

銀増幅技術による高感度インフルエンザ診断薬の開発

森 幹永*, 片田 順一*, 知久 浩之*, 中村 健太郎*, 小山田 孝嘉*

Development of Highly Sensitive Immunochromatographic Detection Kit for Seasonal Influenza Virus Using Silver Amplification

Mikinaga MORI*, Junichi KATADA*, Hiroyuki CHIKU*,
Kentaro NAKAMURA*, and Takayoshi OYAMADA*

Abstract

Applying our photo technology, we succeeded in generating silver particles exceeding 10 μ m by using 50nm gold particles as catalysts, which are commonly used in commercially available influenza diagnostic kits. The amplified silver particles are 1000 times easier to see than gold nano-particles. We have commercialized the influenza detection kit, named “FUJI DRI-CHEM IMMUNO AG cartridge FluAB”, and the densitometry analysis machine to determine automatically positive or negative for influenza infection, named “FUJI DRI-CHEM IMMUNO AG1”, using this amplification technology.

1. はじめに

インフルエンザの臨床症状は「風邪様症状」であるため、診断にはインフルエンザウイルスの検出が必須である。そのため、イムノクロマト法を原理とした迅速診断薬が臨床現場において広く用いられている¹⁾。

また、インフルエンザの治療には、治療薬（オセルタミビル・ザナミビル等）が用いられており、発症後48時間以内のできるだけ早いタイミングでの服用が必要とされている²⁾。したがって、早期診断が非常に重要となっている。

しかしながら、既存の迅速診断薬では、特に発症初期のウイルス量が少ない患者で偽陰性率が高いことが報告されており、迅速診断薬の検出感度向上は、医療現場において強く求められている³⁾。

今回われわれは、長年培ってきた写真技術を迅速診断薬に応用することで銀増幅高感度イムノクロマト迅速診断システムを開発した。診断システムは、インフルエンザ診断薬である「富士ドライケム IMMUNO AG カートリッジ FluAB」と陽性/陰性を自動判定する専用のデンストメトリー分析装置「富士ドライケム IMMUNO AG1」とを組み合わせたものである。このシステムは2011年10月より発売している (Fig. 1)。

本報では、インフルエンザウイルスの高感度検出を可能にした銀増幅技術および診断薬の設計技術を中心に報告する。また、診断システムの有効性の検証結果についても報告する。



Fig. 1 Highly sensitive immunochromatographic detection system for seasonal influenza virus.

本誌投稿論文 (受理2012年2月27日)

*富士フィルム (株) R&D 統括本部

医薬品・ヘルスケア研究所

〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

*Pharmaceutical & Healthcare Research Laboratories
Research & Development Management Headquarters
FUJIFILM Corporation
Ushijima, Kaisei-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa
258-8577, Japan

2. 銀増幅によるイムノクロマト法の高感度化

2.1 イムノクロマト法

一般的なイムノクロマト法の原理を Fig. 2 に示す。

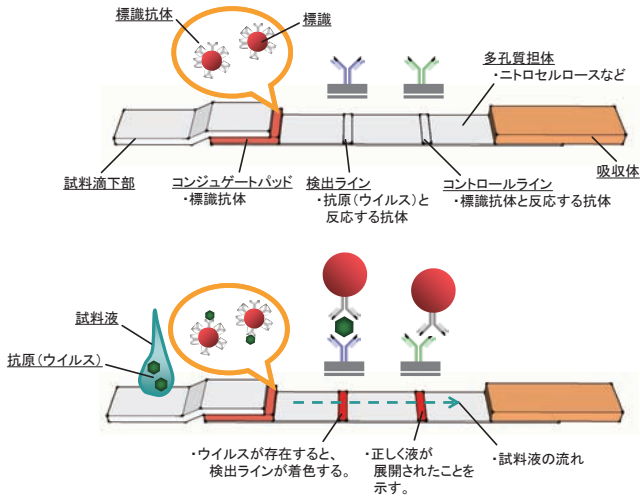


Fig. 2 Principle of immunochromatographic detection kit.

