

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420800

研究課題名(和文)無機錯体を内包するナノ球体リポソームを用いるウイルスの高感度電気化学検出

研究課題名(英文)Highly sensitive electrochemical detection of influenza virus with nanosphere liposome encapsulating an inorganic complex

研究代表者

江頭 直義 (egashira, naoyoshi)

県立広島大学・生命環境学部・名誉教授

研究者番号：90094060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高濃度(0.4M)のフェロシアン化カリウムを内包するイムノリポソームと電気化学検出を組合せた、インフルエンザウイルスの新規高感度検出を創案した。まず高濃度のリポソーム作成条件検討し、高濃度のフェロシアン化カリウムを一か月以上安定に内包することを認めた。続いて、このリポソームを用いてイムノリポソームを調製し、マイクロプレート上で牛血清アルブミンの検出操作を実施し、ブロッキング過程を省いても検出できることを見出した。インフルエンザウイルスについては、全検出操作時間20分以内で 1×10^4 PFU/mLの定量が可能であることを明らかにした。今後、本法の実用化が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a biosensor combining electrochemical detection with an immuliposome that encapsulates high concentration (0.4M) of potassium ferrocyanide. The liposome stably encapsulated the complex in over one month. Then we found that our method using a microplate enabled to detect BSA protein: interestingly the method does not need blocking procedure. Finally we successfully detected influenza virus of 1×10^4 PFU/mL within 20 min with our method that can be expected to be practically utilized.

研究分野：工学

キーワード：バイオセンサ 内包 H1N1 リポソーム インフルエンザウイルス 電気化学検出 フェロシアン化カリウム 抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 新種の病原性ウイルスの出現は甚大な人的被害をもたらし、人類生存の脅威となっている。大流行の恐れのあるウイルスを迅速に検出する手法を創製することは予防体制を確立する上で欠くことができない。インフルエンザウイルスを例にすると、現行の迅速判定法の他に、PCRによるDNA検出(文献1)、光散乱による粒子検出法などが提案されているが、感度、検出時間に一長一短がある。従って、基質特異性の高い抗体を使用する方法は信頼性が高く、さらに発展させることが望ましい。

(2) 抗体を使用するタンパク検出法として、発光性のナノ微粒子の使用、ラベル化したモノクロナール抗体を使用したRu錯体の電流応答を検出する方法など様々な高感度検出法が報告されている。実用化の観点からそのような手法は特別なナノ材料や複雑な化学修飾をしたタンパクを必要とするため全体の検出操作が複雑になり、また高コストになると判断される。実用化するためには従来物質を十分活用したスリムな分析系を開発することが望まれる。

2. 研究の目的

(1) 現行のインフルエンザウイルス感染の迅速判定には数十万粒子のウイルスが必要であり、感度が不十分である。(測定時間20~30分)特に感染初期のウイルス数が少ないときは検出困難である。本研究では、電気化学活性種を高濃度に内包したリポソームを活用して数千PFU/mL(ウイルス数に相当の単位)のウイルスを30分程度で検出することを目的とする。

(2) 申請者Ru錯体を内包するリポソームと電解発光分析を利用したウイルスの高感度検出を検討してきた。しかし、装置は光電子増倍管のために光学系のスペースを確保する必要があり、小型化が困難であった(文献2)。電気化学活性種としてフェロシアン化カリウム(FK)を高濃度に内包したリポソームが調製できれば、電気化学検出が利用できるのでは問題点が解決できると予想される。これまで0.1M以上の錯体を内包して利用した報告は見当たらないので、リポソームの調製法から検討し、最終的にはウイルスの迅速判定に利用できる分析系を確立する。

3. 研究の方法

(1) イムノリポソームの調製: ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン及びコレストロールを含むクロロホルム/メタノール溶液をナス型フラスコに入れ、減圧乾燥し、脂質フィルムを形成した。0.2M FK水溶液1cm³を脂質フィルムに加えた後、温浴上でボルテックスした。得られた溶液をエクストルーダー(ポアサイズ50nm)に窒素加圧で10回通した。この溶液をゲルろ過クロマトグラフィー(Sephadex G-50)に通して分画し、必要なフラクションを回収し濃縮してリポソームを得た。次に、提供されたインフルエンザウイルス抗体を架橋剤SPDPと結合し、透析した。この修飾抗体をDTTで還元した後、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephadex G-25)に通して活性化抗体を得た。最後に、活性化抗体とリポソームを室温、窒素雰囲気下で24時間反応した。この溶液をゲルクロマトグラフィー(Sepharose 4B)に通して遊離抗体を除き、イムノリポソ

