

課題番号	LR016
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ペプチドアレイを用いたアレルギー疾患病態モニタリングシステムの開発
研究機関・ 部局・職名	名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
氏名	大河内 美奈

1. 当該年度の研究目的

本研究では、ペプチドマイクロアレイを用いてペプチドレベルでの抗体エピトープ解析によるアレルギー検査法の開発を目的とし、牛乳アレルギーを例に牛乳に含まれる全タンパク質の網羅ペプチドアレイを作製し、小児牛乳アレルギーの病態把握に有益なエピトープの探索を進めている。平成 24 年度では、小児牛乳アレルギー患者のエピトープ情報に基づいた病態把握と経過予測を目的とし、アレルギー症状の自然経過および経口免疫療法による抗体エピトープの変化について時系列データを解析した。また、エピトープ解析を行う電気化学デバイスの構築に向けて、ポテンシオメトリー法による IgE 抗体検出法について検討した。

2. 研究の実施状況

小児牛乳アレルギーを例にミルクペプチドマイクロアレイを作製し、詳細なエピトープ情報に基づいた高精度解析法について検討している。これまでに、患者血清 10  $\mu$ l を用いた解析プロトコルの標準化を行い、医療機関と連携したミルクアレルギー臨床検体による横断的な解析について検討した。これより、牛乳特異的 IgE 抗体検査で陽性の患者においてアレルギー症状陽性および陰性の患者群を判定する上で有用なエピトープを取得することができた。そこで、本年度はアレルギー症状の経過により患者群を設定し、個々の臨床検体における縦列的な解析を進め、時系列データから症状に伴うエピトープ変化を解析した。自然寛解群およびアレルギー持続群について解析したところ、共通性の高いエピトープ部位がみられた他、群判別に有用なエピトープを取得できた。

