

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月11日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360022

研究課題名（和文）局所励起表面プラズモンセンシングによるインフルエンザウイルス検出と感染性評価

研究課題名（英文）Localized surface plasmon sensing for detection and diagnosis of influenza viruses

研究代表者

加野 裕 (KANO HIROSHI)

室蘭工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80322874

研究成果の概要（和文）：金属表面の顕微領域に局所励起した表面プラズモンを用いて金属表面の屈折率を測定する手法を用いて、微量検体に含まれるインフルエンザウイルスのサブタイプを判定する装置の開発を行った。理論計算によって、屈折率測定を行う領域の大きさが半径180nm程度であること、7個程度のウイルスを測定対象としていることを示し、測定基板表面のモノクロナール抗体と特定のサブタイプのウイルスとの相互作用を有効屈折率の変化から捉えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：A method to determine subtype of influenza viruses by using surface plasmons localized in microscopic region on a flat metal surface was developed. In this method, refractive index variation arisen from interactions between viruses and their monoclonal antibodies was measured. Theoretical calculation revealed that measurement region had a size of ~180nm in radius, and could be occupied by ~7 viruses. The detection of influenza viruses with certain subtype was successfully demonstrated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 応用光学・量子光工学

キーワード：光計測，表面プラズモン，屈折率計測，ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

金属表面に存在する自由電子の集団的な振動の量子である表面プラズモンは、その伝搬定数が金属表面に接した媒質の屈折率に強く依存する性質がある。この性質は、金属に接した媒質の屈折率測定の原理に用いられ、

応用が盛んに進められてきた。この測定法は、金属表面に固定された抗体に抗原が結合することで生じる屈折率変化を捉えることができるほど高い感度を有しており、現在、生体分子間相互作用の最も主要な検出方法の一つである。

この測定法に関し、研究代表者は金属表面の極微小領域に表面プラズモンを局所励起する原理を提案し、その研究開発を進めてきた。従来の方法と異なり、可干渉な表面プラズモンを金属表面の1か所に向かって伝搬させると、干渉によって表面プラズモンの局在が生じる。光学顕微鏡用高開口数油浸対物レンズを用い、金属薄膜を成膜したカバーガラスに励起光を集光することで、これを実現することができる。局在の大きさは、典型的な条件下で、金属表面の半径 $\sim 180\text{nm}$ と見積もられ、金属表面からの距離を考慮した容積は $\sim 6\text{aL}$ （アトリットル）である。インフルエンザウイルスの大きさが $\sim 100\text{nm}$ であることより、これはウイルス数個に相当する。ウイルスに対し活性な領域を表面プラズモンの局在領域に制限し、その領域における屈折率変化を測定すれば、検体中に含まれるウイルスの実効的な検出感度を高めることができる。また、局所的な測定は、検出対象の並列度を高めることに寄与するため、本研究はウイルス検査に新展開をもたらす技術開発となりうる。

## 2. 研究の目的

現在、ウイルスのサブタイプ判定には、ウイルス由来の遺伝子配列が含まれているかどうかを調べる方法が主に利用されているが、PCR法でのDNA増幅に時間がかかり、数時間を要する。これに対し本研究では、特定の型のインフルエンザウイルスに特異的に反応する抗体を基板に固定し、抗体にウイルスが結合することで生じる局所的な屈折率変化を測定する装置開発を行う。ウイルスの検出（サブタイプの判定）を5分程度で行うこと、極めて少ない検体に含まれる特定のウイルスを検出することを第一の目的として研究を実施した。

## 3. 研究の方法

表面プラズモンを極微小領域に局所励起し、その場の屈折率変化を高感度に捉える装置の試作を行った。試作装置では、放射状偏光させたレーザー光を、 $\text{NA}=1.65$ の油浸対物レンズを用いて、円形瞳照明法により、金薄膜を真空蒸着したカバーガラスに集光させる。そして、その反射光を対物レンズの瞳面と光学的に共役な位置に置いたCCDで観察する。CCDで記録される画像には表面プラズモンの励起による光吸収が環状に観察されるので、その半径より基板表面の局所的な屈折率を求めることができる。カバーガラスの表面は、テマイクロフローセルでカバーされており、微量な溶液を基板表面に供給することができる。マイクロフローセルに、アビジンを含む緩衝溶液（PBS）、ビオチン化モノクロナール

抗体を含むPBSを順次導入することで、特定のウイルスだけを結合させることができる基板が得られる。この基板に対し、ホルマリン処理により無毒化したインフルエンザを導入し、基板表面の有効屈折率を測定するが、これに先立って、機械部品から生じる調整ずれの補償や、流路と溶液交換方法の改良などによって、試作装置の屈折率測定感度向上、安定性の確保を行った。

