

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560211

研究課題名(和文) 光によるウイルス感染の検出・制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of optical detection and controlling method for virus infection

研究代表者

佐藤 英俊 (Sato, Hidetoshi)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：10300873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト培養細胞をラマン分光分析法で解析することにより、ヒトに感染可能なウイルスを早期に検出する技術を開発することを目的として本研究を実施した。HEK293細胞とアデノウイルスの系では、ウイルス導入から、最速6時間での検出に成功した。ウイルス感染と増殖が起きる系、感染するが増殖しない系のどちらでも、細胞へのウイルスの侵入を検出した。両者は感染後短時間では同様のスペクトル変化を示すが、時間がたつと増殖する系でのみ、連続的にスペクトルに変化が生じた。すなわち、ウイルスの侵入に伴う細胞の応答と、増殖に伴う遺伝子やタンパクの複製の二つの反応が、細胞のラマンスペクトルに影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to develop a quick detection method for human infecting virus using Raman spectroscopy on cultured human cells. In the present system of HEK293 cell and adenovirus, we have succeeded to detect the infection in 6 hours after the virus invasion. The spectral changes were observed in both of the cells with viruses which can and cannot propagate in the cells. These viruses showed similar spectral changes in the earlier time after the invasion, but they did slightly different features after 12 and 24 hours. Thus, it suggested that the spectral changes consisted of two independent reactions; the interaction between the cell and invading virus, and the propagation of gene and proteins due to the virus infection.

研究分野：生命医用工学

キーワード：ラマン分光 ウイルス検出 リアルタイム検出

1. 研究開始当初の背景

ラマン分光法は振動分光法の一つであり、色素を持たない分子であっても分析が可能な光学技術である。対象試料にレーザーを照射し発生したラマン散乱光を分析するため、顕微鏡下での生きた1細胞の計測も可能である。生物の新しい分析技術として近年急速に注目を集めており、細菌種類の判別分析やES細胞などの分化観測研究の成果が報告されている。代表者等は、生きたがん細胞の判別分析¹や神経細胞の機能獲得過程のモニタリング²に成功しており、高度な計測技術・データ解析技術を獲得してきた。

ラマン分光法では可視・近赤外光を用いるため、顕微鏡で見えない試料の計測は不可能であり、ウイルスのラマン分光研究は、一部のウイルス結晶の分析かチップ増強ラマン分光法(TERS)によるウイルス1粒子の計測例以外、代表者等の知る限り世界的にも報告例が無い。しかし、ウイルス感染細胞であれば顕微鏡で観測可能であることに思い至り、本研究の着想を得た。

1. Y. Oshima, et al., *J. Biomed. Opt.* **15**, 017009-1-8 (2010)
2. K. Hashimoto, et al., *Analyst* **140**, 2344-2349 (2015)

2. 研究の目的

ラマン分光およびレーザー技術を基盤とし、ウイルスに感染した細胞の判別とレーザー照射による制御、および感染ウイルス種の判別を可能とする分析技術の開発に挑戦する。ウイルスを原因とする疾患は有効な治療法が無いことが多く、新しい研究技術の発展が必要である。本研究では、従来の薬品を用いた生化学的手法ではなく、物理的にウイルス感染細胞を識別して制御することを目指しており、新しいウイルス研究技術、およびウイルス疾患治療技術の開拓に発展することが期待できる研究である。

3. 研究の方法

本研究ではヒトへの感染性の無いウイルスを用い、3段階で研究を進める。第1段階では感染後に細胞内で増殖するアデノウイルス(E1, E2 遺伝子欠損)とHEK293(E1, E2 遺伝子を持つ)を用い、早期検出と検出精度の検証を実施する。E1, E2 遺伝子はウイルス増殖に必要なため、HEK293以外でのウイルス増殖は起きず、安全に実験が可能である。次に非増殖型ウイルスの空ベクターを用い、感染検出の可能性を検証する。ラマン分光法と共に免疫染色、電子顕微鏡観察を併用した検証実験も実施する。

4. 研究成果

ヒト培養細胞をラマン分光分析法で解析することにより、ヒトに感染可能なウイルスを早期に検出する技術を開発することを目的として本研究を実施した。HEK293細胞とアデノウイルスの系では、ウイルス導入から、最速6時間での検出に成功した。ウイルス感染と増殖が起きる系、感染するが増殖しない系のどちらでも、細胞へのウイルスの侵入を検出した。両者は感染後短時間では同様のスペクトル変化を示すが、時間がたつと増殖する系でのみ、連続的にスペクトルに変化が生じた。すなわち、ウイルスの侵入に伴う細胞の応答と、増殖に伴う遺伝子やタンパクの複製の二つの反応が、細胞のラマンスペクトルに影響を与えていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. K. Hashimoto, S. N. Kudoh and H. Sato, Analysis of the developing neural system using an *in vitro* model by Raman spectroscopy, *Analyst* **140**, 2344-2349 (2015)
査読有DOI: 10.1039/C4AN01961J

