

長崎大学グローバルCOE プログラム

熱帯病・新興感染症の 地球規模統合制御戦略

平成20年度 研究成果報告書



長崎大学
NAGASAKI UNIVERSITY



2008 Research Report of
The Global COE Program, Nagasaki University
-Global Control Strategy of Tropical and Emerging Infectious Diseases-



長崎大学熱帯医学研究所 グローバル COE 推進室

〒852 8523 長崎市坂本 1 丁目12番 4 号

TEL.095 819 7870 / FAX.095 819 7805

e-mail gcoe@tm.nagasaki-u.ac.jp

http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp

平成22年 3月発行

Contents

学長あいさつ	01
拠点リーダーあいさつ	02
概要	03
事業推進担当者	04
平成20年度活動紹介	05
研究報告	
基礎研究班	
分子疫学的手法に基づくウイルス性胃腸炎の実態解明とその制御戦略への展開(中込治)	10
プリオンの感染増殖機構およびプリオン病の病態解明(西田教行)	12
サルモネラ・エントロキシンの多型と下痢原性発現機構(平山壽哉)	14
マラリア原虫の宿主細胞への侵入機構とその制御(金子修)	16
マラリア感染における宿主T細胞免疫応答の解析(由井克之)	18
フィールド研究班	
熱帯地域の新興ウイルスの調査と迅速検出法の開発(森田公一)	20
ヒト型抗体を用いた新出現ウイルスに対する治療用製剤の開発に関する研究(山城哲)	22
熱帯地域のアルボウイルスの疫学的調査と病原性の解明(森田公一)	24
地域住民参加によるマラリアの実態把握と予防に関する社会技術開発研究(金子聰)	26
スパコホートを利用したマラリア媒介蚊と感染の制御研究(皆川昇)	28
デング出血熱、シャーガス病、マラリアの重症化遺伝子解析(平山謙二)	30
メラネシア島嶼におけるマラリア排除:疫学・生態学・進化的アプローチ(金子明)	32
創薬科学班	
インフルエンザ肺炎における重症化因子の迅速検出法の開発(河野茂)	34
抗ウイルス剤開発(小林信之)	36
HIV感染・再活性化を助長する細菌の制御薬物開発のための基礎研究(中山浩次)	38
エイズ及びプリオン病の検査法と治療薬の開発(甲斐雅亮)	40
マラリア・住血吸虫ワクチン開発(平山謙二)	42
基盤技術の医薬品開発応用(池田正行)	44
業績一覧	46



片 峰 茂

長崎大学 学長

学長あいさつ

サブプライムローン破綻に始まる米国の100年に一度といわれる経済不況が、瞬時にして世界を覆ってしまいました。経済不況にかぎらずエネルギー問題、食糧問題、環境破壊、感染症など現代の最大懸案は全て地球規模であり、地球と人間の存立そのものを脅かしかねない広がりを見せつつあります。このような時代におけるアカデミアとしての大学の責務は、世界と人類に貢献する新しい知の創造であり、それを担う次世代人材の育成だと思えます。その観点から、グローバル COE プログラム「熱帯病・新興感染症の地球規模統合制御戦略」はまさに長崎大学を代表する「知の発信拠点」といえます。

長崎大学の感染症研究の歴史は古く、戦前からの長崎県の離島を中心に流行した感染症（風土病）克服のための研究に始まり、幾多の世界に誇る業績をあげてきました。1967年の風土病研究所の熱帯医学研究所への改組を契機に、研究活動はアジア、アフリカなどの途上国に拡大し、特色ある熱帯医学研究が展開されてきました。このような長年にわたる先輩たちの努力と蓄積が評価され、2003年「熱帯病・新興感染症の地球規模制御戦略拠点」が21世紀 COE プログラムに採択されました。2005年には永年の懸案であった本学スタッフが長期間常駐する海外感染症研究拠点をベトナムとケニアに創設しました。学長直轄の「国際連携研究戦略本部」には国際協力の現場に通暁した専門人材が集結し、本プログラムの国際連携研究や海外拠点の運営・マネジメントに多大の

貢献を果たしています。これら学内外のインフラ整備を基盤に、既にいくつかの特筆すべき研究成果を世界に発信しつつあります。人材育成面でも従来の博士課程（新興感染症病態制御学系専攻）に新たにコースワークを導入し教育の実質化を図るとともに、医歯薬学総合研究科に熱帯医学修士課程を、独立研究科として学際性に富む国際保健開発研究科を新設しました。いずれも本邦初の特色ある修士課程であり、途上国現地で活躍できる研究・国際協力人材の育成を目指しています。

5年間の21世紀 COE プログラムの成果を受け、2008年度からグローバル COE プログラム「熱帯病・新興感染症の地球規模統合制御戦略」として長崎大学の熱帯医学・感染症研究は新たなスタートをきりました。新型インフルエンザなど感染症まん延に対する対策は最重要の地球規模課題となっており、本プログラムの責任はますます重要性を増しています。基礎研究で得られた発見の成果を医薬品開発研究に応用した新しいワクチンや薬剤の開発や、途上国流行地でこれらの医薬品を効果的に流通・配布するための社会開発学的研究成果など、世界の感染症対策にインパクトを与える成果を量産する義務を背負っているといつてよいでしょう。

本プログラムにより世界の多様な科学者が集結する真の意味でのグローバル拠点が長崎に形成され、21世紀世界の平和と人類の福祉（安全・安心）に大きく貢献することを確信しています。



平山 謙二

長崎大学熱帯医学研究所 所長

拠点リーダーあいさつ

私は2008年から2012年まで5年計画で進められるグローバルCOEのリーダーを務めることになりました熱帯医学研究所長の平山です。私の専門は、寄生虫学・免疫遺伝学で、これまでヒトが感染症にかかったあと重症化したりあるいは簡単に回復したりするのがなぜなのか研究してきました。たとえ同じように新型インフルエンザウイルスにさらされたとしても、決して死亡率100%にはなりません。かならず生き残るヒトがいるはず。どうして「いるはず」などと言えるのでしょうか。それには大きく二つの理由があります。

ひとつは、人類は生命の誕生以来、長い間生き延びてきたことです。長い進化の歴史の中でヒトあるいは生物は環境のあらゆるリスクにさらされながらもなんとか生き延びてきました。その間の経験はすべて我々の細胞が持っている遺伝子DNAの中に刻み込まれていますエネルギーを作り出す仕組み、太陽や地球環境に対応する感覚受容器、外部刺激を入力統合して外部に反応する神経筋肉システム、そして他の生物の体内への侵入や増殖を防御する免疫システムなどはすべて非常に単純なモチーフを徐々に進化させて今のヒトが持っているような巧妙なものに作り上げていったのです。ちょっとやさつとの外敵でやられるような柔な体ではないはずなのです。もう一つは、ヒトが一人一人個性を持っているからです。

どこかの国のマスメームは別ですが、本当にヒトはまちまちで同じことをやろうとしても同じにはできません。この個性の大部分は遺伝子の多様性により出来上がっています。もちろん、神経ネットワークのでき方や免疫抗体の種類などはその人のそれまでの環境や経験に影響されるでしょう。しかしそれでも遺伝子の影響はやはり大きなものです。この遺伝子自体の性質として、多様性を保とうとする性質があることがわかっています。この多様性がどんな外敵が来てもヒトが全滅することを許さないのです。

そうは言ってもやはり自分がその生き延びるほうに入ると確信できる人は少ないでしょう。このGCOEは実は皆さんがすべて生き残れると確信できるようにしたいと思っています。長い進化の過程で培われた感染症に対する防御システムを理解し、多様な個性をもった人たちにその人たちに合った防御システムを使ってもらえるようにしていく。私は自分の専門領域からこのような夢を話しましたが、我々のGCOEは22名のいろいろな分野の専門家が感染症防御システムの理解に取り組んでいきます。世界中から若い優秀な学生や研究者も集うことになっています。これらの人たちの相乗作用がどんな大爆発を起こすのか、どうぞ楽しみにごらんください。

概要

近年、病原体の進化、新たなウイルスの出現、地球温暖化、交通手段の高速化や国際貿易の発展などで、一定の地域で起きた感染症があつという間に世界中に広がってしまいます。長崎大学は日本唯一の感染症教育研究拠点として、国際社会の脅威となっている主要感染症を制御し克服することを目的としています。この目的を達成するためにあらゆる感染症の中から、特に、子どもたちの犠牲が大きい①エイズ ②マラリア ③下痢症 ④見捨てられた感染症 ⑤新出現ウイルス ⑥プリオン病という6つの感染症群を対象に「基礎研究」、「医薬品開発」、「社会技術」という3つの研究領域から取り組んでいます。(図①) 6つの感染症群は子どもたちの犠牲が大きいものばかりです。(図②) ③下痢症は先進国では解決していても、世界では依然蔓延しています。④見捨てられた感染症では発生源が貧しい開発途上国であったためにかえりみられることのなかった Dengue 熱や住血吸虫症などに焦点をあてたことが大きな特徴です。

こうした感染症を制御し克服するためには周到な計画、実行できる人材、適切な技術が必要です。そのため教育にも力を入れ、ケニアやベトナムには海外拠点も設け、地道な現地での調査・研究、臨床研究および若手研究者の育成を行いながら、感染症の制御・克服へ向けて日々、研究を行っています。



▲ス/5地区コホート ▲KEMRI ▶P3施設
ケニア・ナイロビ市 ケニア中央医学研究所(KEMRI)内



▲共同で疫学調査▲



▲NIHE ▲臨床教育
ベトナム・ハノイ市 国立衛生疫学研究所(NIHE)内



図①



図②

事業推進担当者(22名)

(平成21年3月現在)

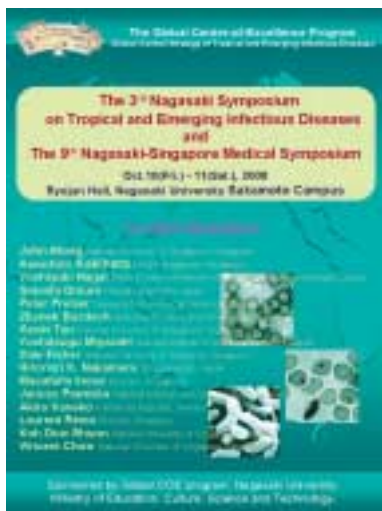
		所 属	研究領域	研究テーマ	助教/ポスドク	技術補助員	大学院生
基礎研究 (9名)	平山 謙二	熱帯医学研究所・教授	免疫遺伝学	見捨てられた病気	Mohammed Nasir (ベトナム)		Tran Thi Ngoc Ha(ベトナム) HELEGER GIDEIN KOF(ガーナ) Ekhlas Hamed Hafeez Ahdou(エジプト) 山崎朝子・NGUYEN THI PHUONG LAN(ベトナム)
	中込 治	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	感染分子疫学	下痢症	Pun Sher Bahadur (ネパール)		
	松山 俊文	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	免疫学	HIV/エイズ			馬 玉華(中国)
	金子 修	熱帯医学研究所・教授	原虫学	マラリア			Kaewthamasorm Morakot(タイ) 紗羅知明子
	平山 壽哉	熱帯医学研究所・教授	病原細菌学	下痢症		藤井 麻美	
	伊藤 敬	医歯薬学総合研究科(医療科学専攻)・教授	生化学	医薬品開発			
	西田 教行	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・准教授	微生物学	プリオン病	佐野 和憲	山川 歩	祖母井香織 須藤 結香 中垣 岳大
	中山 浩次	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	微生物学	医薬品開発			
	由井 克之	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	免疫学	マラリア			亀井 里香
フィールド (8名)	森田 公一	熱帯医学研究所・教授	ウイルス学	新出現ウイルス			岡本 健太 NGUYEN DONG TU(ベトナム) MURAO LYRE ANNI ESPADA(フィリピン) DINH TUAN DUO(ベトナム) Posadas Herrera Guillermo(メキシコ) 大下 一美
	山城 哲	熱帯医学研究所・教授	微生物学	ベトナム拠点			
	金子 聡	熱帯医学研究所・教授	公衆衛生学	ケニア海外拠点・社会技術			
	金子 明	熱帯医学研究所・客員教授	マラリア学	マラリア			
	皆川 昇	熱帯医学研究所・教授	衛生動物学	媒介昆虫・マラリア			
	山本 太郎	熱帯医学研究所・教授	国際保健学	社会技術		江口 克之	Kounnavong Sengchanh(ラオス) 駒澤 大佐
	有吉 紅也	熱帯医学研究所・教授	感染症学	HIV/エイズ	土屋 菜歩		森 正彦 Vu Thi Huong(ベトナム)
	森内 浩幸	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	小児科学	HIV/エイズ			伊達木澄人 国場 英雄 長沼 成子
創薬科学 (5名)	池田 正行	医学部創薬科学・教授	創薬科学	医薬品開発		吉田 実幸	
	甲斐 雅亮	医歯薬学総合研究科(生命薬科学専攻)・教授	機能性分子化学	医薬品開発			喻 志强(中国) HOSSAIN MD TOWHID(バングラデシュ) 唐 辰紅(中国) 山筋睦美 Wainaina Njoroge Moses(ケニア) ZHANG HUAN(中国)
	小林 信之	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	感染病学	基礎研究 HIV/エイズ)			一ノ瀬 亨 劉 格(中国) 郭 朝万(中国)
	河野 茂	医歯薬学総合研究科(新興感染症病態制御学系専攻)・教授	感染症学	医薬品開発	山本 和子		三原 智 高園 貴弘 小佐井康介 西條 朋美
	丹羽 正美	医歯薬学総合研究科(医療科学専攻)・教授	神経薬理学	医薬品開発			
教育担当				佐藤 光 阿部 朋子			

国際シンポジウム

「The 3rd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 9th Nagasaki-Singapore Medical Symposium」

金子 修 (熱帯医学研究所・原虫学 教授)

2009年10月10日(金)と11日(土)に、The 3rd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases/The 9th Nagasaki-Singapore Medical Symposium 合同大会を長崎大学坂本キャンパス良順会館にて開催しました。



初日は、シンガポール国立大学の John Wong 博士により、シンガポールにおけるシンガポール大学の役割や、研究の方向性、重点領域などの講演がありました。後日、シンガポール側の参加者にとっても研究

費の流れなどがわかり、有意義な講演であったと聞きました。続くセッションでは理研感染症研究ネットワーク支援センター長の永井美之博士がアジア・アフリカ感染症研究ネットワークについて、設立からこれまで4年間の進捗状況についての話をされ、引き続き、長崎大学熱帯医学研究所所長の平山謙二博士より長崎大学・感染症グローバル COE の目的と戦略について話がありました。午後は北里大学生命科学研究所の大村智教授の記念講演から始まりました。フィラリアなどの蠕虫に対する特効薬であるイベルメクチンの発見などの講演は非常に興味深いものでした。マラリアのセッションでは、シンガポール南洋理工大学の Peter Preiser、Zbynek Bozdech、シンガポール国立大学の Kevin Tan、長崎大学の Richard Culleton、金子修が発表を行いました。定量プロテオーム解析などを含めスケールが大きな研究が多いように思

いました。初日の最後のセッションである特別臨床講演では、国立感染症研究所の宮崎義継博士が現代の真菌感染症の特徴を、シンガポール国立大学の Dale Fisher 博士がポータブル輸液セットによる在宅医療について講演されました。懇親会の場でも、若手研究者は招待講演者と研究内容について議論し、また、シニアの方々は日本・シンガポールの組織運営の違いなどについて意見を交わしたりと、活発な交流が行われていました。

2日目には南アフリカ共和国 National Institute for Communicable Diseases of the National Health Laboratory Service の Janusz Paweska 博士が発表を行う予定でしたが、一週間前ほど前に南アフリカ共和国で未知の出血性ウイルス感染による4人の死者が出、その対策のために来日することができなくなりました。その旨を長崎大学の森田公一教授が Paweska 博士が研究を行っている P4 施設等の写真を示しながら説明しました。Paweska 博士の不在により、未知のウイルスの恐ろしさがかえって現実味を増し、聴衆一同襟を正して説明に聞き入りました。

本シンポジウムは元々、長崎・シンガポール感染症シンポジウムとして計画が進められていましたが、多くのシンガポールからの招待講演者に加えて、スウェーデンからの参加や、現在はシンガポールの研究機関に所属していても出身地はドイツやチェコスロバキア、フランス、オーストラリアという研究者も多く、国際色豊かな会でした。会期を通じて最前列に座られていた永井美之博士からの質問を始めとし、多くの聴衆からの質問があり、活発な討論が行われていました。長崎・シンガポール間の、あるいは長崎・スウェーデン間のさらなる共同研究の発展と推進を誓い盛会のうちに全スケジュールを終えました。



平成20年度教育改革 プログラム合同フォーラム

實藤 英子 (GCOE 推進室)

2009年1月12日・13日パシフィコ横浜会議センターにおいて文部科学省と財文教協会主催の第20回教育改革プログラム合同フォーラムが開催されました。私たちは2日目の13日(GCOE)のポスターセッションに参加しました。長崎では久しぶりに数日連続して雪が降るような寒い日が続いていたため、むしろこの日は関東の方が暖かく感じられました。



フォーラムは会議センターの1階から3階までをフルに使って開催され、私たちが参加した2日目はグローバルCOEほか、大学教育改革支援、大学教育の国際化加速、産学連携による実践型人材育成事業プログラムなど8つのプログラムをテーマにした分科会と平成20年度に採択を受けた大学によるポスターセッションが行われました。フォーラム参加にあたっては、専門分野以外の大学も参加することを踏まえ、専門性よりも誰が見ても理解しやすいようなポスター作りを心がけました。出展されているポスターの全体的な印象としては、白かブルーが基調となっているものが多く見られた中で、本プログラムのポスターは4つのコーナーに配色を分けて作りました。おかげ様で、他の大学の方々からは“参考に”と写真を撮っていただき好評だったようです。

今回のフォーラムは、今後これらのプログラムへの参加を目指している方々にとっては特に有用なフォーラムではなかったかという印象を受けました。同時に、私たちにとっては医学系以外にも数学、物理学、地球科学、機械、土木、建築、社会科学など各大学の特色ある取り

組みについて知る良い機会となりました。他の大学の取り組んでいる姿勢を目の当たりにすることで、今後の私たちのプログラムの進め方を改めて考えていこうと気持ちの引き締まる2009年の幕開けとなったフォーラムでした。



会場で発表したポスター

ロンドン熱帯医学校とのアフリカ ロンドン長崎奨学金の設立

Inauguration of Africa / London / Nagasaki Scholarship Establish by London School of Hygiene and Tropical Medicine and institute of Tropical Medicine (NEKKEN).