抗原（ウイルス）を含む試料液が試料滴下部に滴下されると、コンジュゲートパッドにあらかじめ含まれている標識抗体と抗原が特異的に結合する。試料液は、多孔質担体による毛管力により水平方向（Fig. 2の右方向）に展開し、吸収体に吸収される。多孔質担体の検出ラインには、ウイルスと特異的に反応する抗体が塗布されており、この抗体と標識抗体がウイルスをサンドイッチする形で標識が検出ラインに固定化される。これにより検出ラインが着色し、陽性と診断することができる。

標識には、金微粒子や着色ラテックス粒子が用いられることが多い。金粒子は、10～100nmで表面プラズモンによる鮮やかな赤色を呈し、抗体の修飾が容易であることから一般的に用いられている。

2.2 写真技術による高感度化

写真の原理は、微弱な光で生成された現像核を触媒とし、現像液による反応で大きな銀粒子を生み出し可視化することである。すなわち、小さな物質を大きな銀粒子の形に変える「増幅技術」である。

イムノクロマト法の標識に用いられる金コロイドを、写真の現像核と同様に触媒とすることで、長年にわたる写真開発で培った増幅技術を、イムノクロマトの高感度化技術に展開することができる。

2.3 金粒子標識の銀増幅

前述の増幅技術としては、インスタント写真技術、レントゲンフィルムに採用されたドライシルバー写真技術など多くの方法があるが、種々の検討の結果、物理現像方式がイムノクロマト法へ最も適用性が高いことがわかった。

物理現像とは、写真フィルムの外部から銀イオンと還元剤を供給し、写真フィルム中の小さな銀粒子を触媒にして、銀粒子を大きく成長させるものである。これは1970年代後半から80代前半にかけて銀価格が高騰し、銀塩写真の省銀化に注力していた際にわが社において深く研究された技術である。

この技術を基に、迅速に大きな銀粒子を生成させるための処方設計を行なった。その結果、2価鉄 (Fe^{2+}) を還元剤に用いることで、多孔質担体上の直径50nmの金粒子を触媒として直径10 μm 以上の銀粒子を生成する事に成功した。加えて、金粒子の存在しない場所での銀粒子生成(カブリ)を抑制する技術も構築し、視認度を1,000倍以上にできる増幅液の処方設計に成功した。成長した銀粒子の電子顕微鏡写真をFig. 3に示す。また、イムノクロマト法に用いる多孔質担体に既知量の金標識を吸着させ、増幅前後で変化した視認性の向上結果を、光学濃度 ($\Delta\text{O.D.}$) を尺度に示す (Fig. 4)。Fig. 4より、明らかに視認度が1,000倍以上になったことがわかる。

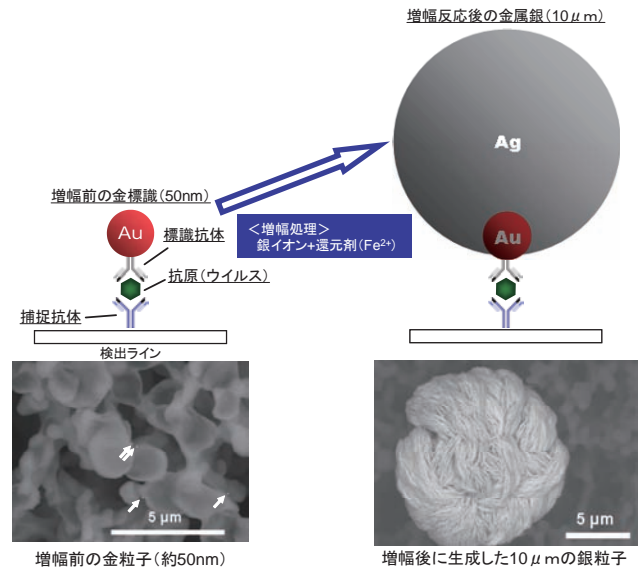


Fig. 3 Large silver particle formed by the silver amplification method.