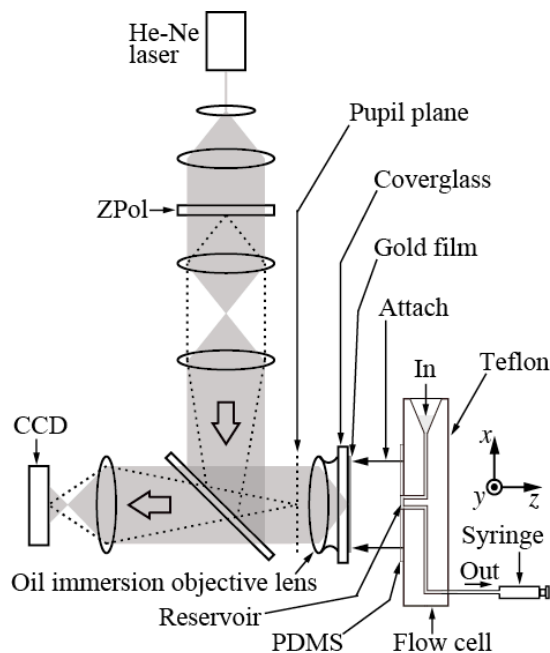


図1 試作装置の構成

最終的に、8回の2液交換を伴う45分間の屈折率測定における測定値の標準偏差が0.0004以下であることを確認した。

この試作装置を用いて、インフルエンザウイルスの検出実験を行った。実験ではA/H1N1型およびA/H3N2型のインフルエンザウイルスを精製、無毒化し、モノクロナール抗体との抗原抗体反応を確認した。図2の実験結果が示すように、ウイルスの結合による有効屈折率増大が0.012であることを確認した。測定領域に存在するウイルスの数量（最大7個）、測定値の安定性を考慮すると、装置が単体のウイルスに応答する感度を備えていることが確認できた。

また、図3の実験結果に示すように、抗体抗原反応を生じない組み合わせでは、測定面上の有効屈折率がほとんど変化しないことも確認した。さらに、低濃度の試料を用いると、有効屈折率がステップ状に増大するケースが見いだされ、単体のウイルスに反応していることが示唆された。その他、人体からスワブによって検体を採取する際の影響を評価

し、これによる屈折率変化が十分に小さいことを確認した。

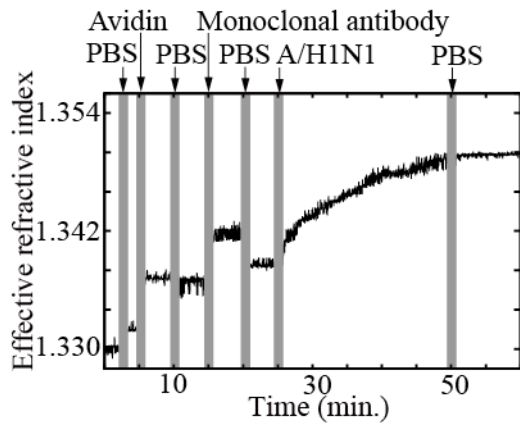


図2 A/H1N1 インフルエンザウイルスとモノクロナール抗体の結合による有効屈折率変化を測定した結果

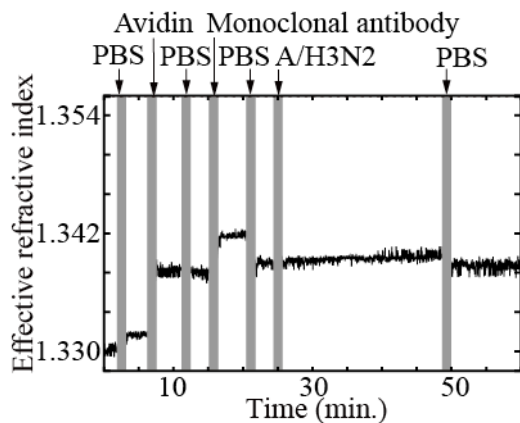


図3 A/H3N2 インフルエンザウイルスとモノクロナール抗体の結合による有効屈折率変化を測定した結果

#### 4. 研究成果

上に詳述した実験を通し、提案する手法、それに基づく装置が、微量検体中に含まれる特定のサブタイプのインフルエンザウイルスの検出に有効であることを確認することができた。また、試作装置が単一のウイルスに応答する測定感度を有していることを明らかにすることができた。

本研究で開発した装置は、検体に特定の型のインフルエンザウイルスが含まれていることを調べる目的に対して有用であるが、多種のウイルスについて一度の測定で判定を行うためには、さらに、測定面に多種の抗体を高密度に配列させる技術が必要になる。今後は、その技術開発を精力的に開発する必要