2009年3月2日、両校代表によりMOUの調印式が行われました。この奨学金はロンドン熱帯医学校教授であるGreenwood教授の希望によって設立されたものです。

Greenwood教授は2008年10月アフリカで第1回野口アフリカ賞を受賞。その賞金をイギリスと日本が協力して、熱帯医学の研究を行っているアフリカの若手研究者の育成に役立てたいと考えました。奨学金の対象者は熱帯医学に携わる修士課

程の学生としており、日本で唯一熱帯医学研究の修士課程教育を行っている長崎大学熱帯医学研究所が、共に若手の育成に携わっていくこととなりました。

市民公開セミナー

「地球温暖化と水資源問題の現在の課題」

西田 教行 (医歯薬学総合研究科・感染分子解析学 教授)

長崎大学の熱帯病・新興感染症 COE プログラムのミッションは、世界規模で起こる感染症の制御に資する人材育成と基礎から臨床まで含めた医学研究である。地道な風土病の調査、住民の健康状態の把握、研究室での病原体の性状解明、ワクチン開発や治療薬開発などに取り組んでいる。現在進行中でありかつ今後さらに問題が顕在化すると思われる地球温暖化にともなう気候変動は、病原体の生態に影響を及ぼすであろうし、途上国の生活水の管理もさらに厳しいものになるかもしれない。

第1演者として、長崎大学の武藤教授に地球温暖化の現状とそれが海岸線の変化に及ぼす影響に関する最新の研究成果を紹介していただいた。これまで常識とされてきた海岸線の変化の有り様が実際には異なることが示され、専門外の人間には多少その時間スケールが直感的には理解しにくい面があったが、人間の活動の影響による温暖化が短期的には起こるものの、歴史的サイクルから見るとやがて地球は冷却され氷河期を迎えることが説明

された。地球環境のダイナミックな面を理解することができたのではないだろうか。第2演者の東京大学の沖先生からは、水問題だけでなくこの温暖化という問題を我々はどう捉えたらよいのかという根本的なことに真摯に市民と共



に考える貴重なご講演をいただいた。ご専門のコンピュータシミュレーションの詳細をさらにお聞きしたかったが、時間の都合上、我々のこころの持ち様に話の中心を置かれたようだ。「手段の自己目的化」には要注意というメッセージが新鮮であった。グローバルな感染症の問題と温暖化にともなう水資源の問題に関する学術的な検討については次の機会を待ちたい。第3演者である日経 BP の深尾氏はこの地球環境問題にメディアはどう向かい合うべきなのか、メディアの限界がどこにあるのかというテーマの講演であった。我々を含め専門外の人のほとんどは温暖化問題に関する情報はマスメディアを通して得ているのではないだろうか。情報発信側の本音を聞く事ができたことは大きな意味があると思う。普段メディアとは遠いところで仕事をしている我々にとって新鮮な視点での話を聞く事ができ、貴重な経験であった。

これを出発点として片峰学長が提示している人間の安全保障に、長崎大学が総合的に取り組む道筋が見え始めてきた講演会であったというのが主催者としての自己評価である。

国立科学博物館 企画展

「熱帯感染症と『たたかう』長崎大学」

堀尾 政博 (熱帯医学研究所・熱帯医学ミュージアム 教授)



3月7日から15日まで、東京・上野公園の国立科学博物館において、企画展「熱帯感染症と『たたかう』長崎大学」を開催しました。

この企画展では、熱帯医学研究所におけるアフリカをはじめとした熱帯地域での「熱帯感

染症」への取り組みを中心に、ノーベル化学賞を受賞した下村脩名誉博士の功績や、西洋医学150年の歩み、本学が所蔵する古写真コレクション、唯一の被爆大学として積み重ねてきた放射線医学に関する資料などを展示、紹介しました。

開催期間中、11,086人の入場者があり、会場は大いに賑わい、来場者からは「普段考えたこともないアフリカの感染症を知り、たいへん勉強になった」などの感想が寄せられました。



長崎大学グローバル COE セミナー

「地球と人間の健康安全保障 世界トップレベル拠点を目指して」



平成21年4月18日(土)、東京都江東区の東京国際交流館プラザ平成において、長崎大学グローバルCOEセミナー「地球と人間の健康安全保障世界トップレベル拠点を目指して」を開催しました。これは、長崎大学の2つのグローバルCOE拠点である「熱帯病・新興感染症の

地球規模統合制御戦略」と「放射線健康リスク制御国際戦略拠点」の紹介を通じて、一地方大学である長崎大学が21世紀における世界の平和と人類の福祉(安全・安心)へ貢献しようとしているかをより多くの若手研究者、一般市民の方に知っていただき、今後の高等教育の在り方について提言することを目的としたものです。

セミナーでは、片峰茂長崎大学長の挨拶に続いて、文部科学省高等教育局大学振興課の義本博司課長に御挨拶をいただき、引き続き「熱帯病・新興感染症の地球規模統合制御戦略」と「放射線健康リスク制御国際戦略拠点」の拠点リーダーである平山謙二熱帯医学研究所所長、山下俊一原爆後障害医療研究所所長から両拠点についての紹介が行われました。

さらに特別講演として、前WHO西太平洋事務局長で、自治医科大学教授である尾身茂先生が、「健康と文明 - 長崎大学に期待するもの - 」と題して特別講演を行いました。最後に質疑応答となり、両拠点に対しての活発な質疑応答が行われました。



Environmental and Health Challenges
- Academie Des Sciences - JSPS Workshop

平山 謙二



2009年5月28日と29日の二日間フランス科学アカデミーにおいて日仏合同で先端学術交流のワークショップが開かれました。今回は感染症のみにとどまらず、環境と健康について多方面から専門家を招いての開催でした。長崎大学からは拠点リーダーの平山謙二が Co-Chair をつとめました。発表者としては皆川昇博士が感染症に対する環境の影響について講演しました。また、中込治博士と、山本太郎博士が座長をつとめ、会を盛り上げました。ワークショップの最後に F. Gros 博士より、次回は脳科学をテーマにしてはどうかとの提案などもあり、学術的・文化的に親睦を深め盛会の内に幕を閉じました。



前バスツール研究所所長 Dr. Andre Capron とともに

プログラム

- 28May2009 -

• Welcome address

J-F. Bach-(Permanent secretary Académie des Sciences)

J-L. Binet-(Permanent secretary of Nat. Acad. Medicine)

G. Laval-(Foreign secretary Académie des Sciences)

Y. Nakatani-(Head of JSPS Strasbourg office)

K. Hirayama-(Dean, Institute of Tropical Medicine,
Nagasaki University)

• Global Environmental Issue (Climatic changes-global impact on environment)

M. Petit-(General Council of computers technologies-
member of the Committee on environment)

• Environmental Impacts on Infectious Diseases

- Vector Ecology

M. Schwartz-(Former director general of Pasteur Institute)

N. Minakawa-(Nagasaki Univ.)

M. Kobayashi-(Nat. Inst. of infectious Diseases)

F. Rodhain-(Pasteur Institute)

• Environment and Neglected Disease

A. Capron-(Former director of Pasteur Institute-Lille)

• Urbanization-Water Hygiene and Sanitation

G. de Marsily-(P. and M. Curie Univ and Ecole des

Mines Lab. of applied geology-(CNRS)

D. Sano-(Hokkaido Univ)

• Air Pollution and Respiratory and Cardiovascular Diseases

K. Ueda-(National Institute for Environmental Studies)

M. Aubier-(Head of pneumology Dept. -Hôpital Bichat)

F. Moisan-(Science director of ADEME)

- 29May2009 -

• Environment-Cancers-Chronic Diseases

N. Yamaguchi-(Tokyo Women's Medical College)

G. Lenoir-(Research director, IGR, Institut G. Roussy)

• Epidemiology

A-J. Valleron-(Pierre and Marie Curie Univ.)

• Genes and Environment

J-F. Bach (Secrét. Perpétuel Académie des Sciences)

• Concluding Remarks

Y. Nakatani-K. Hirayama-M. Schwartz-J.L. Binet-

G. Laval-F. Gros

分子疫学的手法に基づくウイルス性胃腸炎の実態解明とその制御戦略への展開

医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 分子疫学
中込 治

背景

感染症法に基づく感染症発生動向調査によれば、5類感染症である感染性胃腸炎は、全国約3000ヶ所の小児科定点からの報告数をもっとも多い感染症である。感染性胃腸炎は、嘔気、嘔吐、下痢、発熱、腹痛などを主症状とする症候群である。多くの病原体がその原因となりうるが、大部分はウイルスによるものである。胃腸炎を起こすことが確立しているウイルスには、ロタウイルス rotavirus (図1) ノロウイルス norovirus、アデノウイルス adenovirus (40 A1型)、サポウイルス sapovirus、アストロウイルス astrovirus の5種類のウイルスがある。これら5つのウイルスが起こす胃腸炎は、好発年齢(乳幼児か成人か) 発生状況(散発性か集団発生か) 重症度などの点に特徴がある。これらのウイルスの中で医学的にもっとも重要性が高いのは、もっとも高頻度に見られるロタウイルスとノロウイルスである。

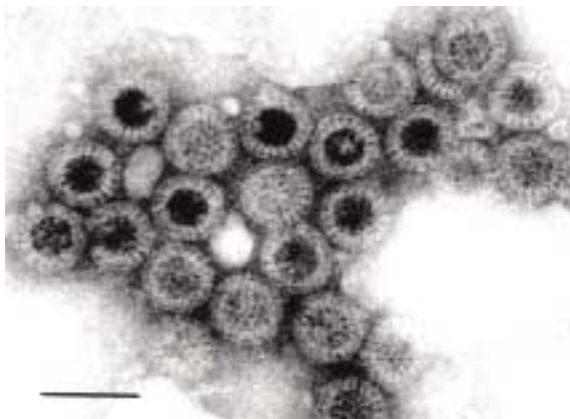


図1：美しい2重殻構造をもつロタウイルスの電子顕微鏡写真

細菌性の経口感染症のほとんどが、先進工業国では問題にならない程度にまで減少したのに、なぜ、ロタウイルスやノロウイルスは現代社会の中に広く浸透していて衰えを見せないのだろうか。私たちの研究グループでは、胃腸炎ウイルスがどのように社会や自然界を行き来しているのか、その実態を解明することこそ制御戦略上重要であると考えている。このような認識から、分子疫学的手法を駆使して、ロタウイルスやノロウイルスによる感染症を克服する手段を追求する。

われわれの研究グループのアプローチ

ロタウイルスやノロウイルスによる感染症を克服する手段を追求するにあたり、長崎大学のグローバルCOEプログラムの基本方針に準拠して、3つの歯車によるアプローチを取っている(図2)。基礎研究とは、科学的な謎を解明することによるアプローチであり、研究グループでは、「ロタウイルスどうやって自然免疫を回避しているか」という点に光を当てて取り組んでいく。第二の歯車、あるいは中心となる歯車は、医薬品であるワクチンの開発である。これは、理論的に理想の2価ワクチンを海外の拠点(ベトナム)との共同研究により開発するものである。また、現在、世界の150カ国以上で承認され、定期接種に導入されはじめているロタウイルスワクチンについて、さまざまあるロタウイルスの血清型が起こす下痢症に効くのかどうか問題であり、これを海外のフィールド(ブラジル・ネパールなど)を活用して行う学術調査によって明らかにする。

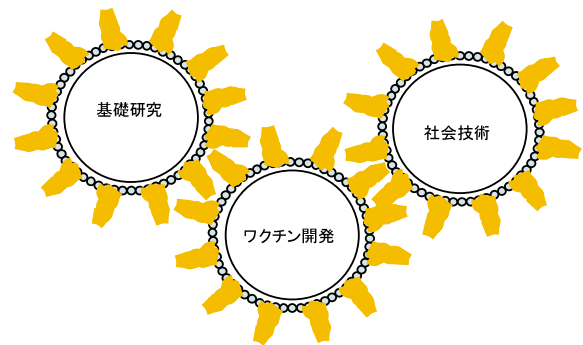


図2：ロタウイルスやノロウイルスによる感染症を克服するための3つの歯車によるアプローチ

ウイルスの生物学的な性質が解明され、有効なワクチンが開発されても、それだけで社会から病気が根絶されるわけではない。医学的に有効な予防や治療の手段を実際の社会の中で実現していく社会技術の開発が必要である。換言すれば、社会への応用に関する研究が必要になる。このような方面からのアプローチの一つとして、ロタウイルスワクチンが日本の社会の中に導入された場合にどのような効果が出現するかをコンピュータによりシミュレーションする方法がある。

ロタウイルスワクチンの 実地での効果を確認！

世界の100カ国以上で承認され、12カ国、1000万人以上を対象として乳児全員への接種が開始されているロタウイルスワクチンであるが、わが国では承認申請もまだなされていない状態である。そのため、ロタウイルスワクチンが患者の減少につながるのかどうか、また、流行している野生株にどのような影響をあたえるかなどの研究は海外に共同研究者を求めて、海外のフィールドで調査を行わなければならない。

そこで、われわれは、ブラジル東北部のレシフェ（人口150万人）にあるこの地域最大の小児病院を定点として、5歳未満の下痢症患者から糞便検体を採取することにより調査を開始した。中間調査はワクチンの定期接種が始まった2006年3月から2007年5月までの15ヶ月間である。

ブラジルで得た臨床材料を解析することにより、この地では、病院で点滴補液療法を受けなければならない5歳未満の重症下痢症に占めるロタウイルスの割合がワクチン開始後1年で、27%から5%に激減したことがわかった。（図3、図4）

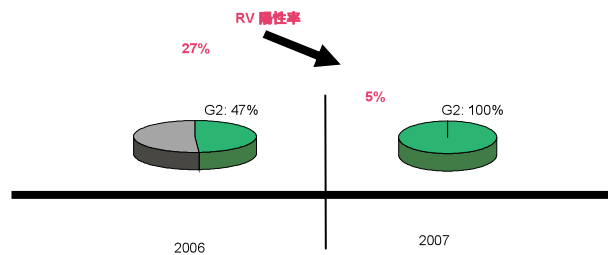


図4：ロタウイルスワクチン使用直後の3ヶ月間とその1年後の3ヶ月間におけるロタウイルス下痢症患者の減少

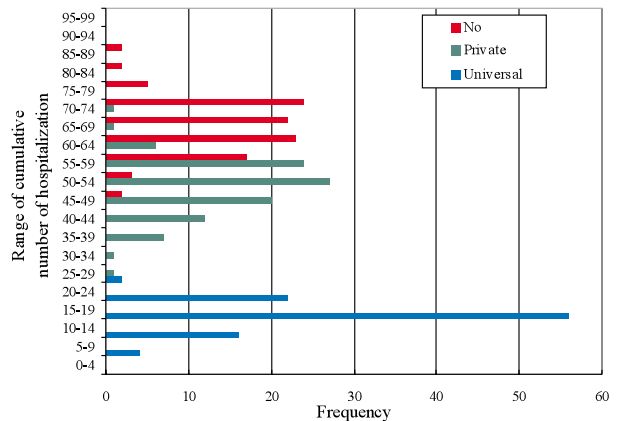


図5：ロタウイルスワクチンが未使用（赤）、任意接種として導入された場合（緑）および定期接種に導入された場合（青）、年間1000人が生まれる日本の仮想的都市に発生する5歳未満のロタウイルス下痢症による入院患者数の分布。ロタウイルスワクチンが定期接種に導入されてはじめて明確な患者数現象が出現する。

ロタウイルスワクチンを 実施した場合の効果を予測！

ロタウイルスワクチンが日本の社会の中に導入された場合にどのような効果が出るのだろうか。これをコンピュータによりシミュレーションしたのが図5である。

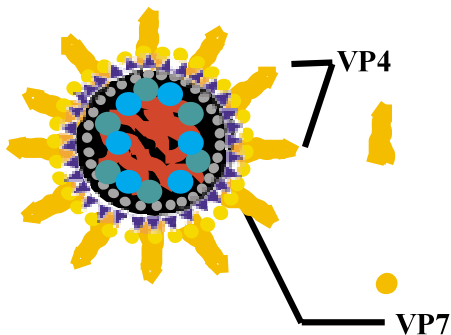


図3：ブラジルで使用されている単価ロタウイルスワクチン

グローバル COE と人材育成

高い学術的な価値をもつ知的情報を生産し、論文の形でこれを公表することによって科学の進歩に貢献することが長崎大学のグローバル COE の目指すところである。しかし、同時に、この過程を通して、将来この領域を支える新しく有為な人材の育成も目指している。われわれの研究グループでも3人の大学院生が活躍しているが、長崎大学と学術交流協定を締結しているリバプール大学やブラジルのフィゲイラ教授記念総合医学研究所の研究者や大学院生も研究に関与している。

発表論文

- 1) Naghipour M, Nakagomi T, Nakagomi O: Issues with reducing the rotavirus-associated mortality by vaccination in developing countries. *Vaccine* 26: 3236-3241, 2008.
- 2) Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, Dove W, Montenegro FM, Correia JB, Nakagomi O, Cunliffe NA, Hart CA: Apparent extinction of non-G 2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol* 153: 591-593, 2008
- 3) Kheyami AM, Nakagomi T, Nakagomi O, Dove W, Hart CA, Cunliffe NA: Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children in Saudi Arabia: first detection of G 9 and G 12 Strains. *J Clin Microbiol* 46: 1185-1191, 2008
- 4) Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA: Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 153: 957-960, 2008

プリオンの感染増殖機構およびプリオン病の病態解明

医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 感染分子解析学
西田教行

背景

プリオン病は人、羊、ウシ、鹿などに見られる致死性の神経変性疾患であり、かつ伝達性の疾患である。その病原体はプリオンと呼ばれるおそらくタンパク質のみで構成される感染性粒子と考えられている。1980年代に英国で発生したBSE（ウシ海綿状脳症）のアウトブレイク、1996年に認知されBSE由来と思われる変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）が世界各国で発生し、社会問題とされてきた。またヒト由来の生物製剤のひとつであった保存硬膜を使用したことによる医原性CJDは圧倒的に本国において多くの犠牲者を出した。

本研究ではプリオンの実体解明、その細胞への感染機序、細胞内での増殖メカニズム、そして神経細胞死を引き起こす病態の解明を目標としている。その本質的問題の解明が新たな治療法開発、早期診断法開発につながっていくと考えている。（西田）

蛋白単独犯仮説は証明しうるか

プリオン病では、正常型プリオン蛋白（PrP^C）の構造変換によって生じる異常型プリオン蛋白（PrP^{Sc}）の脳内蓄積が、病態の主要因として考えられているが、そのメカニズムは明らかとなっていない。プリオンの増幅機構を解明するべく、これまで、試験管内でリコンビナントPrP（rPrP）を用いた異常型PrPの作製が試みられ、アミロイド線維形成に成功している。しかし、これらアミロイド線維には感染性が認められず、人為的に作製された異常型PrPが、本来のプリオンとは異なる事が示唆されている。

細胞内のPrPはエンドソームやリソソームなどの酸性顆粒に局在しており、これらオルガネラのpHがPrP

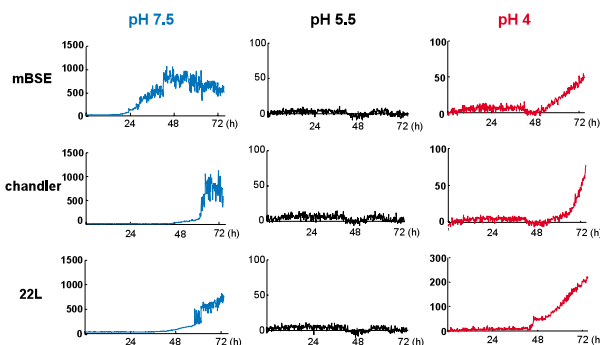


図1：アミロイド線維形成におけるpHの影響。異なるプリオン株を異なるpH条件下でアミロイド線維形成反応を行った。アミロイド線維形成の有無は、アミロイドプローブであるthioflavin-Tを用いてリアルタイムで検出した。

の立体構造や異常型PrPへの構造変化に強く影響を及ぼしていると考えられる。そこで、異なるpH条件下でアミロイド線維形成反応を行った。アミロイド線維の形成はpHによって強く影響を受け、異常型PrPへの変換効率が異なる事が示された（図1）。さらに、これらアミロイド線維のProteinase K（PK）切断パターンや二次構造を解析すると、pHによって異なるパターンを示した。今後、これらの構造の異なるアミロイド線維の感染性を検証し、蛋白単独犯仮説の最終証明にチャレンジしていくと同時に蛋白以外の感染性に必須の因子の存在を想定して、その検索を行う。（佐野）

プリオンの生物学的多様性と細胞指向性

プリオンには、ウイルスや細菌等と他の病原微生物同様に“株”が存在する。株は潜伏期、病理像、臨床症状など特徴的な表現型として定義されているが、その分子機構については不明である。

我々はこれまでに種々の神経細胞を用いてin vitroでの感染実験を行った結果、株によって神経細胞の選択性、すなわち細胞指向性がある事を見出した。また持続感染細胞では蓄積するPK耐性PrP（PrPres）のPK切断パターンやPK抵抗性がマウス脳内のPrPresとは大きく異なっている事がわかった。さらにPrPresあたりの感染価を比較すると、持続感染細胞は非常に少量のPrPresで脳内と同等の感染性を有することがわかった。これら結果は、PrPresのみを単純に病原体本体とするプリオン仮説では説明できず、PK感受性感染性PrPが存在するのか、脳内の異常型PrPはほとんどが非感染性凝集体であると思われる。

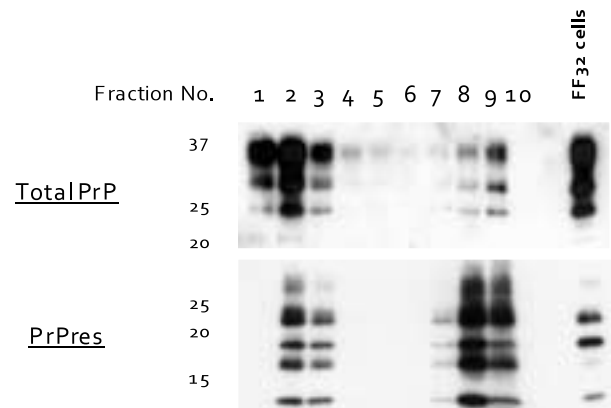


図2：PrP、PrPresの分画。感染細胞の上清を密度勾配遠心法により分離した。各分画のPrP、PrPresをWBで解析した。

そこで持続感染細胞の培養上清を用いてプリオンの精製を試みた。培養上清を分子密度の違いによって分離すると、PrPres ならびに感染性は、いくつかの分画に別れて検出された(図2)。これらの結果は“プリオン”が異なる構造物として存在している事を示唆し、今後構造解析を含め、詳細に解析する事でプリオンの真の姿に迫りたいと考えている。(布施)

プリオン蛋白の機能と神経細胞死

正常型 PrP の機能や異常型 PrP による神経変性作用がどのような分子機構によって制御されているかは不明なままである。

我々は免疫沈降法および FRET assay を用いて、Ca²⁺ 動員性受容体である mGluR 1 と PrPC あるいは mGluR 1 と PrP のホモログである Dpl が結合しうる事を見いだした。また、Dpl が Ca²⁺ 動員性受容体の脱感作を抑制し、細胞内 Ca²⁺ 濃度の持続的な上昇を引き起こす事を見出した。これらの事から PrP やそのホモログは、mGluR 1 と協調し、細胞内 Ca²⁺ 濃度を調節している事が考えられる。また、過度の細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は細胞死のメカニズムの一つであり、PrP ノックアウトマウスでは、この mGluR 1 が豊富に発現しているプルキンエ細胞が脱落していることから、mGluR 1 と PrP の相互作用が破綻することで神経細胞の変性死が誘導されるのかもしれない。

今後、mGluR 1 と PrP の相互作用の有無が、細胞内 Ca²⁺ 濃度にどのような影響を与えているか、また持続感染細胞において、この結合や細胞内 Ca²⁺ 濃度がどのように変化するのかを詳細に解析する事で、プリオン病における神経細胞死のメカニズムを明らかにして行く。(松原)

