

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286062

研究課題名(和文) 局所励起表面プラズモンを用いた極微量検体中ウイルスの並列検出に関する研究

研究課題名(英文) Localized surface plasmon sensing for subtype determination of influenza viruses in a specimen with ultra-small volume

研究代表者

加野 裕 (KANO, Hiroshi)

室蘭工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80322874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスはサブタイプによって感染性や病原性が異なっているため、これを迅速に決定する手法の開発が重要である。本研究では、基板の表面に多種類の抗体を配置して、これとウイルスが結合することによって生じる屈折率変化を測定し、ウイルスの判別を行う手法を提案した。そして、これを実現する基盤技術の開発を行い、ウイルス検出を行う際の感度や安定性の向上、測定時間を短縮する原理の検証、抗体を配列させるための表面化学修飾プロセスの確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Development of a method for quick subtype determination of influenza viruses is important because infectious and pathogenic properties of viruses are different. In this research, we proposed a method in which refractive index change due to antigen-antibody reaction between target viruses with certain subtype and monoclonal antibodies fixed in a micro-channel on a sensing substrate. To realize this concept, we successfully improved stability and sensitivity of a measurement system for virus detection, confirmed a measurement principle for faster data acquisition, and developed a technique to modify chemical property of a substrate surface to locate certain antibodies in a controlled region.

研究分野：光計測工学

キーワード：表面プラズモン 屈折率測定 インフルエンザウイルス サブタイプ判定

1. 研究開始当初の背景

毒性の高い新型インフルエンザウイルスの感染流行が社会にもたらす混雑が心配されている。これに対し、インフルエンザウイルスのサブタイプなどの特性を短時間で判定する技術を確立することが重要であると考えられ、中でも、網羅的な判定手法の開発に対して大きな期待が寄せられている。従来、インフルエンザウイルスのサブタイプ判定には、主に、インフルエンザウイルス由来の遺伝子配列を調べる手法が用いられてきたが、DNA 増幅のプロセスに時間を要するという問題が知られていた。これに対し、特定のインフルエンザウイルスと特異的に反応する抗体が固定された基板を用い、抗体にウイルスが結合することで基板表面に生じる屈折率増大を検出する手法は、大幅な時間短縮を実現でき、潜在的な優位性があると考えられている。実際に、高感度な屈折率測定法として知られる表面プラズモンセンサーを用いることにより、サブタイプを判定可能であることが実験的に確認されたため、この手法をインフルエンザウイルスの網羅的検出へと発展させるべく、本研究を実施することとした。

2. 研究の目的

本研究では、極めて微量な検体から複数種のインフルエンザウイルスを極めて短い時間に検出することが可能なシステムの構築を目指し、これに必要な基盤技術の開発を行った。具体的には、インフルエンザウイルスに対し特異的に相互作用する抗体を制御された位置に固定し、この抗体との抗原抗体反応で判別されたインフルエンザウイルスが引き起こす屈折率変化を、基板表面の極微小領域に局所励起した表面プラズモンをプローブに用いて高速に検出するための光学システム、送液システム、特定の抗体を特定の領域に固定する手法の開発を行った。

3. 研究の方法

はじめに、インフルエンザウイルスの検出を行う基本システムとして、液晶分子による旋光を利用する偏光操作デバイス、20 マイクロメートル平方の領域を走査することが可能なステージ、送液シリンジポンプとシリコン製マイクロ流路などを用いて、局所領域の屈折率を測定する装置の試作を行った。このシステムでは、円形照明系を用い、表面プラズモンによる光吸収をもたらす反射光空間周波数スペクトル変化を測定し、基板表面の有効屈折率を得る。装置試作後、ポリスチレン微小球を試料に用いて試作装置の動作検証を行い、表面プラズモンの局在特性が理論計算とほぼ一致していることを確認した。送液機構については、たとえば、200 $\mu\text{l}/\text{min}$

