

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06205

研究課題名（和文）ナノポアを利用したウイルスの電気物性評価とウイルスセンサーへの展開

研究課題名（英文）Quantitative analysis of virus particles using nanopore-based resistive pulse sensing technique

研究代表者

楊路（Yang, Lu）

東京工業大学・工学院・研究員

研究者番号：60757392

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナノポアセンシング技術により単一ウイルス粒子レベルでウイルス物性の計測を行い、TRPS技術のウイルスセンシングへの応用性を実証した。実験では、電流パルスの高さと頻度からウイルスの粒度分布と濃度の測定に成功した。懸濁液中のウイルス粒子濃度とブランクエッセイの結果に基づき、実際に存在している粒子の数と感染性のある粒子の数の比率を算出することによってウイルスサンプルの感染性の評価ができた。さらに、ウイルス粒子のナノポアを通過するスピードからゼータ電位の測定に成功した。粒子サイズとゼータ電位を抽出し、種類毎にクラスター化することでウイルスを同定できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we measured the physical properties of viruses on a particle-by-particle basis using Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) technique, and the results demonstrated the feasibility of TRPS for virus sensing. First, the particle size distribution was obtained from the magnitude of resistive pulse signal. Then, the total particle concentration was determined from the translocation frequency of particles, and the infectious titer was carried out to obtain the ratio of total to infective virus particles that is capable of indicating the infectivity level of virus sample. Finally, the zeta potential used to evaluate the stability of colloid system was also measured from the translocation rate of particles. In addition, we tried to plot the bivariate histogram based on the diameter and zeta potential of viruses, and every virus showed different clusters. This result revealed that it is possible to discriminate between various viruses.

研究分野：ナノバイオセンシング

キーワード：ナノポア 電気抵抗センシング ウイルスセンシング

1. 研究開始当初の背景

近年、MERS やエボラ出血熱などのウイルスによる感染症が次々と広まり、人々の健康と生命を脅かしつつある。一方で、ウイルス療法 (例えば癌治療に用いる腫瘍溶解性ウイルスや遺伝子治療に用いるウイルスベクター) は新たな疾患治療対策として注目されている。従って、ウイルスのセンシングは感染予防と疾患治療の上で極めて重要である。ウイルスは宿主細胞へ侵入し、自己を複製させ増殖する数十~数百ナノメートルの構造体で、蛋白質の殻 (カプシドとも呼ばれる) とその内部に入っている核酸からなっている。ウイルス粒子の検出には、透過型電子顕微鏡での可視化と定量化と、生化学反応を利用したプラークアッセイや ELISA や PCR などの既存の方法がある (Heider, S. et al., *Virology* 462-463 (2014) 199-206)。これらの手法は特異的な一方で、時間も手間もかかり一部の専門家しか扱うことができない技術であったため、これらに替わる簡便な検出法が求められている。

最近、コールターカウンター方式と呼ばれる電気的な計測法は新規センシング技術として、エクソソームやバクテリアなどの生体サンプルの検出への応用が展開されている。この計測法の原理は、ナノメートルスケールの貫通孔を持つメンブレンを用い、粒子が電解質溶液の中に分散している懸濁液をポアに流す際の電気抵抗を計測することである。粒子がポアを通過すると、その体積分の溶液が置き換えられ、ポアの電気抵抗が増加する。一定電圧を印加する場合、電気抵抗の変化は電流パルスに反映され、パルス高・幅・頻度の解析によって粒子の粒度分布や数が得られる (図 1)。このように粒子を 1 個ずつカウントするため、ラベルフリー・高速・高分解能・高感度検出が可能となった。ナノポアの構成材料は、蛋白質、ガラス、SiN、PET などが挙げられるが、市販の qNano というナノポアデバイスはポリウレタン製のチューナブルポアを使用しており、特に注目を集めている。qNano は測定粒子サイズに応じてポアサイズを調整できるため、検出範囲が広がっていくとともに、ポアの目詰まりも有効に防ぐことができるなどの利点を有している (Kozak, D. et al., *Nano Today* (2011) 6, 531-545)。ナノポア構造を用いたバイオセンシング技術は、DNA のシーケンシングを中心に活発化しているが、ウイルス検出への応用の視点からの研究が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、ナノポアセンシング技術により単一ウイルス粒子レベルでウイルスの計測を行うことで、ウイルス検出への応用性を検討する。さらに、ウイルスのサイズやゼータ電位などの物性データを元に、ウイルス粒子の同定の可能性を明らかにする。

