

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22年度 研究成果報告書



長崎大学
NAGASAKI UNIVERSITY



2010 Research Report of

The Global COE Program, Nagasaki University

-Integrated Global Control Strategy for the Tropical and Emerging Infectious Diseases-

Contents

ごあいさつ	1
まえがき	2
概要	3
事業推進担当者	4
平成22年度活動報告	6
研究成果報告	
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
● 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)	12
● サルモネラ・エンテロキシンの多型と下痢原性発現機構(平山壽哉)	14
● 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)	16
● マラリア感染と宿主 T 細胞免疫応答(由井克之)	18
● 赤痢アメーバおよびリーシュマニアに対する感染防御機構の解明(濱野真二郎)	20
<hr/>	
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)	22
● 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)	24
● 住民コホートを基盤とする小児感染重症化に関連する因子の解明(有吉紅也)	26
● 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)	28
● 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(金子聡)	30
● マラリアの流行発生機構の解明と制御研究:媒介蚊の研究を通して(皆川昇)	32
● 生態学的感染症研究:時間軸・空間軸のなかでの感染症理解(山本太郎)	34
● シャーガス病の慢性合併症 心筋症、巨大結腸症 抵抗性と関連する HLA 遺伝子アレルの同定(平山謙二)	36
● 島嶼マラリア撲滅:ヴァヌアツからビクトリア湖へ(金子明)	38
<hr/>	
創薬科学班	
● 深在性真菌症に対する新規治療戦略の開発(河野茂)	40
● 新規抗ウイルス剤の探索(小林信之)	42
● 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)	44
● プリオン及び薬剤耐性ウイルスの簡易検査法と治療薬の開発(甲斐雅亮)	46
● わが国におけるワクチンギャップ:その原因と対策(池田正行)	48
● マラリアを標的としたナノワクチンの開発(佐々木均・平山謙二)	50
● CD 4 非依存性 HIV 1 の細胞内侵入はエンドソームを經由し、エンドソーム蛋白質分解酵素カテプシン B によって抑制される(山本直樹・久保嘉直)	52
<hr/>	
業績一覧	54
学位取得者名簿	59
Research in Progress Seminar (RiPS) 開催状況	60
報道資料	61



片 峰 茂

長崎大学長

ごあいさつ

平成20年度に開始された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」は、速いもので3年が経過しました。本プログラムの研究面でのミッションは、途上国をふくむ世界の感染症のコントロールに向けて、基礎研究やフィールド研究で得られた成果を診断・治療薬やワクチンなどの開発につなげ、さらにはこれら医薬品を途上国流行地の人々に効果的に届けるための社会開発研究を推進することにあります。そして、さらに重要な使命が、本学が誇る卓越した感染症研究基盤をベースに、感染症制御のために世界の最先端で貢献する次世代研究人材を数多く育成することにあるのです。過去3年間、大過なくプロジェクトは推移し、それなりの成果もあがったものと思います。残る2年間は、有望な研究プロジェクトに集中的に資源を投入するとともに、大学院生を含む若手研究者の発奮を促し、プログラムの成果を明確な形で世に問う期間にしたいと思っています。

平成23年3月11日、東日本大震災とそれに続く原発事故という未曾有の災厄がこの国を襲ってしまいました。マグニチュード9.0、観測史上世界最大級の揺れと津波が、東日本の広い範囲を襲ったのです。引き続き、東京電力福島第一原子力発電所において重大な事故が発生し、周辺地域の放射能汚染とともに、日本の電力供給体制の破綻が強く懸念される事態に立ち至っています。当初、多くの専門家の口から今回の地震や津波の規模が“想定外”であったことが語られました。しかしながら、原発事故に関しては、実態が明らかになるにつれ、事前の危機

管理対策が万全であったか否か、疑問が呈されています。

感染症も重要な危機管理の対象です。近未来に、ヒトに対する感染力が極めて強く凶暴な病原体が我々の前に現れ、人類の存続すら危うくする事態を想定することは、あながち小説や映画の世界だけの話ではないのかもしれませんが。私たち人類はそれに対する備えを講じておく必要があると思います。“想定内”のリスクなのです。ワクチンや診断・治療薬を開発するための研究体制の整備は最も重要な備えのひとつなのです。その意味でも本プログラムの役割は大きいと思います。

病原体はその危険度のレベル（バイオセーフティーレベル；BSL）に応じて4つのグループに分類されます。エボラウイルスや天然痘ウイルスなどは最も危険度の高いBSL4に分類されます。このBSL分類に応じて、その病原体を取り扱える研究施設の構造が決められています。BSL4の病原体は極めて厳重な封じ込め構造を持つBSL4研究施設でしか取り扱えません。

ところが、日本ではBSL4研究施設は一ヶ所も稼働していません。先進国のほぼ全ての国や南アフリカ、インド、台湾にBSL4研究施設があり、中国でも建設が進んでいます。このままでは、日本の感染症研究は世界に遅れをとり、BSL4の感染症が侵入した場合の国家の危機管理の観点からも由々しき問題です。豊富な感染症研究の蓄積と研究者陣容を誇る長崎大学は、BSL4施設の管理・運営を担う資格を有する数少ない研究機関です。長崎の地にBSL4施設を設置する可能性について考えてみたいと思います。



平山 謙二

熱帯医学研究所・教授
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」
拠点リーダー

まえがき

グローバル COE プログラムを2008年に開始して、すでに2年半余りが過ぎました。このプログラムの前身で2003年からほぼ同様のタイトルで運営した21世紀 COE から数えるとすでに7年以上になります。タイトルを変えていない理由はこのプログラムでの成果が具体的な形で現れるにはおそらく10年はかかるであろうと思われるからです。

21世紀 COE で掲げたいわゆる第一期目標は「基礎・臨床・フィールド研究の連携拠点形成」でした。3分野からバランスの良い共同研究者を配置し、このプログラムの資金を求心力として熱帯医学研究所と医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻の教員が共通の目的である世界トップレベルの教育研究拠点形成に向けて力を合わせました。その結果特に人材育成面において、1年制の熱帯医学修士課程（MTM）や国際健康開発研究科修士課程（MPH）を新設し、まさしく世界のトップ5に入る教育基盤の整備を格段に進歩させることに成功したのです。このことによる世界へのインパクトは強烈で、その後野口英世アフリカ賞が制定され最初の医学研究分野での受賞者がロンドン大学のグリーンウッド教授に決定した際に、ご本人の希望で賞金がアフリカの熱帯医学修士課程希望者に奨学金として贈与されることになり、ロンドン大学と並んで日本国内での指定就学先として長崎大学の MTM が選ばれました。この ALN（アフリカロンドン長崎）奨学金受賞者は応募してきたアフリ

カ全土からの700名の有為の候補者の中から厳選され、毎年2名が長崎に入学しています。MTMの修了者の半数以上は博士課程の進学を希望しており、大学院博士課程においても MTM 修了者の早期修了に関する規則改定（3年での修了要件の制定）にいたり、今年最初の博士課程修了生を輩出することができました。このように21世紀 COE では教育面での世界拠点化が進み、終了時には最も良い評価を受けることができました。

2008年度からの第2期にあたるグローバル COE では、「統合制御戦略」という面をさらに前面に押し出し、第一期で未着手であった研究面での統合戦略拠点をめざしました。教育はやればやっただけの事が結果として残りますが、研究面ではそうはいきません。優秀な人材を適材適所に配し、学生の質を高め、より高い理想に向けて切磋琢磨する厳しい環境を形成する必要があります。よりチャレンジングな研究を行うにはリスクに耐えられる失敗を恐れない十分に広い裾野の人材の形成も必要です。また最先端研究機器などの整備も欠かせません。長い道のりでしたが、いよいよ我が COE にこのような環境が醸成されつつあります。このことは学生や若手研究者の真剣なまなざしを見れば一目瞭然です。

さあいよいよ収穫の時が来ました。すでにこのアニュアルレポートにも現れていますが、残り2年間での圧倒的な成果を楽しみにしていただきたいと思います。

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に広がってまいります。2000年9月国連において、国際社会が達成すべき目標として国連ミレニアム宣言が採択されました。国際目標として掲げられた8つのミレニアム開発目標のなかでも、「2015年までにHIV/エイズを始めとする主要な疾病の発生を食い止め、その後発生率を減少させる」という感染症対策はその中心的課題となっています。

本拠点形成の最終目的は、まさにこれら主要感染症の制御・克服です。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・克服することを目的としています。

感染症の制御・克服は、それ自身、人類の長年に渡る

願いであり、そのためには周到な戦略、それを実行する人材、および適切な技術が必要となっています。本拠点では、「新興感染症」「下痢症」「マラリア」「顧みられない感染症」の4つの感染症群における研究プロジェクトを進めていきます。特にこれまで主要な発生源が貧しい開発途上国であったために、顧みられることの少なかった「顧みられない感染症(熱帯性原虫症)」や「下痢症」にも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。そのためにも教育に力を入れ、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。



ケニア・ナイロビ市 ケニア中央医学研究所 (KEMRI) 内



ベトナム・ハノイ市 国立衛生疫学研究所 (NIHE)

事業推進担当者（24名）

		所 属	分野名	研究領域	研究テーマ	助教/ポストドク	技術補助員
基礎研究	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	分子疫学	感染分子疫学	下痢症		
	金子 修	熱帯医学研究所・教授	原虫学	病原原虫学	マラリア	坂口美亜子	大越 桃子
	平山 壽哉	熱帯医学研究所・教授	細菌学	病原細菌学	下痢症	中野 政之	藤井 麻美
	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)・教授	感染分子解析学	微生物学	プリオン病	佐野 和憲	山川 歩
	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	免疫機能制御学	免疫学	マラリア	田村 隆彦	土屋 良美
	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	感染防御因子 解析学	免疫学	HIV/エイズ	馬 玉華 (中国)	
	濱野真二郎	熱帯医学研究所・教授	寄生虫学	寄生虫学	見捨てられた病気	安達 圭志	
フィールド	森田 公一	熱帯医学研究所・教授	ウイルス学	ウイルス学	アルボ/新出現ウイルス	早坂 大輔	千葉多賀子
	山城 哲	熱帯医学研究所・教授	病原体解析部門	微生物学	ベトナム拠点		
	皆川 昇	熱帯医学研究所・教授	病害動物学	衛生動物学	媒介昆虫・マラリア		胡 錦萍 (中国)
	金子 聡	熱帯医学研究所・教授	生態疫学	公衆衛生学	ケニア海外拠点/社会技術		中山 栄美
	山本 太郎	熱帯医学研究所・教授	国際保健学	国際保健学	社会技術	江口 克之	江崎 拓也
	有吉 紅也	熱帯医学研究所・教授	臨床医学	感染症学	HIV/エイズ	土屋 菜歩	
	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	感染病態制御学	小児科学	HIV/エイズ		
	平山 謙二	熱帯医学研究所・教授	免疫遺伝学	免疫遺伝学	見捨てられた病気/医薬品 開発	Mohammed Nasir (ナイジェリア)	森 有右
	金子 明	熱帯医学研究所・客員教授		マラリア学	マラリア		
創薬科学	伊藤 敬	医歯薬学総合研究科 (医療科学専攻)・教授	生化学	生化学	医薬品開発	相原 仁	
	池田 正行	医歯薬学総合研究科 (医療科学専攻)・教授	創薬科学	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	病態検査学	医薬品開発	張 寰 (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	感染分子薬学	感染病学	基礎研究(HIV/エイズ)	河野 広朗	陳 玲瀚 (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	先進感染制御学	感染症学	医薬品開発	宮崎 泰可	山内 俊輔
	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	口腔病原微生物学	微生物学	医薬品開発	門脇 知子	
	佐々木 均	長崎大学病院薬剤部・教授	臨床薬物動態学	神経薬理学	医薬品開発	黒崎 友亮	宮村惣一郎
	山本 直樹	熱帯医学研究所・客員教授		ウイルス学	医薬品開発		
教育担当						佐藤 光	
						阿部 朋子	

(平成23年3月現在)

大 学 院 生

Doan Hai Yen (ベトナム)	Punita Gauchan (ネパール)	Tran Thi Nguyen Hoa (ベトナム)					
Joe Kimanathi Mutungi (ケニア)	Jean Seme Fils Alexandre (ハイチ)	佐倉 孝哉	井上 愛美	朱 曉彤 (中国)	Phonepadith Xangsayalath (ラオス)	Morakot Kaewthamasorn (タイ)	紗羅知明子
高月 英恵	本間拓二郎	須藤 結香	中垣 岳大				
Masoud Akbari (アフガニスタン)							
蔡 君柔 (シンガポール)							
神戸 俊平	下川 周子						
Le Xuan Luat (ベトナム)	Muhareva Raekiansyah (インドネシア)	高松 由基	Mya Myat Ngwe Tun (ミャンマー)	Murao Lyre Anni Espada (フィリピン)	岡本 健太	Nguyen Dong Tu (ベトナム)	Dinh Tuan Duc (ベトナム)
岩下 華子	山田 晃嗣	Endang Pujiyati (インドネシア)	Jephtha Christopher Nmor (ナイジェリア)				
猪飼 桂	Vu Hai Ha (ベトナム)	大木 美香	Islam Manirul (バングラデシュ)	Ubydul Haque (バングラデシュ)	Kounnavong Sengchanh (ラオス)	畑岸 悦子	
Le Nhat Minh (ベトナム)	宮原 麗子	小笠原 徹	山下 嘉郎	Vu Thi Tnu Huong (ベトナム)			
西村 泰亮							
Mbanefo Evaristus (ナイジェリア)	Omar Ahamed Din (ケニア)	Lam Quoc Bao (ベトナム)	Mahamoud Sama Cherif (ギニア)	Ramona Florencia (パラグアイ)	Daniel Boamah (ガーナ)	Tran Thi Ngoc Ha (ベトナム)	Helegbe Gideon Kofi (ガーナ)
井上 大嗣							
朱 歆昌 (中国)	Mohammed Shafikur (バングラデシュ)	Yasmin Hasina (バングラデシュ)	Azam Md Golam (バングラデシュ)	山筋 睦美			
陳 玲瀚 (中国)	清水 哲平	一ノ瀬 亨	郭 朝万 (中国)	劉 格 (中国)			
原田 陽介	田中 章貴	永吉 洋介	三原 智	田代 将人	高園 貴弘		
野中美那子	成田 由香						

活動報告

長崎大学 GCOE 国際シンポジウム

“ The 5th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases The 10th Nagasaki-Singapore Medical Symposium ”

日 時：平成22年04月15日(木)～16日(金)

会 場：シンガポール国立大学医学部医療センター

2010年04月15日(木)と16日(金)に、The 5th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases/ The 10th Nagasaki-Singapore Medical Symposium 合同大会をシンガポール国立大学医学部医療センターで開催しました。

長崎大学からは片峰茂学長、平山謙二拠点リーダーをはじめ8名の研究者が参加し、講演を行いました。また、



4名の大学院生もポスター発表を行い、大変意義のある経験になりました。シンガポール国立大学からも6名の講演があり、C型肝炎、デングモデルマウス、エンテロウイルス、自己免疫と細菌感染、マラリア、インフルエンザについて高度な研究内容が紹介され、活発な質疑応答がおこなわれました。また、国立感染症研究所・エイズ研究センター長で長崎大学熱帯医学研究所・客員教授の山本直樹教授がシンガポール国立大学医学部に4月から開設された新しいラボのこけら落としも兼ね、山本先生をはじめ、新しいスタッフとされる3名のPIの先生にも講演していただき、今後の山本ラボの大きな可能性を感じることができました。



このほか、千葉工業大学の下遠野邦忠教授と佐賀大学の吉田裕樹教授もむかえ、多角的な視野から見た新興・再興感染症についての活発な意見交換の場となりました。

黒崎友亮 COE 研究員が Postdoctoral Presentation Award を受賞 平成22年 8月



病院薬剤部試験研究室の黒崎友亮 COE 研究員は、7月21日、「静電的相互作用を基盤とした生体適合型遺伝子ベクターの開発とその応用」により、「Postdoctoral Presentation Award」を受賞しました。

同賞は2010年7月21日から23日にかけて行われた社団法人日本薬剤学会主催、第35回製剤セミナー（浜名湖ロイヤルホテル・静岡県浜松市）の「Postdoctoral Presentation の部」において優秀な発表を行った若手研究者に授与されるものです。

なお、同賞は製剤セミナー実行委員会による選考において受賞者が決定され、表彰式は7月21日に同会場にて行われました。

要旨

本研究では、種々のアニオン性高分子を用いて、pDNA と polyethylenimine (PEI) からなるカチオン性の pDNA



Postdoctoral Presentation Award 賞状

/PEI complex を静電的に被膜した生体適合型遺伝子ベクター (ternary complex) を開発し、その有用性について検討した。この結果、カチオン性の pDNA/PEI complex を生体適合性のアニオン性高分子である polyadenylic acid (polyA)、polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC)、 α -polyaspartic acid (α -PAA)、 α -polyglutamic acid (α -PGA)、 γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を用いて静電的に被膜することによって、粒子径が100nm以下で、表面がアニオン性に帯電した ternary complex を構築した。pDNA/PEI complex は、強い赤血球凝集や細胞障害性を示したが、開発した ternary complex は、これらの毒性を示さず、高い安全性が認められた。さらに、各 ternary complex の細胞内取り込みと遺伝子発現効率を測定した結果、 γ -PGA を用いて被膜した pDNA/PEI/ γ -PGA complex はアニオン性であるにも関わらず、高い細胞内取り込みと遺伝子発現を示した。

次に、pDNA/PEI/ γ -PGA complex の in vivo における毒性と遺伝子発現効果を評価した。pDNA/PEI complex をマウスへ尾静脈内投与した結果、非常に高い肝障害と急性毒性が観察された。一方で、pDNA/PEI/ γ -PGA complex ではこのような毒性は認められず、生体内でも高い安全性を示した。また pDNA/PEI/ γ -PGA complex は、静脈内投与後に脾臓で選択的に高い遺伝子発現を示した。脾臓の組織学的評価を行った結果、pDNA/PEI/ γ -PGA complex は脾臓の中でも、特に抗原提示細胞に富んだ辺縁体に多量に蓄積し、遺伝子を発現していることを見出した。これらの結果から、pDNA/PEI/ γ -PGA complex は DNA ワクチンベクターとしての有用性が期待できる。

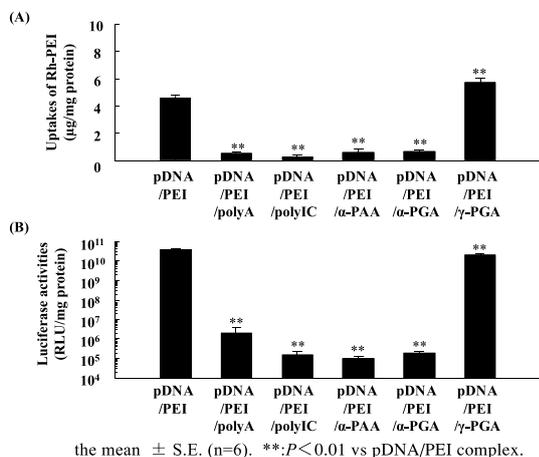


図1. 各複合体の細胞内取り込み(A)と遺伝子発現効果(B)を示す。新たに開発した pDNA/PEI/ γ -PGA 複合体はアニオン性であり、安全性が非常に高いにもかかわらず、毒性の強い pDNA/PEI 複合体と匹敵する細胞内取り込みと遺伝子発現効果を示した。

そこで、メラノーマに対する DNA ワクチン (pUb-M) を用いた pUb-M/PEI/ γ -PGA complex をマウスに複数回投与し、メラノーマに対する免疫誘導効果を評価した。この結果、pUb-M/PEI/ γ -PGA complex の投与によって、マウスの皮内へ移植した腫瘍の増殖が有意に抑制された。さらに、pUb-M/PEI/ γ -PGA complex は、メラノーマ細胞の肺転移を著明に抑制し、肺転移モデルの生存期間を有意に延長することを見出した。

新竜一郎テニュアトラック助教 らの研究成果が Nature Medicine 誌に掲載 平成23年1月



本学大学院医歯薬学総合研究科の新竜一郎テニュアトラック助教らと金沢大学、東京医科歯科大学、東北大学、メルボルン大学（オーストラリア）の研究グループは、今回新たに Real-time QUIC 法 (real-time quaking-induced conversion: RT-QUIC) と名付けた、新しい異常型プリオンタンパク (Prion Protein: PrP) 増幅アッセイを開発し、この RT-QUIC 法によって脳脊髄液中ヒトプリオンの超

高感度検出が可能であることを証明しました。

要旨

研究グループは RT-QUIC 法を代表的ヒトプリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob diseases: CJD) に適用し、日本の CJD 患者由来の髄液を用いて、異常型 PrP の検出を試みたところ、18症例中15例で陽性であった。一方プリオン病以外の疾患由来の髄液35症例ではすべて陰性であった。さらに RT-QUIC 法の CJD 診断への有用性を検証するためにオーストラリアのメルボルン大学と共同研究として髄液30サンプルを無作為に送付してもらい、盲検試験を行った。その結果、RT-QUIC 法の感度は87.5%、特異度は100%であった。これらの試験において RT-QUIC 法の陽性例には現在のプリオン病の髄液診断マーカーである、14 3 3 蛋

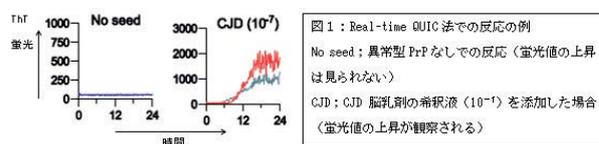


図1: Real-time QUIC 法での反応の例
No seed; 異常型 PrP なしでの反応 (蛍光値の上昇は見られない)
CJD: CJD 脳乳剤の希釈液 (10⁻⁷) を添加した場合 (蛍光値の上昇が観察される)

表1 髄液を用いたCJD診断におけるReal-time QUIC法と14-3-3蛋白生化学的マーカーの感度・特異度の比較

	日本の髄液検体53例			オーストラリアの髄液検体30例 (盲検試験)		
	RT-QUIC	14-3-3	14-3-3	RT-QUIC	14-3-3	14-3-3
感度	83.3%(15/18)	72.2%(13/18)		87.5%(14/16)	87.5%(14/16)	
特異度	100%(0/35)	85.7%(5/35)		100%(0/14)	71.4%(4/14)	

*括弧内は陽性/サンプル数をしめす。

白陰性症例も含まれており、RT-QUIC法は、生存中でのCJD疑い例を評価する高い診断能力が期待できることが示された。

本研究の成果は、「Nature Medicine」2011年2月号に掲載された。

富山大学和漢医薬学総合研究所・長崎大学熱帯医学研究所交流セミナー 「熱帯医学と和漢薬研究の新展開 - 新しい医療体系の構築をめざして - 」

日 時：平成23年02月25日(金)



会 場：長崎大学熱帯医学研究所

このセミナーは、富山大学和漢医薬学総合研究所の門田重利所長と本プログラムの平山謙二拠点リーダーが感染症研究での漢方薬の有効性について考察しようと開催しました。富山大学

からは門田所長から「和漢薬の科学基盤形成拠点について」と題し和漢研について紹介があったほか、富山大学複合薬物薬理学分野の松本欣三教授が「認知症治療薬としての駆瘀血薬 - その実験的エビデンスの構築」について、漢方診断学分野



の柴原直利教授が「漢方薬の臨床効果に及ぼす構成生薬の品質の影響」についてそれぞれ紹介されました。

NEKKENからは、アルボウイルス、ベトナム拠点とアフリカ拠点の感染症研究、熱帯地域での臨床研究、腸管アメーバについてそれぞれの担当教授が紹介しました。

発表後行われたパネル討論では、すでに行っている感染症克服に漢方薬を取り入れた研究についても話があり、感染症研究と漢方薬研究の展望も議論され、今後、共同研究を進めていこうと発展的な意見とともに閉会しました。



研究成果報告

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

急性胃腸炎を起こすことが確立しているウイルスの中で医学的にもっとも重要性が高いのは、ロタウイルスとノロウイルスである(図1)。ロタウイルス下痢症は、わが国をはじめとする温帯地方では、毎年冬から春先にかけて乳幼児を中心に流行する(図2)。

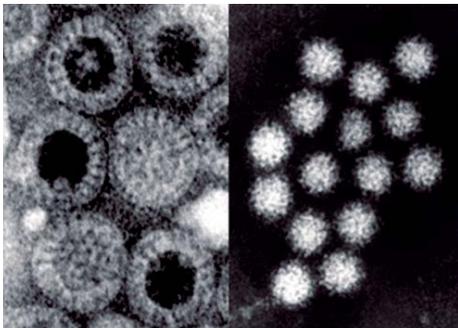


図1：ロタウイルスとノロウイルスの電子顕微鏡写真 2つのウイルスの大きさの違いを実感できるように同じ倍率で表示してある(右上のバーは100nm)

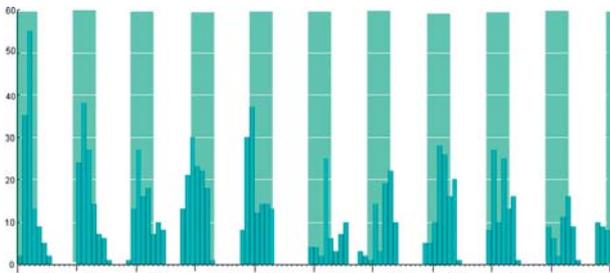


図2：ロタウイルス流行の季節性
グリーンの背景は12月から3月までの冬季を示す。バーは月間のロタウイルス下痢症による入院患者数。

ロタウイルスは、入院が必要な胃腸炎の原因の約40%を占めている。

最近、安全で有効な単価ロタウイルスワクチン Rotarix (グラクソスミスクライン社)と5価ワクチン RotaTeq (メルク社)が開発され、世界20カ国以上で乳幼児の定期予防接種に導入されている。

私たちは、分子疫学的手法を駆使して、高いワクチンの接種率がウイルスの自然界での流行動態にどのような影響を与えているかについて研究している。

私たちの研究グループの アプローチ

私たちは次の3つのアプローチによって研究している。

第一は、「ロタウイルスの進化的変異」という観点からの研究である。第二は、ワクチンのインパクトに関する研究である。残念ながら、わが国ではロタウイルスワクチンが使われていないので、この目的のために海外の拠点を利用し、海外の研究者との共同研究により、ワクチンの異型株に対する発病予防免疫に関する疫学研究や流行動態への影響に関する分子疫学的研究を行っている。

ロタウイルスに対する有効なワクチンが開発されても、地域社会がワクチン定期接種として受け入れなければ現実の中で効果を示すことができない。そこで、第三のアプローチとして、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行くことを目的に、ワクチンによる下痢症制圧効果とその経済的効果の予測などをシミュレーションにより行い、政策提言に結び付けている。

単価ロタウイルスワクチンは ワクチン株とは異なる血清型の 野生株にも効果があるが、流行株の シフトを起こす可能性がある！

単価ロタウイルスワクチン Rotarix のワクチン株(G1 P[8])と異型のG2 P[4]株による下痢症に対する有効性を評価するために、ブラジル東部の小児病院で非ロタウイルス下痢症と急性呼吸器疾患患者を対照にして、症例対照研究を行った。その結果、G2ウイルス株に起因する重症下痢症に対して77%、入院の予防には83-85%の有効性であったこと、すなわち、ワクチンが血清型の壁を超えて異型免疫を誘導することがわかった。また、ワクチン導入前には重症下痢症に占めるロタウイルスの割合が35%であったのに対し、導入後の2年間の平均が13%と6割以上の減少につながっていることも明らかになった。その一方で、導入前にごくわず

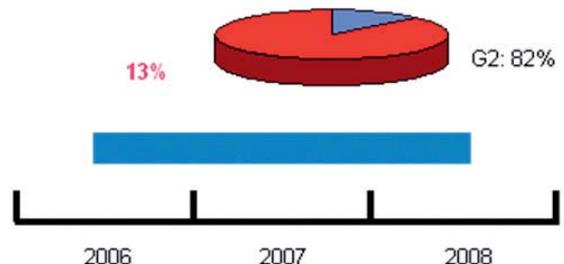


図3 単価ロタウイルスワクチンの有効性を評価する症例対照研究を行った期間の重症下痢症患者に占めるロタウイルスの割合(13%)と検出されたロタウイルスに占めるG2 P[4]株の割合(82%)

かであったワクチン株とは異型の G2P[4] 株が導入直後から増加し、自然変動の範囲かどうか議論があったが、2006年半ばから2008年半ばまでの2年間にわたって優位に推移し、平均でも82%という高い相対頻度を示したことは、ワクチンにより流行株のシフトが起こっている可能性が高い。

ロタウイルスやノロウイルスによる院内感染の感染源は市中にあり、いつも新たに市中から持ち込まれたウイルス株が院内感染を起こしている分子疫学的証拠が得られた！

英国リバプールにある Alder Hey 小児病院（図4）で胃腸炎ウイルスによる院内感染の分子疫学調査を行った（図5）。ロタウイルスやノロウイルスが院内感染による下痢症の主要病原体であるとともに、これらのウイルスは、院内に常在しているウイルス株が感染を起こすのではなく、常に新たな株が市中から侵入しているという仮説を支持する分子疫学的証拠が得られた。



図4：胃腸炎ウイルスによる院内感染の疫学調査が行われた英国 Alder-Hey の病棟群の一部

グローバル COE と人材育成

われわれの研究グループでは3人の博士課程の大学院生が活躍しているが、長崎大学と学术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。

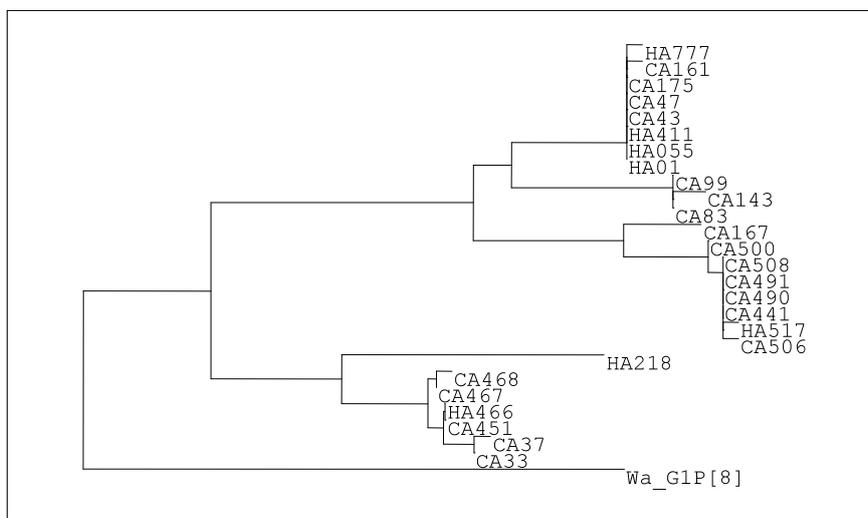


図5：院内感染によるロタウイルス株と市中感染による株の分子系統樹 多様な市中(CA)株に対応する同一配列の多様な院内感染(HA)株がある。

この研究の発表

論文 は GCOE の表記があるもの、* は corresponding author.

1. Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, Montenegro FM, Germano EM, Correia NB, Cuevas LE, Parashar UD, Cunliffe NA, Nakagomi T*. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis*.201; 363-369, 2010
2. Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith W, Kitchin N, Nakagomi O, Nakagomi T, Hart CA, Regan M. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 16: 55-62, 2010
3. Sharma S, Nakagomi T, Nakagomi O, Paul VK, Bhan MK, Ray P. Convalescent phase sera from children infected with G12rotavirus cross neutralizes rotavirus strains belonging to the Wa genogroup. *J Gen Virol* 91: 1794-1799, 2010
4. Sato T, Nakagomi T, Naghipour M, Nakagomi O* Modeling seasonal variation in rotavirus hospitalizations for use in evaluating the effect of rotavirus vaccine. *J Med Virol* 82: 1468-1474, 2010

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 原虫学分野

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物を放出する。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明らかにし、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。

原虫感染赤血球と赤血球侵入型原虫に局在する熱帯熱マラリア原虫 Pf332の輸送機序

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により、脳の末梢血管内壁に接着したり、マラリア原虫非感染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。PfEMP - 1 以外にも熱帯熱マラリア原虫感染赤血球には様々な分子が局在するが、これらの分子の多くが、原虫で翻訳された後、アミノ末端側にある粗面小胞体移行シグナル様配列とそれに続く PEXEL (Plasmodium EXport ELe ment; RxLx (D/E/Q)) と呼ばれる特徴的な配列を用いて原虫周囲に作られた寄生胞膜を通過し、感染赤血球細胞質に移行することが分

かっている。PEXEL 配列は、粗面小胞体で Plasmepsin V と呼ばれるアスパラギン酸プロテアーゼにより、“ RxL” と “ x (D/E/Q) ” の間で切断され、粗面小胞体から寄生胞への輸送に、この切断が必須であることも報告されている (Boddey JA *et al* 2010 ; Russo I *et al* 2010)。寄生胞へ輸送されたタンパク質は、寄生胞膜に局在する原虫由来の分泌装置 Plasmodium Translocon of Exported proteins (PTEX) により、寄生胞膜を通過し、さらに感染赤血球へ輸送されると提唱されている (de Koning-Ward *et al* 2009)。

Pf332も感染赤血球表面に発現する原虫分子の一つで、1992年に Mattei と Scherf により、予想分子量250kDの巨大タンパク質として同定された。Pf332に対する抗体は、培養系において原虫増殖抑制効果を示し、マラリア流行地では、マラリア患者血清中の抗体価とマラリアに対する防御の相関が示されている。Pf332は当初、一つのエキソンにコードされた負電荷にチャージした Glu リピード領域を持つ可溶性タンパク質として発表されたが、我々は Pf332のゲノム配列を検討している際に、Pf332をコードする予想読み枠の上流に、PfEMP - 1 の赤血球結合領域である DBL (Duffy-Binding-Like) 領域と相同性を有する領域と細胞膜貫通領域をコードする読み枠を見出し、Pf332は実は2つのエキソンにコードされており、DBL 領域を N 末端に持つ一回膜貫通型タンパク質であることを明らかにした。Pf332の DBL 領域は赤血球への結合能を示したため、我々は Pf332は感染赤血球の接着と赤血球侵入の両方に関与するリガンドであると提唱している (Moll K *et al* , 2007)。興味深いことに、Pf332は感染赤血球へ輸送され、モラー斑点と呼ばれる感染赤血球膜直下の膜構造物に局在するにもかかわらず、Pf332の DBL 領域の最初の Cys 残基 (第15アミノ酸位置) までの N 末端のアミノ酸配列は “ MSNINNKDSSTEWN ” と疎水性ではなく、また、PEXEL 配列 (RSLAD ; 第78 - 82アミノ酸位置) があるものの、DBL 領域に存在する6つの Cys 残基のうちの4番目と5番目の間に存在している。これらの Cys 残基は、この領域の構造に重要な役割を果たすと考えられるジスルフィド結合を形成するため、本当に輸送シグナ

ルとして機能するのか明らかでない。すなわち、Pf332はPEXEL配列に非依存的に感染赤血球内に輸送されている可能性がある。さらに、Pf332の細胞内領域のC末端にはPfEMP-1と相同性を有する機能未知のWR (Tryptophan-rich) 領域が存在し、このWR領域が輸送に関係している可能性も否定できない。そのため、本年度は、Pf332がどのようにして二つの異なる局在を示し、感染赤血球の接着と赤血球侵入という異なる生物学的イベントに関与するのかを明らかにするために緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した様々な組換え部分 Pf332タンパク質を発現する組換え熱帯熱マラリア原虫を作成し、Pf332が原虫からどのような経路で、またどの領域を利用して感染赤血球内へ移行し、さらにモラー斑点に局在するのか、また、どのようにして赤血球侵入型原虫表面に局在するのかを明らかにすることとした。最初に、Gluリピート領域を除き、DBL領域を含む細胞外領域と膜貫通領域、WR領域をGFPと結合させたmini-Pf332を作成して解析した結果、Gluリピート領域は寄生胞膜の通過とモラー斑点への局在には必要でないことを示すこと、および赤血球侵入型原虫表面での局在が見られないことを明らかにし、さらなる解析のためのmini-Pf332を確立することが出来た(図1、mini-Pf332)。続いて、mini-Pf332から細胞外領域を除くと粗面小胞体マーカーと共局在を示すが(図1、 Δ -DBL)、WR領域を除いてもモラー斑点に輸送されることを明らかにした(図1、 Δ -WR)。さらに、細胞外領域、あるいはWR領域をGFPと融合させたものは原虫細胞質に局在することも明らかにした(図1、DBLとWR)。一方、膜貫通領域をGFPと融合させたものは、粗面小胞体マーカーと共局在を示した(図1、TM)。これらより、GFPは①Pf332の膜貫通領域により、粗面小胞体に移行すること、②Pf332の細胞外領域があると、粗面小胞体からさらに寄生胞内へ移行し、さらに赤血球内、モラー斑点にまで移行すること、③また、WR領域はモラー斑点までの輸送と局在に必要でないことがわかった。細胞外領域のN末端側の配列が感染赤血球内への輸送に関与しているかどうかを検討するために、N末端の14アミノ酸残基を、感染赤血球内へは移行しないことがわかっている熱帯熱マラリア原虫アデニロコハク酸リアー

ゼ(PfASL)のN末端の14アミノ酸「MDVHVNQLKNISPI」と置換した細胞外領域と膜貫通領域をもつ組換えタンパク質を発現させたところ、このアミノ酸置換にかかわらず、GFPはモラー斑点まで輸送された(図1、Rep-PEXEL)。さらに、PEXEL様配列(RSLAD)が感染赤血球内への輸送に関与しているかどうかを検討するために、「RSLAD」を「ASAAA」に置換した細胞外領域と膜貫通領域をもつ組換えタンパク質を発現させたところ、このアミノ酸置換にかかわらず、GFPはモラー斑点まで輸送された(図1、Rep-N-ter)。以上より、Pf332はPEXEL配列非依存的に、細胞外領域に存在する輸送決定部位により感染赤血球に輸送されることを示す事が出来た。また、Pf332がどのようにして赤血球侵入型原虫表面に局在するのかについては、今回の解析結果では明らかでなく、さらなる解析が必要である。

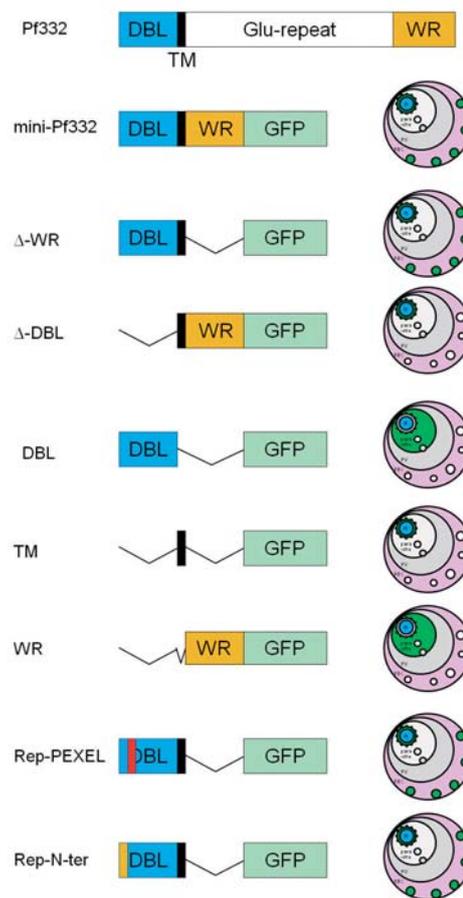


図1：熱帯熱マラリア原虫にて発現した部分 Pf332組換えタンパク質の局在の模式図。

この研究の発表

学会発表

1. Jiang N, Jean Alexandre J, Yahata K, Tsuboi T, Chen Q, Kaneko O 2011 "Identification of a region responsible for *Plasmodium falciparum* Pf332 export to the infected erythrocyte." 第80回日本寄生虫学会大会、東京

サルモネラ・エンテロト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

サルモネラは食中毒原因菌として広く認識されており、衛生環境が不十分な発展途上国のみならず日本を含めた先進国においても本菌による腸管感染症は公衆衛生上の大きな問題の1つである。サルモネラが引き起こす臨床症状(サルモネラ症)は、下痢を主症状とした胃腸炎(食中毒)や全身感染症であるチフス症が主なものとして知られている。

これまでのサルモネラ属菌における研究により、本菌の病原因子として宿主細胞内への侵襲性やマクロファージなどの貪食細胞内での生存に関与する因子の存在が明らかにされている。しかしながら、これまでに報告されている病原因子がサルモネラ症の主病態の1つである下痢原性における役割については不明な点が多いのが現状である。今日までにサルモネラ感染症における下痢原性への関与が示唆されている因子の1つとしてサルモネラ・エンテロトキシン(Stn)の存在が知られているが、下痢症を含めたサルモネラ病原性における詳細な役割は明らかになっていない。

我々はこれまでに、①*stn* 遺伝子分布についてサルモネラを含めた腸管病原菌にて調べたところ、サルモネラにおいて特異的に *stn* 遺伝子が存在し、且つ *stn* 遺伝子には多型が認められること、②Stn タンパク質産生能にはサルモネラ菌株間において相違が認められること、③サルモネラ菌体より調製した Stn を含む粗毒素画分に培養細胞に対する細胞毒性効果を認め、Stn に対する抗体にてこの毒素作用が中和されることを見出している。

そこで、本研究ではサルモネラ病原性における Stn の役割について解析するとともに、Stn のこれまでに明らかとなっていない未知の機能についても検討した。

Stn タンパク質の精製法の確立

Stn タンパク質の精製法確立をするために、我々はこれまでに野生型サルモネラより各種カラムクロマトグラフィーを用いた方法で検討を行ったが、精製度の高い標品を得ることができなかった。そこで、この問題を解決するために3種の異なるプラスミド発現システムを用いた組換え Stn タンパク質の作製を行った。その結果、1つの発現システムのみで非変性下において可溶性の組換え Stn を得ることが出来たが、培養細胞を用いた解析により得られた組換え Stn には生物活性が保持されていないことが分かった。

これらの結果より我々は精製度の高く、且つ生物活性を有する Stn 精製法の確立は難しいと判断するに至った。その原因として、Stn がサルモネラ菌体内で他のタンパク質との複合体を形成する可能性があり、また Stn のアミノ酸配列より推測される等電点に極端な極性(pI = 約11)が認められ、それが精製法確立を困難にしていると推測している。

Stnのサルモネラ病原性における役割

先も述べたように、宿主細胞内への侵襲性と貪食細胞内での生存がサルモネラ属菌の病原性としては広く知られている。そこで Stn とこれら病原性との関連性を明らかにするために、培養細胞を用いた解析を行った。ここでは *stn* 遺伝子を破壊した変異株(*stn* 株)と野生株の比較を行うことにより、サルモネラ病原性への関与について検討した。

その結果、マクロファージ内における生存性では変異株と野生株で差は認められなかったが、宿主細胞内への侵襲性では2つの菌株間において有意な差が認められ、Stn が宿主細胞内への侵襲性へ何らかの関与することが示唆された(Fig.1)。現在は、宿主細胞内への侵襲性に

ついて Stn がどのように関与しているのかを詳細に検討している。

Stnのサルモネラにおける機能解析

Stn の有する機能として、培養細胞に対する細胞毒性効果がこれまでに報告がされており、同様の効果は我々の解析でも確認している。しかしながら、Stn の機能については不確定な部分が多い。特に、サルモネラ菌体内における Stn の役割についてはこれまでのところ全く検討が行われていないのが現状である。そこで、Stn のサルモネラにおける機能についての検討を *stn* 株と野生株を比較することにより行った。

解析の結果、Stn が膜タンパク質である OmpA の発現調節に関与すること、さらにはサルモネラ菌体の外膜部の形成に影響をもたらす可能性が示唆された (Fig 2)。現在は Stn の発現調節機構について解析を進めており、特に Stn のサルモネラ菌体の外膜部の形成への関与について注目している。

まとめ

本年度では、Stn の機能解析を行うことを目的としてその解析を進めてきた。先に述べたように、Stn がサルモネラ属菌の主要な病原性の1つである宿主細胞への侵襲性に関与することが示唆される結果が得られた。しかし、その詳細な作用機序については不明であるので今後の検討課題である。また今後は動物実験を行うことを予

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)

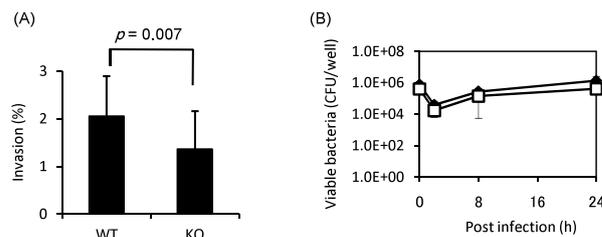


Fig. 1 Stn のサルモネラ病原性への関与の検討
(A)宿主細胞への侵入実験: WT (野生株) KO (*stn* 株)
(B)マクロファージ内での生存実験: 野生株 (黒) *stn* 株 (白)

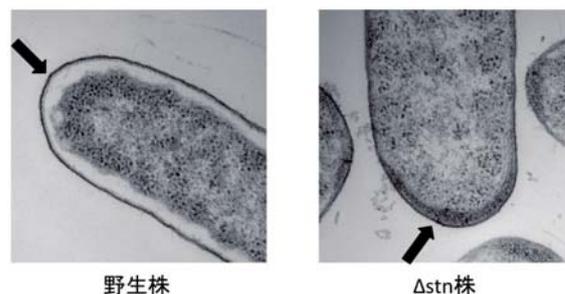


Fig 2 電子顕微鏡による菌体の形態観察
野生株 (左) と *stn* 株 (右) を比較すると、矢印部分で顕著な差が見られる。

定しており、多方面からの解析を行うことで Stn のサルモネラ病原性への関与についての検証することにより、他のサルモネラ属菌の病原因子との関連性についても明らかになるものと期待している。

サルモネラ菌体内における Stn の役割として、菌体膜成分への発現調節の可能性が示唆される結果が得られた。このことは、これまでの報告では認められない新規の発見であり、今後の詳細な解析により Stn の機能についての新たな提言を示すことができるものと考えており、鋭意解析を進行中である。

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

要約

プリオン病は人や羊、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。我々はプリオンの実態解明、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的に解析を行い、プリオン感染・増殖機構に関わる新たな知見を見出した。これらの知見から、迅速かつ特異性の高い新たな診断法開発に成功し、臨床的に困難であった生前診断を可能とした。

背景

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）の発生は、国際的な社会問題に発展した。さらに本国では、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 が多くの犠牲者を出した。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であり、脳組織に蓄積し神経細胞死を引き起こす。プリオン病では、宿主に発現する正常型プリオン蛋白（PrP^c）が異常型プリオン蛋白（PrP^{Sc}）へ構造変換する事で発症すると考えられているが、そのメカニズムは明らかとなっていない。さらに脳内で蓄積する PrP^{Sc} を生前に検出する事は難しく、その診断は CT や MRI による画像診断や臨床所見から行われていた。

リコンビナント PrP (recPrP) を用いた感染性プリオンの試験管内増幅

昨年度、我々は試験管内において、リコンビナント PrP (recPrP) とごく少量のマウスプリオン株感染脳乳剤を混和後、攪拌条件下でインキュベート（40℃）する事で、recPrP 由来のアミロイドを形成される事に成功した。そこで、作製した recPrP アミロイドの二次構造と感染性の有無を確認した。 Chandler、22L 株感染マウ

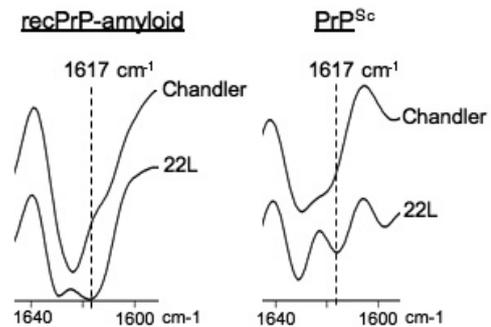


図1. フーリエ変換型赤外分光計 (FTIR) による recPrP アミロイドの二次構造解析。Chandler、22L 株より作製された recPrP アミロイド (左図) と感染マウス脳乳剤から精製した PrP^{Sc} (右図) の二次構造を FTIR で解析した。(佐野 未発表)

ス脳乳剤より形成された recPrP アミロイドは、株特異的に二次構造が異なっており、PrP^{Sc} と類似した二次構造を持つことが明らかとなった (図1)。

さらに、これらの recPrP アミロイドをマウスに脳内接種し、発症までの潜伏期間を検討した結果、recPrP アミロイドは対照群と比べて有為に潜伏期間を短縮し、感染性を獲得したと考えらる。しかし一方で感染脳乳剤を添加せずに生成した recPrP アミロイド (Amyloid No-seed) には感染性が無いことが判明した。そこで両者の性状の違いを検討した。タンパク分解酵素である Proteinase K (PK) に対する抵抗性を解析したところ、両者とも PK に対して抵抗性を有していたが、PK 抵抗性の断片 (バンド) パターンが異なっており構造上の違いが示唆された (図2)。

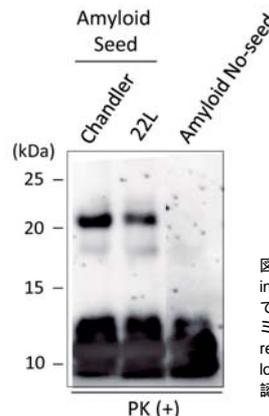


図2. リコンビナント PrP アミロイドの Proteinase K (PK) 抵抗性の測定。Western blot によって、Chandler、22L 株より生成された recPrP アミロイド (Amyloid Seed) とシードを添加せず recPrP のみで生成した recPrP アミロイド (Amyloid No-seed) の PK 抵抗性には明らかな差異を認める。(佐野 未発表)

また透過型電子顕微鏡による観察では、アミロイドの構造形態に違いが見られた(図3)。これらの結果から Amyloid Seed と Amyloid No-seed で構造的な違いが認められ、これらが感染性に影響することが示唆された。今後は更に様々な条件下で作成した recPrP アミロイドの感染性を比較することで、どの様なタイプのアミロイド構造が感染性を有しているのか検討する。

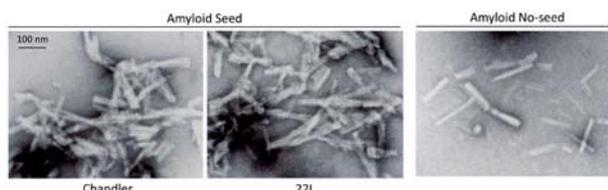


図3. リコンビナント PrP アミロイド構造の形態観察。透過型電子顕微鏡によって Chandler、22L 株より生成された recPrP アミロイド (Amyloid Seed) はシードを添加せず recPrP のみで生成した recPrP アミロイド (Amyloid No-seed) のアミロイド構造と異なっていた。(佐野 未発表)

Real-time QUIC 法による プリオン病の早期診断法の開発

これまでのプリオン病診断は臨床所見および脳画像判定による診断が中心であったため、生前における確定診断は困難であった。QUIC 法をヒト PrP アミロイド化に用い、反応系にアミロイドに結合すると蛍光を発するチオフラビン T を加えておく事で、異常型 PrP の増幅をリアルタイムにモニターする Real-time quaking-induced conversion (RT-QUIC 法) を開発した。さらに反応条件を詳細に検討し、48時間と非常に短期間で異常型を増幅する系の確立に成功した(図4)。

CJD 脳乳剤を用いると 10^{-9} - 10^{-10} 希釈においてもアミロイド生成反応が認められ、理論上 1 femto gram の異

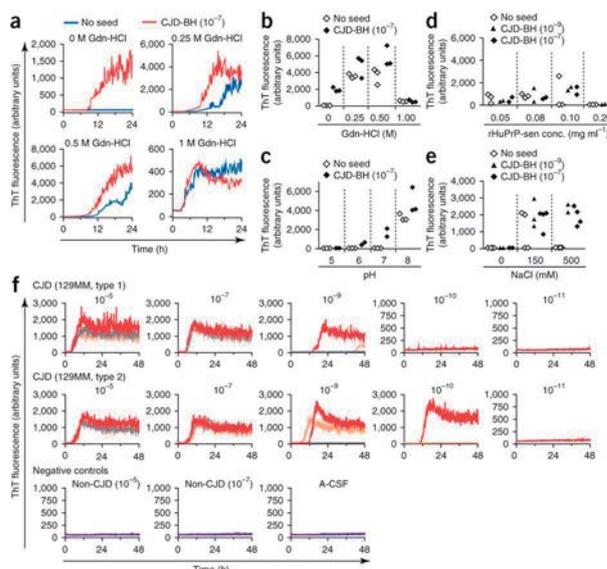


図4. RT-QUIC 法による異常型 PrP の増幅と検出。ヒト CJD 患者由来の髄液を用いて、異常型 PrP が検出された。文献 1。

常 PrP を検出しようことがわかった。この RT-QUIC 法を用いた CJD 髄液診断を試みた。まず日本の CJD 患者由来の髄液を用いて、異常型 PrP の検出を試みたところ、18症例中15例で陽性であった。一方プリオン病以外の疾患由来の髄液35症例ではすべて陰性であった。さらに RT-QUIC 法の CJD 診断への有用性を検証するために、オーストラリアのメルボルン大学から髄液30サンプルを無作為に送付してもらい、盲検試験を行い、その結果、RT-QUIC 法の感度は87.5%、特異度は100%であった(表1)。孤発性 CJD の場合、中枢神経系以外には異常 PrP および感染性はないとされ、この髄液 RT-QUIC 法が唯一の異常 PrP 検出系と言える。今後は、RT-QUIC および髄液マーカーの早期診断法としての有用性を検討する。

	日本の髄液検体53例			オーストラリアの髄液検体30例 (盲検試験)		
	RT-QUIC	14	3 3	RT-QUIC	14	3 3
感度	83.3% (15 / 18)	72.2%	(13 / 18)	87.5% (14 / 16)	87.5%	(14 / 16)
特異度	100% (0 / 35)	85.7%	(5 / 35)	100% (0 / 14)	71.4%	(4 / 14)

表1 髄液を用いた CJD 診断における Real-time QUIC 法と 14-3-3 蛋白生化学的マーカーの感度・特異度の比較 *括弧内は陽性/サンプル数をしめす。文献 1。

この研究の発表

論文

1. Ryuichiro Atarashi, Katsuya Satoh, Kazunori Sano, Takayuki Fuse, Naohiro Yamaguchi, Daisuke Ishibashi, Takehiro Matsubara, Takehiro Nakagaki, Hitoki Yamanaka, Susumu Shirabe, Masahito Yamada, Hidehiro Mizusawa, Tetsuyuki Kitamoto, Genevieve Klug, Amelia McGlade, Steven J Collins & Noriyuki Nishida, Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine* 2011, 17(2):175-8
2. Matsui Y, Satoh K, Mutsukura K, Watanabe T, Nishida N, Matsuda H, Sugino M, Shirabe S, Eguchi K, Kataoka Y. Development of an Ultra-Rapid Diagnostic Method Based on Heart-Type Fatty Acid Binding Protein Levels in the CSF of CJD Patients. *Cell Mol Neurobiol*. 2010, 25.
3. Kim J, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem* 2010;285(19):14083-7.
4. Miyazawa K, Kanaya T, Takakura I, Tanaka S, Hondo T, Watanabe H, Rose MT, Kitazawa H, Yamaguchi T, Katamine S, Nishida N, Aso H. Transcytosis of murine-adapted bovine spongiform encephalopathy agents in an in vitro bovine M cell model. *J Virol*. 84(23):12285-12291. 2010
5. Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguhchi K, Shirabe S, Sata T. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Laboratory Investigation*. 90(11):1637-1644. 2010

マラリア感染と宿主 T 細胞免疫応答

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

マラリアは、流行地域に世界人口の40%が居住しており、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。サハラ砂漠以南のアフリカを中心に開発途上国の病気として見られたため、長らく見捨てられた病気のひとつであったが、近年では各国政府或いは財団からの研究補助金が増え、ある程度研究開発や対策が進みつつある。しかしながら、ワクチンは未だにできておらず、抜本的な解決にはほど遠い状況にある。マラリア原虫は高等原核生物であり、宿主環境に適応して生育する様々な術を準備していることが明らかになりつつある。また感染宿主の応答についても、原虫と免疫細胞との真核細胞同士の高度な相互作用となるため、極めて複雑であり十分に理解されていない。マラリア原虫は赤血球に感染して増殖し、発熱・貧血・肝脾腫など重篤な症状を現す。さらに脳マラリアなどの重症マラリアとなれば生命への危機を及ぼす。マラリアに対する有効なワクチン開発、診断・治療法の開発のためには、感染の病態を正しく理解することが重要である。



マラリア感染の抗原特異的 T 細胞応答を解明する実験モデル

我々は、マラリアの病態理解に立脚した新規治療法の開発及びワクチン開発を目指して基礎的な研究を行っている。流行地における重症マラリアは主として幼児に多く、患者を対象とした研究には限界があり、マウスマラリアのモデルを用いた基礎研究を行っている。マラリアは、ハマダラカの吸血により原虫スポロゾイトが体内に侵入し、まず肝細胞に感染（赤外型）が成立する。その後は肝細胞から出たメロゾイトが赤血球に感染し赤血球期（赤内型）の感染を繰り返すことになる。肝細胞期感染防御の主役は CD8⁺T 細胞、赤内型感染防御の主役は抗体・CD4⁺T 細胞・マクロファージである。我々の研究の主要なターゲットは T 細胞免疫応答であり、肝細胞期、赤血球期各々における感染防御機構、原虫と免疫系との相互作用による免疫の修飾機構、免疫記憶の成立機構、免疫系による宿主障害機構等について基礎的な研究を行っている。

複雑な免疫系と原虫の相互作用を調べるためには、良い実験モデル系の構築が重要である。我々は、免疫学研究によく用いられ、様々な研究用ツールがそろっている卵白アルブミン（ovalbumin、OVA）をモデル抗原として用いるため、OVA 遺伝子組換えマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA を作製し、研究に用いている。既に広く用いられている OVA 特異的な T 細胞受容体トランスジェニックマウスの CD4⁺T 細胞 OT-II や CD8⁺T 細胞 OT-I を用いることで、モデルマラリア抗原 OVA に対する T 細胞の特異的免疫応答、感染防御機構、また免疫病理の発症機構を正確にモニターすることが可能になった。

CD 8⁺T 細胞の免疫応答

肝細胞期においては、CD 8⁺T 細胞が主要な防御機構であり、肝細胞期を標的としたマラリアワクチンはいずれも抗原特異的 CD 8⁺T 細胞の感作を目指している。モデル抗原 OVA を用いることにより肝細胞期の防御機構、記憶細胞の誘導・維持機構の研究を推進することを目指し、そのためにモデル実験系の立ち上げを行ってきた。

CD 8⁺T 細胞が防御免疫に関わるエフェクターとしての役割は、赤血球期においては大きくはない。一方で、マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA 感染により C57BL/6 マウスや CBA マウスに誘導される実験的脳マラリアの発症には CD 8⁺T 細胞が深く関わっていることが知られている。本疾患モデルは熱帯熱マラリアにより発症するヒト脳マラリアにも類似点が多く、発症機構の解明は重要である。モデルマラリア原虫抗原の実験系を導入することにより、発症に関与する CD 8⁺T 細胞の本態について理解を深めることができる。

CD 4⁺T 細胞の免疫応答

CD 4⁺T 細胞は B 細胞と共に赤血球期マラリア感染における感染防御の主役をなすリンパ球である。マラリア原虫感染により原虫特異的 CD 4⁺T 細胞が活性化されると、細胞表面に IL 2 受容体 (CD25) が発現される。モデル抗原組換えマラリア原虫と OT II CD 4⁺T 細胞を用いた一連の研究から、我々は T 細胞によって分

泌される IL 2 がこの受容体に結合してシグナルがはいることにより、T 細胞は IFN γ を産生することを明らかにした。一方、マラリア原虫感染マウスから採取した CD 4⁺T 細胞が原虫抗原に反応して IFN γ を産生する際にも T 細胞自身が産生する IL 2 が必須である。即ち、マラリア原虫特異的 CD 4⁺T 細胞は、抗原を認識してすぐに IFN γ を産生するのではなく、一旦 IL 2 を産生し IL 2 受容体を介して IFN- γ を産生する。

流行地においてマラリアと他の感染症との混合感染などがあった場合、他の微生物によって活性化された T 細胞が IL 2 を産生し、その IL 2 のバスタンダード (傍観者的) 効果によりマラリア原虫特異的 CD 4⁺T 細胞の IFN γ 産生が誘導される可能性もあることを示している。マラリア感染病態と宿主免疫応答の相互作用を考える上で重要な知見であると考えられる。

T 細胞の免疫応答は味方か敵か

マラリア感染宿主の T 細胞免疫応答を解析する中で、肝細胞期におけるように T 細胞免疫応答が感染防御において必須の役割を果たす場合と、脳マラリアの発症におけるように感染病態に重要な役割を果たす場合とがあることが明らかになってきた。免疫応答は諸刃の剣である。これらの T 細胞の活性化はどのように制御されているのか、認識するマラリア原虫抗原は何か、マラリアワクチン開発において免疫細胞を活性化した場合に負の側面はないか等、今後解決していくべき課題は多い。

この研究の発表

論文 は GCOE 表記があるもの

1. Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Yuda M., Chinzei Y., and Yui K., Production of IFN- γ by CD 4⁺T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *Int. Immunol.*, 22(12); 941-952, 2010.

