

文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム 令和3年度秀でた利用成果

金ナノ構造を用いた新型コロナウイルスの超高感度高速検出

Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Science Yong Yang, Zhengren Huang
名古屋工業大学 種村 眞幸



(左から) Prof. Yong Yang, Prof. Zhengren Huan, 種村 眞幸



1. はじめに

新型コロナウイルスの感染拡大は深刻で、感染拡大の防止には、感染の有無を迅速かつ高感度で検出する検査手法の確立が急務である。現在、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応；polymerase chain reaction）検査という検査手法が広く知られ活用されている。これは、核酸の特定領域を数百万～数十億倍に増幅させる手法であるが、検査に長時間を要する点が難点である。例えば、リアルタイムPCR検査法では、遺伝子の核酸断片を増幅の度に発光させ、蛍光強度が一定の値を超えると陽性と判定されるが、これには通常1～2時間以上を要する。本研究ではこの核酸情報を信号として利用するのではなく、ウイルスの有するタンパク質情報を利用してウイルスを迅速かつ高感度で検出しようという試みである。

用いた手法は、機器分析法としてよく知られているラマン分光法である。ラマン分光法では、物質に単色光を照射し、散乱されるラマン散乱光を検出し構成分子の分子振動の情報を得る。この時、原子スケールから数百nmの粗度の金、銀などの表面では吸着分子のラマン散乱強度が劇的に増強される。これを利用したラマン分光法は、表面増強ラマン分光法（Surface-enhanced Raman Scattering, SERS）と呼ばれ、DNAあるいはタンパク質の検出にも利用されている[1][2][3]。本研究ではこのSERSを基本原理として用いている。



2. 金ナノ構造体群の室温形成と表面修飾

名古屋工業大学のナノテクノロジープラットフォーム事業「スマートマテリアル創成支援」では、「ナノカーボンの環境に優しい合成と評価支援」の一環として、炭素材料をはじめとする種々のナノ材料の低温形成を支援の柱の一つとしている。

固体表面への低エネルギー（＜数keV）の希ガスイオン（典型的にはAr⁺イオン）照射は、固体表面構成原子をはぎ取るための手法として広く利用されている。イオン照射によって、固体表面では表面形態変化、結晶構造変化、組成変化などの種々の変化が「室温でも」生じる。精密表面分析では、原子層を一層ずつはぎとるごとく極力平坦に固体表面を削り取ることが要求されるため、イオン照射に伴う表面形態変化は厄介者以外の何物でもない。他方、材料創成の観点からは、室温でもナノサイズの構造や材料が形成できる点は非常に魅力的である。本支援では、このイオン照射を積極的に利用し、ナノ材料を室温合成することを基本戦略としている[4][5][6][7][8]。

本研究では、Si基板上に成膜されたAu薄膜に室温でAr⁺イオン照射を行うことで金ナノ構造体群の作製を行った。使用した中規模カーボンナノファイバー室温合成装置の外観を図1に示す。装置の名称の通り、炭素材料にイオン照射を行うことで、その先端にカーボンナノファイバーを頂く円錐状突起群を室温、無触媒で形成可能で

