

ナノ粒子間相互作用による光学的・電気化学的応答
を用いた感染性ウイルスの高感度検出技術の開発

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2021-06-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹村, 謙信 メールアドレス: 所属: |
| URL | https://doi.org/10.14945/00028239 |

博士学位論文

ナノ粒子間相互作用による光学的・電気化学的
応答を用いた感染性ウイルスの高感度検出技術
の開発

2020年12月

静岡大学
大学院自然科学系教育部
バイオサイエンス専攻

竹村 謙信

博士学位論文目次

竹村 謙信

ナノ粒子間相互作用による光学的・電気化学的応答を用いた感染性ウイルスの高感度検出技術の開発

| | |
|--|----|
| 第一章 序論 | 1 |
| 1.1 ウイルス感染症とウイルス検出系の社会的ニーズ | 1 |
| 1.2 ウイルス検出法 | 2 |
| 1.3 ナノ素材とウイルスの検出 | 3 |
| 1.4 金ナノ粒子 (AuNP) の光学的・電気化学的性質 | 4 |
| 1.5 量子ドット (QD) | 6 |
| 1.6 ナノ粒子の高機能化・多機能化 | 8 |
| 1.7 研究目的 | 9 |
| 第二章 金ナノ粒子のプラズモンフィールドを利用した蛍光増強ウイルス検出系 | 12 |
| 2.1 緒言 | 12 |
| 2.2 実験方法及び材料 | 16 |
| 2.2.1 使用試薬・検体・機器 | 16 |
| 2.2.2 金平糖型金ナノ粒子の合成 | 18 |
| 2.2.3 自己組織化単分子膜形成による金ナノ粒子の機能化 | 18 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2.4 | QD の合成 | 19 |
| 2.2.5 | QD への-COOH 基付与および精製 | 20 |
| 2.2.6 | 合成ナノ素材の機能解析 | 20 |
| 2.2.7 | ナノ粒子への抗体修飾 | 21 |
| 2.2.8 | ELISA による抗体修飾の確認 | 21 |
| 2.2.9 | 検出系の最適化 | 22 |
| 2.2.10 | NS1 タンパク質の検出 | 22 |
| 2.2.11 | ジカウイルスの検出 | 22 |
| 2.2.12 | 選択性の確認 | 23 |
| 2.3 | 結果 | 23 |
| 2.3.1 | 4 種の異なる機能化 AuNP の光学的・物理的解析 | 27 |
| 2.3.2 | L-cysteine CdSeTeS core QD の光学的・物理的性質 | 28 |
| 2.3.3 | FT-IR 及び ELISA によるナノ粒子上への抗体修飾確認 | 28 |
| 2.3.4 | 検出系の最適化と最適条件での NS1 | 31 |
| 2.3.5 | ZIKV NS1 タンパク質の検出 | 33 |
| 2.3.6 | 血清中からの ZIKV NS1 タンパク質の検出 | 35 |
| 2.3.7 | 検出系の選択性確認 | 36 |
| 2.4 | 小括 | 37 |
| 第三章 | ナノ粒子複合体によるプラズモン粒子の多機能化とウイルス検出への応用 | 42 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1 | 緒言 | 42 |
| 3.2 | 実験方法及び材料 | 47 |
| 3.2.1 | 使用試薬・機器 | 47 |
| 3.2.2 | 金ナノ粒子-磁性ナノ粒子複合体 (AuNP-MNP)の合成 | 48 |
| 3.2.3 | Anti-NS14-antibody (NS14 Ab) の修飾 | 48 |
| 3.2.4 | MFIA を用いた NoV-LP の検出 | 49 |
| 3.2.5 | 糞便中からの NoV 検出 | 49 |
| 3.2.6 | MFIA の選択性確認 | 50 |
| 3.3 | 結果 | 51 |
| 3.3.1 | 金ナノ粒子-磁性ナノ粒子複合体 (AuNP-MNP)の解析 | 51 |
| 3.3.2 | Anti-NS14-antibody の修飾と LSPR 蛍光増強効果 | 55 |
| 3.3.3 | MFIA を用いた NoV-LP 検出 | 59 |
| 3.3.4 | 糞便中からの NoV 検出 | 62 |
| 3.3.5 | MFIA の選択性確認 | 63 |
| 3.4 | 小括 | 64 |

| | | |
|-------|--|----|
| 第四章 | 高導電性ナノ複合体を用いたディスプレイ電極の作製と白斑病ウイルス (WSSV) 検出への応用 | 65 |
| 4.1 | 緒言 | 65 |
| 4.2 | 実験方法及び材料 | 68 |
| 4.2.1 | 使用試薬・検体・機器 | 68 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.2 | N,S-GQD の合成と抗体修飾..... | 69 |
| 4.2.3 | AuNP-PAni の合成..... | 69 |
| 4.2.4 | ディスポーザブル（ディスポ）電極の作製..... | 70 |
| 4.2.5 | ディスポ電極を用いた WSSV の検出..... | 70 |
| 4.2.6 | ウェスタンブロット法による WSSV の確認..... | 71 |
| 4.2.7 | ディスポ電極の選択性と安定性..... | 71 |
| 4.3 | 結果..... | 72 |
| 4.3.1 | GQD@AuPAni@CSR の光学的・電気化学的性質..... | 72 |
| 4.3.2 | GQD-@AuPAni/@CSR の電気化学応答の最適化及び表面状態の解析..... | 74 |
| 4.3.3 | ディスポ電極を用いた WSSV の検出..... | 78 |
| 4.3.4 | 検出系の安定性・特異性評価..... | 82 |
| 4.3.5 | 臨床検体への応用..... | 88 |
| 4.4 | 小括..... | 91 |
| 第五章 | 光学的・電気化学的シグナルを用いた 2 信号ウイルスの検出..... | 92 |
| 5.1 | 緒言..... | 92 |
| 5.2 | 実験方法及び材料..... | 92 |
| 5.2.1 | 実験方法及び材料..... | 94 |
| 5.2.2 | AuNP-MNP-CNT の調製..... | 95 |
| 5.2.3 | ナノ素材への抗体修飾..... | 95 |
| 5.2.4 | インフルエンザウイルスの 2 信号検出系を用いた検出..... | 96 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.2.5 | 検出系の安定性・選択性確認..... | 96 |
| 5.3 | 結果..... | 96 |
| 5.3.1 | AuNP-MNP-CNT 及び CdSeTeS QD の光学的特性性質及び形状確認..... | 96 |
| 5.3.2 | インフルエンザウイルスの 2 信号検出..... | 101 |
| 5.3.3 | 検出系の選択性確認..... | 103 |
| 5.3.4 | ヒト血清中におけるインフルエンザウイルスの 2 信号検出..... | 104 |
| 5.4 | 小括..... | 105 |
| 第六章 | 総括..... | 107 |
| 6.1 | 金ナノ粒子を応用したナノバイオセンサーと今後の展望..... | 107 |
| 6.2 | 本研究における今後の展望..... | 109 |
| | 謝辞..... | 112 |
| | 参考文献..... | 113 |

第一章

序論

1.1 ウイルス感染症とウイルス検出系の社会的ニーズ

感染症に関する研究の進展によりワクチン開発や衛生面が向上した現代社会において、特に先進国では感染症における死亡率が激減している (Armstrong et al. 1999)。しかし、1970 年以降、種々のウイルスによる新興感染症は未だ世界的に猛威を振るっている (Mehand et al. 2018; Schrag and Wiener 1995; Stramer et al. 2009)。ウイルス感染拡大の要因の一つは移動技術の発達による長距離移動や国から国へ移動など人の移動が容易になったことが挙げられるが、最も特筆すべきことはウイルスは特殊なナノメートルサイズの粒子構造 (図 1.1) であり、連続抗原変異・不連続抗原変異による新型ウイルスが発生しやすく、不顕性感染者によるヒトからヒトへと感染拡散である (Park et al. 2002; Vouga and Baud 2016)。

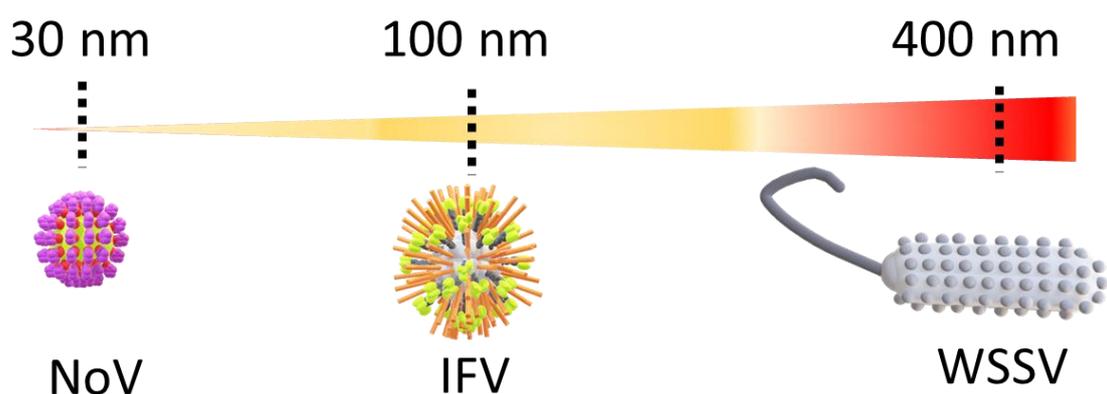


図 1.1 ノロウイルス (NoV)、インフルエンザウイルス (IFV)、白斑病ウイルス (WSSV) のウイルス粒子サイズ

体温測定などの水際対策のみではウイルス感染拡大を防ぐことは難しく、初期感染者や無症状感染者からいち早くウイルスを検出する封じ込め対策が拡散防止には最も有効な手段である (Dai et al. 2009; Yu et al. 2020)。2021 年 11 月発見された新型コロナウイルス (SARS-CoV-19) が世界的に拡散し、4,650 万人が感染し 120 万人の死者の出しており、(2020 年 11 月 2 日現在)。莫大な経済的な損失を与え、ウイルス感染症が及ぼす社会的影響を如実に示している (COVID and Team 2020; Mehta et al. 2020)。

1.2 ウイルス検出法

ウイルスの検出は拡散防止・感染者の明確化・ウイルス種の同定に用いられる。現在主に市販され用いられている検出キットはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用したウイルス核酸 (DNA・RNA) 検出技術、ウイルス特異的抗体を利用した抗原抗体反応によるウイルス抗原検出技術を基盤としている (Murphy and Bustin 2009)。

PCR は、現在ウイルス検出のゴールドスタンダードとして多くのウイルス検出に使用されている。極少量の DNA・RNA から数百万個のコピーを、短時間で増幅することにより高感度かつ高い定量性の下で対象となるウイルスを検出する。現在では増幅プロセスをリアルタイムでモニタリングすることにより定量性能を向上した real-time PCR (RT-PCR) 法 (Mackay et al. 2002) や標的遺伝子の配列から 6 つの領域を選んで組み合わせた 4 種類のプライマーで鎖置換反応を利用して増幅させる方法、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP 法) (Notomi et al. 2000) が開発されている。しかし、高感度であるが対象と異なるウイルスの混在による偽陽性が明記されており、ウイルスの診断においては

病原特定に確実性を持たないこと、高価な設備や熟練技術を必要とするため実施が容易ではないことなど課題を有している。

抗原抗体反応を基盤とする技術では目的のウイルス抗原を、特異抗体で捕捉する反応を酵素反応で検出・定量する方法 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Lequin 2005) や毛細管現象を利用したサンドイッチ免疫反応であるイムノクロマト法 (Ching et al. 1992; Ito et al. 2006) など、既に様々なウイルスを対象に実用化されている。しかし、簡便な方法ではあるが、偽陽性・偽陰性による誤診が生じやすいという技術的課題を抱えている。

1.3 ナノ素材とウイルスの検出

既存技術が有するウイルス検出の課題点を克服するためにナノ粒子を利用した研究は非常に多い (Abraham et al. 2008)。特に貴金属ナノ粒子は光学・化学・物理学的に特殊な性質を有しており、ナノ領域におけるナノ粒子間相互作用の応用により多くの新規ウイルス検出系が開発された (Mokhtarzadeh et al. 2017)。ウイルス検出へ応用するためにはウイルスとの結合を特異的に測定可能なシグナルを生成する必要がある (Upadhyayula 2012)。最も有効な特性はプラズマ中の電子の集団運動による振動を量子化した際、粒子として振る舞うプラズモンと呼ばれる現象であり、光を照射した金属表面の電子振動などにも見られる (Barnes et al. 2003)。応用例としては表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman Scattering: SERS) が挙げられる (Moskovits 2005; Stiles et al. 2008)。通常のラマン散乱は光が物質と相互作用を示し、入射光の波長と異なる散乱光が得られるが、分子識別を行う際、感度が非常に低いことが課題である (Blackie et al. 2009)。しかし、強いプラズモン領域を有するナノ粒子上にて分子のラマン光強度が向上する SERS が発見された (Kneipp et al. 2002)。SERS を利用した場合、

従来技術では不可能であった単分子スケールでの検出が可能であり、分子識別能が格段高い精度を有しており、大きな技術革新をもたらした (Yang et al. 2015)。SERS を用いた分子識別技術は現在では金属イオン検出やウイルス検出にも応用されており、ナノ粒子表面におけるプラズモン現象の多様な応用可能性を示している (Sánchez-Purrà et al. 2017; Zhao et al. 2015)。

1.4 金ナノ粒子 (AuNP) の光学的・電気化学的性質

AuNP は化学的と物理学的に多様な特性を有し、幅広い分野で応用可能なナノ素材として注目されている。AuNP の光学特性、そのサイズに依存する電気化学及び高い化学的安定性は自己組織化、バイオリベリング、触媒作用、電子移動理論、相転移、結晶成長などナノ領域で生じる様々な現象を解明するためのモデルとして AuNP が用いられている (Sardar et al. 2009)。これらの性質は前述したナノ粒子を基盤とするウイルス検出系の作製には非常に有用である。

光学的特性として AuNP は光の照射により、光の振動電磁場が金属の自由電子 (伝導帯電子) の集団的なコヒーレント振動を誘発する (図 1.2) (Grant et al. 2003; Guillon et al. 2007)。この粒子表面付近での電子の振動により、イオン性格子に対する電荷の分極が起こり、光の電場方向に沿った双極子振動が形成されることが知られている (Amendola et al. 2017)。この振動の振幅もプラズモンの一種であるが AuNP では表面に局在することから、局所表面プラズモン共鳴 (LSPR) と呼ばれる。AuNP は非常に強力な LSPR バンドを有しており、LSPR は入射光を強く吸収するため、UV-Vis 分光光度計を用いて吸光度を測定することができる。LSPR バンドの強度と波長は、Mie 理論によって理論的に記述されており、バルク金属と比較して明確な光学的・電子的特性を示すことが知られている (Mie 1908)。

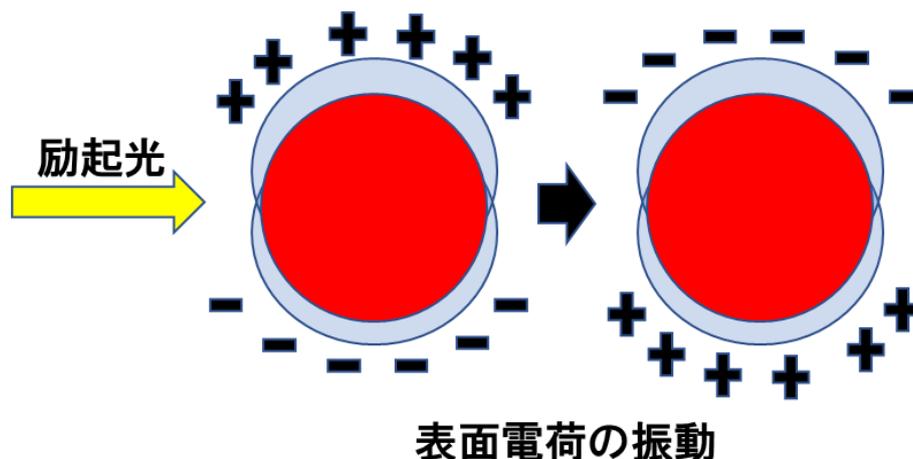


図 1.2 金ナノ粒子表面における局所プラズモン共鳴効果

LSPR は蛍光を有する素材との相互作用により、蛍光素材の蛍光強度を増強・消光することが可能である。蛍光増強作用については LSPR により金属ナノ粒子近傍に形成された近接場光とよばれる電磁波に起因する光電場増強が誘起され、この光電場増強によりナノ粒子近傍に存在する蛍光素材と光の相互作用の確率が増大し、蛍光の増強が生じる。この現象は局所増強効果 (LFEE) と呼ばれている (Feng et al. 2015)。一方、非放射エネルギー移動 (NERET) による蛍光素材から AuNP への電子移動により蛍光強度の強い消光効果が誘起される (Zhang et al. 2014b)。このナノ粒子間相互作用は粒子間距離に大きく依存しており、およそ 16 nm の粒子間距離が維持された場合、最大の蛍光増強効果を得ることができるが、粒子間距離が 4 nm 以下になると消光作用が生じる (Chowdhury et al. 2020a)。LSPR の波長領域が AuNP のサイズ、表面形状または金ナノ粒子近傍の媒体に大きく依存するためこれらの条件についても最適化を行うことで LSPR 蛍光増強効果を最大にすることが可能である (Chen et al. 2008; Nehl and Hafner 2008)。

AuNP の電子的特性は電気化学にもしばしば応用されている (Pingarrón et al. 2008)。電極にコーティングすることで AuNP は非常に高い表面体積比を向上させ、更にその高い電子伝達効率から電極自体の導電性を向上させることが可能である (Guo and Wang 2007)。AuNP 上に DNA プローブを修飾することでウイルス DNA 検出に応用した例も報告されており、バイオセンシングに応用するために電気化学への適応は非常に強力なセンシングツールに成りうる (Seetang-Nun et al. 2013; Zhang et al. 2007)。

1.5 量子ドット(QD)

QD はバルク励起子のボア半径よりも小さい半径を持つ物質であり、量子井戸構造を有する半導体ナノ粒子である (Reimann and Manninen 2002)。半導体では電子エネルギーの満たされた連続領域 (価電子帯) とエネルギー状態が空の連続領域 (伝導帯) との間にエネルギーのギャップ (バンドギャップ) が存在しており、ナノ粒子サイズが小さくなるにつれてバンドギャップが広がり、発光波長が短波長側 (高エネルギー) に移動する (図 1.3) (Baskoutas and Terzis 2006; Leistikow et al. 2011)。コロイド化学の発展と同時に、高い量子効率でを示し非常に長い蛍光寿命を有する素材が報告され、QD の合成研究は著しく発展し、様々な QD が開発された (Huang et al. 2015; Liu et al. 2017)。その光学的特性は主にイメージングやセンシングの分野において非常に重要視されている (Chan et al. 2002; Murphy 2002)。ごく少量の QD が強い蛍光シグナルを示すためにイメージング分野においては目的物質の高輝度体内イメージング、センシング分野においてが標的物質の超高感度蛍光検出が報告されている (Han et al. 2009)。しかし、素材としては主にカドミウム、テルリウム、モリブデン、タングステンなどの重金属 (Akiyama et al. 2007) が用いられ、恒に安全性への問題

が提起されている。また、高量子効率を得る目的で合成難易度が高い有機溶媒中でのホットインジェクション法の利用しており、容易な合成法の開発が模索されている (Williams et al. 2009; Zhang et al. 2014a)。

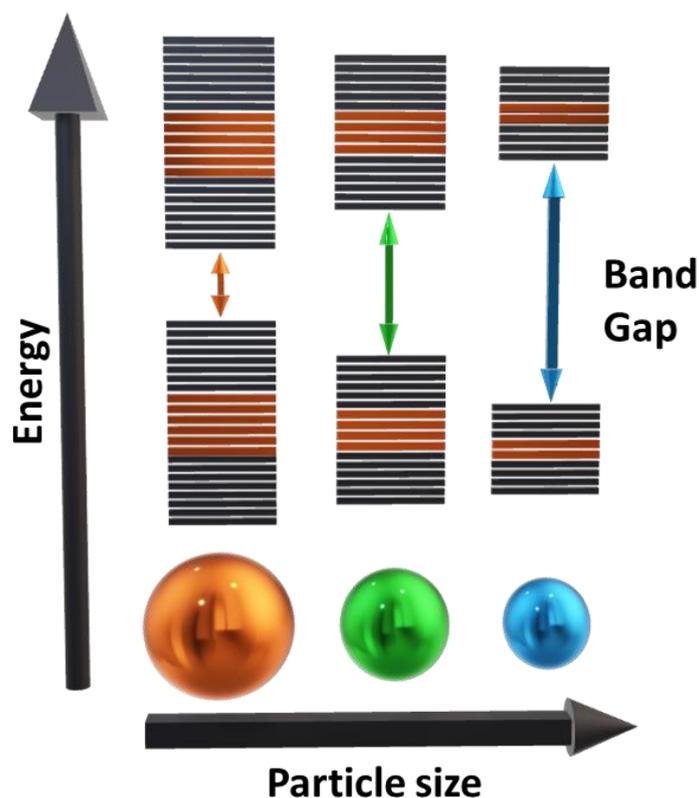


図 1.3 QD の粒子サイズとバンドギャップにおける関連性概要図

安全性の高い QD としてグラフェンを素材とするグラフェン量子ドット (GQD) が注目されている (Peng et al. 2012)。グラフェンは、1 層または数層からなり、大きさはグラフェンの層数に依存している (Yan et al. 2010)。数 nm から 100 nm の範囲で合成が可能であり、化学的にも物理的にも安定で、表面積と質量比が大きい。粒子のエッジにはカルボキシル基をはじめとする官能基があるため水に容易に分散することができるなど、安全性・機能性から非常に有用な素材である (Ritter and Lyding 2009; Wang et al. 2015)。光学的特性は上記

の QD と同様であり、粒子サイズの増加（グラフェン層数や層あたりの炭素原子数）に依存してバンドギャップが減少する (Yan et al. 2011)。また、グラフェンが有する電子移動反応の促進作用は GQD の構造においても保持されており、優れた電気化学的性質を示す (Razmi and Mohammad-Rezaei 2013)。電気化学分野においては電極上に修飾することで電極表面の比表面積増加、導電性の向上が可能であり、マイクロサイズの高性能スーパーキャパシタとしての応用例も報告されている (Liu et al. 2013)。

1.6 ナノ粒子の高機能化・多機能化

異なる性質を有するナノ素材同士を化学的・物理的もしくはコア/シェル構造などの複合体を形成することで多機能もしくは高機能な素材を得ることができる (Komarneni 1992)。ナノ粒子の応用目的に合わせ、複合体をデザインすることは非常に重要である (Caseri 2000)。

高機能化にはポリマーコーティングによるナノ粒子の高度安定化が挙げられる。ポリマーを懸濁した溶媒中でナノ素材を合成し、合成と同時に金ナノ粒子—ポリマー複合体を形成する方法が一般的であるが、高度に均一化したナノ粒子サイズ、形状を得ることは難しい (Rahme et al. 2013)。最も高度にナノ複合体を制御する方法は事前に合成されたポリマーに、事前に作られたナノ粒子を注入する方法である (Corbierre et al. 2004)。高度かつ高安定なポリマーコート複合体は既存のナノ素材が抱える不安定性を大きく改善した (Corbierre et al. 2001)。電気化学的にもポリアニリン中に AuNP を緊密かつ均一に配置することで、電子伝達効率を飛躍的に向上させ、電極の導電性を向上させた例も報告されている (Ganganboina and Doong 2019)。また、ナノ素材のコア/シェル化も目的とする機能の向上に非常に大きな役割を果たす。AuNP の表面電子特性は酵

素様機能（ナノザイム）を示し、電気化学的な応用や比色分析における化学発光を誘起素材として応用されてきた (Ahmed et al. 2016)。この触媒活性を更に向上させたのが AuNP 上への Ag シェル堆積による Ag@Au ナノ複合体である。Ag の薄膜は AuNP 表面と相互作用を示し、より強い電子伝達効率を示す。実際のウイルス検出技術における応用例では複合体形成による反応速度の著しい増加や感度向上が認められた (Khoris et al. 2019)。

複数のナノ素材を組み合わせるにより、2 つ以上の機能を有するハイブリッドナノ複合体の作製が可能となる。代表的な例は光学的性質を持つナノ素材と磁性を有するナノ素材との複合体である。磁性ナノ粒子と QD を組み合わせることで、目的とするタンパク質を夾雑物の中から分離精製し、蛍光の有無の確認をするという 1 ステップ精製が可能となる。

1.7 研究目的

本研究では AuNP が有する光学的・電気化学的性質を利用し、既存のウイルス検出技術が抱える課題を解決しうる新規ウイルス検出系を構築することを目的とし、3 種類の新規ウイルス検出技術を開発した。

第二章では AuNP 上のプラズモン領域が蛍光物質と一定距離に配置されることにより生じる蛍光物質の蛍光増強効果を利用したウイルス検出系を構築した。蛍光増強効果にはウイルス表面上におけるナノ粒子間距離が密接に関係している。安定した蛍光増強効果を得るためにはナノ粒子表面上に修飾する化合物の極性を抑え、夾雑タンパク質の非特異結合や粒子同士の吸着が全く起こらない条件を作り出し、ナノ領域における粒子間相互作用を安定化・極大化させる必要がある。光学的・物理的性質が類似しそれぞれに極性の異なる官能基 (Glutathione : 極性大, L-Cysteine : 極性小) を修飾したウイルス特異的抗体修飾機

能化金平糖型金ナノ粒子を調製し、ジカウイルスを標的ウイルスとして検出を行い、機能化の手法による LSPR 相互作用の安定性・増強効率を評価した。

第三章では偽陰性・偽陽性の可能性を最小化するため、金ナノ粒子を磁性ナノ粒子 (MNP) と複合させ、標的ウイルスを夾雑物から磁気分離し、LSPR による蛍光増強効果を誘起可能な AuNP-MNP を合成し、例年日本で感染性胃腸炎の原因ウイルスとして猛威を振るうノロウイルスの検出に適応した。磁気分離による簡便なウイルス分離と洗浄はこれまで確認されていた夾雑物中における LSPR 蛍光増強効果の減少を最小限に抑えることを可能とした。

第四章では金ナノ粒子が有する電子特性を利用したナノ複合体上へのウイルス結合により生じる電気抵抗値 (インピーダンス、 R_{ct}) の変化を測定する白斑病ウイルス (White spot syndrome virus: WSSV) 検出系を開発した。金ナノ粒子は電子密度が高く、電子伝達効率が優れた素材である。その性質を更に向上させるため、導電性ポリマーであるポリアニリンナノワイヤー中に金ナノ粒子を緊密に配置した金ナノ粒子—ポリアニリンナノワイヤー (AuNP-PAni) と安価かつ高い電気化学的特性を有する N,S-GQD を組み合わせ、新規ナノ複合体 GQD-AuNP-PAni として合成し、オンサイト検出技術への応用可能性を示すために、ディスプレイ電極の開発を構築した。導電性の低いカーボン含有シリコンゴム (Conductive silicon rubber: CSR) を電極素材として効率的なナノ素材のコーティング方法及び構築法を均一化し、電極間で誤差の少ない Ab-GQD-AuNP-PAni/CSR を作成し、WSSV の高感度・迅速検出に成功した。

第五章ではこれまでの研究で得られた AuNP の光学的・物理的性質を基に、1 つの基板上で電気化学的・光学的に標的ウイルスを検出することができる 2 信号型ウイルス検出系を構築し、インフルエンザウイルス A 型の検出に適応した。高い導電性を有する抗体修飾 AuNP-MNP-カーボンナノチューブ (AuNP-

MNP-CNT) 複合体を合成し、ウイルスの磁気分離かつ LSPR を誘導した。更に、インフルエンザウイルス A (H1N1) 特異的な抗体を修飾した QD を調製し、蛍光の測定と電気化学的シグナルの計測により光学的・電気化学的な応答から高感度でインフルエンザウイルスの検出が可能な検出系の構築に成功した。

第六章では、本研究で得られた成果を要約し、AuNP が有する光学的・電気化学的性質のウイルス検出技術への高い応用可能性について言及した。更に本研究を通して目的としてきたオンサイト検出への適応可能性について課題点と現在までの進捗を評価し、今後のウイルス検出技術について展望を述べた。

第二章

金ナノ粒子のプラズモンフィールドを利用した蛍光増強ウイルス検出系

2.1 緒言

LSPR 蛍光増強ウイルス検出系を構築するためにはウイルス添加時における AuNP 及び QD の粒子間距離を適切に保つことが重要な要因となる。溶液中に分散した 2 種の異なる物質を特定の条件下でのみナノスケールで適切な距離に配置するには非常に綿密なセンサーデザインを考える必要がある。ウイルス DNA/RNA の検出においてはプローブの長さを調節し、標的ウイルスの DNA/RNA とのハイブリダイゼーション後にナノ粒子同士が適切な距離を保つようなセンサーデザインを組むことができる (Mei and Tang 2017)。実際の応用例では血清型 4 種の判別と検出が必要なデングウイルス (DENV) を対象に、標的ウイルス DNA を修飾した AuNP と QD が DENV 血清型 1,3 では蛍光増強効果、DENV 血清型 2,4 では蛍光消光効果を誘起することにより血清型の判別を高い検出感度ともに実現している (図 2.1 及び図 2.2) (Chowdhury et al. 2020b)。

本研究では、抗原抗体反応によるウイルスの抗原検出において AuNP と QD の粒子間距離を保持し、LSPR 蛍光増強効果を誘起可能な検出系を構築することを目的とした。標的ウイルス抗原としてジカウイルス (ZIKV) の非構造タンパク質 1 (NS1) を用いた。NS1 タンパク質は、42 kD の大きさを持ち、ホモ二量体構造を形成し、ウイルス感染の主要な抗原マーカーの一つである (Brown et al. 2016)。この分子は ZIKV の NS1 タンパク質は他のフラビウイルス

ス種の NS1 との交差反応性を示さず、検出マーカーとして非常に適したタンパク質である (Song et al. 2016)。

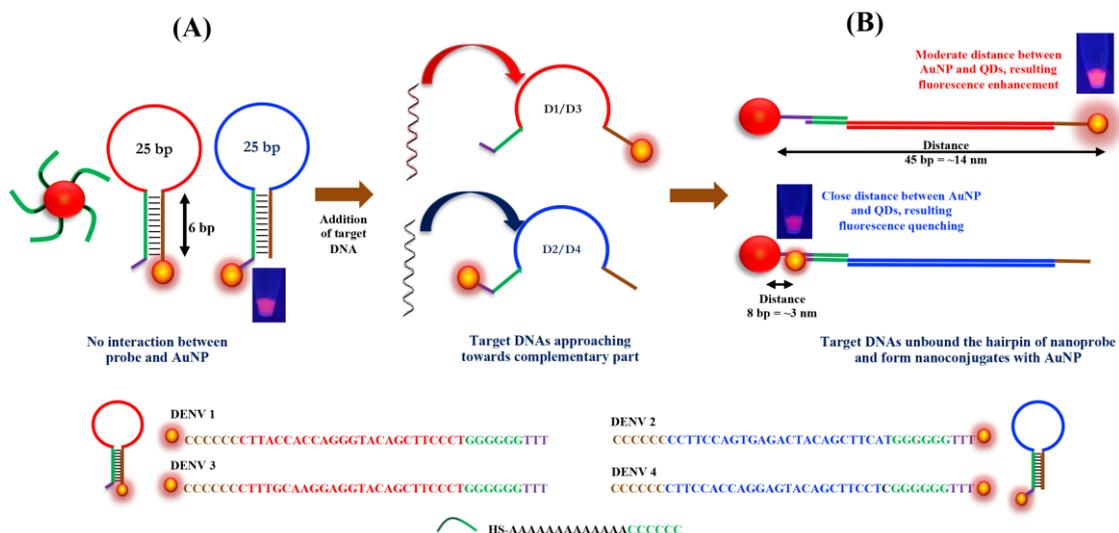


図 2.1 AuNPs とヘアピン ssDNA-CdSeTeS QD による DENV DNA の検出メカニズムの模式図。(A) DProbe1(赤色)および 2 (青色) のヘアピンループとステム領域はそれぞれのデングウイルス血清型に相補的な DNA 配列 (25 塩基) 及び 6 つのポリグアニン (ポリ-G) とポリシトシン (ポリ-C) によって構成されたプローブであり、片側は CdSeTeS QDs と共有結合している。AuNP は、プローブの緑色と相補的であるポリシトシン (ポリ-C) で修飾されている。ハイブリダイゼーションにより AuNP-ウイルス DNA-CdSeTeS の構造をとる。(B) AuNP-dsDNA-CdSeTeS 間の距離は DENV 1/3 血清型の存在下では蛍光増強、および DENV 2/4 血清型の存在下では消光効果生じるようにデザインされている (Chowdhury et al. 2020b)。(掲載許可取得済み)

プラズモニック金平糖型金ナノ粒子 (Plasmonic confetto shape-gold nanoparticle: PC-AuNP) からの LSPR 効果を利用して、量子ドット (QDs)

の蛍光強度を増強する新規 LSPR 蛍光増強検出系を開発した (図 2.3)。極性が異なる 4 種類の化合物 (Glutathione: GSH, Thioglycolic acid: TGA, Mercaptopropionic acid: MPA, L-Cysteine) より安定性の高い機能化 PC-AuNP (SAM-AuNP) を調製し、ZIKV の NS1 検出に応用した。本検出系の LSPR 蛍光増強効果は多くの夾雑タンパクが存在する溶液下においても安定した LSPR 蛍光増強効果を誘起した。

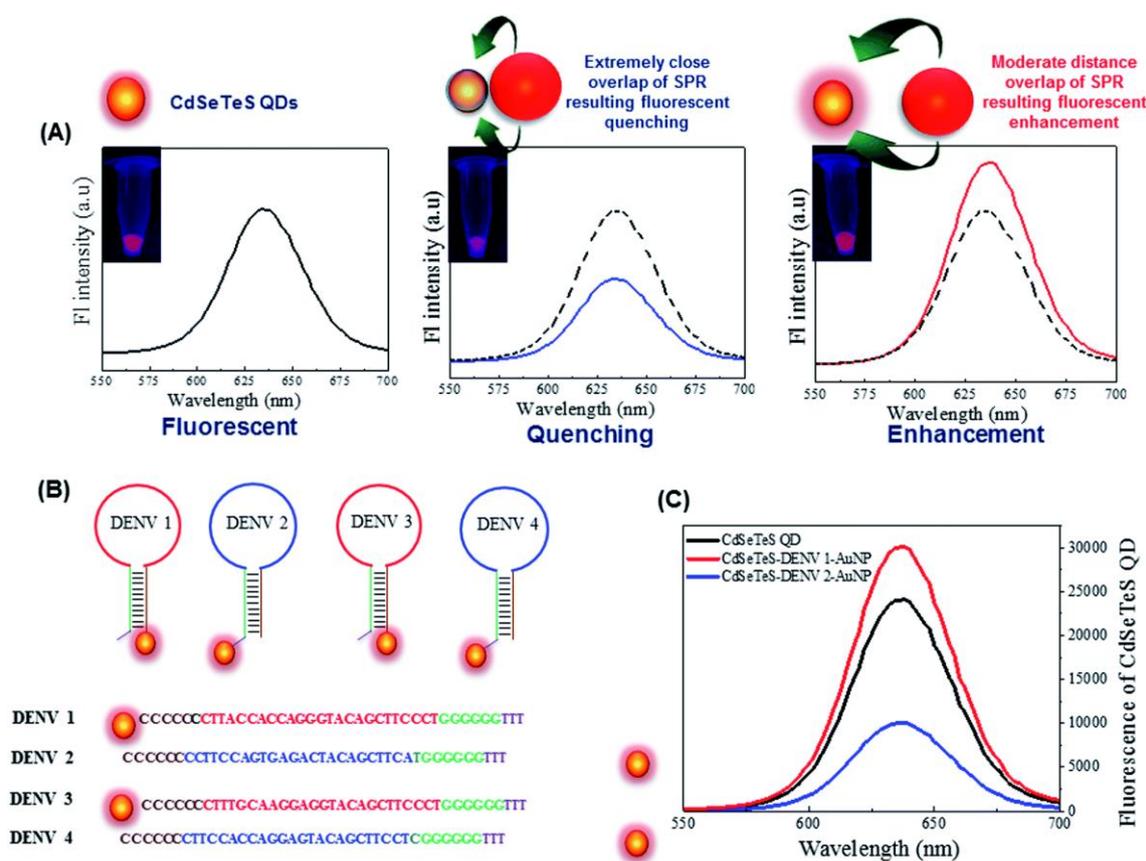


図 2.2 (A) CdSeTeS QDs と AuNP 間の距離依存的 LSPR 効果の模式図、(B) センシングのための 4 種類のヘアピンプローブの調製の模式図、および(C) CdSeTeS QDs、および CdSeTeS QDs-dsDNA-AuNP ナノ複合体の蛍光特性を DENV 1 および DENV 2 で表現した (Chowdhury et al. 2020b)。(掲載許可取得済み)

