

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760370

研究課題名（和文） 誘電泳動インピーダンス計測と抗原抗体反応を用いたウイルス検出法の開発

研究課題名（英文） Development of new virus detection method using dielectrophoretic impedance measurement and antibody-antigen reaction

## 研究代表者

中野 道彦（NAKANO MICHIIHIKO）

九州大学・システム情報科学研究院・助教

研究者番号：00447856

## 研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、ウイルスを電気的に検出するシステムの開発である。近年、インフルエンザウイルスやノロウイルス等の様々なウイルスの突発的な流行があり、その迅速な検出法が求められている。本研究では、そのために、細菌を電気的に検出する手法である誘電泳動インピーダンス計測法を応用した。この方法は、検出液を調製した後は、全て電気信号で操作できるため、自動化が可能で安全・簡便な操作を可能にする。ノロウイルスを対象に、検討を行ったところ、既存の迅速検出法のひとつであるイムノクロマト法と同程度の検出感度で検出できた。

## 研究成果の概要（英文）：

Aim of this research was to develop a new virus detection method controlled by electrical operation. Since outbreaks of several viruses, for example influenza virus and norovirus, suddenly occur in worldwide, its rapid detection method has been strongly required. It was proposed that the method using dielectrophoretic impedance measurement method. The method will realize a method of fast and safe operation because it is operated electrically. Investigation using norovirus as a target virus revealed sensitivity of this method was similar to immunochromatography.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,00	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電気工学・計測工学

キーワード：センシングデバイス、誘電泳動、インピーダンス計測、ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルスは様々な病気や食中毒をもたらす原因であり、空気や水環境中から迅速に検出する方法は現代社会では必要不可欠なものである。これらの検出法には、古典的な培養法を始め、核酸（遺伝子）を検出するPCR法や抗体を用いた免疫法などがある。さらに、近年では微細加工技術を利用したMEMSや $\mu$ TASといった技術分野で少量・省スペースな検出法が検討されている。そのような状況下で、誘電泳動現象を利用して懸濁液中の細菌を微細電極ギャップに捕集し、その捕集によって生じる微細電極間のインピーダンス変化を測定する誘電泳動インピーダンス計測法 (Dielectrophoretic Impedance Measurement, DEPIM法) を研究している。図1にDEPIM法の原理を示す。誘電泳動による細菌捕集は、国内外を問わず様々な研究者によって行われているが、DEPIM法は、そこにインピーダンス計測を組み合わせた点に特徴がある。DEPIM法は細菌を迅速かつ高感度・定量的に検出でき、さらに電気装置の操作は自動化可能で操作を簡便にできるという利点がある。そこで、DEPIM法をウイルス検出に応用することを考えた。

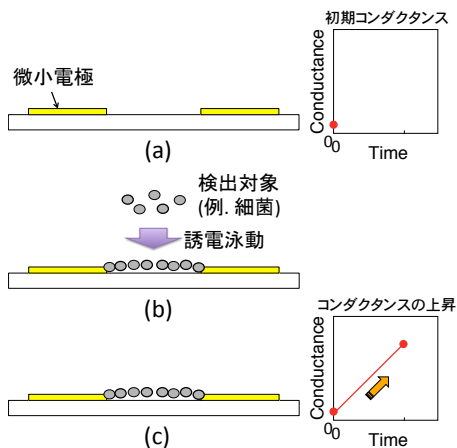


図1 DEPIM法の原理

## 2. 研究の目的

従来のDEPIM法は、専ら細菌検出のみを応用対象としており、ウイルス検出は全く行われていなかった。これは、ウイルスが細菌に比べて非常に小さい（数十～数百分の一）こと、およびその誘電泳動特性がほとんど分かっていないためである。

本研究の目的は、DEPIM法を応用して、ウイルスを電氣的に検出するシステムを開発

することである。このシステムでは、ウイルスを微細電極間に電氣的（誘電泳動）に捕集し、その捕集に伴うインピーダンス変化を利用してウイルスを検出する。本研究の結果として、安価で自動化可能なウイルス検出システムの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