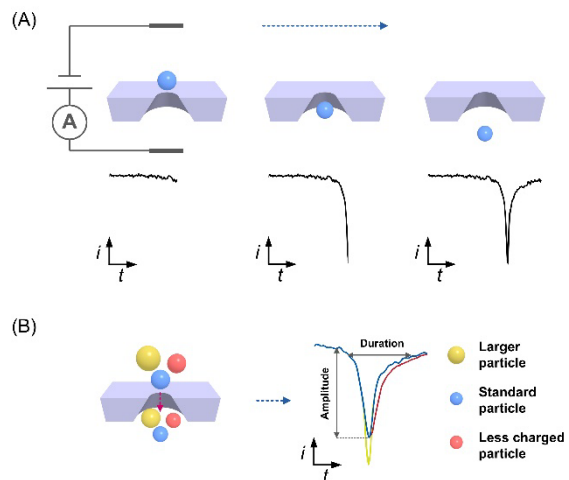


図 1. ナノポアセンシング法の概略図

3. 研究の方法

qNano ナノポアデバイスを用いて単一ウイルス粒子レベルでウイルスサンプルの粒径、濃度、ゼータ電位のセンシングを行う。電流パルス高 (電気抵抗の変化 ΔR) は通過する粒子の体積に比例しているため (式 1 (円筒形ポアの場合))、サイズが既知であるカルボキシル化ポリスチレン標準粒子を用いてウイルス粒子をキャリブレートすることによって、ウイルスの粒度分布が求められる。ナノポアを通過する際の粒子のフラックス (J (個/m²/s)) は主に電気泳動流 (J_{eph}) と電気浸透流 (J_{eo}) と対流 (J_{pd}) が駆動する部分からなっている (式 2)。対流が駆動する粒子のフラックスから懸濁液中の粒子濃度が得られ (式 3)、電気泳動流と電気浸透流から粒子のゼータ電位が得られる (式 4)。

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{d^3}{D^2 L} \quad (1)$$

$$J \approx J_{eph} + J_{eo} + J_{pd} \quad (2)$$

$$J_{pd} = \frac{3D_s \Delta P}{32\eta \left(\frac{L}{D_L - D_s} \right)} C \quad (3)$$

$$J_{eph} + J_{eo} \approx \frac{C\varepsilon}{\eta} (\zeta_{particle} - \zeta_{pore}) E \quad (4)$$

d : 粒径 C : 粒子の濃度 L : ポアの高さ
 D_s : ポアの上側直径 D_L : ポアの下側直径
 ΔP : ポア両側の圧力差 η : 電解液の動粘度
 ε : 電解液の誘電率 ζ : ゼータ電位 E : 電界強度

アデノウイルスはヒト感染性であり、風邪症候群を起こす病原ウイルスの一つとしてよく知られている。本研究ではアデノウイルスを主な対象として用いてウイルスサンプルの粒度分布、濃度、ゼータ電位の測定を実施した。

4. 研究成果

(1) ウイルス粒子の粒度分布を測定した。実験では、ポアサイズ約 100 nm のナノポアを

使用し、ポア上側のアップセルにウイルスを分散させた PBS (塩濃度 137 mM) 懸濁液を垂らし、下側のボトムセルを PBS のみで満たした後、DC 電圧と圧力をかけて粒子をナノポアに通過させ、電流パルスモニタリングした。必要に応じて電圧、圧力とポアサイズを調整し、500 個以上の粒子をカウントした。全く同じ条件で平均直径 114 nm のポリスチレン標準粒子 (CPC100) を測定し、キャリブレーションを行った。アデノウイルスのカプシドは直径約 80 nm の正 20 面体の球形粒子と知られているが、測定した結果、アデノウイルスの平均粒径は 82 ± 9 nm ($n=497$) であり、データの信頼性を示した。さらに、図 2 に示すようなシャープな粒径分布から、ウイルスサンプルはよく分散している状態で顕著な凝集が見られないことがわかった。

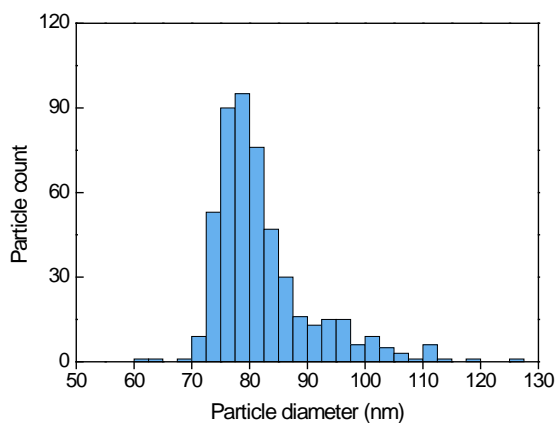


図 2. アデノウイルスの粒径分布

(2) ウイルス懸濁液の粒子濃度を測定した。対流が駆動する粒子のフラックスは懸濁液中の粒子濃度に比例しているため、マルチプレッシャー法により粒子濃度を求めた。粒径の測定と同様に、濃度既知のポリスチレン標準粒子を用いてキャリブレーションを行った。図 3 に示すように、粒子のカウントスピードとかけられていた圧力は線形な関係となる (相関係数 0.99)。標準粒子とウイルスそれぞれのスロープを比較することによって、懸濁液中のアデノウイルス粒子の濃度が得られた (1.2×10^{12} 個/mL)。

