

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26246008

研究課題名(和文) 時間分解プラズモン励起発光イメージングを用いたノロウイルス検出システム研究

研究課題名(英文) Development of norovirus detection system utilizing time-resolved fluorescence imaging excited by surface plasmon resonance

研究代表者

藤巻 真 (FUJIMAKI, Makoto)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・研究グループ長

研究者番号：10392656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した抗ノロウイルス抗体である12A11抗体の性状解析を行い、この抗体が遺伝子型の異なるノロウイルスにも広く反応することを確認した。この抗体を用い、量子ドットを蛍光標識として、アルミニウムを表面プラズモン共鳴励起層に用いた蛍光増強型のバイオセンサによってノロウイルスのウイルス様粒子の検出試験を行い、測定領域内にウイルス様粒子がおよそ100粒子あれば検出可能であることを示した。また、時間分解イメージングを導入することによってセンサチップの自家蛍光によるノイズと蛍光色素による信号光を区別することに成功し、さらに4倍の高感度化に成功した。

研究成果の概要(英文)：A property analysis of 12A11 antibody, which is an anti-norovirus antibody that we developed, was performed, and it was confirmed that the antibody reacted to several different genotype noroviruses. We showed that it was possible to detect approximately 100 virus-like particles of norovirus existing in the detection area of a fluorescent-detection-type biosensor utilizing a surface plasmon resonance excitation layer of aluminum, in which the antibody and a quantum dot fluorescent dye were used. It was also confirmed that a time-resolved fluorescence imaging method can successfully distinguish noises emitted from sensor chip substrates from signals of the fluorescent dye. The sensitivity of the sensor was improved quadruple by introducing the time-resolved fluorescence imaging.

研究分野：フォトニクス、バイオフォトニクス、電気電子工学、材料物性

キーワード：バイオセンサ 表面プラズモン共鳴 蛍光増強 CMOSイメージセンサ 時間分解測定 交差反応性ノロウイルスファージ抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) ノロウイルスは、非常に感染力が強い。表1は、感染者及び集団感染施設におけるウイルス汚染状況をまとめたものである。表にあるように、集団感染施設においては、人が触れる様々な部分にウイルスの付着が確認されており、また、実際にこれらの付着ウイルスから二次感染したとみられる事象が報告されている。データより、感染予防用センサには、100~1000 copies/ml 程度のウイルス検出感度が要求される。現在用いられている酵素連鎖反応法(PCR法)やリアルタイムPCR法では、本レベルを満足する感度が報告されているが、これらの手法は、装置の操作が煩雑であったり、検出に時間を要したり、特殊技能が必要であったりと、現地でのその場検査には適用が難しく、これらの手法と同程度の感度で、かつ簡易、高速なウイルスセンサが現場では求められている。

表1 感染者から検出されるウイルス量と集団感染施設におけるウイルス汚染状況 (copies=ウイルス数)

発症者の便	10 ⁴ -10 ⁸ copies/g
発症者の吐物	10 ³ -10 ⁷ copies/g
不顕性感染者*の便	10 ³ -10 ⁷ copies/g
トイレの便座	520-15000 copies/cm ²
手すり	110-5900 copies/cm ²
ドアノブ	120-270 copies/cm ²

*感染しても発症しない感染者のこと

また、ノロウイルスは2つの遺伝子群、Genogroup IとGenogroup IIに大別され、さらにこれらの遺伝子群は、少なくとも15と18の遺伝子型に分類される。つまり33以上もの型が存在する。各遺伝子型はそれぞれ異なった抗原型に対応している為、遺伝子型特異的なポリクロナール抗体を用いている現状の臨床検査用ノロウイルス検出キットでは、これら全ての型を網羅的に検出することは出来ないという問題点もあった。

2. 研究の目的

(1) 我々の研究の目的は、ノロウイルス感染が疑われる現場で、環境中のノロウイルスの検出試験を実施可能なバイオセンサを開発することである。研究の背景で述べたように、このようなバイオセンサは、現地に持ち運んで使用することが可能であり、高感度で、尚且つすべての遺伝子型のノロウイルスが検出可能であることが望まれる。

