

〈原著〉

インフルエンザウイルスのための化学蛍光法を用いた 光ファイバ型免疫測定

當麻 浩司¹⁾、鈴木 友梨香²⁾、齋藤 真奈³⁾、宮島 久美子^{1), 4)}、
荒川 貴博¹⁾、下村 弘治³⁾、三林 浩二^{* 1), 2)}

Fiber-optic chemifluorescent immunosensor for influenza virus monitoring

Koji Toma¹⁾, Yurika Suzuki²⁾, Mana Saito³⁾, Kumiko Miyajima^{1), 4)},
Takahiro Arakawa¹⁾, Hiroji Shimomura³⁾ and Kohji Mitsubayashi^{* 1), 2)}

Summary A fiber-optic chemifluorescent immunosensor was developed for on-site monitoring of influenza virus. A polished polystyrene (PS) fiber-optic probe was employed to excite and collect fluorescence light emitted from resorufin that is a product of a horseradish peroxidase (HRP)-mediated reaction. The PS fiber probe was attached to a bifurcated fiber which is connected to a light source (light emitting diode) and a detector (photomultiplier tube). A sandwich assay was conducted in a well of a microtiter plate. After binding of a HRP-labeled detection antibody, the polished PS fiber end-face was immersed in the well and excite the produced resorufin to measure the fluorescence intensity. A surface protein of the influenza type A virus (H1N1), hemagglutinin (H1N1-HA) was measured for assessment of the sensor property. The fiber-optic immunosensor showed a wider dynamic range (7.1 – 1560 pg/mL) than that of enzyme-linked immunosorbent assay (47.5 – 1580 pg/mL) along with a high selectivity to H1N1-HA.

Key words: Fiber-optic, Chemifluorescence, Influenza virus, Monitoring

¹⁾ 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
センサ工学分野

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

²⁾ 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科
医歯理工学専攻

〒113-8549 東京都文京区湯島1-5-45

³⁾ 文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

〒113-8668 東京都文京区向丘1-19-1

⁴⁾ 日本学術振興会

〒102-0083 東京都千代田区麴町5-3-1

受領日：平成28年6月3日

受理日：平成28年7月11日

¹⁾ Department of Biomedical Devices and
Instrumentation, Institute of Biomaterials and
Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062,
Japan

²⁾ Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan

³⁾ Faculty of Health Science Technology, Bunkyo
Gakuin University
1-19-1 Mukogaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8668, Japan

⁴⁾ Japan Society for the Promotion of Science
5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan

I. 諸言

インフルエンザはウイルス感染により発熱や倦怠感などの全身症状を発症する呼吸器感染症であり、その罹患者数は世界で毎年1億人以上となっている¹⁾。インフルエンザウイルスは、核タンパク質やマトリックスタンパク質の違いから、A、B、C型に分けられ、特にA型はウイルス表面のタンパク質である16種のhemagglutinin (HA) と9種のneuraminidase (NA) の組み合わせにより、144種の亜型に細分化される²⁾⁻⁵⁾。また、HAやNAは毎年少しずつ変異（連続変異）するため、季節性の流行を引き起こし、数十年に一度に起こる大きな変異（不連続変異）は世界的な大流行を引き起こす。

現在、インフルエンザウイルス感染の診断に用いられている方法は、ウイルス分離法、lateral flow immunochromatographic assay (LFIA) 法、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法などがあり、被験者の鼻腔や咽頭拭い液などの生体試料からウイルスの有無の判別や定量を行っている⁶⁾⁻¹⁰⁾。しかしながらこれらの方法は、既に感染している可能性がある患者を対象としており、感染自体を予防することは困難である。

インフルエンザウイルスの感染経路は飛沫感染、接触感染、飛沫核感染が挙げられる¹¹⁾⁻¹⁵⁾。飛沫感染は感染者のくしゃみや咳により空気中へ放出されたウイルスを含む飛沫が直接呼吸器に入り込むことで感染し、接触感染は飛沫に汚染されたモノに触れることで感染する。また飛沫核感染は、飛沫の水分が蒸発し長時間空間中に浮遊できる状態になった飛沫核を、同じ空間にいる人間が吸い込むことで感染する。つまり、飛沫感染や接触感染は感染者のマスク着用や、手洗いなどで予防が期待できるが、飛沫核感染の予防には空間中に浮遊するウイルス量を把握することが重要であり、on-siteにモニタリングする方法（浮遊ウイルス計測システム）が有効と考えられる。