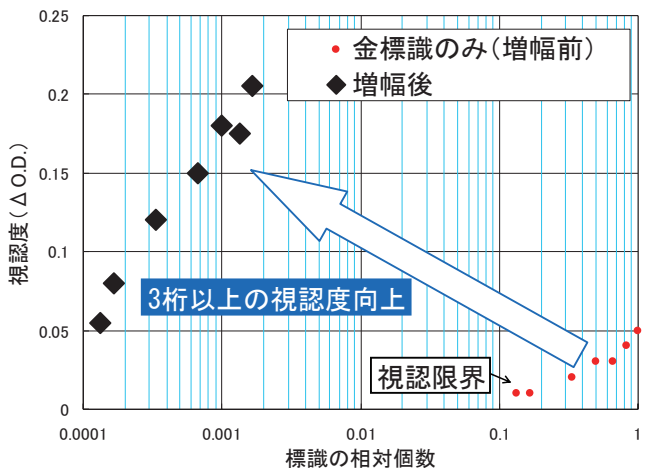


Fig. 4 Visibility improved by the silver amplification method.

2.4 バックグラウンドの低減

一般的なイムノクロマト法では、検出ライン以外に存在する金標識の残存量（バックグラウンド）が少なくない。増幅反応の特性上、金標識数が多いほど増幅後の光学濃度の変化が小さくなる。

そのため、検出ライン部に抗原抗体反応で補足された金標識が同数でも、バックグラウンドが高いと視認性（ $\Delta O.D.$ ）があまり向上しないという問題がある。この問題を模式的にグラフに示す（Fig. 5）。したがって、この増幅技術を活かすには、バックグラウンドの低減が必須課題であった。

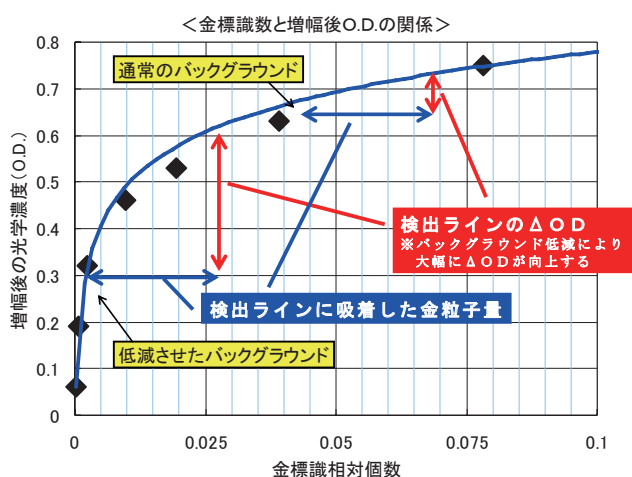


Fig. 5 Effect of reducing the background.

バックグラウンドは、①多孔質担体中の空隙にある試料液に分散し浮遊した状態の金標識と、②多孔質担体や検出ライン成分に非特異的に吸着する金標識が存在することを明らかにした。①については、増幅工程前に「洗浄工程」を追加することで、洗浄前に対しバックグラウンドを30分の1程度の量に低減できることを確認した。洗浄工程の具体的な方法については、3.2項で詳しく報告する。②については、標識抗体の非特異的に結合しやすい箇所を意図的に取り除くことと、新たに開発した非特異吸着防止剤の導入により解決した。

2.5 高感度化により生じる偽陽性の抑制

ウイルスが含まれていない試料液を展開した時に、既存の金標識イムノクロマト法では検出ラインの非特異吸着金標識が検出ライン以外の箇所に対して多い場合でも、その金標識量が目視限界以下であれば視認できないために偽陽性の判定にならない。

