

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560775

研究課題名（和文） インフルエンザウイルスの迅速判定を可能にする新規手法の開発

研究課題名（英文） Development of novel method to rapidly decide influenza infection

研究代表者

江頭 直義（EGASHIRA NAOYOSHI）

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：90094060

研究成果の概要（和文）：新型インフルエンザの出現は人類生存の脅威となっている。迅速判定のために電解発光法とリポソーム（細胞膜からなる小さな入れ物）を組み合わせた新規手法を検討した。リポソームの調製法、リポソームの中に入れる発光物質であるルテニウム錯体の合成、測定操作の最適化を通して測定精度の向上に成功した。インフルエンザウイルスを測定し、70分の操作で数100粒子のウイルスあれば検出できることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Appearance of new influenza has threatened the life of human. In order to rapidly decide the infection, we researched novel method combining electrochemiluminescence (ECL) with a liposome, a small vesicle consisting of cell membrane. We have successfully enhanced the precision of the ECL data by optimizing the liposome preparation and the detection procedure, and by preparing chemiluminescent ruthenium complexes encapsulated in the liposome. Consequently, we have detected the virus of hundreds of particles by 70-min measurement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：インフルエンザ、ウイルス、電解発光、イムノリポソーム、迅速判定

1. 研究開始当初の背景

急速な地球温暖化や自然破壊にともない様々な新種の病原性ウイルスが出現しては大きな人的被害をもたらしており、人類生存の脅威となっている。そのため特に大流行の

恐れるあるインフルエンザウイルスを迅速に検出し、予防する体制を確立することが重要である。しかし現在の迅速判定法として使用されているELISA法の感度は不足しているため、感染していても陰性になる恐れがあり、

また感染初期のウイルスが少ないときには判定困難である。その他、従来法の血清学的方法やウイルス分離検査もあるが、測定には長時間を要し、迅速判定には向かない。さらに、最近では、ナノ粒子を用いた電気化学的方法や光散乱法など新たな方法が提案されているが、まだ十分な感度ではない。そのため新たな迅速高感度検出法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

我々は電解発光法とイムノリポソームを組み合わせた新規手法を提案し、インフルエンザウイルス表面タンパクのヘマグルチニンについてアットモル(attomol)レベルの高感度検出を報告している。この方法は、リポソーム内に発光物質であるルテニウム錯体を高濃度に内包し、抗原抗体反応の後、リポソームを破壊する。漏れ出したルテニウム錯体を電気分解し、生じた発光を検出することにより感度増幅している。この検出手法を利用してごく少数(数100粒子)のインフルエンザウイルスを検出する手法を確立し、早期感染の迅速判定に役立てることを目的とする。実用性を高めるためには検出操作の簡便化と信号の精度向上が求められる。

3. 研究の方法

(1)イムノリポソーム調製法の確立：リポソーム材料の脂質の鎖長を変化させて内包率の向上について検討した。使用した脂質材料は、ホスファチジルコリン(PC、 $10\mu\text{M}$)のアシル鎖長C12、C14、C16であり、コレステロール($2.5\mu\text{M}$)を加え、エクストルーダを使用する押し出し法により調製した。ゲルクロマトグラフィーによる精製操作の後、得られたリポソームは光散乱法により粒径を測定した。また、ジセチルリン酸添加物の効果も調べた。

(2)測定操作の最適化：精度向上のためのバックグラウンド発光の低減を図るために各測定操作及び測定のキーとなる金電極表面の自己組織化膜(SAM)の作製を中心に検討した。ジチオジプロピオン酸などのSAM材料の 10mM エタノール溶液に電極を浸漬して調製した。

(3)新規ルテニウム錯体の合成とその性能評価：本検出法では、リポソーム内に発光分子であるルテニウム錯体を高濃度に内包し、漏れだすことなく安定に内包させるリポソームが不可欠である。水溶性が高い種々の側鎖を有する錯体を合成し、それらの発光強度及び溶解性について評価した。さらに他の錯体についても検討した。