電気化学デバイスの構築については、半導体集積回路およびディスプレイ電極を用いてポテンシオメトリー法による検出について検討した。集積回路は MOSFET で構成し、フェロセン誘導体を修飾した金電極を用いることで安定性の高い検出が可能であった。また、抗体エピトープの解析には、アミノ基修飾ビーズ上にエピトープ候補ペプチドを合成し、IgE 抗体および酵素固定化抗 IgE 抗体との反応により、結合した酵素固定化量を検出した。アルカリフォスファターゼ標識抗 IgE 抗体の反応基質としてホスホアスコルビン酸を用い、種々の抗原エピトープに対する IgE 抗体結合量を定量的に検出できた。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計8件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計7件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Masashi Kuboyama Ryuji Kato, Mina Okochi, Hiroyuki Honda (2012) Screening for silver nanoparticle-binding peptides by using a peptide array. <i>Biochem. Eng. J.</i> 66:73-77.</li> <li>2. Yuji Asai, Tomoya Sugita, Ryuji Kato, Mina Okochi, Kyuya Nakagawa, Hiroyuki Honda (2012) Enhancement of the activity of a Lactobacilli-aggregating by freezing treatment. <i>Jpn. Chem. Eng. J.</i> 48:609-614.</li> <li>3. Kei Kanie, Yuji Narita, Yingzi Zhao, Fumiaki Kuwabara, Makoto Satake, Susumu Honda, Hiroaki Kaneko, Tomohiko Yoshioka, Mina Okochi, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato (2012) Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. <i>Biotechnol. Bioeng.</i> 109: 1808-1816.</li> <li>4. Takashi Ochiai, Tomoya Sugita, Ryuji Kato, Mina Okochi, Hiroyuki Honda (2012) Screening of an alpha-amylase inhibitor peptide by photolinker-peptide array. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 76:819-824.</li> <li>5. Mina Okochi, Taku Matsumura, Shuhei Yamamoto, Eiichi Nakayama, Kowichi Jimbow, Hiroyuki Honda (2013) Cell behavior observation and gene expression analysis of melanoma associated with stromal fibroblasts in a three-dimensional magnetic cell culture array. <i>Biotechnol. Prog.</i> 29, 135-142.</li> <li>6. Mina Okochi, Taku Matsumura, and Hiroyuki Honda (2013) Magnetic force-based cell patterning for evaluation of the effect of stromal fibroblasts on invasive capacity in 3D cultures. <i>Biosens Bioelectron</i> 42, 300-307.</li> <li>7. 中柄昌弘、片山真、加藤竜司、大河内美奈、高瀬智和、吉田安子、川瀬三雄、本多裕之；全網羅ミルクペプチドアレイを用いたアレルギー診断ペプチド探索への分布関数解析法の応用、<i>化学工学論文集</i>、39(1)、40-45 (2013) Masahiro Nakatochi, Makoto Katayama, Ryuji Kato, Mina Okochi, Tomokazu Takase, Yasuko Yoshida, Mitsuo Kawase and, Hiroyuki Honda; Comprehensive Combination Analysis for Screening of Significant Peptide Epitopes Using a Slide Glass Type-Exclusive Peptide Array from Milk Protein. <i>Kagaku Kogaku Ronbunshu</i>, 39(1), 40-45 (2013)</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計1件 大河内美奈：ペプチドアレイを用いたアレルギー疾患モニタリングシステムの開発、<i>化学工学</i>、2012、76(4)、219-221</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計25件</p>	<p>専門家向け 計23件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mina Okochi, Taku Matsumura, Hiroyuki Honda: Magnetic force-based cell patterning for evaluation of the effect on invasive capacity in 3D culture system, Caucun, Mexico, 2012.5.18, Biosensors 2012 Congress</li> <li>2. 大河内美奈：ペプチドマイクロアレイを用いたミルクアレルギーの解析、清水、2012.5.25、第44回静岡コロキウム</li> <li>3. Mina Okochi, Yuji Asai, Tomoya Sugita, Hiroyuki Honda: Screening of peptides associated with adhesion and biofilm formation of lactic acid bacteria, San Fransisco, 2012.6.20, American Society for Microbiology 2012 (ASM2012) 112<sup>th</sup> General Meeting</li> <li>4. Syuhei Yamamoto, Kouichi Jinbow, Mina Okochi, Hiroyuki Honda: Three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning for analysis of the competitive effect of NPRCAP and heat treatments. Kyoto, Japan, 2012.8.28-31, The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology/The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine</li> <li>5. 杉田知哉、神谷知宏、大河内美奈、本多裕之：抗体結合ペプチドを用いた抗体ホモジニアス検出系の開発、仙台、2012.9.19-21、化学工学会第44回秋季大会</li> <li>6. 新井小百合、山本修平、大河内美奈、本多裕之：藍藻変異株のスクリーニングに向けた微小液滴培養、仙台、2012.9.19-21、化学工学会第44回秋季大会</li> <li>7. 岡崎宜恭、大河内美奈、本多裕之：カルシウムインジケータを用いた小細胞による脱顆粒反応検出系の構築、仙台、2012.9.19-21、化学工学会第44回秋季大会</li> <li>8. 神谷知宏、片山真、大河内美奈、本多裕之：銀コロイド凝集反応を利用した抗体認識ペプチドによる迅速抗体検出、名古屋、2012.9.19-21、第61回高分子討論会</li> <li>9. Mina Okochi: Application and development of technologies using magnetic nanoparticles for analysis of individual cells. 2012.9.20, Daegu, Korea, IBS2012, KBB-SBJ Joint Symposium</li> <li>10. Mina Okochi, Masashi Kuboyama, Hiroyuki Honda: The design of a biomarker specific probe and label-free colorimetric detection by aggregation of unmodified silver nanoparticles. Yokohama, Japan, 2012.9.23-28, IUMRS-International Conference on Electronic Materials</li> <li>11. Mina Okochi, Yasuko Yoshida and Hiroyuki Honda: Profile of IgE and IgG4 Binding Epitopes in Cow's Milk Allergens Using Peptide Array. Honolulu, USA, 2012.10.9, 2012 Electrochemical Society Pacific Rim Meeting (PRIME)</li> <li>12. 大河内美奈：ナノ磁性微粒子を用いたテクノロジーの開発と応用、神戸、2012.10.23、日本生物工学会90周年記念大会生物工学奨励賞受賞講演</li> <li>13. 山本修平、大河内美奈、本多裕之：磁気細胞パターンニングを用いた薬剤評価システムの構築 2012.10.25、日本生物工学会90周年記念大会</li> </ol>