がある。また、測定領域に検体を導入する手法について、必要容量を減少させる手法を開発することにより、開発した装置の利点を一層活かすことができるようになる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- (1) Jun Ning, Kotaro Nagata, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, and Hiroshi Kano, Detection of influenza virus with specific subtype by using localized surface plasmons excited on a flat metal surface, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 2013, in press.
- (2) G. Terakado, J. Ning, K. Watanabe, and H. Kano, High-resolution simultaneous microscopy of refractive index and fluorescent intensity distributions by using localized surface plasmons, Appl. Opt., 査読有, 2013, 3324-3328, 10.1364/AO.52.003324.
- (3) K. Morigaki, K. Mizutani, M. Saito, T. Okazaki, Y. Nakajima, Y. Tatsu, H. Imaishi, Surface functionalization of a polymeric lipid bilayer for coupling a model biological membrane with molecules, cells, and microstructures, Langmuir, 査読有, 2013, 2722-2730, 10.1021/la304747e.
- (4) M. Yamada, H. Imaishi, and K. Morigaki, Microarrays of phospholipid bilayers generated by inkjet printing, Langmuir, 査読有, 2013, 6404-6408, 10.1021/la400570h.
- (5) K. Watanabe, R. Miyazaki, G. Terakado, T. Okazaki, K. Morigaki, and H. Kano, Localized surface plasmon microscopy of submicron domain structures of mixed lipid bilayers, Biomed. Opt. Express, 査読有, 2012, 2012-2020, 10.1364/BOE.3.002012.
- (6) K. Watanabe, K. Matsuura, F. Kawata, K. Nagata, J. Ning, and H. Kano, Scanning and non-scanning surface plasmon microscopy to observe cell adhesion sites, Biomed. Opt. Express, 査読有 2012, 354-359, 10.1364/BOE.3.000354.

- (7) A. Aina, S. Tamura, T. Suzuki, R. Ito, H. Asanuma, T. Tanimoto, Y. Gomi, S. Manabe, T. Ishikawa, Y. Okuno, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Sata, T. Kurata, H. Hasegawa, Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine, *J. Med. Virol.*, 査読有, 2012, 336-344, 10.1002/jmv.22273.
- (8) N. Nakajima, N. Van Tin, Y. Sato, HN Thach, H. Katano, PH Diep, T. Kumasaka, NT Thuy, H. Hasegawa, LT San, S. Kawachi, NT Liem, K. Suzuki, T. Sata, Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam, *Mod. Pathol.*, 査読有, 2012, 357-369, 10.1038/modpathol.2012.193.
- (9) E. van Riet, A. Aina, T. Suzuki, H. Hasegawa, Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design, *Vaccine*, 査読有, 2012, 5893-5900, 10.1016/j.vaccine.2012.04.109.
- (10) T. Suzuki, A. Aina, N. Nagata, T. Sata, H. Sawa, H. Hasegawa, A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 2011, 719-726, 10.1016/j.bbrc.2011.09.142.
- (4) Jun Ning, Localizes Surface Plasmon Sensing of Single Influenza Virus with Specific Subtype, 第73回応用物理学会学術講演会 JSAP-OSA joint symposium, 2012年9月11日, 松山市.
- (5) Kenichi Morigaki, Stable and functional model biological membrane composed of polymeric and fluid lipid bilayers, *Engineering Lipid Bilayers*, 2012年9月7日, Leeds (UK).
- (6) K. Nagata, Subtype determination of influenza viruses by a localized surface plasmon sensor, XI Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (EUOPT(R)ODE XI), 2012年4月3日, Barcelona (Spain).
- (7) 加野 裕, 局所励起表面プラズモンを利用したウイルスセンシング, 日本生物物理学会 2011年度北海道支部例会, 2012年3月6日, 旭川市.
- (8) 永田 航太郎, 局所励起表面プラズモン屈折率センサーによる インフルエンザウイルス検出:測定値の安定性評価, 第72回応用物理学会学術講演会, 2011年8月31日, 山形市.
- (9) Shinichiro Yamazaki, FDTD calculation of electric field distribution produced by localized surface plasmons under annular pupil illumination, International Conference on Nanophotonics 2011, 2011年5月23日, Shanghai (China).
- (10) G. Terakado, Fluorescence and refractive index imaging by a localized surface plasmon microscope with annular pupil illumination, Focus on Microscopy FOM2011, 2011年4月18日, Konstanz, (Germany).

[学会発表] (計10件)

- (1) Hiroshi Kano, Localization of Surface Plasmons on a Flat Metal Surface and Its Applications to Bio-sensing, Optics & Photonics Taiwan, International Conference (OPTIC 2012), 2012年12月7日, Taipei (Taiwan).
- (2) H. Hasegawa, Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human, 第16回日本ワクチン学会学術総会, 2012年11月18日, 横浜市.
- (3) Hiroshi Kano, Localization of Surface Plasmons on a Flat Metal Surface and Its Applications to Bio-sensing, International Union of Materials Research Societies - International Conference on Electronic Materials 2012 (IUMRS-ICEM 2012), 2012年9月25日, 横浜市.

[その他]

ホームページ等

<http://www3.muroran-it.ac.jp/kanolab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加野 裕 (KANO HIROSHI)

室蘭工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号: 80322874

### (2) 研究分担者

長谷川 秀樹 (HASEGAWA HIDEKI)

国立感染症研究所・感染病理部・部長

研究者番号: 30301790

森垣 憲一 (MORIGAKI KENICHI)

神戸大学・遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：10358179

(3) 連携研究者  
該当無し