

2009 12026 A

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた
ウイルス性疾患の超早期検査・診断法の開発

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 隅田 泰生

平成22年(2010年)4月

目 次

ページ

I. 総括研究報告書

シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルス性疾患の超早期検査・
診断法の開発

隅田泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科） …………… 1

II. 分担研究報告書

糖鎖合成、シュガーチップおよび糖鎖固定化金ナノ粒子の調製&ウイルス濃縮機能
を組み込んだ超高速PCR装置の開発

隅田 泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科）

児玉 崇（株式会社トラスト・株式会社ニート） …………… 13

ヘルペスウイルス感染症への応用

奥野 寿臣（兵庫医科大学） …………… 23

シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成

石田 秀治（岐阜大学応用生物科学部） …………… 25

HTLV-1 の糖鎖結合性の解析

有馬 直道（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科） …………… 29

ウシウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）の糖鎖結合能に関する研究

馬場 昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科） …………… 35

SGNP 技術を用いた HIV-1 感染症の病態に関する研究

岡本 実佳（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科） …………… 42

表面プラズモン共鳴センシングの高感度化に関する研究

梶川 浩太郎（東京工業大学大学院総合理工学研究科） …………… 48

ウイルス感染症（HBV、HCV）への応用

坪内 博仁（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科） …………… 54

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・印刷

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業 [MSOffice1]）
平成21年度 総括研究報告書

シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた
ウイルス性疾患の超早期検査・診断法の開発

主任研究者 隅田泰生 鹿児島大学大学院理工学研究科 教授

研究要旨

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。一方で、細胞表面の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。申請者らは糖鎖を固定化したバイオデバイス「シュガーチップ」および「糖鎖固定化金ナノ粒子（SGNP と略）」（下図参照）を開発した。シュ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ち、すでにインフルエンザウイルスの識別に応用し、それを達成した。本研究では、これらデバイスをさらに改良・統合して、PCR で検出できない極低濃度のウイルスを超早期に検出・診断可能な先端医療技術の開発を行う。本年度は9名の分担研究者の協力のもと、以下の成果をあげた。

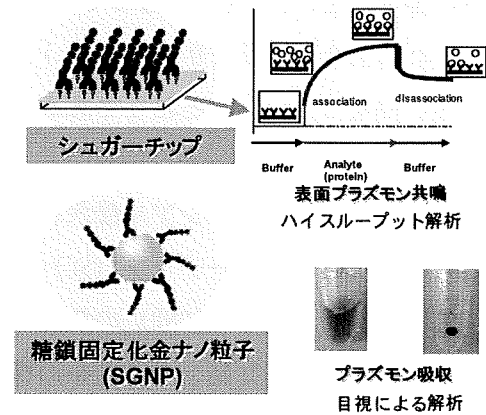


図1 技術のまとめ

研究班員（括弧内は、分担研究テーマ）

主任研究者：

隅田泰生

鹿児島大学大学院理工学研究科・教授

（糖鎖合成、シュガーチップおよび糖鎖固定化金ナノ粒子の調製）

分担研究者：

奥野 寿臣

兵庫医科大学・准教授

（ウイルス感染症 (HSV-1、HSV-2) への応用）

石田 秀治

岐阜大学応用生物科学部・教授

（シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成）

有馬 直道

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
（ウイルス感染症 (HTLV-1) への応用）

馬場 昌範

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
（ウイルス感染症 (HBV、HCV) への応用）

岡本 実佳

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師
（ウイルス感染症 (HIV) への応用）

梶川 浩太郎

東京工業大学大学院・教授

（局在表面プラズモン共鳴法に基づくファイバー型チップの基本設計）

坪内 博仁

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
(ウイルス感染症 (HBV、HCV) への応用)

児玉 崇 (株) トラスト

(株) トラスト 代表取締役

(ウイルス濃縮機能を組込んだ超高速PCR装置の開発)

牟田 健一

(株) モリテックス システム機器部・部長

(ファイバー型局在表面プラズモン共鳴測定装置の製造、ただし、班員になっていただいたが、会社の都合で活動できなかった。)

本年度の成果は、以下のとおりである。

(1) 糖鎖 (硫酸化糖鎖やシアル酸含有糖鎖など) の合成とシュガーチップ (SC) 及び糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) の調製

ウイルスが特異的に結合する糖鎖の探索のための SC、ならびにそれを用いた SGNP を調製するために、各種糖鎖を合成した。初年度は、多くのウイルスが結合するヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸の部分二糖構造をそれぞれ多種合成し、またシアル酸関連では、最も高度にシアロ化されたガングリオシド GQ1b の実践的合成法を確立した。さらにシアル酸をモチーフとした阻害剤の設計と合成に成功した。

(2) 多チャンネルファイバー型局在表面プラズモン共鳴測定装置 (LSPR) の感度向上

梶川および隅田らが開発した光ファイバー型 LSPR と SGNP を組み合わせることによって、その感度を 2~3 桁高めるための技術、方法の開発をおこなった。今年度は、SGNP の大きさと感度向上の関係の理論計算を主

として行った。

(3) ウイルスの超高感度検出と選択的除去法ならびに治療薬開発のためのスクリーニング技術の開発

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結合を利用し、ウイルス種や株の判別を超高感度で迅速かつ容易に行う検査技術を確立するための実験を行った。本年度は、すでに結合糖鎖を確かめているヘルペスウイルスの超高感度検出系をストレス度と密接に関係があるとされているHSV-6に拡張した。

HCVに関しては、HCVの類縁ウイルスであるBVDV (牛下痢ウイルス) を用いて結合糖鎖を決定、その糖鎖を固定化したSGNPを用いた超高感度分析を行った。

HIVについては、加熱し感染性を無くしたHIVについての検討を終え、2年度に感染性のあるHIVを対象として検討するための与試験的検討を終えた。

HTLV-1については感染細胞上清を用いて、結合糖鎖の同定を行い、結合糖鎖を発見し、2年度に超高感度検出系を完成させるための検討を終えた。

HCV、HBVについては初年度にインターフェロンまたは抗ウイルス薬を基本とした治療を行った患者検体を集積し、2年度にBVDVやHSVの結果を直ちに応用できる体制を構築した。