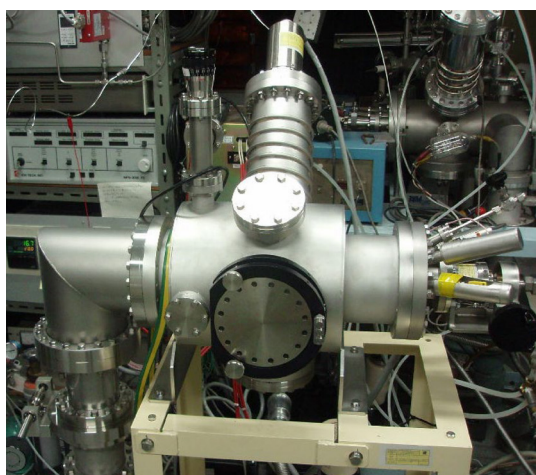


図1 中規模カーボンナノファイバー室温合成装置の外観

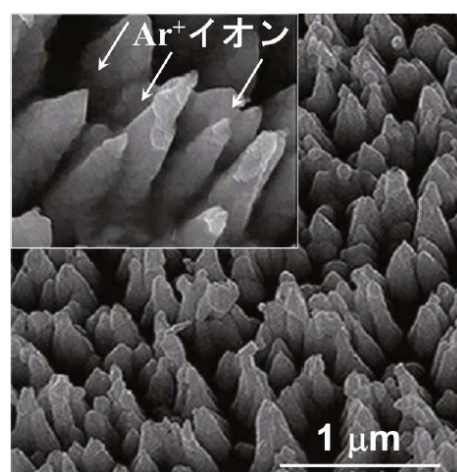


図2 Au 円錐状ナノ突起群のSEM像（挿入図：高倍率像）[9]

ある。カーボンナノチューブをはじめとするナノカーボンの合成には化学気相合成（CVD）法がよく知られているが、本装置ではCVDは行わず、対象材料へのイオンビームの室温照射という異なる原理の合成装置である。イオン照射によって、イオンの入射方向に円錐状突起群と、炭素材ならその先端にイオンの入射方向に細線状のカーボンナノファイバーが形成される[4][5][6][7][8]。装置の構成はいたってシンプルで、イオンビーム径約5cmのイオン源および水冷試料台より成る。イオンの入射角度は試料面の法線方向に対し45度である。

図2に、室温形成された円錐状の金ナノ突起群の走査電子顕微鏡（SEM）像を示す[9]。イオンビームのエネルギーは1keVである。対象が炭素ではないので先端にはカーボンナノファイバーの形成は生じないが、イオンの入射方向に先鋭な先端のAuの円錐状突起群が高密度に形成されている。この先鋭な先端故に、先端では電場が増強されその結果吸着分子の情報が増強されたSERSスペクトルを得ることが可能である。形成された突起の底面の平均直径、平均長さ、数密度はそれぞれ $\sim 300\text{nm}$ 、 $\sim 700\text{nm}$ 、 $\sim 9\mu\text{m}^{-2}$ である。高倍率SEM像（図2挿入図）を注意深く観察すると、イオン照射前のAu薄膜構造を反映して、円錐状突起は粒径約40nmの粒状構造の集合体であることが分かる。SERSでは、上述の先鋭な先端での信号増強効果の他に、粒子間のギャップ領域でも、Hot-spot効果と呼ばれるラマン信号の増強が生じる。本研究でも、Auナノ突起群がこの粒状構造体の集合であることもSERSの信号強度の更なる増強に寄与している。

本研究を成功へと導いた工夫はこのナノ構造体の形成だけには留まらない。新型コロナウイルスの人への感染（人の細胞への侵入）では、ウイルスは人の細胞表面に存在する受容体タンパク質、ヒトACE2受容体（Angiotensin-converting enzyme 2）と結合した後、ウイルス外膜と細胞膜の融合を生じ、人の細胞へ侵入を開始することが知られている。従って、治療薬開発の創薬研究では、この融合を抑制するような研究方向となるが、

本研究では、新型コロナウイルスがACE2と親和性が高い特性を逆に活用している。この活用のために、Auナノ構造体群形成後アミド修飾を行い、更にACE2含有溶液（ACE2-His PBS solution）に30分程度浸漬することでAuナノ構造体群表面へのヒトACE2受容体修飾を行った。これにより、新型コロナウイルスはAuナノ構造体群の森に効率的にトラップされることとなる。また、このヒトACE2との親和性はウイルス種に固有であることから、新型コロナウイルスの選択検出の効果も発現する。これらの、突起先端でのラマン信号増強効果、Hot-spot効果、ナノ突起群の森へのトラップ効果を模式的に図3に示す。これらの工夫により高感度のSERS分析を可能にしている。

