

## 学位論文の要旨

氏名	張 旭
学位論文題目	糖鎖を固定化した金ナノ粒子を用いたウイルスの高感度検出に関する研究

本論文は、ウイルスが細胞に感染する第一ステップであるウイルス表面の蛋白質と細胞表面の糖鎖との特異的結合を利用し、その糖鎖を固定化した金ナノ粒子を用いたウイルスの高感度検出に関する研究をまとめたものである。

本論文は7章により構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第1章では、序章として本研究の背景・目的・意義について記載した。細胞表層の糖鎖は生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有する。一方、これら糖鎖はウイルスにはレセプターとして使用され、その感染を仲介する。シアル酸含有糖鎖を介して感染するインフルエンザウイルスはその代表例である。動植物に感染するウイルスを同定する事は、感染症の早期診断、また治療や予防指針を決定するために必須である。しかし、生体内（体液中）、食品、飲料水、河川水などに存在するウイルスは極微量であり、現在の技術では検出できない場合がある。ウイルスが細胞に感染する際に、低親和性レセプターとして細胞表層の糖鎖が使用されることから、隅田らはこの現象を逆手にとり、糖鎖を固定化したナノ粒子を用いてウイルスを捕捉・濃縮することに成功していた。本研究では、この技術を種々のウイルスに対して適応し、定量的リアルタイムPCRと組み合わせて、超微量のウイルスの検出を行い、ウイルスの高感度検査診断法として確立することを目的とした。本研究によって、発症前診断を可能にすることのメリットや、社会的意義についても記載した。

第2章では、本研究の核技術である「ショガーチップ」と「糖鎖固定化金ナノ粒子」の調製について記載した。すでに隅田らは糖鎖を金などの金属に効率よく固定化する方法を発明し、糖鎖を固定化したバイオデバイス「ショガーチップ」と「糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP)」を開発していた。ショガーチップは表面プラズモン共鳴を利用した測定に使用することによって、また SGNPは目視による観測によって、糖鎖が結合する蛋白質や細胞などの対象物との相互作用を無標識で迅速・簡便に測定できるという特徴をもっている。私は、まず各々のウイルスが結合する糖鎖の決定のためにショガーチップを調製した。すなわち、中性糖やシアル酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸 (HS) 合成二糖を含む47種類の糖鎖を固定化したアレイ型ショガーチップ、およびコンドロイチン硫酸 (CS) の合成二糖ライブラリー全16種類の糖鎖を固定化したアレイ型ショガーチップを調製した。一方、ショガーチップによって、多くのウイルスが結合するヘパリンを用いて、2種類の方法で糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) を調製した。

第3章では、ウイルス高感度検査技術の開発について記載した。人ヘルペスウイルス HHVs (human herpes viruses) を用いて技術の確立を目指した。糖鎖を固定した金ナノ粒子 (SGNP) を用いてウイルスを捕捉・濃縮後、定量 PCR(qPCR) を行うことによって、従来の方法に比べて高感度でウイルスを検出できる技術を確認した。

第4章では、インフルエンザウイルスの高感度検査を例として示す。即ち、第2章で作成した種々の糖鎖を固定化したアレイタイプのシュガーチップを用いて、インフルエンザウイルスがヘパリンと結合することを明らかにした。次いで、シュガーチップ実験の結果からヘパリンを固定化したSGNPを作成し、これとインフルエンザウイルスを混合したのち、遠心分離してSGNPとウイルスの複合体を沈殿させた。沈殿を加熱してウイルス粒子からRNAを放出させ、逆転写反応を行った後リアルタイムPCRにかけた。SGNPを加えない場合に比べて6サイクル以上早くDNAが検出され、SGNPによってインフルエンザウイルスが濃縮された事が明らかとなった。また、被験者に苦痛を与えることなく検体を採取するために、被験者の唾を用いて検査を行った。その結果、インフルエンザに罹患しているが自覚症状のない不顕性感染者または潜伏期患者の唾からもインフルエンザウイルスを検出することができた。この技術では、現在一般的に使用されているインフルエンザ検査キットの50万倍以上の感度があるため、感染のごく初期でもウイルスが同定された。

第5章では、鯉ヘルペスウイルス(KHV)の高感度検査を例として示す。KHVは鯉にのみ感染し、その致死率は約90%であり、鯉の大量死を招く。さらに、観賞用の錦鯉は高価であるため、被害は深刻で、世界中で問題になっている。病気の発症には、水温が大きく影響し、KHVの増殖適温外では、鯉がKHVに感染しても発症せずキャリアになる場合がある。このキャリアー鯉(感染耐過魚)が感染源になる。しかし、キャリアー鯉が放出するウイルス量は極微量で、従来方法(PCR)では検出が困難であった。KHVの糖鎖結合性を探索するために、47種の糖鎖を固定したアレイ型シュガーチップを用いて、精製KHVの結合をSPRイメージング法で調べた。その結果、KHVの糖鎖結合パターンはヒトヘルペスウイルスに類似し、特にヘパリンに強い結合性を示した。そこで、ヘパリンを固定化したSGNPとKHVを混合した後、遠心分離、加熱後qPCRに供した。SGNPを加えない場合に比べて6サイクル以上早くKHVのcDNAが検出された。さらに、KHVで死亡した鯉のえら組織からも高感度でKHVを検出することに成功した。

