

導波モードセンサーを用いたインフルエンザウイルスの検出

— 手のひらサイズの高感度センサーを開発 —

栗津 浩一*、藤巻 真、Subash C. B. GOPINATH、王 曉民

我々はかつてシンセシオロジー誌^[1]において、導波モードセンサーの開発を報告した。この論文では、波長掃引方式の開発や装置の小型化方法についての研究紹介を行うとともに、応用例としてインフルエンザウイルスH3N2とその他の亜型の識別が明確にできたことを報告する。また我々はシアル酸の吸着の違いによるH3N2型とH5N1型の識別が導波モードセンサーで可能であることを示した。イムノクロマトグラフィー、ELISA、SPRとの感度比較をH3N2 Udorn株を用いて行い、この中では導波モードセンサーが最も高感度であることを確認した。このような小型高感度センサーは感染症の国内への侵入防止に対する水際対策として空港、航空機内、アリーナ等で有効であると考えている。

キーワード: バイオセンサー、導波モード、インフルエンザウイルス、小型センサー

Detection of influenza viruses with the waveguide mode sensor

– Development of a palmtop sized sensor –

Koichi AWAZU*, Makoto FUJIMAKI, Subash C. B. GOPINATH and Xiaomin WANG

We developed a highly sensitive sensor, based on optical waveguide modes, which was reported in the journal, *Synthesiology*^[1]. The first part of the present paper reports the method for reducing sensor size. Applications include identification of influenza virus A H3N2 and other subtypes of influenza viruses. We also found that sialic acid based detection using the waveguide sensor system analysis was very useful in distinguishing between H3N2 and H5N1 viruses. Using these techniques, H3N2 and H5N1 strains of influenza viruses have been successfully identified with the waveguide-mode sensor. Sensitivity comparison was also conducted for waveguide-mode sensor, immunochromatography, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and surface plasmon resonance (SPR). Of these techniques, waveguide mode sensor showed the greatest sensitivity for the H3N2 Udorn strain. The palmtop sized, high sensitive sensor will be useful in border control against intrusion of infections, for example, in aircraft, at airports, and arenas.

Keywords: Bio sensor, waveguide mode, influenza virus, palmtop sensor

1 初めに

人類は 20 世紀に 3 回、今世紀に入っただけで 1 回のインフルエンザパンデミック（世界的大流行）に見舞われている。20 世紀のパンデミックは 1918 年のスペイン風邪（スペイン・インフルエンザ）、1957 年のアジア風邪、1968 年の香港風邪である。そして今世紀 2009 年の新型インフルエンザは記憶に新しい。インフルエンザは届出が必要な伝染病である^{注1)}。スペイン・インフルエンザでは、7ヶ月でパンデミックとなり、感染者および死者の見積もりには幅があるものの世界人口 18 億人のうち、10 億人が感染し、8000 万人が死亡している。日本で最初の感染者が報告されてから 3 週間で日本中に広まり、国民の 42 % が感染し、45 万人が死亡したと伝えられている。スペイン・インフルエンザが終息したのは 1920 年であり、1929 年から始まった世界大恐慌の遠因となったと経済学者は見ている^[2]。そ

して 2009 年春発生の新型インフルエンザでは、アメリカ Center for Disease Control and prevention (CDC) によると全米で 2010 年 10 月までに約 27 万人が入院し、1 万 2 千人が死亡している^[3]。過去の流行に比べてそれほど多くの死者が出なかった原因は、弱毒型^{注2)}であったためである。日本では累計で 2068 万人が感染したと報告されている^[4]。

それでは何故、このようなパンデミック型のインフルエンザが周期的に現れるのであろうか。まずインフルエンザには A 型、B 型、C 型の 3 種類がある。このうち A 型は、抗原性の異なる 16 種類の赤血球凝集素 (HA) と 9 種類のノイラミニダーゼ (NA) の組み合わせによって 144 種類の亜型が存在する。新型インフルエンザとはこの HA や NA が変異することである。この HA と NA の型から H1N1 型インフルエンザといった呼び方をする。新型インフ

産業技術総合研究所 電子光技術研究部門 〒305-8565 つくば市東 1-1-1 中央第 5
Electronics and Photonics Research Institute, AIST Tsukuba Central 5, 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8565, Japan * E-mail: k.awazu@aist.go.jp

Original manuscript received September 22, 2014, Revisions received January 2, 2015, Accepted January 5, 2015

ルエンザとは新たな型の HA や NA が人類の間に出現することで、抗原連続変異と不連続変異、またはインフルエンザの遺伝子が鳥から人へ入ることによる。その後の研究からスペイン・インフルエンザは鳥インフルエンザ由来の弱毒型の H1N1 型であることがわかっている。

新型インフルエンザが深刻な理由として以下の 3 つが挙げられる。①これまで存在しなかった型のために誰にも免疫がない。②インフルエンザの感染力が極めて強い。空気感染するような能力を獲得したインフルエンザウイルスだけがパンデミックを引き起こせるとも考えられている。③未知のウイルスであるために、ワクチンを作っておくことができない。またスペイン風邪で顕著であった現象として若い人が全身感染や多臓器不全、ウイルス感染への過剰生体反応であるサイトカインストームといった重篤な病態へと進んでいく。例えばスペイン・インフルエンザでは死者のピークは 24-29 歳であった。日本でも、“働き盛りから順に倒れる”といった新聞の見出しが残されている。すなわち、社会を支える働き盛りの人たちを中心に瞬間に患者は広がり、死に至り社会機能が麻痺してしまう。厚生労働省の試算によれば^[6]、もしスペイン・インフルエンザ並み(致死率 2.0%)のインフルエンザがパンデミック型で発生した場合、64 万人が死亡すると考えている。しかし H5N1 亜型の変異ウイルスの場合致死率 60% であることから、さらに大きな被害がでるとの予測もある^{[6][8]}。

人類だけでなく、動物にとってもインフルエンザは重要な問題である。鳥インフルエンザウイルスの家禽や家畜への感染が確認されれば、現在の対策は家畜伝染病予防法に基づき広範囲にわたる殺処分を行うことになっている。例えば 2010 年には鳥根県の養鶏場で H5N1 亜型が確認され、21,549 羽が殺処分されている^[9]。殺処分だけに留まらず、半径 10 キロ圏内の養鶏場の立ち入り検査、防疫作業、鶏舎に至る道路の通行止め措置を行う必要があるのが甚大な経済的損害である。そこで鳥インフルエンザ発生源を一刻も早く発見し、最低限の殺処分だけで収束させることができれば、広範囲にわたる殺処분을しなくて済む。またパンデミック化を防ぐことも可能となり、経済的な効果は大きい。この教訓もあり、2014 年 4 月 13 日に熊本県の肉用鶏農場で発生した高病原性鳥インフルエンザ(その後 H5N8 と判定)では、初動が速かったために被害の拡散は最小限に留まった。

現在問題となっている同じ鳥インフルエンザでも H5N1 型と H7N9 型はそれぞれ全く異なった課題を有している。H5N1 型は強毒型でありニワトリを始め多くの鳥類に致死感染を引き起こすが、鳥から人への感染は例外的に起きるだけと考えられている。これに対して H7N9 型は弱毒型で