そこで、本研究では、計測システムへの組込みを見据え、インフルエンザウイルスの表面タンパクを高感度に測定可能なセンサを、光ファイバと免疫化学蛍光法を利用することで開発し、A型インフルエンザH1N1のHA (H1N1-HA) の測定を行った。

II. 方法と材料

1. 試薬

Phosphate buffer (PB, 50mM, pH 7.7) 溶液は、リン酸二ナトリウム (Na₂HPO₄, Wako) を超純水で50mMに調製し、リン酸二水素カリウム (KH₂PO₄, Wako) を加えることでpH 7.7に調整した。各濃度のresorufin標準溶液（励起ピーク波長 λ_{ex} = 570 nm、蛍光ピーク波長 λ_{em} = 585 nm）は、resorufin sodium salt (Sigma-Aldrich) とPB溶液を用いて調製した。酵素反応に使用する10-acetyl-3,7-dihydroxy-phenoxazine (ADHP) 溶液は、市販のキット（QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate, Thermo Fisher Scientific）に含まれる、ADHP concentrate、Enhancer solution、Stable peroxide solutionを1 : 50 : 50の分量で混合し、調製した。捕捉抗体（cAb, mouse anti-2009 H1N1 hemagglutinin monoclonal antibody, Sino Biological）の吸着に使用するcarbonate-bicarbonate buffer (CB) 溶液の濃度とpHは、超純水に溶解させる炭酸水素ナトリウム (NaHCO₃, Wako) の濃度と、炭酸ナトリウム (Na₂CO₃, Wako) の付加量でそれぞれ調整した。Tris buffered saline (TBS, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) 溶液は、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol 999 (Tris, Wako) と塩化ナトリウム (NaCl, Wako) を超純水にて溶解させて調製し、塩酸 (HCl, Wako) を加えることでpH 7.4に調整した。Wash buffer溶液 (0.05 wt% Tween20 in TBS) は、TBS溶液にTween20 (Kanto Chemical) を0.05 wt%となるように加え、調製した。Blocking buffer溶液およびSample dilution buffer溶液、Detection antibody dilution buffer溶液はbovine serum albumin (BSA, Wako) をWash buffer溶液中で、各々2 wt%、0.1 wt%、0.5 wt%になるように調製した。

2. ポリスチレン製光ファイバプローブの作製と評価

光ファイバプローブには、加工性やデバイス組込み性、光学特性に優れたポリスチレン (PS) をコア素材としたファイバ（コア径1 mm, Shenzhen Corporeal Photoelectric）を採用した。PS製光ファイバを約10cmに切り出し、研磨装置 (Rev, Krell Technologies) を用いて端面を研

磨することでファイバの光学特性を高め、プローブを作製した。研磨は、粗研磨用のシリカフィルム（粒子径 30 μm）による乾式研磨、粒子径の小さいシリカフィルム（粒子径 9 μm）による湿式研磨、そしてアルミナフィルム（粒子径 0.3 μm）による湿式研磨の順で行い、ファイバ端面を鏡面処理した。

鏡面処理を施したPS製光ファイバプローブを用いてresorufin標準溶液（0.1–50 μM）に対する特性評価を行った。各濃度のresorufin標準溶液で満たしたセル内に光ファイバプローブを浸漬し、resorufinからの蛍光強度を測定した。また、市販のガラス製光ファイバプローブ（F1000-900 PROBE, コア径1mm, Ocean Optics）を用いて同様の実験を行い光学特性の比較を行った。

3. 光ファイバ型免疫測定系の構築

本測定系で採用した化学蛍光法では、検出抗体（dAb, rabbit anti-2009 H1N1 hemagglutinin, Sino Biological）の標識酵素（horseradish peroxidase, HRP）に基質（ADHP）を反応させ、生成物である蛍光物質（resorufin）の蛍光強度を測定することで、H1N1-HAの測定を行った（Fig. 1a）。

