

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第410号		氏名	Budi Saksono
審査委員	主査	隅田 泰生		
	副査	門川 淳一	橋本 雅仁	

平成27年2月12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30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、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] シュガーチップの結果より、ヘパリンはデングウイルス粒子との高い結合性を示したので高分子であるからデングウイルス粒子との結合性がよいか？ [回答1] SPRイメージング結果より、ヘパリンだけでなく、他の糖鎖であるコンドロイチン硫酸タイプE、DS25、また硫酸化した低分子糖鎖もデング粒子に高い結合性を持つため、高分子であればよいものではなく、硫酸基の数とその位置に依存するのではないかと考えられる。

[質問2] Hep-cGNP、DS25-cGNPそしてDS25-GNPは異なる方法で調製したのか？そして、出来たものは単に大きさが違うだけなのか？糖鎖の量はどのようにあわせるか？ [回答2] 3種のSGNPの作成方法は殆ど同じで、異なるのは使用した還元剤である。Hep-cGNP、そしてDS25-cGNPを作成する際は、クエン酸を還元剤として使用した。一方、DS25-GNPはNaBH<sub>4</sub>を還元剤として使用した。調製したナノ粒子の大きさは異なるがそれは使用した糖鎖の長さ、と調製条件によるものと考えられる。利用した糖鎖リガンド複合体の濃度は一定の濃度で加えているが、ナノ粒子を作る段階で攪拌速度を変えることで出来たナノ粒子の粒径が変わった事をしばしば経験した。

[質問3] デング血清型の結果からGold Protocol法との比較で7検体から2検体はデング血清型の識別の結果異なるが血清型の識別できると言う結論はどうですか [回答3] Gold Protocol法によるデング血清型の識別は、別の実験者が過去において行った結果であるため、保存状態などは不明である。患者の血清には、一つなデング血清型だけでなく、多少他の血清型が混合することは多々あるので、保存中でどのようにかわったか全く見当つかない。我々の結果を見て、先方の研究者は、識別法を切り替えたため、これ以上の結果はない。将来フィリピンなど他国において、より系統的な研究を計画している。

[質問4] Gold Protocol法とは何ですか？ [回答4] Gold Protocol法はLanciottiが開発したデングウイルス血清型の識別法であり、5セットのプライマーを利用して2ステップのPCR法 (nested PCR) のことである。

[質問5] SGNPにより、血中の様々なウイルスも濃縮される可能性があるが、デング熱ウイルスであることはどのように判断したか？ [回答5] 特異性はPCR法で使用されたプライマーのデング特異性に依存する。Bioinformatic上で他のFlavivirusのゲノムとホモロジ検索を行い、それを鋳型にしてデング特異性のプライマーとホモロジ検索した所、現在、使用したプライマーは特異的にデングウイルスを検出することが分かった。

[質問6] ウイルスの量と感染性の関係は？ [回答6] デング熱ウイルスに感染しても、人によって異なる病状が見られたので、世界健康機関は2009年にデングの識別法を変更した。どのレベルで感染するかしないかは検討しにくいではないかと考えられる。その人の免疫力などによるものと考えられる。

[質問7] 本検査法は10コピー/μLの感度性を持つがそれ以上に感度性を上げる必要はあるか？ [回答7] デング検出に関してはそれ以上の感度性を上げる必要はないと考えました。なぜかという死亡率は非常に少ないためである。エボラウイルスに対する検出法であればそれ以上に感度性を上げる必要はある。死亡率は高いからである。

[質問8] Pseudo PositiveとPseudo Negativeか？ [回答8] それに関する実験はやっていない。

[質問9] なぜIgMはSGNPを障害するか？ [回答9] まず、16個の陽性サンプルの中から3個はIgMが存在することでSGNP法による検出は陰性だったので、30%の確率その現象は偶然とは考えられない。恐らくIgMのエピトープはSGNPの結合部位に近いのでIgMが先に結合することでデングウイルスへのSGNPの結合は障害されると考えられる。IgGは恐らくエピトープの位置はSGNPの結合部位とはかなり離れるため、障害性がないと考えられる。その現象はデングウイル