2. P. Meksiarun, N. Spegazzini, H. Matsui, K. Nakajima, Y. Matsuda and H. Sato, *In vivo* study of lipid accumulation in the microalgae marine diatom *Thalassiosira pseudonana* using Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **69**, 45-51 (2015) 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1366/14-07598>
3. H. Sato, A. Taketani, K. Moor, P. Meksiarun, K. Hashimoto, Y. Maeda, M. Ishigaki, B. B. Andriana, Raman Spectroscopy in Studies on Live Cell and Tissues. *Adv. Sci. Eng. Med.* **6**, 899-901 (2014) 査読有 10.1166/ asem.2014.1589
3. S. S. Alzahrani, M. Sawa, K. Hashimoto, K. Moor, B. B. Andriana, S. Kato, T. Yagura, and H. Sato, Free Labeling Diagnostic for Biochemical Changing of Pancreatic Cancer Cell Treated by Caffeine, *Adv. Sci. Eng. Med.* **6**, 889-891 (2014) 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/ asem.2014.1590>
4. B. B. Andriana, N. Miyoshi, T. Watanabe, K. Katayama, and H. Sato, Mapping and Imaging the Distribution of Phosphate Within Omentum Tumor, *Adv. Sci. Eng. Med.*, **6**, 876-878 (2014) 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/ asem.2014.1588>
5. P. Meksiarun, N. Spegazzini, H. Matsui, Y. Matsuda, H. Sato, Raman Spectroscopy for Monitoring CO₂ Effects on Fatty Acid Synthesis of Microalgal Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Adv. Sci. Eng. Med.*, **6**, 873-875 (2014) 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/ asem.2014.1587>
6. M. Ishigaki, A. Taketani, H. Sato, Discrimination of fish egg quality and viability by Raman spectroscopy, *Anal. Methods.*, **6**, 9206-9211(2014) 査読有 10.1039/C4AY01037J
7. K. Moor, K. Ohtani, D. Myrzakozha, O. Zhanserkenova, B. B. Andriana and H. Sato, Noninvasive and label-free determination of virus infected cells by Raman spectroscopy, *J. Biomed. Opt.*, **19**(6), 067003-1-5 (2014) 査読有 10.1117/1.JBO.19.6.067003

〔学会発表〕(計 52 件)

1. 佐藤英俊,「ライトシートダイレクトラマンイメージング技術の開発」第7回日本分光学会赤外ラマン分光部会シンポジウム, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府豊中市), 2015年1月27日
 2. 橋本剛佑, 小川直哉, 佐藤英俊,「シトシンアラビノシドに対する神経細胞応答のラマンスペクトル変化の解析」, レーザー学会講演会第35回年次大会, 東海大学高輪校舎(東京都港区), 2015年1月11日
 3. 竹谷皓規, Bibin B. Andriana, 宮本涼生, 佐藤英俊,「ラマンプローブを用いた生き
- たモデルマウス腫瘍の *in situ* 研究」レーザー学会学術講演会第35回年次大会, 東海大学高輪校舎(東京都港区), 2015年1月11日
 4. 小川直哉, 橋本剛佑, 大黒亜美, 今岡進, 佐藤英俊,「神経細胞に対する内分泌攪乱物質の応答評価:ラマン分光法による低侵襲解析」レーザー学会学術講演会第35回年次大会, 東海大学高輪校舎(東京都港区), 2015年1月11日
 5. H. Sato. "Prospects of Biomedical Raman Spectroscopy: Direction for Practical Applications", Biomedical Molecular Imaging 2014, 7 Nov., 2014, Taipei, Taiwan (Invited talk)
 6. H. Sato, K. Moor, K. Fukuda, Y. Nishimoto, N. Ogawa, D. Ichihara, M. Sawa, B. B. Andriana, "Study of live cell reactions using Raman spectroscopy", SPEC2014, 18 Aug. 2014, Krakow, Poland (Invited talk)
 7. H. Sato, D. Ichihara, M. Sawa, K. Fukuda, Y. Nishimoto, "Raman studies of live cells and tissues: how it can contribute to biology and medicine", International conference on Raman spectroscopy (ICORS2014), 11 Aug. 2014, Jena, Germany (Invited talk)
 8. B. B. Andriana, N. Miyoshi, H. Sato, Imaging the Phosphate Distribution Oral SCC and Omentum Tumor. Biomedical Molecular Imaging 2014, 7 Nov. 2014. Taipei, Taiwan.
 9. P. Meksiarun, K. Hashimoto, H. Sato, Monitoring of unsaturated fatty acids effect in sebocyte differentiation stage by using Raman spectroscopy. SPEC2014, 18 Aug. 2014, Krakow, Poland.
 10. K. Hashimoto, N. Ogawa, H. Sato, A study of drug response on live Primary cultured neuronal cell by Raman spectroscopy. SPEC2014, 18 Aug. 2014, Krakow, Poland.
 11. A. Taketani, B. B. Andriana, H. Sato, Raman endoscopy for monitoring of anticancer drug treatment in colorectal tumors of live model mice. SPEC2014, 18 Aug. 2014, Krakow, Poland
 12. B. B. Andriana, A. Taketani, H. Sato, In-Site Raman Probe analysis for Anorectal Prolapse. International conference on Raman spectroscopy (ICORS2014), 11 Aug. 2014, Jena, Germany
 13. K. Moor, B. B. Andriana, K. Ohtani, H. Sato, Early in situ detection of virus infection with Raman spectroscopy. ICORS2014, 11 Aug. 2014, Jena, Germany
 14. 竹谷皓規, Bibin B. Andriana, 宮本涼生, 佐藤英俊,「ラマン内視鏡を用いたモデルマウス直腸腫瘍の *in situ* 研究」, レーザー学会第463回研究会, AP大阪駅前梅田1丁目(大阪府大阪市), 2014年7月26