ウイルス濃縮技術を自動化するために、初年度にウイルス自動濃縮機 (ロボット) を試作し、インフルエンザウイルスを対象として試行を始めた。

研究発表

論文・総説・著書等

- ◆ K. Tawaratsumida, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, Y. Fujimoto, K. Fukase, Y. Suda, M. Hashimoto, Characterization of N-terminal Structure of TLR2-activating Lipoprotein in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, 284(14), 9147-52 (2009)
- ◆ S. Muraoka, Y. Ito, M. Kamimura, M. Baba, N. Arima, Y. Suda, S. Hashiguchi, M. Torikai, T. Nakashima, K. Sugimura, Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DR β -specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library, *J. Biochem.*, 145(6), 799-810 (2009)
- ◆ M. Sato, Y. Ito, N. Arima, M. Baba, M. Sobel, M. Wakao, Y. Suda, High sensitivity analysis of naturally occurring sugar chains, using a novel fluorescent linker molecule. *J. Biochem.*, 146, 33-41 (2009)
- ◆ Y. Fujimoto, M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, K. Fukase, Lipopeptides from *Staphylococcus aureus* as Tlr2 Ligands: Prediction with mRNA Expression, Chemical Synthesis, and Immunostimulatory Activities, *ChemBioChem*, 10(14), 2311-2315 (2009)
- ◆ Y. Fujimoto, M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, K. Fukase, Lipopeptides from *Staphylococcus aureus* as Tlr2 Ligands: Prediction with mRNA Expression, Chemical Synthesis, and Immunostimulatory Activities, *ChemBioChem*, 10, 2273-2303 (2009)
- ◆ N. Sasaki, T. Hirano, T. Ichimiya, M. Wakao, K. Hirano, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, Y. Suda, S. Nishihara, The 39-Phosphoadenosine 59-Phosphosulfate Transporters, PAPST1 and 2, Contribute to the Maintenance and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, *ProOne*, 4(12), ppe8262 (2009)
- ◆ A. Saito, M. Wakao, H. Deguchi, A. Mawatari, M. Sobel, Y. Suda, Towards the assembly of heparin and heparin sulfate oligosaccharide libraries: efficient synthesis of uronic acid and disaccharide building blocks, *TETRAHEDRON*, 66, 3951-3962 (2010)
- ◆ Otani, N., Baba, K., Okuno, T. Interferon- γ release assay: A simple method for detection of varicella zoster virus-specific cell-mediated immunity. *J. Immunol. Methods*, 351, 71-74, 2009
- ◆ Abdu-Allah, Hajjaj Hassan Mohamed, Watanabe, K., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Potent small molecule mouse CD22-inhibitors: Exploring the interaction of the residue at C-2 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 5573-5575, 2009.

- ◆ Sadagopan, M., Vats, S., Moriya, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Human sialidase inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation of 4-acetamido-5-acylamido-2-fluoro benzoic acids. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 4595-4603, 2009.
- ◆ Abdu-Allah, Hajjaj Hassan Mohamed, Watanabe, K., Hayashizaki, K., Iwayama, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions. *Tetrahedron Lett.*, 50, 4488-4491, 2009.
- ◆ Tanaka, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Ishihara, H. and Koketsu, M.: Synthetic study on $\alpha(2-8)$ -linked oligosialic acid employing 1,5-lactamization as a key step. *Tetrahedron Lett.*, 50, 4478-4481, 2009.
- ◆ Iwayama, Y., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: A first total synthesis of ganglioside HLG-2. *Chem. Euro. J.*, 15, 4637-4648, 2009.
- ◆ Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Ganglioside GQ1b: Efficient total synthesis and the expansion to synthetic derivatives to elucidate its biological roles. *J. Org. Chem.*, 74, 3009-3023, 2009.
- ◆ Sato, T., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Di-tert-butylsilylene-directed α -selective synthesis of p-nitrophenyl T-antigen analogues. *Glycoconjugate J.*, 26, 83-98, 2009.
- ◆ S. Suzuki, S. Nagel, B. Schneider, S. Chen, M. Kaufmann, K. Uozumi, N. Arima, H.G. Drexler, A.R. MacLeo. A second NOTCH1 chromosome rearrangement: t(9;14)(q34.3;q11.2) in T-cell neoplasia. *Leukemia* 23, 1003-1006, 2009
- ◆ S. Owatari, M. Otsuka, T. Takeshita, K. Mizukami, S. Suzuki, K. Uozumi, Y. Tashiro, N. Arima, S. Hanada. Uncommon cases of immature-type CD56+ natural killer (NK)-cell neoplasms, characterized by expression of myeloid antigen of blastic NK-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 89, 188-194, 2009
- ◆ T. Kozako, M. Yoshimitsu, H. Fujiwara, I. Masamoto, S. Horai, Y. White, M. Akimoto, S. Suzuki, K. Uozumi, C. Tei, Arima N. PD-1/PDL-1 expression in HTLV-1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia*, 23, 375-382, 2009
- ◆ T. Kozako, K. Fukuda, S. Hirata, Y. White, M. Harao, Y. Nishimura, Y. Kino, S. Soeda, H. Shimeno, F. Lemonnier, S. Sonoda, N. Arima. Efficient induction of human T-cell leukemia virus -1-specific CTL by chimeric particle without adjuvant as a prophylactic for adult T-cell leukemia. *Mol. Immunol.*, 47, 606-613, 2009
- ◆ Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Miyachi H, Hashimoto Y, Aoyama H. Structural development studies of anti-hepatitis C virus