研究発表

論文

- 1) Takakura Y, Yamaguchi N, Nakagaki T, Satoh K, Kira J, Nishida N. Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 19; 377(3): 957-61
- 2) Mouillet-Richard S, Nishida N, Pradines E, Laude H, Schneider B, Féraudet C, Grassi J, Launay JM, Lehmann S, Kellermann O. Prions impair bioaminergic functions through serotonin- or catecholamine-derived neurotoxins in neuronal cells. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29; 283(35): 23782-90.
- 3) Yoshikawa D, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Okimura N, Yamaguchi Y, Mori T, Miyata H, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S. Dominant-negative effects of the N-terminal half of prion protein on neurotoxicity of prion protein-like protein/doppel in mice. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29; 283(35): 24202-11

シンポジウム講演・学会発表

1. Noriyuki Nishida, The Japan-Korea Joint Seminar (AACL 2008), 2008, Huis Ten Bosch, Nagasaki, Japan
2. Noriyuki Nishida, The 3rd Nagasaki Symposium-The 9th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, 2008, Ryojun Hall, Nagasaki University, Nagasaki, Japan
3. 新竜一郎、布施隆行、第56回日本ウイルス学会、2008年、岡山
4. 中垣岳大、祖母井香織、プリオン研究会、2008年、北海道
5. 中垣岳大、ウイルス学会地方会、2008年、熊本
6. 松原岳大、第82回日本薬理学会、2008年、横浜

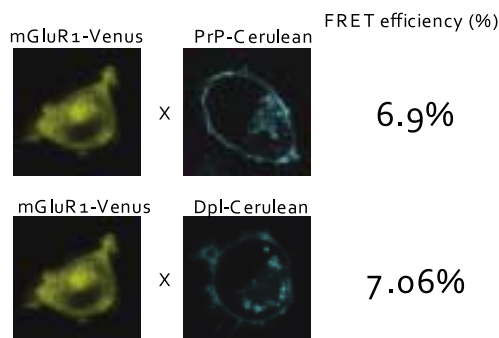


図2 : mGluR 1 と PrP、Dpl の結合。mGluR 1 と PrP 又は Dpl の結合を FRET により解析した。

異常プリオン蛋白の分解過程解明

PrPc および PrPSc の代謝経路については今日まで様々な議論があるが解明にまでには至っていない。通常、蛋白質の代謝メカニズムとしては proteasome を介した選択的蛋白分解のユビキチン - プロテアソーム系と lysosome を介した非選択的 bulk 分解のオートファジー系と大きく2つの様式に大別される。

我々は PrPSc の細胞内蓄積が蛋白代謝経路障害により引き起こされると考え、当研究室で樹立した異なるプリオン株由来のプリオン持続感染細胞 (22L、Ch、FK) を用いて、PrPSc 蓄積における proteasome inhibitor および autophagy inhibitor and stimulator の影響について検討した。現在、株間によって PrPSc の代謝様式が異なるという興味深い結果を得ており、更なる解析 (signal cascade など) を行っている。これらの研究を遂行することにより、プリオンの細胞内代謝機構が明らかとなればプリオン病の治療薬研究へとさらに発展できる新たな視点を得るものと期待している。(石橋)

サルモネラ・エンテロキシンの多型と下痢原性発現機構

熱帯医学研究所 細菌学
平山壽哉

背景

サルモネラ属菌は分類学的に2菌種、6亜種からなり、2500種以上の膨大な血清型に分類されている菌群である。この中でヒト及び家畜に対して病原性を示すものはごく一部であるものの、サルモネラ感染症は血清型 serovar Typhi 及び serovar Paratyphi A 感染により引き起される重篤なチフス症（全身感染症）や serovar Enteritidis や serovar Typhimurium に代表される食中毒原因菌の感染により引き起される非チフス性サルモネラ症（腸管感染症）まで多岐にわたっている。この中で、非チフス性サルモネラ症は世界的に最も多い食中毒であり、熱帯地方を含む発展途上国のみならず、先進国においてもしばしば大きな問題となる。

サルモネラ属菌感染の分子機構に関しては、本菌の標的細胞に対する侵襲性について世界中で詳細な解析が行われてきた。すなわち、サルモネラ属菌は腸管内で細菌固有の分泌装置（III型分泌装置）を介してエフェクターと呼ばれる病原因子群を標的細胞内に注入し、標的細胞の機能攪乱により細胞骨格の構造変化を誘導して、能動的に細胞内に侵入する。この標的細胞侵襲性は感染成立において重要なステップであるものの、サルモネラ属菌により引き起される下痢症状との直接的な関連性は明らかにされていない。一方で、1994年には serovar Typhimurium の染色体 DNA 上にコレラ毒素や毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシンの A サブユニットと homology のある遺伝子（Salmonella enterotoxin; *stn*）が報告された。しかし、Stn のサルモネラ症、とくに本菌が引き起こす下痢症における役割は全く解明されていない。

我々はサルモネラ属菌の病原性を分子レベルで解き明かす事を目的として、Stn の下痢原性の解明を行っている。

stn 遺伝子の分布及び Stn タンパク質の発現性

PCR 法を用い、様々な菌株における *stn* 遺伝子の分布を検討したところ、調査を行った全てのサルモネラ属菌株(58血清型542株：熱帯地方での臨床分離株を含む)において *stn* 遺伝子の存在が確認された。しかしながら、他の腸内細菌科の菌種においては *stn* 遺伝子の存在は認められず、*stn* 遺伝子がサルモネラ属菌に特異的な遺伝子である事を明らかにした。一方で、Stn タンパク質の発現を検討するために、Stn のアミノ酸配列からエピトープと思われる2カ所を選び、それらのペプチドを合成した。これら2種類の合成ペプチドを抗原として用いて2種類の抗 Stn ペプチド抗体を作製し、Stn に対する sandwich - ELISA 系を構築した。この系を用いてサルモネラ属菌の Stn タンパク質の産生性を比較したところ、*stn* 遺伝子の分布とは異なり、Stn タンパク質の産生性には菌株間での相違が見られた。後述の様に、Stn タンパク質は細胞毒性を持つので、サルモネラ属菌の病原性を考える上で Stn タンパク質の産生性が菌株間で異なる事実は非常に興味深い。我々の現在までの調査で、*stn* 遺伝子には多型性が存在し、更に Stn 高産生株と低産生株ではその遺伝子配列に違いがある事が分かっている。*stn* 遺伝子の多型性及び Stn 産生性と病原性の相関は今後の解析課題として重要である。また、現在、*stn* 遺伝子欠失株を作成中であり、*stn* 遺伝子欠失および同株に対する *stn* 遺伝子のコンプリメンテーションによる病原性の変化の検討も今後の課題である。

Stn タンパク質の細胞毒性

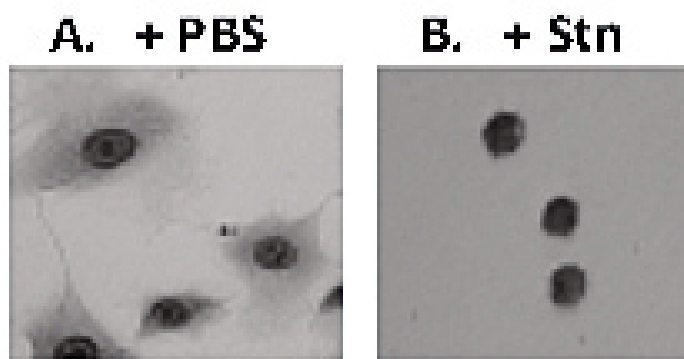
Stn の病原性を分子レベルで解明するためには、菌体を用いた解析に加え、精製 Stn タンパク質を用いた解析が必須である。我々はタイ王国の下痢患者より分離さ

れた serovar Enteritidis 株の菌体破碎上精より各種カラムクロマトグラフィーを連続的に用いて Stn タンパク質の精製を試み、SDS - PAGE 後の銀染色において Stn を含む 2 本のバンドを示すまでの精製に成功した。この精製 Stn および粗毒素画分の培養細胞に対する毒性を評価したところ、Stn の添加により細胞質の消失と核の萎縮を伴う形態学的変化の誘発を認め (図) この活性が抗 Stn ペプチド抗体により中和されることを確認した。

残念ながら上記の精製法により得られる Stn タンパク質の回収率は非常に低く、今後予定している細胞毒性試験や結紮腸管を用いた下痢原性の証明に資するには不十分である。我々は現在、精製法を改良し精製 Stn 標品を迅速かつ大量に獲得する方法を検討している。現在までに、出発材料中の Stn タンパク質の増量を目的として、*stn* 遺伝子を挿入したプラスミド DNA を親株で

ある serovar Enteritidis 株 (タイ王国の下痢患者由来) に導入した。この形質転換株の Stn タンパク質産生性が親株に比べ上昇している事より、本形質転換株は Stn タンパク質の精製に対して有用な菌株であると考えている。

本研究で扱う Stn は上述の様に 1) サルモネラ属菌特異的に存在する遺伝子であり、2) 菌株間でその産生量に差が見られ、更には 3) 細胞毒性をもつ事から、サルモネラ属菌の病原性において重要な役割を担う事が示唆される。本研究により Stn の構造及び活性と下痢原性の相関が明らかとなれば、サルモネラ感染症の予防、治療およびワクチン開発の立案に役立つ事が期待される。更に、これまでに明らかにされている侵襲性にかかわる因子群との関連を究明する事で、サルモネラ属菌の感染から下痢症発症までの分子レベルでの理解がすすむものとする。



図の説明
培養細胞に対する Stn タンパク質の毒性：粗製 Stn 画分を作用させた CHO 細胞のギムザ染色像 (B)。細胞質の消失と核の萎縮が観察される。コントロールとして PBS 処理細胞を用いた (A)。

この研究の発表

学会発表

Yamasaki E., Hoshi H., Seto Y., Chongsa-nguan M., Chicumpa W., Nair G. B., Makino S.-I., Hirayama T., Kurazono H.. Purification and characterization of *Salmonella* enterotoxin . 日米コレラ会議 (2008 .11 福岡) にて発表

山崎栄樹、星英之、牧野壮一、平山壽哉、倉園久生。 *Salmonella* enterotoxin (Stn) 精製法の確立及び細胞毒性解析。日本細菌学会総会 (2009 .3 .名古屋) にて発表

共同研究者

倉園久生教授、山崎栄樹助教 (帯広畜産大学)

Wanpen Chaicumpa 教授 (マヒドール大学医学部、タイ)

Manas Chongsa-nguan 准教授 (マヒドール大学熱帯医学部、タイ)

G. B. Nair 所長 (国立コレラ及び関連下痢症研究所、インド)

中山真彰、久恒順三 (長崎大学)

マラリア原虫の宿主細胞への侵入機構とその制御

熱帯医学研究所 原虫学
金子 修

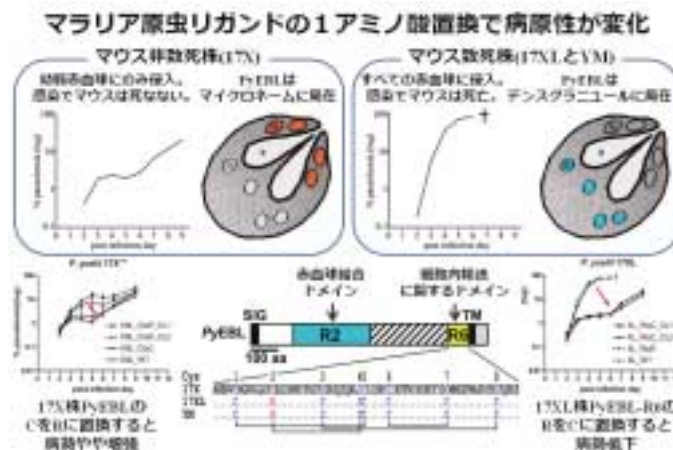
背景

マラリアは世界で年間3 - 5億人の感染者、100万人以上の死者を出す重大な原虫感染症である。ヒト体内では、メロゾイトと呼ばれる細胞侵入型原虫が赤血球へ侵入し、2 - 3日毎に分裂して形成された8 - 24のメロゾイトが感染赤血球を破壊して血流中に出現し、新たな赤血球に再侵入することにより増殖する。メロゾイトは赤血球に侵入する際に、マイクロネームやロプトリーといった細胞内小器官から赤血球認識リガンドなどを含む内容を放出する。感染成立には、原虫リガンドが赤血球受容体を認識することが必要であるため、原虫リガンドは増殖阻害ワクチンの標的と考えられ、また、原虫リガンドを活性化したり、侵入後に赤血球受容体と結合した原虫リガンドを切断したりするための種々の原虫酵素は創薬の標的となる。本研究課題では、マラリア原虫の赤血球認識リガンドについて、個々の原虫における機能分子としての役割を分子細胞生物学的に、また、マラリア流行地でヒト免疫にさらされながら進化してきた抗原分子としての役割（多型による免疫回避など）を集団遺伝学的に解析することで、マラリア感染成立のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

マラリア原虫リガンド EBL の1アミノ酸置換により病原性がドラマチックに変わる

西アフリカに住む多くの人たちの赤血球表面ではダフィー血液型抗原と呼ばれる三日熱マラリア原虫メロゾイトに対する受容体が欠損しており、その結果、三日熱

マラリアにはかからない。ダフィー血液型抗原を認識する分子は PvDBP と呼ばれており、三日熱マラリアワクチン開発の標的分子として研究が進められている。三日熱マラリア原虫は長期培養ができないため、実験室レベルでのモデルとして、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* に着目して PvDBP の相合体 PyEBL の解析を進めていたところ、BALB/c マウスに対する非致死株と致死株との間で、細胞内での局在を決定すると提唱されていた部位でアミノ酸が一か所だけ異なっていることを見出した。特異抗体により PyEBL の局在を両者で比較したところ、非致死株では他のマラリア原虫の相合体で報告されているように PyEBL はマイクロネームと言う細胞内小器官に局在していたが、致死株ではデンス・グラニュールと言う異なる細胞内小器官に局在していた。そこで、遺伝子改変の手法により致死株の PyEBL を非致死株型にアミノ酸配列を変えると、PyEBL の局在はデンス・グラニュールからマイクロネームに変化し、病勢も非致死株と同等レベルまで低下し、マウスは死ななくなった。一方、非致死株の PyEBL を致死株型に置換すると PyEBL の局在はデンス・グラニュールに変化し、病勢も増加したが、マウスは死ななかった。このことは、PyEBL は両者の間での病勢の差を規定する主要な因子であるが、致死株で見られる病勢には PyEBL に加えて、別の因子も関与していることを示唆する。1970年代に致死性の原虫株が見出され以来、多くの研究がなされたにも関わらず、病原性決定因子は明らかにされなかったが、本研究により、それをついに明らかにすることができた [2] 一方、チームメンバーのカレトン助教は、増殖速度と病原性の異なる2株のネズミマラリア原虫の遺伝子交配株の作成し、遺伝学的に増殖速度決定因子（病原



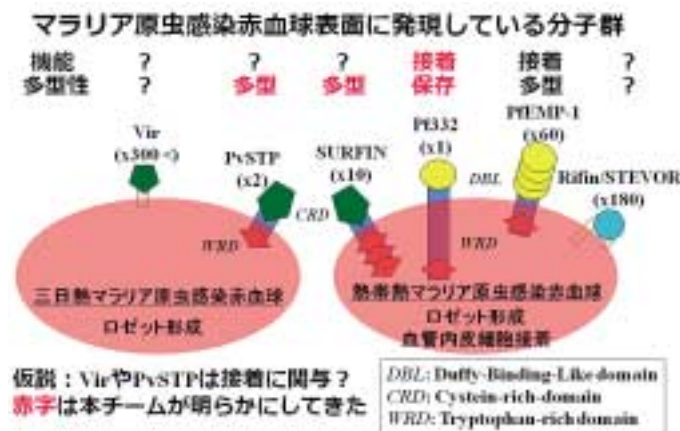
性決定因子)の同定を試み、強く関連するゲノム領域を同定していたが、上記の情報を共有した結果、PyEBL遺伝子座が同定したゲノム領域に存在し、原虫の増殖速度と100%相関することを見出し[3]、二つの異なる研究の結果がマッチした。三日熱マラリア原虫は幼若赤血球にのみ侵入するため病原性が低い、本研究で見出されたようなアミノ酸置換が起きた場合、ネズミマラリア原虫と同様に病原性が増す可能性が否定できないため、PvDBPを標的とするワクチン開発は注意を要する。

原虫感染赤血球表面と メロゾイト表面に局在する SURFINは著しく多型である

SURFINは2005年に報告された熱帯熱マラリア原虫のリガンド候補分子である[1]、熱帯熱マラリア原虫のゲノム上には10のメンバーが存在するが、ヒト免疫にさらされ防御免疫の標的となる原虫分子は多型を示すため、10のSURFINメンバーの細胞外領域と考えられる部位について、5つの実験室内株を用いて、どの程度の多型を示すのかを検討した。その結果、程度の差はあるが、全てのメンバーが多型であることを見出した。このことは、全てのメンバーがタンパク質として発現し、ヒト免

疫にさらされている可能性を示唆する[4]、メンバーの一つであるSURFIN_{4.2}の多型について、タイのマラリア流行地から短期間に採取した30株以上の熱帯熱マラリア原虫株を用いて、集団遺伝学的解析を行ったところ、細胞外領域全体にわたって、多様性を増す正の選択圧が検出された。しかし、N末端側のCys残基に富み、メンバー間で良く保存されている領域(CRD)の多型は、それに続く、メンバー間で多様化している領域(多様化領域)に比べて少なく、CRDには機能的な制約がかかっている可能性が示唆された[5]

熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球はPfEMP-1と呼ばれる多重遺伝子族にコードされる原虫リガンドを用いて、脳の末梢血管内壁に接着したり、未感染の正常赤血球に接着する(ロゼット形成)ことで昏睡などの重篤な症状を引き起こす。一方、三日熱マラリア原虫感染赤血球もロゼット形成を起こし生物学的に重要な機能を担っていると考えられているが、そのゲノム上にはPfEMP-1相同体は存在しない。かわりに、SURFINと似た構造をもつPvSTPやVIRと呼ばれる分子が300以上も存在するのである。本チームでは、SURFIN関連分子の生物学的な役割を明らかにすべく、分子細胞生物学的な解析を開始している。



参考文献

- 1) Winter G, Kawai S, Haeggstrom M, Kaneko O, von Euler A, Kawazu S, Palm D, Fernandez V, Wahlgren M. 2005. SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes. J. Exp. Med. 201: 1853-63.

この研究の発表

論文

- 2) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (in press)
- 3) Pattaradilokrat S, Culleton RL, Cheesman SJ, Carter R. Gene encoding Erythrocyte Binding Ligand linked to blood stage multiplication rate phenotype in *Plasmodium yoelii yoelii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (in press)

学会発表

- 4) Tang J, Yahata K, Torii M, Kaneko O. 2009. The diversity of the extracellular domains of *Plasmodium falciparum* SURFIN family proteins; evidence for positive diversifying selection. 第78回日本寄生虫学会大会、東京
- 5) Kaewthamasorn M, Yahata K, Alexandre JSF, Nakazawa S, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Kaneko O. 2008. Positive diversifying selection on *Plasmodium falciparum* SURFIN_{4.2}" XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Jeju, Korea.

