

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 22 年度 分担研究報告書

シュガーチップと糖固定化金ナノ粒子技術を用いた
HIV-1 感染症早期診断および新規予防法の開発

研究担者 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科）
濱崎隆之（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）
馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

研究要旨：有効な予防ワクチンがない現在、性行為による HIV-1 の伝播を予防する安全で効果的な microbicide の開発が緊急に必要とされている。HIV-1 に特異的に結合する多糖類は標的細胞への吸着および侵入を阻害して microbicide となる可能性がある。本研究では、糖鎖固定化技術を用いて開発されたシュガーチップによる解析において HIV-1 への高い結合性が認められた type E chondroitin sulfates (CS-E)が in vitro において強力かつ選択的に HIV-1 複製を阻止することを明らかとした。シュガーチップ解析において HIV-1 への明らかな結合性を示さなかった CS-A, CS-B, CS-C および CS-D には抗 HIV-1 効果は認められなかった。シュガーチップ解析で明らかにされた糖鎖の HIV-1 への結合性は抗 HIV-1 効果と連結していると考えられる。このことからシュガーチップによる糖鎖の HIV-1 結合性の解析は効果的な新規 microbicide の探索に有用であると考えられる。

HIV-1 感染拡大を阻止するためには、簡便で精度の高い HIV-1 診断法の開発が不可欠である。非侵襲的で精度の高い HIV-1 診断法の開発を目指し、糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮法とリアルタイム RT-PCR の組み合わせによる唾液中の HIV-1 の検出法の確立を試みた。金ナノ粒子に固定する糖鎖にはシュガーチップ解析の結果、最も HIV-1 への結合性の高かった heparan sulfate を用いた。実験の結果、糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルス濃縮は、リアルタイム RT-PCR 法による唾液中の HIV-1 の検出感度を著しく増加させた。本方法は簡単かつ非侵襲的に採取できる唾液検体から微量の HIV-1 を検出することを可能にすることから、簡便かつ有効な HIV-1 スクリーニング検査法となると考えられる。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) は、(1) エンベロープに存在する Env の表面タンパク質 (gp120) と標的細胞の CD4 分子の結合、(2) gp120 の立体構造の変化によって細胞膜近傍に露出した gp120 の V3 領域とケモカインレセプターの結合、(3) さらなる gp120 の立体構造の変化に伴

う gp41 の構造変化(4) gp41 の細胞膜貫通、

(5) ウイルス・細胞膜の融合、の課程を介して細胞内に侵入する。gp120、特に V3 領域は陽性荷電しているため、陰性多糖類は gp120 と結合して HIV-1 の細胞内への侵入を阻害する。そのため HIV-1 に結合する糖は HIV-1 吸着・侵入阻害剤あるいは microbicide となる可能性がある。昨年度、アレータイプ

金固定化チップを用いた表面プラズモン共鳴システム（シュガーチップ）により96種類の糖鎖について解析を行い、heparinの他type E chondroitin sulfate (CS-E)がHIV-1に特異的に結合することを明らかにした。heparinは分子中に多数の硫酸基が含まれ負に帯電しており、HIV-1吸着を阻害することが知られている。chondroitin sulfateに抗HIV-1作用があることはすでに報告されているが、CS-Eの抗HIV-1作用についての報告はまだない。シュガーチップ解析の結果ではCS-E以外のタイプのchondroitin sulfateはHIV-1に対して特異的な結合を示さなかった。これらのことからCS-Eを含む各タイプのchondroitin sulfateの抗HIV-1効果を調べ、シュガーチップ解析の結果と比較した。

HIV-1は血液だけではなく、母乳、精液、膈分泌液、唾液、汗などの体液にも存在する。唾液中のHIV-1は微量であるため、HIV-1感染スクリーニング法として現在、唾液中の抗HIV-1抗体をウェスタンブロット法で検出する方法が開発されている。しかし、唾液中の抗HIV-1抗体も微量であるため、精度は100%ではない。当然ながら血液検査と同様に、感染直後から抗HIV-1抗体出現までの期間（ウィンドウピリオド）においてはこの方法ではHIV-1感染を見つけることはできない。そこでウィンドウピリオドにおいても診断可能な非侵襲性で精度の高いHIV-1診断法の開発を目指し、糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮法とリアルタイムRT-PCRの組み合わせによる唾液中のHIV-1の検出法の確立を試みた。

B. 研究方法

(1) In vitro HIV-1 アッセイ

T細胞株 MT-4 細胞を 1×10^5 cells/ml に調整し（培養液：RPMI1640+10%牛胎仔血清+100

U/ml ペニシリン+100 μ g/ml ストレプトマイシン）、種々の濃度のCS-A、CS-B、CS-C、CS-D、CS-E、Dextran Sulfate、Heparin およびAZT存在下、37°Cで2時間ブレインキュベーションした後、HIV-1（III_B株）をMOI 0.1で感染させた。4日間培養後、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法により各サンプルの生細胞数を調べ、感染細胞で抗HIV-1効果を偽感染細胞で毒性を評価した。試験は3回繰り返した。

(2) 糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルス濃縮およびリアルタイムRT-PCR法によるHIV-1の検出（図1）

PBSを用いてHIV-1ストック液を10倍ずつ段階希釈した。それぞれのHIV-1希釈液250 μ lに健常人ボランティアより採取した等量の唾液を加えた。検体を一部採取して保存(A)した後、ヘパリン固定化金ナノ粒子を10 μ l加えた。時々攪拌しながら室温で30分間静置後、10,000 \times g、10分間遠心した。上清を採取して保存(B)した後、沈殿物に水10 μ lを加えて溶かした(C)。A、B、Cそれぞれについて、TaKaRa One Step SYBR® (PrimeScript® RT-PCR Kit II)を用いThermal cycler Dice Real time System TP800を使用してリアルタイムRT-PCR法でHIV-1遺伝子の検出を行った。プライマーは581F (5'-tggtactagactagctccctcagacc-3')および620T (5'-agctcctctggttcccttc-3')を用いた。2コピーのHIV-1遺伝子が宿主細胞のDNAにインテグレートされているU1細胞のDNAを用いて検量線を作製し、サンプル中のHIV-1遺伝子の測定は絶対定量で行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては動物実験、臨床検体を使用した実験は行っていない。本研究で使用した