- agents with a phenanthridinone skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* 18 (7), 2402-2411 (2010)
- ◆ Salim MTA, Okamoto M, Hosoda S, Aoyama H, Hashimoto Y, Baba M. Anti-bovine viral diarrhea virus activity of novel diphenylmethane derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.* 20, 193-200 (2010)
 - ◆ Okamoto M, Sakai M, Goto Y, Salim MTA, Baba C, Goto K, Watashi K, Shimotohno K, Baba M. Anti-bovine viral diarrhea virus and hepatitis C virus activity of the cyclooxygenase inhibitor SC-560. *Antiviral Chem. Chemother.* 20, 47-54 (2009)
 - ◆ Sato M, Ito Y, Arima N, Baba M., Sobel M, Wakao M, Suda Y. High sensitivity analysis of naturally occurring sugar chains, using a novel fluorescent linker molecule. *J. Biochem.*, 146, 22-41 (2009).
 - ◆ Hosoda S, Aoyama H, Goto Y, Salim MTA, Okamoto M, Hashimoto M, Baba M., Hashimoto Y. Discovery of diphenylmethane analogs as anti-bovine diarrhea viral agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 3157-3161 (2009).
 - ◆ Aoyama H, Sako K, Sato S, Nakamura M, Miyachi H, Goto Y, Okamoto M, Baba M., Hashimoto Y. Polymethylated γ -carbolines with potent anti-bovine viral diarrhea virus (BVDV) activity. *Heterocycles*, 77, 779-785 (2009).
 - ◆ Shi M, Wang X, Okamoto M., Takao S, Baba M. Inhibition of porcine endogenous retrovirus (PERV) replication by HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Res.*, 83, 201-204 (2009).
 - ◆ A. Syahir, H. Mihara and K. Kajikawa. "A New Optical Label-Free Biosensing Platform Based on a Metal-Insulator-Metal Structure", *Langmuir*, 26 (8), 6053-6057 (2010)
 - ◆ Y. Uchiho, M. Shimojo, K. Furuya and K. Kajikawa. "Optical Response of Gold Nanoparticle-Amplified Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", *J. Phys. Chem.*, 114 (11), 4816-4824 (2010).
 - ◆ Y. Uchiho and K. Kajikawa. "Evaluation of gap distance between gold nanospheres and a gold substrate by absorption spectroscopy", *Chem. Phys. Lett.*, 478, 211-214 (2009).
 - ◆ G. Gupta, Y. Nakayama, K. Furuya, K. Mitsui, M. Shimojo and K. Kajikawa. "Cross-sectional Transmission Electron Microscopy and Optical Characterization of Gold nanislands", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, 080207 (2009) (2pages).
 - ◆ R. Uzawa, D. Tanaka, H. Okawa, K. Hashimoto and K. Kajikawa. "Optical rectification in self-assembled monolayers probed at surface plasmon resonance condition", *Appl. Phys. Lett.*, 95, 021107 (2009) (3pages).
 - ◆ S. Fukuba, R. Naraoka, K. Tsuboi and K. Kajikawa. "A new imaging method for gold-surface adsorbates based on anomalous reflection", *Opt. Commun.*,

- 282, 16, 3386-3391 (2009).
- ◆ A. Syahir, K. Tomizaki, K. Kajikawa and H. Mihara, "Poly (amidoamine)-Dendrimer-Modified Gold Surfaces for Anomalous Reflection of Gold To Detect Biomolecular Interactions", *Langmuir*, 25 (6), 3667-3674 (2009).
 - ◆ K. Kajikawa, S. Abe, Y. Sotokawa and K. Tsuboi, "Linear and Nonlinear Optical Properties of Gold Nanospheres Under Localized Surface Plasmon Resonance Condition", *Nanofabrication - Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized Films -, Application 6*, 333-352 (2009).
 - ◆ G. Gupta, D. Tanaka, Y. Ito, D. Shibata, M. Shimojo, K. Fukuya, K. Mitsui and K. Kajikawa, "Absorption spectroscopy of gold nanoisland films: optical and structural characterization", *Nanotechnology*, 20, 025703 (2009) (9pages).
 - ◆ 梶川浩太郎 「メタマテリアルのセンシングへの応用」, *光技術コンタクト*, 47 (10), 15-19 (2009).
 - ◆ Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.*, 45, 459-467, 2010
 - ◆ Takami Y, Uto H, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol. Res.*, 40, 438-445, 2010
 - ◆ Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of alanine aminotransferase levels and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*, 45, 326-34, 2010.
 - ◆ Takeshita M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Uto H, Tsubouchi H, Kataoka H. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J. Biol. Chem.*, 284: 21165-76, 2009.
 - ◆ Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology*, 50, 393-9, 2009.
- 学会発表 (シンポジウム等)
- ◆ 隅田泰生, 「糖鎖固定化金ナノ粒子：ウイルスの超高感度検出のための新規ツール」、国際バイオフィォラム、平成21(2009)年7月1日～3日、発表日

- 2009/7/1(口頭) 東京都
- ◆ 張旭, 青山和枝, 加瀬哲男, 隅田泰生
糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた「インフルエンザウイルスの高感度検出」、第 23 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、平成 21 (2009) 年 7 月 3 日～5 日(口頭)、東京都
 - ◆ 若尾雅広、小幡瑠美、酒見千穂、杜若祐平、近藤宇男、満下宣子、隅田泰生
「コンドロイチン硫酸部分二糖構造ライブラリーの構築とシュガーチップへの応用」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21 (2009) 年 9 月 9 日～11 日、発表日 2009/9/9 (口頭)、岐阜県高山市
 - ◆ 山口憂三、佐藤昌紀、岩切健二、若尾雅広、隅田泰生、「蛍光性リンカーを用いた微量糖鎖のチップ化と局在プラズモン共鳴法による相互作用解析」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21 (2009) 年 9 月 9 日～11 日、発表日 2009/9/10 (口頭)、岐阜県高山市
 - ◆ 田中小代里、若尾雅広、隅田泰生、「Fe₃O₄をコア成分とした糖鎖固定化磁性金ナノ粒子の開発」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21 (2009) 年 9 月 9 日～11 日、発表日 2009/9/11 (ポスター)、岐阜県高山市
 - ◆ 張旭、青山和枝、若尾雅広、隅田泰生
「当鎖固定化金葉の粒子を用いたインフルエンザウイルスの高感度検出」、第 29 回日本糖質学会年会、平成 21 (2009) 年 9 月 9 日～11 日、発表日 2009/9/11 (ポスター)、岐阜県高山市
 - ◆ 隅田泰生、小野敬子、山口裕三、「分離・精製技術分子相互作用」、Bio Japan2009 (world Bussiness Forum)、平成 21 (2009) 年 10 月 7 日～9 日、発表日 2009/10/7 (ポスター)、横浜市
 - ◆ 隅田泰生、新しいバイオデバイス: 「シュガーチップ」と「糖鎖固定化金ナノ粒子」
「技術開発フォーラムー新規分子検出システムによる次世代バイオ分析」、全日本科学機器展 in 大阪 2009、学会連動セミナーの一企画、平成 21 (2009) 年 10 月 21 日(口頭)、大阪市
 - ◆ 張旭、青山和枝、田中小代里、森川佐依子、廣井聡、加瀬哲男、若尾雅広、隅田泰生
「糖鎖への結合性を利用したインフルエンザウイルスの 類型化ならびに高感度検出法」、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、平成 21 (2009) 年 10 月 25 日～27 日(口頭)、東京都
 - ◆ 恒見圭太、隅田泰生、橋本雅仁、
「Mesorhizobium loti 由来NO生産り多糖の活性検討及び構造解析」、第 82 回日本生化学会大会 (4P-730)、平成 21 (2009) 年 10 月 21 日～24 日、発表日 2009/10/24 (ポスター)、兵庫県神戸市
 - ◆ 隅田泰生、張旭、青山和枝、鶴田一・中村祥子、加瀬哲男、小財健一郎、若尾雅広、「糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルスの濃縮と高感度検出」、第 82 回日本生化学会大会 (4P-867)、平成 21 (2009) 年 10 月 21 日～24 日、発表日 2009/10/24 (ポスター)、兵庫県神戸市
 - ◆ 田中小代里、張旭、青山和枝、加瀬哲男、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮」、第 82 回日本生化学会大会 (4P-871)、平成 21 (2009) 年 10 月 21 日～24 日、発表日