検出対象をウイルス性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスとし、その組換えウイルスキャプシド（無毒化ウイルス）を利用して、DEPIM検出可能かどうかを確かめた。

(1) ノロウイルスの誘電泳動特性の調査  
DEPIM法は対象を誘電泳動力によって微細電極間に捕集して、その捕集に伴う電極間のインピーダンス変化を計測する。そこで、微細電極（電極間距離：5  $\mu$ m）を用いて、ノロウイルスがどのような条件において誘電泳動可能であるかを、溶媒の導電率と印加電圧の周波数をパラメーターに確かめた。ノロウイルスキャプシドを蛍光色素で修飾して、種々の濃度の塩化ナトリウム溶液に懸濁して、微細電極上に滴下し、交流電圧（5 V<sub>PP</sub>）を印加した。

(2) ノロウイルスのDEPIM検出  
次に、ノロウイルスキャプシドを用いてDEPIM測定を行った。DEPIM測定には、櫛歯型微細電極（電極間距離：5  $\mu$ m）に、ファンクションジェネレータから100 kHz、5V<sub>PP</sub>の交流電圧を印加した。シャント抵抗を介して電流をロックインアンプにより検出し、微細電極間のインピーダンス変化を計測した。ノロウイルスキャプシドは、イオン交換水に懸濁し、シリンジポンプによって送液した。実験装置の概略図を図2に示す。微細電極への送液速度およびノロウイルスの濃度を変化させて、その検出感度について検証した。

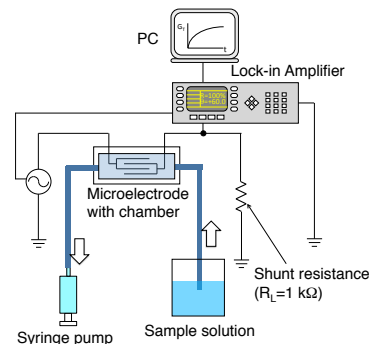
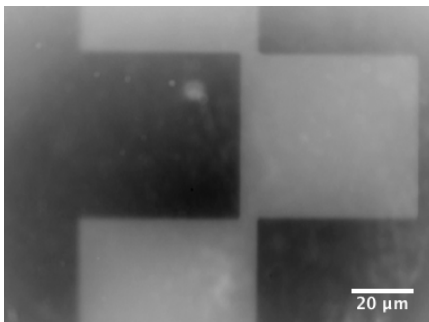


図2 DEPIM法の実験装置

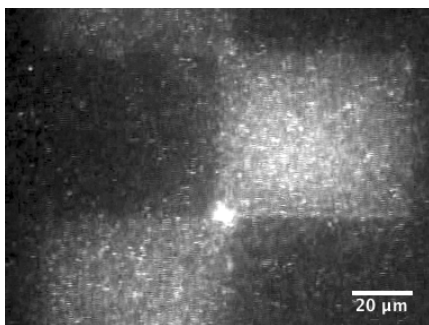
#### 4. 研究成果

##### (1) ノロウイルスの誘電泳動特性の調査

図3に誘電泳動によって、微細電極間に蛍光染色ノロウイルスキャプシドが捕集されている様子を示す。このように、ノロウイルスが誘電泳動によって、電極間距離が最も短い部分(=高電界部)に捕集されることが観察された。そして、そのノロウイルスの誘電泳動特性について調べたところ、懸濁液の導電率が約 0.01 S/m 以下であれば、正の誘電泳動、すなわち誘電泳動による捕集が可能であることがわかった。



(a)



(b)

