

〈原著〉

イムノクロマト法の特異性を改善する新技術

小澤 慎吾

The new technology to improve specificity of immunochromatography

Shingo Ozawa

Summary Immunochromatography is one of the assays which are well known and used in clinical setting. To compare with the other assay, its rapidness, easy handling and inexpensive cost are being mentioned for its advantages. However, its quality of sensitivity and specificity are still developing so the users have to think the limitation of the kit they use and sometimes are required to interpret the test result with clinical record and the other assays exactly to diagnosis patients. To conquer the problem, several studies have been done especially to improve its sensitivity but few reports are shown about specificities. Thus, in this study, the specificity of BD Veritor System is evaluated from many aspects of scientific views. Human anti-animal antibody, cross reaction and test environment are now being considered as the factors which cause false positive in immunochromatography so the function of BD Veritor System was investigated with these several factors.

Key words: Veritor, Diagnosis, Specificity, Immunochromatography, False positive

I. 緒言

イムノクロマト法をはじめとする免疫学的測定における偽陽性の発生率は特異度として評価される¹⁾。本法における特異度はその対象となる検査キットなどを信頼性のある検査法（ゴールドスタンダード）で評価し、双方の結果の陰性一致率より算出される。イムノクロマト法を評価する上で、比較対象として使用される検査法

には主として分離培養法、PCR法、または厚生労働省より承認を受けた既承認品などがあげられる。一般に特異度が高いほどその一致率が高い値が得られるが、この特異度は比較対象の検査性能により左右される。したがって、比較対象に検出感度の低いものを採用した場合はそのデータの信憑性が懸念される。そのため、同一原理に基づく検査結果を比較する場合は各検査キットの性能を十分に理解しておかなければな

日本バクトン・ディッキンソン株式会社

〒107-0052 東京都港区赤坂 4-15-1

赤坂ガーデンシティ

受領日 平成25年10月7日

受理日 平成25年10月22日

Nippon Becton Dichkinson Company, LTD.

4-15-1 Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

らない。この検出感度の差異はその検査キットの検出原理や対象抗原の抽出方法に起因するとされる²⁾。

小児領域におけるインフルエンザウイルス感染症例では解熱時においても半数以上がウイルス分離培養陽性であり、一定の割合で薬剤耐性が生じている報告³⁾もある。抗ウイルス薬の乱用による薬剤耐性の発生率を抑える上で偽陽性判定には注視する必要がある。また、新型インフルエンザウイルスや鳥インフルエンザウイルスなどの感染が確認された場合には感染者の隔離が必要となるが、設備状況の限界から、感染患者を同室に集め感染予防を計るコホート隔離が採用される場合⁴⁾もある。このような事態における偽陽性判定は健常な患者を不必要に感染の危険にさらすこととなり、正確な陰性判定を導くことが検査キット開発メーカーに求められる。

イムノクロマト法を原理とする免疫学的測定においてはtwo site immunoassay (サンドイッチ法) が用いられている。ニトロセルロース膜上に固相化された抗体とその膜上を毛細管現象により展開する標識抗体に検査対象の抗原が挟みこまれる形でテストラインが発色する原理⁵⁾を応用したものであるが、近年、様々な偽陽性の原因物質が同定されている。中でも代表的なものの一つとして、Human Anti-Animal Antibodyによる影響があげられる。その一例としてHAMA (Human Anti-Mouse Antibody) では本法で一般的に使用されているマウスモノクローナル抗体に結合能を示す異好性抗体がある。HAMAはサンドイッチ法を主原理とする検査キットにおいて、ニトロセルロース膜上に固相化された抗体と標識抗体の双方に結合し、偽陽性として反応する⁶⁾。このような背景から米国FDA (The Food and Drug Administration) では、偽陽性の可能性を検査キットの使用者へ注意勧告することを義務付けている^{7), 8)}。さらに、免疫学的測定では交差反応による偽陽性の可能性も注意しなければならない。ポリクローナル抗体を使用した検査法ではしばしば偽陽性が報告⁹⁾されている。イムノクロマト法ではウサギポリクローナル抗体を用いたA群ベータ溶血連鎖球菌 (Strep A) を検査対象とする検査キットに偽陽性の報告例^{10), 11)}が多い。

