

イバー型シュガーチップを用いてファージのスクリーニングを行い、*N*-型糖鎖では 30 種類、*O*-型糖鎖では 42 種類のファージを単離した。その後、それぞれのファージから scFv の抽出・精製を行い、得られた 30 種類 (*N*-型糖鎖：12 種類、*O*-型糖鎖：18 種類) の scFv について FACS 解析による結合活性を測定した。

FACS 解析の結果、*O*-型糖鎖において S1T 細胞に特異的に結合する scFv 3 種類 (O1-2E-K21, O1-2E-K33, O1-2E-K34) が得られたが、scFv の安定性の問題から再現性をとることはできなかった。

\*本研究を進めるにあたっては、鹿児島大学大学院理工学研究科隅田研究室の多くの大学院生、学生に多大なご協力を頂きました。感謝申し上げます。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ◆ White Y, Arima N *et al.* Novel cytotoxic isolated from Jamaica *Hyptis verticillata jacq* induces apoptosis and overcomes multidrug resistance. *AntiCancer Research*, 31, 4251-4258, 2011
- ◆ Kozako T, Arima N *et al.* IPD-1/P D-L1 pathway-mediated immune responses against human T-lymphotropic virus type I in HAM/TSP and carriers with collagen disease. *Human Immunol.* 72, 1001-1006, 2011
- ◆ Hamasaki T, Baba M, Arima N *et*

*al.* Selective inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by a novel tetramethylnaphthalene derivative. *AntiCancer Research*, 31, 2241-2248, 2011

- ◆ Kozako T, Arima N *et al.* Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS Journal*, 278, 1358-1366, 2011

### 2. 学会発表

- ◆ Kozako T, Arima N *et al.* Over-expression of SIRT1 and induction of apoptosis by its inhibition in adult T cell leukemia cells. 15<sup>th</sup> International Conference of Human Retrovirology; HTLV, Leuven, Belgium, 2011, June 5.

## G. 知的財産権の出願・登録情報

### 1. 特許出願；

名称 シソ科植物ヒプティス・ヴェルチシラータ (*Hyptis verticillata*) 由来の抗腫瘍剤およびその製造方法

番号；特願2011-114629

出願年月日；平成23年5月23日

国内

## 日本脳炎ウイルス（JEV）の糖鎖結合能に関する研究

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

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：フラビウイルス科に属するウイルスの、糖鎖に対する結合能を明らかにする目的で、昨年度は不活化した日本脳炎ウイルス（JEV）を用いて、その糖鎖結合能について調べたが、今年度は感染性のあるウイルス粒子を用いて同様の検討を行い、不活化ウイルス粒子の糖鎖結合能と比較した。その結果、感染性 JEV は不活化 JEV と同様に、負の電荷を有するヘパラン硫酸系糖鎖に対して結合性を示すとともに、コンドロイチン硫酸系糖鎖に対しては、一部のものだけに結合した。

### A. 研究目的

フラビウイルス科 (*Flaviviridae*) に属するウイルスは、エンベロープを有する 1 本鎖の+鎖 RNA ウイルスであり、粒子は 40-60 nm の直径を持つ。フラビウイルス科にはフラビウイルス属、ペスチウイルス属、ヘパシウイルス属の 3 属が存在する。フラビウイルス属の主なものとしては、黄熱病ウイルス (YFV)、デング熱ウイルス (DENV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、西ナイルウイルス (WNV) があり、何れも蚊やダニによって媒介される。ペスチウイルス属の主なものとしては、ウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) やブタコレラウイルス (SFV) があり、これはヒトには感染しないが、家畜には重篤な疾患を引き起こす。ヘパシウイルス属には C 型肝炎ウイルス (HCV) があり、これは主に感染血の輸血によって感染し、感染すると高頻度に慢性肝炎へと移行し、肝ガンの原因となる。

これらの中で、特にフラビウイルス属のウイルスは、ヒトに対して重篤な疾患を引き起こすことがあり、発症予防や治療の点からも、高感度で特異的なウイルス検出法が必要である。そ

こで、本研究では JEV に特異的に結合する糖鎖が存在するかどうかについて検討し、もし特異的な糖鎖が同定出来れば、それを用いて高感度なフラビウイルスの検出方法を確立することを目的としている。昨年度は実験室内で安全に取り扱えるホルマリン不活化 JEV を用いて、その糖鎖結合能について調べたが、今年度は感染性のある JEV を用いて、同様の検討を行った。

### B. 研究方法

ウイルスと細胞：実験には JEV の Bejin 株を用いた。ウイルスは長崎大学熱帯医学研究所の森田公一教授より分与された。ウイルスの増殖にはハムスター腎細胞である BHK-21 を使用した。BHK-21 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FCS) 添加 Dulbacco's Modified Eagle Medium DMEM 培地中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて培養した。ウイルスストックは細胞に JEV を感染させ、3 日間培養後に上清を回収し、3,000 rpm にて 5 分間遠心処理して上清を回収したものをを用いた。ウイルス液は使用するまで -80°C に保存した。

ウイルスの濃縮と精製:JEV の糖鎖への結合能を糖鎖チップを用いて測定するために、ウイルスの濃縮と精製を行った。具体的には、得られたウイルスストック液 100 ml を 0.45  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過した。濾過したウイルス液は、次に超遠心 (100,000  $\times$  g, 90 分, 4 $^{\circ}$ C) を行い、得られた沈澱物を 1 ml のリン酸緩衝液 (PBS) に再浮遊させた。これを再び超遠心 (100,000  $\times$  g, 90 分, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた沈澱物を 500  $\mu$ l の 0.05% の Tween 20 を含む PBS (T-PBS) に再浮遊させ、これを「超遠心後の上清」と規定した。さらに、このサンプルを

T-PBS にて n 倍ずつ希釈し、「n 倍希釈サンプル」とした。

糖鎖結合能の測定:得られたサンプルは、図 1 に示すような糖鎖をマウントした糖鎖チップ MultiSPR-052-cho-01 (株式会社 スディックバイオテック) と表面プラズモン共鳴測定装置 (1 channel 96 ligands SPR, Toyobo) を用いて、その糖鎖結合能を解析した。