(4)ウイルス検出の感度向上：最適化した測定条件下でタンパクあるいは不活性処理したインフルエンザウイルスA型(H1N1)を測定した。金電極上のSAMにはヘマグルチニン部分ペプチド TGLRNGITNKVNSVIEKAA (19mer, MW 2105.30)を化学結合した。リポソーム表面にはウイルス抗体を結合したイムノリポソーム(図1)を調製した。

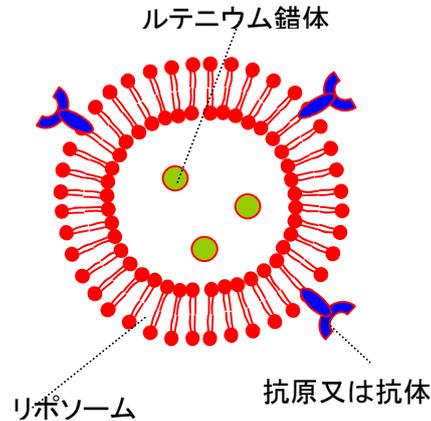


図1 修飾リポソーム

4. 研究成果

(1)イムノリポソーム調製法の確立：脂質材料PEのアシル鎖を長くしたリポソームのルテニウム錯体の内包率は、C16で最大であり、C12の8倍以上に増加し、安定に内包することを見出した(図2)。それらのリポソーム粒径は90nmであった。さらに、このリポソームにジセチルリン酸を加えると内包率がさらに向上し、 $4\mu\text{M}$ の添加で未添加と比較して6倍に大きく向上するのが認められた。

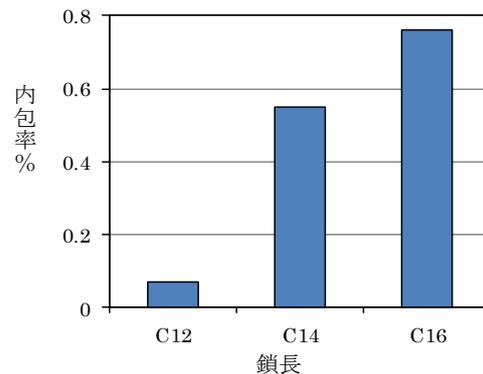


図2. 内包率に及ぼす鎖長の効果

(2)測定操作の最適化：ヘマグルチニンペプチドを結合した電極上に既知濃度ウイルスとイムノリポソームを加えて抗原抗体反応した。リン酸緩衝液で2

回洗浄し、金電極上のリポソームをエタノールで破壊した後、印加電圧+1.2V測定するのが最適であった。金電極上のSAMの作製では、これまでジチオジプロピオン酸のみを使用していたが、被覆率の安定性が十分でなかった。しかし、本研究では、少量の有機物を添加し、被覆率向上を図った。電極上のSAMにフェロセンを化学結合し、電気化学的手法（CV法、図4）によりフェロセンの電気量を評価した。この結果より添加物濃度1%においてほぼ100%の被覆率で達成できた。このSAM修飾電極を使用するとバックグラウンドシグナル強度が1/5に低下することが確認され、検出精度を向上できると期待される。

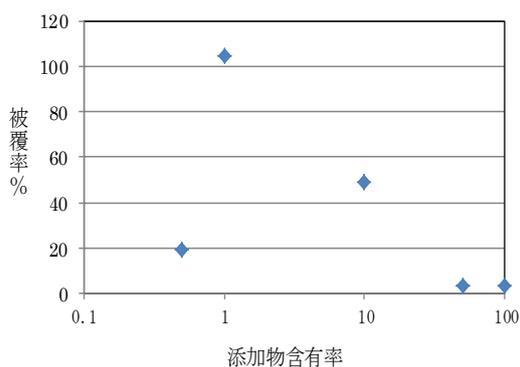


図3. 被覆率に及ぼす添加物の効果

(3) 新規ルテニウム錯体の合成とその性能評価：水溶性を強化するための側鎖を導入した錯体の2種類を合成した(図4)。錯体の合成ステップは、ジカルボン酸を有する錯体を合成し、Z修飾テトラメチレンジアミン(C4)を導入し、その後Z基を除いて目的生成物を得た。その水溶性は市販のトリスビリジンルテニウム錯体と比較して向上したが、発光強度は30%程度であった。C3についても合成したが、その溶解性及び発光強度は同程度であった。予備実験としてBSAタンパクの検出に適用したが、感度の向上は認められなかった。その他の錯体を用いてリポソームを調製し、内包率を測定した。

