

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13801  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25246029  
研究課題名(和文) 高選択性ウイルス検出システム開発のための先進的バイオ・プラズマ融合科学の基盤創成

研究課題名(英文) Establishment of advanced bio-plasma fusion science for developing high-selectivity virus detection system

研究代表者  
永津 雅章 (Nagatsu, Masaaki)  
静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：20155948  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プラズマ研究の新展開として、バイオ・医療分野の研究者と連携し、現在問題となっている新型インフルエンザウイルスの高選択・迅速検出システムの開発を目指し、1. マスクレス微細表面修飾を実現するための大気圧プラズマジェット源の開発(第1ステップ)2. ウイルス等の特定タンパク質に選択的に結合する抗体の固定化(第2ステップ)3. 大腸菌を用いた捕集効率および吸着選択性に関する研究(第3ステップ)4. 高感度ウイルス検出のためのセンシング技術の開発(第4ステップ)の4つの研究項目を実施した。本研究で得られた成果は、国内外で評価の高い学術論文に46編、国際会議に73件、国内学会に86件発表を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, it is our objectives to develop the high-sensitive, rapid detection system of new-type influenza virus in collaboration with other researchers in bio-medical field as new development of plasma research. During 4 years, we have carried out the following 4 research items.

1. Development of atmospheric pressure plasma jet for maskless ultra-fine surface modification(The 1st step), 2. Immobilization of antibody for selective binding specific protein or virus(The 2nd step), 3. Study of collection efficiency and selectivity using E. coli bacteria(The 3rd step), 4. Development of sensing technology for high sensitive virus detection (The 4th step) The results of the present study have been reported in 46 journals, 73 international conferences, and 86 domestic conferences.

研究分野：プラズマエレクトロニクス

キーワード：プラズマ科学 表面・界面物性 ウイルス バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、第4期科学技術基本計画において、持続可能な社会構築のためのライフイノベーションが重点項目として掲げられ、技術立国日本としての世界的地位の復活が強く謳われている。このような背景に加えて、近年の地球規模的な生活環境の異変による新型インフルエンザや口蹄疫などのウイルスや、人類にとって全く免疫力のない新たなウイルスの発生は、われわれの生命を危機にさらしかねない世界的に大きな社会的問題となっている。研究代表者はこれまで、プラズマ科学のライフサイエンスへの応用に強い関心を持ち、医療・バイオ分野へのプラズマ応用に関わる研究を積極的に進めてきた。その一環として、平成20年度に島山力三教授(東北大)とともに、プラズマ研究者の参画を呼び掛け、プラズマ・核融合学会の専門委員会「プラズマ・バイオ融合科学への新展開」を発足させ、2年間にわたり学会の枠を超えてシンポジウムなどの活動を行ってきた。他方では、当該分野において世界をリードする研究を推進するためには、言うまでもなくプラズマ研究者が医療・バイオ分野などの異分野の研究者と緊密に連携を行うことが不可欠である。また、研究代表者は、平成21年度より新学術領域研究「プラズマとナノ界面の相互作用に関する学術基盤の創成」(代表者:白谷正治教授(九州大))の計画研究代表者として、「プラズマプロセスによる微粒子マイクロ表面のバイオ活性制御技術の開発と医療応用」を担当し、プラズマ表面修飾を施した磁気ナノ微粒子を用いたA型インフルエンザ抗体の固定化およびインフルエンザウイルス回収に関する研究を進めてきた。

本研究では、これまでに得られた研究成果をさらに発展させ、先進的バイオペラズマプロセスを駆使した高選択性ウイルス検出技術の開発およびワクチン作製用ウイルス回収技術の開発へと展開するため、新たな基盤研究として本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