表 1 鳥インフルエンザウイルスによる死亡者数
2014 年 6 月 27 日現在。^{[7][8]}

	死亡者数 / 感染者数
H5N1	393/667
H7N9	118/393

あるために、鳥が感染しても症状は現れず、したがって鳥の体温等のモニターは意味をなさない。ところが弱毒ではあっても鳥から人への感染は発生しており、人には免疫がないために重症となっている。

H5N1 および H7N9 型の鳥インフルエンザは動物だけの問題では済まなくなっている。両ウイルスとも動物から人への感染が起こりうる。しかも、その致死率は表 1 に示したとおり極めて高い。さらに、問題を深刻化させる可能性が危惧されている。頻繁に人に感染することで、より人に適応変異したインフルエンザウイルスが生じ、人から人へ効率よく感染が広がる可能性である。現時点では、両ウイルスともに、基本的にはニワトリからの感染で人が発症していると考えられているが、事態がいつ変化し急激な人での流行が起こるか、誰にも予測できない。

2 ベンチマーク

通常、病原微生物の同定には、その遺伝子または抗原タンパク質の同定が必要である。遺伝子の同定にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いた場合、陽性検体が 1 度でも漏れいするとエアロゾルコンタミネーションで擬陽性結果が出る危険性が高い。密閉チューブ内での遺伝子増幅法である qRT-PCR、qPCR 等リアルタイム PCR や Digital PCR がここ数年で目覚ましい発展を遂げたが、それでも PCR 産物のエアロゾルコンタミネーションの可能性は否定できない。これがひとたび起きると PCR 偽陽性が常態化してしまう。メーカー作成のガイドブックでの指針でもコンタミネーションを避けるための手法に数ページを割いているが、前処理、後処理を別の部屋に分けて、各部屋専用の試薬セット、ピペット、ディスプレイ機器類を揃えることを推奨している^[10]。したがって、PCR 系の解析法は、設備の整った研究施設で、熟練者が実施する場合には威力を発揮するが、一般の診療所、空港検疫所、集会所、学校等の通常施設での検出、同定には不向きである。さらに鳥インフルエンザウイルスの場合、鶏舎、生鳥市場や屠畜場等のフィールドでの検出が求められるが、このような環境を PCR は苦手としている。もしフィールドで PCR を行い、最初の検査では、ネガティブコントロールがネガティブであったとしても、同じ場所で

の2度目の測定ではPCR産物汚染の可能性が格段に増加する。また検出に時間がかかり、操作が煩雑であることも欠点である。これに比べ、抗体による検出は、検出感度は遺伝子検査に及ばないものの検出時間は短く、遺伝子増幅や特殊な工程を必要としない簡便な方法であり、抗原タンパク質のコンタミネーションの可能性はほとんどない。これは抗原タンパク質の増幅の過程がないことによる。

抗体を用いた検査手法として最も普及しているのがイムノクロマトグラフィーである。保険点数が150点と高いことも手伝ってインフルエンザA、B型診断用のイムノクロマトグラフィーが普及している。しかし、最近の研究で例えば2009年にHurtらは3種類のイムノクロマトグラフと5種類のインフルエンザA H1N1とH3N2を用いて感度試験を行っている^[11]。その結果、検出限界は検査キットおよび対象ウイルスによって大きく異なり $10^3 \sim 10^5$ TCID50/mLであったと報告している。山口らは、イムノクロマトグラフィーに付属のウイルス陽性コントロールを用いて感度比較を行っている^[12]。その結果、 $0.7-1.4 \times 10^3$ TCID50/mLと高感価の場合、的中率は熟練した臨床検査技師で98.8%、検査室職員（助手・看護師、看護学校教員）で85.4%と比較的高かったが、 $3.5-7.0 \times 10^2$ TCID50/mLと低感価の場合、的中率は熟練した臨床検査技師で60.7%、検査室職員で43.8%と極めて低かった。

Baccamらは鼻ぬぐいにより採取されるA/Hong Kong/123/77 H1N1株は罹患後2～3日で最大値をとるが、その値は $5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ TCID50/mL nasal wash程度であると報告している^[13]。以上3つの報告を総合して考えると、罹患後ウイルス量が最大となる時期でないとイムノクロマトグラフ法で精度良く検出ができないことがわかる。

国立感染症研究所によると、イムノクロマトグラフ法によ

る偽陽性（真の陰性）は、インフルエンザがコミュニティの中であまり流行していない、アウトブレイクの初期、および最後の時期により多く見られやすくなっている^[14]。またイムノクロマトグラフ法による偽陰性（真の陽性）については、インフルエンザがコミュニティで流行している、アウトブレイク中に多く見られるとしている。

鳥インフルエンザでも同様で、環境省ではイムノクロマトグラフ法の問題点として、感染した鳥でも陰性を示すことが報告されている^[15]。例えば確定検査で陽性だった60羽のうち、簡易検査で陽性だったのはわずか27羽であった事例が同マニュアルで紹介されている。逆に簡易検査で陽性でありながら、確定検査では陰性となった事例も示されている。この原因として持ち帰ってから、ウイルス分離の確定検査までの間に乾燥もしくは低温でない状況により、何らかの理由で試料中のウイルスが不活化してしまったことが挙げられている。つまり、その場で現行法よりも数ケタ高感度かつ迅速な検出を行う技術が求められている。

3 開発内容

3.1 小型導波モードセンサーの開発

我々は独自の導波モードセンサーを開発してきた^{[16][17]}。最も初期の導波モードセンサーは、すでにシンセシオロジーでも報告してきたとおり^[1]、ある特定の入射角において反射膜層および導波路層において、導波モードが形成される。光源として波長632.8 nmのHe-Neレーザーを用いて角度掃引を行うと、ある特定の角度において反射強度が減少する。表面に分子が吸着するなど表面状態が変化すると、それに伴う表面の屈折率変化を計測することができる。しかし、この場合、図1の光学系に示したとおり光源側と検出器側の二つのゴニオメータを同期させて掃引する

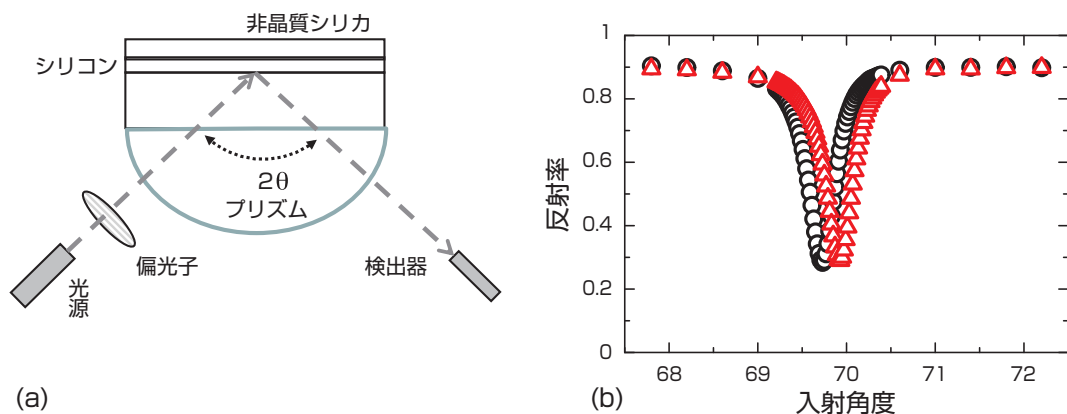


図1 (a) 角度掃引型導波モードセンサーの光学配置。プリズム下のSiO₂ガラス基板にはシリコン単結晶膜(c-Si)が張り合わされている。c-Siを熱酸化して非晶質SiO₂(a-Si)膜としている。このSiO₂膜中に射導波モードが形成される。ある特定の角度2θで反射強度が急激に変化することが確認される。非晶質シリカ表面に分子が付着すると2θの値が変化する。角度2θは2つのゴニオメータを同期させている。