一方、銀増幅を行なう場合は、僅かな金標識数の差を増幅により強く発色させるため、偽陽性になってしまう問題があった。つまり、銀増幅する場合は、既存のイムノクロマト法に対して、検出ラインの金標識の非特異吸着を大幅に抑制する必要がある。この課題についても、先述した標識化抗体の非特異吸着箇所の除去によって解決できた。Fig. 6にウイルスを含まない試料液を展開した際の、検出ライン部分の非特異吸着の低減効果を示す。

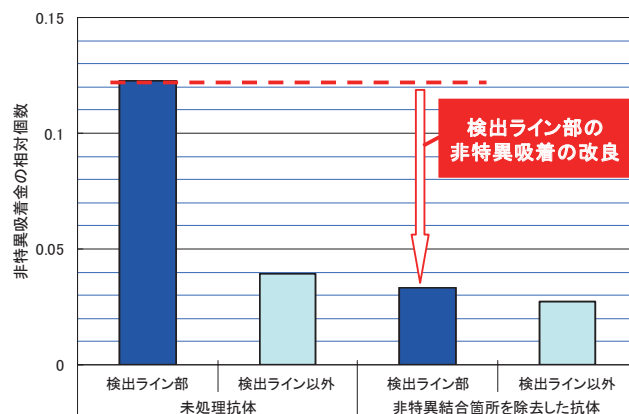


Fig. 6 Improvement in decrease of non-specific adsorption at the detection line.

3. 銀増幅イムノクロマトのカートリッジ化

従来の多くのイムノクロマト法は、試料液を滴下し検出ラインの発色の有無を確認するだけで、陽性/陰性が判定できる。一方、われわれが開発した銀増幅技術は、新たに、洗浄工程、増幅工程が必要になるため、従来のイムノクロマト法に対し、操作が煩雑になる可能性があった。

しかし、本システムでは、従来のイムノクロマト法に対して、煩雑な操作を増やさなければならず、装置が自動判定する設計にすることで、これまで以上に操作を簡略化した。ユーザーは、試料液を滴下し、カートリッジを専用装置に挿入するだけで、陽性/陰性の判定できる。したがって、ユーザーの操作負荷は、従来のイムノクロマト法による検査と同等以下となっている。

しかし、従来まで必要なかった専用装置が必要となるため、診療所のテーブルサイドといった小さな設置面積でも使用できるよう、専用装置を極力小型にする必要性があった。そこで、専用装置はカートリッジの構成部材を「押す」という単純な動作だけにして小型化を達成し、カートリッジは「押される」だけで増幅液の送液をコントロールできる形状に設計した。さらに診断薬として下記機能を付与し、ユーザーニーズに対応する設計を行なった（Fig. 7）。

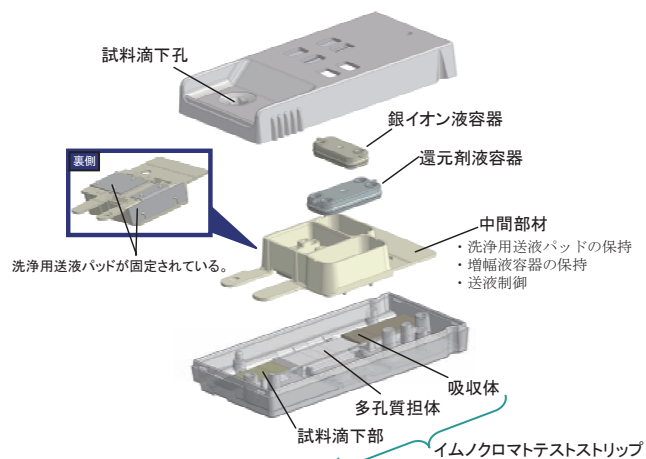


Fig. 7 Configuration of the cartridge of silver amplification detection kit.