細胞は株化培養細胞であることから、倫理面の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

CS-E の 50% 有効濃度 (EC₅₀) 3.3 ± 1.3 μg/ml で、dextran sulfate より弱いものの、MT-4 細胞への HIV-1 感染を強力に阻害した (表 1)。CS-E の 50% 毒性値 (CC₅₀) は >100 μg/ml であった。シュガーチップ解析で HIV-1 への結合が認められなかった他のタイプの chondroitin sulfate は全く抗 HIV-1 効果を示さなかった。

UI 細胞の DNA を用いて作製した検量線を用いて希釈 HIV-1 溶液の HIV-1 量を測定したところ、10、100 CCID₅₀/ml はそれぞれ、ほぼ 10、100 copies/ml となり、今回行ったリアルタイム RT-PCR 法による HIV-1 遺伝子の検出は正確なものであることが示された (図 2)。この方法により各唾液検体中の HIV-1 遺伝子を検出した結果、100 copies/ml の HIV-1 遺伝子を含んだ唾液検体では大きな差はなかったが、10 copies/ml ではヘパリン固定化金ナノ粒子による濃縮により HIV-1 遺伝子の検出効率が顕著に高くなり、0.1 copies/ml では濃縮前の検体からは HIV-1 遺伝子を検出できなかったが、濃縮後の検体からは検出することができた (図 3)。

D. 考察

シュガーチップ解析において HIV-1 への高い結合性が認められた CS-E は高い抗 HIV-1 効果を示したが、HIV-1 への明らかな結合性を示さなかった CS-A、CS-B、CS-C および CS-D には抗 HIV-1 効果は認められなかったことから、シュガーチップ解析で明らかにされた糖鎖の HIV-1 への結合性は抗 HIV-1 効果と連結していると考えられる。このことからシュガーチップによる糖鎖の HIV-1 結

合性の解析は効果的な新規 microbicide の探索に有用であると考えられた。CS-E は他のタイプのコンドロイチン硫酸に比べて硫酸含量が高い (8.2-9.0%)。このことが CS-E の HIV-1 への結合性および抗 HIV-1 効果に関与していると推測された。使用した CS-E の純度は 60-65% であったことから、さらに純度が高くなれば抗 HIV-1 効果も強くなると考えられ、microbicide として利用が期待される。

ヘパリン固定化金ナノ粒子を用いたウイルス濃縮により、0.1 copies/ml の濃度の HIV-1 でも唾液検体からリアルタイム RT-PCR 法により検出することができた。濃縮前の検体からは 0.1 copies/ml の HIV-1 は感度の高い RNA 検出法であるリアルタイム RT-PCR 法でも検出できなかった。このことから、糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮とリアルタイム RT-PCR 法の組み合わせは唾液中の微量の HIV-1 検出に極めて優れた方法であると考えられる。唾液は簡単かつ非侵襲的に採取できる検体で、今日、各種感染症、腫瘍疾患、心疾患などの診断に用いられている。HIV-1 感染者の唾液中の HIV-1 量は血液中の HIV-1 量は約 20% であることから、今回 0.1 copies/ml の濃度の HIV-1 でも唾液検体から検出することが可能な糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮とリアルタイム RT-PCR 法を組み合わせた方法、血液検体に匹敵する感度で唾液検体から HIV-1 を検出することができると考えられる。唾液検体を用いたスクリーニング法として、唾液中の抗 HIV-1 抗体を測定する診断キットはすでに販売されているが、この方法では「ウィンドウ・ピリオド」と呼ばれる感染から抗体検出が可能となるまでの期間は HIV-1 感染の有無を診断することはできない。糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮とリアルタイム RT-PCR 法を組み合わせた方法を用

いれば「ウィンドウ・ピリオド」においても唾液検体で HIV-1 感染の有無を判定できる可能性がある。HIV-1 が分泌される体液の中で、血液、母乳、精液、膣分泌液は HIV-1 感染を伝播するが、多量の口腔内出血がない限り唾液を介した HIV-1 感染は起こらない。よって本方法は簡便、有効かつ安全な HIV-1 感染の早期診断法となると考えられる。

E. 結論

シュガーチップ解析において HIV-1 への高い結合性が認められた CS-E は *in vitro* において強力かつ選択的に HIV-1 複製を阻止した。

ヘパリン固定化金ナノ粒子を用いたウイルス濃縮により、リアルタイム RT-PCR 法による唾液中の HIV-1 RNA の検出感度を著しく増加させ、濃縮前では検出できなかった 0.1 copies/ml の HIV-1 RNA を検出することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ Salim MT, Goto Y, Hamasaki T, Okamoto M, Aoyama H, Hashimoto Y, Musiu S, Paeshuyse J, Neyts J, Froeyen M, Herdewijn P, Baba M. Highly potent and selective inhibition of bovine viral diarrhea virus replication by γ -carboline derivatives. *Antiviral Res.* 88:263-268, 2010.
- ◆ Salim MT, Okamoto M, Hosoda S, Aoyama H, Hashimoto Y, Baba M. Anti-bovine viral diarrhoea virus activity of novel diphenylmethane derivatives. *Antivir Chem Chemother.* 20:193-200, 2010.
- ◆ Nakamura M, Aoyama A, Salim MT, 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.* 18:2402-2411, 2010.