赤痢アメーバおよびリーシュマニアに対する感染防御機構の解明

熱帯医学研究所 寄生虫学
濱野真二郎

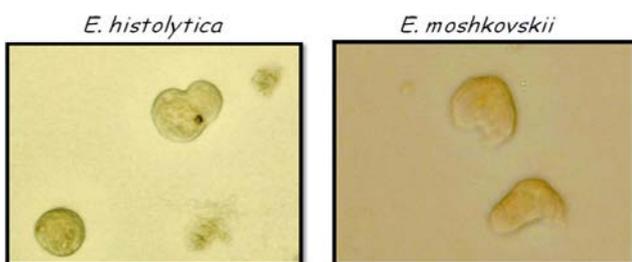
背景

赤痢アメーバ症は発展途上国における小児下痢症の主要原因である。我々は赤痢アメーバの感染モデル系を確立し、同原虫の感染成立、病原性発現機構ならびに同原虫に対する感染防御機構の研究を展開している。

E. moshkovskii は1941年に同定されたアメーバであり、当初、自由生活性アメーバであると考えられていた。1961年に Texas の Laredo で下痢、体重減少を呈する患者から分離された株が *E. histolytica* Laredo 株と命名されたが、この株は *E. moshkovskii* と生物学的特徴を共有しており、後に *E. moshkovskii* と同一であることが判明した。上述のように *E. moshkovskii* はヒトに寄生可能なアメーバであり、下痢患者から分離されたエピソードのある病原体である。近年の分子生物学的手法の発達により、*E. moshkovskii* が発展途上国において高頻度に感染していることが判明してきているが、ヒトにおける病原性についてはようやく研究が端緒についたばかりである。

E. moshkovskii は病原性 *E. histolytica* と同様にマウスの腸管に定着する！

5系統の近交系マウス（CBA/J, C3H/HeN, C3H/HeJ, C57BL/6, BALB/c）の虫垂に以下3種のヒト寄生性アメーバ（*E. histolytica*、*E. moshkovskii*、*E. dispar*）栄養体を接種した。



各アメーバのマウス腸管への定着能を調べると共に、下痢原性、体重の変化、原虫の感染動態を測定・観察した。

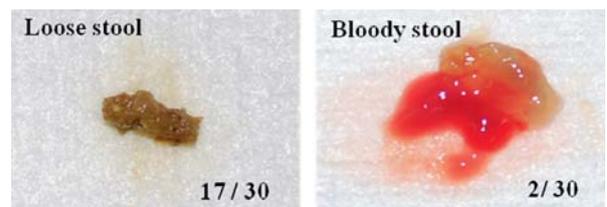
すると病原性が未確定の *E. moshkovskii* も、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できた。また、非病原性アメーバ *E. dispar* はマウス腸管内に定着できなかった。

	<i>E. histolytica</i>	<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. dispar</i>
BALB/c	0 / 10 (0 %)	0 / 10 (8 %)	
C57BL/6	0 / 15 (0 %)	1 / 18 (6 %)	0 / 10 (0 %)
C3H/HeJ	6 / 10 (60 %)	4 / 10 (40 %)	
C3H/HeN	5 / 10 (50 %)	6 / 10 (60 %)	
CBA/J	16 / 25 (64 %)	21 / 35 (68 %)	0 / 20 (0 %)

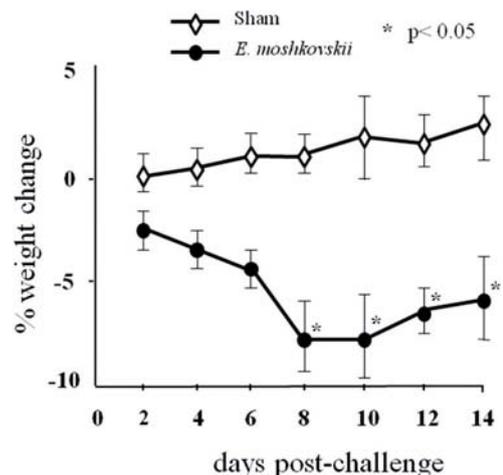
The infection was examined on day 7 after challenge.

E. moshkovskii はマウスにおいて下痢原性を有し、体重減少などの全身症状を引き起こす！

さらに、*E. moshkovskii* は CBA/J マウス腸管に一定期間定着・感染し、下痢症状に加えて典型的なイチゴゼリー状の粘血便を引き起こした。

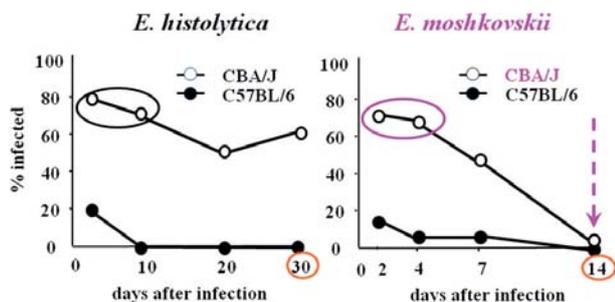


E. moshkovskii による下痢・粘血便



また、*E. moshkovskii* は感染 8 12日目をピークとする有意な体重減少を引き起こした。

病原性 *E. histolytica* と *E. moshkovskii* の CBA/J や C57BL/6 近交系マウス腸管での感染動態は以下の通りであった。



E. histolytica は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行したものの、*E. moshkovskii* は激しい炎症を惹起し、感染およそ2週間で腸管から排除された。

本年度の研究より *E. moshkovskii* が潜在的に病原性を有しており、少なくともマウスにおいては病原性 *E. histolytica* と同様の宿主域を示し、下痢と体重減少を主体とした臨床症状を引き起こすことが判明し、ヒトにおける下痢原性のさらなる研究が必要となってきた。

さらに、*E. histolytica* と *E. moshkovskii* がマウス腸

管において全く異なる感染動態を示すことが明らかとなった。一旦感染が成立した後、*E. histolytica* は慢性持続性感染に移行するが、*E. moshkovskii* は感染14日目までに排除された。この現象は一義的には *Entamoeba* spp. の違いによるものであり、非病原性アメーバ *E. dispar* も加えた病原性因子の探索に道を拓くものである。一方、宿主サイドから見ると、CBA/J マウスにおける *E. histolytica* 感染はアメーバが持続感染する系を、*E. moshkovskii* 感染はアメーバが排除される典型的な系を提供するものであり、赤痢アメーバに対する感染防御機構を研究する上、非常に有用な研究基盤をなす知見である。

昨年までの研究で、*E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* の表面に存在する PAMPs は共に免疫系に認識され、そのシグナルは MyD88依存性に伝達されるものの、炎症性サイトカインの産生パターンの違いから、両種の PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) の構成が異なることが示唆されている。一方、非病原性 *E. dispar* には炎症性サイトカインの産生誘導能がなく、これら PAMPs による免疫応答の誘導が、原虫の腸管内定着や病原性ならびに感染防御とどのような関係にあるのかを明らかにしていく必要がある。

この研究の発表

論文 は GCOE の明記があるもの

1. Nakaya, M., Hamano, S., Kawasumi, M., Yoshida, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T.: Aberrant IL-4 production by SOCS 3-over-expressing T cells during infection with *Leishmania major* exacerbates disease manifestations. *Int. Immunol.* 2011; 23(3): 195-202.
2. Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y., Yoshida, H.: IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 2010; 185(2): 1150-1157.
3. Ishida, H., Matsuzaki-Moriya, C., Imai, T., Yanagisawa, K., Nojima, Y., Suzue, K., Hirai, M., Iwakura, Y., Yoshimura, A., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H.: Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 402(4): 790-795.
4. Imai, T., Shen, J., Chou, B., Duan, X., Tu, L., Tetsutani, K., Moriya, C., Ishida, H., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H., Himeno, K.: Involvement of CD 8(+) T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17 XL strain. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40(4): 1053-61
5. 濱野真二郎・吉田裕樹：寄生虫感染と免疫応答、感染症、2010；40(6)：205-211。
6. 原田倫世、濱野真二郎：アメーバ赤痢やクリプトスポリジウム症の現状と最新の知見、化学療法の領域、2011、27(4)、72-79。

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

要約

ベトナムにおける新興ウイルス調査を2009年度に引き続き調査地域を拡大して実施した。野生のコウモリにおいて SARS ウイルスやニパウイルスが感染している可能性が示唆された。また特異性の高い安全な診断用抗原を大量供給するためバキュロウイルス発現系による SARS ウイルスの N タンパク抗原を作製した。さらにベトナムで流行している高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の LAMP 法による迅速診断系を作成した。また網羅的病原体同定技術として開発した nLC/MS を用いた同定法の感度を、2 次元情報を利用して10倍向上させた。

背景

近年、新しく出現したウイルスによる突発的な感染流行が発生し世界的なレベルで健康、経済活動に大きな脅威を与えている。中国における SARS ウイルスの出現（2003年）やメキシコから発生したブタ由来の新型インフルエンザウイルスのパンデミック（2009年）は記憶に新しいところである。熱帯地域の開発が加速し、ヒトや物の大量、広範囲な移動が増大している今日、新たに出現した病原体、および将来病原体となりうる微生物を調査してヒト社会への感染リスクを評価し、迅速で高感度な診断方法を開発しておくことは重要である。この研究ではアジアやアフリカで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するとともに網羅的な検出技術や高感度な特異的検出技術を開発することを目的としている。

ベトナムのコウモリにおけるニパウイルスおよび SARS ウイルスの抗体保有状況の調査

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、本研究では初年度から熱帯雨林に生息するコウモリの調査を実施している。2010年度も長崎大学ベトナム拠点、およびベトナム国立衛生疫学研究所の協力のもと、調査地域を拡大し捕獲した種々のコウモリから血液

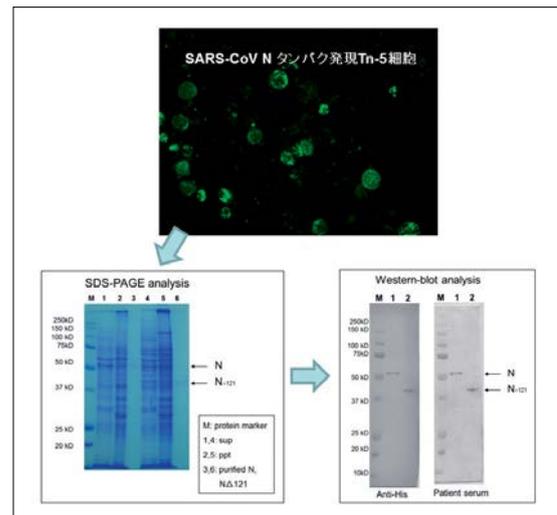


図1：バキュロウイルス発現系による SARS ウイルス N タンパクの発現

を採取して血清疫学調査を実施しオオコウモリの一部にニパウイルス、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。また、コロナウイルスに属する SARS ウイルスについては他のコロナウイルスとの交叉抗体を検出することが無いよう、診断抗原として SARS ウイルス N タンパク質の共通性の高い部分を除いた診断用 N タンパク抗原（図1 N）をバキュロウイルス発現系を用いて作製し、より感度、特異性に優れた抗体検出系を作成した。

蚊と共生する新規病原ウイルス調査

研究初年度から、アジアにおいてヒトを吸血する種類の蚊からのウイルス分離とその同定作業を継続している。これらの調査を通して、これまで大変希少なウイルスを分離した。2008年度にはベトナムでバンナウイルスの初めての分離を報告し、2009年度はフィリピンで初めてコンナンウイルスの存在を明らかにし、遺伝子解析を実施した。2010年度にはフィリピンで新たに新規ウイルスを分離したが、このウイルスはこれまでにまったく報告のない遺伝子配列を持っており、現在その全塩基配列を解読中である。2011年度中に報告を目指している。

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りこの手法による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。これまでに、ウエストナイルウイルス、リフトバレー熱ウイルス、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、2009年度は40年ぶりに出現した新型インフルエンザウイルスなどに対するLAMP法を開発しているが、2010年度には高病原性鳥インフルエンザH5N1に対するLAMP法を改良し、ベトナムの患者サンプルを用いてその有効性を確認した。

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

本研究において実施している熱帯地域の動物、昆虫が

保持するウイルスの調査においては、多くの既知ウイルスが分離されることから、1対1対応の同定法では研究の進捗が遅れることから、安価な網羅的迅速同定法として本研究ではnLC/MSを用いた質量分析によるプロテオーム解析手法を応用した網羅的な同定手法の確立をめざしている。2009年度までに、粗製性したサンプルでも1回の解析でウイルスの同定が出来るプロトコルを確立したが、2010年度には分析情報の2つの指標を2次元展開し（retention time及びm/z値、図2.）、粗製性サンプル中にある多量の宿主由来の成分を避けて、ウイルス由来成分と思われる領域を集中的に解析するプログラムにより検出感度を10倍にすることに成功した。本手法は網羅的遺伝子解析法と比較すると、感度には劣る一方で多くの検体を安価なランニングコストで解析できる点においてきわめて利用価値の高い方法と思われる。

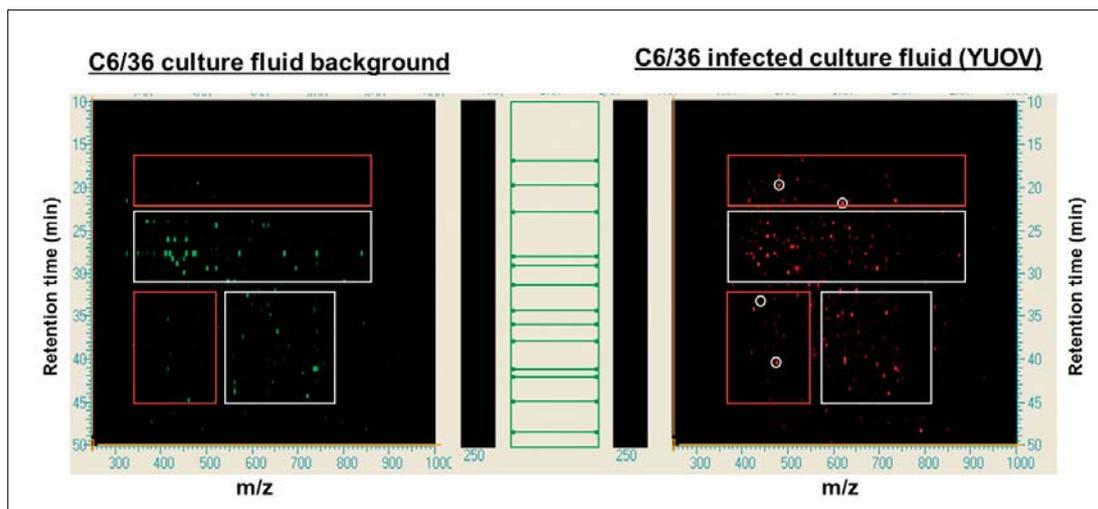


図2：二次元解析データを利用した集中的質量分析により網羅的ウイルス同定手法の感度が10倍に向上した。宿主由来のシグナル領域（図左、蚊培養細胞C6/36細胞のみのペプチドシグナル）を避けて感染細胞（図右）に特異的なシグナルを優先的に解析するプログラムにより検出限界を向上させた。

この研究の発表

論文

1. Kubo T, Agoh M, Mai le Q, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, Hirano M, Yoshikawa A, Hasebe F, Kohno S, Morita K. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol.* Vol.48(3): 728-35. 2010
2. Kenta Okamotoa, Yushirou Endoa, Shingo Inouea, Takeshi Nabeshimaa, Phan Thi Ngab, Posadas H. Guillermoa, Fuxun Yua, Do Phuong Loanb, Bui Minh Trangb, Filipinas F. Natividadc, Futoshi Hasebea, Kouichi Morita. Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. *J. Virol. Meth.* Vol. 167: 31-36. 2010
3. Duc Tuan Dinh, Mai Thi Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. An Updated Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of H5N1 Avian Influenza Viruses. *Tropical Medicine and Health*, Vol. 39(1): 3-7, 2011
4. Yasui F., Kai C., Saito K., Inoue S., Yoneda M., Morita K., Mizuno K., Kohara M. Analysis of the mechanism by which BALB/c mice having prior immunization with nucleocapsid protein of SARS-CoV develop severe pneumonia after SARS-CoV infection. *Procedia in Vaccinology.* Vol.2: 42-48, 2010

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 ベトナム拠点
山城 哲

要約

高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 感染回復者より得られたリンパ球を用いてヒト Fab ライブラリーを構築し、そこから H5N1 クレード 2 型を効果的に中和するヒト単クローン性 Fab 抗体 3 クローンを分離した。そのうち 2 クローンはヒト由来 H5N1 クレード 2 株の HA 1 上の 289 残基部分を認識することが推測された。また H5N1 中和 Fab 抗体は、マウス感染モデルを用いた検討では H5N1 感染に対して予防効果を示す可能性が示唆された。今後 Fab を完全型 IgG 1 に変換して中和活性を検討する。

背景

アジアやアフリカの一部の国では高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 のヒトへの感染が散発的に報告される中、ヒト間で伝播可能な株の出現に警戒する必要がある。ベトナムでは 2003 年の最初の報告から 2011 年 4 月までに 119 名の H5N1 感染症確定患者があり、そのうち 59 人が死亡している。市販されているリン酸オセルタミビル（タミフル）やザナミビル（リレンザ）が治療の中心とされているが、その他に補助的な治療の候補として抗体療法があげられる。抗体療法は疾患特異的に効果を発揮し、また副作用が少ない点が利点としてあげられる。我々の研究班はヒトにおけるインフルエンザ H5N1 感染症に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視野に入れた研究を行っている。

ベトナムにおいてインフルエンザウイルス H5N1 株の変化が見られた。

2003 年から 2007 年までにベトナム国内で報告された

ヒトにおける H5N1 感染症患者からはクレード 1 型に属する株が分離されたが、2007 年後半以降の患者からはクレード 2 型（2.3.4）が分離されるようになった。我々のデータでは H5N1 クレード 1 型用に作成した中和抗体は、H5N1 クレード 2 型には中和活性を示さないかもしくは著しく低下する可能性がある事が示唆された。平成 20 年度に我々は倫理委員会の承認を得た後、説明と同意のもとに H5N1 クレード 2 型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。また我々は H5N1 クレード 2 型粒子を精製しそこから 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。

H5N1 クレード 2 型に対し中和活性を持つヒト Fab 抗体を分離した。

コンビナトリアル科学とファージディスプレイ法とを組み合わせることにより、H5N1 感染回復者より得られたリンパ球を用いてヒト Fab ライブラリーを構築し、そこから H5N1 に効果的に中和活性を有するヒト単クローン性 Fab 抗体 3 クローンを分離した。いずれも、CDC が推奨する in vitro の系でクレード 1 型に比べて 2 型を効果的に中和した。

H5N1 中和ヒト Fab 抗体は同ウイルス HA にある立体構造エピトープを認識した。

H5N1 に効果的に中和活性を有するヒト単クローン性 Fab 抗体 3 クローンのうち、2 クローンは HA 部分を認識することがウエスタンブロット法で示唆された。またリコンビナントタンパクを作成して検討した結果、

それらの Fab 抗体は HA 1 タンパク上の立体構造を有するエピトープを認識することを確認した。我々はさらにエスケープミュータントを用いた検討を行い、中和活性を有する Fab 抗体が結合する HA 1 タンパク上のエピトープを推定した。その結果、H5N1 中和ヒト単クローン性 Fab 抗体で処理した H5N1 株は、HA 1 上の 289 残基部分に恒常的にアミノ酸変異が導入されたが、PBS や非中和ヒト Fab 抗体で処理した H5N1 株には同様の変異は見られなかった。同エスケープミュータントはもはや、H5N1 クレド 2 型に中和活性を有する Fab 抗体では中和されなかった。以上より今回分離した H5N1 中和ヒト Fab 抗体は、H5N1 クレド 2 型株の HA 1 上の 289 残基部分に特異的に結合することが示唆された。

ヒト単クローン性 Fab 抗体は、H5N1 動物感染モデルを用いた検討で予防的効果を持つことが示唆された。

次に我々は、in vitro で示された単クローン性ヒト Fab 抗体の H5N1 クレド 2 型に対する中和活性を、H5N1 動物感染モデルを用いた in vivo の実験系で検討を行った。今回はチャレンジ株として 08 年にアヒルから分離された A/duck/VN/G12/2008 を用いた。同株は 4 週齢の Balb/c マウスを 10^6 TCID₅₀ で死に至らしめる。マウスを予め中和活性を示したヒト単クローン性 Fab 抗体で処理すると、PBS で処理した群に比べて、同ウイルスのチャレンジに対して約 40% の生存効果が得られた。

この研究の発表

論文 は GCOE 表記のあるもの

1. Shivakoti, S., Ito, H., Murase, T., Ono, E., Takakuwa, H., Yamashiro, T., Otsuki, K., and Ito, T. (2010) Development of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for Detection of Avian Influenza Viruses in Field Specimens. J. Vet. Med. Sci, 72(4): 513-524.

一方、予めウイルス接種した後、同 Fab 抗体を投与しても十分な生存効果は得られなかった。以上より、今回分離したヒト単クローン性 Fab 抗体のいくつかは、高病原性 H5N1 株に対して予防効果が認められるものの、H5N1 感染発症後の治療効果は期待できないことが示唆された。今回分離したヒト単クローン性 Fab 抗体は、患者より分離された H5N1 株を標的に選別されたクローンである。今後動物感染モデルに用いる H5N1 チャレンジ株をヒト由来株に代えて検討を行う。

中和ヒト単クローン性 Fab 抗体のヒト完全型 IgG 1 抗体への変換

次に我々は H5N1 クレド 2 型に中和活性を有する Fab 抗体を pComb 3 H ベクターを用いてヒト Fc 部分を付与し、ヒト IgG 1 に変換して CHO 細胞に発現させる系を構築した。現在発現したヒト IgG 1 をカラムで精製中である。

今後の研究計画

今後の計画として、中和 Fab を完全型 IgG 1 に変換し、H5N1 に対する中和活性を in vitro および in vivo 双方で検討する予定である。

住民コホートを基盤とする小児感染重症化に関連する因子の解明

熱帯医学研究所 臨床感染症学
有吉紅也

要約

デング熱の伝搬には人口密度と水道普及率が影響すると考えられるが、実態は明らかでない。われわれはベトナム中部都市の住民を対象としたコホート研究、さらに地理情報を用いた空間解析と感染症数理モデルにより、デング熱の伝搬を規定する因子を多面的に分析した。その結果、デング熱のアウトブレイクが発生しやすい人口密度は3,000-7,000人/km²と狭い範囲であり、研究対象地域では都市郊外から農村部にみられた。一方で都市部の罹患率は低く、これは高い水道普及率によって説明された。数理モデルを用いた検証では、地域のデングウイルス媒介蚊と人口の比率が一定の範囲にあるときにアウトブレイクが発生しやすいことが示唆された。これらの結果は、デング熱の予防対策において重要である。

研究の背景

デング熱は、デングウイルスの感染によって、発熱と出血傾向をきたす疾患であり、重症化すると致死率の高いデング出血熱となる。毎年、全世界で5千万人が感染するが、とくに近年、東南アジア一帯において猛威をふるっている。これは、地球温暖化と急速な都市化によるデングウイルスの媒介蚊である *Aedes aegypti* の増加が原因であると考えられている。一般にデング熱は、人口密度の高い都市部でアウトブレイクが発生しやすいとされている。しかし、実際にデング熱の罹患率と人口密度の関係を調べた研究は少ない。また水道の普及による媒介蚊の減少が、アウトブレイクの発生にどう影響するのかを検討した報告はこれまでにない。

ベトナム中部における大規模疫学調査とデング熱のアウトブレイク

本研究の対象地域は、ベトナム中南部海岸に位置するカンホア省の33のコミューンである。当研究室では、2006年にベトナム国立衛生疫学研究所と共同で、対象地域の全住人35万人（75,000世帯）を対象とした世帯調査を実施した。これにより住人の家族構成、社会経済的因子、住居の地理情報に関する情報を収集した。また、同地域より地域中核医療機関に入院する症例を個別に同定し、世帯調査情報とリンクした。対象地域では2005年から2008年までの3年半に2つの大きなアウトブレイクが発生し、合計3012例のデング熱による入院症例があった。

データの解析

人口密度は、*Aedes aegypti* の平均移動距離を考慮し、半径100メートル以内の範囲で算出して解析を行った。コホート研究のデータ解析は Poisson regression model を用い、アウトブレイクの地理的同定には空間解析ソフト SaTScan を用いた。媒介蚊の数と人口の比率が、どうデング熱の罹患率に影響するかについて、Ross-MacDonald model を用いた数理モデルにより検証した。

デング熱の罹患率と人口密度、水道普及率の関係

デング熱の罹患率は、半径100メートル以内に110人が住んでいる領域（1 kmあたり3,550人に相当する）でピークに達していた。研究対象地域ではこの人口密度は比較的 low、おもに農村部から都市近郊部に認められる。次にこの罹患率のピークが、水道普及率によって変化する

るかどうかを検討した。水道へのアクセスが悪いと、屋内に水を備蓄する容器を置くため、そこが媒介蚊の温床となる。解析の結果、水道へのアクセスが不良な地域では、半径100メートル以内の人口が190人の地域に罹患率のピークがある一方、水道へのアクセスが良好な地域では極めて低い人口密度にピークが認められた。また空間解析においても、人口密度が比較的低くかつ水道へのアクセスの悪い地域で、大きなアウトブレイクが発生していた。一方、人口密度が高い地域においては、明確なアウトブレイクを認めなかった。

人口密度と媒介蚊の比率

これらは人口密度と媒介蚊の数の比率が、デング熱のアウトブレイク発生に関係していることを示唆している。一定面積に占める人口が増えても媒介蚊の数が一定である（水道普及率が高い地域）人口増加により媒介蚊は増加するが一定数で定常化する（水道普及率の低い地域）という2つのシナリオを想定し、数理モデルを用いて検討した。その結果、前者では極めて低い人口密度で、後者では低～中人口密度で鋭い罹患率のピークが出現した。これは、われわれの実際のデータと良く適合しており、人口密度と媒介蚊の数の比率がアウトブレイクを規定するという仮説を支持するものと考えられた。

公衆衛生対策上の意義について

デング熱には現時点で特効的な治療法はなく、有効なワクチンも実用化されていない。媒介蚊の吸血活動は日中であり、蚊帳使用による予防効果もあまり期待できない。したがって媒介蚊そのものを減らすことが対策の中心となる。本研究結果は、水道普及のデング熱流行への副次的効果を初めて示した。また、デング熱アウトブレイクをきたしやすい至適人口密度の地域を同定し、対策を施すべき優先地域を決める上で意義がある。これらは、デング熱のみならず、他のリフト・ヴァレー熱、ウエストナイル病、チクングンヤ病、黄熱病といった蚊媒介疾患の対策にも適用できるだろう。

今回の研究には、主に以下の方々が協力した。ベトナム国立衛生疫学研究所 Duc Anh 副所長、Thiem 医師、カンホア県保健局の Tho 医師、長崎大学熱帯医学研究所の吉田レイミント准教授、鈴木助教、Schmidt 学振外国人特別研究員

この研究の発表

論文 は GCOE 表記のあるもの

- 1 . Vu HT, Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, Oishi K, Yamamoto T, Watanabe K, Vu TD, Schmidt WP, Phan HT, Morimoto K, Le TH, Yanai H, Kilgore PE, Dang AD, Ariyoshi K. Association Between Nasopharyngeal Load of Streptococcus pneumoniae, Viral Coinfection, and Radiologically Confirmed pneumonia in Vietnamese Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2010.
- 2 . Suzuki M, Thiem VD, Yoshida LM, Anh DD, Kilgore PE, Ariyoshi K. Who is exposed to smoke at home? A population - based cross - sectional survey in central Vietnam. *Tob Control*. 2010 Aug; 19(4): 344-5.
- 3 . Gesprasert G, Wichukchinda N, Mori M, Shiino T, Auwanit W, Sriwanthana B, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Miura T, Auewarakul P, Thitithanyanont A, Ariyoshi K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF 01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One*. 2010 Jun 17; 5(6): e 11179
- 4 . Ataru Tsuzuki, Vu Dinh Thiem, Motoi Suzuki, Hideki Yanai, Toru Matsubayashi, Lay-Myint Yoshida, Le Huu Tho, Truong Tan Minh, Dang Duc Anh, Paul E. Kilgore, Masahiro Takagi, and Koya Ariyoshi. Can Daytime Bed-net Usage Reduce the Risk of Dengue Hemorrhagic Fever among Children in Vietnam? *Am J Trop Med Hyg* 2010 Jun; 82(6): 1157-9
- 5 . N Wichukchinda, T Nakajima, N Saipradit, E E. Nakayama, H Ohtani, A Rojanawiwat, P Pathipvanich, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert, T Shioda, A Kimura. TIM 1 haplotypes control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*. 2010 Jul 17; 24(11): 1625-31
- 6 . Saeng-Aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kannagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF 01_AE cases that failed d 4 T+3 TC+nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res*. 2010 Jul; 87(1): 22-9

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

要約

3年間にわたり五島、長崎において採取した日本脳炎ウイルスの分子疫学解析により日本脳炎ウイルスは毎年中国から日本へ飛来していることを明らかにした。また同ウイルスのブタでの高い増殖性のメカニズムとして、インターフェロン初期誘導に重要なウイルス二本鎖RNAがブタ細胞では長く小胞体内に留まり細胞のウイルス検出機構を逃れていることを明らかにした。デングウイルスの疫学調査においては有史以来、初めてネパール国カトマンズ地区に侵入したデング熱の流行でウイルスを分離して分子疫学解析をおこない流入ルートを明らかにした。またデングウイルスの病原性の研究では出血熱から分離されたウイルス株が今まで知られていない受容体(SDC2分子)を使いヒト単核球系細胞に感染できることを示した。

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、近年進行している地球温暖化により日本を含む温帯地域にも熱帯の蚊が侵入して流行地域が拡大することが危惧されており、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によりその動向を明らかにするとともに、ウイルスの病原性を分子レベルで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

2009年度までの研究により日本脳炎ウイルスの一部は日本本土に土着しているが、多くは東南アジアから中国を経由して日本に飛来していることを明らかにした。日本脳炎ウイルスは遺伝子解析により5つの遺伝子型に分類できるが、1990年以降に日本に飛来しているウイルスは遺伝子型I型のA群ウイルスのみである。しかし、ウイルスが日本で越冬出来ることも明らかになった

今、どの程度の頻度で日本に飛来しているのかは、日本脳炎ウイルスの生態を理解する上で重要である。本研究では3年間にわたり長崎市西方100kmの東シナ海に浮かぶ五島列島で日本脳炎ウイルスの定点観測(ブタ抗体調査とウイルス分離)を実施し解析を完了した(図1)。その結果、五島列島においては冬季になると日本脳炎ウイルスの活動が消失し、翌年7、8月にウイルスの活動が再開するが、日本脳炎ウイルスは毎年遺伝子型が入れ替わり、その型は長崎本土とは運動しておらず中国のいくつかの地域で近年分離された株と近縁であった。このことから中国から日本へウイルスは毎年飛来していると結論された。ウイルスの運び屋については渡り鳥や感染した蚊自体が風により運ばれる可能性があるが今後の研究課題である。

