

インフルエンザウイルスのヒト感染性と亜型の同時鑑別のための

グラフェン FET を用いた horseradish peroxidase 反応の検出

Detection of Horseradish Peroxidase Reaction on Graphene FET toward

Testing for Human Infectivity and Subtypes of Influenza Virus

阪大産研¹、村田製作所²、徳島大³、東京農工大⁴、京都府立医大⁵、香川大⁶、中部大⁷○山中天志¹、白井充¹、小野堯生¹、牛場翔太²、金井康¹、谷奥正巳¹、大野恭秀^{1,3}、前橋兼三^{1,4}、井上恒一¹、渡邊洋平⁵、中北慎一⁶、河原敏男⁷、鈴木康夫⁷、木村雅彦²、松本和彦¹ISIR, Osaka Univ.¹, Murata Mfg.², Tokushima Univ.³, TUAT⁴, KPUM⁵, Kagawa Univ.⁶, Chubu Univ.⁷○T. Yamanaka¹, M. Shirai¹, T. Ono¹, S. Ushiba², Y. Kanai¹, M. Tanioku¹, Y. Ohno^{1,3}, K. Maehashi^{1,4},K. Inoue¹, Y. Watanabe⁵, S. Nakakita⁶, T. Kawahara⁷, Y. Suzuki⁷, M. Kimura², and K. Matsumoto¹

E-mail: yamanaka11@sanken.osaka-u.ac.jp

近年、変異により新たにヒト感染性を獲得したインフルエンザウイルス(IFV)の発生・流行が世界的に危惧されており、そうした IFV の迅速検出、及びワクチン接種のための亜型同定が必要とされている。我々は、検出対象の表面電荷に鋭敏に応答するグラフェンを用いた電界効果トランジスタ(G-FET)を、IFV がヒト感染時に足掛かりとするヒト型シアロ糖鎖で修飾し、IFV のヒト感染性を高感度に鑑別することに成功してきた[1]。検出した IFV に亜型特異的な抗体を結合させれば亜型鑑別が可能だが、ここにデバイ長の問題がある。生理的塩濃度下でのデバイ長は IFV よりはるかに小さいため、IFV に結合した抗体は G-FET でほとんど検出できない。一方で我々は、酵素分子 horseradish peroxidase(HRP)をその反応産物により検出できることを示してきた[2]。そこで、亜型特異的な抗体に HRP を複合体化して抗体の結合を検出する、「グラフェン電荷検出型 ELISA 法」を構想した。本法ではグラフェン上に捕捉した IFV の電荷でヒト感染性を鑑別し、酵素抗体複合体を結合させたのち、全体を pL 体積の微小液滴に封入することで、微量の酵素反応産物を濃縮し、高感度に亜型を同定する。

G-FET 上にコートした非晶質フッ素ポリマー(CYTOP、旭硝子株式会社)を酸素プラズマでエッチングし、チャネル上に 2 pL のマイクロウェルを構築した(Fig. 1)。HRP と過酸化水素及びルミノールを本デバイスに導入したところ、反応産物の負電荷による G-FET のホールキャリア誘起を検出し、マイクロウェル内の G-FET での HRP 反応検出が示された(Fig.2)。ところで一般にルミノール反応は塩基性条件下で行われるが、糖鎖と IFV の結合アッセイは一般に中性付近で行われる。そこで次に、基質を溶解する緩衝液の組成を調整し、糖鎖と IFV が結合可能な溶液組成を見出した(Fig.3)。今後、これらの要素技術を統合し、IFV のヒト感染性と亜型の同時高感度計測を目指す。

【謝辞】本研究は JST-CREST(JPMJCR15F4)の支援を受けた。[1]川田拓哉 他、第 78 回応用物理学会秋季学術講演会、8a-C16-13、[2]白井充 他、第 78 回応用物理学会秋季学術講演会、8a-C16-14

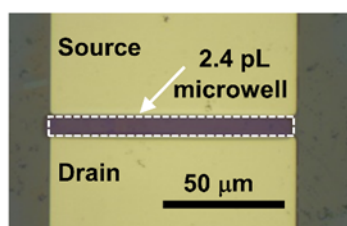


Fig. 1: Microscopic image of G-FET. The length, width and depth of microwell are 100, 6 and 4 μm, respectively.

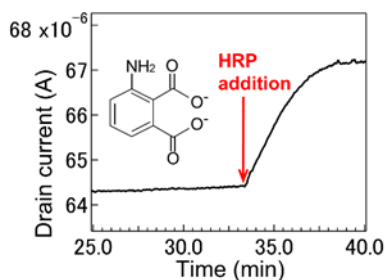


Fig.2: Hole current change of G-FET in HRP reaction. Inset: negatively-charged reaction product.

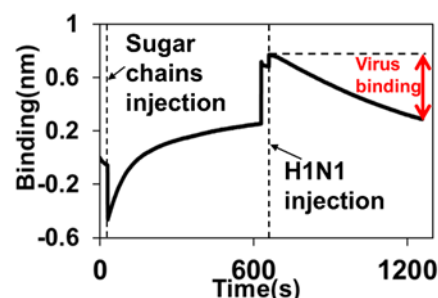


Fig.3: Binding assay for H1N1 IFV and human-type sialoglycan under the same conditions as Fig. 2.