これまでのイムノクロマト法はテストライン

の発色の有無を視認し、陽性か陰性かの判定を行うものが主流であるが、イムノクロマト法を原理とするデンシトメトリー分析装置 (BDベリター システムリーダー) は、専用試薬と組み合わせることにより判定と同時に偽陽性の可能性を検証し判定結果に反映させるアダプティブリードテクノロジーが搭載されている。本技術では発色したテストラインの信憑性を独自に開発された判定ロジックによりテストライン、および、そのバックグラウンドを分析し、判定結果に算出する方法がとられている。本稿では、このアダプティブリードテクノロジーの有用性の検討結果について述べる。検査対象の微生物にはイムノクロマト法ウイルス検査キットで主流となるインフルエンザウイルスを使用し、細菌検査キットではA群ベータ溶血連鎖球菌を使用した。

II. 対象と方法

1. インフルエンザウイルス抗原キットの検証

1) 臨床評価試験

2010年から2012年に、日本の医療機関で採取された914検体 (鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液及び咽頭拭い液) を使用した。BDベリター™システムリーダー及びその専用試薬 (Table 1) となるBDベリター™システム Fluの性能評価をウイルス分離培養法の結果と比較した。BDベリター™システムリーダーでは従来のイムノクロマト法に基づくテストラインでの発色がバックグラウンドを認識する判定部[N]で再検証される。判定部[N]では、従来のイムノクロマト法で懸念される様々な偽陽性の原因因子が認識され判定結果へ反映される。本法を弊社ではアダプティブリードテクノロジーと呼び、その有用性の臨床評価を行った。BDベリター™システムリーダーでインフルエンザウイルスA型及びB型の両陽性が得られた検体に関しては、さらに核酸増幅法による追加試験を行った。なお、本臨床評価は弊社研究倫理委員会にて承認後、医療機関に依頼され、「臨床研究に関する倫理指針」に準じて実施されたものである。

2) HAMAの影響評価

検体中の偽陽性因子の一つとなるHAMAのブ

ロック剤にはTRU Block™ (Meridian Life Science, Inc. USA) を使用し、TRU Block™の添加の有無によるイムノクロマト法の反発色変化をBDベリター™システム リーダー、および、その専用試薬となるBDベリター™システムFluを使用し評価した。ブロック剤のポジティブコントロールには市販のHAMA-PUR (フナコシ)、ネガティブコントロールにはインフルエンザウイルスA型(臨床分離株)を使用した。テストラインの発色値 (arb.u.) は再現性試験 (N=3) を実施し、その平均値を求めた。

2. A群ベータ溶血連鎖球菌抗原キットの検証

1) 交差反応性の評価

BDベリター™システム Strep Aの交差反応性試験の対象とした60種の微生物より、そのテストラインに使用したウサギポリクローナル抗体に反応性を示した*Staphylococcus aureus*をコントロールとして試験を行った。菌量は生理食塩水で種々の濃度に希釈し検討を行った。テストラインの発色値 (arb.u.) は再現性試験 (N=3) を実施し、その平均値を求めた。また、使用した検体中におけるStrep Aの有無は核酸増幅法で確認を行った。

2) 試料の調整及びテスト環境による検査キットへの影響

BDベリター™システム Strep Aに同梱されているGAS試薬1 (酢酸含有) の添加量の違いによる交差反応性への影響を評価した。添加不十分のサンプルとしてGAS試薬1を60μL、生理食塩水を30μL混合したものを試験に用いた。一方、通常使用のコントロールとしてGAS試薬

1を90μL (本品の仕様では90~100μL使用する) 加えたものを使用した。これによりpHの変化による非特異反応の可能性について検証を行った。また、イムノクロマト法における抗原抗体反応の判定時間以降における反応性の評価も継時的に行った。交差反応のコントロールには*Staphylococcus aureus*を使用した。菌量は生理食塩水で希釈しマクファーランド比濁法で 2.4×10^9 CFU/mLに調整した菌液を100μL使用した。テストラインの発色値 (arb.u.) は再現性試験 (N=3) を実施し、その平均値を求めた。

Ⅲ. 結果

1. インフルエンザウイルス抗原キットの検証

1) 臨床評価試験

ウイルス分離培養法で陰性結果が得られたもののうち、テストラインの光度が陽性値を示すレベルであるが、BDベリター™システム特有の判定部[N]の機能により陰性結果を示したものは914検体中11件あった (Table 2)。検体種では咽頭拭い液に多く認められ、また、インフルエンザウイルスA型において判定部[N]の効果が示された。一方、BDベリター™システム リーダーでインフルエンザウイルスA型及びB型の両陽性の結果が得られたものは4例あった。その内、1例が核酸増幅法においても両陽性の結果が得られた。他3例は核酸増幅法でインフルエンザウイルスA型は陰性であったが、インフルエンザウイルスB型が陽性であることがウイルス分離培養法により示された。この両陽性を示した4例では核酸増幅法、および、ウイルス分離培養法共に陰性結果を示すものはなかった。

