

氏 名	Moor Kamila
学位の専攻分野の名称	博士（理 学）
学位記番号	甲理第196号（文部科学省への報告番号甲第720号）
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2020年3月2日
学位論文題目	<b>DEVELOPMENT OF LABEL-FREE DETECTION TECHNIQUE FOR HUMAN INFECTIOUS VIRUS BY RAMAN SPECTROSCOPY</b> <b>（ラマン分光法を用いたヒト感染性ウイルスの無標識検出技術の開発）</b>
論文審査委員	（主査） 教授 大 谷 清 （副査） 教授 沖米田 司 教授 佐 藤 英 俊

ヒト感染性ウイルスをヒト感染によらずに検出する技術の開発が、本研究の目的である。ウイルスは複製能力を宿主細胞に依存しており、生物には分類されないが、感染によって増殖し環境中に拡散する。生物と同様にDNAまたはRNAによってその構造に関する情報を保っているが、複製能力を全てコードしているわけではなく、比較的小さな遺伝情報をタンパク質の殻に包んだ構造を取る。従って、ウイルスは光学顕微鏡で見ることができないサイズであり、環境中のウイルスを単体で見つけ出すことは非常に困難である。ウイルス検出を困難にするもう一つの理由が、宿主特異性の高さである。ウイルスは細胞膜上の特定のひとつまたは複数のタンパク質を選んで結合するため、多くの場合ヒト感染性ウイルスを他の動物で検出することはできない。従って、従来技術では、誰か人が犠牲とならない限り、環境中のヒト感染性ウイルスを検出することは困難であった。

一般的なウイルス検出シーケンスは、宿主の示す感染症状の観測から始まる。宿主が哺乳動物の場合、ウイルスが体内で増殖する過程で抗原抗体反応が生じ、血中に抗体が生じる。ウイルスが既知の場合はこの抗体を検出してウイルス感染を検出する。抗体検出が困難な場合や未知ウイルスの場合、ウイルスを単離して遺伝子情報を解析後、その情報に基づいて Polymerase Chain Reaction (PCR) で試料中の遺伝子を増幅して検出する。抗原抗体反応や遺伝子情報に基づく従来技術は確実ではあるが、多くのウイルスでは、感染から発症までの潜伏期間が数日から数十日に至るため、従来の手法による検出法で、ウイルス感染を短時間で検出することは困難であった。

## 論文内容の要旨

本研究ではヒト培養細胞を用い、ウイルス感染による変化をラマン分光法で分析することにより、迅速にヒト感染性ウイルスを検出する技術を開発した。免疫システムから分離された培養細胞がウイルス感染しても、動物個体が示すような症状は当然観察できない。ウイルスの増殖と細胞の形態変化が観測できるまでには数日を要するため、従来の手法では検出に長い時間が必要であった。筆者は、形態変化の前に生じる分子レベルでの変化をラマン分光法で検出する着想を得た。ラマン分光法は生きた細胞をそのまま、培養条件下、ラベルフリーで分析することができる。アデノウイルスを Human Embryonic Kidney (HEK) 293細胞に感染させて分析した結果、当初は感染後12時間で細胞の分子組成変化の検出に成功した。ラマンスペクトルの

多変量解析の結果、感染による分子組成の変化は、細胞周期で生じる変化より十分に大きく、また変化の方向も異なることが分かった。筆者の調べた限り同様の研究報告は無く、実験システムの不安定さなどの影響も考えられるため、同様の実験を10回以上繰り返し、実験条件を確立すると共に、実験結果に十分な信頼性を得ることに成功した。ラマンシステムの改良による検出精度の改善の結果、最終的には感染後3時間でウイルス感染による変化の検出に成功した。また、3-6時間と9時間以降では、細胞内に生じる分子組成変化が異なり、前者では核酸、後者ではタンパク質の変化が大きいたことが示唆された。細胞内でのウイルス複製機構、すなわちウイルス核酸の複製段階とタンパク質発現段階を反映している可能性が高い。HEK293細胞へのアデノウイルス感染と複製が起きていることを確認するため、透過型電子顕微鏡で観察した結果、ウイルス感染細胞中のみならずウイルス粒子とみられる構造体が観測された。また、ウイルス感染細胞の細胞小器官膜および細胞膜の一部に、非感染細胞とは異なる不均一性が見られた。ラマン分光による判別分析モデルでは、判定に用いられるスペクトル成分に脂質が含まれる可能性があり、膜構造の乱れとの関連が疑われたが、ガスクロマトグラフィーを用いた分析の結果、ウイルス感染の有無による脂質変化は観測されなかった。従って、感染-非感染細胞のラマン分光分析判別モデルに、細胞内の脂質は関係していないことが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、ヒト感染性ウイルスの検出にヒト培養細胞とラマン分光分析を組み合わせる発想をもって実現した、新規で独創性の高い技術開発研究である。感染性ウイルスの存在を、培養細胞を用いて感染後3時間で検出できることは、ウイルスの存在をヒトに感染する前に検出できることを意味しており、ウイルス性感染症のパンデミックを防止する技術として、社会への大きな貢献となる可能性がある。我々の知る限り、世界的に初めて発表された技術であり、アイデアを実現する実験および分析条件の確立など筆者の貢献は非常に大きく、博士学位を授与するに十分な研究成果である。また、透過型電子顕微鏡やガスクロマトグラフィー等の分析手法を併用して分析結果を多角的に証明する科学的姿勢は、高く評価できる。本論文の内容はすでに、筆頭著者として国際学術誌である *Journal of Biomedical Optics* に2報、プロシーディングスである *Proceedings of SPIE* に2報発表している。また本論文の内容について、国際学会で主著者として口頭1報、ポスター3報、および国内学会で口頭1報を発表している。そのほか、ラマン分光分析に関する共著論文を、国際学術誌に2報発表した。審査委員は本論文の内容を中心に事前の面接審査と公開の論文審査会を行い、著者が論文内容と用いた技法について十分に理解するとともに、関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認した。英語能力に関しては、学位審査が全て英語で行われたほか、著者自ら英語で論文執筆を行い、国際会議で発表しており、充分であると認識した。以上より、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）甲号の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定した。