ームを得た。

(2)分析操作：マイクロプレートに 10 $\mu\text{g/mL}$ インフルエンザ抗原ペプチド (19 mer : TGLRNGITNKVNSVIEKAA) 溶液 200 μL を加え、冷暗所で一晩静置してコーティングを行った。アスピレーターで溶液を除去した後、PBS 350 μL で 2 回洗浄した。段階希釈した A 型インフルエンザウイルス (H1N1) 溶液 80 μL とイムノリポソーム 20 μL を加えてピペッティングを行った後、30 分、遮光下で 10 分静置した。アスピレーターで溶液を除去した後、PBS 350 μL で 3 回洗浄した。200 ppm TritonX-100 / 0.1 M PB 100 μL を加えた後、イムノリポソームより漏出した FK を電気化学検出器を備えたフローインジェクション分析法を行った。印加電圧は+0.500 V vs. Ag/AgCl、測定温度 30 $^{\circ}\text{C}$ である。

4. 研究成果

(1)電気化学活性種の探索：高濃度の金属錯体を内包させるため、基本的な調製条件を検討した。まず、数種の金属錯体を内包したリポ

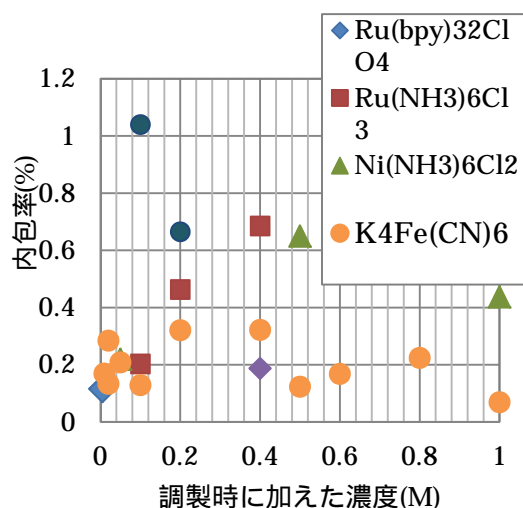


図 1 錯体の内包率

ソームを調製し、内包濃度及び内包率を調べた (図 1)。Ru(bpy)₃ · 2ClO₄、Ru(NH₃)₆ · Cl₃、Ni(NH₃)₆ · Cl₂、Fc(COONa)₂ 錯体は溶解性、酸化電位の観点から除いた。FK が 0.20~0.40M の高い濃度を内包させることが可能であり、40 日経過してもほとんど漏出がなく、強い電気化学応答を示した。

(2)リポソームの破壊：一連の界面活性剤及び有機溶媒の添加によるリポソームの破壊を検討した。その結果、有機溶媒は電気化学の応答に影響を与えるので都合が悪く、界面活性剤の中では 200ppmTritonX-100 の破壊効率が低いことを見出した。

(3)2 成分 SAM (自己集合膜) の調製：検出のために SAM 金電極を使用する可能性があるため、バックグラウンド低減には欠陥の少ない SAM 表面を形成する必要がある。2 成分 SAM について検討すると調製溶液におけるジチオジプロピオン酸及びヘキサチオール濃度比 100:1 で最も欠陥が少なかった。

(4)BSA の検出：代表的なタンパクである BSA (牛血清アルブミン) をマイクロプレー上に固定した後、様々な濃度の検体 BSA と一定量のイムノリポソーム溶液を添加し、抗原抗体反応した。リン酸緩衝液で洗浄後、Triton X-100 溶液を加えた。この溶液をフローインジェクション分析した。

通常マイクロプレートの処理では大きなバックグラウンドの応答が認められ、この原因はタンパクによるブロッキング過程にあることをつきとめた。この過程を除くとバックグラウンドが大きく低減し、良好な信号が得られ、