(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。また、動物実験も行っていない。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Gc 4Gc	Gc 4Gc 4Gc	Gc 6Gc 4Gc	Gc 6Gc	Gc 6Gc 6Gc	Gc 3Gc 3 Gc	Gc 4Gc	Gc 6Gc	Ga 6Gc	Ga 4Ga 4 Gc	Ga GaN Ac $\alpha$ 6Gc	Ga GcN Ac $\beta$ 6Gc
<b>B</b>	Ga 4Gc	Ga 4[Fc 3]GcNAc 3Ga 6Gc	Ma 2Ma	Ma 3Ma 6Ma	Ma 6Ma	Fc 2Ga 4 Gc	Fc 6Gc	Fc 6Gc	Xy $\beta$ 6Gc	GcNAc 6 Gc	GcNAc GcNAc	GcNAc 6 Gc
<b>C</b>	GcNAc 3 Ga 4GcN Ac 3Ga 4 Gc	GaNAc 6 Gc	GaNAc 3 Ga	NeuAc 23 Ga 4Gc	NeuAc 23 Ga 4GcN Ac	NeuAc 23 Ga GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 23 Ga 4GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 26 Ga 4Gc	NeuAc 26 Ga GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 26 Ga 4GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 26 GaNAc $\alpha$ 6Gc	Heparin
<b>D</b>	Chondoriti n	Chondoriti n A	Chondoriti n B	Chondoriti n C	Chondoriti n D	Chondoriti n E	GcNS6S 4GcA 6G c	GcNS6S 4IdA2S 6 Gc	GcNS6S 4IdA2S 6 Gc	GcNS 4G cA 6Gc	GcNS 4Id A2S 6Gc	GcA 3Ga NAc4S6S 6Gc
<b>E</b>	Gc 4Gc	Gc 6Gc	Ga 6Gc	Ga 4Ga 4 Gc	Ga GaN Ac $\alpha$ 6Gc	Ga GcN Ac $\beta$ 6Gc	Gc 4Gc	Gc 4Gc 4Gc	Gc 6Gc 4Gc	Gc 6Gc	Gc 6Gc 6Gc	Gc 3Gc 3 Gc
<b>F</b>	Fc 6Gc	Fc 6Gc	Xy $\beta$ 6Gc	GcNAc 6 Gc	GcNAc GcNAc	GcNAc 6 Gc	Ga 4Gc	Ga 4[Fc 3]GcNAc 3Ga 6Gc	Ma 2Ma	Ma 3Ma 6Ma	Ma 6Ma	Fc 2Ga 4 Gc
<b>G</b>	NeuAc 23 Ga 4GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 26 Ga 4Gc	NeuAc 26 Ga GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 26 Ga 4GcN Ac $\beta$ 6Gc	NeuAc 26 GaNAc $\alpha$ 6Gc	Heparin	GcNAc 3 Ga 4GcN Ac 3Ga 4 Gc	GaNAc 6 Gc	GaNAc 3 Ga	NeuAc 23 Ga 4Gc	NeuAc 23 Ga 4GcN Ac	NeuAc 23 Ga GcN Ac $\beta$ 6Gc
<b>H</b>	GcNS6S 4GcA 6G c	GcNS6S 4IdA2S 6 Gc	GcNS6S 4IdA2S 6 Gc	GcNS 4G cA 6Gc	GcNS 4Id A2S 6Gc	GcA 3Ga NAc4S6S 6Gc	Chondoriti n	Chondoriti n A	Chondoriti n B	Chondoriti n C	Chondoriti n D	Chondoriti n E

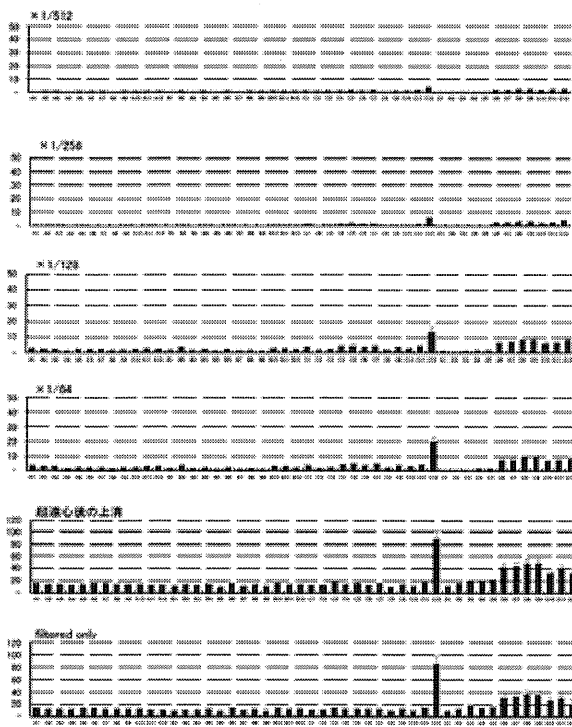
図 1. 糖鎖チップのレイアウト

### C. 研究結果

今回の実験では、複数のロットを準備し、その中から感染価の高い 2 つの異なるロットを選択し、それぞれの糖鎖結合能について解析した。それぞれのサンプルを解析した結果、図 2 に示すような糖鎖結合のパターンがみられた。

今回のサンプルは、昨年度に不活化ウイルスを用いて実施した実験結果とは異なり、「超遠心後の上清」を 512 倍まで希釈しても、ウイルス特異的なシグナルを検出することが可能であった。また、2 つのロット間で結果に違いは認められなかった。

実験 (1) JEV-lot 20110801



実験 (2) JEV-lot 20110804

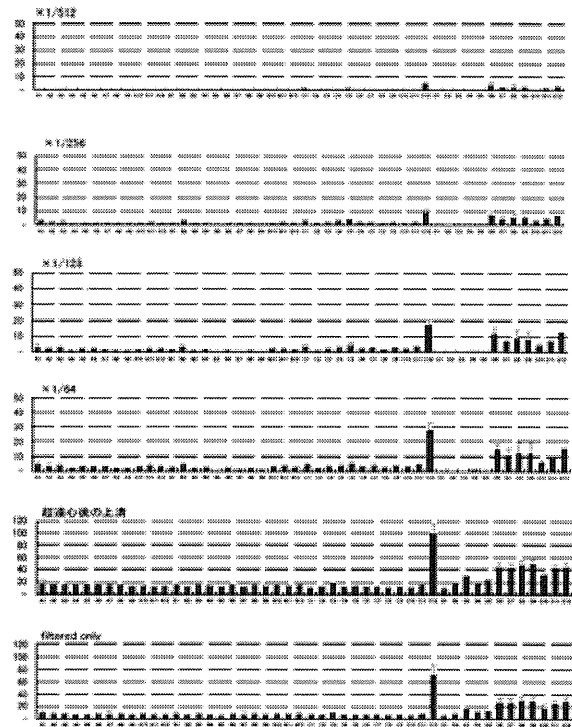


図 2. 各サンプルの糖鎖結合能

D. 考察

今回、感染性 JEV を用いて得られた実験結果を、昨年度に不活化 JEV を用いて得られた結果と比較すると、感染性 JEV も全ての HS 系糖鎖に対して結合性を示した (図 3)。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ップタンパク質との、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、JEV は CS E にだけ結合した (図 3)。これらの結果については、不活化 JEV で得られた結果と差がないことから、JEV に関する限り、ホルマリンによる不活化はウイルス粒子の糖鎖結合能に影響を与えないことが分かった。しかしながら、今回実験に用いた JEV の培養上清は、昨年度実験に用いた JEV の培養上清と比

較して、きわめて強い糖鎖結合能を有しており、これがウイルスの株の違いによるものなのか (Nakayama 株 vs. Beijin 株)、あるいはホルマリンで不活化することによる糖鎖結合能の低下によるものなのかは、今後の検討課題である。