近年の地球温暖化など、様々な地球規模での生活環境の変移は、未知の伝染性ウイルスの発生をもたらし、安全安心社会の構築を目指す我々に大きな脅威を与えている。特に、世界的な伝染によるパンデミックが危惧されている新型インフルエンザウイルスや様々な伝染性ウイルスなどの迅速な検出技術の開発が、世界的な喫緊の課題となっている。さらに、未知のウイルスに対して、不活化させることなく捕集し、迅速にワクチン製造を可能にする技術の開発も不可欠である。本研究では、これまでにプラズマエレクトロニクス分野で培われたプラズマ生成・プロセス技術を当該分野の技術革新に活用し、生物工学、糖鎖工学、ウイルス学、デバイス工学などの異分野の研究者との有機的連携を図り、世界初の高選択性ウイルス検出・回収技

術の開発を目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究では、当初の研究目的を着実に達成するため、以下の4つのステップを順次進めていく形で、研究を実施した。

(1) マスクレス微細表面修飾を実現するための大気圧プラズマジェット源の開発(第1ステップ):

ウイルス検出デバイスの作製では、研究代表者が開発したナノキャピラリーを取りつけた大気圧プラズマジェット装置を用い、ポリマーあるいはカーボンナノチューブ(CNT)基板上にマスクレスで、ミクロンサイズの官能基修飾および糖鎖タンパクの固定化を行う計画である。これまでに、口径100nmのナノキャピラリーを用いた実験において、直径2 $\mu\text{m}$ のアミノ基ドットパターン作製が可能であることを、蛍光色素を用いた蛍光顕微鏡により確認している。本研究では、ナノ微細化したプラズマジェットビームとポリマーあるいはCNT基板との表面相互作用について、アルゴンガスのみを用いたプラズマ前処理における基板バイアスの効果を定量的に調べ、後処理におけるアンモニアガスプラズマによるアミノ基(-NH<sub>2</sub>)修飾、アルゴンガスに酸素あるいは水蒸気を添加した場合のヒドロキシ基(-OH)あるいはカルボキシ基(-COOH)修飾の可能性を調べる計画である。

(2) ウイルスの特定タンパク質に選択的に結合する糖鎖、抗体の固定化(第2ステップ):

これまでに研究代表者が新学術領域研究で開発を行ったグラファイト外包磁気微粒子を用いて、プラズマ表面修飾によりアミノ基修飾を施した後、インフルエンザウイルスを模擬したレクチンタンパク質に選択的に結合する糖鎖を用いた実験の結果、80%のレクチンタンパク質を磁気回収することに成功した。本研究では、これらの予備実験の結果から、アミノ基修飾したポリマーおよびCNT基板上に糖鎖や抗体を固定化する方法を用いて実験を行った。

(3) ウイルスを用いた捕集効率および吸着選択性に関する研究(第3ステップ):

抗体を固定化した磁気微粒子を用いたウイルス回収に関する予備実験では、ウイルス濃縮率の顕著な増加に成功している。しかしながら、ウイルスが、抗体あるいは糖鎖以外の物質と吸着する場合に対処するため、事前の表面処理の工夫も必要になると考えている。このような場合には、ウイルス自身の表面吸着特性および基板表面特性との関連を調べることにした。

(4) 高感度ウイルス検出のためのセンシング技術の開発(第4ステップ):

前記のプロセスを経て選択的に捕集した

ウイルスを、高速かつ高感度に検出する手法の開発が重要である。従来、ウイルスの検出には、操作が簡便で、測定を迅速に行うことが可能なイムノクロマト法（免疫クロマトグラフィ）が用いられているが、検出感度がPCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法と呼ばれるDNAを増幅する手法）に比べて1桁から2桁低く、ウイルス濃度が低いサンプルでは検出が困難である。本研究では、捕集したウイルスに選択的に結合する糖鎖あるいは抗体をリガンドとして用い、ウイルスに特定した蛍光体の蛍光の判別により、ウイルスの検出、同定を行うものである。研究代表者らは、すでにレーザーアブレーション法によるZnOナノ蛍光体の作製(Ma, et al, *Appl. Phys. Lett.* 2011)に成功しており、本研究では、アミノ基修飾したナノ蛍光体表面に、ウイルス検出用リガンドの固定化および蛍光特性に関する研究を実施する。