Table 1 Veritor System Flu and Strep

	Extraction Reagent	Reaction time for IC assay	Antibody on test device	Specimen
Veritor System Flu	Surfactant	5-10 min	Mouse monoclonal	Nasopharyngeal Swab Nasal Aspirate Throat Swab
Veritor System Strep	Sodium Nitrite Acetic Acid	5 min	Rabbit polyclonal	Throat Swab

To evaluate the specificity of immunochromatography, two kinds of kit are compared. The differences between Flu and Strep kits are extraction of antigen and reaction of antibody. These factors mainly contribute to their detection capability.

2) HAMAの影響評価

臨床検体より、BDベリター™システム Fluの判定部[A]、[B]及び[N]に発色シグナルが確認されたものの成分分析を行った。この分析対象の検体は全てBDベリター™システム リーダーで陰性結果が得られた。回収された検体の中で、3検体がTRU Block™の添加により、マウスモノクローナル抗体の非特異反応が低下するものが確認された (Fig 1)。回収された検体は全て核酸増幅法によりインフルエンザウイルスは陰性として結果が得られた。

の濃度よりその反応性が確認された (Fig 2) がBDベリター™システム リーダーでの判定では判定部[N]の機能によりテストラインの発色反応を陰性とする結果が得られた。使用した *Staphylococcus aureus*の検体はStrep Aの核酸増幅法では陰性結果が得られた。

2. A群ベータ溶血連鎖球菌抗原キットの検証

1) 交差反応性の評価

BDベリター™システム Strep Aのテストラインで使用されたウサギポリクローナル抗体に反応性を示す *Staphylococcus aureus*は 1×10^8 CFU/mL

2) 試料の調整及びテスト環境による検査キットへの影響

検体中のpHによる影響としてはGAS試薬1 (酢酸含有) を本来の2/3量に相当する $60 \mu\text{L}$ 添加したコンディション (弱酸性のコンディション: pH 6.2~pH 6.8) で *Staphylococcus aureus*による交差反応が促進された。また、判定時間が超過するほど交差反応による発色反応が促進された (Fig 3)。BDベリター™システム リーダーでの判定ではいずれの場合においても陽性結果

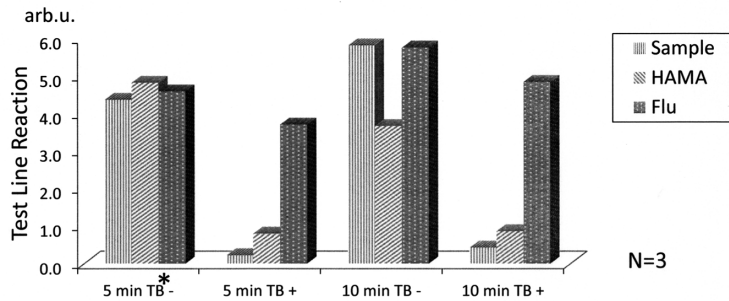


Fig. 1 Non-specific reaction of mouse monoclonal antibody

The reaction of mouse monoclonal antibody on immunochromatography was evaluated by reflectance-based measurement. The non-specific reaction with clinical samples was not observed at the presence of TB* in 5 and 10 min of detection time.

TB* indicates TRU block™ which prevents false positive caused by HAMA.

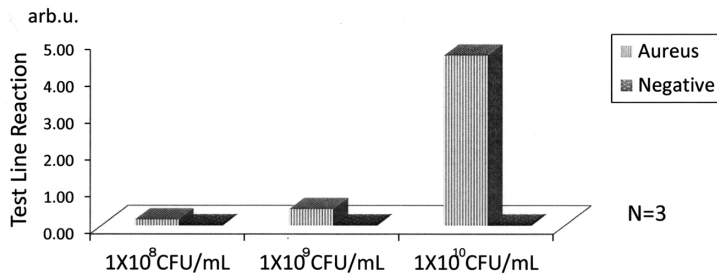


Fig. 2 Non-specific reaction of rabbit polyclonal antibody

The reaction of rabbit polyclonal antibody on immunochromatography was evaluated by reflectance-based measurement. The non-specific reaction began to be observed at the presence of *Staphylococcus aureus* with the concentration of 1×10^8 CFU/mL.