①オールインワン設計

- ・増幅液を内蔵し、洗浄の実施、増幅液の吐出は専用装置が行なう。
- ・カートリッジ以外の消耗品の設置や廃棄が不要である。

②保管安定性

- ・30℃環境で2年間の保管ができるような増幅液の安定化を行なう。

上記を実現するにあたり、ポイントとなる技術について以下に報告する。

3.1 増幅液の保管

還元剤液 (Fe^{2+}) と銀イオン液 (Ag^+) を混合すると、触媒が存在しなくても、徐々に反応が進行する。そのため、保管安定性付与のため別々に保管する必要があった。そこで二つの樹脂性の小容器に分けて、還元剤液と銀イオン液を充填および封止し、カートリッジ内で別々に設置した。

封止は、金属箔/樹脂層からなるシートを小容器に熱溶着することで実施した。増幅液をカートリッジ内で吐出させ多孔質担体上に供給するために、封止シートには、容易に突き破れる性質とバリア性という相反する機能が要求される。樹脂層を薄くすると突き破り易くなるが、熱溶着部において樹脂層が欠損し、金属箔と増幅液が接触し増幅液を劣化させる問題が生じる。そこで樹脂層が厚くても突き破り易い材料の選択と、熱溶着部において樹脂層を残すため最適な封止条件（ヒーターの温度・圧力・溶着時間）により、性能の両立を達成した。

還元剤の Fe^{2+} は酸素により酸化劣化するが、包材に脱酸素剤を同梱することで30℃ 2年の保管安定性を達成した。

3.2 洗浄・増幅液の送液と増幅反応の実現

還元剤液および銀イオン液のカートリッジ内での送液方法について、説明する。

試料滴下部に試料液が点着されると、従来のイムノクロマト法同様の抗原抗体反応が進行し、抗原の量に応じて検出ラインに金標識が結合する。

Fig. 7に示した「中間部材」を専用装置で押し付けることで、洗浄用送液パッドが多孔質担体に接触する。引き続き、還元剤液容器が押し込まれることで還元剤液が洗浄用送液パッドの一方に吐出される。還元剤液が、試料液の展開方向に対し垂直方向に送液されることで多孔質担体の洗浄が行なわれる。このとき、還元剤液が流れる力は、多孔質担体と洗浄用送液パッドの毛管力によって生じている。洗浄と同時に、多孔質担体の空隙が還元剤液で満たされる。この方法によって、余剰の金標識除去を目的とした洗浄と還元剤液の供給を兼ねることができ、カートリッジ内の送液工程を単純化することが可能になった。洗浄前後において、多孔質担体のバックグラウンドの金標識量は約30分の1に減少していることを確認している。

次に「中間部材」と多孔質担体が面して形成されたク

リアランス (Fig. 8) に、吐出された銀イオン液が速やかに充填される。その結果、増幅反応が進行し、多孔質担体平面においてきわめて均一な増幅反応を進行させることができる。ここで得られる均一な増幅反応は、ほかの送液方法で達成するのはきわめて困難だと考えている。例えば還元剤液と銀イオン液を外部で混合し、多孔質担体の毛管力で送液する方法では、銀粒子の生成が増幅液の流れ方向で不均一になり非常に乱れた増幅面状になってしまう。

以上述べた機構のほかに、次のような機構を導入している。洗浄・増幅反応中に、試料液が洗浄用送液パッドに流入すると、還元剤液の置換不良などによって増幅面状が悪化する。「中間部材」を押し付けた際にこの流れを遮断する構造を設置した。また、銀イオン液のクリアランスへの充填において、空気が混入すると、空気と接した箇所では増幅反応が進行しない。そこで、空気は排除し銀イオン液だけがクリアランスに充填できるようにした。これは、カートリッジの形状設計と、銀イオン液と「中間部材」との接触角のコントロールにより達成している。