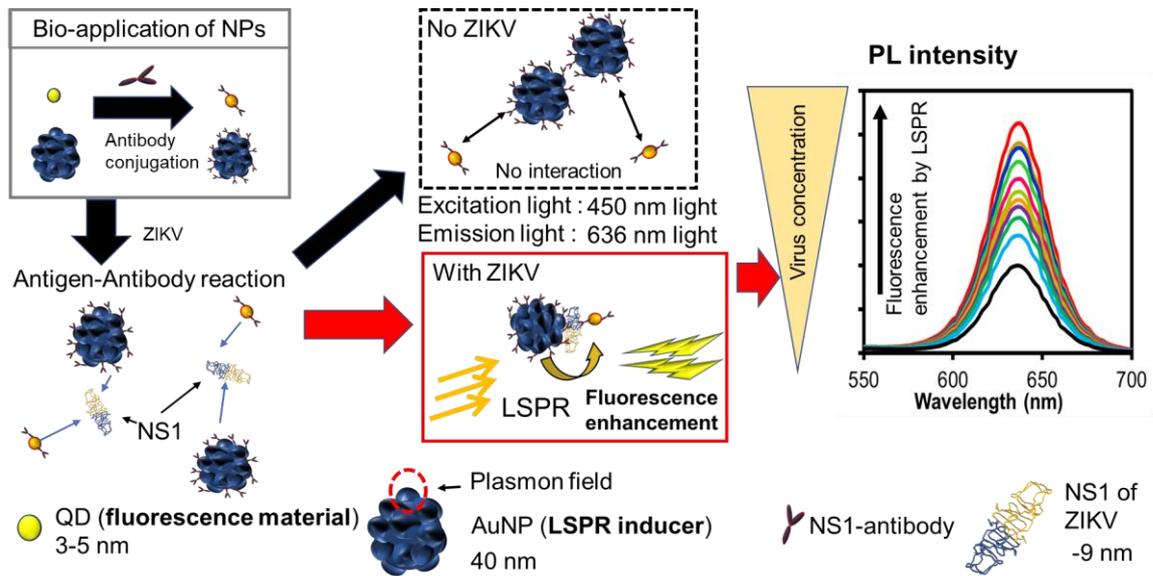


図 2.3 LSPR 増幅免疫蛍光バイオセンサーの概要図。ウイルス特異的な抗体を修飾した QD 及び AuNP が標的 NS1 タンパクに結合すると QD-NS1-AuNP サンドイッチ構造をとり、適切な粒子間距離を維持するため、ウイルス濃度依存的な蛍光増強効果が誘起される。

2.2 実験方法及び材料

2.2.1 使用試薬・検体・機器

使用試薬

Acetone (Wako, Osaka, Japan)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, Tokyo, Japan)

Cadmium oxide (CdO) (Sigma, Tokyo, Japan)

Chloroform (Wako, Osaka, Japan)

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Sigma, Tokyo, Japan)

HAuCl₄ (Sigma, Tokyo, Japan)

HEPES buffer (Wako, Osaka, Japan)

Hydrochloric Acid (Wako, Osaka, Japan)

Hydrogen peroxide (Wako, Osaka, Japan)

L-Cysteine:L-Cyst (Nacalai tesque, Japan)

L-glutathione (GSH) (Sigma, Tokyo, Japan)

3-Mercaptopropionic acid (3-MAA) (Sigma, Tokyo, Japan)

Methanol (Wako, Osaka, Japan)

Hexadecylamine (HDA) (Sigma, Tokyo, Japan)

N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS) (Sigma, Tokyo, Japan)

1-octadecene (Sigma, Tokyo, Japan)

Oleic acid (Wako, Osaka, Japan)

Selenium (Se) (Sigma, Tokyo, Japan)

Sodium acetate (Wako, Osaka, Japan)

Sorbitan monolaurate (Tween 20)

Sulfur (S) (Sigma, Tokyo, Japan)

Sulfuric Acid (Wako, Osaka, Japan)

Sodium acetate (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)

Potassium hydroxide (Wako, Osaka, Japan)

PBST: 1 × PBS buffer + Tween 20 (0.1 (w/v)%)

Tellurium (Te) (Sigma, Tokyo, Japan)

Tetramethylbenzidine (TMBZ) (Dojindo, Kumamoto, Japan)

Thioglycolic acid (Sigma, Tokyo, Japan)

Trioctylphosphine (TOP) (Sigma, Tokyo, Japan)

Trioctylphosphine oxide (TOPO) (Sigma, Tokyo, Japan)

※以後使用される同名試薬は断りがない限り同じメーカーより購入したものである。

使用抗体・ウイルスサンプル

Anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

Mouse anti-NS1 antibody (2786064, Millipore, USA)

Zika virus recombinant NS1 antigen (Native antigen, Oxford, UK)

ZIKV strain PRVABC-59 森田 公一教授（長崎大、熱帯医学研究科）より分譲

Influenza viruses A/California/07/2009 (H1N1) (Vircell Microbiologists, Granada, Spain)

Influenza viruses A/Netherlands/219/03 (H7N7) (Vircell Microbiologists, Granada, Spain)

Norovirus-like particles (NoV-LPs) (Sf-9 細胞で発現)

使用機器

透過型電子顕微鏡 (TEM) (JEM 1400Plus)

Dynamic light scattering (DLS) (Zetasizer nano series, Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom)

Microplate reader (IM200, Infinite M200, TECAN)

ハイブリット冷却遠心機 6200 (KUBOTA, Tokyo, JAPAN)

マイクロプレートリーダー (680, BIO-Rad, Tokyo, JAPAN)

マイクロプレートウォッシャー (1575, BIO-Rad, Tokyo, Japan)

X-Ray Diffractometer (XRD) (RINT ULTIMA XRD, Rigaku Co., Tokyo, Japan)

FT/IR spectrometer (FT/IR-6600, JASCO, Tokyo, Japan).

※以後記載される同名の機器は断りがない限り同じ機器を用いている。

2.2.2 金平糖型金ナノ粒子の合成

36 ml の超純水と 4 ml の HEPES buffer (100 mM, pH 7.4)、1 ml の塩化金(Ⅲ)溶液 (20 mM) を混合し、室温・暗所条件下で 30 分静置し、粒子の成長方向をコントロールすることにより、表面に凹凸のある金平糖型金ナノ粒子を合成した (Chen et al. 2010)。合成した金ナノ粒子溶液より還元剤である HEPES を取り除くために遠心分離による精製・洗浄を 3 回行った (7500 g, 4°C, 20 min)。HEPES を含有する上清を除いて得られた沈殿を 5 ml の超純水に再懸濁し、金平糖型金ナノ粒子溶液として以後の実験に用いた。

2.2.3 自己組織化単分子膜形成による金ナノ粒子の機能化

チオール基が有する Au への親和性を利用し、金平糖型 AuNP 上に 4 種類の異なる化合物を修飾した。用いた自己組織化単分子膜 (SAM) 形成用化合物 (GSH, TGA, MPA, L-Cyst) はそれぞれチオール基及びカルボキシル基を含んでおり、酸性の条件下でチオール基の金ナノ粒子上への修飾が促される。そのため、作製した AuNP 溶液に 1 N HCl を加え、pH 2 に調製した溶液を SAM 形成に用いた。金ナノ粒子 1 ml に対し、0.1 M の化合物を 100 μ l 加え室温で 30 min よく攪拌した後、4°C 条件下で一晩静置した。SAM を形成した金ナノ粒子を精製するために用いて遠心分離 (1500 g, 5 min, 20°C) を行い、上清を取り除き、5 ml の超純水に再懸濁した。同条件で遠心分離・再懸濁を 3 回行い、10 ml の超純水に懸濁し、精製した 4 種類の異なる官能基修飾金ナノ粒子溶液を得た。

2.2.4 QD の合成

QD の合成には有機溶媒を用いたホットインジェクション法を用いた (Capek et al. 2009)。三又フラスコ中に 1.3 g (10.1 mmol) CdO、0.6 g HDA、2.23 ml TOP、30 ml oleic acid および 50 ml octadecene を加えた。QD 合成溶液として以下の 4 種を準備し、Se 溶液はサーマルサイ클ラーを用いて使用するまで加熱攪拌した。その他の 3 種は使用するまで攪拌を行った。

1. Se powder (0.3 g(3.8 mmol) and TOPO(1.93 g(5 mmol) in 25 ml octadecene
2. Te powder 0.48 g and 5 mmol(1.93 g) TOPO in 25 ml octadecene
3. ZnO(0.407 g) dissolved in 20 ml oleic acid and 30 ml octadecene
4. Sulphur (0.16 g) and 5 mmol (1.93 g) TOPO in 25 ml octadecene

三又フラスコをマントルヒーターにセットし、リービッヒ冷却管、窒素ガスボンベとのコネクター、温度計をフラスコそれぞれにセットし、攪拌しながら

ら加熱を開始した。窒素ガスによって空気を除きながら 260℃付近まで加熱を行い、三又フラスコ内の溶液が変化したのを確認し、Se 溶液を三又フラスコ内に加え Cd 溶液と反応させた。ここに Te 溶液を加え更に反応させた。三又フラスコ壁面に付着した Te 溶液が溶解したのを確認後、S 溶液を加え 20 min 反応させた。反応溶液から一定量ガラス注射筒を用いて取り出し、100 ml 三角フラスコに移しクリーンベンチ内で冷却し、CdTeSeS core 溶液を冷却した。この QD 溶液にメタノールを加え、QD の沈殿を待ち、上清をデカントで取り除き、ここにアセトンを加え、フラスコの口をパラフィルムで密封し、室温で一晩静置した。

2.2.5 QD への-COOH 基付与および精製

一晩静置した QD 溶液の沈殿を確認し、上清をデカントし、フラスコの半量を目安としてクロロホルムを加え QD を溶解した。QD 溶液を 3.0 g KOH + 40 ml methanol + 2 g L-Cysteine の組成で作製した溶液に加え、30 min 攪拌した後、1.5 h 静置した。上清をデカントし、QD をファルコンチューブに移しアセトンを QD 溶液と 1 : 1 になるように加えた。これを遠心分離 (8500 g 3 min, 室温) し、上清をデカントで取り除いた。ここにクロロホルムを加えしっかりと振り、同様の条件で遠心分離を行った。クロロホルムをデカントにより取り除き、アセトンを加えよく振り、QD の粒子状態を確認した。以降不純物が完全に取り除けるまでクロロホルムとアセトンによる洗浄を繰り返し、不純物の除去完了が確認できたら溶液をデカントで取り除き、クリーンベンチ内で乾燥させた。乾燥させた QD 粒子を回収した。

2.2.6 合成ナノ素材の機能解析

合成したナノ素材溶液を TEM 用 Cu グリッド上のカーボン支持膜に 10 μ l 滴下し、真空乾燥機で一晩乾燥させた。TEM を用いて真空条件下でグリッド表面上に付着したナノ粒子の表面形状を確認した。また、各粒子の吸光度測定及び蛍光強度測定は蛍光マイクロプレートリーダーを用いて行った。更に、ナノ粒子の溶液中における流体力学的サイズおよびナノ粒子表面ゼータ電位を解析するためにキャピラリーセルに 700 μ l の溶液を加え、DLS を用いて測定を行った。

2.2.7 ナノ粒子への抗体修飾

各種 SAM 修飾ナノ粒子及び QD は表面にカルボキシル基を有している。ZIKV 特異的抗体上のアミノ基と架橋するために EDC/NHS 反応を用いた。ナノ粒子溶液 2 ml に対して 0.1 M EDC を 1 ml 加え、室温で 30 分間攪拌した。0.1 M NHS を 0.5 ml 加え、10 分間攪拌を続け、ここにジカウイルス抗体を 1 μ g/ml になるように加え、7 $^{\circ}$ C 条件下で一晩反応させ修飾した。修飾完了後、遠心分離 (7500 g, 4 $^{\circ}$ C, 20 min) を行い、上清を除き 4 ml の miliQ で懸濁し、目的の抗ジカウイルス抗体を修飾した AuNP (Ab-AuNP) 及び Ab-QD を得た。

2.2.8 ELISA による抗体修飾の確認

ナノ粒子への抗体修飾を確認するために bead ELISA を行った。抗体修飾を 100 μ l ずつポリスチレン 96 well プレートに加えて一晩 4 $^{\circ}$ C で固定化した。洗浄後に 2%BSA 液 100 μ l を加え 1 h Blocking した。洗浄後に anti-mouse IgG-HRP を 2%BSA で 1/4000 に希釈し、well に 100 μ l ずつ加えて 1h 反応させた。洗浄後、発色試薬を 100 μ l 加えて青色発色を確認後、反応停止液として 10% H₂SO₄ を 50 μ l 加えて発色が青色から黄色に変化するのを確認し、マイク

ロプレートリーダーで吸光度を測定した。また、抗体未修飾金ナノ粒子及び 2% BSA をコントロールとし、同条件で ELISA を行った。すべての洗浄は PBST (Tween20)を用いて 3 回行っている。

2.2.9 検出系の最適化

最も高い光学的及び構造安定性を示した Ab-MPA-AuNP を用いて Ab-QD との相互作用による LSPR 蛍光増強効果の最適化を行った。溶液中におけるナノ粒子比率を Ab-QD : Ab-AuNP=5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 とした検出溶液を調製し、標的溶液として 10 RNA copies/ml の希釈 ZIKV strain PRVABC-59 溶液を加え、5 分のインキュベーション後、励起光 400 nm 発光波長 410 nm から 700 nm の条件で蛍光測定を行い、ピークである 634 nm における蛍光強度の確認を行った。

2.2.10 NS1 タンパク質の検出

最適化した検出系を用いて市販の Zika virus recombinant NS1 antigen 検出を行った。10 fg/ml から 1 ng/ml までの希釈系列を調製し、20 µl のウイルス溶液を 80 µl の最適化検出液に加え、5 分間のインキュベート後、前項と同様の条件で蛍光強度を測定し、蛍光の増強を確認した。

2.2.11 ジカウイルスの検出

実際の検体への応用可能性を評価するために、作製した 4 種の SAM 形成 AuNPs それぞれを用いて超純水中に希釈した ZIKV 溶液中の NS1 タンパク質検出実験を行った。検体中の NS1 タンパク質の有無は ELISA 法により事前に確認された。検体溶液より 10 copies/ml から 10^7 copies/ml までの希釈系列を作製し、

20 μ l のウイルス溶液を 80 μ l の検出液に加え、3 分間のインキュベート後、Infinite M200 (TECAN) で蛍光強度を測定し、蛍光の増強を確認した。検出実験は今回作製した 4 種の抗体修飾 Ab-AuNP すべてを用いて行われている。また、Ab-QD のみを使用した場合蛍光増強シグナルが測定されないことを証明するために、同様の超純水希釈サンプルを用いて検出実験を行い、評価した。

更に、夾雑物中での蛍光増強化への影響を評価するため、超純水中におけるウイルス検出結果より、有意な結果が得られた MPA-AuNPs 及び L-CystAuNPs を用いた。ヒト血清を含む検体と含まない検体を 10^7 copies/ml から 10^1 copies/ml までの希釈系列検体を用いて検出試験を行った。

2.2.12 選択性の確認

本検出系の選択性を確認するために標的を含まない溶液 (Negative control)、2%BSA、NoV-LP (100 ng/ml)、H7N7 influenza virus (100 ng/ml)、ZIKV (10^7 copies/ml) を用いて検出実験を行った。検出実験はこれまでの試験と同条件で行った。

2.3 結果

2.3.1 4 種の異なる機能化 AuNP の光学的・物理的解析

GSH-, TGA-, MPA-, L-Cyst-capped AuNP の紫外/可視吸収スペクトルを図 2.4A に示す。GSH-と TGA-をキャップした AuNP は、それぞれ 494~554 nm の間の表面プラズモン共鳴 (SPR) バンドを示し、654 nm と 634 nm にピークの最大値を示した。一方、MPA-と L-Cyst をキャップした AuNP は、526~648 nm の範囲の広い SPR ピークを特徴としていた。また、MPA と L-Cyst を持つ AuNP は、526~648nm の範囲に広い SPR ピークを示した。対応する AuNP の TEM 像から

不均一性を特徴とする表面形状であり (図 2.4B-E)。それぞれの SAM-AuNP の形状を比較すると、GSH-AuNP (図 2.4B) は準球状の形態を示し、本来の PC-AuNP 構造が保たれていないことが判明した。一方で、MPA- (図 2.4D) と L-Cyst-capped AuNP (図 2.4E) は、ほとんどが金平糖型の表面形状を特徴としており、SAM の形成後も安定した金平糖型構造を保っていた。

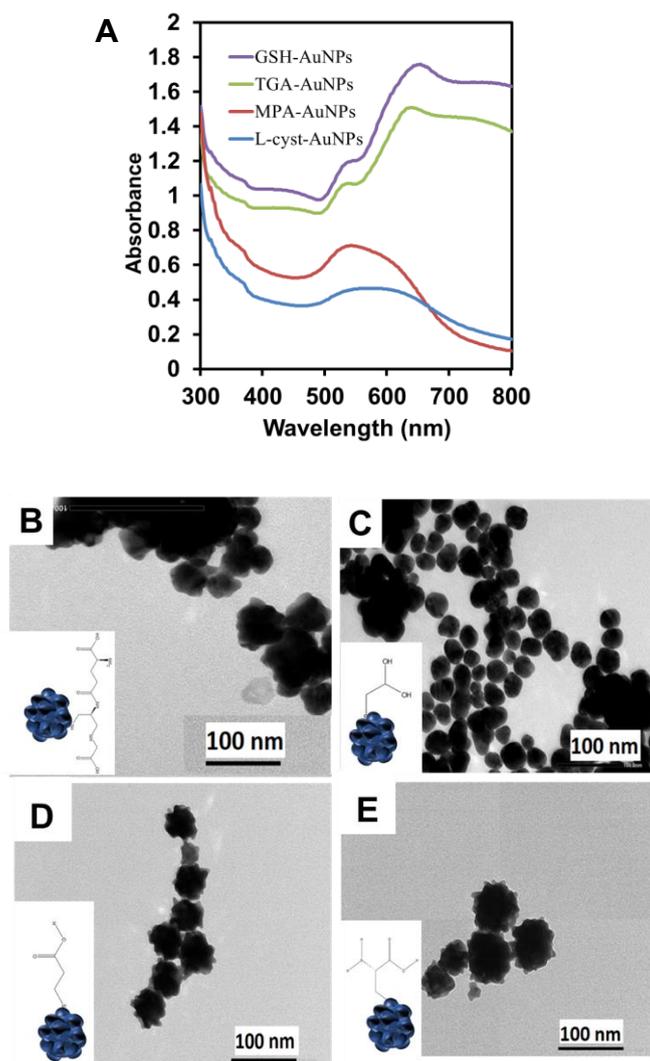


図 2.4 化合物により機能化された AuNP の紫外/可視吸収スペクトル (A) と TEM 像 (B-E)。(B), (C), (D), (E)はそれぞれ GSH-, TGA-, MPA-, L-Cyst 修飾 AuNP を示す。

更に AuNP の性質を解析するため、DLS を用いた粒径分布測定及び粒子表面ゼータ電位測定を行った (図 2.5A-D1)。得られた結果よりピーク値を表 2.1 にまとめる。GSH、MPA、L-Cyst 修飾金ナノ粒子では抗体修飾前に 40~50 nm 程度の粒径であり、抗体修飾後にサイズの増加が確認できた (図 2.5A-D)。しかし、TGA 修飾 AuNP は粒径が著しく減少していた。また、ゼータ電位測定結果では GSH, TGA 修飾 AuNP が抗体修飾前後でゼータ電位シフトを示していないことに対し、MPA, L-Cyst 修飾 AuNP では抗体修飾後-40 mV から-30 mV 付近への正のゼータ電位シフトが確認された (図 2.5A1-D1)。

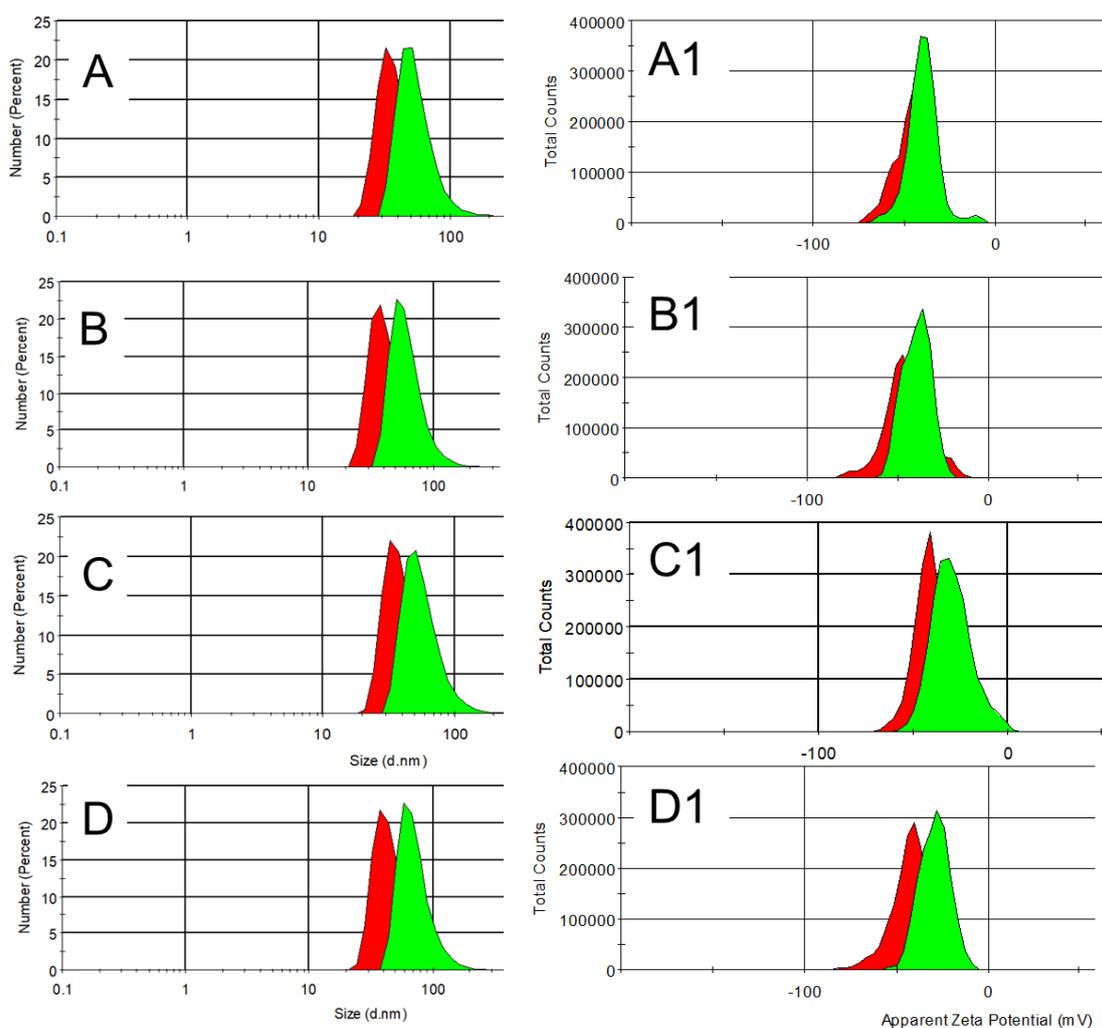


図 2.5 チオール修飾された AuNP (赤色の曲線) および Ab-AuNP (緑色の曲線) についての DLS 流体力学的曲線 (A-D) およびゼータ電位 (ZP) (A1-D1)。チオールキャッピング剤は、(A,A1) GSH (B,B1) TGA (C,C1) MPA および (D,D1) L-シストである。緑と赤の曲線は、それぞれチオールキャッピングされた AuNP と Ab-AuNP を示している。チオールキャッピングは、(A1) GSH、(B1) TGA、(C1) MPA、(D1) L-Cyst である。

表 2.1 チオールキャップされた AuNP と Ab-AuNP の流体力学的サイズと表面ゼータ電位

| Sample | Hydrodynamic particle size (nm) | Zeta potential (mV) |
|-----------------|---------------------------------|---------------------|
| GSH-AuNPs | 21.24 ± 8.42 | -45.2 ± 9.9 |
| Ab-GSH-AuNPs | 55.54 ± 19.31 | -39.5 ± 7.6 |
| TGA-AuNPs | 42.37 ± 14.21 | -35.4 ± 12.4 |
| Ab-TGA-AuNPs | 62.73 ± 21.32 | -42.7 ± 7.6 |
| MPA-AuNPs | 40.05 ± 13.69 | -40.6 ± 11.1 |
| Ab-MPA-AuNPs | 55.33 ± 20.94 | -29.2 ± 8.2 |
| L-Cyst-AuNPs | 46.33 ± 16.81 | -38.4 ± 11.0 |
| Ab-L-cyst-AuNPs | 72.82 ± 25.37 | -29.4 ± 10.3 |

4 種の異なる SAM-AuNP は光学的・物理的な違いを示した。これらの違いは粒子表面へ結合したチオール基の密度によるものと考えられる。金平糖型 AuNP は強く局在化した LSPR 領域を粒子表面に形成するが、粒形の粒子と比較し、構造的安定性が低く、塩や化合物など溶液中の物質と反応し、表面形状が球形に

変化または凝集してしまう場合がある (Wang et al. 2009b)。密な SAM が形成されている場合、粒子表面は分子膜により保護され、表面構造の維持が可能となる (Alkilany and Murphy 2009)。しかし、長時間の SAM 形成反応の中で粒子表面にまばらな分子膜形成しか生じなければ粒子表面は保護されず、粒子表面の電荷不安定性より粒子同士の凝集などが生じる可能性が高い、この点から MPA-AuNPs 及び L-Cyst-AuNPs は緊密な SAM の形成により粒子構造の保護に成功していることが示された。SAM の形成は官能基の付与として抗体修飾にも非常に重要である。Ab-MPA-AuNPs 及び Ab-L-Cyst-AuNPs のみが DLS によるゼータ電位測定結果としてウイルス特異的抗体のナノ粒子表面への修飾によるゼータ電位の正シフトを示し、FT-IR や ELISA からも抗体修飾を示す有意な結果を得たことから最適な SAM 形成素材の選択が構造的な不安定性を有するナノ素材の機能化に不可欠であることが証明された。

2.3.2 L-cysteine CdSeTeS core QD の光学的・物理的性質

紫外/可視吸収及び蛍光測定を行い、QD の光学特性を評価した。QD の吸光ピークは 608 nm であり、蛍光強度ピークは 634nm で最大であった (図 2.6A)。合成した QD の量子効率測定より、57%であった (Grabolle et al. 2009)。

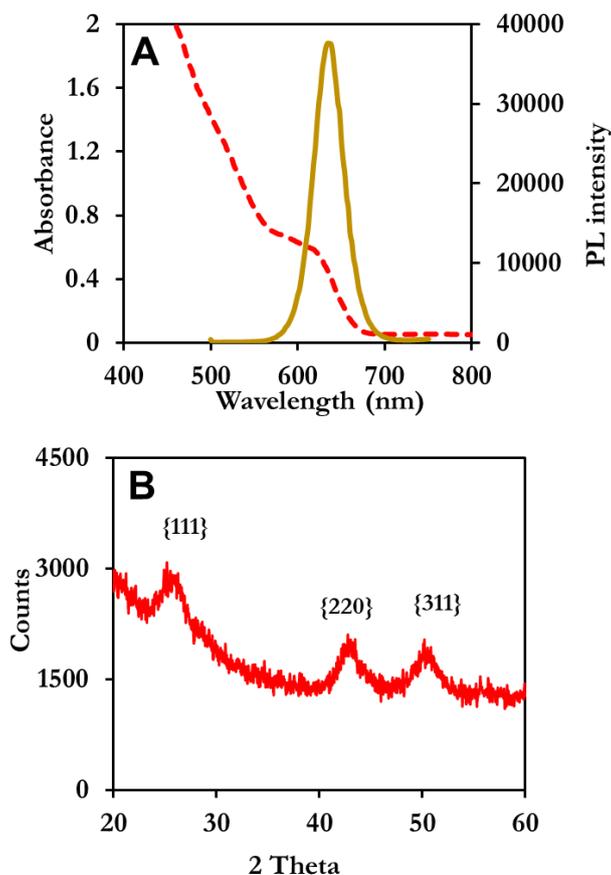


図 2.6 (A) L-cyst CdSeTeS コア QDs の UV/vis 吸収スペクトル (点線) と 蛍光発光スペクトル (実線)。(B) L-Cyst CdSeTeS コア QD の粉末 XRD パター ン。

更に QD の結晶性を特徴付けるために PXRD を用いて結晶構造解析を行った (図 2.6B)。QD の回折パターンは 111、220、311 に特徴的なピークを有しており、QD が結晶性かつ立方体であることを示している(Wang et al. 2009a)。

2.3.3 FT-IR 及び ELISA によるナノ粒子上への抗体修飾確認

SAM-AuNP とそれぞれの Ab-AuNP の FT-IR 分析を行い、Ab 上のアミノ基と SAM-AuNP 上の基との間にアミド結合が形成されていることを確認した。その

結果、Ab-AuNPs の-OH バンド及び-C=O-NH バンドの強度は、Ab-GSH-AuNPs 及び Ab-TGA-AuNPs よりも Ab-MPA-AuNPs 及び Ab-L-Cyst-AuNPs の方が強いことが確認された (図 2.7A-D)。図 2.7E は、Ab-QDs と Ab-AuNPs との共有結合を確認する ELISA の結果を示す。Ab-QDs、Ab-L-Cyst-AuNPs および Ab-MPA-AuNPs は、陰性対照 (2%BSA) と比較して強い吸光度を示しており、共有結合的な相互作用が確認された。MPA および L-Cyst-AuNPs はまた、GSH および TGA-AuNPs よりも優れた抗体結合効率を示していた。

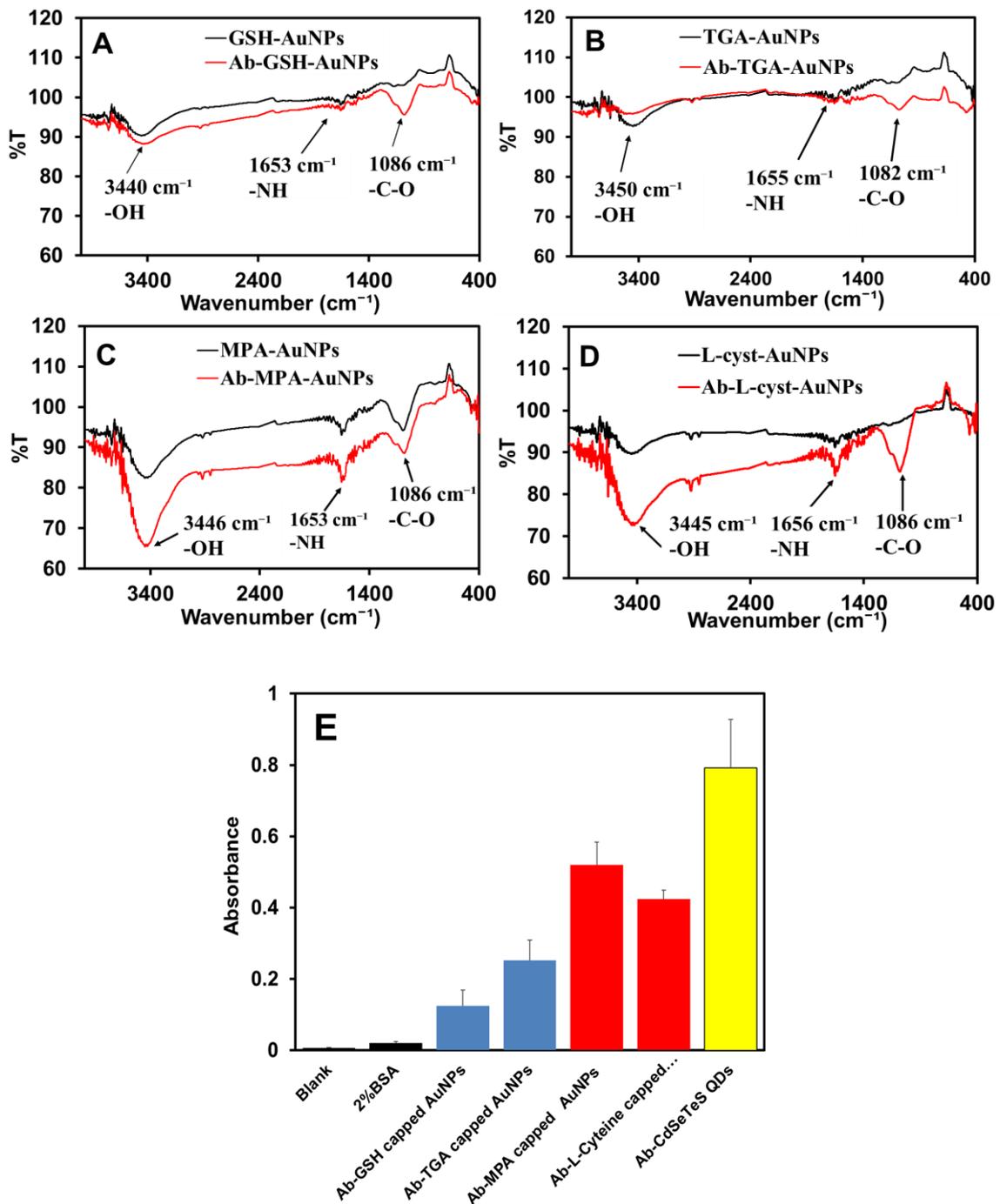


図 2.7 機能化 AuNP の FT-IR スペクトルとその結合アッセイ。AuNP は GSH(A)、TGA(B)、MPA(C)、L-Cyst(D)を表面に修飾した。(E) ELISA を用いた QDs および AuNP 上に修飾した抗体の確認。2%の BSA をネガティブコントロールとして使用した。

2.3.4 検出系の最適化と最適条件での NS1

異なるナノ粒子比率におけるウイルス添加時の蛍光増強効果は QD:AuNP=3:1 の比率でコントロールと比較し 1.3 倍と最も強く誘起された (図 2.8)。一方で、QD:AuNP=5:1, 1:1 の溶液ではウイルス添加後の消光効果が認められた。

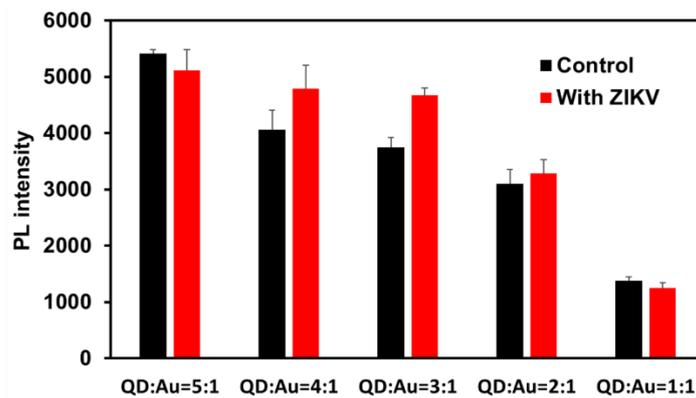


図 2.8 検出液中における Ab-QDs と Ab-AuNPs の比率が LSPR 蛍光増強効果に与える影響の評価。ZIKV 濃度は 10 RNA copies/ml であった。

得られた結果より、QD:AuNP=3:1 の比率を最適条件とし Ab-MPA-AuNP を用いて、ZIKV の NS1 抗原を検出した。検出系の蛍光強度は、10 pg/mL から 1 ng/mL の範囲で NS1 抗原の濃度に依存しており蛍光強度ピーク値から作成した検量線では高い直線性を示した (図 2.9A-B)。検出限界 (Limit of Detection, LOD) は 1.28 fg/ml であり、本センサーは NS1-ZIKV を高感度に検出できることを示している。

