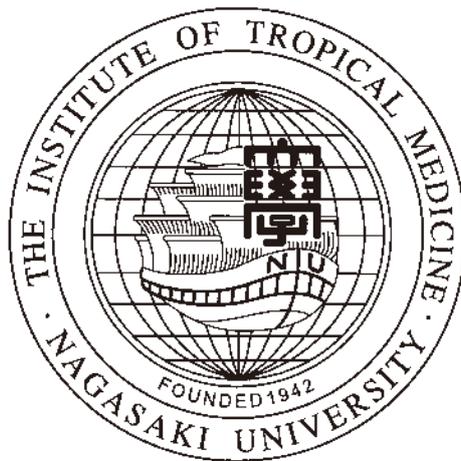


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

平成 28 年度
(2 0 1 6)



長崎大学熱帯医学研究所
(全国共同利用研究所)

はじめに

長崎大学熱帯医学研究所

所長 平山謙二

熱帯地域を中心とした開発途上国では近年、疾病構造の変化がみられるなか依然として古典的な熱帯病は流行を繰り返し、加えてエボラ出血熱や結核など新興再興感染症が保健衛生のみならず社会・経済分野でも重大な脅威となっています。先進諸国あるいは国際機関、民間支援機関などは、この問題を憂慮し多大な投資を HIV/AIDS、結核、マラリア、顧みられない熱帯病に対して実施してきております。その結果、マラリアなどでは明瞭な死亡者数の減少も見られるようになりました。しかし一方では近年多くの熱帯病・新興再興感染症の発生状況や背景事情はより多様化、複雑化してきています。異常気候、熱帯雨林の環境破壊などの諸問題の解決は儘ならず、これらがまた感染症の発生状況の混迷の度合いを高めており、加えて内戦や国際紛争がこれまで順調に進展してきたいくつかの優良な国際感染症対策プログラムさえも後退させている事例が発生しています。

このような状況において、長崎大学熱帯医学研究所は熱帯地域における調査研究に軸足を置き、熱帯保健衛生の問題を解決するための科学的根拠を提供するための研究をさらに強力に推進していく予定です。

本研究所は全国共同利用・共同研究拠点として以下にあげる活動を通して研究者を糾合し熱帯医学領域の学術の向上と世界的な感染症対策へ寄与することを目標として活動しています。

1. 全国共同研究

本研究所のアジア・アフリカ感染症研究拠点等の機能を活用し、熱帯病・新興感染症の臨床疫学、公衆衛生学、微生物病学をベースにしたプロジェクトを全国に公募し、共同研究の内容に応じて研究所内の共同研究施設の利用に便宜を図ります。現地の研究者も参加することができます。

2. 研究集会

関連研究の情報交換や共同研究の促進のための国際的な研究会や、研究技術の普及のための研修会を公募し支援いたします。

3. リソースセンター

研究や教育に資するため病原体や遺伝情報の集積保存、全国配布を行います。

4. 熱帯医学ミュージアム

共同利用研究で得られた知識や科学的新知見を社会に還元するため、サイエンスコミュニケーション、学術情報の保存および発信の中核をにないます。

熱帯医学研究拠点としての本研究所の特色はアジア・アフリカ感染症研究施設などの研

究基盤を背景として国内外の多様な領域の研究者とともに、熱帯地域の現場に根ざした共同研究を遂行することが挙げられます。本拠点が提供する共同研究基盤が、開発途上国ひいては世界の熱帯病・新興再興感染症制御に資する新たな知と技の創造をめざし、日本の学術コミュニティをさらに活性化し社会に貢献するものであることを期待しております。

目 次

第1部 一般共同研究

1. 新規 FRET プローブを用いた HTS によるラッサウイルス放出阻害薬 の同定
代表者：水谷龍明（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・助教） 1
2. 原生生物カプサスポラの *Schistosoma mansoni* に対する捕食行動
代表者：菅 裕（県立広島大学生命環境学部・准教授） 7
3. 数理モデルを用いたデング媒介蚊の遺伝分化・流動動態の定量的予測
代表者：岩見真吾（九州大学大学院理学研究院生物科学部門・准教授） 11
4. タイ・ランパンエイズコホートにおける日和見感染症と MBL 遺伝子多型の検証
代表者：柳澤邦雄（群馬大学医学部附属病院 血液内科・助教） 16
5. 赤痢アメーバにおける表面レクチンサブユニット (Igl) の機能解析
代表者：橋 裕司（東海大学医学部・教授） 21
6. 臨床試験に向けての新規マラリアワクチン BDES-NPV の製造プロセスと品質管理に
関する研究
代表者：伊従光洋（金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授） 26
7. 北海道のエゾシカにおけるマダニ媒介性ウイルスの血清・分子疫学調査
代表者：内田玲麻（酪農学園大学 獣医学群・獣医学類・助教） 32
8. ベトナムにおける自然環境由来コレラ菌のゲノム疫学的ヒト感染機構の解明
代表者：丸山史人（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学講座・准教授） 38
9. アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の検出とその伝播に関する研究
代表者：前野芳正（藤田保健衛生大学 医学部 ウイルス・寄生虫学・准教授） 43
10. ヒトマラリアに認められる免疫抑制の調査研究（ケニア）
代表者：木村大輔（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師） 48
11. 組換え体デングウイルス粒子によるコンドロイチン硫酸Eの分子認識機構
代表者：左 一八（会津大学短期大学部・食物栄養学科・教授） 53
12. サルマラリア原虫を用いた肝臓休眠体に関する新規実験系の開発
代表者：川合 寛（獨協医科大学・熱帯病寄生虫病学講座・准教授） 59
13. 赤痢アメーバにおけるコレステロール硫酸とシスト形成との関連性の証明
代表者：見市(三田村)文香（佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野・助教） 66
14. マラリア感染赤血球に有効な新規薬物送達システムの開発
代表者：田上辰秋（名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師） 70
15. 小児滲出性中耳炎の罹患率に与える肺炎球菌ワクチンの効果
代表者：金子賢一（長崎大学大学院医歯薬総合研究科・
耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野・准教授） 75
16. フィリピンにおける日本住血吸虫症の抑制過程に関する総合的研究
代表者：飯島 渉（青山学院大学・文学部・教授） 80

17. 多角的な小動物 PET/SPECT/CT イメージング による SFTS 発症メカニズムの 解析および治療法の開発 代表者：淵上剛志（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・ 生命薬科学専攻・健康薬科学講座・准教授）	83
18. ケニア・ロタウイルス疫学研究への新しい分析技術の応用 代表者：長谷川 慎（長浜バイオ大学バイオサイエンス学部・教授）	91
19. バベシア原虫マダニステージでのライブイメージング実験系の開発 代表者：河津信一郎（帯広畜産大学原虫病研究センター・教授）	100
20. 生薬由来新規抗マラリア薬の探索 代表者：小松かつ子（富山大学 和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野・教授）	106
21. ベトナムにおける眼感染症の病因（肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV）導入前 の評価） 代表者：上松聖典（長崎大学病院 眼科・講師）	112
22. T 全球的気候システムの変動に伴うバングラデューにおけるコレラ流行メカニズム解明の ための共同研究の推進 代表者：寺尾 徹（香川大学教育学部・教授）	116
23. 次世代シーケンサーによる <i>Orientia tsutsugamushi</i> の比較ゲノム解析 代表者：堀田こずえ（東京大学大学院農学生命科学研究科・助教）	121
第2部 研究集会	
1. 日本インターフェロン・サイトカイン学会大会 代表者：吉田裕樹（佐賀大学医学部・分子生命科学講座・免疫学分野・教授）	127
2. 医学研究のための倫理に関する国際セミナー 代表者：佐々木 均（長崎大学病院・薬剤部・教授）	129
第3部 海外拠点連携共同研究	
1. アフリカで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と形態学的、生理学的、 分子生物学的解析 代表者：笹川千尋（千葉大学真菌医学研究センター・センター長）	137
2. ハノイコホートを用いた HIV-1 subtype A/E ウイルス感染症の疫学およびワクチン 開発と治療のための基盤研究 代表者：滝口雅文（熊本大学エイズ学研究センター・教授）	142
(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿	147

第 1 部

一 般 共 同 研 究

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：新規 FRET プローブを用いた HTS によるラッサウイルス放出阻害薬の同定
課題番号：28-一般-1

2. 代表者：水谷 龍明（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・助教）
共同研究者：大場 雄介（北海道大学大学院医学研究科・教授）
浦田 秀造（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

