

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18000

研究課題名(和文) ナノインプリント法を用いた超高感度インフルエンザウイルス検査チップの開発

研究課題名(英文) High sensitive inspection chip for influenza virus based on the local surface plasmon resonance

研究代表者

紋川 亮 (MONKAWA, AKIRA)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・技術開発支援部・上席研究員

研究者番号：10399397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、金ドットパターン上に低分子かつ認識・識別能力が高いシアル糖鎖を固定させたインフルエンザ検出チップを作製した。インフルエンザウイルスタンパク質を用いた検出チップの性能評価の結果、LSPRスペクトルは、1fg/mlのトリインフルエンザウイルス(H5N1)を滴下することにより、高波長側にシフトする。一方、ヒトインフルエンザウイルス(H1N1)については、1000倍の1pg/mlを滴下した場合であっても、ほとんどシフトしない。この結果、開発した検査チップは、PCR法と同等の検出感度での検査を10分程度で実現可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：H5N1 is a highly pathogenic influenza virus that causes severe respiratory disease in birds. The development of high sensitive detection method for H5N1 will be important to control spread and prevent disease at the outbreak of pandemic H5N1. In this study, we developed a high sensitive inspection chip for influenza virus based on the local surface plasmon resonance (LSPR). The sensitivity of the LSPR sensor chip was confirmed by using human and avian influenza virus hemagglutinins (H1 and H5). When H5 hemagglutinin of 1fg/ml was dropped on the sensor chip for 10 min, the LSPR peak red shift was observed. When H1 hemagglutinin of 1 pg/ml was dropped, the LSPR peak position remains the same before and after dripping. These results indicated that the sensor can detect and discriminate H5 at femtogram-level sensitivity. The detection sensitivity of the sensor is higher 109 times than immunochromatography method.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：局在プラズモン共鳴 インフルエンザウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

トリインフルエンザ(H5N1)やエボラウイルスは、致死率が非常に高く、世界的なパンデミック(感染爆発)を引き起こすことが懸念されている。パンデミックの発生は、我々の健康だけでなく、経済活動をはじめとする社会機能の麻痺など、世界的な経済損出をもたらす。これらのウイルスの脅威に対抗するためには、迅速検出法を用いた早期診断による感染者の封じ込めが不可欠である。早期診断は、封じ込めの効果が期待されるとともに、抗ウイルス薬投与などの適切な診療を早期に実施でき、患者の生存確率を高める。タミフルやリレンザなどの抗ウイルス剤は、インフルエンザウイルスの増殖を抑制することができ、有効な手段といえる。しかしながら、最適な効果を得るためには、抗ウイルス剤を感染から 48 時間以内のできるだけ早いタイミングでの服用が必要とされている。そのため、ポイントオブ検査によるインフルエンザウイルスの早期かつ正確な診断は、医療関係者にとって、抗ウイルス剤の投与の決定において、最も重要な指標となる。診断には、免疫クロマト法を原理とした迅速診断薬が臨床現場において広く用いられている。しかしながら、既存の迅速診断薬では、特に発症初期のウイルス量が少ない患者で偽陰性率が高いことが報告されており、ウイルスに罹患しているにもかかわらず、適切な治療を受けられず重症化したり、ウイルスを拡散させたりする原因となっている。現状、インフルエンザウイルスの検出は、RT-PCR 法によるウイルスゲノム検出が、最も高感度な検出方法であるが、検出までに数時間かかり、サーマルサイクラーなどの特殊な装置が必要である。そのため、迅速な封じ込めに RT-PCR 法を利用するには限界がある。それ故、迅速診断薬の検出感度向上は、医療現場において強く求められている。