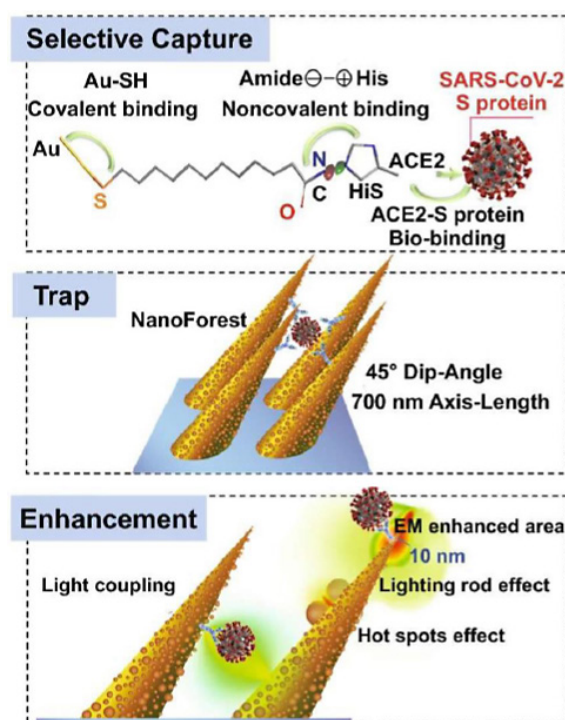


図3 高感度SERS分析を可能とする工夫[9]



3. SERS による新型コロナウイルスの検出 [9]

本研究では、共焦点顕微ラマン分光装置（Confocal Raman spectrometer；inVia, Renishaw, UK）を用いた。励起光の波長，レーザビーム径は，それぞれ 785nm，約 2 μ m である。

図 4 に新型コロナウイルスのモデル構造と各部位に対応するラマンスペクトルを示す。新型コロナウイルスは，最外層にスパイクタンパク質（SARS-CoV-2S protein），その内側の層にはヌcleoカプシドタンパク質（SARS-CoV-2 nucleocapsid protein）などの特徴的なタンパク質を有する構造である。図 4 のラマンスペクトルには，比較のためにヒト ACE2 受容体，および，SARS（重症急性呼吸器症候群；2002 年に中国広東省で発生し流行）コロナウイルスのスパイクタンパク質（SARS-CoV S protein）も併せて示してある。スペクトルを比較すると，それぞれに特

微的なピークが表れていることが分かる。ちなみに本研究では，上述のような ACE2 受容体とウイルスとの選択的な親和性も確認している。SARS-CoV S に比べて新型コロナウイルスの SARS-CoV-2S は親和性が高く，SARS ウイルスよりも感染が速いことが確認された。

図 5 に ACE2 を介して金のナノ突起先端に新型コロナウイルスがトラップされている模式図を示す。ACE2 によって先端から約 10nm の辺りにウイルスがトラップされている。ウイルスのサイズは約 100nm である。金突起外周部の赤色領域は，局所電界強度分布の計算結果で，Au 突起先端で電界が増強されている様子を示している。図 6 に Au 突起上の ACE2 受容体にトラップされたウイルスのラマンスペクトルを示す。ここでは，新型コロナウイルスを非感染処理して使用している。ウイルスサイズは約 100nm と大きく，ラマン分析ではウイルス全体の情報を捉えているわけではない。取得できる情報は，主にウイルス外周のスパイクタンパク質の情報である。ACE2 受容体によって，電界強度の増強領域に上手くこのスパ