3. 研究の方法

(1) 我々は、標的ウイルスを蛍光色素で標識化し表面プラズモン共鳴(SPR)にて蛍光増強を行い検出するセンサ技術を保有している。また、蛍光増強面をV字型の溝の側面として形成し、V字の頂角を適切に設定することによって、検体を流す流路となり、SPRを励起するプリズムとなり、また、ウイルス捕捉面ともなるバイオチップの形成に成功している^①。本センサを以下ではV溝バイオセ

ンサと呼ぶ。V溝バイオセンサは優れた検出感度と簡素化された検出機構を兼ね備えているが、チップに用いている材料が励起光によって自家蛍光を発してしまい、信号光の取得を阻害することが分かっている。自家蛍光は、通常、蛍光物質とは異なる蛍光寿命を持つことから、蛍光寿命の差によって、自家蛍光と信号光を分離できれば、信号光のみを高効率に取り込むことができる。よって、本開発では、V溝バイオセンサにおける蛍光画像観測に時間分解測定機能を付与することによって自家蛍光成分を取り除き、さらなる高感度検出を達成する。

時間分解イメージングには、時間分解CMOSイメージセンサを用いる。我々は国内最高レベルのCMOSイメージセンサの開発実績も有している。既にCMOSイメージセンサの低ノイズ化と高時間分解能化技術の開発実績があり、光量で4桁以上の広いダイナミックレンジを実現する回路技術による1フォトン相当(量子効率を100%とした場合)の低ノイズ化と、新規の横電界制御方式CMOS画素による2nsの時間分解能を達成している。また、開発した時間分解CMOSイメージセンサをHeLa細胞に適用し、核と細胞質を異なる寿命をもつ蛍光物質で染色して、蛍光寿命により細胞の各部位をイメージングした実績がある^②。V溝バイオセンサと時間分解CMOSイメージセンサの融合によって、センサの高感度化が期待できる。

もう1つの課題となっている全ての遺伝子型のノロウイルスの網羅的な検出においては、我々が持つ抗体開発技術を活用する。我々は既に、ファージディスプレイ法による抗GI(Genogroup I)ヒト型抗体、抗GII(Genogroup II)ヒト型抗体の単離に成功しており、抗GIヒト型抗体はGIのさまざまな遺伝子型のノロウイルス株に広範囲に反応し、抗GIIヒト型抗体もまたGIIのさまざまな遺伝子型のノロウイルス株に広範囲に反応することを明らかにしている。これらの抗体を用いてノロウイルス株の全ての型を一括で検出可能なシステムを提案する。

4. 研究成果

(1) ノロウイルス検出用V溝バイオセンサの開発

まず我々はノロウイルス検出に最適なV溝バイオセンサを構築した。蛍光色素としては、ストークスシフトが大きく、蛍光観測時に励起光の迷光の影響を受けにくい量子ドットを使用することとし、本研究では市販のCdSe-ZnSコアシェル構造を有する量子ドット(Qdot705, Thermo Fisher Scientific)を選定した。Qdotは短い波長での蛍光励起効率が良く、具体的には波長500nm以下が望ましい。そこで、本研究では短波長帯でのSPR励起に適したアルミニウムをSPR励起層として採用した。励起波長は、Qdotの励起効率、SPRの電場増強度、光源の入手可能性とコス

ト、安定性を考慮し、総合的に判断した結果、波長 390nm の LED 光源を採用することとした。また、センサチップ基板の材料としては、これまでの研究で使用実績のあるポリスチレンを採用することとした。

ポリスチレンのチップ上に SPR 励起層となるアルミニウム層を堆積すると、表面にはアルミニウムの自然酸化膜が形成されることが知られている。そこで、実際のアルミニウム層の形成に用いる RF マグネトロンスパッタリング装置 (CFS-4EP-LL, 芝浦メカトロニクス (株)) でアルミニウム膜を成膜しエリプソメータ (VASE, J. A. Woollam Co.) でその厚さを評価したところ、アルミニウム酸化膜の厚さは 5 nm であった。

センサチップ表面はさらに、ウイルス捕捉用の抗体や、その抗体を固定化するための自己組織化単分子膜が形成されることから、これらの有機物層の厚さを 20nm と仮定し、またその表面は水に浸されているとして、有機物層と水との界面における電場増強度を、転送行列法を用いて計算した。電場計算に用いたセンサチップの断面図を図 1 に示す。ポリスチレン、アルミニウム酸化膜、有機物層及び水の屈折率はそれぞれ 1.632、1.788、1.450 及び 1.352 とし、アルミニウム層の複素屈折率は $0.378+i4.727$ とし計算を行った。