測定系では研磨したPS製光ファイバプローブを、ファイバコネクタを介して二分岐光ファイバ（コア径 600 μm, BIF600-VIS/NIR, Ocean Optics）に接続し、その両端を励起光源である発光ダイオード（LED, λ = 535 nm, Brightek Optoelectronics）および検出器である光電子増倍管（PMT, H7421-40, Hamamatsu Photonics）に接続した（Fig. 1b）。測定では、LEDからの励起光をバンドパスフィルター（BPF1, λ = 570 ± 10 nm, Asahi Spectra）および光ファイバプローブを介してその端面から照射し、生成されたresorufinを励起する。その結果resorufinから放出された蛍光を、同プローブ端面から集光し、バンドパスフィルター（BPF2, λ = 600 ± 10 nm, Asahi Spectra）を介してPBにて検出した。Resorufinのピーク励起波長（570 nm）と蛍光ピーク波長（585 nm）は近接しているため、BPFを導入することで出力とノイズ比（SN比）の向上を図った。

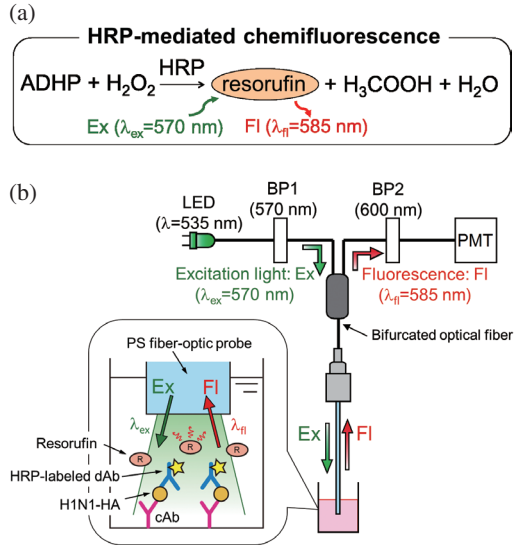


Fig. 1 (a) HRP-mediated reaction used for chemifluorescence and (b) a schematic of a fiber-optic chemifluorescent immunosensor.

4. H1N1型インフルエンザウイルスの表面タンパク（H1N1-HA）の測定条件

はじめに構築した測定系による免疫化学蛍光法の条件を最適化するため、(i) cAbの希釈に使用するCB溶液の濃度とpH、(ii) cAb濃度、そして (iii) dAb濃度を検討した。(i) CB溶液濃度の最適化実験では、pH 9.7に固定したCB溶液（20–60 mM）にて調製した2 μg/mL cAb溶液を、マイクロウェルプレート（greiner bio-one）のウェルに付加後、4℃で20時間静置した（Fig. 2a）。静置後、Blocking buffer溶液を付加し、室温で1時間静置することでウェル表面のブロッキングを行った。その後、Sample dilution buffer溶液にて200 pg/mLに希釈した抗原（H1N1-HA）溶液を付加し、室温で2時間静置することでH1N1-HAをcAbに結合させた。最後にDetection antibody dilution buffer溶液にて2 μg/mLに希釈したdAb溶液を付加し、室温で1時間静置することでcAb/H1N1-HA/dAbの免疫複合体を形成した（Fig. 2b）。なお各反応後にはWash buffer溶液でウェル表面の rins を3回ずつ行った。dAbに標識されたHRPを介してH1N1-HAの化学蛍光測定を行うため、免疫複合体形成後にADHP溶液を付加し、5分間静置

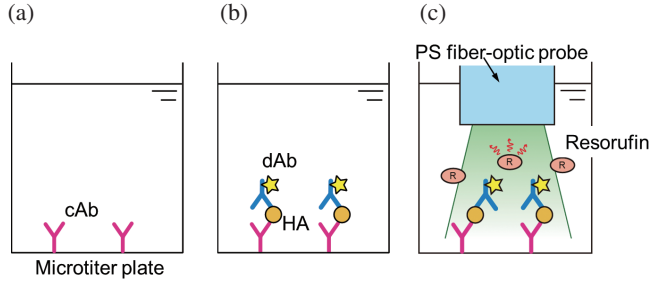


Fig. 2 Assay procedure to measure H1N1-HA: (a) immobilization of capture antibody (cAb) on a microtiter plate, (b) bindings of H1N1-HA and detection antibody (dAb) and (c) measurement of fluorescence intensity of resorufin produced through the HRP-mediated reaction with the PS fiber-optic probe.

