

様式2

平成28年度 生体医歯工学共同研究実施報告書

受理年月日	
受理番号	2046

平成29年 3月 10日

生体医歯工学共同研究拠点 研究所長会議 議長 殿

共同研究代表者

所属機関 琉球大学

職 名 准教授

氏 名 作道 章一

勤務先所在地 〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町

上原207番地

電話番号 (098)895-1252

FAX番号 (098)895-1252

E-mailアドレス sakudo@med.u-ryukyu.ac.jp



下記により、共同研究の実施報告を致します。

記

研究題目	(和)抗体固定化ナノ微粒子による高感度ウイルス検出法の開発 (英) Development of Highly Sensitive Detection Method of Virus Using Antibody-integrated Nanoparticles		
研究領域	1. 生体材料に関する基礎・応用研究 2. 生体工学に関する基礎・応用研究 3. 生体機能分子に関する基礎・応用研究 ④ 化学・電気・機械・材料工学の生体応用研究		
研究期間	平成 28 年 6 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
研究組織			
氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
作道 章一	琉球大学・医学部	准教授	本研究の総括
永津 雅章	静岡大学・電子工学研究所	教授	実験結果検討
Anchu Viswan	静岡大学・大学院自然科学系教育部	博士3年生	実験の遂行
杉浦 邦昂	静岡大学・大学院総合科学技術研究科	修士2年生	実験の遂行
所要経費			
旅費総額	研究・会議費総額	消耗品費総額	
0円	0円	200,000円	
生体医歯工学共同研究拠点内対応教員	(共同研究をした教員名を記載) 永津 雅章		
共同研究継続の希望について	<input checked="" type="checkbox"/> 有 ・ <input type="checkbox"/> 無	平成29年度研究費総額(千円)	200,000円
		※継続を希望される場合記入してください	

研究成果

近年、デングウイルス(DENV)、ジカウイルス、中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルス、重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスなどによる新興再興感染症が国境を越えて猛威をふるい、世界規模の脅威となっている。特に、2014年8月26日に東京都内で感染したと考えられるデング熱症例が約70年ぶりに確認されるなど、DENV対策は急務である。そのような状況にも関わらず、既存の診断法は、広範なDENVに対して、検出感度や確度の面で十分とはいえない状況にある。そこで、本研究ではガスプラズマ技術を応用して効率的にアミノ基を表面修飾した磁性ナノ粒子を作製し、DENVに選択性を持った抗体を多数結合させた抗体固定化ナノ微粒子をもちいたウイルス濃縮系の開発を行った。

まず、アンモニアの雰囲気下で高周波プラズマを発生させることで、グラフェン層でカプセル化された磁性ナノ微粒子の表面にアミノ基を修飾させた。そして、磁性ナノ微粒子へのアミノ基の付加をFluorescamineや2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acidとの反応で確認した。次に、カップリング剤であるSPDP(*N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate)を磁性ナノ微粒と反応させ、アミノ基と抗体を架橋し抗体固定化ナノ微粒子を作製した。この方法でDENVに対する抗体(D23-1G7C2)(1)を結合した抗体固定化ナノ微粒子は、4種類の血清型のDENV(DENV1 (Mochizuki株)、DENV2 (16681株)、DENV3 (80-2株)、DENV4 (H241株))に感染した細胞の培養液と混和した後、磁気フィールドを用いて回収した。さらに、得られたナノ微粒子をReverse transcriptase (RT)-Polymerase chain reaction (PCR)で解析し、回収されたDENVの検出を行った。RT-PCRの解析の結果、4種類の血清型の全てでナノ微粒子のフラクションにDENVのバンドが検出されたことから、抗体固定化ナノ微粒子は全ての血清型のDENVを回収することができることが明らかとなった。また、本方法により回収されたDENVはRT-PCRで検出することができたことから、検出感度を上昇させることができるものと考えられた。

以上、本方法は既存の検出法へサンプルを供する前に、液体サンプルからDENVを回収することができ、検出感度上昇に貢献できるものと考えられた。本研究のプラズマ表面修飾では、ナノ微粒子表面に微粒子1個当たり数万個の官能基を修飾できることが化学誘導体化法を用いて確認できていることから、従来技術よりも数桁高い抗体固定化の可能性が期待できる。本研究の成果が医療・バイオ分野に与えるインパクトは極めて大きく、さらに将来的な産業界との連携による実用化研究へと展開させていきたい。

8月24日研究打ち合わせ(静岡大学訪問)

使用した設備・資料・試料等

- ・磁気ナノ微粒子製造用DCアーク放電装置
- ・表面修飾用RFプラズマ実験装置

本研究成果に関連する論文発表状況

- 1: Sakudo A, Viswan A, Chou H, Sasaki T, Ikuta K, Nagatsu M. Capture of dengue viruses using antibody-integrated graphite-encapsulated magnetic beads produced using gas plasma technology. Mol Med Rep. 2016;14(1):697-704.
- 2: Sakudo A, Chou H, Ikuta K, Nagatsu M. Integration of antibody by surface functionalization of graphite-encapsulated magnetic beads using ammonia gas plasma technology for capturing influenza A virus. Bioorg Med Chem Lett. 2015;25(9):1876-9.
- 3: Sakudo A, Chou H, Nagatsu M. Antibody-integrated and functionalized graphite-encapsulated magnetic beads, produced using ammonia gas plasma technology, for capturing Salmonella. Bioorg Med Chem Lett. 2015;25(5):1012-6.
- 4: 永津雅章, Anchu Viswan, 張晗, 作道章一, 生田和良, "プラズマ高機能化磁気ナノ微粒子を用いた高感度ウイルス検出システム", 月刊「クリーンテクノロジー」2016; 26(6), 52-6.
- 5: Yang E, Han Chou H, Shun Tsumura S, Nagatsu M, "Surface Properties of Plasma Functionalized Graphite-Encapsulated Gold Nanoparticles Prepared by Direct Current Arc Discharge Method" J. Phys. D: Appl. Phys. 49(18) (2016) 185304.
- 6: Viswan A, Chou H, Sakudo A, Nagatsu N, "Bioconjugation efficiency of plasma-functionalized carbon-encapsulated iron nanoparticles with biotin-avidin system", Biomed. Phys. Eng. Express 2015;1(4) (2015) 045104.
- 7: 永津雅章, 楊恩波, 張晗, 作道章一, 生田和良, "プラズマ修飾ナノ微粒子のバイオ・医療応用", 表面科学 2013; 34(10):535-540.