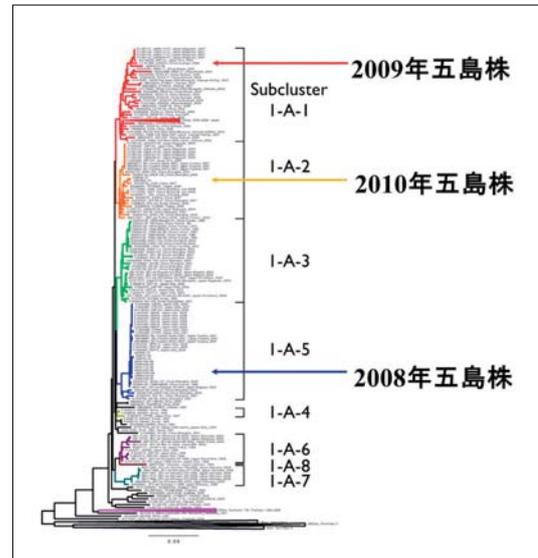


図1：2008年～2010年に五島列島で分離した日本脳炎ウイルスの分子疫学解析。毎年遺伝子型が代わり、それぞれ中国で近年分離された株に近く、長崎市近辺で分離された株とは運動していなかった。投稿準備中

日本脳炎ウイルスの感染種特異性

日本脳炎ウイルスはブタの体内では高い増殖性を示し媒介蚊へのウイルス供給源となっている。一方、ヒトにおける感染では重篤な脳炎を発症するが、神経細胞以外でのウイルス増殖性は低く血液中のウイルス量が少ないため蚊へのウイルス供給源とはならず終宿主(dead-end host)と呼ばれる。この研究ではブタ培養細胞と霊長類

培養細胞を用い、細胞レベルで感染伝搬性の差異を再現する系を構築し解析した。その結果、感染伝搬をコントロールする主体は細胞側のインターフェロンとその出現時期であり、ブタ細胞では日本脳炎ウイルス感染においてインターフェロン誘導の主要因であるウイルス二本鎖RNAが感染細胞小胞体内に長くとどまりインターフェロンの誘導を妨害していることが明らかになった(図2)。

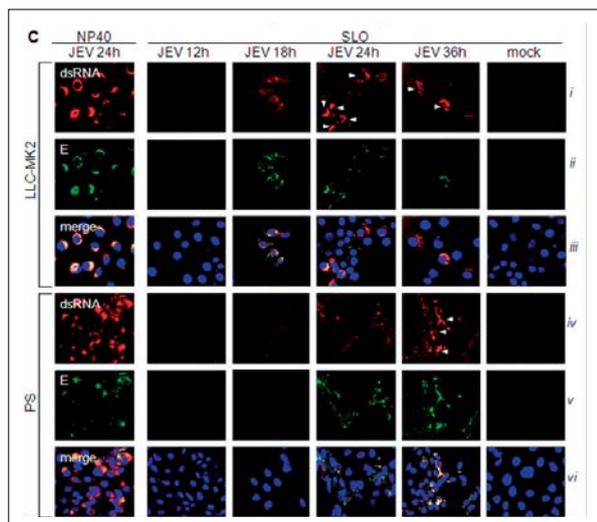


図2: ブタ細胞(PS)では霊長類細胞(LLC-MK2)よりも遅れて小胞体内の日本脳炎ウイルス二本鎖RNA(dsRNA)が細胞質に露出されることによりインターフェロンの産生が遅れ感染伝搬が亢進している。(SLO処理細胞では小胞体膜が可溶化されないため細胞質内のdsRNAのみが検出できる。) 成果7より改変

デングウイルスの分子疫学

2009年に引き続き、アジア各国でウイルスを分離して分子疫学解析を実施した。2010年のニュースは有史以来初めてネパール国のカトマンズ近郊でも流行が発生したことであり地球温暖化の影響と思われる。我々はネ

パール国との共同で多数のウイルスを分離し分子疫学解析を行い、この流行はネパール国南部の低地のインド国境から侵入したウイルスが2か月ほどで高地まで到達したことを明らかにした。またカトマンズにおいてネッタイシマカの生息を確認した。

デングウイルス受容体の解析

2009年度に同定した新規デング受容体候補について2010年度の研究により最終的に感染細胞表面に発現するSDC2の糖鎖構造にデング2型ウイルス(16681株)が結合することを確定した。この分子をノックインしたデングウイルス非感受性細胞では当該デングウイルス株の高い感染率が確認された(図3)。SDC2を介する感染と症状、重症度との関連を今後調査する予定である。

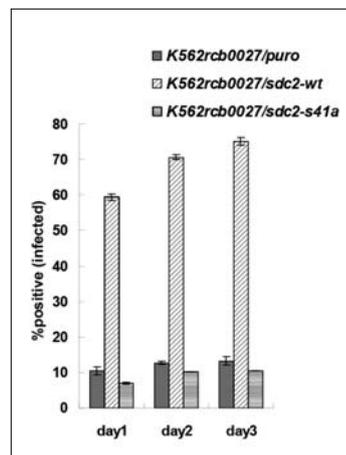


図3: デングウイルス非感受性K562細胞(Puro)にヒトSDC2遺伝子を発現させた細胞(sdc2-wt)、および糖鎖を除いたSDC2を発現させた細胞(sdc2-s41a)のデングウイルス2型の感染率。SDC2がデングウイルス(DEN216681株)の感染受容体として機能している。

この研究の発表

論文

- Inoue S.(他11名) Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. Vector-Borne and Zoonotic Diseases Vol.10(2): 143-150, 2010.
- Nabeshima T. and Morita K. Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia. Future Virology Vol.5 (3): 343-355, 2010.
- Kato D.(他10名) Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. Antiviral Research Vol.88: 236-243. 2010.
- Michael O Baclig(他9名) Flow Cytometric Analysis of Dengue Virus-infected Cells in Peripheral Blood. Southeast Asian Trop Med Public Health, Vol.41(6): 1352-1358, 2010.
- Posadas-Herrera G.(他13名) Development and evaluation of a formalin-inactivated West Nile Virus vaccine (WN-VAX) for a human vaccine candidate. Vaccine. Vol.28: 7939-7946, 2010.
- Wichit S.(他11名) Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. Microbiol Immunol. Vol.55(2): 135-140, 2011.
- Espada-Murao L. and Morita K. Delayed cytosolic exposure of Japanese encephalitis virus double-stranded RNA impedes interferon activation and enhances viral dissemination in porcine cells. Journal of Virology, 2011. (in Press)

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 聰

要 約

Health and Demographic Surveillance System (HDSS: 人口の登録と動態調査システム) を運用する Mbita 地区において、HDSS による死亡例の把握、ならびに蚊帳の使用状況に関する調査結果を用い、殺虫剤を染みこませた蚊帳の普及具合と蚊帳を使わない若年人口層の割合による 5 歳未満死亡のリスクの変化に関する解析を行った。その結果、蚊帳を使用している乳幼児は、蚊帳を使わない乳幼児に比べ、死亡率が低いことが解った。また、蚊帳を使わない乳幼児の死亡に対する周囲の蚊帳の普及率による比較では、蚊帳の普及率が高いほど、蚊帳を使わない乳幼児の死亡リスクがあがっていた。さらに蚊帳を使わない生活をしている 5 歳 ~ 20 歳の人口は、マラリア原虫を保持しマラリア感染の根源になっていると考えられるが、そのような人口が周囲に多くいる乳幼児ほど、死亡率が低いことが明らかとなった。

背 景

ケニア・ピクトリア湖畔に広がる長崎大学ケニア研究教育拠点 Mbita フィールドは、マラリア流行地である。

同フィールドにおいて運用されている Health and Demographic Surveillance System (HDSS: 人口の登録と動態調査システム) によれば、2010 年の調査情報においても 5 歳未満死亡率は、ケニアにおける全国平均 (74 人 / 1,000 出生) よりも高いことから (90.4 人 / 1,000 出生)、マラリアによる乳幼児死亡がいまだにある程度高いことが予想される。そのような事もあり、この地域では、ケニア政府ならびに複数の NGO が殺虫剤を染みこませ、殺虫剤の再浸透などの処理の不要な蚊帳を妊産婦・5 歳未満の子供を持つ世帯を中心に配布している。その効果もあり、HDSS において、定期的に行っている蚊帳仕様に関する世帯別・個人別調査に寄れば、蚊帳の使用率は、一部の年齢層においては確実に上がっている。一方で、5 歳以上 20 歳未満の年齢層での蚊帳使用率

は、ほとんど改善せず、未だ、10% 前後の蚊帳使用率のまま、改善の傾向が見られない。この年齢層の人口は、マラリアの高流行地においては、既に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重篤なマラリアを発症しにくい代わりに、完全にマラリア原虫を排除している状態でもない「半感染・半免疫状態」に保たれている。したがって、このような年齢層が、地域においてマラリア感染の鎖が断ち切れない状態を保っているいわゆる無症状『リザーバー (保原虫者)』として、マラリア感染の維持に寄与している可能性も強い。

殺虫剤を染みこませた蚊帳の 普及と 5 歳以上 20 歳未満人口 の影響

Mbita における HDSS プログラムでは、HDSS 地域の全世帯に対する蚊帳の使用状況、さらには、個人単位の蚊帳種類並びに蚊帳を用いた就寝状況の有無に関して調査をこれまで 3 回行っている。したがって個々のレベルでの蚊帳の使用状況、使用している蚊帳の種類の把握、さらには、過去の蚊帳の使用状況の変遷の把握が可能となっている。

さらに、HDSS の基礎情報収集プログラムにより、HDSS 地域の住民死亡状況の把握も可能となっている。つまり、どの家に住むどの乳幼児がいつ死亡したのか？さらには、その家はどこ (緯度並びに経度) に存在しているのか？さらには、個々の乳幼児の周囲にだれが住み、どのくらいの距離を持っているのか (緯度経度により計測可能)？などの把握が可能である。このことから、個々の乳幼児周囲の蚊帳の種類別利用状況、周囲の人口の年齢分布や密度の把握が可能である。このような蚊帳の地域分布、蚊帳の地域分布による 5 歳未満死亡状況の比較、さらには、5 歳未満の子供の周囲の蚊帳の使用状況、ならびに周囲のリザーバー (保原虫者) と思われる 5 歳から 20 歳未満の若年者層の分布を把握し、5 歳未満死亡に対するそれぞれの要因の影響を評価した。

蚊帳自体の効果、かやの地域効果、蚊帳を使わない5歳以上20歳未満人口の効果

HDSS プログラムとして、これまでに3回行った蚊帳使用に関する調査結果と5歳未満乳幼児周囲の年齢別の人口分布を用いて、5歳未満の死亡に対する効果を解析した。過去3回の調査の間、蚊帳の配布等により蚊帳の使用等に変化が発生している。従って、蚊帳使用にの状況が経時的に変化する。5歳未満乳幼児の同期間における死亡のリスクを乳幼児の蚊帳の使用状況、乳幼児周囲の蚊帳の使用状況、乳幼児周囲の5歳から20歳未満の住民の居住状況に関する解析を行い、それぞれの乳幼児死亡に対するリスクの評価を行った。

蚊帳の影響に関しては、蚊帳を使用していない乳幼児に比して、通常の蚊帳（殺虫剤を染みこませていない）を用いている乳幼児の死亡リスクの低減は、統計学的に有意な差が見られなかった。一方で、「殺虫剤を染みこませた蚊帳」を使用している乳幼児の死亡率は、有意に低下していた。つまり、殺虫剤を染みこませた蚊帳は、乳幼児死亡を直接効果がある。

さらに殺虫剤を染みこませた蚊帳は、地域全体の蚊の密度を減少させる効果があると期待されていることから、蚊帳を使用していない住民に対しても、マラリア感染予防に役立つと言われている。つまり、蚊帳を使用していない乳幼児に対して、周囲の蚊帳は予防的に働くのか？周囲の蚊帳の存在と5歳未満乳幼児死亡への影響に関する解析も行った。その結果、殺虫剤を染みこませた蚊帳が周囲に多いほど、上記予測とは逆に、蚊帳を使用していない5歳未満の乳幼児の死亡のリスクが上昇することが、明らかとなった。しかし、蚊帳の密度が多いことは、すなわち人口密度が高いことでもあり、貧困層の多い漁師町は、人口密度の高い地域に相当する。一方で、裕福層の居住する町の人口密度が高く、すなわち蚊帳の密度も高い。また、貧困層で人口密度の高い漁師町でも、蚊帳の普及していない地域もある。結果の解釈に関しては、今後評価についての更なる検討が必要であるが、暗に殺虫剤を染みこませた蚊帳が地域全体のマラリア負荷を減らすとは、明言できない結果となった。

さらに、「半感染・半免疫状態」に保たれているだろうと考えられる5歳から20歳未満の人口が周囲に多く住む場所に就寝している乳幼児の死亡リスクは、高くなっているのか？すなわち、マラリア原虫を保持して蚊に刺

されている人口が周囲に多いほどマラリア原虫に感染した蚊が増え、その結果、蚊帳を使わない乳幼児にマラリア感染蚊を介したマラリア感染が増加し、一部の乳幼児がマラリアにより死亡するのか？解析の結果、「周囲に5歳から20歳未満の人口が多い蚊帳を使用していない乳幼児に比べ、少ない重要事の死亡のリスクが高い」ということが解った。この仮説に関しても、反対の結果となった。解釈としては、以下のことが考えられる。1) 5歳から20歳未満の人口は、蚊帳を使わないことにより、蚊を引きつけ、乳幼児が蚊に刺される機会から防御している。これは、zooprophylaxis の考え方と同じであり、周囲に蚊の対象がいる場合、蚊に刺されるリスクが軽減し、その結果マラリア感染リスクも減少する、すなわち、周囲にいる蚊の対象により守られるという論理である。元々は、家畜等によりマラリア感染を防ぐということを述べた論理であるが、今回の解析では、5歳から20歳未満の人口がその役割を演じている可能性が示唆される。すなわち、マラリア感染の鎖をつなぎつつ、蚊帳を使わない乳幼児を守っているという、相反する役割を果たしている可能性がある。2) 一方で、5歳から20歳未満の人口が多いことは、町に住む乳幼児であることが考えられる。町に済むと言うことは、ある程度裕福であることから、周囲に5歳から20歳未満の人口が多いところに住む乳幼児は、裕福が故に、蚊帳を使わない場合でも、マラリア感染による死亡が少ないという仮定も考えられる。

今後のマラリア対策

今後のマラリア対策を考える上で、蚊帳の配布・交付から漏れた乳幼児のリスクを考慮した対策が必要であると共に、蚊帳を比較的使用していない若年人口層は、リザーブとしての機能をしていると考えられているが、一方で、蚊帳を使わない乳幼児に対する防御壁の機能も果たしている。リザーブ対策と防御機能の双方から今後のマラリア対策を検討する必要がある。

マラリアの流行発生機構の解明と制御研究: 媒介蚊の研究を通して

熱帯医学研究所 病害動物学

皆川 昇

背景

近年、ケニア各地でマラリア感染の低下が見られる。これは、マラリア対策として殺虫剤付きの蚊帳の配布とアルテミシンをもとにした治療薬の普及の効果と推定されている。しかし、ビクトリア湖盆など一部の地域では、いまだに高い感染が維持されていることと、媒介蚊による殺虫剤抵抗性も報告されており、これらの対策だけでマラリアをなくすことは困難である。

さらに、近年の気候変動などの環境変化が、マラリア感染に負の影響を与えるのではないかと懸念されている。環境変化は、特に媒介蚊の生息地や成長に大きな影響を与えやすいからである。

目的

本研究では、これらの背景をふまえ、なぜ、ビクトリア湖畔など一部の地域でマラリア感染がいまだに高いかを媒介蚊の研究をとおして明らかにするとともに、よりよい対策法を提言することを目的とする。

具体的な研究目的として下記のような懸念や疑問をあきらかにすることとしている。

- 温暖化などの気候変動とマラリア流行との関連性、
- 長く懸念されていたビクトリア湖でのホテアオイの繁殖とマラリア感染の関連性、
- 湖の水位変化による湖岸の媒介蚊繁殖地、及び感染への影響、
- 蚊帳の有効性と媒介蚊の反応、
- 蚊帳や治療薬を補足する他の制御法の検証。

気候変動の影響

90年代に西ケニア高地でマラリアが頻繁に流行した。その要因として、温暖化などの気候変動、土地利用変化、原虫の薬剤耐性などが指摘されている。我々は、以前の

研究でインド洋ダイポールモード現象にともなう気象変化が東アフリカのマラリア流行と関連があることを明らかにした。本研究においては、さらに低地との比較を行い、低地よりも高地の方が気候変動とマラリア感染の関連性が高いことを示す結果が得られた。今後、どのようにしてインド洋ダイポールモード現象などの気候変動がマラリア流行につながるかという機構を蚊の生態を含めてモデル化する予定である。

ビクトリア湖の ホテアオイの影響

近年、ビクトリア湖では、外来種のホテアオイが繁殖し、漁船の航行を妨げたりして住民の生活に大きな影響を及ぼしている。また、ホテアオイがマラリア媒介蚊（フネスタス：*Anopheles funestus*）の繁殖地になり、流行につながるのではないかと長く懸念されていた。

昨年度までの調査の結果、多くの場合マラリア媒介蚊は湖内のホテアオイで繁殖はしないことが分かった。しかし、湖岸に生えている背丈の高い湿生植物や木によって波の影響の少ない水域に溜まっているホテアオイの集団にはフネスタスが繁殖していることが確認できた。また、マイナーな媒介蚊2種も繁殖していることが確認できた。

現在、ホテアオイに媒介蚊が繁殖する地域とそうでない地域での媒介蚊の密度と分布、及び人間の感染状況を比較することで、ホテアオイがどれほど地域のマラリア感染に寄与しているかを検証中である。

湖の水位変化の影響

ビクトリア湖の水位低下によってできた湖岸沿いのラグーン状の細長い水たまりが多数出現し、それらに近い地域で幼児感染率が高いことを明らかにした。また、その地域では屋内での蚊の密度が高く、特に主要媒介蚊で

あるフネスタスが他の地域に比べて多く出現する。媒介蚊の保虫率も他の地域より高いため、ラグーンが蚊の発生源であり、地域のマラリア感染に寄与していることを示した。現在、水位変化と媒介蚊の密度変化をモニターしており、時系列的にも水位変化と媒介蚊との関係を検証中である。

このような湖岸の繁殖地は、地域的に集中しており、幼虫を対象とした殺虫剤散布などで感染を押さえることができると思われる。他に、物理的に繁殖地の環境を変えて蚊の発生を抑える手法などの効果を検証する予定である。

蚊帳の効果と蚊の反応

ケニアでの調査地での蚊帳の普及は進んでおり、多くの家が蚊帳を所有している。使用状況を調べてみると、蚊帳をシートとして使用、暑いためにあっても使用しない、客用にとっておくなどの例が多くみられた。また、漁村では、漁網や小魚を干す道具として頻繁に使用されていた。

また、これまでの調査で、蚊帳の使用は、5 - 15歳の子供が、大人や幼児に比べて非常に低いことが明らかになった。その要因として、子供の多くは居間の床で寝ていおり、蚊帳の使用率が低いこと、また、ベットで寝ている子供とベットがなくとも寝室で寝ている子供の使用率は高いことが分かった。これらのことから、居間は蚊帳が吊るしにくい、また、朝に蚊帳を取り外さなければならぬため、その煩雑さが蚊帳の使用率を下げていることが示唆された。

現在、蚊帳の中で住民全員が寝れることを目標として、ケニア保健省が蚊帳を配布している。これにより、ビクトリア湖地方のマラリア感染がどれほど下がるかが明らかになり、蚊帳の効果の検証が可能となる。よって、幼児感染の定期調査と蚊の密度調査を今後も継続する予定である。

蚊の蚊帳に対する反応

蚊帳が普及することにより、アフリカの主要マラリア媒介蚊の種構成が変わるという仮説が提唱されている。ガンビエ (*An. gambiae*) の成虫は、人嗜好性が強く、家屋内に主に生息している。一方、近縁種のアラビエンシス (*An. arabiensis*) は、比較的動物嗜好性が強い。よって、蚊帳の普及によって、ガンビエが減り、相対的にアラビエンシスの割合が高まるということである。さらに、感染場所は、屋内よりも屋外が重要になる可能性が高い。

ビクトリア湖畔の調査地の10年前のデータと比較したところ、多くの地域でガンビエの割合が急激に減少していることが明らかになった。しかし、一部、ビクトリア湖内の島では、いまだにガンビエの比率が高いところがあることも明らかになった。また、蚊の密度は全体的に10年前と比べ減っていることも分かった。

昨年度までにケニア各地でのマラリア媒介蚊の採集を実施した。現在、サンプルの分析しており、これにより、ケニアでの媒介蚊の分布と種構成の実態が明らかになる。そして、過去のデータと比較を行い、分布と種構成に変化が見られるかを明らかにする予定である。

この研究の発表

論文 は GCOE の表記のあるもの

- 1 . Ndjinga JK, Minakawa N. 2010. The importance of education to increase the use of bed nets in villages outside of Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Malaria Journal*. 9: 279.
- 2 . Ohba S, Kawada H, Dida GO, Juma D, Sonye G, Minakawa N, Takagi M. 2010. Predators of *Anopheles gambiae* sensu lato (Diptera: Culicidae) larvae in Wetlands, Western Kenya: Confirmation by polymerase chain reaction method. *Journal of Medical Entomology*. 47: 783-787.
- 3 . Iwashita H, Dida G, Futami K, Sonye G, Kaneko S, Horio M, Kawada H, Maekawa Y, Aoki Y and Minakawa N. 2010. Sleeping arrangement and house structure affect bed net use in villages along Lake Victoria. *Malaria Journal*. 9: 176.
- 4 . Okara RM, Sinka ME, Minakawa N, Mbogo CM, Hay SI and Snow RW. 2010. Distribution of the main malaria vectors in Kenya. *Malaria Journal*. 9: 69.
- 5 . Zhou G, Githeko AK, Minakawa N and Yan G. 2010. Community-wide benefits of targeted indoor residual spray for malaria control in the Western Kenya Highland. *Malaria Journal*. 9: 67.

生態学的感染症研究: 時間軸・空間軸のなかでの感染症理解

熱帯医学研究所 国際保健学分野

山本太郎

背景

フィールドを背景とした感染症研究を以下の視点で行い、感染症の自然史、時間軸、空間軸のなかでの感染症を再構築し、その自然史の理解を深めることを目的とした研究を行う。具体的には、以下の4つのユニットで行っている。

- 1) 「時間軸のなかでの感染症」を再構築し研究するユニット
- 2) 「環境や気候変動と感染症」の関係を研究するユニット
- 3) 「生態系と感染症」の関係を研究するユニット
- 4) エイズ流行の「社会的要因」に関する研究ユニット
こうした研究ユニットを貫く共通概念を、「空間軸」と「時間軸」に置く。空間的広がりや時間的広がりの中で、感染症流行の様相を比較し、その多様性を理解する。あるいは、そうした広がりの中における、微生物の遺伝的多様性を、適応・進化といった側面から理解することを目指す。感染症は、生物（微生物）と生物（宿主）の相互作用をもたらす生物学的現象の一つである。相互作用は宿主としてのヒトの文化や社会制度を含む社会構造にも大きく影響される。そうした相互作用をひとつずつ紐解いていくような研究と言い換えることもできる。

東アジアにおける HTLV 1 の 系統分化に関する知見を得た (時間軸のなかでの感染症)

HTLV 1 は塩基配列に基づき、いくつかの遺伝子型・亜群に細分されており、東アジアからはそのうち大陸横断亜群 (TC) と日本亜群 (JPN) が知られている。沖縄、台湾および北海道、樺太の HTLV 1 集積地では TC が高頻度で見られるのに対し、本土の集積地では JPN が優勢であることが散発的に報告されてきた。前年度に引き続き、九州から琉球列島、及び本土の海岸部に散在する集積地から得られたウイルス株の系統解析を進めてきた。新規データ量を追加し、解析手法を改善した結果、系統分化のパターンがより明瞭に示された。日本で分離されたウイルス株のうち従来の RFLP に基づく分類では TC と同定されるものの大半は、東アジアに限局して見られる系統群 (EAS) に含まれ、残りは世界広域に分布する系統 (GLB3) に含まれることが分かった。分岐年代推定の結果、EAS は約6000年前頃、JPN は約4000年前頃には日本に存在していたことが分かった。

サルT細胞白血病ウイルス1型 (STLV 1) の感染自然史に 関する知見を得た (時間軸のなかでの感染症)

HTLV 1 はサルを自然宿主とするサルT細胞白血病ウイルス1型 (STLV 1) がヒトに偶発的に感染する過程で進化してきたことが分子系統学的研究によって明らかになってきた。本研究では、野生由来のニホンザル

の集団を対象に STLV 1 の感染経路、感染力、病原性を確認し、あわせて宿主の社会行動を分析することで、STLV 1 の感染自然史の解明を目指す。STLV 1 は旧世界真猿類の間で広く蔓延しており、そこから新たな HTLV 1 系統が出現し、ヒト社会に蔓延する可能性もある。本研究から得られる知見は、霊長類などの哺乳類を自然宿主とするウイルスがヒトへ宿主転換するプロセスの理解を助け、将来的には新興感染症の制御にも役立つと考えられる。HTLV 1 および STLV 1 のプロウイルスゲノムを定量する実験系を構築し、現在、STLV 1 陽性ニホンザル全血中のプロウイルス量の定量を行っている。個体によってバラツキが大きいものの、陽性未発症のヒトと比べるとはるかにウイルス量が高い傾向にある。今後、唾液、精液等の非血液検体を対象として解析を進めることで、ニホンザルの野生群における主要な感染ルートを解明したい。

本研究課題に関連して、高等霊長類の生活史、社会構造などを専門とする研究者と、感染症の疫学、分子進化を専門とする研究者が最新の知見を持ち寄り、宿主と病原体の共進化、宿主転換などの新興感染症出現の進化的な背景を考察するべく、「霊長類の行動生態学と熱帯感染症疫学の接点」と題した研究集会を開催した。

古病理標本、古人骨からの 病原体 DNA の検出 (時間軸のなかでの感染症)

古病理標本 (数十年前) や古人骨 (数百年前) から回収した病原体 DNA を対象に分子系統学的解析を行うことにより、過去から現在に至る病原体の進化的変遷を明らかにし、過去と現在の流行様相の違いを分子進化的な観点から理解することを目指す。現段階では現代人の歯髄および現代人と近世人の骨組織 (緻密質) からの DNA の回収、ミトコンドリア DNA の多変領域の増幅に成功しており、抽出、増幅過程でのクロスコンタミネーションの防止のための手技の改善に取り組んでいる。実験系確立後の研究対象として、日本に古くから存在し、人々の暮らしや経済活動に大きな影響を及ぼしてきた結核や leprosy などを考えている。そこで、2011年度末にこれらの感染症を研究対象としている学外研究者と意見交換するために、「感染症の分子進化研究会 第二回」と題した研究集会を企画している。

インド洋の海洋気象現象と バングラデシュにおけるコレラ流行 との関係について知見を得た (環境や気候変動と感染症)

地球温暖化は人間の健康に大きな影響を与えると考えられる。特に太平洋のエルニーニョ現象がコレラ蔓延地域であるバングラデシュにおいて、その流行と関連があることが報告されている。一方、最近の海洋気象学研究において、熱帯インド洋東西の海面水温の二極化現象 (インド洋ダイポール現象) がインドモンスーンやベンガル湾の海面水位に影響を与えることが報告されている。

バングラデシュ国際下痢研究所 (ICDDR,B) との共

同研究で、過去20年間の気象データと首都ダッカのコレラやその他の下痢症患者数のデータベースを構築し、エルニーニョ、ダイポール現象、降雨量および気温とコレラ患者数の関連を明らかにするため時系列統計解析を行った。その結果、比較的最近(直近3ヶ月)のダイポール指数とコレラ患者数に正の関連があり、4-7ヶ月以前のダイポール指数と患者数に負の関連があることが明らかとなった。

これらの研究成果は、開発途上地域における地球温暖化の影響予測の精度を向上させ、世界保健機関の提唱する気象データを利用した感染症流行早期警報システム開発のための重要な基礎的データとなる点で学術的に価値があり、また社会的要請に応えるものでもある。

蚊媒介性感染症の シミュレーションモデルから 導かれる最適なコントロール方法 (生態系と感染症)

感染症の中には吸血性の節足動物が感染を媒介するものがある。マラリアやデング熱はその代表例で、それぞれ特定のグループ(属)の蚊が媒介する。これらの病気の動態は人だけでなく蚊の生態によっても大きく影響されるので、環境条件の地理的な違いや気象条件の時間的な変化に複雑な影響を受ける。このような蚊媒介性感染症の複雑な動態を理解し制御するためにはコンピュータによるシミュレーションが有用である。本プロジェクトでは蚊媒介性感染症の時間的動態と空間的変動について、それぞれデング熱とマラリアを題材に数理モデルを用いた研究を行っている。

これらの研究ではまず、実際に観察された症例数の時間変化や空間分布をうまくシミュレーションで再現するような蚊の個体群の属性(発生源の数やその分布)を探る。現実をうまく再現するモデルが出来上がると、今度はシミュレーション上でそこに介入を加えて病気の発生がどのように変化するかを調べる。このようなアプローチによって、経済的コストや環境負荷を抑えながら最も効率の高い蚊の防除方法を探っている。具体的にはデング熱発生数を減らすのに最適な殺虫剤の散布時期、マラリアを減少させるのに最適な殺虫剤処理蚊帳の配布方法について検討中である。

中国の医学生への 血液媒介感染予防のための 教育的介入の試み (エイズ流行の社会的要因)

HIVをはじめとする血液媒介性の感染症は医療現場に

おいても感染リスクが高く効果的な予防策が望まれている。中国における医学生337人を対象に質問票を用いて感染リスクの知識調査を行い、また無作為化試験によって短期間の教育的介入が彼らの知識レベルを高めるかどうかを調べた。医学生の感染リスクおよび予防措置についての知識は概ね良好だったが、HIVの感染経路や外傷の対処方法など一部正答率の低い問題もあった。1回の講習によって有意な知識レベルの上昇は見られず、より長期的な教育的介入の必要性が示唆された。

メコン流域の多国間感染症 防御体制を構築

中国と東南アジア「黄金の三角地帯」に接する雲南省に焦点を合わせ、China AIDS network、雲南省健康と発展研究会及び昆明医学院と共同で、ハイリスク人口の健康・疾病プロフィールを描くことを目標としている。本研究は、メコン流域の多国間感染症防御体制を構築するために不可欠な基礎資料となる。倫理申請(中国における流動人口とHIV/エイズ予防対策についての研究、承認番号:10092253;中国・雲南省における静脈注射薬物乱用者を対象とするエイズ・結核重複感染に関する疫学研究、承認番号:10092254)

ラオス-中国国際流動人口の医療保障に関する調査。中国雲南省西双版纳州国境とラオス側での人的交流に焦点をあて、国際流動人口の社会的特性を調べる。雲南省「健康と発展」研究所と共同で、ラオスに出入国する中国人の調査を行っている。中国-ラオス国境流動人口859名のデータを収集分析した。国際流動人口は言葉の壁のせいで滞在国の健康サービスから除外されがちであり、健康保険に加入していない実態が明らかになった。一方、エイズ、マラリア等の感染症の流行状況や予防などについては現在までのところ把握できていない。こうした集団に対する母国語による健康教育及び有効な介入法の研究が次の課題となっている。

雲南省女性CSWに関する研究。女性CSWは、bridge populationと言われる。本研究グループは中国-ラオス国境地域及び中国-ミャンマー国境地域で、現地疾病管理センターの協力を得て、CSWを対象にした調査を行った。調査は、1)FHI BSS KABP 質問票を用いたインタビュー調査により人口学的属性、医療保障、流動歴、性感染症歴、感染予防知識、性行動等、2)現地疾病管理センターによるエイズ、梅毒、淋病、クラミジア等の各項目の検査からなる。129名 street-based と185名 brothel-based、合わせて314人のCSWを対象とした調査を行った。地方衛生当局による積極的な street-based CSW に対する介入の必要性が示唆された。

この研究の発表

論文 は GCOE の明記があるもの

1. Zhang Z, Yamamoto T, Wu X, Moji K, Cai X, Kuroiwa C. Educational intervention for preventing blood-borne infection among medical students in China. *Journal of Hospital Infection*. 75(1): 47-51. 2010. 2010 May (Epub 2010 Mar 25). (IF 3.012).
2. Haque U, Magalhaes RJS, Reid HL, Glass GE, Clements ACA, Ahmed AM, Islam A, Yamamoto T, Haque R. Spatial prediction of malaria prevalence in an endemic area of Bangladesh. *Malaria J.*; 9: 120. 2010. 2010 May 9. (IF 2.913).
3. Haque U, Hashizume M, Sunahara T, Hossain S, Ahmed SM, Haque R, Yamamoto T and Glass GE. Progress and challenges to control malaria in a remote area of Chittagong hill tracts, Bangladesh. *Malaria J.*; 9: 156. 2010. 2010 Jun 10. (IF 2.913).
4. Eguchi K, Ohsawa K, Fuse M (Kiyono), Suzuki J, Kurokawa K, Yamamoto T. Epidemiological Evidence that Simian T-lymphotropic Virus Type 1 in *Macaca fuscata* has an Alternative Transmission Route to Maternal Infection. *AIDS Res Human Retroviruses*. 27(2): 113-4. 2010. 2011 Feb (Epub 2010 Sep 21). (IF 2.024).
5. Hashizume M, Faruque ASG, Terao T, Yunus M, Streatchfield K, Yamamoto T, Moji K. The Indian Ocean Dipole and cholera incidence in Bangladesh: A time series analysis. *Environ Health Perspect*. 119(2): 239-44. 2010. 2011 Feb (Epub 2010 Oct 27). (IF 6.191).
6. Haque U, Hashizume M, Glass GE, Dewan A, Overgaard HJ, Yamamoto T. The role of climate variability in the spread of malaria in Bangladeshi highland. *PLoS ONE*. 5(12): e 14341. 2010. 2010 Dec 16. (IF 4.351).