2. 学会発表

- ◆ Okamoto M, Chono H., Baba M. Transduction of CD4+ T lymphocytes by the retroviral vector expressing an *Escherichia coli* endoribonuclease MazF induces cellular resistance to HIV-1 replication. XVIII International AIDS Conference July 2010, Vienna.
- ◆ 岡本実佳, 蝶野英人, 津田大嗣, 井上晃一, 峰野純一, 馬場昌範 HIV-1 感染 RNA 分解酵素 MazF 導入リンパ球の長期継代培養の解析. 第 24 回日本エイズ学会 2010 年 11 月 (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

今回は特許出願等なし。

表 1. In vitro における各種 Chondroitin sulfate の抗 HIV-1 効果

Compound	EC ₅₀		CC ₅₀	
CS-A	> 100	μ g/ml	> 100	μ g/ml
CS-B	> 100	μ g/ml	> 100	μ g/ml
CS-C	> 100	μ g/ml	> 100	μ g/ml
CS-D	> 100	μ g/ml	> 100	μ g/ml
CS-E	3.3 \pm 1.3	μ g/ml	> 100	μ g/ml
Dextran sulfate	0.077 \pm 0.030	μ g/ml	> 100 and 14.4	μ g/ml
Heparin	0.083 \pm 0.024	U/ml	> 4	U/ml
AZT	0.016 \pm 0.0046	μ M	30.6 \pm 12.4	μ M

図 1. 糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルス濃縮およびリアルタイム RT-PCR 法による HIV-1 の検出

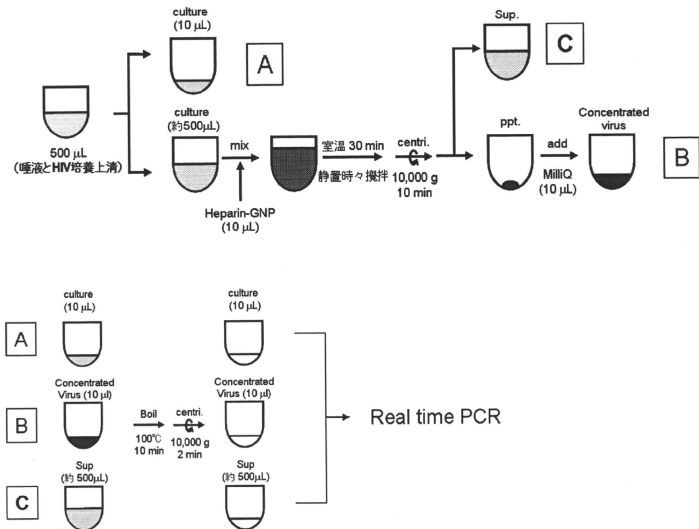


図2. リアルタイム RT-PCR 法による HIV-1 RNA の検出 (実験精度)

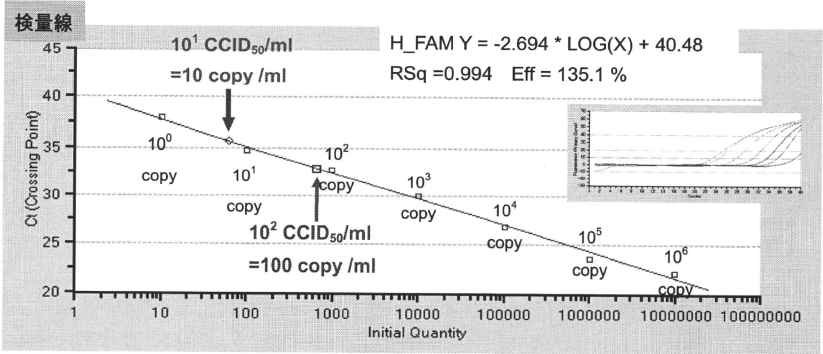
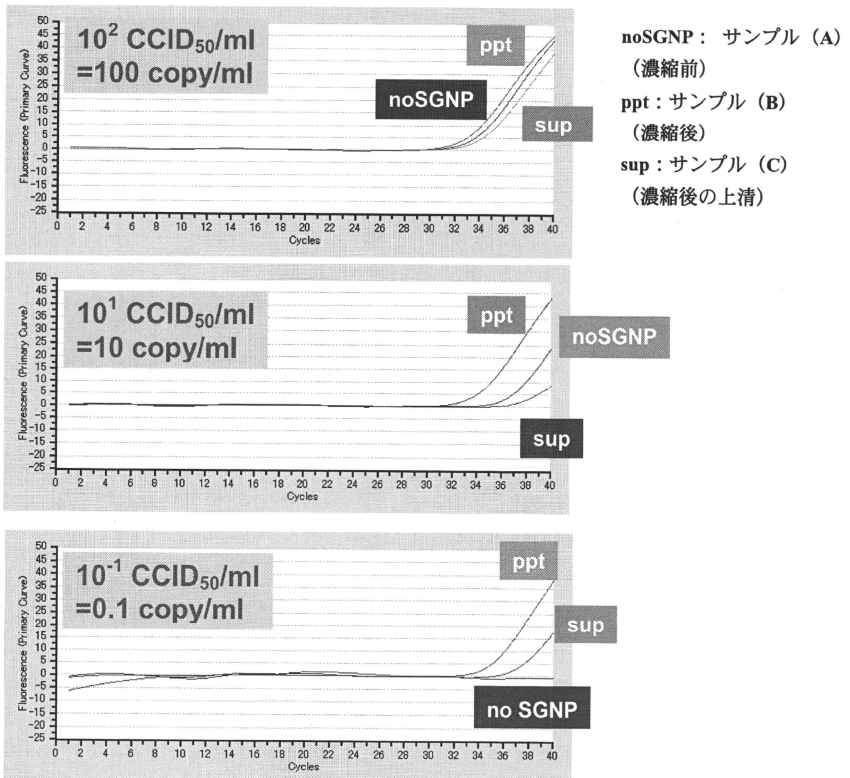


図3. リアルタイム RT-PCR 法による HIV-1 RNA の検出 (唾液検体)