様式19 別紙1

	<p>14. Mina Okochi, Shinji Koike, Hiroyuki Honda: Detection of HER2 expressing cells using the on-chip RT-PCR employing a magnetic droplet-manipulation system. Kyoto, Japan, 2012.11.27-28, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis</p> <p>15. Shuhei Yamamoto, Mina Okochi, Hiroyuki Honda, Kowichi Jimbow :Analysis of the chemo-thermo sensitivity on B16F1 melanoma in three-dimensional cell culture array using magnetic force-based cell patterning. Kyoto, Japan, 2012.11.27-28, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis</p> <p>16. 大河内美奈：磁力制御によるがん細胞のオンチップ遺伝子発現解析、沖縄、2012.12.5、電気情報通信学会</p> <p>17. 杉田智哉、大河内美奈、本多裕之：トリプトファン消光を利用した抗体検出ペプチドプローブのデザイン、大阪、2013.3.17-19、化学工学会第78年会</p> <p>18. 岡崎宜恭、大河内美奈、本多裕之：ミルクペプチドアレイを用いたエピトープ解析によるアレルギー経過予測と患者群判別 2013.3.17-19、化学工学会第78年会</p> <p>19. 神谷知宏、本多裕之、大河内美奈：液滴ハンドリングシステムを用いた微少細胞からの脱顆粒反応検出、大阪、2013.3.17-19、化学工学会第78年会</p> <p>20. 田邊智哉、杉田智哉、大河内美奈、本多裕之：抗体精製のためのIgG結合ペプチドリガンドの探索、大阪、2013.3.17-19、化学工学会第78年会</p> <p>21. Mina Okochi: Peptide Array Based Analysis of Food Allergy, Philadelphia, USA.,2013.3.20, Pittcon 2013</p> <p>22. 酒井雄規、大河内美奈、本多裕之：糖尿病臨床サンプルを用いた赤血球による血管疾患リスク予測、仙台、2013.3.29-31、電気化学会第80回大会</p> <p>23. 丹羽宏介、酒井雄規、大河内美奈、本多裕之：ポテンシオメトリー法によるアレルギーエピトープの解析、仙台、2013.3.29-31、電気化学会第80回大会</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>1. 大河内美奈：ペプチドアレイを利用したミルクアレルギーの解析、名古屋、2012.7.14、電気化学会主催「産学官連携フォーラム」</p> <p>2. 大河内美奈：ペプチドアレイを用いた食物アレルギーの経過解析、名古屋、2013.1.29、名古屋大学 予防早期医療創成センター 第3回ワークショップ</p>
<p>図書</p> <p>計3件</p>	<p>1. 大河内美奈、本多裕之 「磁性微粒子を用いた一細胞機能解析」を分担執筆、名古屋大学eブックシリーズ1 最先端メディカルエンジニアリング p204-209 (総ページ数209)、一粒書房、愛知県、2013年</p> <p>2. 式田光宏、川部勤、松島充代子、本多裕之、大河内美奈、名古屋大学eブックシリーズ1 最先端メディカルエンジニアリング 一粒書房、「MEMS技術による医療バイオ応用」の項を分担執筆、p100-105 (総ページ数 p209)、愛知県、2013年</p> <p>3. 大河内美奈 第18章4節7項「微生物を利用したバイオセンサ」を分担執筆 電気化学便覧第6版 丸善株式会社、2013年</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/proc/index.htm">http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/proc/index.htm</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1. 名古屋大学工学研究科主催「テクノ・フェア名大2012」、2012年8月31日、名古屋大学(豊田講堂)、政府・自治体関係者、中部地区の経済界及び企業の研究開発担当者等を対象、約1000名、「ペプチドアレイを用いた食物アレルギー高精度診断法の開発」に関するポスター発表を行った。</p> <p>2. 名古屋大学工学部主催「平成24年度テクノサイエンスセミナー」、2012年8月9日、名古屋大学(工学部1号館)、高校生が対象、95名、所属研究室の担当する固定化バイオリクターに関する実験を行った。</p> <p>3. 電気化学会主催「産学官連携フォーラム」、2012年7月14日、名古屋大学(ES館)、会員および一般市民に向けた公開講座、62名、電気化学会の産学官連携フォーラム委員を担当し、「バイオセンシングの現状と今後の展開」に関する講演会の企画・運営および発表を行った。</p> <p>4. 日本生物工学会中部支部主催「中高生を対象とした実験教室」、2012年11月20日、名古屋大学(工学部1号館)、愛知県立瑞陵高等学校1年生40名、生物工学分野の実験教室を企画・運営し、「砂糖、果糖、ブドウ糖. お菓子に入れる糖をつくる」と題し、酵素反応および糖の簡易精製に関する実験を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載</p> <p>計0件</p>	

様式19 別紙1

その他	
-----	--

4. その他特記事項

日本生物工学会生物工学奨励賞（斎藤賞）受賞

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	113,000,000	70,974,000	26,778,000	15,248,000	0
間接経費	33,900,000	21,292,200	8,033,400	4,574,400	0
合計	146,900,000	92,266,200	34,811,400	19,822,400	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	14,636,776	26,778,000	0	41,414,776	40,292,323	1,122,453	0
間接経費	4,216,955	8,033,400	0	12,250,355	8,717,277	3,533,078	0
合計	18,853,731	34,811,400	0	53,665,131	49,009,600	4,655,531	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	37,713,268	ペプチドシンセサイザー、消耗品等
旅費	1,548,983	研究発表、情報収集旅費等
謝金・人件費等	329,989	研究支援者給与
その他	700,083	物品修理、学会参加費等
直接経費計	40,292,323	
間接経費計	8,717,277	
合計	49,009,600	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
ペプチドシンセサイザー	独国intavis AG製 Model ResPepSL(ス ホット合成仕様)	1	14,581,350	14,581,350	2013/1/18	名古屋大学
				0		
				0		