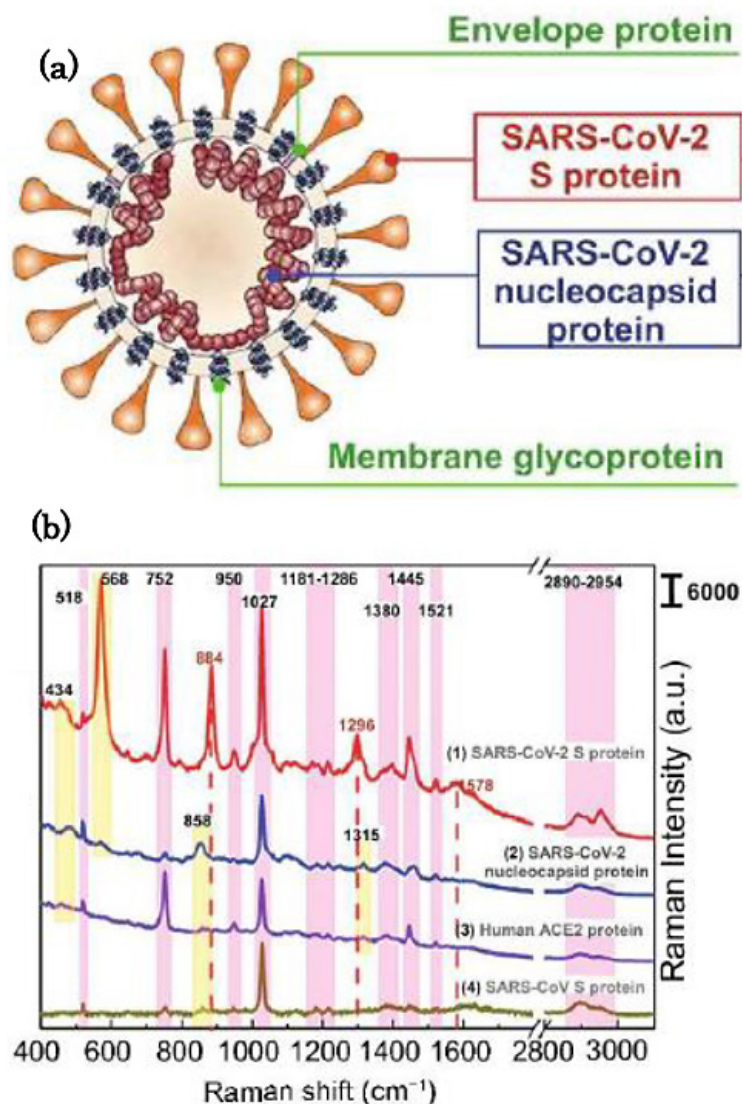


図 4 新型コロナウイルスの構造モデルと各部位のラマンスペクトル [9]

イクタンパク質が位置することとなる。図6には、併せて、ACE2 受容体を介して検出されるリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline : PBS) 中のスパイクタンパク質 (V_S)、ヌクレオカプシドタンパク質 (V_N)、健康な人の尿に混合されたそれらのタンパク質 (2,200 copies/mL 相当量) のラマンスペクトルも示してある。スペクトル測定に要する時間は1～2秒である。スペクトルの比較から、ウイルス検出法としては、 V_S を検出すればよいことが確認される。



4. ウイルス検出量の定量評価と検出限界 [9]

新型コロナウイルスは感染力が強いので、安全にかつ定量的に実験を行うために、新型コロナウイルス自身ではなく、表面に新型コロナウイルスのスパイクタンパク質を有する模擬ウイルスを作製し定量評価を行った。図7にその模擬ウイルスの模式図を示す。同様に、ヌクレオカプシドタンパク質を有する模擬ウイルスも合成し実験を行った。

感染の有無を定量的に評価するために多変量解析の一種である主成分分析 (principal component analysis ; PCA) および Discrimination Analysis (DA) と呼ばれる手法を用いた。図8 (a) ～ (d) に典型的な分析結果を示す。例えば、図8 (a) では、感染を模擬した陽性の尿 (V_S -positive および V_N -positive) および非感染の尿での比較である。それぞれのデータ点群は重なりを有さず、明確に区別可能であることが分かる。感染の有無の検出は、必ずしも理想的なモデル環境下だけで必要とされるものではない。複雑に他のタンパク質が混在する環境下でも正確な陽性判定が求められる。これを検証するため、健康な人の尿に代えて、慢性腎炎患者の尿サンプルでも同様の測定を行っている。結果を図8 (b) に示す。タンパク質環境が複雑でも、確実にウイルス検出が可能であることが分かる。図8 (c) はウイルス量 2200 copies/mL での検出例である。この程度の量があれば、各々僅か1秒程度で成人の尿 100 検体すべてでウイルスの検出が可能である。