第6章では、本研究の技術を各種ウイルスの高感度検査への応用について記載した。第3章で確立した技術を、HTLV-1(ATL/HAM viruses), BVDV(Bovine viral diarrhea viruses), JEV(Japanese encephalitis viruses), HIV(AIDS viruses), HBV(Hepatitis B viruses), HCV(Hepatitis C viruses), Noroviruses, CV(Coxsackie viruses), EV(Enteroviruses)に応用した。

第7章では、本研究を総括し、今後の展望について記載した。ウイルスと細胞表面の糖鎖との特異的結合を利用し、ウイルス種の判別やタイプ分けを迅速かつ簡便に行う検査技術を確認することという本研究の目的が達成できた。人のみならず、動物に感染する一般のPCRで検出できない極低濃度のウイルスも高感度で検査することを可能にした。今後の展望として、ウイルス性疾患の超早期検査・診断法の自動化の開発の進行状況について記載した。第4章で確立した各種のウイルスの高感度検査技術をより便利で利用しやすいするために、機械による自動化の試みについても記載した。これらによって、血液・体液中あるいは特定の臓器細胞に存在する超微量のウイルスをより迅速に検出することが期待できる。今後より多くのウイルス種の高感度検査に活用され、ウイルス性感染症の早期診断、また治療や予防指針に繋がるに違いない。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第367号	氏名	張 旭
審査委員	主 査	隅田 泰生	
	副 査	門川 淳一	橋本 雅仁
学位論文題目	糖鎖を固定化した金ナノ粒子を用いたウイルスの高感度検査に関する研究 (Study on Development of High Sensitive Detection of Viruses Using Sugar-chain Immobilized Gold Nano-Particles.)		
審査要旨	<p>提出された学位論文等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、ウイルスが細胞に感染する第一ステップであるウイルス表面の蛋白質と細胞表面の糖鎖との特異的結合を利用し、その糖鎖を固定化した金ナノ粒子を用いたウイルスの高感度検出に関する研究をまとめたものである。</p> <p>第1章では序章として本研究の背景・目的・意義について記載した。隅田らは糖鎖を固定化したナノ粒子を用いてウイルスを捕捉・濃縮することに成功していた。本研究では、この技術を種々のウイルスに対して適用し、定量的リアルタイム PCR と組み合わせて、超微量のウイルスの検出を行い、ウイルスの高感度検査診断法として確立することを目的とした。</p> <p>第2章では本研究の核技術である「シュガーチップ」と「糖鎖固定化金ナノ粒子」の調製について記載した。私は、まず各々のウイルスが結合する糖鎖の決定のためにシュガーチップ、次は多くのウイルスが結合するヘパリンを用いて、糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) を調製した。</p> <p>第3章ではウイルス高感度検査技術の開発について記載した。人ヘルペスウイルス HHVs (human herpes viruses) を用いて技術を確立させ、現在臨床研究進行中である。</p> <p>第4章では鯉ヘルペスウイルス (KHV) の高感度検査を例として示した。47種の糖鎖を固定したアレイ型シュガーチップを用いて、精製 KHV の結合を SPR イメージング法で調べた。その結果、KHV はヘパリンに強い結合性を示した。そこで、ヘパリンを固定化した SGNP と KHV を混合した後、遠心分離、加熱後 qPCR に供した。鯉のえらから高感度で KHV を検出することに成功した。</p> <p>第5章ではインフルエンザウイルスの高感度検査を例として示した。被験者に苦痛を与えることなく検体を採取するために、被験者の唾を用いて検査を行った。その結果、インフルエンザに罹患しているが自覚症状のない不顕性感染者または潜伏期患者の唾からもインフルエンザウイルスを検出することができた。この技術では、現在一般的に使用されているインフルエンザ検査キットの50万倍以上の感度があるため、感染のごく初期でもウイルスが同定された。現在臨床研究進行中である。</p> <p>第6章では、本研究を総括し、今後の展望について記載した。本研究の技術を、HTLV-1 (ATL/HAM viruses)、BVDV (Bovine viral diarrhea viruses)、JEV (Japanese encephalitis viruses)、HIV (AIDS viruses)、HBV (Hepatitis B viruses)、HCV (Hepatitis C viruses)、Noroviruses、CV (Coxsackie viruses)、EV (Enteroviruses) に応用した。ウイルスと細胞表面の糖鎖との特異的結合を利用し、ウイルス種の判別やタイプ分けを迅速かつ簡便に行う検査技術を確認することという本研究の目的が達成できた。今後の展望として、高感度検査技術を機械による自動化や、血液・体液中あるいは特定の臓器細胞に存在する超微量のウイルスをより迅速に検出することが期待できる。今後より多くのウイルス種の高感度検査に活用され、ウイルス性感染症の早期診断、また治療や予防指針に繋がるに違いない。</p> <p>以上本論文は、糖鎖を固定化した金ナノ粒子とリアルタイムPCRと組み合わせて、従来困難だった超微量のウイルスの検出法を検証したもので、ウイルス検査技術に大きく寄与した。その内容、期待度共に博士論文として十分に通用するものであり、よって審査委員会は博士 (工学) の学位論文として合格と判定する。</p>		