マラリア感染における 宿主T細胞免疫応答の解析

医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 免疫機能制御学
由井克之

背景



図1：ハマダラカ

マラリアは、ハマダラカに媒介され、年間患者数2～3億人、死者100～200万人といわれ、世界的に最も重要な感染症のひとつであるが、未だに有効なワクチンは開発されていない。ワクチン候補抗原の探索は、従来から患者血清（抗体）を用いて行われており、そのために主として原虫表面に発現される分子のみがワクチン候補抗原として採り上げられてきた。しかしながら、感染防御の主役の一角を担うT細胞は、細胞内部の抗原でも検出し、攻撃することができる。例えばマラリア感染においても肝細胞期の原虫排除はT細胞により行われるし、赤血球期の防御でもT細胞は重要な役割を担っていること

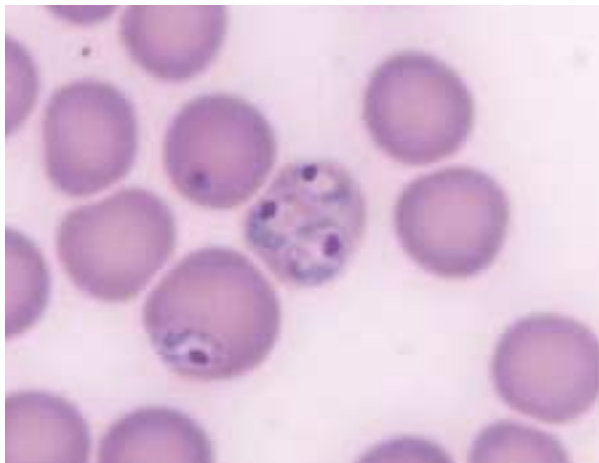


図2：マラリア原虫赤内型

が知られている。このような分子から標的となる防御抗原が明らかになれば、ワクチン候補抗原の巾は大きく広がると考えられる。しかしながら、赤血球内や原虫細胞質内に発現される原虫蛋白が防御免疫の標的になりうるのか、また感染の各ステージに於いてどのような免疫応答がエフェクターとして有効なのかについては、これまで明確な解析はなされていなかった。

マラリア感染において、免疫系は防御ばかりではなく、組織傷害の原因となっている可能性も指摘されている。マラリア重症化の主要な原因のひとつである脳マラリアでは、CD8⁺T細胞が発症に深く関わっていることが示されている。即ち、マラリア感染においてT細胞は「諸刃の剣」の役割を演じており、その活性制御は極めて重要な課題である。

我々は、有効なマラリアワクチンの開発に最終目標を見据えつつ、マウスマラリアの実験系を用いて基礎的な研究を進めている。今回、マラリア感染におけるT細胞機能を解析するための新たな実験モデルを開発し、赤内型マラリア感染におけるCD8⁺T細胞の活性化と脳マラリア発症における役割について解析した。

モデル抗原を発現する 組換えマラリア原虫の開発

モデルマラリア抗原として、免疫学でよく用いられる卵白アルブミン（OVA）を用いた。OVAの遺伝子を含むプラスミドをマウスマラリア *P. berghei* ANKA株に導入し、ラットに感染させて耐性遺伝子DHFR-tsを有する組換え原虫をピリメサミンで選択後、マウスを用いて原虫のクローニングを行った（三重大学・油田教授との共同研究）。

抗原発現部位を原虫抗原が発現される様々な部位にターゲットするため、①原虫細胞内発現、②メロゾイト表面発現、③感染赤血球表面発現、④感染赤血球内発現などの様々な遺伝子コンストラクトを作成し、組換え原虫を作成して発現を調べた。しかしながら、最終的に発現が確認されたのは原虫細胞内発現の組換え原虫のみであった。

モデル実験系を用いた マラリア赤内型感染病態の 解析：赤内型抗原特異的 CD8⁺T細胞の活性化

組換え遺伝子の発現を確認した後、赤内型マラリア感染における宿主CD8⁺T細胞の免疫応答に関して、以下の実験系を樹立して研究を進めた。

1. T細胞受容体トランスジェニックマウス OT-1 の CD8⁺T細胞を精製し、CFSE ラベル後 C57BL/6 マウスに移入した。

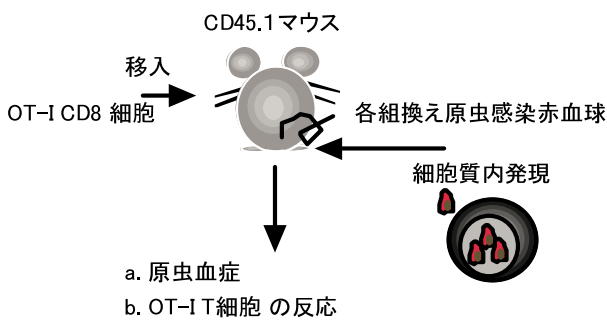


図3：OT-1 受け身移入実験

2. 組換え原虫或いはコントロール野性型原虫を感染させ、原虫血症上昇後脾T細胞の細胞表面分子のフローサイトメーター解析、CFSEによる細胞分裂の評価、細胞内染色によるサイトカイン発現、細胞傷害性T細胞活性等の機能解析を行った。赤内型マラリア抗原特異的CD8⁺T細胞が活性化され、細胞傷害性T細胞に分化することが明らかになった。また、抗原非特異的CD8⁺T細胞も弱いながら一部活性化された。
3. 赤内型抗原の抗原提示機構については、TAP (transporter of antigen presentation) 遺伝子ノックアウトマウスを宿主として用いることにより評価した。マラリア抗原特異的CD8⁺T細胞活性化は、TAP分子依存的抗原のクロスプレゼンテーションによることが明らかになった。
4. 抗原非特異的CD8⁺T細胞の活性化には、NK細胞が関与することが示唆された。

この研究の発表

論文

Miyakoda, M., Kimura, D., Yuda, M., Chinzei, Y., Shibata, Y., Honma, K., Yui, K. Malaria-specific and non-specific activation of CD8⁺T-cells during infection with *Plasmodium berghei*. J. Immunol., 181(2): 1420-1428, 2008.

脳マラリア発症における マラリア特異的 CD8⁺T細胞の関与

熱帯熱マラリアでは、脳マラリア発症が重症化の主要な原因である。*P. berghei* ANKA 株でもマウスに脳マラリアが発症すること、そこにはCD8⁺T細胞が関与することが知られている。そこで、OVA 組換えマラリア原虫モデルにおける脳マラリア発症機構についても検討した。

1. OT-1細胞移入マウスでは、OVA 発現マラリア感染により活性化し激しく増殖したOT-1細胞が、優先的に脳に集積していた。しかしながら脳マラリアによる死亡時期は野性型マラリア原虫感染時と変わりなかった。
2. 適応免疫系としてOT-1細胞のみを有するOT-1/Rag KOマウスを用いた感染実験を行った。野性型原虫感染では脳マラリア等発症せず、高い原虫血症にも関わらず長期間生存した。一方、OVA 発現マラリア感染時には、原虫血症が低い感染早期に死亡したが、明確な脳マラリア症状は観察されなかった。このことから、赤内型抗原特異的に活性化されたCD8⁺T細胞が宿主の病態悪化に働くことが明らかとなったが、脳マラリア発症に直接関与するか否かは今後の研究に待たれる。

結 語

モデル抗原を用いた赤内型マラリア原虫感染において特異的T細胞、非特異的T細胞の活性化とそれらの病態への関与が明らかになった。マラリアに対する免疫応答は、防御と共に病因としても機能し、「諸刃の剣」である。マラリア制圧のためには感染時の免疫応答調節機構の深い理解が重要である。

熱帯地域の新興ウイルスの調査と迅速検出法の開発

熱帯医学研究所 ウイルス学
森田公一

背景

近年、これまでに存在が知られていなかったウイルスが突発的に流行し、世界的なレベルで健康、経済活動に大きな影響を与えている。また、以前には限られた地域で流行していたウイルスが何らかの理由で他の地域に移動して大きな健康被害を発生させている。熱帯地域の開発が加速し、ヒトや物の大陸間移動がより増加している今日、熱帯の動物に生息し病原体となりうる微生物を調査し、ヒト社会への感染リスクを評価し、加えてその診断方法を開発することが重要である。この研究では、アジアやアフリカにおいて野生のコウモリや鳥、蚊などに生息しているウイルスを調査し、あわせて網羅的な検出技術を開発する一方、危険があると判断されるウイルスについては高感度な特異的検出技術を開発することも目的としている。

ベトナムのコウモリがニパウイルスや、SARSウイルスの抗体を保有している事を確認

従来からコウモリは多くのウイルスの保有動物として知られており、我々も熱帯雨林に生息するコウモリの調査を実施している。2008年には長崎大学ベトナム拠点に

表1) 2008年にベトナムで捕獲されたコウモリのニパウイルスに対する抗体保有状況

	Date	Place	No. of sample	Nipah + (%)
Megabats				
<i>Rousettus leschenaulti</i>	22Feb	Hoa Binh	20	5 (25.0)
	25Jul	Dak Lak	2	0
<i>Cynopterus sphinx</i>	06-09Mar	Dak Lak	29	3 (10.3)
	25Jul	Dak Lak	15	0
	26-27Jul	Dak Nong	51	0
Microbats				
Free-tailed bat	06-09Mar	Dak Lak	71	0
Unidentified	26Jul	Dak Nong	8	0
Free-tailed bat	29Aug	Hoa Binh	10	0

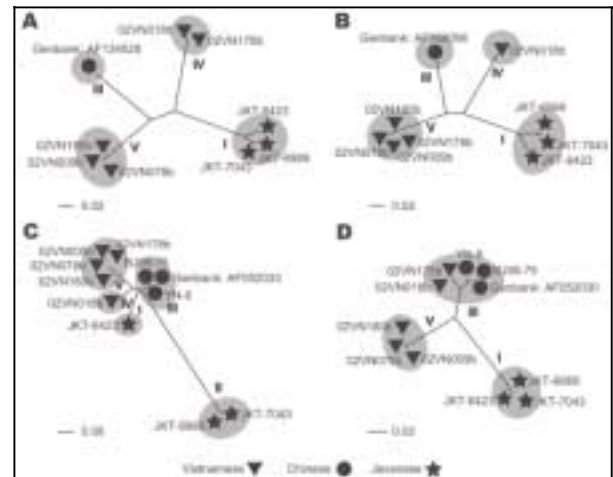
*: Comprehensive seropositive rate for NIV infection 3/95 (3.2%) .

において収集した種々のコウモリから血液を採取して一部のコウモリの血清中にニパウイルス、SARS ウイルスに対する抗体が存在することを明らかにした(表1)。今後はコウモリからウイルスを分離してその病原性を明らかにし、リスク評価を実施する予定である。

フィリピンやベトナムの蚊からユンナンウイルス、バンナウイルスなどを分離同定した。

フィリピン、ベトナムにおける蚊の調査からは大変希少なウイルスが分離された。たとえばバンナウイルスは1990年、中国の雲南省で脳炎患者から分離され、1993年にはインドネシアでも自然界の蚊から分離されている。しかし、いまだその生態や分布、ヒトの病原体としての重要性については不明のままである。またユンナンウイルスはさらに稀なウイルスで中国の雲南省で蚊から分離されて以来、分離の報告はない。この研究ではフィリピンやベトナムで採取した種々の蚊のなかに生息するウイルスを網羅的に解析しているが、この過程で5株のバンナウイルスと3株のユンナンウイルスがそれぞれベトナム北部、フィリピンのルソン島において分離同定された。このうち、バンナウイルスについては12分節のウイルス

図1: バンナウイルスの樹状解析(文献1)ベトナム株は中国の株と近縁な関係にある。



遺伝子のうち、11分節の全遺伝子配列を解読し中国で分離されたウイルスと比較した。その結果、バンナウイルスはアジアに広く生息する蚊媒介性のウイルスである可能性が示唆された。今後さらにアジアにおける詳細な分布を調査する一方で、ヒトの病原体としての重要度を調査する予定である。バンナウイルスについては迅速な血清診断法、遺伝子検出系も合わせて開発した。

プロテオーム解析を応用した 網羅的・迅速病原体解析法の開発

熱帯の自然動物のなかには何千、何万という種類の病原体となりうる微生物が生息している。本研究においてもすでに自然界の動物から多数の未同定ウイルスが分離されているが、これを従来の特異的検査法により1つ1つ同定する作業は多くの時間と労力を必要とし、かつ稀

な微生物については同定できないこともしばしば経験された。この問題を解決するため、本研究ではプロテオーム解析手法を用いた網羅的な同定手法の確立をめざしている。図2のようにnLC/MSを用いて、ウイルス感染細胞培養液をそのまま解析する手法により、1日以内にウイルスの同定が可能となった。また網羅的遺伝子解析法と比較してランニングコストが安価であるのも本手法の特徴だ。

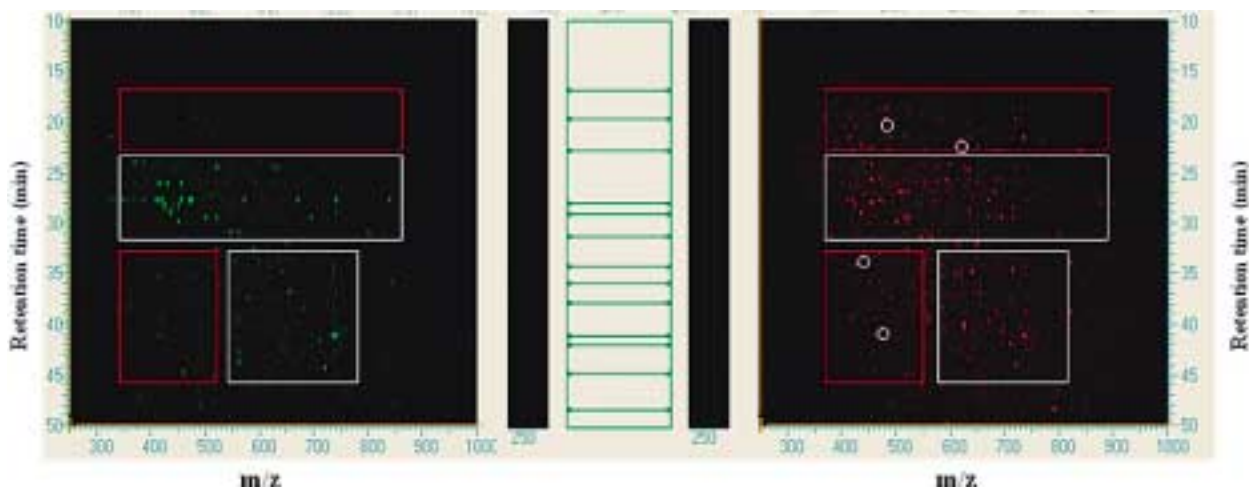
LAMP法を利用した特異的で 高感度な迅速病原体検出法の開発

LAMP法は我が国で開発された迅速、簡便な遺伝子増幅技術である。本研究では日本発の技術であるLAMP法により種々の新興感染症を迅速に検出する技術も合わせて開発している。(業績文献 3, 4)

図2 : nLC/MS解析から得られるデータの二次元展開図 : 図中の点は検出されたペプチドの位置を示している。
ウイルス感染細胞特異的なペプチドを選択的に分析することにより効率の良いウイルス検出が可能となる。

(A) ウイルス未感染細胞上清

(B) ウイルス感染細胞上清



この研究の発表

論文

1. Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas Guillermo, Maria del Carmen Parquet, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Isolation and Molecular Characterization of Banna Virus from Mosquitoes, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* Vol.14 (8), 1276-1279; 2008
2. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguchi S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol.* Vol.181 (9): 6337-48. 2008
3. Manmohan Parida, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao and Kouichi Morita: Loop mediated isothermal amplification(LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* Vol.18: 407-422: 2008
4. Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* Mar; 47(3): 645-51. 2009

ヒト型抗体を用いた新出現ウイルスに対する治療用製剤の開発に関する研究

熱帯医学研究所 病原体解析部門

山城 哲

背景

近年ライフスタイルや環境の変化に伴い、新興・再興感染症の地球規模での流行が懸念されている。2002年末から2003年前半にかけて起こった SARS の流行は記憶に新しく、鳥インフルエンザまたはブタインフルエンザからの新型インフルエンザ発生への警鐘も鳴らされている。そのような新興・再興感染症の脅威を少しでも軽減するためには、感染症の実態を科学的根拠に基づいて長期的に調査する事と同時にその予防法および感染した際の適切な治療法を研究する事が重要である。現在鳥インフルエンザウイルス H5N1 亜型感染症に関しては数種類のワクチンが研究開発されている。また感染初期の治療法としてはオセルタミビル（タミフル）やザナミビル（リレンザ）等のノイラミニダーゼ阻害剤が市販されているが耐性ウイルス株の報告も見られる。近年ヒトや動物の免疫の仕組みを利用して病気を治療する抗体医薬の研究が盛んである。そのような抗体医薬研究の手法の一環としてコンビナトリアルバイオエンジニアリングがある。それはコンビナトリアルライブラリー法で疾患特異的なヒトライブラリーを構築し、ファージディスプレイ法で有用な抗体を選別していく技術を基本とする。ヒトまたはヒト化抗体を治療薬として使用した場合、疾患特異的に効果を発揮しかつ副作用が少ないという利点が期待される。市販されている類似の製剤としてシナジスがあり、RS ウイルスの予防製剤として臨床に広く応用されている。我々の研究班は新興・再興感染症に有効な予防または治療効果を示し将来的に臨床応用可能な抗体製剤の開発を目指す。

研究の進め方

本研究の目的は新興・再興感染症、特にインフルエンザウイルス A 型 H5N1 亜型、日本脳炎ウイルス、およびデングウイルスに効果的な中和活性を示すヒト抗体またはヒト型抗体を確立する事である。次にそれを大量培養する体制を確立し、そこから精製した抗体標品に最適な保護剤または安定化剤などを選定することである。そ

れぞれのウイルスに効果的な中和活性を有する抗体の確立のためにファージディスプレイ法を用いる。ファージディスプレイ法はまず、H5N1 感染生還者より供与された末梢血リンパ球を用いて H5N1 ウイルス中和抗体発現遺伝子を豊富に含むヒト Fab ライブラリーを構築する。そこから種々の H5N1 ウイルス抗原を用いて同ウイルス中和 Fab 抗体を選別しその後 IgG に変換する。この場合 IgG 標品はヒト抗体となる。1918年に発生したインフルエンザウイルスによるパンデミックいわゆるスペイン風邪の際、重症患者に感染生還者の血清を投与すると死亡率が低下したという報告があり、重症インフルエンザ感染症における抗体療法の有用性を示唆するものである。

H5N1 ウイルスに対し中和活性を有するヒト抗体の分離

北部ベトナムで05年以来約2年ぶりにヒト H5N1 感染症患者が発生した。05年にヒト感染症を起こしたウイルス（H5N1 clade 1）とは異なる H5N1 clade 2 型ウイルスによる感染であった。我々の研究チームは倫理委員会の承認を得、説明と同意のもとに感染生還者ボランティアから末梢血リンパ球の提供を受けヒト Fab ライブラリー（H5N1 ヒト Fab ライブラリー）を構築した。ライブラリーには H5N1 中和抗体発現遺伝子が豊富に含まれると推定された。

現在 clade 2 型が東南アジアを中心に家禽の間で流行を繰り返しているが、05年に発症した H5N1 感染患者血清はすでに新しい clade 2 型 H5N1 ウイルスによる血球凝集を阻止できないことがわかった。05年以前に感染した H5N1 ウイルス患者の血清中の抗体は clade 2 型 H5N1 ウイルスを効果的に中和できない可能性を示唆するものであると思われた。

次に我々は clade 2 型ウイルス粒子を精製しそこから hemagglutinin (HA) を豊富に含む画分を抽出した。HA は中和抗体の誘導に関与するとされるウイルスタンパクである。ウイルス粒子および HA 画分を用い、それぞれに効率的に結合するヒト Fab 抗体を発現するファージ

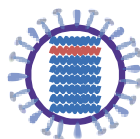
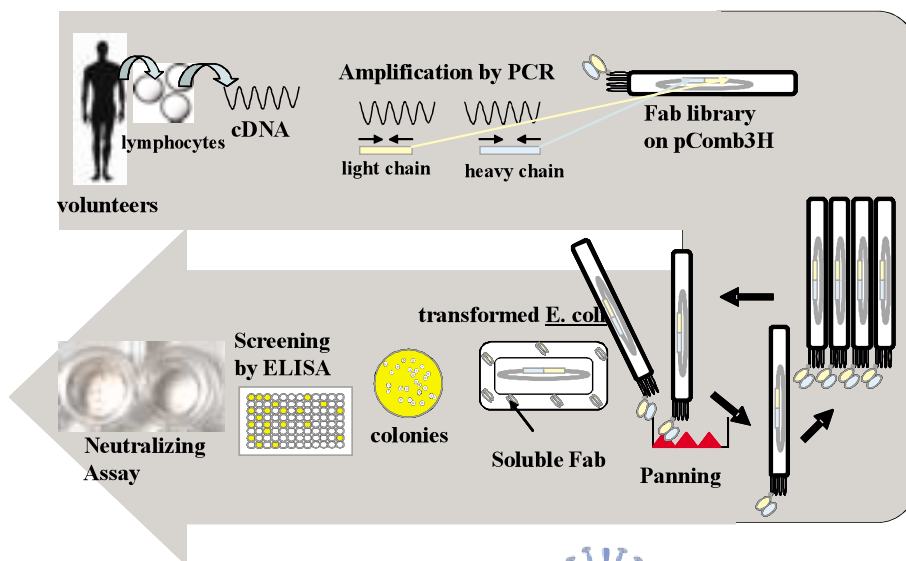
をファージディスプレイ法で H5N1 ヒト Fab ライブラリーから12種類分離した。そのうち大腸菌を用いて大量培養後、カラム法を用いて精製できた1種類を米国 CDC が推奨する ELISA 法を用いて H5N1 clade 2 型ウイルスに対する中和活性能を測定したが、同ウイルスに対する十分な中和活性をもたない事が示された。残りの11種類のヒト Fab も大量培養、精製を進めて中和試験に供する。またより感度の高い中和活性アッセイ系とされる免疫染色法を用いた試験も行う予定である。

日本脳炎ウイルスおよびデング血清型3型ウイルスに対するヒト中和 Fab は分離ができており完全型ヒト IgG に変換を試みている。

今後の研究方針

これまで H5N1 ウイルス精製ピリオンおよびそこから抽出した HA 画分を用いて候補抗体の分離を行ってきた。それに加えリコンビナント HA (H5) タンパクおよび市販のワクチン標品を用いて同様の取り組みを行い多くの候補ヒト抗体を分離する。リコンビナント HA タンパク発現については九州大学医学部および免疫生物研究所との共同研究の体制で行う。中和抗体誘導と密接に関連するピンポイント HA (H5) タンパク発現系の構築や、精製の利便性を考慮したフュージョン HA(H5) タンパクの作製に取り組んでいる。また H5N1 clade 1 および clade 2 ウイルス株抗原を大量に精製しハイブリドーマ法でマウス単クローン性抗体を多数作成し H5N1 ウイルス中和活性を有するクローンを選出する。

図の説明
図：ファージディスプレイ法を用いたインフルエンザ A 型 H5N 亜型に中和活性を持つヒト単クローン性抗体の分離の概略



6

この研究の発表

論文 (関連する論文)

- 1) Shibuya T., Yamashiro T., Masaike Y., Ohuchi M., Uechi G., Nishizono A. 2008. Identification of a human monoclonal Fab with neutralizing activity against H3N2 influenza A strain from a newly constructed human Fab library. *Microbiol Immunol.* 52: 162-170.
- 2) Arakawa M, Yamashiro T., Uechi G., Tadano M., Nishizono A. 2007. Construction of human Fab (gamma 1/kappa 1) library and identification of human monoclonal Fab possessing neutralizing potency against Japanese encephalitis virus. *Microbiol Immunol.* 51: 617-625.