また、今回の実験においても、負の電荷を持っていない GcNAc 系の糖鎖に対し BVDV が結合したのに対し、JEV は GcNAc 系の糖鎖に対しては結合が観られなかった。

E. 結論

今年度の本研究において、感染性を有する JEV の糖鎖結合能は、ホルマリンで不活化した JEV と質的に同様の特異性を有する糖鎖結合能を示すことが明らかとなった。しかし、これは、同じフラビウイルス科に属する BVDV の糖鎖結合能とは異なり、むしろヘルペスウイルスのそれと類似していることも、昨年結果と同様であった。

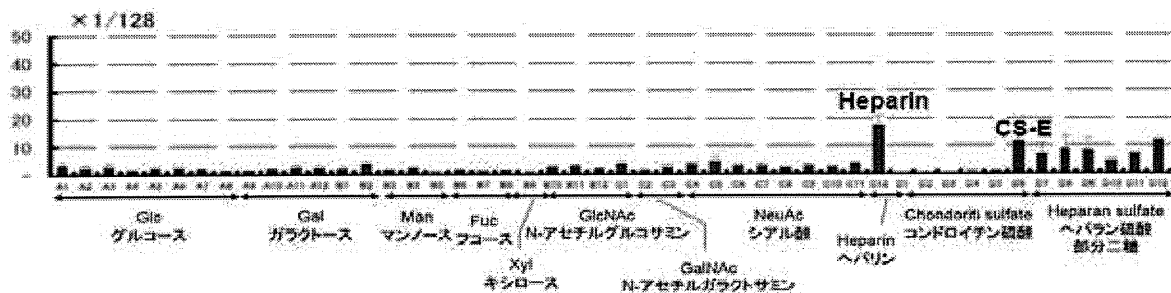


図3. 感染性 JEV の糖鎖への結合

## F. 研究発表（本研究に関係するもの）

### 1. 論文発表

1. Aoyama H, Sugita K, Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Hashimoto Y. Fused heterocyclic amino compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.* **19**:2675-2687 (2011).
2. Salim MTA, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**:714-719 (2011).

### 2. 学会発表

1. Mohammed TA Salim, Hiroshi Aoyama, Kazuyuki Sugita, Kou-ichi Watashi, Mika Okamoto, Yuichi Hashimoto, Masanori Baba. Discovery of novel phenanthridinone derivatives as selective inhibitors of HCV replication. 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 2011 年 5 月 29 日, 金沢.
2. 岡本実佳, 張 旭, 濱崎隆之, 隅田泰生, 馬場昌範. 糖固定化金ナノ粒子技術を用いた HIV-1 感染症新規予防法および早期診断法の開発. 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 2011 年 5 月 30 日, 金沢.
3. Okamoto M, Zhang X, Hamasaki T, Nishi Y,

Suda Y, Baba M. The binding specificity of HIV-1 to sugar-chains and the concentration of HIV-1 using heparin-immobilized gold nanoparticles toward the discovery of anti-HIV-1 effects of sugar-chains and a super high sensitive diagnosis. *15th International Congress of Virology*, September 15, 2011, Sapporo, Japan.

4. Salim MTA, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Okamoto M, Hashimoto Y, Baba M. Discovery of novel phenanthridinone derivatives as selective inhibitors of HCV replication. *15th International Congress of Virology*, September 15, 2011, Sapporo, Japan.
5. 岡本実佳, 張 旭, 濱崎隆之, 外山政明, 隅田泰生, 馬場昌範. 糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた HIV-1 感染症新規予防法および早期診断法の開発. 第 25 回日本エイズ学会学術集会, 2011 年 12 月 1 日, 東京.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

台湾出願特許 101107378 (2012/3/5)、H I V - 1 の低侵襲的な簡便かつ高感度検査法、隅田泰生、馬場昌範、岡本実佳（出願人：世錡生命科學有限公司）

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 23 年度 分担研究報告書

糖固定化技術を用いた各種 HIV-1 の糖鎖結合性の解明および  
唾液中 HIV-1 の迅速診断法の開発

研究分担者 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）

外山政明（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

橋口照人（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

古川良尚（鹿児島大学附属病院）

馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

研究要旨： 現在、標準的な HIV-1 感染症の診断には血液検体を用いられているが、血液検査を受けられる施設の不足から、全世界において、多くの HIV-1 感染者が標準的な HIV-1 検査を受けることが困難な状況にある。HIV-1 感染者の唾液中には微量の HIV-1 が含まれる。そのため、唾液は血液に代わり HIV-1 感染診断の検体となる可能性がある。そこで、本研究では、糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮技術を用いて、唾液を検体とする HIV-1 診断法の開発を行った。糖鎖固定化技術を用いて開発されたシュガーチップ法による解析の結果、R5、X4 HIV-1 いずれにおいても、Heparin および type E chondroitin sulfates (CS-E) は HIV-1 に特異的に結合することが明らかになった。また、分子量約 2,500 のデキストラン硫酸 (DS25) も Heparin と同様の結合性を示した。これらの結果から、HIV-1 と糖鎖との結合には、硫酸化多糖の硫酸基に由来する (-) 電荷と HIV-1 の表皮タンパク gp120 の (+) 電荷部位との静電的相互作用が重要であると考えられる。Heparin または DS25 を固定させた金ナノ粒子 (Heparin-GNP または DS25-GNP) を用いて HIV 感染者唾液中の HIV-1 の濃縮後、リアルタイム RT-PCR 法で HIV-1 RNA の検出を行い、臨床における血液検査の結果と比較した。その結果、14 例中 1 例が 10 コピー以上、12 例が 10 コピー未満であった。一方、13 例の血漿 HIV-1 RNA は、2 例が 40 copies/ml 以上、11 例が 40 copies/ml 未満であった。この判定基準において、血液検査との一致率は 85.7%であった。これらの結果は、HIV-1 検査において、唾液検体は血液検体の代替となる可能性があることを示している。

## A. 研究目的

抗レトロウイルス化学療法および HIV-1 予防活動により HIV-1 新規感染者数は 1999 と比べ 19%減少した。しかし、2009 年時点で、未だ全世界で 260 万人の人々が新たに HIV に感染している。HIV 感染者数の多い地域のほとんどは低所得の国々である。HIV-1 検査は血液検体を用いて行われるため、臨床検査施設が十分でないそれらの地域では、多くの人々にとって HIV-1 検査を受けることは困難になっている。そのため、HIV-1 感染拡大を防ぐためには、血液検査に代わる簡便かつ有効な HIV-1 検査法の開発が急務である。

簡便で有効な HIV-1 診断法の開発を目指し、我々はこれまで、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 の検出法の研究開発を行ってきた。シュガーチップ法により HIV-1 の糖結合プロファイルを解析した結果、Heparin、CS-E、合成ヘパラン硫酸部分二糖類に、X4 HIV-1 に対する特異的な結合を認めた。また、HIV-1 産生細胞の違いによって HIV-1 結合糖プロファイルの変化はないことを明らかにした。さらに、ヘパリンを固定化した金ナノ粒子 (Heparin-GNP) による HIV-1 濃縮法は、唾液中の HIV-1 の検出感度を著しく増加させることを明らかにした。