シャーガス病の慢性合併症(心筋症、巨大結腸症) 抵抗性に関連する HLA 遺伝子アレルの同定

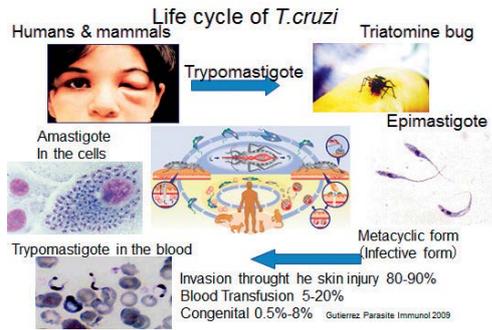
熱帯医学研究所 免疫遺伝学
平山謙二

要約

ボリビアサンタクルースの熱帯病研究所 (CENETROP)、日本病院 (Hospital Japones) および西沢外科との共同研究によるシャーガス病の無症候、心臓病、消化管障害の3つの病型における宿主および原虫の遺伝解析。病型と原虫の系統あるいは亜系統との関連が認められないことは昨年報告したが、今回は宿主側の HLA に関連することが明らかとなった。

背景

シャーガス病はラテンアメリカに広く分布する細胞内寄生原虫クルーストリパノソーマ感染症である。2009年の報告でも年間30万人が新たに感染している。小児の急性期患者以外有効な薬剤はいまだ開発されていないので、ほとんどが慢性に移行し、生涯原虫を保有して生活する。慢性期の患者は大きく3つの病型に分類され、無症候群、心疾患群、巨大食道結腸症群と呼ばれる。合併症を伴う患者では突然死や急性腹症などが多発するが、慢性患者の3割程度が発症すると考えられている。

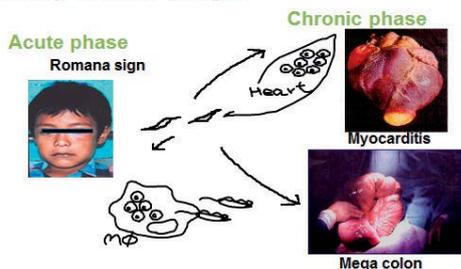


トリパノソーマ原虫は患者あるいは感染動物の血液を吸血したサシガメの糞の中で分化した感染型の原虫の経皮あるいは経粘膜感染により侵入し、すぐにマクロファージに取り込まれそこで増殖する。血液中を移動し体内の細胞に慢性感染を繰り返す。

心疾患と巨大結腸症を 発症する人は限られている。

慢性期の患者のうち、以下に示す2つの合併症がボリビアでも頻りに観察される。下図に示すのが心筋や伝導系の障害を特徴とする心臓シャーガス病の典型的な病像

Majority infected at early Childhood and 30% develop Chronic Chagas



である。

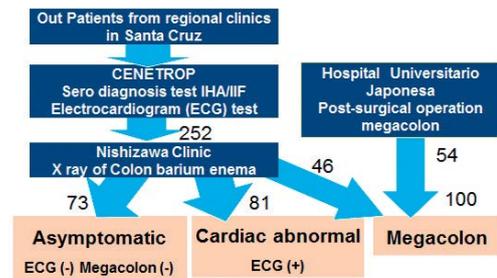
ボリビアやブラジルなど南部のラテンアメリカでは巨大結腸症の患者も多くみられる。下図に示すように消化管の神経叢が破壊され、自律神経の緊張が消失し、特に下部結腸が巨大化し便秘や腸ねん転などを引き起こす。

客観的な診断に基づく3つの 典型的な臨床型の判別

慢性患者は血清検査で抗体陽性となるので、コレラの患者を心電図や結腸の造影検査すれば、臨床型を決定することができる。以下に本研究で行った診断プロトコールと実際に集まった患者数を示した。

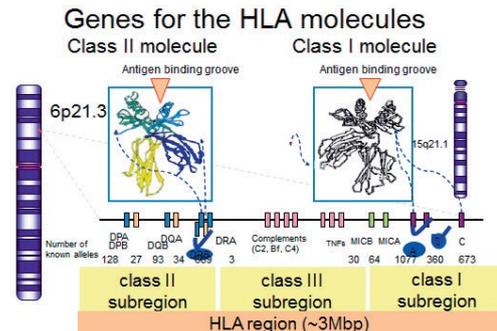


Diagnostic Protocol of Chronic Chagas



合併症の感受性抵抗性と 関連する HLA アレル

無症候性73名、心疾患81名、巨大結腸症100名について



Clinical groups of Chronic Chagas

ECG	Mega colon	No. of Patients	Male	Female	Mean age ± SD	121/122 PCR (+)
-	-	73	34	39	42.3 ± 8.5	57.5
-	NE	41	16	25	42.9 ± 9.6	61.0
+	NE	21	10	11	40.6 ± 10.4	52.4
+	-	43	22	21	38.5 ± 9.8	72.1
+	+	17	6	11	47.9 ± 14.1	52.9
-	+	36	17	19	47.1 ± 12.0	55.6
NE	+	47	27	20	55.6 ± 17.0	80.9
NE	-	28	12	16	42.5 ± 7.4	71.4
Total		306	144	162	44.7 ± 12.4	64.1

Allele frequency of the HLA Class I & II genes

	Complication+ vs Indeterminate				
	N=162 (%)	N=72 (%)	*OR	**Pv	***Pc
A*01:01	17 (10.7)	4 (5.5)	-	NS	-
A*01:06	1 (0.6)	4 (5.5)	0.107	0.034	NS
B*14:02	3 (1.8)	8 (11.4)	0.149	0.004	0.028
DRB1*01:02	5 (3.1)	8 (11.1)	0.258	0.026	NS
DRB1*08:02	48 (30.0)	11 (15.3)	2.376	0.022	NS
MICA*011	1 (0.6)	6 (8.5)	0.071	0.005	NS

*Odds Ratio **P value ***P corrected

A*01, B*14 and DRB1*01 are associated to protection against Chagas Megacolon

HLA allele	Megacolon		OR	Pv	Pc
	(+)	(-)			
A*01	n=99 (4.0)	n=142 (17.0)	0.20	0.001	0.01
B*14	2 (2.0)	16 (12.0)	0.16	0.005	0.05
DRB1*01	2 (2.0)	20 (14.2)	0.01	0.001	0.01

て HLA A, B, DRB1, MICA 遺伝子座のアレルタイプピングを行い、合併症に関連するアレルの検索を行った。その結果、HLA A*01が心疾患感受性、また B*14, DRB1*01, MICA*011 という互いに強い連鎖不平衡にある三つのアレルが巨大結腸症あるいは合併症に抵抗性のハプロタイプを構成することが明らかとなった。

考察

シャーガス病の無症候、心臓病、消化管障害の3つの病型と宿主の HLA 遺伝子多型との関連が明らかになった

この研究の発表

学会発表

del Puerto Rodas RF, Nishizawa JE, kikuchi M, Iihoshi N, Roka Y, Gutierrez Velarde FU, Hirayama K et al., HLA Class I and Class II analysis in chronic Chagas disease in Bolivia. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan. August 22-27, 2010. (Abstract: International Immunology AUGUST 2010 VOLUME 22 SUPPLEMENT NUMBER 1, pp iv 129, 2010)

論文 は GCOE の明記があるもの

- Huy NT, Hirayama K. et al. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. Crit Care. 2010 Dec 31; 14(6): R 240.
- García G, Hirayama K, Guzmán MG. et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. Int J Infect Dis. 2011 Jan; 15(1): e 38-43. Epub 2010 Nov 26.
- García G, Hirayama K, Guzmán MG. Et al. Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. Am J Trop Med Hyg. 2010 Jun; 82(6): 1153-6
- del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roka Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Lineage analysis of circulating Trypanosoma cruzi parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis. 2010 May 18; 4(5): e 687.
- Kohama H, Hirayama K, Arakawa T. et al. Intranasal administration of Schistosoma japonicum paramyosin induced robust long-lasting systemic and local antibody as well as delayed-type hypersensitivity responses, but failed to confer protection in a mouse infection model. Jpn J Infect Dis. 2010 May; 63(3): 166-72

Allele frequency of the HLA Class I & II genes (ECG+ patients)

	ECG+ vs ECG-		OR	Pv	Pc
	N=80 (%)	N=149 (%)			
A*01:01	14 (18.1)	8 (5.5)	3.74	0.004	0.03
A*01:06	1 (1.3)	4 (0.0)	-	NS	-
B*14:02	1 (1.3)	9 (6.2)	-	NS	-
DRB1*01:02	3 (3.8)	9 (6.1)	-	NS	-
DRB1*08:02	21 (26.9)	34 (23.5)	-	NS	-
MICA*011	1 (1.3)	6 (4.2)	-	NS	-

ECG=electrocardiogram

Summary

- Allele B*14:02 is associated with protection against the development of serious complication in the chronic stage of the disease (ECG+ and/or Megacolon+).
- The haplotype DRB1*01 / B*14:02 / MICA*011 was present.
- Allele A*01:01 associated with susceptibility to ECG alterations while had a tendency to confer protection against the development of Chagas Megacolon.



たので、ここで同定された抵抗性ハプロタイプである B 14 DR01 MICA011についてさらに詳細な遺伝解析を行う必要がある。このハプロタイプの一般集団での頻度を調べるのがまず重要であるが、同時にこのハプロタイプの機能的な特徴についても発現解析や免疫細胞刺激活性などについて今後の研究を展開する。

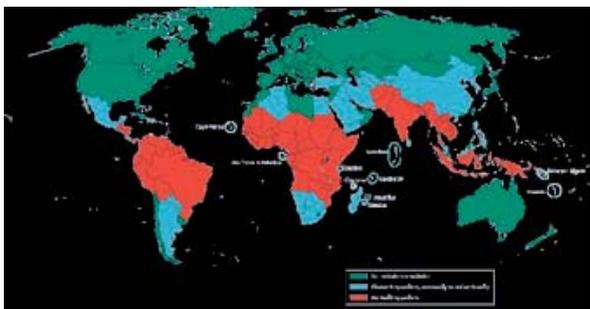
最近、末梢血中の原虫 DNA の定量化が可能となったので、原虫血症と HLA との関連についても検討する予定である。

島嶼マラリア撲滅:ヴァヌアツからビクトリア湖へ

熱帯医学研究所 免疫遺伝学 客員教授
金子 明

背景

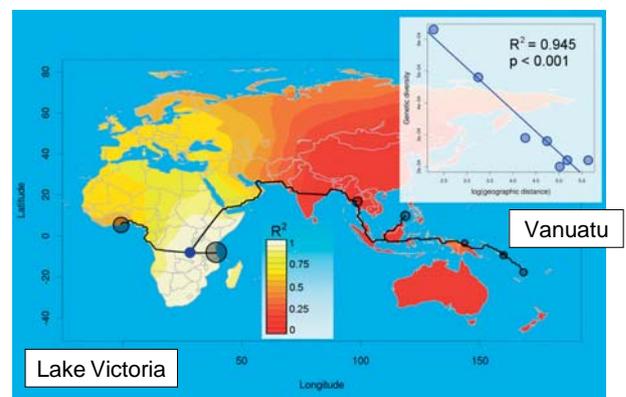
マラリア根絶は、21世紀人類が対峙する Global Health 上の課題である。現在、マラリア伝播は世界108カ国(下図緑)において制圧されているが、100カ国(青・橙)においては継続している。後者のうち39各国(橙)においてマラリア撲滅に向けた取り組みが始まっている(Feachem 2009)。この39カ国のうち11カ国はアフリカに属することは特記すべきことであるが、依然それらの地域はアフリカの辺縁あるいは島嶼に限られる。各地でマラリア感染リスクの急激な減少が報告されてきており、Global Fund 等の新たな資金投入による薬剤処理蚊帳や ACT 等対策法の流行国におけるスケールアップが、アフリカにおいても奏功しているとの認識が形成されつつある。しかし熱帯アフリカ大陸中核の高度流行地域においてマラリア撲滅が可能であるかは、地球規模のマラリア根絶に至る過程において残された課題である。島嶼は対策研究に対して自然の実験場を提供する。我々は南太平洋アネイチウム島における過去20年間の持続的島嶼マラリア撲滅対策の経験から、その戦略をケニア・ビクトリア湖高度マラリア流行島嶼に応用し、住民の集団治療と殺虫剤処理蚊帳配布による短期集約対策によるマラリア撲滅が達成可能か? さらに達成されたマラリア撲滅が住民主導の長期的蚊帳使用とサーベイランスにより維持されるか? について検証し、熱帯アフリカにおけるマラリア撲滅可能性を検討することを究極の目的とする。



熱帯熱マラリア原虫はアフリカを出た人類(out of Africa)と供に拡散した

熱帯熱マラリア集団の遺伝学的構成は、マラリア治療

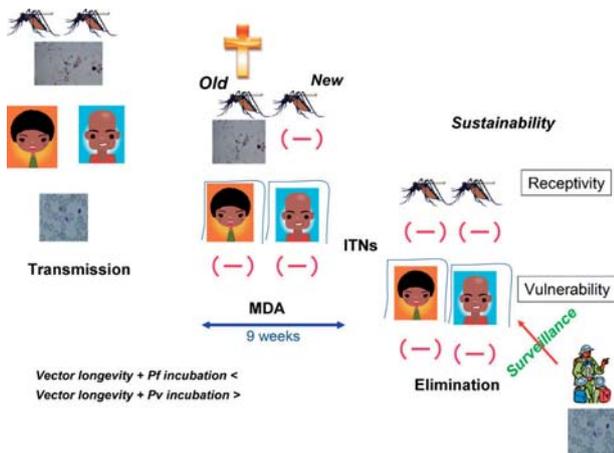
や対策効果を決定する重要因子であると目されるが不明な点が多い。我々は世界中から集めた519例の *P. falciparum* について2つの housekeeping 遺伝子(63 SNPs from 5000 nucleotides)を解析した。アフリカ、アジア、太平洋の原虫集団を通して、集団内遺伝的多様性とサハラ以南アフリカ(ケニア・ビクトリア湖)からの距離の間に負の相関が認められた($R^2 = 0.95$)。それに反して地域ごとのマラリア伝播の強さはこの多様性の度合いに関与していなかった。この衝撃的な熱帯熱マラリア原虫の地理的パターン(isolation by distance)はこれまで報告されていた人類のパターンを反映し、両者がサハラ以南アフリカに共通起源をもつことを支持するものである。この熱帯熱マラリア原虫拡散の推定年齢は現人類は out of Africa 以前にこの原虫に感染していて、両者がともに拡散し南西太平洋ヴァヌアツまで至ったことを示唆する(Tanabe 2010)。



島嶼マラリア撲滅維持の 住民主導戦略

アジア太平洋の低マラリア流行地域では現存する対策手段により撲滅を達成することが可能と考えられる。ヴァヌアツ、アネイチウム島においては1991年に集団治療、薬剤処理蚊帳によるマラリア撲滅パッケージが強固な住民参加のもとに導入された後、輸入例をのぞいて、熱帯熱マラリア感染は消滅し、三日熱マラリアも1996年以降は地元島嶼民において見られなくなった。その後、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きた。ア島における経験を総括し、マラリア撲滅にお

ける住民の役割を検証した。撲滅プログラムが成功するためには、対策活動の主体を外的ドナーから住民に移すことが重要である。住民の役割を単純な参加から計画立案から関与する社会的な参加に引き上げることが、マラリア制圧から撲滅へのプログラム方向性の転換において必要となる (Kaneko 2010)。



ビクトリア湖島嶼への展開

ケニアにおいては、2009年の推計では国民の65%にあたる2千6百万人は2 - 10歳小児における熱帯熱マラリア原虫感染率が1%以下と極めて低い地域に生活するようになった。その一方、10.6%は、この感染率が40%以上と依然高い感染リスクとともに暮らしている

(Noor 2009)。Subaは後者を代表する。ケニア政府は2009年、“*malaria free Kenya*”をスローガンとして第2次国家マラリア戦略を開始した。本研究はそれに呼応するものであり、熱帯アフリカ大陸高度マラリア流行地域を対象としてマラリア撲滅を試みるところに最大のチャレンジ性がある。また島嶼モデルにより挑戦することを第2の特徴とする。本研究地域のケニア・ビクトリア湖畔のSuba地域には中等度サイズの2島嶼[Mfangano (人口約20000)、Rsinga (25000)]および3小島嶼[Okodhe, Takauri, Kibuogi (人口各島約1000)]が存在する。第1段階ではKibuogiを対象にしてMDAによるマラリア



撲滅を計画する。なお、ロンドン熱帯医学校がRsingaにて幼虫対策、ケニア保健省が室内残留噴霧による成虫対策を評価しており、これらの結果を統合した戦略によりMfangano島マラリア根絶を本研究計画の次の段階として考える。なお対象5島嶼および海岸部のUngoi集落を含めて、寄生虫、血清、分子疫学的評価の対象としていく。これにより人、原虫、媒介蚊の島嶼間の変異、対策実施による変化を見ていく。

この研究の発表

論文

1. Dancause KN, Vilar M, Chan C, DeHuff C, Wilson M, Soloway LE, Tarivonda L, Regenvanu R, Kaneko A, Garruto RM, Lum JK. Patterns of childhood and adolescent overweight and obesity during health transition in Vanuatu. *Public Health Nutrition* 2011, Accepted.
2. Doi M, Tanabe K, Tachibana S-I, Hamai M, Tachibana M, Mita T, Yagi M, Zeyrek FY, Ferreira MU, Ohmae H, Kaneko A, Randrianarivelojosa M, Sattabongkot J, Cao Y-M, Horii T, Torii M, Tsuboi T. Worldwide sequence conservation of transmission-blocking vaccine candidate Pvs 230 in *Plasmodium vivax*. *Vaccine* 2011; Accepted.
3. Dancause KN, Dehuff C, Soloway LE, Vilar M, Chan C, Wilson M, Tarivonda L, Regenvanu R, Kaneko A, Garruto RM, Lum JK. Behavioral changes associated with economic development in the South Pacific: Health transition in Vanuatu. *Am J Hum Biol*.2011.doi: 10.1002/ajhb.21146.[Epub ahead of print]
4. Arisue N, Kawai S, Hirai M, Palacpac NM, Jia M, Kaneko A, Tanabe K, Horii T. Clues to Evolution of the SERA Multigene Family in 18 *Plasmodium* Species. *PLoS One* 2011; 6(3):e 17775.
5. Chaves LF, Kaneko A. Spleen rates in children: an old and new surveillance tool for malaria elimination initiatives in islands. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2011; 105: 226-231.
6. Tanabe K, Zakeri S, Palacpac NMQ, Afsharpad M, Randrianarivelojosa M, Kaneko A, Marma ASP, Horii T, Mita T. Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (PfATP 6) gene among wide geographical parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(1): 94-100.
7. Tanabe K, Mita T, Jombart T, Palacpac N, Ranford-Cartwright L, Sawai H, Sakihama N, Horibe S, Ohmae H, Nakamura M, Ferreira MU, Escalante AA, Bjorkman A, Farnert A, Kaneko A, Horii T, Kishino H, Balloux F. *Plasmodium falciparum*: a stowaway in our ancestors' journey out of Africa. *Current Biol* 2010; 20: 1283-1289.
8. Kaneko A, Wahlgren M. Foreword: Malaria research-diversity and control: A Sweden-Japan Joint Seminar. *Acta Trop* 2010; 114: 129-130.
9. Kaneko A. A community-directed strategy for sustainable malaria elimination on islands: short-term MDA integrated with ITNs and robust surveillance. *Acta Trop* 2010; 114: 177-183.

深在性真菌症に対する新規治療戦略の開発

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

要 約

深在性真菌症は日和見感染症として発症することが多く、なかでもカンジダ症とアスペルギルス症は高頻度に見られ、致命的経過をとることも少なくない。近年、新規抗真菌薬の開発が停滞しており、既存の抗真菌薬の有効利用にも目を向けた新たな治療戦略の開発が急務とされている。本研究で我々は、*Candida glabrata* のタンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンを阻害すると、アゾール系薬を含む既存の抗真菌薬の効果を著しく高め、さらに菌の病原性も低下させることを明らかにした。また、侵襲性肺アスペルギルス症に対しては、アムホテリシンBリボソーム製剤吸入療法の有効性が動物実験で確認できた。このような、新しい治療標的の検索や投与法の工夫は、既存の抗真菌薬の有効利用および新規薬剤の開発に寄与するものと考えられる。

背 景

臓器移植など高度医療の発展や HIV 感染者の増加に伴い、日和見感染症として発症する深在性真菌症への対策は極めて重要な課題となっている。有効な抗真菌薬に限られており、特にアゾール系抗真菌薬に低感受性で近年増加傾向にある *Candida glabrata* 感染症は治療に難渋することも少なくない。カルシニューリンは Ca^{2+} 依存性に活性化されるタンパク質脱リン酸化酵素であり、真核生物で広く保存されている。種々のストレス応答・薬剤抵抗性に関与していることがモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で報告されているが、病原真菌においては不明な点が多く残されている。我々は、重要な病原真菌の一つとして近年注目されている *C. glabrata* を用いて、カルシニューリンの役割および情報伝達経路を解明し、新たな治療薬開発への応用を目指している。

カルシニューリンの阻害は 抗真菌薬の効果を著明に高める！

アゾール系抗真菌薬は静菌的作用しか有していないため、耐性菌が誘導されやすい。*C. glabrata* は本薬剤に元々低感受性であり、薬剤の曝露により急速に耐性化することが知られている。我々は、カルシニューリン阻害剤 FK506 の併用により、アゾール系薬が *C. glabrata* に対して著効することを確認した。また、*C. glabrata* のカルシニューリン欠損株に対して、フルコナゾールが殺菌的に作用することを明らかにした。カルシニューリンによって制御されている下流標的分子として Crz1 転写因子が同定されているが、フルコナゾールは CRZ1 欠損株に対しては殺菌作用を示さなかった。そのため、Crz1 非依存性のカルシニューリン情報伝達経路が、*C. glabrata* のアゾール耐性に重要であることが示唆された。

カルシニューリンの阻害のみで 病原性が低下する！

カンジダ血症マウスモデルを用いた病原性解析において、カルシニューリン欠損株感染マウスの肝・脾・腎内菌数は野生株またはカルシニューリン回復株を感染したマウスに比べ有意に少なく、カルシニューリンが病原性にも重要であることが確認された。

侵襲性肺アスペルギルス症に対して アムホテリシンBリポソーム製剤の 吸入療法が有効であった！

アムホテリシンBは、*Aspergillus fumigatus* に対して有効な薬剤であるが、経静脈投与では腎毒性などの副

作用が問題となる。吸入治療では、血中濃度を上げずに、治療標的臓器である肺へ高濃度の薬剤が到達することが確認された。実際に侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルにおいてその治療効果が確認された。現在、他の病原真菌に対する治療効果およびキャンディン系抗真菌薬吸入療法の有効性も検討中である。

この研究の発表

論文 は GCOE 表記のあるもの

1. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(4): 1639-1643, 2010.
2. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of the Sit2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 10(3): 343-352, 2010.
3. Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Skn7p is required for oxidative stress response and virulence in *Candida glabrata*. *Mycopathologia* 169(2): 81-90, 2010.
4. Takazono T, Izumikawa K, Nagayoshi Y, Tanaka A, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kamihira S, Kohno S. Evaluation of the Cica Fungi Test *Candida*, a novel serum *Candida* mannan antigen kit, and its comparison with Cand-Tec in candidemia patients. *Jpn J Infect Dis.* In press.

学会発表

1. Miyazaki T. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. American Society of Microbiology-Candida and Candidiasis conference, Miami, USA.
2. Miyazaki T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Functional Characterization of the Regulators of Calcineurin in *Candida glabrata*. 50th ICAAC, Boston, USA.
3. 宮崎泰可、永吉洋介、田中章貴、三原 智、高園貴弘、小佐井康介、西條知見、栗原慎太郎、今村圭文、泉川公一、関 雅文、掛屋 弘、山本善裕、柳原克紀、田代隆良、河野 茂。 *Candida glabrata* における Sit2 MAPK の役割 - 細胞壁ストレス応答と病原性への関与について - 。第84回日本感染症学会総会。京都。
4. 宮崎泰可。 *Candida glabrata* における細胞壁ストレス応答機序の解明 - カルシニューリンと Sit2 MAPK 経路を中心に - 第57回日本化学療法学会総会。長崎。
5. 宮崎泰可、山内俊輔、永吉洋介、田中章貴、三原 智、高園貴弘、小佐井康介、西條知見、今村圭文、泉川公一、関 雅文、掛屋 弘、山本善裕、柳原克紀、河野 茂。 *Candida glabrata* におけるカルシニューリン情報伝達経路の役割 - 抗真菌薬感受性と病原性への関与について - 。第11回真菌症フォーラム。東京。
6. 泉川公一。慢性肺アスペルギルス症 up to date。第54回日本医真菌学会総会。東京。
7. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Kohno S. Role of the Sit2-mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. ASM-Candida and Candidiasis conference, Miami, USA.

