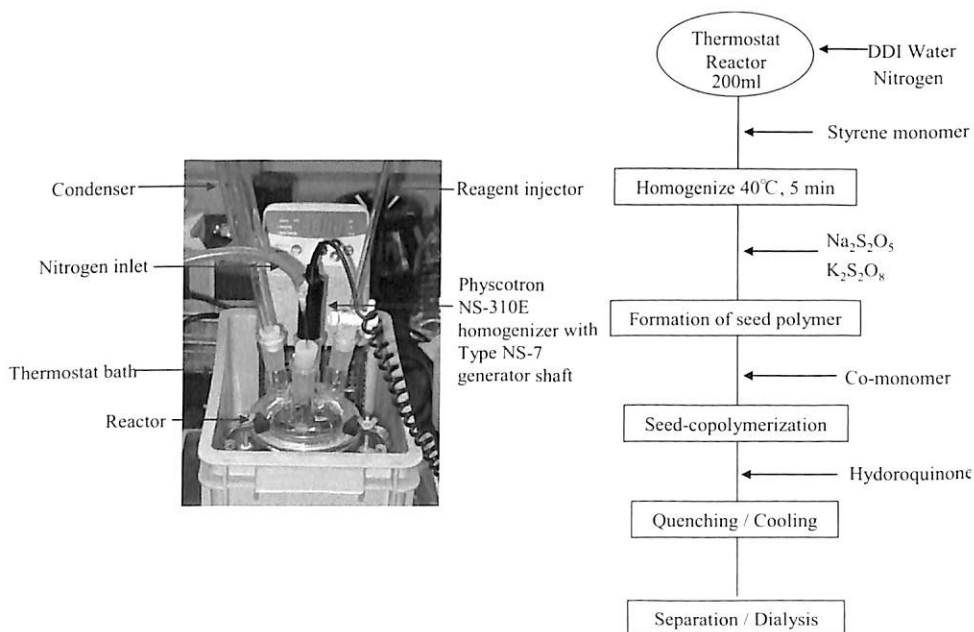


Fig.3 Reactor and Scheme for synthesis of latex particles

を感作した。遠心分離後、イオン交換水 0.5 ml で再懸濁し 38°C で攪拌しながら、1% 熱アルカリ変性 BSA (Bovine Serum Albumin) 液を 1.0 ml 加え 1 時間ブロッキングを行った。4°C で一夜静置した後、0.05% BSA、5% グリセロール、0.05% NaN_3 溶解済み 20 mM pH 7.5 MOPS 緩衝液 (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid) にて 2 回洗浄した。同 MOPS 緩衝液で 0.06% に調整して超音波処理、3 μm メンブレンフィルターにてろ過をして恒温器で 40°C、3 日間インキュベートして 4°C で保存した。

2. 1. 4 CMS (クロロメチル基修飾粒子) ラテックス試薬の作製

20 mM pH 7.5 リン酸緩衝食塩水 (PBS) にて CMS を 3 回洗浄した。再度 PBS 1.0 ml にて懸濁し、38°C の湯浴中で攪拌しながら、同 PBS にて調整した抗 Influenza A 抗体を 60 μg 加え、4 時間インキュベートして抗体を感作した。以降の操作は上述した 2. 1. 3 に準じて行った。

2. 1. 5 PMAA (カルボキシル基修飾粒子) ラテックス試薬の作製

20 mM pH 6.0 リン酸緩衝液 (PB) にて PMAA を洗浄し、同緩衝液 0.5 ml にて再懸濁した。水溶性カルボジイミドである WSC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride, 同仁化学) 20mg および NHS (N-Hydroxysuccinimide, Acros) 12 mg を PB 0.5 ml にて溶解した溶液を加え、25°C にて 25 分間攪拌した。遠心分離後、1.0 mM 塩酸を用いて洗浄し 20 mM pH 7.5 PB 1.0 ml にて懸濁し超音波処理を行った。PB にて調整した、抗 Influenza A 抗体 120 μg を加え、25°C で 1 時間攪拌した後、以降の操作は上述した 2. 1. 3 に準じて行った。