- 2009/10/24 (ポスター)、兵庫県神戸市
- ◆ Okuno, T., Ursea, R., Hooper, L. C., Smith, J., Hooks, J. J., Hayashi, K.: Involvement of HHV-6 in corneal inflammation. The 34th International Herpesvirus Workshop, 2009, Ithaca.
 - ◆ 鈴木達哉, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 水酸基をアルキルセレノ基で置換したセレノ糖鎖の合成研究、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 藤川紘樹, 布施智明, 今村彰宏, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 環状 GlcCer acceptor を用いたガングリオシド GalNAc-GD1a の全合成、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真, Tamai, H., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: 部分修飾シアル酸二量体を有するガングリオシド LLG-3 の全合成、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 河村奈緒子, 安藤弘宗, 田中賢治, 鈴木健一, 楠見明弘, 石田秀治, 木曾真: ラフト分子の一分子追跡の為の蛍光 GM3 プロブの合成と機能評価 2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 毛受雅典, 安藤弘宗, 石田秀治, 額綱守, 木曾真: パラ位置換ベンジルセレノグリコシド供与体を用いたグリコシル化反応の検討、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 斉藤里紗, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 癌特異抗原としてのガングリオシド GM2 同族体の合成研究、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 岩山祐己, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: トラフナマコ由来生理活性ガングリオシド HPG-7 の全合成研究、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
 - ◆ 藤川紘樹, 今村彰宏, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 分子内グリコシル化を用いた効率的ガングリオシド合成法の開発、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市 (飛騨・世界生活文化センター) (Oral)
 - ◆ 田中秀則, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真, 額綱守: 1,5-ラクタム化を鍵反応とした α (2-8) オリゴシアル酸の合成研究、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市 (飛騨・世界生活文化センター) (poster)
 - ◆ 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 棘皮動物アオヒトデ由来ガングリオシド LLG-3 の合成、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市 (飛騨・世界生活文化センター) (Oral)
 - ◆ 岩山祐己, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: トラフナマコ由来新規生理活性ガングリオシド HPG-7 の全合成 (I) 還元末端側2糖の効率的合成、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市 (飛騨・世界生活文化センター) (poster)
 - ◆ 中島慎也, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真

真：ラクト及びガングリオ系二系列を同一分子中に有するハイブリッド型ガングリオシドの全合成第 29 回日本糖質学会年会、2009 年 9 月 9 日～9 月 11 日、岐阜県高山市（飛騨・世界生活文化センター）(poster)

- ◆ Nakashima, S., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A First Synthesis of Lacto-ganglio Series Ganglioside, 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009. (Oral)
- ◆ Tamai, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Synthetic Study of Ganglioside LLG-3 from Echinoderms. 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009. (poster)
- ◆ Yoshida, F., Saito, R., Komura, N., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: An efficient synthesis of GM1 epitope -containing Octasaccharide from *C. jejuni*, 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009. (poster)
- ◆ 吉満誠、小迫知弘、鈴木紳介、松下格司、久保田龍二、出雲周二、魚住公治、有馬直道、HTLV-1 感染者における免疫抑制受容体の発現. 第 2 回 HTLV-1 研究会, 2009 年 8 月 30 日、東京
- ◆ 小迫知弘、田路真吾、鈴木進、占野廣司、魚住 9 公治、有馬直道、HTLV-1 関連疾患における HTLV-1 特異的 CTL の多様性、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 9 月 30 日、横浜
- ◆ T. Kozako, T. Shoji, A. Aikawa, S. Hayashida, Y. Kuramoto, R. Mononagare, S. Honda, H. Shimeno, S. Soeda, M. Yoshimitsu, Y. White, N. Arima. SIRT1, a longevity gene encoded protein, regulates apoptosis of adult T-cell leukemia cells and its inhibition by sirtinol induces apoptosis. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, 2009, December 7, New Orleans, LA, USA
- ◆ T. Kozako, M. Akimoto, Y. White, S. Toji, K. Matsushita, S. Izumo, S. Suzuki, K. Uozumi, H. Shimeno, S. Soeda S, N. Arima. Target Epitopes of Human T Lymphotropic Virus 1 Recognized by Class I MHC-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes in HAM/TSP Patients and Infected Patients with Autoimmune Disorders. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, 2009, December 6, New Orleans, LA, USA
- ◆ Y. White, M. Yoshimitsu, T. Kozako, M. Akimoto, S. Toji, K. Matsushita, R. Kubota, S. Izumo, K. Uozumi, S. Shimeno S, S. Soeda, N. Arima. Increased Frequency of HTLV-1 Tax Specific CD8+ Regulatory T-Cells in HTLV-1 Infected Individuals. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting (New Orleans, LA)
- ◆ 馬場昌範, 岡本実佳, 後藤志典, 迫 久美子, 佐藤伸一, 青山洋史, 橋本祐一, 武部豊. 新規 γ -カルボリン誘導体の抗フラビウイルス効果について. 第 46 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2009 年 9 月 4 日, 佐賀.
- ◆ Salim MTA, Okamoto M, Hosoda S, Aoyama H, Hashimoto Y, Baba M. Anti-bovine viral diarrhea virus (BVDV) activity of