ナノ構造を持つ金や銀などの金属構造体は、その自由電子が光の電場と結合して集団運動する局在プラズモン共鳴(LSPR)を示すことが知られている。LSPR は、金属構造体の種類や構造に依存した LSPR スペクトルを示す。LSPR スペクトルは、金属構造体周囲の誘電率変化に伴い、強度や極大波長が変化する。LSPR は、金属表面上の受容体への生体分子の結合をラベルフリーで検出することが可能であり、簡易検査チップのための有望なツールとして期待されてきた。一般に、孤立金属ナノ構造の LSP 場は、約 30nm の減衰長を有し、さらに、金属表面から短い距離 (<5nm) にわたって集中的に分布する。したがって、LSPR は、金属ナノ構造体の表面に近接した変化に非常に敏感である。LSP 領域の短い浸透深度は、抗原抗体反応を利用した検出方法には不向きである。抗原認識のため、金属ナノ構造体に抗体を固定化した場合、LSP 領域の浸透深度部分を抗体で埋め尽くし、LSPR スペクトルの大きなシフトが発生する。

その後、抗体に抗原が反応しても、大きな誘電率変化が発生しないため、LSPR スペクトルのシフトは発生しない。これは、特に低濃度での標的物質の検出を困難にする。それ故、LSPR によるラベルフリー検出は 100 pg/ml のタンパク質検出が限界であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、FDTD シミュレーションにより、LSPR によるラベルフリー検出の感度を大幅に向上させる金ナノパターン形状の最適化およびナノインプリント法による金ナノパターン作製法の最適化を目的とする。近年、ナノスケールでの微細加工に関する技術の中で、ナノからマイクロスケールの広範囲なレンジの構造体を一括で再現性良く形成することができる利点を有することからナノインプリント技術が注目されている。ナノインプリント技術の最大の利点は、様々な特徴を備える部品を電子線リソグラフィ法等の従来技術と比較して、より安価に作製できる点である。製造コストを低減できるのは、ナノインプリント技術で用いる装置の構成が簡便かつ安価で、製造時間も圧倒的に短く、ハイスループットな作製が可能となるためである。

## 3. 研究の方法

本研究では、FDTD シミュレーションを用いて、ウイルス検出感度が高い金ナノパターン形状を抽出する。形状最適化した金ナノパターンチップはナノインプリント法により作製する。作製したチップは、低分子インフルエンザウイルス認識部位であるシアル糖鎖を固定化し、インフルエンザウイルス検出能力を評価する。本研究の遂行により、検査チップの実用化に向けた基礎研究を遂行し、新型インフルエンザ発生時の感染拡大を抑制するために有効な超高感度検査システムの構築を目指す

## 4. 研究成果

### 4.1. FDTD シミュレーションによる金ナノパターンの構造とモデルタンパク質吸着時のシフト量の関係解明

金ナノパターンの構造は、FDTD シミュレーションを用いて最適化した。図 1a に金ナノパターンの模式図、図 1b に金ナノパターン形状とスペクトルのピーク位置およびモデルタンパク質 1 個を金ナノパターン表面に設置した時のピーク位置を示す。金ナノパターンの直径(d)とピッチ(p)を変化させることにより、LSPR スペクトルの形状およびピーク位置は変化する。この結果は、LSPR スペクトルのピーク位置は、金ナノパターンの直径とピッチに依存していることが明らかになった。さらに、それぞれの金ナノパターンにタンパク質を吸着させた場合のスペクトル変化についてシミュレーションした。この結果は、ピーク波長が 1100nm 以上の金ナノパ