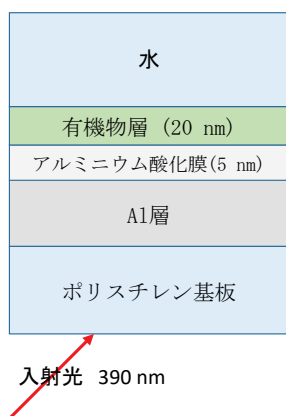


図 1 センサチップにおける最適な V 溝頂角及びアルミニウム層の厚さの算出に用いたモデル。

計算の結果、V 溝の最適な頂角及びアルミニウム層の厚さはそれぞれ 52.9° 及び 19 nm であり、またこの時の、電場増強度は 16.7 となるという結果を得た。この計算で得た値を元にセンサチップの試作を行った。設計値は、V 溝頂角 52.9° 、V 溝の長さ 10 mm、開口幅 0.3 mm とした。溝の両端にはサンプル液を注入するための液溜めを形成した。この V 溝形状は、ポリスチレン基板に金型成形によって形成した (クラスターテクノロジー (株))。アルミニウム層は RF マグネトロンスパッタリングにて、上述の設計値になるように成膜した。作製した V 溝チップの写真を図 2 に示す。また、図 3 は測定系の模式図である。LED 光源からの励起光はコリメートレ

ンズによってコリメートした後にバンドパスフィルタによって狭帯域化し、偏光板によって P 偏光とした後にセンサチップの裏面に照射される。V 溝上に蛍光物質が存在すると、SPR の増強電場によって蛍光が励起される。蛍光画像はバンドパスフィルタによって励起光の散乱光を除去した後、光学レンズによって集光し、16 bit 冷却 CCD カメラ (BU-51LN, ビットラン (株)) により取得した。

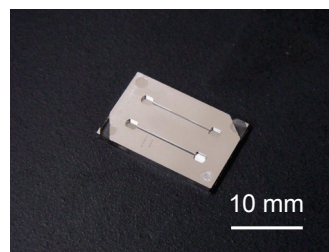


図 2 作製したセンサチップの写真

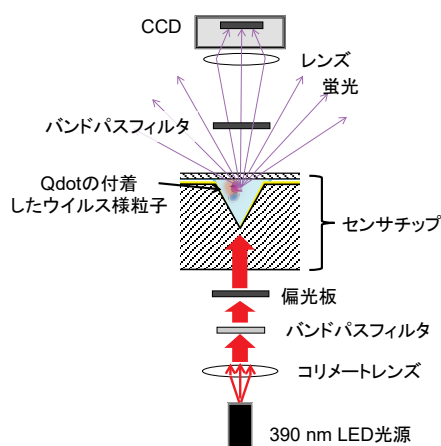


図 3 V 溝バイオセンサの光学配置図

検出対象にはノロウイルスのウイルス様粒子を用い、モノクローナル抗ノロウイルス抗体 (12A11) を捕捉抗体としてセンサチップ表面に固定した。また、ビオチン化したポリクローナル抗体を 1 次抗体として用い、さらに、ストレプトアビジン付きの Qdot を蛍光標識として使用した。

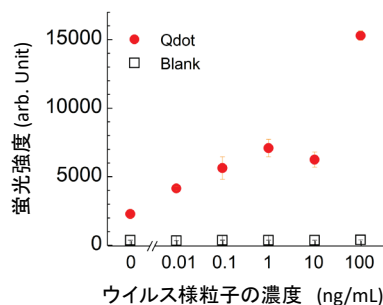


図 4 蛍光強度とウイルス様粒子の濃度の関係。赤丸はウイルス様粒子を検出した結果。白四角は、チップに水のみを入れて測定した場合の測定結果。

測定結果を図4に示す。図4の横軸はウイルス様粒子の量、縦軸は検出された蛍光強度を示す。ウイルス様粒子 0.01 ng/ml でもウイルス様粒子なし(0 ng/ml)の場合と比べて有意な蛍光信号強度が得られている。このウイルス様粒子濃度 0.01 ng/ml は、検出領域内にウイルス様粒子が大凡 100 個程度存在することに相当する。

