

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18318

研究課題名(和文) ウイルスの高精度検出を可能にする糖鎖固定化単分散ポリマー粒子のワンポット合成

研究課題名(英文) One-pot synthesis method of sugar-immobilized monodisperse polymer particles for high-accuracy detection of viruses

研究代表者

山内 紀子 (Yamauchi, Noriko)

茨城大学・理工学研究科(工学野)・助教

研究者番号：20598106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：環境低負荷なソープフリー乳化重合を用い、糖(グルコース)を表面固定化したポリメタクリル酸メチル(PMMA)微粒子のワンポット合成に成功した。本手法の特徴は、オクチル-D-グルコピラノシド共存下でソープフリー乳化重合を行うことで、疎水性のオクチル基がアンカー(錨)となってPMMA粒子に埋め込まれる一方で、親水性のグルコース部を水溶液と接する粒子表面に露出させることができることである。グルコースと特異吸着するタンパク質であるコンカナバリンA(ConA)の吸着により、生成粒子表面にグルコースが存在することを確認している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、微粒子の高機能化に関する研究は多く報告されているが、多段階操作や毒性の高い試薬を必要とすることが多い。本合成法は、粒子サイズが均一なポリマー粒子の形成と粒子表面への糖固定化を、温和な条件下、水溶液中で一段階で行える簡便かつ安全な手法である。今後、本技術を応用して、種々のウイルスを検出可能な粒子合成を進め、感染初期のウイルスがより少ない段階で、ウイルス感染を正確に判断する診断技術への適用を目指していく。

研究成果の概要(英文)：By using glucose bearing an octyl group with high affinity to polymethylmethacrylate (PMMA), glucose units were successfully immobilized on monodisperse submicron-sized PMMA particles by a one-pot soap-free emulsion polymerization. The most noteworthy characteristic of the present method is that the glucose units were incorporated into the PMMA matrix simply by adding octyl-D-glucopyranoside when the polymerization of MMA was initiated. The presence of the immobilized glucose components on the particle surface was proven by the specific affinity for concanavalin A (ConA). Due to the hydrophobic nature of the PMMA matrix, the relatively hydrophilic glucose components tend to be oriented toward the outer aqueous phase, giving rise to the markedly increased adsorption of ConA, where the nonpolar octyl tail acts as the anchor to the relatively hydrophobic polymeric matrix.

研究分野：材料化学工学

キーワード：糖鎖固定化微粒子 ポリマー粒子 ソープフリー乳化重合 ワンポット合成 水相重合 単分散 ウィルス検出 蛍光

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的大流行を引き起こす感染症の広がりを抑制するためには、病原体の保有者（または保有動物）を可能な限り早期発見し、迅速に適切な施策・治療を実行しなければならない。そのためには、感染初期の病原体の量が極めて少ない時期に、感染を正確に判断する診断技術が求められる。

一方、科学技術の進歩に伴い、ナノ～マイクロサイズの微粒子の高機能化が進んでいるが、それに伴って、微粒子合成手法が複雑化している。微粒子の応用を見据えたとき、粒子表面および内部を精密に制御可能であるとともに、できる限り安全で簡便な手法で、かつ幅広く応用展開できる微粒子合成プロセスの確立が必須である。

2. 研究の目的

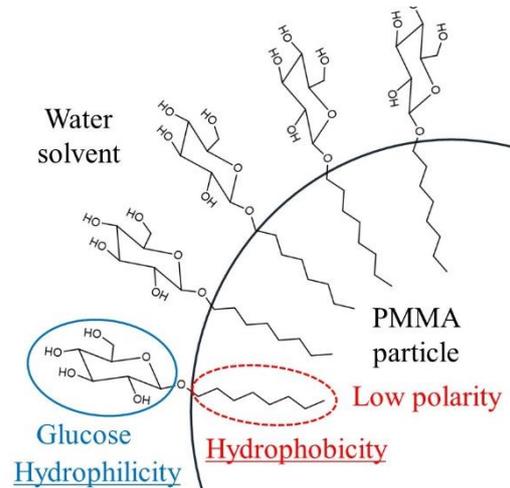
インフルエンザなどの感染症の拡大を抑制するためには、感染初期のウイルスが微量な検体に対する、迅速かつ正確なウイルス有無の判定が望まれる。本研究では、「糖鎖」のウイルス認識能を利用して、検体中のウイルスの検出・濃縮・分離操作を簡便かつ精密に行うことができる「糖鎖固定化ポリマー微粒子」の新規合成法の確立を目指している。