学会発表

- 1) Construction of a human Fab library and molecular cloning of human monoclonal antibodies with neutralizing potency against influenza virus subtype H5N1. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (Sapporo, December, 2008)

熱帯地域のアルボウイルスの疫学的調査と病原性の解明

熱帯医学研究所 ウイルス学
森田公一

背景

熱帯地域では蚊などの昆虫で媒介されるウイルス（アルボウイルス）による感染症が猛威をふるっている。さらに近年は地球温暖化とともにウイルス媒介能力のある蚊の北上が確認されており、たとえばデングウイルス感染によるデング熱の発生は北上している。また、従来は限られた地域で生息していると考えられていた一部のアルボウイルスが自然界において長距離を移動している可能性も示されており、アルボウイルス感染症は熱帯地域のみならず他の温帯地域でも保健衛生上の問題として重要な課題となっている。この研究においては熱帯地域で重要なアルボウイルスの分子疫学を主とした疫学調査を実施するとともにウイルスの病原性に係る分子基盤を解明することを目的としている。

日本脳炎ウイルスの移動のダイナミズム

日本脳炎は日本脳炎ウイルスの感染による急性の発熱をともなう中枢神経感染症である。東南アジアでは毎年2万人をこえる患者発生があり、もっとも重要なウイルス性の脳炎である。日本においては1960年代まで毎年数千名の患者が発生していたが、1970年代以降にはワクチンの普及や媒介蚊の減少などの要因により減少し、現在では年間10名以下の患者発生で注目をあつめることはなくなった。しかし、毎年夏には関東以南の地域でコガタアカイエカからウイルスが分離され、また増幅動物であるブタにも感染していることが抗体調査で分かっており、日本でも依然として感染リスクは存在する。日本で毎年夏に出現する日本脳炎ウイルスは冬には完全に姿を消すので、その起源については従来から飛來說、と土着説（あるいは越冬説）とが唱えられてきた。すなわち、毎年初夏にウイルスの常在地である東南アジアからウイルスが

何らかのルートで日本本土に運ばれるとする説が飛來說、冬の間ウイルスが自然界のどこかに越冬し初夏に再び出現とするのが土着説である。本研究グループではベトナムや日本で日本脳炎ウイルスを分離し、中国で分離されたウイルスを加えて遺伝子の塩基配列を解析したところ、最近アジアで分離された遺伝子型1型の日本脳炎ウイルスは8つの系統に分類された。このうちⅥ、Ⅶ亜型を除く6つの型は年代をおって西から東に移動し日本に飛来していることを突き止めた（図1）。一方で、遺伝子型Ⅵ、Ⅶ亜型に属するウイルスは日本でしか分離されず、土着しているのではないかと考えられた（図2）。これらの結果から東南アジアの日本脳炎ウイルスが極めて高速に東アジアへ移動している事実が明らかになり、

図1：日本脳炎ウイルスの長距離移動：遺伝子型1型でⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型の日本脳炎ウイルスは西から東へ移動し日本へ飛来していた。



図2：日本脳炎ウイルス遺伝子1型Ⅵ、Ⅶ亜型は国内でのみ確認された。



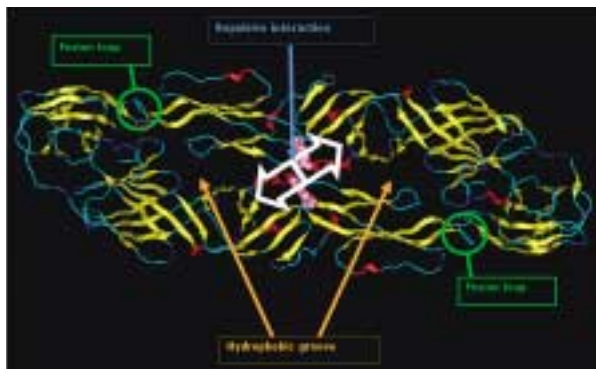
日本においても今後もこのウイルスへの警戒が必要であることが示唆された。

デングウイルスの変異株の分離

デングウイルス感染では比較的軽症のデング熱と重症で時には致死的な疾患であるデング出血熱が発症する。デングウイルス感染により2つの病型がある理由、さらにウイルス感染から出血熱発症に至る分子レベルでの機序は未だ不明のままであり、治療法の開発、予防薬の開発が遅れている。現在、出血熱発症メカニズムについては、1)免疫学的機序、2)ウイルス側の因子、3)ヒトの遺伝的素因が関与していると考えられているが、我々はデングウイルスが遺伝子レベルで多様性に富んでいることに着目してウイルス側の病原因子を調査している。今年ベトナムの同一のデング出血熱患者から2つの異なる性質を持つデングウイルスを分離した。1つは蚊の培養細胞に高い結合性と増殖性を示し、もう1つはヒトの単核球系の培養細胞に親和性と高い増殖性を示した。この2つのウイルスの遺伝子塩基配列を比較したところアミノ酸差異が3つあるが極めて近似した株であることが分かった。特に感染細胞の親和性を規定するウイ

ルス表面のE蛋白質に1つのアミノ酸置換(62番のグルタミン酸がリジンに変異)が認められた。この立体構造上の位置は図3に示した様にE蛋白の2量体の構造に影響を及ぼすと推測されデングウイルスはEタンパクの1つのアミノ酸置換でも感染細胞の種類が容易に変異する性質を持つことが明らかになった。現在、B細胞系に感染するデングウイルスが利用する細胞表面のウイルスレセプターを同定しているが、いずれにしても、デングウイルスのヒトでの感染細胞の多様性と種類が明らかにされることで、出血熱の発症機序を理解する一助となると考え、研究を進めている。

図3：感染細胞の特異性を变化させたアミノ酸変異(白矢印部分)



この研究の発表

論文(関連する論文)

1. Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. *J Gen Virol*. Vol. 90: 827-832. 2009
2. Basu Dev Pandey, Kouichi Morita, Santa Raj Khanal, Tomohiko Takasaki, Isao Miyazaki, Tetsuro Ogawa, Shingo Inoue, Ichiro Kurane. Dengue virus, Nepal. *Emerging Infectious Diseases* Vol.14(3), 514-515; 2008
3. Kazuya Hidari, Naonori Takahashi, Masataka Arihara, Masato Nagaoka, Kouichi Morita, Takashi Suzuki.: Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol.376, 91-95: 2008
4. Nguyen Thi Phuong Lan, Mihoko Kikuchi, Vu Thi Que Huong, Do Quang Ha, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Ha Manh Tuan, Vo Van Tuong, Cao Thi Phi Nga, Tran Van Dat, Toshifumi Oyama, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama. Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB 1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol.2. e 304, 2008
5. Liu J, Liu B, Cao Z, Inoue S, Morita K, Tian K, Zhu Q, Gao GF. Characterization and application of monoclonal antibodies specific to West Nile virus envelope protein. *J Virol Methods*. Vol. 154(1-2): 20-6. 2008
6. 森田公一：「日本脳炎ウイルス」 *Drug Delivery System* 23(2): 159-161, 2008.
7. 森田公一：「西ナイル熱」 *Medical Practice* 25(5): 799-801, 2008
8. 森田公一：「デング熱・出血熱」 *臨床と研究* Vol. 85(9), 1242-1246, 2008
9. 森田公一：「デング出血熱ワクチン」 *日本臨床*. Vol.66(10), 1999-2003, 2008
10. 森田公一：蚊媒介性の熱帯性ウイルス疾患 デング出血熱の発症機序をめぐって ; *最新医学 (The Medical Frontline)*, Vol. 64 (4), 919-923, 2009.
11. 森田公一、木下一美；デング熱研究の最前線；*医学のあゆみ (J. Clin. Exp. Med.)* Vol.229(4), 241-245, 2009

地域住民参加によるマラリアの実態把握と予防に関する社会技術開発研究

熱帯医学研究所 生態疫学

金子 聡

背景

疾病を集団もしくは地域として捉え、予防対策を実施・評価してゆくためには、その集団・地域の特性を正確に捉え、時間を追ってその変遷ならびに疾病罹患の変化を把握・監視する必要がある。現在、アフリカでは、5歳未満の死亡率削減のための防虫剤練り込み蚊帳の配付等によるマラリア対策が進んでいる。その対策の評価には、地域において、正確な情報を収集するシステムの構築が必要となる。しかし、多くの場合、基盤となる情報システムが機能していないことも多く、評価システムの構築を伴わないまま、対策が実施されている。そこで、本研究では、1)長崎大学熱帯医学研究所ケニア研究教育拠点のフィールドを活用した科学的根拠に基づいたマラリア対策の評価をなす実態把握と評価のシステム系を構築し、2)現在のマラリア対策の実態の把握と評価、さらには、実態を把握した上での効果的なマラリアの予防方法を「地域」の視点で開発することを目的とし、活動を展開する。

マラリア対策の評価は、5歳未満死亡率の低下やマラリア感染率の低下により行う必要がある。さらには、マラリア対策により集団としてマラリア感染機会が減ることにより生ずる集団免疫の低下、対策効果出現の時間的・地域的な「ばらつき」の把握とその影響の評価などが必要となる。これには、対象住民の観察を長期にわたり行える系、すなわち「Demographic Surveillance System(DSS)」と呼ばれる調査地域の全人口とその動態を把握する『住民参加型』のシステムの構築が必要となる。

地域の人口動態を把握するシステム

人口動態とは、ある地域における「人の動き」により起こる人口の変動のことである。人の動きとは、出生、死亡、移出入であり、それらを把握することにより、そ

の地域、集団における人口の変動・変遷を時間軸に沿って追うことが出来る。マラリア対策を例にとれば、マラリア対策の進捗と5歳未満人口の死亡率の減少により評価を行うことが可能となる。このような情報は、非常に基礎的なものではあるものの、アフリカにおいては、日本のような戸籍・住民票登録制度がないため、整備が遅れている。従って、調査地域においては、特別に人口の動態を把握する仕組みの構築が必要となる。これが、現在、我々が構築を進めている西ケニア・スバ地区におけるシステムである(図1)。5万5千人に対して、毎月追跡調査を行い、出生・死亡・移動などを登録、地域の人口動態をひと月遅れで把握している(図2、図3)。また、同地域では、住所登録の仕組みも無いため、位置情報と登録情報を連結させる事が難しい。したがって、全地球測位システム(GPS)と連動させた登録システムにより家屋に緯度経度を割り振り、位置情報を管理している。

死因を探る

低開発地域においては、多くの人々は、病院ではなく自宅で死亡している。そのため、死亡診断が確定せず、このことは、地域における疾病の状況の把握をさらに困難にしている。そのような現状を少しでも改善するため、死に至る過程を家族・親族に調査し、医師により間接的に死亡診断を行う調査を展開している。この作業を「Verbal Autopsy」という。マラリアによる死亡を可能な限り把握することを目標としている。

マラリア対策の進展を測る仕組み

人口動態を把握するシステムの構築と共に、マラリア対策の進捗度合いを測るシステムも同時に必要となる。現在、人口動態の情報収集システムの上に構築する形で、蚊帳の使用状況を調査するシステムも運用している。個

人毎の蚊帳の使用状況や地域別の蚊帳の使用率、また、使用している蚊帳の種類、さらには、妊婦に対して行われる「マラリアに対する間欠予防治療（intermittent preventive treatment for pregnant women: IPT）の普及状況など、マラリア対策の進捗状況を把握する仕組みの構築も同時に進めている。

遺伝子レベルで感染マラリア原虫を捕らえる：マクロとミクロの連携

熱帯熱マラリアは、熱帯熱マラリア原虫により引き起こされる熱帯病であるが、同じ熱帯熱マラリア原虫であっても、遺伝子レベルでは異なることがわかっている。また、マラリアの高流行地に居住する子供は、遺伝子の異なる多種類の熱帯熱マラリア原虫に感染していることが報告されており、また、そのような子供は、重篤なマラリアを発症しにくいことも報告されている。したがって、多重の熱帯熱マラリア原虫の感染は、住民や子供を完全にマラリア原虫を排除するわけでもなく、症状を呈するわけでもない「半感染・半免疫状態」に保ち、重篤マラリアへの移行を防ぐとともに、マラリアの感染の鎖が断ち切れないような仕組みを維持することに寄与している。そのような「鎖」が、マラリア対策により断ち切れることにより何が起こるのか？マラリア診断に用いられている塗抹標本や簡易診断テストでは、わからない体内の感染マラリア原虫の遺伝子レベルの情報を捉え、その情報と人口動態や実地での調査、さらには、住民の行動・生活習慣の変化等と連結・連動させる事により新しい「切り口」からのマラリア対策の評価、さらには新しいマラリア対策への提言に至る研究を目指している。

図 1



図 2

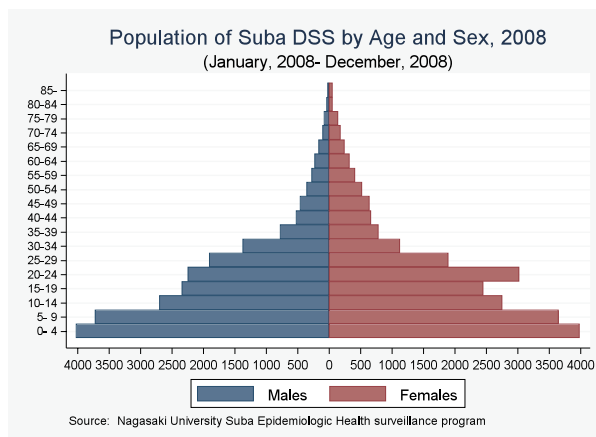
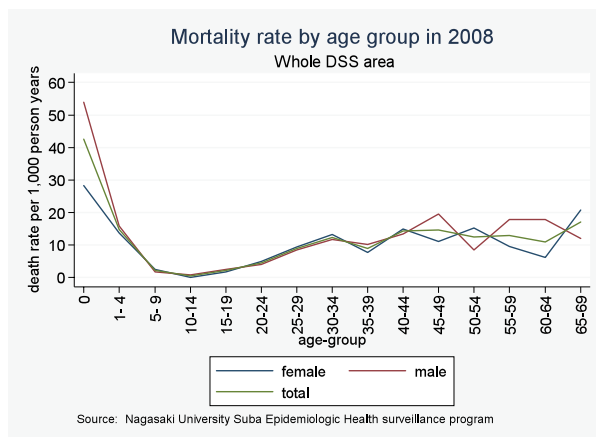


図 3



図の説明

図 1：Demographic Surveillance System (DSS) 展開地域の衛星写真 (Google Earth より)。青い線に囲まれた地域が調査地域である (全長37km、面積163.28km²：東京23区の約1/4の広さ)。この地域に住む5万5千人の動態を23名の調査員で毎月の訪問調査し、把握している。また、公衆衛生に関連する追加調査も実施している。

図 2：同地域の性別5歳階級別人口ピラミッド (2008年)。5-9歳から10-14歳階級にかけての人口の減少は、寄宿制の学校への入学による減少 (ケニアでは、寄宿制が一般である) と考えられる。25-29歳階級の女性の増加は、主に人口の外部からの流入である。その後、30-34歳階級において人口の減少を見るが、多くは人口の流出である。

図 3：性別年齢階級別の死亡率 (2008年集計)。5歳未満死亡率が他の年齢階級に比べ高い。本 DSS のデータから計算された2008年の生命表によれば、同地域の0歳児の平均余命は、男57歳、女61歳であった。同生命表 (2008年) によれば、5歳未満死亡率は、1,000出生当たり女児79、男児109であった。

この研究の発表

発表

1) 第17回 International Congress for Tropical Medicine and Malaria (Jeju, Korea) にて発表

スバコーホートを利用したマラリア媒介蚊と感染の制御研究

熱帯医学研究所 病害動物学

皆川 昇

背景

アフリカの乳幼児を中心に年間100万人近くがマラリアの犠牲になっているといわれている。近年、殺虫剤付きの蚊帳が普及し、その効果が報告され始めたが、媒介蚊による殺虫剤抵抗性も報告されており限界が指摘されている。また、治療薬としてアーツネートを含んだ合剤の普及も進んでいるが、組織的にかつ広範囲に治療を行わなければその効果も一過性である。

媒介蚊の移動は繁殖地近辺に限られているため、移動の激しい人間の体内の原虫を制御の対象にするよりも蚊を対象にする方が効率がよい。さらに、蚊は成虫になり拡散するので、人間から感染させられる前の幼虫の段階で対処の方が効率よいこともモデルにより示されている。よって、本研究では、幼虫を対象とした媒介蚊の制御法を研究する。具体的には、バチルス菌が生成する蚊に特異的な毒素をもとにした環境に優しい幼虫剤と繁殖地の環境修正を考えており、それらの効果的な使用法を探求する。この幼虫剤は、先進国では広く蚊の制御に使われているが、アフリカのマラリア媒介蚊には使用されていない。

対象地域は、西ケニア・スバ地区で、評価のために長崎大学 GCOE 推進担当者の一人である金子聡氏を中心に人口動態システムを展開している。基礎データの収集のため蚊の繁殖地と家屋内の蚊の密度、蚊と幼児の感染調査を定期的に開始し、また、蚊帳の普及・使用状況などの背景も調査している。

高感染地帯とその原因

対象地域は、ビクトリア湖に東西が挟まれるようになってきた半島になっており、西湖岸にある村々で幼児感染率が80%にも達することを発見した。他の地域の幼児感染率が40%前後であるため、それは極端に高い。湖の水位

低下によって出現した湖岸沿いの土地に、波によりできたラグーン状の繁殖地が西湖岸に集中しているため、その地域の家屋内の蚊の密度が非常に高くなっている。ちなみに、水位低下は近年の気候変動に伴う干ばつやナイル川への流出口にあるダムの放水量増加によるといわれている。

主な媒介蚊は、アフリカでよく知られているガンビエではなく、フネスタスであり、水位低下でできた繁殖地にうまく適応していることが明らかになった。西湖岸の村々で採集された媒介蚊の感染率（7 - 8%）も他の地域（3%前後）の2倍以上である。蚊帳の普及率や経済状況は他の地域と違いがないため、湖の水位低下がその地域の高感染の原因であることは明らかである。

蚊帳の使用法

WHOの提言をもとに、政府とNGOにより殺虫剤付きの蚊帳の普及が近年急速に高まっている。調査地域でも多くの家が蚊帳を1 - 2張り所有している。現地の家は小さく、蚊帳を2張り張るのが限界であり、これ以上蚊帳を手に入れても使用ができない。また、1軒に4 - 5人が住んでいるため、1つの蚊帳で2人以上が寝ると蚊帳から体の一部がでてしまう。さらに使用状況を調べてみると、蚊帳をシーツとして使用、暑いためにあっても使用しない、お客用にとっておくなどの例が多くみられた。また、野外では漁網や小魚を干す道具として頻繁に使用されていた。よって、これ以上蚊帳を配っても効果が飛躍的に向上するかは疑問である。蚊帳の配布時には、使用法の説明を十分に行うとともに啓蒙教育も必要である。

今後の計画

高感染地帯にある繁殖地に幼虫剤を散布しつつ、住民の同意のもとに繁殖地を物理的になくす手法を用いて蚊と感染の制御を試みる。少なくとも、今回明らかになっ

た高感染地域においては、繁殖地が湖岸に限られているので、その効果が十分に期待できる。うまくいけば、スポット的な流行の対処法としての好例となりうる。現在、どのように実施するかを行政及び住民と協議中である。

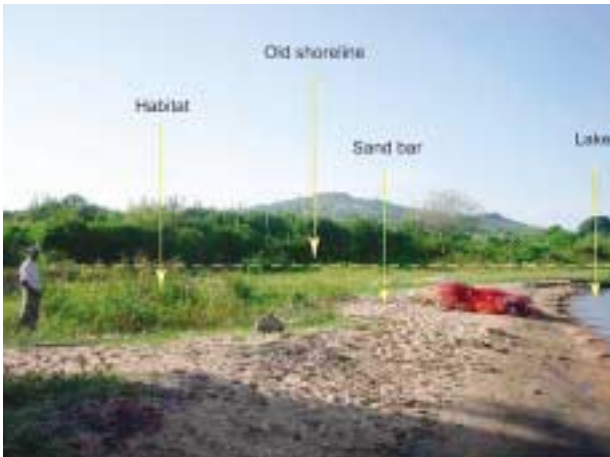


図1：波により砂が岸際に堆積してできた蚊の繁殖地（Habitat）、以前の湖岸は点線の部分にあった。



図2：青色の漁網は、NGO などから支給された蚊帳をつないでつくっている。小魚を干すのにも使用。

この研究の発表

論文

- 1) Minakawa N, Dida O. G, Sonye G, Futami K and Kaneko S. 2008. Unforeseen misuses of bed nets in fishing villages along Lake Victoria. *Malaria Journal*. 7:165.
- 2) Minakawa N, Sonye G, Dida O. G, Futami K and Kaneko S. 2008. Recent reduction in the water level of Lake Victoria has created more habitats for *Anopheles funestus*. *Malaria Journal*. 7:119.

口頭発表

- 1) Minakawa N, Sonye G, Dida GO, Futami K, and Kaneko S. 2008. Recent increase of water hyacinth in Lake Victoria and reduction of lake water level increased breeding habitats for *Anopheles funestus*. XXIII International Congress of Entomology. 2008. Durban, South Africa.