2. 2 抗インフルエンザ抗体感作ラテックス試薬によるインフルエンザウイルスの分離・定量

2. 2. 1 臨床検体および対象となるウイルス抗原

臨床検体は、2005 年 2 月～3 月期に共同研究先の病院にて上気道インフルエンザ様患者から採取された鼻腔拭い液 96 検体、鼻腔吸引液 94 検体を用いた。各検体は患者鼻腔より直接、紙軸綿棒に

て拭い採取した鼻腔拭い液、および患者鼻腔よりアスピレーターにて吸引した鼻汁を紙軸綿棒にて採取した鼻腔吸引液を使用した。

対象として用いたウイルス抗原は、2005 年春シーズンに流行した香港型インフルエンザウイルスと同じ型である Influenza A/Texas/1/77 H3N2 精製済み不活化ウイルス (Fitzgerald, USA) を測定直前に 0.5% BSA、0.9% NaCl、0.1% EDTA2Na、0.09% NaN_3 および検討界面活性剤 1% を含む 50 mM pH 8.4 Tris-HCl から構成されるウイルス抽出液にて希釈し、ウイルス抗原として使用した。検討した界面活性剤は、Tween 20 (Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate)、Triton X-100 (Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether)、および MEGA8 (*n*-Octanoyl-*N*-Methylglucamide (同仁化学)) の非イオン界面活性剤 3 種類をそれぞれ使用し、免疫反応性を検討した。

2. 2. 2 測定装置と方法

ラテックス試薬の LTIA 測定は、卓上免疫反応測定装置 (Spotchem-IM SI-3510, アークレイ) を使用して行った (Fig.4)。測定用キュベットに R1 試薬として 1% BSA、0.9% NaCl、0.1% EDTA2Na、0.09% NaN_3 溶解済み 200 mM pH 8.4 Tris-HCl に PEG 20,000 を溶解した反応緩衝液を 56 μl 、R2 試薬には各ラテックス試薬を 56 μl 、測定サンプルを 28 μl セットして 660 nm の測定波長で 15 秒サイクル 5 分間の吸光度を測定し end-point 法により反応性を求めた。

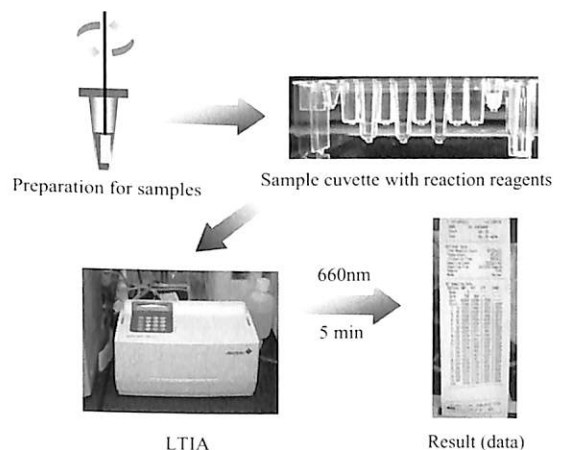


Fig.4 Schematic of measurement for Influenza virus antigens and clinical specimens by LTIA

2. 2. 3 ウイルス分離培養法および RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) 法

ウイルス分離培養法は単層培養したイヌ腎細胞 (Madin-Darby Canine Kidney cell : MDCK 細胞 : JCRB9029, HSRRB より分与) を用いて行った。ウイルス液は、各検体液をストレプトマイシン、ペニシリン、アセチルトリプシン (Sigma, USA) を含むイーグル基礎培地 (GIBCO, USA) にて希釈し、0.45 μ m メンブレンフィルターにてろ過して調製した。ウイルス液を細胞に播種後、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下にて恒温培養して、細胞変性効果 (CPE) を観察した。ウイルス分離培養操作後、この培養上清を一部回収して RT-PCR 法を行い培養上清中のインフルエンザウイルスを分離した。ウイルス RNA は、QIAamp Viral RNA Mini キット (Qiagen, USA) を付属の説明書にしたがい使用して抽出した。続いて RT-PCR 法は、逆転写酵素として ReverTra Ace (TOYOBO) および DNA ポリメラーゼとして KOD-Plus- (TOYOBO) を使用し、国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアルに準じて、逆転写反応 (RT) ではランダムプライマーを用い、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ではインフルエンザウイルス HA 遺伝子特異的なプライマー (Table 3) を用いて行った。

