

LPIA (Latex Photometric Immunoassay) 法を用いた  
Influenza A および B ウイルスの迅速診断に関する研究

神野英毅 (応用分子化学科)

1. 緒言

世界各国で毎年数百万規模の流行が繰り返され、健康被害と社会的影響をもたらす感染症はインフルエンザであり、本疾患は我々に最も身近で影響をもたらす疾患である。

Influenza ウイルスは *Orthomyxovirus* 科に属する、核タンパク質やマトリックスタンパク質などの内部タンパク質の抗原性により、A, B, C, の3型に分類される<sup>1)</sup>。主にA型とB型が冬季に流行し急性呼吸器感染症を起こし、その症状は上気道炎症の他に、急激な発熱、頭痛、悪寒、全身倦怠感、筋肉痛などの全身症状を示し、進行が極めて早いことが知られている<sup>2)</sup>。また乳小児や老人などが感染すると肺炎や脳炎、脳症など重篤な合併症を起しやすく死亡率が高いこと、施設内などで爆発的な感染を引き起こすことから対策が望まれている。インフルエンザの治療薬として近年、ノイラミニターゼ阻害剤などの抗ウイルス薬が開発され日本国内でも使用されるようになったが、ウイルス増殖期の感染後48時間以内でしか効果がないため迅速かつ高感度な診断が求められている<sup>3)</sup>。従来の診断法としてウイルス培養法、免疫学的血清法、RT-PCRなどが用いられている。しかしながら、確定までに速くて数日を必要とし、特別な設備が必要なため迅速診断には至らなかった。これに対して近年ではbed sideで測定可能な迅速診断法が開発され効果を上げている。これらはEIAやイムノクロマトグラフィー法、フロースルー免疫測定法などの抗原抗体反応の特異性、迅速性を利用している<sup>3)</sup>。免疫測定法のなかでも迅速診断法の一つであるLatex凝集反応(LA)は、ポリスチレンラテックス粒子などの担体に抗体を結合させたLatex試薬を用い、抗原抗体反応が見かけ上ラテックスの凝集という形

で現れ、微量な抗原でも大きな凝集塊として現れることから、抗原に試薬を混合するだけの簡便かつ迅速な診断であり、Latex近赤外比濁法(Latex Photometric Immunoassay : LPIA)として確立されており高感度な測定が可能である。

このような背景から、本研究では抗Influenza A及びB抗体結合Latex試薬を4種類の方法で作製すると共に測定条件を検討しLPIA法を用いたInfluenza A及びBウイルスの迅速診断法の確立を目的とした。

2. 実験方法

【使用抗体】

各Latex試薬の作成にあたり使用した抗体は、抗Influenza A及びB抗体として2種類のInfluenza A及びB核タンパクモノクローナル抗体(Fitzgerald U.S.A)を253Kで保存、使用直前に室温で溶解しそれぞれ混合して使用した。

【抗Influenza抗体結合ラテックス試薬作成】

① Polystyrene Latex を用いた物理吸着法 N461 0.272  $\mu$  m Polystyrene Latex 粒子(積水化学工業株)を 20mM pH8.2 ホウ酸緩衝液を用いて 0.2 (w/v)%に調整し、ホウ酸緩衝液で2種クローン混合抗体を 0.2mg/ml に調製した抗体液を 0.5ml 加え 1hr インキュベートしながら抗体を吸着した。吸着後、遠心分離(22,600 g, 277 K, 20 min)し上清に含まれる未吸着抗体は BCA 法にて定量し抗体吸着量を求めた。遠心分離した Latex 粒子はイオン交換水で懸濁し、2%(w/v)熱変性 BSA(dnBSA)を加え抗体吸着と同条件でブロッキングを行った。277K で1晩静置した後、遠心分離(22,600 g, 277K, 20 min)し、MOPS Latex 保存液を用いて粒子を洗浄した。再び MOPS Latex 保存液に懸濁して超音波分散させミリポアフィルターにてろ過をした。313K で3