受賞

- 宮崎泰可。第22回日本化学療法学会上田賞。
- 宮崎泰可。The 10th ASM Conference on Candida and Candidiasis Postdoctoral Travel Grant Award, USA.
- 宮崎泰可。第84回日本感染症学会総会最優秀賞 - ASM Best Presentation Award.
- 泉川公一。抗生物質協議会研究奨励賞。

新規抗ウイルス剤の探索

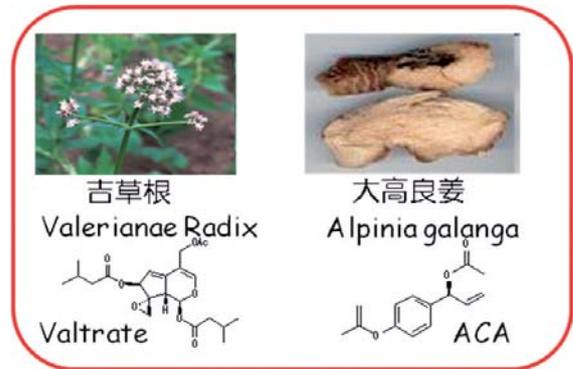
医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 感染分子薬学
小林信之

背景

ウイルス性感染症に対する治療薬の開発は急務であるが、AIDSを除いて大きな進歩がない現状で我々は抗ウイルス剤の効果的なスクリーニング系の開発を進めながら新規抗ウイルス剤の開発を進めている。我々はこれまでに抗インフルエンザウイルス剤の探索を中心に研究を行ってきており、天然物資源等からいくつかの候補活性を見出し、その分離精製を進めてきている。

インフルエンザウイルス核外輸送系を標的とした新規抗インフルエンザ剤の探索

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。最近さらにインフルエンザウイルスRNAポリメラーゼの阻害剤が上市まじかになってきている。しかしながら既にアマンタジン耐性インフルエンザウイルスは広く広がっており、2009年の季節性インフルエンザウイルスではほぼ100%タミフル耐性となっている。インフルエンザウイルスそのものはエイズウイルス同様極めて変異を起こしやすいウイルスであるため、今後もウイルス遺伝子産物を標的とした抗ウイルス剤は、短期間のうちにその耐性ウイルスが出現してくると予測される。これらの問題に対応するにはエイズで効果を挙げている多剤併用療法が考えられる。しかしながら、抗インフルエンザウイルス剤の開発は進んでおらず、さらなる新規阻害剤の開発が急務である。一方耐性ウイルスの出現に対応する方策の一つとして我々はインフルエンザウイルスの複製が感染細胞核内で行われることに注目し、その過程に参与する宿主因子を標的とした抗インフルエンザウイルス剤の探索を進めている。我々はこれまでにその評価系であるGES#5細胞を樹立し(Watanabe K et al. Drug Discover Ther 2008)、この細胞を用いて天然物からの阻害剤を探索し



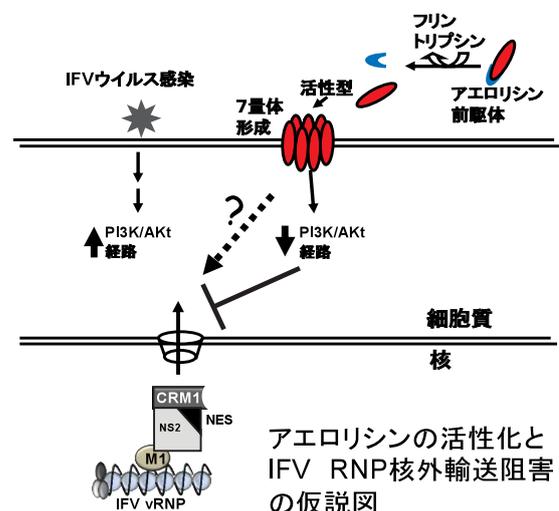
た。その結果吉草根および大高良姜ゆらいの Valtrate および ACA にインフルエンザウイルス vRNP 核外輸送阻害活性を見出した (Watanabe K et al. Drug Discovery & Therapeutics 5 2011印刷中)。

ACA, Valtrate はともに極めて短期間でその効果を表す事から、抗インフルエンザ薬としての可能性が十分に考えられる。しかしながら、細胞毒性も現時点では有意に高いため、今後さらなる検討が必要である。

我々は一方これまでにおよそ100種の天然物由来物質と約5000株の海洋微生物から核外輸送系の阻害剤を探索した。その結果7種の海洋微生物に核外輸送阻害活性を見出している。

そこでこの中で最も活性が強い4411株の成分の精製を進めてきている。

現在までのところ、その精製は完了していないが、TOF



TOF 等の解析の結果その活性アエロリシンである可能性が高いと考えている。現在論文準備中である。

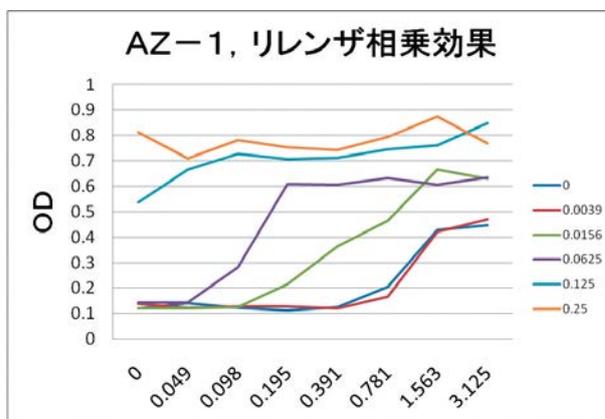
アエロリシンは前駆体より Furin, やトリプシンにより開裂され、活性型が標的細胞膜上で7量体を形成、細胞膜に孔をあけ溶血活性が出現する。またアエロリシンはPI3K経路を抑制する事が知られている。アエロリシンと蛋白質核外輸送との直接の関わりの報告はこれまでに無く我々の報告が初めての物となる。その活性は、PI3K経路阻害剤によりNES含有蛋白質の核外輸送阻害が起きると推測している。これらの機構が今後明らかになれば核外輸送系の新規阻害剤の開発につながっていくと期待している。

核外輸送系の詳細機構解明についてはこれまで我々は宿主因子 Hsc70が関与している事を明らかにしてきたが、今回 Hsc70およびNS2蛋白質のインフルエンザウイルスM1蛋白質との結合部位の詳細を明らかにした(Shimizu T et al FEBS Letters 2011)。この事から Hsc70およびNS2のM1との結合部位を標的とした新規抗インフルエンザウイルス剤の開発を現在進行中である。

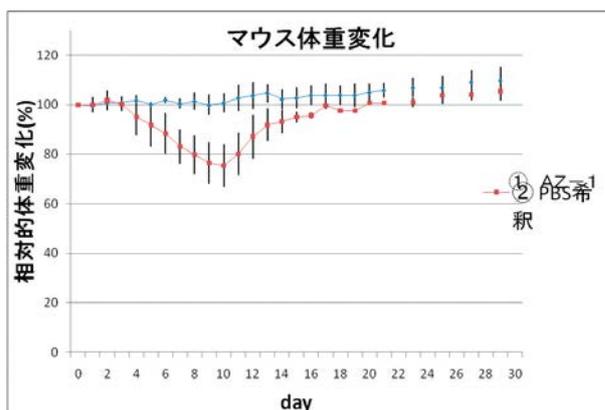
MDCK細胞を利用した 抗インフルエンザウイルスの探索

我々はこれまでに種々の天然物資源より、MDCK細胞を利用した抗インフルエンザ活性のスクリーニングを進めており、天然物資源の中に複数の高い活性を見出すことに成功した。その活性AZ-1の精製を現在進めているがこれまでの結果よりAZ-1はインフルエンザウイルスの細胞吸着過程を阻害する事が明らかとなった(現在論文準備中)。そこでAZ-1と作用点の異なる

抗インフルエンザ薬リレンザとの相乗効果をみると、極めて高い相乗効果が見られた。



さらにインフルエンザウイルスのマウス経鼻接種感染系でのAZ-1の効果を検討した。その結果AZ-1は優位にインフルエンザウイルスのマウス感染を抑制した。



この活性は極めて強く、細胞毒性もほとんど見られないことから、抗ウイルス剤としての可能性が十分に考えられる。現時点では本物質はまだ不純物を含んでおり、22年度にその精製を進めていく計画である。

この研究の発表

論文 はGCOEの明記があるもの

1. Watanabe K., Takatsuki H., Sonoda M., Tamura S., Murakami N and Kobayashi N: Anti-influenza viral effects of novel nuclear export inhibitors from Valeriane Radix and Alpinia galangal. Drug Discoveries and Therapeutics 5. (2011) in press
2. Shimizu T., Takizawa N., Watanabe K., Nagata K and Kobayashi N: Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. FEBS Letters 585.41-46 (2011)
3. Takizawa N., Kumakura M., Takeuchi K., Kobayashi N and Nagata K: Sorting of influenza A virus genome segments after nuclear transport. Virology 401.248-256 (2010)
4. Yu Z., Kabashima T., Tang C., Shibata T., Kitazato K., Kobayashi N., Lee MK and Kai M: Selective and facile assay of human immunodeficiency virus protease activity by a novel fluorogenic reaction. Analytical Biochemistry 397.197-201 (2010)

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 CCR5 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 CCR5 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。

HBP35タンパク質は Por 分泌機構を利用して分泌される

P. gingivalis は菌体表面に C-terminal domain (CTD) 含有外膜蛋白が局在している。gingipain もそれらの一つであり、その輸送機構ならびに表面接着メカニズムは、多くの関心を集めている。今回、CTD タンパク質の一つである Hemin binding protein35 (HBP35) (Shoji *et al.* , 2010) が、gingipain と同様に Por Secretion System (PorSS) により、菌体表面に輸送され、おそらく CTD が切断された後、菌体表面上にある A-LPS と結合する

ことで、表面に接着することを見出した。HBP35はCTDをC末端にもち、菌体表面上で、糖鎖に結合した形で局在することが明らかとなっており、イムノプロット解析ではスミア分子として認められる。また、本菌体表面上の糖鎖には、少なくともOリポ多糖、Aリポ多糖、莢膜多糖が存在し、gingipainやHBP35はAリポ多糖と結合していることが明らかとなっている。最近、私たちはgingipainを輸送する、十数個からなるタンパク質群 (PorSS) を見出した (Sato *et al.* , 2010)。

今回、HBP35タンパク質の外膜への輸送機構ならびに糖鎖修飾機構を明らかにする為に、変異株作製ならびにタンパク質解析を行った。

- (1) Cell lysate を用いて、抗 HBP35抗体によりイムノプロット解析を行った。野生株にて、スミアバンドと40 kDa のバンドが認められた。PorSS に関わる変異株では、40 kDa バンドは認められるものの、スミアバンドは認められなかった (図1)。野生株で認められるスミアバンドは、抗 A リポ多糖抗体にて認識されることより、PorSS の変異株では、菌体表面に HBP35 が出てないと予想された。また、抗 A リポ多糖抗体によりイムノプロット解析を行ったところ、PorSS の変異株では、野生株に比べ、分子サイズが低いところに検出された。これらの結果から、PorSS を介して輸送されるタンパク質が菌体表面に出て A リポ多糖と結合することで、野生株では、抗 A リポ多糖抗体の認識分子が PorSS の変異株に比べて、上方にシフトすることが考えられた。
- (2) PorSS の変異株では、HBP35 が菌体表面に出ていない可能性が考えられたので、抗 HBP35抗体を用いたドットプロット解析と免疫電顕を行った。ドットプロット解析では、PorSS の変異株で、HBP35 は菌体表面に存在しないことが分かった (図2)。また、免疫電顕の結果では、野生株では、ランダムにゴールド粒子が多数認められたが、*porT* 変異株では、ほとんど認められなかった。これらのことから、HBP35は、PorSS 依存性

に菌体表面に局在化することが示唆された。

(3) 次に HBP35 のスメアバンドにおける糖鎖修飾の実態を明らかにする為に、プロテアーゼの 3 重欠損株より、ウサギ抗 HBP35 抗体で免疫沈降を行い、スメアバンドや 40 kDa のバンドを切り出し、トリプシン消化によるペプチドマッピングを行った。40 kDa のバンドからは CTD 由来のペプチドが検出されたが、スメアバンドからは CTD 由来のペプチドが同定できなかった。

(4) そこで、CTD 領域のペプチド抗体を作成し、それらがスメアバンドを認識するか否かを検討した。野生株または *hbp35* 変異株より免疫沈降産物を調製し SDS PAGE に供しました。作製した 3 つのペプチド抗体は、40 kDa を認識するものの、スメアバンドは認識しなかった。この結果から、スメアバンドを示す HBP35 蛋白は CTD が切断されている可能性と、CTD に糖鎖修飾が起きている可能性が考えられた。

(5) 私たちはこれまでに抗 A リポ多糖抗体による認識が低下した 10 種類の変異株を構築している。それらの変異株を用いて、抗 HBP35 抗体による Western 解析したところ、用いた変異株全てにおいて HBP35 のスメアバンドは検出されなかった。10 種類の変異株のうち、9 つの株では抗 A リポ多糖抗体は全く認識しなかった。しかしながら、1 株では部分的に認識されていることを見出し、その株を Anionic polysaccharide synthesis related protein A, *apsA* 変異株と命名した。*apsA* 変異株では、HBP35 が、40.5 および 42 kDa 領域に複数検出された。

今後、これらの HBP35 分子の構造を解析することで CTD タンパク質が菌体表面で A リポ多糖とどのように結合しているかについて解析を進めたい。

図 1

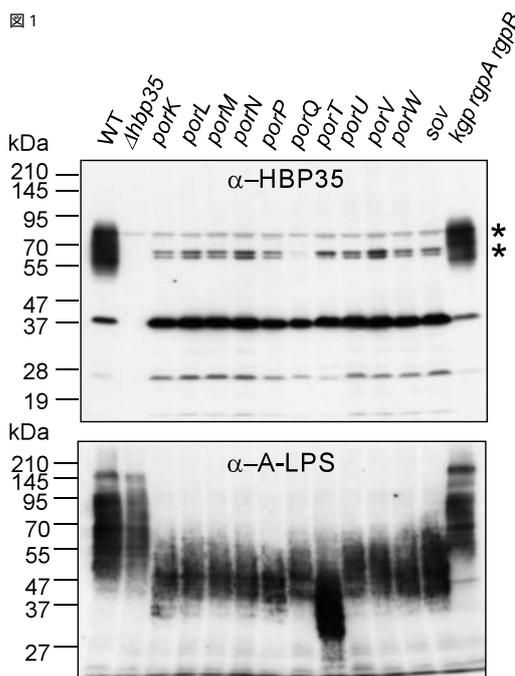
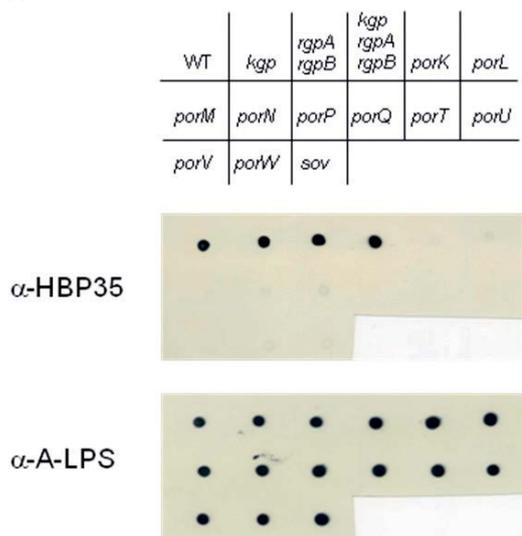


図 2



図の説明

図 1 . イムノプロット解析
図 2 . ドットプロット解析

この研究の発表

論文 は GCOE の明記があるもの

- 1 . Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M.J., Rhodes, R.G., and Nakayama, K. (2010) A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 276-281.
- 2 . Shoji, M., Shibata, Y., Shiroza, T., Yukitake, H., Peng, B., Chen, Y.Y., Sato, K., Naito, M., Abiko, Y., Reynolds, E.C., and Nakayama, K. (2010) Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP 35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol* 10: 152.

プリオン及び薬剤耐性ウイルスの簡易検査法と治療薬の開発

医歯薬学総合研究科 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、プリオン病とウイルス感染症に焦点を当て、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。

プリオン病は、脳などの神経組織に存在する正常なプリオンタンパク質 (PrP^C) が、異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) へと構造的に変化し、脳内に蓄積することで引き起こされる一連の神経疾患である。PrP^{Sc} は、PrP^C と比較して、難溶性であり、プロテアーゼ分解に抵抗性を示すという特徴がある。現在、PrP^C と PrP^{Sc} を識別できる抗体がないことから、PrP^{Sc} の直接検出法 (プリオン病の診断法) の開発が期待されている。したがって、正常型と異常型を識別できる分子の発見は、プリオン病の診断や治療薬の開発において重要な意味を持つ。そこで今回、プロテアーゼ抵抗性マウス PrP (mPrP^{Res}) の作製を行ない、正常用アプタマーによって、mPrP^{Res} と mPrP^C が識別されるか否かを調べた。

一方、ウイルス酵素の阻害剤である抗ウイルス薬が多数開発されているが、ウイルスゲノムは変異を起こしやすいため、標的酵素に変異を持った薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。このため、薬剤耐性と関係している変異を識別する手法は、効果的なウイルス感染症の診断・治療を行なう上で非常に重要である。我々は、エイズの原因であるヒト免疫不全ウイルス (HIV) や C 型肝炎ウイルス (HCV) をモデルとして、ウイルスプロテアーゼの基質特異性に基いた簡便な薬剤耐性変異ウイルス及びウイルス種の同時識別法を開発している。今回、この識別法を迅速かつハイスループット化することを目的に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の代わりにマイクロチップ電気泳動による解析手法について検討した。また併せて、HIV プロテアーゼ (HIV-PR) に対して我々が新規に創製した修飾塩基導入型人工 siRNA を用いて、細胞内の HIV-PR の発現阻害を調べた。

アプタマーを用いて プリオンタンパク質を構造的に識別する

特定の分子を認識するアプタマーは、核酸分子であるため、大量合成や化学修飾が可能、保存性も良いという特徴を有しており、抗体に代わるものとして期待されている。また、PrP^C と PrP^{Sc} を識別できる抗体開発も困難であることから、我々は、化学合成できるアプタマーによる PrP^C と PrP^{Sc} の識別法を開発している。まず、アプタマーを検出できる化学発光試薬 (TMPG) を開発し、mPrP^C の特異的な検出法を報告した。また、mPrP^C と塩化銅を混合し、4℃で静置することで mPrP^{Res} を作製した。今回、mPrP^C と mPrP^{Res} を PVDF 膜に吸着させ、mPrP^C 用のアプタマーと TMPG 試薬を用いて化学発光検出した結果、mPrP^C のみが検出された (図 1)。この結果は、アプタマーによって立体構造の異なる PrP を特異的に認識できることを示唆するものである。今後、PrP^{Sc} や PrP^{Res} に対するアプタマーを世界で初めて開発し、異常プリオンタンパク質の検出法を開発する予定である。

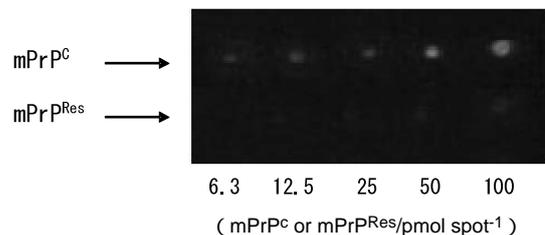


図 1 : アプタマーを用いた mPrP^C と mPrP^{Res} の識別

薬剤耐性ウイルスを迅速に識別する

我々は、複数のペプチド性基質をウイルスプロテアーゼと反応させ、分解ペプチドの HPLC クロマトグラムパターンから、変異ウイルスや複数のウイルスの存在を判定する方法を開発している。図 2 に示すように、本法では、HIV-PR の阻害物質である抗エイズ薬 (リトナビル) を酵素反応液に共存させると、複数のペプチド性基

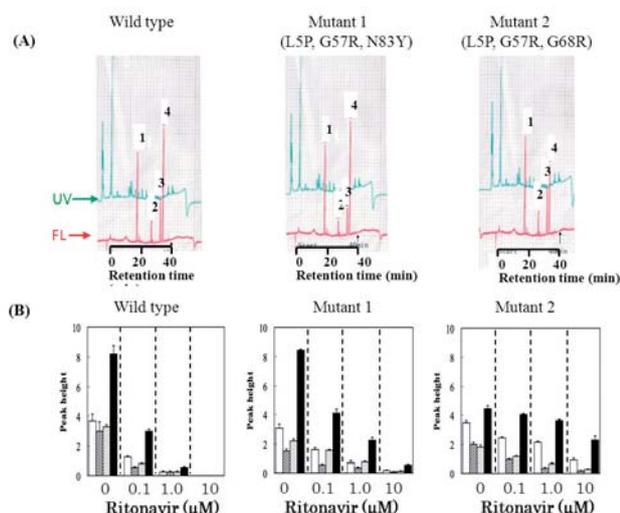


図2 : (A) HIV-1 プロテアーゼの基質特異性に基づいた薬剤耐性変異型 HIV の識別 (Peak 1 = LETS, Peak 2 = FEAM, Peak 3 = FLDG, Peak 4 = LIVQ). (B) 変異型 HIV-1 プロテアーゼに対する抗エイズ薬 (リトナビル) の阻害評価

質の分解パターンが変化することによって、薬剤耐性であるか否かを識別できる。これらの分解ペプチドの検出には、我々が開発した遊離ペプチドに特異的な蛍光誘導体化反応を用いている。今回、この反応で生じる蛍光体をマイクロチップ電気泳動によって分離した結果、HPLC による40分間の分離時間から、マイクロチップ電気泳動では、40秒以内に分離時間を短縮できることが分かった。今後、迅速かつハイスループット検査法へ発展させる予定である。

ウイルスタンパク質をコードする mRNA を分解して ウイルス増殖を阻害する

ウイルス酵素はウイルス性疾患の治療における重要なターゲットである。実際に、エイズ、C型肝炎、インフルエンザなどのウイルス疾患の治療において、これらのウイルス酵素の阻害剤が臨床で使用されている。しかし、HIV など変異の激しいウイルスでは、酵素阻害剤に対し

て耐性を示す株が直ちに出現する。

RNA 干渉は短い2本鎖 RNA (siRNA) によって特定 mRNA を分解する現象であり、特定酵素の発現をサイレンスできる siRNA は、ウイルス疾患の効果的な治療薬に成り得るものと考えられる。本研究では、修飾塩基を導入した siRNA を合成し、1)ヌクレアーゼに対する耐性、2)有毒なベクター非存在下での細胞内透過、3)ウイルス酵素をコードする mRNA の特異的分解などを同時に実現できる抗ウイルス薬を開発している。

今回、標的ウイルスとして HIV を選択し、HIV の増殖に必須の酵素である HIV-PR の mRNA をターゲットとして、3' 或いは 5' 末端に修飾塩基を導入した人工 siRNA を創製した。これらの人工 siRNA は、天然型 siRNA と比較して高いヌクレアーゼ耐性を示した。次に、HIV-PR の発現プラスミドを用いて、HeLa 細胞中での人工 siRNA による RNA 干渉を評価した。その結果、5' 修飾人工 siRNA は、HIV-PR の mRNA を分解し、天然型と同程度の RNA 干渉効果を示した (図3)。

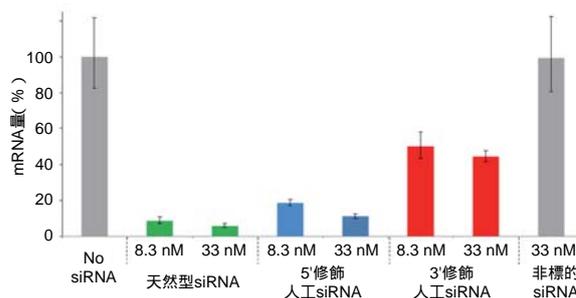


図3 : 人工 siRNA による HIV プロテアーゼをコードする mRNA のサイレンシング

RNA 核酸は、生体内で速やかに消化されるため、投薬が困難であると言われている。しかしながら、我々の人工 siRNA は生体投与できる可能性を有しており、今後、多数の修飾塩基を siRNA に導入することで細胞膜透過性を向上させ、抗ウイルス薬としての人工 siRNA の創製研究に進展させる予定である。

この研究の発表

論文 は GCOE の明記があるもの

1. Hossain MT, Shibata T, Kabashima T, Kai M: Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein on a membrane using trimethoxyphenylglyoxal; *Anal. Sci.*, 26, 645-647 (2010).
2. Krawczyk T, Kondo M, Azam MG, Zhang H, Shibata T, Kai M: Alginate acid-based macromolecular chemiluminescent probe for universal protein assay on a solid-phase membrane; *Analyt.*, 135, 2894-2900 (2010).
3. Yamasuji M, Shibata T, Kabashima T, Kai M: Chemiluminescence detection of telomere DNA in human cells on a membrane by using FITC-labeled primers; *Anal. Biochem.*, (in press).
4. Yu Z, Kabashima T, Tang C, Shibata T, Kitazato K, Kobayashi N, Lee MK, Kai M: Selective and facile assay of human immunodeficiency virus protease activity by a novel fluorogenic reaction; *Anal. Biochem.*, 397, 197-201 (2010).
5. Shibata T, Kawasaki SY, Fujita JY, Kabashima T, Kai M: A novel and specific fluorescence reaction for uracil; *Anal. Chim. Acta*, 674, 234-238 (2010).

わが国におけるワクチンギャップ:その原因と対策

医歯薬学総合研究科 創薬科学

池田正行

要約

他の先進諸国とわが国の間にあるワクチンギャップの実態を把握するために、わが国と同様に国民皆保険制度を持ち、医薬品の承認審査制度も共通している英国とわが国で、標準的な予防接種用ワクチン20品目の承認状況を比較検討したところ、わが国でも承認されていたのは3品目のみだった。未承認の17品目のうち、11品目は混合ワクチンであり、残りの6品目の内訳は、ヒトパピローマウイルス(1)、髄膜炎菌(3)、肺炎球菌(2)だった。

背景

日本の医療・公衆衛生水準は世界でもトップクラスであるにもかかわらず、こと、ワクチンに関しては、海外では定期予防接種となっている多くの品目が未承認となっており、ワクチンギャップと呼ばれている。これまで、個々の品目のワクチンギャップに関しては、多数のメディア記事と学術報告が散見されるが、系統的な検討は無い。今回、創薬研究班では、わが国と同様に国民皆保険制度を持ち、the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ガイドラインに基づいて、医薬品の承認審査制度も共通している英国とわが国の間で、標準的な予防接種用ワクチン20品目の承認状況を比較検討した。

対象と方法

英国で定期予防接種の対象となっているワクチン20品目について、インターネット上で公開されている審査報告書を対象に、日英の承認審査情報を比較検討した。日本の承認審査情報は Japan Pharmaceutical Information Center (JAPIC) 公開されている。英国の承認審査情報は、Electronic Medicines Compendium、欧州医薬品庁 European Medicines Agency (EMA) の承認審査情報は

European public assessment report のそれぞれのウェブサイトで公開されているものを用いた。

結果：わが国におけるワクチンギャップ

結果を表1に示す。英国・欧州で標準的なワクチン20品目のうち、わが国で承認されていたのは3品目に過ぎなかった。そのうちわけはインフルエンザ菌ワクチン、2価ヒトパピローマウイルスワクチン、及び7価肺炎球菌ワクチンであった。この3品目における、英国での承認からわが国での承認審査に至るまでの遅れは、それぞれ、173ヶ月、25ヶ月、104ヶ月であった。未承認の17品目のうち、11品目は混合ワクチンであり、残りの6品目の内訳は、ヒトパピローマウイルス(1)、髄膜炎菌(3)、肺炎球菌(2)だった。(カッコ内は品目数)

考察

今回の検討では、英国に比して、わが国におけるワクチン承認が甚だしく遅れていることが明らかになった。その原因としては、生物学的因子と社会的因子の両方の要素が考えられる。ワクチンギャップを解決するためには、1) ワクチンの承認申請システムの改善、2) 予防接種法改正を含めた行政改革と財源の確保、3) 一般市民やジャーナリストのリテラシーの向上が必要である。

Table 1 Approval data on 15 standard vaccines in Japan and the UK^a

Generic Name	Proprietary Name	Date of First Approval Application		Date of Approval	Submission Delay ^{b,c}	Approval Delay ^{b,d}	Review Time ^{b,e}
		Japan	UK/EMA				
Diphtheria, tetanus and poliomyelitis	Revaxis TM	NA	NA	UA	Jun-03		
Diphtheria, tetanus, pertussis and poliomyelitis	Repevax TM	NA	NA	UA	Nov-01		
Diphtheria, tetanus, pertussis and poliomyelitis	Infanrix-IPV TM	NA	NA	UA	Aug-06		
Diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis and Haemophilus influenzae type b	Infanrix-IPV+Hib TM	NA	NA	UA	Jan-05		
Diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis and Haemophilus influenzae type b	Pediacel TM	NA	NA	UA	Oct-02		
Haemophilus influenzae type b	ActHIB TM	Mar-03	NA	Jan-07	Aug-92	173	46
Haemophilus influenzae type b and Meningococcal group C conjugate	Menitorix TM	NA	NA	UA	Dec-05		
Hepatitis A and Hepatitis B	Ambirix TM	NA	Jun-01	UA	Aug-02		15
Hepatitis A and Hepatitis B	Twinrix Adult TM	NA	Aug-95	UA	Sep-96		14
Hepatitis A and Hepatitis B	Twinrix Paediatric TM	NA	Apr-96	UA	Feb-97		10
Human papillomavirus bivalent	Cervarix TM	Sep-07	Mar-06	Oct-09	Sep-07	19	25
Human papillomavirus quadrivalent	Gardasil TM	NA	Dec-05	UA	Sep-06		9
Measles, mumps and rubella (live)	MMRVaxpro TM	NA	Jun-04	UA	May-06		23
Measles, mumps and rubella (live)	Priorix TM	NA	NA	UA	Dec-97		
Meningococcal group C conjugate	Meningitec TM	NA	NA	UA	Sep-07		
Meningococcal group C conjugate	Menjugate TM	NA	NA	UA	Mar-10		
Meningococcal group A, C, W135 and Y conjugate	Menveo TM	NA	Oct-08	UA	Mar-10		16
Pneumococcal 7-valent conjugate	Prevenar TM	Sep-07	Oct-99	Oct-09	Feb-01	95	25
Pneumococcal 10-valent conjugate	Synflorix TM	NA	Dec-07	UA	Mar-09		14
Pneumococcal 13-valent conjugate	Prevenar13 TM	NA	Dec-08	UA	Dec-09		12

NA: not available. UA: unapproved.
a as of March 2011

b represented as months

c Submission delay was defined as the difference between the date of approval in Japan and that in the UK/EMA.

d Approval delay was defined as the difference between the date of approval in Japan and that of first authorisation in the UK/EMA.

e Review time was defined as the time between the date of application for approval and the actual date of approval.