を示すことはなかった。

Ⅳ. 考察

今回の検討により、イムノクロマト法のテストラインで使用される抗体の非特異的に反応する因子が複数確認された。このような因子は標識抗体がテストラインで発色する可能性を持つため、従来のテストラインの有無を目視により判定する方法には限界が示唆された。BDベリター™システムではテストラインの有無のみならず、発色したテストラインの信憑性も評価される。これは判定部[N]におけるバックグラウンドとテストラインの発色光度を比較し判定結果へ反映する原理に基づいている。また、インフルエンザウイルスをはじめとする感染症では発症後間もない患者の検体では対象となる抗原の量が不十分となり、目視での判定を危険視する報告¹²⁾がある。デンストメトリー分析装置をはじめとする機器判定による検査結果の一般化が求められる。

インフルエンザウイルス抗原キットによる臨床評価試験ではウイルス分離培養で陰性結果が得られた臨床検体のうち、テストラインに陽性値を示す発色反応があった11検体すべてにおい

てBDベリター™システムリーダーで陰性結果が得られた。914検体中、その頻度は1.2%であった。成分分析の結果からはHAMAをブロックするTRU Block™の添加の有無により反応性が異なることが認められたことから、偽発色の原因の一つとしてHAMAの可能性が考えられた。Two site immunoassayにおける異好性抗体の干渉作用については血中に確認されたHAMAの影響が示唆され、その頻度は1～2%とする^{13),14)}報告と今回の結果は近い値となった。人体内での異好性抗体産生要因としては直接的な外来動物との接触に加え、外来動物細胞を使用した生物製剤の服用または食品添加物の摂取などがあげられる⁶⁾。HAMAに関する報告例としてはまずマウス脳由来の日本脳炎ワクチンがあげられる。1960年代に1000人以上認められた日本脳炎患者数が本ワクチンの接種により1990年代には10人以下となった¹⁵⁾背景からも、その日本での使用数は広範囲に及ぶことが伺える。また、癌治療で活躍する分子標的薬では1980年頃からマウス由来のモノクローナル抗体が使用され¹⁶⁾HAMA発生の一因とされる。特に分子標的薬の活躍する大腸癌 (colon cancer) や皮膚癌 (melanoma) の治療では幅広く使用されている。

臨床評価では咽頭拭い液におけるインフルエ

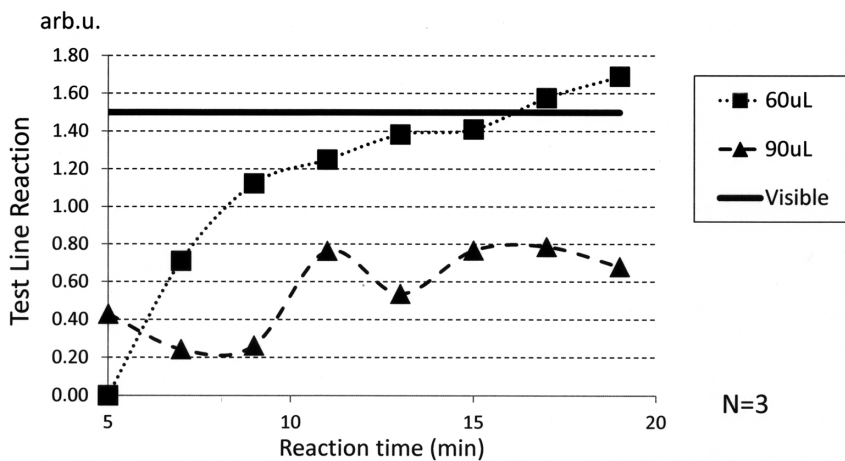


Fig. 3 Cross reaction environmental enhance factors
 Cross reaction was evaluated by pH condition and reaction time. ■ indicates lower volume of GAS1 reagent was added to samples. ▲ indicates proper volume of GAS1 reagent was added to samples.
 Visible line indicates test line signal acceptable for visually reading.

生物試料分析

Table 2 Discrepancy between visual test line and culture result

Specimen	Flu Type	Test line (+), Culture (-), Reader (-)
Nasopharyngeal Swab	Type A	1/190
	Type B	0/106
Nasal Aspirates	Type A	2/100
	Type B	1/99
Throat Swab	Type A	5/213
	Type B	2/206
Total		11/914

The proportion of visual test line with positive signal from culture negative results. Veritor System Reader showed negative results with the specimen of discrepancy, which agrees with culture result. The total number was 11.