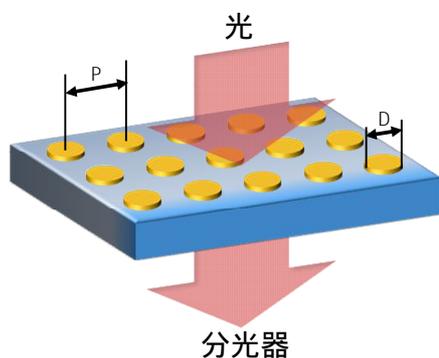


図 1a 金ナノパターンの模式図

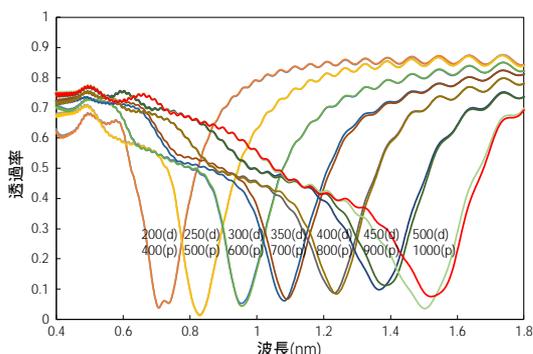


図 1b 金ナノパターン形状とスペクトルのピーク位置およびモデルタンパク質 1 個を金ナノパターン表面に設置した時のピーク位置

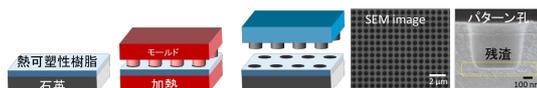
ターンで、LSPR ピーク位置の高波長側へのシフトが観察された。シフト量は LSPR スペクトルのピーク位置が高波長側になるに連れて大きくなった。この結果は、波長 1100nm を超える近赤外領域にピーク波長を有する金ナノパターンが、微量なウイルスを超高感度に検出するのに有用であることを示している。インフルエンザ検査チップは、うがい液などの液体を滴下し検査するため、近赤外領域に存在する水の吸収領域(1450nm)を避ける必要がある。本研究では、ピーク波長が 1230nm 程度である D400P800 のパターンをインフルエンザウイルス高感度検出用金ナノパターンの設計候補とした。

#### 4.2. ナノインプリント法による金ナノパターンチップ作製方法

金ナノパターンは、ナノインプリントリソグラフィ (NIL) 法により作成した。近年、ナノスケールでの微細加工(コロイドリソグラフィやナノ球リソグラフィなどの自己組織化手法および電子ビームリソグラフィを含む直接描画技術)に関する様々な技術が開発されているが、NIL 法は、ナノからマイクロスケールの広範囲なレンジの構造体を一括で再現性良く形成することができる利点を有することから注目されている。NIL 法の最大の利点は、従来の微細加工技術と比較して、大面積化が可能であり量産性が高い点、ナノインプリント技術で用いる装置の構成

が簡便かつ安価で、製造時間も圧倒的に短く、ハイスループットな作製が可能となるため製造コストが低減できる点にある。一般に、NIL 法は、熱および UV 法を使用して、パターンを基板に転写することができる。本研究では、インプリント及びパターン転写工程後にインプリントされた樹脂を除去することは容易である熱ナノインプリント法を選択した。

(1) 樹脂コート (2) 加圧(熱・UV) (3) パターン形成



(4) Reactive ion etching (5) 金蒸着 (6) 金ナノパターン



図 2 NIL 法による金ナノパターン作成手順

図 2 に NIL 法による金ナノパターン作成手順を示す。ナノインプリント法により、石英基板表面にホールパターンを作製する。金ナノパターンはホールパターンに金をスパッタすることにより作成した。