した後に反応停止液を付加した。その後ウェル中に光ファイバプローブ端面を浸漬し、resorufinを励起することで蛍光強度を測定した (Fig. 2c)。CB溶液のpH最適化では最適なCB溶液濃度に固定した条件にて、pHを9.4–9.8へと変化させながら上記の実験を行い、蛍光強度を比較した。次に (ii) cAb濃度では、最適化された濃度とpHのCB溶液で0–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のcAb溶液を調製し、同手順でH1N1-HAの蛍光測定を行い最適化した。最後に (iii) dAb濃度の最適化では、(i)、(ii) で最適化された条件の下、Detection antibody dilution buffer溶液により0–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したdAb溶液を用いて同様の実験を行い、各dAb濃度における蛍光測定を比較した。

(i)～(iii)の最適化された条件において、3–1560pg/mLのH1N1-HAに対する蛍光強度を上記と同手順で測定し、光ファイバ型免疫測定系のセンサ特性評価を行った。ここで比較としてELISA法を用いたH1N1-HAの測定も行った。ELISA法ではウェル上に免疫複合体形成後、発色基質3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Bethyl Laboratories) を付加し、発色5分後に波長370 nmの吸光度をマイクロウェルプレートリーダー (SH-1000Lab, Corona Electric) にて測定した。

III. 結果と考察

1. ポリスチレン製光ファイバプローブの光学特性

研磨前後のPS製光ファイバ端面の光学顕微鏡像をFig. 3aに示す。粗い切断面が、アルミナフィルムによる鏡面加工処理の後には平滑化さ

れている様子が観察された。研磨処理後にresorufin標準溶液の蛍光強度を測定した結果をFig. 3bに示す。resorufin標準溶液の濃度の増加に伴い蛍光強度が増加していく様子が観察され、0.1–50 μM の範囲で定量が可能であった。比較として用いたガラス製の光ファイバにおいても

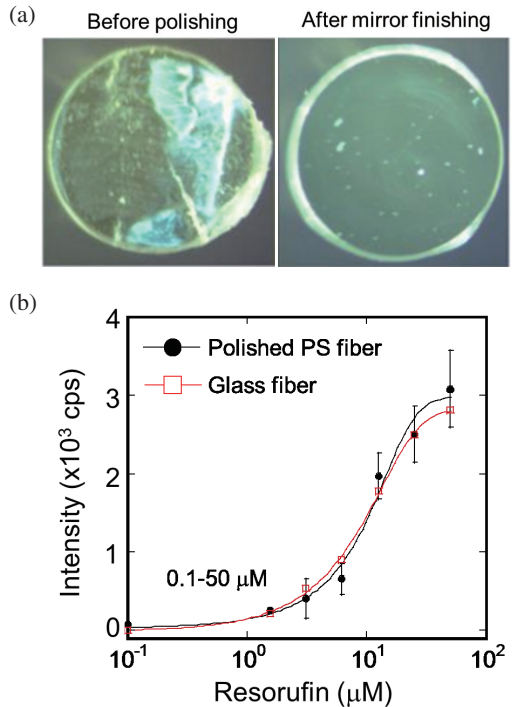


Fig. 3 (a) Microscope images of the PS fiber-optic end-face before polishing (left) and after mirror finishing (right) and (b) responses of the polished PS (●) and a glass (□) fiber-optic probes to resorufin standard solution.