表面プラズモンバイオセンサの高感度化と高集積化に関する研究

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局在表面プラズモン共鳴を用いて、2量体化した金ナノ粒子（NP）を使った高感度化を実現した。この方法を用いた光ファイバ型局在表面プラズモン共鳴バイオセンサを作製し、アビジン蛋白質の検出限界を従来の方法に比べて 1/10~1/100 にすることに成功した。また、表面プラズモン共鳴に類似する手法である金の異常反射を用いて、多種の検出対象物質を一度に検出できる高密度蛋白質チップの作成と検出システムを開発した。その結果、1平方ミリメートルあたり 100 ch と高い密度でマルチチャンネル検出を行うことに成功した。

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桁程度の感度の改善が必要である。これまで行ってきた金ナノ粒子（AuNP）を使ったLPRを改良し、AuNPの2量体構造を使ってこれを解決することを目的とした。研究の結果、アビジン蛋白質検出限界を 1/10~1/100 とすることに成功した。また、多種の検出対象物質を一度に検出できる方法として高密度蛋白質チップの作成と検出を行った。チャンネル密度は1平方ミリメートルあたり100chと高い密度の蛋白質チップの作成とその検出システムの開発を行うことができた。個々のチャンネルの直径は65 μ mであり、これを100 μ mの間隔で10 \times 10個配置したチップで

ある。これは、これまで報告されている蛋白質の非標識バイオチップの中で最も高密度なマルチチャンネルバイオセンシングシステムである。

B. 研究方法

a. 2量体 AuNP による高感度化

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 $^{\circ}$ Cで2時間熱処理を行った。この処理により、光ファイバ端面には半球状のAuNP構造が構築される。この光ファイバをamino- ω -undecanthiol (AUT)のエタノール溶液に浸漬し、AuNP表面にAUTの自己組織化単分子膜(SAM)を作成した。さらに、AuNP水溶液(NPのサイズは直径15nm, 30nm, 50nm)に浸漬して、2量体構造を作成した。2量体の形成は、反射光のスペクトル中に2量体構造に起因するピーク(波長670nm)が現れることで確認した。その2量体構造にBiotin N-hydroxysuccinimide ester (Bio-Su)を修

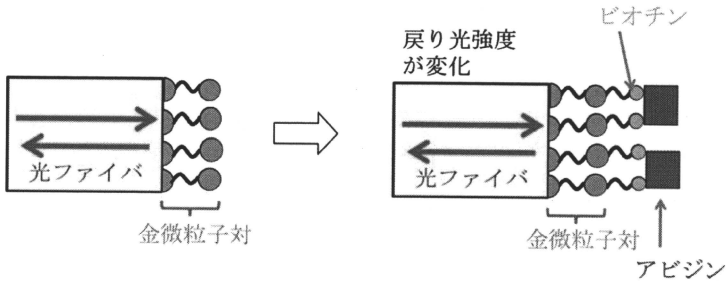


図1 光ファイバプローブの模式図

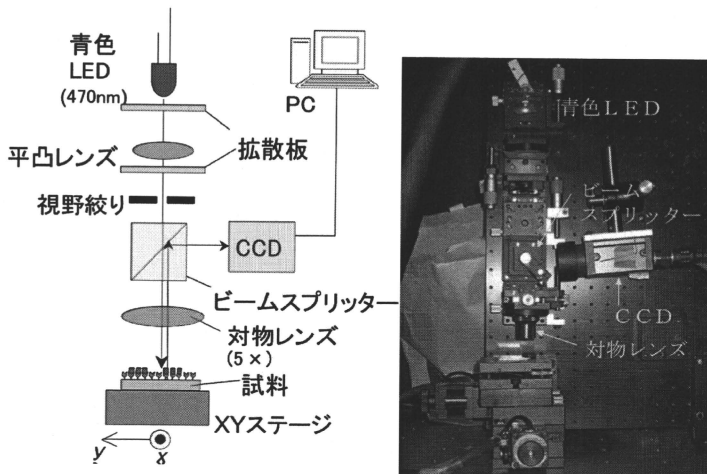


図2 高密度蛋白質チップの検出システム光学系と写真

飾した。そして、戻り光強度の測定を行い、アビジン (avidin : 分子量 66,000) の検出を行った。

検出信号の測定装置は以下の通りである。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. 高密度蛋白質チップの作成と検出

高密度蛋白質チップの作製と信号の検出については以下のように行った。ガラス基板の上に金を 100nm の厚さで蒸着して、チップの基板とした。光ファイバの先端に PDMS を塗布

したピンを作成し、これをスポットする物質（オクタデカンチオールやアビジン）の溶液中に浸漬し、自作のスポッターにより基板の上にスポッティングを行った。

検出の光学系およびその写真を図2に示した。青色LED（波長470nm）で基板を照射し、基板の像を顕微光学系によりCCDカメラ上に結像した。コンピュータを用いてこれを読み込み、画像解析してデータを得た。このシステムでは1画像を得るために必要な時間は1秒〜5秒程度であり、高速な検出が可能である。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

a. 2量体 AuNP による高感度化

図3にアビジンの濃度を徐々に増加させた際の戻り光強度をプロットした結果を示す。このプローブで用いた2つめの AuNP の直径は50nmであった。1pMから信号が変化し、アビジンが検出されている。いくつかのプローブを試した結果、最も良かった場合には、検出限界が1pMであり、他の大きさの微粒子では、10pM〜100pMから検出されることがわかった。

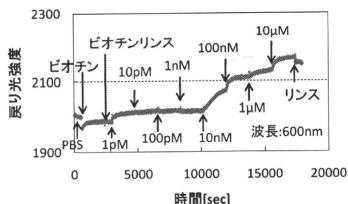


図3 濃度を徐々に増加させた際の戻り光強度。ここでは、直径50nmのAuNPを用いた。

図4に、2つめのAuNPのサイズを変えた時の戻り光強度の濃度依存性をプロットしたものを示す。AuNPのサイズは15、30、50nmである。直径30nmの微粒子では10pM〜100pM程度で変化が起きていることがわかる。1つの微粒子の場合に比べて1桁〜2桁の改善がみられることがわかった。