3. 決定額： 400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ラッサウイルス（LASV）の感染者は、西アフリカを中心として年間 10-30 万人、そのうち 5000 人以上がウイルス性出血熱により死亡している（CDC ホームページ(<http://www.cdc.gov/vhf/lassa/>)）。今現在、核酸類縁体であるリバビリンが治療に用いられているが、感染初期に静脈内投与が必要とされており、効果が限定的かつ副作用が大きいことから、より簡便・安全かつ有効な新薬の開発が強く望まれている。近年、ウイルスの細胞外への放出を阻害することで、効果的な感染予防や治療となることが実証されてきた（例：インフルエンザ薬タミフル）。LASV の細胞外への放出は、LASV が保有する Z 蛋白質が中心的な役割を果たす。具体的には、Z 蛋白質の RING ドメインを介した重合化によって、LASV 粒子の形成が始まると考えられている（Kentsis et al., *PNAS*2002）。さらに、**Z 蛋白質はアレナウイルス科間で高度に保存されていることから、Z 蛋白質の重合化を特異的に阻害する低分子化合物は、エスケープ変異を受け難い、効果的なラッサ熱治療薬へ直結**する。申請者らは、LASV と同じウイルス科に属するリンパ球形脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）の Z 蛋白質に GFP 変異体（CFP or YFP）を付加させることで、重合化に伴って、Fluorescence resonance energy transfer (FRET) が生じる、Z 重合化モニタリングプローブを独自に開発した（5. 研究経過に添付）。本研究では、この新規に開発した FRET プローブを利用し、重合化を阻害する薬剤探索を目的とした大規模ハイスループットスクリーニング系（HTS 系）を実施する。さらに、熱研対応研究者と連携し、ウイルス感染実験等の高次スクリーニングを実施し、Proof of concept (POC) 獲得を目指し、最終的に**ラッサウイルスの細胞放出を阻害するリード化合物**を見出す。共同研究者は、バイオイメージング研究で世界をリードする研究者（大場雄介・北大院医）であり、新規蛍光プローブを利用したスクリーニング系の開発及びウイルス放出過程のライブイメージング解析を強力に推進できる。

②研究内容

本研究では、LASV の細胞外放出過程を特異的に阻害する薬剤を導出するために、次にあげる 3 つの研究項目を実施する。

①FRET プローブを利用した HTS による VLP 放出阻害薬の同定

開発した FRET プローブを用いて、Z 蛋白質重合化阻害剤の探索 HTS の構築を目指す。必要であればアクセプター蛍光蛋白に変異を入れるなどして S/N 比を改善させる。HTS 系を樹立後、速やかに東京大学創薬イノベーションセンターに申請を行い、化合物を入手、1 次 HTS に着手する。熱研対応職員は、すでに同センターへの手続きを済ませており、迅速な遂行が可能である。HTS で見出した化合物については、再現性・濃度依存性について検討を行った結果、同センターに構造開示を依頼し、構造周辺化合物の申請を行う。入手した周辺化合物を用いて同様の HTS 系を実施し、さらなる化合物の絞り込み及び構造活性相関を行い、ヒット化合物を得る。

②新規 FRET プローブを用いた細胞生物学的解析と応用

VLP 放出過程で、ウイルスは宿主因子を利用することが熱研対応研究者の研究から次第にわかってきたが、依然として不明な点が多い。そこで、①で同定された低分子化合物に阻害される細胞内シグナルを網羅的に解析し、ウイルスが利用する宿主細胞分子を同定する。さらに、共同研究者が駆使する最新のイメージング技術を用いて、ウイルス放出過程のライブセルイメージング解析を行うことで、ウイルス生活環のうち、assembly/budding 期の分子基盤を明らかにする。

③ヒット化合物を用いた高次スクリーニングの実施及びリード化合物の同定

①で得られたヒット化合物は、Z 蛋白質の重合化を定量する熱研対応職員が有する生化学実験法で検証する。高次スクリーニングを通過した確定ヒット化合物を最適化し、リード化合物創出を目指す。

③予想される成果

ラッサウイルス (LASV) に対する効果的な薬剤は、現在のところ人類の手元にはない。核酸類縁体であるリバビリンが治療に用いられるが、副作用が大きいことに加え、感染初期における静脈内投与で限定的に効果があるため、より有効な治療法の確立が強く望まれている。これまでのところはアフリカ西南部に局限した感染症であるが、2014 年に始まり未だ終息していないエボラウイルスのアウトブレイクが記憶に新しいが、LASV 感染症も決して対岸の火事ではない。実際、LASV は天然痘を除き日本国内に侵入してきた唯一の BSL-4 病原体である (1987 年)。LASV が分類されるアレナウイルス科は、ほぼ三年に一度新種のウイルスが発見され、今後も人類の脅威となる新種の致死性ウイルスの出現が危惧されている。また、アレナウイルス科の細胞侵入機序 (Entry) は多岐に渡るために、Entry を阻害する薬剤は、たとえ開発できたとしても汎用性が低い。一方で、本研究で抗ウイルス作用の標的とする Z 蛋白質は、アレナウイルス科間で類似しており、新種のアレナウイルスでも保持される可能性が非常に高い。すなわち、本研究から導出される Z 重合阻害効果を有する化合物は、アレナウイルス全般に対する抗ウイルス治療薬の有用なリード化合物となることが期待される。前出の通り、有効な抗 LASV 薬が望まれる現状において、効果的阻害薬の同定は、LASV に代表されるウイルス学研究分野だけでなく全人類に多大な貢献をもたらす。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

LASV と高い相同性を持つリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 由来の Z 蛋白質を利用して、HTS 対応の FRET プローブの開発を行った。図 1 のように、複数の Z 蛋白質を連結させた骨格となる分子の、N 末端側に黄色蛍光蛋白質 (Venus)、C 末端側に FRET ペアに対応する SECFP を配置した遺伝子コンストラクトを設計し、Z 重合化に伴い FRET シグナルが増加するプローブを前年度までに作製した (Probe-x)。今年度は、S/N 比の向上を図り Venus 又は SECFP に円循環変異 (*PNAS*. 96(20):11241.(1999)) を加えた変異体を作製した。

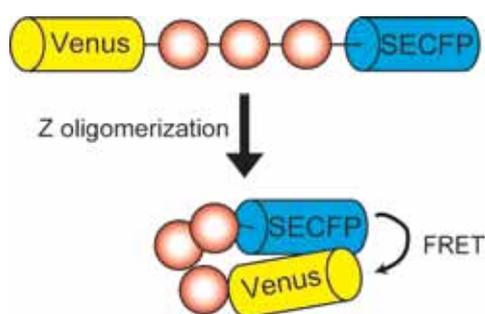


図 1. Z 重合化モニタリング FRET プローブ

Z 蛋白質の自己重合化機構を利用して、重合化依存的に生じる FRET シグナルを検出する新規蛍光プローブを作製した。これまでの実験結果から、2 から 6 個の Z 蛋白質を連結することで、重合化に伴って FRET が得られることが分かっている (平成 27 年度成果)。

続いて上述のプローブを利用して、Z 重合化を阻害する化合物を探索した。スクリーニング対象の化合物セットは、PathogenBOX を用いた (<https://www.pathogenbox.org/>)。また、実際のスクリーニングでは、FreeStyle293 細胞に常法でトランスフェクションした蛍光プローブ一過性発現細胞のライセートを用いた。これらを 96-well ベースで混合し、それぞれの化合物活性について FRET 効率を指標にしてスクリーニングを行った (SoftMax Pro, Molecular Devices)。

②成果 (結果+考察)

(1) プローブ (Probe-x) の改良

S/N 比の向上を図り、Venus, SECFP に対する円循環変異を導入したプローブを作製した。しかしながら、上記の変異体は、いずれも 293T 細胞における一過性発現量が野生型 Venus (又は SECFP) プローブに比べて低下した。また、発現細胞ライセートを用いた FRET 効率も野生型に比べて劣るものであった (data not shown)。これらの結果は、当該プローブに関しては、円循環変異によって蛋白フォールディング時に弊害が生じる、もしくは Z 重合により誘導される SECFP:Venus 結合様式を円循環変異体が構造的に阻害することが推察された。従って、円循環変異体導入により期待した改善が認められなかった。現状の Probe-x については、サンプル間のばらつきが少ない点、FRET 値が高い再現性を有する点や、重合が生じない Z 変異型プローブとの比較からダイナミックレンジが 220%に達する点から、1 次スクリーニングとしての利用可能性が高いと判断し、これ以上のプローブ改良作業を一旦終了し、現状のプローブを用いた 1 次 HTS 系の樹立を検討することとした。

(2) 化合物スクリーニング

● 1次 HTS 系のバリデーション

化合物スクリーニングに先立って、Probe-x を用いたスクリーニング系のバリデーションを行った。図 3 に示すように、CV (%) が 10%以内、S/B 値 : 3.21 (>2), Z'値 : 0.89 (>0.5) であり、HTS 系として耐えうる値を示した。

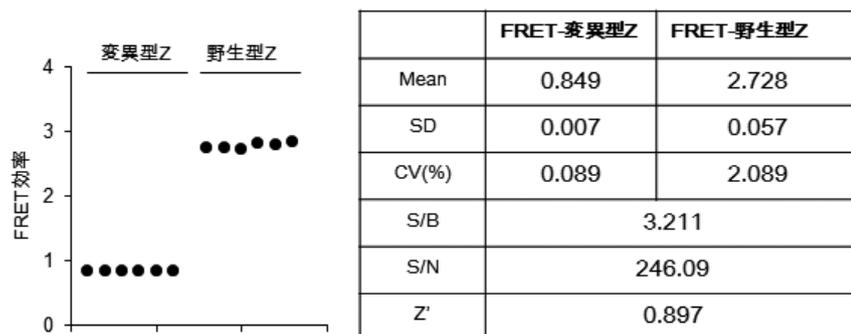


図 3. HTS 系バリデーション

Probe-x (野生型 Z)、もしくは変異型 Z を組み込んだ Probe-x (変異型 Z) の発現細胞ライセートの FRET 効率 (FRET/CFP) を 96-well-plate ベース (各 6-wells) で評価した。右表には、アッセイ系の信頼度を示す指標を示した。