分析操作時間の短縮に繋がることを見出した。最適化された条件下で、0.01~1 μg/mL の BSA 濃度範囲で典型的なシグモイド応答を得た (図 2)。

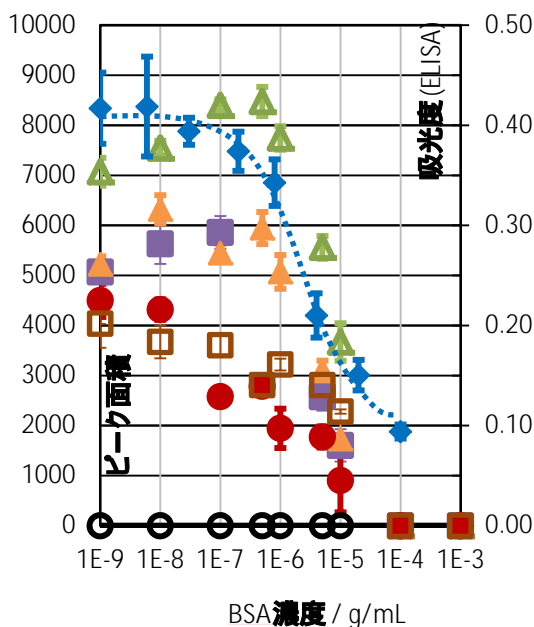


図 2 BSA の検量線

(5)インフルエンザウイルスの検出：
抗原ペプチドにはウイルス表面のヘマグルチニンタンパクの一部を利用し、ウイルスの抗体は共同研究者(大分大学・一二三恵美教授)から提供された。また、ウイルスは頻りに流行する H1N1 型を対象とし、不活性化処理されたものである。これらの材料を用い、段階希釈したウイルスについて検出操作を行うと良好なシグモイド応答が得られた。様々な抗原抗体反応時間について検討すると 10 分でも十分な応答が得られ、全操作時間でも 20 分以内での検出を実現した。1x 10⁴ PFU/mL のウイルスがあれば検出可能であり、この結果は現行の迅速判定法に匹敵さらに凌駕するもので

ある。本研究の目的はほぼ達成できたので、今後、抗体及び検出操作の改良によりインフルエンザウイルスの新しい早期判定法としての実用化が期待される。

<引用文献>

- Famis L.R., Wu N, Wang W, Clanizia L-JA, Wang X, McDonald MJ, *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 396;396-74.
Egashira N, Morita S, Hifumi E, Mitoma Y, Uda T, *Anal. Chem.* 2008;80;4020-5.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

片山裕美、大木孝行、三苦好治、一二三恵美、江頭直義

Detection of influenza virus by a biosensor based on the method combining electrochemiluminescence on binary SAMs modified Au electrode with an immunoliposome encapsulating Ru(II) complex, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読有, 408, 2016, pp5963-5971
DOI: 10.1007/s00216-016-9587-8

[学会発表] (計 4 件)

片山裕美、三苦好治、江頭直義、2成分 SAM 膜電極上におけるイムノリポソーム / 電解発光によるインフルエンザウイルスの検出、第 95 回日本化学会春季年会、2015 年 3 月 26 日、日大理工 (舟橋キャンパス)
中西莉子、稲毛咲矢香、三苦好治、江頭直義、フェロシアン化カリウム内包イムノリポソームを用いる電気化学検出によるタンパクの迅速定量、日本化学会第 96 回春季年会、2016 年 3 月 24 日 (同志社大学京田辺

キャンパス)

片山裕美、三苦好治、一二三恵美、江頭直義、Detection of influenza virus by an immunosensor combining liposome and electrochemiluminescence on Au electrode modified with binary self-assembled monolayers, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015年12月17日 (Hawaii)

(2)研究分担者 なし

中西莉子、臼井ありさ、三苦好治、一二三恵美、江頭直義、フィロシアン化カリウム内包イムノリポソームと電気化学検出を組み合わせたインフルエンザウイルスの迅速定量、日本化学会第97回春季年会、2017年3月16日(慶応義塾大学日吉キャンパス)

[産業財産等]

○出願状況(計1件)

名称：被検物質の定量方法

発明者：江頭直義、三苦好治

権利者：公立大学法人県立広島大学

種類：特許

番号：2016-044902

出願年月日：2016年3月8日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等 なし

http://

6. 研究組織

(1)研究代表者

江頭 直義 (EGASHIRA, Naoyoshi)

元県立広島大学生命環境学部 名誉教授

研究者番号：90094060