以上の実験結果から、V溝バイオセンサは、検出領域内に固定化した補足用抗体によって 100 個程度のノロウイルスを捕捉すれば、検出することができるが示された。

(2) 高速ゲート動作可能なイメージンテンシファイアを用いた時間分解イメージ測定

以上に示した様に、V溝バイオセンサは低濃度のノロウイルスを検出できる能力を有する。センサチップ基板の自家蛍光による影響を取り除くことができれば、さらなる高感度化が実現できる。

図5(a)及び5(b)はそれぞれ、蛍光寿命測定装置(FluoroCube, (株)堀場製作所)を用いて測定したポリスチレン基板及びQdot705の蛍光寿命測定結果である。この時、励起光は波長390nm、パルス幅1nsとし、波長705nmの蛍光寿命を観測した。ポリスチレン基板の蛍光寿命が5.3nsであるのに対し、Qdot705の蛍光寿命は131nsであり、時間分解測定によって、十分分離が可能であることが分かった。

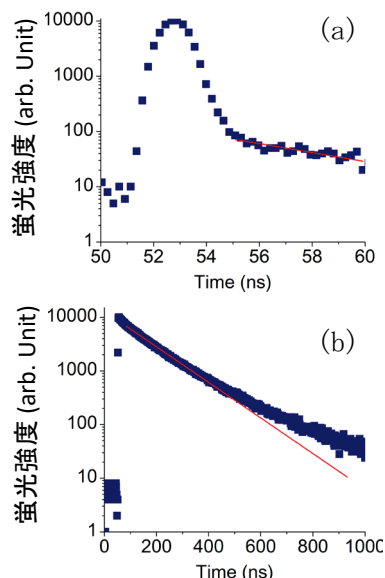


図5 ポリスチレン基板(a)及びQdot705(b)の蛍光寿命測定結果。

そこで我々は、高速ゲート動作が可能なイメージンテンシファイアを用いた簡易な時間分解測定を行い、基板の自家蛍光によるノイズの除去を試みた。図6は、パルス光入射に対してゲートを開ける時間を遅らせて蛍光測定を行った際の、ゲートのディレイ時間と観測された蛍光強度の関係を示す。ここ

ではゲート幅は10nsとした。図中の赤丸はQdot705を含む水を測定した結果であり、図中の黒四角は水のみを測定した結果である。赤丸はV溝バイオセンサ上で観測されたQdot705の蛍光寿命に相当し、黒四角はポリスチレン基板の蛍光寿命に相当する。ここで得られたポリスチレン基板の蛍光寿命は5nsであり、蛍光寿命測定装置で得られた値と同じ値が得られた。一方、Qdot705の蛍光寿命は18nsと、蛍光寿命測定装置で得られた値よりも小さい値となった。このQdotの蛍光の短寿命化は、アルミニウムによる蛍光のクエンチングに起因するものと思われる。それでもなおQdotの方が基板よりも長い蛍光寿命を示したことから、ゲート遅延時間を10nsに設定して、Qdotの蛍光測定を行ったところ、ゲート遅延時間なしとして測定した場合、つまり通常の測定手法を取った場合に対して、センサの感度が4倍程度高感度化されることが分かった。このように、V溝バイオセンサと時間分解蛍光測定とを組み合わせることによってセンサの高感度化が可能であることを示すことができた。

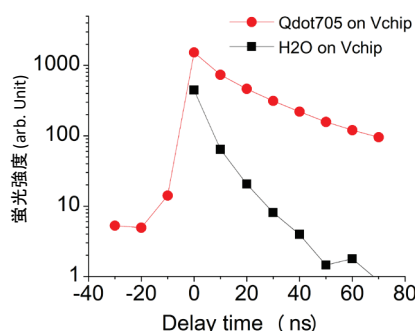


図6 イメージンテンシファイアを用いて測定したV溝バイオセンサチップ上に滴下したQdotの蛍光強度の時間変化(赤丸)。黒四角はセンサチップに水のみを滴下して測定した結果。

(3) CMOSイメージセンサによるV溝蛍光寿命イメージング

以上の検討を踏まえ、時間分解CMOSイメージセンサを用いたV溝バイオセンサによるイメージング試験を行った。我々が開発したイメージセンサは、撮像素子自身が時間分解機能を有しており、また、4つの時間窓を設定することが可能で、1度に4点のディレイ時間を変えた蛍光強度測定が行える。