#### 4. 研究成果

本研究では、プラズマ応用研究の新展開として、バイオ・医療分野の研究者と連携し、現在問題となっている新型インフルエンザウイルスの高選択・迅速検出システムの開発を目指した。平成25年度から平成28年度までの主な研究成果は、以下の通りである。

(1) マスクレス微細表面修飾を実現するための大気圧プラズマジェット源の開発(第1ステップ):

ナノキャピラリーを有する大気圧プラズマジェット源を用いたドットアレイ状のCNT基板の空間制御表面修飾技術の開発を目的として、アンモニアガスを用いたアミノ基修飾、酸素を用いたヒドロキシ基あるいはカルボキシ基のマスクレス表面修飾を行い、それぞれの官能基に選択的に結合する蛍光色素を用いて確認を行った。

図1に開発した大気圧プラズマジェット装置の概略を示す。(*Appl. Phys. Lett.* 2016, *Appl. Surf. Sci.*, 2016)

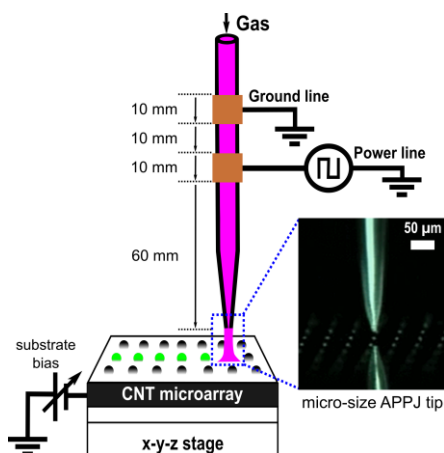


図1 マイクロキャピラリーを有する大気圧プラズマジェット装置

実験装置は、内径3 mmのガラス管に銅テー

プで上流側に接地電極、下流側に高電圧電極を施した二電極構造である。先端には数ミクロンのキャピラリーが取り付けられており、電極間に周波数5 kHz、電圧±7.5 kVの矩形波を印加することによってプラズマを生成した。図1に示したように、基板として用いたドットアレイ構造のカーボンナノチューブ(CNT)のプラズマ表面処理では、Heプラズマによる前処理と、HeとNH<sub>3</sub>またはO<sub>2</sub>による混合ガスプラズマによる後処理の2段階プロセスを用いており、He/NH<sub>3</sub>によりアミノ基修飾、He/O<sub>2</sub>によりカルボキシル基修飾が可能であることを実証した。(*Carbon* 2015, *Appl. Surf. Sci.* 2016, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016)

(2) ウイルスの特定タンパク質に選択的に結合する糖鎖、抗体の固定化(第2ステップ):

ウイルス抗原抗体反応をビオチン-アビジン結合で模擬した実験系を用い、ドットアレイ状のカーボンナノチューブ基板にビオチンを固定化し、細菌等の抗原を見立てた蛍光標識化されたアビジンを用い、蛍光計測によりカーボンナノチューブアレイ上へのアビジン捕集を確認した。

図2は、大気圧プラズマジェットにより表面修飾を行った後、抗体を模擬したビオチンを固定化し、さらに抗原であるウイルスや細菌を模擬した蛍光標識化されたアビジンを検出するための原理図を示しており、実際に、“S”、“U”の文字パターン状にCNT基板にビオチンを固定化させ、蛍光アビジンを含む溶液で反応させた後の蛍光顕微鏡写真を図3に示す。