高効率・高精度でのウイルス検出のためには、糖鎖がポリマー微粒子表面に高密度で固定化されるとともに、粒子の粒径均一性が高い（単分散である）ことが求められる。糖鎖を密に固定化した単分散ポリマー微粒子を水溶媒中でのクリーンプロセスで合成する手法を確立し、感染症治療をはじめとする医療・バイオ分野の発展に広く貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

糖鎖固定化ポリマー微粒子の新規合成法の確立にあたり、モデル糖としてグルコピラノシド（グルコース）をもつ、オクチル- β -D-グルコピラノシド（オクチル- β -D-glc）を用い、糖固定化ポリマー粒子の作製条件を精査した。糖固定化ポリマー粒子の作製法としては、環境低負荷なソープフリー乳化重合を用いた。ここで、糖鎖固定化法としては、カルボキシ基などの官能基を表面にもつ粒子を合成後、糖鎖を共有結合により固定化する手法が考えられるが、化学反応の際、糖鎖骨格部位が損なわれやすい。また、静電相互作用を利用した物理吸着では、粒子表面に吸着した糖鎖がはずれやすいという問題がある。そこで本研究では、疎水性側鎖をもつ糖を予め分散させた水溶媒中に、モノマーおよび重合開始剤を加えて重合することにより、親水性の糖が粒子表面に存在する糖固定化ポリマー粒子の作製を試みた（Scheme 1 に糖固定化ポリマー粒子の模式図）。

Fig. 1 に作製手順を示す。モノマーとしてメタクリル酸メチル (MMA)，重合開始剤として過硫酸カリウム (KPS) を用いた。粒子表面への糖固定化の確認には、 β -D-glc と特異吸着するタンパク質 Concanavalin A (ConA) を用いた。さらに、粒子のタンパク質特異吸着能を評価するため、 β -D-glc と特異吸着性のないタンパク質 Wheat Germ Agglutinin (WGA) との比較をした。



Scheme 1 Illustration of the sugar-immobilized PMMA particles.

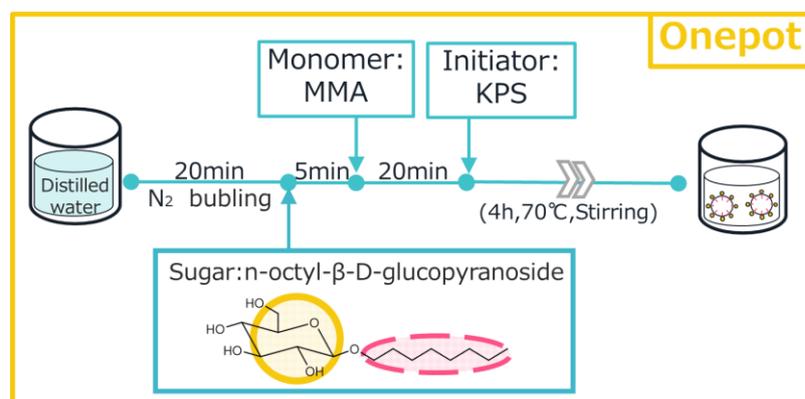


Fig. 1 Preparation scheme of the sugar-immobilized PMMA particles by soap-free emulsion polymerization.

4. 研究成果

Fig. 2に糖無添加および糖濃度を4 mM として重合したときの生成粒子の走査型電子顕微鏡 (SEM) を示す。糖濃度4 mM において、糖無添加条件と同様に平均粒径350 nm 程度の単分散粒子が得られた。**Fig. 3** に糖濃度を0 mM~2 mM、 4 mM、 10 mM として重合したときの生成粒子 (12.5 mg) に対する ConA および WGA の吸着量を示す。ConA 吸着量は、糖無添加のとき16 μg であるのに対し、1、2、4、10 mM のときはそれぞれ50、67、89、91 μg となり、糖濃度の上昇とともに ConA 吸着量が増加した。一方、糖添加条件の粒子に対する WGA 吸着量の増加は見られなかった。よって、糖は粒子表面固定化後も ConA と特異吸着を示す性質を保持できたことがわかった。

以上より、ポリマー粒子形成とその粒子表面への糖鎖固定化を並行的に行うワンポット法を確立できた。オクチル- β -D-glc のグルコピラノシド部をウイルスとの特異吸着能を有する糖骨格に変えることにより、種々のウイルスの高精度検出が可能な粒子作製が期待できる。本研究成果は、査読付原著論文 (N. Yamauchi, *et al.*, *Colloids Surf. A*, 580 (2019) 123754) などで報告した。