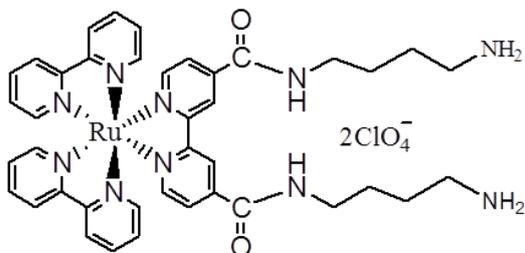


図4. 水溶性ルテニウム錯体の例

(4) ウイルス検出の感度向上：

以上の最適条件下でインフルエンザウイルス(H1N1)を測定するとシグモイド様の応答が得られ、数100粒子のウイルスが70分で判定できることが分かった。これまでの検出操作による結果と比較してバックグラウンド発光が減少し、精度の向上が認められた。

実用化のためには、医療現場で利用できるように測定操作のさらなる簡易化、装置の低コスト化が求められる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

- ① 江頭直義、山本剛士、猪谷富雄、三苦好治、宇田泰三、A flow-through electrochemiluminescence sensor for salt stress on rice plants, Analytical Sciences, 査読有, 26, 371-373 (2010).
- ② 江頭直義、一二三恵美、イムノリポソームを用いたインフルエンザウイルスの高感度検出法、ぶんせき、査読無、25-27 (2010).

〔学会発表〕(計 7件)

- ① 大木充幸、三苦好治、宇田泰三、江頭直義、イムノリポソームと電解発光を組み合わせた新規タンパク検出法の展開、第47回化学関連支部合同九州大会(北九州)2010, 7, 10
- ② 大内達也、三苦好治、宇田泰三、江頭直義、リポソーム内包率と電解発光強度に与える脂質組成の影響、第47回化学関連支部合同九州大会(北九州)2010, 7, 10
- ③ Masaharu Murakami, Tomonari Kasai, Masashi Okada, Arun Vaidynath, Katsuhiko Mikuni, Naoyoshi Egashira, Masaharu Seno, Hiroki Hamada, Trastuzumab conjugated immunoliposome loading glycosylated Paclitacel, AACR in Cancer Research (California, USA), 2011, 1, 30.
- ④ 江頭直義、Sensitive and rapid detection of influenza virus by electrochemiluminescence combined an immunoliposome, 14th Asian Chemical Congress (Bangkok, Thailand) 2011. 9. 6
- ⑤ 江頭直義、三苦好治、界面活性剤によるリポソーム破壊の電解発光による評価、日本化学会第92春季年会(横浜市)2012. 3. 26
- ⑥ 井口佳哉、三苦好治、江頭直義、イムノリポソームを用いる電解発光によるインフルエンザウイルス検出、日本化学会第

92 春季年会（横浜市）2012. 3. 26

- ⑦ 江頭直義、三苦好治、農薬チアベンダゾールの電解発光による選択検出、日本化学会第 93 春季年会（草津市）2013. 3. 24

〔図書〕（計 1 件）

- ① 江頭直義、阪口利文、バイオチップ実用化ハンドブック、エヌ・ディー・エス（2010）pp74-80.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 直義 (EGASHIRA NAOYOSHI)
県立広島大学・生命環境学部・教授
研究者番号：90094060

(2) 研究分担者

西本 潤 (NISHIMOTO JUN)
県立広島大学・生命環境学部・准教授
研究者番号：80253582

(3) 連携研究者

宇田 泰三 (UDA TAIZO)
大分大学・工学部・教授
研究者番号：20232837