ポスター発表

- 1) Minakawa N, Sonye G, Dida GO, Futami K, Kaneko S, Horio M, and Shimada M. 2008. Recent reduction in the water level of Lake Victoria has created more habitats for malaria vectors. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Jeju, Korea.
- 2) Dida GO, Horio M, Sonye G, Futami K, Kaneko S, Horio M, and Shimada M. 2008. Bed nets for capturing and drying fish in villages on the shore of Lake Victoria. The XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Jeju, Korea.
- 3) Futami K, Omondi J, Syombua M, Akweywa P, Kaneko S, Horio M, Shimada M and Minakawa N. 2008. Non-larvicidal effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Anopheles arabiensis*. The XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Jeju, Korea.

デング出血熱、シャーガス病、マラリアの重症化遺伝子解析

熱帯医学研究所 免疫遺伝学
平山謙二

要約

デングウイルス感染症は熱帯地域で流行する蚊媒介性疾患の中でも重要な感染症である。特に再感染後約3分の1が重症化し出血熱あるいはショック症候群を呈するが、特徴的な病態の形成にはウイルスの病原性ととも宿主側の遺伝的な要因も重要な役割を果たしている。本研究ではデング出血熱のうち、特に重篤なショック症候群を呈した小児を多数集め、ショックに陥らなかった出血熱患者集団との遺伝的な相違について調べた。ここでは候補遺伝子として免疫応答遺伝子であるHLA遺伝子に焦点を絞った。その結果、HLAのある種の型が重症化を促進あるいは抑制することを強く示唆する結果を得ることができた。

背景

ヒトが同じ病原体に感染したあと重症化したりあるいは簡単に回復したりという個性があるのはなぜなのか。この個性の大部分は遺伝子の多様性により出来上がっている。この多様性がどんな外敵が来てもヒトが全滅することを許さないのである。感染症に対するヒトの応答性を観察することにより、その防御能の個体差を規定している遺伝子の変異を見つけることでそのメカニズムの詳細を解明することができる。

ベトナムにおける デング出血熱の流行

デング熱はネッタイシマカという熱帯地域に生息する蚊によって媒介されるウイルス感染症である。1980年代より急激にその数を増加させている。熱帯地域での大都市への人口集中や医療保健衛生システムの整備による診断技術の向上などが原因ではないかと考えられる。もち

ろん、媒介蚊が多数発生し、患者が密集する地域ではいつでも大流行する危険性がある。ベトナムの南部は熱帯地域であり、近年の経済発展に伴い、ホーチミン市など都市部への人口集中は著しいものがあり、毎年患者の発生があり、また死亡例も報告されている。

デング出血熱の病態

蚊に吸血されるとウイルスが体内に侵入し樹状細胞内で増殖を開始5日間の潜伏期の後39度以上の高熱、頭痛、骨痛、筋肉痛などが3 - 4日続き、その後解熱する。ウイルス血症も発熱後5日ほどで検出限界以下に下がってしまう。同じ血清型のウイルスに再感染することはないが、血清型が変われば再感染することになる。おもに再感染の場合、解熱時に突然出血やショック症状を呈するデング出血熱やショック症候群を多く発症する。消化管の大出血やショックによる死亡例も多くみられる。重症化を引き起こす原因として一般的には、再感染時にウイルス感染増殖を促進する抗体があげられる。過剰に増殖したウイルス粒子は免疫系を刺激し炎症性のサイトカインを過剰に産生させることになり、それによって免疫系の制御が壊れ全身の血管の透過性が一気に亢進し血漿の漏出が起こる。あるいは凝固系の異常から出血が引き起こされる。

デング出血熱感受性抵抗性 HLAの探索

ベトナムの限られた地域で限られた期間患者を観察し、重症化する人たちの遺伝的な特徴を観察する研究を行った。患者はホーチミン市内の第2小児病院と近郊のピンロン県予防医療センターの二つの病院を訪れ、入院治療した小児のうち、研究の条件に合致した者を選び出し、本人あるいは保護者の承諾を得たうえで各種検査を行っ

た。倫理委員会はベトナムと日本の両方で独立して申請し承認を受けた。対象としたのは、6か月から15歳までのキン族（ベトナム人の大半）男女で病院近郊に居住する者とし、WHOの診断基準に従って、デング出血熱（DHF）およびデングショック症候群（DSS）の診断を行った。対照としては、二つの病院の近郊の同年齢の小児を採血した。2002年から2005年まで足かけ4年の歳月をかけて1200名ほどの小児のサンプリングを終了し、ショック症候群420名、出血熱群211名、デング熱114名、対照群450名のDNA解析を行った。

デング出血熱と HLA 対立遺伝子との相関

HLA A 座の HLA A*24 の 70 番アミノ酸がヒスチジングループの対立遺伝子の頻度がデング熱、デング出血熱で上昇し、ショック症候群でさらに上昇するという重症化促進因子として働いていることがわかった。また、HLA DRB1*0901 が特にショック症候群で優位に減少することがわかった。すなわち、この対立遺伝子は重症化を

抑制する働きがあった。今回のような多数の重症患者を用いた研究は世界で初めてだが、すでに数年前に同じホーチミン市の熱帯病病院で行われた研究においても、HLA A*24 との患者の相関が報告されている。今回の結果は再現性を確かめたことになる。HLA は T 細胞の活性化に必須の抗原提示分子であるので、これらの遺伝子を持つ個体では何らかの特徴的な T 細胞応答が行われている可能性が高い。HLA A*24 分子が提示できるデングウイルスのタンパク配列はある程度予測できるが、できれば網羅的な抗原の探索を行い、刺激される CD8 T 細胞の特徴を他の HLA と比較ながら観察する予定である。さらに興味深いのは HLA DRB1*0901 により刺激される T 細胞の性質である。これは防衛的に働くので、ワクチンのデザインに直接関係する現象を拾う可能性がある。

今回の研究には、以下の方々が協力した。ベトナムのホーチミン市バスツール研究所 VTQ Huong 博士、Tien 所長、第2小児病院の TT Thuy 部長、ビンロン県予防医学センターの VV Tuong 医師、長崎大学熱帯医学研究所の森田教授、安波教授、菊池講師、大学院生 NP Lan、医学部生小山君。

この研究からの発表

論文

- 1) Lan NT, Kikuchi M, Vu TQH, Vu TTN, Hoang ND, Do QH, Tran TT, Vo T, Cao N, Tran D, Oyama T, Morita K, Yasunami M, Hirayama K. Protective and Enhancing HLA-alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Fever, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. PLoS Negl Trop Dis. 2(10): e 304, 2008
- 2) Helegbe GK, Nguyen TH, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with Plasmodium berghei-ANKA after chronic exposure. Malaria Journal 2009, 8: 91 doi:10.1186/1475-2875-8-91

は GCOE の記述あり

メラネシア島嶼におけるマラリア排除： 疫学・生態学・進化学的アプローチ

熱帯医学研究所
金子 明

背景

2008年9月15日、ニューヨークで開催された国連ミレニアム開発計画マラリアサミットにおいて新たな世界マラリア行動計画（Global Malaria Action Plan）が採択された。そこでは今後段階的にマラリア患者数を減らしていき、根絶まで持っていく方針がはっきり打ち出されている。現在の国際社会の期待感（＝楽観主義）は1955年WHOによる最初のマラリア根絶計画が立ち上がった当時と類似する。しかしこの最初の根絶計画は1960年台に頓挫した。その理由として、1）マラリア伝播の地域特性が対策上に考慮されなかったこと、2）根絶にいたる長期間の対策維持の課程において住民のみならず援助側も疲弊したことが上げられている。ここ数年、多くの流行国において外部援助資金の著しい増大により、新たなマラリア患者治療方針および新たな媒介蚊対策のスケールアップが進み、一部ではその成果が報告されてきている。ザンジバルにおいては、WHOの近年の戦略従い、2002年に Artemisinin-based combination therapy（ACT）、2005年に long-lasting impregnated nets（LLIN）が導入され、その結果マラリア流行抑止に著しい効果があったことがカロリンスカの当研究グループにより報告されている〔4〕。しかし根源的な問題は未解決である：短期間の重点的な対策により一定地域からマラリアが除去された後、いかにその状態を根絶にいたるまで長期間維持しうるか？

マラリア死の80%はアフリカの5歳以下小児に集中するが、発症例の半数以上はアフリカ外でおきる。マラリア流行の多様性が重要である。地域特性は人、原虫、媒介蚊集団の遺伝的構成を制御し、それが感染効率、疾病重症度、治療薬・殺虫剤効果、ワクチン開発等の対策構成要素に重要な影響を与えており、マラリア地域特異性を考慮した対策戦略の確立が必要であると考え。一方、人、熱帯熱マラリア原虫、媒介蚊（*Anopheles gambiae*）

の全ゲノム解読が達成された。新たな知見がいかに流行地住民の生活水準向上に貢献しうるかは21世紀における科学の挑戦である。本研究においては地域特性に基づいたマラリア対策について、太平洋島嶼マラリア流行地域のヴァヌアツ、パプアニューギニアよりアプローチする。

三日熱マラリア感染に対する 防御免疫は島嶼における マラリア排除後10年間維持され！

ヴァヌアツのアネイチウム島では、筆者がWHOマラリア専門官として1991年に集団治療と媒介蚊対策による集約的対策を実施した。その結果マラリア感染は排除され、小島嶼ではマラリア根絶が可能であることを報告した〔2〕。アネイチウム島の事例は西太平洋地域島嶼マラリア対策のモデルとして取り上げられ、ヴァヌアツおよびソロモン島嶼のマラリア感染排除を目指した新たな取り組みが主としてAUSAIDの主導により始まっている。戦略はACT、LLINおよびindoor residual spraying（IRS）を組み合わせた総合的対策である。

地域からマラリア排除後の根絶に至るまでの状態維持を妨げる要因として、マラリア再導入・再燃は極めて重要な問題である。アネイチウム島においては、1991年のマラリア排除後、住民主導のサーベイランスおよび媒介蚊対策が維持されていた。しかし同島へのマラリア再導入・再燃の可能性は継続的に存在していた。マラリアが排除された状態は、2002年当初まで維持された後、マラリア患者集団発生が住民側サーベイランスにより認知され、我々はマラリア再燃について検討を行うことになった。

方法：アネイチウム島の全住民を対象とした横断的マラリア調査（malaria serosurvey）を2002年の6月と11月に実施した。特に年齢特異的マラリア罹患率を明らかにし、その免疫応答および原虫多様性における意義に

ついて検討した。

結果：2つの調査において計28例の三日熱マラリア(Pv)感染と1例の熱帯熱マラリア(Pf)感染が見出された(原虫陽性率 18%)。このPfはタナ島から移入されたものであったが、すべてのPvは土着の伝播(indigenous)と考えられた。この28例Pv中、26例は1991年以降に生まれたマラリア感染の経験がない子供であった。1982年以前に生まれた集団では全く感染が見出されなかった。後者集団においては、マラリア排除後7年が経過した1998年の時点において、PvおよびPf赤内型原虫粗抗原に対するIgG抗体血清陽性率はそれぞれ81%および34%、PfおよびPv組み換えスポロゾイト蛋白に対するIgG抗体血清陽性率はそれぞれ12%および3%であった。Pvmsp1シークエンスでは2002年アネイチウムにおいて2つのハプロタイプが見出された。一方マラリア伝播が継続する比較6島においてはハプロタイプ数は4-10であった。アネイチウムにおける主要ハプロタイプはその93%を占め、すべての比較島において見出された。一方もうひとつのハプロタイプは6比較島中2島に見出された。これらヴァヌアツ7島において、pvmSP1ブロック5のシークエンスされた領域で見出されたSNPは一つのみであった。

考察：アネイチウムにおいてみられた制限された原虫多様性は再燃が単一の新たな移入によることを示唆する。我々の結果は地域からのマラリア排除後、原虫に対する抗体レベルが以前繰り返し感染暴露した集団においては10年後も維持されることを示唆する。このことはまたアネイチウムにおける2002年の再燃における成人の防御を説明すると考えられる。限られた遺伝子プールにおける安定したPv抗原SNPがこれらの背景として考えられる。



図：アネイチウム島における community microscopist

この研究の発表

論文

- 1) Chaves L F, Kaneko A, Pascual M. Random, top-down or bottom-up co-existence of parasites: malaria population dynamics in multi-parasitic settings. Ecology 2009; in press.
- 2) Dahlström S, Ferreira PE, Veiga MI, Sedighi N, Wiklund L, Mårtensson A, Färnert A, Sisowath C, Osório L, Darban H, Andersson B, Kaneko A, Conseil G, Björkman A, Gil JP. Plasmodium falciparum Multidrug Resistance Protein 1 (pfMRP 1) and artemisinin-based combination therapy in Africa. J Infect Dis 2009; in press
- 3) Kaneko A, Chaves LF, Taleo G, Wickremasinghe R, Perlmann H, Tsuboi T, Björkman A, Tanabe K, Troye-Blomberg M. Protective immunity against *Plasmodium vivax* infections persists a decade after malaria elimination on islands: a cross-sectional observation. Manuscript-A.
- 4) Kaneko A, Taleo G, Chaves LF, Tanabe K, Troye-Blomberg M, Björkman, Rieckmann KH. Sustainable malaria freedom: a longitudinal study on Aneityum island 1991-2007. Manuscript-B.

インフルエンザ肺炎における重症化因子の迅速検出法の開発

医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 先進感染制御学
河野 茂

背景

新型インフルエンザの流行が現実のものとなり、インフルエンザウイルス (Flu) 感染症はかつてないほど注目を集めている。我々は以前からインフルエンザウイルス感染に伴う、特に呼吸器領域での感染免疫に関して研究を行っており、肺炎球菌 (Sp) との重複感染による致死性の肺炎マウスモデル及び緑膿菌慢性気道感染マウスのインフルエンザウイルス感染による急性増悪モデルを確立し、PAF (肺炎球菌の anchor) やケモカイン、Toll-like Receptor、好中球機能などを解析し、インフルエンザ肺炎の重症化に個体側の免疫学的要因が大きく関与している可能性を突き止めていた。

本プログラムにおいて、長崎大学は地球規模での熱帯病・新興感染症統合制御を目標としているが、個々の患者においても、インフルエンザの発症のみならず、その重症化を予測し、病態を制御することはきわめて重要な研究テーマと考えられる。

われわれは前述したマウスモデルの解析から、重症化に関連する免疫分子を同定し、これを阻害することができれば、病態制御や重症化防止が大いに可能であろうと考えた。

今回はこの中から、ジェノミクス (遺伝子) 的解析と併行して進めた、プロテオミクス (タンパク) 的手法を用いた解析とその結果確認された好中球関連の酵素とその活性化について特に解説する。

プロテインチップを用いて、病態に 相関する共通のシグナルを発見!

プロテインチップシステムはイオン化したタンパク質をシグナルとして検出する新たな近年開発されたシステムであり、前立腺ガンにおける腫瘍マーカーの同定などに実績を上げている。我々はこのシステムを感染症に応

用することを試み、以前から解析を行っているインフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染による重症肺炎マウスモデルの肺組織ホモジネートにおいて、各々の単独感染による比較的軽症の肺炎マウスの肺組織ホモジネートと比較し、その肺炎重症度と発現量が相関する共通シグナルをサンプルから同定した (図1)。

2次元電気泳動にて分子を同定、確認!

この後、同じくプロテオミクスの解析法として2次元電気泳動による同様の比較検討を試みた。

特に重複感染による重症肺炎サンプルにおいて強く発現しているバンドを確認したが (図2)、これはPMF解析から、好中球関連のプロテアーゼ: α アンチトリプシン (A1AT) と判明した。これは特に好中球の活性化を制御する酵素として知られており、他の重症肺障害発症との関与を示唆する多数の臨床報告とも一致するデータである。エラスターゼや関連する酵素活性の上昇もこのマウスモデルにおいてその後確認した。さらに、これらのインフルエンザ肺炎マウスにおいて、プロテアーゼ阻害剤 (gabexate mesilate) の投与により、重症化を一部抑制することができた。

プロテインチップシステムは装置の簡便化や臨床現場への応用が進められており、今後これらの成果が実際にインフルエンザ患者の肺炎への進展、致死化の予測に大いに応用され、迅速な治療が可能となることが期待される。

プロテインチップでのシグナルと実際の同定されるタンパク質の詳細な比較や、血清をサンプルとして用いた場合のデータやその処理、同定されたタンパク質の治療ターゲットとしての応用の可能性も示唆され、さらに多くの症例やモデルにおける検討を進めていく予定である。

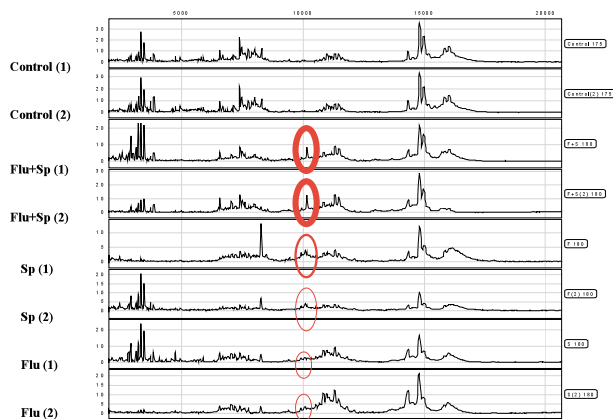


図1：プロテインチップによるマウス肺組織ホモジネートの解析。ウイルスまたは細菌感染単独群が見られるシグナルが、重症の重複感染肺で特に強いピークを示す（赤丸）。

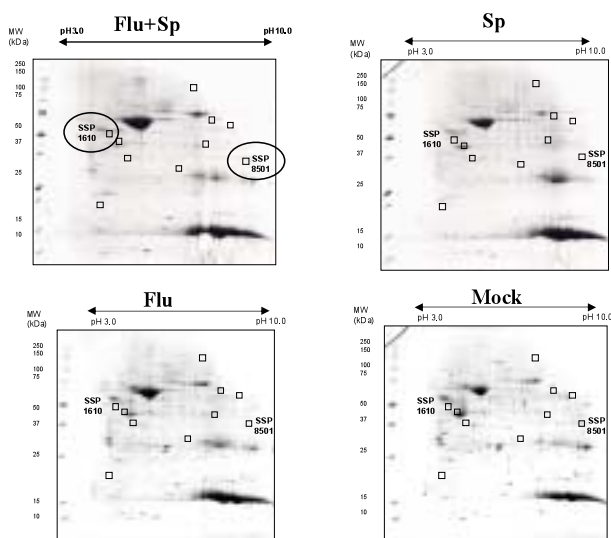


図2：2次元電気泳動によるマウス肺組織ホモジネートの解析。ウイルスまたは細菌感染単独群と共通に見られるバンドが、重症の重複感染肺で特に強く見られる（黒丸）。

この研究の発表

論文

- 1) Seki M, Kosai K, Hara A, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mukae H, Tashiro T, and Kohno S. 2009. Expression and analysis of Platelet activating factor (PAF) related molecule in severe pneumonia in mice due to influenza virus and bacterial co-infection using by DNA microarray Jpn J Infect Dis. 62: 6-10.
- 2) Seki M, Suyama N, Hashiguchi K, Hara A, Kosai K, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Mukae H, Tashiro T, and Kohno S. 2008. A patient with fulminant influenza-related bacterial pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* followed by *Mycobacterium tuberculosis* infection Intern Med. 47: 2043-2047.
- 3) Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, and Kohno S. 2008. Two-dimensional gel electrophoresis analysis in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice. Clin Exp Immunol. 152: 364-371.
- 4) Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, and Kohno S. 2008. Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfecting with influenza virus. Scand J Infect Dis. 28: 338-342.
- 5) Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, and Kohno S. 2008. Gabexate mesilate suppresses influenza pneumonia in mice through inhibition of cytokines. J Int Med Res. 36: 322-328.