(b) (a)の光学系で非晶質シリカ表面に分子が吸着した場合のイメージ。横軸が2θになる。分子が吸着する前は○、吸着した後は△となる。

必要があり、光学系自身が大型かつ複雑になるという問題点があった。このため、角度掃引型では携帯型センサーというユーザーのニーズを満足させることはできないと考えた。そこで、角度を掃引するのではなく、波長を掃引する手法を考案した。波長を掃引することでスペクトルが得られれば、小型化の障害となっている二つのゴニオメータをなくすことが可能となる^[18]。図2は、直径5 nmのタンパク質（屈折率1.45）が吸着したと想定した場合の吸着前後での反射率変化量のシミュレーション結果である。単結晶シリコン層厚さ220 nm、シリカ導波路層厚360 nm、プリズム材質はシリカ、またS偏光での計算である。幾つかのピークが確認でき、例えば500 nm、68°付近で反射率変化量が最大となる領域にピークが存在する。この計算結果から、入射角度を固定して、入射光の反射スペクトルを観測することによっても、ターゲット物質の検出が可能であることがわかった。

波長を掃引することでも導波モードでの測定が可能なことから、図3のような光学系を設計した。励起光は白色光のまま測定部背面に到達し、その後反射光はコリメータレ

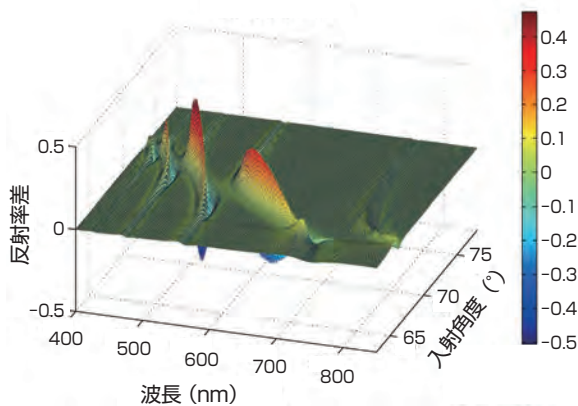


図2 反射率変化の角度、波長依存性の計算結果
反射率変化量を色で表した。波長を固定して、角度を掃引しても反射率変化のピークが観察されるが、角度を固定し波長を掃引しても反射率変化のピークが観察されることがわかる。

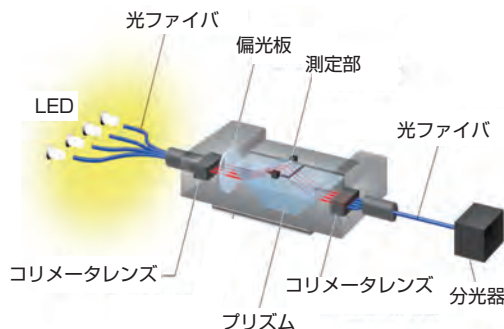


図3 波長掃引型の導波モードセンサー
光源として白色LEDを用いる。測定部に測定板を設置して、測定板上の反応を反射光で検出する。光ファイバーの光軸を揃えることで、分光器まで反射光を導くことができる。

ンズ、光ファイバを経て分光器に到達する。光源を4つ使うことにより測定部で4点の計測が可能となる。この光学系により、同期させながら掃引させる2台のゴニオメータが不要となり、小型化が可能となった。

測定時における図3の測定部をより詳細に示したものが図4である。表面反応を検出する検出板はSiO₂ガラス基板上の単結晶シリコン(c-Si)膜を形成したものを、シリコンを熱酸化し非晶質シリカ(a-SiO₂)とすることで得ている。このa-SiO₂層表面での屈折率変化に対して最も大きな反射率変化量が得られるようにc-Si膜厚とa-SiO₂膜厚を設計することで表面反応を鋭敏に検出する仕組みである。図5は、波長512 nm、シリカ導波路層厚さ284 nm、単結晶シリコン層厚さ220 nmで検出板表面付近の電場強度分布を計算したものである。導波路層表面に強い電場が形成され、高感度な検出が実施可能であることがわかる。したがって表面に抗体を固定化しておき、ウイルスと反応させることによる表面の屈折率変化を捕えることが可能である。また、後述のように金ナノ粒子で信号を増幅することも可能である。

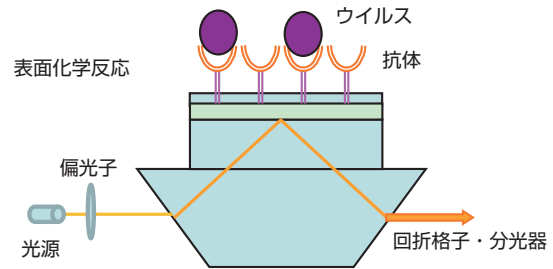


図4 導波モードセンサーの光学配置
プリズム上のSiO₂ガラス基板、検出板の構成は図1と同じ。出射光は分光器で分光される。

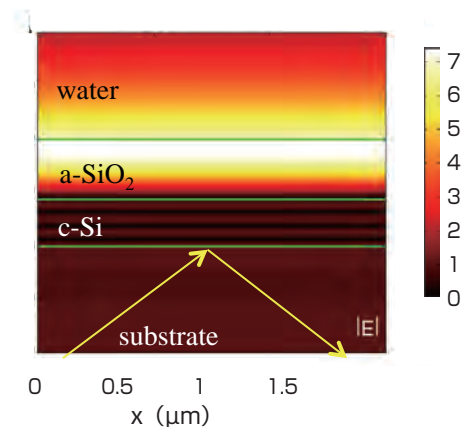


図5 c-Si層220 nm、SiO₂層284 nm、励起波長512 nm 導波モードの電場強度分布
図1と同様、黄色の矢印が光入射、出射方向である。SiO₂層最表面に電場強度が最大になるように膜厚等を設計した。横のスケールバーが電場強度を示している。

