

研究テーマ：ウイルスの迅速高感度検出法に関する研究	
研究代表者（職氏名）：教授 江頭 直義	連絡先 (E-mail 等) : negasira@pu-hiroshima. ac. jp
共同研究者（職氏名）：准教授 西本 潤	

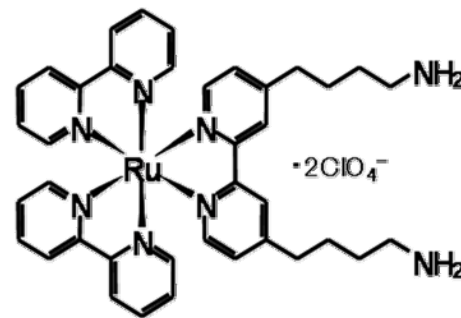
要 旨：本検出は、電解発光を生じるルテニウム錯体を内包したイムノリポソームを使用する新規な手法である。迅速高感度化は、リポソーム、電解発光、錯体の吸着などの要素を組み合わせることで可能となった。さらに測定操作の最適化により数 100 粒子（PFU）/mL インフルエンザウイルスの 90 分以内での検出を実現した。本手法は様々なタンパクの検出にも適用できるので幅広い分野への応用が期待される。

1. はじめに

新型インフルエンザウイルスの世界的流行で懸念されており、その予防あるいは判定のためには迅速な高感度検出器が求められている。しかし、現在の迅速判定法にはウイルス数 10^5 PFU/mL の検出が困難である。本研究では、さらに少ないウイルス数を迅速に検出できる新規手法の開発を行った

2. イムノリポソーム調製法の確立

超音波法とエクストルーダ法により、本研究室ルテニウム錯体（図 1）を内封したリポソームをエクストルーダ法が粒径分布の狭い、粒径の揃った、種々の細孔径の膜を使用して調製すると強い発光強度を与えことを見出した。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リポソーム表面に固定化してイムノリポソームを得た（図 2）。

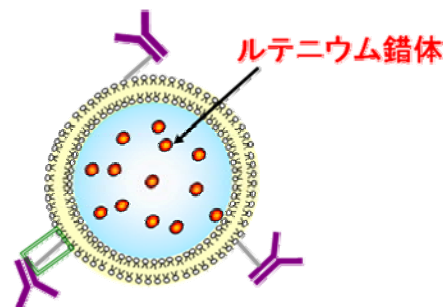


で合成した調製した。たものが得 50nm が最インフルエ 図 1 ルテ

ーム表面に固定化してイムノリポソームを得た（図 2）。使用した抗体は、ヘマグルチニン H1 及び H2 型に特異的な抗原設計したモノクロナール抗体である。

3. 検出系の高感度化

検出の操作は以下のとおりである。①金電極基盤ウイルス抗原ペプチドの固定化、②この電極上でイムノリポソームの競合反応、③電極の洗浄、④電極上たイムノリポソームの破壊、⑤60°C 5 分間加熱によるルテニウム錯体の金電極への吸着、⑥電圧印加（1.3 V vs. Au 電極）による



へのウイルスとイムに結合するルテニ Au 電極)

る発光強度の測定。

高感度化には幾つかの測定因子があるが、その中で電極上のリポソームの効果的な破壊法を検討した。様々な有機溶媒では適度な沸点を有するエタノールの添加が効果的な破壊を引き起こし、バックグラウンドシグナルをほとんど引き上げないことを見出した。高温加熱、凍結などの物理的手法は破壊効率が低かった。

4. インフルエンザウイルスの測定

インフルエンザウイルスに対する抗体を使用してイムノリポソーム（粒径：約 80nm）を調製した。

このイムノリポソームを用いて電極上で抗原抗体反応し、電極表面に結合したイムノリポソームを破壊して電解発光を観測した。ウイルスについては、研究協力者（保険環境センター）より提供されたウイルス原液（不活性化処理済み）を希釈して使用した。さらに3. 以外の検出操作の最適条件を探索し、90分以内で数100PFU/mLウイルスの検出を可能にした。この感度は、現行の迅速判定法を100倍以上凌駕するものであった。

5. ルテニウム錯体の合成

幾つかのビピリジン類似の配位子を用いてルテニウム錯体を合成し、性能評価を行った。発光強度は弱かったが、発光波長のシフトは観測され、同時測定への可能性が得られた。

我々が開発した手法は、ウイルスの迅速高感度として有効であることが明らかとなった。今後は、本手法を様々なタンパク（バイオマーカーあるいはアレルゲン）の検出に適用し、実用化を視野に入れて検討を進めていく予定である。

<平成19年度成果発表>

- ① イノベーション・ジャパン（平成19年9月12日、国際フォーラム（有楽町））へ出展、科学技術振興機構JSTの顕在化ステージに採択（平成19年10月～平成20年8月）、中国新聞朝刊（平成20年2月7日）に掲載。
- ② 論文：印刷中含め3編、例えばN. Egashira, S. Morita, E. Hifumi, Y. Mitoma, T. Uda, Attomole detection of hemagglutinin molecule of influenza virus by electrochemiluminescence sensor combining an immunoliposome that encapsulated a Ru complex, *Analytical Chemistry*, **80**, 4020-4025 (2008).
- ③ 特許：1件、（出願人）江頭直義、（発明者）江頭直義、三苦好治：特願2007-334525、電解発光物質を内封するリポソームを用いた迅速高感度アッセイ法、（出願日）平成19年12月26日
- ③ 学会発表：6件、例えば N. Egashira, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda, Attomol detection of hemagglutinin peptide of influenza virus on the basis of electrogenerated chemiluminescence and immunoliposome, *12th Asian chemical Congress (12ACC)*, SKAM150, Kuala Lumpur, Aug. 2007.