

## 学位論文の要旨

氏名

Budi Saksono

学位論文題目

デング熱ウイルスの高感度検出法の開発に関する研究

本論文は、デング熱ウイルス（以下DENV）の糖鎖結合活性、ナノテクノロジー、遺伝子診断法を融合させた高感度、簡便、正確なDENVの検査法の確立を目的としてなされた研究をまとめたものであり、以下の5章によって構成されている。

第1章は、序論として本研究の意義を述べた。デング熱病はDENVによる感染症であり、蚊を介して人から人へ感染する病気である。世界で最も感染率が高く、患者の数は年間1億人以上、うち死亡率は5%以上である。未だにワクチンや特効薬は開発されておらず、デング熱病患者の数を抑えるためには、蚊が生息しない環境を整備すること、そして早期でのDENVの検査法が必須とされている。DENVの検査としては、ウイルスのRNA、NS1等のウイルス由来タンパク質、ヒト血清中のIgGとIgMの変動の検査が知られている。しかし、少量の検体からの簡便、かつ正確な検査法は存在しない。DENVのエンベロープタンパク質は糖鎖と相互作用することが知られていた。私は、その現象を利用し、ナノテクノロジーと遺伝子診断法を組み合わせ、高感度、簡便、かつ正確なDENVの検査法を開発した。

第2章は、糖鎖固定化ナノ粒子の作成について述べた。まず、DENV（DENV-1、-2、-4の三つのサブタイプ）のエンベロープ蛋白質との糖鎖相互作用を、48種の糖鎖を固定化したアレイ型シュガーチップを用いて、SPRイメージング法で解析した。高い結合活性を示した糖鎖のうち、ヘパリンと低分子の硫酸化デキストランを用いて、3種の糖鎖固定化ナノ粒子(SGNP)を作成して、DENVの濃縮実験を行い、適切な糖鎖固定化ナノ粒子を検討し、最適のSGNPを決定した。

第3章は、SGNPによるDENVの濃縮に基づいた *in vitro* 実験について述べた。DENV由来の標的DNA断片を含むプラスミドを作成し、またPCRのプライマーを、論文を参考に設計した。また、血清の存在下でSGNPによる濃縮が可能であり、DENVの検出限界が10 copies/ $\mu$ Lと高感度であった。

第4章は、臨床検体を用いた実証実験について述べた。インドネシアにおいて、87例の患者検体を用い、常法である市販のRNA抽出キットを用いた方法と上述のように開発した方法(SGNP法)との比較検討を行った。SGNP法はRNA抽出法に比べて、1/20以下の検体量を用いたにもかかわらず、両者の間には統計的に差がないことが明らかとなり、煩雑な操作が必要なRNA抽出法よりもSGNP法は優れていることが示された。さらに、本方法はDENVのサブタイプを正確に同時に測定可能であり、さらに検出限界も10 copies/ $\mu$ Lと高感度であり、さらにNS1やRNA抽出法で検出できないサンプルからもDENVを検出できた。

第5章は、本研究の総括を述べた。本研究によって、DENVの糖鎖結合活性、ナノテクノロジー、遺伝子診断法を融合させた高感度、簡便、正確なDENVの検査法開発を確立した。患者サンプルを用いた実証実験では、検出限界10 copies/ $\mu$ Lで高感度な検査診断法であり、さらにDENVのサブタイプを正確に同時に測定可能であった。

## Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Study on the Development of Highly Sensitive Detection Method for Dengue Virus

Name: Budi Saksono

Dengue infectious disease, occurred by dengue virus (DENV), is spreading among world through the beating by mosquito as a vector. According to the WHO report, more than 100 million peoples have a risk to be infected annually, and the number of patients tends to increase year by year. So far, the vaccine and effective drug specific for DENV are not available. Therefore, the epidemiological management and early stage of accurate detection of DENV are strongly required to reduce the cases.

Many detection methods for dengue viruses, such as PCR based method, NS1 based method, or serological method, have been developed and commercialized. However, the conventional, rapid, accurate and highly sensitive diagnostic method for DENV has not been yet reported. In this study, using glyco-nanobiotechnology combined with gene amplification method, I have developed a novel diagnostic method for DENV. The method was verified by the clinical research done in Indonesia using 87 sera of patients. From the results of the clinical research, in which only 10 copies/ $\mu\text{L}$  of DENV in sera and their serotypes were able to be diagnosed, it was proved that the highly sensitive and convenient dengue detection method was developed.

The thesis is composed of 5 chapters as follows:

1. Chapter I described the introduction and background of this study.
2. Chapter II described how to prepare the sugar chain immobilized gold nanoparticles (SGNPs).
3. Chapter III described the evaluation of SGNP on their ability to capture and concentrate DENV *in vitro*.
4. Chapter IV described the clinical research done in Indonesia using the above SGNP and assay method for 87 sera of patients, and the comparison between our methods and commercially available RNA extraction method.
5. Chapter V summarized this study and future prospects.