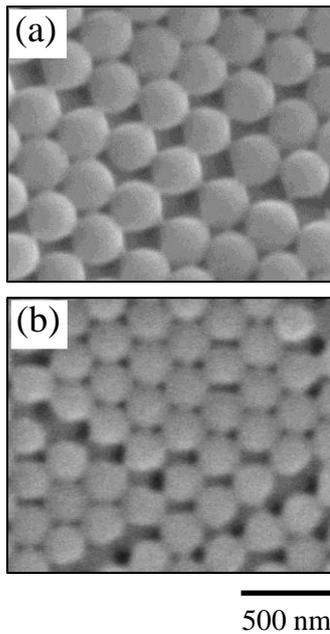


Fig. 2 SEM image of PMMA particles polymerized (a) without octyl- β -D-glucopyranoside and (b) with octyl- β -D-glucopyranoside at 4 mM.

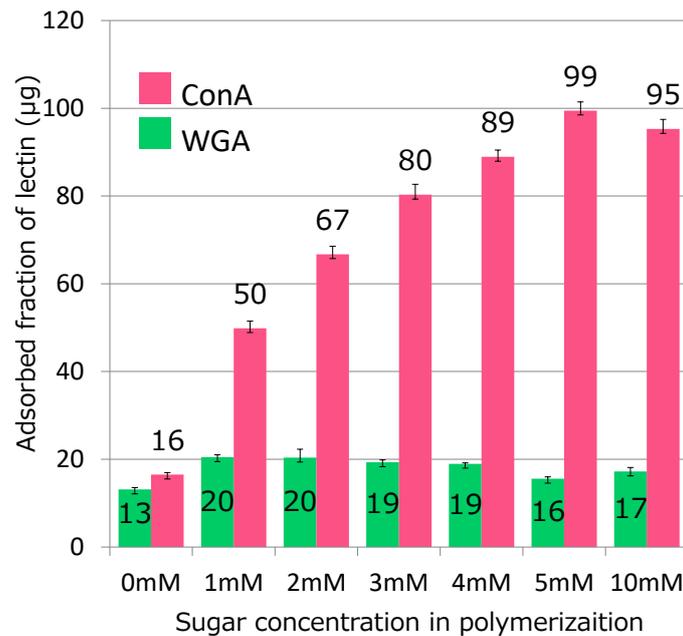


Fig. 3 Adsorbed amount of ConA and WGA on the surface of sugar-immobilized PMMA particles (12.5 mg).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mochizuki Yusaku, Shoji Ryo, Kobayashi Yasukazu, Yamauchi Noriko, Sato Kazunori	4. 巻 53
2. 論文標題 Macro-Porous Ceria Photocatalysts Synthesized Using Silica Nanospheres for Efficient Adsorption and UV-Photocatalysis System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN	6. 最初と最後の頁 120 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1252/jcej.19we201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi Noriko, Iino Haruna, Obinata Shunsuke, Ogata Makoto, Yatabe Risa, Kobayashi Yoshio, Kurumada Kenichi	4. 巻 580
2. 論文標題 One-pot formation of sugar-immobilized monodisperse polymethylmethacrylate particles by soap-free emulsion polymerization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 123754 ~ 123754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaya Kambayashi, Noriko Yamauchi, Kouichi Nakashima, Masaki Hasegawa, Yuki Hirayama, Teruaki Suzuki, Yoshio Kobayashi	4. 巻 1576
2. 論文標題 Silica coating of indium phosphide nanoparticles by a sol-gel method and their photobleaching properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SN Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 1576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s42452-019-1635-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 uki Suga, Kouichi Nakashima, Noriko Yamauchi, Yusuke Yasuda, Toshiaki Morita, Yoshio Kobayashi	4. 巻 925
2. 論文標題 Preparation of high-concentration colloid solutions of metallic copper particles and their use in metal-metal bonding processes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SN Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s42452-019-0845-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山内紀子, 五十嵐達也, 小林芳男, 車田研一	4. 巻 54
2. 論文標題 Fe3O4ナノ粒子の疎水性シリカナノコーティングによる磁気特性の保護	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 塗装工学	6. 最初と最後の頁 274 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山内紀子, 小林芳男	4. 巻 64
2. 論文標題 無極性溶媒への分散と磁気特性の保護を可能にするFe3O4粒子のナノコーティング法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 37 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tayama Mayu, Inose Tomoya, Yamauchi Noriko, Nakashima Kouichi, Tokunaga Masayuki, Kato Chihiro, Hatoyama Keiichiro, Kamei Takashi, Gonda Kohsuke, Kobayashi Yoshio	4. 巻 574
2. 論文標題 Fabrication and dual-modal imaging properties of quantum dot/silica core-shell particles with immobilized single-nanometer-sized gold nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 162 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akitoshi Tokumasu, Tomoya Inose, Noriko Yamauchi, Kouichi Nakashima, Masayuki Tokunaga, Chihiro Kato, Keiichiro Hatoyama, Takashi Kamei, Kohsuke Gonda, Yoshio Kobayashi	4. 巻 297