本年度は、シュガーチップ法により R5 HIV-1 を含めた、さらなる HIV-1 結合糖プロファイルの解析を行った。また、Heparin-GNP または DS25-GNP を用いて HIV-1 感染者唾液中からの HIV-1 RNA の検出を試みた。

## B. 研究方法

(1) 糖鎖チップを用いた R5 HIV-1 の結合糖プロファイルの解析 (図 1)

X4 HIV-1 である HIV-1 III<sub>B</sub> 株の慢性感染細胞である MOLT-4/III<sub>B</sub> 細胞の上清および R5 HIV-1 である HIV-1 Ba-L 株感染により HIV-1 産生を誘導した MOLT-4/CCR5 細胞の上清をそれぞれフィルターろ過した後、10,000 × g で 90 分間遠心後、上清を取り除いて PBS に溶解したものをさらに同様の操作を繰り返したものをシュガーチップに結合させ、SPR imaging で解析した。

(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 法による唾液中 HIV-1 の検出 (図)

14名の男性 HIV-1 感染者より唾液を採取した。感染者の CD4 陽性細胞値は 256–641/μl、平均 427/μl であった。

HIV-1 感染者より採取した唾液 250 μl に PBS を等量加えた。Heparin-GNP または DS25-GNP を 10 μl 加え、時々攪拌しながら室温で 30 分間静置後、10,000 × g、10 分間遠心した。沈殿物に水 10 μl を加えて溶かし、TaKaRa One Step SYBR<sup>®</sup> (PrimeScript<sup>®</sup> 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'-tggtactagatgctccctcagacc-3') および 620T (5'-agctcctctggtttccctttc-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 遺伝子の測定を行った。

(3) HIV-1 感染者血漿中の HIV-1 RNA 定量

COBAS<sup>®</sup> AmpliPrep/COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup>

HIV-1 Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) を用いて、唾液採取時と同時に採取された血漿中の HIV-1 RNA 定量は行われた。

(倫理面への配慮)

本研究において、臨床検体を使用した実験は、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理審査を受け、その了承の基に行われた。動物実験は行っていない。以上より、倫理面の問題はないと考えられる。

### C. 研究結果

47 種類の糖鎖が乗ったシュガーチップを用いたシュガーチップ法による解析の結果、X4 HIV-1 と R5 HIV-1 で糖鎖結合パターンに大きな違いは認められず、Heparin および CS-E で HIV-1 に対する特異的な結合が認められた。また、DS25 も Heparin と同様の結合性を示した (図 2)。

Heparin-GNP または DS25-GNP を用いて HIV 感染者唾液中の HIV-1 の濃縮を行い、リアルタイム RT-PCR 法で HIV-1 RNA の検出を行った結果、14 例中 1 例が 10 コピー以上、12 例が 10 コピー未満であった。一方、13 例の血漿 HIV-1 RNA は、2 例が 40 copies/ml 以上、11 例が 40 copies/ml 未満であった。この判定基準において、血液検査との一致率は 85.7% であった (表 1)。

### D. 考察

シュガーチップ法による解析の結果、co-receptor 利用性の違いによる HIV-1 結合糖プロファイルの大きな差は認められなかった。また、DS25 も X4 HIV-1、R5

HIV-1 どちらに対しても、Heparin と同様の結合性を示した。これらから、HIV-1 と糖鎖との結合には、硫酸化多糖の硫酸基に由来する (-) 電荷と HIV-1 の表皮タンパク gp120 の (+) 電荷部位との静電的相互作用が重要であると考えられる。

DS25 が X4 HIV-1、R5 HIV-1 どちらに対しても、Heparin と同様の結合性を示したことから、Heparin-GNP または DS25-GNP を用いて、HIV-1 感染者唾液中の HIV-1 の濃縮およびリアルタイム RT-PCR 法による検出を行った。唾液中の HIV-1 RNA 量が 10 コピー以上を陽性とした場合、血漿を用いた通常の HIV 検査との結果の一致率は 85.7% と比較的高い結果であった。これまでに報告された、リアルタイム RT-PCR 法により HIV-1 感染者からの唾液中の HIV-1 RNA を測定した研究では検出率は感染者の約 40% である [Shepard, et al., 2000; Shugars et al., 2000; Shugars et al., 2001; Navazesh et al., 2010]。それらと比較すると、今回、Heparin-GNP または DS25-GNP による濃縮後、リアルタイム RT-PCR 法で検出した結果では、血漿中の HIV-1 RNA が 40 コピー以上であった 3 症例中 1 例で唾液中の HIV-1 RNA 量が 10 コピー以上であり、検出率はやや低い。今後、症例数を増やしてさらに検討する必要があると思われる。

### E. 結論

X4、R5 HIV-1 いずれにおいても、HIV-1 結合糖プロファイルに大きな差はなく、硫酸化率の高い糖鎖に HIV-1 への選択的な結合が認められた。Heparin または DS25 を固定化した金ナノ粒子を用いて HIV-1 感染者 14 例の唾液中の



HIV-1 の濃縮およびリアルタイム RT-PCR 法による検出を行った結果、血漿を用いた通常の HIV-1 検査との結果の一致率は 85.7%であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ◆ Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 415: 714-719, 2011.
- ◆ Hamasaki T, Toyama M, Aoyama H, White Y, Okamoto M, Arima N, Hashimoto Y, Baba M. Selective inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by a novel tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* 31: 2241-2247, 2011.
- ◆ Aoyama H, Sugita K, Nakamura M, Aoyama A, Salim MT, Okamoto M, Baba M, Hashimoto Y. Fused heterocyclic amido compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg med Chem.* 15: 2675-2687, 2011.

### 2. 学会発表

- ◆ Mika Okamoto, Xu Zhang, Takayuki Hamazaki, Yousuke Nishi, Yasuo Suda, Masanori Baba. The binding specificity of HIV-1 to sugar-chains and the concentration of HIV-1 using heparin-immobilized gold nanoparticles toward the discovery of anti-HIV-1 effects of sugar-chains and a super high sensitive diagnosis. XV International Congress of Virology September 2011, Sapporo.
- ◆ 岡本実佳, 張 旭, 濱崎隆之, 外山政明, 隅田泰生, 馬場昌範. 糖固定化金ナノ粒子技術を用いた HIV-1 感染症新規予防法および早期診断法の開発. 第 25 回日本エイズ学会 2011 年 11 月 (東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

台湾出願特許 101107378 (2012/3/5)、H I V- 1 の低侵襲的な簡便かつ高感度検査法、隅田泰生、馬場昌範、岡本実佳 (出願人: 世錡生命科學有限公司)

図1. シュガーチップ法による HIV-1 結合糖プロファイルの解析 (実験方法)