Table 3 Negative results agreement between Veritor System Reader and Culture assay

	Flu A	Flu B	Flu A or B
Nasopharyngeal Swab	99.0% (190/192)	97.2% (106/109)	98.3% (296/301)
Nasal Aspirates	95.2% (100/105)	99.0% (99/100)	97.1% (199/205)
Throat Swab	93.8% (213/227)	99.5% (206/207)	96.5% (419/434)

The specificity of Veritor System Reader was compared with Culture assay. Throat swab showed lower specificity than other specimen, especially against Flu A antigen.

インフルエンザウイルスA型の判定で非特異反応におけるテストラインの発色の頻度が多かった (Table 2)。この一部の判定結果に関してはBDベリター™システム Fluの持つ判定部[N]の機能により改善の見られるものもあるが、依然としてウイルス分離培養法と不一致となる結果もあった (Table 3)。この不一致の割合は他検体種に比べても多いことから、咽頭拭い液に特有の原因物質がある可能性が考えられた。この点に関しては今後の改善が求められる。インフルエンザウイルスキットに推奨される検体として咽頭拭い液は検出感度が低いことから鼻腔ぬぐい液及び鼻腔吸引液が推奨されている¹⁷⁾。BDベリター™システムFluでは特異度の観点から見ても咽頭拭い液より鼻腔ぬぐい液および鼻腔吸引液が推奨される。一

方、臨床試験で得られたインフルエンザウイルスA型及びB型の両陽性の症例は4件あった。この内、1件は核酸増幅法により真の両陽性であることが確認された。他3例はインフルエンザウイルスB型がウイルス分離培養法で同定されたが、インフルエンザウイルスA型は陰性であった。このことから、BDベリター™システムFluで得られたインフルエンザウイルスA型及びB型の両陽性の結果に関してはいずれかのインフルエンザウイルスに感染している可能性が示唆される一方で、今回の症例のようにインフルエンザウイルスA型で非特異反応を起こしている可能性も否定できない。このようなケースに関しては他検査法や臨床症状と比較の上、慎重な診断が求められる。

抗原抗体反応に基づく検査キットでは交差反応による偽陽性の一因も考慮しなければならない。異好性抗体では検査キットで使用される抗体が異好性抗体の抗原として認識されることが非特異反応の原因となったが、交差反応の場合は検査キットで使用される抗体が抗体として働く。すなわち、本来の検査対象の抗原とは異なるが似た構造を持つ抗原と反応してしまうものである。特にポリクローナル抗体では複数種の抗体が混在するため、予期せぬ抗原と反応し交差反応を起こす確率がモノクローナル抗体に比べ高くなる。また、ポリクローナル抗体の作製にはその由来動物の個体差に影響されることもあり、生産プロセスの違う他社製検査キットでは同じ動物由来のポリクローナル抗体を使用したものでも、異なる交差反応試験の結果が得られる可能性もあり注意が必要である。

このような背景の中、今回A群ベータ溶血連鎖球菌抗原キットの評価試験を行った。本キットでは主としてウサギポリクローナル抗体が検査キットに用いられるが、本キットによる偽陽性の報告は多く、施設によってはイムノクロマト法より培養法で同定検査を行うことを主流とするところもある。BDベリター™システム Strep Aの交差反応試験によれば本キットに使用したウサギポリクローナル抗体では*Staphylococcus aureus*に対し交差反応が確認された。この時の菌量は 1×10^8 CFU/mLであった。一方、テストラインでは発色反応は確認されるものの、BDベリター™システム リーダーでは陰性結果が表示された。これはBDベリター™システム Strep Aの持つ判定部[N]の機能によりテストラインの発色反応を偽発色としてリーダーが認識したこと起因する。一方、*Staphylococcus aureus*を初めとするテストラインの偽発色に影響を及ぼす因子が過剰に加えられた検体に対してはBDベリター™システム リーダーではエラー表示（コントロール エラー#02）される。これは検体が過剰に抽出試薬へ加えられたことを意味するため、検体の取り直し、または希釈を行い再検査する必要があった。

今回確認された*Staphylococcus aureus*によるウサギポリクローナル抗体の交差反応はGAS試薬1の添加不十分のコンディション（弱酸性）では促進が見られた。A群ベータ溶血連鎖球菌抗