の流量で、超純水、リン酸緩衝溶液 (PBS) の交互溶液交換を行ったとき、超純水、PBS の屈折率測定値は、手動送液と比べて大幅に安定性が向上し、超純水と PBS の平均屈折率 (超純水: 1.33007, PBS: 1.33100) の差に対し、各溶液の屈折率測定値の標準偏差 (超純水: 0.000080, PBS: 0.000039) が 10% 以下であることを確認できた。さらに、基板表面に、アビジン、ビオチン化モノクロナール抗体を固定し、無毒化した H1N1 型のインフルエンザウイルスを導入すると、基板表面の屈折率変化からウイルスを検出可能であることを確認した。

つぎに、測定効率の向上のために、装置動作の高速化を目的とした改良を行った。この改良においては、ラジアル偏光させた 0 次ベッセル光を回折限界まで絞り込んで励起光を基板に照射し、測定領域に生じる屈折率変化をもたらす反射光強度の変化を測定する。この光学系では検出器にフォトダイオードを用いることができるために大幅な時間短縮が可能となる。

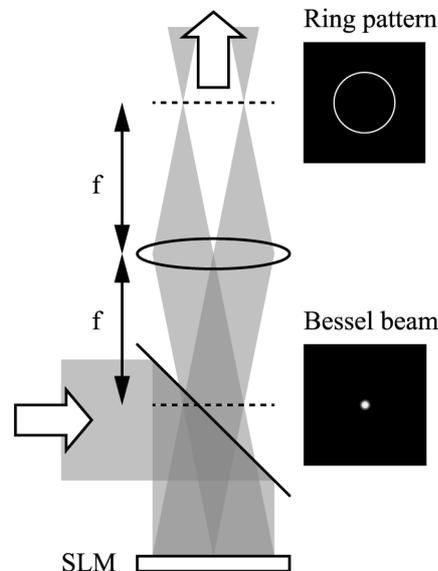


図 1 空間位相変調器を用いた光学系

本研究では、図 1 に示すように、空間位相変調器を用いて 0 次ベッセル光を生成した後、これを偏光コンバーターでラジアル偏光に変換し、油浸対物レンズで集光する照明光学系を構築し、クレッチマン配置基板の金属表面に回折限界スポットを生成した。また、基板からの反射光を基板表面と光学的に共役な位置に設置したイメージセンサーで検出する光学系を構築し、反射光強度を測定した。金属表面に、直径 $1\ \mu\text{m}$ の透明微小球を分散させ、照明光を走査したところ、図 2 に示すように、高いコントラストで微小球が空間分解された画像を得た。これにより、空間位相変調器を利用して 0 次ベッセル光を生成する照明光学系の有効性を確認することができた。また、フォトダイオードを検出器に用いることで、走査ステージの限界走査周波数で、

微小球を観察できることを確認した。

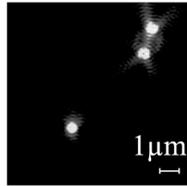


図2 微小球の観察像

特定の位置に特定の抗体を配置する手法の開発については、当初、基板表面に成膜した脂質二分子膜を微細パターンニングしてその表面にモノクロナール抗体を固定することにより、脂質二分子膜が残存している領域にだけ特定のインフルエンザウイルスが結合できるようにする計画であったため、まず、脂質二分子膜の加工状態を観察する機構を導入した。脂質二分子膜加工には、ジアセチレンが炭素鎖に導入されたモノマー脂質分子を用い、これを2光子光重合させる予定であったため、近赤外フェムト秒パルスレーザーを光源に用いて自家蛍光を観察する顕微鏡システムを構築した。パターン化脂質二分子膜を用いた実験では、十分に高い蛍光信号強度が得られ、脂質二分子膜のパターン観察に有用であることが確認できた。さらに、脂質二分子膜を顕微鏡下でパターンニングするための機構を導入し、作製した脂質二分子膜のラインパターンを確認できたものの、照射光強度や照射時間など最適化する途上で、フェムト秒パルスレーザーに修理不能な故障が発生したことにより、この方法による抗体配置の実験は継続不能となった。