- 日
15. P. Meksiarun, Raman spectroscopy for monitoring CO₂ effects on fatty acid synthesis of microalgal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. The 2nd international Conference on Science and Engineering in Biology, Medical and Public Health 2014 (BioMedPub 2014), 31 May 2014 Bali, Indonesia
 16. S. S. Alzahrani, Free Labeling Diagnostic for Biochemical of Pancreatic Cancer Cell Treated by Caffeine, BioMedPub 2014, 31 May 2014 Bali, Indonesia
 17. H. Sato, Raman spectroscopy in studies on live cell and tissues, BioMedPub 2014, 1 Jun. 2014 Bali, Indonesia
 18. Y. Maeda, M. Ishigaki, A. Taketani, B. B. Andriana, R. Ishihara and H. Sato, Measurement of the human esophageal cancer in an early stage with Raman spectroscopy, BiOS, San Francisco, USA, 2 Feb. (2014)
 19. B. B. Andriana, A. Taketani, C. L. R. Soeratman, M. Ishigaki, Y. Maeda, M. Sawa and H. Sato, Application of ball-lens hollow fiber Raman probe to study an anorectal prolapse, BiOS, San Francisco, USA, 2 Feb. (2014)
 20. M. Ishigaki and H. Sato, The discrimination of fish egg quality and viability by using Raman spectroscopy, BiOS, San Francisco, USA, 2 Feb. (2014)
 21. K. Hashimoto, S. N. Kudoh and H. Sato, Raman study if analysis for the states of maturation and the drug response of neural cell, BiOS, San Francisco, USA, 2 Feb. (2014)
 22. A. Taketani, M. Ishigaki, B. B. Andriana and H. Sato, Raman endoscopy for the in situ investigation of advancing colorectal tumors in live model mice, BiOS, San Francisco, USA, 2 Feb. (2014)
 23. K. Moor, K. Ohtani, D. Myrzakozha, O. Zhanserkenova, B. B. Andriana and H. Sato, Analysis of the infected cell by Raman spectroscopy in dynamics with using of other methods of comparison, BiOS, San Francisco, USA, 2 Feb. (2014)
 24. 市原大輔, 矢倉達夫, 佐藤英俊, 「細胞分化モデルを用いた薬剤応答とラマンスペクトルの相関関係」, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 25. 西本雄祐, 前田康大, 佐藤英俊, 「生体応用のための CARS 分光システムの開発」, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 26. 竹谷皓規, B. B. Andriana, 石垣美歌, 佐藤英俊, 「ラマン内視鏡を用いた生きたモデルマウス直腸腫瘍の in situ 研究」, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 27. 橋本剛佑, 工藤卓, 佐藤英俊, 「培養神経細胞の成熟に伴う細胞内分子組成変化のラマン分光分析」, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 28. P. Meksiarun, N. Spegazzini, H. Matsui, K. Nakajima, Y. Matsuda and H. Sato, “In vivo study of lipids accumulation in microalgal marine diatom by using Raman spectroscopy and MCR-ALS”, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 29. K. Moor, K. Ohtani, B. B. Andriana and H. Sato, “Determination infected cells in early stage by Raman spectroscopy”, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 30. 福田健人, 佐藤英俊, 「ラマン分光法を用いた ES 細胞の分化の分析技術の開発」, レーザー学会第 34 回年次大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市), 2014 年 1 月 21 日
 31. S. S. Alzahrani, B. B. Andriana and H. Sato, “Study of caffeine on pancreatic cancer cells by Raman microscopy”, 第 11 回医用分光光学研究会, 三国観光ホテル (福井県坂井市), 2013 年 12 月 7 日
 32. B. B. Andriana, N. Miyoshi, T. Watanabe, K. Katayama, H. Kinoshita and H. Sato, “Mapping and Imaging the distribution of Phosphate in Non-clinical Tumor Observed Using Fourier Transform-Infrared and Raman Microscopic”, 第 11 回医用分光光学研究会, 三国観光ホテル (福井県坂井市), 2013 年 12 月 7 日
 33. 佐藤英俊, 「ラマンファイバーによる生体スペクトル計測」, 第 11 回医用分光光学研究会, 三国観光ホテル (福井県坂井市), 2013 年 12 月 7 日
 34. 石垣美歌, 竹谷皓規, 前田康大, B. B. Andriana, 石原立, 佐藤英俊, 「ラマン分光法を用いた初期食道がんの分析」, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2013 年 12 月 7 日
 35. H. Sato, 「ラマン分光分析の生体・生細胞への応用: 装置および分析技術」, Inside Raman 2013: New Raman Technology Revealed, 島津製作所関西支社 (大阪府大阪市), 2013 年 11 月 22 日
 36. H. Sato, Prospects of Biomedical Raman