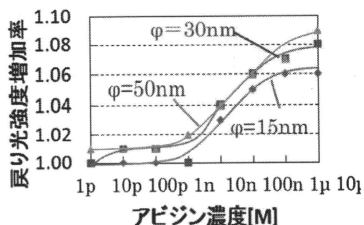
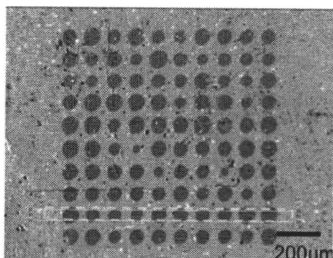


図4 戻り光強度増加率のアビジン濃度依存性

b. 高密度蛋白質チップの作成と検出

構築したチップおよび検出系の性能を確かめるため、良く規定された試料であるオクタデカンチオールSAMをスポットしたチップについて検出を行った。その結果を図5に示す。オクタデカンチオールSAMの厚さは、2.2nm程度であることがわかっており、均一で高い密度の単分子膜を形成する。図に示すように、透明な単分子膜であるにもかかわらず明瞭なオクタデカンチオールSAMの像を得ることができた。これは、金の異常反射に起因するイメージの増感による。金の異常反射とは、波長470nmの光に対しては、1nmの膜厚（物質の量として1ng/mm²）に対して1.1%の反射率変化を生じる現象である。表面プラズモンに類似した現象であり、バイオセンシングに用いることができる。得られた結果より、この手法が高密度な蛋白質チップの実現



CCDイメージ

ODT-SAMドット(φ65μm)

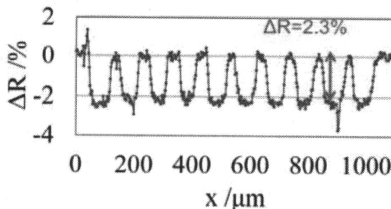


試料溶液

1.5mM ODT-SAM

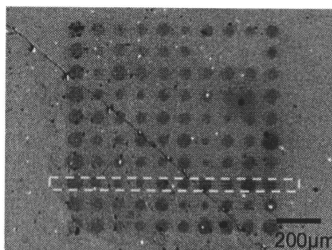
コンタクトタイム

1min



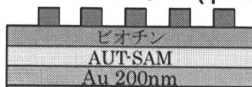
反射光強度変化

図5 オクタデカンチオール SAM をスポットしたチップの検出結果 (異常反射像) および反射率のクロスセクション



CCDイメージ

アビジンドット(φ60μm)

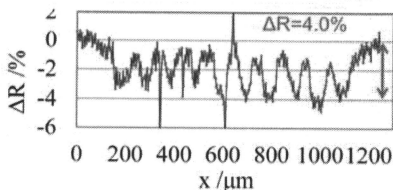


試料溶液

0.3mg/ml アビジン溶液

コンタクトタイム

10min



反射光強度変化

図6 アビジン蛋白質チップの検出結果 (異常反射像) および反射率のクロスセクション

に十分な性能を有することがわかった。

次にアビジン蛋白質のアレイの像を図6に示す。アビジン蛋白質のスポットティングはオクタデカンチオール SAM に比べて均一性が良くないので、図5と比べて明瞭さは劣るが、4%の反射率変化が得られており、蛋白

質チップとして十分な感度で検出ができていと考えられる。ただし、蛋白質のスポットティングには時間がかかり、アレイの作製時間は数時間を要した。これは、ビオチンとアビジン蛋白質の反応時間が遅いためである。

D. 考察

a. 2量体 AuNP による高感度化

これまでのウエットプロセス、ドライブプロセスで作成したプローブでは、アビジンの検出限界は 1nm 程度であった。また、昨年報告したサンドイッチアッセイ法では、検出限界は 10pM であった。ただし、サンドイッチアッセイ法では、煩雑であり定量製も確保できない短所がある。

今回行った AuNP の 2量体を用いたアッセイでは、10pM~100pM 程度が得られている。すなわち、蛋白質検出限界を 1/10~1/100 にすることに成功した。

b. 高密度蛋白質チップの作成と検出

アビジン蛋白質のチャンネル密度として 1 平方ミリメートルあたり 100ch の検出を行うことができた。用いたスポットのサイズの直径は 65 μ m であり、これを 100 μ m のセパレーションで 10 \times 10 個並べたチップである。これまで報告されている蛋白質の非標識バイオチップの中で最も高密度なマルチチャンネルバイオセンシングを達成することができた。

E. 結論

2量体化したナノ粒子 (NP) を用いて、アビジン蛋白質検出限界を 1/10~1/100 にすることに成功した。また、多種の検出対象物質を一度に検出できる方法として高密度蛋白質チップの作成と検出を行った。密度として 1 平方ミリメートルあたり 100ch と非常に高い密度でのマルチチャンネル検出を行うことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Yamaguchi, G. Okawa, K. Hashimoto, M. Shimojo, K. Kajikawa, "Phase of the electronic field localized at

surface-immobilized gold nanospheres determined by second-harmonic, interferometry", Phys. Rev., B, 83, 085425 (2011)(7pages).

