

局所プラズモン共鳴効果に基づく

磁気分離型ナノバイオセンサーの作製と複数ウイルス検出への応用

静岡大学バイオサイエンス専攻 博士前期課程 2年 (助成時)

同上 博士前期課程 3年 (現在)

竹村 謙信

【研究背景・目的】

インフルエンザウイルスやノロウイルスが例年冬季に感染が広がり、社会の脅威となっている。更に近年、エボラ出血熱や MERS など新興・再興感染症の発生や伝播は、その当該国だけではなく世界の社会・経済面においても大きな影響を及ぼす。ウイルス感染症の拡大を防ぐためには、迅速に高感度で感染症原因ウイルスを同定しないと行けない。感染症原因ウイルスの検出は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を原理として用いたウイルス DNA、RNA の検出がゴールドスタンダードとして用いられているが、ノロウイルスやインフルエンザウイルス等の特定のウイルス検出にはイムノクロマト法が知られている。しかし、前者は遺伝子検出に長時間を要し、さらに設備が揃った実験施設でのみ実施可能である。後者は早期感染を診断できる感度ではなく、感染初期の偽陰性や偽陽性がしばしば問題となっており、高感度かつ簡便な検出技術の創出が喫緊の課題となっている。

本研究では遺伝子診断が抱える技術や設備の問題、迅速診断キットが抱える偽陰性・偽陽性の問題を解決する簡便検出キットとしてノロウイルスを対象に新たな免疫蛍光磁気分離型ナノバイオセンサーを構築した (図 1)。

【検出系の構築】

新規金ナノ粒子—磁気ナノ粒子複合体 (AuNP/MNP) の合成：金ナノ粒子は磁気ナノ粒子分散溶液中で金イオンを最適 pH, 温度条件下で還元することにより、磁気ナノ粒子上に堆積する形で合成されている。温度条件を変更する事で球形の AuNP 堆積 (図 2B) だけでなく金平糖型 AuNP の堆積も可能であった (図 2C-D)。