図3 蛍光修飾ノロウイルスキャプシドの誘電泳動捕集  
(a) 捕集前、(b) 捕集後

##### (2) ノロウイルスのDEIPM検出

ノロウイルスのDEIPM検出の結果を図4および図5に示す。それぞれDEIPM検出部(微細電極)への送液速度が、50  $\mu\text{l}/\text{min}$ と5  $\mu\text{l}/\text{min}$ である。ノロウイルスは、細菌と同じように、誘電泳動捕集に伴って電極間のインピーダンスを変化させ、それを電気的に検出可能であることが示された。また、その検出感度は、流速 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  であれば 2.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、流速 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  にすると 2.5  $\text{pg}/\mu\text{l}$  であった。この検出感度は、迅速検査法のひとつであるイムノクロマト法とほぼ同程度であった。一方で、夾雑物に対してどのように対応するかが課題として残った。

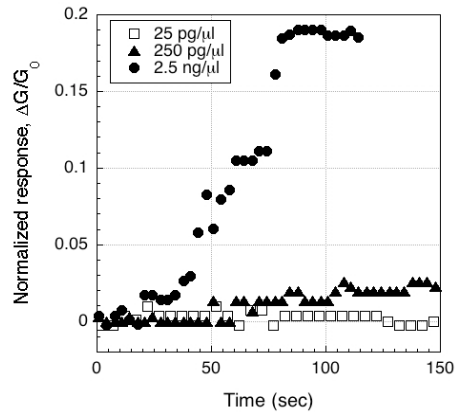


図4 ノロウイルスキャプシドのDEIPM応答  
(流速: 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ )  
それぞれ、2.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (●)、250  $\text{pg}/\mu\text{l}$  (▲) および 25  $\text{pg}/\mu\text{l}$  (□)。

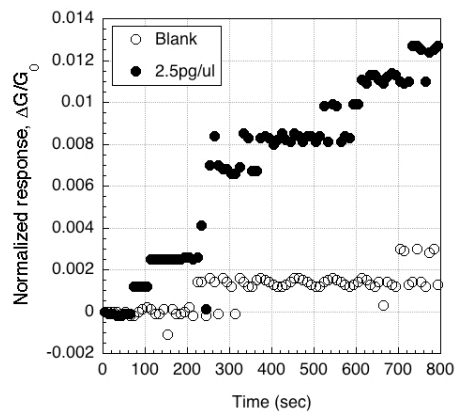


図5 ノロウイルスキャプシドのDEIPM応答  
(流速: 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ )  
それぞれ、2.5  $\text{pg}/\mu\text{l}$  (●) ブランクサンプル (○)。

#### 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 5 件)

1. R. Hamada, H. Takayama, Y. Shonishi, L. Mao, M. Nakano and J. Suehiro, "A rapid bacteria detection technique utilizing impedance measurement combined with positive and negative dielectrophoresis," Sens. Actuators B: Chem., 181, 439-445, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.snb.2013.02.030
2. M. Nakano, T. Hisajima, L. Mao and J. Suehiro, "Electrical detection of norovirus capsid using dielectrophoretic impedance measurement method," Proc. 2012 IEEE Sensors, 469-471, 2012. (査読有) DOI: 10.1109/ICSENS.2012.6411163

[学会発表] (計 22 件)

1. M. Nakano, L. Mao, T. Hisajima, H. Morgan and J. Suehiro, "Observation of dielectrophoresis of norovirus capsid," 2013 International symposium on information science and electrical engineering, 2013年1月11日, Fukuoka.
2. M. Nakano, T. Hisajima, L. Mao, J. Suehiro, "Electrical detection of norovirus capsid using dielectrophoretic impedance measurement method," IEEE Sensors 2012, 2012年10月28日～31日, Taipei, Taiwan.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

九州大学 末廣研究室 ホームページ :  
<http://hv.ees.kyushu-u.ac.jp/Lab-j/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野 道彦 (NAKANO MICHIHIKO)

九州大学・システム情報科学研究院・助教  
研究者番号：00447856

### (2) 研究協力者

末廣 純也 (SUEHIRO JUNYA)

九州大学・システム情報科学研究院・教授  
研究者番号：70206382