学会発表

- 1) *Seki M, and Kohno S. 2008. Severity of community-acquired pneumonia due to influenza virus and bacteria co-infection. Gordon Research Conference 2008: Biology of Acute Respiratory Infections. March 10-14. Ventura, USA.
 - 2) Seki M, Kosai K, Yanagihara K, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, and Kohno S. 2008. Two-dimensional gel electrophoresis analysis in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice. America Thoracic Society: General Meeting 2008. May 18-22. Toronto, Canada.
 - 3) 関 雅文、河野 茂 2008インフルエンザウイルス感染後の二次性細菌性肺炎に関する検討 第7回九州肺分子研究会 1月12日 福岡
 - 4) 関 雅文、柳原 克紀、小佐井康介、栗原慎太郎、中村茂樹、泉川公一、掛屋 弘、山本 善裕、田代 隆良、河野 茂 2008 インフルエンザウイルス感染を合併した細菌性肺炎の重症化に関する検討 第105回日本内科学会総会 4月11日 東京
 - 5) 関 雅文、河野 茂 2008 2次元電気泳動を用いたインフルエンザウイルス感染後の重症細菌性肺炎における好中球由来プロテアーゼの関与に関する検討 第82回日本感染症学会総会 ワークショップ 4月17日 島根
 - 6) 小佐井康介、関 雅文、柳原 克紀、栗原慎太郎、中村茂樹、泉川公一、掛屋 弘、山本 善裕、田代 隆良、河野 茂 2008 プロテアーゼ阻害剤による重症インフルエンザウイルス肺炎の制御に関する検討 第82回日本感染症学会総会 4月17日 島根
 - 7) 関 雅文、小佐井康介、栗原慎太郎、中村茂樹、泉川公一、掛屋 弘、山本 善裕、柳原 克紀、田代 隆良、河野 茂 2008 インフルエンザウイルス感染を合併した市中肺炎症例の重症度と関連するサイトカインに関する検討 第48回日本呼吸器学会総会 6月16日 神戸
 - 8) **関 雅文、河野 茂 2008 重症インフルエンザウイルス肺炎に関するマウスを用いた検討 第61回日本呼吸器学会・結核学会九州地方会 学術奨励賞受賞講演 11月6日 沖縄
- (* 日本化学療法学会海外派遣奨学費 受給 ** 日本呼吸器学会・結核学会九州支部学術奨励賞 受賞)

抗ウイルス剤開発

医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 感染分子薬学
小林信之

背景

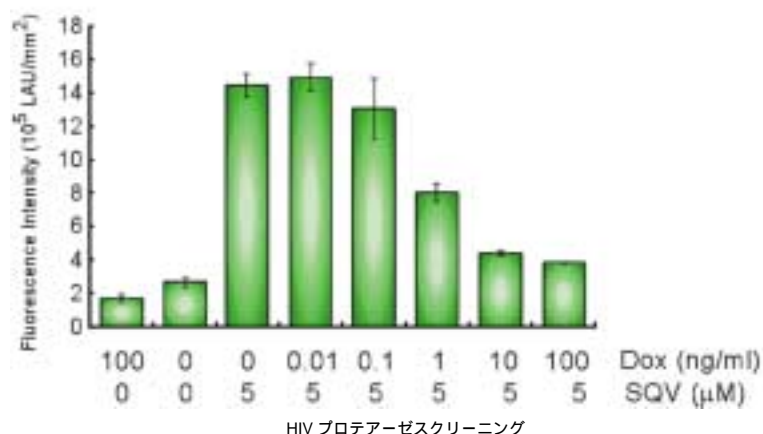
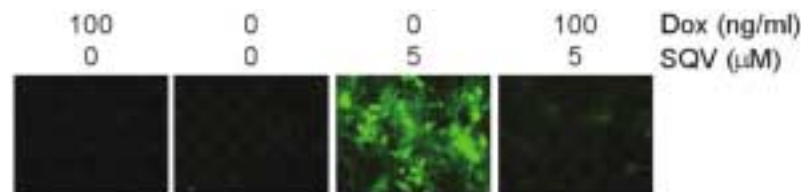
これまで細菌性感染症に対しては抗菌剤の開発が積極的に行われて来ているが、ウイルス性感染症に対する治療薬の開発は AIDS を除いて大きな進歩がないのが現状である。その最大の理由は抗ウイルス剤の効果的なスクリーニング系の開発が進んでいないためである。AIDS において今日効果的な治療薬の開発が進められてきた背景には感染高感受性細胞の発見 (Harada S, et al. Science 229, 1985) とその細胞系を用いた抗ウイルス剤スクリーニング系の樹立があった (Nakashima H, et al. Med Microbiol Immunol 175, 1986) ためである。今日の抗 AIDS 薬の開発はこれらスクリーニング系の樹立になしえなかったと言っても過言ではない。他方、今日 SARS やトリ高病原性インフルエンザウイルス等の新たな脅威を迎え、新規抗ウイルス剤の開発がきわめて重要な課題となってきた。我々は新規抗ウイルス剤の開発に向けて、効果的な抗ウイルス剤のスクリーニング系の確立を基盤とした新規抗ウイルス剤の開発を進めていく。

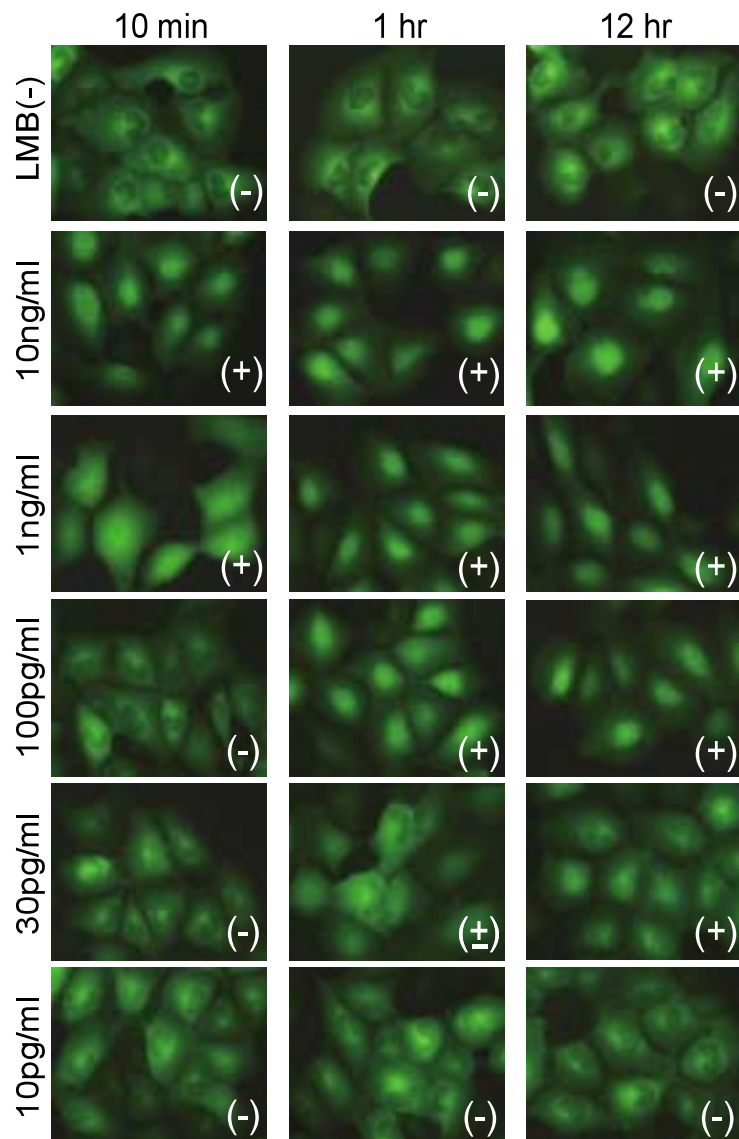
これまでの成果

我々はこれまで効果的な抗ウイルス剤スクリーニング系として HIV プロテアーゼ阻害剤評価系を開発した。この系では HIV プロテアーゼ蛋白質をテトラサイクリン制御下に発現制御を行っている (図 1 Fuse et al. Microbes and Infection 8, 2006)。

この系では HIV ウイルスそのものを利用しないため、安全に抗ウイルス剤の探索が行われる。現在天然物資源を利用して新規活性を探索中である。

1997年の香港での H5N1 型トリ高病原性インフルエンザ出現以来今日までインフルエンザウイルスの世界流行が懸念されているが、これまでに開発され、上市された抗ウイルス剤に関しては M2 阻害剤であるアマンタジンおよび NA 阻害剤であるタミフルおよびリレンザのみである。インフルエンザウイルスはエイズウイルス同様極めて変異率が高いウイルスであるため容易に耐性ウイルス株が出現すると予測される。事実既にアマンタジン耐性株は広く世界に広まっており、タミフル耐性株の出現も確認されてきている。このような状況においては





インフルエンザウイルス vRNP 核外輸送阻害剤スクリーニングシステム

AIDS 同様インフルエンザウイルスも異なる作用点に働く抗ウイルス剤の開発や耐性株の出現しにくい治療薬の開発が急務である。このような観点から我々はこれまで抗インフルエンザ薬の効率的なスクリーニング系の確立を進めてきた。これまでにハイスループットな抗インフ

ルエンザウイルススクリーニング系の確立に加え、我々は細胞因子を標的とした抗インフルエンザウイルスのスクリーニング系を確立した (Watanabe K et al. Drug Discover Ther2 2008)。

HIV 感染・再活性化を助長する細菌の制御薬物開発のための基礎研究

医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 口腔病原微生物学
中山浩次

背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の口腔汚染から全身感染を引き起こすことが HIV 陽性の母親をもつ母乳栄養の子において報告されている。実験的にも口腔粘膜上皮への HIV 1 の感染によって口腔組織の初感染に引き続いて全身への HIV の播種がみられている。口腔上皮細胞には通常、HIV のコレセプターである CCR 5 は発現しておらず、初感染時に重要な R5 tropic HIV の感染がどのように生じるかについては不明であったが、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の感染により CCR 5 がケラチノサイトに発現することが実験的に証明された (J. Immunol. 2007, 179, 2542-2550)。また、*P. gingivalis* の代謝産物である酪酸によって生体細胞内に潜伏している HIV 1 の再活性化が生じることが実験的に証明されている (J. Immunol. 2009, 182, 3688-3695)。このように *P. gingivalis* の感染により HIV の口腔からの感染や再活性化を引き起こす可能性がますます報告されている。本研究は HIV 感染・再活性化を助長する *P. gingivalis* の増殖をコントロールする薬物を開発するため、本菌の最重要病原因子である分泌性タンパク分解酵素 gingipain の分泌機構を解明することにある。

P. gingivalis ATCC33277ゲノムの全塩基配列決定！

P. gingivalis ATCC33277株全ゲノム塩基配列を決定した。ATCC33277株ゲノムは2,354,886塩基対でW83株ゲノムサイズとほぼ同じでありGC比も差がなかった。ATCC33277株ゲノムからは2,091個の推定遺伝子 (ORF) を抽出した。NCBIに登録されているW83株ゲノムについてもORFの再抽出を行い、ORFを2023個とした。W83株ゲノムの177個、ATCC33277株ゲノムの223個がそれぞれの株に特異的なORFであった。

ATCC33277株ゲノムには新規の conjugative transposon (CTn) が1つ、部分的CTnが3つ見出された。またATCC33277株ゲノムとW83株ゲノム間には全領域にわたって177箇所の再構成が生じており、ゲノム構造に大きな相違があることがわかった。再構成のうち39ヶ所では大規模なゲノムの inversion や組み換えにより遺伝子の並びが大きく入れ代わっていた。再構成がみられた箇所の76.9%にはISまたはMITEの痕跡が認められた。このことから *P. gingivalis* におけるゲノムの再構成には transposable elements が関与していると考えられた。さらに各株特異的なORFの多くはゲノムの再構成によって影響をうけるORFであったことから、ゲノムの再構成が *P. gingivalis* の株間の多様性をもたらしていると推測された。決定したATCC33277株のゲノム配列のさらなる解析を進めた。ATCC33277株のゲノムに見いだされた intact なCTn (CTnPg1) が実際にゲノム配列から切り出され他の *P. gingivalis* 株に伝達するかを検討した。CTnPg1がゲノム配列から切り出されて circular intermediate form を形成することをPCRにて確認した。さらにATCC33277株のCTnPg1領域にアンピシリン耐性遺伝子を挿入した株およびW83株のporTにエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入した株を作製し、接合実験に供した。ATCC33277株からW83株へのCTnPg1は伝達され、伝達効率は 10^{-5} ~ 10^{-6} であった。*P. gingivalis* 菌株間の活発な遺伝子転移が推測された。この結果は *P. gingivalis* でみられるゲノムの再構成は transposable elements がもたらしているという我々の推測を強く支持するものであった。

さらに網羅的な遺伝子発現の解析をめざして、市販のDNAアレイでは得られない各遺伝子の転写単位の決定、遺伝子発現の調節領域の同定等を目指す為にカスタム tiling DNAアレイを作製した。DNAアレイのプローブはATCC33277株の両鎖のゲノム配列をもとに8+/-3bp間隔に全ゲノム配列にわたってオーバーラップす

るように設計した。この tiling DNA アレイをもちいてまずはアレイへの target の反応条件を検討し決定した。現在までに野生株の対数増殖期の菌体から調製した RNA より作製したカスタム DNA アレイに反応させデータを得た。野生株の対数増殖期には機能が推定される遺伝子だけではなく機能が未知の hypothetical protein の一部も発現することを明らかにした。

gingipain の分泌機構

私たちはジンジパインの菌体外への輸送・分泌機構に異常を示す変異株を分離し、その変異遺伝子 *porT* を同定している。P. gingivalis の遺伝子のもっとも類似性のある ortholog は近縁種である Bacteroides fragilis などに見つかることが多いが、*porT* 遺伝子については Bacteroides には存在せず、Phylum Bacteroidetes 中の少し離れた菌種である Cytophaga hutchinsonii や Flavobacterium johnsoniae に見つかる。そこで P. gingivalis の遺伝子で C. hutchinsonii には ortholog が存在するが、Bacteroides 種のいずれかにはないもの、67 遺伝子 (*porT* を含む) を同定し、その内の 46 遺伝子の変異株を作製したところ、10 遺伝子の変異株がジンジパインの輸送・分泌機構に異常を示した。そのなかに C. hutchinsonii や F. johnsoniae の滑走運動に関わる遺伝子群の ortholog が含まれていた。そこで F. johnsoniae の *porT* ortholog の変異株を作製したところ、その変異株は滑走運動に異常を示した。今回、同定されたジンジパイン輸送・分泌機構に関与するタンパクはいままでに報告のある輸送・分泌機構に含まれるタンパクとは類似性がないものであり、新規のタンパク輸送・分泌機構を構成しているものと考えられる。

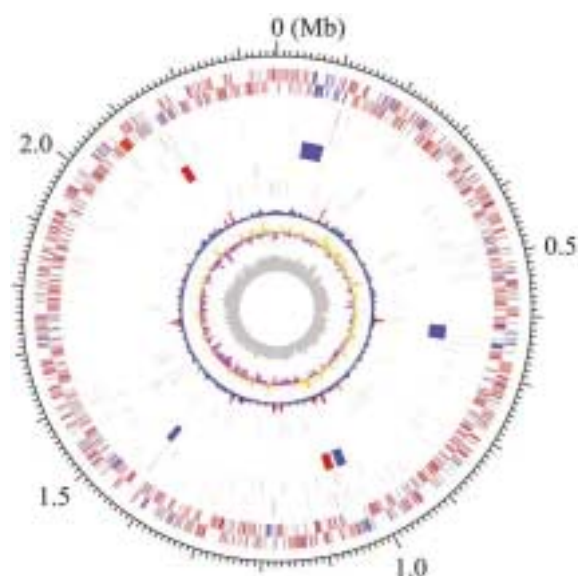


図 1 : P. gingivalis ATCC33277 の全塩基配列決定

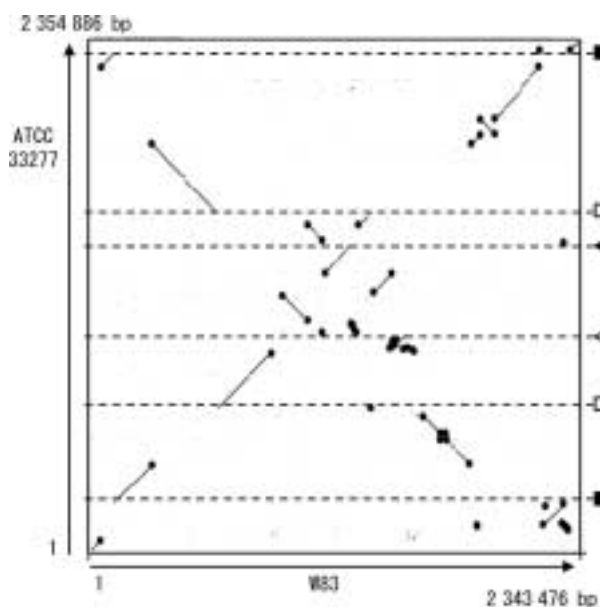


図 2 : ATCC33277 と W83 のゲノム配列の比較 (大規模なゲノム再編成がみられる)

この研究の発表

論文

- 1) Naito, M, Hirakawa, H, Yamashita, A, Ohara, N, Shoji, M, Yukitake, H, Nakayama, K, Toh, H, Yoshimura, F, Kuhara, S, Hattori, M, Hayashi, T, and Nakayama, K. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W 83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. DNA Res. 15: 215-225, 2008
- 2) Sato K, Kido N, Murakami Y, Hoover CI, Nakayama K, and Yoshimura F. Lipopolysaccharide biosynthesis-related genes are required for colonial pigmentation of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology-SGM, in press.
- 3) Kikuchi Y, Ohara N, Ueda O, Hirai K, Shibata Y, Nakayama K, and Fujimura S. *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative ECF sigma factor shows a mutator phenotype. Oral Microbiol. Immunol., In press.

エイズ及びプリオン病の検査法と治療薬の開発

医歯薬総合研究科 環境薬科学講座 機能性分子化学
甲斐雅亮

背景

本研究では、国内での流行が危惧されている後天性免疫不全症候群（AIDS）とプリオン病に焦点を当て、これらの検査法および治療薬を新規に開発することを研究目標にしている。

現在、日本国内でのヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染者は一万人を越えると言われており、特に首都圏を始めとする人口密集地域において HIV 感染が広がっている。抗 HIV 薬の開発により、AIDS の発症を遅延できるようになったが、HIV ゲノムは容易に変異するため、薬剤耐性をもつ変異株が直ちに出現する。そのため、HIV 感染者の持つ HIV のサブタイプを同定する手法は、効果的な AIDS 治療を行う上で非常に重要である。今回、HIV プロテアーゼの基質特異性を利用した、HIV サブタイプの識別法に関する有用な知見が得られたので報告する。また、抗 HIV 薬の開発研究の一環として、HIV プロテアーゼを標的とした RNA 干渉法（RNAi）についても簡単に報告する。

プリオン病は、正常なプリオンタンパク質（PrPC）の立体構造が変化した、異常型プリオンタンパク質（PrPSc）によって引き起こされる一連の神経疾患である。また、PrPC は、PrPSc との接触によって異常型へと変異すると考えられている。つまり、PrPSc は、病原体であり且つ感染源であると言える。しかし、正常型と異常型のアミノ酸配列が同じであることから、これらの識別は困難であり、現在のところプリオン病に対する効果的な治療法は開発されていない。従って、正常型と異常型の物性の調査およびこれらを識別できる分子の発見は、プリオン病治療薬の開発において重要な意味を持つ。今回は、アプタマー探索に必要なマウスプリオンタンパク質（mPrP）の発現と精製を試み、その物性に関して興味深い結果が得られたので報告する。

基質特異性の変化を調べることによって HIV プロテアーゼの変異を判定する

現在臨床で用いられているほとんどのエイズ治療薬は、プロテアーゼなどの HIV 由来の酵素を標的としている。

しかし、HIV のゲノム RNA が変異すると、HIV 酵素の配列も変異するため、活性中心の構造に変化が起こる。そのため、エイズ治療薬がこれらの酵素と強く結合できなくなり、抗 HIV 活性が低下する。これが、HIV の薬剤耐性獲得の原理である。一方、この現象は、HIV の変異によって HIV 酵素の基質特異性が変化していると解釈できる。つまり、HIV プロテアーゼに変異が生じた場合、基質の切断活性が変化すると予想される。そこで、様々な基質ペプチドに対する HIV プロテアーゼ変異体の切断パターンを解析し、簡便かつ迅速な HIV 変異株の同定法としての可能性を探索した。

この切断パターン解析を可能にする手法として、当研究室で開発した、遊離の N 末端アミノ基を持つペプチドに対する高選択的蛍光誘導体化法を適用した。この反応は、N 末端が修飾されたペプチドやペプチド結合を有しない他の生体物質に対しては蛍光を与えず、極めて選択性が高い。従って、N 末端が保護された HIV プロテアーゼの基質ペプチドを用いて、酵素反応とそれに引き続く蛍光誘導体化を行えば、切断されたペプチド断片のみが蛍光を発する。基質ペプチドとして、N 末端がアセチル化された 4 種のペプチドを用い、天然型 HIV 1 プロテアーゼおよび 2 種の変異型 HIV 1 プロテアーゼによる基質切断パターンを評価した（図 1）。その結果、変異体 1 では、各ペプチド断片のピーク強度比は同程度であった（図 1A、B）。しかし変異体 2 では、各ピークの強度比が変化していた（図 1C）。これらの結果から、HIV プロテアーゼに変異が起こると、各ペプチド基質の認識能に変化が生じ、変異に特徴的な生成パターンを与えることが明らかになった。この発見は、HIV サブタイプ同定のための新しい技術開発につながると期待できる。

一方、HIV 酵素には、変異が起こってもアミノ酸配列が高度に保持されている領域が存在する。従って、この領域の mRNA を標的としてタンパク質発現を阻害できれば、HIV の変異に影響を受けない理想的な抗 HIV 薬の開発につながると予想できる。そこで、短い 2 本鎖 RNA（siRNA）によって特定 mRNA の発現を阻害する AIDS 治療薬の開発研究に着手した。現在、人工修飾核酸を持つ siRNA を合成している。

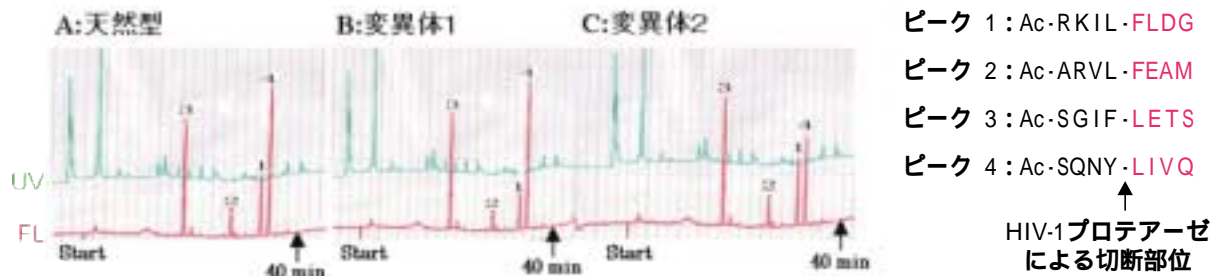


図1 HIV-1プロテアーゼを用いた4種のペプチド(図右の配列)の切断パターン。A)天然型 HIV-1プロテアーゼを用いた場合。B)変異体1 (Leu5Pro, Gly57Arg, Asn83Tyr)を用いた場合。C)変異体2 (Leu5Pro, Gly57Arg, Gly68Arg)を用いた場合。