LOD については以下の式に基づいて算出を行った。

$$\text{LOD} = 3.24 \times \frac{SD}{m}$$

SD = ブランクを QD 蛍光強度測定と同様の条件で 10 回測定した測定値平均。

m = 検出結果から回帰直線の式、 $y = mx + b$ の傾き (Takemura et al. 2017) 。

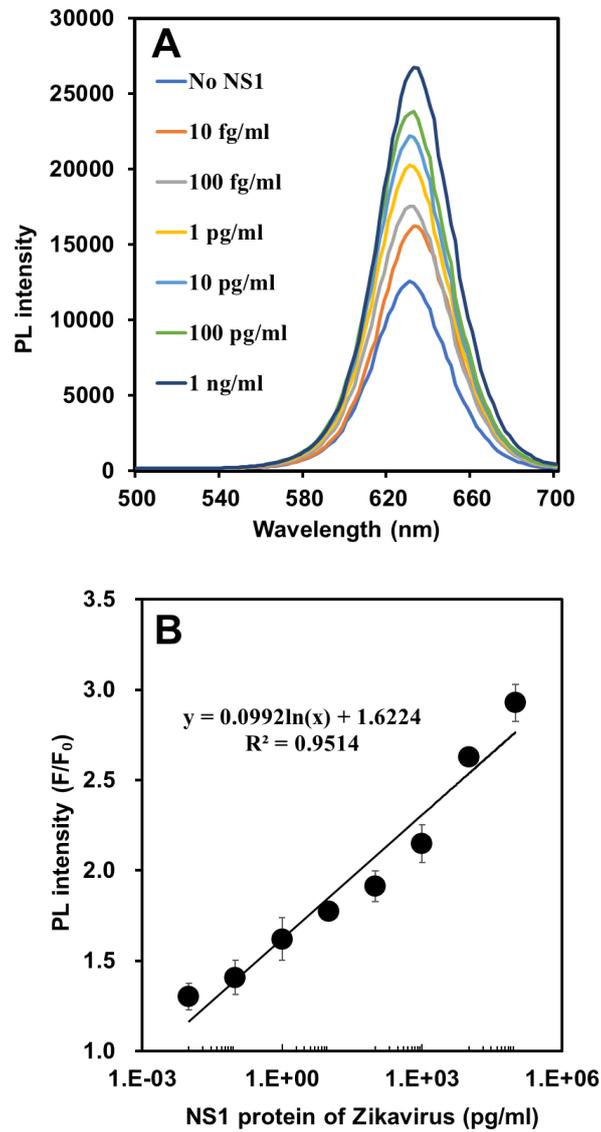


図 2.9 Ab-MPA-AuNPs と Ab-QDs を用いた ZIKV 検出における蛍光増強スペクトルと検量線。Ab-MPA-AuNPs の LSPR 蛍光増強効果を用いた NS1 濃度依存的蛍光増強スペクトル (A) と検量線 (B)。

2.3.5 ZIKV NS1 タンパクの検出

ZIKV に感染した培養液中に NS1 が含まれていることを ELISA で確認した (図 2.10)。ZIKV の NS1 の免疫蛍光検出は、Ab-QDs の蛍光強度信号に対する Ab-AuNP の LSPR 増幅効果によって引き起こされた。

また、それぞれの Ab-GSH-、Ab-TGA-、Ab-MPA-および Ab-L-cyst-AuNP を用いた ZIKV 検出のための LSPR 増幅蛍光増強スペクトルを図 2.12 に示す。Ab-TGA-および Ab-GSH-AuNP では、LSPR 増幅シグナルが低く、直線性が低いことが示された。一方、Ab-MPA-および Ab-L-Cyst-AuNPs の場合は、10 copies/mL から 10^7 copies/mL までの広い濃度範囲で、より高感度で ZIKV を検出することに成功した (図 2.11)。LOD は、Ab-L-Cyst-AuNPs (LOD = 8.2 copies/mL) > Ab-MPA-AuNPs (LOD = 35.0 copies/mL) > Ab-TGA-AuNPs (LOD = 55.8 copies/mL) > Ab-GSH-AuNPs (LOD = 57.9 copies/mL) の順であった。

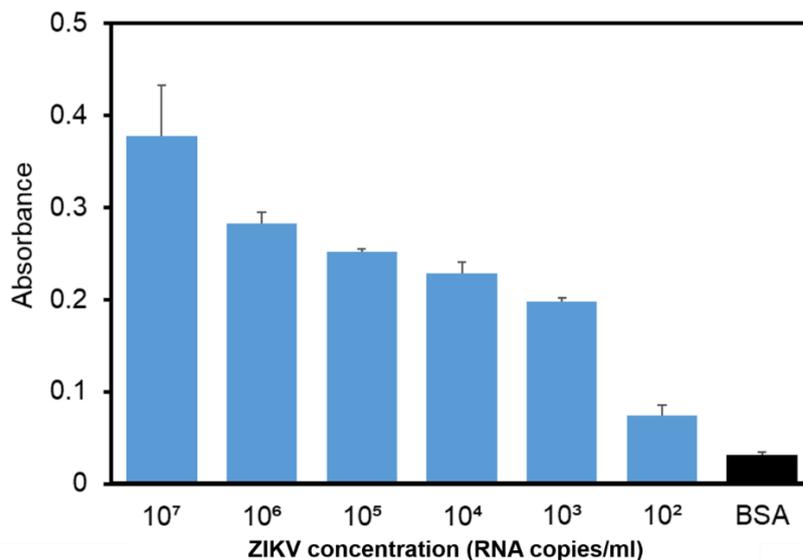


図 2.10 ジカウイルスサンプル溶液中の NS1 タンパク質に対する NS1 抗体の存在を示す ELISA。

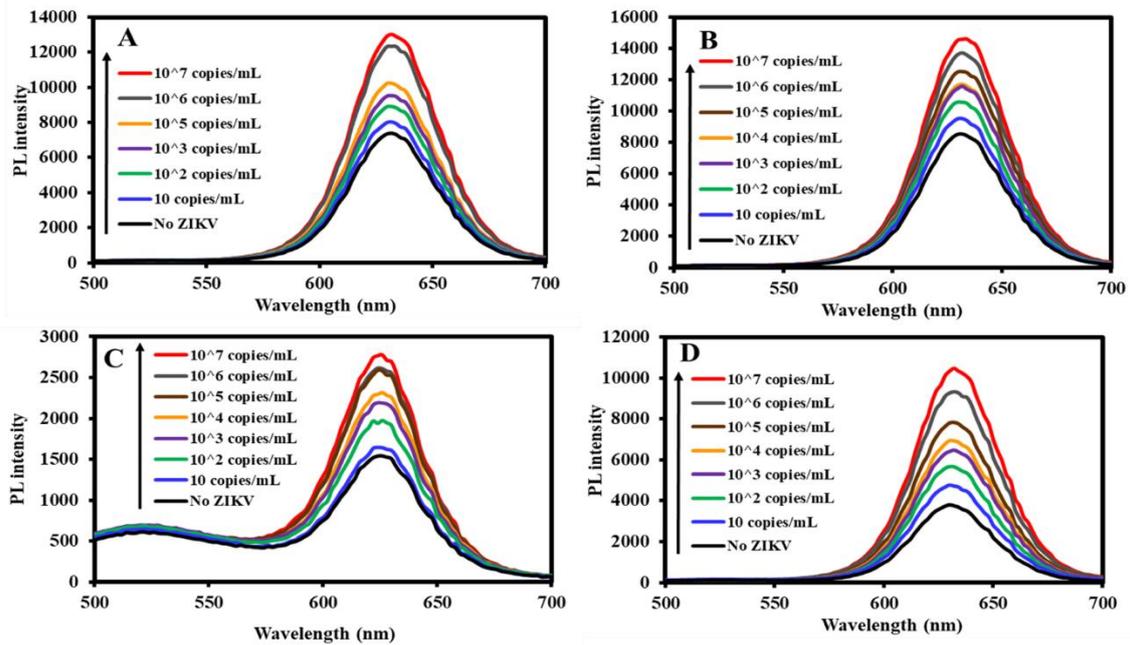


図 2.11 A) Ab-GSH-AuNPs, B) Ab-TGA-AuNPs, C) Ab-MPA-AuNPs, D) Ab-L-Cyst-AuNPs の LSPR 信号増幅器を用いた検出された ZIKV と相関する Ab-QDs の蛍光増強スペクトル。

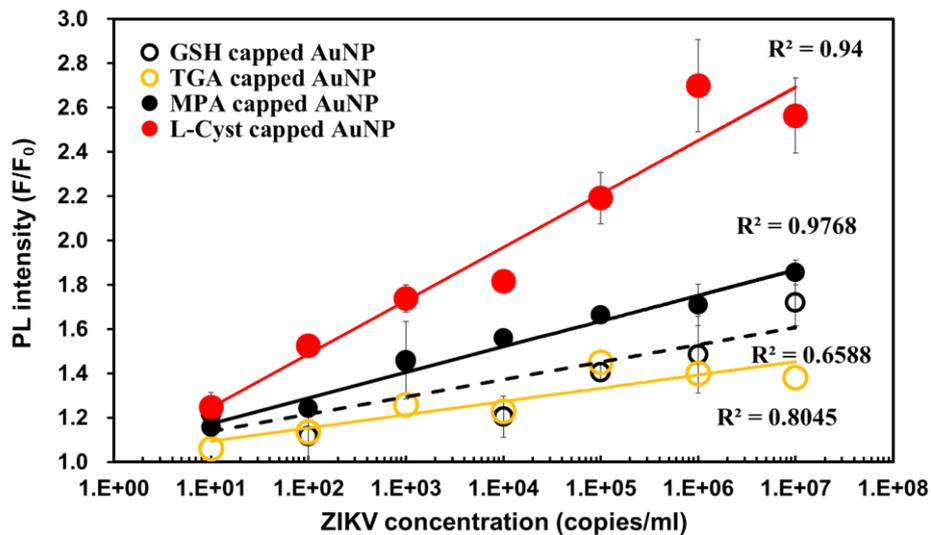


図 2.12 L-Cyst-AuNPs (赤丸) と Ab-MPA-AuNPs (黒丸) の LSPR 蛍光増強効果による NS1 検出は、Ab-GSH-AuNPs (黒丸) と Ab-TGA-AuNPs (黄丸) の LSPR 蛍光増強効果による NS1 検出よりも高い相関係数を示した。

2.3.6 血清中からの ZIKV NS1 タンパク質の検出

夾雑物を多量に含むヒト血清における LSPR 増幅免疫蛍光ウイルス検出技術の機能性を評価した。NS1 検出のための Ab-MPA-AuNPs および Ab-L-cyst-AuNPs の線形蛍光校正プロットを図 2.13A-B に示す。その結果、Ab-MPA-AuNP は、Ab-L-Cyst-AuNP よりも安定してヒト血清中における蛍光増強効果を誘起することが可能であることが示された。ヒト血清中の QD-Ab-NS1-Ab-MPA-AuNPs および QD-Ab-NS1-Ab-L-Cyst-AuNPs の TEM 像を比較した結果として、QD-Ab-NS1-Ab-L-Cyst-AuNPs では粒子の凝集が確認された (図 2.13A-B)。

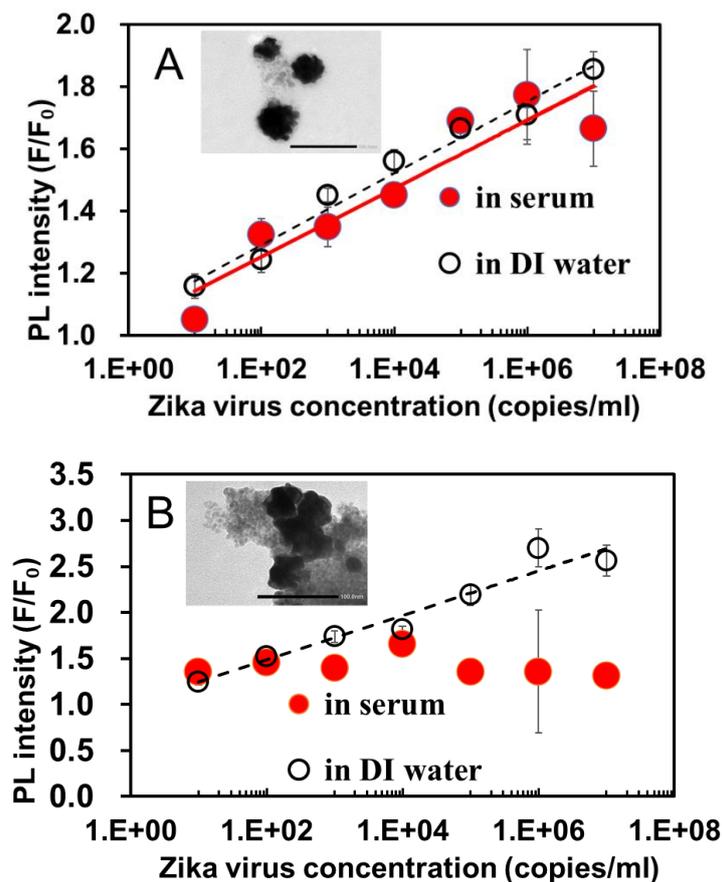


図 2.13 蛍光増強による NS1 検出結果の検量線。(A) Ab-MPA-AuNPs および(B) Ab-L-Cyst-AuNPs を用いて ZIKV を検出した。QD-Ab-Ab-ZIKV-Ab-MPA-AuNPs

および QD-Ab-Ab-ZIKV-Ab-L-cyst-AuNPs の TEM 像を追加として図中に示す。検出に用いたサンプル溶媒は、ヒト血清中（赤丸）および純水中（黒枠丸）であった。

2.3.7 検出系の選択性確認

検出系の特異性を評価するために BSA、ノロウイルス様粒子（NoV-LP）およびインフルエンザウイルス A（H7N7）を用いて検出実験を実施した。図 2.14 に示すように、ZIKV 以外では蛍光増強効果は認められなかった。この結果は、本研究で開発された LSPR 誘導免疫蛍光バイオセンサーが ZIKV に特異的であることを強く示唆している。

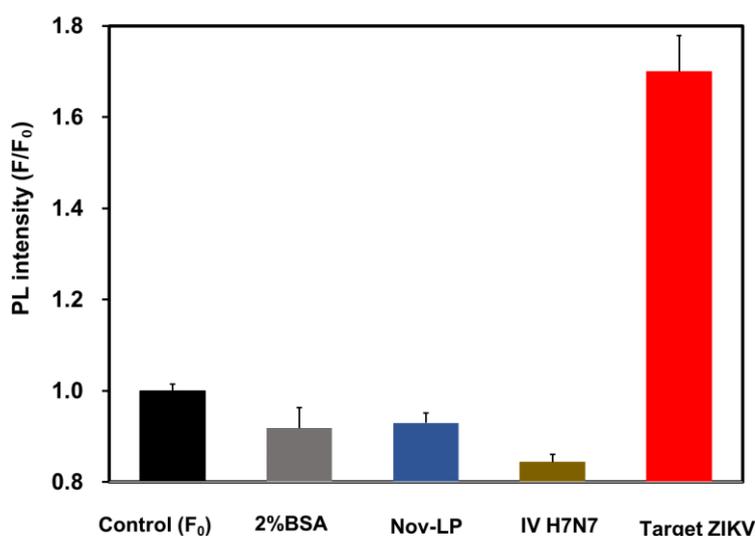


図 2.14 検出法の選択性確認結果。ZIKV の蛍光強度を、NoV-LPs、インフルエンザウイルス A（H7N7）BSA、ネガティブコントロールとして BSA の蛍光強度と比較した。使用した試料の濃度は、NoV-LPs とインフルエンザウイルス A（H7N7）は 100 ng/mL、ZIKV は 1×10^5 RNA copies/mL であった。

2.4 小括

LSPR 蛍光増強効果における重要な要素は粒子間距離及びプラズモン粒子である AuNP 自体のサイズである。本研究では 40 nm 程度の大きさである金平糖型 AuNP 上に SAM を形成し、抗体修飾後検出に用いている。標的である NS1 タンパクとの抗原抗体反応による QD-Ab-NS1-Ab-AuNP サンドイッチ構造が検出溶液中で形成される。LSPR の蛍光増強効果は AuNP サイズが 25 nm 以下でかつ粒子間距離が 8.5 nm 以上である場合に強く誘起されている (図 2.15d-f) (Chowdhury et al. 2020a)。本研究で用いた AuNP は図 2.15b と同様の粒形を保持しており、蛍光増強効果ではなく消光効果が誘起されると予期される性質であった。しかし、構造的に多数の 5–10 nm 程度のスパイクを有しており、こうしたスパイク上にはそれぞれに局所的なプラズモン領域が形成されることが知られている。したがって、QD との LSPR による相互作用では NS1 タンパク質とのサンドイッチにより予想される 8 nm 以上の距離において消光効果ではなく強い蛍光増強効果を誘起したと考える (図 2.16)。

また、LSPR による蛍光増強効率も QD と AuNP の溶液中における粒子比率に大きく影響された。AuNP の増加による QD の消光減少はすでに証明されており、本研究においても同様の現象が確認された (図 2.15g)。最適化した検出系を用いた市販 NS1 タンパク質の検出では NS1 の濃度依存的な蛍光増強効果が得られた。LOD は 1.28 fg/ml であり、一般的な抗原抗体反応を利用した ELISA 法などでは感度が ng/ml のオーダーであることより、LSPR シグナルは非常に低濃度であっても増強信号を得ることが示された。しかし、検出系の安定性は抗体修飾 AuNP の安定性に強く寄与しており、実際に構造的・光学的安定性が低いと評価された Ab-TGA-AuNPs と Ab-GSH-AuNPs を用

いた検体中の NS1 タンパク質検出では濃度依存的な蛍光増強効果の増強率及び直線性が低く、安定した検出性能を発揮していなかった。

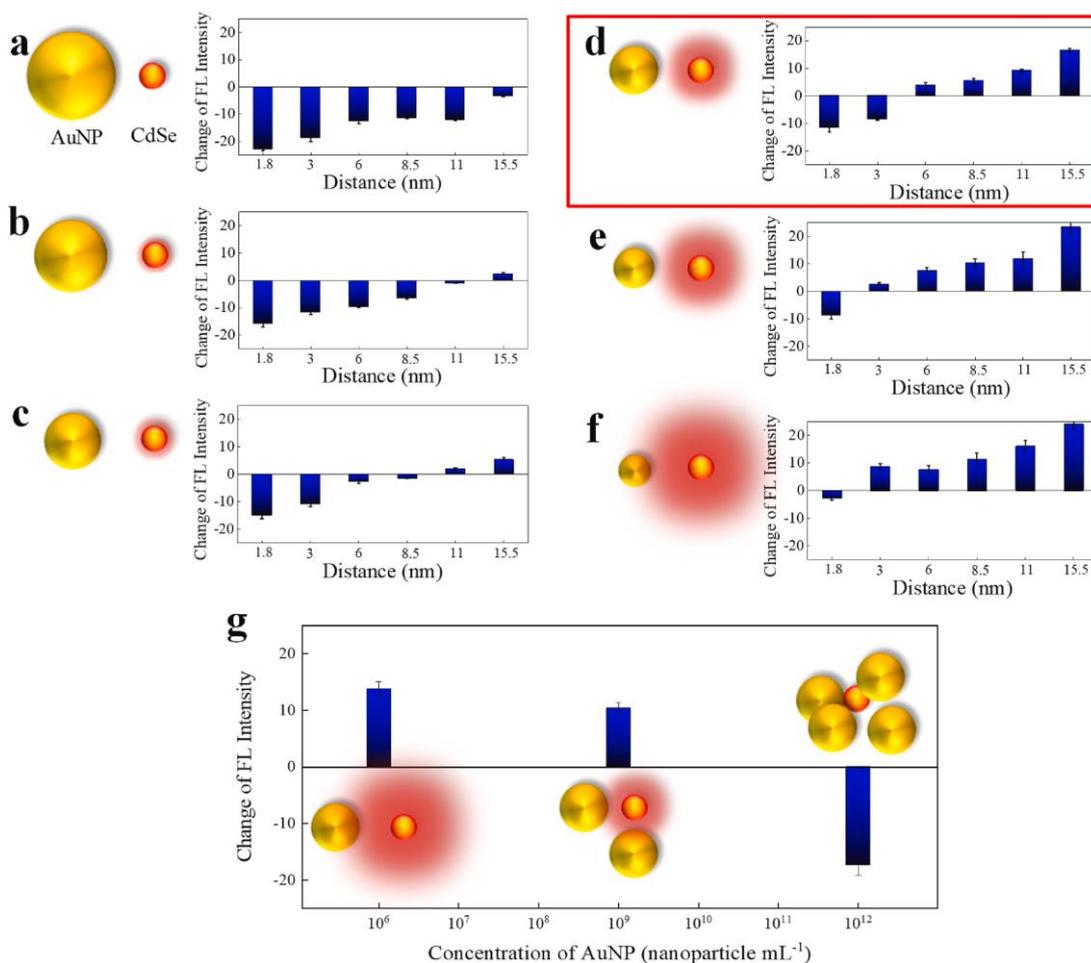


図 2.15 様々な CdSe QD-ペプチド-AuNP 複合体における CdSe QD の蛍光増強効果の解析図。80 nm (a)、60 (b)、45 (c)、35 (d)、25 (e)、および 15 nm (f) 異なるサイズの AuNP 6 種と 6 つの異なるペプチド長を組み合わせ、様々な蛍光強度の変化をもたらした。(g) 10¹²、10⁹、および 10⁶ mL⁻¹ の異なる AuNPs 濃度が及ぼす蛍光増強効果への影響 (Chowdhury et al. 2020a)。(掲載許可取得済み)

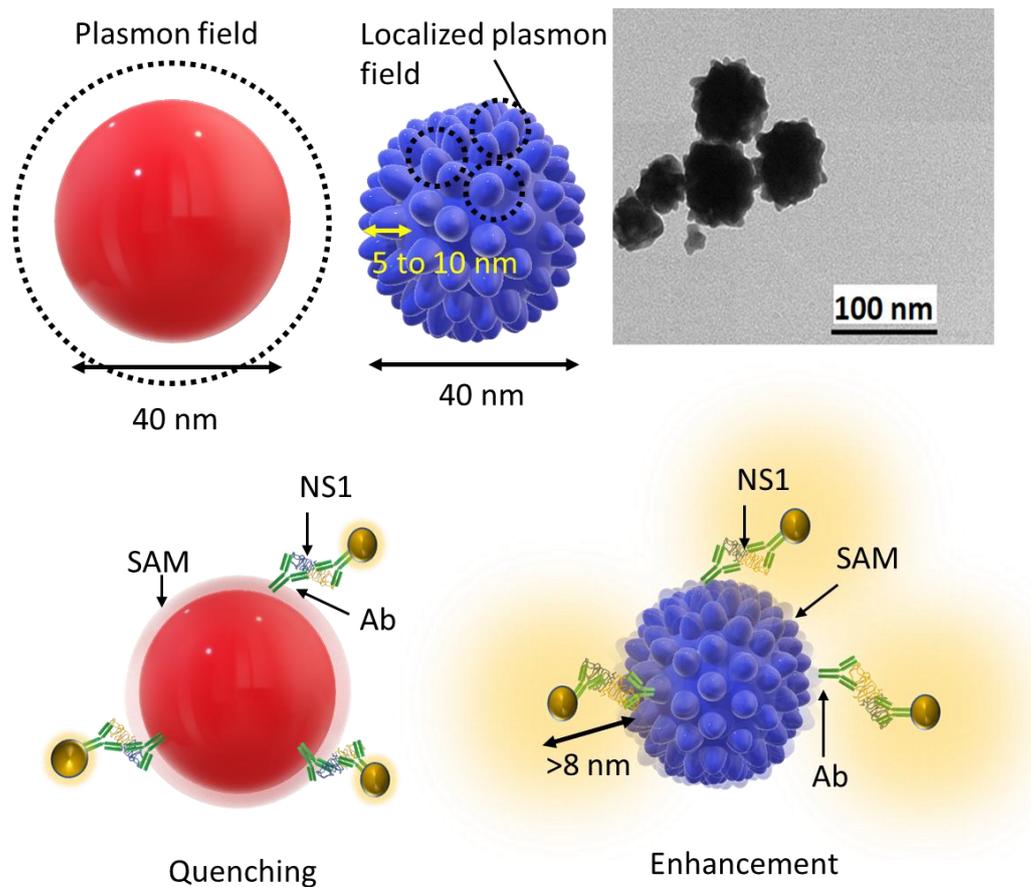


図 2.16 本研究において合成・応用された金平糖型 AuNP が及ぼす QD への蛍光増強効果の球形 AuNP との比較図。NS1 タンパク質の蛍光増強・消光効果は AuNP 表面構造に依存する。

本研究で用いた MPA は SAM 形成用化合物として一般的に市販されている化合物であり、酸性条件に pH を調節する過程のみで AuNP 表面上に密に SAM を形成することが知られている。粒子構造が安定な条件下での密度の高い SAM 形成に成功したために、抗体修飾による機能化が最も効率よく進行したと考える。L-Cyst も MPA と同じく、S 分子が持つ Au との強い親和性をベースに AuNP 上へ密に SAM を形成することが可能な化合物である。その抗体修飾効率は ELISA の結果より MPA と差異はそれほどなく、同様に AuNP の構造を保持

したまま抗体修飾に成功した。GSHは表面にEDC/NHSにより活性化可能な官能基を4種類有しており、抗体との反応性の向上及び検出感度の向上を予期した。しかし、結果としては粒子構造の不安定化及び凝集を招き、粒子表面への抗体修飾効率が非常に低いことが判明した。これはGSHが有するアミノ基及びカルボキシル基が粒子同士の強力な化学結合が誘起されたためと考察する。TGAを利用した場合、AuNPはその金平糖型表面構造が球形粒子へと変化していた。化学構造としてはMPAに類似しているが、より酸化されやすくその安定性は低い。粒子構造を安定に保つ条件下でのSAM形成は化合物自体の酸化によりAuNP上への化合物結合が十分に生じず、検出の不安定化を招いたと考える。

最終段階として実施したヒト血清中におけるNS1検出ではL-Cyst-AuNPにおいて蛍光強度の著しい現象が確認された。特に高濃度の標的ウイルス溶液では強い蛍光増強効果の減少が見て取れた。L-Cystにはカルボキシル基とアミノ基が含まれている。EDC/NHS反応ではこの2種の官能基がそれぞれ活性化され、抗体未修飾部位は活性化されたアミノ基及びカルボキシル基が露出する状態となる。結果として夾雑タンパク質との非特異的な結合や接着が生じやすい。今回の結果では高濃度ウイルス溶液において蛍光強度減少が生じた。これはヒト血清に粒子を加えたことにより、本来はウイルスとの特異性を保持する抗体修飾AuNPsが粒子間の結合や夾雑タンパク質との接着・結合により機能を失い、高濃度の標的物質の存在下ではすべてのウイルス粒子を検出するための抗原抗体反応が生じなかったためであると考察する。本研究より、LSPRによる蛍光増強効果をベースとしたヒト血清中からの安定的なZIKV検出系の構築に成功した。先行研究ではヒト血清中におけるインフルエンザウイルス検出時に最大で27%の蛍光増強減少が確認されたが、本研究では増強幅減少値は12%とMPAの修飾

により夾雑タンパク中における LSPR 誘起の安定性を向上させることに成功した (Takemura et al. 2017)。

しかし、未だに蛍光増強効果減少は生じている。他種のウイルスにも広く適用されているイムノクロマト法によるウイルス検出法や標的ウイルスの正確な検出が可能である RT-PCR などの遺伝子検出技術に代わる技術として本研究の実用化を目指すためには更なる安定性の向上が求められる。

第三章

ナノ粒子複合体によるプラズモン粒子の多機能化とウイルス検出への応用

3.1 緒言

ナノ粒子同士の複合体形成はウイルス検出系の構築に非常に有効な手段である。これまでの研究では AuNP 単体で LSPR による蛍光増強効果のみを用いてウイルスの検出を実施した。それらの研究で QD の高い蛍光強度による非常に強い蛍光バックグラウンドやヒト血清中などの多量の夾雑物中における LSPR シグナルや安定性の低下が課題となった。実際に AuNP と QD の距離を消光効果が誘起されるよう化学的に調節し、一方では AuNP と QD の間にウイルスを結合させることで、粒子間距離の拡張から生じる蛍光増強効果、2 種の現象をコントロールすることで非常に高感度なウイルス検出が可能である (図 3.1) (Nasrin et al. 2018)。

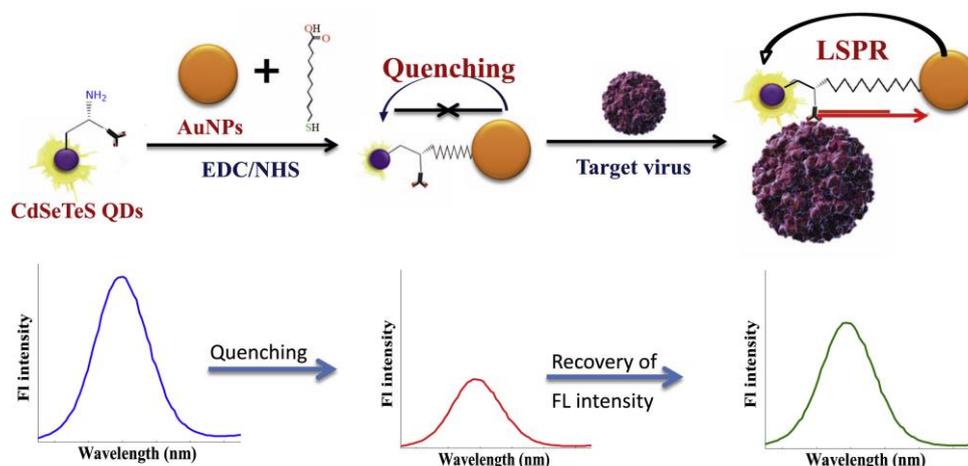


図 3.1 CdSeTeS QD/AuNPs ナノ複合体の作製と、NoV-LPs 検出に向けたセンシン

グ機構の模式図。AuNPs と CdSeTeS QD との共有結合により、NoV-LPs の抗原抗体反応による結合後に回復した蛍光信号を効果的に消光することができた (Nasrin et al. 2018)。(掲載許可取得済み)

こうしたプラズモン粒子と QD の結合による有効なウイルス検出系の構築はさらに発展させ (図 3.2)、ナノ粒子間の抗体修飾数を増やし、更にナノ粒子を繋ぐリンカーの長さを最適化することで複合体形成時に蛍光増強効果を極大化した (図 3.3) (Nasrin et al. 2020)。

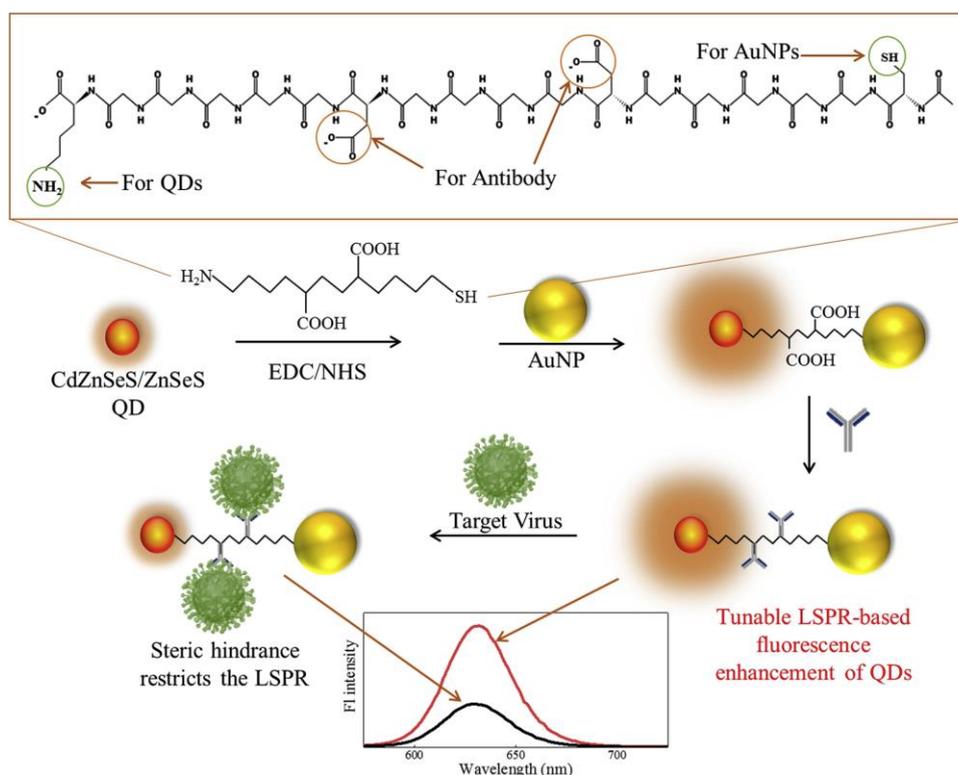


図 3.2 CdZnSeS/ZnSeS QD-ペプチド-AuNP ナノコンポジットの作製とそのインフルエンザウイルス検出機構の模式図。本研究では、AuNP と QD をペプチドリンカーで複合体化している (Nasrin et al. 2020)。(掲載許可取得済み)

ウイルスが結合した際に生じるナノ粒子間の電子伝達効率を低下させることで

安定したウイルス濃度依存的蛍光消光効果を誘起し、高い安定性を示す検出系の構築に成功している。しかし、依然として血清中における LSPR 蛍光増強・消光効果のシグナル減衰は改善されていない。

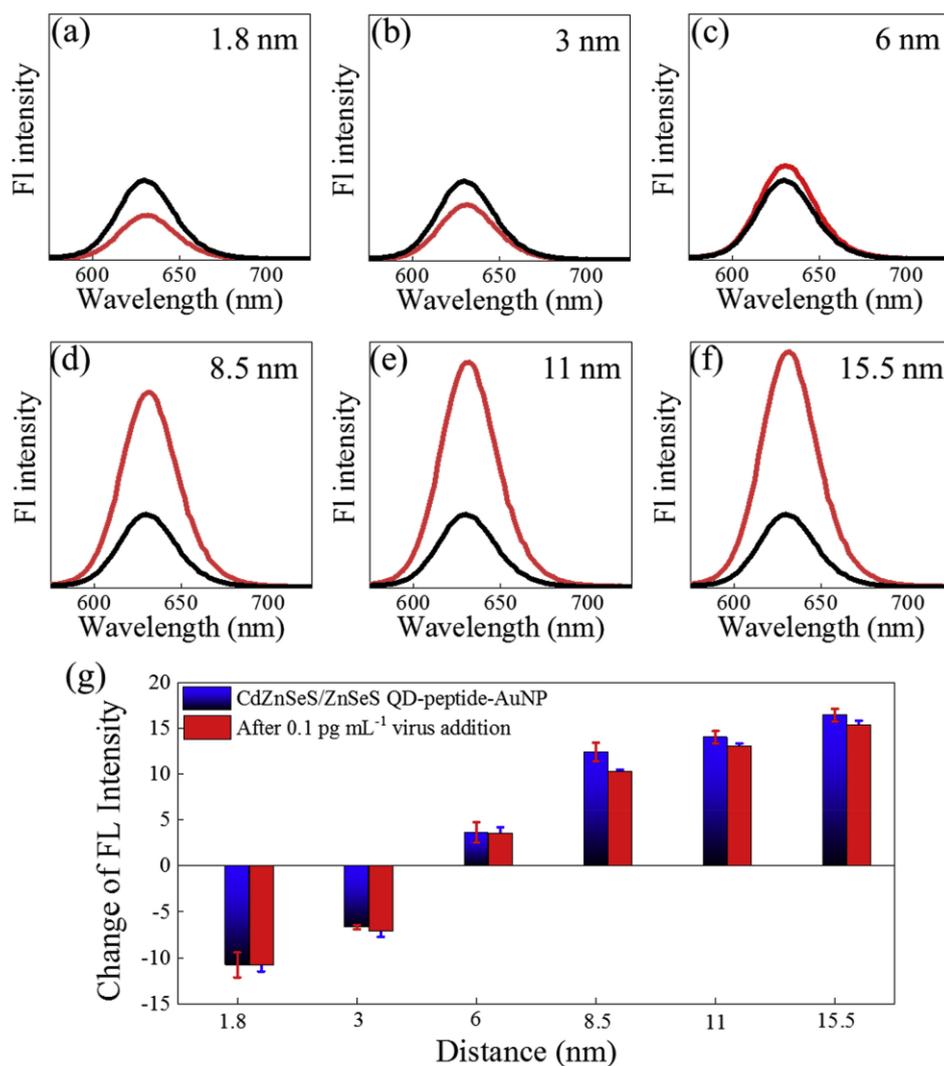


図 3.3 ペプチドの長さ(a) 1.8、(b) 3、(c) 6、(d) 8.5、(e) 11 及び(f) 15 nm と変化させた距離依存性蛍光スペクトル。5 nm（黒線および赤線はそれぞれ AuNP との修飾前後の CdZnSeS/ZnSeS QD-ペプチドの蛍光を示す）と、(g)ペプチド鎖長変化に対する蛍光強度の変化とインフルエンザウイルス（0.1 pg/mL）の添加前後蛍光増強・消光効果 (Nasrin et al. 2020)。(掲載許可取得済み)