小型化までの変遷を図6に示した。初期においては、(a)のように1 m × 50 cmで2段の定盤上に光学系を設定した角度掃引型であったが、その後図2、3のとおり波長を掃引することでも導波モードでの測定が可能なることから、図3のような光学系を設計した。励起光は白色光のまま測定部背面に到達し、その後反射光はコリメータレンズ、光ファイバを経て分光器に到達する。この光学系により、同期させながら掃引させる2台のゴニオメータが不要となったために、図6(b)のとおり小型化(30 cm × 15 cm × 20 cm)に成功し、技術移転先企業より製品化された。この装置にはパソコン、通信用Bluetooth、バッテリーが搭載されている。その後、主として光学系のさらなる小型化に努め(c)のとおり7 cm × 5 cm × 15 cmを達成した。

3.2 インフルエンザウイルス亜型の識別

導波モードセンサーでインフルエンザ亜型の識別を試みた^[20]。ポリクローナル抗体は、H3N2 A/Udorn/307/1972

を健康なウサギに免疫することで得た。このポリクローナル抗体を検出板表面に固定化した。4種類のH3N2インフルエンザウイルスは界面活性剤であるTriton X-100で分解した後、検出板表面に固定化したポリクローナル抗体と反応させた。その後、ポリクローナル抗体を金ナノ粒子の周りに固定化した標識を用いて高感度化させた。測定に使用したウイルスは1 μgである。図7はその結果で、点線がウイルスのみを反応させたもの、実線が金ナノ粒子で高感度化させたものである。ウイルスの種類は(a) A/Shandong/9/1993、(b) A/Brisbane/10/2007、(c) A/Panama/2007/1999、(d) A/Wisconsin/67/2005である。すべてに関してスペクトル反射率の変化が確認され、反応性に差はあるものの、同じH3N2の抗体に対して、H3N2は結合することがわかった。なお誤差は反射率変化にして20%以内である。

次に、表面に固定化した抗体を同じ抗H3抗体とし、

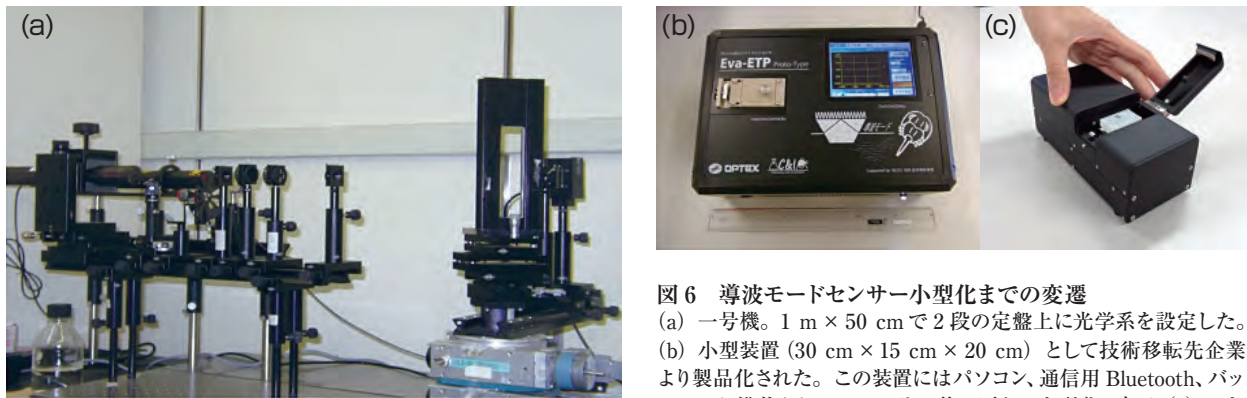


図6 導波モードセンサー小型化までの変遷
(a) 一号機。1 m × 50 cmで2段の定盤上に光学系を設定した。
(b) 小型装置(30 cm × 15 cm × 20 cm)として技術移転先企業より製品化された。この装置にはパソコン、通信用Bluetooth、バッテリーが搭載されている。その後、更なる小型化に努め(c)のとおり7 cm × 5 cm × 15 cmを達成した。^[19]

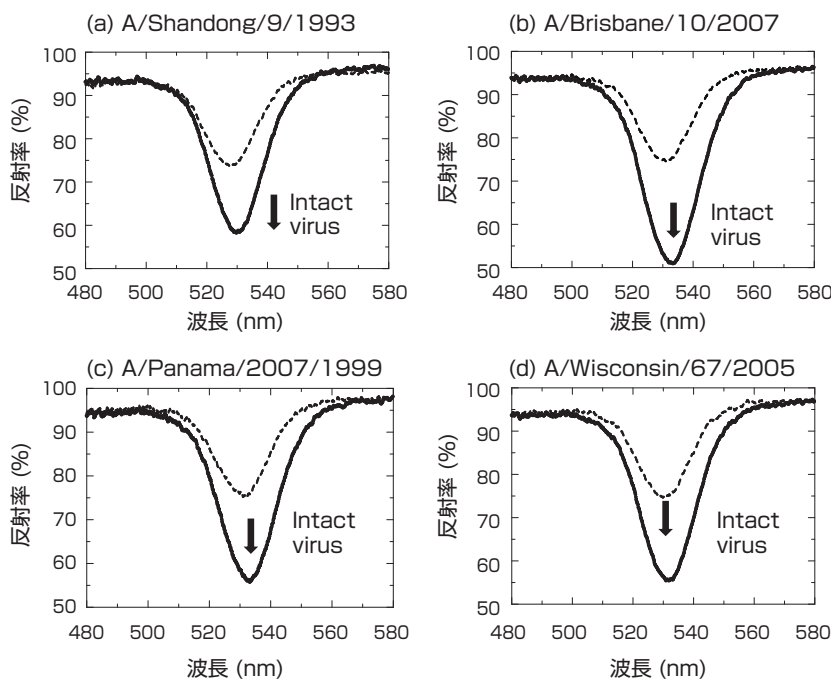


図7 H3N2抗体を固定化させた検出板を用いて各種H3N2ウイルスの検出を行った結果
(a) A/Shandong/9/1993、
(b) A/Brisbane/10/2007、
(c) A/Panama/2007/1999、
(d) A/Wisconsin/67/2005
である。

検出対象として H3N2 以外のサブタイプのウイルスを用いた。H5N1 のウイルスは国内では扱いが難しいので、すべて赤血球凝集素 (HA タンパク) を用いた。結果を図 8 に示した。点線がウイルスのみで反応させたもの、実線が金ナノ粒子で高感度化し検出したものである。測定に使用したウイルスは 1 μg である。図 8 (a)、(b)、(c)、(d) はそれぞれ A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)、A/chicken/India/NIV33487/2006 (H5N1)、A/California/07/2009 (H1N1)、A/Japan/305/1957 (H2N2) の赤血球凝集素の検出試験を行った結果である。H3N2 であれば赤血球凝集素だけでも (a) に示すとおりスペクトルの変化が見られた。しかし、他の亜種の赤血球凝集素では全くスペクトルに変化は見られなかった。このことは、固定化した抗体と異なる亜種の赤血球凝集素は結合しないことを意味する。したがって、H3N2 の抗体を固定化した検出板を用いると H3N2 のウイルスの検出はできるが、それ以外の亜種は検出できないことを意味しており、導波モードセンサーにより亜種の識別が可能であることが示された。