3. 結 果

3. 1 各ラテックス粒子の総表面積と抗体感作率の比較

各ラテックス粒子に抗インフルエンザ抗体を感作させ、得られたラテックス試薬の抗体感作量をその上清に含まれる抗体量から求め、抗体感作率を Table 4 に示した。最も感作率が高い CMS は、添加量 60.0 μ g に対し感作量 52.8 μ g、感作率 88% であった。PS は添加量 80 μ g、感作量 60.1 μ g、感作率 75.2%、総表面積が最も広い PMAA は添加量 120 μ g、感作量 61.4 μ g、感作率 51.1% であった。

3. 2 ウイルス抽出液に用いた界面活性剤と各ラテックス試薬の反応性

インフルエンザ抗原調整に用いる界面活性剤として Tween 20, Triton X-100, および MEGA8 の

Table 3 Sequence of primers for Influenza viruses by RT-PCR

Primers	Sequence (5'-3')
A/H1 (+)	AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA
A/H1 (-)	GCT ATT TCT GGG GTG AAT CT
A/H3 (+)	AGC AAA AGC AGG GGA TAA T TC
A/H3 (-)	TGC CTG AAA CCG TAC CAA CC

Table 4 Amount of sensitizing anti-Influenza antibody on latex particles

	Added (μ g)	Sensitized (μ g)	Rate (%)
PS	80.0	60.1	75.2
CMS	60.0	52.8	88.0
PMAA	120.0	61.4	51.1

"Added" is the amount of an antibody that is used for preparation of the latex reagent. "Sensitizing" is consumed antibody for preparation of latex reagents. "Rate" is the ratios of sensitizing antibody to added antibody.

界面活性剤 3 種類をそれぞれ 1% 使用してウイルス抽出液を作製した。このウイルス抽出液を使用してウイルス抗原を 10 μ g/ml の濃度に調製し、各抗インフルエンザ抗体感作ラテックス試薬を用いて測定した。その結果、各ラテックス試薬とも界面活性剤として MEGA8 を使用したウイルス抽出液が最も反応性が高かった。そこで、MEGA8 を使用した各試薬の吸光度変化量 (dAbs) を 100 としたときの各界面活性剤の dAbs の割合を Fig.5 に示した。PS, CMS では Tween 20, Triton X-100

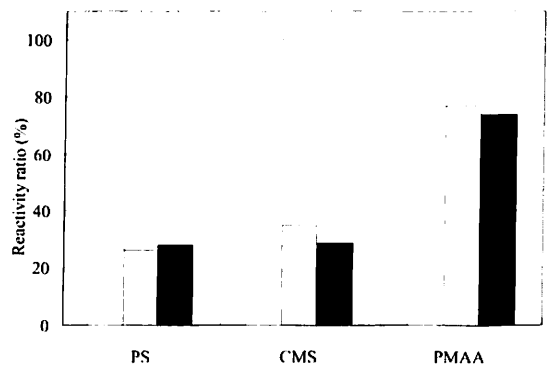


Fig.5 Comparison of reactivity of latex reagents between MEGA8 and Tween20, Triton-X100. "Reactivity ratio" in each detergent is result by criteria of MEGA8. The symbols indicate the detergent.