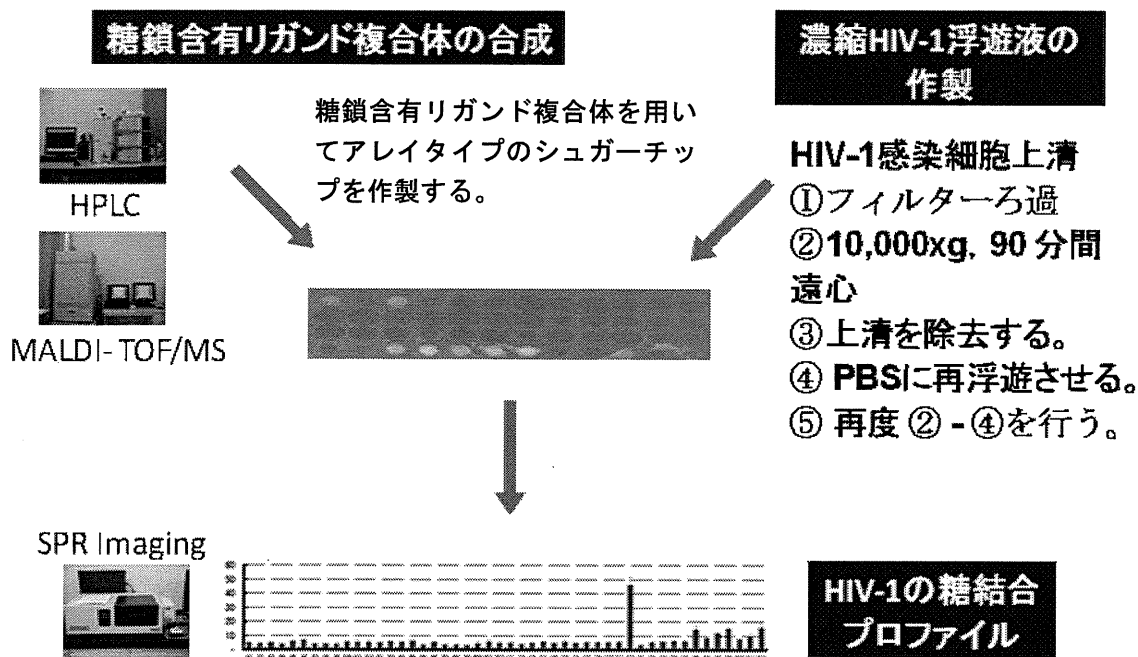


図2. シュガーチップ法による HIV-1 結合糖プロファイルの解析 (実験結果)

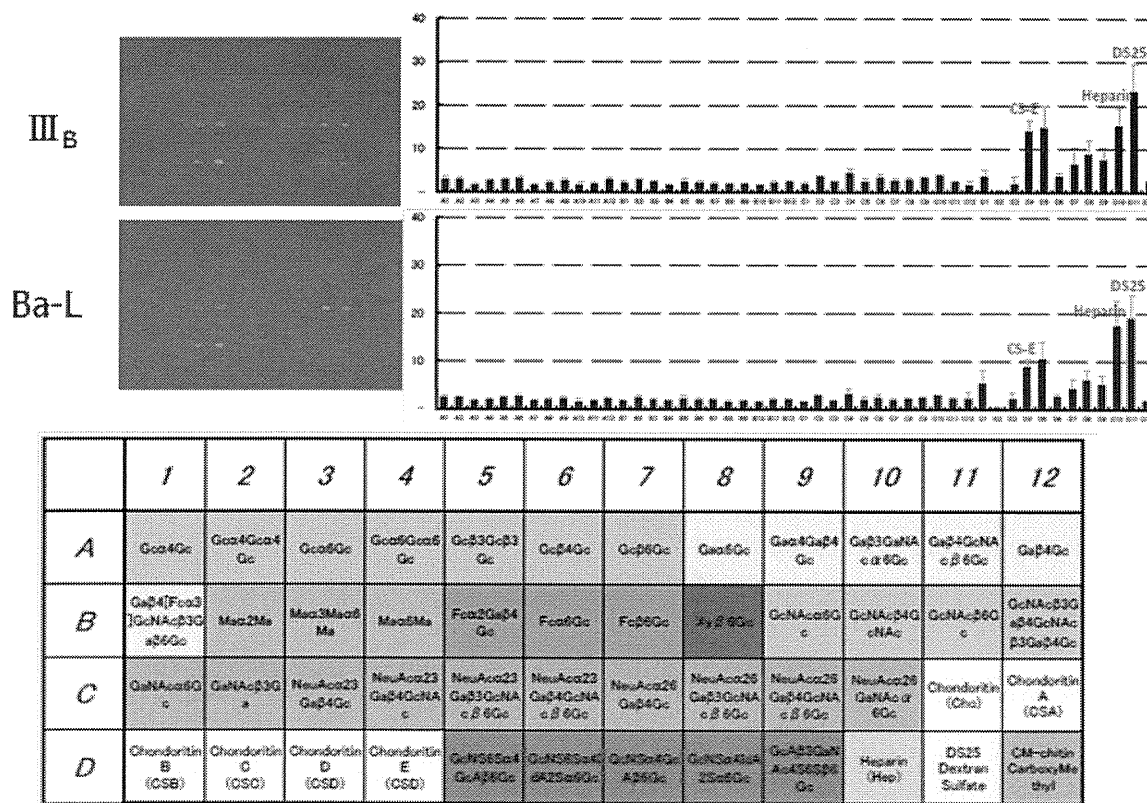


表1. リアルタイム RT-PCR 法による HIV-1 RNA の検出 (臨床検体)

Plasma \ Saliva	(+) (>40 copies/ml)	(-) (<40 copies/ml)
(+) (>10 copies/ml)	1	0
(-) (<10 copies/ml)	2	11

血漿と唾液は同時に採取

Plasma : COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (Roche Molecular Systems, Inc.) を用いて検出

Saliva : DS25-GNPを用いて濃縮後、リアルタイムRT-PCR法で検出

糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた肝炎ウイルスの超高感度検出系の確立

研究分担者 井戸 章雄  
鹿児島大学大学院医歯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 准教授

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、本年度は(1) 極低濃度の HBV を検出可能とする高感度検出系、および(2) 唾液中 HCV 検出系の確立を目的に、HBV と特異的に結合する糖鎖抗原の同定と糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた唾液中 HCV の検出を試みた。HBs 抗原の糖鎖結合能の解析から、硫酸基がクラスター化している糖鎖に結合することが明らかとなった。従って、HCV 同様、糖鎖固定化金ナノ粒子 DS25-GNP で濃縮できる可能性が考えられた。一方、唾液中 HCV-RNA が検出可能であったものは 13 例中 1 例のみであった。そこで、血清 HCV-RNA 量が明らかな HCV 持続感染者の血清を用いて DS25-GNP による HCV の濃縮が可能か否かを検討したところ、100x、1000x に希釈した血清から HCV-RNA が検出されたことから、本方法によって HCV が濃縮可能であることが確認された。以上の結果から、HBs 抗原に特異的に結合する糖鎖が明らかとなり、DS25-GNP で HBV が濃縮できる可能性が示唆された。また、DS25-GNP を用いた唾液中 HCV-RNA 検出系では検体の保存方法などを改良して、最適化、さらに定量性の検証を行う必要が考えられた。