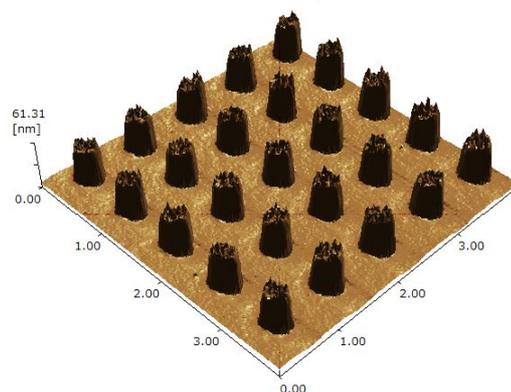


図 3 金ナノパターンの AFM 画像

図 3 にナノインプリント法により作成した金ナノパターンの AFM 画像を示す。金ナノパターンドット径は 380 ~ 390nm、ピッチが 780nm であった。高さは 40 ~ 70nm であった。これは、Au/Si 成膜や斜め Ar ミリング処理において、装置条件を完全に同じに制御できないことが原因と考えている。FDTD シミュレーションにより、金ナノパターンの高さが、タンパク質の検出に影響を与えるか調査した結果、40 ~ 90nm であれば、シフト量が 6 ~ 13nm と金の高さによる違いは出るものの、タンパク質の単分子検出が可能であることが明らかになった。作製した金ナノパターンにおける LSPR スペクトルのピークトップ位置は 1180 ~ 1250nm であった。

金ナノパターンの作製にあたり、金と石英との密着性を良くするために、Ti Cr、Si などの金属膜を石英と金の間に密着層として介在させる必要がある。残念なことに、これらの遷移金属下地層の使用は、大きな光損失によって引き起こされる屈折率に対する貴

金属ナノ構造の LSPR 感度の劣化を引き起こす。Na et. al.(2016)は遷移金属下地層をピラニア処理により部分的に除去することにより、感度が改善することを報告している。しかしながら、ピラニア処理は、機械的および化学的安定性も低下すると報告している。本研究では、この課題を解決するために、遷移金属下地層として Si を選択し、さらに Si を加熱酸化させることで、LSPR 感度およびパターン

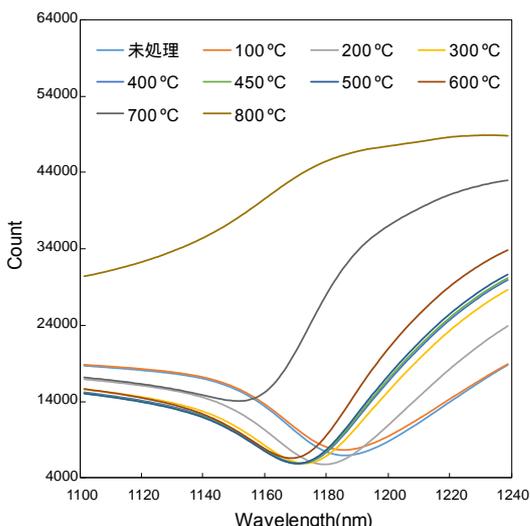


図 4 100～800℃で加熱した金ナノパターンの LSPR スペクトル

図 4 に 100～800℃で加熱した金ナノパターンの LSPR スペクトルを示す。100℃まではスペクトルの変化はなかったが 200℃以上ではスペクトルがシフトした。400～500℃でスペクトルのシフト量は最大に達した。600℃以上では、スペクトルが小さくなり、800℃でスペクトルが消失した。AFM 測定の結果、200℃以上で加熱した金ドットの先端部は、微小な金粒子がスパイク状に粒成長している。それに伴い、金ドットの直系はほとんど変化していないが、高さが 10nm 程度高くなった。600℃以上では、金ドットの直系が 5nm 程度小さくなるとともに、高さが 50nm 程度高くなった。

加熱による LSPR スペクトルのシフトは、金ドットの粒成長による形状変化と下地層である Si 下地が加熱処理より SiO<sub>2</sub> に酸化した影響であると考えられる。加熱前の金ナノパターンは、ピラニア洗浄および超音波処理でパターンの崩壊が観察されたが、加熱処理した金ナノパターンチップは、ピラニア洗浄および超音波処理でも金ナノパターンが崩壊しなかった。この結果は、基板の加熱処理より機械強度が向上したことを示唆している。Si は 370nm 以上で Au と共結晶を作ることが知られており、この機械強度の維持の原因は、加熱することにより、Au-Si 界面の密着性が高まったためであると考えられる。これらの結果から、400℃～500℃で金ナノパターン基板を加熱酸化させることで、LSPR 感度