□ : MEGA8, ▣ : Tween20, ■ : Triton-X100

とも MEGA8 使用時と比較して反応性が低く、MEGA8 の 2~4 割程度の反応性であった。一方、PMAA では Tween 20, Triton X-100 は MEGA8 の 8 割程度の反応性を示した。

3. 3 抗インフルエンザ抗体感作ラテックス試薬の反応性

作製した各抗インフルエンザ抗体感作ラテックス試薬は、インフルエンザウイルス抗原の測定において、抗原抗体反応によるラテックス凝集反応が明確に確認でき、抗原濃度に比例して吸光度変化量(dAbs)が上昇し、反応曲線が得られた。各試薬を用いて抗原濃度 0.1~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲にて定量した結果を Fig.6 に示した。CMS は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の範囲で反応性が低下したが、PS はこの濃度範囲で最も高い反応性を示し、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では CMS, PMAA の約 5 倍の吸光度変化量を示した。PMAA の反応性は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは最も低かったが、抗原濃度 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の吸光度変化量では CMS をわずかに上回った。得られた反応曲線は PS, PMAA は直線的であり、PS の吸光度変化量と抗原濃度の相関は $R^2=0.994$ であった。担体として PS を用いたラテックス試薬が最も良好な反応性を示し、その検出限界を平均 $\pm 3\text{SD}$ (N=5) で求めたところ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CV=8.2) であった。

次に、Fig.7 に各ラテックス試薬の抗インフルエンザ抗体の感作率、およびこれらの試薬のインフルエンザ抗原濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の吸光度変化量を示した。PS と CMS は約 80% の抗体感作率を示

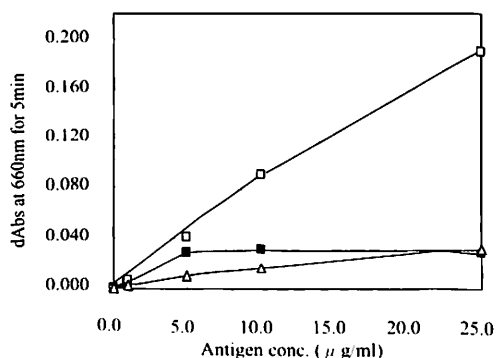


Fig.6 Immunoreactivity of anti Influenza antibody sensitized latex reagents at 660 nm for 5 min. The ranges of antigen concentration are 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The symbols indicate the reagent □ : PS, ■ : CMS, △ : PMAA.

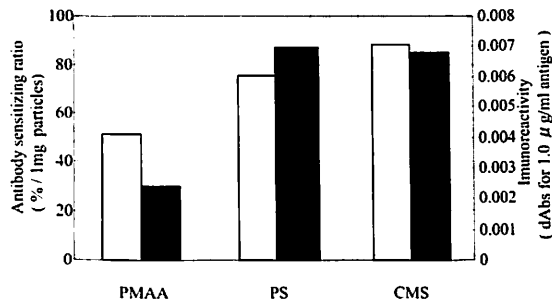


Fig.7 Comparison of latex reagents between antibody sensitized ratio and latex reagent reactivity. □ : Antibody sensitizing ratio for 1mg particles (%) ■ : Immunoreactivity of latex reagent by 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antigen (dAbs)

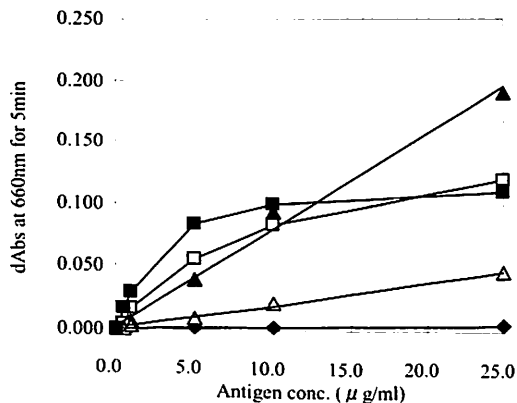


Fig.8 Immunoreactivity of various anti Influenza sensitized latex reagents at 660nm for 5min. The ranges of antigen concentration are 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The symbols indicate the latex reagent ■ : PS 459nm, □ : PS 400nm, ▲ : PS 358nm, △ : PS 250nm, ◆ : PS 168 nm