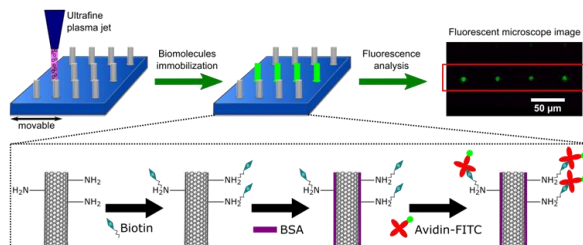


図2 CNTドットアレイ基板のプラズマ表面修飾とビオチン-アビジン結合を用いたウイルス検出模擬実験の概略

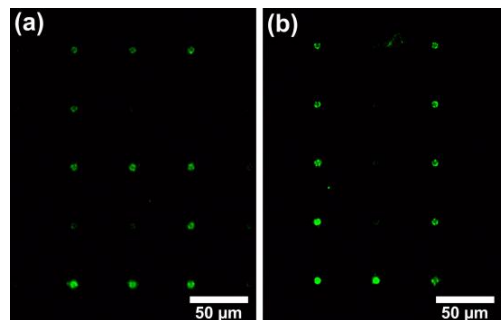


図3 “S”および“U”文字パターン状にプラズマ表面修飾したCNT基板にビオチンを固定化させ、蛍光アビジンを反応させた後の蛍光顕微鏡写真

これらの結果は、ウイルス等の抗体を CNT アレイに選択的に固定化することにより、ウイルスを検出するためのバイオチップとして応用可能であることを示している。なお、本項目に関する研究成果は、*Carbon*, 2015, *Appl. Phys. Lett.* 2015, 2016, *Appl. Surf. Sci.* 2016, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016 に発表した。

(3) ウイルスを用いた捕集効率および吸着選択性に関する研究(第 3 ステップ) :

本研究では、インフルエンザウイルス、デング熱ウイルスおよびサルモネラ菌を用いた、磁気ナノ微粒子による磁気捕集および捕集効率に関する研究を実施した。図 4 は、RF プラズマによりアミノ基修飾を行った磁気ナノ微粒子表面にインフルエンザ抗体を固定化し、低濃度のインフルエンザウイルスを混入した溶液中での結合反応を介して、磁気捕集による濃縮化を行うプロセスの概略を示している。(表面科学 2013, 応用物理 2015, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015)

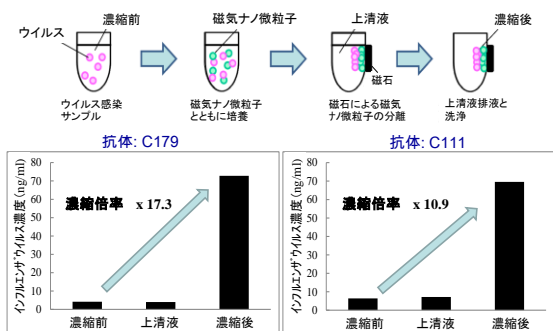


図 4 インフルエンザウイルス抗体固定化磁気ナノ微粒子を用いたウイルス捕集

図 4 に示したように、濃縮前のウイルス濃度を約 11 倍~17 倍までウイルス濃度を濃縮化できることを確認した。本手法を用いて、サルモネラ菌 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015) およびデング熱ウイルス (*Mol. Med. Rep.*, 2016) についても、磁気ナノ微粒子による高感度検出が確認されている。また、結合選択性に関する研究では、ビオチン-アビジン結合を用いた CNT ドットアレイ基板でのウイルス捕集の模擬実験より、ビオチンを固定化した CNT 以外での自然吸着を避けるため、牛血清アルブミン (BSA) 等によるブロッキングを行った。図 5 は、赤色の矢印で示したライン上の CNT 部分にのみビオチンを選択的に固定化した CNT アレイ基板を用いて、蛍光アビジン分子の捕集の様子を示している。本研究により、BSA によるブロッキングを行わない場合には、アビジンが未処理の CNT に吸着しているが、BSA ブロッキングした場合には、ビオチン固定化した CNT にのみ蛍光アビジンが結合している様子が確認できた。(Appl. Phys. Lett. 2016)