マラリアを標的としたナノワクチンの開発

長崎大学病院 薬剤部 熱帯医学研究所 免疫遺伝学
佐々木均 平山謙二

背景

マラリアは熱帯・亜熱帯地域に広く分布する感染症で、ハマダラカによって媒介されるマラリア原虫の感染によって引き起こされる。4種類のヒトマラリアのうち、熱帯熱マラリアと三日熱マラリアがその大半を占めており、いずれも発熱や貧血などの症状を呈するものの、特に熱帯熱マラリアは重篤な合併症を伴うと死に至る事が知られている。第二次世界大戦後の DDT などの殺虫剤を用いた媒介蚊対策や特效薬クロロキンの出現によってマラリアによる死亡者数は減少したものの、その後クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫や殺虫剤抵抗性の蚊が出現した。このため現在でも、年間約5億人が罹患し、熱帯熱マラリアによる死亡者は年間150万人以上にも及ぶと推定され、WHOの“三大感染症”のひとつとなっている。

近年、新しいマラリア対策の切り札としてワクチンが注目されている。これまでに、マラリア表面抗原に対するワクチンが開発され、第II相臨床試験の結果、約5割程度の効果が得られている。しかし、この効果は感染抑制には十分ではなく、さらに効果的なワクチンの開発が望まれている。

マラリアの感染を100%抑制するDNA内包型ナノワクチンを開発した

我々はこれまでに、様々な電荷を持った化合物を静電的に自己組織化することで、安全性が高く、様々な臓器への指向性を有した画期的な構造体の構築に成功している。特に、DNAを脾臓の辺縁体に存在する樹状細胞へ選択的に送達し、発現させる事が可能な新規構造体を開発し、マラリア DNA ワクチンへ応用した結果、免疫誘導効果を得ることに成功した。

そこで本年度は、平山教授との共同研究で、DNA ワ

クチンの構造や投与量、投与間隔などを最適化することで、マラリアの DNA ワクチンの効果を大きく向上した改良型のナノワクチンを開発し、その有用性について検討した。

まず、マラリアの DNA ワクチン pVR - MSP 1c を構築し、この DNA ワクチンにポリエチレンイミンと γ ポリグルタミン酸を自己組織化することによって、マラリアナノワクチンを作成した。

動物実験の結果、マラリア DNA ワクチンのみをマウスへ投与しても、抗体価の誘導はほとんど認められなかった。一方で、ナノワクチンを投与した結果、非常に高い抗体価の誘導効果が認められた。さらに、免疫したマウスへマラリア原虫を感染させたマウスで、未処理のマウスやマラリア DNA ワクチンだけを投与したマウスは、ほとんどのマウスが死亡したものの、ナノワクチンを投与したマウスはすべて生存し、高い感染抑制効果が認められた。

加えて、このナノワクチンは静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与において強い免疫誘導効果を示すことを確認しており、特に静脈内投与と腹腔内投与の効果が高いことを見いだした。

生体分解型材料を用いた遺伝子ベクターの開発

ポリエチレンイミンは生体内での分解が難しいことから、ポリエチレンイミンの代わりに生体分解性のカチオン性高分子であるポリリジンやポリアルギニンなどのポリペプチドを用いた新規遺伝子ベクターの検討を行った。ポリリジンやポリアルギニンと pDNA との複合体を γ ポリグルタミン酸を用いて自己組織化した結果、細胞障害性や赤血球凝集を示すことなく、高い遺伝子導入効果を示すアニオン性の遺伝子ベクターの構築に成功した。この生体分解性の遺伝子ベクターをマウスへ静脈内投与した結果、ポリエチレンイミンの場合と同様に、脾臓へ

選択的に遺伝子を導入することを見いだした。

また、 γ ポリグルタミン酸だけでなく、新たな被膜成分として、コンドロイチン硫酸を見いだした。コンドロイチン硫酸をポリリジンやポリアルギニンなどの生分解性の高分子と組み合わせることで、高い安全性と効果を兼ね備えた画期的な遺伝子ベクターの構築に成功している。

免疫誘導効果を劇的に向上した、 抗原タンパク質内包型ナノワクチンの開発

DNA ワクチンの成功を元に、抗原タンパク質を用いたナノワクチンの開発に着手した。抗原タンパク質のモデルである卵白アルブミン (OVA) にカチオン性化合物を添加し、さらに γ ポリグルタミン酸を用いて静電的に自己組織化することによって、アニオン性のナノワ

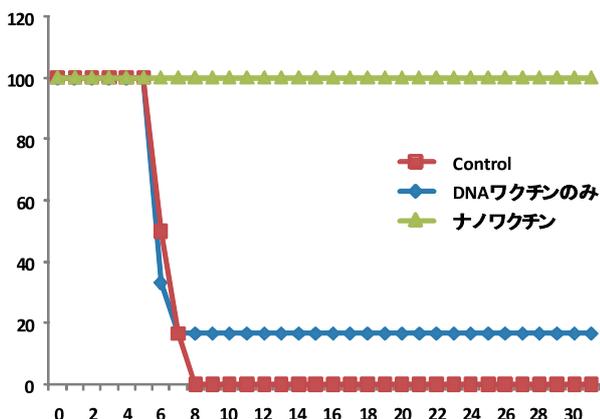


図1 : DNA 内包ナノワクチンのマラリア感染抑制効果

クチンを開発した。

このナノワクチンは樹状細胞株に高効率で取り込まれ、マウスに皮内投与した結果、OVA のみを投与した場合と比較して、抗体価を劇的に向上することを見いだした。さらに、このナノワクチンを投与したマウスへ、OVA 発現癌細胞株を移植した結果、腫瘍の増殖を完全に抑制することに成功している。

今後はマラリアの抗原タンパク質を用いて、免疫誘導効果の向上に関する検討を行う予定である。

図の説明

図1 : DNA 内包ナノワクチンのマラリア感染抑制効果
マラリア DNA ワクチン、またはナノワクチンを用いて免疫したマウスへマラリア原虫を感染させ、感染後の生存率を観察した。DNA ワクチンのみではほとんど効果が得られなかったが、ナノワクチンを投与したマウスは全例が生存しており、高い感染抑制効果が得られた。

図2 : OVA 内包ナノワクチンの抗体価誘導効果
マウスへ OVA のみまたはナノワクチンの構成成分(vector)のみ、ナノワクチンを投与し、投与後の OVA に対する抗体価を測定した。この結果、OVA だけを投与した場合に抗体価の上昇が一部認められたものの、ナノワクチンを投与することで、抗体価が劇的に向上した。

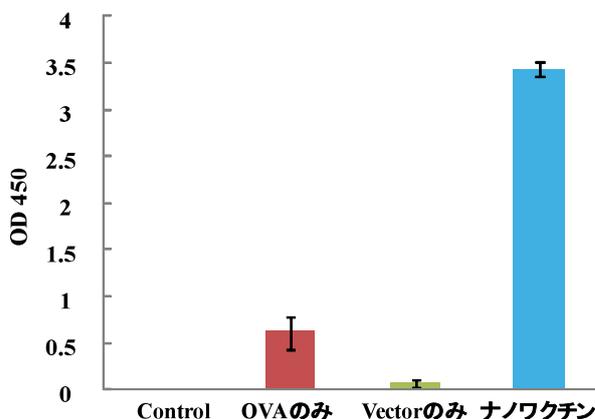


図2 : OVA 内包ナノワクチンの抗体価誘導効果

この研究の発表

論文 は GCOE 表記のあるもの

- 1) Kurosaki T, Kitahara T, Kawakami S, Higuchi Y, Yamaguchi A, Nakagawa H, Kodama Y, Hamamoto T, Hashida M, Sasaki H, gamma-Polyglutamic acid-coated vectors for effective and safe gene therapy, J Control Release, 2010, 142(404-10)
- 2) Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Yamamoto K, Nakagawa H, Kodama Y, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H, Chondroitin sulfate capsule system for efficient and secure gene delivery. J Pharm Pharm Sci, 2010; 13,(351-61)

特許

- 1) 佐々木均、黒崎友亮、北原隆志、藤 秀人、由井克之、平山謙二、森田公一、「薬物送達複合体」、特願2010 - 43186 .

CD4非依存性 HIV 1 の細胞内侵入はエンドソームを經由し、エンドソーム蛋白質分解酵素カテプシン B によって抑制される

熱帯医学研究所 エイズ・感染防御（防疫）

山本直樹 久保嘉直

要約

HIV 1 感染によって引き起こされるエイズは、熱帯地域で流行する疾患の中で、重要な感染症の 1 つである。HIV 1 の細胞内侵入は、相反する結果が報告され、未だ明らかでない。本研究では、エンドソーム蛋白質分解酵素であるカテプシン B が CD4 非依存性 HIV 1 感染を阻害し、cystatin-C がカテプシン B 活性を抑制することにより CD4 非依存性 HIV 1 感染を促進することを明らかにした。加えて、CD4 非依存性 HIV 1 はエンドソームを介して細胞内に侵入するが、CD4 依存性 HIV 1 感染はエンドソームを經由せずに細胞内に侵入することが示唆された。

背景

HIV 1 感染によって引き起こされるエイズは、熱帯地域で流行する疾患の中で、重要な感染症の 1 つである。エイズ治療薬は開発されたが、耐性ウイルスの出現が大きな問題となっており、HIV 1 複製機構の詳細な解明による新規治療薬の開発が望まれている。HIV 1 を含むエンベロープ膜を持つウイルスの細胞内侵入は、エンドソームに取り込まれた後、エンドソーム膜とウイルスエンベロープ膜の膜融合によって起こる場合と、細胞表面膜とウイルスエンベロープ膜の直接的な膜融合により起こる場合が知られている。しかし、HIV 1 の細胞内侵入は、相反する結果が多数報告されており、未だ明らかになっていない。

ほとんどの HIV 1 分離株は、感染受容体として CD4 およびケモカインリセプター（CXCR 4 もしくは CCR 5）を認識し感染する。しかし、CD4 を必要とせずケモカインリセプターのみを認識し感染する CD4 非依存性 HIV 1 がエイズ患者から高頻度に単離される。この

ような CD4 非依存性 HIV 1 は、CD4 を発現していない脳、肝臓、腎臓などの細胞に感染し、エイズ患者においてしばしば併発する脳炎、肝炎、腎炎などの疾患に関連していると考えられている。このように CD4 非依存性 HIV 1 は重要な研究対象であるがほとんど研究されていない。我々は、CD4 非依存性 HIV 1 と CD4 依存性 HIV 1 の感染機構を比較することによって、CD4 依存性 HIV 1 のみを用いた研究では得られなかった感染機構を明らかにすることを目標として、以下の実験を行った。

cystatin-C は CD4 非依存性 HIV 1 感染を促進する

様々な細胞の CD4 非依存性 HIV 1 感染感受性を観察した結果、HeLa 細胞が CD4 非依存性 HIV 1 感染に対し耐性であることがわかった。しかし、CD4 を発現する HeLa 細胞の CD4 依存性 HIV 1 感染感受性は高かったため、HeLa 細胞は CD4 非依存性 HIV 1 感染特異的に耐性である。感染感受性の高かった 293T 細胞と HeLa 細胞のハイブリドームを作成した。このハイブリドーム細胞の CD4 非依存性 HIV 1 感染感受性は高かったため、HeLa 細胞は CD4 非依存性 HIV 1 感染に必須な細胞因子を欠損しているために感染耐性となっている。HeLa 細胞が欠損している CD4 非依存性 HIV 1 感染に必須な細胞因子を単離するため、cDNA 発現ライブラリーを HeLa 細胞に導入し、プラスチジン耐性遺伝子を持つ CD4 非依存性 HIV 1 ベクターを接種しプラスチジン選択した。6 個のプラスチジン耐性細胞クローンが得られ、その内 1 つの細胞クローンが、元々の HeLa 細胞の CD4 非依存性 HIV 1 感染感受性よりも約 5 倍高かった。この細胞クローンから、導入した cDNA 配列を PCR により単離したところ、cystatin-C であることがわかった。

cystatin-C 発現プラスミドを導入した HeLa 細胞の CD4 非依存性 HIV 1 感染感受性は、約 3 倍増加した。しかし、CD4 依存性 HIV 1 感染は影響を受けなかった。これらの結果は、cystatin-C が CD4 非依存性 HIV 1 感染を促進することを示している。

カテプシン B は CD4 非依存性 HIV 1 感染を抑制する

cystatin-C はカテプシン B 蛋白質分解酵素の阻害因子として働くことが既に知られている。様々な細胞のカテプシン B 活性と CD4 非依存性 HIV 1 感染感受性を観察した結果、カテプシン B 活性と感染感受性は逆相関関係にあることが明らかとなった。カテプシン B 活性が低かった 293T 細胞にカテプシン B を強制発現させると、CD4 非依存性 HIV 1 感染感受性が低下したが、CD4 依存性 HIV 1 感染には影響しなかった。標的細胞のカテプシン B 阻害剤 CA 074Me 処理は、CD4 非依存性 HIV 1 感染を 5-8 倍促進したが、CD4 依存性 HIV 1 感染には影響しなかった。これらの結果は、カテプシン B が CD4 非依存性 HIV 1 感染を抑制していることを示している。

CD4 非依存性 HIV 1 感染はエンドソームを経由する

活性型カテプシン B は後期エンドソームに存在する

ので、CD4 非依存性 HIV 1 感染はエンドソームを介して細胞内に侵入すると考えられる。この仮説を証明するため、エンドソーム酸性化阻害剤 bafilomycin A 1 (BFA 1) とエンドサイトーシス阻害剤 dynasore の影響を観察した。予期した通り、BFA 1 と dynasore は CD4 非依存性 HIV 1 感染を抑制したが、CD4 依存性 HIV 1 感染には影響しなかった。また、エンドサイトーシスに必須な細胞因子 EPS15 のドミナント・ネガティブ変異体 (EPS15 DN) は、エンドサイトーシスを抑制することが知られている。EPS15 DN は CD4 非依存性 HIV 1 感染を抑制したが、CD4 依存性 HIV 1 感染には影響しなかった。これらの結果は、CD4 非依存性 HIV 1 感染はエンドソームを経由し細胞内に侵入するが、CD4 依存性 HIV 1 感染はエンドソームを経由しないことを示している。本研究により、今まではっきりとしていなかった HIV 1 の細胞内侵入経路が明らかとなった (PLoS One, revised)。

この研究は、シンガポール国立大学医学部教授兼長崎大学熱帯医学研究所客員教授・山本直樹博士、国立感染症研究所室長兼長崎大学熱帯医学研究所客員准教授・佐藤裕徳博士、長崎大学医学部教授・松山俊文博士、琉球大学医学部教授・田中勇悦博士、大阪大学微生物学研究所特任教授・大石和徳博士、徳島文理大学健康科学研究所教授・勝沼信彦博士および大学院生・吉居廣朗と神山陽香との共同研究である。

2010年

- 1 Yasui F, Kai C, Saito K, Inoue S, Yoneda M, Morita K, Mizuno K, Kohara M. Analysis of the mechanism by which BALB/c mice having prior immunization with nucleocapsid protein of SARS-CoV develop severe pneumonia after SARS-CoV infection. *Procedia in Vaccinology*. 2: 42-8. 2010 Jan 1. (森田公一)
- 2 Kheyami AM, Nakagomi T, Nakagomi O, Getty B, Hart CA, Cunliffe NA. Detection of coronaviruses in children with acute gastroenteritis in Maddina, Saudi Arabia. *Ann Trop Paediatr*. 30: 45-50. 2010. (IF 0.966)(中込治)
- 3 Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith W, Kitchin N, Nakagomi O, Nakagomi T, Hart CA, Regan M. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 16(1): 55-62. 2010 Jan. (IF 6.859)(中込治)
- 4 Yoshida LM, Suzuki M, Yamamoto T, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, Oishi K, Vu TD, Le TH, Le MQ, Yanai H, Kilgore PE, Dang DA, Ariyoshi K. Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J*. 29(1): 75-7. 2010 Jan. (IF 3.064)(有吉紅也)
- 5 Kubo T, Agoh M, Mai le Q, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, Hirano M, Yoshikawa A, Hasebe F, Kohno S, Morita K. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic(H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol*. 48(3): 728-35. 2010 Jan 13(Epub 2010 Mar). (IF 4.220)(森田公一)
- 6 Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Skn7p is required for oxidative stress response and virulence in *Candida glabrata*. *Mycopathologia*. 169(2): 81-90. 2010 Feb. (IF 1.810)(河野 茂)
- 7 Seki M, Kohno S, Newstead M, Zeng X, Bhan U, Lukacs N, Kunkel S, Standiford T. Critical role of IRAK-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. *J Immunol*. 184(3): 1410-8. 2010 Feb 1. (IF 5.754)(河野 茂)
- 8 Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, Montenegro FM, Germano EM, Correia NB, Cuevas LE, Parashar UD, Cunliffe NA, Nakagomi T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis*. 201: 363-9. 2010 Feb 1. (IF 6.288)(中込治)
- 9 Shimakawa Y, Camélique O, Ariyoshi K. Outbreak of chickenpox in a refugee camp of northern Thailand. *Confl Health*. 4: 04. 2010 Feb 22. (有吉紅也)
- 10 Inoue S, Alonzo M, Kurosawa Y, Reyes J, Dimaano E, Alera M, Saito M, Oishi K, Hasebe F, Matias R, Natividad F, Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Vector-Borne and Zoonoti*. 10(2): 143-150. 2010 Mar. (IF 2.733)(森田公一)
- 11 Zhou G, Githeko AK, Minakawa N, Yan G. Community-wide benefits of targeted indoor residual spray for malaria control in the western Kenya highland. *Malaria J*. 67. 2010 Mar 3. (IF 3.489)(皆川 昇)
- 12 Okara RM, Sinka ME, Minakawa N, Mbogo CM, Hay SI, Snow RW. Distribution of the main malaria vectors in Kenya. *Malaria J*. 69. 2010 Mar 4. (IF 3.489)(皆川 昇)
- 13 Ahmed K, Ahmed S, Mitui MT, Rahman A, Kabir L, Hannan A, Nishizono A, Nakagomi O. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. *Virus Genes*. 40(3): 347-56. 2010 Jun (Epub 2010 Mar 10). (IF 1.693)(中込治)
- 14 Sharma S, Nakagomi T, Nakagomi O, Paul VK, Bhan MK, Ray P. Convalescent phase sera from children infected with G12 rotavirus cross neutralizes rotavirus strains belonging to the Wa genogroup. *J Gen Virol*. 91: 1794-9. 2010 Jul (Epub 2010 Mar 17). (IF 3.568)(中込治)
- 15 Kim J, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem*. 285(19): 14083-7. 2010 May 7 (Epub 2010 Mar 19). (IF 5.328)(西田教行)
- 16 Okamoto K, Endo Y, Inoue S, Nabeshima T, Nga PT, Guillermo PH, Yu F, Loan do P, Trang BM, Natividad FF, Hasebe F, Morita K. Development of a rapid and comprehensive proteomics-based arboviruses detection system. *J Virol Methods*. 167(1): 31-6. 2010 Jul (Epub 2010 Mar 19). (IF 2.139)(森田公一)

- 17 Takizawa N, Kumakura M, Takeuchi K, Kobayashi N, Nagata K. Sorting of influenza A virus genome segments after nuclear transport. *Virology*. 401(2): 248-56. 2010 Jun 5 (Epub 2010 Mar 21). (IF 3.305)(小林信之)
- 18 Zhang Z, Yamamoto T, Wu X, Moji K, Cai X, Kuroiwa C. Educational intervention for preventing blood-borne infection among medical students in China. *J Hosp Infect*. 75(1): 47-51. 2010 May (Epub 2010 Mar 25). (IF 3.078)(山本太郎)
- 19 Kondo Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, Nakayama K. Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 78(6): 2846-56. 2010 Jun (Epub 2010 Mar 29). (IF 4.098)(中山浩次)
- 20 Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, Himeno K. Involvement of CD8(+) T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur J Immunol*. 1: 1-1. 2010 Apr. (IF 4.942)(濱野真二郎)
- 21 Buss SN, Hamano S, Vidrich A, Evans C, Zhang Y, Crasta OR, Sobral BW, Gilchrist CA, Petri WA Jr. Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. *Int J Parasitol*. 40(7): 833-43. 2010 Apr. (IF 3.822)(濱野真二郎)
- 22 Matthijnsens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis*. 16(4): 625-30. 2010 Apr. (IF 6.859)(中込 治)
- 23 Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(4): 1639-43. 2010 Apr. (IF 4.672)(河野 茂)
- 24 Saeng-Aroon S, Tsuchiya N, Auwanit W, Ayuthaya PI, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Rojanawiwat A, Kan-nagi M, Ariyoshi K, Sugiura W. Drug-resistant mutation patterns in CRF01_AE cases that failed d4T+3TC+ nevirapine fixed-dosed, combination treatment: Follow-up study from the Lampang cohort. *Antiviral Res*. 87(1): 22-9. 2010 Jul (Epub 2010 Apr 9). (IF 4.439)(有吉紅也)
- 25 Kohama H, Harakuni T, Kikuchi M, Nara T, Takemura Y, Miyata T, Sato Y, Hirayama K, Arakawa T. Intranasal administration of *Schistosoma japonicum* paramyosin induced robust long-lasting systemic and local antibody as well as delayed-type hypersensitivity responses, but it failed to confer protection in a mouse infection model. *Jpn J Infect Dis*. 63(3): 166-72. 2010 May. (IF 1.367)(平山謙二)
- 26 Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of the Slf2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 10(3): 343-52. 2010 May. (IF 2.279)(河野 茂)
- 27 Nabeshima T, Morita K. Phylogeographic analysis of the migration of Japanese encephalitis virus in Asia. *Future Virology*. 5(3): 343-51. 2010 May. (IF 0.713)(森田公一)
- 28 Haque U, Magalhaes RJS, Reid HL, Glass GE, Clements ACA, Ahmed AM, Islam A, Yamamoto T, Haque R. Spatial prediction of malaria prevalence in an endemic area of Bangladesh. *Malaria J*. 9: 120. 2010 May 9. (IF 3.489)(山本太郎)
- 29 del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(5): e687. 2010 May 18. (IF 4.752)(平山謙二)
- 30 Tokunaga T, Naruke Y, Shigematsu S, Kohno T, Yasui K, Ma Y, Chua KJ, Katayama I, Nakamura T, Hishikawa Y, Koji T, Yatabe Y, Nagayasu T, Fujita T, Matsuyama T, Hayashi H. Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 397(2): 202 - 7. 2010 Jun 25 (Epub 2010 May 23). (IF 2.595)(松山俊文)
- 31 Matsui Y, Satoh K, Mutsukura K, Watanabe T, Nishida N, Matsuda H, Sugino M, Shirabe S, Eguchi K, Kataoka Y. Development of an ultra-rapid diagnostic method based on heart-type fatty acid binding protein levels in the CSF of CJD Patients. *Cell Mol Neurobiol*. 30(7): 991-9. 2010 May 25. (IF 2.423)(西田教行)
- 32 Shoji M, Shibata Y, Shiroza T, Yukitake H, Peng B, Chen Y-Y, Sato K, Naito M, Abiko Y, Reynolds EC, Nakayama K. Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol*. 10: 152. (Epub 2010 May 25). (IF 2.960)(中山浩次)
- 33 Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, Kaneko O, Uemura H, Kanbara H, Yanagi T, Hirayama K. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides.

- Parasitol Res. 107(3): 727-30. 2010 Aug (Epub 2010 May 25). (IF 1.812)(金子 修)
- 34 Sawatsubashi S, Murata T, Lim J, Fujiki R, Ito S, Suzuki E, Tanabe M, Zhao Y, Kimura S, Fujiyama S, Ueda T, Umetsu D, Ito T, Takeyama K, Kato S. Core histone H2A ubiquitylation and transcriptional regulation. *Exp Cell Res*. 316(17): 2707-12. 2010 Oct 15 (Epub 2010 May 31). (IF 3.609)(伊藤 敬)
- 35 Hossain MT, Shibata T, Kabashima T, Kai M. Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein on a membrane using trimethoxyphenylglyoxal. *Anal Sci*. 26(6), 645-7. 2010 Jun. (IF 1.465)(甲斐雅亮)
- 36 García G, Sierra B, Pérez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, Izquierdo A, Pupo M, Danay Díaz DR, Sánchez L, Marcheco B, Hirayama K, Guzmán MG. Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg*. 82(6): 1153-6. 2010 Jun. (IF 2.446)(平山謙二)
- 37 Tsuzuki A, Thiem VD, Suzuki M, Yanai H, Matsubayashi T, Yoshida LM, Tho le H, Minh TT, Anh DD, Kilgore PE, Takagi M, Ariyoshi K. Can daytime use of bed nets not treated with insecticide reduce the risk of dengue hemorrhagic fever among children in Vietnam?. *Am J Trop Med Hyg*. 82(6): 1157-9. 2010 Jun. (IF 2.446)(有吉紅也)
- 38 Haque U, Hashizume M, Sunahara T, Hossain S, Ahmed SM, Haque R, Yamamoto T, Glass GE. Progress and challenges to control malaria in a remote area of Chittagong hill tracts, Bangladesh. *Malaria J*. 9: 156. 2010 Jun 10. (IF 3.489)(山本太郎)
- 39 Satoh K, Nakaoka R, Nishiura Y, Tsujino A, Motomura M, Yoshimura T, Sasaki K, Shigematsu K, Shirabe S, Eguchi K. Early detection of sporadic CJD by diffusion-weighted MRI before the onset of symptoms. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 82(8): 942-3. 2011 Aug (Epub 2010 Jun 11). (IF 4.791)(西田教行)
- 40 Iwashita H, Dida G, Futami K, Sonye G, Kaneko S, Horio M, Kawada H, Maekawa Y, Aoki Y, Minakawa N. Sleeping arrangement and house structure affect bed net use in villages along Lake Victoria. *Malaria J*. 176. 2010 Jun 22. (IF 3.489)(皆川 昇)
- 41 Suzuki M, Thiem VD, Yoshida LM, Anh DD, Kilgore PE, Ariyoshi K. Who is exposed to smoke at home? A population-based cross-sectional survey in central Vietnam. *Tob Control*. 19(4): 344-5. 2010 Aug (Epub 2010 Jun 27). (IF 3.077)(有吉紅也)
- 42 Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J of Immunol*. 185(2): 1150-7. 2010 Jun 30. (IF 5.745)(濱野真二郎)
- 43 Gesprasert G, Wichukchinda N, Mori M, Shiino T, Auwanit W, Sriwanthana B, Pathipvanich P, Sawanpanyalert P, Miura T, Auewarakul P, Thitithanyanont A, Ariyoshi K. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load. *PLoS One*. 5(6): e11179. 2010 Jun 17. (IF 4.411)(有吉紅也)
- 44 Inagaki M, Nagai S, Yabe T, Nagaoka S, Minamoto N, Takahashi T, Matsuda T, Nakagomi O, Nakagomi T, Ebina T, Kanamaru Y. The bovine lactophorin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis. *Biosci Biotech Bioch*. 74(7): 1386-90. 2010 (Epub 2010 Jul 7). (IF 1.292)(中込 治)
- 45 Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation and increased biofilm formation. *Infect Immun*. 78(9): 3801-12. 2010 Sep (Epub 2010 Jul 12). (IF 4.098)(中山浩次)
- 46 Wichukchinda N, Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*. 24(11): 1625-31. 2010 Jul 17. (IF 6.348)(有吉紅也)
- 47 Xin L, Cao Z, Lau C, Kai M, Lu J. G-rich sequence-functionalized polystyrene microsphere-based instantaneous derivatization for the chemiluminescent amplified detection of DNA. *Luminescence*. 25(4): 336-42. 2010 Jul-Aug. (IF 1.395)(甲斐雅亮)
- 48 Suzuki M, Ariyoshi K. *Leptospira* serovar as prognostic factor (letter). *Emerg Infect Dis*. 16(8): 1333. 2010 Aug. (IF 6.859)(有吉紅也)
- 49 Sato T, Nakagomi T, Naghipour M, Nakagomi O. Modeling seasonal variation in rotavirus hospitalizations for use in evaluating the effect of rotavirus vaccine. *J Med Virol*. 82: 1468-74. 2010 Aug. (IF 2.895)(中込 治)
- 50 Shibata T, Kawasaki SY, Fujita JY, Kabashima T, Kai M. A novel and specific fluorescence reaction for uracil. *Analytica Chimica Acta*. 674(2): 234-8. 2010 Aug 3. (IF 4.310)(甲斐雅亮)

- 51 Satoh K, Tobiume M, Matsui Y, Mutsukura K, Nishida N, Shiga Y, Eguhchi K, Shirabe S, Sata T. Establishment of a standard 14-3-3 protein assay of cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest.* 90(11): 1637-44. 2010 Nov (Epub 2010 Aug 9). (IF 4.405)(西田教行)
- 52 Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K, and Sekimizu K. *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol. Chem.* 285(43): 33338-47. 2010 Oct 22 (Epub 2010 Aug 11). (IF 5.328)(中山浩次)
- 53 Shuaibu MN, Kikuchi M, Cherif MS, Helegbe GK, Yanagi T, Hirayama K. Selection and identification of malaria vaccine target molecule using bioinformatics and DNA vaccination. *Vaccine.* 28(42): 6868-75. 2010 Oct (Epub 2010 Aug 13). (IF 3.572)(平山謙二)
- 54 Satoh T, Takeuchi O, Vnadenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. The JMJD3-IRF4 axis regulates M2 macrophage polarization and host response against helminth infection. *Nat Immunol.* 11(10): 936-44. 2010 Oct (Epub 2010 Aug 22). (IF 25.668)(由井克之・松山俊文)
- 55 Ohba S, Kawada H, Dida GO, Juma D, Sonye G, Minakawa N, Takagi M. Predators of *Anopheles gambiae* sensu lato (Diptera: Culicidae) larvae in wetlands, western Kenya: confirmation by polymerase chain reaction method. *J Med Entomol.* 47(5): 783-7. 2010 Sep. (IF 1.925)(皆川 昇)
- 56 Adiku TK, Dove W, Grosjean P, Combe P, Nakagomi T, Nakagomi O, Hart CA, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Madagascar during 2004-2005. *J Infect Dis.* 202 Suppl: S 175-9. 2010 Sep 1. (IF 6.288)(中込 治)
- 57 Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Yamamoto K, Nakagawa H, Kodama Y, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H. Chondroitin sulfate capsule system for efficient and secure gene delivery. *J Pharm Pharm Sci.* 13(3): 351-61. 2010 Sep 3. (IF 1.914)(佐々木均)
- 58 Kuesap J, Hirayama K, Kikuchi M, Ruangweerayut R, Na-Bangchang K. Study on association between genetic polymorphisms of haem oxygenase-1, tumour necrosis factor, cadmium exposure and malaria pathogenicity and severity. *Malar J.* 9: 260. 2010 Sep 17. (IF 3.489)(平山謙二)
- 59 Kato D, Era S, Watanabe I, Arihara M, Sugiura N, Kimata K, Suzuki Y, Morita K, Hidari KI, Suzuki T. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Res.* 88(2): 236-43. 2010 Nov (Epub 2010 Sep 21). (IF 3.489)(森田公一)
- 60 Eguchi K, Ohsawa K, Fuse M(Kiyono), Suzuki J, Kurokawa K, Yamamoto T. Epidemiological Evidence that Simian T-lymphotropic Virus Type 1 in *Macaca fuscata* has an alternative transmission route to maternal infection. *AIDS Res Human Retroviruses.* 27(2): 113-4. 2011 Feb (Epub 2010 Sep 21). (IF 2.082)(山本太郎)
- 61 Miyazawa K, Kanaya T, Takakura I, Tanaka S, Hondo T, Watanabe H, Rose MT, Kitazawa H, Yamaguchi T, Katamine S, Nishida N, Aso H. Transcytosis of murine-adapted bovine spongiform encephalopathy agents in an in vitro bovine M cell model. *J Virol.* 84(23): 12285-91. 2010 Dec (Epub 2010 Sep 22). (IF 5.189)(西田教行)
- 62 Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis* cell-induced hemagglutination and platelet aggregation. *Periodontol 2000.* 54(1):45-52. 2010 Oct. (IF 2.082)(中山浩次)
- 63 Ito R, Ishihara K, Shoji M, Nakayama K, Okuda K. Hemmagglutinin/adhesion domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 60(3): 251-60. 2010 Dec (Epub 2010 Oct 6). (IF 2.494)(中山浩次)
- 64 Posadas-Herrera G, Inoue S, Fuke I, Muraki Y, Mapua CA, Khan AH, Parquet Mdel C, Manabe S, Tanishita O, Ishikawa T, Natividad FF, Okuno Y, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a formalin-inactivated West Nile Virus vaccine (WN-VAX) for a human vaccine candidate. *Vaccine.* 28(50): 7939-46. 2010 Nov 23(Epub 2010 Oct 8). (IF 3.572)(森田公一)
- 65 Ndjinga JK, Minakawa N. The importance of education to increase the use of bed nets in villages outside of Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Malaria J.* 279. 2010 Oct 12. (IF 3 489)(皆川 昇)
- 66 Helegbe GK, Yanagi T, Senba M, Huy NT, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K. Histopathological studies in two strains of semi-immune mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA after chronic exposure. *Parasitol Res.* 108(4): 807-14. 2011 Apr (Epub 2010 Oct 27). (IF 1.812)(平山謙二)
- 67 Hashizume M, Faruque ASG, Terao T, Yunus M, Streatfield K, Yamamoto T, Moji K. The Indian Ocean Dipole and cholera incidence in Bangladesh: A time series analysis. *Environ Health Perspect.* 119(2): 239-44.2011 Feb (Epub 2010 Oct 27). (IF 6.087)(山本太郎)
- 68 Lancaster OM, Breuer M, Cullen CF, Ito T, Ohkura H. The meiotic recombination checkpoint suppresses NHK-1 kinase to prevent reorganisation of the oocyte nucleus in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 6(10): e1001179.

