

研究テーマ：電解発光に基づくウイルス及びタンパクの迅速検出法の開発

研究代表者（職氏名）：教授・江頭直義

連絡先 庄原市七塚町 5 6 2 生命環境学部
(E-mail 等) : negasira@pu-hiroshima.ac.jp

共同研究者（職氏名）：准教授・西本 潤

1．はじめに

インフルエンザの世界的な流行を迎え、その迅速検出法の開発は非常に重要である。本研究では、我々が開発した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使用してウイルスの迅速検出を検討し、昨年の成果として数 100PFU/mL ウイルスを 90 分程度で検出することに成功した。今年度も、この検出操作によりほぼ同様な検出感度を達成し、他の型のインフルエンザに対する応答及び異なる抗体を用いるイムノリポソームによる応答を検討した。本手法は、様々なウイルスあるいはタンパクにも適用できるので幅広い展開が期待できる。

2．イムノリポソームの調製

ホスファチジルコリン・ジパルミトイル、ホスファチジルエタノールアミン・ジパルミトイル（SPDP 修飾）及びコレステロールを膜材料として押し出し法によりルテニウム錯体を内封したリポソーム（粒径約 80 nm）を調製した。続いてインフルエンザウイルスのヘマグルチニン抗体を SPDP 修飾し、ジチオスレートで活性化した。この抗体（A 型 H1）をリポソーム表面に化学結合した後、ゲルクロマトグラフィー(Sepharose 4B)で精製し、イムノリポソーム（図 1）を得た。

3．インフルエンザウイルス検出法

ピラニア液で前処理した金電極基盤にジチオジプロピオン酸の SAM を形成した後、表面カルボキシル基を活性化し、ウイルス抗原ペプチドを化学結合した。この電極上に、希釈したウイルス(不活性化処理済)、続いてイムノリポソームを加え 4 1 時間抗原抗体反応した。

電極表面に結合していない成分を除くためにリン酸緩衝液で電極を洗浄した。

電極上のリポソームを破壊するためにエタノールの加え、60 5 分間加熱した。

電極を洗浄後、電解液（トリエチルアミン TEA + 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)）を加え、電圧を印加（1.3 V vs. Au）し、発光を観測した。

4．インフルエンザウイルスの測定

バックグラウンド発光を抑えるために検出操作における金電極表面上の SAM 形成及びそのタンパク結合過程の検討を行い、最適な反応温度及び反応時間を検討した。

その後、A/H1 型に対する抗体を結合したイムノリポソームを使用し、種々のウイルスを測定した。その結果、A/Beijing/262/95(H1N1)については、数 100PFU/mL ウイルスの検出が

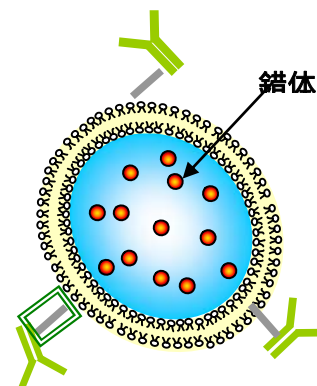


図 1 イムノリポソーム

可能であり、この感度は ELISA の結果と比較して 100 倍以上高感度であった。他の H1 型については応答が異なり、検出感度が少し低下していた。予想どおり B 型については全く応答が認められなかった。また、A 型 H3 抗体修飾リポソームを調製し、ウイルスに対する応答を調べた。さらに、オスミウム錯体についても従来とは異なる配位子の導入を検討した。

5. まとめ

本検出法は、感度の点では現行の迅速判定法を大きく凌駕しているため、抗原抗体反応時間を最適化し、短時間化を達成すれば大きな展開が期待できる。また、本検出法を実施する装置開発も合わせて進める必要がある。

「平成 20 年度成果発表」【論文・著書】

N. Egashira, S. Morita, E. Hifumi, Y. Mitoma, and T. Uda, Attomole detection of hemagglutinin molecule of influenza virus by combining an electrochemiluminescence sensor with an immunoliposome that encapsulates a Ru complex, *Anal.Chem.*, **80**, 4020-4025 (2008). N. Egashira, T. Hirata, E. Hifumi, T. Ohta, T. Uda, Rapid detection of BSA protein by electrochemiluminescence sensor combining an immunoliposome which encapsulates a Ru complex, *Electrochemistry*, **76**, 579-582(2008). 江頭直義、一二三恵美、宇田泰三、ウイルス 1 粒子の超高感度計測に向けて、*マテリアルインテグレーション*, **21(5)**294-298(2008). 江頭直義、一二三恵美、宇田泰三、*先進化学センサ*、第 3 章第 3 節担当、pp307-311、2008 年 6 月電気化学会化学センサ研究会編(ティー・アイ・シー発行)、N. Egashira, S. Morita, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda, Highly sensitive detection of influenza virus hemagglutinin by lectrochemiluminescence using immunoliposome, *ECS Transactions*, **16(11)**115-121(2008). Y. Mitoma, I. Hashimoto, C. Simion, M. Tashiro, and N. Egashira, Highly mieo-diastriselective pinacol coupling of aromatic aldehydes mediated by Al powder/copper sulfate in water, *Synthetic communications*, **38**, 3243-3250 (2008).

【学会発表】 大田 民、矢隅由紀、宇田泰三、江頭直義、ルテニウム錯体内封イムノリポソームを用いる BSA タンパクの迅速検出、第 4 5 回化学関連支部九州大会、7 月 5 日、北九州市 九島充幸、濱岡利恒、高尾信一、一二三恵美、宇田泰三、江頭直義、ルテニウム錯体内封イムノリポソームを用いるインフルエンザウイルスの迅速検出、第 4 5 回化学関連支部九州大会、7 月 5 日、北九州市、 — N. Egashira, S. Morita, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda, Highly sensitive detection of influenza virus hemagglutinin by lectrochemiluminescence using immunoliposome, Pacific Rim Meeting on electrochemical and solid-state science, Honolulu, Oct. 12-17, 2008. 江頭直義、森田慎一、高尾信一、一二三恵美、宇田泰三、イムノリポソームと電解発光を組み合わせた新規手法によるインフルエンザウイルスの検出、第 5 4 回ポラログラフィー及び電気化学討論会、P 2 5、熊本、1 1 月 2 3 日(2 0 0 8) 電解発光内封イムノリポソームを用いるインフルエンザウイルスの迅速検出(2)、江頭直義、九島充幸、高尾信一、三苫好治、一二三恵美、宇田泰三、日本化学会第 8 9 春季年会、平成 2 1 年 3 月 金属カルシウムを用いた有害ハロゲン化合物類の脱ハロゲン化反応、(16)金属カルシウム触媒法による置換クロロベンゼン類の脱クロロ化反応に関する反応機構の検討、S.Cristian, 掛田光則、江頭直義、三苫好治、日本化学会第 8 9 春季年会、平成 2 1 年 3 月 アスベストの非加熱式分解技術に関する研究(1)還元剤として作用する金属粉末の影響に関する検討、三苫好治、江頭直義、掛田光則、宮田秀明、日本化学会第 8 9 春季年会、平成 2 1 年 3 月