共同研究者

今中 大 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
梶 一晃 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学

A. 研究目的

我が国の慢性肝炎の大部分は B 型肝炎ウイルス（HBV）あるいは C 型肝炎ウイルス（HCV）の感染（ウイルス性肝炎）であり、活動性の慢性肝炎は、長期間を経て肝硬変となり、肝細胞癌発生に至る可能性が高い。わが国では HBV 保有者（キャリア）は約 130～150 万人いるが、その多くが非活動性キャリアで、病変が進行して病変が進行して肝硬変・肝細胞癌に至るのはその約 1 割であるが、B 型慢性肝炎では必ずしも

肝硬変を経ないで、軽度の肝障害から肝細胞癌の発生をきたすことがある。さらに、これまで臨床的治癒と考えられてきた HBc 抗体あるいは HBs 抗体陽性の HBV 既往感染者に免疫抑制・化学療法後に HBV 再活性化による肝炎が発症することが報告され、微量な HBV を検出可能とする高感度測定法の開発が期待されている。一方、HCV 保有者（キャリア）は、我が国では約 150～200 万人と報告されているが、その約半数が肝機能の安定した慢性肝炎の状態とみなされている。しかし、ALT 上昇を伴う活動性の慢性肝炎は、長期間、肝所に病変が進行して肝硬変・肝細胞癌に至ることが多く、肝細胞癌の 70～80% が C 型肝硬変・慢性肝炎を背景に発生している。現在、血清 HCV 抗体検査が HCV 保有者のスクリーニングに用いられているが、血液検体の採取を必要とするため、保険所や医療機

関を受診する必要があり、特に 40-50 歳代の働き盛りの世代ではスクリーニング検査が進んでいないのが実情である。さらに今後肝疾患が進展して問題が顕在化することが懸念される発展途上国において、血清 HCV 抗体検査による HCV 保有者のスクリーニングはその簡便性、費用の面から実施困難となることが考えられ、血液以外の検体を用いた HCV 検出系の確立が期待される。

以上より、本研究では(1) 極低濃度の HBV を検出可能とする高感度検出系、および(2) 唾液中 HCV 検出系の確立を目的に、HBV と特異的に結合する糖鎖抗原の同定と糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた唾液中 HCV の検出を試みた。

## B. 研究方法

### 1) HBs 抗原の糖鎖結合能の検討

① HBs 抗原産生ヒト肝癌細胞株 PLC/PRF/5 細胞の細胞抽出液および培養上清における HBs 抗原発現量を、二種類の HBs 抗体 (MCA4658 および OBT0990P) を用いたウェスタン法で検出した。

② PLC/PRF/5 細胞の培養上清を用いてシュガーチップ解析を行い、HBs 抗原の糖鎖結合能を検討した。

### 2) 唾液中 HCV-RNA 検出系の基礎的検討

① HCV 持続感染者 13 名より同意を得て採取した唾液 500  $\mu$ l を 100 倍に希釈して 5 ml とし、糖鎖固定化金ナノ粒子 DS25-GNP と 30 分間混和した後、上清および沈殿溶出液を用いて HCV-RNA を定量的 RT-PCR にて測定した。

② HCV 持続感染者 5 名より文書同意を得て採取した血清検体 500  $\mu$ l を 10 倍希釈した後、4 段階 (1x、10x、100x、1000x) に希釈した検体 500  $\mu$ l に DS25-GNP 10  $\mu$ l を加えて 30 分間混和し、上清および沈殿溶出液を用いて HCV-RNA を定量的 RT-PCR にて測定した。

(倫理面への配慮)

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) HBs 抗原の糖鎖結合能の検討

① ヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 ではその細胞抽出液および培養上清、いずれにおいても HBs 抗原タンパクが検出された。また使用した二種類の抗体 ((MCA4658 および OBT0990P) 間で HBs 抗原の検出感度および特異性に差はみられなかった。

② PLC/PRF/5 細胞の培養上清を用いて HBs 抗原の糖鎖結合能を検討したところ、HBs 抗原は硫酸基がクラスター化している糖鎖に結合した。

### 2) 唾液中 HCV-RNA 検出系の基礎的検討

① 唾液を採取した 13 名の HCV 持続感染者 (慢性肝炎 2 名、肝癌 11 名) の血清 HCV-RNA は 3.6-6.5 logIU/mL であった。これらの患者において唾液中 HCV-RNA が検出されたのは 1 名 (血清 HCV-RNA 6.5 logIU/mL) のみであった。

② 血清を採取した HCV 持続感染者 (慢性肝炎 3 名、肝癌 2 名) の血清 HCV-RNA は 5.7-6.8 logIU/mL であった。DS25-GNP による濃縮を行うと、これらの患者血清の 100x および 1000x 希釈液から HCV-RNA が検出された。一方、10x 希釈液からは HCV-RNA は検出されなかった。

## D. 考察

HBs 抗原の糖鎖結合能の解析から、硫酸基がクラスター化している糖鎖に結合することが明らかとなった。従って、HCV 同様、糖鎖固定化金ナノ粒子 DS25-GNP で濃縮できる可能性が考えられた。今後、HBV 持続感染者の血清のみならず、唾液中の HBV 検出系への応用が期待される。

唾液中 HCV-RNA は 13 例中 1 例のみにて検出された。PCR による唾液中 HCV の検出率は 40～50%と報告されており、本研究における検出率は低いものであった。そこで、血清 HCV-RNA 量が明らかな HCV 持続感染者の血清を用いて DS25-GNP による HCV の濃縮が可能か否かを検討したところ、100x、1000x に希釈した血清から HCV-RNA が検出されたことから、本方法によって HCV が濃縮可能であることが確認された。一方、10x 希釈した血清では HCV-RNA は検出できなかった。これは血清中のタンパクが HCV と糖鎖固定化金ナノ粒子上の糖鎖の結合を阻害していることによるものと考えられ、100x 以上に血清を希釈することで解決できることも明らかとなった。

## E. 結論

今回、HBs 抗原に特異的に結合する糖鎖が明らかとなり、DS25-GNP で HBV が濃縮できる可能性が示唆された。また、DS25-GNP を用いた唾液中 HCV-RNA 検出系ではその陽性率が低かったが、HCV 持続感染者の血清では高感度に HCV-RNA が検出されたことから、唾液中 HCV-RNA 検出系の確立には検体の保存方法などを改良して、最適化、さらに定量性の検証を行う必要が考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A,

Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17:4890-4898.

2) Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, Saishoji A, Kure T, Ohno K, Toyokura E, Imanaka D, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Hashiguchi T, Tsubouchi H. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep* 2011; 26: 1227-1233.

3) Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba t, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med* 2011; 9: 55 doi:10.1186/1479-5876-9-55

4) Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Changing etiologies and outcomes of acute liver failure: a perspective from Japan. *J Gastroenterology Hepatol* 2011; 26: 65-71.