そこで新たに、表面プラズモン励起可能な基板上で、特定の数 μm 平方の領域をアビジン末端表面にパターンニングすることができ、かつ、これを繰り返し実行可能な手法を探索した。そして、図3に示すように、基板表面

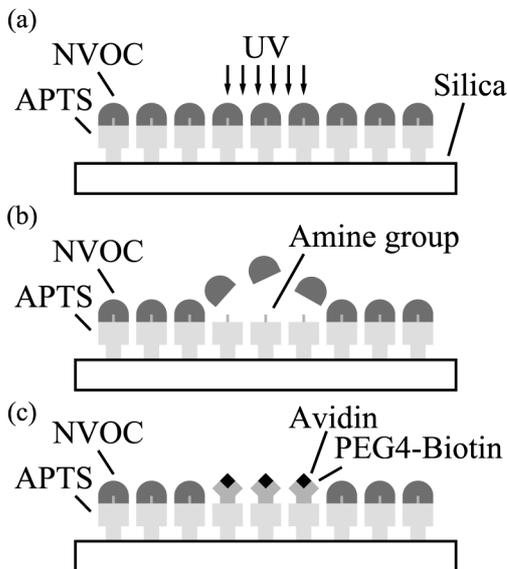


図3 抗体配置のための基板表面加工

に、光照射で基板表面から脱離する保護基を結合させておき、抗体を固定したい領域に光照射を行って基板表面を化学的に活性化し、アビジン末端表面を作製する手法を採用することにした。具体的には、まず、アミン基末端を有する APTS (3-aminopropyltriethoxysilane) を基板のシリカ表面にシラン結合させ、その表面に光乖離性保護基である NVOC (4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl chloroformate) を結合させる。ここで、顕微鏡下において、基板表面の一部に紫外光を照射して、NVOC を部分的に乖離させ、基板表面の局所領域においてアミン基を露出させる。これに NHS-PEG4-Biotin とアビジンを結合させ、アミン基末端表面をアビジン末端表面に改変する。この手法の繰り返しによって、特定の抗体を所望の位置に固定することが可能になる。

このプロセスが期待通りに進んでいることを確認するため、顕微鏡カバーガラス表面にアビジン末端表面を加工し、ビオチン末端を有する蛍光色素を用いてアビジン修飾領域を可視化しようと試みたが、非紫外光照射領域と有意な差を計測することができなかった。そこで、基板、および光学系を改良し、表面プラズモンを測定プローブとする屈折率測定法を用いて、各プロセスにおける基板表面の有効屈折率を計測できるようにし、反応過程をモニターした。各プロセスにおける有効屈折率分布を測定し、これを解析した結果、APTS の結合 (典型的なケースで屈折率 0.0007 の増大)、保護基の結合 (同 0.0018 の増大)、保護基の部分脱離 (同屈折率 0.0018 の減小)、ビオチンおよびアビジンの結合 (同屈折率 0.0070 の増大) を確認することができた。これにより、基板表面の一部領域をアビジン末端表面に顕微加工できることを確認した。

4. 研究成果

(1) 局所励起表面プラズモンを用いて屈折率測定を行う試作装置を用い、アビジン化させた基板表面にビオチン化抗体を結合させ、特定のサブタイプを有するインフルエンザウイルスを含む微量検体を送液すると、基板表面の屈折率が増大し、抗体とウイルスの結合を検出できることを実験的に確認した。

(2) 基板表面の特定領域に、特定の抗体を固定する手法として、表面プラズモン励起可能な基板の表面をアミン基で化学修飾し、これを一時的に光脱離性の分子で保護する手法が有効であることを確認した。さらに、紫外光照射により保護分子を脱離させた領域だけをアビジン化させることができるようになった。

(3) 基板表面の光近接場領域における有効屈折率を測定する光学システムに、空間位相変調器を用いた環状照明系を用いること

で、フォトダイオードによる信号光取得が可能になることを実験的に確認した。この結果、従来、測定速度のボトルネックとなっていたイメージセンサーによる信号取得から解放され、走査ステージの性能限界までシステムの動作を高速化することができた。