2. Y. Uchiho, M. Shomojo and K. Kajikawa, "Electrooptic Effect and Optical Rectification in Gold Nanoparticles Immobilized above a Gold Surface", J. Phys. D: Applied Physics, 43, 495101 (2010) (4pages).
3. T. Yamaguchi, H. Okawa, K. Hashimoto and K. Kajikawa, "Formation Process of Self-Assembled Monolayer on Gold Nanosphere Probed by Second Harmonic Generation", Langmuir, 26, 14543-14547(2010).
4. A. Syahir, H. Mihara and K. Kajikawa, "A New Optical Label-Free Biosensing Platform Based on a Metal-Insulator-Metal Structure", Langmuir, 26, 6053-6057(2010).
5. Y. Uchiho, M. Shimojo, K. Furuya and K. Kajikawa. "Optical Response of Gold Nanoparticle-Amplified Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", J. Phys. Chem. C, 114, 4816-4824(2010).
6. 岡本隆之、梶川浩太郎 「プラズモニクス 基礎と応用」 講談社サイエンス 2010. 10. 1
2. 学会発表
 1. 梶川浩太郎 「非線形プラズモニクス」、第 58 回応用物理学関連連合講演会(神奈川県工科大学)、24 p-BG-8、2011. 3. 24~3. 27 (招待講演)
 2. 長井悠佑、山口達也、梶川浩太郎 「表面増強偏光ラマンスペクトルによる金ナノ粒子への分子吸着構造の評価」、第 58 回応用物理学関連連合講演会(神奈川県工科大学)、25 p-BH-12、2011. 3. 24~3. 27

3. 山口達也、梶川浩太郎 「金ナノ粒子を使ったプラズモニク構造の温度依存性」、第 58 回応用物理学関連連合講演会 (神奈川工科大学)、25a-BH-3、2011. 3. 24 ~ 3. 27
 4. 田中大輔、倉石央騎、下条雅幸、梶川浩太郎 「PDA ナノ結晶の光・電子線リソグラフィ」、第 58 回応用物理学関連連合講演会 (神奈川工科大学)、24p-KH-7、2011. 3. 24~3. 27
 5. 福場伸哉、梶川浩太郎 「マイクロコンタクトプリンティングを使った蛋白質マクロアレイの作製」、第 58 回応用物理学関連連合講演会 (神奈川工科大学)、25a-BV-22、2011. 3. 24~3. 27
 6. 梶川浩太郎 「表面プラズモンバイオセンシング」、2011 年電子情報通信学会総合大会 (東京都市大学)、CI-1-8、2011. 3. 14~17 (依頼講演)
 7. 梶川浩太郎 「表面プラズモンを使った輻射増強」、研究会 有機発光デバイスの発光の増強方法を開拓する II (京都工芸繊維大学)、2011. 3. 7 (招待講演)
 8. ティエンタインファン、大石健太、梶川浩太郎 「MIM 構造中の表面プラズモン共鳴による液晶光双安定素子」、第 71 回応用物理学学会学術講演会 (長崎大学)、15a-M-5、2010. 9. 14~17
 9. 山口達也、梶川浩太郎 「金基板上の金ナノ微粒子構造からの 2 光子励起光発光イメージング」、第 71 回応用物理学学会学術講演会 (長崎大学)、16p-NK-9、2010. 9. 14~17
 10. 倉石央騎、田中大輔、下条雅幸、梶川浩太郎 「表面プラズモン共鳴を利用した PDA ナノ結晶の Kerr 効果の測定」、第 71 回応用物理学学会学術講演会 (長崎大学)、14a-ZF-6、2010. 9. 14~17
 11. 梶川浩太郎 「光ファイバを使った局在プラズモンバイオセンシング」、第 61 回東工大精密工学研究所シンポジウム (東京工業大学蔵前会館)、2010. 7. 22 (招待講演)
 12. 梶川浩太郎 「プラズモニクスに関する最近の話題」、プラズモニクス研究会 (島津製作所東京支店イベントホール)、2010. 5. 26
 13. 山口達也、梶川浩太郎 「金ナノ微粒子表面に修飾する自己組織化単分子膜の被覆課程の調査」、プラズモニクス研究会 (島津製作所東京支店イベントホール)、2010. 5. 26
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許出願
梶川浩太郎・榎本 靖・松村康史・新田龍三 「金属微粒子複合体及びその製造方法」
出願人：国立大学法人東京工業大学・新日鐵化学株式会社
特許願 2010-123225 2010 年 5 月 28 日
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

ウイルス感染症（HBV, HCV）への応用に関する研究

研究分担者 坪内 博仁
鹿児島大学大学院医学総合研究科
健康科学専攻人間環境学講座
消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：本研究事業では極低濃度のウイルスを既存の方法より高感度かつ超早期に検出・診断する医療技術を開発する計画であり、分担研究者らは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。昨年度に引き続き、本年度も、B型急性肝炎、deNovoB型肝炎およびB型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療、およびC型慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療の経過中の血清サンプルを合計39名（HBV関連5名、HCV34名）、130検体（HBV23検体、HCV107検体）を集積した。また、健常者とC型慢性肝炎患者血清のプロテオーム解析を行い、C型肝炎ウイルスが存在すると、免疫関連分子の特異的な断片が出現しやすいことを見出した。

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検出できる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。

3) C 型慢性肝炎患者血清のプロテオーム解析
インターフェロン治療を行っていない C 型慢性肝炎患者血清と HCV 感染の無い健常者の血清を用いて、網羅的に蛋白発現解析する。

（倫理面への配慮）

- 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。
- 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 型急性肝炎、B 型慢性肝炎患者、および deNovoB 型肝炎の治療経過中の血清を経時的に採取出来た患者は 5 名で、合計 23 サンプルを集積した。
- 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 34 名の患者の治療前後の血清サンプルを合計 107 検体集積した。
- 3) インターフェロン治療を行っていない C 型慢性肝炎患者血清と HCV 感染の無い健常者の血清を用いて、プロテオーム解析した。HCV 感染者では肝障害がなくても、免疫関連分子の特異的な断片が出現することを見出し、この断片の出現が HCV 感染と関連する可能性を明らかにした。

D. 考察

deNovo B 型肝炎や C 型慢性肝炎の治療経過中にはウイルス量は既存の PCR 法では検出できないことが多いが、検出感度以下となっても、その後にウイルスが増殖することはよく知られている。本年度は、昨年に引き続き、このようなウイルスの存在が推定されるが PCR で検出できない状態の時期も含めて、血清サンプル

を経時的に集積した。また、今年度は、プロテオーム解析により、免疫関連分子の特異的な断片がHCV感染により出現することを見出した。この特異的な断片が極低濃度のHCVの存在下でも検出できるかは、今後の課題であるが、ウイルスの間接的な存在診断に応用できる可能性がある。また、共同研究者でウイルスを検出できる測定系が確立できた場合には、その検出系の感度・特異度も明らかにする予定である。