検出限界を見極めるために、更にウイルス量を 80 copies/mL まで減少させた実験結果を図8(d), (e)に示す。これは尿 1 検体について、DA 分析及び $40 \times 30 \mu\text{m}^2$ 領域でのマッピングを行った結果である。このウイルス量は、通常のリアルタイム PCR の検出下限に匹敵する。このウイルス量でも本研究の DA 分析で点群のばらつきは出てくるものの、それでも明確な区別が可能である。マッピングでは各点の分析領域は約 $2 \mu\text{m}\phi$ であるので、300 点のマッピングである。+印の箇所 (40 箇所) でウイルスが検出されている。マッピング分析の分析所要時間は5分程度である。リアルタイム PCR に比べて格段に迅速な

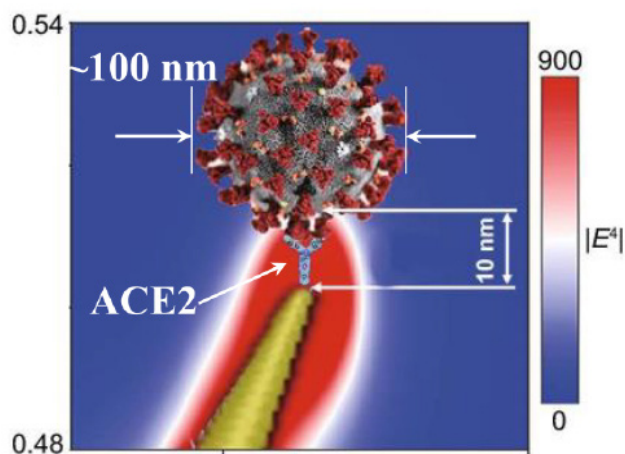


図5 Au ナノ構造体先端の電界強度分布

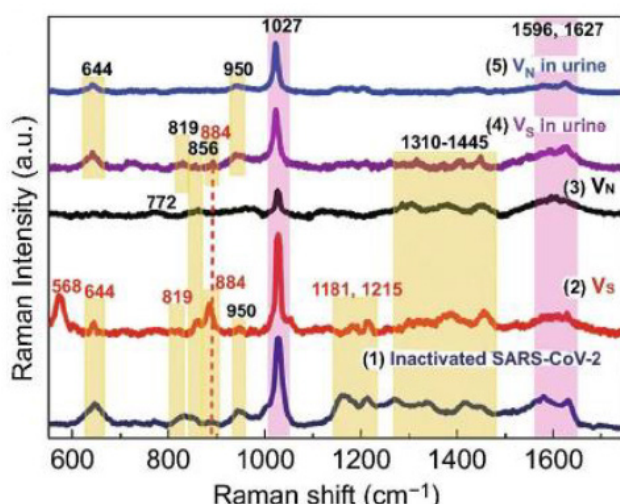


図6 健康な人の尿に混合された V_S 、 V_N (2,200 copies/mL 相当量)、PBS 液中の V_S 、 V_N 、および非感染処理を施した新型コロナウイルスのラマンスペクトル [9]

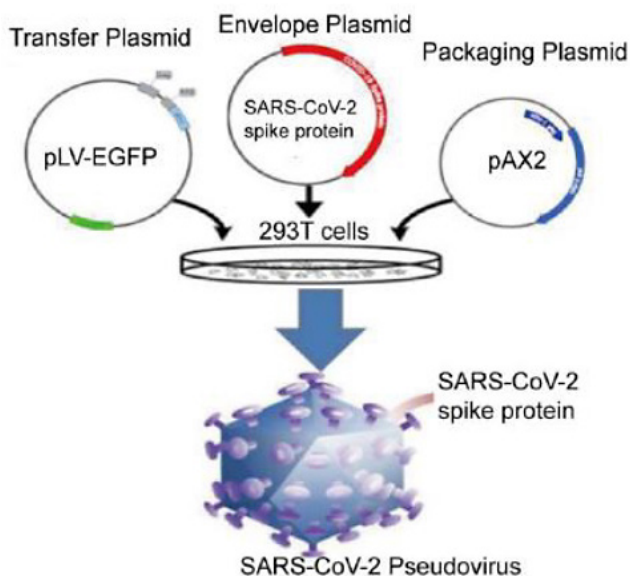


図7 表面に新型コロナウイルスのスパイクタンパク質を有する模擬ウイルスの模式図 [9]