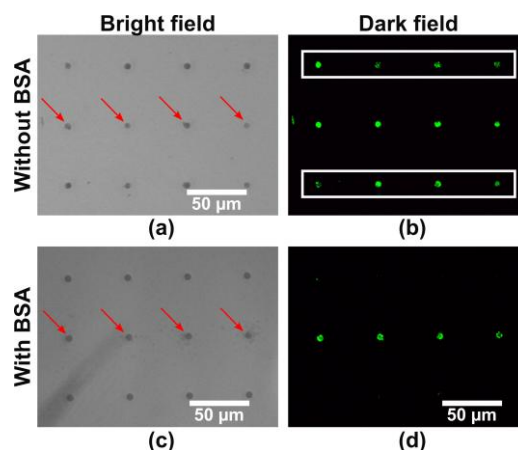


図 5 BSA ブロッキングによるアビジン分子の自然吸着抑制の様子 (下: BSA あり)

(4) 高感度ウイルス検出のためのセンシング技術の開発(第 4 ステップ) :

本研究では、ウイルス捕集後の検出を可能にするイメージング技術の開発を行うため、捕集したウイルスに結合させる蛍光体として ZnO ナノ微粒子に注目した。図 6 はバイオイメージング材料としての実際的な応用を示しており、リガンドとして抗体、ターゲット分子としてウイルスを想定している。

レーザーアブレーションにより作製した直径約 20 nm の ZnO ナノ微粒子表面に Ar/NH<sub>3</sub> プラズマを用いてアミノ基修飾を行った。ZnO 表面にアミノ基が修飾されたかどうかの判断は、アミノ基に選択的に結合する蛍光色素を用いて確認を行った。

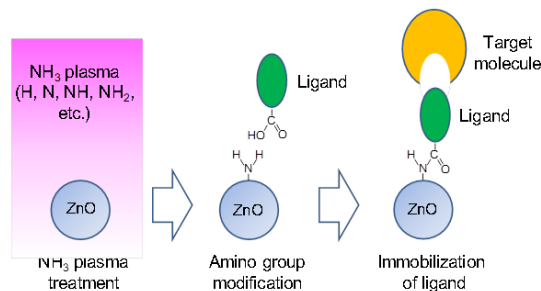


図 6 ZnO ナノ蛍光体を用いたバイオイメージングの説明図

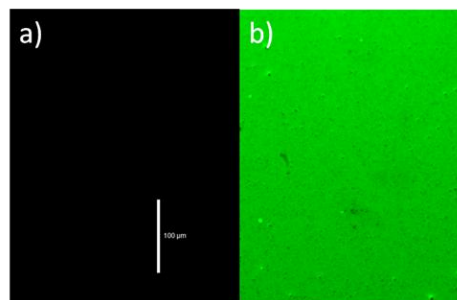


図 7 アミノ基標識用蛍光色素を用いた ZnO ナノ微粒子のアミノ基修飾の確認 (左: 未処理、右: アミノ基修飾)

アミノ基修飾の確認は、図 7 に示したよう

に、プラズマ表面修飾を行った ZnO ナノ微粒子表面全体に蛍光を観測しており、アミノ基の固定化が可能であることを示している。

(*Dig. J. Nanomater. Bios.*, 2014)

最後に、本研究で得られた成果は、国内外で評価の高い学術論文に 46 編、国際会議に 73 件、国内学会に 86 件発表を行った。このうち招待講演は、国際会議 16 件、国内学会 10 件である。また、図書執筆に 1 件、特許出願を 1 件行った。