- novel diphenylmethane analogs. 第19回抗ウイルス療法研究会, 2009年6月4日, 東京.
- ◆ 馬場昌範, 岡本実佳, 後藤志典, 迫久美子, 佐藤伸一, 青山洋史, 橋本祐一, 武部豊. 3, 4, 5-トリメチル- γ -カルボリン誘導体の抗フラビウイルス効果. 第19回抗ウイルス療法研究会, 2009年6月4日, 東京.
 - ◆ 岡本実佳, 蝶野英人, 馬場昌範. RNA分解酵素 MazF を発現する新規レトロウイルスベクターを用いたエイズ遺伝子治療法の開発, 第23回日本エイズ学会学術総会, 2009年11月27日, 名古屋.
 - ◆ T. Yamaguchi and K. Kajikawa, "Analysis of Second Harmonic Generation in Self-Assembled Monolayers Absorbed on Gold Nanospheres", Global COE PICE International Symposium, Tokyo, 2010. 3. 9~3. 10
 - ◆ Y. Uchiho and K. Kajikawa, "2nd-order nonlinear optical effects on a surface immobilized gold nanoparticle structure", Global COE PICE International Symposium, Tokyo, 2010. 3. 9~3. 10
 - ◆ D. Tanaka and K. Kotaro, "Optical properties of PDA nanocrystals on Au substrates", Global COE PICE International Symposium, Tokyo, 2010. 3. 9~3. 10
 - ◆ 宮前慎介, 梶川浩太郎, "局在プラズモン共鳴バイオセンサプローブの作製条件", 第57回応用物理学関係連合講演会(東海大学), 2010. 3. 17~3. 20
 - ◆ 山口達也, 梶川浩太郎, "金ナノ微粒子表面の自己組織化単分子膜の光第二次高調波発生の解析", 第57回応用物理学関係連合講演会(東海大学), 2010. 3. 17~3. 20
 - ◆ 大石健太, 梶川浩太郎, "液晶相転移による表面プラズモンの共鳴状態変化でおこる光双安定性", 第57回応用物理学関係連合講演会(東海大学), 2010. 3. 17~3. 20
 - ◆ 内保裕一, 下条雅幸, 梶川浩太郎, "金属メタ分子の2次の非線形光学効果", 第57回応用物理学関係連合講演会(東海大学), 2010. 3. 17~3. 20
 - ◆ K. Kajikawa, "Plasmonic Biosensing Platform", WINP Tech2009(神戸大学), 2009. 11. 1~11. 2 招待講演
 - ◆ 田中大輔, 鷺澤良平, 大川春樹, 橋本和彦, 梶川浩太郎, "表面プラズモン共鳴を利用した自己組織化単分子膜の光整流", 第70回応用物理学学術講演会(富山大学), 2009. 9. 8~9. 11
 - ◆ Syahir Amir, 梶川浩太郎, 三原久和, "金属・絶縁体・金属(MIM)構造をセンシング基盤に用いた分子間相互作用の検出", 第70回応用物理学学術講演会(富山大学), 2009. 9. 8~9. 11
 - ◆ 西田知夏, 宇都浩文, 森内昭博, 長谷川将, 桶谷真, 井戸章雄, 坪内博仁: C型慢性肝炎合併透析患者のALT値とUDCAの効果. 第45回日本肝臓学会総会. 2009年6月(神戸)
 - ◆ 熊谷公太郎, 井戸章雄, 馬渡誠一, 呉建, 玉井努, 森内昭博, 長谷川将, 宇都浩文, 桶谷真, 田原憲治, 堀剛, 藤崎邦夫, 黒木和男, 重信秀峰, 小森園康二, 岩満章浩, 坪内博仁: 3年以上の核酸アナログ製剤投与例における長期成績. 第93回

日本消化器病学会九州支部例会. 2009年6月(福岡市)

- ◆ 玉井 努, 宇都浩文, 高見陽一郎, 熊谷公太郎, 呉 建, 馬渡誠一, 森内昭博, 長谷川 将, 桶谷 眞, 井戸章雄, 坪内博仁: HCV 関連慢性肝疾患における血清 MnSOD 濃度の臨床的意義. JDDW (第 13 回日本肝臓学会大会) 2009年10月(京都市)
- ◆ 熊谷公太郎, 馬渡誠一, 井戸章雄, 最勝寺晶子, 橋口正史, 呉 建, 玉井 努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷 眞, 田原憲治, 堀剛, 藤崎邦夫, 黒木和男, 重信秀峰, 小森園康二, 岩満章浩, 坪内博仁: 3年以上ラミブジン投与可能であった非代償性 B 型肝硬変における治療後の肝予備能評価. 第 94 回日本消化器病学会九州支部例会. 2009年11月(熊本市)
- ◆ 玉井 努, 宇都浩文, 最勝寺晶子, 橋口正史, 熊谷公太郎, 呉 建, 馬渡誠一, 森内昭博, 桶谷 眞, 井戸章雄, 坪内博仁: C 型慢性肝炎に対する IFN 治療後の肝発癌症例における IFN 治療効果の臨床的意義. 第 38 回日本肝臓学会西部会. 2009年12月(米子市)
- ◆ Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H: Clinical significance of hepatitis C virus infection and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients. ANS Renal Week 2009. 2009年10月(サンディエゴ, 米国)

知的所有権の出願・登録状況

- ◆ 隅田泰生, 若尾雅広, 「糖鎖固定化磁性金属ナノ粒子の製造方法」、特願 2009-175001、出願日: 2009年7月28日
- ◆ 隅田泰生, 若尾雅広, 児玉崇, 「ウイルス濃縮方法および磁性体組成物」、特願 2010-45753、出願日: 2010年3月2日
- ◆ 若尾雅広, 隅田泰生 「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子、およびその製造方法」、特願 2010-53040、出願日: 2010年3月10日
- ◆ 隅田泰生, 荒野明男, 楠本正一, 「リンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体」、登録番号 4364853、登録日: 2009年8月25日
- ◆ 隅田泰生, 荒野明男, 楠本正一, マイケルソバール, 「多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法」、登録番号 4430344、登録日: 2009年12月25日