● 1次 HTS : 400 化合物

1次 HTS の閾値は、野生型 Z プローブ ($FRET^c_{(WT)}=2.8-2.7$) に EDTA を添加した際に減弱した値 ($FRET^c_{(EDTA)}=2.5-2.6$) を設定することとした。図 4 に示したように、400 化合物についてスクリーニングを実施した結果、 $FRET^c_{(EDTA)}$ を下回る化合物が 16 個得られた。さらに日を変えて再現性及び濃度依存性について検討した結果、最終的に $FRET^c_{(EDTA)}$ を下回る 3 化合物をヒット化合物として得た。そのうち少なくとも一化合物 (化合物①) については、生細胞における FRET 阻害作用が確認できた (図 5)。今後は、カウンターアッセイによる化合物特異性の評価を経て、周辺化合物の収集から高次スクリーニングへと移行し、抗ラッサウイルス薬の創出を目指す。

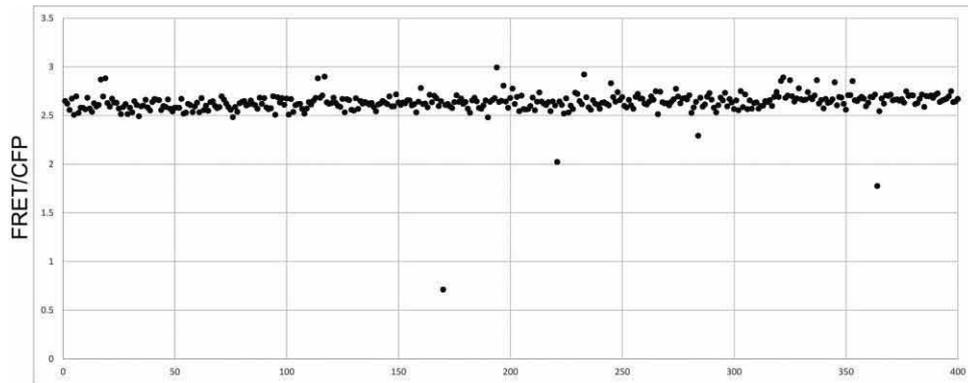


図 4. PathogenBOX400 化合物のスクリーニング結果

400 化合物 (80-wells x 5 プレート) について FRET を指標にしてスクリーニングを実施した。縦軸が FRET/CFP、横軸は化合物 ID を示す。

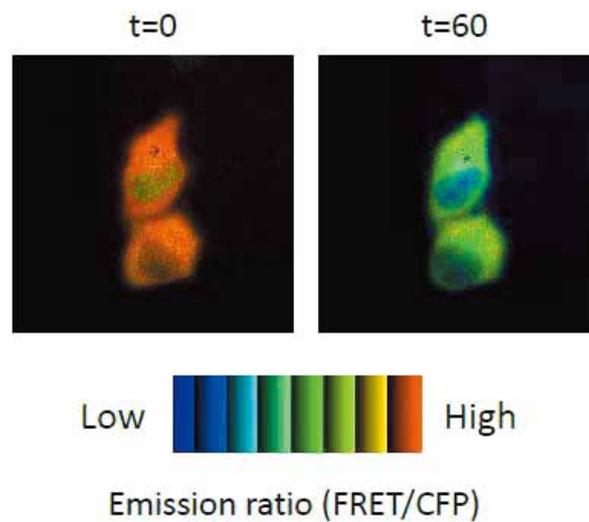


図 5. 生細胞におけるヒット化合物①による阻害効果

Probe-x を導入した HeLa 細胞に対して化合物①を最終濃度 $1\mu\text{M}$ となるように添加した。蛍光顕微鏡 (IX81, Olympus) を用いて経時的に SECFP, Venus, FRET 由来の蛍光強度を測定した。図は、化合物①を加える直前 ($t=0$) と添加後 1 時間 ($t=60$) の FRET を可視化したものであり、化合物を添加することで FRET シグナルが減弱したことを示す。

③成果の公表

なし

6. 自己評価

目的の一つとして掲げた **FRET** プローブを利用した **HTS** に着手し、ヒット化合物が得られたことは一定の成果である。今後は、目的③に準じて、高次スクリーニングに進むことを予定している。目的②に関しては、現状進んでいないことから、不満は残るが一応の成果を挙げられたものと考えられる。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙がらなかった）
- Ⓓ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：原生生物カプサスポラの *Schistosoma mansoni* に対する捕食行動
課題番号：28－一般－2

2. 代表者：菅 裕（県立広島大学生命環境学部・准教授）
共同研究者：加藤 健太郎（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

3. 決定額：500 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

Capsaspora owczarzaki（以下カプサスポラ）は動物に最も近縁な原生生物の一種であり、動物の多細胞性進化のメカニズムに迫るためのモデル生物として、近年注目されている。その進化的価値に加えて、カプサスポラにはもうひとつの生物学的、疫学的に重要な特徴がある。それはカプサスポラが、世界で多大な健康被害を引き起こしている住血吸虫 *Schistosoma mansoni* の中間宿主であるカタツムリ *Biomphalaria glabrata* に共生し、*S. mansoni* のスポロシストを捕食している（可能性が高い）ということである。もしそれが本当なら、カプサスポラを *S. mansoni* に対する「生物ワクチン」として使用できる可能性がある。しかしながらこの知見は、30年以上前に一度だけ発表されたもので、申請者の知る限り、その後検証実験等は一切されていない。本研究では、*B. glabrata* の体内及び *in vitro* において、カプサスポラのスポロシスト捕食行動及び細胞増殖過程を解析することで、カプサスポラを環境負荷の小さい「生物ワクチン・生物農薬」として使用できないか、その可能性を探る。

②研究内容

カプサスポラの、*in vivo* (*B. glabrata* 体内) 及び *in vitro* における *S. mansoni* スポロシスト捕食行動を確認する。生きた *S. mansoni* を扱うことが必要な実験は、適切な封じ込めレベルや、設備が調った長崎大の研究拠点において行う。具体的には、(1)*in vitro* でスポロシストを混合した時のカプサスポラの行動や増殖の様子を解析すること、及び(2)*S. mansoni* に感染した *B. glabrata* にカプサスポラを共感染させ、*S. mansoni* の増殖を制御できないかどうかを調べること、の2点である。申請者の研究室では、破砕したスポロシスト細胞によっても同様な反応が起こるかどうかなど、特別な施設を必要としない実験を行う。また、将来的な RNAseq 解析につなげるため、カプサスポラから、スポロシストのコンタミネーションを抑えて RNA を抽出するための条件調整を行う。

③予想される成果

S. mansoni をはじめとする住血吸虫が引き起こす健康被害は、世界で2億人以上に問題を与えているといわれる。本研究は、カプサスポラの *S. mansoni* に対する生物ワクチン・農薬としての可能性を確かめるための、フィージビリティスタディと位置付けられる。カプサスポラが、*B. glabrata* 体内で *S. mansoni* の増殖を効率よく抑えることが確認できれば、

カプサスポラを自然の *B. glabrata* に人工感染させるなどの実地応用が見えてくる。更にカプサスポラの RNAseq 解析等により、捕食活動や細胞増殖に伴う遺伝子発現の変化を捉えることができれば、これらの現象の分子メカニズムに迫ることもできる。将来的にはこれらの成果を生かし、環境への影響が少ない *S. mansoni* 駆除薬が開発できる可能性もある。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

計画通り以下の3つの実験を行った。いずれも専門的な設備と知識を保有する熱研との共同研究なしには不可能な実験であった。

- (1) カプサスポラの *S. mansoni* スポロシスト捕食行動の観察
- (2) カプサスポラが *B. glabrata* へ感染することによる、*S. mansoni* ミラジウムの *B. glabrata* への感染への影響
- (3) *S. mansoni* を捕食中のカプサスポラから RNA を抽出するための条件の検討

加藤（熱研）が *S. mansoni* のスポロシスト及び卵を採取し、UV で死滅処理したものと、様々な条件で熱を加えて死滅させたものを菅（県立広島大）に提供した。並行して加藤の側でも生きてスポロシストを使用して実験を行った。

2016年12月の分子生物学会では、研究の実施について菅と加藤が直接意見交換した。また2017年3月1日-2日には菅が熱研を訪問し、加藤とディスカッションを行った。

②成果（結果+考察）

(1) *S. mansoni* スポロシストをカプサスポラのカルチャーに与えたところ、強い捕食活動が観察された（図1）。これは35年前に最初に現象が観察されて以来、我々の知る限り2度目の観察例となる。カプサスポラはスポロシストが完全に消滅するまで約2日に亘り捕食活動を続けた。一方、*S. mansoni* の卵を与えたところ、そのような捕食活動は一切見られなかった。また、UV 処理や熱処理を行ったスポロシストでも同様な現象が観察されたことから、生きてスポロシストが自律的に誘引物質を放出しているのではなく、スポロシストの表面の構造や物質自体がカプサスポラを引き付けるものと考えられる。更にその物質は、卵には存在せず、また熱やUV に対してもある程度の安定性をもつものと考えられる。

しかしながら、35年前に報告されたような、スポロシストの捕食によってカプサスポラが急激に増殖する現象は観察できなかった。これは生きてスポロシストを使用した時も、死滅したものを使用した時も同様であった。