もう一つのインフルエンザウイルス亜型の識別方法について紹介したい^[21]。各々の反応の模式図と実験結果とを図 9、10 に示した。検出対象はヒトインフルエンザ A 型 H3N2 のウイルス粒子、および鳥インフルエンザ H5N1 の赤血球凝集素を用いた。それぞれのウイルスを識別するために、2,6 シアル酸および 2,3 シアル酸でコーティングした 2 種類の金ナノ粒子を標識として用いた。金ナノ粒子を標識とすることで増感もなされている。ヒトインフルエンザ H3N2 ウイルスの HA タンパクは金ナノ粒子表面の 2,6 シ

表 2 H3N2 Udorn 株を用いた導波モードセンサー、免疫クロマトグラフィーおよび ELISA の検出限界濃度比較

手法	H3N2 pfu/ml
導波モードセンサー	800
免疫クロマトグラフィー	8×10^4
ELISA	2×10^3

アル酸と反応しスペクトルが変化するが (図 9 (a) (c))、金ナノ粒子表面の 2,3 シアル酸とは反応しないためスペクトルは変化しない (図 9 (b) (d))。逆に、鳥インフルエンザ H5N1 の赤血球凝集素は金ナノ粒子表面の 2,6 シアル酸と反応しないためスペクトルは変化しないが (図 10 (a) (c))、金ナノ粒子表面の 2,3 シアル酸とは反応しスペクトルが変化する (図 10 (b) (d))。このようにして、ヒトインフルエンザ H3N2 ウイルスと鳥インフルエンザ H5N1 の赤血球凝集素の簡易識別が可能となった。

次にウイルスを使った検出感度試験として A 型のインフルエンザウイルス H3N2 Udorn を用いた。ここでは、感染力の指標である plaque forming unit (pfu) を用いて比較を行い、表 2 にまとめた。導波モードセンサーでの検出試験では、まず、ウイルスと金ナノ粒子標識された抗体を混ぜて 10 分放置した後、この混合液をセンサー上に滴下して 30 分後の信号を測定した。この時、導波モードセンサーの検出限界は 8×10^2 pfu/ml となるデータが得られた。免疫クロマトグラフィーでは同試料にて検出限界は 8×10^4

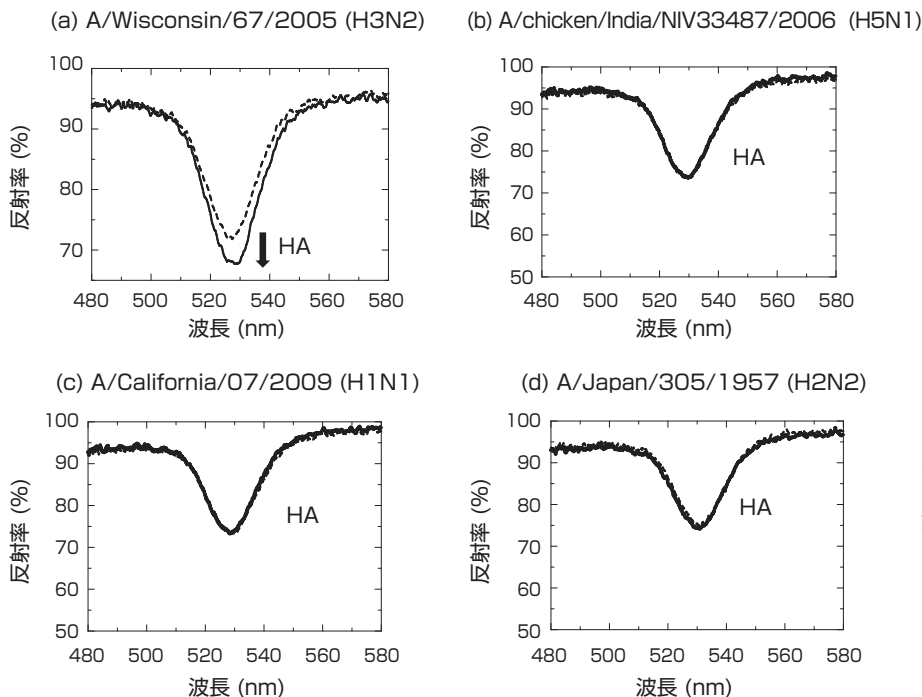


図 8 H3N2 抗体を固定化させた検出板を用いて各種亜型の赤血球凝集素の検出を行った結果 (a) A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)、(b) A/chicken/India/NIV33487/2006 (H5N1)、(c) A/California/07/2009 (H1N1)、(d) A/Japan/305/1957 (H2N2) である。

pfu/ml だった。サンドイッチ法 ELISA の H3N2 ウイルスの検出限界は 2×10^3 pfu/ml だった。以上の定量的試験の結果より、導波モードセンサーは SPR や免疫クロマトグラフィーおよび直接吸着法 ELISA との比較において、1~2桁高感度であることがわかった。サンドイッチ法 ELISA は、前処理などの煩雑さと数時間~1日におよぶ所要時間が煩わしく、また試験者の技量に依存する。したがって導波モードセンサー技術は、前処理の簡便さと所要時間の短さにおいて、圧倒的な優位性を有していると考えられる。

3.3 非特異吸着抑制表面

抗原抗体反応による検出において重要なのは、非特異吸着を防ぐことである。産総研バイオメディカル研究部門との共同開発において図 11 のような表面形成を行った^[22]。タンパク質の非特異吸着を抑制するシラン表面修飾材料としてメトキシオリゴエチレングリコール-トリエトキシシランを用いた。これは末端をメチル化したオリゴエチレングリコール基となっており、およそ完全に非特異吸着を抑制で

きる。また抗体を固定化するシラン表面修飾材料としてスクシンイミドエステル-トリエトキシシランを用いた。表面末端にスクシンイミド基を有しており、抗体固定化が可能である。この2種類のハイブリッド溶液にシリカ表面を有する検出板を浸漬させるだけで、高レベルのプロッキング特性と抗体固定特性が発現した。現在は、血清や血漿中のウイルスの検出において、非特異吸着を効率よく抑制できることを確認済である。鼻ぬぐいによる検体中のインフルエンザウイルスを特異的に検出することが期待できる。

3.4 構成学的考察

以上を構成学的に図 12 に記載した。統合技術である「簡便で高感度なインフルエンザウイルス検出装置の実現」は、ニーズでありゴールである。また一方、要素技術のうち、シリコンテクノロジーと光学、電磁気学はすでに我々は蓄積を有していた。統合技術を達成するには互いにほとんど学問的に重なり合っていない要素技術の4分野の融合が不可欠であった。そこで表面化学とウイルス学の専門家と