日間エージング処理を施し、0.06% (w/v)抗 Influenza 抗体物理吸着 Latex 試薬とし、使用直前まで 277K にて保存した。

② Carboxyl 基修飾 Latex による化学結合法  
G1225 0.25  $\mu$ m カルボキシル基修飾 Latex 粒子(JSR(株))を 20mM pH6.0 リン酸緩衝液で洗浄した。1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide,Hydrochloride(WSC)ならびに N-Hydroxysuccinimide(NHS)を溶解した同リン酸緩衝液を加え懸濁し、室温で 30min 攪拌し Latex 粒子表面のカルボキシル基を活性化させた。活性反応後 2mM HCl 溶液で洗浄し 20mM pH7.5 リン酸緩衝液で懸濁した後、超音波処理を施した。これに 0.1mg/ml 抗体液を 1ml 加え、室温で 2hr 攪拌して抗体を結合した。残存抗体は BCA 法にて定量した。PBS Latex 保存液で粒子を 2 度洗浄し、同保存液にて再度懸濁して超音波処理を施し、0.5% (w/v)抗 Influenza 抗体結合 CM Latex 試薬とし、使用直前まで 277K にて保存した。

③ Chloromethyl 基修飾 Latex による化学結合  
K9-020 0.22  $\mu$ m 活性化済みクロロメチル基修飾 Latex 粒子(Estapor France)を 20mM pH7.5 リン酸緩衝食塩水にて洗浄し懸濁した。超音波処理を行い、0.1mg/ml 抗体液を 0.5ml 加え、室温で 3hr 攪拌して抗体を結合した。残存抗体は BCA 法にて測定した。沈殿は 40mM グリシンを含む反応停止液で懸濁し室温で 20min 攪拌して反応停止処理を行った。PBS Latex 保存液で 2 度洗浄し、同保存液にて再度懸濁して超音波処理を施し、0.25%(w/v)抗 Influenza 抗体結合 Chloromethyl 基修飾 Latex 試薬とし、使用直前まで 277K にて保存した。

④ スペーサー分子導入 Latex による結合法  
スペーサー分子導入 Latex 粒子は上記の②で述べた方法を用いて、Latex 粒子に CM Optlink<sup>®</sup> 0.424  $\mu$ m カルボキシル基修飾 Latex 粒子(Seradyn U.S.A)を用いて、抗体の代わりに L(+)-アスパラギン酸ナトリウムをスペーサー分子として結合し作製した。抗体の結合は同様に②の方法を用いて行い、0.1mg/ml 抗体液 1ml を使用して 0.5% (w/v)抗 Influenza 抗体結合スぺ

ーサー Latex 試薬とし使用直前まで 277K にて保存した。

#### 【試薬の測定】

測定には、Spectrochem-IM SI-3510(アークレイ(株))LPIA 測定装置を使用し 660nm の測定波長で 5 分間、吸光度変化量を求めた。Tris-HCl、EDTA2Na、BSA、NaCl を混合し pH8.3 に調製したものを反応緩衝液として、Polyethylene glycol(PEG)4000、6000、及び 20000 を反応増感剤として適量加えて使用した。抗原には Influenza A 及び Influenza B 不活化ウイルス (Fitzgerald U.S.A)を既知のウイルスとして、核タンパクを抽出するため Octanoyl-N-Methylglucamide(MEGA8),Polyoxyethylene (20)Sorbitan Monolaurate(Tween20), Polyoxyethylene(10)Octylphenylether (Triton-X100)の 3 種類の非イオン性界面活性剤で希釈して使用した。

#### 【実検体の測定】

抗 Influenza 抗体物理吸着 Latex 試薬を用いて実検体を測定し、診断法の有効性を確かめた。検体には鼻汁 6 サンプルを使用した。またこの検体をフロースルー免疫測定法を用いた Influenza 迅速診断キット クイック S インフル A・B 「生研」(デンカ生研(株))を用いて測定し相関性を求めた。

### 3. 結果及び考察

#### 【モノクローナル抗体混合割合による反応性】

使用した抗体は単一エピトープを認識するモノクローナル抗体であるため高い特異性を持つが、抗原の複数箇所を認識するポリクローナル抗体より力価が低いと考えられる。そこで複数のモノクローナル抗体を混合して結合し反応性を求めた。(Fig.1)単クローンよりも 2 種クローンのほうが高い反応性が得られた。また混合割合により反応性に違いが確認されたがこれは単クローンの力価を反映しているものと考えられる。

#### 【各種 PEG による反応増感作用の検討】

3 種類の PEG による反応性を Fig.2 に示す。添加 PEG の平均分子量が高くなるほど低濃度で高い反応性を示し PEG20000 が最も高い反応性が得られた。作製した全ての試薬において同様な結果が得られたため PEG20000 をリファレンス増感剤と

して選択した。LAと同じく抗原抗体反応を用いたELISA法によるCRP抗原の測定においても同様の傾向が確認されたことから、PEGは抗原抗体反応を促進し、有効な平均分子量には一定の範囲があるのではないかと推測される。