図1 スポロシスト（中央の大きな細胞）を捕食するカプサスポラ（周囲のドット状の細胞）

(2) まずカプサスポラが *B. glabrata* に感染するかどうかを確認するために、*B. glabrata* マントルへのカプサスポラの接種を行った。カプサスポラと *B. glabrata* それぞれに対する 18SrRNA 遺伝子へのプライマーをデザインし、接種の数日後に PCR を行ったが、カプサスポラの感染は確認されなかった。2017 年度はできるだけ若い個体を使用して実験を行う。例えば卵から生まれた直後の *B. glabrata* をカプサスポラカルチャーの中でしばらくインキュベートするなどの処理を試したい。

(3) UV 処理したスポロシストをカプサスポラに与えて培養したところ、24 時間程度でスポロシストからカビが発生した。これは UV 処理を長時間行っても同様であった。しかしながら簡単な熱処理により、カビの発生をほぼ完全に抑えることに成功した。更にこの時、スポロシストの熱処理によってカプサスポラの捕食活動には少なくとも顕微鏡下では全く影響が見られなかった。したがって、カプサスポラの捕食活動の RNAseq による解析のためには、スポロシストの熱処理が基本的な戦略となろう。実際には更に RNase 処理を組み合わせるなど、スポロシストからの RNA 持ち込みを完全防ぐための方策を検討する必要がある。2017 年度はまず、生きたスポロシスト、各種熱処理を行ったスポロシスト、及び熱処理に加えて RNase 処理を行ったスポロシストのそれぞれから RNA の抽出を行い、どの程度 RNA が残留するかを確認した上で、RNAseq 解析に持ち込みたい。

③成果の公表

特になし。

6. 自己評価

主に以下の 3 つの実験を行った。それぞれに対する自己評価を以下に述べる。

(1) カプサスポラの *S. mansoni* スポロシスト捕食行動を 35 年ぶりに観察することができたのは大きな成果であると言える。この実験は当初考えたほど単純ではなく、種々のスポロシスト処理を試す必要があったが、熱研の設備と加藤の専門知識を活用して様々な条件を試すことができた。35 年前の報告では、カプサスポラはスポロシストに引き付けられるのではなく、偶然にスポロシストに接触したカプサスポラ細胞が捕食活動に入るものとされていた。しかし CCD カメラを用いた我々のタイムラプス観察によると、カプサスポラがスポロシストに能動的に「飛びついている」様子も見られ、前報告と異なる知見も新たに得られた。一方、前報告にあったようなカプサスポラの急激な増殖は観察できず、これも全く異なる結果が新たに得られたといえる。

(2) カプサスポラは *B. glabrata* に安定して寄生しなかった。カプサスポラが寄生しやすい株があるのかもしれないが、まずは継続して実験を行うことが必要であろう。少なくとも寄生を確かめるための PCR による実験系を整備できたことは成果の一つであると言える。

(3) 実験を進めるうえで熱処理が有効であることを示唆する結果が得られた。これを基本戦略に RNAseq 解析に進むための目途がついたことは大きな成果である。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

Ⓒ （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

（6. に述べたため省略）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：数理モデルを用いたデング媒介蚊の遺伝分化・流動動態の定量的予測
課題番号：28-一般-3

2. 代表者：岩見 真吾（九州大学大学院理学研究院生物科学部門・准教授）
共同研究者：山口 諒（首都大学東京理工学研究科・日本学術振興会特別研究員 PD）
布野 孝明（九州大学大学院システム生命科学府・博士前期課程）
森岡 優志（海洋研究開発機構（JAMSTEC）・博士研究員）
中谷 友樹（立命館大学文学部地域研究学域・教授）
中岡 慎治（科学技術振興機構・さきがけ研究者）
Marko Jusup（北海道大学電子科学研究所・助教）

3. 決定額：400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

2014年、東京都を中心に1型のデングウイルスの流行が確認され、現在、日本はデング出血熱のリスクに曝されている。デングウイルスはネッタイシマカなどの蚊（ベクター）によって媒介されるデング熱の原因ウイルスである。公衆衛生上、デングウイルスの流行を制御するための最も重要な対策は、殺虫剤散布を含む媒介蚊の除去、すなわち“ベクターコントロール”である。しかし、航空機や鉄道、船の著しい発達によりグローバル化する現在、その制御は新たな局面を迎えている。デングウイルスのベクターは自己の飛翔能力は限局的である一方で、ヒトなどの宿主に付着することで長距離移動が可能になったからである（E. Fonzi et al., PLoS NTD, 2015）。これらのヒト移動に伴うベクターの長距離移動はデングウイルスの予防と制御を困難にする。例えば、デング流行地域での殺虫剤の散布はしばしば蚊に変異をもたらし、殺虫剤抵抗性ベクターを出現させる事がある。そして、これらの抵抗性蚊は人の移動を介して非流行地域に到達し、その地の野生型と交配・繁殖を繰り返す事で定着する。この様な非流行地域での抵抗性ベクターの常在化は、殺虫剤によるベクター除去を無効化するのである。今後、制御介入を効果的に評価するためには、積極的なベクター監視及びそのサーベイランスが求められている。また、ロバストなベクターコントロールを確立するためには、蚊集団における遺伝分化・流動ダイナミクスの予測が重要になってくる。即ち、コンピュータシミュレーションによる援用が期待されている。

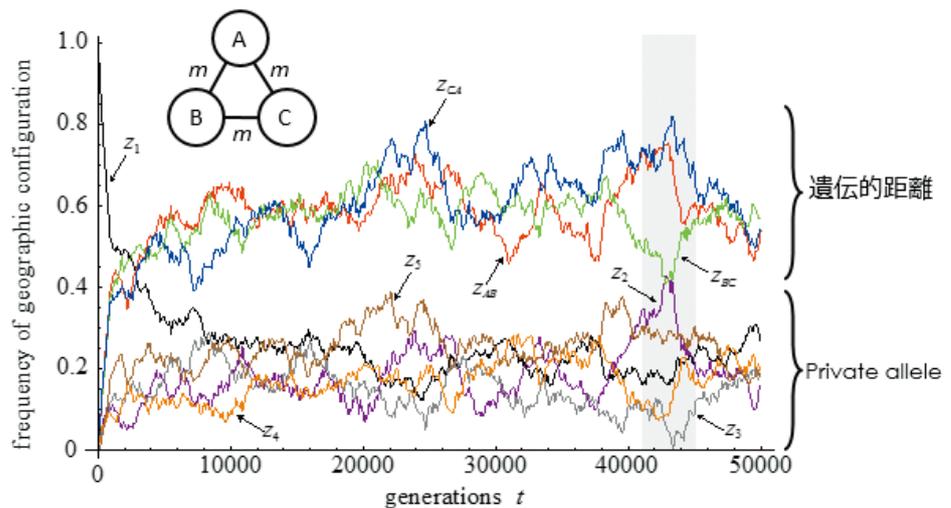
本研究ではデングウイルスの主たる媒介蚊である *Aedes aegypti* の遺伝分化・流動予測に向けた集団遺伝学モデルを提案する（九大・岩見/山口）。特に、デング流行地域であり、フェリーの往来ネットワークにより多くの島々が“繋がっている”フィリピンにて得られたマイクロサテライト配列データを開発した集団遺伝学モデルにより解析する（九大・布野/東大・中岡/北大・Jusup）。そして Approximate Bayesian Computation (ABC) を含

む最新のコンピュータシミュレーションを駆使して、船一隻の往来あたり移動する蚊の頻度や、新たな種（例えば、デングウイルスを媒介しない遺伝的に改変された蚊）が各島に定着するまでの待ち時間などを計算していく（九大・岩見/山口）。これらの知見はフィリピンにおけるベクターコントロールを確立する上で極めて重要な示唆になり、デングウイルス伝播の制御と予防に大きく貢献すると考えられる。また、本研究を通じて構築できた数理モデルおよびシミュレータを発展させていく事で、日本国内におけるベクターコントロールの確立に応用していく（熱研・皆川）。

②研究内容

前半：2016年4月1日～2016年9月30日

右図は、3つの生息地を仮定した場合の計算機シミュレーションである。上段の挙動は集団間(すなわち、生息地間)、下段の挙動は集団内(生息地内)における遺伝的距離を表している。本シミュレーションでは、



3つの生息地ネットワークおよび移住個体数が対称となっている。研究期間の前半では、15港の生息地数を考慮した数理モデルを開発する。各港を結ぶネットワークを隣接行列により特徴づけ、港間のフェリー運航スケジュールにより重みをつける。これらの現実的なネットワーク上での媒介蚊の遺伝分化・流動動態を計算できるシミュレータを開発する。計算時間が現実的でない場合は、スーパーコンピュータ（統計数理研究所共同利用）を用いた大規模計算も視野に入れている。