し反応性も同等であったが、PMAA は抗体感作率が約 50%とこれらと比べると低く、反応性も低かった。また、反応性に対する粒径の影響を調べるために、粒径が異なる PS 粒子を用いて作製した抗インフルエンザ抗体感作ラテックス試薬の反応性を Fig.8 に示した。粒径 168 nm から 459 nm の範囲において、抗原濃度 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以内での反応性は粒径に比例して高くなり、459 nm が最も高かったが、これら大粒径粒子の反応性は 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では抗原過剰域を示した。これに対し、約 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では直線的な反応を示した 358 nm が他の 4 つの粒子よりも高い反応性を示した。

3. 4 LTIA 法による臨床検体からのインフルエンザウイルスの分離

鼻腔拭い液 (Swabs) 96 検体, 鼻腔吸引液 (Aspirates) 94 検体を対象に RT-PCR 法によるインフルエンザウイルスの分離を行った。その結果, 鼻腔拭い液にて陽性は 9 検体, 陰性は 87 検体, 鼻腔吸引液では陽性は 5 検体, 陰性は 89 検体であった。これらの結果を各検体に含まれるインフルエンザウイルスの真の分離結果とした。次に, これらの検体を LTIA 法にて分離し, その判別結果を Table 5 に示した。その結果, 鼻腔拭い液は 22 検体が陽性, 74 検体が陰性, 鼻腔吸引液では 17 検体が陽性, 77 検体が陰性と判定した。RT-PCR 法の結果を基準として比較した LTIA 法の測定結果は, 鼻腔拭い液は陽性 8 検体, 陰性 73 検体, 鼻腔吸引液では陽性 5 検体, 陰性 77 検体が一致して, その測定感度, 特異性はそれぞれ, 鼻腔拭い液は 89%, 84%, 鼻腔吸引液では 100%, 87% を示した。

4. 考 察

LTIA 法にて検体中より目的とする抗原のみを高感度で分離・定量するためには, ラテックス試薬が抗原存在時のみ高効率に抗原と結合し特異的凝集反応性を示し, それ以外では分散・安定であり非特異的凝集反応を起こさないことが要求される。そのために, 対象とする抗原, および特異的な抗体, 担体であるラテックス粒子と抗体の感作法, 測定方法に応じた粒径等の選択は分離・定量性能に大きく影響を与える⁽¹⁾。

インフルエンザウイルスは, ウイルスの表面タ

ンパク質であるヘマグルチニンとノイラミニダーゼの 2 つの組み合わせにより複数の亜型が存在する。加えて, これらのタンパク質はその抗原性に変異しやすい⁽²⁾, 目的抗原タンパク質として選択した場合, 同じ抗体で検出し続けることは難しい。一方, これらの変異しやすいタンパク質とは異なり, インフルエンザウイルスの核タンパク質はウイルス型を決定する基本となる抗原性を維持している。この核タンパク質はより変異しにくく安定であり, ウイルス型特異的かつ亜型間に高い抗原共通性がある⁽³⁾。そのために, 作製したラテックス試薬はインフルエンザウイルス核タンパク質に対するモノクローナル抗体を使用した。しかしながら, 核タンパク質はインフルエンザウイルス粒子の外殻であるエンベロープの内部に存在するため, 分離するためにはこれを破壊して抽出する必要がある。通常, タンパク質抽出で行われる超音波処理や凍結融解などの物理的プロセスは, 処理に手間がかかることから迅速診断には向いていない。一方, 界面活性剤などで化学的に処理することができれば, より簡便にタンパク質の抽出が行えるため, 本研究では 3 種類の非イオン性界面活性剤を用いてウイルス処理の検討を行った。これらの非イオン性界面活性剤はドデシル硫酸ナトリウム等と比較すると, その効果は穏やかなために細胞や細菌の膜タンパク質可溶性に用いられている。また, Tween 20 や Triton X-100 は, ELISA 法などの他のイムノアッセイにて良く用いられていることから, ラテックス凝集反応においてもウイルス処理に適していると考えられた。しかし, Fig.5 に示した結果のように PS, CMS,

Table 5 Sensitivity and specificity of LTIA in comparison with RT-PCR.