国際特許

- ◆ 隅田泰生, 荒野明男, 楠本正一, マイケルソバール, 「多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法」、中国 ZL03821302. 8、登録日: 2009年8月6日

その他(研究に関する新聞記事等)

- ◆ 2009年6月30日、新聞報道、南日本新聞、記事題目: インフルエンザ 超感度の検出法開発
- ◆ 2009年7月1日、新聞報道、日本経済新聞、記事題目: インフルエンザ 超感度で検知 スティック、診断法開発
- ◆ 2009年10月21日、新聞報道、日本経済

新聞、記事題目：インフル対策 消毒液の
需要急増

- ◆ 2009年12月1日、テレビ報道、NHK 情報
WAVEかごしま、「インフルエンザ ウイルス 超高
感度検出法開発 鹿児島大学」で紹介。
- ◆ 2009年12月2日、テレビ報道、NHK おは
よう九州沖縄、「インフルエンザ ウイルス 超高感度
検出法開発 鹿児島大学」で紹介。
- ◆ 2009年12月13日、新聞報道、朝日新聞、
記事題目：新型インフル発症前に判別 兵
庫医大で試験運用へ ウイルス検査短縮
半日→30分
- ◆ 2009年12月13日、インターネット報道、
朝日新聞、インターネット版、記事題目：
新型インフルをスピード検査 早期治療
で重症化防ぐ
- ◆ 2009年12月16日、新聞報道、朝日小学
生新聞、記事題目：新型インフル 30分
で感染判断
- ◆ 2010年1月25日、新聞報道、日本経済新
聞、記事題目：「新型インフル発症前に判
定：鹿児島大学など検査法開発」
- ◆ 2010年1月25日、インターネット報道、
産経ニュース、記事題目：「【新型インフ
ル】発症前、微量で簡単ウイルス検出 鹿
児島大など」
- ◆ 2010年1月25日、新聞報道、産経新聞、
記事題目：「唾液でウイルス検出 鹿児島
大学教授ら開発 新型インフル発症前に
診断」
- ◆ 2010年1月25日、新聞報道、北日本新聞、
記事題目：「発症前にウイルス検出 唾液から
新型ウイルスで鹿大教授ら」

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

平成 21 年度 分担研究報告書

糖鎖合成、シュガーチップおよび糖鎖固定化金ナノ粒子の調製

&

ウイルス濃縮機能を組込んだ超高速PCR装置の開発

主任研究者 隅田 泰生 鹿児島大学 大学院理工学研究科 教授

研究協力者 若尾 雅広 鹿児島大学 大学院理工学研究科 助教

研究協力者 張 旭 鹿児島大学大学院理工学研究科 大学院生

分担研究者 児玉 崇 株式会社トラスト・株式会社ニート 代表取締役

研究要旨：ウイルスが特異的に結合する糖鎖の探索のためのシュガーチップ（SC）、ならびにウイルスの濃縮や LPR 測定の高感度向上に使用する糖鎖固定化金ナノ粒子（SGNP）を調製するために、糖鎖を合成した。特に、新規糖鎖として、多くのウイルスが結合するヘパラン硫酸の部分二糖構造 2 種類を合成し、さらに SC や SGNP に固定化するために糖鎖リガンド複合体へ誘導した。SC に関しては、47 種類の糖鎖を固定化したアレイ型のシュガーチップを調製し、各種ウイルスの糖鎖結合性を SPR イメージング法で調べた。SPR イメージング法でウイルスとの結合を確認した糖鎖を固定化した SGNP を調製し、ヘルペスウイルス（HHV）やウシ下痢ウイルス（BVDV）の高感度検査に応用した。さらに、この高感度検査を自動化・迅速化するために、糖鎖固定化磁性金ナノ粒子（SMGNP）を開発し、それを用いた自動濃縮装置をニート社の協力下試作した。

A. 研究目的

糖鎖は生命現象に必須の役割を持つが、一方で各種ウイルスが細胞へ吸着する際にレセプター分子として使用される。これを逆にとり、本課題は、通常の PCR で検出できない極低濃度のウイルスを超早期に検出・診断可能な先端医療技術の開発を行うこと、さらにウイルスの選択的除去や新薬開発のためのスクリーニング技術に応用することを目的とする。このために、ウイルスが特異的に結合する糖鎖の探索のためのシュガーチップ（SC）、ならびに探索した糖鎖を固定化した SGNP を調製すること、さらにそれら調製に必要な種々の糖鎖および糖鎖リガンド複合体を合成することを目的と

する。また、高感度検査を自動化・迅速化するために、糖鎖固定化磁性金ナノ粒子（SMGNP）を開発し、同時に自動濃縮装置の試作をも目的とする。

B. 研究方法

糖鎖合成

Scheme 1-3 に示す化学合成法によってヘパラン硫酸部分二糖構造 2 種を調製し、それらを我々が開発しているモノバレントリンカーと縮合させて糖鎖リガンド複合体を合成した。

アレイ型シュガーチップ

47 種類の糖鎖を固定化した SPR イメージング用のアレイ型チップを調製した。糖鎖のマウント位置は図 1 に示した。

糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP)

ヘパリンを固定化したナノ粒子 (Hep-GNP) を、 NaAuCl_4 からクエン酸を還元剤とし、ヘパリンを我々の方法でリガンド複合体化した Hep-mono を添加することによって調製した。

糖鎖固定化磁性金ナノ粒子 (SMGNP)