プリオンタンパク質の調製法によって溶解性に差が生じる

特定の分子に対して親和性を有する核酸分子 (DNA または RNA) すなわちアプタマーは、試験管内で大量合成が容易であり、安定で、かつ化学修飾も比較的容易であるため、抗体に代わるものとして期待されている。我々は、PrPC と PrPSc を識別できるアプタマーの開発を行っているが、そのために、大量のプリオンタンパク質が必要となる。そこで、mPrP の大量調製を目的として、大腸菌発現系を用いて mPrP の発現と精製を行い、さらに、mPrP の溶解性と酵素分解の抵抗性について調べた。

マウス脳 cDNA ライブラリーより、mPrP cDNA をクローニングし、発現プラスミドを構築した。大腸菌中において PrP のみを発現させた場合、封入体となることが報告されていたので、今回、比較的分子量の大きいタグタンパク質であるマルトース結合タンパク質 (MBP) が融合しているタンパク質 (MBP-mPrP) として発現させた。大腸菌から発現タンパク質を抽出する場合、一般的に、菌体破碎は超音波処理によって行われる。しかし、PrPC に極少量の PrPSc を共存させると、インキュベーションと超音波刺激の繰り返しによって、PrPSc が試験管内で増幅することが知られている。そこで、大腸菌を超音波と低張ホモジナイズの2種類の方法で破碎

し、それぞれの破碎方法により調製した抽出液から mPrP を精製した。まず、MBP のアミロース親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いて MBP-mPrP を精製し、その後、MBP-mPrP から MBP を切断することで、最終的に mg 単位の精製 mPrP を得た。

次に超音波破碎によって得られた mPrP [mPrP(s)] とホモジナイズによって得られた mPrP [mPrP(h)] の溶解度を調べたところ、可溶化剤を含む水溶液に対しては、mPrP(h) の溶解度は mPrP(s) の溶解度より高くなっていた (表1)。また、両 mPrP を proteinase K で消化したところ、mPrP(s) の分解速度は、mPrP(h) に比べて遅くなっていた。以上の結果は、超音波刺激が mPrP の物理化学的性質に影響を与えることを示している。今後、超音波刺激による mPrP の構造変化の有無をより詳細に調べ、プリオンに特異的なアプタマー探索を行う。

表1 mPrP の溶解度における超音波刺激の影響

	飽和濃度 (mg/mL)			
	mPrP(s)		mPrP(h)	
	n = 1	n = 2	n = 1	n = 2
0.1% SDS	0.28	0.35	0.65	0.54
0.05% SDS	0.27	0.26	0.56	0.49
1.0M 塩酸グアニジン	0.30	0.48	0.42	0.58
0.5M 塩酸グアニジン	0.21	0.41	0.35	0.56
0.1M 塩酸グアニジン	0.16	0.28	0.32	0.38

この研究の発表

学会発表

- 1) T. Krawczyk, H. Zhang, T. Shibata, T. Kabashima, M. Kai. Alginate acid-based macromolecular probe for chemiluminescent detection of protein. The Second Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences in Nagasaki, Nagasaki, March 2009.
- 2) H. Md. Towhid, T. Kabashima, T. Shibata, M. Kai. Development of simple method for DNA aptamer against protein. The Second Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences in Nagasaki, Nagasaki, March 2009.
- 3) Z. Yu, C. Tang, T. Kabashima, T. Shibata, M. Kai. Novel Fluorometric Assay for the Identification of Mutant HIV Proteases. The Second Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences in Nagasaki, Nagasaki, March 2009.

マラリア・住血吸虫ワクチン開発

熱帯医学研究所 免疫遺伝学

平山謙二

要旨

住血吸虫ワクチン開発のため、防御効果が明らかな放射線照射セルカリア (RAC) によるワクチン効果を解析した。まず RAC ワクチン接種ミニブタの血清と特異的に反応する日本住血吸虫卵及び虫体由来の抗原の同定をプロテオームを用いて行った。虫卵及び虫体の可溶性粗抗原を二次元液体クロマトグラフィーシステム (2D-PF, BECKMAN Coulter 社) で分画し、ワクチン血清に特異的に反応した分画蛋白の N 末端アミノ酸配列を決定し、EST 遺伝子バンクから Blast 探索し、最終的に AAW27472 .1、AXX25883 .1、AAW27690 .1 の 3 つの候補分子の組み換え蛋白が血清と反応することを明らかにした。これらのタンパクをマウスに免疫し抗血清を作成し培養ソーミュラ幼虫での組織発現を調べたところ、AAW27472 .1、AXX25883 .1 はソーミュラ表面に発現していた。さらに、候補分子を pcDNA/V5 /GW/D-TOPO (Invitrogen) に挿入し DNA ワクチンを作成しワクチン効果を調べた。陰性対象群 (Empty plasmid DNA) と比較して、AXX25883 .1 に 27% 程度の感染虫体数の減少効果が認められた。

背景

住血吸虫症には主に中国揚子江流域、フィリピンミンダナオ島などに分布する日本住血吸虫症とアフリカ、中南米に分布する Mansonia 住血吸虫症、Bilharzia 住血吸虫症が存在する。住血吸虫症はいわゆる顧みられない熱帯感染症の範疇にいれられており WHO など国際的なコミュニティにより克服すべき重要な寄生虫疾患である。現在中国の日本住血吸虫症だけでも年間数十万人の新規感染者が報告されている (Zhou XN. et. al. Emerg Infect Dis. 2007)。住血吸虫症の蔓延に伴う経済的な損失、健康への障害等の被害は一般的な DALY などの指標によっては過小評価することが指摘されている。特に日本住血吸虫の場合、プラジカンテルによる集団治療などに

より患者を一時的に無くしたとしても中間宿主である宮入貝を一掃するか固有宿主である水牛や家豚への感染を防御しないかぎり、完全に制圧することは難しい。ヒトおよび家畜を対象としたワクチンが求められている (McManus DP. et al, Clin Microbiol Rev 2008)。

ワクチン開発には二つの突破口がある。ひとつはマウスモデルによる不活化生ワクチン (放射線照射セルカリア) で、非常に高い再感染阻止能が付与されることが知られている (Zhang L. et al., Microbes and infection 2008)。もう一つはヒトにおける感染抵抗性についての報告 (Walter K et. al, J Immunol 2006) である。最近中国の浸淫地で広範囲、かつ長期的に行われたフィールド調査により高度感染抵抗性を持つ人が存在することが報告された (Ellis MK et al. J Immunol 2007)。このような人たちの特徴的な免疫応答性を再現できればワクチンとなりうる。

ワクチン抗原の探索

放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニブタの血清中の特異抗体に反応する住血吸虫抗原分画を同定し、新規ワクチン候補分子を虫卵及び虫体の可溶性抗原分画を二次元液体クロマトグラフィーシステムで分画し、抗体の反応性が認められる分画蛋白から、4 分画の主要なタンパクの N 末端アミノ酸配列をエドマン法により決定し、相同性検索の結果と分子量、等電点 (pI) の情報を元に 4 候補分子を決定した。このうち AAW27472 .1、AXX25883 .1、AAW27690 .1 について組み換え蛋白を作成した。これでマウスを免疫し抗血清を作成し培養ソーミュラ幼虫での発現部位について解析を行った。さらに、これらの候補分子のワクチン効果を判定するための予備実験として、候補分子を pcDNA/V5 /GW/D-TOPO (Invitrogen) に挿入し DNA ワクチンを作成し、Balb/C マウス (1 群 13 匹) に 3 回免疫後、血中抗体価を確認し日本住血吸虫セルカリアを 40 隻感染させた。感染後 6 週目に灌流し、成虫虫体を回収しワク

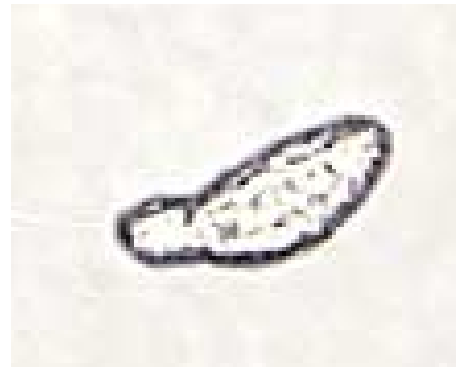
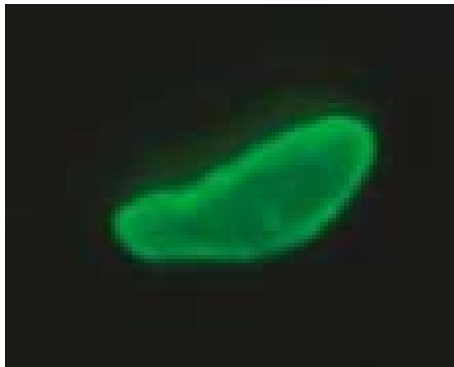


図 . マウス抗血清を用いた AXX25883 .1の発現局在の解析48hours cultured Schistosomula (Live)

チン効果を判定した。

新たなワクチン候補蛋白のうち、AAW27472 .1は23%程度の日本住血吸虫のカテプシン B・エンドペプチターゼ、26%のマンソン住血吸虫のカテプシン B との相同性が認められた。AXX25883 .1は syntaxin と83%、Glutathion S-tranferase (GST) と23%の相同性 (図 1) を、AAW27690 .1は Dehydrogenase subunit 1 と46%の相同性を示すことが確認された。

組み換え蛋白免疫マウス抗血清による培養ソーミユラ幼虫での発現部位について解析を行ったところ、AAW27472 .1、AXX25883 .1はソーミユラ表面に発現していることが推察された (図)。

DNA ワクチンによる免疫後、日本住血吸虫セルカリ

アを40隻感染させた結果、陰性対象群 (Empty plasmid DNA) と比較した結果、AAW27690 .1と AAW27472 .1には、感染防御効果が認められなかったが、AXX25883 .1は27%程度の回収虫体数の減少が認められた (未発表)。

放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニブタの血清中の特異抗体に反応する住血吸虫抗原分画を探索する方法では新規ワクチン候補を多数同定することはできなかった。今後日本住血吸虫ゲノムプロジェクトが完全になれば改善するものと考えられる。

今後、ワクチン候補蛋白 AXX25883 .1の示した感染防御応答性と、放射線照射セルカリアによる防御免疫との異同を詳細に解析することがよりよいワクチンの開発につながると考えられる。

論文

- 1) Ekhlas Hamed A-H A, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of Schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. Parasitology International: Parasitology International 58 (2009) 36-44
- 2) Yu C, Yin X, Kikuchi M, Hirayama K, Zhu Y, Yu C. Isolation of the cDNAs encoding secreted and membrane binding proteins from egg of Schistosoma japonicum (Chinese strain), Acta Parasitol. 53 (1): 110-114, 2008.
- 3) Tippawangkosol P, Duangchanda T, Ubalee R, Ruengweerayut R, Hirayama K, Na-Bangchang K. Identification of HLA-A 24 restricted pre-erythrocytic stage specific T-cell epitopes using Plasmodium falciparum synthetic peptides: a preliminary study. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 40 (1): 10-7. 2009.
- 4) Uyen DT, Huy NT, Trang DT, Nhien NT, Oida T, Hirayama K, Harada S, Kamei K. Effects of amino acids on malarial heme crystallization. Biol Pharm Bull. 31 (8): 1483-8, 2008
- 5) Shuaibu MN, Wuyep PT, Yanagi T, Hirayama K, Ichinose A, Tanaka T, Kouno I. Trypanocidal activity of extracts and compounds from the stem bark of Anogeissus leiocarpus and Terminalia avicennoides. Parasitol Res. 102 (4): 697-703, 2008

は GCOE の記述あり

基盤技術の医薬品開発応用

医学部 創薬科学
池田正行

背景

従来、大学を含め、日本の学術機関では、ともすると基礎研究の成果を論文にして発表することで事足りりとして、臨床試験（治験）にまで繋げる臨床開発は製薬企業任せだった。しかし、医薬品の開発では、莫大な開発費用を回収できるだけの利潤が見込めないと企業が判断することも多いため、大学を含めた公的機関が企業に代わって開発を進める必要がある。特に熱帯病・新興感染症分野では、その傾向が強い。一方、新薬の成功確率が1万数千分の1と言われる状況下で、企業のように潤沢な資金や豊富な人材に恵まれない大学でのトランスレショナルリサーチは、今や多くの困難に直面している。そのような状況下で、アジア・アフリカ地域に拠点をもち、フィールドワークにも豊富な経験を持つ長崎大学には、熱帯病・新興感染症に対する医薬品開発で、大きな期待が寄せられている。本年度は、医薬品開発に応用可能で、汎用性に富み、且つ独創性の高い二つの基盤技術が本学で見いだされた。

感染症標的分子のイメージング技術開発

感染症の発症と進展のメカニズムは、病原体の体内侵入という観点からだけで解明されるものではない。病巣の主座となる臓器はどこか、その臓器の中で、どんな病変がどのように分布しているのか。その病変はどの分子のどのような変化によって生じているのかといった情報は、診断ばかりではなく、治療薬・予防薬の開発にとっても、極めて大切である。

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）では、異常型プリオン蛋白質（PrPSc）凝集体が脳内に沈着し、神経細胞が破壊され、患者はやがて死に至る。これまでのところ有効な治療手段がなく、発症までの期間は極めて長いと考えられるものの、ほとんどの症例では発症後急速に症状が悪化し、1年以内に死亡する。従って、現状の診断法では、仮に治療法が開発されたとしても手遅れとなる可能性が強い。本学薬学部の中山らは、プリオン病の早期診断をめざし、非侵襲的イメージング技術であるPETやSPECTなどによって、プリオン蛋白質の沈着を体外から画像化するための分子イメージングプローブ

の開発を進めてきた。

中山らは、これまでに開発を進めてきたアルツハイマー病の病原物質であるアミロイド 蛋白質 A 結合性プローブ（図1）（2008年9月、Bayer Schering Pharmaとライセンス契約締結）の中から、CJD 脳に沈着するPrPSc凝集体に結合性を示す化合物の探索を行うため、プリオン病の一種であるウシ海綿状脳症 Bovine spongiform Encephalopathy（BSE）感染モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色実験をおこなった。その結果、PrPSc凝集体への結合性が認められる化合物を見出しているこの化合物は、すでに、脳への高い移行性を確認しており、PrPScの分子イメージングプローブの候補といえる。

CJDに代表されるヒトのプリオン病そのものは稀な疾患だが、臨床的にプリオン病の除外が必要な認知障害や高次脳機能障害の頻度は非常に高く、プリオン病画像診断に対する期待は非常に高い。今後、臨床応用に向けて本格的な開発を行う。

さらに、プリオン病以外の感染症の治療薬・予防薬の開発を支援するために、特に熱帯病・新興感染症に注目し、その病態の鍵を握る分子の局在を画像化についても検討する。

新規投与形態に基づく細胞内への遺伝子送達技術開発

近年、優れた薬理活性を有するものの、強い副作用あるいはその体内動態特性のため臨床応用が困難な医薬品候補薬物や、難治性疾患に対して投与される遺伝子性医薬品に対する精密な体内動態制御法および製剤設計法の開発の確立が強く望まれている。細胞への遺伝子導入に際しては、ウイルスベクターに伴う様々な安全性の問題を回避できる非ウイルスベクターが特に注目を浴びてい

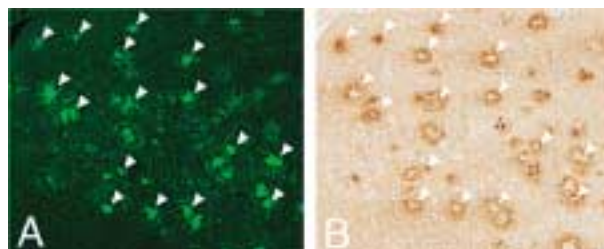


図1：アルツハイマー病モデルマウスの神経病理組織標本。(A)アミロイド 蛋白質 A 結合性プローブにより蛍光標識されたアミロイド斑が(B)隣接切片での免疫組織化学によるアミロイド斑と一致している。

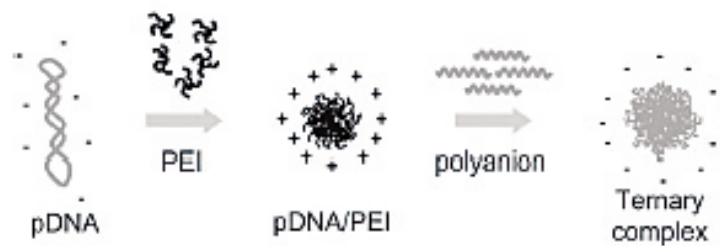


図2：プラスミド DNA (pDNA) / ポリエチレンイミン (PEI) と多陰イオン polyanion による三つ組複合体 (Ternary complex) の形成

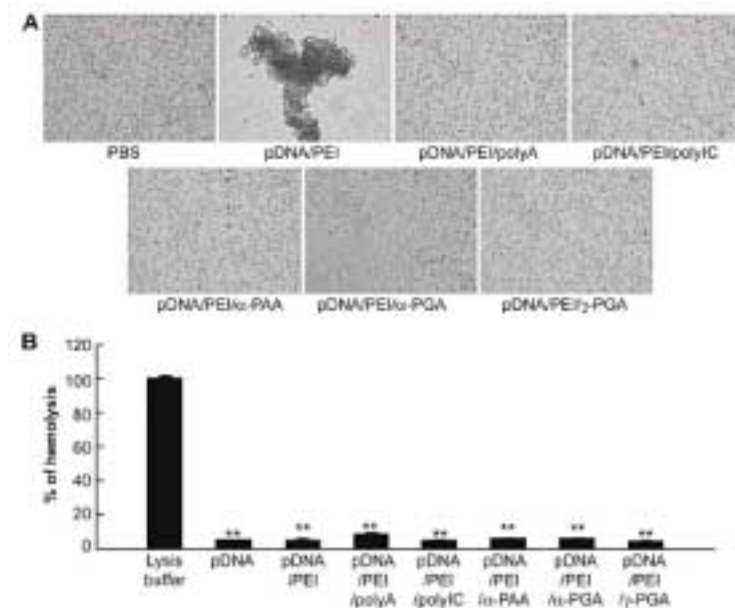


図3：赤血球と各複合体の相互作用。プラスミド DNA (pDNA) / ポリエチレンイミン (PEI) では強い凝集が見られるが、polyanion でコーティングした三つ組複合体では凝集が見られない(A)。また、溶血も見られない(B)。

る。その中でも、陽イオン性の水溶性ポリマーであるポリエチレンイミン (PEI) は、効率の高い遺伝子導入試薬としてよく知られている (図2)。PEI の最大の問題点は、陰性荷電分子である細胞膜のプロテオグリカン等に非特異的に結合し、赤血球凝集から血栓症や炎症を惹起する点である。

本学薬学部の佐々木らは、PEI/プラスミド DNA (pDNA) 複合体を親水性のポリマーとなる polyanion でコーティングすれば、赤血球凝集を起こさないことを見出した (図3)。さらに、多くの polyanion が遺伝子導入効率を低下させるのに対し、ポリグルタミン酸 (PGA) は、PEI/pDNA とほぼ同様の、極めて良好

な導入効率を、*in vitro* ばかりではなく、*in vivo* でも示した。特に、*in vivo* では、脾臓に特異的に高い導入効率を示された。以上の結果は、PGA が、これまで *in vivo* における PEI による遺伝子導入の最大の障害だった毒性の問題を解決し、臨床応用が可能な遺伝子治療の有力な方法となることを示唆している。今後は *in vivo* で遺伝子導入される細胞の種類や、様々な疾患モデル動物において本法の有効性、安全性を検討する必要がある。特に免疫反応の主座である脾臓で遺伝子導入効率が高いことから、対象疾患は、感染症や癌のワクチン開発、悪性リンパ腫や自己免疫疾患が有望と考え、今後の開発を進める。

論文

- 1) Ono M, Maya Y, Haratake M, Ito K, Mori H, Nakayama M. Aurones serve as probes of b-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 361: 116-21
- 2) Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Niidome T, Kodama Y, Nakagawa H, To H, Sasaki H. Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems. *Biomaterials.* 2009; 30: 2846-53

業績一覧 論文

Ekhlas H A-H, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. " Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. "

Parasitology Int. 2009 March; 58(1): 36-44.

Hashizume M, Terao T and Minakawa N. " The Indian Ocean Dipole and malaria risk in the highlands of western Kenya. "

Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 February 10; 106(6): 1857-62.

Lan NT, Kikuchi M, Huong VT, Ha do Q, Thuy TT, Tham VD, Tuan HM, Tuong VV, Nga CT, Van Dat T, Oyama T, Morita K, Yasunami M, Hirayama K. Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB 1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome.

PLoS Negl Trop Dis. 2008 October 1; 2(10): e 304.