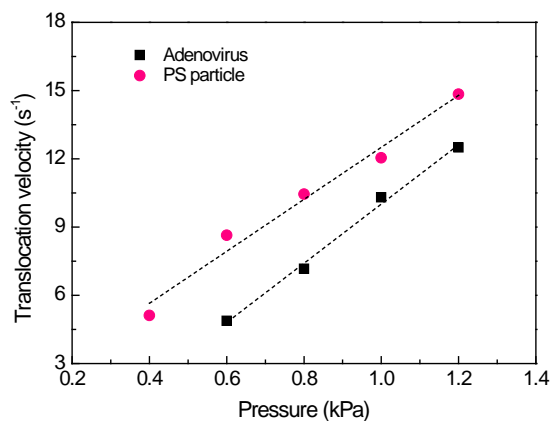


図 3. 粒子のカウント速度 VS 圧力

さらに、HEK293 を宿主細胞として、アデノウイルスを宿主に感染させてプラークアッセイを行った。計算した結果、ウイルス懸濁液の濃度は 4.3×10^9 pfu/mL であるが、これは感染性を有するウイルス粒子の数だけを反映している。ナノポアセンシングの結果と比較して実際に存在しているウイルス粒子の数と感染性のある粒子の数の比率は約 279 であり、ウイルスサンプルの感染性のレベルを把握することができた。

(3) ウイルス粒子のゼータ電位を測定した。ゼータ電位は液中の粒子の分散の安定性や壁面への粒子の吸着性を検討する上で重要なポイントとなっている。実験では、粒子がナノポアを通過する際に電気泳動流と電気浸透流が駆動するフラックスから、各粒子のゼータ電位が得られた。粒径の測定と同様に標準粒子を用いてキャリブレーションを行った後、マルチボルテージ法により粒子のゼータ電位を測定した。計算したアデノウイルス粒子の平均ゼータ電位は -17.5 ± 2.5 mV ($n=497$) であり (図 4)、マイナス電荷のアデノウイルスは PBS (pH7.4) 液中にある程度凝集しやすい傾向があると予測できる。さらに、以上の測定データからウイルスの粒子サイズやゼータ電位を抽出して整理すると、図 5 に示すように、種類毎にクラスター化することでウイルスを同定できる可能性が示唆された。

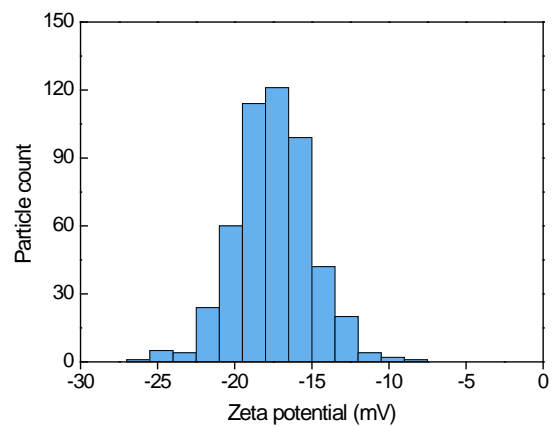


図 4. アデノウイルスのゼータ電位分布

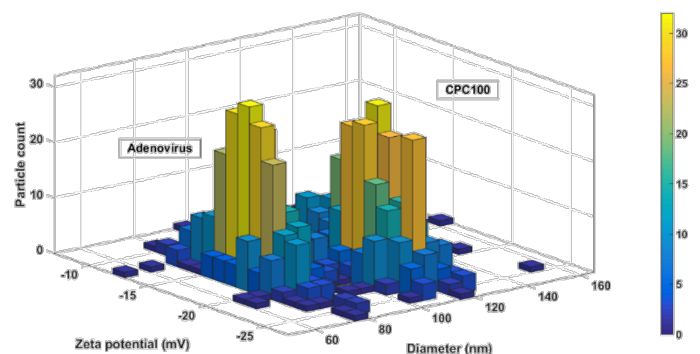


図 5. アデノウイルスの粒径とゼータ電位の二変量ヒストグラム

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① L. Yang, T. Yamamoto. Quantification of virus particles using nanopore-based resistive-pulse sensing techniques. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1500. (査読有)
DOI: 10.3389/fmicb.2016.01500

[学会発表] (計 1 件)

- ① L. Yang. Quantitative analysis of viral particles using tunable resistive pulse sensing technology. 2016 AIChE annual meeting, San Francisco, CA, USA, 11/15, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 路 (Yang Lu)

東京工業大学・工学院・研究員

研究者番号 : 60757392