【各界面活性剤が反応性に及ぼす効果】

使用した抗体は主に Influenza ウイルスの核タンパクにエпитープがあるため、核タンパクを抽出することで抗原性を高めることが出来ると考えられる。そこで3種類の界面活性剤により処理した抗原、及び未処理の抗原を測定した結果を Fig.3 に示した。N461 及び K9-020 を用いて作製した試薬は MEGA8 が、G1225 及びスパーサー分子導入 Latex 粒子を用いたものは Tween20 を用いたものが最も高反応だった。未処理の抗原は低かったが反応性を示した。これは僅かながらウイルスの表面にもエピトープがあったためだと考えられる。N461 は他のものと比べ全体の反応性は高いが界面活性剤処理により未処理抗原の2倍程度の反応性しか得られなかったのに対し、化学結合で作製した3種類の試薬は4~10倍ほどの反応性が得られた。N461 が物理的に抗体を吸着しているのに対して化学結合法ではより強固な共有結合により抗体を結合しているため界面活性剤存在下において抗体に及ぼす影響が少なかったためだと考えられる。MEGA8 で処理したものが平均して反応性が良好だったためリファレンス界面活性剤として MEGA8 を選択した。

【各方法による抗体結合の割合】

各方法で抗体結合後の上清から未結合の抗体量を BCA 法により定量し抗体結合率を求めた。また使用した Latex 粒子の単位表面積あたりの抗体結合量も Fig.4 に示す。K9-020 を用いたものが両抗体結合率 90%以上と最も高く、G1225 を用いたものが約 55%と最も低かった。しかしながら、単位表面積あたりの抗体結合量は N461 を用いた物理吸着法が他の3つの化学結合法よりも高い結果となった。これは物理吸着法では粒子表面に抗体が多層吸着しているが、化学結合法では単層吸着しているためだと

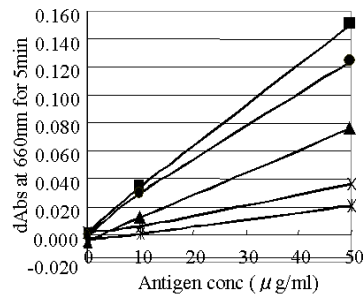


Fig.1 Reactivity of anti-Influenza A adsorbed latex using mixed monoclonal antibody

■ cloneA:B=7:3 ● cloneA:B=5:5 ▲ cloneA:B=3:7  
 × cloneA \* cloneB  
 Clone A: M2110109 Clone B: M32211

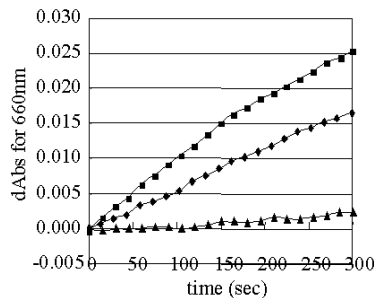


Fig.2 Reactivity of Anti Influenza A coupled Latex reagent using PEG enhancer

Latex: N461 based anti Influenza A Physical adsorbed reagent  
 Antigen: Influenza A virus 10 µg/ml

▲ PEG4K(5%) ● PEG6K(4.3%) ■ PEG20K(2.1%)

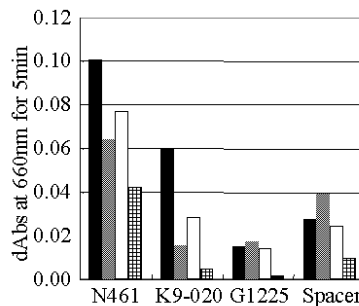


Fig.3 Effect of detergent on latex agglutination for anti Influenza A coupled Latex

Antigen: Influenza A virus 10 µg/ml

■ : MEGA8    ■ : Tween20  
 □ : Triton-X100    ▨ : No detergent

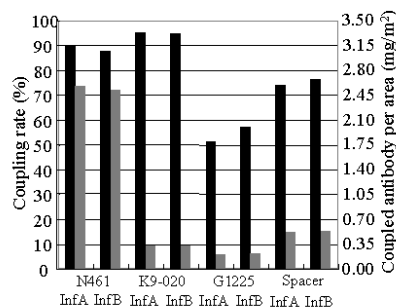


Fig.4 Coupling rate of antibody on latex and coupled per surface area

InfA: anti Influenza A coupled latex reagent  
 InfB: anti Influenza B coupled latex reagent