後半：2016年10月1日～2017年3月31日

バイオインフォマティクスの手法を駆使してマイクロサテライト配列データ（Simple Sequence Repeats: SSR）を解析する。SSRは突然変異率が高いため最近の集団拡大を検出しやすいという利点もある。E. Fonzi et al., PLoS NTD, 2015では、Fixation Indexes (Fst)を用いて異なる個体の遺伝的距離の指標としていた。本研究では、データ同化を念頭に置いてより扱いやすい指標を用いる事を検討している。例えば、個体同士の距離をSSRから同定した多型マーカーのハミング距離により定義すれば、多次元尺度法により15港各々の生息地におけるベクターのSSRが規定する高次元空間を反映した低次元空間として扱う事が可能になる。そして、前半で開発したフィリピンを想定したメタポピュレーションモデルによるシミュレーションにて多型マーカーの進化を計算し、ABCによりデータ同化していく。この様に様々な研究手法を駆使してマイクロサテライト配列データの

解析を進め、媒介蚊の遺伝分化・流動動態の定量的予測を行う。また、並列してベクターコントロールの可能性を検討していく（下記参照）。

③予想される成果

本研究では、数理生物学・数理科学・昆虫学の専門家が集い、相互発展的にデングウイルスの流行予防を実現するために媒介蚊のマイクロサテライト配列データを定量的に解析・分析する。そして、生物学的な妥当性が十分に担保され、かつ、（デングウイルスに限定されず類似の感染症に広く適応可能な）昆虫媒介性の感染症を対象とした集団遺伝学モデルを構築する事で、ベクターコントロールの基礎を確立するために活用していく。以下、本研究を遂行する事で期待される成果を列挙する：

- ・ 集団遺伝学モデルによりマイクロサテライト配列データの定量的理解
- ・ 変異遺伝子の流動動態、あるいは、集団への固定時間の予測
- ・ ベクターの移動数の推定やベクターコントロールのための交通流操作の提案
- ・ 温暖化等の気候変動による気温の変化が媒介昆虫に与える影響の検討

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【集団遺伝学モデルに関する研究】

現在、生息地（島）が2つである単純な数理モデルを構築している。ここで各島の蚊集団はそれぞれ遺伝子プールを保持していると仮定した。また、生殖隔離に関わるような形態、行動、生理的機構などをつかさどる遺伝子座が遺伝的距離 z を計算する上で対象となり、その遺伝子座数を l とした。その他、移入成功率 m や突



移入成功率: m
 移入の相対個体数: $\varepsilon (= N' / (N + N'))$
 遺伝子座の数: l
 突然変異率: u
 有効遺伝子流動:

$$\varepsilon_e = \frac{(1 - I(z)) \varepsilon}{\text{交配成功率 } w(z)}$$

集団間の平均遺伝的距離ダイナミクス

$$E \left[\frac{\Delta z}{\Delta t} \right] = \frac{2u(1-z)}{\text{変異}} - \frac{2m\varepsilon_e z}{\text{移入}}$$

 集団間の移入にのみ不適合性が働く。

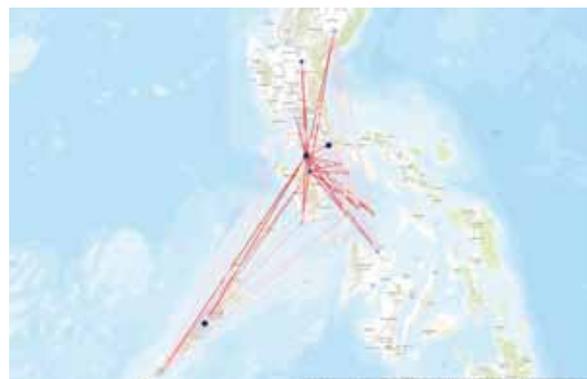
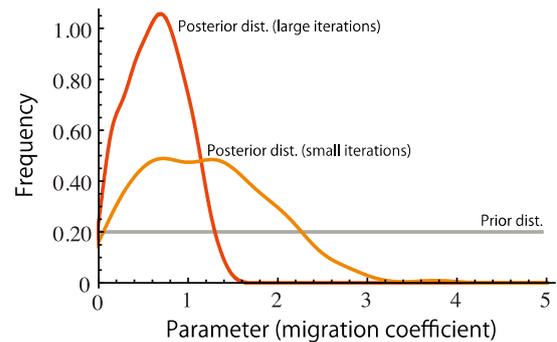
然変異率 u を定義する事で右図に示した数理モデルが構築され、島間における遺伝的距離のダイナミクスを計算する事が可能になった。本研究では、これらの検討モデルをもとにフィリピンの島々における15港をフェリーの往来頻度による重み付きネットワークでつなぎ合わせたメタポピュレーションモデルを開発した。

また、フィリピンの15港付近に生息している蚊のマイクロサテライト配列データをバイオインフォマティクス的手法を用いて解析した。“マイクロサテライト”とは細胞核などのゲノム上に存在する反復配列で、ゲノム中に広く散在しており集団遺伝学のための遺伝マーカーとして利用されている。例えば、多型マーカーとして用いる場合は、単位配列の繰り返し回数を遺伝型とみなす事ができる。本研究では、15港付近の蚊が持つマイクロサ

テライト配列を多次元空間上に射影しそれらの特徴を解析した後、抽出可能な統計量（例：ハミング距離）がシミュレーションにより再現できるか否かを検討した。そして、ABCによるデータ同化を行い、フィリピンにおける媒介蚊の遺伝分化・流動動態の定量的予測を行った。なお、これらの解析に必要なデータ（E. Fonzi et al., PLoS NTD, 2015）は皆川氏から提供を受けた。

②成果（結果＋考察）

フィリピンの15港から得られたネットアイシマカ集団のマイクロサテライト配列データ解析（7遺伝子座）から、各集団には地理的隔離による遺伝的分化は起きておらず、船舶貨物の輸送量と分化程度に負の相関があることが判明した。人為的影響による島間の蚊の移動個体を推定するため、個体ベースシミュレーションから計算される要約統計量をABCによってデータ同化した。具体的な統計量として、集団間の固定指数（ R_{st} ）に加え、集団内の平均ヘテロ接合度とアレル数を使用した。島間の関係性は105通り存在することから、独立に移入個体数を推定する既存のソフトウェア(MIGRATE-N)では推定精度が悪く、本研究では独自に船舶データに比例したパラメータを導入することで解決し、推定精度を向上させた（次ページ右図）。同様に、各蚊集団



の有効集団サイズの推定は、港周辺の人口密度に比例したパラメータとして推定することに成功した。続いて、船舶ネットワークの隣接行列を用いた固有ベクトル中心性解析から、遺伝子流動のダイナミクスが2つの港（Batangas 及び Calapan）に大きく依存している可能性が示唆された。ここまでの結果より、各集団間の移動個体数・各集団サイズを推定し、デングウイルス媒介蚊の集団構造の再現に成功した。この開発されたシミュレーションを用いることで、殺虫剤抵抗性変異を持ったベクターのメタ集団内の広がり进行评估することが可能である。さらに、フィリピン行政が公開している人口や船舶に関する統計データを使用することで、将来的な集団構造の予測も可能となる。今後はハブ機能を持つ港の特定だけでなく、ベクターコントロールに効果的な船舶航路の特定とその効果の定量化を目指す。

③成果の公表

関連した研究成果は以下の学会・研究会で公表した。

2017年3月14日～18日 第64回日本生態学会大会@早稲田大学

シンポジウム「Ecological Epidemiology : Eco-Epi modeling and data analysis」

ウェブページ：<http://www.esj.ne.jp/meeting/64/>

2016年12月26日～27日 第1回えこえぴワークショップ@JR博多シティ 会議室3

ウェブページ：<http://ecoepi.jimdo.com/>

2016年11月15日 第13回生物数学の理論とその応用@京都大学数理解析研究所

ミニシンポジウム「えこえぴモデルの展開」

ウェブページ：http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/d_math/rims/

また、原著論文については、残りの解析が終了次第、執筆を開始する。

6. 自己評価

数理生物学・数理科学・昆虫学の専門家が集い、相互発展的にデングウイルスの流行予防を実現するために媒介蚊のマイクロサテライト配列データを定量的に解析・分析を行った。そして、生物学的な妥当性が十分に担保され、かつ、(デングウイルスに限定されず類似の感染症に広く適応可能な) 昆虫媒介性の感染症を対象とした集団遺伝学モデルを構築する事で、ベクターコントロールの基礎を確立するためのコンピュータシミュレーションの開発を行う事が出来た。特に、新規性の高い点は、集団遺伝学モデルによりマイクロサテライト配列データを定量的に解析できた点である。また、シミュレーションを駆使する事で変異遺伝子の流動動態、あるいは、集団への固定時間の予測が可能になった。今後は、シミュレーションによる仮想交通流操作によりベクターの移動数やベクターコントロールのためのシナリオを分析する。また、将来のフィリピン諸島の人口増加に伴う遺伝子流動のダイナミクスの解析を進めていく。近年、人類はジカ熱やチクングニア熱の流行に直面している。感受性の高い遺伝子型を持った蚊が出現した時に、この様な遺伝子の在来蚊への定着及び伝播を定量的に理解する事は社会的・学術的に極めて重要である。以上のように、今後蚊媒介性感染症の流行対策を考えていくうえで、重要となる理論的基盤を開発したという意味で有意義な研究である。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- ④ (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (6の自己評価で述べておれば省略して良い)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：タイ・ランパンエイズコホートにおける日和見感染症と MBL 遺伝子多型の検証