- 2010 Oct 28. (IF 9.543)(伊藤 敬)
- 69 Krawczyk T, Kondo M, Azam MG, Zhang H, Shibata T, Kai M. Alginate acid-based macromolecular chemiluminescent probe for universal protein assay on a solid-phase membrane. *Analyst*. 135(11): 2894-900. 2010 Nov. (IF 3.913)(甲斐雅亮)
- 70 Baclig MO, Gervacio LT, Suarez LA, Buerano CC, Matias RR, Kumatori A, Inoue S, Morita K, Natividad FF, Hasebe F. Flow cytometric analysis of dengue virus-infected cells in peripheral blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 41(6): 1352-8. 2010 Nov. (森田公一)
- 71 Shoji M, Yoshimura A, Yoshioka H, Takade A, Takuma Y, Yukitake H, Naito M, Hara Y, Yoshida S, Nakayama K. Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preproprotein expressed in *Escherichia coli* is lipidated and a mature or processed recombinant FimA protein forms a short filament in vitro. *Can J Microbiol*. 56(11): 959-67. 2010 Nov. (IF 1.235)(中山浩次)
- 72 Kimura D, Miyakoda M, Honma K, Yuda M, Chinzei Y, Yui K. Production of IFN-g by CD4+ T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *Int Immunol*. 22(12): 941-52. 2010 Dec (Epub 2010 Nov 8). (IF 3.301)(由井克之)
- 73 Nakazawa S, Culleton R, Maeno Y. In vivo and in vitro gametocyte production of *Plasmodium falciparum* isolates from Northern Thailand. *Int J Parasitol*. 41(3-4): 317-23. 2011 Mar (Epub 2010 Nov 24). (IF 3.822)(金子修)
- 74 Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H. Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochem Biophys Res Commun*. 402(4): 790-5. 2010 Nov 26 (Epub 2010 Oct 29). (IF 2.595)(濱野真二郎)
- 75 García G, González N, Pérez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, Izquierdo A, Sánchez L, Díaz D, Lezcay M, Pacheco B, Hirayama K, Guzmán MG. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis*. 15(1): e38-43. 2011 Jan (Epub 2010 Nov 26). (IF 2.529)(平山謙二)
- 76 Hara S, Henmi T, Kawakami A, Fujikawa K, Mukae H, Ishimatsu Y, Sakamoto N, Kakugawa T, Kaji K, Fujimoto M, Kuwana M, Tsukada T, Satoh K, Motomura M, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Hayashi T, Origuchi T, Eguchi K, Kohno S. Clinical, serologic and magnetic resonance imaging of 3 cases of inflammatory myopathy with abundant macrophages in the Japanese population. *Rheumatol Int*. 2010 Dec 2. (IF 1.431)(西田教行)
- 77 Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog*. 6(12): e1001217. 2010 Dec 2. (IF 9.079)(西田教行)
- 78 Haque U, Hashizume M, Glass GE, Dewan A, Overgaard HJ, Yamamoto T. The role of climate variability in the spread of malaria in Bangladeshi highland. *PLoS ONE*. 5(12): e14341. 2010 Dec 16. (IF 4.411)(山本太郎)
- 79 Richly H, Rocha-Viegas L, Ribeiro JD, Demajo S, Gundem G, Lopez-Bigas N, Nakagawa T, Rospert S, Ito T, Di Croce L. Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1. *Nature*. 23; 468(7327): 1124-8. 2010 Dec 23. (IF 36.101)(伊藤 敬)
- 80 Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Satoh K, Tamai M, Nakamura H, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. The power Doppler ultrasonography score from 24 synovial sites or 6 simplified synovial sites, including the metacarpophalangeal joints, reflects the clinical disease activity and level of serum biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 50(5): 962-5. 2011 May (Epub 2010 Dec 23). (IF 4.171)(西田教行)
- 81 Huy NT, Thao NT, Diep DT, Kikuchi M, Zamora J, Hirayama K. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. *Crit Care*. 14(6): R240. 2010 Dec 31. (IF 4.595)(平山謙二)

Ⅲ 事業推進担当者が指導した学位取得者

平成22年度学位取得者名簿 16名(うち外国人6名)

()内は学位取得年月日

有吉 紅也

Huong Thi Thu Vu 「Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral co-infection and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children .(ベトナム人の小児を対象とした鼻咽頭に定着した肺炎球菌の菌量と肺炎発症のリスク、およびウイルス重複感染による相互作用に関する研究)」(2010 / 10 / 6)

田中 健之 「Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by macrophages through Rac1 activation (単球走化性促進因子 1 / CC ケモカインリガンド 2 は Rac 1 の活性化を介してアポトーシス細胞除去を促進させる)」(2011 / 2 / 2)

甲斐 雅亮

MD. Towhid Hossain 「Chemiluminescence detection of prion protein on membrane and its enzymatic degradation in the presence of aptamers or amino acids」(2010 / 9 / 17)

喻 志強 「Novel fluorescence assay for HIV-1 protease and its application to mutant discrimination」(2010 / 9 / 17)

山筋 睦美 「DNA の高感度化学発光画像検出法の開発と応用」(2011 / 3 / 18)

河野 茂

山口 博之 「Serum levels of surfactant protein D predict the anti-tumor activity of gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (血清サーファクタント蛋白D値は、進行非小細胞肺癌患者におけるゲフィチニブの抗腫瘍効果を予測する)」(2011 / 2 / 23)

高園 貴弘 「Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis (侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルに対するミカファンギンと吸入アムホテリシンB脂質製剤の併用療法の有用性)」(2011 / 3 / 18)

深堀 範 「*Aspergillus fumigatus* regulates mite allergen-pulsed dendritic cells in the development of Asthma (気管支喘息発症におけるダニ抗原でパルスしたマウス樹状細胞に対する *Aspergillus fumigatus* 感染の及ぼす影響)」(2010 / 6 / 2)

松島 加代子 「MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa (ヘリコバクターピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 感染胃粘膜におけるマイクロRNA の発現)」(2010 / 6 / 2)

井上 直樹 「Down-regulation of microRNA 10a expression in esophageal squamous cell carcinoma cells (食道扁平上皮癌細胞における microRNA 10a の発現低下)」(2010 / 8 / 4)

松本 章子 「*Helicobacter pylori* VacA Reduces the Cellular Expression of STAT3 and Pro-Survival Bcl-2 Family Proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, Leading to Apoptosis in Gastric Epithelial Cells (*H. pylori* 空胞化毒素 VacA は胃上皮細胞の STAT 3 と Bcl-2 / Bcl-XL 発現を減弱させアポトーシスを誘導する)」(2011 / 2 / 2)

藤田 華子 「Effects of doxycycline on production of growth factors and matrix metalloproteinases in pulmonary fibrosis (肺線維症におけるドキシサイクリンの成長因子、マトリックスメタロプロテアーゼ産生に対する効果)」(2011 / 3 / 18)

中山 浩次

雪竹 英治 「Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis* (ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖および遺伝子発現への非鉄金属ポルフィリンの影響)」(2011 / 2 / 2)

平山 謙二

Helegbe Gideon Kofi 「Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure (マウスマラリアであるプラスモディウムバーギアイのアンカ系統の慢性暴露による赤血球破壊の程度の純系実験マウス系統による相違について)」(2011 / 3 / 18)

森田 公一

Posadas Herrera Guillermo 「Development and evaluation of a formalin-inactivated West Nile Virus vaccine (WN-VAX) for a human vaccine candidate (西ナイルウイルス不活化ワクチンの開発と評価)」(2011 / 2 / 23)

Dinh Tuan Duc 「An updated loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of H5N1 avian influenza viruses (鳥インフルエンザ H 5 N 1 ウイルスに対する LAMP 法を用いた診断法の開発)」(2011 / 3 / 18)

RiPS セミナー開催状況

Workshop and Research in Progress Seminar

Usually every 3rd Tuesday of each month, 18:00PM-19:30PM

(official language: English)

Date	Section (Section Head)	Speaker	Title
Apr/20/2010 18:00 19:30 @Ryojun	DMMI, Mol Pharm Infect Agents (Kobayashi N)	Ken Watanabe	Nuclear export inhibitors; a possible target for novel anti-influenza viral drugs
	NEKKEN, Protozool (Kaneko O)	Shusuke Nakazawa	Forest Malaria and Monkeys
	Nagasaki Univ Hosp, Dept Hosp Pharm (Sasaki H)	Hitoshi Sasaki	Development of effective and secure drug delivery system as SAFE-Ball (Clinical DDS) and its application
May/18/2010 18:00 19:30 @Ryojun	DMMI, Immunol (Yui K)	Takahiko Tamura	Expansion of dendritic cells by Flt 3 ligand modifies T cell responses during infection with <i>Plasmodium berghei</i> ANKA and prevents the development of cerebral malaria.
	NEKKEN, Immunogenet (Hirayama K)	Florencia Del Puerto	Immunogenetic analysis of chronic Chagas disease in Bolivia.
	DMMI, Chem Biofunct Mol (Kai M)	Takayuki Shibata	Attempt for the regulation of HIV 1 protease expression by artificial siRNAs
Jun/15/2010 18:00 19:30 @Ryojun	DMMI, Cell Mol Biol (Nishida N)	Takehiro Matsubara	Cellular prion protein binds to metabotropic glutamate receptor type I and regulates its function
	NEKKEN, Eco Epidemiology (Kaneko S)	Satoshi Kaneko	Ecoepidemiology in Africa
	Pharmaceutical Medicine (Ikeda M)	Masayuki Ikeda	Regulatory Science: Strategy for dealing with Japan's drug lag.
Jul/20/2010 18:00 19:30 @Ryojun	NEKKEN, Virol (Yamashiro T)	Gen-ichiro Uechi	Construction of a human Fab library and molecular cloning of human monoclonal Fab with neutralizing potencies against Influenza A subtype H5N1 strains
	DMMI, Med Virol (Moriuchi H)	Masami Miyakawa	A Birth Cohort Study on Mother-to-Child Transmission of Cytomegalovirus, Hepatitis B Virus, Rubella Virus and TT Virus in Khanh Hoa Province, Viet Nam: Implications for Preventive Strategies
	NEKKEN, AIDS Research (Kubo Y)	Yoshinao Kubo	Identification of a cellular factor determining susceptibility to CD4 independent HIV infection
Aug/17/2010 18:00 19:30 @Ryojun	NEKKEN, Vector Eco Environ (Minakawa N)	Noboru Minakawa	Does infestation of water hyacinths increase a risk of malaria transmission?
	DMMI, Mol Clin Microbiol (Kohno S)	Taiga Miyazaki	Elucidation of the calcineurin signaling cascade controlling stress response and virulence in the pathogenic fungus <i>Candida glabrata</i>
	NEKKEN, Virol (Morita K)	Lyre Anni E. Muraio	Defective recognition of Japanese encephalitis virus RNA in porcine cells delays the interferon response to promote viral dissemination
Sep/14/2010 09:00 19:00	GCOE-WS (@NEKKEN)	closed only for GCOE participants	
Oct/19/2010 18:00 19:30 @Ryojun	DMMI, Cytokine Signaling (Matsuyama T)	Hideki Hayashi	Identification of poly(I:C)-induced pancreatitis-related genes in IRF 2-deficient mice
	NEKKEN, Clin Med (Ariyoshi K)	Motoi Suzuki	Khanh Hoa Health Project in Vietnam: Multi-dimensional Approach for Investigating Infectious Diseases
	DMMI, Epidemiol (Nakagomi O)	Punita Gauchan	Apparent replacement of rotavirus strains over time: a case of G12P [6] strains observed in Nepal during a 2 years and 4 months of surveillance.
Nov/16/2010 18:00 19:30 @Ryojun	NEKKEN, Int Health (Yamamoto T)	Manirul Islam	Understanding causal pathways of relapse in substance dependence disorders (drug addiction) and effect of culturally appropriate psychosocial intervention in preventing relapse through blocking those pathways.
	DMMI, Biochemistry (Itoh T)	Takashi Ito	Histone Modification Mediated Epigenetic Regulation in Mammal and Malaria-Strategy of The Project-
	NEKKEN, (Kaneko A)	Akira Kaneko	Global malaria eradication: from islands in Vanuatu to Lake Victoria
Dec 10	not scheduled		
Jan/18/2011 18:00 19:30 @Ryojun	DMMI, Microbiol Oral Infect (Nakayama K)	Tomoko Kadowaki	Regulation of secretion of virulence factors by a novel two-component signal transduction system in <i>Porphyromonas gingivalis</i> .
	NEKKEN, Bacteriol (Hirayama T)	Masayuki Nakano	Study of the <i>Salmonella</i> enterotoxin, Stn
	Nagasaki Univ Hosp, Dept Hosp Pharm (Sasaki H)	Hitoshi Sasaki	Development of Clinical DDS (Nano balls) for vaccines
Feb/22/2011 18:00 19:30 @Ryojun	NEKKEN, Parasitol (Hamano S)	Chikako Shimokawa	A study on the pathogenicity of <i>Entamoeba moshkovskii</i>
	DMMI, Mol Biol Infect Agents (Kobayashi N)	Hiroaki Kawano	<i>In vitro</i> reconstitution and X-ray crystallography of the virus-like particles of betanodavirus
	NEKKEN, Protozool (Kaneko O)	Megumi Inoue	A genomic locus containing <i>msp 1</i> is involved in strain-specific immunity in <i>Plasmodium yoelii yoelii</i>

NEKKEN = Institute of Tropical Medicine

DMMI = Dept Mol Microbiol & Immun, Grad Sch Biomed Sci, Nagasaki Univ

2010年

日本化学療法学会 感染症治療でシンポ

長崎

第58回日本化学療法学会総会学術講演会(会長・河野茂長崎大学院教授)が2日から、長崎市茂里町の長崎プリックホールを主会場に開かれている。

4日までの期間中、H1V(エイズウイルス)やインフルエンザなどに関する講演やシンポジウムを予定している。全国から約1500人が参加する見込み。

3日の会長あいさつで河野教授は「感染症の治療は人類が生き続ける限り向き合っていくものだ。シンポールが西洋医学を伝えた長崎の地で化学療法の将来を見たい」と述べた。

今年1月に承認された新しいインフルエンザ治療薬「ベラミビル」に関するシンポジウムでは、5人の医師が成人や子どもへの臨床試験の結果を基に有効性や安全性、副作用の注意点を解説した。承認前の臨床試験に携わった河野教授は「ベラミビルは点滴薬なので口からの摂取や吸入が困難な患者には第一選択薬となりうる。重症患者やハイリスク患者などにも有効的だ」と特長を挙げた。

(西村伸明)



長崎新聞 (6月4日)

うわさ流布、マスコミ対応 日中韓の医師ら研修

感染症発生時の情報管理

リスクアセスメント研修の開会式で自己紹介をする参加者
—長崎市坂本1丁目、長崎大熱帯医学研究所

「感染症発生時の情報管理」が24日、長崎市坂本1丁目の長崎大熱帯医学研究所で始まった。26日まで、同大とWHOの共催。医学的研修ではなく、感染症が発生したときに流布するうわさやマスコミ対応などについて学ぶのが目的。同大によると、リスクアセスメントの研修を国内で実施するのは初めて。日本、中国、韓国の医師や政府関係者など20人が参加した。

開会式で同大の高木正洋副学長は、同大医学部は日本初の医学学校であることや放射線医療、感染症研究を進めている歴史などを英語で説明し、「今後もWHOと研究を進めていきたい」とあいさつ。参加者は一人ずつ自己紹介し、「このような機会に参加できてうれしい」などと意気込みを見せた。

研修では、参加者が5つのグループに分かれ、講義とグループワーク演習を3日間で計7こま行う。

(永野孝)



長崎新聞 (8月25日)



高病原性鳥インフルエンザの発現メカニズムなどについて解説する高田教授（長崎市、新興養メモリアルホール）

克服には病原性発現メカニズムの解明必要

北海道大獣共通感染症リサーチセンターの高田礼人教授がこのほど、長崎市長崎市の市立図書館新興養メモリアルホールで講演。鳥はインフルエンザウイルス、インフルエンザなど人間にも動物にも感染する微生物によって起こる人獣共通感染症について「克服す

人獣共通感染症で講演

北海道大・高田教授「鳥のウイルスと人のウイルスが同時に感染し、豚の体内で遺伝子再集合が起きて生まれた新たなウイルスが人に感染した」と述べた。1997年に香港で6人が死亡した高病原性鳥インフルエンザは「遺伝的特別な体質のししか感染しない」と冷静な対応を求め

長崎新聞 (11月5日)

た。致死率が高いエボラ出血熱を起すウイルスについて「毎年のようにアフリカで突発的流行が起きてい

2011年
長崎新聞 (1月25日)

世界の感染症テーマに講座

あす 長大熱帯医科研

長崎大熱帯医学研究所(平山謙二所長)は26日午後7時から、世界の感染症に関する市民公開特別講座を長崎市興善町の市立図書館新興養メモリアルホールで開く。同大は危険度が高い病原体を研究する「高度安全実験施設(レベル4施設)」の設置を検討しており、同大の取り組みについての説明もある。入場無料。同研究所の森田公一教授と安田二期教授が「我が国が直面する世界の感染症の脅威」と題して講演。交通・運輸機関

「レベル4施設」概要説明も

の発達に伴い、新たな病原性が世界中に拡散する危険性があるとして、感染症の研究の現状などを解説する。同大の須齋正幸理事は「高度安全実験(レベル4施設)に関する本学の取り組みについて」と題し、同大が検討している施設の概要を説明する。施設の設置に向けた検討を学内で始めたことを明らかにした。レベル4施設は、国内では国立感染症研究所山形舎(東京都武蔵村山市)があるが、住民らの反対によって稼働していない。問い合わせは同研究所(電095・819・7833)。(永野孝)

感染症テーマに市民講座

「レベル4施設必要」

長大熱研

長崎大熱帯医学研究所(平山謙二所長)は26日夜、長崎市興善町の市立図書館新興養メモリアルホールで感染症に関する市民公開特別講座を開き、エボラウイルスなど危険度が高い病原体を研究する「高度安全実験(レベル4)施設」設置に関する同大の検討状況を説明した。市民ら約100人が参加。同研究所の森田公一教授(ウイルス学)と安田二期教授(新興感染症学)が「我が国が直面する世界の感染症の脅威」と題し講演。森田教授は新興・再興感染症が出現・拡大する理由にジャンクル開発や交通手段の発達を挙げ「文明生活を維持する上で変えられず、



高度安全実験施設の必要性を訴える長崎大熱帯医学研究所の安田二期教授（長崎市立図書館）

同大の須齋正幸理事は設置検討の理由について「長崎大学は感染症に関する研究や教育、医療活動について長年の実績がある」と説明。参加者からは「住民とコンセンサスを得ることが大事だ」と意見が出た。片峰茂学長は「人材や研究施設を考えれば長崎は数少ない候補地の一つだが、住民のコンセンサスが絶対にいる。やりたいと思っていないが建設ありきではない」と述べた。

(西村伸明)

長崎新聞 (1月28日)

難病「ヤコブ病」 生前診断法開発

認知症などが急速に進み死に至る神経難病「クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）」について、患者から採取した髄液を使い、生前に確定診断する方法を、長崎大学大学院薬学総合研究科の西田教授（感染分子解析学）らの研究グループが世界で初めて開発した。30日の米医学誌「ネイチャー・メディスン」電子版に発表された。

長崎大研究グループが世界初



佐藤克也講師



新電一郎助教

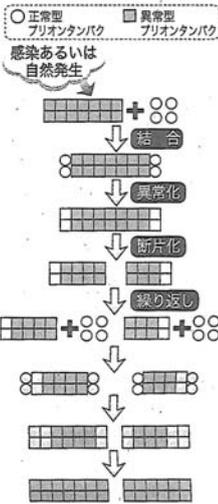


西田教授

髄液中のプリオンタンパク増幅検出

CJDは遺伝が関与するものなどを除き原因不明で発症する「散发性CJD」。今ところ根本的な治療法はないが、生前の確定診断が可能になったことで、今後早期診断の可能性が開ける。治療薬の開発にもつながると期待される。CJDの症状はアルツハイマー型認知症と似ているが、生前の患者から病原体が、生前の患者から病原体

異常型プリオンタンパク高感度増幅法の原理



で検出できなかった患者の髄液中にあるごく微量の異常型プリオンタンパクの検出を試みたところ、29人、88

異常型プリオンタンパクに著目。異常型と正常型が結合すると異常型に劣化する仕組みを利用し、試験管内で薬液反応を連続して起こし増幅させた上で検出する「高感度増幅法」の開発に世界で初めて成功した。国内とオーストラリアを合わせCJDで亡くなった34人でこの方法を用い異常型プリオンタンパクの検出を試みたところ、29人、88

の検査を依頼されている。論文は、西田教授のほか新電一郎助教、佐藤克也講師らが共同執筆した。西田教授は「異常型プリオンタンパクを直接見つける法定打になる。髄液は簡単に採取できるのは患者のメリットも大きい。今後は症状が悪化する前に確定診断できるようにしたい」と話した。(西村伸明)

プリオン病 髄液から病原体検出 長崎大など 早期発見に応用

長崎大学や筑波大学、研究チームは、脳がスポンジ状になるプリオン病「変異型クロイツフェルト・ヤコブ病」の診断に有望な手法を考案した。腰椎の髄液から病原体とされる異常プリオンを高精度に検出する。現在は確定診断には

脳の解剖しか方法がなく、新手法は患者の早期発見・診断につながる可能性がある。米医学誌「ネイチャー・メディスン」(電子版)に31日掲載される。長崎大の西田教授、新電一郎助教らが取り組んだ。研究チームは異常プリオンが含まれる可能性があるとみて、脳から脊髄を満たしている髄液に注目。患者の腰椎から髄液を採り、ネズミにつくった正常なプリオンを混ぜる。髄液に異常プリオンが含まれていれば、正常プリオンを異常プリオンに変えて増えるので、正確に検出できるという。

新手法を代表的なプリオン病「クロイツフェルト・ヤコブ病」の日本人患者18人の髄液で試したところ、15人で陽性となった。一方、プリオン病でない35人の髄液はすべて陰性だった。プリオン病でない人を見分けるのに使える。プリオン病は脳にあるプリオンたんぱくが構造変化を起し、異常プリオンとなって神経細胞の中などに蓄積して障害を起す病気。

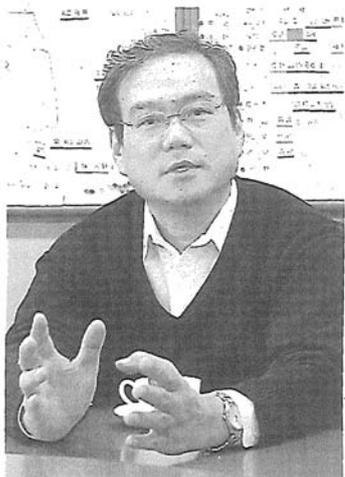
熱帯医研の蓄積生かす 国家の危機管理に寄与

長崎大の感染症研究拠点構想

森田公一教授に聞く

長崎大学が最も危険度が高い病原体を扱う感染症研究施設「高度安全実験（BSL4）施設」設置の検討をすすめている。新型肺炎SARSや新型インフルエンザなどの感染症が世界的な広がりを見せるなか、長崎に施設を設置しようとする目的や意義は何か。新興ウイルス感染症が専門で、検討のための学内ワーキンググループ委員でもある熱帯医学研究所副所長の森田公一教授（54）に聞いた。

（江崎憲一）



「新興感染症とは何か。驚異を身近に感じる事態が多々発生している」「アフリカなどの熱帯地域を見ると、開発や旅行に絡んで未知の微生物と人の接触が増え、新しい病気が出てきています。ここ20、30年の間に出現した感染症が新興感染症だ。エイズや新型インフルエンザ、鳥インフルエンザなど

長崎大学熱帯医学研究所副所長・森田公一教授（54） 1985年長崎大大学院修了。95年から世界保健機関（WHO）西太平洋地域事務局感染症対策課長、98年に熱帯医学研究所に復帰、01年10月から同研究所ウイルス学分野教授。専門は熱帯性ウイルス感染症、新興ウイルス感染症。



施設の可能性検討

長崎大学は昨年5月、「高度安全実験（BSL4）施設」を設置する可能性について考え始めている」とした学長声明を発表。意義や目的、地域への話し合いなどを期限を切らずに検討するため、学内に外

もない。新型インフルエンザが日本に入ってきた時のことは記憶に新しいと思う。

BSL4施設とは

「バイオ・セーフティー・レベルのことで、世界保健機関（WHO）の基準に沿った病原体研究施設。感染力や致命率、ワクチンの有無など扱う病原体の危険度の低い方から4段階ある。エボラ出血熱やラッサ熱など最も危険度が高いとされる感染症の病原体を研究するのがBSL4施設だ。未知のウイルスの危険度

を確認したり、病原体の診断やワクチン開発、その効果判定などを行う」

「施設内部は気圧が外部より低く保たれ、中の空気が外に漏れないような設計になっている。排気は高性能フィルターを通してウイルスが漏れない。実験者は宇宙服のようなスーツを着て作業し、病原体と空気に遮断された環境にある」写真参照

なぜ長崎で

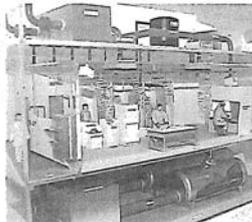
「長崎大は1857年に医学伝習所として開学し、150年の歴史がある。私が勤める熱帯医学研究所は前身の風土病研究所から60年以上を数え、熱帯の感染症に特化した研究施設としては国内唯一。歴史的な蓄積があり、研究拠点となる素地がある」

住民の理解必要

市民講座で説明

地域住民から不安や反

長崎大熱帯医学研究所内に「熱帯医学ミュージアム」にある一般的な高度安全実験（BSL4）施設の模型。一般にも公開され、平日午前9時から午後5時まで見学が可能。長崎市坂本1丁目



対の声があがるのでは

「建設ありきで話ではない。地域住民の理解が必要なのは言うまでもない。現在、市民講座を開いているのも、住民にまずに分かって頂きたいところが一番大きい。施設は音や煙を出す迷惑施設ではない。早く診断し安全に寄与するという面で安心・安全のための施設だ」

IG8（主要国首脳会議）

の国の中でBSL4施設が稼働していないのは日本だけ。逆に致死率の高い感染症が世界中で広まった場合、自国が優先され、日本は診断などが後回しにされる可能性がある。国家の危機管理上、十分な状態であるのが現状だ」

朝日新聞
（2月7日）

▼長崎大研究グループがヤコフ病の生前診断法開発 神経難病「クロイツフェルト・ヤコフ病」について、患者から採取した髄液を使い、生前に確定診断する方法を、長崎大大学院歯学部総合研究科の西田敦行教授（感染分子解析学）らの研究グループが、世界で初めて開発。30日付の米医学誌「ネイチャー・メディスン」電子版に発表された。

長崎新聞
（2月7日）

アフリカ人2人 研究励む

長崎大熱研 マラリアやエイズ予防

日本政府の「野口英世アフリカ賞」を受賞した英国人博士が賞金1億円で創設した奨学金制度の1期生として、アフリカの男性研究者2人が、長崎大熱帯医学研究所（長崎市）で研究に励んでいる。母国で流行するマラリアやエイズの予防、治療に関する研究成果を残し、博士のようにアフリカの医療に貢献したいという。2期生も8日に決まり、10月にマリとザンビアの男性が来日する。

（寺垣はるか）

野口英世賞ゆかりの奨学金

熱帯医学研究所の教授に研究経過を報告するズングラーナさん（中央）とバラサさん（左）



創設者は、ロンドン大教授ウッド博士。アフリカで約30年間、臨床医として診療

を続けながらマラリア研究に取り組み、2008年に同賞を受賞した。「アフリカの現状に即応できる現地の科学者を育てたい」と賞金全額を奨学金に充てた。長崎大で研究しているのは、ブルキナファソのオーグスチン・ズングラーナさん(35)と、ウガンダのアレックス・バラサさん(33)。2人とも母国の研究機関で働いたが、「日本で知識や技術を向上させたい」と奨学生に応募した。昨年10月から、それぞれ、マラリアの免疫、エイズ患者の生存期間の予測法を研究している。

読売新聞
(2月10日)

「初めて見る実験器具もあった」とズングラーナさん。バラサさんは「生活をささげて研究に没頭する日本人の精神がすばらしい」と週末も大学でパソコンに向かっている。家族を母国に残しており、寂しさも感じるが、タコの刺し身やスシが好物になり、日本の暮らしにもなじんできた。長崎原爆資料館も見学し、「目にしたことを帰国後に伝えたい」と口をそろえる。留学期間は9月まで。ブルキナファソでは病院を訪れる人の7割がマラリア患者といる。ズングラーナさんは「ワクチン開発に貢献したい」。バラサさんは「外国からの支援金をエイズ対策に効果的に使えるよう、政策立案に携わりたい」と夢を描いている。

ATLの予防や治療の現状学ぶ

長崎大医学部で講演会

主に母乳を通じて感染し、成人T細胞白血病(ATL)などを引き起こす可能性があるウイルスの感染防止についての講演会が29日、長崎市坂本1丁目の長崎大医学部であり、医師や看護師、学生など約1000人が感染予防の歴史や治療の現状などを学んだ。

県内の小児科医や産婦人科医、県などをつくる県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業連絡協議会主催。ATLは古くから西日本に多い病気で、近年は全国的に増加傾向。本県では19

87年から「県ATLウイルス母子感染防止研究協力事業」が始まり、検査を受けた24万人から約8千人の感染者が見つかったという。治療法は確立していない。講演会では専門家や患者会代表など4人が登壇。うち同大の塚崎邦弘准教授は「ATLに対する治療の現状」と題して講演。85年と93年の年齢別死亡者数のグラフを示し、「もともとは50〜60代で発症することが多かったが、70代が多くなった」と述べた。

（永野孝）



参加者がATLウイルス母子感染防止学を学んだ講演会。長崎大

長崎新聞
(3月31日)



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 7803 / FAX.095 819 7805

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

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