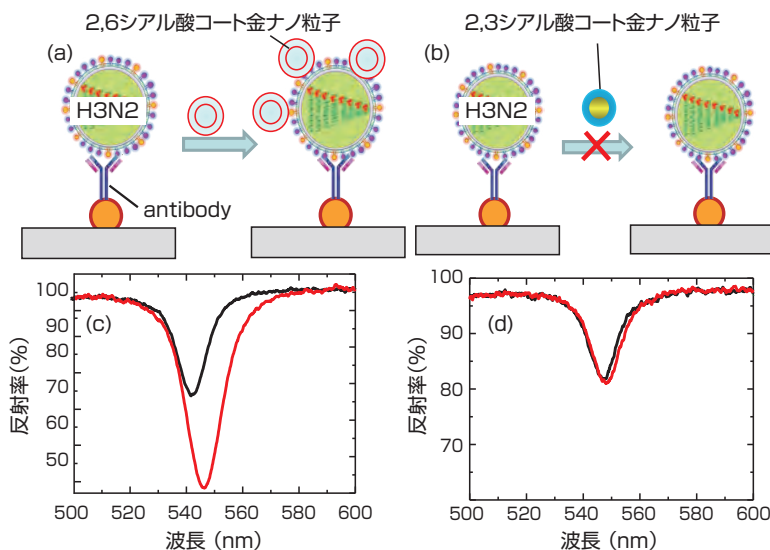


図9 抗体を用いて H3N2 ウイルスを導波モード検出板に固定化させた。その後 2,6 シアル酸と 2,3 シアル酸で直径 5 nm の金ナノ粒子をコーティングしたものを用いて標識した。金ナノ粒子により増感されている。(a) 金ナノ粒子表面の 2,6 シアル酸は H3N2 の HA タンパク質とは結合する。(b) 金ナノ粒子表面の 2,3 シアル酸は H3N2 の HA タンパク質と結合しない。実際に (a) (b) の反応を導波モードセンサーを用いて観察すると、(c) 金ナノ粒子表面の 2,6 シアル酸は H3N2 の HA タンパク質とは結合して、スペクトルが変化した。(黒線から赤線) (d) 金ナノ粒子表面の 2,3 シアル酸は H3N2 の HA タンパク質と結合しないので、スペクトルの変化も見られなかった。

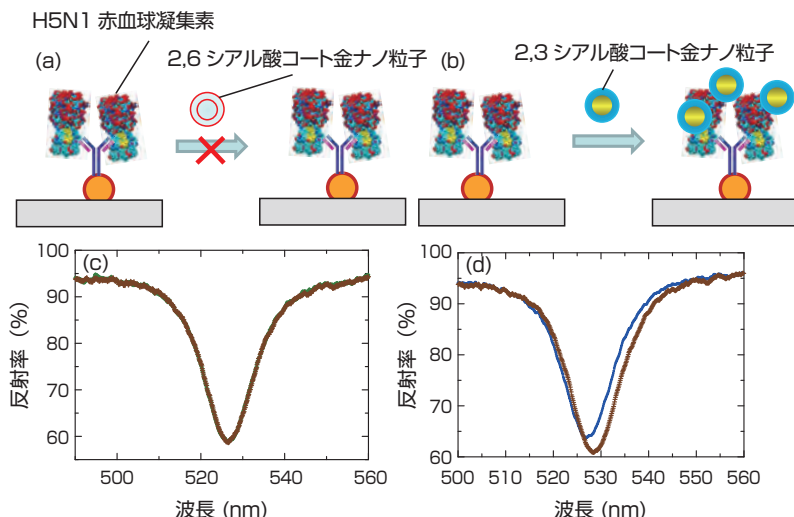


図10 抗体を用いて H5N1 赤血球凝集素を固定化させた。その後 2,6 シアル酸と 2,3 シアル酸で直径 5 nm の金ナノ粒子をコーティングしたものを用いてラベル化させた。(a) 金ナノ粒子表面の 2,6 シアル酸は H5N1 とは結合しない。(b) 金ナノ粒子表面の 2,3 シアル酸は H5N1 と結合する。実際に (a) (b) の反応を導波モードセンサーを用いて観察すると、(c) 金ナノ粒子表面の 2,6 シアル酸は H5N1 とは結合せずスペクトルも変化しない。(d) 金ナノ粒子表面の 2,3 シアル酸は H5N1 と結合し、スペクトルの変化が見られた。(青線から茶線)

共同研究を行うことで、中間統合技術の開発に成功した。ゴールに向かって、要素技術に再三立ち戻りながら中間統合技術を最適化させて、統合技術を構築させた。

4 異分野融合のプロセス

この研究は、小型センサーを設計、製作するために光学の実験と計算両方の研究者の協力が必要であった。さらにその設計を実現するために企業との協力があつた。実際にできたセンサーを使用する社会課題として、新型インフルエンザの迅速検査の提案をいただいたのは内科医師からであった。2008年にもしも新型インフルエンザが大流行した場合、当時のPCR技術では時間がかかること、イムノクロマトグラフィーでは新型かどうか判別できないことから、内科医として打つ手がないというご意見をいただいた。2009年春にメキシコで新型インフルエンザが発生、パンデミック化する1年前の話である。本センサーを用いることで新型インフルエンザの迅速、その場同定という喫緊の社会課題に対応できると考えた。表面反応を観測する上で重要なのは、非特異吸着の抑制である。多くの論文では、非

特異吸着を抑制する工夫の記述がないが、検体中のウイルスを測定する上では、重要な課題である。これに関しては、所内バイオメディカル研究部門との共同研究により解決できた。このようにこの研究は異分野の研究者の持つ情報や技術要素の連携により達成できたものである。

5 最後に

安全安心な社会を実現するためには将来的には、インフルエンザウイルスのみでなく各種ウイルスの検出が必要と考えている。ウイルス感染に国境はないので、各国できめ細かくウイルスを常時モニタリングし、水際でウイルスの拡散を防止することが重要である。また、ウイルスの感染と温度、湿度、バクテリアが関連していると言われているがまだ明確にはなっていない。すべてのデータを地理情報と一括で管理することで、IT医療、IT農業として新たなビジネスとして展開可能である。この際、センサーという商品を売るのみでなく、サービス、情報、メンテナンスとパッケージにすることにより、売り切りモデルでないビジネスが展開できる。

この論文では、インフルエンザウイルス検出に特化した内容を紹介してきた。現在、導波モードセンサーを用いた簡易血液検査装置の開発も行っており、B型、C型肝炎等感染症や血液型判定を行なえるようにすることを目指している。これができれば、被災地の避難所内で直接輸血をしたり、救急車の中で血液検査を済ませてしまうことも可能である。また、表面反応を観察するシステムであり、めっき液の劣化の常時モニターをはじめとする生産ラインの管理にも用いることができる。すでに、めっき工場を持つ複数社が関心を示している。

謝辞

この研究開発において、早稲田大学理工学術院大木義道教授研究室の学生諸氏には実験を手伝っていただいた。生化学やウイルス学に関する助言は日本大学医学部黒田和道准教授、神戸大学医学研究科感染症センター清水一史特務教授よりいただいた。