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第367号	氏名	張 旭
審査委員	主 査	隅田 泰生	
	副 査	門川 淳一	橋本 雅仁

平成 24 年 2 月 15 日 16:00 から行われた学位論文発表会において、審査委員を含む約 40 名の前で学位論文の内容が説明され、その後、以下に示すような質疑応答が行われた。いずれについても満足すべき回答を得ることが出来た。

[質問 1] 今回の発表に取り上げられたウイルスはすべてヘパリンに結合性を示した。なぜなのか？

[回答] ウイルスの表面を構成しているタンパク質はプラスの電荷を持ち、これはヘパリンのマイナス電荷を持つ硫酸基と静電的相互作用により結合性が示された。

[質問 2] 糖鎖構造を認識しているようなウイルスはなかったのか？

[回答] この研究を通じて多くのウイルスはヘパリンと結合するがわかった。一方、BVDVのようなヘパリン以外にも結合性を示したウイルスも存在する。ウイルスの糖鎖構造認識は今後の課題として残る。

[質問 3] 実検体になると、ヘパリンによって非特異的に混雑物も濃縮してしまうと、検査への影響は？

[回答] 本研究では、ヘパリン固定化したGNPはあくまでも捕捉・濃縮するためだけの存在で、最終的にリアルタイム PCR によって DNA や RAN を特定するので、検査への影響はない。さらに、多くの種類のウイルスに対して、Heparin-GNP が共通的に使用できることは、検査試薬としての有利性がよい。

[質問 4] コイヘルペスウイルスのキャリアー鯉は病気が治癒したのか？ウイルスはどこへ？

[回答] ウイルスは鯉の脳内に潜んでいるという報告があるが、不明なところが多い、キャリアー鯉は殆ど発病しないが、他の鯉に病気を蔓延してしまう。

[質問 5] 本研究の高感度検査法でも158日経てば、キャリアー鯉からウイルスを検出できなくなったが、人同様、ストレスを与えたりして、ウイルスを検出できるようにすることはできないか？

[回答] 鯉にストレスを与えたことがあるが、低水温・振動によって、ウイルスを検出できるようになる個体もいれば、そうでない個体もいる。再現性取れていないので、はっきりとしたことは分からない。

[質問 6] インフルエンザウイルスに感染して、何日目での高感度検査で分かるのか？

[回答] 一般的にインフルエンザに感染すると、潜伏期間は7日で、検査方法が検出できるウイルスの量から考えると、従来の検査方法は少なくとも発症しないと検出できないが、本研究の高感度検査では、ウイルスと接触してから、3日前後のウイルス量でも検出できる。つまり、発症する前に検出できる。

[質問 7] 発症しなくても他人への感染はできるのか？

[回答] 発症しなくてもウイルスが存在しているので、咳やくしゃみで周りへ伝播してしまう。

[質問 8] 感染を防げるには、さらに感度をどこまで上げる必要があるのか？

[回答] 本研究の高感度検査ではすでに発症する前に検査できるレベルで、この時点で早期に隔離や治療を始めれば、十分感染を食い止めることができる。

[質問 9] 実際治療方針決定において、高感度検査で治療すべきかどうかの判定基準はどこにあるのか？

[回答] 個人差がある。ヘルペスウイルスの場合、健康な人なら、高感度で検出できたとしても自然に回復するが、慢性疾患のある患者なら重症化する恐れがあるからすぐ治療する必要がある。インフルエンザの場合、院内感染や流行を阻止しないといけないので、高感度検査で陽性になった時点で隔離される。

[質問 10] この高感度検査法の実用性は？

[回答] 現在長距離輸送にも耐えられる SGNP の作成に成功し、検査試薬として十分実用性がある。

以上から審査委員会は、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(工学)の学位を与えるに足りる資格を有するものと判定した。