2. 学会発表  
なし

## 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。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

糖鎖結合金ナノ粒子を用いたノロウイルス感染の診断に関する研究

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

糖鎖固定化金ナノ粒子を用いて、便中や病院環境に存在するノロウイルスを精製、濃縮を行った。濃縮したノロウイルス粒子から RNA を抽出し、超高速 PCR を組み合わせることにより約 2 時間でウイルス遺伝子を検出することが可能となった。本法をノロウイルス感染の病院内アウトブレイクの事例に応用することにより、高精度かつ迅速にアウトブレイク対策を実施した。SGNP が院内感染対策に有用であることを示した。

A. 研究目的

ノロウイルス感染の診断にはイムノクロマト法を用いたウイルス抗原の検出が頻用されるが検出感度は60-70%程度であり、PCRを用いた検出には及ばない。しかし、従来の方ではウイルス遺伝子の検出には手間と時間を要し、院内感染対策への応用が困難であった。糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)と超高速PCRを用いることにより、簡便にノロウイルスを濃縮、精製し速やかにウイルス遺伝子の検出することで、院内感染対策に応用することを目的とした。

B. 研究方法

ノロウイルス感染が疑われる消化器症状を有する患者から便検体を採取し、10容中央量のリン酸緩衝液に懸濁した。15,000rpmの遠心にて上清中を採取し、上清中のウイルスをSGNPによる濃縮、精製した。濃縮したウイルス粒子を加熱により、RNAを採取した。得られたRNAはTRUST Medical製超高速PCR装置RT-PCTを用いたノロウイルスの検出に供した。ノロウイルス感染がアウトブレイクしたトイレなど病棟環境をリン酸緩衝液で洗浄し、洗浄液から

SGNPを用いてウイルス粒子を用い、便検体同様にRT-PCRによりウイルス遺伝子を検出した。RT-PCRによるウイルス遺伝子の有無により、患者の隔離、医療スタッフの就業制限の決定、感染ルートの解明に供した。

（倫理面への配慮）

ノロウイルス感染が疑われる患者のうち、患者の同意が得られた検体のみ検査対象とした。RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出による検査はコストの面からイムノクロマト法に移行しつつあるが商業的検査機関でも一般化されているが、PCRを用いた方が高感度である。従ってイムノクロマト法にRT-PCR法を加えて感染の有無の検討を行うことはイムノクロマト法の場合に比べ、検査の感度を上げ、患者には一切の不利益を生じない。検査結果は感染診断と感染対策、イムノクロマト法の感受性向上の研究に用いられ、個人の検査結果が公表されることはなく、プライバシーも侵害しない。ID、氏名、病棟などの情報は保持され結果は院内感染対策に用いた。PCR検査の後、便検体は診断の高感度化を図る研究材料として、-20℃での凍結保存がなされるが検体は独自の番号を割付けを行いし、患

者ID、氏名とは分離して管理することにより匿名化を図る。本研究は兵庫医科大学倫理委員会にて承認を受けた。

### C. 研究結果

1. 平成23年度に3病棟3件のノロウイルス感染の集団発生があった。合計30人疑い患者の内、10/30名(33.3%)の患者はイムノクロマト法により陽性を示した。一方、超高速PCRによる検査では14/16名(87.5%)が陽性であった。陽性の患者は陰性患者を隔離を行い、陽性医療スタッフには就業の停止を勧告した。検体採取から、PCR終了まで約2時間で終了し、高感度かつ迅速に感染対策を行った。

2. 病院環境からのウイルス遺伝子の検出は、患者発生病棟のトイレ、手すりなど手指の接触部位の洗浄を行った。3ヶ所の手すりのうち2ヶ所、1ヶ所の便座の便器からノロウイルスのRNAを検出し、院内感染の感染ルートと考えられ、これ等の箇所を含む病院環境に2000ppmの次亜塩素酸による環境消毒を行った結果、以後の感染拡大は認めなかった。

### D. 考察

イムノクロマト法によるノロウイルス感染の診断は、検出感度は60%程度と高いものではなく、偽陰性を示すことも多い。ノロウイルスは10-1100コピーの極めて微量での感染を来すため、偽陰性の存在は院内でのアウトブレイクにおいては障害となる。一方、RT-PCRを用いた診断は従来の方法でも感度は高いものの、RNAの抽出、RT-PCRが繁雑であること、RT-PCRに3時間程度の時間が必要であることなどから、検査には半日から1日以上時間を要していた。本法では検体採取から結果の

判明まで2時間と大幅に時間の短縮が可能であり、正確かつ迅速な感染対策を行うことが可能であることが示された。また、夾雑物を多量に含む便中から病院環境の付着する極微量のウイルス粒子まで濃縮、精製することが示された。この方法を用いることにより診断のみならず感染ルートや、食品中に含まれるウイルスの検出など感染源や感染ルートの調査にも用いることが可能であることが示される。

### E. 結論

SGNPを用いたノロウイルス感染を診断は2時間程度可能であり、適確な感染対策のほか疫学的な研究にも応用が可能であることが示された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

中嶋一彦、ウイルス濃縮と超高速PCRを用いたノロウイルスの高感度、迅速検出と院内感染対策への応用、第27回日本環境感染学会総会 福岡 2012.2.2-3

### G. 知的財産権の出願・登録情報

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

該当なし

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

特記なし



糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)-qPCR 法による唾液中の  
インフルエンザウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルス遺伝子の検出

研究分担者 西 順一郎 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院小児科 講師

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-qPCR(リアルタイム PCR)法は、従来の方法に比べて極めて高感度であるため、唾液中のウイルス検出が可能である。今回、インフルエンザが疑われる成人 74 名、小児 109 名、さらに帯状疱疹疑いの入院患者 12 名の唾液検体を用いて臨床応用を検討した。インフルエンザ迅速診断キット A 陽性患者の唾液は、SGNP-RT-qPCR では、成人で 100%(25/25)、小児で 96.4%(54/56)がインフルエンザ A 陽性であった。また、迅速診断キットが陰性患者の唾液からも、成人で 52.2%(24/46)、小児で 56.5%(26/46)にインフルエンザウイルスが検出された。本法は、インフルエンザ診療において、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。また水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)は、帯状疱疹 7 名すべての皮膚から検出されたが、唾液から検出されたのは、播種性帯状疱疹と顔面神経麻痺患者の 2 名だけであった。唾液を用いた帯状疱疹の診断への応用は困難であるが、唾液への VZV の排泄度をみることで院内感染対策に利用できると考えられた。

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-qPCR(リアルタイム 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。ウイルスと結合しやすい糖鎖を固定した金ナノ粒子を用いることで、唾液中のウイルスも検出可能となった。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と帯状疱疹の診断において本法の有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

インフルエンザウイルス検査の対象は、2010～2012 年に鹿児島大学病院でインフルエンザが疑われた患者 38 名・職員 98 名から採取した唾液 167 検体である。さらに、小児検体として鹿児島市の村上こどもクリニック(村上直樹院長)を受診したインフルエンザ疑い患者から採取した唾液 127 検体も対象とした。