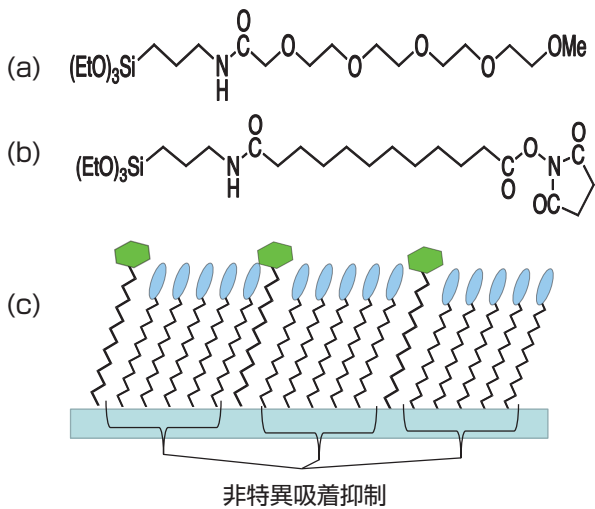


図11 非特異吸着抑制表面
トリエトキシシランに (a) メトキシオリゴエチレングリコール、(b) スクシンイミドエステルをそれぞれ結合させた。(a) は非特異吸着を抑制し、(b) のスクシンイミド基が抗体のカルボニル基と結合する。

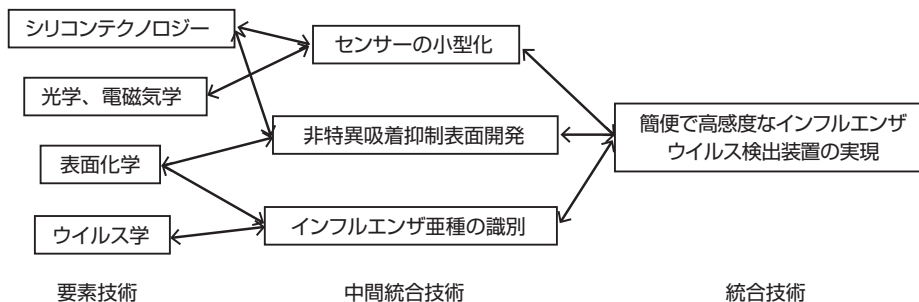


図12 構成学的記述

注1) 日本語では、風邪 (flu) とインフルエンザを混同して用いているが全く異なり、後者は届出の必要な伝染病である。感染症には全例の届出が必要なもの、一部の指定病院のみが届出が必要なものがある。季節性インフルエンザは後者である。
 注2) 強毒インフルエンザの明確な定義は難しいが、通常は、鳥インフルエンザに用いられ、条件の一つはHAのプロテアーゼ開裂部位が強毒型であることである。そういう意味で、スペイン・インフルエンザは弱毒型によるということになる。

参考文献

[1] 藤巻真, 粟津浩一: 高感度分子吸着検出センサの開発, *Synthesiology*, 2 (2), 147-158 (2009).

[2] 岡田晴恵, 田代真人: 新型インフルエンザH5N1, 岩波書店, 7, 10 (2007).

[3] Centers for Disease Control and Prevention: H1N1 Flu, http://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates_2009_h1n1.htm, 2015-01-02.

[4] 内閣府: 新型インフルエンザ全般に関する参考資料, <http://www.cas.go.jp/jp/seisaku/ful/syakai/dai2/sankou2.pdf#search=%E6%96%B0%E5%9E%8B%E3%82%A4%E3%83%B3%E3%83%95%E3%83%AB%E3%82%A8%E3%83%B3%E3%82%B6+%E6%AD%BB%E8%80%85%E4%BA%88%E6%B8%AC>, 2015-01-02.

[5] 厚生労働省: 新型インフルエンザ対策行動計画 平成21年2月17日改訂版 全体版, 7 (2009).

[6] 速水融, 立川昭二, 田代真人, 岡田晴恵, (岡田晴恵編): 強毒性新型インフルエンザの脅威, 藤原書店, 161 (2006).

[7] 厚生労働省健康局結核感染症課作成2014年6月27日現在, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou02/>, 2015-01-02.

[8] 内閣官房新型インフルエンザ等対策室: 鳥インフルエンザA (H7N9) への対応について, 2014年3月25日.

[9] 島根県庁: http://www.pref.shimane.lg.jp/industry/norin/ringyo/choujyu_taisaku/koubyougenseitoriihuruenzanoha_sseinuituie.html, 2015-01-02.

[10] ロッシュ・ライフサイエンス: PCRの一般的なガイドライン, http://roche-biochem.jp/pdf/prima/molecular_biology/pcr/PCR_manual_J/third_edition/PCR_manual_chapter2_J.pdf, 2015-01-02.

[11] A. C. Hurt, C. Baas, Y.M. Deng, S. Roberts, A. Kelso and I. G. Barr: Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 3 (4), 171-176 (2009).

[12] 山口育男, 青山知枝, 山本優, 木下恵子, 伊藤由美, 西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キットBDペリターシステムFluにおける機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討, *日本臨床微生物学雑誌*, 23 (3), 39-44 (2013).

[13] P. Baccam, C. Beauchemin, C.A. Macken, F.G. Hayden and A.S. Perelson: Kinetics of influenza A virus infection in humans, *J.Virology*, 80 (15), 7590-7599 (2006).

[14] 国立感染症研究所: 感染症情報センター, http://idsc.nih.go.jp/disease/swine_influenza/2009cdc/CDC_rapid_testing.html, 2015-01-02.

[15] 環境省: 高病原性鳥インフルエンザに備えて(対応編), http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/bird_flu/manual/pref_0809/4_chpt2.pdf, 18, 2015-01-02.

[16] K. Awazu, C. Rockstuhl, M. Fujimaki, N. Fukuda, J. Tominaga, T. Komatsubara, T. Ikeda and Y. Ohki: High sensitivity sensors made of perforated waveguides, *Opt. Express*, 15 (5), 2592-2597 (2007).

[17] M. Fujimaki, C. Rockstuhl, X. Wang, K. Awazu, J. Tominaga, Y. Koganezawa, Y. Ohki and T. Komatsubara:

Silica-based monolithic sensing plates for waveguide-mode sensors, *Opt. Express*, 16 (9), 6408-6416 (2008).

[18] X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato, K. Nomura, K. Awazu and Y. Ohki: Optimal design of a spectral readout type planar waveguide-mode sensor with a monolithic structure, *Opt. Express*, 19 (21), 20205-20213 (2011).

[19] K. Awazu, M. Fujimaki and S. C. B. Gopinath: Palmtop waveguide-mode sensor: Comparison of sensitivity and subtyping of influenza viruses with SPR, ELISA and Immunochromatography, *Sensors*, 2013 *IEEE*, ieeexplore.ieee.org (2013).

[20] S. C. B. Gopinath, K. Awazu, M. Fujimaki and K. Shimizu: Evaluation of anti-A/Udorn/307/1972 antibody specificity to influenza A/H3N2 viruses using an evanescent-field coupled waveguide-mode sensor, *PLoS ONE*, 8, e81396, 1-9 (2013).

[21] S. C. B. Gopinath, K. Awazu, M. Fujimaki and K. Shimizu: Neu5Aca2,6Gal and Neu5Aca2,3Gal receptor specificities on influenza viruses determined by a waveguide-mode sensor, *Acta Biomaterialia*, 9 (2), 5080-5087 (2013).

[22] M. Tanaka, K. Yoshioka, Y. Hirata, M. Fujimaki, M. Kuwahara and O. Niwa: Design and fabrication of biosensing interface for waveguide-mode sensor, *Langmuir*, 29 (42), 13111-13120 (2013).

