

※課題番号 : F-12-RO-0011
※支援課題名 (日本語) : 表面プラズモン共鳴を用いたノロウイルスセンサの開発
※Program Title (in English) : Development of a biosensor for norovirus based on surface plasmon resonance
※利用者名 (日本語) : 佐藤 久
※Username (in English) : Hisashi Satoh
※所属名 (日本語) : 北海道大学大学院工学研究院
※Affiliation (in English) : Faculty of Engineering, Hokkaido University

※概要 (Summary) :

ノロウイルスと大腸菌 O157 を高感度で検出する表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサを開発した。高屈折率ガラス上にマスクレス露光とシリコン樹脂の型取り技術により抗体を固定したマイクロ流路を形成し、試料を流してスペクトルを計測した。4 倍の感度向上を確認し、実用化に向けた展開が期待できる。

※実験 (Experimental) :

マスクレス露光装置、設計・T-CAD 用ワークステーションを用いてガラス基板の上に SU-8 を使用してパターンを形成し、それを鋳型にしてポリジメチルシロキサン (PDMS) の流路を作製した。センサチップは、金蒸着高屈折率ガラス (Au-11 ; 五稜化学株式会社) を用いて作製した。金薄膜上に 10-Carboxy-1-decanethiol の自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer: SAM) を形成した。

SAM 分子のカルボキシ基が活性エステルとなる。ここに病原微生物に対する抗体を含むリン酸緩衝溶液 (PBS) を 10 μ L 滴下した。本研究で使った抗体溶液は、濃度 100 μ g/mL で抗大腸菌 O157 モノクローナル抗体 (No.1061 ; ViroStat 社) を含む PBS、濃度 1000 μ g/mL で抗ノロウイルス GII.4 モノクローナル抗体 (P3B11 ; abcam 社) を含む PBS、である。ノロウイルス高感度検出のためのサンドイッチ法のシグナル増幅プローブとして、ウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein: VBP) を用いた。実験には濃度 70 μ g/mL で VBP を含む PBS を用いた。このように作製した、抗体が固定化された高屈折率ガラス (センサチップと称す) に PDMS 流路 (容積 6 μ L) を重ね、フローセル型センサとした。これを光導波路分光装置 (S-SPR-6000 ; システムインスツルメンツ

株式会社) に固定し、マイクロシリンジポンプ (MSPE-1 ; アズワン) を用いてセンサにサンプル溶液を供給した。サンプル溶液には非病原性大腸菌 O157:H7 (ATCC 700728) およびノロウイルスのウイルス様粒子 (NoVLP) を加えた。センサチップ上で生ずる抗原抗体反応は、SPR スペクトルの最大共鳴波長のシフト量を用いて定量した。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

本研究では、市販の抗 O157 抗体および抗ノロウイルス抗体を用いた病原微生物 SPR バイオセンサを開発した。このセンサを用いることで定量的に大腸菌を検出でき、検量線を作成できた。ノロウイルスに関しては、シグナル増幅プローブとして VBP を使ったサンドイッチ法により、センサシグナルを 4 倍に増幅できた (図 1)。今後はさらなるセンサの改良 (例えばセンサシグナルの安定性向上、定量下限値の低下など) を行う。

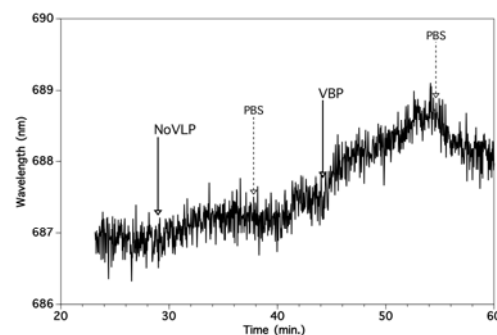


図 1. ノロウイルス用センサのセンサグラム

※その他・特記事項 (Others) : なし

共同研究者等 (Coauthor) :

三宅亮 (広島大学)、佐藤旦 (広島大学)

論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

1. 坂榎 有紀恵ら 第 49 回環境工学研究フォーラム
2. 坂榎 有紀恵ら 日本分析化学会第 61 年会
3. 佐藤久ら 水環境学会シンポジウム