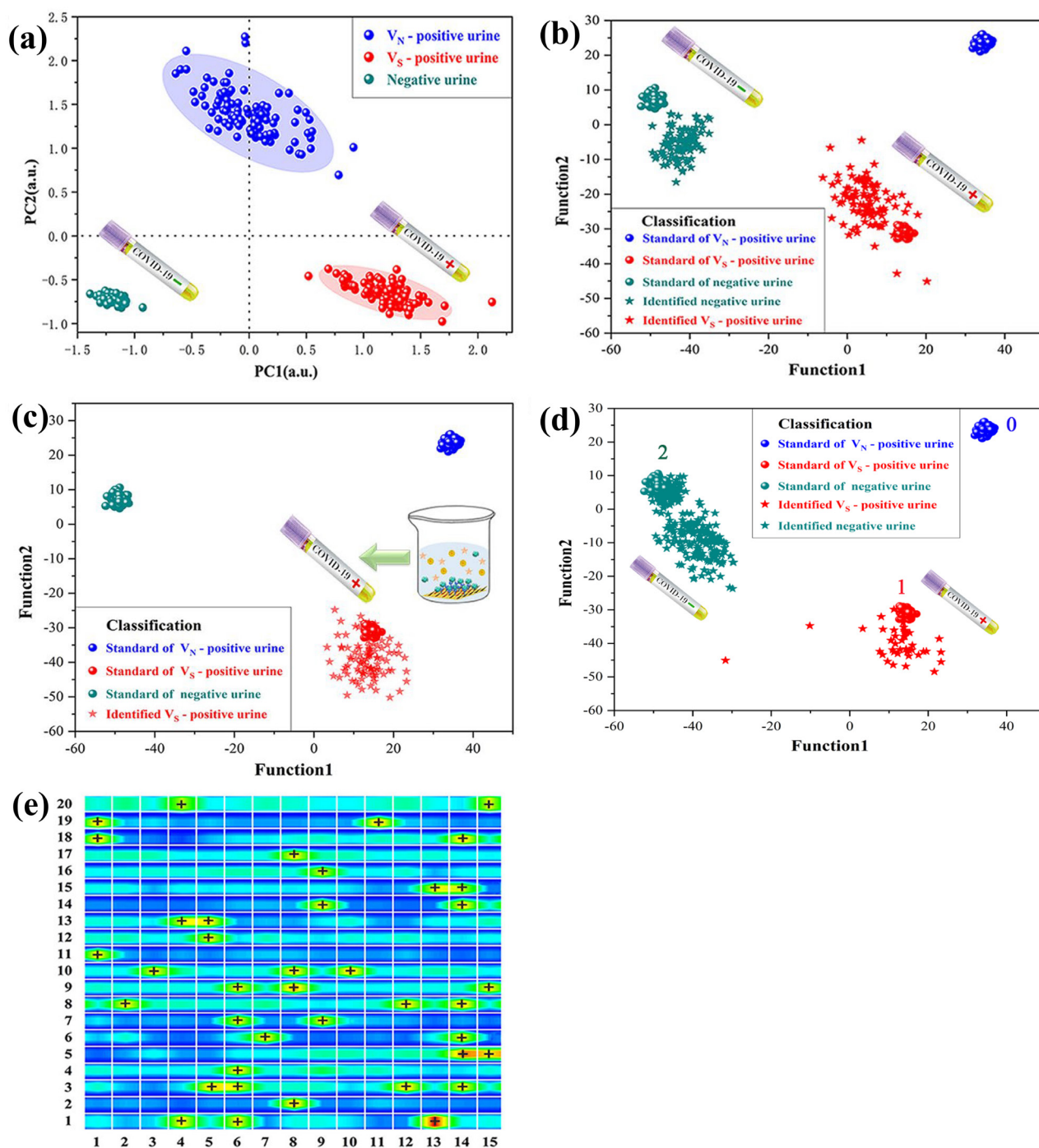


図8 (a) ~ (d) 典型的な PCA, DA 分析結果

(a) 健康な人の尿サンプルでの比較, (b) 慢性腎炎患者の尿サンプルでの比較, (c) ウイルス量 2200 copies/mL でのウイルス検出能力, (d) ウイルス量 80 copies/mL でのウイルス検出能力, (e) 80 copies/mL 検体の SERS マッピング 300 点 (40 × 30 μm^2) の分析結果 [9]

分析が実現できている。80 copies/mL であるので、新型コロナウイルスの場合、ウイルス数は 80 個 /mL である。40 箇所でのウイルス検出の意味をもう少し検討しよう。ウイルスのサイズは約 100nm である。これと分析領域の体積を考えると、ウイルスが単一で均等に液中に分散しているとすると、300 点の分析点のうち、ウイルスの存在する割合は約 20% の約 60 点である。従って 40 箇所はその約 7 割で単一ウイルスを検出していることになる。現在は更に高感度分析を目指して研究を進めている。



5. まとめ

金ナノ突起群を用いた表面増強ラマン分光法を新型コロナウイルスの分析に適用することにより、リアルタイム PCR の検出下限に匹敵する 80 copies/mL の分析が 5 分程度で可能であった。本研究は、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業（名古屋工業大学スマートマテリアル創成支援）の支援の下、行われたものである。ラマ

分光法を専門とする利用者と室温でのナノ突起構造体の形成を得意とする支援機関との協働により生まれた成果である。新型コロナウイルスの一刻も早い収束を祈りつつ、引き続き、更なる高感度化に取り組むとともに、幅広い分野での実用化を目指した研究展開を模索している。



参考文献

- [1] S. Nie, and S.R. Emory, Science 275 (1997) 1102.
- [2] K. S. Novoselov, C. Zong, M.X. Xu, L.J. Xu, T. Wei, X. Ma et al., Chem. Rev. 118 (2018) 4946.