- Spectroscopy, 第2回光バイオプシー研究会, 箱根嶺南荘(神奈川県足柄下郡), 2013年9月27日
37. K. Moor, K. Otani, B. B. Andriana and H. Sato, Early detection of virus infection by Raman spectroscopy, 第2回光バイオプシー研究会, 箱根嶺南荘(神奈川県足柄下郡), 2013年9月27日
 38. K. Alipin, B. B. Andriana and H. Sato, Possibility Raman Observation for Studying Ukon Treated Sample, 第2回光バイオプシー研究会, 箱根嶺南荘(神奈川県足柄下郡), 2013年9月27日
 39. B. B. Andriana, M. Sawa, A. Taketani, Y. Maeda and H. Sato, Some characteristic of Raman spectroscopic in studying live tumor model, 第2回光バイオプシー研究会, 箱根嶺南荘(神奈川県足柄下郡), 2013年9月27日
 40. A. Taketani, M. Ishigaki, B. B. Andriana and H. Sato, Raman Spectroscopy for the In Situ Investigation of Advancing Colorectal Tumors in Live Model Mice, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 41. H. Sato, K. Moor, P. Meksiarun, A. Taketani, K. Hashimoto, M. Ishigaki, Y. Maeda and B. B. Andriana, Prospects of Biomedical Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 42. B. B. Andriana, N. Miyoshi, A. Taketani, M. Ishigaki and H. Sato, The Phosphodiester Group in Colorectal Tumor Observed by Raman Spectroscopic and FTIR, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 43. Y. Nishimoto, Y. Maeda and H. Sato, Development of CARS System for Biology Using Dual-Wavelength Electronically Tuned Laser, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 44. D. Ichihara, K. Omura, Y. Oshima and H. Sato, Analysis of Correlation Drug Evaluation and Raman Spectra Using Cell Differentiation Model, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 45. M. Sawa, B. B. Andriana and H. Sato, Analysis of Spectroscopic Technique for Live Tissue on a Subcutaneous Tumor Model Mouse, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 46. M. Ishigaki and H. Sato, The Discrimination of Fish Egg Quality and Viability by Using Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 47. S. S. Alzahrani, K. Fukuda, M. Sawa, K. Hashimoto, B. B. Andriana and H. Sato, Label-free Monitoring of the Effects of Caffeine and 5-fluorouracil Treatment on Human Pancreatic Cancer Cells by Raman Microscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 48. K. Moor, K. Otani, B. B. Andriana and H. Sato, Early Detection of Virus Infection by Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 49. K. Fukuda, H. Sato and D. Ichihara, Development of the Analytical of Embryonic Stem Cells Differentiation by Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 50. K. Hashimoto, S. N. Kudoh and H. Sato, Analysis of the Maturation Process of Rat Hippocampal Neurons by Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 51. P. Meksiarun, N. Spegazzini, H. Matsui, K. Nakajima, Y. Matsuda and H. Sato, *In vivo* Study of Lipids Accumulation in Microalgal Marine Diatom *Thalassiosira Pseudonana* by Using Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013) Poster.
 52. Y. Maeda, M. Ishigaki, A. Taketani, B. B. Andriana, Ryu Ishihara and H. Sato, Diagnosis of Early Stage Esophageal Cancer with Raman Spectroscopy, ICAVS-7, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 26 Aug. (2013)
6. 研究組織
- (1)研究代表者
佐藤 英俊 (SATO, Hidetoshi)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号: 10300873
- (2)研究分担者
大谷 清 (OTANI, Kiyoshi)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号: 30201974