■ : Coupling rate (%)  
 ■ : Coupled antibody per area (mg/m²)

考えられる。

【各 Latex 試薬の反応性】

上記で検討した条件を用いて各方法で作製した抗 Influenza A 及び B 結合試薬の反応性を Fig.5 及び Fig.6 に示す。各試薬とも抗原濃度の上昇に従い Latex 凝集反応による吸光度変化量の上昇が確認され、Influenza A では 0.5~10  $\mu$ g/ml、Influenza B では 10~50  $\mu$ g/ml の範囲で検量線が作製できた。N461 を用いたものは両試薬とも最も高い反応性が得られた。

【実検体測定の結果】

N461 を用いた抗 Influenza A 抗体物理吸着 Latex 試薬ならびに FTIA 法による鼻汁検体の測定結果を Fig.7 に示す。LPIA 法では 10 分で結果を得ることができ、初期吸光度の 10%以上の吸光度変化量を陽性としたところ 6 サンプル中 5 サンプルの結果が一致した。一致しなかった 1 サンプルには疑陽性が確認された。

4. 結論

本研究では、LPIA 法を用いて Influenza A 及び B ウイルスの迅速診断法の確立を目的とし、抗 Influenza A 及び B 抗体結合 Latex 試薬を作製し測定条件を検討した。その結果、増感剤として PEG20000、核タンパク抽出目的に MEGA8 を使用した既知の Influenza A ならびに B ウイルスを用いた測定において、Influenza A 及び B ウイルスに対して特異的な反応が確認できた。実検体を用いた測定においては測定時間 10 分、FTIA 法との一致率 83%と従来法に比べ迅速性がすぐれた成績が得られた。以上のことから LPIA 法を用いた Influenza A 及び B ウイルスの迅速診断法は臨床検査法として実用可能なことが示唆された。

参考文献

- 1)S.Hongo., *Med Front.* **59**,2(2004),15-29
- 2)K.Odawara., *Infection Control.* **11**,12(2002),19-23.
- 3)K.Mitamura., *Med Front.* **59**,2(2004),88-

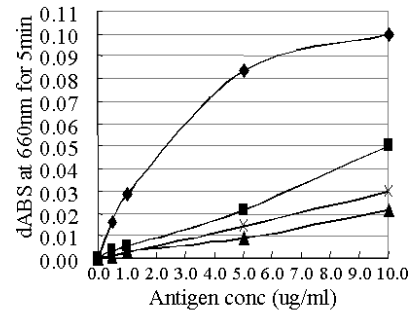


Fig.5 Immunoresponse of anti Influenza A coupled latex reagent

◆N461 0.464  $\mu$ m    ■N9-020 0.22  $\mu$ m  
▲G1225 0.25  $\mu$ m    ✕Spacer infA

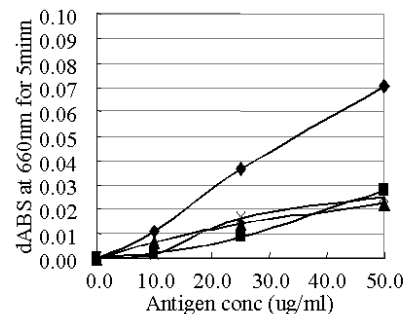
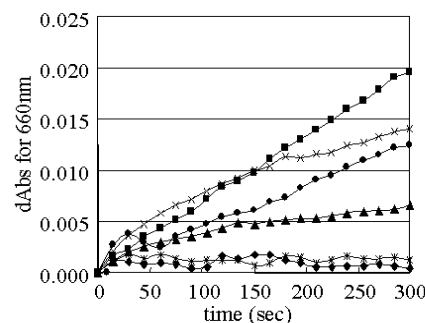


Fig.6 Immunoresponse of anti Influenza B coupled latex reagent

◆N461 0.464  $\mu$ m    ■N9-020 0.22  $\mu$ m  
▲G1225 0.25  $\mu$ m    ✕Spacer infA



	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4	Sample5	Sample6
LPIA	-	+	+	+	-	+
FTIA	-	-	+	+	-	+

Fig.7 Measurement of specimen for nasal drip by Latex Photometric immuno assay

Latex Reagent:N461 based anti Influenza A  
Physical adsorbed reagent  
Up:changed by dAbs for 660nm  
Down:Compare with FTIA

◆ Sample1    ■ Sample2    ▲ Sample3  
✕ Sample4    ✖ Sample5    ● Sample6