およびパターンの機械的強度を向上させた金ナノパターン基板の作製に成功した。

#### 4.3. ウイルス認識部位の作製方法

インフルエンザウイルスを認識するためには、金ナノパターン表面に、認識部位を固定する必要がある。インフルエンザウイルスを特異的に認識する生体物質としては、ヘマグルチニン抗体が用いられている。抗体は、分子量 150 万のタンパク質である。これは、補足対象物であるヘマグルチニン(分子量 6 万)よりも大きい。FDTD シミュレーションにより、抗体を固定化した金ナノパターンチップに抗原抗体反応によりウイルスを補足した場合の LSPR スペクトルのシフト量を明らかにした。その結果、ヘマグルチニン抗体を固定化した時点で、LSPR スペクトルは大きくシフトし、その後、ヘマグルチニンを捕捉したとしても、LSPR スペクトルはシフトしなかった。これは、実際の実験結果と一致した。

本研究では、分子量が小さくヘマグルチニンの補足が可能なシアル糖鎖を用いて、ヘマグルチニンの高感度検出が可能かどうか検討した。オングストロームから数ナノメートルの大きさである多糖は、宿主細胞へのインフルエンザウイルス感染におけるインフルエンザウイルスの様々な HA 変種によって特異的に認識可能なリガンドとして重要な役割を演じる。インフルエンザウイルスが表皮細胞に浸潤する際、HA と  $\alpha$ 2,3-や  $\alpha$ 2,6 シアリル N アセチルノイラミンのようなシアル酸を含む三糖鎖は結合する。トリ H5N1 ウイルス HA のヒト結合は、シアル酸とガラクトース鎖の間の糖鎖結合構造の特長によって決定されるので、それは、迅速、高感度、利便性の高い検出およびウイルスの特性評価は、上述した 2 つのシアリルオリゴサッカライドリガンドを固定化した金ナノパターンチップを用いることにより達成することが可能である。 $\alpha$ 2,3 シアル酸は、H5 ヘマグルチニンと  $\alpha$ 2,6 シアル酸は H1 ヘマグルチニンと強固に結合することが知られている。LSPR 検査チップに  $\alpha$ 2,3、 $\alpha$ 2,6 シアル酸をそれぞれ固定化することにより、H5 と H1 ヘマグルチニンを高感度に見分けることが可能になると考えている。

認識部位の固定化法を以下に示す。LSPR 金ナノパターンの金部分に、アミノオキシチオールを、石英部分には、アミノオキシシランを固定化する。アミノオキシ基は糖鎖とグライコプロテック反応で結合することが知られている。本研究では、アミノオキシ基と  $\alpha$ 2,3、 $\alpha$ 2,6 シアル糖鎖をそれぞれ結合させることにより、チップ全体をシアル糖鎖で固定化し、インフルエンザ検査チップを作成した。図 # に各修飾による LSPR スペクトルのシフト変化を示す。その結果、各固定化試薬の反応に伴う LSPR スペクトルのシフトはほとんど起きていないことが明らかになった。

#### 4.4 ウイルス検出実験

トリインフルエンザウイルス(H5N1)の検出感度を測定した(図5)。検出チップは、 $\alpha$ 2,3シアル糖鎖を固定化したものを用いた。H5N1ウイルスより1000倍濃度を高めた1pg/mlの季節性インフルエンザウイルス(H1N1)を滴下した場合は、LSPR スペクトルのシフトはほとんど起こらなかった。続いて、1fg/mlのH5N1ウイルスを滴下するとLSPR ピークは高波長側にシフトした。シフト量は8nm程度であった。H1N1の検出感度も同様に検査した。図6に測定結果を示す。検出チップは、 $\alpha$ 2,6シアル糖鎖を固定化したものを用いた。その結果、H1N1ウイルスより1000倍濃度を高めた1pg/mlの季節性インフルエンザウイルス(H5N1)を滴下した場合は、ほとんどシフトしなかった。続いて、1fg/mlのH1N1ウイルスを滴下するとLSPR ピークは高波長側にシフトした。シフト量は8nm程度であった。LSPR チップにおける夾雑物の評価として、BSA1 $\mu$ g/mlを滴下した際のLSPR スペクトルのシフト量を観察した。その結果、ほとんどシフトはしていなかったことから、夾雑物の影響はかなり低いことが明らかとなった。これらの結果は、LSPR 検査チップが、H1ヘマグルチニンとH5ヘマグルチニンを高感度で識別できることを示している。