執筆者略歴

粟津 浩一 (あわづ こういち)

1991年東京工業大学博士後期課程修了。博士(工学)。同年電子技術総合研究所入所、加速器応用工学の研究に従事。1996年から98年までモントリオール大学招聘研究員。2001-2002年新エネルギー・産業技術総合開発機構主任研究員、2002-2004年分子科学研究所客員教授。2003-2010年産業技術総合研究所近接場光応用工学研究センターチーム長、2005-2007年東京大学工学系研究科客員教授、2009-2012年情報通信エレクトロニクス分野研究企画室長、2012年から現在電子光技術研究部門副研究部門長、ナノフォトニクス、医療との融合領域の研究に従事している。この論文では、界面、表面の状態観察に関する検討を行った。



藤巻 真 (ふじまき まこと)

1998年早稲田大学博士後期課程修了。博士(工学)。1998-2000年日本学術振興会特別研究員として、早稲田大学、モントリオール大学にて、光通信デバイスの研究に従事。その後、科学技術特別研究員として、電子技術総合研究所にてパワーエレクトロニクス素子、光通信素子の開発に従事。その後、早稲田大学助教授を経て、2004年に産業技術総合研究所に入所。2012-13年情報通信エレクトロニクス分野研究企画室企画主幹、2013-現在電子光技術研究部門光センシング研究グループ長。近接場光を用いたバイオセンシング技術の開発に従事している。産総研技術移転ベンチャーの取締役に就任し、産総研の技術の実用化に従事。この論文では、主に光学設計を行った。



Subash C. B. GOPINATH (さばっしゅ ごびなす)

1999年インド国マドラス大学博士課程修了、同年台湾中央研究院、2003-2013年産業技術総合研究所、博士研究員およびテクニカルスタッフ、2013年-現在マレーシア国マレーシアプリンス大学ナノ電子工学研究所准教授、バイオとナノテクの融合領域の研究に従事。この論文ではウイルス検出全般を担当。



王 曉民（おう ぎょうみん）

1999年東京大学大学院工学系研究科電子工学専攻博士課程中退。通信・放送機構招聘研究員を経て、2000年に技術研究組合フェムト秒テクノロジー研究機構に参加し、超高速光伝送の研究に従事。2003-2010年産業技術総合研究所近接場光応用工学研究センターにて、新規光デバイスの開発に従事。その後、ナノエレクトロニクス研究部門に移り相変化新機能デバイスの研究に従事している。2011年博士（工学）（早稲田大学）。この論文では、電磁波の数値計算と高感度化のための光学設計を行った。



査読者との議論

議論1 全体

コメント（小林 直人：早稲田大学研究戦略センター）

この論文は、導波モードセンサーによる光反射スペクトル変化を検出することによりインフルエンザウイルスを簡便・迅速に同定することが可能な装置を研究開発した報告です。健康・医療に関する社会での喫緊の課題を解決する極めて有用な手法を生み出した経緯を詳細に述べており、イノベーション創出の一例としてのアピール度も高くシンセシオロジー誌の論文として相応しい内容です。

ただし、初稿ではすでに引用文献に示された著者らの既発表論文の総説的な表現となっているきらいがあったので、イノベーションの方法論として論文の再構成を提案しましたが、その結果目的・シナリオ・要素技術とその構成等が整理して論述され、シンセシオロジーの論文に相応しいものになったと思います。

コメント（三石 安：産業技術総合研究所）

ナノ粒子の吸着を感度良く検出する導波モードセンサーを用いたウイルス検出器の小型化に関する論文で、技術移転企業が実用機としての小型装置の開発に取り組んでいる点で、シンセシオロジー論文として適切です。ただし、論文初稿の記述では抗原抗体反応に基づく検出データの部分に記述を多く割いており、現場使用に耐えるための工夫や、小型化の工夫に関する記述が少なくこの論文で表現すべき目標をまだ十分に記述できていないと感じました。

議論2 構成学的な記述について

コメント（小林 直人）

シンセシオロジー誌では、研究の目標、それを実現するためのシナリオ、研究目標を達成するための要素（技術）の選択と統合、結果の評価を記述することになっています。これらの関係がよく分かる図を示すとともに、この研究での要素技術、中間統合技術、統合技術（目標）の関係を記述してはいかがでしょうか。また、今回の簡便・迅速なインフルエンザウイルス検出の研究開発方法に関する総合的な評価と今後の展望を記して下さい。

回答（栗津 浩一）

新たに図12として構成学的な図を記載しました。ここで統合技術

である「簡便で高感度なインフルエンザウイルス検出装置の実現」は、ニーズでありゴールです。また一方、要素技術のうち、シリコンテクノロジーと光学、電磁気学はすでに我々は蓄積を有していたものです。統合技術を達成するには互いにほとんど学問的に重なりを持っていない要素技術の4分野の融合が不可欠でした。そこで表面化学とウイルス学の専門家と共同研究を行うことで、中間統合技術の開発に成功しました。また、ゴールに向かって、要素技術に再三立ち戻りながら中間統合技術を最適化させて、統合技術を構築しました。このような内容を新たに「3.4 構成学的考察」として記述しました。また本雑誌の趣旨に添うように、総合的な評価と今後の展望に関して「4 異分野融合へのプロセス」という項目を起こしました。

議論3 性能の優位性について

コメント（三石 安）

抗原抗体反応の特異性が非常に高いことは周知ですので、今回の論文では、角度掃引型の検出器を感度を犠牲にせずに波長掃引型にするためのセンサー設計の工夫や、現場での使用を考えた小型装置への実装の工夫の部分十分に記述していただく目標が達成されると思います。またインフルエンザウイルスの重型を、既存の抗原抗体反応を用いた検出手法より、精度、感度ともによく、加えて迅速に検出できるという優位性が明確に伝わるように、記述を整理してください。

回答（栗津 浩一）

角度掃引から波長掃引に変えるということのイメージが読者に伝わりにくいことから、新たに計算を行った結果の図2を加えました。この図より、それぞれの掃引方法により現れる導波モードが3次元的に理解いただけると思います。また、本手法の既存の手法に対する優位性については表2を作成し、また感度、測定時間の記載を行いました。

議論4 本研究成果の反響について

質問（小林 直人）

この研究成果は、長時間の前処理や測定の必要性、低感度性等が課題であった従来の方法に比べて、簡便性・迅速性の観点から画期的な方法を開発したと考えられます。すでに関係者にもこの研究成果は披露されていると思いますが、反響はいかがでしょうか。もし評価するコメント等があればご紹介ください。

回答（栗津 浩一）

実際にできたセンサーを使用する社会課題として、新型インフルエンザの迅速検査の提案をいただいたのは内科医師からでした。2008年にもしも新型インフルエンザが大流行した場合、当時のPCR技術では時間がかかること、イムノクロマトグラフィーでは新型かどうか判別できないことから、内科医として打つ手がないというご意見をいただきました。本センサーを用いることで新型インフルエンザの迅速、その場同定という喫緊の社会課題に対応できると考えています。この点は、「4 異分野融合へのプロセス」という項目の中で紹介しました。