- [3] Y. Yang, Z.Y. Li, K. Yamaguchi, M. Tanemura, Z.R. Huang et al., Nanoscale 4 (2012) 2663.
- [4] S. Subash, K. Golap, 種村 眞幸, 金属 88 (2018) 95.
- [5] 種村眞幸, S. Sharma, 北澤正志, 「イオン誘起導電性カーボンナノファイバーの特性と応用 (第3章 第10節)」, 書名「導電性材料の設計, 導電性制御および最新応用展開」技術情報協会, 2021年 (ISBN 978-4-86104-867-8)
- [6] M. Tanemura and S. P. Lau: "Flexible Field Emitters: Carbon Nanofibers (Chapter 15.)" in "Carbon Nanotube and Related Field Emitters: Fundamentals and Applications" Edited by Y. Saitoh, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Weinheim) (2010).
- [7] M. Z. Yusop, P. Ghosh, Y. Yaakob, M. Tanemura et al., ACS Nano, 6 (2012) 9567.
- [8] S. Sharma, M. S. Rosmi, Y. Yaakob, M. Z. Yusop, M. Tanemura et al, Carbon 132 (2018) 165.
- [9] Y. Yang, Y. Peng, C. Lin, L. Long, J. Hu, J. He, H. Zeng, Z. Huang, Z-Y. Li, M. Tanemura et al, Nano-Micro Lett. 13 (2021) 109.

(名古屋工業大学 種村 眞幸)



【お問い合わせ】

分子・物質合成プラットフォーム

名古屋工業大学

☎ 052-735-5298

E-mail hihara@nitech.ac.jp

ホームページ

<http://nano.web.nitech.ac.jp/>