Swabs

		PCR		Total
		+	-	
LTIA	+	8	14	22
	-	1	73	74
Total		9	87	96

Sensitivity 89% (8/9)
Specificity 84% (73/87)

Aspirates

		PCR		Total
		+	-	
LTIA	+	5	12	17
	-	0	77	77
Total		5	89	94

Sensitivity 100% (5/5)
Specificity 87% (77/89)

PMAA のいずれの試薬においても、ラテックス凝集反応に影響を及ぼさない界面活性剤は MEGA 8 であった。また、PMAA と比較すると PS, CMS では Tween 20, Triton X-100 による影響が大きく、反応性の著しい低下が確認された。

本研究では、抗体への親和性の異なるラテックス粒子として、物理吸着用の PS, 化学結合用のクロロメチル基を表面に修飾した CMS, カルボキシル基を修飾した PMAA の 3 種類の粒子を用いて、それぞれ対応した方法で抗体を感作した。PS にて行った感作法は温和な条件で抗体を粒子表面に感作できるが、界面活性剤などにより抗体が遊離することがある¹⁴⁾。それに対して CMS, PMAA にて行った感作法では、抗体をより強固な化学結合により感作できるため安定性が高く、担体-抗体間に数原子を挿入することによってスペーサーの効果を与え、反応性の向上が期待できる¹⁵⁾。また、PMAA のように粒子表面を親水性にすることで検体に含まれるタンパク質の非特異的な吸着を防ぎ特異性と感度が上昇する¹⁶⁾ことから、ラテックス試薬としてより性能が高いと考えられた。Fig.5 に示したように、PMAA が比較的界面活性剤の影響を受けなかった結果はこのような抗体の結合性に起因し、感作抗体に対する界面活性剤の影響が少なかったためと考えられる。しかしながら、Fig.6 に示したように抗原濃度を変えて定量してみると、PMAA は反応性が最も低く、CMS は抗原濃度が上昇するにつれて反応性は低下したが、PS は低下することなく直線的に反応し、広い抗原濃度レンジの測定にて良好な結果が得られた。この結果から試薬反応性の面では、前述した化学結合による感作法の利点は確認できなかった。そこで、このような反応性の違いを検討するために、各ラテックス試薬の抗体感作率と反応性の比較を行った。Fig.7 に示した結果から、PMAA 抗体感作率は PS, CMS と比べると低く、その反応性も低かった。CMS は PS よりもわずかに抗体感作率が高いものの、反応性は PS の方が高かった。一方、反応性とラテックス粒径の比較を示した Fig.8 では、粒径によって反応性は異なり、特に抗原濃度 10 µg/ml 以下においては 358 nm より大きい粒子の反応性が高かった。

以上のことから、本検討における各ラテックス

試薬の反応性の違いは、感作された抗体量に起因したものと推測された。感作抗体量がある程度高いことで、ラテックス凝集反応性は向上するものの上限があり、適量の抗体感作量が存在すると考えられる。また、インフルエンザウイルスの微量の分離を行うためには低濃度抗原の反応性が高い方が望ましいことから、本測定条件においては粒径 358 nm 以上の PS に抗体を感作した試薬を用いるのが適していると考えられる。

このような検討により、PS を担体粒子として抗インフルエンザラテックス試薬を作製し、臨床検体より LTIA 法を用いてインフルエンザウイルスの分離を行った。LTIA 法の比較基準法として、ウイルス宿主である MDCK 細胞によるウイルス分離培養法と、続いて行ったウイルス遺伝子特異的なプライマーによる RT-PCR 法を行った。これらの手法は判定までに数時間から数日の測定時間を要するが、信頼性が高く実験室的手法としてインフルエンザの確定診断に用いられる¹⁷⁾。RT-PCR 法と比較した結果、LTIA 法は 5 分間の測定にて鼻腔拭い液および吸引液よりおよそ 9 割以上の感度でウイルスを分離することができた。Table 5 に示すように、検体間の比較では鼻腔吸引液がより良好な感度を示した。鼻腔拭い液は鼻腔に綿棒を挿入して採取するため採取誤差が生じやすい。一方、鼻腔吸引液はアスピレーターによって機械的に検体吸引を行うため採取誤差が発生しにくく、得られる検体量も多いためと考えられる。