図7はこのイメージセンサを用いてV溝バイオセンサにおける蛍光信号の時間分解観察を行った時の画像の一例であり、また、図8は、図7の蛍光信号部分の蛍光強度の減衰の様子を示す図である。図8のデータから得られた蛍光寿命は18nsであり、イメージンテンシファイアを用いた測定と同等の値が得られた。しかし、このイメージセンサを用いた時の測定限界は、従来の時間分解法を用いない測定方法と同程度であり、測定限界値の改善は見られなかった。その理由は、開

発したイメージセンサのノイズにあった。低濃度試料では、信号強度が弱い上に、時間分解測定では、蛍光強度の減衰を観測することから、時間経過に対して弱くなっていく信号強度を正確に測定する必要がある。今回用いた CMOS イメージセンサでは、冷却が不十分であり熱的なノイズのため、このような微弱蛍光領域での蛍光強度を正確に測定することができなかった。時間分解 CMOS イメージセンサの低ノイズ化は今後の課題である。



図7 時間分解 CMOS イメージセンサで観測した V 溝バイオセンサにおける蛍光信号の画像

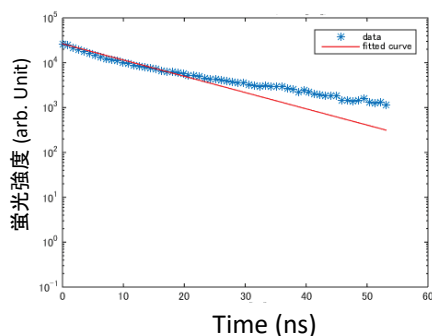


図8 時間分解 CMOS イメージセンサで観測した V 溝バイオセンサにおける蛍光信号強度の時間変化

(4) 抗体の性能評価

12A11 抗体の性状解析においては、12A11 抗体が GII. 4 遺伝子型株のウイルス様粒子だけでなく他の GII 遺伝子群の株 (GII. 3 遺伝子型株、GII. 5 遺伝子型株、GII. 6 遺伝子型株、GII. 7 遺伝子型株) のウイルス様粒子のウイルス吸着因子への結合も阻害することを明らかにし、12A11 抗体の GII 遺伝子群に対する交差反応性の高さを実証した。また、GI 遺伝子群を幅広く認識する CV-2F5 抗体と併用すればヒトに感染するとされる GI、GII 両遺伝子群のノロウイルス検出が可能であることが実証された。

(5) 外力支援近接場照明バイオセンサ

本研究開発を通じて、我々は、当初想定してなかった新たな着想を得て、ウイルスの検出感度を飛躍的に向上することに成功し、開発したセンサを外力支援近接場照明バイオセンサと名付けた。本センサの基本原理は、検出対象となるウイルスに信号用標識を抗体にて吸着させ、近接場光で光信号を励起し

てウイルスを検知する、という点で、上述の V 溝バイオセンサと同じである。また、開発の基本概念として、基板から生じるノイズ信号の影響を抑えることでセンサの高感度化を達成する、という点も同じである。我々が新たに発案した手法は、ウイルスをセンサチップ表面で捕捉するのではなく、磁気微粒子に抗体を付けて捕捉し、ウイルスを外部磁場によって動かすことによって、ノイズ信号と見分ける、というものである。我々が開発した検出系及び抗体プローブを用い、この検出原理を取り入れたところ、数 10 個レベルのノロウイルスのウイルス様粒子の検出に成功した^③。