E. 結論

既存のPCR法では検出できないHBVもしくはHCVが存在する時期も含めて、患者血清を経時的に集積した。また、プロテオーム解析から免疫関連分子の特異的な断片がHCV感染で出現することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Changing etiologies and outcomes of acute liver failure: A perspective from Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011, Suppl 1: 65-71.
- Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. *Proteome Sci.* 2010; 8: 70.
- Oketani M, Tsubouchi H. Current status and prevention of fulminant hepatitis due to hepatitis B reactivation. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* 2010; 107: 1426-33.
- Ide T, Sata M, Sakisaka S, Nakamuta M, Fujiyama S, Mizuta T, Tahara K, Fujisaki K, Komorizono Y, Watanabe H, Morita Y, Tsubouchi H. Peginterferon- α -2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C as assessed by a multi-institutional questionnaire in Japan. *Hepatol Res.* 2010; 40: 557-65.
- 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.* 2010; 45: 459-67.
- 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.* 2010; 45: 326-34.

2. 学会発表

- Tamai T, Uto H, Takami Y, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Clinical significance of serum MnSOD levels in patients with hepatitis C virus (HCV)-related chronic liver disease. The 7th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference. 千葉市, 2010年12月.
- Hiramine Y, Uto H, Imamura Y, Tamai T, Baba Y, Hiwaki T, Sho Y, Tahara N, Ido A, Tsubouchi H: A comparative study of sorafenib and hepatic arterial infusion chemotherapy for unresectable advanced hepatocellular. The 7th APASL Single Topic Conference. 千葉市, 2010年12月.
- Kumagai K, Ido A, Takami Y, Sasaki F, Kure K, Tamai T, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H: Association of a genetic polymorphism in osteoactivin with hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. The 7th APASL Single Topic Conference. 千葉市, 2010年12月.
- 佐藤悠子, 宇都浩文, 高見陽一郎, 佐々木文郷, 熊谷公太郎, 最勝寺晶子, 小田耕平, 呉建, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 桶谷真, 井戸章雄, 中島知明, 岡上武, 坪内博仁: ALTが正常を維持するC型肝炎ウイルス持続感染者の血清プロテオミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会. 浦安市, 2010年7月.
- 熊谷公太郎, 桶谷真, 小田耕平, 最勝寺晶子, 橋口正史, 馬渡誠一, 呉建, 玉井努, 森内昭博, 宇都博文, 桶谷真, 井戸章雄, 坪内博仁: de novoB型肝炎における劇症化の病態と対策. 第96回日本消化器病学会九州支部例会. 宜野湾市, 2010年11月.
- 糖一晃, 熊谷公太郎, 井戸章雄, 最勝寺晶子, 橋口正史, 馬渡誠一, 呉建, 玉井努, 森内昭博, 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: B型慢性肝炎患ナイーブ例に対するラムブリ

ン投与例とエンテカビル投与例の比較検討.
第46回日本肝臓学会総会, 山形市, 2010年5
月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

平成 22 年度 分担研究報告書

ノロウイルスの高感度、迅速な検出法による院内感染対策への応用

研究分担者 中嶋 一彦 兵庫医科大学 感染制御部 講師

研究要旨: ノロウイルス感染は市中での感染のみならず、院内に持ち込まれることで、院内感染をしばしば生じ、嚴重な感染対策が必要である。現在、ウイルスの検出方法としてイムノクロマト法が一般に頻用されるが、感度は十分とはいえない。金ナノコロイド粒子によるウイルスの濃縮と高速 PCR を用いることにより、迅速性を保ちながらウイルスの検出感度を上げ、より精度の高い感染対策が可能であるかを検討する。

A. 研究目的

ノロウイルス感染患者からの臨床検体からウイルスの濃縮、検出を高感度、迅速に検出し感染の有無を特定することが、感染対策に有用であったかを検討する。

B. 研究方法

ノロウイルス感染を疑う患者の便を採取する。臨床検体をリン酸緩衝液に懸濁し、糖鎖を結合した金ナノ粒子と混和し濃縮を行う。金ナノ粒子と結合したウイルスを沈殿させ、上清を除去し、濃縮したウイルスから加熱により RNA を抽出する。得られた RNA を高速 PCR を用いて RT-PCR によりウイルス遺伝子の存在を確認する。患者が入院している場合、直ちにウイルスの有無を病棟、診療科に還元した。また、これを元に病院内での隔離の要否を決定し、院内伝播の防止するために患者の隔離または隔離の解除を行った。

（倫理面への配慮）

検体採取においては、患者の同意を持って提出された検体を用いた。検体採取は唾液、便であり苦痛を与える行為はない。

C. 研究結果

3 件事例で院内感染が原因となるノロウイルスの集団発生に対し、ウイルスの濃縮によるウイルスの存在の確認を行った。それぞれの事例 1 では 8 名、事例 2 では 7 名、事例 3 では 5 名の下痢、嘔吐などの症状を有する集団があった。それぞれの群に対し院内感染としてイムノクロマト法によるウイルス検出を行ったところ、検査が可能であった患者のうち 1 群では 3/7 例、2 群では 1/5 例、3 群では 2/5 例の陽性であった。しかし、高速 PCR を用いた検討では 1 群 4/6 例、2 群 4/5 例、3 群 4/5 例が陽性であった。また、濃縮を行った検体と濃縮を行わなかった検体の比較では、濃縮を行った検体からのみウイルス遺伝子の検出が可能な検体もみられた。この結果を用い、陰性の患者は個室隔離などの対策を中止した。また、症状が軽度または当初ノロウイルス感染が否定的であったため、個室への隔離を解除が検討されていた患者にたいしては、ノロウイルス感染症として隔離の継続や、環境消毒の徹底などを図り、さらなる院内感染の拡大阻止を行った。この結果、新たな感染者は出現しなかった。