同様の定量範囲が得られたことから、研磨処理を施したPS製ファイバはガラス製ファイバと同等の光学特性を示すことが明らかとなり、光ファイバ型免疫測定系のプローブとして採用することとした。

2. 免疫測定法の最適化およびH1N1-HA測定

はじめにCB溶液の濃度を20–60 mMと変化させたところ、40 mMの時に蛍光強度が最大となった。次にCB溶液のpHに対する蛍光強度の依存性を調べたところ、pH 9.6において蛍光強度が最大となり、pH 9.8の時に比べ2倍以上の増加を示した (Fig. 4)。これはpH 9.6の時にcAb中の疎水部が最も多く現れ、マイクロウェルプレートとの強い疎水–疎水相互作用によりウェルプレート表面へのcAb吸着量が最大となったことによるものと考えられる。更にcAb、dAb濃度を変化させた時の蛍光強度は、それぞれ2 µg/mL、4 µg/mL以上で飽和し顕著な増加を示さなかったことから、以降の実験ではcAb濃度を2 µg/mL、dAb濃度を4 µg/mLとした。

最適化された条件の下、ウェルプレート表面上でサンドイッチアッセイを行い、光ファイバ型免疫測定系にてH1N1-HAを測定した。実験ではH1N1-HA濃度に応じた蛍光出力が観察され、7.1–1560 pg/mLとELISA (47.5–1560 pg/mL) に比して高感度かつ広範囲での定量が可能であった (Fig. 5)。これはLFIAよりも3桁程度高い感度であり、咽頭拭い液中よりも低濃度に存在する空間中の浮遊インフルエンザウイル

スを測定できる可能性を示すものであった¹⁶⁾。また、ELISAで使用するウェルプレートリーダーのように大型な装置は不要であり、免疫測定の短時間化や繰り返し性を向上すれば、ウイルスモニタリングの実現が期待される。

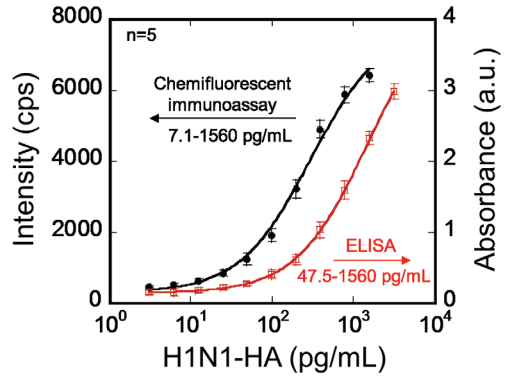


Fig. 5 Calibration curves of the fiber-optic chemiluminescent immunosensor (●) and ELISA (□) for H1N1-HA.

最後にH1N1-HAに対する選択性の評価を行うため、A型インフルエンザウイルスの亜型であるH3N2由来の表面タンパクH3N2-HAを同様に測定し、出力を比較した (Fig. 6)。その結果、H3N2-HAに対する出力はほとんど得られず、抗原抗体反応による特異性に基づいた本測定系のH1N1-HAに対する高い選択性が示された。以上の結果より、化学蛍光法を用いた本測定系は広い定量範囲、高感度・選択性を備え、H1N1-HAの測定に対する有用性が示された。

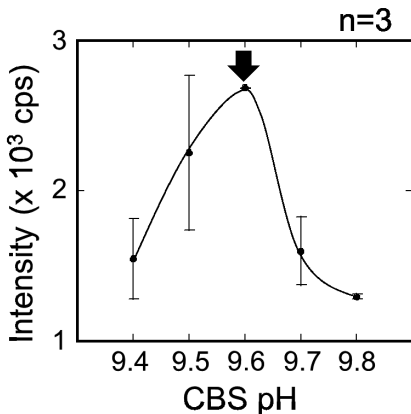


Fig. 4 Dependence of the fluorescence intensity of the immunoassay on CB solution pH.

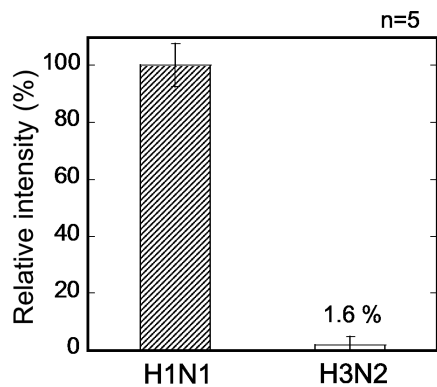


Fig. 6 Selectivity of the fiber-optic chemiluminescent immunosensor to H1N1-HA.