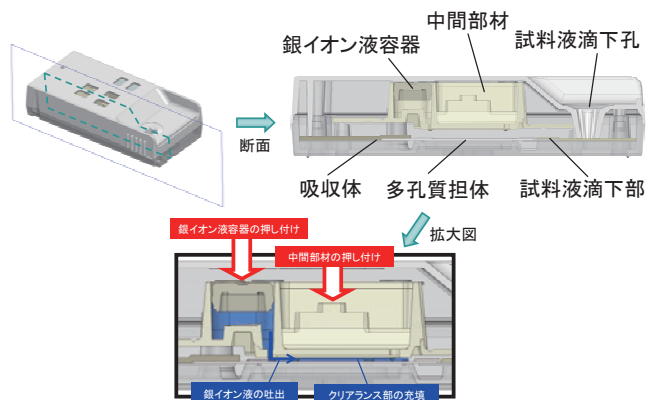


Fig. 8 Schematic description of pumping of Ag^+ solution in the cartridge.

4. 性能評価

これまで述べてきた技術により構築した銀塩増幅技術による高感度インフルエンザ診断システムを用いて、インフルエンザ感染症の診断における性能評価を行なったので報告する。本評価は、(財) ライフ・エクステンション研究所付属永寿総合病院倫理委員会の承認を得て実施した。なお、本章は文献4よりそのデータを引用している。

(1) 希釈感度試験

2009年に患者の同意を得た上で採取し、冷凍保存した鼻腔吸引液（ウイルス分離培養にてA(H1N1)pdm2009ウイルス陽性であった2検体、B型ウイルス陽性であった2検体）を試験直前に解凍し試験に用いた。これらの検体の生理食塩水による希釈系列を作成し、銀増幅イムノクロマト法とエスプライン インフルエンザA&B-N

Table 1 Detection limits using nasal aspirates.

concentration	Influenza Type A-1		Influenza Type A-2		Influenza Type B-1		Influenza Type B-2	
	Espline	Silver Amplification	Espline	Silver Amplification	Espline	Silver Amplification	Espline	Silver Amplification
1	+	2+	+	2+	+	2+	+	n.d.
1/2	-	2+	-	+	-	2+	-	n.d.
1/4	-	+	-	+	-	2+	-	n.d.
1/8	n.d.	+	n.d.	+	n.d.	2+	n.d.	+
1/16	n.d.	+	n.d.	+	n.d.	+	n.d.	-
1/32	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	n.d.

(富士レビオ(株), 以下エスプライン) の検出限界濃度を比較した。なお, エスプラインは2011年現在国内で販売されているインフルエンザ迅速診断キットの中で最も高感度なキットの1つと報告されている⁵⁾。

結果を Table 1 に示す。テストラインが強く発色したものを(2+), 発色したものを(+), 発色しなかったものを(-)とした。(2+) または (+) を陽性判定とした。検出限界濃度を比較すると, 銀増幅イムノクロマト法を用いた高感度インフルエンザ迅速診断システムでは, エスプラインに対し, A型で16倍, B型で8~16倍高感度であった。

(2) 臨床試験

2009-10年シーズンに, 座間小児科診療所をインフルエンザ様症状で受診した外来患者の鼻腔拭い液120検体を用いて, エスプラインと感度・特異度を比較した。

鼻腔拭い液は, 1患者より3本同時採取し, 銀増幅イムノクロマト法用, エスプライン用, ウイルス分離培養試験用, として各1本ずつ用いた。

臨床試験の結果を Table 2 に示す。全120検体中, ウイルス分離培養またはリアルタイム RT-PCR で陽性となったのは67検体で, すべて A(H1N1)pdm2009 ウイルスであった。この67検体のうち, エスプライン陽性が51検体に対し, 銀増幅イムノクロマト法では55検体が陽性であった。この結果, 銀増幅イムノクロマト法の感度(陽性一致率)は82.1%となり, エスプラインの76.1%と比べ6%が高かった。一方, 特異度(陰性一致率)も98.1%と十分に高かった (Table 3)。