課題番号：28－一般－4

2. 代表者：柳澤 邦雄（群馬大学医学部附属病院血液内科 助教）

共同研究者：半田 寛（群馬大学医学部附属病院血液内科 診療教授）

小川 孔幸（群馬大学医学部附属病院血液内科 助教）

土屋 菜歩（東北大学 東北メディカルバンク機構 助教）

Nuanjun Wichukuchinda（タイ王国保健省生命医科学研究所）

Archawin Rojanawiwat（タイ王国保健省生命医科学研究所）

Panita Pathipvanich（タイ王国ランパン病院 Day Care Center）

Pathom Sawanpanyalert（タイ王国保健省）

安波 道郎（佐賀県医療センター好生館ライフサイエンス研究所）

有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所臨床感染症学分野 教授）

3. 決定額：900 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

HIV 感染症は後天性の細胞性免疫不全をもたらす疾患であり、指標疾患に挙げられる日和見感染症を合併した場合には、後天性免疫不全症候群（AIDS）と定義される。厚労省の調査によれば、ニューモシスチス肺炎(PCP)は2014年までに我が国で集計された AIDS 指標疾患中、最も高頻度（累計 53.4%）を占める。最近申請者らは、自然免疫系における異物認識に重要な役割を持つ、マンノース結合レクチン(Mannose-binding lectin : MBL)をコードする *MBL2* 遺伝子の多型(SNP)に着目し、遺伝子型に基づく血清中 MBL 濃度は初診時の PCP 発症と有意に関連すること、また非発症群の MBL 濃度は発症群より有意に高いことなどを先行研究で明らかにした¹⁾。また *in vitro* での検討では、MBL 添加によりニューモシスチス真菌に対するマクロファージの貪食増強効果が確認され、直接オプソニン作用による生体内での防御的効果を示唆するデータも得ている¹⁾。今回長崎大学熱帯医学研究所（有吉紅也教授）の提案により、タイ国立衛生研究所（NIH）に保管された北タイ ランパンエイズコホート研究²⁻⁵⁾の保管ヒトゲノムおよび血清に着目し、より多い症例数と異なる人種・環境下において上記知見に再現性があるか、検証することを計画した。

上記コホート研究においては、756名の HIV/AIDS 患者に由来する *MBL2* 遺伝子多型の解析が全く別の視点で行われ、すでに論文化されている⁶⁾。また解析結果は京都市の HLA 研究所およびタイ NIH で匿名化の上管理されている。今回の研究では、出版済み論文で関連性が検証されている *MBL2* 遺伝子多型と患者血清 MBL 濃度、PCP

発症率との相関性を、コホートの既存データを後方視的に解析することで、より多い症例数で統計学的に検証したい。そのことで、臨床上の重要性がますます高まっている PCP の危険因子の一つを提示するとともに、分子細胞レベルでの解析が充分とはいえない PCP および AIDS 関連日和見感染症の制御機構について新たな視点を提供する事を目指している。

- 1) Yanagisawa K, Ogawa Y, Uchiumi H, Gohda F, Mawatari M, Ishizaki T, Mitsui T, Yokohama A, Handa H, Tsukamoto N, Nojima Y. Gene polymorphisms of mannose-binding lectin confer susceptibility to *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J Infect Chemother.* 2015 Nov;21(11):769-75.
- 2) Tsuchiya N, Pathipvanich P, Wichukchinda N, Rojanawiwat A, Auwanit W, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Incidence and predictors of regimen-modification from first-line antiretroviral therapy in Thailand: a cohort study. *BMC Infect Dis.* 2014 Oct 30;14:565.
- 3) Mori M, Wichukchinda N, Miyahara R, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Maekawa T, Miura P, Goulder M, Yasunami K, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. HLA-B*35:05 is a protective allele with a unique structure amongst HIV-1 CRF01_AE-infected Thais, where the B*57 frequency is low. *AIDS* (2014) 28(7): 959-67.
- 4) Pathipvanich P, Tsuchiya N, Rojanawiwat A, Schmidt W-P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K. Changing burden of HIV/AIDS to clinical settings in northern Thailand over fifteen years. *Jpn J Infect Dis* (2013) 66(5):375-8.
- 5) Sapsutthipas S, Tsuchiya N, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Takeda N, Isarangkura-na-ayuthaya M, Kameoka M. CRF01_AE-specific neutralizing activity observed in plasma derived from HIV-1-infected Thai patients residing in northern Thailand: comparison of neutralizing breadth and potency between plasma derived from rapid and slow progressors. *PLoS One* (2013) 8 (1):e53920.
- 6) Ivanova M, Ruiqing J, Matsushita M, Ogawa T, Kawai S, Ochiai N, Shivarov V, Maruya E, Saji H. MBL2 single nucleotide polymorphism diversity among four ethnic groups as revealed by a bead-based liquid array profiling. *Hum Immunol.* 2008 Dec;69 (12):877-84.

②研究内容

初年度はランパン病院で採取され、タイ NIH で保管されている HIV/AIDS 患者ゲノム・血清検体のリストアップと、先行解析されている *MBL2* 遺伝子多型データの照合、さらに匿名で連結されている臨床情報との関連を整理する。あわせて遺伝子型が実際の形質（血中 MBL 蛋白濃度）に反映していることを検証するために、保管血清中の MBL 蛋白濃度を MBL-oligomer ELISA kit (Bio Porto 社) で測定し、採血タイミングごとの経時的変化

も併せて検討する。

次年度は上記過程で収集したデータをもとに、以下の2つのデザインで統計学的な検討を行う。

1) ケース・コントロール・スタディー

ケース：タイで HIV 感染者に多くみられる4つの日和見感染症（PCP、クリプトコッカス症、結核、ペニシリウム症）の罹患歴をコホートの観察期間中に有する患者。

コントロール：末梢血 CD4 数が低値（ $<200/\mu\text{l}$ 、 $<100/\mu\text{l}$ 、 $<50/\mu\text{l}$ ）にも関わらず、上記日和見疾患を観察期間中に罹患しなかった患者。

上記2群の MBL2 遺伝子型を欠損群、低～中産生群、高産生群に層別化し、感染罹患の有無をロジスティック解析で検証し、オッズ比を検討する。

2) コホート研究：

コホートの登録患者756名全員を MBL2 遺伝子型に基き欠損群、低～中産生群、高産生群に層別化し、Cox の比例ハザードモデルを用いて上記日和見感染症の発症有無を検定する。

③予想される成果

・ CD4 数以外の PCP の危険因子を抽出でき、日和見感染の管理上有益な知見を提供できる。

・ 上記に関連して、PCP 以外の日和見感染症との相違も比較・検討できる。

・ 近年免疫抑制療法の普及に伴って増加が問題となっている、PCP をはじめとする日和見感染症の予防・管理にあたっての基礎データを提供できる可能性がある。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

平成 28 年度の本共同研究費を使用し、血中 MBL 濃度測定用の kit (Bio Porto 社 MBL oligomer ELISA-kit) を確保した。また柳澤と土屋が 11 月 29 日から 12 月 3 日までタイ保健省生命医科学研究所へ訪問し、Nuanjun 博士及び Archawin 博士との研究打ち合わせ、および追加実験を実施した。具体的にはデータセットから抽出された情報による統計上のサブ解析と、保存血漿を使用した血中 MBL 濃度の測定・検討を行った。

1) ケース・コントロール・スタディー

32 人の MBL 欠損型の *MBL2* 遺伝子多型患者 (MBL-def: 4 人に PCP 既往あり、28 人はなし) と 88 人の非欠損型 (non-def: 18 人に PCP 既往あり、70 人はなし) をランダムに抽出し、PCP を含む日和見感染 (OIs) 発症に関するロジスティック解析を行った。その結果 $CD4 > 50/\mu L$ の患者において、MBL-def であることはオッズ比 4.42 (95%CI 1.12-16.3, $p=0.026$) で PCP 発症と関連するとの試算を得た。この傾向は他の OIs (クリプトコッカス症、結核、ペニシリウム症) では認められなかった。

また 28 名の MBL-def 患者血漿と 89 人の non-def 患者血漿を抽出し、MBL 濃度を測定・比較したところ、中央値は 230.4 ng/ml および 1471.1ng/ml と良好に分離されており、解析済みの遺伝子多型の結果と実際の MBL 濃度がよく相関することが確認できた。

2) コホート研究

現地渡航後にデータセットを確認した結果、ほとんどのサンプルが外来通院中に採取されたものと判明し、抗 HIV 療法ならびに予防的抗菌薬投与など、何らかの介入を受けた後のものと考えられた。このような条件下では、*MBL2* の遺伝子多型、急性炎症期～安定期の血中 MBL 濃度、治療介入前か否かといった交絡因子を含めて OIs 発症の頻度を解析する必要があり、現在研究デザインの再検討を行っている。

②成果 (結果+考察)

前記の通り、 $CD4$ 数: $50 \sim 200/\mu L$ の HIV 感染者において、MBL 欠損型遺伝子多型の存在が有意に PCP 発症を増加させている試算モデルを得ることができ、本研究の作業仮説を裏付けるデータと考えられる。現在、*MBL2* 遺伝子多型と患者 MBL 濃度の関連を、さらにサンプル数を増やして解析することを検討中である。