D. 考察

本研究により便からノロウイルスが濃縮が可能であることが示され、イムノクロマトに比べ高い精度で診断が可能であることが示された。

濃縮の効果を利用し、環境などからの検出や感染経路の特定など臨床、疫学面への利用も可能と考えられる。

E. 結論

本研究で行った方法にて、ノロウイルスの検出が可能であり、臨床面への応用の可能が示された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヘルペスウイルス感染症への応用

分担研究者 奥野壽臣 兵庫医科大学・准教授

研究要旨：ヒトヘルペスウイルス（HSV-1、VZV、EBV、CMV、HHV-6A・B、HHV-7）がヘパリン結合金ナノ粒子（Heparin Gold Nano Particle、HGNP）によって濃縮できるか否かを調べた。ウイルス粒子と HGNP を混合し、HGNP を遠心沈殿させ、沈渣と上清中のウイルス量を定量 PCR 法で測定し比較した。その結果、EBV、HHV-6A・B は結合しなかった。CMV は一部結合する可能性が得られた。HSV-1、VZV と HHV-7 の結合は不明であった。

A. 研究目的

糖鎖結合金ナノ粒子を用いてヒトヘルペスウイルスを濃縮すること。

B. 研究方法

各ヒトヘルペスウイルスを含む液を 10,000g、10 分、2 回遠心した上清にヘパリン結合金ナノ粒子（Heparin Gold Nano Particle、HGNP）を加え、3 時間 4 度で反応させた。再び 10,000g、10 分遠心し HGNP を沈殿させ、その沈渣に PBS を加え元の量に戻した。その液と上清とにそれぞれプロテアーゼ K を加え、含まれるウイルス量を Real-time PCR で定量し、両者を比較した。HHV-6A・B は TaqMan PCR 用のプローブを用い、その他のウイルスは SYBR グリーン法で行なった。

C. 研究結果

EBV、HHV-6A・B の Real-time PCR による Ct 値は、元のウイルス液と HGNP

処理遠心の上清はほとんど同じであったが、HGNP 処理遠心の沈渣では 4 サイクル以上それより多かった。CMV の場合はそれらの増幅効率は同程度であった。HSV-1、VZV と HHV-7 の場合はウイルス DNA の増幅が起こらなかった。

D. 考察

EBV、HHV-6A・B での HGNP 処理遠心の沈渣がその上清よりも Ct 値がかなり多いということは、ウイルスが HGNP と結合して沈殿せず上清に残っていることを意味している。CMV でその両者の Ct 値がほぼ同じであるということは、ウイルスの半分程度が HGNP に結合して沈殿したことを表している。HSV-1、VZV と HHV-7 でウイルス DNA の増幅が起こらなかったのは、プライマーが良くなかった、ウイルスの量が少なすぎた、ことなどの要因が考えられた。

E. 結論

HGNPでCMVを濃縮することができる。
この方法で唾液中のウイルスの検出感度を
高めることができる可能性が示唆された。
HSV-1、VZVとHHV-7についてはさらなる
条件の検討が必要とされた。

F. 研究発表

1.論文発表

Okuno T, Hooper LC, Ursea R, Smith J,
Nussenblatt R, Hooks JJ, Hayashi K. Role
of human herpes virus 6 in corneal
inflammation alone or with human
herpesviruses. *Cornea*. 30: 204-207, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)-RT-PCR 法による患者唾液中のインフルエンザウイルス遺伝子の検出

研究分担者

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院小児科 講師

西 順一郎

研究要旨

糖鎖固定化金ナノ粒子(sugar-chain immobilized gold nano particles, SGNP)を用いた SGNP-RT-PCR 法は、従来の方法に比べて極めて高感度にウイルス検出が可能である。インフルエンザウイルスと結合しやすいヘパリンを固定した金ナノ粒子を用いることで、唾液中のインフルエンザウイルスの検出が可能となった。今回、インフルエンザ患者の 161 検体を用いて臨床での応用を検討した。唾液中のインフルエンザウイルスは、本法により成人ではほぼ全例で検出可能であった。小児でも年齢によらず検出できたが、鼻腔ぬぐい液と比べると偽陰性率 30%であった。本法による成人でのウイルス排泄期間の検討では、これまで報告されてきた 7 日間より長く、14~21 日に及ぶ患者もみられた。本法は非常に高感度であり、基礎疾患のある患者の早期治療や院内感染対策に応用可能であると考える。

A. 研究目的

糖鎖固定化金ナノ粒子(sugar-chain immobilized gold nano particles, SGNP)を用いた SGNP-RT-PCR 法は、従来の方法に比べて約 1000 倍程度感度が高い新たなウイルス検出法である。インフルエンザウイルスと結合しやすいヘパリンを固定した金ナノ粒子を用いることで、インフルエンザウイルスの高感度検出が可能となった。唾液中のウイルスも検出可能であり、臨床での応用が期待されているが、多数の臨床検体を用いた検討はまだ行われていない。本研究では、唾液検体を用いたインフルエンザの診断において本法の有用性を検討すること、さらにインフルエンザ患者におけるインフルエンザウイルスの排泄期間を本法で再検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象とした検体は、2010~2011 シーズンにおいて、鹿児島大学病院のインフルエンザ患者および罹患した職員からの 100 検体、川内こどもクリニック、川内市医師会立市民病院等の外来での小児インフルエンザ患者からの 61 検体である。小児の年齢は、8か月~15歳(中央値 7歳)であった。検体の内訳は、唾液 108 検体(うち綿棒採取 8 検体)、迅速イムノクロマト法キット測定に用いたのちの鼻腔ぬぐい液 53 検体である。

SGNP-RT-PCR は鹿児島大学理工学研究科の隅田研究室で行い、A 全般のプライマーと A/H1N1(2009)、A/H3N2 にそれぞれ特異的プライマーを設定して測定した。採取した検体は、MEM 液体培地と等量混合し、測定までは 4℃に保存した。