エスプラインと結果が乖離した4検体に関して, リアルタイム RT-PCRにより各キットで使用した検体液中に含まれるウイルス量を比較したが, エスプラインの検体液の方が銀増幅イムノクロマト法の検体液よりもウイルス量が多いことはなかった。このことからエスプラインと結果が乖離した検体は, 採取ウイルス量の差によるものではなく, 試薬の感度差に起因するものと考えられる。

発症後の時間別の感度および検体数を Table 4 に示す。今回の乖離検体4検体のうち, 2検体は発症後6時間未満であり, 2検体は発症後48時間以上であった。ウイルスの増幅過程でありウイルス量が少ない発症初期と, 回復期でウイルス量が少ない発症後期で, 高感度化により見逃しを減らせたことが示唆された。

Table 2 Performance of silver amplification and Espline compared with virus cell culture and/or real-time RT-PCR.

AH1N1 (2009) Cell culture + RT-PCR	Silver Amplification		total
	+	-	
+	55	12	67
-	1	52	53
total	56	64	120

AH1N1 (2009) Cell culture + RT-PCR	Espline		total
	+	-	
+	51	16	67
-	0	53	53
total	51	69	120

Table 3 Sensitivity/Specificity.

AH1N1 (2009) Cell culture + RT-PCR	Silver Amplification	Espline
Sensitivity	82.1% (70.1% - 90.4%)	76.1% (64.1% - 85.7%)
Specificity	98.1% (89.9% - 100%)	100.0% (93.3% - 100%)

95% C.I. in parenthesis.

Table 4 Time elapsed after onset and sensitivity.

Time from onset (h)	Silver Amplification		Espline	
	Sensitivity	n +/total	Sensitivity	n +/total
~ 6	84.6%	11/13	69.2%	9/13
6 ~ 12	75.0%	3/4	75.0%	3/4
12 ~ 24	76.0%	19/25	76.0%	19/25
24 ~ 48	90.0%	9/10	90.0%	9/10
48 ~	100.0%	4/4	50.0%	2/4
No Data	81.8%	9/11	81.8%	9/11
total	82.1%	55/67	76.5%	51/67

5. 結言

国内で販売されているインフルエンザウイルス抗原検出試薬のほとんどはイムノクロマトグラフ法を測定原理としているが、Tagawaらの基礎検討では、キットによってあるいはインフルエンザウイルスの型・亜型によって最小検出感度が大きく異なる場合もあることが報告されている⁶⁾。検出感度向上を図るためにイムノクロマトグラフ法に新規技術を付加した試薬として、通常のコロイド標識を白金に代えた白金イムノクロマトグラフ法⁷⁾や、酵素免疫法と組み合わせた酵素増幅イムノクロマトグラフ法⁸⁾などが商品化されており、臨床成績においても精度の向上が得られたことが報告されている。

本システムでは、写真現像技術を応用し感度の向上を期した。これまで現像技術による増幅としては、組織染色⁹⁾やELISA¹⁰⁾への応用が報告されている。また、イムノクロマトグラフ法への応用¹¹⁾も報告されているが、増幅率が十分でなく、反応に数十分を要したことから、検出感度・迅速性という点で不十分であった。

今回開発した銀増幅技術では、2章で述べたように、迅速にシグナル粒子を100倍以上の大きさに増幅し感度を向上させ、一方で、標識にFc部位を切断・除去した抗体を用い、洗浄工程を加え、臨床検討でも特異度を落とさず感度を向上させた。また、3章で述べたように、本システムは、増幅のための薬剤を試薬カートリッジに組み込むオールインワン設計とし、専用の機器で増幅の工程を行なえるようにしたことで、ユーザーは従来の迅速診断キットと同様に簡便な検査を可能にした。

臨床評価においては、検体数は少ないものの、本システムは2011年現在国内で販売されているインフルエンザ迅速診断キットの中で最も高感度なキットの1つであるエスプラインとの直接比較において、より高い感度であり、また良好な特異度であった。両キットの判定が乖離した検体は、発病から6時間未満と48時間以上の検体で、ウイルス量が少ないと考えられる時期のもので、本システムは偽陰性が出やすい条件の検体において、より有用性が高いと期待される。