LTIA 法と同じく抗体を用いた迅速的な分離・測定法としてイムノクロマトグラフィー法がある。イムノクロマトグラフィー法は着色粒子などを標識した一次抗体をサンプルと反応させ、反応後の分散液をメンブレン上にて毛細管現象により展開させて二次抗体のライン上で捕捉し、その呈色により目的抗原の存在を判別する方法である¹⁸⁾。本法は 10 分程度で特異性の高い測定が可能であり、近年では改良により感度も向上している。このイムノクロマトグラフィー法と LTIA 法を比較すると、イムノクロマトグラフィー法は測定から判別まで全て手動で行う必要があり、その結果は定性的である。一方、LTIA 法は医療機関に既存の自動免疫測定装置を使用することができ、インフル

エンザ流行期に求められる定量的なハイスルー
 プット測定が可能である。今回得られた LTIA 法
 の結果はイムノクロマト法と同等以上の感度を示
 し、より短時間で定量が行えた。しかしながら、
 イムノクロマトグラフィー法の特異性はおよそ 9
 割以上を示すのに対して、LTIA 法の特異性は若
 干低い傾向を示した。これは、メンブレン上でサ
 ンプルの展開・分離が行われるイムノクロマトグ
 ラフィー法と異なり、ラテックス凝集反応では一
 液内で全ての反応が進行することから、抗原との
 反応性も高いが夾雑成分の影響を受けやすいため
 と考えられる。したがって、ラテックス試薬に用
 いるブロッキング剤や検体処理液などの検討によ
 り、ラテックス試薬の反応性を維持しながら夾雑
 成分の影響を軽減し、より高い特異性の向上を図
 ることが今後の課題である。

5. 結 言

本研究では、LTIA 法にて迅速かつ高感度に、
 検体中からインフルエンザウイルスを分離・定量
 することを目的として、各ラテックス粒子に抗イ
 ンフルエンザウイルス核タンパク質モノクローナ
 ル抗体を感作したラテックス試薬を作製し、その
 反応性を測定した。作製したラテックス試薬をウ
 イルス抗原に混合すると、どの試薬においてもラ
 テックス凝集反応が確認でき、吸光度変化量対抗
 原濃度の検量線が作製できた。その結果、界面活
 性剤である MEGA8 によりウイルスを処理し、粒
 径 358 nm 以上の PS を担体としたラテックス試
 薬を用いたものが良好な反応性を示した。また、
 臨床検体を用いた検討では 5 分間と従来法より迅
 速的にインフルエンザウイルスを分離することが
 でき、その感度は RT-PCR 法を基準としておよそ
 9 割以上と高感度であった。

以上のように、インフルエンザウイルスを迅速
 かつ高感度に分離・定量可能なラテックス試薬を
 開発した。本試薬を用いた LTIA 法は、簡便なホ
 モジニアスイムノアッセイであることから臨床現
 場でのインフルエンザ治療、対策に対応すること
 ができ、インフルエンザのパンデミック期のような
 短時間に多数の感染者が出現する状況において
 有効な定量法として期待できる。