(4) 送液機構においては、シリンジポンプを用いて、屈折率測定の安定化を図り、溶液交換を経ても屈折率測定値の標準偏差を 10^{-5} オーダーで安定させることができるようになった。これにより、抗原抗体反応検出などのバイオセンシングに十分安定な測定環境を整えることができた。

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 19 件)

H. Kano, A. Iseda, K. Ohenoja, I. Niskanen, "Refractive index measurement of nanoparticles by immersion refractometry based on a surface plasmon resonance sensor", Chem. Phys. Lett. Vol. 654, 72-75 (2016) 査読有 DOI:10.1016/j.cplett.2016.05.013

A. Ainai, H. Hasegawa, M. Obuchi, T. Odagiri, M. Ujike, M. Shirakura, E. Nobusawa, M. Tashiro, H. Asanuma, "Host Adaptation and the Alteration of Viral Properties of the First Influenza A/H1N1pdm09 Virus Isolated in Japan", Vaccine, Vol. 10, e0130208 (2015) 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0130208

T. Suzuki, A. Kawaguchi, A. Ainai, S. Tamura, R. Ito, P. Multihartina, V. Setiawaty, KN. Pangesti, T. Odagiri, M. Tashiro, H. Hasegawa, "Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 112, 7809-7814 (2015) 査読有 DOI:10.1073/pnas.1503885112.

H. Hasegawa, E. van Reit, H. Kida, "Mucosal immunization and adjuvants", Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 386, 371-380 (2015) 査読有

Y. Tanimoto, K. Okada, F. Hayashi, K. Morigaki, "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", Biophys. J. Vol. 109, 2307-2316 (2015) 査読有 DOI:10.1016/j.bpj.2015.10.015

森垣 憲一, "光重合性脂質を用いたパターン化モデル生体膜の創製", 高分子, 64 巻, 653-654 (2015) 査読有

K. Sasahara, K. Morigaki, Y. Mori, "Uptake of raft components into amyloid

beta-peptide aggregates and membrane damage", Anal. Biochem. Vol. 481, 18-26 (2015) 査読有

DOI:10.1016/j.ab.2015.04.014

K. Kuroda, H. Miyoshi, S. Fujii, T. Hirai, A. Takahara, A. Nakao, Y. Iwasaki, K. Morigaki, K. Ishihara, S. Yusa, "Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) surface patterning by biocompatible photo-crosslinking block copolymers", RSC Adv. Vol. 5, 46686-46693 (2015) 査読有 DOI:10.1039/C5RA08843G

F. Okada, K. Morigaki, "Micropatterned model membrane with quantitatively controlled separation of lipid phases", K. RSC Adv. Vol. 5, 1507-1513 (2015) 査読有 DOI:10.1039/C4RA09981H

K. Toma, H. Kano, and A. Offenhäusser, "Label-Free Measurement of Cell-Electrode Cleft Gap Distance with High Spatial Resolution Surface Plasmon Microscopy", ACS Nano, Vol. 8, 12612-12619 (2014) 査読有

DOI:10.1021/nn505521e

E. van Riet, A. Ainai, T. Suzuki, G. Kersten, H. Hasegawa, "Combating infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design", Adv. Drug. Deliv. Rev. Vol. 74, 28-34 (2014) 査読有

DOI:10.1016/j.addr.2014.05.011

K. Sasahara, K. Morigaki, K. Shinya, "Amyloid aggregation and deposition of human islet amyloid polypeptide at membrane interfaces" FEBS J. Vol. 281, 2597-2612 (2014) 査読有

DOI:10.1111/febs.12807

E. Kanemura, T. Goto, Y. Tatsu, H. Imaishi, K. Morigaki, "Parallel assay of inkjet-printed cytochrome P450", Anal. Methods Vol. 6, 2117-2124 (2014) 査読有 DOI:10.1039/C3AY41446A

M. Fujiwara, K. Shiokawa, T. Kubota, K. Morigaki, "Preparation of calcium carbonate microparticles containing organic fluorescent molecules from vaterite", Adv. Powder Technol. Vol. 25, 1147-1154 (2014) 査読有