6. 謝辞

本研究開発において、増幅液の処方検討にご協力頂きました御船博幸氏、試薬のカートリッジ化に関しましてご尽力されました生産技術センターの皆様、微量の金微粒子の解析手法を確立し開発にご協力頂きました解析技術センターの皆様、機器開発に関しましてご尽力されましたメディカルシステム開発センターの皆様、臨床現場からの貴重なアドバイスを頂きました富士フィルム健康管理センターの皆様、臨床現場からのご協力頂きました、永寿総合病院三田村敬子先生、座間小児科診療所山崎雅彦先生、石崎昌実氏、川崎市衛生研究所清水英明先生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 三田村敬子, 山崎雅彦, 市川正孝, 川上千春. インフルエンザウイルス. 小児科臨床. **61** (2), 179-187 (2008).
- 2) 小児呼吸器感染症ガイドライン診療ガイドライン作成委員会. 小児呼吸器感染症ガイドライン診療ガイドライン2007, 2007, 100-104.
- 3) 三田村敬子, 菅谷憲夫. インフルエンザの診断と治療－臨床症例のウイルス排泄からの考察－. ウイルス. **56** (1), 109-116 (2006).
- 4) 三田村敬子, 山崎雅彦, 片田順一, 小山田孝嘉, 市川正孝, 石丸陽子, 清水英明, 川上千春. 銀増幅イムノクロマトグラフィー法を用いた高感度インフルエンザ迅速診断システムの臨床検討. 医学と薬学. **67** (2), 307-314 (2012).
- 5) 川上千春, 七種美和子, 山崎雅彦, 市川正孝, 清水英明, 三田村敬子. (H1N1) 2009インフルエンザウイルスに対する迅速診断キットの反応性及び感度の比較検討. 第85回日本感染症学会総会 (2011-4-21).
- 6) Sakai-Tagawa, Y.; Ozawa M.; Tamura, D.; Le, M.T.Q.; Nidom, C.A.; Sugaya, N.; Kawaoka, Y. Sensitivity of influenza rapid diagnostic tests to H5N1 and 2009 pandemic H1N1 viruses. J Clin microbial. **48** (7), 2872-2877 (2010).
- 7) 高崎好生, 進藤静生, 山下祐二, 横山隆, 芝尾京子, 岩屋美奈子, 福田徹三, 柏木征三郎. 臨床研究 新しい技術白金－金コロイドを用いたインフルエンザ迅速診断キット“イムノエースFlu”の評価. 臨床と研究. **85** (12), 1804-1807 (2008).
- 8) 三田村敬子, 山崎雅彦, 市川正孝, 市川正孝, 木村和弘, 川上千春, 清水英明, 渡邊寿美, 今井光信, 新庄正宣, 武内可尚, 菅谷憲夫. イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理によるインフルエンザ迅速検査キットの検討. 感染症学雑誌. **78** (7), 597-603 (2004).
- 9) Clive, S.H.; Peter J, Philip NC, Colin CB : Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. J Histochem Cytochty. **31** (7), 938-944 (1983).
- 10) Yeh, C.-H.; Hung, C.-Y.; Chang, T.C.; Lin, H.-P.; Lin, Y.-C. An immunoassay using antibody-gold nanoparticle conjugate, silver enhancement and flatbed scanner. Microfluid Nanofluid. **6** (1), 85-91 (2009).
- 11) Cho I.-H.; Seo S.-M., Peak E.-H., Peak S.-H. Immunogold-silver staining-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography. J Chromatogr B. **878** (2), 271-277 (2010).

(本報告中にある“エスプライン”は富士レビオ(株)の登録商標です。“FUJI”, “DRI-CHEM”, “富士”, “ドライケム”は富士フィルム(株)の登録商標です。)