2. 論文標題 Au nanoparticles coated with chitosan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloid and Polymer Science	6. 最初と最後の頁 1143 ~ 1148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s00396-019-04524-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogata Makoto, Yamanaka Takashi, Koizumi Ami, Sakamoto Mao, Aita Rena, Endo Hiroyuki, Yachi Takehiro, Yamauchi Noriko, Otsubo Tadamune, Ikeda Kiyoshi, Kato Tatsuya, Park Enoch Y., Kono Hiroyuki, Nemoto Manabu, Hidari Kazuya I. P. J.	4. 巻 2
2. 論文標題 Application of Novel Sialoglyco Particulates Enhances the Detection Sensitivity of the Equine Influenza Virus by Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 1255 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.8b00813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi Noriko, Yachi Takehiro, Kurumada Kenichi	4. 巻 553
2. 論文標題 One-pot spontaneous formation of submicron hexane-dispersible silica particles with the aid of amphiphilic reaction solvent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 253 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2018.05.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計30件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 山内紀子, 葉師寺謙介, 田子愛理, 小林芳男, 化学工学会第85年会
2. 発表標題 Ni粒子を内包した糖固定化PMMA粒子の水相合成
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko Yamauchi, Risa Yatabe, Haruna Iino, Makoto Ogata, Yoshio Kobayashi
2. 発表標題 One-pot formation of sugar-immobilized fluorescent polymer particles by soap-free emulsion polymerization
3. 学会等名 Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering congress (APCChE) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田子愛理, 山内紀子, 中島光一, 小林芳男
2. 発表標題 Ni/SiO ₂ ナノ粒子の作製法の開発
3. 学会等名 化学工学会横浜大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪野祥, 米澤岳洋, 山内紀子, 中島光一, 小林芳男
2. 発表標題 液相プロセスによるジルコニアコーティング技術の開発
3. 学会等名 化学工学会横浜大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田山真由, 山内紀子, 中島光一, 猪瀬智也, 徳永正之, 加藤智尋, 権田幸祐, 小林芳男
2. 発表標題 がんの画像診断を目的としたインドシアニングリーン含有ポリ乳酸-グリコール酸共重合体ナノ粒子の開発
3. 学会等名 化学工学会横浜大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内紀子, 谷田部里紗, 飯野春菜, 尾形慎, 小林芳男
2. 発表標題 糖固定化ポリマー粒子形成過程における疎水性蛍光色素の取り込み
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月優作、庄司良、小林靖和、山内紀子、佐藤一則
2. 発表標題 多孔質酸化セリウム複合材料による水中溶存有害物質の吸着・光触媒除去
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内紀子
2. 発表標題 原料を加えて混ぜるだけ！？ - 微粒子形成とその表面機能化を同時に行うワンポット合成法の開発 -
3. 学会等名 第7回「若手研究者・技術者を対象とした工場見学および交流会」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内紀子
2. 発表標題 複雑な世の中だからこそ、シンプルな微粒子合成法にこだわる ~ 表面機能性微粒子のワンポット合成法の開発 ~
3. 学会等名 材料技術研究協会 2018年度討論会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusaku Mochizuki, Ryo Shoji, Yasukazu Kobayashi, Noriko Yamauchi, Kazunori Sato
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of high adsorbability ceria photocatalyst for water treatment
3. 学会等名 The 7th International GIGAKU Conference in Nagaoka (IGCN 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内紀子、谷地起拓、車田研一
2. 発表標題 二種のアルコキシシランの反応速度差を利用した粒子内極性グラデーション
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯野 春菜、磯井 友真、尾形 慎、車田 研一、山内 紀子
2. 発表標題 蛍光染料種の糖固定化PMMA粒子への成長段階での自発的とりこみ
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾形慎、山中隆史、相田玲奈、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、左一八
2. 発表標題 シアロ糖鎖微粒子を用いた馬インフルエンザウイルスの高感度検出