#### 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 46 件)

- ① T. Abuzairi, M. Okada, S. Bhattacharjee, M. Nagatsu, Surface conductivity dependent dynamic behaviour of an ultrafine atmospheric pressure plasma jet for microscale surface processing, *Appl. Surf. Sci.*, 査読有, 390 巻, 2016, 489-496, DOI:10.1016/j.apsusc.2016.08.047.
- ② A. Viswan, H. Chou, K. Sugiura, M. Nagatsu, Surface Modification of Graphite-Encapsulated Iron Nanoparticles by RF Excited Ar/NH<sub>3</sub> Gas Mixture Plasma and Their Application to Escherichia Coli Capture, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 査読有, 49 巻, 2016, 364001, DOI:10.1088/0022-3727/49/36/364001.
- ③ T. Abuzairi, M. Okada, R. W. Purnamaningsih, N. R. Poespawati, F. Iwata, M. Nagatsu, Maskless localized patterning of biomolecules on carbon nanotube microarray functionalized by ultrafine atmospheric pressure plasma jet using biotin-avidin system, *Appl. Phys. Lett.*, 査読有, 109 巻, 2016, 023701(4pages), DOI: 10.1063/1.4958988.
- ④ A. Sakudo, A. Viswan, H. Chou, T. Sasaki, K. Ikuta, M. Nagatsu, Capture of dengue viruses using antibody-integrated graphite encapsulated magnetic beads produced by gas plasma technology, *Mol. Med. Rep.*, 査読有, 14 巻, 2016, 697-704, DOI: 10.3892/mmr.2016.5330.
- ⑤ I. Motrescu, M. Nagatsu, Nano-capillary atmospheric pressure plasma jet—A tool for ultrafine maskless surface modification at atmospheric pressure, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 査読有, 8 巻 19 号, 2016, 12528-12533, DOI: 10.1021/acsami.6b02483.
- ⑥ E. Yang, H. Chou, S. Tsumura, M. Nagatsu, Surface Properties of Plasma Functionalized Graphite-Encapsulated

Gold Nanoparticles Prepared by Direct Current Arc Discharge Method, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 査読有, 49 巻 18 号, 2016, 185304

DOI:10.1088/0022-3727/49/18/185304.

- ⑦ A. Sakudo, H. Chou, K. Ikuta, M. Nagatsu, Integration of antibody by surface functionalization of graphite-encapsulated magnetic beads using ammonia gas plasma technology for capturing influenza A virus, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 25 巻 9 号, 2015, 1876-1879, DOI:10.1016/j.bmcl.2015.03.03
  - ⑧ 永津 雅章, プラズマの環境・バイオ応用, *応用物理*, 査読有, 84 巻 9 号, 2015, 818-823
  - ⑨ T. Abuzairi, M. Okada, Y. Mochizuki, N. R. Poespawati, R. Wigajatri, M. Nagatsu, Maskless functionalization of a carbon nanotube dot array biosensor using an ultrafine atmospheric pressure plasma jet, *Carbon*, 査読有, 89 巻, 2015, 208-216, DOI:10.1016/j.carbon.2015.03.015
  - ⑩ I. Topala, M. Nagatsu, Capillary plasma jet: a low volume plasma source for life science applications, *Appl. Phys. Lett.*, 査読有, 106 巻, 2015, 054105(5pages) DOI:10.1063/1.4907349
- 他 36 編
- [学会発表] (計 159 件)
- ① M. Nagatsu, A. Viswan, T. Abuzairi, M. Okada, K. Sugiura, R. W. Purnamaningsih, N. R. Poespawati, "The Future of Nanotechnology for Medical Applications", Joint International Conference of ICNERE2016/EECCIS2016, 2016 年 10 月 31 日 -2016 年 11 月 2 日, Malang(Indonesia) (招待講演)
  - ② M. Nagatsu, H. Chou, A. Viswan, T. Abuzairi, M. Okada, M. A. Ciolan, N. R. Poespawati, R. W. Purnamaningsih, A. Sakudo, S. Bhattacharjee, "Plasma Surface Functionalization of Nanostructured Materials for Biomedical Applications", AVS 62nd International Symposium and Exhibition, 2015 年 10 月 19 日-2015 年 10 月 23 日, San Jose (USA) (招待講演)
  - ③ M. Nagatsu, A. Viswan, T. Abuzairi, M. Okada, K. Sugiura, R. W. Purnamaningsih, N. R. Poespawati, A. Sakudo, "High sensitive virus and bacteria detection using plasma-surface-functionalized and antibody-integrated carbon nanomaterials", 9th ICRP/ 68th GEC/33th