ノロウイルス (NoV) は、感染症胃腸炎の主要な原因の一つであり、食品、水、環境、またはヒトかヒトへの水平感染により拡散する (Mattner et al. 2006) など衛生上脅威である。感染症の症状としては、吐き気や重篤な腹痛、嘔吐、頭痛、下痢、悪寒などが挙げられる (Verhoef et al. 2010)。遺伝子学的には、NoV は 6 つの遺伝子群 (GI~GVI) に分けられ、さらに最近の研究によると、これらの遺伝子群は 38 の遺伝子群に細分化されている (Verhoef et al. 2015)。これらの遺伝子群は、感染経路、感染性、受容体への結合能などの点で違いを示している。特に食中毒感染とヒトからヒトへの水平感染の間では、遺伝子型の違いが報告されている。GII 型は特にヒトにおける感染症例の報告が多く、2009 年 9 月から 2013 年 8 月までに米国内で発生した NoV による流行性胃腸炎では、全体の 72% が GII.4 によるものであった (Noda et al. 2008)。現在治療や予防薬として直接効果のある薬剤はない状況である。高齢化社会が進んでいる現代社会では、このような感染症による感染の拡大を防ぐために、高感度かつ迅速な検出法が求められている。そこで、本研究では、NoV の特異的抗体を修飾した金平糖型金ナノ粒子-磁性ナノ粒子複合体 (AuNP-MNP) を合成し、簡便にウイルスを分離することで、夾雑物による LSPR 効果減衰を防止する磁気分離免疫蛍光ウイルス検出技術 (Magnetofluoroimmunoassay, MFIA) の構築を目指した (図 3.4)。

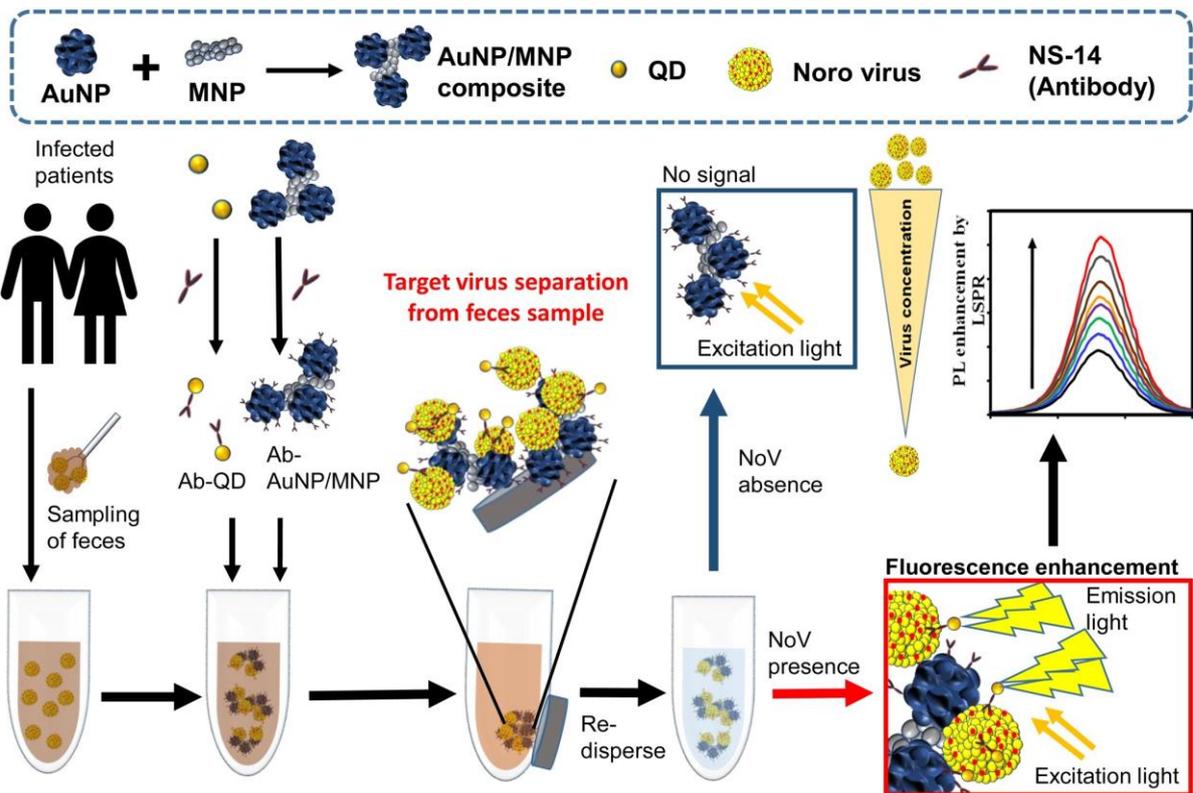


図 3.4 MFIA を用いた糞便サンプル中からの磁気分離ウイルス検出の概要図。
 磁性ナノ粒子と複合体化された Ab-AuNP/MNP は対象ウイルスを溶液から分離し、更にウイルス上に結合した Ab-QD と AuNP の相互作用による蛍光増強効果はウイルス濃度依存的なウイルスの蛍光検出を可能とする。

3.2 実験方法及び材料

3.2.1 使用試薬・機器

使用試薬（既出の品は除く）

Polyoxyethylene (Sigma, Tokyo, Japan)

mercaptoundecanoic acid (11-MUA) (Sigma, Tokyo, Japan)

Ferric chloride (Sigma, Tokyo, Japan)

Ferrous chloride (Sigma, Tokyo, Japan)

ノロウイルス抗原キット NV-EIA 「生研」 (Denka, Niigata, Japan)

使用抗体・検体

Influenza virus A/Netherlands/219/03 (H7N7) (Prospec-Tany TechnoGene Ltd. Rehovot, Israel)

Influenza virus A/Hong-Kong/1073/99 (H9N2) (Prospec-Tany TechnoGene Ltd. Rehovot, Israel)

Monoclonal anti-NS14 antibody (Anti-NoV GII) (Kitamoto et al. 2002; Kou et al. 2015)
(浜松医科大学 鈴木哲朗教授より供与)

NoV-like particles (NoV-LPs) (国立感染研究所 ウイルス第二部 李天成博士より供与)

Hepatitis E virus-like particles (HEV-LPs) (国立感染研究所 ウイルス第二部 李天成博士より供与)

臨床 NoV (GII.2, GII.3, GII.4) (静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 阿部冬樹様より供与)

使用機器

Superconducting quantum interference device (SQUID; MPMS-7, Quantum Design, Inc., San Diego, USA)

Transmission electron microscopy (TEM, JEM-2100 F, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan)

Scanning TEM for energy dispersive X-ray spectrometry (EDS)

3.2.2 金ナノ粒子-磁性ナノ粒子複合体 (AuNP-MNP)の合成

AuNP/MNP ナノハイブリッド複合体を室温で 2 段階合成した。超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (SPION) は、Hong らの論文に沿って合成した (Hong et al. 2011)。Ferric chloride (5 mmol) と Ferrous chloride (10 mmol) に水酸化アンモニウム 10 ml を 40 ml の脱イオン水に添加した。室温で 30 分間急速攪拌した後、磁気分離により MNP を精製し、次いでエタノールで 3 回洗浄した。MNP を 36 ml の水に分散させた後、21.6 mM の HAuCl_4 を MNP 溶液に添加した。Au³⁺イオンは MNP 上に物理的に吸着し、還元剤として 0.1M HEPES 緩衝液を用いて 40°C または 80°C で 30 分間攪拌しながら AuNP を MNP 表面上に合成した (Chen et al. 2010)。吸着されなかった AuNP は磁気分離により除去した。AuNP/MNP 上に官能基を修飾するために SAM 形成化合物である 11-MUA を使用した。1 mg/ml の AuNP/MNP を、無酸素環境下、窒素ガス下、pH 2 の溶液中で 0.1 M 11-MUA と混合した。11-MUA-AuNP/MNP ナノ複合体を磁気分離により精製し、超純水を用いて 3 回洗浄した。精製した複合体を用いてその後の物理的・光学的解析を行った。

3.2.3 Anti-NS14-antibody (NS14 Ab) の修飾

ナノ粒子上のカルボキシル基を用いて EDC/NHS カップリングにより NS14 Ab

を AuNP/MNP 及び QD 表面上に修飾した (Fischer 2010)。AuNP/MNP 上に修飾 11-MUA のカルボキシル基は、EDC と活性化され、活性化されたカルボキシル基は、アミド結合を介して NS14 Ab 化学結合を形成する。1 ml の 11-MUA/AuNP/MNP と 1 ml の QDs を 500 μ l の 0.1M EDC と混合し、室温で 30 分間攪拌した後、500 μ l の 0.1 M NHS と 5.1 μ g の NS-14 Ab を添加し 7°C で 16 時間攪拌した。Ab-AuNP/MNP ナノ複合体を磁氣的に分離し、1 ml の脱イオン水を用いて 3 回洗浄した。Ab-QD は、6500 g で 5 分間、7°C で遠心分離し、純水に再懸濁することにより精製した。最後に、精製されたナノ材料を 5 ml の超純水に懸濁した。

3.2.4 MFIA を用いた NoV-LP の検出

Ab-AuNP/MNP ナノコンポジットと Ab-QDs を 1:3 の比率で混合し、検出溶液とした。80 μ l の検出液に対して、20 μ l の NoV-LP 溶液を添加し、室温で 5 分間インキュベートした。NoV-LP はナノ素材上の抗体と反応し QD-Ab-NoV-Ab-AuNP/MNP サンドイッチ構造を形成した。このサンドイッチハイブリッド構造を磁気分離し、超純水に再懸濁させた後、励起光 400 nm 発光波長 410 nm から 700 nm の条件で蛍光測定を行った。また、AuNP/MNP を用いた MFIA によりヒト糞便中の NoV-LP を検出し、不純物を含まない場合との検出性能とセンシング挙動を比較した。本実施例では、1 pg/ml \sim 10 ng/ml の糞便中の NoV-LP を検出し、検出性能を評価した。蛍光増強は、試料の蛍光強度値(F)と対照の蛍光強度値(F₀)の比(F/F₀)と定義した。

3.2.5 糞便中からの NoV 検出

NoV は、感染者から採取した臨床糞便サンプルから単離した。糞便サンプル

100 mg を 900 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4) に懸濁し、固形物を分離した後、上清を検出サンプルとした。検体よりの RNA の抽出から濃度決定までは PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ、滋賀県、日本) を用いた。リアルタイム RT-PCR により各サンプルの濃度 GII.2 : 6.2×10^7 RNA コピー/ml、GII.3 : 7.2×10^8 RNA コピー/ml、GII.4 : 5.7×10^7 RNA コピー/ml が決定された。本実施例では、糞便サンプル中の RNA コピー100 個/ml から 10^7 RNA コピー/ml NoV までの範囲で検出性能を評価した。蛍光測定は同様の条件で行った。CdSeS QDs の蛍光ピークは 610 nm に観測された。また、臨床的に単離された NoV をリアルタイム RT-PCR で定量し、市販の NoV 検出キット (NV-EIA「生研」) を用いてアッセイした。

3.2.6 MFIA の選択性確認

ヒト血清及び 5%BSA などの夾雑物を多量に含むサンプル中でのタンパク質のナノ素材への非特異的な吸着による LSPR 蛍光増強効果への影響の有無を確認すると同時に、インフルエンザウイルス A(H7N7)、A(H9N2)、HEV-LPs などの多種のウイルス存在下で検出試験を行い、MFIA の選択性を評価した。

3.3 結果

3.3.1 金ナノ粒子-磁性ナノ粒子複合体 (AuNP-MNP)の解析

MNP と AuNP/MNP の表面形状と大きさを TEM で観察した (図 3.5A-D)。MNP は球形状をしており、粒径は 10 nm から 20 nm であった (図 3.5A)。AuNP/MNP は温度条件の違いにより球形状または金平糖型の AuNP を MNP 表面に形成していることが判明した。また、図 3.5E 示すように各種合成ナノ素材の吸光度測定により光学的に粒子を解析・評価した。金平糖型 AuNP/MNP の吸光バンド (λ_{\max}) は約 632 nm であった。スペクトルピークは同じ大きさの球状 AuNP とは明らかに異なり、金平糖型 AuNP/MNP の表面構造に起因するものであるため、複合体形成が光学的に示唆された (Jain et al. 2006; Khlebtsov 2008)。さらに、約 750 nm には、二次的なプラズモニック吸光バンドがわずかに観測され、このスペクトルは、SPION 上の密接に配置された金平糖型 AuNP 間のプラズモニック結合相互作用と関連していた (Lee and Lee 2017; Lin et al. 2001)。SPION 上の金平糖型 AuNP の TEM 像によれば、SPION 上では複数の AuNP が互いに接触しており、プラズモニック結合吸光度の結果が TEM 像と一致していることが示唆された。一方、0.1M HEPES 緩衝液 4 ml 中で 80°C で合成した球状 AuNP の吸光度ピークは、約 558 nm であった。球状 AuNP の吸光スペクトルのピークは既に報告されており、14.8 nm の大きさの AuNP は 517 nm に吸光ピークを示し、48.3 nm の大きさの AuNP は 533 nm に吸光ピークを示す (Haiss et al. 2007)。球状の AuNP/MNP の粒子平均直径は 10 から 20 nm であった。吸光度スペクトル特性は同じ大きさの AuNP と一致していない。更に AuNP 表面に 11-MUA を修飾した後の粒子を用いた吸光度測定では各温度で同様の吸光度スペクトルを示した (図 3.5 破線のスペクトル)。このことは、11-MUA 修飾後の AuNP/MNPs の

LSPR 特性に変化がないことを意味していた。

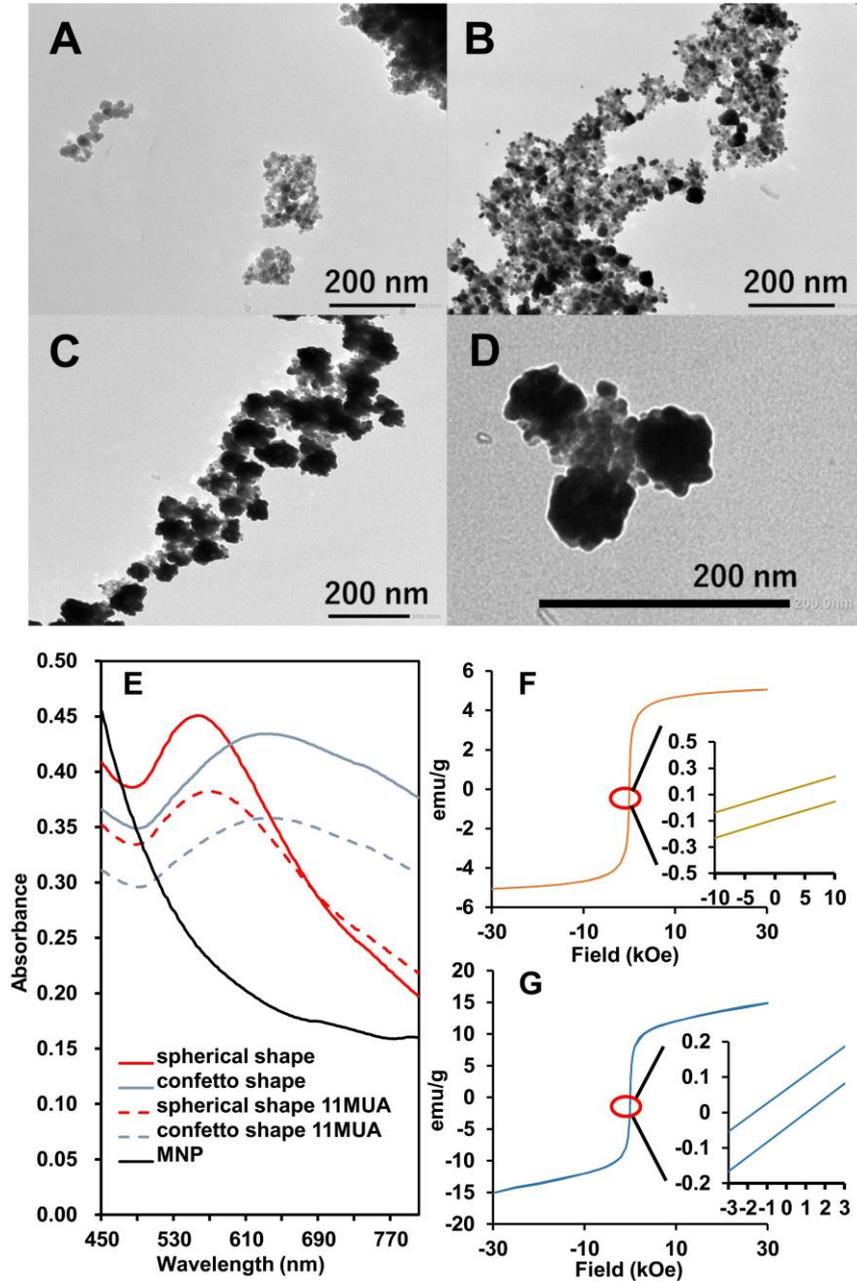


図 3.5 TEM (A)、SPIONs (B)、AuNP/MNP 複合体 (C) および金平糖型 AuNP/MNP 複合体 (D) のナノ粒子像。AuNP/MNP 複合体および 11-MUA キャップされた AuNP/MNP 複合体の吸収スペクトル分析 (E)。ヒステリシス曲線を有する SPIONs (F) および AuNP/MNP (G) の SQUID 測定。

AuNP/MNP の磁気特性は SQUID 解析によって特徴づけられた。MNP と AuNP/MNP (40°C条件下)の磁気ヒステリシスループより MNP の保磁力は 8 Oe、-8 Oe であり、リマニエンス効果は約 0.04 emu/g、-0.04 emu/g で示された。MNP の表面に AuNP 修飾を施した後の複合体では保磁力は約 2 Oe および-2 Oe で測定され、リマニエンス効果は約 0.03 emu/g および-0.03 emu/g であった。このように、複合体化した後も、磁気特性は維持されていた (図 3.5F-G)。

更に複合体化の性質を評価するために、STEM を用いて金平糖型 AuNP/MNP の元素分析を行った (図 3.6A-C)。その結果、Au と Fe がはっきりと観察された。Au のピークは Fe のピークと重なっており、Au が Fe 上に存在していることが示唆された。さらに、EDS スペクトルから Au (La 9.712、M 2.120) と Fe (La 6.398、M 0.705) の元素ピークを測定した (図 3.6D)。複合体化形成後のナノ素材結晶構造については PXRD を用いて分析を行った。結果として、38.2°、44.3°、64.4°、77.6°、81.8°に AuNP の特異的な 2θ ピークが存在し、複合体形成後の格子パターン(111)、(200)、(220)、(311)、(222)を示すことから、MNP 上に AuNP が形成されていることが明らかになった (図 3.7)。この結果は、MNP 上に堆積した AuNP が結晶構造を保持していることも証明している。

MNP の表面には静電相互作用により Au イオンが付着し、HEPES 緩衝液と熱により AuNP に還元された。還元剤としての HEPES は成長速度だけでなく、AuNP の形状も制御することができるため、反応温度に依存して変化する還元電位もナノ複合体の合成に重要な要因である。実際に AuNP のサイズと形状は、40 °Cでは金平糖型・40 nm 程度の粒子を形成したが、80°Cの条件下では 10-30 nm までの大きさが不均一な球形状の粒子が形成されていた。これは熱エネルギーの上昇により、HEPES による Au イオンの還元速度が非常に速くなるため、結晶粒形成までの時間が短くなり、表面のランダム成長が誘起されないために

生じた現象であると推察する (Sun and Xia 2002)。

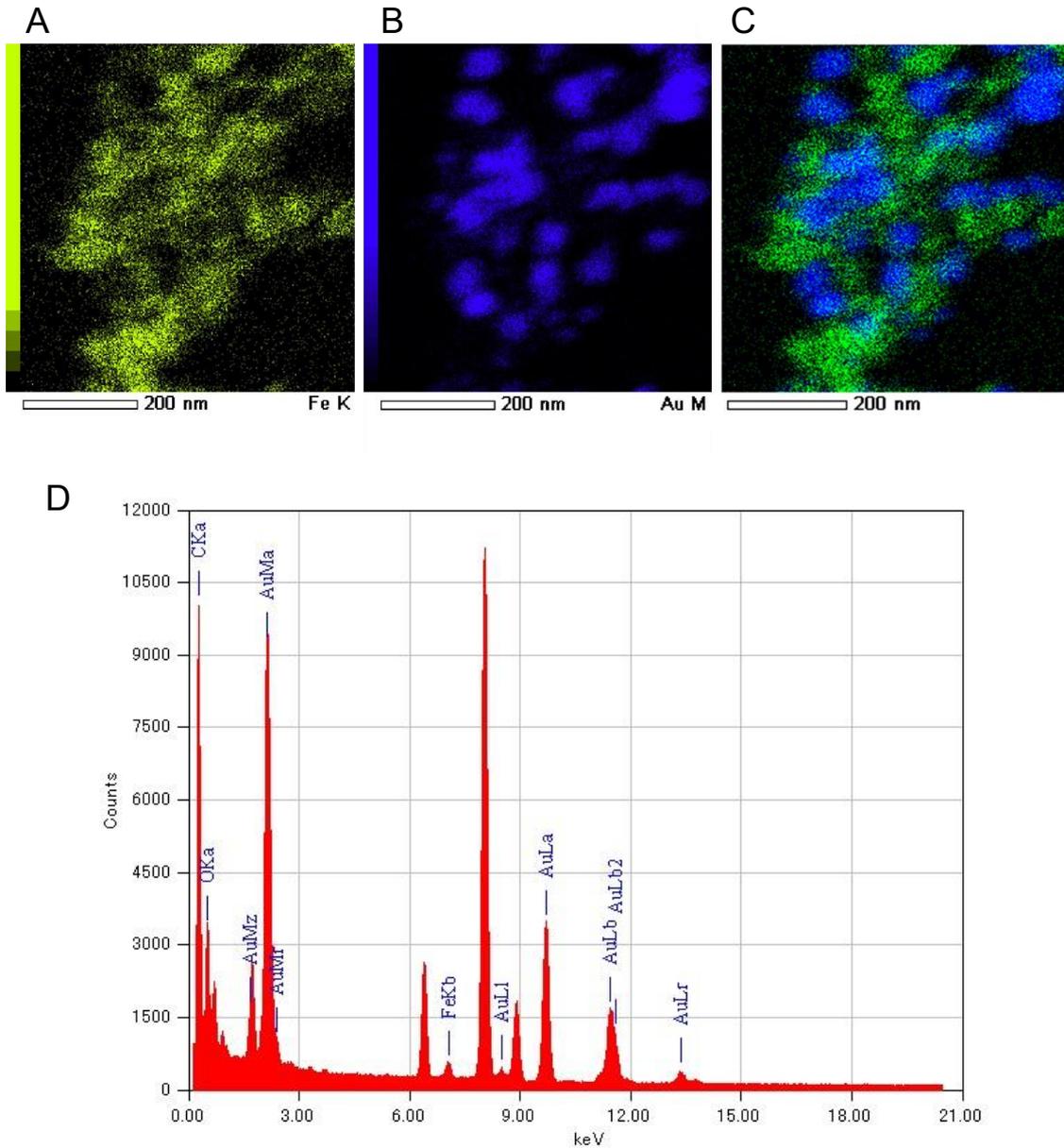


図 3.6 (A-C) AuNP/MNP 複合体の元素マッピング(STEM)。(A) Fe マッピング(B) Au マッピング、(C) Au と Fe の重複画像。(D) 11-MUA で修飾された AuNP/MNP 複合体の EDS 分析は、Au、Fe、C、O のピークを明確に示しています。

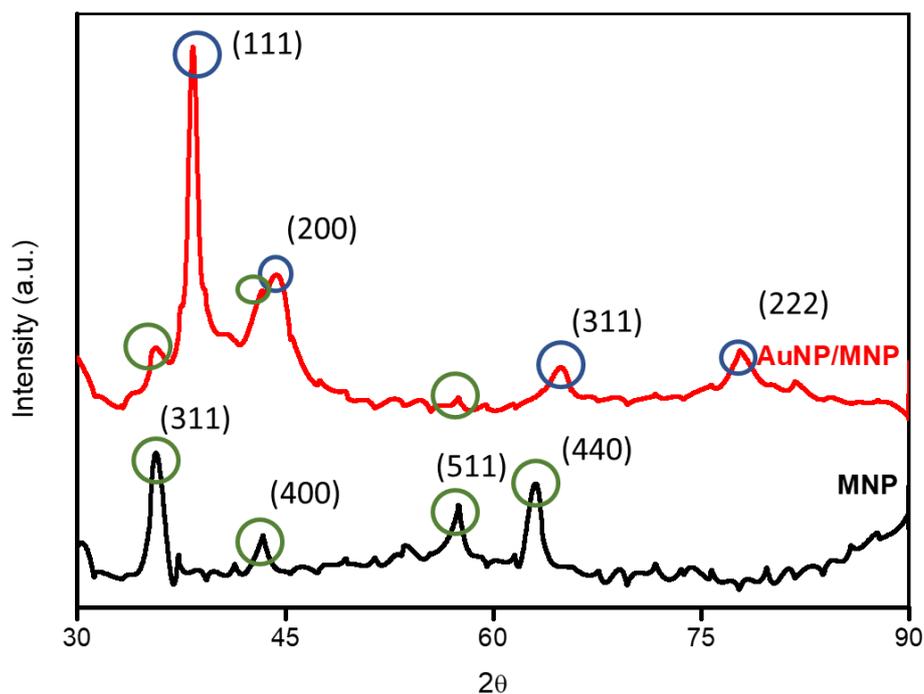


図 3.7 AuNP/MNP(-)と MNP(-)の粉末 X 線回折パターン。青丸は Au のピーク、緑丸は MNP のピークを示す。

AuNP/MNP の複合体形における MNP・AuNP の物理的・光学的な影響は確認されず、複合体形成後も各ナノ粒子が機能性を保持していた。Au@MNP のようなコア/シェル構造を有する複合体では AuNP のシェルサイズが磁性に影響を及ぼす (Wang et al. 2008)。また、金平糖型 AuNP のような LSPR の誘起に適した構造を有する形状への加工は非常に難しい (Kwizera et al. 2017)。本研究において形成された金平糖型 AuNP/MNP は蛍光増強ウイルス検出系への応用に非常に適した素材である。

3.3.2 Anti-NS14-antibody の修飾と LSPR 蛍光増強効果

ハイブリッドナノ材料の表面における抗体修飾効率はMNP上のAuNPサイズに依存する。特に、金平糖型AuNPは、通常の球状のAuNPに比べて、粒子端に局在化した強力なLSPR領域を有するとともに凸凹とした構造が表面積を向上させている。ELISAの結果より、金平糖型AuNP/MNPでは最も高効率な抗体修飾が確認された(図3.8A)。球形状のAuNP/MNPについても抗体修飾には成功している。更に、ウイルス検出への応用の前段階としてAb-MNP、金平糖型Ab-AuNP/MNP, 球形状AuNP/MNP及びAb-QDを用いてノロウイルス様粒子(NoV-LPs)の検出実験を行った(図3.8B)。

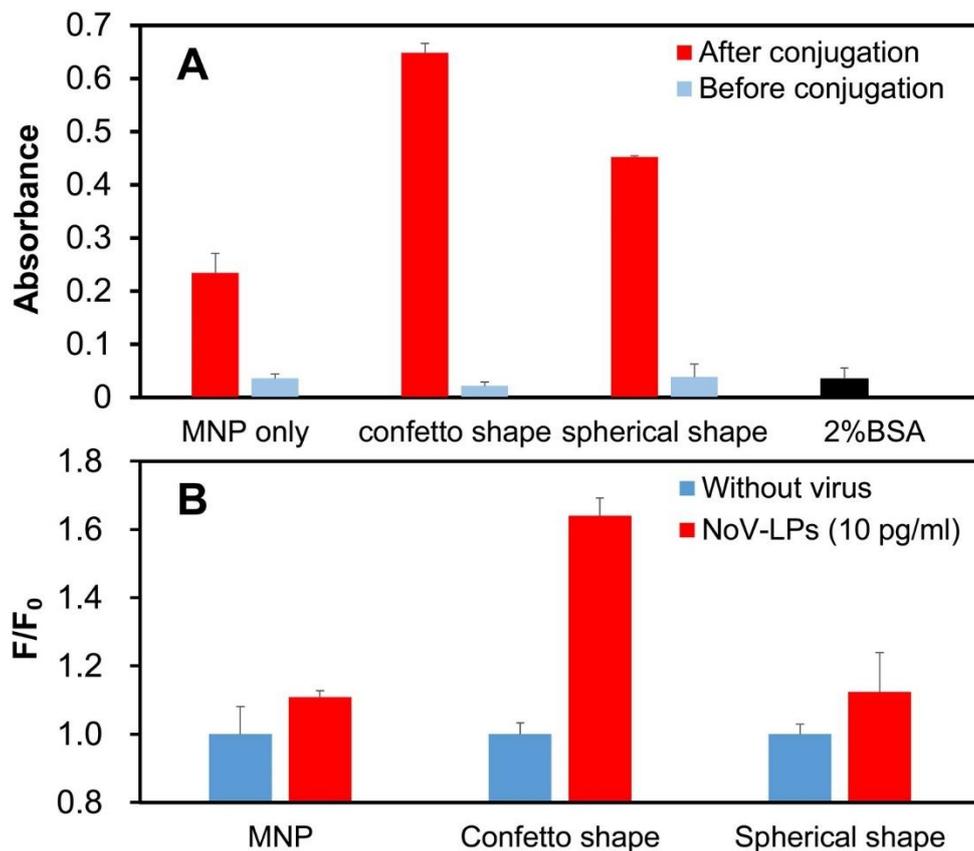


図 3.8 ナノ材料の表面形状が抗体結合および LSPR 蛍光増強効果に及ぼす影響 (A) ナノ材料への抗体結合の ELISA による確認結果。(B) Ab-金平糖型および Ab-球形状 AuNP/MNP 複合体を用いた NoV-LP (10 pg/ml) の磁気蛍光検出。

MNP については表面電位を利用した静電気結合により MNP 上に抗体を吸着させることで抗体修飾を行っているが、抗体修飾の効率は低かった。QD への抗体修飾についても ELISA により確認しており、同様に抗体修飾に成功した (図 3.9)。

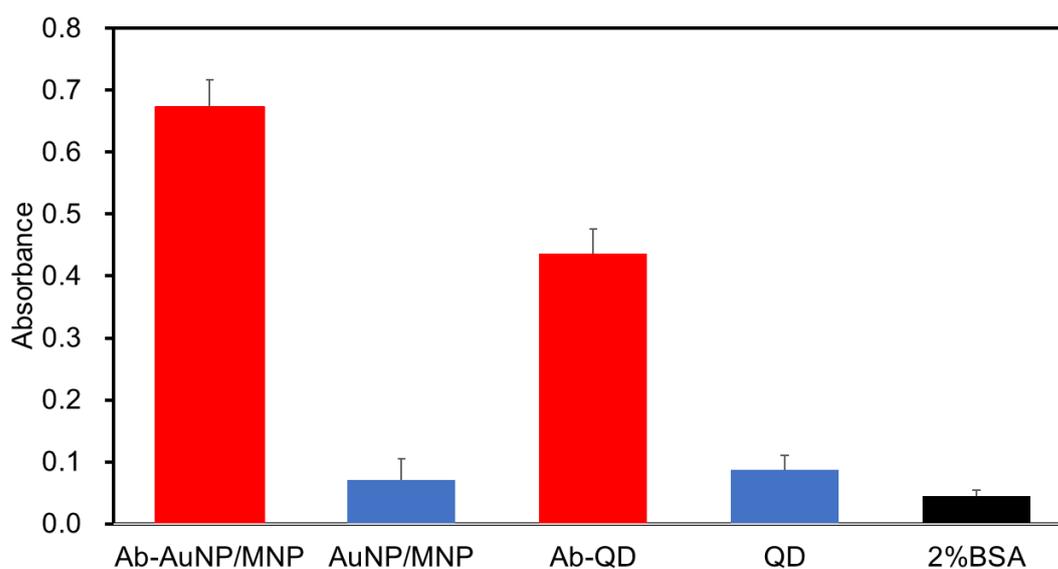


図 3.9 ELISA による Ab-AuNP/MNP 複合体と Ab-QD の抗体修飾確認 (Ab-NP : 赤、NP : 青、2%BSA : 黒 (ネガティブコントロール))。

事前に NoV-LP と NS-14 抗体の反応性については ELISA により確認し、抗原抗体反応による特異的な結合を確認している (図 3.10)。結果として 10 pg/ml のサンプル溶液中にて、AuNP を修飾していない MNP では QD のウイルス結合による蛍光強度が 1.16 倍上昇したが、蛍光シグナルとしては不十分であった。対して、金平糖型 Ab-AuNP/MNP を用いた系では蛍光強度が AuNP の LSPR 蛍光増強効果により 1.63 倍まで蛍光シグナルが増強しており、ウイルス検出への応用に適していた。球形状 AuNP/MNP については MNP と同様の蛍光シグナルが増強であったことから、プラズモン粒子として不適と評価し、以後の試験ではす

べて金平糖型 Ab-AuNP/MNP を用いている。

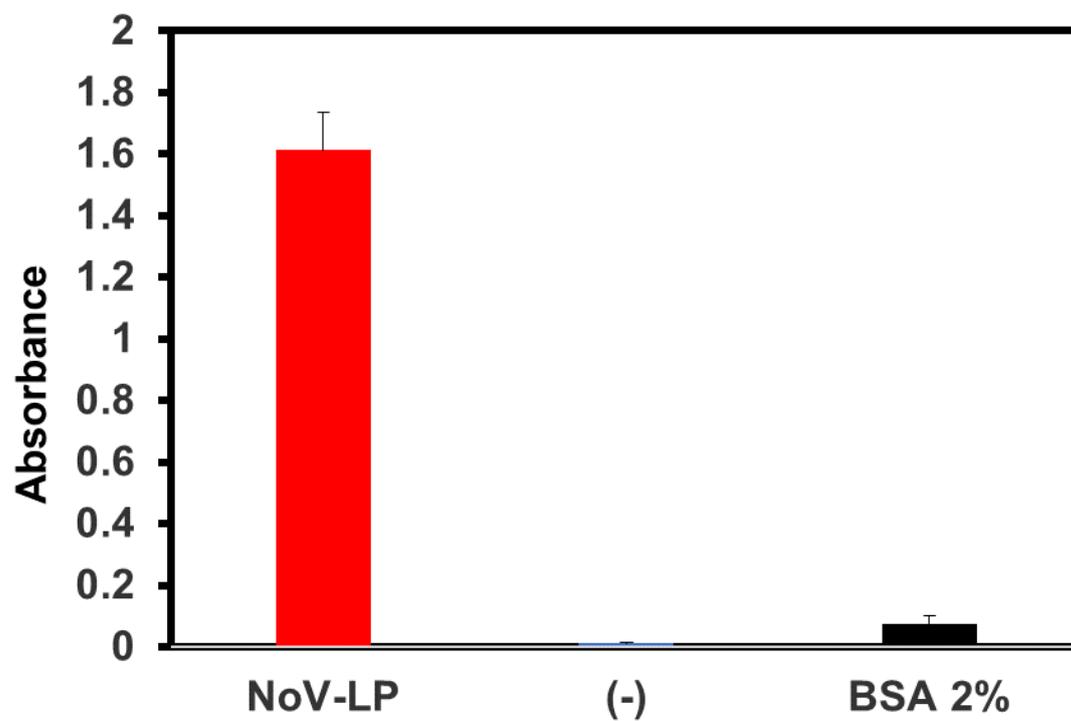


図 3.10 ELISA を用いた NS-14 と NoV-LP の結合。

3.3.3 MFIA を用いた NoV-LP 検出

MFIA を用いて超純水中および糞便中の NoV-LP の検出を行った (図 3.11A-E)。NoV-LPs の濃度を上げると、QD の蛍光強度も徐々に増加し、この現象は超純水中だけでなく、糞便環境でも観察された (図 3.11A)。どちらの溶液中でも蛍光増強効果は同様の増強率を示し、検量線の直線性もほぼ同じであった (図 3.11B)。これは、AuNP/MNP を外部磁力によって磁気分離し、不純物から NoV-LP を分離することに成功したことを意味し、夾雑物中の NoV-LP をノイズまたは LSPR 蛍光増強効果の減衰なしに検出できることを示している。いずれの場合も優れた感度を示し、LOD は純水で 0.24 pg/ml、糞便で 0.48 pg/ml と推定された。さらに、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、磁気分離処理後の QD-Ab-NoV-LP-Ab-AuNP/MNP の観察を行った (図 3.11C-D)。磁気分離された QD-(NoV-LP)-AuNP/MNP の蛍光像が明瞭に観察されたため、本検出法により標的となる NoV-LP の存在を観察することができた。

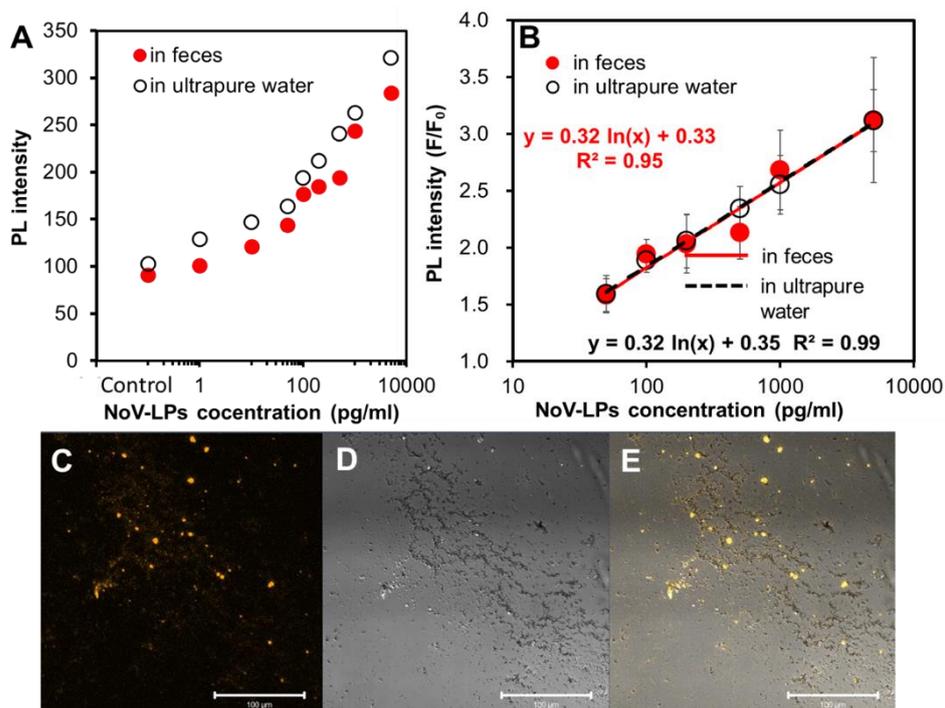


図 3.11 MFIA を用いた蛍光増強 NoV-LP 検出の結果、蛍光増強効果は NoV-LP 濃度(A)と検量線(B) に依存することが示された。共焦点レーザー走査顕微鏡像での磁気分離後の超純水中に再懸濁した溶液中の QD-Ab-NoV-LP-Ab-AuNP/MNP サンドイッチ構造の暗画像 (C)、レーザー走査なしの画像(D)、およびマージした画像(E) 画像中ではレーザー照射により蛍光を発する QD と灰色の時期ナノ粒子が確認された。(B)の誤差範囲は標準偏差(n = 3)を示す。

一方、本 MFIA の検出性能についても、磁気分離なし (Ab-AuNP、Ab-QD) と LSPR なし (Ab-MNP、Ab-QD) の検出系を用いて NoV-LP の検出を行い、比較した (図 3.12, 図 3.13)。超純水では LSPR の蛍光増強が見られたが、糞便サンプル溶液では有意に減少した (図 3.12)。この結果は、LSPR を用いた免疫蛍光検出系に磁気分離を加えることが糞便サンプルから NoV を検出するために有用であることを示している。

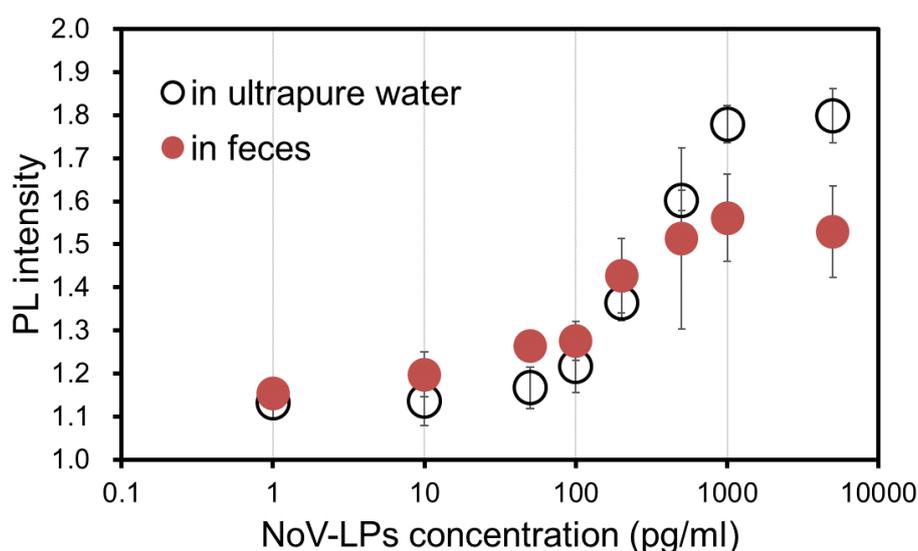


図 3.12 Ab-AuNP と Ab-QD を用いた磁気分離を行わない LSPR による NoV-LP 検出結果。NoV-LP は超純水中(○) 及び糞便中 (0.1 mg/ml) (●)に懸濁された。

また、超純水中の NoV-LP を検出するために MNP と QD を用いた場合、ウイルス濃度に依存して蛍光強度が増強されたが、蛍光強度シグナルは MFIA に比べて低かった (図 3.13)。この結果はプラズモン粒子による蛍光増強効果の検出感度向上効果を示している。

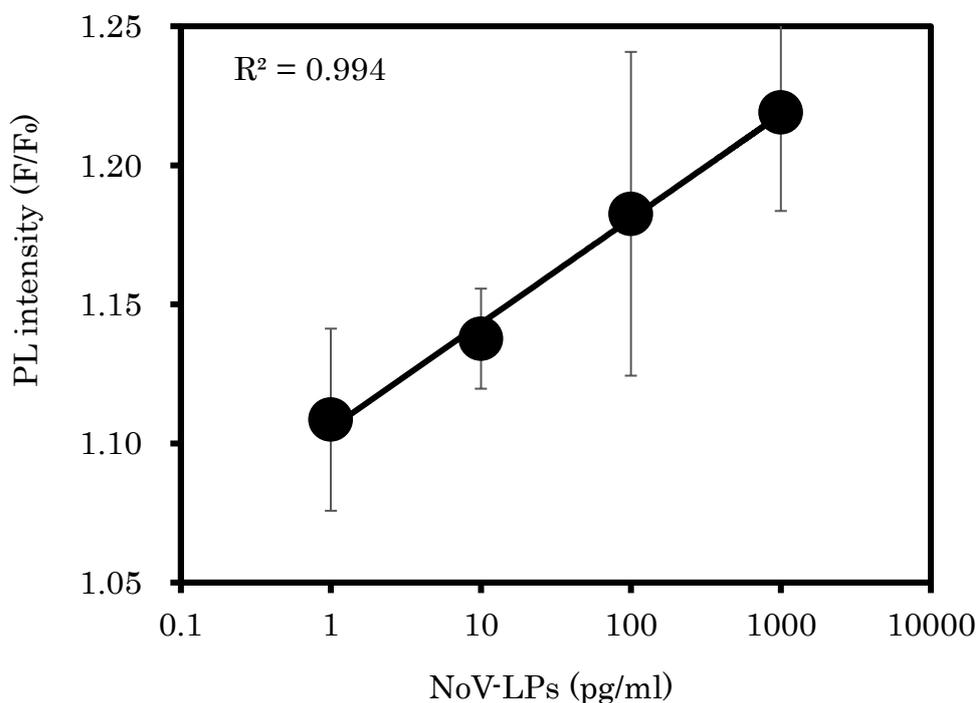


図 3.13 Ab-MNP と Ab-QDs を用いて、LSPR 蛍光増強効果を用いずに行った NoV-LPs の検出。蛍光強度の増加は NoV-LPs の濃度に依存していた。

3.3.4 糞便中からの NoV 検出

感染したヒト糞便からの数種類の臨床 NoV (GII.2、GII.3、GII.4) を、この MFIA を用いて検出した (図 3.14)。GII.2 および GII.3 では、NoV の濃度に応じて QD の蛍光が直線的に増加し、 10^2 から 10^7 RNA copies/ml まで増加し、GII.2 では 98 RNA copies/ml、GII.3 では 84 RNA copies/ml の LOD を示したが、GII.4 では 1000 RNA copies/ml から蛍光が増加し、LOD は 934 RNA copies/ml であった。

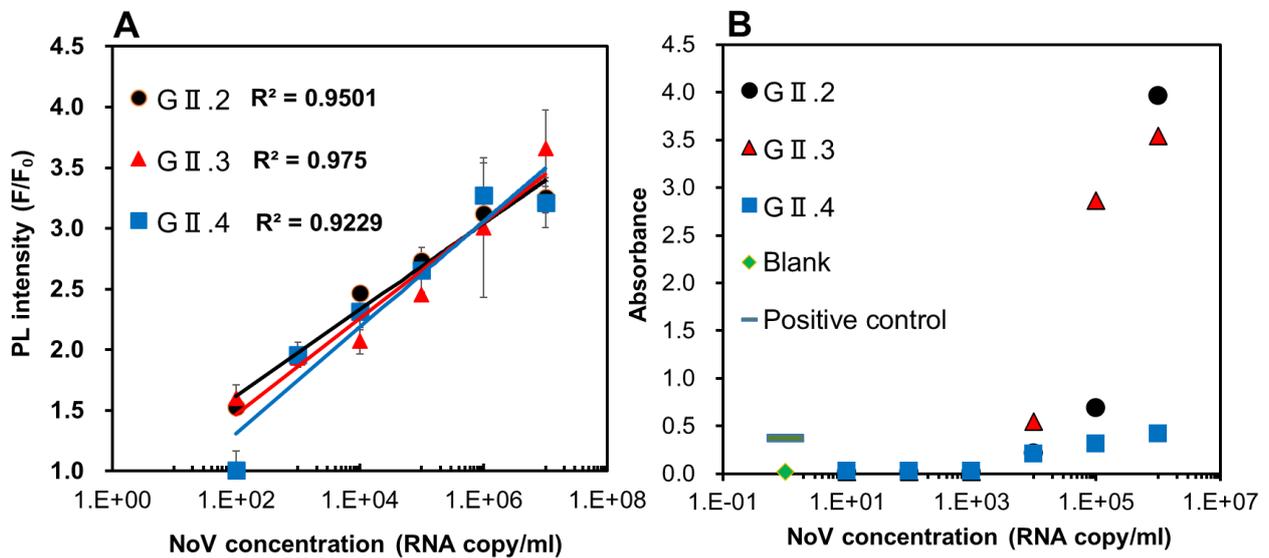


図 3.14 LSPR 増幅 MFIA (本研究) (A) および市販の ELISA キット (B) による臨床検体を用いた NoV (遺伝子型 II.2,3,4) の検出。(A)および(B)の誤差範囲は標準偏差 (n = 3) を示す。

更に検出系の機能を評価するため、同様の臨床検体 NoV サンプルを用いて市販の ELISA キットと比較した (GII.2, GII.3, GII.4)。NoV の 10^4 RNA copies/ml から化学発光強度が増加しており、検出限界は 9825 RNA copies/ml であった。この結果から、本検出系は市販の ELISA キットと比較して約 100 倍の感度を有することが証明された。MFIA の特色はウイルス粒子自体を最大 84 RNA copies/ml で

検出可能である点である。他のウイルス RNA を用いた検出系と比較すると感度は劣るが、ウイルス粒子自体を検出できるバイオセンサーとしては十分な感度を維持している。したがって、磁気分離蛍光増強ウイルス検出系は、実際の臨床サンプルを前処理することなく、磁気分離法により標的ウイルスを不純物から分離することができるため、現場での検出に応用することができる可能性が高い。

3.3.5 MFIA の選択性確認

インフルエンザウイルス A(H7N7)、A(H9N2)、E 型肝炎ウイルス様粒子(HEV-LPs)などの多種のウイルス存在下で検出試験を行い、MFIA の選択性を評価した。試験したネガティブコントロール分析のいずれも LSPR 蛍光増強効果は誘起されていなかった (図 3.15)。この結果より、MFIA は NoV を特異的に検出し、選択性が高いことを強く示唆している。

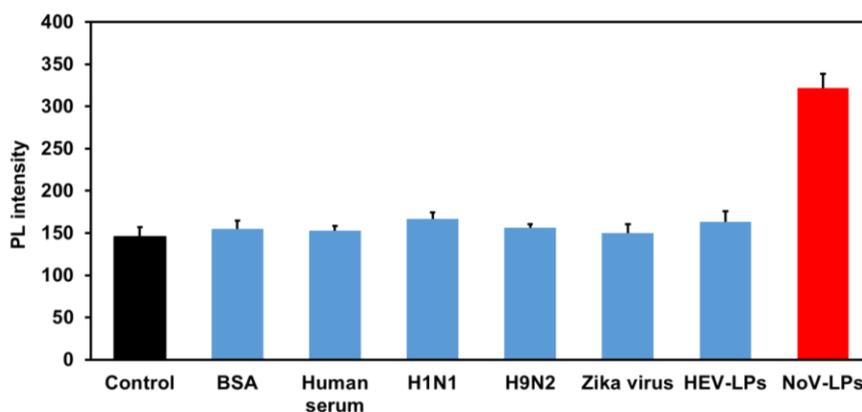


図 3.15 MFIA の選択性。5%BSA、ヒト血清、インフルエンザウイルス A (H1N1、H9N2) 100 ng/ml、ZIKV 10^5 RNA copies/ml、E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-LP) 100 ng/ml を陰性サンプルとして使用した。

3.4 小括

LSPR を基盤とした MFIA は、NoV の高感度、選択的、かつ簡便な検出方法を実証した。NoV-LP の感度は純水で 0.24 pg/ml、糞便で 0.48 pg/ml であった。NV-EIA「生研」と比較して、本法の感度は約 1000 倍向上している。本法を臨床検体の検出に適用したところ、LOD は GII.2 で 98 RNA copies/ml, GII.3 で 84 RNA copies/ml であった。また、遺伝子型によって検出限界は異なっていたが、糞便を含む検体からも安定して NoV を検出することができた。本検出法は臨床検体に含まれる不純物の影響を最小限に抑えることができ、感度と選択性に優れているため、オンサイトでの NoV 検出に適した検出法であると考えられる。

ナノ素材の多機能化はこれまでの課題点を解決することが可能な手法であり、本法における磁性ナノ粒子と金ナノ粒子の複合体化は磁気分離による標的ウイルスの高効率な分離及び LSPR による蛍光増強効果の誘起を同時に実施することを可能とした。

第四章

高導電性ナノ複合体を用いたディスプレイ電極の作製 と白斑病ウイルス (WSSV) 検出への応用

4.1 緒言

電気化学的応答を基盤とする様々な検出技術が開発され、バイオセンシング分野に応用されている (Ju and Chen 2015; Parlak et al. 2017)。更に QD、金属ナノ粒子といったナノ素材を応用し、抗体-抗原反応を利用することで標的物質を選択的に高感度で検出する技術についても報告されており、ナノテクノロジーの電気化学分野における応用可能性が示されている (Fan et al. 2015)。

先行研究として、AuNP が有する電気化学的特性をポリマー中に緊密に形成することでより高機能な電気化学的特性を示す金ナノ粒子-ポリアニリンナノワイヤ (AuNP-PAni) (Berzina et al. 2011; Gangopadhyay et al. 2012) と窒素・硫黄コドーピンググラフェン量子ドット (Ab-N,S-GQD) (Yang et al. 2017) を組み合わせ、新規ナノ複合体を調製し E 型肝炎ウイルス検出に応用した (図 4.1) (Chowdhury et al. 2019)。ポリアニリンのようなナノ構造導電性ポリマーは長期安定性を示し、マトリックスとナノ粒子間の相互作用に影響を与え、電極基材として優秀である。実際に上記検出系を利用したウイルス検出では Ab-GQDAuNP-PAni を修飾した電極が非常に高い導電性を示しウイルスの抗原抗体反応による電極上への結合により生じる電荷移動抵抗 (R_{ct} 値) の増加を検出シグナルとしてインピーダンス法 (EIS 法) により測定することで、簡便に対象ウイルスを検出可能であった。各種電気化学的パラメーターの最適条件下で検出系は 1 fg/ml から 100 pg/ml までの幅広い濃度範囲で HEV-LP を検出し、そ

の検出限界は 0.8 fg/ml であった (Chowdhury et al. 2019)。

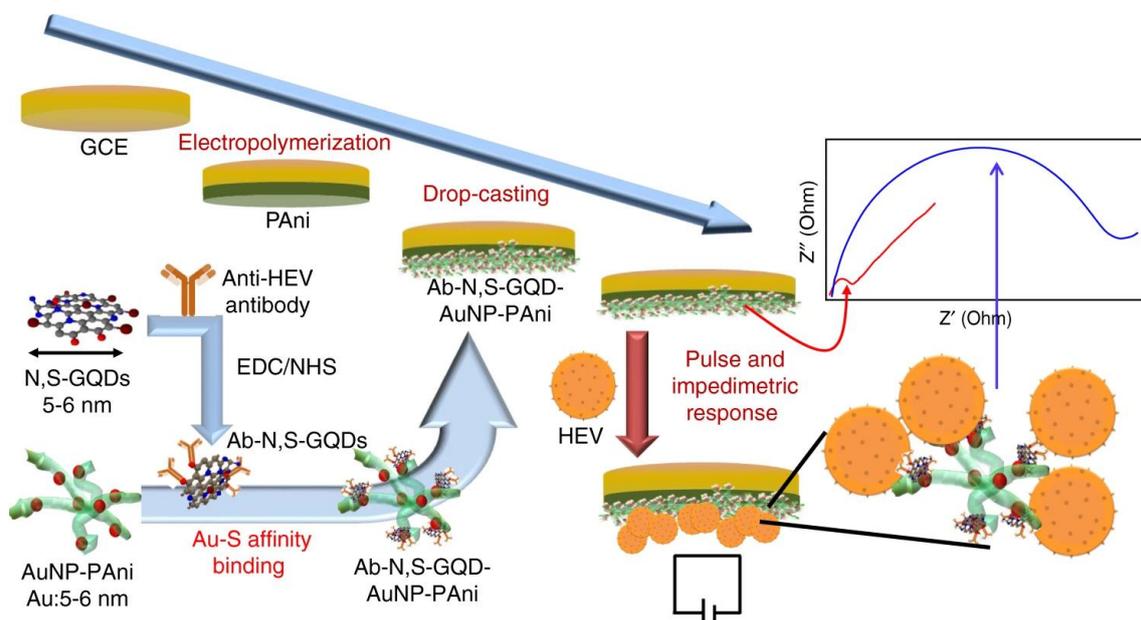


図 4.1 HEV 検出のための外部電磁パルス誘起電気化学バイオセンサー (Chowdhury et al. 2019)。(掲載許可取得済み)

本研究では先行研究で示された Ab-GQD-AuNP-PANI 電極の電気化学的有用性を利用し、エビの白斑病ウイルス (WSSV) を標的としたディスプレイ電気化学センサーを開発した (図 4.2)。WSSV はエビに感染して白点病 (WSD) を引き起こし、3~10 日以内に感染したエビは 100% 死亡する (Escobedo - Bonilla et al. 2008; Sánchez-Paz 2010)。WSSV は台湾で発見され、瞬く間に世界に広がり、エビの養殖業に莫大な経済的損失を与えた (Chou et al. 1995)。最近では、インドで年間数百万米ドルの損失が報告されている (Vaseeharan et al. 2003)。

WSSV はエビとカニやザリガニなどの無脊椎動物水生生物との垂直感染や共食いによって感染が拡大し、高い死亡率を示しており、発症を防ぐためには迅速な検出法の開発が必要である。WSSV を検出するための既存技術は、ウイルス DNA を用いた PCR 法または特異抗体を用いたタンパク質アッセイに依存している (Powell et al. 2006)。PCR 法を用いた際の検出限界 (LOD) は数百個 DNA

copies/ml であり、4~12 時間以内に検出が可能である。WSSV エンベロープ蛋白質の検出には、抗原抗体反応を用いたドットブロット法、ラテラルフロー法 (LFIA)、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) が一般的に用いられている (Chen et al. 2002; Kulabhusan et al. 2017; Shekhar et al. 2006)。LFIA 法における LOD は 1000 DNA copies/ml、ELISA を用いた場合は 120 ng/ml である。しかしながら、養殖における PCR アッセイの利用可能性は、コストが高く、高度に熟練した操作者を必要とするため、依然として限られている。一方、抗原検出法は、ウイルス感染症の迅速な臨床診断には有用であるが、検出感度が低く誤診を招く。

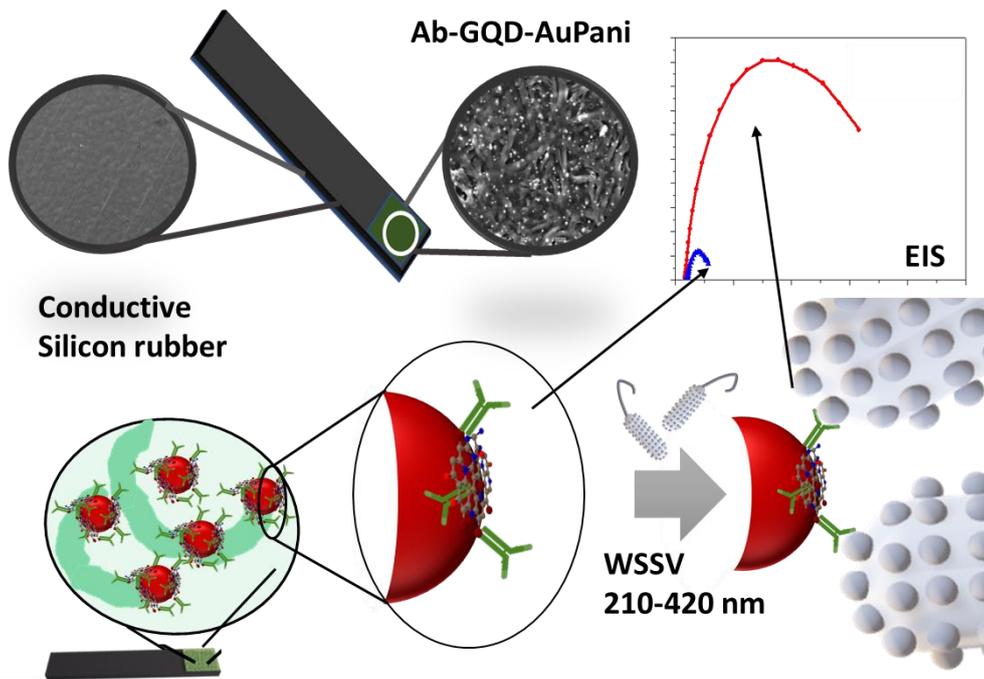


図 4.2 WSSV を検出するための高導電性ディスポーザブル電気化学電極の概要図。高導電性素材 Ab-GQD-AuNP-PANI は修飾した電極上で非常に高い導電性を示し、ここに対象ウイルスが抗原抗体反応により特異的に結合するとウイルスタンパクの付着による Rct 値の増加が観察され、この値をシグナルとして WSSV を検出している。

4.2 実験方法及び材料

4.2.1 使用試薬・検体・機器

使用試薬及び消耗品

Toluene (Sigma, Tokyo, Japan)

Aniline (Sigma, Tokyo, Japan)

Thiourea (Sigma, Tokyo, Japan)

Citric acid (Sigma, Tokyo, Japan)

導電性シリコンゴム (信越化学工業株式会社、東京、日本)

使用抗体・検体

Anti-WSSV VP28 antibody (Abcam Inc., Cambridge, UK)

Anti-mouse monoclonal antibody (Abcam Inc., Cambridge, UK)

Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology., CA, USA WSSV 感染エビ

(国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所 佐藤純様より供与)

使用機器

Voltammetry (SP-150, BioLogic. Inc., France)

Electrodes (EC frontier, Tokyo, Japan)

Reference: saturated Ag/AgCl

Counter: platinum wire

Nanoscope IV Pico Force Multimode (Bruker, Santa Barbara, CA, USA)

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS, ESCA1600 system, ULVAC-PHI Inc., Tokyo, Japan)

4.2.2 N,S-GQD の合成と抗体修飾

N,S-GQD は、クエン酸にチオ尿素と標準的な水熱法によって調製した (Ganganboina and Doong 2019)。0.23 g のクエン酸と 0.23 g のチオ尿素を超純水 5 mL に懸濁し、20 mL 容のテフロン容器に加える。テフロン容器をステンレス鋼のオートクレーブ容器に移した。次いで、この溶液を 160°C で 4 時間加熱し、N,S-GQDs の褐色の懸濁液を得た。合成溶液をファルコンチューブに移し、35 ml のエタノールを加え、5000 g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。調製した N,S-GQD をさらに精製するために、1 kDa の透析バッグで 8 時間透析した。

N,S-GQD にウイルスとの反応性を付与するために、EDC/NHS 反応を用いて GQD 上の N 分子と抗体上のカルボキシル基を用いて抗体修飾した。0.1 M EDC を 5.1 μ g の抗体溶液 (PBS、pH 7.2) と混合し、室温で 30 分間攪拌した後、0.1 M NHS と 1 mL の N,S-GQD を添加し、抗体のカルボキシル基と EDC を反応させて活性エステル中間体を生成させた。その後、0.1M NHS と N,S-GQD 1 mL を加え、7°C で 16 時間攪拌を続け、反応液を 1 kDa 透析バッグを用いて透析し、未反応の EDC と NHS を除去した。最後に、0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.4) 中の抗体共役 N,S-GQD (Ab-N,S-GQD) のストック溶液を 4°C で保存した。

4.2.3 AuNP-PAni の合成

界面重合法を用いて Au-PAni を合成した (Chowdhury et al. 2014)。0.1M 塩酸水溶液中の 3 mM の H₂AuCl₄ を、有機相としてトルエン中の 0.5M アニリンモノマーにゆっくりと流し込み、界面重合を開始した。水相中にポリアニリンナノ

ファイバーがゆっくりと形成され、数分以内で溶液の色が濃緑色になった。また、重合工程中に水相中のポリアニリンナノファイバー内に AuNP を同時に合成し、複合化させた。合成した溶液を室温で 5500×g で遠心分離し、超純水を用いて再分散させて精製した。この精製工程を 3 回行い、AuNP-PAni 溶液を得た。

4.2.4 ディスポーザブル (ディスポ) 電極の作製

Ab-N,S-GQD 溶液を AuNP-PAni 溶液と混合し、7°C で 16 時間攪拌したところ、N,S-GQD にドーブされた硫黄分子が Au-S 親和性結合により AuNP と結合し、GQD-AuNP-PAni を形成させた。

導電性シリコンゴム(CSR)上に Ab-GQD-AuNP-PAni 複合体を修飾するために超純水中で、0.5M 硫酸と 0.1M アニリンモノマーを混合し、3 電極システムのサイクリックボルタンメトリー(CV)によるポリアニリンの電気化学的堆積を行った。CV 曲線は、0~1V の電位範囲で 20 mV/s のスキャンレートで 15 サイクル実施された。CSR 電極の裏面は、ポリアニリンコーティングを避けるために、非導電性テープで覆われていた。次に、15 µl の Ab-GQD-AuNP-PAni 溶液を CSR 上に滴下した。

4.2.5 ディスポ電極を用いた WSSV の検出

検出試験ではあらかじめ参考文献の方法により調製・DNA copies/ml 濃度が決定されたウイルス溶液を用いている (Sato et al., 2008)。ろ過した 0.1M PBS を用いて、WSSV 溶液希釈系列を 10^2 から 10^9 DNA copies/ml まで調製した。

WSSV 溶液中に Ab-GQD-AuNP-PAni/CSR 電極上に滴下し、室温で 10 分間インキュベートし、抗 WSSV VP28 抗体(Ab)と WSSV の抗原抗体反応による結合を

誘起した。この電極を PBST に浸漬して未結合のウイルスもしくは夾雑物を電極上より除去した後、インピーダンス法による電気抵抗値の測定を行った。電極上の電気抵抗値 (Rct) は、100 kHz から 0.1 Hz までの周波数範囲内で、正弦波振幅 5 mV 条件で測定した。このディスク電極を用いた WSSV の検出時間は 15 分未満であった。検出系評価のために、それらの検体を RT-PCR をもちいて測定した結果と比較した。

検出実験に用いられた WSSV 検体は以下の手順に沿い、供与された 10 匹の WSSV 感染エビより採取された。エビの筋組織を 4×PBS の容量でホモジェナイザーを用いてホモジナイズし、続いて 1000 g、4°C で 10 分間遠心分離した。次いで、上清を 0.22 μm の酢酸セルロース膜で濾過し、検体として検出試験に用いた (Sato et al. 2008)。

4.2.6 ウェスタンブロット法による WSSV の確認

得られた WSSV 上清を 18%ポリアクリルアミドゲル上に担持し、Trans-Blot-SD システムを用いて PVDF メンブレンに 15 mA で 1 時間転写した。その後、メンブレンをブロッキングバッファー (0.1% Tween 20 [TBS-T] に濃度 5% w/v となるようにスキムミルクを加えた溶液) 中に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、メンブレンを TBS-T で 3 回 5 分間洗浄した。タンパク質検出のために、メンブレンを一次抗体である抗 WSSV-VP28 ウサギモノクローナル抗体 (1:2000) を含むバッファー中で 4°C、一晩インキュベートし、TBS-T で洗浄した。次いで二次抗体 (抗 IgG [ウサギ] pAb-HRP [1:10000]) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。化学発光法によりバンドを可視化し撮影した。

4.2.7 ディスポ電極の選択性と安定性

IFVA(H1N1)や HEV など、不純物や金属イオンを含む様々な溶液を用いて、Ab-GQD-AuNP-PAni/CSR 電極の選択性試験を行った。また、センサーの実用性を評価するために、異物を含む溶液を使用した。安定性を確認するために、ディスポ電極を 4°C で 56 日間保存し、1 週間ごとに電極の性能を試験した。

4.3 結果

4.3.1 GQD@AuPAni@CSR の光学的・電気化学的性質

AuNP-PAni の表面形状およびポリアニリンナノワイヤー中への AuNP 配置は TEM により確認された (図 4.3A)。N,S-GQD-AuNP-PAni の HRTEM 像は、N,S-GQD の 2 つの結晶化構造の 2 つの特徴的なフリンジパターン (図 4.3B) を示し、図 4.3C に示すように AuNPs の特徴的なフリンジ (0.24 nm) 及び、N,S-GQDs の炭素格子の特徴的なフリンジ (0.21 nm) が観察された (Dutta Chowdhury and Doong 2016; Torres-Mendieta et al. 2016)。

更に、図 4.3D に示すように、N,S-GQD-AuNP-PAni ナノコンポジットの結晶構造特性を XRD で解析した。PAni は、(021) に対応する $2\theta=26.0^\circ$ に特異的なピークを明らかに示した。AuNP ピークは、それぞれ (100)、(110)、(111)、(200)、(220)、(221) 面に対応する $2\theta=23.6^\circ$ 、 25.5° 、 28.2° 、 38.2° 、 44.3° 、 64.4° 、 78.2° に特徴的なピークを示した (Berzina et al. 2011; Dave et al. 2015)。N,S-GQDs が結合した後、ナノ複合体は同様のピークと強度を示し、GQDs の付着が AuNP の構造的な格子変化を引き起こさないことを示している (Cai et al. 2017)。グラファイト層は、XRD スペクトルにおいて 24° にピークを示しており、AuNP の高強度ピークと完全に重なるため、解析されていない。これらのピークは、AuNP-

PA_{ni} ナノ複合体上に N,S-GQDs が付着していることを示している。さらに抗体の修飾は、ELISA によって確認された (図 4.3E)。

各構築段階の CSR 電極表面の電気化学的特性をサイクリックボルタンメトリーで測定した結果より機能的な導電性基盤にもかかわらず、CSR 単体の電荷蓄積量は非常に低い数値を示し、ポリアニリンコーティング後に有意に増加することが示された (図 4.3F)。さらに、ポリアニリンの酸化還元ピークが +0.8/+0.1 V に現れ、ポリアニリンのエメラジン塩の形成を示している (Mirmohseni and Solhjo 2003)。

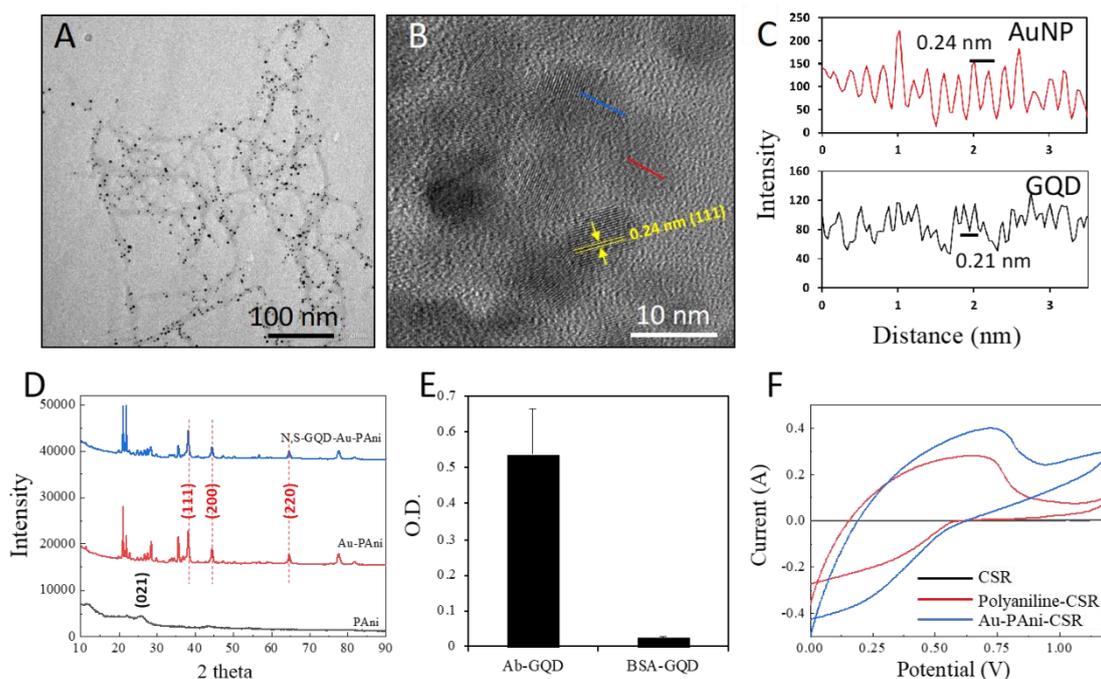


図 4.3 Ab-GQD-AuNP-PA_{ni} の物理的・電気化学的性質解析結果。A) AuNP-PA_{ni} の TEM 像、(B) N,S-GQD-AuNP ナノ複合体の HR-TEM 像、(C) ImageJ を用いたナノ素材表面の特徴的フリンジ解析。D) CSR、PA_{ni}/CSR、AuNP-PA_{ni}/CSR、および N,S-GQD-AuNP-PA_{ni}/CSR の粉末 XRD 分析。(E) Ab-N,S-GQD の ELISA 分析。(F) CSR、PA_{ni}/CSR、AuNP-PA_{ni}/CSR のサイクリックボ

ルタンメトリー図。

また、AuNP-PAni への N,S-GQD の結合を示すために、FT-IR 分析を行った。N,S-GQD のチオール基のための 2570 cm^{-1} に特徴的なピークに加えて、PAni と AuNP-PAni のための同様のピークが観察された。 $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ には、予想通りアミノ基または水酸基のための強いピークも観察された (図 4.4)。AuNP-PAni 修飾後ディスプレイ電極の導電率は電流密度の増加を示し、バイオセンシングに应用するための電極として十分な性能を示した。

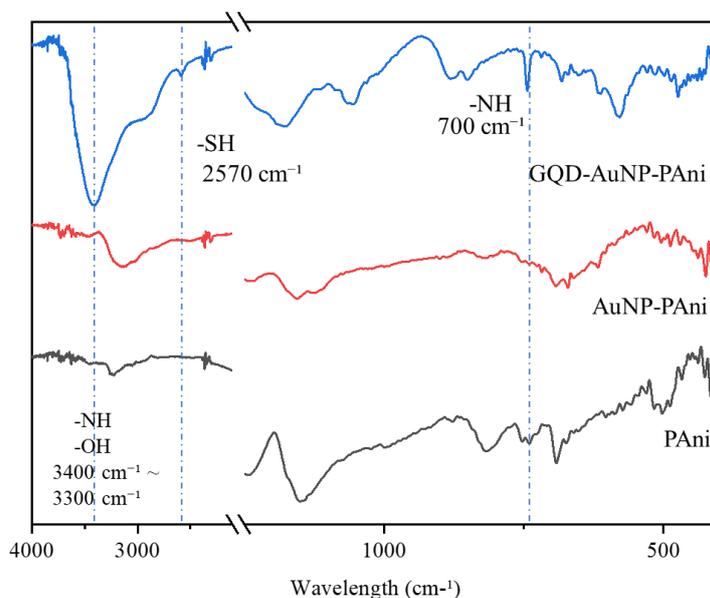


図 4.4 FT-IR 赤外吸収スペクトルによる GQD-AuNP-PAni、AuNP-PAni、PAni 表面の官能基の解析

4.3.2 GQD- AuNP-PAni /CSR の電気化学応答の最適化及び表面状態の解析

CSR 上のポリアニリン層の厚さは、ディスク電極の導電性 (R_{ct} 値) の再現性を維持するための重要なパラメータである。ポリアニリンの厚さは、電解重合ステップの CV サイクル数に正比例している。ポリアニリン@CSR の R_{ct} 値が最も低くなるのは 15 サイクルで、20 サイクル以上になると、酸化還元反応ではポリアニリンのペルニグラニン (青) の過酸化生成が生じ、導電率の低下が見られた (図 4.5)。さらに、電解重合後の CSR の SEM による表面形状観察では、サイクル数の増加に伴い、ポリアニリン層の厚さが厚くなっていることがわかった (図 4.6)。

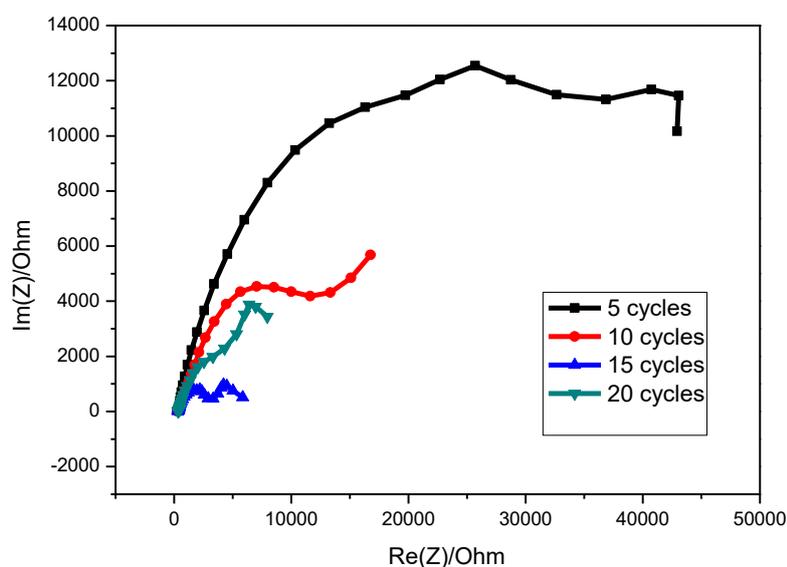


図 4.5 PAAni/CSR センサー電極の 5 から 20 の電解重合サイクル数によるインピーダンス値。

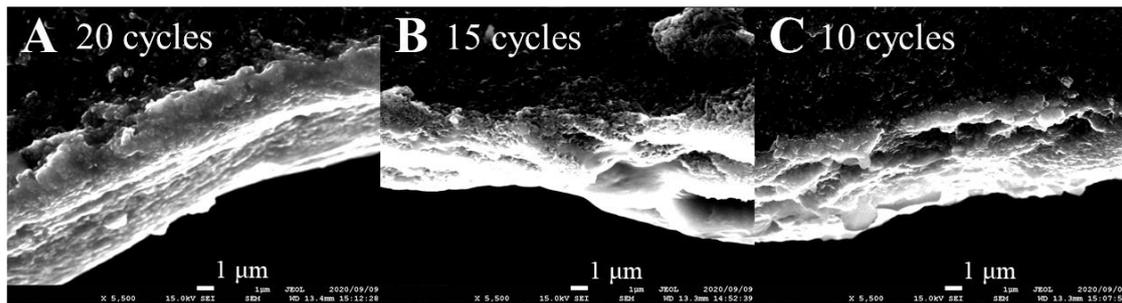


図 4.6 (A–C) CSR 上に成膜されたポリアニリン層の SEM 画像。

GQD-AuNP-PAni/CSR の表面詳細を SEM と AFM でさらに特徴づけた。表面が平滑な CSR は、重合ポリアニリンのコーティングにより粗くなる (図 4.7A–B)。ポリアニリン層でコーティングされた CSR の粗さは、Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni を滴下により修飾した後、再び比較的滑らかな表面形状を示す (図 4.7C)。同様の変化が AFM による表面解析においても確認された (図 4.7D–E)。AuNP-PAni はナノワイヤ構造を形成し、AuNP に N,S-GQD が結合することで、ポリアニリンの多孔質構造を覆うようにナノコンポジットをコーティングした後の電極はより滑らかになる。

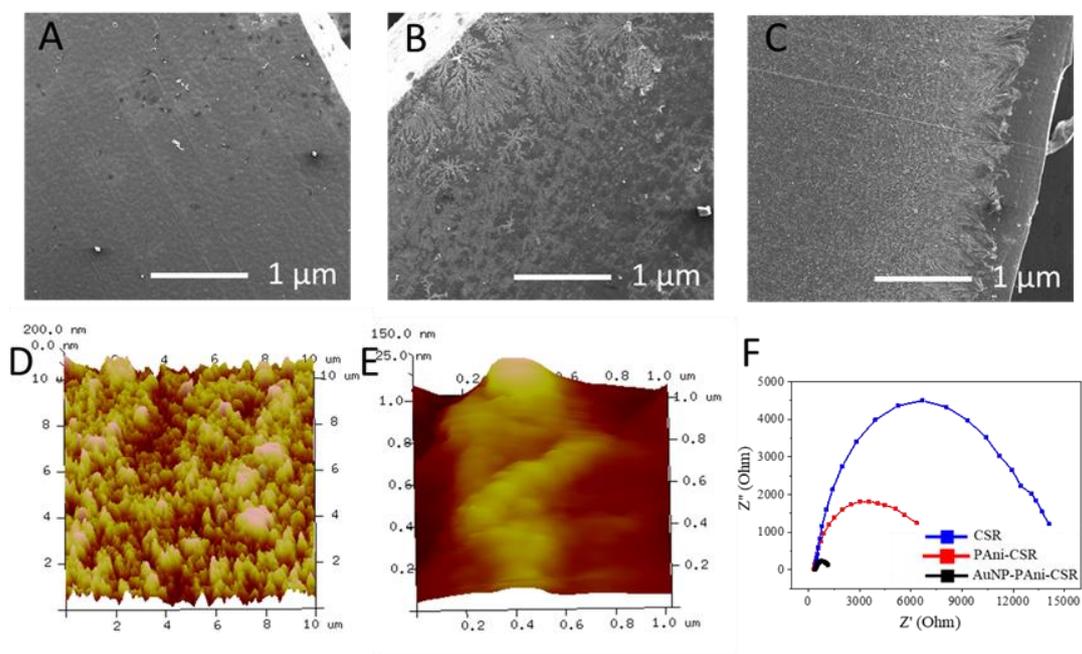


図 4.7 CSR、PANi/CSR、および AuNP-PANi/CSR の表面状態。(A–C) CSR および AuNP-PANi/CSR の SEM 画像および (D–E) AFM 画像、ならびに (F) CSR、PANi/CSR および AuNP-PANi/CSR のインピーダンスナイキストプロット図。

CSR 上に AuNP-PANi を修飾した場合、AuNP を修飾した CSR と比較して、電気伝導率が有意に向上した (図 4.8)。

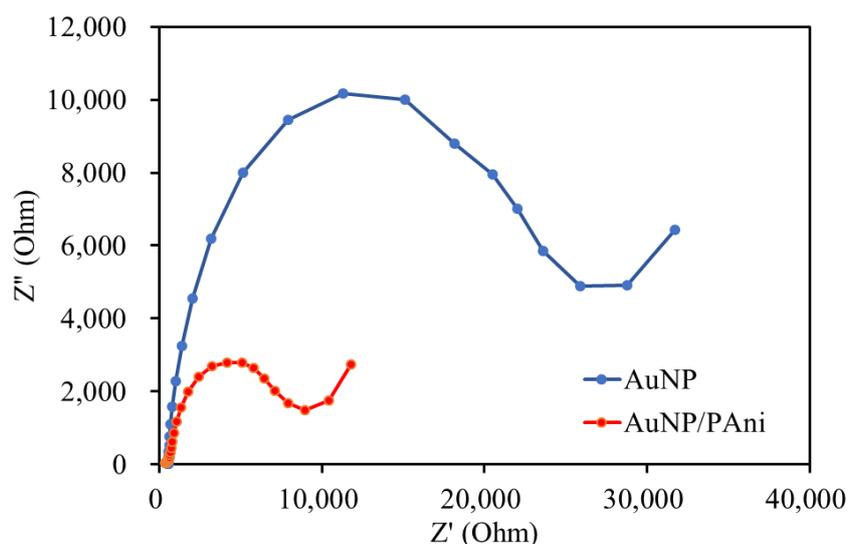


図 4.8 AuNP 修飾 CSR (青線) と AuNP/PAni 修飾 CSR (オレンジ線) の Rct 値の比較。

これらの結果より、AuNP は導電性の低い導電性シリコンゴム上に修飾することで、その導電性を改善することが可能であることが示された。更に、ポリマーとの複合体化により調製した AuNP-PAni は AuNP-ポリマー間の相互作用による電子伝達効率向上を引き起こし、AuNP 単体よりも更に高い導電性を示した。N,S-GQD を抗体修飾用のアンカーとして使用し調製した Ab-GQD-AuNP-PAni は安定した AuNP 上への抗体修飾を達成しただけでなく、GQD が本来持つ電気化学的特性を付与し、結果として Ab-GQD-AuNP-PAni 修飾電極は電気化学的ウイルス検出電極として非常に有用な性質を示すことが本研究から証明された。ナノ素材間の相互作用による電子伝達効率の向上は電気化学バイオセンサーの構築において有効な手段であることが示された。

4.3.3 ディスポ電極を用いた WSSV の検出

実験の初段階として検出に用いる電極の最適な Ab-GQD-AuNP-PAni 修飾面積

を決定するために 2 mm²から 25 mm²までの Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni 修飾面積の異なる電極を用意し、WSSV を検出した (図 4.9)。Rct 値は検出時に得られたナイキストプロットより図面中の等価回路図を用いて算出されており、電極表面周辺の電子電流およびイオン電流は、バルク溶液抵抗 (Rsol)、電極近傍のイオンによって形成される二重層キャパシタンス (C)、電極電解質界面での酸化還元反応による電流の流れを表す電荷移動抵抗 (Rct)、一定の位相要素、および電極に付着したウイルス層の可能性のある抵抗 (Rvir) によって示される。これらの要素のうち、最も大きな変化が生じる Rct 値を用いて検量線を作成している。結果としてセンサー面積が大きいほど、WSSV 結合による Rct 値の変化が顕著であった。検出面積の大きさは、抗原抗体反応時のウイルスとの接触面の大きさを示している。この結果は面積が大きいほど、センサーに結合するウイルスが多いことを示唆している。一方、面積が大きいセンサーは相関係数 (R² 値) が低く、特に高濃度域では誤差範囲が大きい。また、面積が大きくなると、ナノ材料を滴下するだけの簡単な修飾手順では電極間の均一性を得ることが難しくなり、結果としてウイルス検出における R² 値が低くなる。そこで、最も信頼性の高い結果が得られる検出面積 15 mm²の電極を最適検出電極とした。

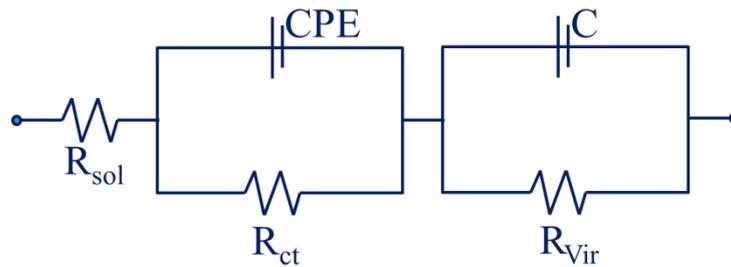
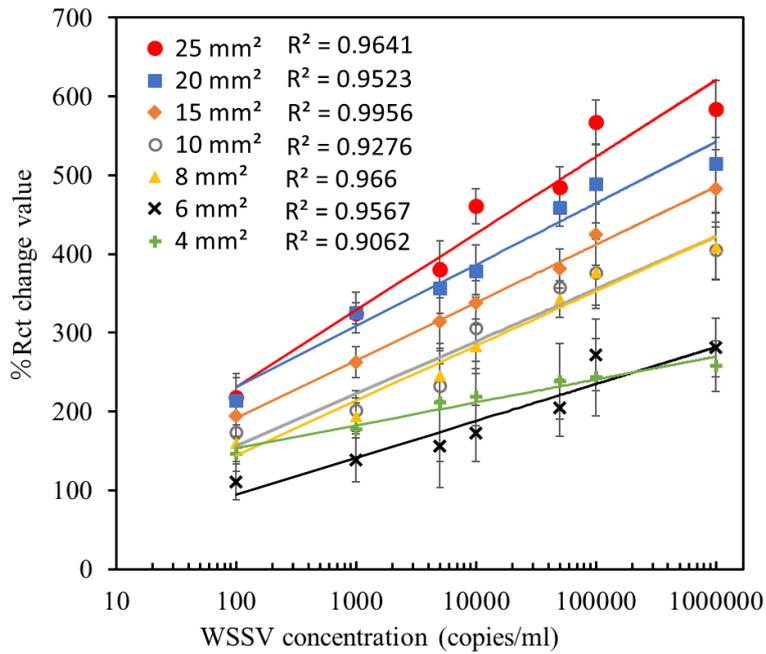


図 4.9 WSSV の検出精度・感度における Ab-GQD- AuNP-PAni -PAni/CSR 表面積の影響及び検量線作成のためのナイキストプロットフィッティングに用いた等価回路図。

最適な Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni/CSR 電極を用いて 10^2 から 10^9 DNA copies/ml の異なる濃度の WSSV をインキュベートした後の Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni/CSR 電極のナイキストプロットを図 4.10A に示す。センサー電極の EIS 応答は、タンパクの結合によるナノ素材間の電子伝達効率低下により WSSV の濃度とともに R_{ct} 値の上昇が生じる。測定信号は、対応するウイルス搭載電極の R_{ct} 値と裸電極の R_{ct} 値との間の信号差の変化率を採用した。校正プロットは、 R_{ct} と

WSSV 濃度との間に優れた線形関係を示した (図 4.10B)。LOD は 48.4 DNA copies/ml であり、WSSV の検出に遜色のない感度である。

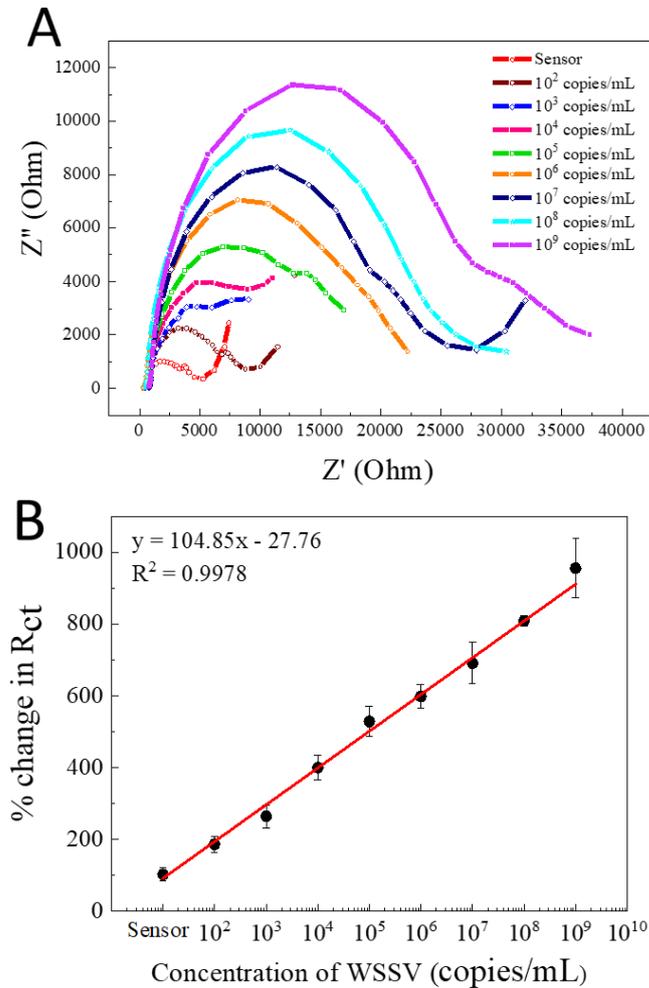


図 4.10 ディスポ電極を用いた WSSV の検出。A) 10^2 から 10^9 DNA copies/ml の範囲での WSSV 濃度のナイキストプロット。B) 得られた R_{ct} 値より作成した検量線。各検出は 3 回実施し、データは平均 \pm SD (n=3) とした。

WSSV 検出後、ウイルスが結合した電極の表面は著しく粗さが増加し、電極上に WSSV が存在することを示した (図 4.11A,B)。

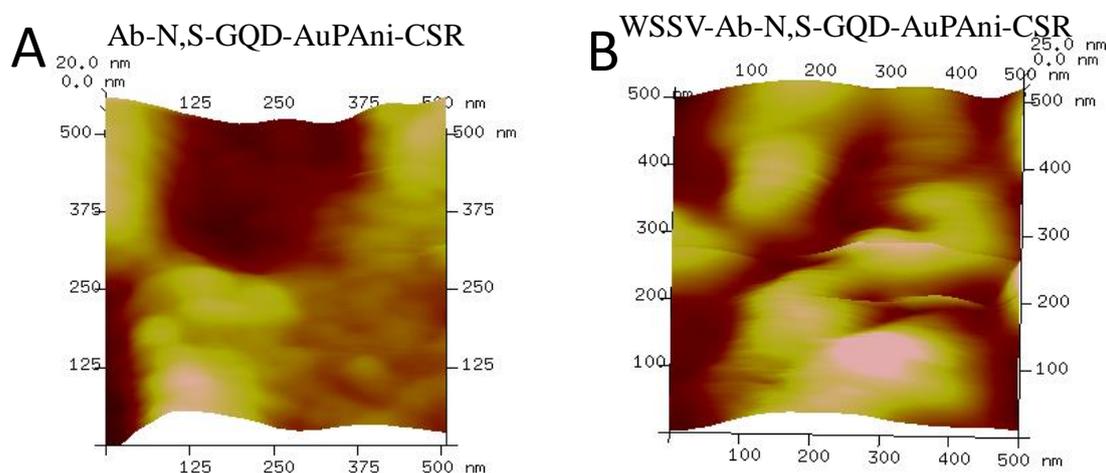


図 4.11 Ab-GQD-AuNP-PAni 電極(A)と WSSV 結合電極(B)の AFM 画像。

4.3.4 検出系の安定性・特異性評価

本検出系の WSSV に対する特異性を確認するために、他の様々なウイルスや夾雑物を含む溶液を用いて、選択性確認試験を行った (図 4.12A)。その結果、WSSV 以外のウイルスや夾雑物を含む溶液中での Rct 値は Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni/CSR の初期 Rct 値と同様の値を示した。検出系の高い選択性は、Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni の緊密なコーティングによって達成された。また、溶液中に多くの夾雑物が存在し、センサー表面に非特異的な吸着が発生しやすい状況下においても PBST 高効率の洗浄で標的 WSSV 以外の物質を除去することができた。

更に検出系の安定性を評価するために WSSV が PBS、L-アスコルビン酸、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} イオンなどと混合して存在している場合、電気抵抗値から算出され

た WSSV 量は本来添加された量と同様もしくはそれ以上の copies/ml を示すかを試験した。結果として、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} の場合は WSSV 添加量と比較し検出により得られた値から算出したウイルス濃度は 90%であった。これらの結果から、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} が標準偏差 $\pm 13\%$ の範囲で検出系に影響を与えていることが示唆された。これはナノ素材表面が負電荷を帯びているためにイオンの吸着が生じ、洗浄による除去が効率的でないために生じたと推定される。しかしながら WSSV の検出における異なる電極を用いた検出での電極間誤差は約 4%であり、本検出系は夾雑物を含む溶液中においても実用性を示している。(表 4.1)

Ab-N,S-GQD@AuNP-PAni/CSR の安定性については、長期的な使用への適用性を観察するために、8 週間の試験を行った。図 4.12B に示すように、 10^4 DNA copies/ml のウイルスを添加した後の Rct のシグナル強度は、35 日後まで 86%であったが、56 日後には 73.4%まで低下した。

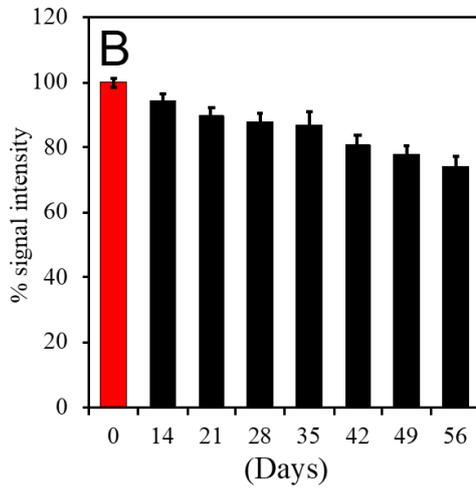
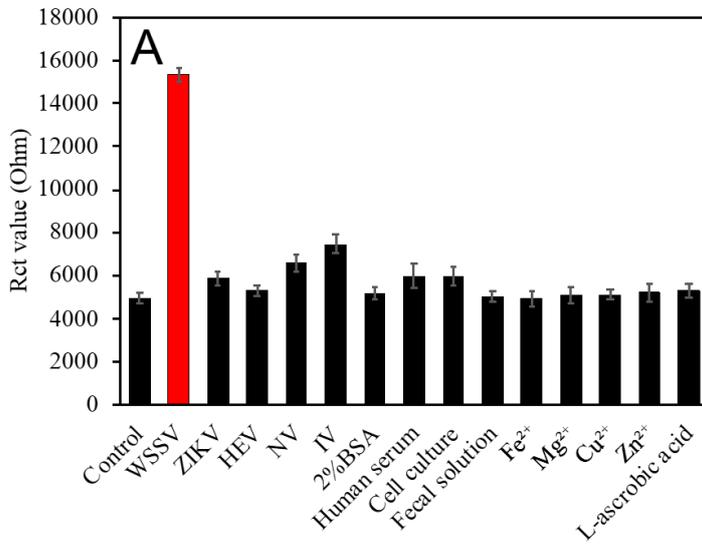


図 4.12 (A) Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni/CSR の WSSV 検出に対する選択性。IFV と HEV の濃度は 10 pg/ml、ZIKV と NoV の濃度は 10^4 copies/ml、ヒト血清は 100%溶液を使用した。糞便溶液は、1ml の PBS 緩衝液に 1g の糞便を遠心分離した溶液の上清を用いた。イオンと L-アスコルビン酸は 1 mM の濃度で調製した。(B) ディスポ電極の安定性。電極を冷蔵庫で 56 日間 2 週目から 1 週間毎に検出した。

表 4.1 様々な夾雑物含有溶液中における WSSV の検出

| Suspension ¹⁾ | Average Rct value ²⁾ | Concentration by Rct (copies/ml) ³⁾ | Recovery ratio (%) ⁴⁾ | Relative error (%) ⁵⁾ |
|--------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| PBS | 15,833 | 10,915.0 | 109.2 | ± 2.4 |
| L-ascorbic acid (1 mM) | 15,244 | 10,987.2 | 109.9 | ± 3.8 |
| Fe ²⁺ (1mM) | 15,784 | 11,577.6 | 110.8 | ± 4.2 |
| Mg ²⁺ (1mM) | 15,484 | 9,187.9 | 91.9 | ± 3.8 |
| Cu ²⁺ (1mM) | 15,662 | 12,523.3 | 125.2 | ± 2.9 |
| Zn ²⁺ (1mM) | 15,422 | 8,512.7 | 88.1 | ± 3.3 |

¹⁾ WSSV concentration in suspension is 10⁴ copies/ml.

²⁾ Average Rct value of WSSV detection (n=3)

³⁾ WSSV concentration was calculated using the calibration curve (Fig. 3B).

⁴⁾ Recovery was defined as $\frac{\{\text{Concentration by Rct}-10^4\} \text{ copies/mL}}{10^4 \text{ copies/mL}} \times 100$.

⁵⁾ Recovery error was defined as $\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$, where x_i and \bar{x} denote Rct and average Rct values (n=3), respectively.

更に検出系の汎用性を評価するために、抗 HEV 抗体と抗 HA 抗体を結合させた 2 つの Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni/CSR 電極を用意し、対応する標的ウイルス (HEV 及び Influenza A (H1N1)) を検出した。いずれのウイルスを検出した場合においても R_{ct} 値はウイルス濃度の増加とともに増加することを示し (図 4.13A,B)、それらの対応する検量線が優れた直線性を示すことを示している (図 4.14A,B)。検出限界は、G3 HEV については 34.6 RNA copies/ml、IFVA については 0.98 fg/ml であった。を調査した。初日ウイルス添加時における R_{ct} 値を 100%とした。

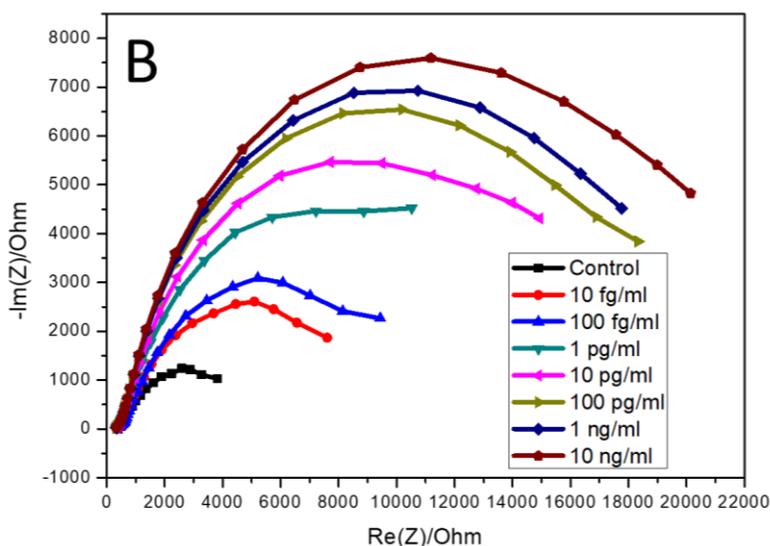
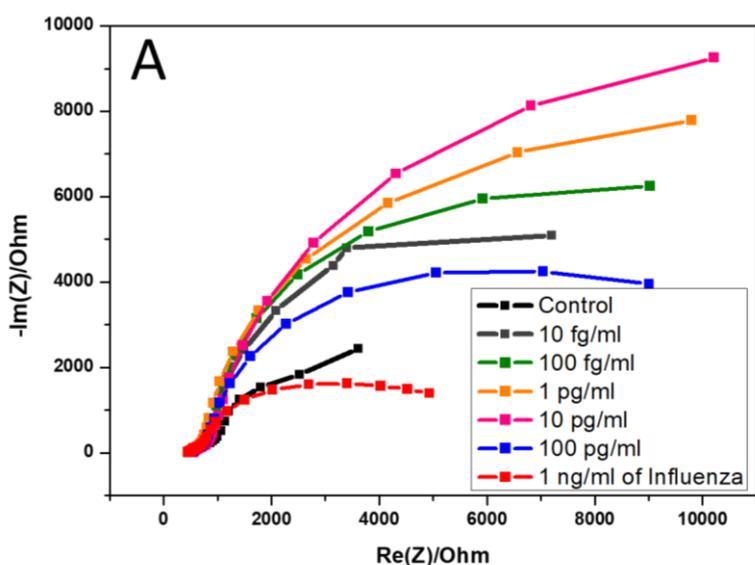


図 4.13 Ab-N,S-GQDs-AuNP-PAni/Pan/CSR センサー電極に A)G3 HEV と B)IFVA を添加する前後のナイキストインピーダンスプロット。

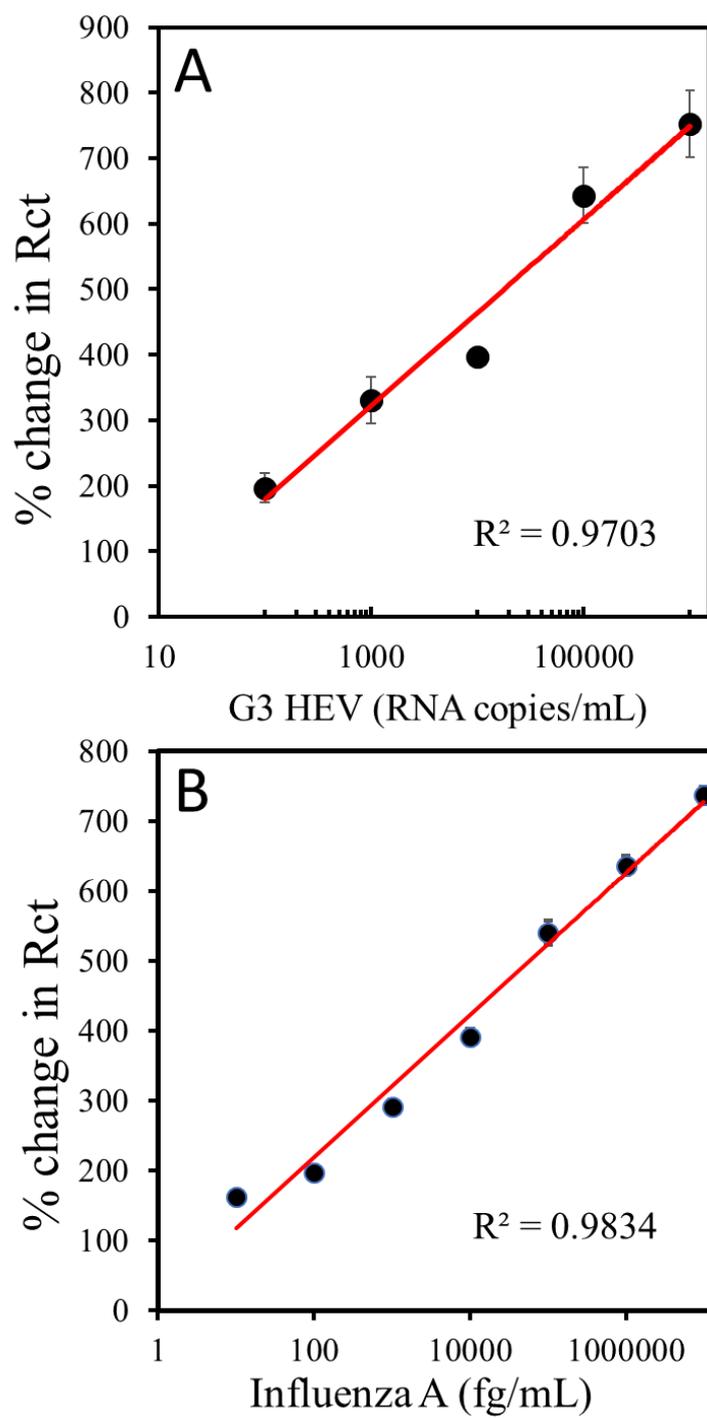


図 4.14 Ab-GQD-AuNP-PAni/CSR 電極を用いた G3 HEV(A)と IFVA(H1N1) (B)の検出より得られた Rct 値をもとに作成した検量線。

4.3.5. 臨床検体への応用

緩衝液中での WSSV の検出に成功した後、10 匹の WSSV 感染エビから実試料を採取し、Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni/CSR を用いて検出試験を実施した。それらの DNA コピー数を、この本法から得られた結果と比較した。検出結果を図 4.15A にまとめた。RT-PCR を用いた検出データと比較し、陰性検体であるサンプル No.2 および 4 は本検出系では 2.4 および 6.5 DNA copies/ml であると算出され、これは本検出系の検出限界を下回る値であることから同様に WSSV 非感染とした。サンプル No.8 および 9 の結果は、RT-PCR 結果から大きく乖離している。しかし、これらのサンプルの RT-PCR を用いた検出結果と本法の検出結果は類似性を示しており、本検出系の実用性を確認することができた。ウェスタンブロット解析では、 10^7 DNA copies/ml/ml 以上のウイルス力価では、約 22 kDa の VP-28 タンパク質バンドが検出されたが、 10^7 DNA copies/ml/ml 未満では検出できなかった (図 4.15B)。本検出系はウェスタンブロットよりも 6~7 桁高い感度を示していることを示している。

また、センサーの性能や目的分析物の検出精度への夾雑物の影響についても評価を行った (表 4.2)。 10^4 copies/ml の一定濃度の WSSV を異なるマトリックスと混合し、同様にセンサー電極で検出した。検出された WSSV の濃度は、得られた R_{ct} 値に基づいて検量線 (図 4.10B) を用いて算出した。検出精度を RT-PCR の結果と比較している。WSSV が PBS、L-アスコルビン酸、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} イオン中にある場合、算出された WSSV の濃度は 110%であったが、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} の場合は 90%であった。これらの結果から、一部のイオンが標準偏差 $\pm 13\%$ の範囲で検出精度に影響を与えていることが示唆された。

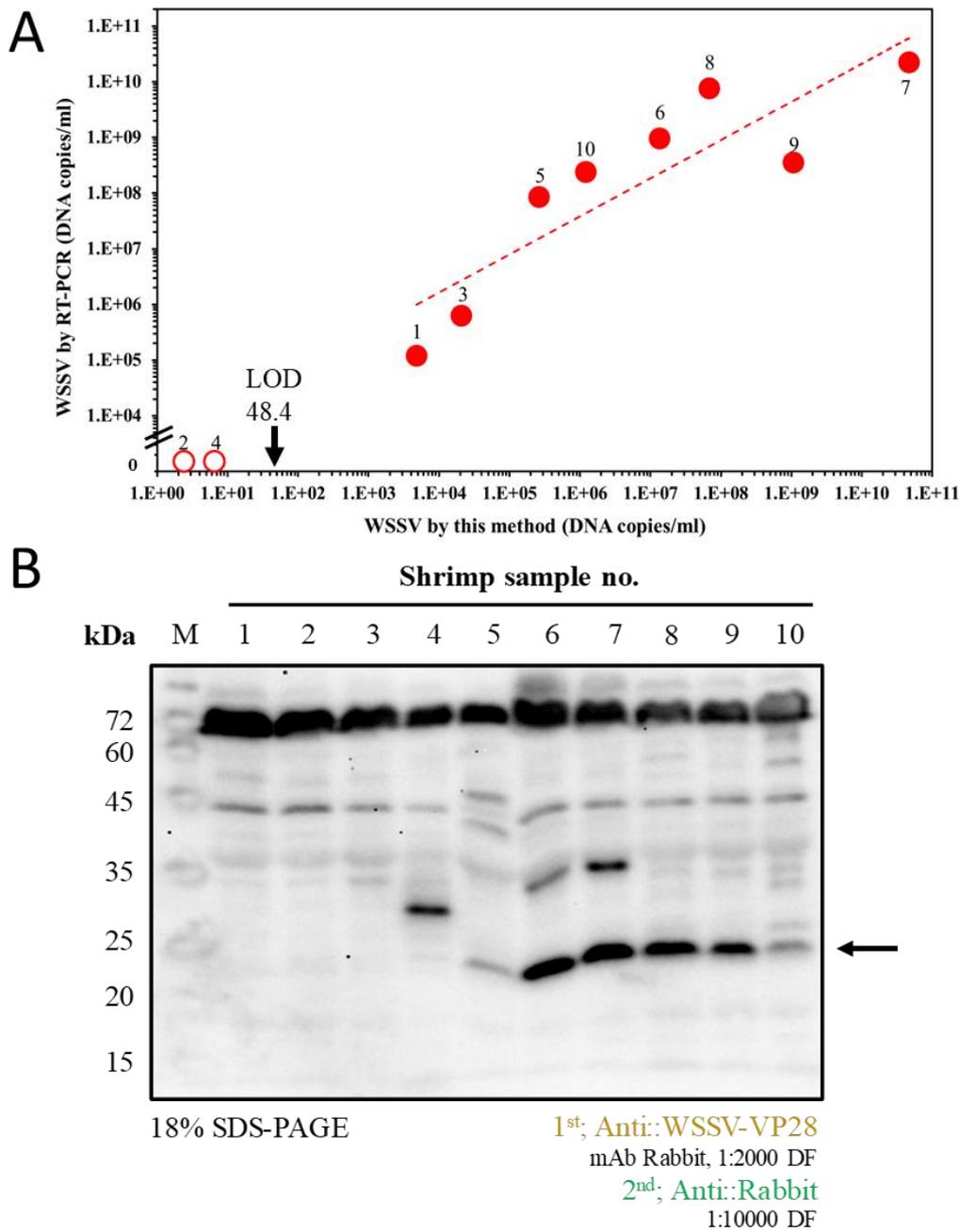


図 4.15 (A) 本検出法と RT-PCR 法の比較。陰性サンプル (○) 及び陽性サンプル (●) は RT-PCR の結果から判断している。LOD は検出限界を示す。(B) 抗 VP28 抗体を一次抗体として用いたエビ試料からの WSSV-VP28 のウエスタンブロットによる分子量解析結果。矢印は VP-28 を示す。

表 4.2 本法と RT-PCR を用いた実試料検出の検出結果の詳細。

| Sample No | R _{ct} value±SD (n=3) | WSSV concentration (DNA copies/ml) | | VP28 detection | Shrimp |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------|--------|
| | | by EIS* | by RT-PCR | | |
| Control | 2680±146 | 0 | – | | |
| 1 | 7179±238 | 4.8×10 ³ | 1.2×10 ⁵ | no | live |
| 2 | 2797±720 | 2.4×10 ⁰ | 0 | no | live |
| 3 | 8988±108 | 2.0×10 ⁴ | 6.2×10 ⁵ | no | dead |
| 4 | 4572±143 | 6.5×10 ⁰ | 0 | no | live |
| 5 | 12101±490 | 2.6×10 ⁵ | 8.4×10 ⁷ | no | dead |
| 6 | 16946±406 | 1.4×10 ⁷ | 9.6×10 ⁸ | yes | dead |
| 7 | 26949±140 | 4.7×10 ¹⁰ | 2.2×10 ¹⁰ | yes | dead |
| 8 | 18946±893 | 6.9×10 ⁷ | 7.5×10 ⁹ | yes | dead |
| 9 | 22308±195 | 1.0×10 ⁹ | 3.5×10 ⁸ | yes | dead |
| 10 | 13988±406 | 1.2×10 ⁶ | 2.4×10 ⁸ | yes | dead |

* The copy number of WSSV was determined from the calibration line (Fig 4.3.2. B) using the measured R_{ct} value.

4.4 小括

本研究では、20分以内に WSSV を迅速かつ高感度に検出するために、CSR 電極上に Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni を修飾したディスク電極を作製した。作製した検出系は高導電性 Ab-N,S-GQD-AuNP-PAni 複合体の修飾により非常に高い導電性を示し、インピーダンス測定の基盤として適した電気化学的特性を示した。WSSV の濃度が 10^2 から 10^9 DNA copies/ml の広い範囲で直線的に増加し、LOD は 48.4 DNA copies /ml であった。WSSV に感染した養殖クルマエビから WSSV の検出行ったところ、RT-PCR と同等の結果が得られ、リアルタイムウイルス検出のための優れたモニタリングシステムとしての可能性を示した。本検出系は、十分な検査設備を持たないエビ養殖場のオンサイト検出系として非常に高い可能性を示した。WSSV の蔓延抑制のための迅速かつ簡便・高感度な検出系として重要な役割を果たすことが期待される。

第五章

光学的・電気化学的シグナルを用いた 2 信号ウイルスの検出

5.1 緒言

ナノ素材を利用したウイルス検出技術は高い感度を示めすが、ウイルスに対する応答シグナルの安定性が最も重要な要素となる。近年、ウイルス検出へのニーズが高まっており、特に感染の初期段階では、信頼性の高い正確な信号を迅速に得ることが可能な高感度で正確なウイルス検出技術の実現が求められている。中でも、ウイルス検出に複数シグナルを用いることの有用性は近年議論されている。(Ganganboina et al., 2020) これまで開発した光学的・電気化学的検出系はウイルス濃度依存的な蛍光増強効果或いは電気抵抗値の向上により高い感度と汎用性を示した。しかし、ナノ界面における相互作用を原理とする検出系をウイルス検出に適応するためには、より信頼性の高いシグナルが必要である。

本章ではこれまでの研究で最適化・増強されたプラズモン粒子の光学的・電気化学的性質を 1 つの基板でシグナル応答を捉えるウイルス検出を目指した。ウイルス検出時に 2 種のシグナルを利用することで偽信号による偽陽性・偽陰性の可能性を低減することでより信頼性の高い検出系構築を目指している。使用する素材としてプラズモン粒子と磁性ナノ粒子、そして高い導電性を有するカーボンナノチューブ (CNT) を複合体化し、標的ウイルスの抗体を修飾した。また蛍光・電気化学シグナル生成素材として CdSeTeS QDs を用いた。Cd を素材とする QD は少量の塩酸を使用することにより溶解することでイオンを

溶出することが可能であり、Cd イオンは -0.8 V 付近に特徴的な電流ピークを有することが知られている (Pinwattana et al., 2010)。この特性を応用し、標的ウイルス特異的な抗体を修飾した QD を用いた光学的・電気化学的 2 信号型ウイルス検出系を考案した。両信号共に AuNP-MNP-CNT による増強が可能であり、増強されたシグナルは高感度なウイルス検出を可能とする。抗体修飾 AuNP-MNP-CNT に結合した対象ウイルスは夾雑物より簡便に磁気分離され、ウイルス検出の為にシグナル測定に用いられる。蛍光シグナルとしてはウイルス上に結合した抗体修飾 QD の蛍光強度が AuNP-MNP-CNT ナノ複合体上の AuNP による LSPR により増強される。ウイルス濃度依存的な蛍光増強シグナルから対象ウイルスを検出することが可能となる。電気化学的にはウイルス上に結合した QD を塩酸により分解し、Cd イオンを溶出することで生じる Cd イオンの -0.8 V 付近に特徴的な電流ピーク値を測定することで対象を検出する。電気化学測定には電位の変化に応答する電流の変化を計測するボルタンメトリー分析法のうち電流サンプリングを印加パルスの後半部に設定し、充電電流による測定系への影響を最小限に抑え、高感度な測定が可能な微分パルスボルタンメトリー (Differential pulse voltammetry: DPV) 法により測定した。ウイルス濃度依存的な電流値の変化から対象ウイルスを正確に検出可能である。本研究では A 型インフルエンザウイルス(IFVA)を対象にセンサーの光学的・電気化学的シグナルを用いた際の標的ウイルス検出能について評価した。概略を図 5.1 に示す。

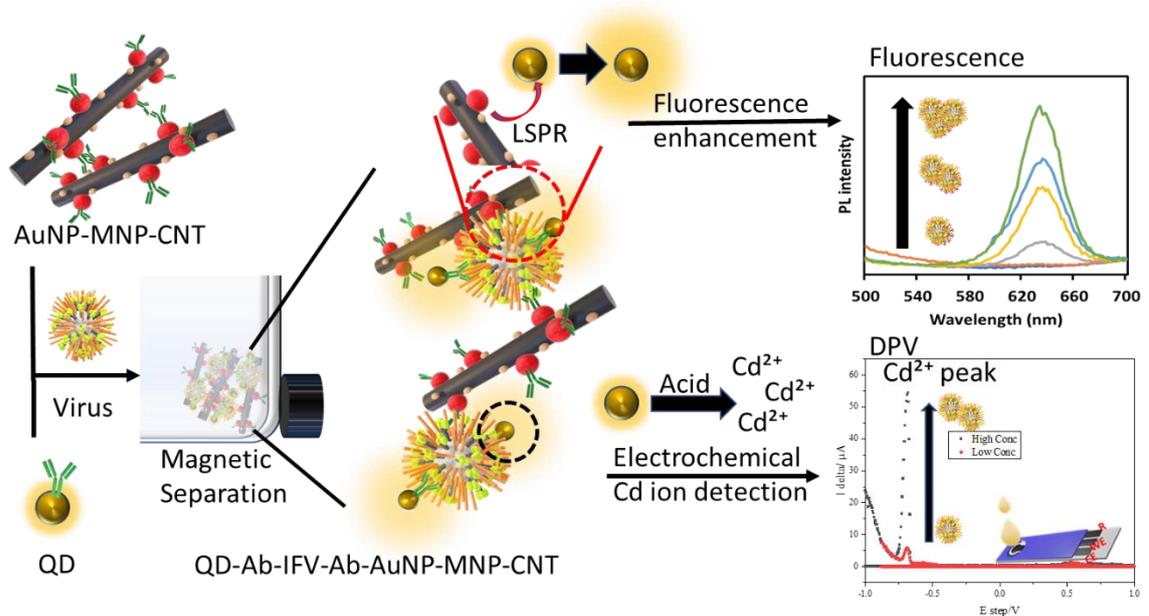


図 5.1 光学的・電気化学的 A 型インフルエンザ(IFVA)検出法の概要図。プラズモンハイブリッドナノ複合体により磁気分離された IFV は QD によりラベリングされる。QD の蛍光強度は AuNP により増強され、ウイルスを光学的に高感度検出することが可能となる。更にウイルス上に結合した QD を酸により分解し、Cd イオンを溶出させることで、Cd イオンに特徴的な-0.8V 付近の電流値から電気化学的にウイルス検出を可能である。

5.2 実験方法

5.2.1 実験方法及び材料

使用試薬

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (Sigma, Tokyo, Japan)

Gallic acid monohydrate (GA) (Sigma, Tokyo, Japan)

Glutaraldehyde (Sigma, Tokyo, Japan)

使用消耗品

スクリーンプリント電極 (DRP-C11L, Metrohm, Swiss)

5.2.2 AuNP-MNP-CNT の調製

AuNP-MNP-CNT を調製するために、MNP を合成した(Lee et al. 2018)。塩化第一鉄四水和物 2 mmol と塩化第一鉄 1 mmol を純水 40 mL に溶解した。次いで、アンモニア溶液 (25% w/w) 1 mL を混合物に添加し、混合物を 10 分間攪拌して、MNP を形成した。その後、この MNP 溶液に GA 3 mmol を加え、90°C で 30 分間攪拌した。反応後、GA 修飾 MNPs (GA-MNPs) をアセトンと磁気分離により精製した。次に、HAuCl₄ 10 mmol と 2 mg の MWCNT を純水 (50 mL) に分散させ、30 分間超音波処理した。この過程で、Au イオンは GA-MNP により MWCNT の表面で還元され AuNP を形成する。さらに、GA-MNP は、GA 中のベンゼンと CNT との π - π 相互作用により、CNT の表面に付着し、複合体を形成した。AuNP-MNP-CNT は 11-MUA を添加した 70%エタノール溶液中で 48 時間攪拌することにより AuNP 上にカルボキシル基を修飾した。

5.2.3 ナノ素材への抗体修飾

各ナノ素材にウイルスとの反応性を付与するために、EDC/NHS 反応を用いてナノ粒子上のカルボキシル基と抗体上のアミノ基を用いて抗体修飾した。0.1 M EDC を 5.1 μ g の抗体溶液 (PBS 中) と混合し、室温で 30 分間攪拌した後、0.1 M NHS と 1 mL の N,S-GQD を添加し、抗体のカルボキシル基と EDC を反応させて活性エステル中間体を生成させた。その後、0.1M NHS と N,S-GQD 1 mL を加え、GQD 表面とアミノ基とのアミン反応を可能にした後、7°C で 16 時間攪拌を続け、反応液を 1 kDa 透析バッグを用いて透析し、未反応の EDC と NHS を除去した。最後に、1 ml の超純水中に懸濁し、標的ウイルスに対する抗

体を修飾した AuNP-MNP-CNT (Ab- AuNP-MNP-CNT) 及び Ab-QD を得た。

5.2.4 インフルエンザウイルスの 2 信号を用いた検出

40 μl の AuNP-MNP-CNT 溶液と 60 μl の CdSeTeS QDs 溶液を混合し検出溶液とした。検出溶液に 100 μl のウイルス溶液を添加し、各種ナノ粒子上に修飾された抗体とウイルスとの結合により QD-Ab-ウイルス-Ab-AuNP-MNP-CNT サンドイッチ構造が形成される。磁気分離により、ウイルスを溶液中より分離した後 120 μl の溶液中に懸濁し、100 μl の溶液を用いて蛍光強度測定を行った

(CdSeTeS QDs Ex: 380 nm Emi: 636 nm)。また 20 μl の検出溶液と 10 μl の HCl を混合した溶液を電解質溶液と共にスクリーンプリント電極 (作用電極:炭素、対極電極:炭素、参照電極:Ag/AgCl) 上に滴下しウイルス上に結合した QD を酸分解することで溶液中に Cd イオンを溶出させた。DPV 法を用いて一定のパルス電圧下で Cd イオンの存在により変化する -0.8 V 付近の電流値を測定した。本研究では標的ウイルスとして IFV (H1N1) を用いた。

5.2.5 検出系の安定性・選択性確認

検出系の標的ウイルス特異性を示すためにインフルエンザウイルス A (H5N6)、HEV-LP、NoV-LP を用いて検出試験を行い本検出系の選択性を評価した。

5.3 結果

5.3.1 AuNP-MNP-CNT 及び CdSeTeS QD の光学的特性及び形状確認

CNT 上に MNP 及び AuNP を形成させることで磁性とプラズモン特性、高い

導電性を示す素材の合成を目指した。構築したナノ複合体上が目的の構造を示すことを証明するため、EDSによりナノ複合体上の各元素をマッピングした(図 5.2A-E)。結果として、マッピングから各種 C,Au,Fe 元素ピークがナノ複合体上に確認された。CNT 上に $\pi-\pi$ 結合により結合した MNP 上に修飾された GA は金イオンを正常にナノ粒子化し、CNT 上の MNP 付近に AuNP が合成される複合体構造が見られた。また、EDS スペクトラムからも各種元素ピークが確認されており(図 5.2A-F)、複合体形成が示唆された。更にナノ複合体上に堆積した AuNP が結晶構造を保持していることを証明するために XRD を用いた結晶構造解析を行った。AuNP ピークは、それぞれ(100)、(110)、(111)、(200)、(220)、(221)面に対応する $2\theta=23.6^\circ$ 、 25.5° 、 28.2° 、 38.2° 、 44.3° 、 64.4° 、 78.2° に特徴的なピークを示した。ナノ粒子複合体は AuNP の CNT 上への修飾後にのみ AuNP に特徴的な吸光度ピーク (510–530 nm) が見て取れた(図 5.3B)。MNP 及び CNT は吸光度ピークを示さないことから、MNP の表面の AuNP 形成が証明された。TEM により、CNT 上には電子密度が異なる粒子が確認された(図 5.3C)。MNP は電子密度が低く、AuNP は非常に高い電子密度を有することから、2 種類の異なるナノ材料により複合体の形成が認められた。更に AuNP-MNP-CNT の電気化学的特性を評価するために、本研究で用いた電極上に AuNP-MNP-CNT を磁気を用いて堆積させ、電極上の導電性を電気化学インピーダンス分光法 (Electrochemical Impedance Spectroscopy: EIS) により測定したところ、電極界面における導電性は AuNP-MNP-CNT の堆積により向上した(図 5.3D)。

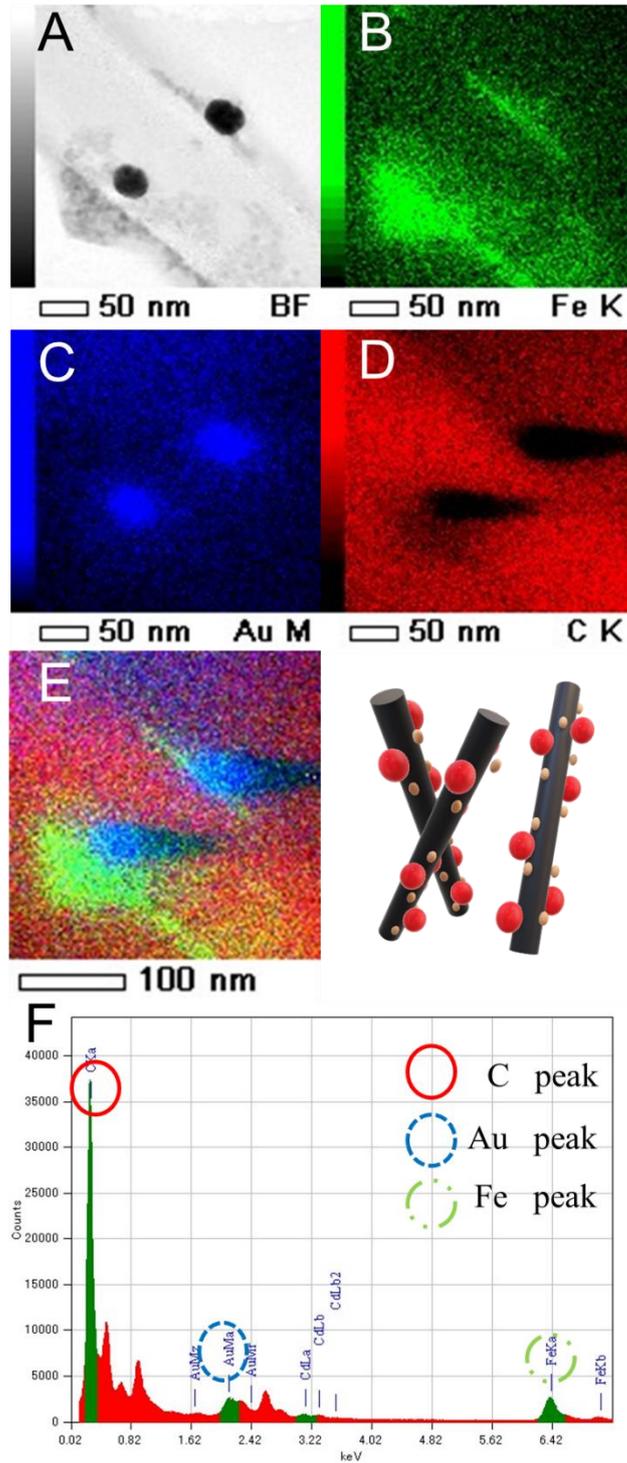


図 5.2 (A) AuNP-MNP-CNT, MNP-CNT, CNT の吸光度。(B) AuNP-MNP-CNT 表面形状の TEM イメージ。(C)電極のみ (黒線) 及び AuNP-MNP-CNT を堆積した電極 (赤線) の導電性。

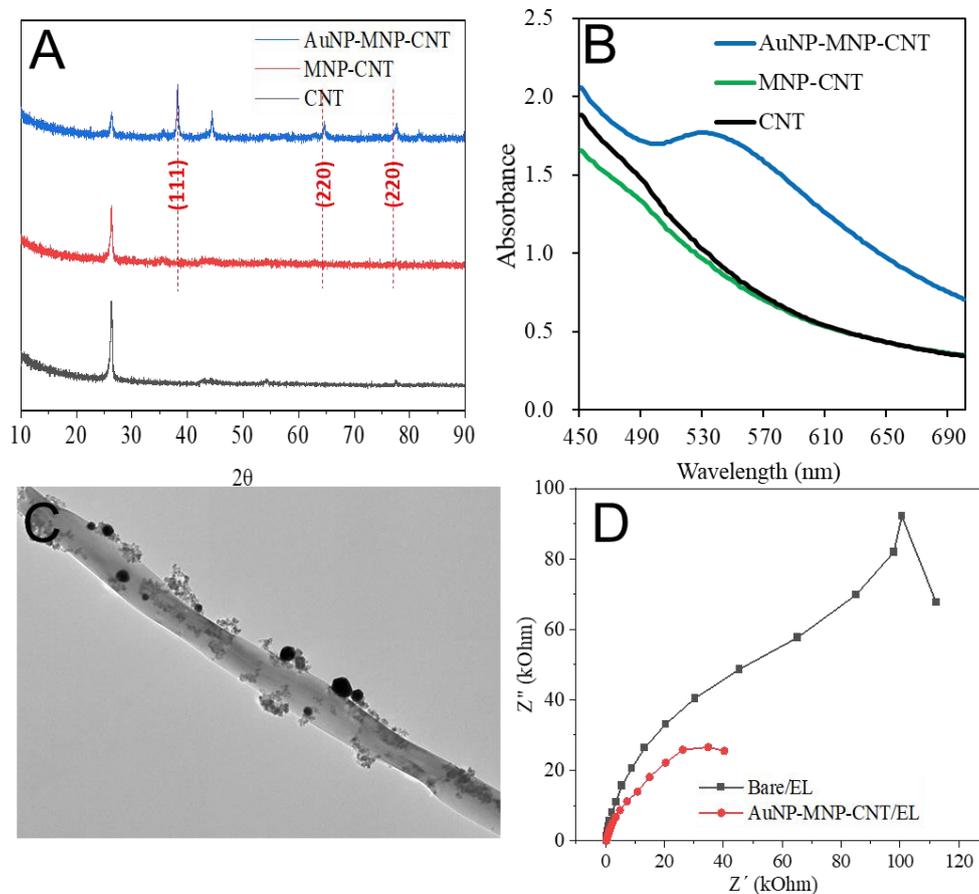


図 5.3 (A) XRD による結晶構造解析結果。(B) AuNP-MNP-CNT, MNP-CNT, CNT の吸光度。(B) AuNP-MNP-CNT 表面形状の TEM イメージ。(C)電極のみ (黒線) 及び AuNP-MNP-CNT を堆積した電極 (赤線) の導電性。

また、各種ナノ粒子上への抗体修飾は ELISA 法により確認した。AuNP-MNP-CNT は AuNP 表面に修飾されたカルボキシル基により抗体を化学的架橋により修飾することが可能であり、ELISA の結果 (図 5.4) から表面上に抗体が結合していることが示唆された。コントロール値については BSA と比較し高い数値が得られたが、これは AuNP 自体が有するナノザイムとしての性質が ELISA における化学発光法に影響を及ぼしたためと考えられる (Khoris et al.,

2018)。QD についても、抗体未修飾 QD に比べ高い吸光度が得られたことからナノ粒子上への抗体修飾に成功した。

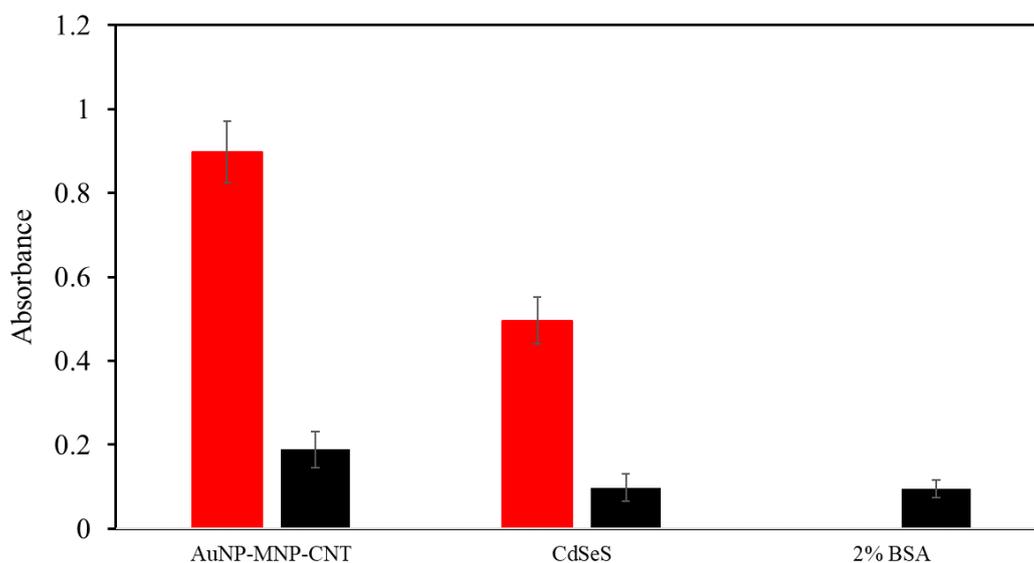


図 5.4 ELISA による抗体修飾の確認。ウイルス上に修飾された抗体は二次抗体である Anti-mouse IgG HRP により捕捉され、発光試薬により抗体の有無が確認される。抗体修飾ナノ粒子 (■)、抗体未修飾ナノ粒子 (■)

更に検出系の性能を評価するために、AuNP-MNP-CNT と MNP-CNT を用いて IFVA(H1N1) 10 pg/ml の検出試験を実施した。コントロールとしては超純水を用いて検出試験を行ったサンプルを用いている。結果として、Ab-AuNP-MNP-CNT ではコントロールと比較し 3.65 倍の蛍光増強効果が得られた (図 5.5)。一方で Ab-MNP-CNT では 1.73 倍とウイルス濃度依存的な蛍光強度の増加傾向は見られたが、これはウイルス数の増加と共に QD の量が増加しているために生じた増加である。この結果から MNP-CNT 上に修飾された AuNP はウイルス検出時にウイルス上の QD を LSPR により蛍光増強していることが示唆

された。

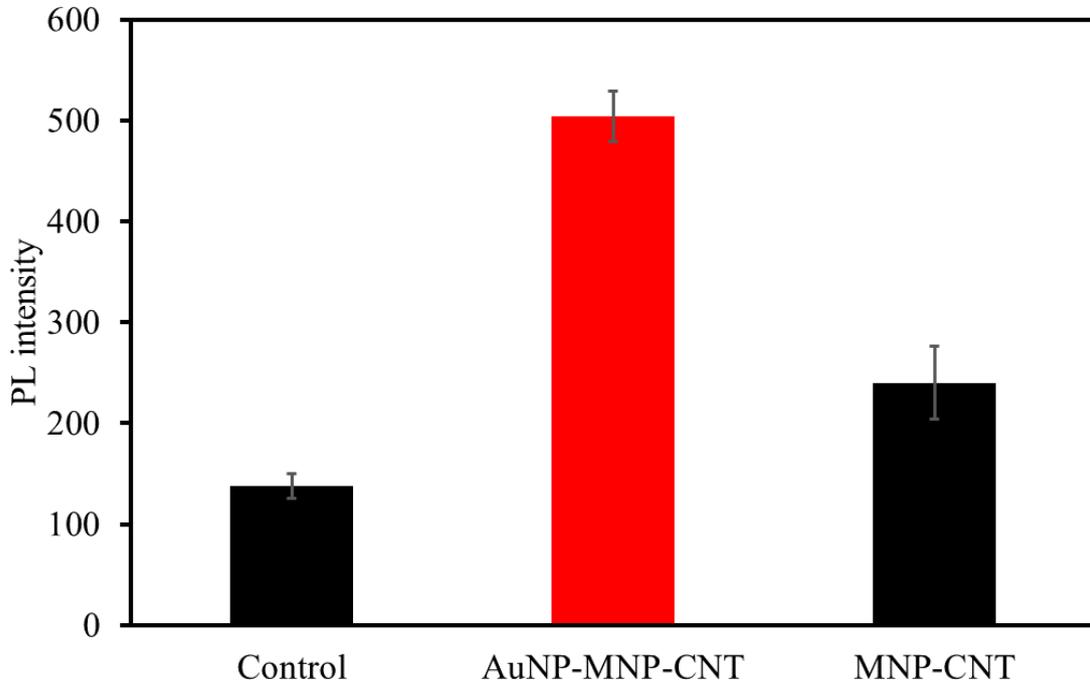


図 5.5 AuNP-MNP-CNT と MNP-CNT を用いた蛍光増強効果の比較。サンプルとコントロールはそれぞれ IFVA(H1N1) 10 pg/ml と超純水を用いた。

5.3.2 インフルエンザウイルスの 2 信号検出

IFVA (H1N1)を対象として LSPR による蛍光増強検出と DPV 法を用いた電流値の測定により検出試験を行った。蛍光強度測定では使用している QD の蛍光ピークに一致する蛍光波長にウイルス濃度依存的な蛍光増強効果が得られた

(図 5.6A)。Ab-AuNP-MNP-CNT により分離された IFV と結合した Ab-QD は AuNP により蛍光が増強した。また、DPV 測定では Cd イオンに特徴的な-0.8 V 付近の電流ピークがウイルス濃度依存的に増加していた (図 5.6B)。ウイルス粒子数が増加すればウイルスに結合した QD 数も増加するため、塩酸による QD のイオン化により生じる Cd イオン量はウイルス濃度依存的に増え基底電位

ピークにおける電流値が増加し、低濃度のウイルス条件下でも電氣的応答を得ることができた。本結果より得られた結果をプロットした検量線は非常に高い直線性を示した (図 5.7A)。また、前述の手法と同様に検量線より算出された LOD 値は 1.78 fg/ml であり、高感度な IFVA (H1N1) の検出が可能であった。更に、DPV 測定でも各ウイルス濃度において得られた電流ピーク値より作成された検量線は高い直線性を示し、算出された LOD は 2.12 fg/ml であり LSPR による蛍光増強検出とほぼ同様の数値を示した (図 5.7B)。

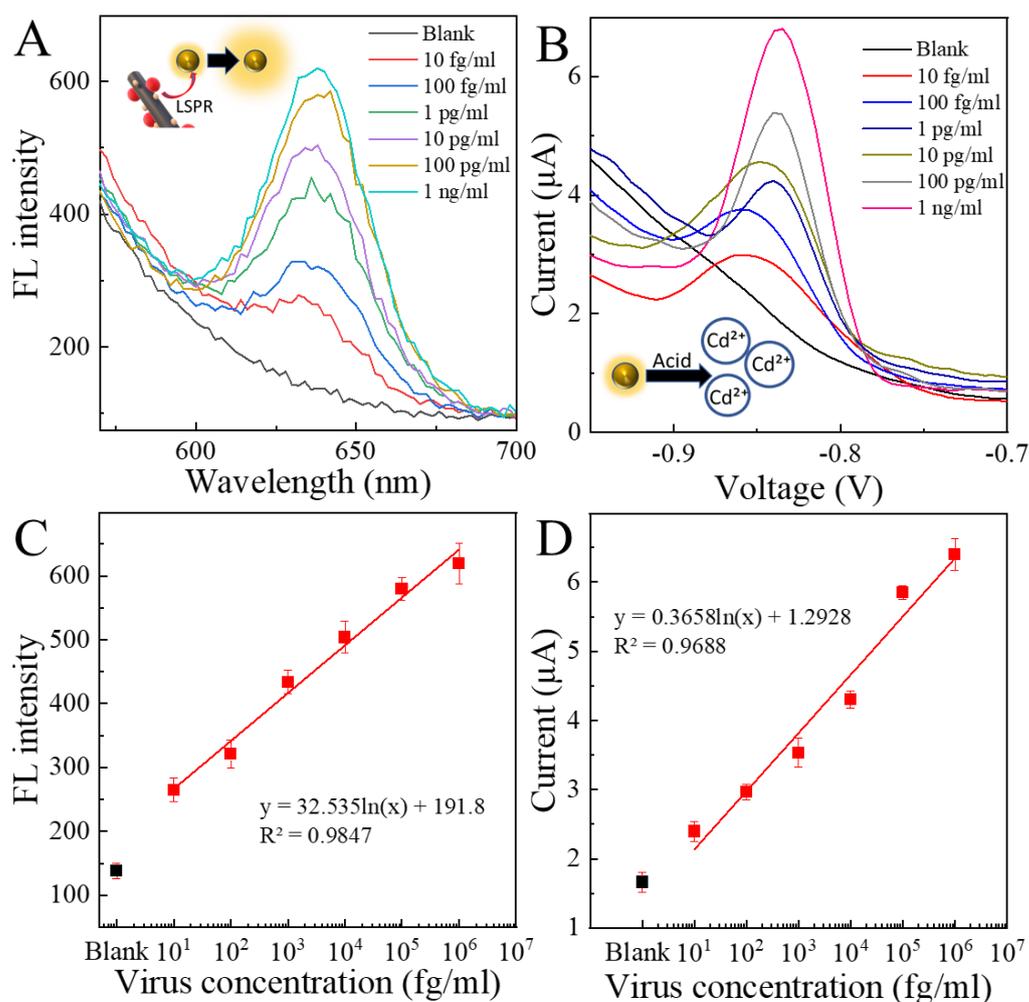


図 5.6 (A) IFV(H1N1)の LSPR 蛍光増強効果によるウイルス検出結果及び (B) DPV 法による検出結果。(C) IFVA(H1N1)の LSPR 蛍光増強効果によるウイルス検出結果の蛍光強度ピーク値より作成した検量線及び (D) DPV 法により得られた電流値とウイルス濃度との検量線。

5.3.3 検出系の選択性確認

IFVA (H5N6)、HEV-LP などの多種のウイルスや VLP 存在下で検出試験を行い、本検出系の選択性を評価した。試験したネガティブコントロール分析のいずれも LSPR 蛍光増強効果及び -0.8 V 付近の電流値増強は確認されなかった (図 5.8A,B)。本検出系において選択性は抗体の標的ウイルス特異性及び Ab-AuNP-MNP-CNT によるウイルス分離の精度に依存している。結果より、本検出系は標的にウイルスに対して高い特異性を有していることが示唆された。

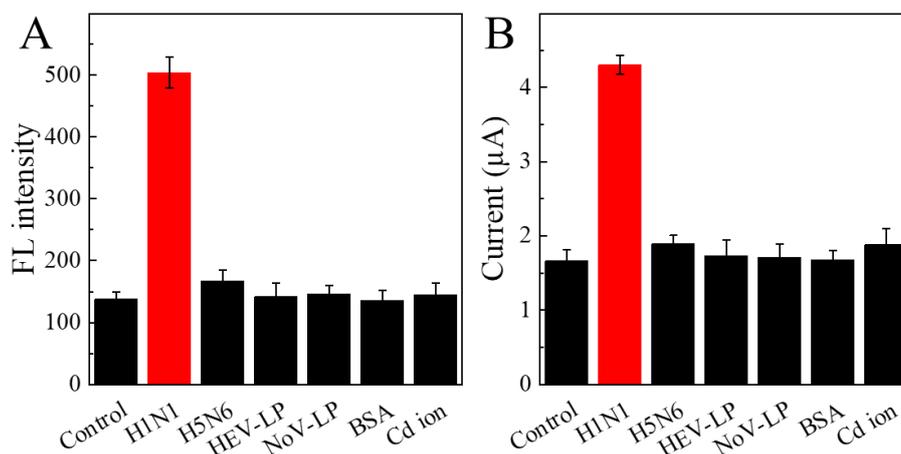


図 5.7 Ab-AuNP-MNP-CNT 及び Ab-QD を用いた検出に対する選択性試験。

(A) LSPR 蛍光増強ウイルス検出及び (B) DPV 法による電気化学的ウイルス検出を用いた選択性確認試験。IFVA (H1N1),(H5N6)、HEV-LP と NoV-LP の濃度は 10 pg/ml、BSA は 2%となるように調製した。

5.3.4 ヒト血清中におけるインフルエンザウイルスの2信号検出

検出系の検出信頼性をさらに実証するために、ヒト血清中に懸濁させた IFVA 溶液を試料溶液として調製し、検出試験を行った結果、ヒト血清中においても蛍光強度と電流値はウイルス濃度依存的な増加を示した (図 5.8 A,B)。両信号のピーク値から生成した検量線から算出した LOD は、光学検出では 4.29 fg/ml、電気化学検出では 2.63 fg/ml であった (図 5.8 C,D)。また、超純水中での検出と比較して、光学検出、電気化学検出ともに検出限界値の有意な低下は見られなかった。この結果は、AuNP-MNP-CNT を用いた 2 信号型ウイルス検出法が非常に信頼性が高く安定した検出システムであることを証明している。

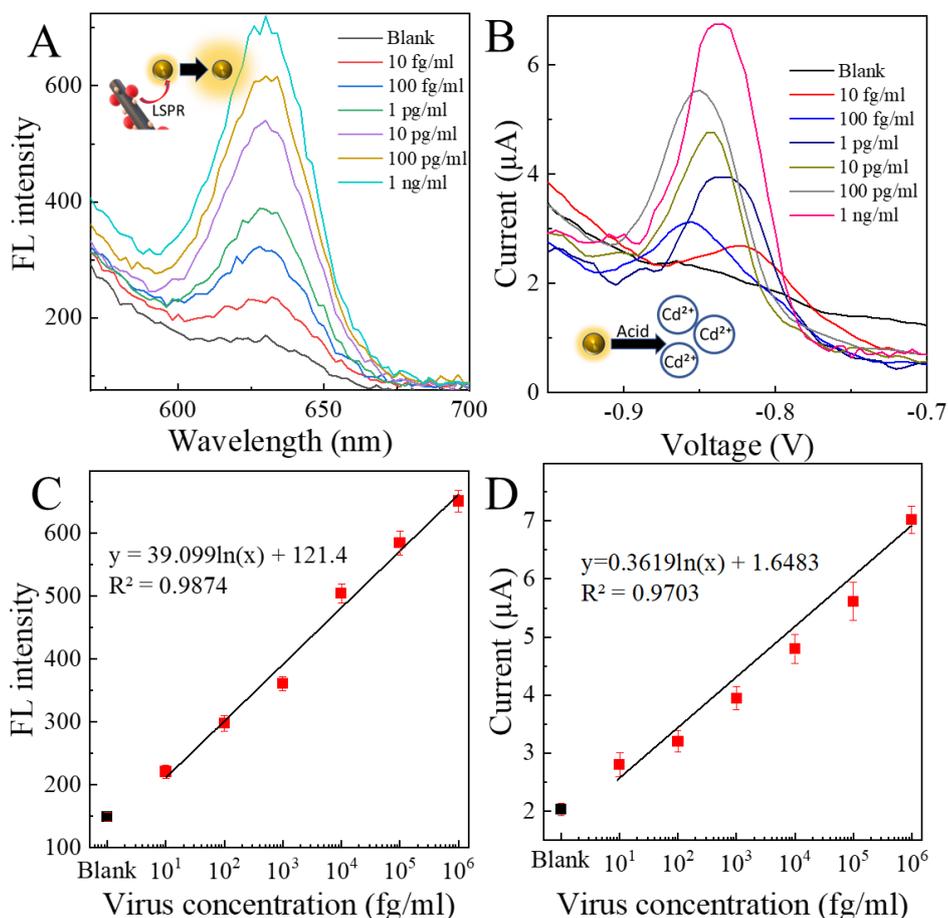


図 5.8 (A) IFV(H1N1)の LSPR 蛍光増強効果によるウイルス検出結果及び (B) DPV 法による検出結果。(C) IFVA(H1N1)の LSPR 蛍光増強効果によるウイルス検出結果の蛍光強度ピーク値より作成した検量線及び (D) DPV 法により得られた電流値とウイルス濃度との検量線。

5.4 小括

本研究では AuNP-MNP-CNT をプラズモン磁気分離ナノ素材及び電気化学的シグナル向上のための導電性素材として使用した。AuNP-MNP-CNT はウイルスの磁気分離と QD の LSPR による蛍光増強の誘起、更に電極上にて電極の導

電性を大きく向上し、結果として QD の素材である Cd イオンを電気化学的に測定することを可能とした。蛍光強度測定及び DPV 法による Cd イオンの電流値測定による IFV の検出はウイルス濃度依存的な 2 信号それぞれの信号強度増強を示し、非常に高い感度を示した。AuNP-MNP-CNT は作用電極上に磁気を用いて堆積させた場合に電極の導電性を向上したことから AuNP-MNP-CNT の使用は電気化学的にも有益であり、AuNP の有する電気化学的ウイルス検出技術への応用可能性についても示唆された。

本法により多機能化したナノ素材が信頼性、感度、簡便性、迅速性を有する新規ウイルス検出技術の開発及び実用化に高い可能性を有することが示唆された。

第六章

総括

6.1 金ナノ粒子を応用したナノバイオセンサーと今後の展望

本研究を通し、特に AuNP の有する性質に着目し、LSPR による蛍光増強効果と電気化学的性質を応用することにより新規ウイルス検出系の作製に成功した (図 6.1)。LSPR による光学的ナノ粒子間相互作用は AuNP のサイズ・表面構造改質・機能化による粒子安定化・蛍光素材との粒子間距離の 4 点を最適化することで安定的に誘起可能であった。LSPR を原理とするウイルス検出系に最も重要な点は、ウイルスとの結合時に AuNP と蛍光物質の距離である。

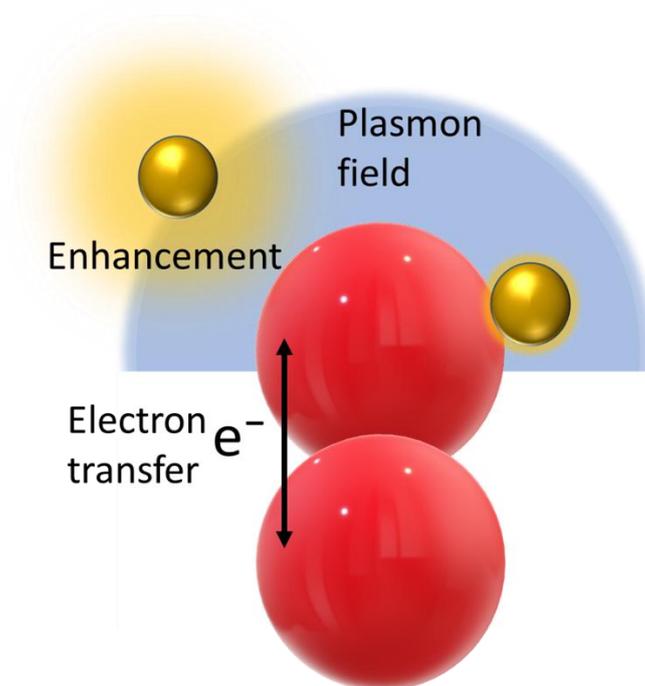


図 6.1 プラズモンナノ粒子上における蛍光物質の蛍光増強効果/消光効果及びナノ粒子間電子伝達の概要図。

ZIKV NS1 タンパク質の検出を目的とした研究ではナノ粒子表面に粒子構造の安定化と非特異的なタンパク質の吸着を抑えるための機能化を施し、AuNP-Ab-対象物質-Ab-QD のサンドイッチ構造形成時に 8 nm から 15.5 nm の距離を維持するようにして LSPR による蛍光を増強し、ウイルス濃度依存的な蛍光増強効果の誘起に成功した。

更に、AuNP による蛍光増強効果は QD の量子効率を非常に強く増強するため、非常に少ないウイルス数であっても増強された QD の蛍光シグナルを測定可能であり、その感度は既存の抗原抗体反応を原理とする検出系と比較し 100 倍以上であった。しかし、夾雑物中における蛍光増強効果の低下は AuNP の表面改質のみでは十分でなかった。LSPR は AuNP から QD の元素へ移動した電子が蛍光元素自体の量子効率向上を補助することで誘起される。そのため、あらかじめ想定されたウイルス抗原以外の非特異的な物質が存在した場合、電子移動効率の低下により量子効率の向上が減少する。夾雑物が多い溶液中では最適条件であっても周囲に存在する夾雑物により上記のような量子効率低下が生じることが想定される。そうした影響を排除し、より安定した蛍光検出技術を構築するために磁性ナノ粒子と AuNP を組み合わせ、AuNP-Ab-ウイルス-Ab-QD のプラズモン誘起状態を形成したサンドイッチ構造を磁気分離により夾雑物中から分離し、洗浄することで夾雑物の影響を少なくした蛍光増強効果によるウイルス検出を可能とした。一つの基板に複数の機能性を付与することは LSPR をはじめとしたナノ粒子間相互作用を利用した検出技術を実用化に近づけるために非常に有効な手段である。

AuNP の粒子表面における高い電子密度と他の貴金属ナノ粒子もしくは素材が近傍に配置された際に生じる非常に効率の高い電子移動速度は電気化学的に応用可能であった。AuNP を修飾した電極は導電性向上が認められた。更に、

導電性ポリマーとの複合体形成は AuNP-ポリマー間における電子伝達効率はより向上し、EIS を原理とする測定として指標となるコントロール（バックグラウンド） R_{ct} 値を限界まで小さい値で均一に電極を形成することが可能であった。結果として、AuNP をベースとしたウイルス検出は電極表面でのナノ粒子間電子伝達効率低下から生じる R_{ct} 値の増加信号を測定可能であり、非常に高感度な検出系の作製に成功した。

LSPR の蛍光と R_{ct} 値 2 シグナルを用いたウイルス検出系は非常に高感度なウイルス検出を可能とした。AuNP-MNP-CNT 複合体はウイルスの溶液中からの磁気分離、ウイルス上に結合した QD の蛍光増強、電気化学的ウイルス検出に使用する電極の導電性向上という 3 種の機能を有し、蛍光検出・電気化学的検出ともに高い感度と直線性を示した。2 信号を用いることでより信頼性の高いウイルス検出が可能であり、非常に有効な検出系であった。

本研究を通し、高感度な新規ウイルス検出系の作製に成功しただけでなく実際のオンサイト検出や診療所における簡便検出を想定した夾雑タンパク質中からの標的ウイルスの 1 ステップ分離機能や 1 つの基板上で複数のウイルスを検出し、亜型を特定する機能を付与した。各検出系ともに臨床検体や実際の検出条件を想定した環境下でウイルスを検出可能であり、実用化にも高い可能性を秘めている。

6.2 本研究における今後の展望

ウイルス検出技術開発におけるナノ粒子やナノ粒子間相互作用の有用性・応用可能性は、本研究により証明された。しかし、ナノ粒子は様々な分野に実用化されているが、ナノ粒子間相互作用を応用したウイルス検出キットは開発・市販されていない。社会的にウイルス検出技術を適応するためには検出シグナルの

安定性、取得数値の信頼性、カットオフ値の設定、アッセイ毎の相対誤差及び長期保存性等のクリアすべき課題点が多数存在している。現在市販される各ウイルス検出技術は、技術的に課題を抱えてはいるものの、オンサイト検出や小さな診療所等では依然需要が高い。

本研究を通して AuNP は非常に優れたシグナル形成素材であることが示された。AuNP 表面上に形成されたプラズモン領域の応用はナノサイズのターゲットであるウイルス粒子上において有意に働き、対象のウイルスを短時間かつ特異的に検出することに成功している。AuNP 自体の安定性についても表面への化合物修飾やポリマーとの複合体化などにより非常に高い分散性を付与することが可能であり、電気化学的検出系では 56 日間シグナル形成素材として性能を示したことから、実際のキット化などで課題となる保存性は素材として問題がない。更に、合成についても既に多数の研究報告があり、複合体化した場合であっても簡便かつ再現性高く合成することが可能である。全体として AuNP は高感度かつ簡便な新規ウイルス検出技術の開発・キット化に非常に有用な素材である。

今後、本研究で最適化された LSPR 蛍光増強効果誘起のナノ粒子間距離である 8 nm から 15.5 nm の距離、ナノ素材同士の複合体化による多機能化や高機能化、電気化学的特性を応用したセンサー実際の応用に向けたキット化のために更に最適化する。具体的にはセンサー部位のコーティングナノ素材やラベリング素材の最適化（サイズ、形状、複合体化）による最適化 2 信号型ウイルス検出系を作製する。更に将来的には 1 つの検出基盤を用いて複数のウイルスが信頼性高く検出可能な技術へと発展させていく。これはウイルス感染により引き起こされる症状が発熱や息苦しさを例として異なるウイルスであっても類似している場合も多く、症状から感染したウイルス種を判断し検出を行うこと

は難易度が高いためである。誤診による不適切な治療は感染者の生命に関わるため感染初期からウイルス種の特特定までを簡便に実施可能な検出技術は重要である。高い信頼性と感度を有する AuNP を応用した 2 信号型複数ウイルス検出技術を完成させていく。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導頂いた指導教員である静岡大学グリーン科学技術研究所 所長 朴龍洙教授に深く感謝御礼申し上げます。また、ナノ素材の合成法からウイルスの検出まで多くの助言をいただき、共に研究を進めた Dr. Ankan 氏に感謝を申し上げます。ウイルス検体・抗体などのサンプルを供与してくださった浜松医科大学医学部 鈴木哲朗教授、国立感染研究所 李天成様、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所 養殖部門 佐藤 純様、静岡県環境衛生科学研究所 微生物部 阿部冬樹様、静岡県庁衛生課動物愛護班 原稔美様、長崎大学 森田公一教授に深く感謝申し上げます。また、同じ研究室において研究を行い、本研究に協力いただいた静岡大学農学部生物工学研究室の皆様、様々な機器を利用させて頂いた静岡大学共同機器利用センターの皆様、最後に本研究を行うにあたり支えていただいた家族・友人の皆様、深く感謝申し上げます。

参考文献

- Abraham, A., Kannangai, R., Sridharan, G., 2008. Nanotechnology: a new frontier in virus detection in clinical practice. *Indian journal of medical microbiology* 26(4), 297.
- Ahmed, S.R., Kim, J., Suzuki, T., Lee, J., Park, E.Y., 2016. Detection of influenza virus using peroxidase - mimic of gold nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering* 113(10), 2298–2303.
- Ahmed, S.R., Takemeura, K., Li, T.-C., Kitamoto, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Park, E.Y., 2017. Size-controlled preparation of peroxidase-like graphene-gold nanoparticle hybrids for the visible detection of norovirus-like particles. *Biosensors and Bioelectronics* 87, 558–565.
- Akiyama, T., Sugawara, M., Arakawa, Y., 2007. Quantum-dot semiconductor optical amplifiers. *Proceedings of the IEEE* 95(9), 1757–1766.
- Alkilany, A.M., Murphy, C.J., 2009. Gold nanoparticles with a polymerizable surfactant bilayer: synthesis, polymerization, and stability evaluation. *Langmuir* 25(24), 13874–13879.
- Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O.M., Iatì, M.A., 2017. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter* 29(20), 203002.
- Armstrong, G.L., Conn, L.A., Pinner, R.W., 1999. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *Jama* 281(1), 61–66.
- Barnes, W.L., Dereux, A., Ebbesen, T.W., 2003. Surface plasmon subwavelength optics. *nature* 424(6950), 824–830.

- Baskoutas, S., Terzis, A.F., 2006. Size-dependent band gap of colloidal quantum dots. *Journal of applied physics* 99(1), 013708.
- Berzina, T., Pucci, A., Ruggeri, G., Erokhin, V., Fontana, M.P., 2011. Gold nanoparticles–polyaniline composite material: Synthesis, structure and electrical properties. *Synthetic metals* 161(13–14), 1408–1413.
- Blackie, E.J., Le Ru, E.C., Etchegoin, P.G., 2009. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules. *Journal of the American Chemical Society* 131(40), 14466–14472.
- Brown, W.C., Akey, D.L., Konwerski, J.R., Tarrasch, J.T., Skiniotis, G., Kuhn, R.J., Smith, J.L., 2016. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nature structural & molecular biology* 23(9), 865–867.
- Čapek, R.K., Lambert, K., Dorfs, D., Smet, P.F., Poelman, D., Eychmüller, A., Hens, Z., 2009. Synthesis of extremely small CdSe and bright blue luminescent CdSe/ZnS nanoparticles by a prefocused hot-injection approach. *Chemistry of Materials* 21(8), 1743–1749.
- Cai, A., Wang, Q., Chang, Y., Wang, X., 2017. Graphitic carbon nitride decorated with S, N co-doped graphene quantum dots for enhanced visible-light-driven photocatalysis. *Journal of Alloys and Compounds* 692, 183–189.
- Caseri, W., 2000. Nanocomposites of polymers and metals or semiconductors: historical background and optical properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21(11), 705–722.
- Chan, W.C., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S., 2002.

- Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current opinion in biotechnology* 13(1), 40–46.
- Chen, H., Kou, X., Yang, Z., Ni, W., Wang, J., 2008. Shape-and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir* 24(10), 5233–5237.
- Chen, R., Wu, J., Li, H., Cheng, G., Lu, Z., Che, C.-M., 2010. Fabrication of gold nanoparticles with different morphologies in HEPES buffer. *Rare Metals* 29(2), 180–186.
- Chen, Z., Wang, C., Shih, H., 2002. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. *Journal of fish diseases* 25(4), 249–251.
- Ching, S., Billing, P., Gordon, J., 1992. Process for immunochromatography with colloidal particles. Google Patents.
- Chou, H., Huang, C., Wang, C., Chiang, H., Lo, C.-F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms* 23(3), 165–173.
- Chowdhury, A.D., Ganganboina, A.B., Tsai, Y.-c., Chiu, H.-c., Doong, R.-a., 2018. Multifunctional GQDs-Concanavalin A@ Fe₃O₄ nanocomposites for cancer cells detection and targeted drug delivery. *Analytica chimica acta* 1027, 109–120.
- Chowdhury, A.D., Gangopadhyay, R., De, A., 2014. Highly sensitive electrochemical biosensor for glucose, DNA and protein using gold-polyaniline nanocomposites as a common matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical* 190, 348–356.

- Chowdhury, A.D., Nasrin, F., Gangopadhyay, R., Ganganboina, A.B., Takemura, K., Kozaki, I., Honda, H., Hara, T., Abe, F., Park, S., 2020a. Controlling distance, size and concentration of nanoconjugates for optimized LSPR based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 112657.
- Chowdhury, A.D., Takemura, K., Khorish, I.M., Nasrin, F., Tun, M.M.N., Morita, K., Park, E.Y., 2020b. The detection and identification of dengue virus serotypes with quantum dot and AuNP regulated localized surface plasmon resonance. *Nanoscale Advances* 2(2), 699–709.
- Chowdhury, A.D., Takemura, K., Li, T.-C., Suzuki, T., Park, E.Y., 2019. Electrical pulse-induced electrochemical biosensor for hepatitis E virus detection. *Nature communications* 10(1), 1–12.
- Corbierre, M.K., Cameron, N.S., Lennox, R.B., 2004. Polymer-stabilized gold nanoparticles with high grafting densities. *Langmuir* 20(7), 2867–2873.
- Corbierre, M.K., Cameron, N.S., Sutton, M., Mochrie, S.G., Lurio, L.B., Rühm, A., Lennox, R.B., 2001. Polymer-stabilized gold nanoparticles and their incorporation into polymer matrices. *Journal of the American Chemical Society* 123(42), 10411–10412.
- COVID, T.C., Team, R., 2020. Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-United States, February 12–March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 69(12), 343–346.
- Dai, J., Guha, R.K., Lee, J., 2009. Efficient Virus Detection Using Dynamic Instruction Sequences. *JCP* 4(5), 405–414.
- Dave, K., Park, K.H., Dhayal, M., 2015. Characteristics of ultrasonication assisted assembly of gold nanoparticles in hydrazine reduced graphene

oxide. RSC advances 5(130), 107348–107354.

Dutta Chowdhury, A., Doong, R.-a., 2016. Highly sensitive and selective detection of nanomolar ferric ions using dopamine functionalized graphene quantum dots. ACS applied materials & interfaces 8(32), 21002–21010.

Escobedo - Bonilla, C.M., Alday - Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M., Nauwynck, H., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. Journal of fish diseases 31(1), 1–18.

Fan, Z., Li, S., Yuan, F., Fan, L., 2015. Fluorescent graphene quantum dots for biosensing and bioimaging. Rsc Advances 5(25), 19773–19789.

Feng, A.L., You, M.L., Tian, L., Singamaneni, S., Liu, M., Duan, Z., Lu, T.J., Xu, F., Lin, M., 2015. Distance-dependent plasmon-enhanced fluorescence of upconversion nanoparticles using polyelectrolyte multilayers as tunable spacers. Scientific reports 5, 7779.

Fischer, M.J., 2010. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. Surface plasmon resonance, pp. 55–73. Springer.

Ganganboina, A.B., Doong, R.-A., 2019. Graphene quantum dots decorated gold-polyaniline nanowire for impedimetric detection of carcinoembryonic antigen. Scientific reports 9(1), 1–11.

Ganganboina, A.B., Chowdhury, A.D., Khoris, I.M., Doong, R., Li, T.C., Hara, T. Abe, F., Suzuki, T., Park, E.Y., 2020. Hollow magnetic-fluorescent nanoparticles for dual-modality virus detection. Biosensors and Bioelectronics 170, 112680.

- Gangopadhyay, R., Chowdhury, A.D., De, A., 2012. Functionalized polyaniline nanowires for biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* 171, 777–785.
- Grabolle, M., Spieles, M., Lesnyak, V., Gaponik, N., Eychmüller, A., Resch-Genger, U., 2009. Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties. *Analytical chemistry* 81(15), 6285–6294.
- Grant, C.D., Schwartzberg, A.M., Norman, T.J., Zhang, J.Z., 2003. Ultrafast electronic relaxation and coherent vibrational oscillation of strongly coupled gold nanoparticle aggregates. *Journal of the American Chemical Society* 125(2), 549–553.
- Guillon, C., Langot, P., Del Fatti, N., Vallée, F., Kirakosyan, A., Shahbazyan, T., Cardinal, T., Treguer, M., 2007. Coherent acoustic vibration of metal nanoshells. *Nano letters* 7(1), 138–142.
- Guo, S., Wang, E., 2007. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica chimica acta* 598(2), 181–192.
- Haiss, W., Thanh, N.T., Aveyard, J., Fernig, D.G., 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra. *Analytical chemistry* 79(11), 4215–4221.
- Han, B., Yuan, J., Wang, E., 2009. Sensitive and selective sensor for biothiols in the cell based on the recovered fluorescence of the CdTe quantum dots–Hg (II) system. *Analytical chemistry* 81(13), 5569–5573.
- Hong, S.C., Lee, J.H., Lee, J., Kim, H.Y., Park, J.Y., Cho, J., Lee, J., Han, D.-

- W., 2011. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International journal of nanomedicine* 6, 3219.
- Huang, H., Susha, A.S., Kershaw, S.V., Hung, T.F., Rogach, A.L., 2015. Control of emission color of high quantum yield CH₃NH₃PbBr₃ perovskite quantum dots by precipitation temperature. *Advanced Science* 2(9), 1500194.
- Ito, M., Watanabe, M., Nakagawa, N., Ihara, T., Okuno, Y., 2006. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation. *Journal of virological methods* 135(2), 272–275.
- Jain, P.K., Lee, K.S., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A., 2006. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *The journal of physical chemistry B* 110(14), 7238–7248.
- Ju, J., Chen, W., 2015. In situ growth of surfactant-free gold nanoparticles on nitrogen-doped graphene quantum dots for electrochemical detection of hydrogen peroxide in biological environments. *Analytical chemistry* 87(3), 1903–1910.
- Khlebtsov, N.G., 2008. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Analytical chemistry* 80(17), 6620–6625.
- Khoris, I.M., Takemura, K., Lee, J., Hara, T., Abe, F., Suzuki, T., Park, E.Y., 2019. Enhanced colorimetric detection of norovirus using in-situ growth

- of Ag shell on Au NPs. *Biosensors and Bioelectronics* 126, 425–432.
- Kitamoto, N., Tanaka, T., Natori, K., Takeda, N., Nakata, S., Jiang, X., Estes, M.K., 2002. Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *Journal of Clinical Microbiology* 40(7), 2459–2465.
- Kneipp, K., Haka, A.S., Kneipp, H., Badizadegan, K., Yoshizawa, N., Boone, C., Shafer-Peltier, K.E., Motz, J.T., Dasari, R.R., Feld, M.S., 2002. Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles. *Applied Spectroscopy* 56(2), 150–154.
- Komarneni, S., 1992. Nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry* 2(12), 1219–1230.
- Kou, B., Crawford, S.E., Ajami, N.J., Czakó, R., Neill, F.H., Tanaka, T.N., Kitamoto, N., Palzkill, T.G., Estes, M.K., Atmar, R.L., 2015. Characterization of cross-reactive norovirus-specific monoclonal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 22(2), 160–167.
- Kulabhusan, P.K., Rajwade, J.M., Sugumar, V., Taju, G., Sahul Hameed, A., Paknikar, K.M., 2017. Field-usable lateral flow immunoassay for the rapid detection of white spot syndrome virus (WSSV). *PloS One* 12(1), e0169012.
- Pinwattana, K., Wang, J., Lin, C.T., Wu, H., Du, D., Lin, Y., Chailapakul, O., 2010. CdSe/ZnS quantum dots based electrochemical immunoassay for the detection of phosphorylated bovine serum albumin. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 1109–1113.

- Kwizera, E.A., Chaffin, E., Wang, Y., Huang, X., 2017. Synthesis and properties of magnetic-optical core-shell nanoparticles. *RSC advances* 7(28), 17137–17153.
- Lee, J., Lee, J., 2017. Magneto-optically active magnetoplasmonic graphene. *Chemical Communications* 53(43), 5814–5817.
- Lee, J., Morita, M., Takemura, K., Park, E.Y., 2018. A multi-functional gold/iron-oxide nanoparticle-CNT hybrid nanomaterial as virus DNA sensing platform. *Biosensors and Bioelectronics* 102, 425–431.
- Leistikow, M., Mosk, A., Yeganegi, E., Huisman, S., Legendijk, A., Vos, W.L., 2011. Inhibited spontaneous emission of quantum dots observed in a 3D photonic band gap. *Physical review letters* 107(19), 193903.
- Lequin, R.M., 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry* 51(12), 2415–2418.
- Lin, J., Zhou, W., Kumbhar, A., Wiemann, J., Fang, J., Carpenter, E., O'connor, C., 2001. Gold-coated iron (Fe@ Au) nanoparticles: synthesis, characterization, and magnetic field-induced self-assembly. *Journal of Solid State Chemistry* 159(1), 26–31.
- Liu, F., Zhang, Y., Ding, C., Kobayashi, S., Izuishi, T., Nakazawa, N., Toyoda, T., Ohta, T., Hayase, S., Minemoto, T., 2017. Highly luminescent phase-stable CsPbI₃ perovskite quantum dots achieving near 100% absolute photoluminescence quantum yield. *ACS nano* 11(10), 10373–10383.
- Liu, W.W., Feng, Y.Q., Yan, X.B., Chen, J.T., Xue, Q.J., 2013. Superior micro - supercapacitors based on graphene quantum dots. *Advanced Functional Materials* 23(33), 4111–4122.

- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research* 30(6), 1292–1305.
- Mattner, F., Sohr, D., Heim, A., Gastmeier, P., Vennema, H., Koopmans, M., 2006. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clinical Microbiology and Infection* 12(1), 69–74.
- Mehand, M.S., Al-Shorbaji, F., Millett, P., Murgue, B., 2018. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. *Antiviral research* 159, 63–67.
- Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., Manson, J.J., Collaboration, H.A.S., 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet (London, England)* 395(10229), 1033.
- Mei, Z., Tang, L., 2017. Surface-plasmon-coupled fluorescence enhancement based on ordered gold nanorod array biochip for ultrasensitive DNA analysis. *Analytical chemistry* 89(1), 633–639.
- Mie, G., 1908. A contribution to the optics of turbid media, especially colloidal metallic suspensions. *Ann. Phys* 25(4), 377–445.
- Mirmohseni, A., Solhjo, R., 2003. Preparation and characterization of aqueous polyaniline battery using a modified polyaniline electrode. *European Polymer Journal* 39(2), 219–223.
- Mokhtarzadeh, A., Eivazzadeh-Keihan, R., Pashazadeh, P., Hejazi, M., Gharaatifar, N., Hasanzadeh, M., Baradaran, B., de la Guardia, M., 2017. Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 97, 445–457.

- Moskovits, M., 2005. Surface - enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering* 36(6–7), 485–496.
- Murphy, C.J., 2002. Peer reviewed: optical sensing with quantum dots. ACS Publications.
- Murphy, J., Bustin, S.A., 2009. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? *Expert review of molecular diagnostics* 9(2), 187–197.
- Nasrin, F., Chowdhury, A.D., Takemura, K., Kozaki, I., Honda, H., Adegoke, O., Park, E.Y., 2020. Fluorometric virus detection platform using quantum dots-gold nanocomposites optimizing the linker length variation. *Analytica Chimica Acta* 1109, 148–157.
- Nasrin, F., Chowdhury, A.D., Takemura, K., Lee, J., Adegoke, O., Deo, V.K., Abe, F., Suzuki, T., Park, E.Y., 2018. Single-step detection of norovirus tuning localized surface plasmon resonance-induced optical signal between gold nanoparticles and quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics* 122, 16–24.
- Nehl, C.L., Hafner, J.H., 2008. Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 18(21), 2415–2419.
- Noda, M., Fukuda, S., Nishio, O., 2008. Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. *International journal of food microbiology* 122(1–2), 216–220.

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* 28(12), e63–e63.
- Park, C., Ishinaka, M., Takada, A., Kida, H., Kimura, T., Ochiai, K., Umemura, T., 2002. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Archives of virology* 147(7), 1425–1436.
- Parlak, O., İncel, A., Uzun, L., Turner, A.P., Tiwari, A., 2017. Structuring Au nanoparticles on two-dimensional MoS₂ nanosheets for electrochemical glucose biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 89, 545–550.
- Peng, J., Gao, W., Gupta, B.K., Liu, Z., Romero-Aburto, R., Ge, L., Song, L., Alemany, L.B., Zhan, X., Gao, G., 2012. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano letters* 12(2), 844–849.
- Pingarrón, J.M., Yanez-Sedeno, P., González-Cortés, A., 2008. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta* 53(19), 5848–5866.
- Powell, J.W., Burge, E.J., Browdy, C.L., Shepard, E.F., 2006. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple®, an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR. *Aquaculture* 257(1-4), 167–172.
- Rahme, K., Chen, L., Hobbs, R.G., Morris, M.A., O'Driscoll, C., Holmes, J.D., 2013. PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *Rsc Advances* 3(17), 6085–6094.

- Razmi, H., Mohammad-Rezaei, R., 2013. Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase: application to sensitive glucose determination. *Biosensors and bioelectronics* 41, 498–504.
- Reimann, S.M., Manninen, M., 2002. Electronic structure of quantum dots. *Reviews of modern physics* 74(4), 1283.
- Ritter, K.A., Lyding, J.W., 2009. The influence of edge structure on the electronic properties of graphene quantum dots and nanoribbons. *Nature materials* 8(3), 235–242.
- Sánchez-Paz, A., 2010. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary research* 41(6), 43.
- Sánchez-Purrà, M., Carré-Camps, M., de Puig, H., Bosch, I., Gehrke, L., Hamad-Schifferli, K., 2017. Surface-enhanced Raman spectroscopy-based sandwich immunoassays for multiplexed detection of Zika and Dengue viral biomarkers. *ACS infectious diseases* 3(10), 767–776.
- Sardar, R., Funston, A.M., Mulvaney, P., Murray, R.W., 2009. Gold nanoparticles: past, present, and future. *Langmuir* 25(24), 13840–13851.
- Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2008. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. *Diseases of aquatic organisms* 82(2), 89–96.
- Schrag, S.J., Wiener, P., 1995. Emerging infectious disease: what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends in ecology & evolution* 10(8), 319–324.

- Seetang-Nun, Y., Jaroenram, W., Sriurairatana, S., Suebsing, R., Kiatpathomchai, W., 2013. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Molecular and Cellular Probes* 27(2), 71–79.
- Shekhar, M., Azad, I., Ravichandran, P., 2006. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 261(4), 1122–1127.
- Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., Gao, G.F., 2016. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nature structural & molecular biology* 23(5), 456–458.
- Stiles, P.L., Dieringer, J.A., Shah, N.C., Van Duyne, R.P., 2008. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 601–626.
- Stramer, S.L., Hollinger, F.B., Katz, L.M., Kleinman, S., Metzger, P.S., Gregory, K.R., Dodd, R.Y., 2009. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 49, 1S–29S.
- Sun, Y., Xia, Y., 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *science* 298(5601), 2176–2179.
- Takemura, K., Adegoke, O., Takahashi, N., Kato, T., Li, T-C., Kitamoto, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Park, E. Y. 2017. Versatility of a localized surface plasmon resonance-based gold nanoparticle-alloyed quantum dot nanobiosensor for immunofluorescence detection of viruses. *Biosens Bioelectron.* 89, 998–1005.
- Torres-Mendieta, R., Ventura-Espinosa, D., Sabater, S., Lancis, J., Mínguez-

- Vega, G., Mata, J.A., 2016. In situ decoration of graphene sheets with gold nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids. *Scientific reports* 6, 30478.
- Upadhyayula, V.K., 2012. Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: a review. *Analytica Chimica Acta* 715, 1–18.
- Vaseeharan, B., Jayakumar, R., Ramasamy, P., 2003. PCR - based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Letters in Applied Microbiology* 37(6), 443–447.
- Verhoef, L., Hewitt, J., Barclay, L., Ahmed, S., Lake, R., Hall, A.J., Lopman, B., Kroneman, A., Vennema, H., 2015. Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999 ?" 2012. *Emerging infectious diseases* 21(4), 592.
- Verhoef, L., Vennema, H., Van Pelt, W., Lees, D., Boshuizen, H., Henshilwood, K., Koopmans, M., Network, F.-B.V.i.E., 2010. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerging infectious diseases* 16(4), 617.
- Vouga, M., Baud, D., 2016. Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenatal diagnosis* 36(9), 799–811.
- Wang, D., Chen, J.F., Dai, L., 2015. Recent advances in graphene quantum dots for fluorescence bioimaging from cells through tissues to animals. *Particle & Particle Systems Characterization* 32(5), 515–523.
- Wang, L., Park, H.-Y., Stephanie, I., Lim, I., Schadt, M.J., Mott, D., Luo, J.,

- Wang, X., Zhong, C.-J., 2008. Core@ shell nanomaterials: gold-coated magnetic oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 18(23), 2629–2635.
- Wang, R., Calvignanello, O., Ratcliffe, C.I., Wu, X., Leek, D.M., Zaman, M.B., Kingston, D., Ripmeester, J.A., Yu, K., 2009a. Homogeneously-alloyed CdTeSe single-sized nanocrystals with bandgap photoluminescence. *The Journal of Physical Chemistry C* 113(9), 3402–3408.
- Wang, Y., Neyman, A., Arkhangelsky, E., Gitis, V., Meshi, L., Weinstock, I.A., 2009b. Self-assembly and structure of directly imaged inorganic-anion monolayers on a gold nanoparticle. *Journal of the American Chemical Society* 131(47), 17412–17422.
- Williams, J.V., Kotov, N.A., Savage, P.E., 2009. A rapid hot-injection method for the improved hydrothermal synthesis of CdSe nanoparticles. *Industrial & engineering chemistry research* 48(9), 4316–4321.
- Yan, X., Cui, X., Li, L.-s., 2010. Synthesis of large, stable colloidal graphene quantum dots with tunable size. *Journal of the American Chemical Society* 132(17), 5944–5945.
- Yan, X., Li, B., Cui, X., Wei, Q., Tajima, K., Li, L.-s., 2011. Independent tuning of the band gap and redox potential of graphene quantum dots. *The journal of physical chemistry letters* 2(10), 1119–1124.
- Yang, L., Li, P., Liu, H., Tang, X., Liu, J., 2015. A dynamic surface enhanced Raman spectroscopy method for ultra-sensitive detection: from the wet state to the dry state. *Chemical Society Reviews* 44(10), 2837–2848.
- Yang, Y., Liu, Q., Liu, Y., Cui, J., Liu, H., Wang, P., Li, Y., Chen, L., Zhao, Z.,

- Dong, Y., 2017. A novel label-free electrochemical immunosensor based on functionalized nitrogen-doped graphene quantum dots for carcinoembryonic antigen detection. *Biosensors and Bioelectronics* 90, 31–38.
- Yu, L., Wu, S., Hao, X., Li, X., Liu, X., Ye, S., Han, H., Dong, X., Li, X., Li, J., 2020. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO. medRxiv.
- Zhang, J., Gao, J., Miller, E.M., Luther, J.M., Beard, M.C., 2014a. Diffusion-controlled synthesis of PbS and PbSe quantum dots with in situ halide passivation for quantum dot solar cells. *ACS nano* 8(1), 614–622.
- Zhang, J., Song, S., Wang, L., Pan, D., Fan, C., 2007. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. *Nature protocols* 2(11), 2888–2895.
- Zhang, L., Song, Y., Fujita, T., Zhang, Y., Chen, M., Wang, T.H., 2014b. Large enhancement of quantum dot fluorescence by highly scalable nanoporous gold. *Advanced Materials* 26(8), 1289–1294.
- Zhao, H., Jin, J., Tian, W., Li, R., Yu, Z., Song, W., Cong, Q., Zhao, B., Ozaki, Y., 2015. Three-dimensional superhydrophobic surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for sensitive detection of pollutants in real environments. *Journal of Materials Chemistry A* 3(8), 4330–4337.
- Zu, H., Guo, Y., Yang, H., Huang, D., Liu, Z., Liu, Y., Hu, C., 2018. Rapid room-temperature preparation of MoO_{3-x} quantum dots by ultraviolet irradiation for photothermal treatment and glucose detection. *New*

Journal of Chemistry 42(23), 18533–18540.