参考文献

- 1) 神野英毅, 小森谷友絵, 大代京一, “医療に活かされる分
 離技術 バイオ医薬品研究開発のための分離精製技術”, 分離
 技術, **34**, 102-108 (2004)
- 2) 川口春馬, “バイオアフィニティ微粒子”, 繊維と工業, **60**,
 391-394 (2004)
- 3) 小西章平, “ラテックス凝集反応 臨床検査自動システムへ
 の応用”, 分離技術, **22**, 157-167 (1992)
- 4) 小森谷友絵ら, “Amino acid spacer 法による超高感度 CRP
 試薬の研究開発とその臨床的意義”, 日本臨床検査自動化学
 会雑誌, **33**, 14-20 (2008)
- 5) 小林とよ子ら, “Latex agglutination test による糞便中の
Clostridium difficile 毒素の定量について”, 嫌気性菌感染症研
 究, **14**, 117-122 (1984)
- 6) T. Komoriya *et al.*, “The development of sensitive latex
 agglutination tests for detecting astroviruses (serotypes 1 and 3)
 from clinical stool specimen”, *Journal of the Association for Rapid
 Method and Automation in Microbiology*, **13**, 103-114 (2003)
- 7) N.J. Cox, K. Subbarao, “Influenza”, *Lancet*, **354**, 1277-1282
 (1999)
- 8) 新庄正宣, “ノイラミニターゼ阻害剤をどう使うか”, 臨床
 雑誌内科, **96**, 821-824 (2006)
- 9) 小松 方, 長坂洋子, “I. 呼吸器感染症”, *Medical
 Technology*, **32**, 1019-1024 (2004)
- 10) Hiroshi NEMOTO, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO,
 “Development of Latex Turbidimetric Immunoassay for Rapid and
 Sensitive Detection of Influenza Virus”, *Journal of Association for
 the Rapid Method and Automation in Microbiology*, **18**, 117-
 126(2007)
- 11) 日方幹雄, “ラテックス”, 山本重夫, バイオ検査薬の開発,
 普及版第 1 刷, シーエムシー, 東京, (2000) p.113-121
- 12) 信澤枝里, “ゲノム解析からみたインフルエンザウイルス
 遺伝子の変異と流行-遺伝子変異に着目して”, 臨床検査, **52**,
 28-34 (2008)
- 13) M. Jin *et al.*, “Development of enzyme-linked immuno sorbent
 assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to
 avian influenza virus”, *Avian diseases*, **48**, 870-878 (2004)
- 14) M. Feng *et al.*, “Effects of Tween 20 on the desorption of
 proteins from polymer surfaces”, *Journal of Biomaterials Science.
 Polymer edition*, **7**, 415-424 (1996)
- 15) M.P. Sanz *et al.*, “Amino, chloromethyl and acetal-functionalized
 latex particles for immunoassays : a comparative study”, *Journal of
 Immunological Methods*, **287**, 159-167 (2004)
- 16) H. Kawaguchi, “Functional polymer microspheres”, *Progress in
 Polymer Science*, **25**, 1171-1210 (2000)
- 17) C. Steininger *et al.*, “Effectiveness of reverse transcription-PCR,
 virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for
 diagnosis of influenza A virus infection in different age groups”,
Journal of clinical microbiology, **40**, 2051-2056 (2002)
- 18) 山崎雅彦ら, “イムノクロマトグラフィー法によるインフ
 ルエンザ迅速診断キットの臨床的検討”, 感染症学雑誌, **75**,
 1047-1053 (2001)

Study on Rapid Separation and Measurement of Influenza Virus by Latex Turbidimetric Immunoassay

Hiroshi Nemoto^{*} · Tomoe Komoriya^{*} · Hideki Kohno^{*}

^{*} Advanced Research Center for Life Science and Human Environment Graduate School of Industrial Technology, Nihon University
2-1, Izumi-cho 1-chome Narashino-shi, Chiba 275-8575, Japan

For the purpose of rapid and sensitive detection and measurement of the influenza virus in clinical samples with the latex turbidimetric immunoassay (LTIA), the performance of latex reagents was studied by evaluating the sensitization of anti-influenza A monoclonal antibody to 3 types of latex particles. We measured the immunoreactivity of these latex reagents to influenza A viral antigens. The latex agglutination reaction confirmed the sensitivity of each latex reagent from the change in the specific absorbance. The LTIA was treated under conditions of excellent immunoreactivity: the detergent used was MEGA8 and the latex reagent used was polystyrene carrier particles. The LTIA could detect the influenza A virus in clinical samples in 5 min, and the sensitivity of this assay was greater than 90% as compared to the results of standard reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The LTIA is a rapid and sensitive method for the detection and measurement of the influenza virus in clinical samples containing many contaminants. It is a simple homogeneous immunoassay whose results correspond with the diagnosis of influenza in the clinical setting. This assay can have potential use for detecting the influenza virus in many patients over the short term during influenza pandemics.