図4に従って、ナノメートルサイズのマグネタイトをまず調製し、さらに NaAuCl_4 と還元剤として NaBH_4 、および糖鎖リガンド複合体

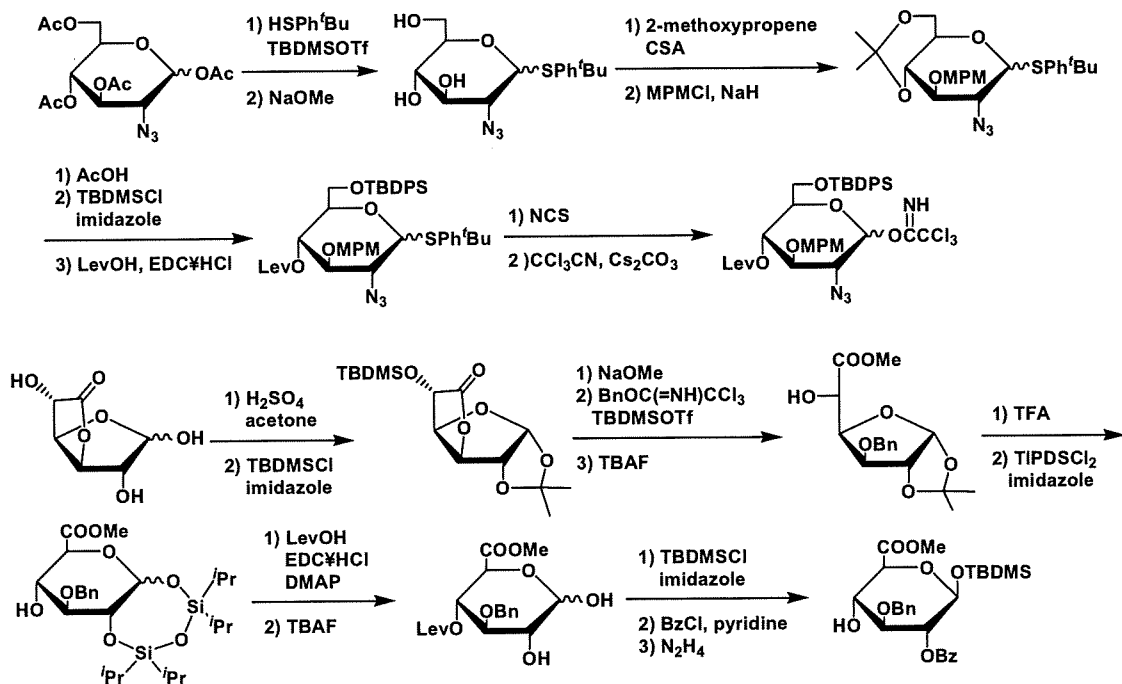
を加えて SMGNP を調製した。糖鎖としては α グルコース、およびヘパリンを用いた。

自動濃縮装置の試作

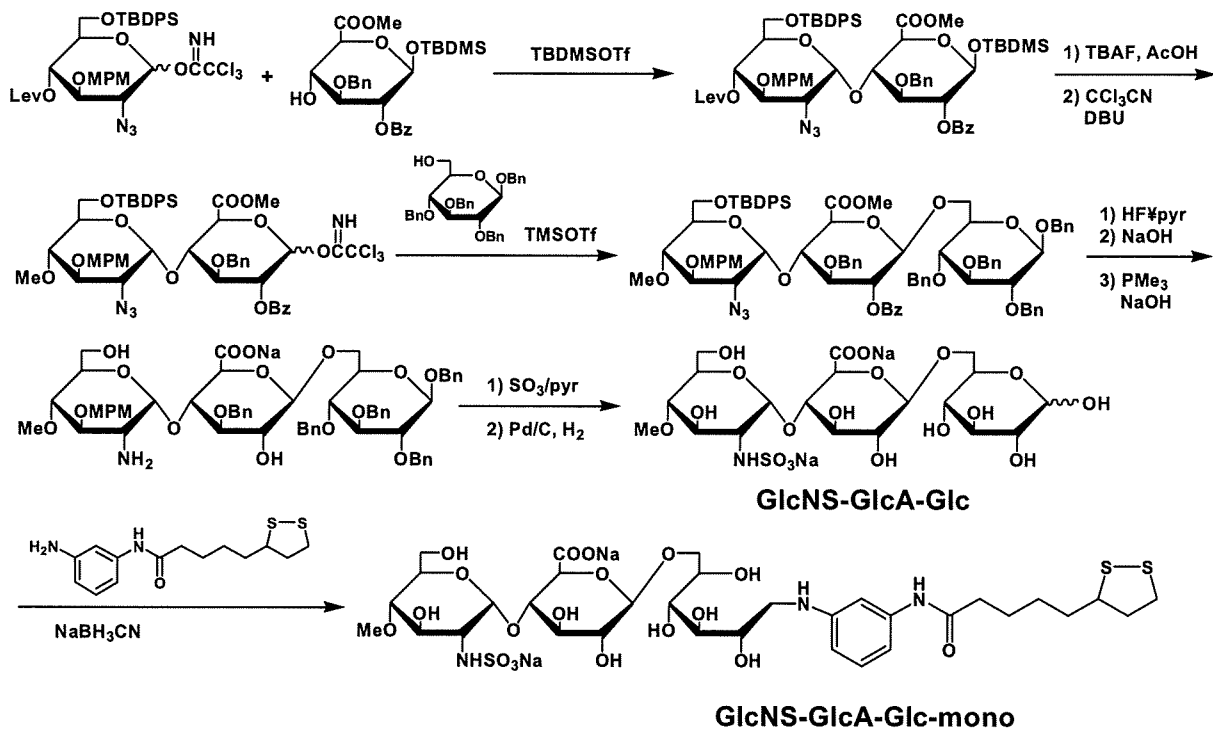
ウイルス濃縮プロトコルを自動化し、より簡便・迅速に超高感度検査を行うことができるように、研究分担者の児玉氏とともに、ニート社において自動濃縮装置を試作した。

(倫理面への配慮について)