<引用文献>

- ①K. Nomura et al., An angular fluidic channel for prism-free surface-plasmon-assisted fluorescence capturing, *Nature communications*, 4-2855, 2013, 1-7.
- ②M. W. Seo et al., 10.8ps-time-resolution 256×512 image sensor with 2-Tap true-CDS lock-in pixels for fluorescence lifetime imaging, 2015 IEEE International solid-state circuits conference digest of technical papers, 58, 2015, 141-154.
- ③M. Yasuura and M. Fujimaki, Detection of extremely low concentrations of biological substances using near-field illumination, *Scientific Reports*, 6-39241, 2016, 1-7.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ①H. Ashiba, Y. Sugiyama, X. Wang, H. Shirato, K. Higo-Moriguchi, K. Taniguchi, Y. Ohki, M. Fujimaki, Detection of norovirus virus-like particles using a surface plasmon resonance-assisted fluoroimmunosensor optimized for quantum dot fluorescent labels, *Biosensors and Bioelectronics*, 93, 2017, 260-266. 査読有 DOI:10.1016/j.bios.2016.08.099
- ②M. W. Seo, Y. Shirakawa, Y. Masuda, Y. Kawata, K. Kagawa, K. Yasutomi, S. Kawahito, A programmable sub-nanosecond time-gated 4-tap lock-in pixel CMOS image sensor for real-time fluorescence lifetime imaging microscopy, *ISSCC Dig. Tech. Papers*, 2017, 70-71. 査読有 DOI:10.1109/ISSCC.2017.7870265
- ③M. Yasuura and M. Fujimaki, Detection of extremely low concentrations of biological substances using near-field illumination, *Scientific Reports*, 6-39241, 2016, 1-7. 査読有 DOI:10.1038/srep39241
- ④Z. Li, M. W. Seo, K. Kagawa, K. Yasutomi, S. Kawahito, A CMOS image sensor with

lateral electric field modulation pixels for fluorescence lifetime imaging with sub-nano-second time response, Japanese Journal of Applied Physics, 55, 2016, 04EM06-1-7. 査読有

DOI:10.7567/JJAP.55.04EM06

⑤M. W. Seo, K. Kagawa, K. Yasutomi, Y. Kawata, N. Teranishi, Z. Li, I. Halin, S. Kawahito, A 10ps time-resolution CMOS image sensor with two-tap true-CDS lock-in pixels for fluorescence lifetime imaging, IEEE J Solid-State Circuits, 51, 2016, 141-154. 査読有

DOI:10.1109/JSSC.2015.2496788

〔学会発表〕(計19件)

①M. W. Seo, Y. Shirakawa, K. Kagawa, K. Yasutomi, S. Kawahito, A high performance multi-tap CMOS lock-in pixel image sensor for biomedical applications, Photonics, Photonics West 2017, 2017/1/28-2/2, Moscone Center, San Francisco (USA).

②藤巻真、V溝バイオセンサーによる免疫アッセイ、生物化学的測定研究会第21回学術シンポジウム、2016/11/11、産総研関西センター(大阪府)。

③H. Ashiba, Y. Sugiyama, Y. Ohki, X. Wang, M. Fujimaki, Aluminum-based V-trench biosensor for plasmon-assisted fluoroimmunoassay of norovirus virus-like particles, Biosensors 2016, 2016/5/25-27, Gothenburg (Sweden).

④杉山勇輝、黒田千愛、大木義路、芦葉裕樹、王晓民、藤巻真、V溝バイオセンサーを用いたノロウイルス様粒子の検出、第76回応用物理学会秋季学術講演会、2015/9/13-16、名古屋国際会議場(愛知県)。

⑤久保田智巳、石田豊和、白土東子、結晶構造を基にしたノロウイルスキャプシドタンパク質とウイルス抗原との結合エネルギー解析、第37回日本分子生物学会年会、2014/11/26、パシフィコ横浜(神奈川県)。

〔図書〕(計2件)

白土東子、最新医学社、最新医学、第70巻11月増刊号、「ノロウイルスと血液型抗原」、2015、2221-2426(2320-2328)。

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

①

名称：光学的検出方法及び光学的検出装置
発明者：安浦雅人、藤巻真、芦葉裕樹、島隆之

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2017/006759 (WIPO)

出願年月日：2017年2月23日

国内外の別：外国

②

名称：光学的検出方法及び光学的検出装置

発明者：安浦雅人、藤巻真、芦葉裕樹

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願2016-090662

出願年月日：2016年4月28日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤巻真 (FUJIMAKI Makoto)

産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・研究グループ長

研究者番号：10392656

(2) 研究分担者

芦葉裕樹 (ASHIBA Hiroki)

産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・研究員

研究者番号：90712216

久保田智巳 (KUBOTA Tomomi)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：90356923

香川景一郎 (KAGAWA Keiichiro)

静岡大学・電子工学研究所・准教授

研究者番号：30335484

谷口孝喜 (TANIGUCHI Koki)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：40094213

守口匡子 (HIGO-MORIGUCHI Kyoko)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：60298528

染谷雄一 (SOMEYA Yuichi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：50283809

白土東子 (SHIRATO Haruko)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：60356243

(3) 連携研究者

川人祥二 (KAWAHITO Shoji)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：40204763