③成果の公表

上記成果に関して、今のところ未発表である。29 年度以降、論文化および日本感染症学会等での発表を目指していく。

6. 自己評価

群馬大学での先行研究で得られた成果を国外のコホートに拡大して再検討した結果、CD4 数 50~200/ μ l というカテゴリー内ではあるものの、PCP 発症と *MBL2* 遺伝子変異が関連するという試算が得られたことは大きな意義を有するものと考えます。

代表的な AIDS 指標疾患である PCP の発症に、個体の遺伝的素因が関与する可能性を示した初めての報告であり、臨床的なインパクトは強い。また日本初のエビデンスが国際共同研究に発展し、有意義な知見を得られたことも日本の学術発展上、非常に意義深いものと考えられる。以上のように、研究の進捗状況は概ね順調であり、29 年度も継続を申請したい。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- Ⓒ （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：赤痢アメーバにおける表面レクチンサブユニット（Igl）の機能解析
課題番号：28－一般－5

2. 代表者：橋 裕司（東海大学医学部・教授）
共同研究者：牧内 貴志（東海大学医学部・助教）
加藤 健太郎（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

3. 決定額：450千円

4. 申請時書類より

①研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は熱帯・亜熱帯を中心に世界中に分布しており、年間約5千万人が大腸炎や肝膿瘍を発症し、約10万人が死亡している。わが国においても赤痢アメーバ症の患者数は年々増加傾向にあり、2013年には報告数が初めて1,000例を超えるなど、大きな問題となっている。赤痢アメーバが病原性を発揮するには宿主細胞への接着が必須の過程であり、ガラクトース・N-アセチルガラクトサミン特異的な表面レクチン (heavy subunit of Gal/GalNAc lectin, Hgl) が重要な役割を果たしている。本研究申請者の橋らは、Hglとは別の表面分子が宿主細胞への接着に重要であることを明らかにし、この分子を intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin (Igl) と命名した (Cheng *et al.*, Infect. Immun., 2001)。Iglには Igl1 と Igl2 の2つのアイソタイプが存在しており、特に Igl1 について赤痢アメーバ症の診断や予防への応用を検討してきた。しかし、接着にかかわるドメインについての詳細はまだ解明されていない。本研究では、最近明らかになった Igl の新規機能に着目することにより、機能部位の検索を行う。そして、アメーバの病原性における Igl の役割を明確にすることを目的としている。

②研究内容

今年度の共同研究においては、まず、*Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子をそれぞれ高発現する赤痢アメーバ株の樹立を試みる。発現ベクターにそれぞれの *Igl* 遺伝子を組み込み、リポフェクション法によって虫体に導入する。G418を含む培地を用いて遺伝子導入細胞を選択し、G418濃度を上げながら継代馴化させて安定した株を確立する。これらの株を用い、虫体の赤血球や宿主細胞に対する接着活性、溶血活性、赤血球貪食能等に及ぼす Igl 過剰発現の影響について、発現ベクターのみを導入した株と比較検討する。特に Igl1 と Igl2 の過剰発現株に関して、両者間で機能の違いがあるかどうかについても検討する。

次に、*Igl* 遺伝子の発現抑制株の樹立を試みる。*Igl1* と *Igl2* 遺伝子の塩基配列の相同性が高いので、それぞれの *Igl* 遺伝子の発現抑制が困難な場合には、両方の遺伝子を同時に発現抑制する株を作製する。虫体の赤血球や宿主細胞に対する接着活性、溶血活性、赤血球貪食能等に及ぼす影響について、ベクターのみを導入した株と比較検討する。

③予想される成果

これまで Igl の *in vitro* 系での機能評価は、赤血球や Chinese hamster ovary (CHO) 細胞への接着活性、赤血球貪食能、CHO 細胞への傷害活性を指標としてきた。その際には、赤痢アメーバ栄養型虫体と宿主細胞との反応系に Igl を加えて競合させる方法、あるいはモノクローナル抗体で虫体を前処理した後に宿主細胞と反応させる方法などを用いた。しかし、操作が煩雑になることや、定量的に評価することが容易ではないなど、問題があった。今回、加藤が見いだした溶血活性を指標とすれば、虫体そのものを用いることなく、遊離ヘモグロビンを測定することで、定量的に活性を評価することができる。それによって、Igl における接着活性や溶血活性を有する部位を絞り込むことが可能になり、より効果的で安全なワクチンを開発する上で重要な情報が得られると期待できる。また、Igl1 と Igl2 の比較によって、アイソタイプ間で接着活性・溶血活性に差異が存在するのか、あるいは発現量の差異がより重要なのかを明らかにできる。更に、病原性のない *E. dispar* においても同様の活性が存在するのかどうかを解析することによって、Igl が宿主細胞への病原性に関わるだけでなく、腸粘膜のムチン層への接着やアメーバの食胞内における赤血球の消化等においても重要な役割を演じている可能性を明らかにできる。また、蛍光物質を内包したナノ粒子を用いることで、Igl の宿主細胞に対する作用をリアルタイムで観察することが可能になる。そして Igl 遺伝子の発現量改変株を樹立して比較解析することで、Igl の機能を明確に証明できると考えられる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

1) 非病原性アメーバ *Entamoeba dispar* の Igl による溶血活性の測定

E. dispar SAW1734RclAR 株について、Igl1 の全長と C 末端側断片の組換えタンパク質を大腸菌を用いて発現させた(長崎大学組換え DNA 実験承認番号:第 1503131304-2 号)。赤痢アメーバの全長 Igl および Igl 断片と *E. dispar* の全長 Igl および C 末端側断片の溶血活性を比較した。

2) 赤痢アメーバの Igl 遺伝子発現抑制株の樹立および溶血活性の測定

psAP2-Gunma plasmid を用いて、赤痢アメーバ HM-1:IMSS G3 株から Igl 遺伝子を発現抑制した株を樹立した。Igl 遺伝子発現抑制株とベクターのみ導入したコントロール株を用いて溶血活性の比較を行った。

②成果 (結果+考察)

1) 非病原性アメーバ *Entamoeba dispar* の Igl による溶血活性の測定

昨年度、*E. dispar* の Igl に赤痢アメーバの Igl と同程度の溶血活性があるという予備実験結果を得たので、本年度はさらに詳細な検討を行った。その結果、*E. dispar* の Igl に赤痢アメーバの Igl と同程度の溶血活性があることに加え、*E. dispar* Igl の C 末端側に溶血活性が存在することが明らかになった (図 1)。*E. dispar* は赤痢アメーバと比較して溶血活性が低く、Igl の発現量も低いことが報告されており、Igl 発現量の差が病原性の差に関係していることが予想された。

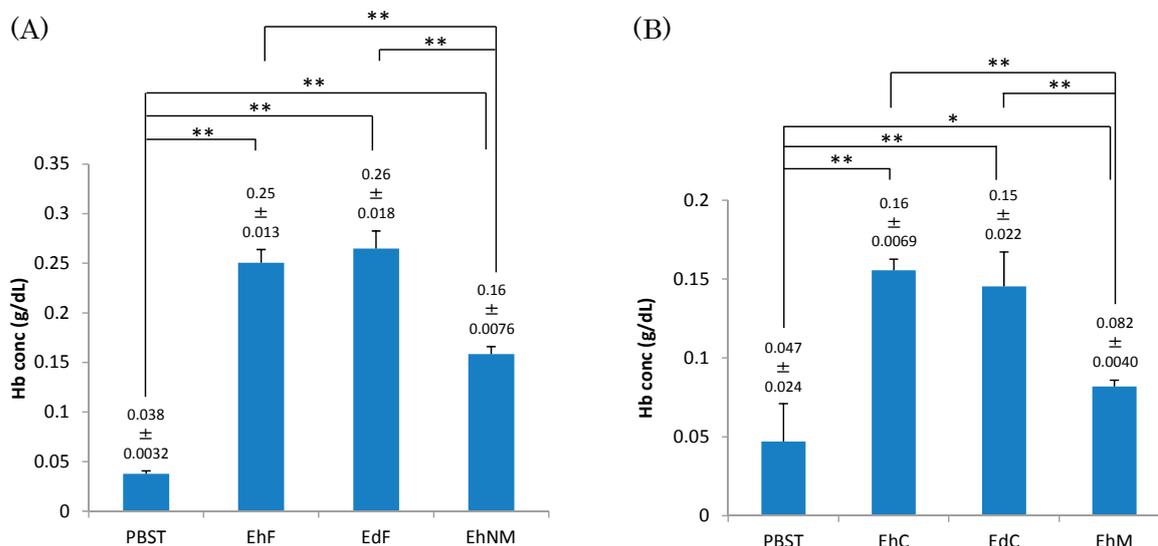


図 1. 赤痢アメーバの全長 Igl (EhF) および Igl 断片 (EhC, EhNM, EhM) と *E. dispar* の全長 Igl (EdF) および Igl 断片 (EdC) による溶血活性の比較 EhF と EdF の溶血活性の比較(A)、EhC と EdC の溶血活性の比較(B)において、ともに有意差はなく、同程度の溶血活性が認められた。

2) 赤痢アメーバの *Igl* 遺伝子発現抑制株の樹立および溶血活性の測定

上述 1) の結果より、赤痢アメーバの *Igl* 発現抑制株を作製し、溶血活性に与える影響を調べた。*Igl* 発現抑制株 (*Iglgs*) において、実際に *Igl1* の産生量が抑制されていることを *Igl1* 特異的なヒトモノクローナル抗体 (XEhI-20) を用いたウェスタンブロッティング法により確認した (図 2 A)。*Igl* 発現抑制株とコントロール株 (Control) を用いて溶血活性を比較した結果、*Igl* 発現抑制株で溶血活性が低下している結果が得られ (図 2 B)、赤痢アメーバの栄養型虫体による溶血に *Igl* が関与していることが明らかとなった。