原キットでは検体を抽出試薬へ添加する直前に亜硝酸ナトリウムと酢酸を混合し、生じた亜硝酸によってA群ベータ溶血連鎖球菌のC多糖体を抽出する。これは主としてテストラインにおける抗原抗体反応に貢献されるが、今回の検討では特異性向上にも寄与することが示唆された。また、BDベリター™システム Strep Aでは試料をテストプレートへ添加後5分で判定を行うが、この所定の時間を超過するほど交差反応が顕著に促進され、経時的に非特異反応が起こりやすくなることも同時に示唆された。*Staphylococcus aureus*をはじめとする交差反応には抗原抽出過程が影響されるとする報告¹⁸⁾もあることから、今回の結果もふまえ、今後さらなる検討が必要である。

現在市販のtwo site immunoassay法を主原理とする検査キットでは非特異反応を抑える様々な工夫がされている。例えば、ELISA法ではHAMAに結合能を示す物質を予め試薬に添加すること¹⁹⁾で、非特異反応を防止するTRU Block™をはじめとするブロッキング試薬がいくつか販売されている。イムノクロマト法による検査キットでは早期診断を必要とする医療現場で幅広く活用されている背景から高感度な検査キットが求められているが、高感度を追求する一方で、いかに特異性を維持できるかが今後の課題となる。

文献

- 1) 金井 正光, 奥村 伸生: 臨床検査法提要 第32版, 37-38, 金原出版株式会社, (2005)
- 2) 徳野 治, 藤原 美樹 他: 各種インフルエンザ迅速診断キットの評価. 感染症学雑誌, 83: 525-533, 2009.
- 3) 三田村 敬子, 菅谷 憲夫: インフルエンザの診断と治療 第56巻, 第1号, pp.109-116, ウイルス (2006)
- 4) 国立国際医療センター: インフルエンザ対応マニュアル 第6-2版, pp.8, (2006)
- 5) 島田 美樹, 眞野 成康: 臨床現場に貢献する分析科学, ふんせき, 10: 502-505, 2010.
- 6) Kricka L: Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays. Clin Chem, 45: 942-956, 1999.
- 7) US Department of Health and Social Services. Food and Drug Administration: Review criteria for assessment of professional use human chorionic gonadotropin (hCG) in vitro diagnostic devices (IVDs). Washington, DC:

- Department of Health and Social Services, 1996.
- 8) US Department of Health and Social Services: Review criteria for assessment of rheumatoid factor (RF) in vitro diagnostic devices using enzyme-linked immunoassay (EIA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), particle agglutination tests, and laser and rate nephelometry. Washington, DC: Department of Health and Social Services, 1997.
 - 9) Fiacco V, Bryson Y: Comparison of Monoclonal and Polyclonal Antibody for Confirmation of Cytomegalovirus Isolates by Fluorescent Staining. *J Clin Micro*, 19: 928-930, 1984.
 - 10) 光野 典子, 幡 智宏: A群レンサ球菌迅速診断キットの基礎的検討. *感染症学雑誌*, 80: 665-673, 2006.
 - 11) Ding J, Wang P: Methods for the Rapid Screening of Group A Streptococci: Fluorescent in situ Hybridization versus Immunochromatography. *Med Princ Pract*, 20: 504-508, 2011.
 - 12) 山口 育男, 西村 秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ペリター システム Fluにおける機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. *日本臨床微生物学雑誌*, 23: 39-44, 2013.
 - 13) Mossner E, Leng H: Elimination of heterophilic antibody interference in monoclonal sandwich tests. *Clin Chem*, 36: 1093, 1990.
 - 14) Yang X, Ji H, et al.: Detection and Elimination of Interference by the Heterophilic Antibody in Antibody Microarray-Based Immunoassay. *Clin Chem*, 57:527-529, 2011.
 - 15) 倉根 一郎: マウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンの評価. *ウイルス*, 55: 307-312, 2005.
 - 16) Grossman HB: Clinical applications of monoclonal antibody technology. *Urol Clin North Am*, 13: 465-474, 1986.
 - 17) 厚生労働省医薬食品局安全対策課: インフルエンザウイルス抗原の検出を目的とする体外診断用医薬品の自主点検結果及び適正使用について No.194-2, 医薬品・医療用具等安全性情報, (2003)
 - 18) Facklam R: Specificity Study of Kits for Detection of Group A Streptococci Directly from Throat Swabs. *J Clin Micro*, 25: 504-508, 1987.
 - 19) Kragstrup T, et al.: A simple set of validation steps identifies and removes false results in a sandwich enzymelinked immunosorbent assay caused by anti-animal IgG antibodies in plasma from arthritis patients. *Springer*, 263: 1-10, 2013.