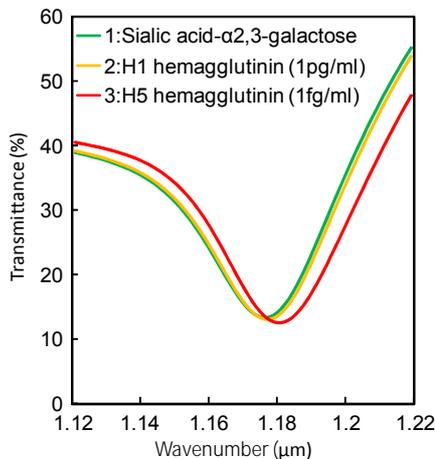


図5 H5N1の検出試験

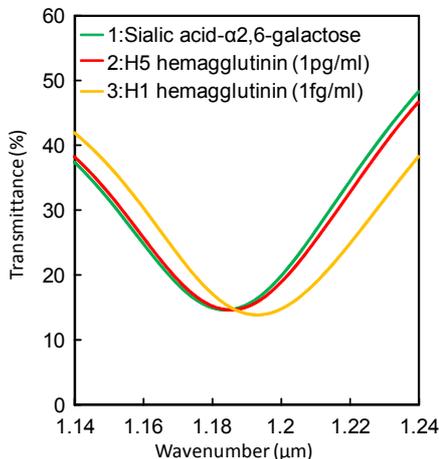


図6 H1N1の検出試験

濃度依存性を確認するために、ヘマグルチニンの濃度を1ag、10ag、100ag、1fg、1pg、1ng、1 $\mu$ gにおけるLSPR スペクトルのシフト量を比較した。その結果、1fg/ml以上では、LSPR スペクトルのシフトが発生し、シフト量は5~10nm程度であった。1、10ag/mlでは、スペクトルのシフトは観察できなかった。100ag/mlでは、2nm程度シフトした。これらの結果から作製したLSPR チップは1fg/mlのヘマグルチニンを検出することが可能であることが明らかになった。本研究では、1fg/mlのヘマグルチニン溶液を10 $\mu$ l、LSPR チップに滴下している。この中に含まれているヘマグルチニンの個数は、計算上、100個程度である。インフルエンザウイルス1個当たりヘマグルチニンが500程度含まれているため、これらの結果は、LSPR チップがウイルス1個の検出が可能であることを示している。この結果は、現在用いられているイムノクロマト法(検出感度：ウイルスたんぱく質濃度10 $\mu$ g/ml)よりも検出感度が10<sup>9</sup>倍高く、10分程度で約1個程度のウイルスを検出できることを示している。これは、従来の課題を解決する検査チップとして、非常に有用であるヘマグルチニンがLSPR チップ上に存在していることを証明するために、ナノサーチ顕微鏡を用いて、ヘマグルチニンを探し出した。図#にナノサーチ顕微鏡の観察結果を示す。金ドットパターン表面に、20nm程度の球体が観察された。このチップに酸素プラズマ処理した結果、スペクトルは元に戻り、ドットパターン表面に存在していた球体も消失した。これは、LSPR スペクトルのシフトが金ドット表面にヘマグルチニンが補足されたことにより発生したことを示唆するものである。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

紋川亮・瀧本悠貴・月精智子、高感度インフルエンザ検査チップの開発、応用物理学会春季学術講演会、横浜、パシフィコ横浜、3/17、2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

紋川 亮 (AKIRA, Monkawa)

東京都立産業技術研究センター・上席研究員

研究者番号：10399397