Ⅳ. 結語

本研究では浮遊ウイルスのモニタリングを目的として、PS製光ファイバプローブを用いた高感度な化学蛍光測定法の開発を行った。蛍光測定系を構築した後、ウイルスの表面タンパク質であるヘマグルチニン (H1N1-HA) の測定を行ったところ、ELISA法に比べ高感度かつ広い定量範囲 (7.1–1560pg/mL) を実現し、また抗原特異性に基づく高い選択性を示した。今後、浮遊ウイルス測定システムへの組込みを見据え、気相中のウイルス用の捕集デバイスを開発し本センサと組み合わせることで、on-siteにてウイルス濃度をモニタリング可能なシステムへと展開していく。

Ⅴ. 謝辞

本研究遂行のために必要な予算として、日本学術振興会による科学研究費助成事業、科学技術振興機構、文部科学省による特別教育研究基金「Research Promotion of Neo-Biology」からご支援頂きました。

文献

- 1) Sriwilajaroen N and Suzuki Y: Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Japan Acad Ser B*, 88: 226-249, 2012.
- 2) Hamson AW, Mackenzie JS: The influenza viruses. *Med. J Aust*, 10: 39-43, 2006.
- 3) Krejcova L, Hynek D, Michalek P, Milosavljevic V, Kopel P, Zitka O, Konecna M, Kynicky J, Adam V, Hubalek J and Kizek R: Electrochemical sensors and biosensors for influenza detection. *Int J Electrochem Sci*, 9: 3440–3448, 2014.
- 4) Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY and Huang LM: Influenza pandemics: past, present and future. *J Formos Med Assoc*, 105: 1-6, 2006.
- 5) Suarez DL and Schultz-Cherry S: Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev Comp Immunol*, 24: 269-283, 2000.
- 6) Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E,

- Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G and Capua I: Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol*, 33: 432-437, 2004.
- 7) Boon ACM, French AMF, Fleming DM and Zambon MC: Detection of influenza A subtypes in community-based surveillance. *J Med Virol*, 65: 163-170, 2001.
- 8) He Q, Velumani S, Du Q, Chee WL, Fook KN, Donis R and Kwang J: Detection of H5 avian influenza viruses by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay using H5-specific monoclonal antibody. *J Clinical Vaccine Immunology*, 14: 617-623, 2007.
- 9) Montalto NJ. An office-based approach to influenza: clinical diagnosis and laboratory testing. *Am Fam Physician*, 67: 111-118, 2003.
- 10) Poehling KA, Griffin MR, Dittus RS, Tang YW, Holland K, Li H and Edwards KM: Bedside diagnosis of influenza virus infections in hospitalized children. *Pediatrics*, 110: 83-88, 2002.
- 11) Roy CJ and Milton DK: Airborne transmission of communicable infection - the elusive pathway. *N Engl J Med*, 350: 1710-1712, 2004.
- 12) Lindsley WG, Blachere FM, Thewlis RE, Vishnu A, Davis KA, Cao G, Palmer JE, Clark KE, Fisher MA, Khakoo R and Beezhold DH: Measurements of airborne influenza virus in aerosol particles from human coughs. *PLoS One*, 5: e15100, 2010.
- 13) Edwards DA, Man JC, Brand P, Katstra JP, Sommerer K, Stone HA, Nardell E and Scheuch G: Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:17383-17388, 2004.
- 14) Fabian P, McDevitt JJ, DeHaan WH, Fung ROP, Cowling BJ, Chan KH, Leung GM and Milton DK: Influenza virus in human exhaled breath: an observational study. *PLoS One*, 3: e2691, 2008.
- 15) Milton DK, Fabian MP, Cowling BJ, Grantham ML and McDevitt JJ: Influenza virus aerosols in human exhaled breath: particle size, culturability, and effect of surgical masks. *PLoS Pathog*, 9: e1003205, 2013.
- 16) Kang K, Chen L, Zhao X, Qin C, Zhan Z, Wang J, Li W, Dzakah EE, Huang W, Shu Y, Jiang T, Cao W, Xie M, Luo X and Tang S: Development of rapid immunochromatographic test for hemagglutinin antigen of h7 subtype in patients infected with novel avian influenza a (h7n9) virus. *PLoS ONE*, 9: e92306, 2014.