水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)検査の対象は、2011～2012 年に鹿児島大学病院の入院患者 11 名と職員 1 名から採取した唾液と皮膚の 38 検体である。疾患は帯状疱疹 6 名、播種性帯状疱疹 1 名、口角・口唇炎 2 名、顔面神経麻痺 1 名、皮膚疼痛 1 名、網膜炎 1 名である。VZV の検査に加えて、単純ヘルペスウイルス(HSV)とヒトヘルペスウイルス 6 型

(HHV-6)の検出も同時に行った。

SGNPによる濃縮処理は、鹿児島大学理工学研究科の隅田研究室で行い、インフルエンザの検査では、A 全般、A/H1N1(2009)、A/H3N2、B に特異的なプライマーを用い RT-qPCRを行った。VZV、HSV、HHV-6は、SGNP による濃縮後、qPCR により検出した。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。

本研究は、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院の臨床研究倫理委員会の承認を得て行っており(受付番号 23-139、23-140)、患者からの検体採取にあたっては、研究内容を説明の上、本人または保護者の同意書を得た。

### C. 研究結果

インフルエンザウイルス迅速診断検査とSGNP-RT-qPCR検査を同時期(2日以内)に行った成人74名の結果を表1に示す。迅速診断キットA型陽性患者の唾液は、SGNP-RT-qPCR検査でもすべてA型陽性(100%、25/25)であった。迅速診断キット陰性者の唾液からも、SGNP-RT-qPCR検査でA型が52.2%(24/46)に検出された。

インフルエンザウイルス迅速診断検査とSGNP-RT-qPCR検査を同時期(2日以内)に行った小児109名の結果を表2に示す。迅速診断キットA型陽性患者の唾液を用いたSGNP-RT-qPCR検査は、A型が96.4%(54/56)、陰性が3.6%(2/56)であった。迅速診断キット陰性患者の唾液からも、SGNP-RT-qPCR検査でA型が50.0%(23/46)、B型が6.5%(3/46)検出された。

入院患者のVZV検査結果を表3に示す。带状疱疹6名、播種性带状疱疹(水痘)1名、顔面神経麻痺1名の皮膚検体は、すべて

VZV陽性であり、口角・口唇炎、皮膚疼痛、網膜炎患者の皮膚検体は陰性であった。唾液検体では、播種性带状疱疹と顔面神経麻痺患者だけがVZV陽性であった。HHV6は11名(91.7%)の唾液で陽性であった。

### D. 考察

唾液検体を用いたインフルエンザウイルスのSGNP-RT-qPCR法は、検体採取が容易であるとともに、小児・成人ともに検出率が高く、インフルエンザの診断に有用と考えられる。迅速診断キットでA型陽性にも関わらず唾液のSGNP-RT-qPCR法が陰性であったのは小児2名(成人・小児全体の2.5%)のみであったが、検出感度を考えると迅速診断キットの偽陽性の可能性も考えられる。

迅速診断キットで陰性であった発症早期の検体においても、約52-57%が本法でインフルエンザウイルス陽性となっており、発症早期の診断に特に有用である。本法は、高感度であるがゆえに、一般診療では不顕性感染やごく軽症の患者でも陽性になる可能性がある。感染初期からの早期治療が必要となる基礎疾患のあるハイリスク患者や院内感染対策上早期隔離が必要となる入院患者での早期診断では、本法の有用性がさらに高まると考えられる。

VZVの皮膚からの検出率は、带状疱疹患者では100%であり、確定診断に利用できる。しかし、唾液へのVZVの排泄は一部を除いてみられず、唾液を用いた带状疱疹の診断は困難である。しかしながら、播種性带状疱疹・水痘や顔面神経麻痺を合併する顔面の带状疱疹では、唾液へもウイルス排泄がみられており、伝播力が強いことが推測される。病院内で個室隔離の必要性を判断する際に参考になるため、本法は带状疱疹の診断でも院内感染対

策に応用できると考えられる。

#### E. 結論

唾液検体を用いたSGNP-RT-qPCR法は、インフルエンザウイルスの早期検出と院内感染対策に非常に有用であり、今後の臨床応用が期待される。帯状疱疹では、唾液へのVZV排泄は限定的であることがわかったが、皮膚検体を用いた確定診断には有用である。また、伝播力に関わる唾液への排泄度を判定することで、院内感染対策にも応用可能と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanohara H, Hashiguchi T, Zenmyo M, Yamamoto T, Ijiri K, Kawano Y, Komiya S. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63(1):10-15
- 2) Matsumoto K, Shigemi A, Yaji K, Shimodozono Y, Takeda Y, Ikawa K, Morikawa N, Miyanohara H, Kawamura J, Orita M, Tokuda K, Nishi J, Yamada K:

Reduction in the incidence of MRSA with use of alcohol-based hand rub solutions and gloves. *J Infect Chemother* 2011 Sep 6 [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

- 1) 西 順一郎, 張 旭, 河野嘉文, 隅田泰生. 糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) RT-qPCR 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. 第44回日本小児呼吸器疾患学会 宇都宮 2011.10.15-16
- 2) 西 順一郎, 川村英樹, 折田美千代. 糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) RT-qPCR 法による唾液中のインフルエンザウイルス遺伝子の検出— 入院患者と病院職員における検討— 第27回日本環境感染学会総会 福岡 2012.2.2-3

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表 1 迅速診断キットと唾液 SGNP-RT-qPCR の比較(成人)

	唾液 SGNP-RT-qPCR		
	A	B	—
迅速診断キット A+	25	0	0
迅速診断キット B+	1	2	0
迅速診断キット—	24	0	22

陽性例 H1N1(2009): 12、H3N2: 28、A 亜型不明: 10

表 2 迅速診断キットと唾液 SGNP-RT-qPCR の比較(小児)

	唾液 SGNP-RT-qPCR		
	A	B	—
迅速キット A+	54	0	2
迅速キット B+	1	5	1
迅速キット—	23	3	20

陽性例 H1N1(2009): 2、H3N2: 70、A 亜型不明:6

表 3 帯状疱疹疑い患者の唾液 SGNP-qPCR

疾患	n	検体	VZV	HSV	HHV-6
帯状疱疹	6	唾液	0	1	5
	6	皮膚	6	0	0
播種性帯状疱疹	1	唾液	1	1	1
	1	皮膚	1	0	0
口角・口唇炎	2	唾液	0	1	2
	2	皮膚	0	1	0
顔面神経麻痺	1	唾液	1	0	1
	1	皮膚(顔面)	1	0	0
皮膚疼痛	1	唾液	0	0	1
	1	皮膚	0	0	0
網膜炎	1	唾液	0	0	1
	1	血清・心嚢液	0	0	0

VZV, 水痘・帯状疱疹ウイルス; HSV, 単純ヘルペスウイルス; HHV-6, ヒトヘルペスウイルス6