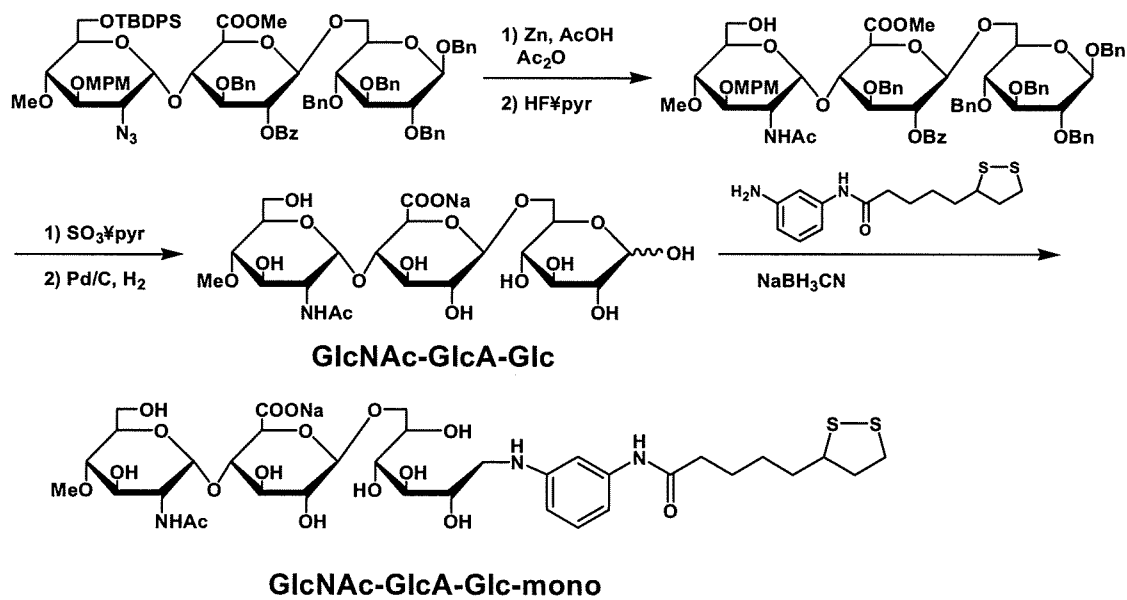
本研究では、ヒトのサンプルは用いていない。



Scheme 1 ヘパリン硫酸部分構造の合成；単糖の調製

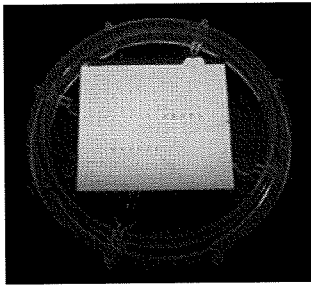


Scheme 2 ヘパラン硫酸部分構造 (GlcNS α 1-4Glc β 1-6Glc) およびその糖鎖リガンド複合体の合成

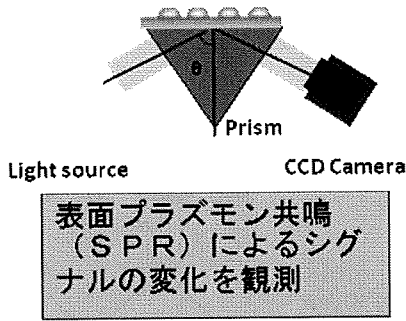


Scheme 3 ヘパラン硫酸部分構造 (GlcNAc α 1-4Glc β 1-6Glc) およびその糖鎖リガンド複合体の合成

アレイ型シュガーチップ



SPR イメージング原理



SPR イメージング測定機器 (SPRinter)



アレイ型シュガーチップに固定化した糖鎖

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gca4Gc (A401)	Gca4Gca4Gc (A402)	Gca6Gca4Gc (A602)	Gca6Gc (A601)	Gca6Gca6Gc (A603)	Gc3Gc3Gc (E301)	Gc4Gc (E401)	Gc6Gc (E601)	Gca6Gc (G601)	Gca4Gca4Gc (C401)	Gca3Gca4Gca6Gc (D301)	Gca4GcaNAcβ6Gc (D402)
B	Gca4Gc (D401)	Gca4[Fca3]GcNAcβ3Gca6Gc (D403a)	Man2Ma (G201)	Man3Man6Ma (G301)	Man6Ma (G601)	Fca2Gca4Gc (E201)	Fca6Gc (E601)	Fca6Gc (F601)		GcaNAcα6Gc (Q601)	GcaNAcβ4GcaNAc (J401)	GcaNAcβ6Gc (L601)
C	GcaNAcβ3Gca4GcaNAcβ3Gca4Gc (L601)	GcaNAcα6Gc (Q601)	GcaNAcβ3Gc (L301)	NeuNAcα23Gal4Gc (H401)	NeuNAcα23Gal4GcNAc (H402)	NeuNAcα23GalNAcNAcβ6Gc (H301)	NeuNAcα23Gal4GcNAcβ6Gc (H404)	NeuNAcα26Gal4Gc (O401)	NeuNAcα26GalNAcNAcβ6Gc (O301)	NeuNAcα26Gal4GcNAcβ6Gc (O402)	NeuNAcα26GalNAcα6Gc (O404)	Heparin (Hep)
D	Chondroitin (Ch)	Chondroitin A (CSA)	Chondroitin B (CSB)	Chondroitin C (CSC)	Chondroitin D (CSD)	Chondroitin E (CSE)						

図1 アレイ型シュガーチップ (上段左)、SPR イメージングの概略 (上段中)、SPR イメージング測定機器 (上段右)、ならびにアレイ型シュガーチップに固定化した糖鎖のマウント位置 (下段)

C・D. 研究結果・考察

アレイ型シュガーチップと SPR イメージング

図1にアレイ型シュガーチップの外観、それを用いる SPR イメージングの概略と装置、ならびに 47 種類の糖鎖のマウント図を示した。また、このシステムを用いたコイヘルペスウイルスの糖鎖結合性の解析結果を図2に示した。ヘルペスウイルスに特徴的なヘパリン、およびヘパラン硫酸の部分二糖構造に結合親和性が見られる。特にヘパリンに対して親和性が高いので、ヘパリンを固定化した金ナノ粒子を調製することとした。

糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP)

ヘパリンを固定化したナノ粒子 (Hep-GNP) を用いて精製コイヘルペスウイルス (KHV) を濃縮し、その遺伝子DNAをリアルタイムP

C R (Takara Bio, Thermal Cycler Dice Real Time) を用いて解析した結果を図3に示した。ウイルスを 1/5, 1/50 と希釈していく (図3中では「濃縮前」と記載) と、増幅曲線および融解温度曲線の双方で、希釈に伴いコントロールとくらべて増幅曲線の Ct は大きくなり、また融解温度曲線もコントロールに比べてピーク強度が小さくなっている。特に 1/50 希釈では Ct 値はリアルタイム PCR の限界値 (40) に近づき、融解温度もコントロールの位置にピークはみられない。一方、Hep-GNP をウイルス溶液に加え、遠心分離した沈殿物を解析 (図3中では「濃縮」と記載) した場合には、Ct 値の減少と融解温度曲線におけるピークの増加が明確に観測された。