DOI:10.1016/j.apt.2014.02.022

S. Otsuki, N. Murase, H. Kano, "Mueller matrix microscopic ellipsometer", Opt. Commun. Vol. 305, 194-200 (2013) 査読有 DOI:10.1016/j.optcom.2013.04.065

J. Ning, K. Nagata, A. Ainai, H. Hasegawa, and H. Kano, "Detection of influenza virus with specific subtype by using localized surface plasmons excited on a flat metal surface", Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 52, 082402-1-082402-4 (2013) 査読有

DOI:10.7567/JJAP.52.082402

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. Vol. 52, 3324-3328 (2013) 査読有 DOI:10.1364/AO.52.003324

S. Otsuki, N. Murase, H. Kano, "Back focal plane microscopic ellipsometer with internal reflection geometry", Opt. Commun. Vol. 294, 24-28 (2013) 査読有 DOI:10.1016/j.optcom.2012.12.013

M. Yamada, H. Imaishi, K. Morigaki, "Microarrays of phospholipid bilayers generated by inkjet-printing", Langmuir Vol. 29, 6404-6408 (2013) 査読有 DOI:10.1021/la400570h

〔学会発表〕(計 13 件)

A. Hereid, T. Yamashita, and H. Kano, "Surface plasmon microscopy with a Bessel beam illumination system using a spatial light modulator", Focus on Microscopy (FOM2016), Taipei, Taiwan, Mar. 2016.

K. Morigaki, Y. Tanimoto, F. Hayashi, "Evaluating the raftophilicity of rhodopsin photoreceptor in a patterned model membrane", 251st American Chemical Society National Meeting, San Diego, USA, Mar. 2016.

H. Hasegawa, "Impact of the quaternary structure of human secretory-IgA on neutralization potency to influenza A virus in upper respiratory tract", The U.S. - Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 50th Anniversary and 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, North Bethesda, USA, Jan. 2016.

森垣憲一, 安藤公二, 田邊真志, "パターン化脂質膜とナノ空間を融合した新規人工生体膜の創出", 第 35 回表面科学学術講演会, つくば市, つくば国際会議場, 2015 年 12 月.

K. Morigaki, "Micro-/nano-compartments between substrate-supported model membrane and silicone elastomer", TethMem 2015, Singapore, Singapore Nov. 2015.

H. Hasegawa, "Development of intranasal inactivated influenza vaccine and immune system induced by the vaccine", 9th Vaccine & ISV Congress, Seoul, Korea, Oct. 2015

H. Kano, T. Yamashita, and A. Hereid, "Surface plasmon microscopy with ring pupil illumination by using a spatial

light modulator", The 11th Finland-Japan Joint Symposium on Optics in Engineering, Joensuu, Finland, Sep. 2015.

H. Hasegawa, "Development of mucosal vaccine for influenza", TEPIK International Influenza Symposium, Seoul, Korea, Apr. 2015.

K. Morigaki, "Nanometric gap structure between substrate-supported model membrane and silicone elastomer", 249th American Chemical Society National Meeting, Denver, USA, Mar. 2015.

K. Morigaki, "Micropatterned model membrane for studying the affinity of proteins to lipid raft", 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌市, 札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月.

K. Morigaki, "Controlled distribution of lipids and proteins in a micropatterned model membrane", 247th American Chemical Society National Meeting, Dallas, USA, Mar. 2014.

H. Kano, "Microscopy using localized surface plasmons on a flat metal surface", Japan-UK workshop on Photonics and Metamaterials Research, British Embassy Tokyo, Tokyo, Japan, Mar. 2014.

H. Kano, "Refractive index imaging by using localized surface plasmons excited on a flat metal surface", Annual Meeting 2014, The Physical Society of Republic of China, Taichung, Taiwan, Jan. 2014.

〔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・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 8 0 3 2 2 8 7 4

(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: 3 0 3 0 1 7 9 0

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: 1 0 3 5 8 1 7 9