- SPP, 2015年10月12日-2015年10月16日, Honolulu, Hawaii(U.S.A) (招待講演)
- ④ M. Nagatsu, A. Sakudo, A. Viswan, T. Abuzairi, H. Chou, M. Okada, E. Yang, I. Motrescu, M. A. Ciolan, R. W. Purnamaningsih, N. R. Poespawati, D. Luca, "Plasma surface modifications of nano-structured materials and their applications to virus detection system", ICPIG 2015, 2015年7月26日-2015年7月31日, Iasi (Romania) (招待講演)
- ⑤ M. Nagatsu, M. A. Ciolan, T. Abuzairi, A. Viswan, A. Sakudo, E. Yang, S. Yang, H. Chou, N. Okada, M. Okada, N. R. Poespawati, R. Wigajatri, X. Wang, and D. Luca, "Plasma Surface Functionalization of Nanostructured Materials for Bio-medical and Environmental Applications", MRS 2015 Spring Meeting, 2015年4月7日-2015年4月9日, San Francisco (U.S.A) (招待講演)
- ⑥ M. Nagatsu, T. Abuzairi, A. Viswan, M. Okada, R. Wigajatri, N. R. Poespawati, "Maskless Surface Functionalization for Biomedical Application Using Nano-Capillary Atmospheric Pressure Plasma Jet", MRS 2014 Fall Meeting, 2014年12月3日-2014年12月4日, Boston (USA) (招待講演)
- ⑦ M. Nagatsu, "Low-Temperature Plasma Processing for Biomedical Applications", The 10th International Conference on Physics of Advanced Materials and 1st Autumn School on Physics of Advanced Materials, 2014年9月22日-2014年9月28日, Iasi( Romania) (招待講演)
- ⑧ M. Nagatsu, "Plasma Surface Functionalization of Nano-structured Materials for Bio-medical Applications", APCPST-12 & SPSM-27, 2014年8月31日-2014年9月5日, Adelaide (Australia) (招待講演)
- ⑨ 永津雅章, "医療・バイオ分野へのプラズマ応用とその展望", Plasma Conference 2014, 2014年11月18日-2014年11月21日, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市) (招待講演)
- ⑩ Masaaki Nagatsu, Mihai A. Ciolan, Enbo Yang, Yohei Mochizuki, Han Cho, Iuliana Motrescu, Akikazu Sakudo, Dumitru Luca, "Nano/micro-sized Plasma Surface Modifications for Biomedical Applications", AEPSE 2013, 2013年8月29日-2013年8月30日, 済州島 (韓国) (招待講演)

他 149 件

[図書] (計 1 件)

永津雅章 (分担執筆), (株) 情報機構、"ナノ

粒子の表面修飾と分析評価技術 ～各種特性を向上するためのナノ粒子表面関連技術とその評価～", 担当部分: 第 1 章・第 2 節・第 8 項 「プラズマを用いた表面修飾」 p.93-98, 第 4 章・第 4 節「磁性ナノ粒子の表面修飾とその評価」 p.290-297, 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 被処理体を修飾する方法及び被処理体を修飾する装置

発明者: 永津雅章

権利者: 静岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-230170

出願年月日: 2016年11月28日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://nagatsu-lab.eng.shizuoka.ac.jp/japan/lab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永津 雅章 (NAGATSU, Masaaki)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号: 20155948

### (2) 研究分担者

作道 章一 (SAKUDO, Akikazu)

琉球大学・医学部・准教授

研究者番号: 10397672

猪川 洋 (INOKAWA, Hiroshi)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号: 50393757

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号: 90238246

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )