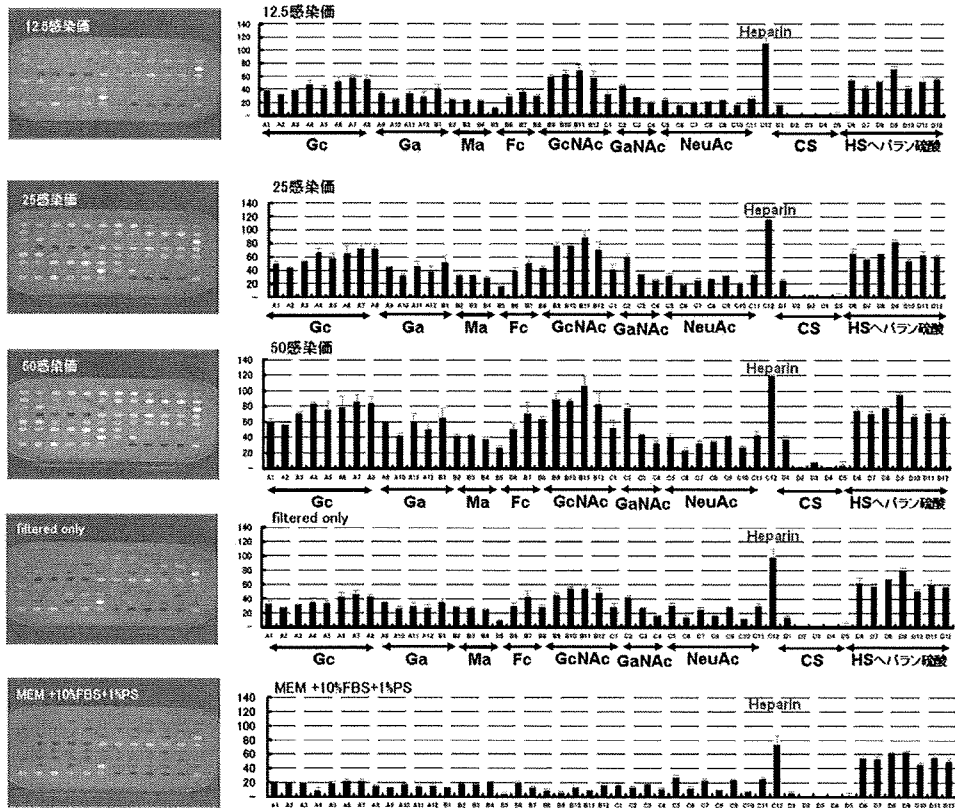


添加培養液も測定した。



1	Glc α 1-4Glc	25	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
2	Glc α 1-4Glc α 1-4Glc	26	GalNAc α 1-6Glc
3	Glc α 1-6Glc α 1-6Glc	27	GalNAc β 1-3Gal
4	Glc α 1-6Glc	28	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc
5	Glc α 1-6Glc α 1-6Glc	29	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
6	Glc β 1-3Glc β 1-3Glc	30	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-6Glc
7	Glc β 1-4Glc	31	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Glc
8	Glc β 1-6Glc	32	NeuAc α 2-6Gal β 1-4Glc
9	Gal α 1-6Glc	33	NeuAc α 2-1-6Gal β 1-3GlcNAc β 1-6Glc
10	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc	34	NeuAc α 2-1-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Glc
11	Gal β 1-3GalNAc α 1-6Glc	35	NeuAc α 2-6GalNAc α 1-6Glc
12	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Glc	36	Heparin
13	Gal β 1-4Glc	37	Chondroitin sulfate
14	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	38	Chondroitin sulfate A
15	Man α 1-2Man	39	Chondroitin sulfate B
16	Man α 1-3Man α 1-6Man	40	Chondroitin sulfate C
17	Man α 1-6Man	41	Chondroitin sulfate D
18	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc	42	Chondroitin sulfate E
19	Fuc α 1-6Glc	43	GlcNS6S α 1-4GlcA β 1-6Glc
20	Fuc β 1-6Glc	44	GlcNS6S α 1-4IdA2S α 1-6Glc
21	Xyl β 1-6Glc	45	GlcNS α 1-4GlcA β 1-6Glc
22	GlcNAc α 1-6Glc	46	GlcNS α 1-4IdA2S α 1-6Glc
23	GlcNAc β 1-4GlcNAc	47	GlcAb1-3GalNAc4S6S β 1-6Glc
24	GlcNAc β 1-6Glc		

図2. 各サンプルの糖鎖結合能

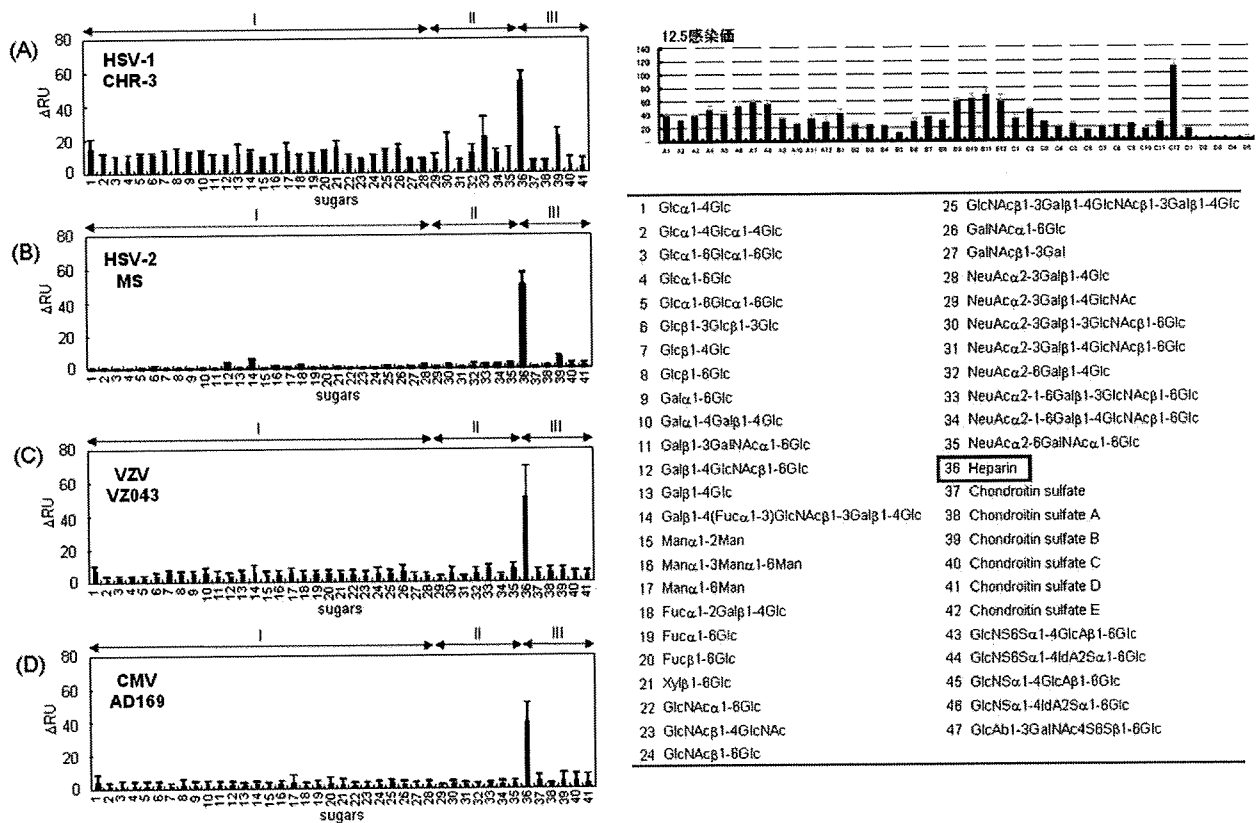


図3. ヘルペスウイルスの糖鎖結合能

D. 考察

今回 BVDV を用いて得られた結果を、既に分かっているヘルペスウイルスである単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2)、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、そしてヒトサイトメガロウイルス (CMV) と比較すると、ヘルペスウイルスは heparin だけに結合したが、一方、BVDV の方は heparin と結合に加えて、さらに全体的に 3 つの山が存在し、結合パターンのようなのがみられた (図 2, 図 3)。

BVDV の糖鎖結合能について、さらに詳しく解析を試みたところ、BVDV は全ての HS 系糖鎖に対して結合性を示した (図 4)。これは、ヘパラン硫酸 (HS) 系糖鎖がマイナス電荷を有する硫酸基を多く持っており、プラスに電荷

しているウイルスのエンベロープタンパク質との、静電的相互作用の結果による結合であると考えられる。また、コンドロイチン (CS) 系糖鎖について、CS A, CS B, CS C, CS D, CS E にはすべて硫酸化基を持っているにも関わらず、BVDV は CS E にだけ結合した (図 5)。ここで、糖鎖の構造を比べみると、CS E の硫酸基は他の CS 系の糖鎖と違って、2 つの硫酸基が最も近く、隣同士のような位置関係にあり、糖鎖結合能が硫酸基の位置関係によって左右されていることが示唆された。

さらに興味深い点は、BVDV が GcNAc 系の糖鎖に対し結合することである。GcNAc 系の糖鎖は HS 系や CS 系の糖鎖と異なり、負の電荷を持っていない。それでも結合が見られたことは、BVDV が GcNAc 系の糖鎖を特異的に認識

している可能性がある。このことから、新たな糖鎖によるウイルス認識プロセスが示唆された。さらに、血液や実際の検体からウイルスの

検出には heparin より電荷を持たない GcNAc 系の糖鎖が適していると思われるので、今後の展開が期待できる。

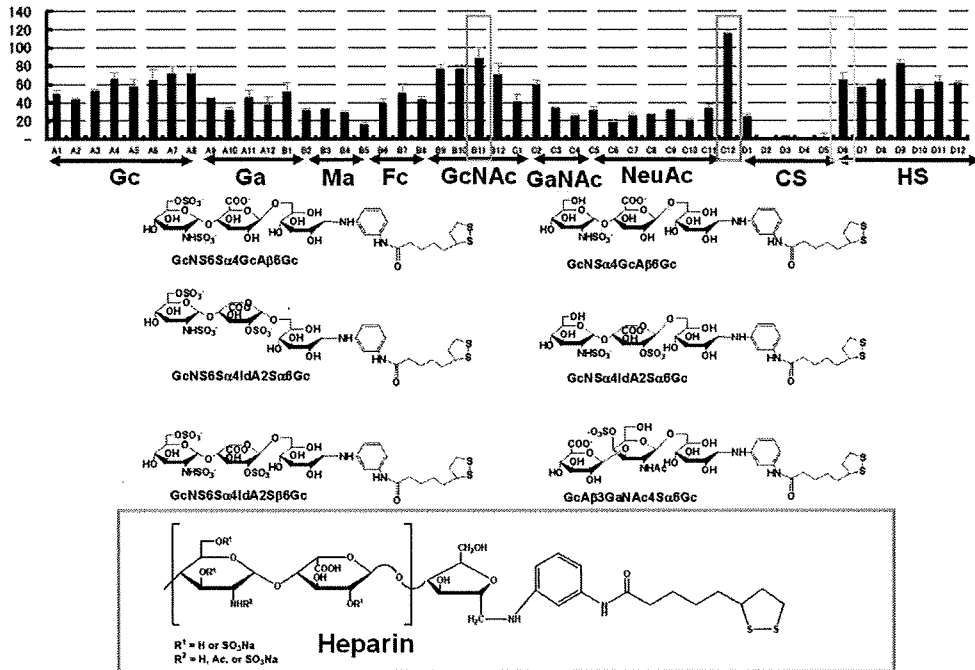


図4. BVDV のヘパラン硫酸 (HS) 系糖鎖への結合

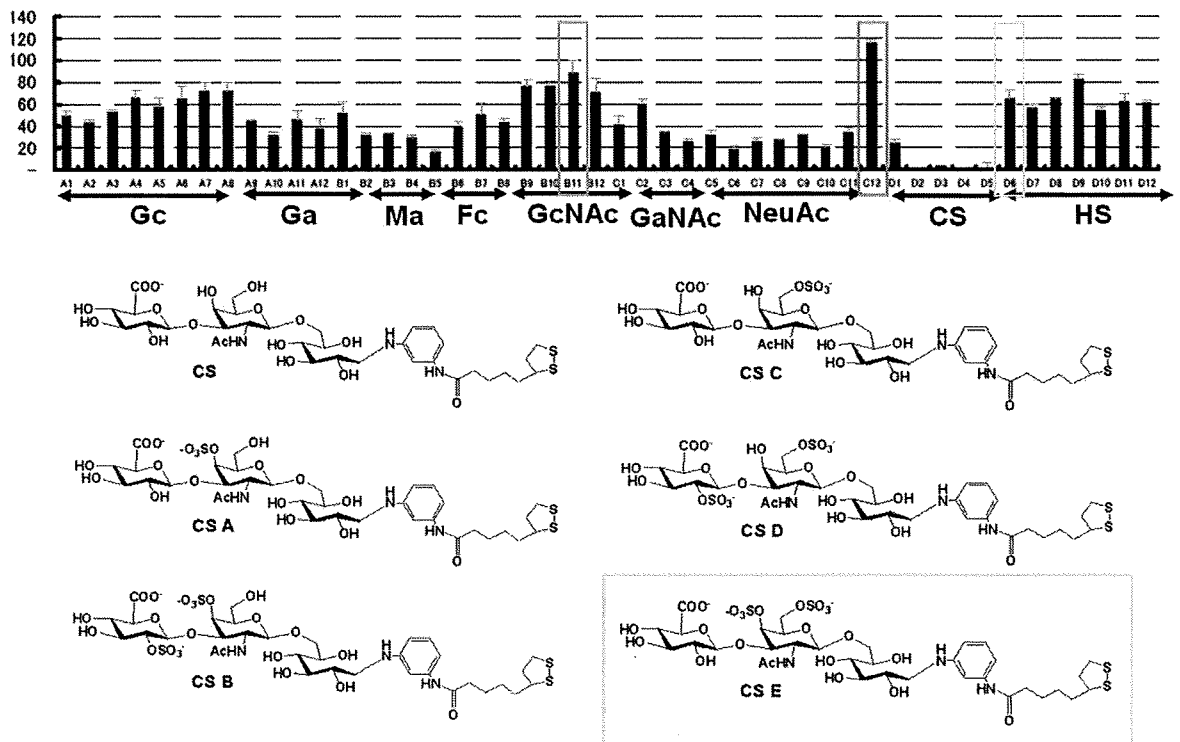


図5. BVDV のコンドロイチン硫酸 (CS) 系糖鎖への結合

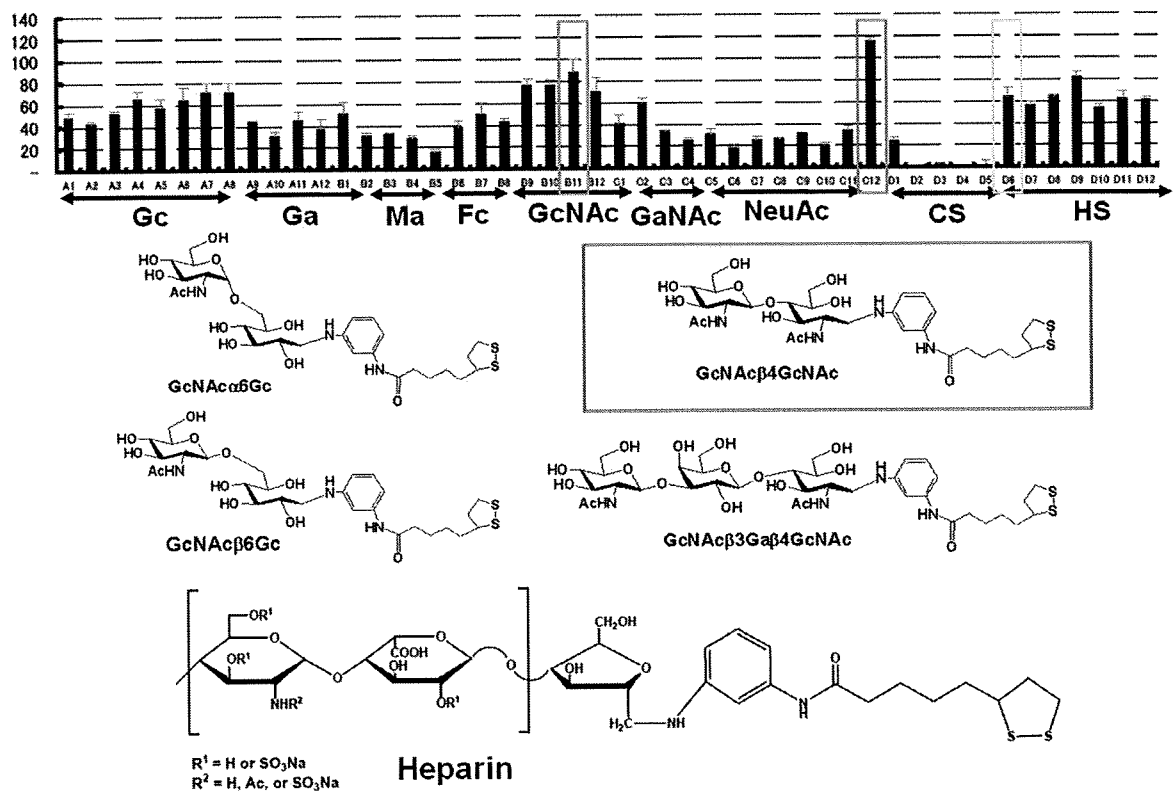


図6. BVDV の GcNAc 系糖鎖への結合

E. 結論

本研究において、BVDV が電荷を持っていない GcNAc 系糖鎖に結合することが分かった。このことから、BVDV は GcNAc 系の糖鎖を特異的に認識していることが示唆された。

F. 研究発表 (本研究に関するもの)

1. 論文発表

- ◆ 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. *Boiorg. 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. Biochemistry* **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).

2. 学会発表

- ◆ 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.

SGNP 技術を用いた HIV-1 感染症の病態に関する研究

分担研究者 岡本実佳 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 講師

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

研究要旨：シュガーチップを用いて HIV-1 結合糖鎖を解析した結果、Heparin, Type E Chondroitin sulfates (CS-E) およびヘパラン硫酸由来合成糖への HIV-1 の特異的な結合が認められた。また、HIV-1 結合糖鎖のプロファイルは、濃縮 HIV-1 液の源となる HIV-1 産生細胞培養上清の熱不活化処理の有無、あるいは HIV-1 産生細胞の T 細胞系、マクロファージ系の違いによって変化することはなかった。今回 HIV-1 への結合性が示された多糖類の中で CS-E およびヘパラン硫酸由来合成糖の抗 HIV-1 効果についてこれまで報告はなく、それらの新規 HIV-1 吸着阻害薬としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

AIDS の原因ウイルスである HIV-1 はレトロウイルス科のレンチウイルス亜科に属する。約 100 nm の直径を持つ粒子で内部にコアと呼ばれる円筒形の構造を持ち、コアを包むように感染細胞由来の脂質二重層からなるエンベロープが存在する。エンベロープには表面タンパク質 (gp120) と膜貫通タンパク質 (gp41) のヘテロ二量体が 3 個会合して形成されるエンベロープ蛋白質が存在する。

HIV-1 は、gp120 が標的細胞の CD4 分子と結合し、その後 gp120 の立体構造の変化により細胞膜近傍に露出した V3 領域がケモカインレセプター (CCR5 あるいは CXCR4) に結合することにより標的細胞に吸着する。gp120 はその後さらに構造変化を起こし、それに伴い gp41 の N 末端の疎水性の部分が露出して細胞膜に刺さりさらに構造変化を起こすことにより細胞融合が起こり HIV-1 コアが細胞内に侵入する。

gp120、特に V3 領域は陽性荷電していて、陰性荷電している細胞表面の糖蛋白質のヘパ

ラン硫酸鎖と静電的に相互作用している。そのため硫酸基の付加などにより陰性に荷電している多糖類は、HIV-1 自体あるいは gp120 のケモカインレセプター結合領域と結合することによって、それぞれ HIV-1 の細胞への吸着、侵入を阻止する。そのため、HIV-1 に結合する糖類は HIV-1 吸着・侵入阻害剤あるいはマイクロビサイドとして HIV-1 感染予防に用いることができる可能性がある。そこで本研究ではシュガーチップを用いて HIV-1 結合糖鎖の同定を試みた。

さらに、臨床検体由来の HIV-1 結合糖鎖解析により HIV-1 感染症の病態のさらなる解明および診断・治療法開発への応用を目指すため、将来における P3 施設以外における HIV-1 結合糖鎖解析を考慮し、熱不活化処理 (60℃, 30 分間) による糖鎖結合性への影響を調べた。

B. 研究方法

濃縮 HIV-1 液の作製：T 細胞系 HIV-1 慢性感染細胞である MOLT-4/Ⅲ_B 細胞、あるいは TNF- α 刺激を受けたマクロファージ系

HIV-1 慢性感染細胞である OM-10.1 細胞、それぞれより培養上清を回収し過した後、1～2 回超遠心し得られた沈殿物を PBS に再浮遊させることにより作製した。また、HIV-1 p24 Antigen ELISA キット (ZeptoMetrix Co.) を用いて得られた濃縮 HIV-1 液の HIV-1 量を測定した。

HIV-1 結合糖類の同定： 得られた濃縮 HIV-1 液を原液として PBS で 2 段階希釈を 10 段階行い、希釈されたサンプルそれぞれを

図 1 に示すような糖鎖をマウントしたシュガーチップ MultiSPR-052-cho-01 (株式会社 スティックスバイオテック) と表面プラズモン共鳴装置 (1 channel 96 ligands SPR, Toyobo) を用いて解析した。

(倫理面への配慮について)

本研究においてヒトのサンプルは用いていない。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gc 4Gc	Gc 4Gc 4Gc	Gc 6Gc 4Gc	Gc 6Gc	Gc 6Gc 6Gc	Gc 3Gc 3Gc	Gc 4Gc	Gc 6Gc	Ga 6Gc	Ga 4Ga 4Gc	Ga GaN Ac α 6Gc	Ga GcN Ac β 6Gc
B	Ga 4Gc	Ga 4[Fc 3]GcNAc 3Ga 6Gc	Ma 2Ma	Ma 3Ma 6Ma	Ma 6Ma	Fc 2Ga 4Gc	Fc 6Gc	Fc 6Gc	Xyβ 6Gc	GcNAc 6Gc	GcNAc GcNAc	GcNAc 6Gc
C	GcNAc 3Ga 4GcN Ac 3Ga 4Gc	GaNAc 6Gc	GaNAc 3Ga	NeuAc 23Ga 4Gc	NeuAc 23Ga 4GcN Ac	NeuAc 23Ga GcN Ac β 6Gc	NeuAc 23Ga 4GcN Ac β 6Gc	NeuAc 26Ga 4Gc	NeuAc 26Ga GcN Ac β 6Gc	NeuAc 26Ga 4GcN Ac β 6Gc	NeuAc 26GaNAc α 6Gc	Heparin
D	Chondoritin	Chondoritin A	Chondoritin B	Chondoritin C	Chondoritin D	Chondoritin E	GcNS6S 4GcA 6Gc	GcNS6S 4IdA2S 6Gc	GcNS6S 4IdA2S 6Gc	GcNS 4GcA 6Gc	GcNS 4IdA2S 6Gc	GcA 3GaNAc4S6S 6Gc
E	Gc 4Gc	Gc 6Gc	Ga 6Gc	Ga 4Ga 4Gc	Ga GaN Ac α 6Gc	Ga GcN Ac β 6Gc	Gc 4Gc	Gc 4Gc 4Gc	Gc 6Gc 4Gc	Gc 6Gc	Gc 6Gc 6Gc	Gc 3Gc 3Gc
F	Fc 6Gc	Fc 6Gc	Xyβ 6Gc	GcNAc 6Gc	GcNAc GcNAc	GcNAc 6Gc	Ga 4Gc	Ga 4[Fc 3]GcNAc 3Ga 6Gc	Ma 2Ma	Ma 3Ma 6Ma	Ma 6Ma	Fc 2Ga 4Gc
G	NeuAc 23Ga 4GcN Ac β 6Gc	NeuAc 26Ga 4Gc	NeuAc 26Ga GcN Ac β 6Gc	NeuAc 26Ga 4GcN Ac β 6Gc	NeuAc 26GaNAc α 6Gc	Heparin	GcNAc 3Ga 4GcN Ac 3Ga 4Gc	GaNAc 6Gc	GaNAc 3Ga	NeuAc 23Ga 4Gc	NeuAc 23Ga 4GcN Ac	NeuAc 23Ga GcN Ac β 6Gc
H	GcNS6S 4GcA 6Gc	GcNS6S 4IdA2S 6Gc	GcNS6S 4IdA2S 6Gc	GcNS 4GcA 6Gc	GcNS 4IdA2S 6Gc	GcA 3GaNAc4S6S 6Gc	Chondoritin	Chondoritin A	Chondoritin B	Chondoritin C	Chondoritin D	Chondoritin E

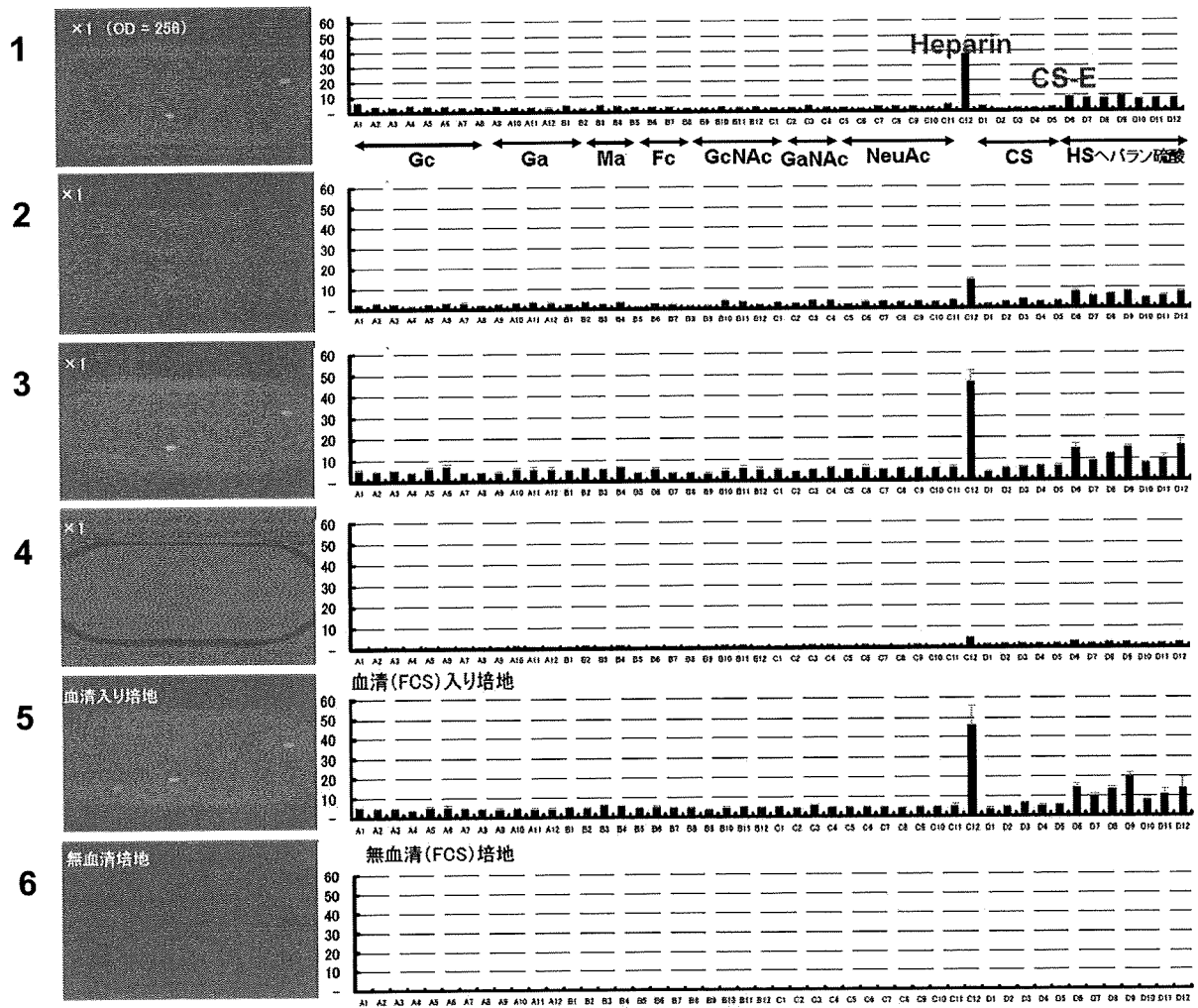
図 1. 糖鎖チップのレイアウト

C. 研究結果

HIV-1 の主な標的細胞は T リンパ球系あるいはマクロファージ系で、HIV-1 は出芽の際、宿主細胞の細胞膜をかぶって細胞外へ放出される。そこで、濃縮 HIV-1 液の源として、T 細胞系持続的 HIV-1 産生細胞である MOLT-4/III_B 細胞、TNF-α 刺激により HIV-1 産生を誘導されたマクロファージ系 HIV-1 慢性感染細胞

である OM-10.1 細胞の 2 種類の細胞上清を用いた。また、熱不活化処理による HIV-1 の糖鎖結合性のへの影響を調べるため、MOLT-4/III_B 細胞培養上清について熱不活化処理 (60℃, 30 分間) の有無による HIV-1 結合糖鎖のプロファイルの変化を調べた。

それぞれのサンプルを解析した結果、図 2 お



1	Glc α 1-4Glc	25	GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
2	Glc α 1-4Glc α 1-4Glc	26	GalNAc α 1-6Glc
3	Glc α 1-6Glc α 1-6Glc	27	GalNAc β 1-3Gal
4	Glc α 1-6Glc	28	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc
5	Glc α 1-6Glc α 1-6Glc	29	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
6	Glc β 1-3Glc β 1-3Glc	30	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-6Glc
7	Glc β 1-4Glc	31	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-8Glc
8	Glc β 1-6Glc	32	NeuAc α 2-6Gal β 1-4Glc
9	Gal α 1-6Glc	33	NeuAc α 2-1-6Gal β 1-3GlcNAc β 1-6Glc
10	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc	34	NeuAc α 2-1-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Glc
11	Gal β 1-3GalNAc α 1-6Glc	35	NeuAc α 2-6GalNAc α 1-6Glc
12	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Glc	36	Heparin
13	Gal β 1-4Glc	37	Chondroitin sulfate
14	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	38	Chondroitin sulfate A
15	Man α 1-2Man	39	Chondroitin sulfate B
16	Man α 1-3Man α 1-6Man	40	Chondroitin sulfate C
17	Man α 1-6Man	41	Chondroitin sulfate D
18	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc	42	Chondroitin sulfate E
19	Fuc α 1-6Glc	43	GlcNS6S α 1-4GlcA β 1-6Glc
20	Fuc β 1-6Glc	44	GlcNS6S α 1-4IdA2S α 1-6Glc
21	Xyl β 1-6Glc	45	GlcNS α 1-4GlcA β 1-6Glc
22	GlcNAc α 1-6Glc	46	GlcNS α 1-4IdA2S α 1-6Glc
23	GlcNAc β 1-4GlcNAc	47	GlcAb1-3GalNAc4S6S β 1-6Glc
24	GlcNAc β 1-6Glc		

図2. 各サンプルの糖鎖結合能

	HIV-1 産生細胞	培地における血清の有無	培養上清の熱不活化処理	超遠心	濃縮 HIV-1 液の p24 抗原量
1	MOLT-4/Ⅲ _B	(+)	(+)	100,000×g, 90分, 2回	25,835 pg/ml
2	MOLT-4/Ⅲ _B	(+)	(-)	20,000×g, 120分, 1回	N.D.
3	OM-10.1 (TNF- α 刺激+)	(-)	(-)	20,000×g, 120分, 1回	71,339 pg/ml
4	MOLT-4/Ⅲ _B	(-)	(-)	20,000×g, 24時間, 1回	46,455 pg/ml
5	(血清入り培地)				
6	(無血清培地)				

図 2. 各サンプルの糖鎖結合能 (続き)

よび図 3 に示すように Heparin, CS-E およびヘパラン硫酸由来合成糖への HIV-1 の特異的な結合が認められた。また、HIV-1 産生細胞の T 細胞系、マクロファージ系の違い、さらに HIV-1 慢性感染細胞培養上清の熱不活化処理の有無による HIV-1 結合糖鎖のプロファイルに変化は認められなかった。

また、培養上清中の蛋白質などによる HIV-1 非特異的な糖鎖結合の影響を調べるため、2回超遠心操作を行う、あるいは、無血清培地によって培養された HIV-1 慢性感染細胞の培養上清をサンプルとして用いて解析を行ったが、HIV-1 結合糖鎖のプロファイルに特に変化は認められなかった。さらに、比較対象として血清の入った培地と無血清培地のシュガーチップによる結合糖鎖の解析を行ったが、無血清培地では結合糖鎖は検出されなかった。

D. 考察

今回、シュガーチップによる解析の結果、Heparin, CS-E およびヘパラン硫酸由来合成糖への HIV-1 の特異的な結合が示された。それ

らの中で、heparin の抗 HIV-1 効果についてはすでに報告されているが、CS-E の抗 HIV-1 効果についての報告はない。CS-E は Herpes simplex virus type 1 に対する抗ウイルス効果の報告はあることから、HIV-1 に対しても同様に抗ウイルス効果を示す可能性があると考えられた。また、ヘパラン硫酸由来合成糖も HIV-1 への結合性を示した。硫酸多糖類において多くの場合、硫酸化の度合いが高いほど陰性荷電が高くなりウイルスへの結合性が強くなることによって抗ウイルス効果も高くなる。しかし、ウイルスへの結合性は硫酸多糖類の単なる高荷電のみによって影響されるものではなく、硫酸基の配置など硫酸多糖類の構造学的特徴も関与する。今回、HIV-1 への結合性を示したヘパラン硫酸由来合成糖については硫酸基の数による明確な HIV-1 結合性への影響は認められなかった。今後、それぞれの構造学的解析により硫酸多糖類の HIV-1 への結合性の詳細なメカニズムが解明されるものと期待される。

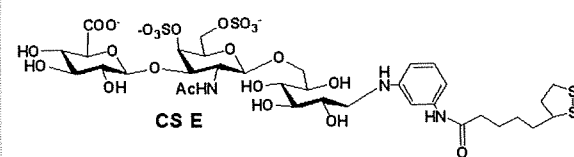
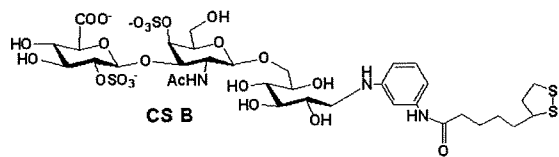
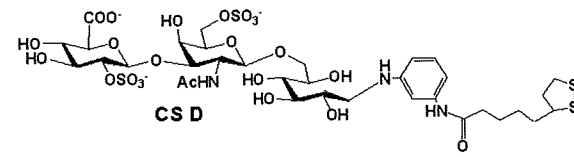
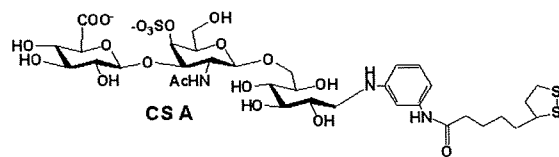
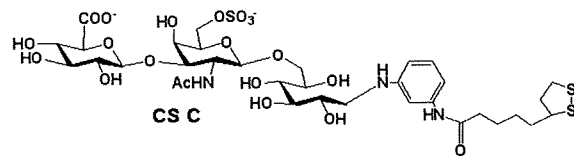
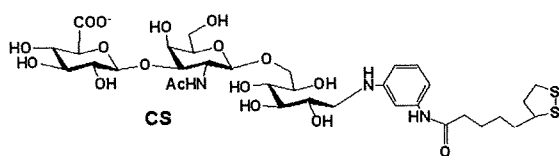
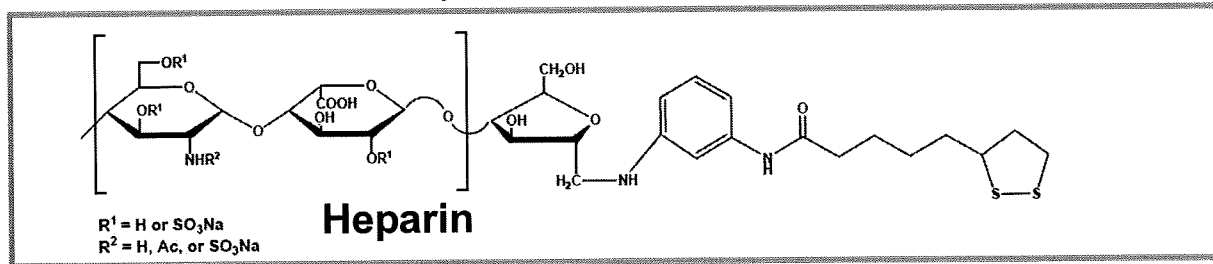
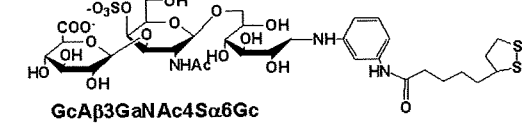
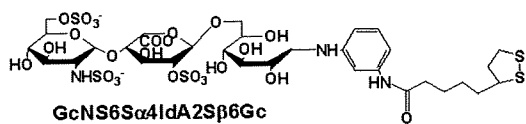
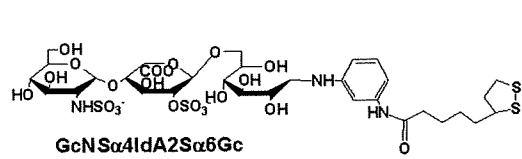
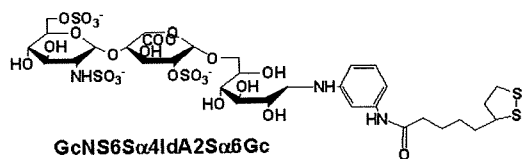
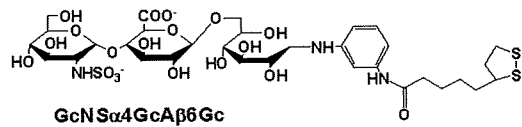
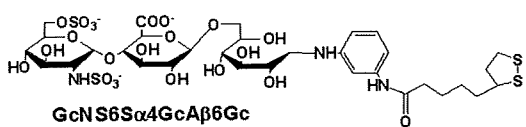
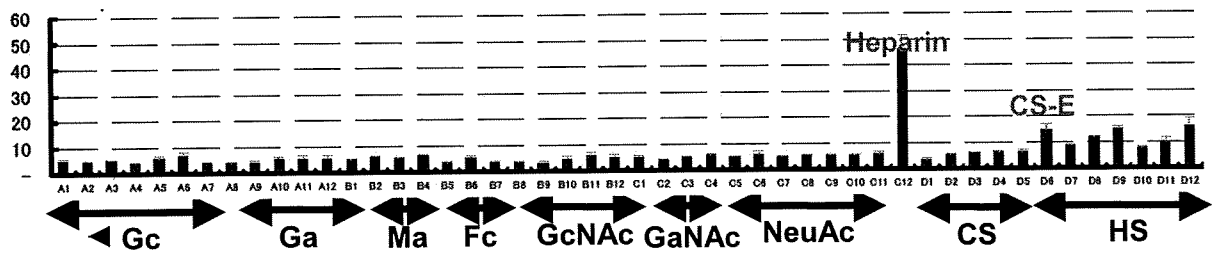


図3. HIV-1 のヘパラン硫酸 (HS) およびコンドロイチン硫酸 (CE) 系糖鎖への結合 (まとめ)

E. 結論

本研究においてシュガーチップによる解析の結果、Heparin, CS-E およびヘパラン硫酸由来合成糖への HIV-1 の特異的な結合が示された。また、HIV-1 の糖鎖結合性プロファイルは、HIV-1 産生細胞の種類、ウイルス液の熱不活化処理に影響されないことが明らかとなった。

F. 研究発表（本研究に関するもの）

1. 論文発表

- ◆ 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).

2. 招待講演

- ◆ 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.

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

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

研究分担者 梶川浩太郎 東京工業大学大学院総合理工学研究科・教授

研究要旨: 非標識でウイルスや蛋白質などのセンシングが可能な表面プラズモン共鳴法において、ナノ粒子 (NP) を使ったサンドイッチアッセイによるシグナル増幅を用いた高感度化の理論解析、および実験的検証を行った。計算から NP によるシグナル増幅は、伝搬型表面プラズモン共鳴法では約 20 倍、局在型表面プラズモン共鳴法では 40 倍におよぶことがわかった。一方、この方法を用いて実験をおこなったところ、局在型表面プラズモン共鳴法においてアビジン蛋白質検出限界を 1/100 以下にすることに成功した。

A. 研究目的

ウイルスや蛋白質などのセンシングにおいて、検出対象分子を蛍光物質などで標識する必要が無い表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) や局在プラズモン共鳴 (localized surface plasmon resonance: LPR) は有力な手段である。しかし、実際の医療現場で実用化されるためには、2-3桁の感度改善が必要である。NP を使ったシグナル増幅を使えばこれが達成できる可能性が高いが、この原理を定量的に説明できる理論は未解決である。そのため、最適な検出条件 (NP サイズ、濃度など) の探索は全く手探りの状態である。本研究では、多重局子を考慮した計算を行い、NP 層の実効的な屈折率を計算できる理論の構築を行った。また、LPR においては、NP 結合時の散乱効率の増加を計算して、シグナル増幅の大きさを求めることに方法を提案することができた。さらに、LPR におけるシグナル増幅の実験的検証を行い、約 100

倍以上の増幅を観測することができた。

B. 研究方法

a. 実験 図 1 に光ファイバプローブの模式図を示す。光ファイバ端面に金を 5nm 程度真空蒸着し、電気炉で 500° C で 2 時間熱処理を行った。この光ファイバプローブに、amino- ω -undecanethiol (AUT)、Biotin N-hydroxysuccinimide ester (Bio-Ssu) を修飾し、avidin (分子量 66,000) の検出を行った。また、光ファイバプローブに alpha-Glc-mono を修飾し、糖蛋白 ConA の検出を行った。

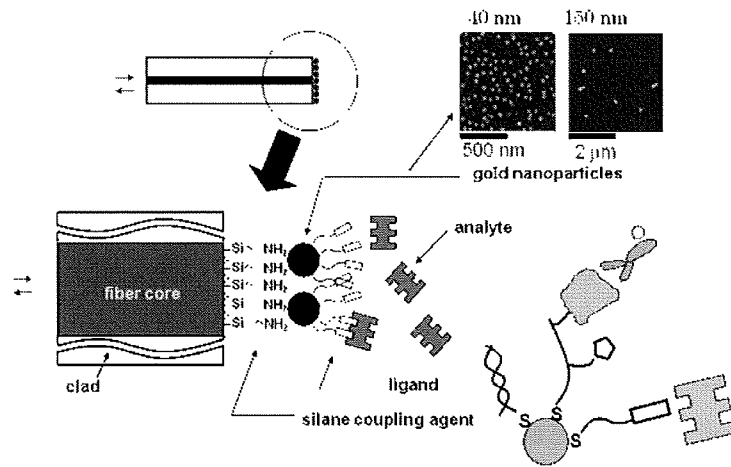


図1 光ファイバセンサプローブ

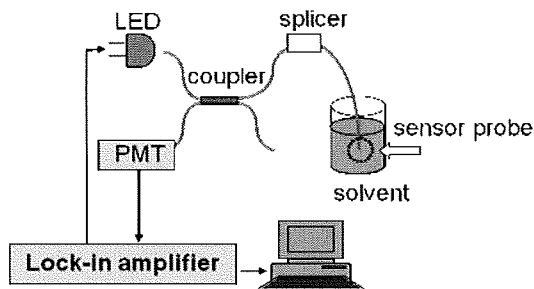


図2 センサ装置の構成図

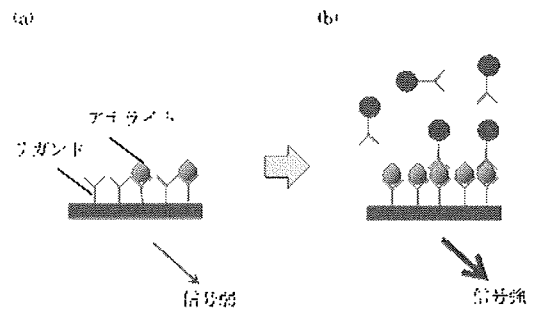


図3 サンドイッチアッセイ

サンドイッチアッセイ用には、avidin 用には直径 15nm の金ナノ微粒子を用い、ConA 用には alpha-Glc-GNP を水溶液中に分散したものをを用いた。

LPR におけるシグナル増幅の実験に用いた装置の概略を図2に示す。光源にはハロゲンランプを用い、光ファイバにカップリングした。プローブと光ファイバカプラの結合にはスプライサ (UltraSprice, 米国 Siemon 社) を用いた。プローブからの戻り光は CCD 型分光器 (USB-2000, 米国 Oscan Optics 社) で検出し、コンピュータで解析を行った。

b. 計算

数値計算は Pentium Core 2 Duo (2.4MHz) メモリ 4GB 搭載した PC を用い、Mathematica を使ってコーディングした。全ての計算は 10 時間以内に終わった。

C. 研究結果

a. 理論計算

サンドイッチアッセイにおけるシグナル増幅のモデル (サンドイッチアッセイ) を図3に示す。通常のセンシングに用いる金ナノ微粒子がウイルスや蛋白質などの検出対象分子と結合したモデルが図3である。検出対象分子の濃度が高く、十分多くの分子が結合する際には、金ナノ微粒子の分極率

が変化して散乱光効率が增加し、戻り光強度の増加として現れる。しかし、検出対象分子の濃度が低い場合には、信号が弱く検出は困難である。ここへ、検出対象分子に特異的に結合する NP を結合させることにより、散乱光効率が增加し、戻り光強度の増加が得られる。その変化の定量的な計算方法はこれまで提案されてこなかったが、以下のように疑似静電場におけるラプラスの方程式を解くことにより、それを知ることができる。図4のような系を考えると NP の分極率 α は

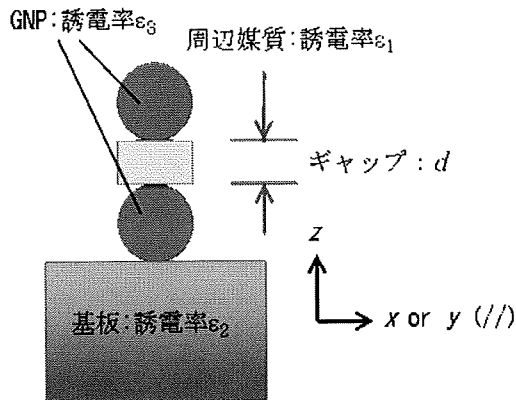


図4 計算に用いた GNP の 2 量体モデル

$$\alpha_q = 4\pi\varepsilon_1 R^3 A_q \quad (q = // \text{ or } z)$$

となる。ここで、 R は GNP 微粒子の半径、 q は電場の方向を表す。 A は多重極展開を行った際の係数であり、以下の式から求めることができる。

$$\sum_{j=1}^{\infty} \left\{ \delta_{kj} + \frac{k(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(\varepsilon_1 - \varepsilon_3)}{[k\varepsilon_3 + (k+1)\varepsilon_1](\varepsilon_1 + \varepsilon_2)} \frac{(k+j)!}{k!j!(2r_z)^{k+j+1}} \right\} A_{zj} = \left(\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_3}{\varepsilon_1 + 2\varepsilon_3} \right) \delta_{k1} \quad (k = 1, 2, 3, \dots)$$

$$\sum_{j=1}^{\infty} \left\{ \delta_{kj} + \frac{k(\varepsilon_2 - \varepsilon_1)(\varepsilon_1 - \varepsilon_3)}{[k\varepsilon_3 + (k+1)\varepsilon_1](\varepsilon_1 + \varepsilon_2)} \frac{(k+j)!}{(k+1)!(j-1)!(2r_{//})^{k+j+1}} \right\} A_{//j} = \left(\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_3}{\varepsilon_1 + 2\varepsilon_3} \right) \delta_{k1} \quad (k = 1, 2, 3, \dots)$$

ここで j, k は多重極子の次数である。また、 $r_q = 1 + R/d$ である。

伝搬型の SPR の場合には、微粒子が層構造を形成すると見なして、その層の実効的な誘電率を求めることができる。モンテカルル口法を用いて NP 間の電磁的な相互作用 L を計算した結果、微粒子の被覆率 $\sigma < 0.08$ の場合には、 $L \approx 1$ としても誤差が 5% 以内であることがわかった。その結果、実効的な層の膜厚 t_{eff} を $t_{\text{eff}} = 2R$ とおくと

$$\varepsilon_z = \varepsilon_1 \left(1 + \frac{2\sigma A_z L_{zz}}{1 - 2\sigma A_z L_{zz}} \right)$$

$$\varepsilon_{//} = \varepsilon_1 (1 + 2\sigma A_{//} L_{//})$$

と記述できることがわかった

これらの結果、伝搬マトリクス法を用いた反射率計算から、表面プラズモン共鳴測定における NP を使ったシグナル増幅を見積もることができる。その結果を図5に示した。波長 635nm において直径 80nm の微粒子で 600 倍、波長 835nm において、直径 80nm の微粒子で 125 倍、150nm の微粒子では 334 倍となることがわかった。増幅が大きい場合には、信号の飽和も起こりやすいため、この理論計算による最適なサイズと波長の選択が不可欠であることもわかった。

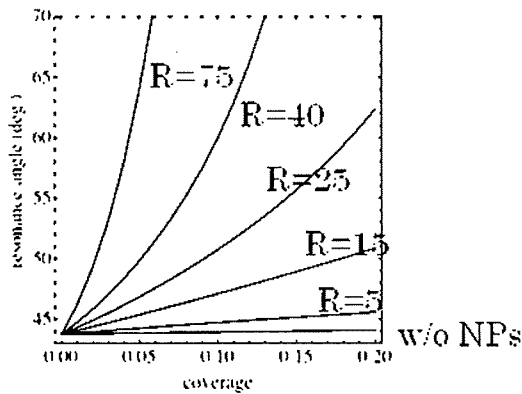


図5 計算結果の例

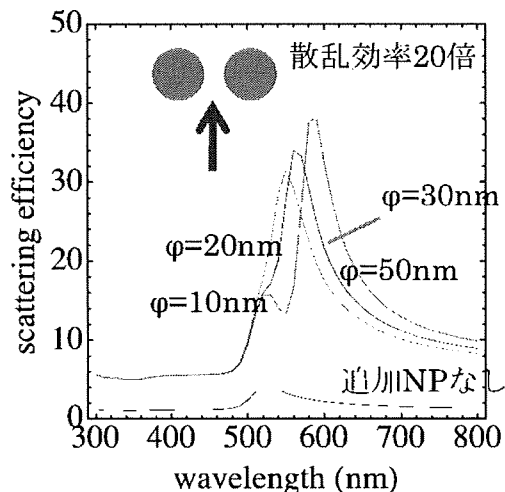


図6 散乱効率の計算結果

LPRにおいては、シグナル増幅はNPによる散乱効率の増加となってあらわれる。散乱断面積 C_{sca} は、光の波数 k を使って以下のように表されるため、

$$C_{sca} = \frac{k^4}{6\pi} |\alpha|^2$$

これより、シグナル増幅の波長分散を求めることができる(図6)。その結果、直径50nmのNPを用いることにより20倍以上の増幅が得られることがわかった。

D. 実験

光ファイバ型局在プラズモン共鳴センサを用いてNPによるシグナル増幅の実験を行った結果を図7に示す。NPによる増幅を行わない場合には、アビジンの検出限界は1nMであった。これはこれまで報告されてきた値と一致している。一方、直径15nmのAuNPを使ったシグナル増幅を用いることにより79%の信号変化が得られるようになった。その結果、この方法で検出限界濃度を1/100以下に下げることが成功した。

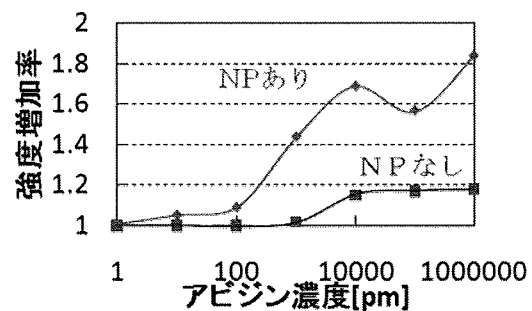


図7 アビジンのセンシング結果

次に alpha-Glc-mono をリガンドとして用いた検出限界の測定結果を図8に示す。NPによる増幅を行わなかった場合の検出限界は10nMであった。これは、当研究室でこれまでおこなってきた結果とほぼ同じである。一方、alpha-Glc-GNPを用いてサンドイッチアッセイを行った結果、検出限界を1/10の1nMとすることができた。アビジンとの違いは、alpha-Glc-GNPの直径が5nmと小さかったため、信号の増強が十分でなかったためと考えられる。今後、10-20nm程度のGNPを用いて増強度の改善をはかっ

ていきたいと考えている。

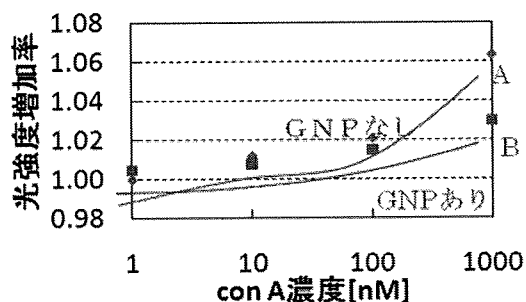


図8 Con Aの検出結果

E. 結論

NPによるシグナル増幅の理論を提案し、数値計算を行った。また、実験結果からそれが有力な方法であることを検証した。より効果的な感度の改善には、大きいNPを用いることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ 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. C*, 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 Nanoislands", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 48, 080207 (2009) (2 pages).
- ◆ 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) (3 pages).
- ◆ 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) (9 pages).
- ◆ 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).

2. 学会発表

- ◆ 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, 鵜澤良平, 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

ウイルス感染症（HBV,HCV）への応用

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨:本研究事業では PCR で検出できない極低濃度のウイルスを超早期に検出・診断可能な医療技術を開発する計画であり、分担研究者らは特に B 型肝炎ウイルス（HBV）および C 型肝炎ウイルス（HCV）を対象として解析する。本年度は、患者の同意を得て、B 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療前後、および deNovoB 型肝炎発症患者の血清サンプルを約 30 検体、C 型慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療前、治療中および治療後の患者血清サンプルを約 300 検体集積した。

A. 研究目的

本研究事業では 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計画であり、分担研究者らは特に B 型肝炎ウイルス（HBV）および C 型肝炎ウイルス（HCV）を対象として解析する。

B. 研究方法

1) HBV 感染患者

B 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療前後、および deNovoB 型肝炎発症患者の血清サンプルを集積する。

2) HCV 感染患者

C 型慢性肝炎患者でインターフェロンを基本とした治療を行った患者の治療前、治療中、および治療後の患者血清サンプルを集積する。

倫理面の配慮

- a. 個人の人権の擁護：参加者のデータは、匿名化を行い、厳重な秘密保持のもとに管理され、本研究のデータが参加者に不利益を及ぼすことはないと考えられる。
- b. 個人情報の管理：ID 番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いた

ものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。

c. 研究等によって生じる個人への不利益：超音波検査や静脈穿刺は侵襲性の高いものではなく、被験者に不当な危険が生じることはほとんどない。個人のプライバシーに関わる点については十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究結果

- 1) HBV に関しては、B 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療前後、および deNovoB 型肝炎発症患者の血清サンプルを約 30 検体集積した。
- 2) C 型慢性肝炎患者でインターフェロンを基本とした治療を行った患者の治療前、治療中、および治療後の患者血清サンプルを約 300 検体集積した。

D. 考察

PCR では検出できない程度のラミブジン耐性株が出現していた場合、エンテカビルに変更するとエンテカビルも耐性となる可能性があり、現在の検出系では HBV DNA が検出されない症例の中で、極少量ながら増殖傾向にある耐

性ウイルスを極早期に検出することは、治療薬の選択に有用である可能性がある。また、化学療法後の deNovoB 型肝炎の発症予測に、HBV DNA の検出は重要であり、超早期に HBV DNA の増加を検出できれば、早期治療に結びつき、患者の予後の改善に役立つ可能性がある。

HCV 感染による慢性肝炎患者に対してはインターフェロンを基本とした治療が行われている。しかし、現行の HCV RNA の検出系は感度が十分ではなく、その抗ウイルス効果の判定は治療終了後 24 週の経過観察後の HCV RNA の検査が必要である。また、現在の HCV RNA 測定系では体内の HCV RNA が消失しているのか、HCV RNA が検出感度以下でも存在しているのかの判断はできないため、インターフェロン治療中にどの患者に延長投与すべきか判断に苦慮することも多い。HCV RNA の高感度検出系が確立できれば、早期治療効果判定や治療継続の可否について適切な判断ができる可能性がある。

E. 結論

現行の PCR 法で検出できない極低濃度のウイルスを検出できる測定系が確立できた後に、その検出系の臨床的有用性を集積したサンプルを用いて明らかにする予定であり、本年度は血清サンプルの集積を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ 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* 40:438-455,2010.

- ◆ 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.

2. 学会発表

- ◆ 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)