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾形慎、山内紀子、藤田彩華、甲野裕之
2. 発表標題 糖被覆型微粒子の合成と視的識別が可能なウイルス検出システムの開発
3. 学会等名 全国高専フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusaku MOCHIZUKI, Ryo SHOJI, Yasukazu KOBAYASHI, Noriko YAMAUCHI, Kazunori SATO
2. 発表標題 Synthesis of Porous CeO ₂ Photocatalyst Showing Specific Adsorbability for Purification of Water Environment
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2018(WET2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Yamauchi, Shunsuke Obinata, Haruna Iino, Yoshio Kobayashi, Kenichi Kurumada
2. 発表標題 One-pot preparation of micron-sized monodisperse polymer particles with carboxyl groups on their surface
3. 学会等名 ICCCI 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾形慎、山中隆史、相田玲奈、谷地赳拓、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、左一八
2. 発表標題 新規糖鎖微粒子を用いたウマインフルエンザウイルスの高感度検出
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相田玲奈、山中隆史、谷地赳拓、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、左一八、尾形慎
2. 発表標題 糖鎖微粒子の合成とウマインフルエンザウイルスの高感度検出
3. 学会等名 日本生物工学会 北日本支部シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 磯井友真、荒川史弥、尾形慎、車田研一、伊藤博、小林厚志、山内紀子
2. 発表標題 アルキル-β-D-チオグルコシドの単分散ポリマー粒子表面へのワンポット固定化
3. 学会等名 第8回福島地区CEセミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 磯井友真、荒川史弥、山内紀子、尾形慎、車田研一
2. 発表標題 単分散PMMA粒子の形成過程での蛍光色素と機能性糖の同時並行固定化
3. 学会等名 第8回福島地区CEセミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 遠藤博之、相田玲奈、谷地赳拓、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、山中隆史、左一八、尾形慎
2. 発表標題 ウマインフルエンザウイルスを吸着濃縮可能な糖鎖微粒子の合成
3. 学会等名 第3回北関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒川史弥、磯井友真、山内紀子、尾形慎、車田研一
2. 発表標題 アルキル-β-D-グルコピラノシドを表面固定化した単分散PMMA粒子の水相合成
3. 学会等名 第3回北関東磐越地区化学技術フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中澤誠人、坂本舞央、谷地赳拓、山内紀子、車田研一、尾形慎
2. 発表標題 糖鎖固定化有機シリカ微粒子の作製における最適条件検討
3. 学会等名 グライコサイエンス若手フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 遠藤博之、相田玲奈、坂本舞央、谷地赳拓、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、山中隆史、左一八、尾形慎
2. 発表標題 Neu5Gc 2,3LacNAc固定化微粒子のウマインフルエンザウイルス濃縮能評価
3. 学会等名 グライコサイエンス若手フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内紀子、飯野春菜、尾日向駿介、尾形慎、車田研一
2. 発表標題 ウイルスの高精度検出を可能にする糖固定化ポリマー粒子のワンポット形成
3. 学会等名 化学工学会 第49回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山内紀子
2. 発表標題 One-pot aqueous formation of sugar-immobilized monodisperse submicron polymer particles
3. 学会等名 化学系学協会 盛岡大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相田玲奈、坂本舞央、谷地赳拓、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、山中隆史、左一八、尾形慎
2. 発表標題 N-グリコリルノイラミン酸固定化微粒子の合成とウマインフルエンザウイルス濃縮能評価
3. 学会等名 日本応用糖質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相田玲奈、坂本舞央、谷地赳拓、山内紀子、車田研一、尾形慎
2. 発表標題 キトビオース被覆型有機シリカ微粒子の合成とその特性評価
3. 学会等名 日本キチン・キトサン学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾形慎、山内紀子、藤田彩華、甲野裕之
2. 発表標題 糖被覆型微粒子の合成と視的識別が可能なウイルス検出システムの開発
3. 学会等名 平成29年度 全国高専フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾形慎、山内紀子、大坪忠宗、池田潔、加藤竜也、朴龍洙、山中隆史、左一八
2. 発表標題 インフルエンザウイルスを吸着濃縮可能な糖鎖プローブの開発
3. 学会等名 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

茨城大学研究者情報
<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/105/0010401/profile.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----