【ノロウイルス様粒子の検出】

検出系の性能を確認するために、本研究では初段階とし

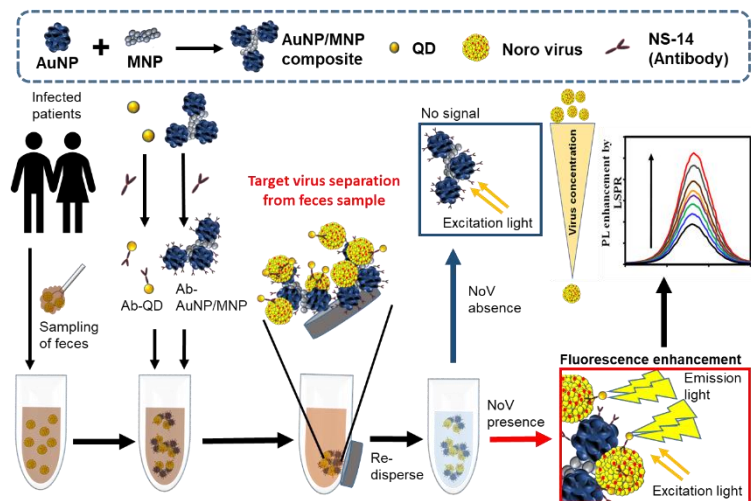


図 1. ノロウイルスの免疫磁気分離検出概要図。

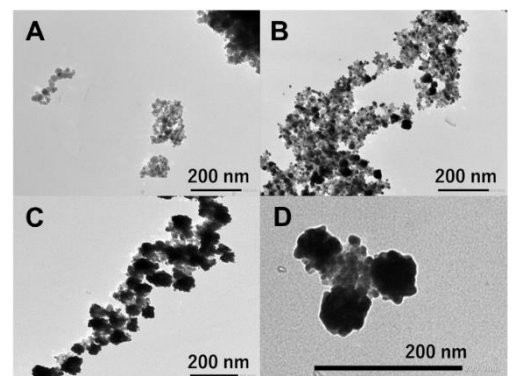


図 2. A) 磁気ナノ粒子 B-D) 異なる合成条件のプラズモン磁気ナノ粒子 (AuNP/MNP) の TEM による観察。

てノロウイルスと類似なカプシドタンパクを有し、核酸を有さないノロウイルス様粒子 (NoV-LP) を用いてウイルス検出実験を行った。

【NoV-LP 検出結果】

QD と AuNP/MNP=1:2 の割合で混合した溶液を検出液とし、ここに NoV-LP 溶液を加え抗原抗体反応を誘起した。磁気分離により NoV-LP を分離、超純水中に再懸濁し蛍光強度測定を行った。NoV-LP 濃度は 1 pg/ml から 1 ng/ml までの希釈系列を調製している。また、夾雑タンパク中からも高効率に NoV-LP の分離・検出が可能であることを証明するため、ウイルス非感染者より採取した糞便溶液中に NoV-LP を懸濁した状態で同様の検出実験を行っている (図 3A-B)。結果として、本検出系は糞便溶液中であっても超純水中と同様の性能で LSPR 蛍光増強効果を NoV-LP 濃度依存的に引き起こし、ウイルス検出に成功した。検量線から得た本検出系の検出限界は糞便中において 0.48 pg/ml であり、既存の ELISA を始めとする検出法と比較し、100 倍以上の感度向上に成功した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた QD の検出後溶液蛍光を確認した試験では AuNP/MNP 複合体存在箇所のみ局所的な QD の強い蛍光シグナルが見られ、QD-NoV-LP-AuNP/MNP のサンドイッチ構造形成が示唆された (図 3C-E)。

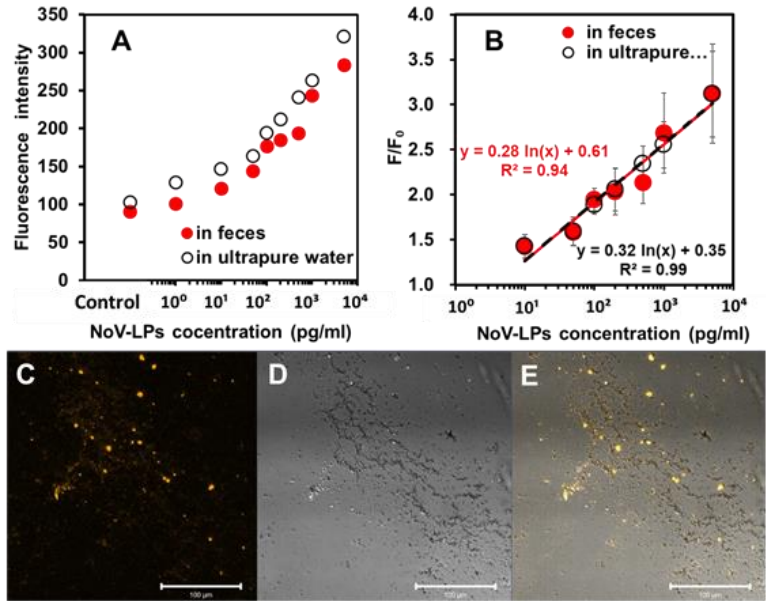


図 3. A) AuNP/MNP 及び QD を用いた NoV-LP の検出結果 ○超純水中 ●ヒト糞便中。B) 検出結果より求めた検量線。C-E) 磁気分離後の QD-NoV-LP-AuNP/MNP を共焦点レーザー顕微鏡により観察した結果。

【選択性の確認】

本検出系のターゲットウイルス特異性を示すため、BSA、ヒト血清、A 型インフルエンザウイルス (H1N1, H9N2)、ジカウイルス、E 型肝炎ウイルス様粒子を用いて非特異的な蛍光増強が生じないかを確認した (図 4)。NoV-LP 以外のウイルス存在下では蛍光増強効果は誘起されず、本検出系の高い選択性が示された。

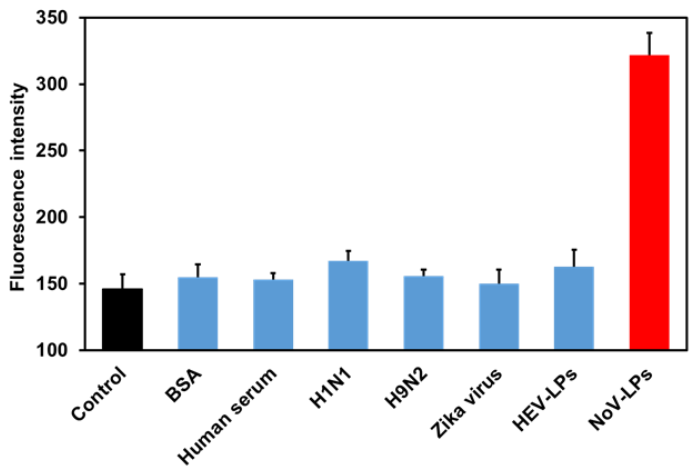


図 4. 検出系の選択性確認

【総括】

今回市販 ELISA により得られた検出限界と比較すると本検出系は 100 倍の感度を示すことが明らかになった。この新規免疫蛍光磁気分離型ナノバイオセンサーは、サンプル添加後 20 分以内に糞便サンプル中のノロウイルス検出が高感度に可能であることが示唆され、この成果より、本検出系はオンサイト検出に適していると考えられる。