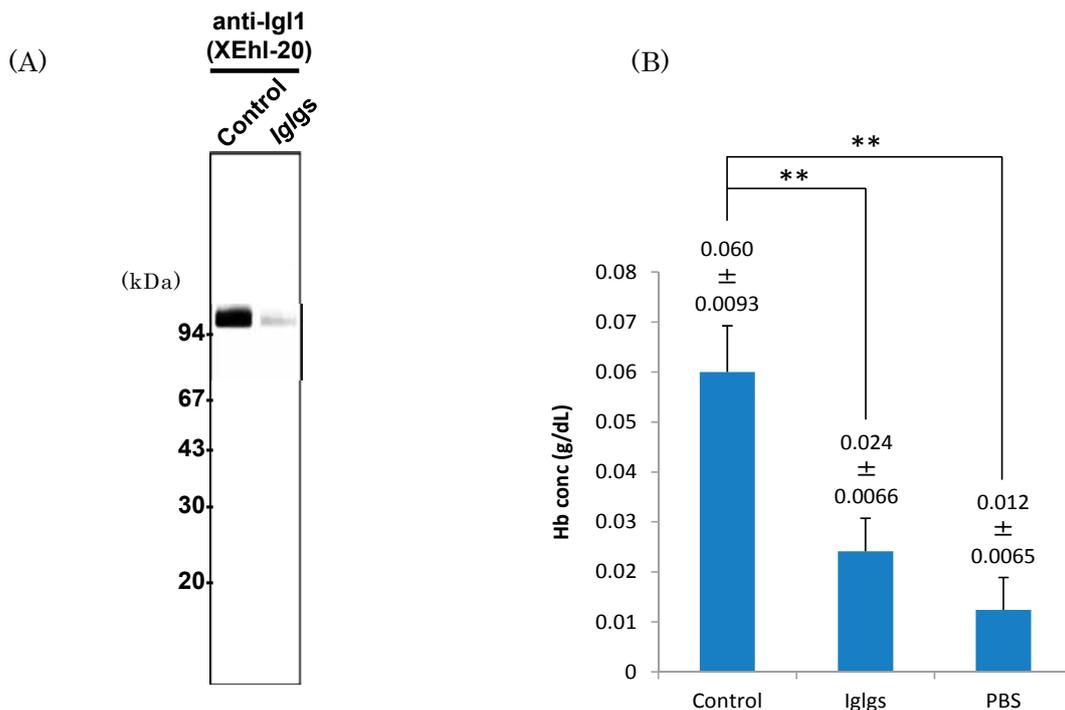


図 2. 赤痢アメーバの *Igl* 発現抑制株における *Igl* 産生量のウェスタンブロッティング法による解析 (A) と *Igl* 発現抑制株における溶血活性の測定 (B)

③成果の公表

1. 加藤健太郎、橘 裕司: *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* レクチンの活性比較研究 (第 35 回日本糖質学会年会、高知市文化プラザかるぽーと、2016 年 9 月 3 日)
2. 加藤健太郎、牧内貴志、橘 裕司: *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の *Igl* レクチンの活性比較研究 (第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 1 日)

昨年度と今年度の共同研究の成果について、現在論文投稿中である。

6. 自己評価

今年度も昨年度と同じ構成メンバーによる共同研究であり、それぞれが得意な分野を分担して実施することにより、効率よく研究を推進することができた。今年度は特に、赤痢アメーバにおいて *Igl* 遺伝子の発現抑制株の樹立に成功し、それをを用いて溶血活性を測定できたことを評価したい。*Igl1* と *Igl2* の遺伝子配列は相同性が高いため、それぞれ単独での発現抑制株の樹立が困難なことは想定内であり、アイソタイプ特異的なモノクローナル抗体を利用することで、遺伝子発現量の多い *Igl1* の産生が抑制されると溶血活性が低下することを確認できた。過去の研究結果も踏まえ、赤痢アメーバと *E. dispar* の性状の差異における *Igl* の関与について結論を導き出せた。発現抑制株で明瞭なデータが得られたので使用しなかったが、*Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子をそれぞれ高発現する株も樹立できている。一部実施しなかった実験もあるが、全体的には納得のいく成果が得られたので、達成度はⅢとした。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- ⒸIII （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：臨床試験に向けての新規マalariaワクチン BDES-NPV の製造プロセスと品質管理に関する研究

課題番号：28－一般－6

2. 代表者：伊従 光洋（金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授）
共同研究者：吉田 栄人（金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）
吉田 邦嵩（金沢大学医薬保健学総合研究科医科学専攻・大学院生）
Fitri Ameria（金沢大学医薬保健学総合研究科創薬科学専攻・大学院生）
坂口 美亜子（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

3. 決定額：400 千円

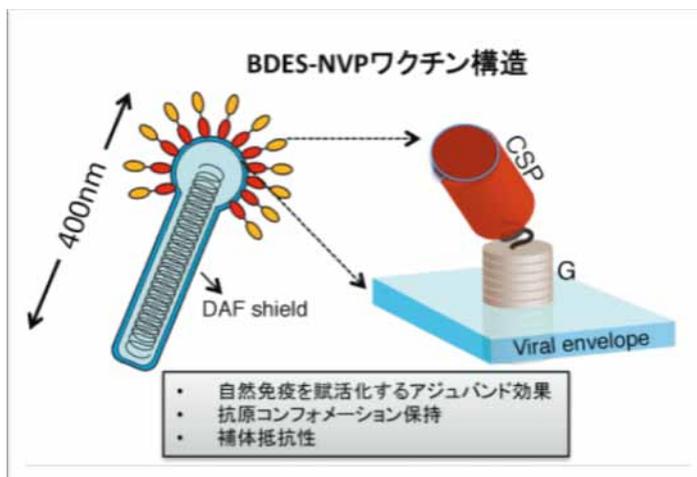
4. 申請時書類より

①研究目的

非感染性バキュロウイルスナノ粒子ワクチンシステム（BDES-NVP: Non-infectious Viral Particle Baculovirus Dual Expression System）を技術基盤として、ワクチン開発が困難とされるマalariaワクチン開発に挑戦する。既に、熱帯熱マalaria PfCSP 抗原を発現するコンポーネント-DNA ハイブリッド型 BDES-NVP ワクチンを構築し、このワクチンが遺伝子組換えマウスマalaria原虫に対し、>60%感染防御効果を達成している。100%感染防御効果に向けての改良を実施しているが、本申請課題では臨床応用に向けての BDES-NPV の製造プロセス、品質管理についての標準化と仕様の確定を2年間の研究目的とする。

②研究内容

【BDES ワクチンの概図】：全長 400 nm のマッチ棒状のナノ粒子ワクチンで、TLR9 を介して自然免疫を賦活化する特殊なアジュバント効果がある（右図）。BDES ウイルス表面にマalariaワクチン抗原 CSP と補体抵抗分子 DAF を発現提示している。コンポーネントワクチンと DNA ワクチンとの両機能を併せ持つ細胞性・液性両免疫を効果的に誘導できる新しいコンセプトのハイブリッド型ワクチンプラットフォームである。



【平成28年度計画】製造プロセスの標準化、コスト低減、閉鎖系での製造のためにアフィニティーカラムによる精製法を検討する。BIA セパレーションズ社が開発した次世代型「CIM multus™」モノリスカラムを第一選択カラムとして、昭和電工（株）と共同でワクチン製造プロセスの検討を行う（金沢大）。アフィニティーカラムで精製した各フラクションは電子顕微鏡観察を行う（熱研 坂口）。具体的には、BDES-NPV の形状の定性化およびマラリア抗原の発現量の定量化（免疫電顕）を実施する。

③予想される成果

①BDES-NPV の製造プロセス、安定剤・保存方法の決定により品質管理システムが確立される。BDES-NPV の大量培養技術はすでに確立されており、安価で利便性が高い。BDES-NPV は BSL 1 で安全性が高く、ヒトへの応用が可能な新規ワクチンベクターとなることが期待される。

②本申請課題と並行して、英国ジェンナー研究所が開発したチンパンジーアデノウイルス(ChAd63)と我々が開発した BDES-NVP との Heterologous Priming-Booster 免疫法による非臨床動物実験で、100%感染防御を目指している。マラリア臨床試験は日本では困難なため、ヒトチャレンジ感染試験の設備が整っているジェンナー研究所と共同で研究を推進するが、BDES-NVP の品質管理システムが整うことによりスムーズに First-in-Human 臨床試験へと進むことが可能となる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

(1) Sf-9 細胞の培養とバキュロウイルスの増幅

Sf-9 細胞 (*S. frugiperda*, 11496-015, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) はペニシリン/ストレプトマイシン (ThermoFisher) 含有 Sf-900II SFM 培地 (ThermoFisher) を用いて 27°C で培養した。細胞継代は 5 日間隔で行い、3 ヶ月もしくは 30 代を長期継代の上限とした。精製にはウイルス粒子上に外来抗原を発現しないコントロールウイルス (GL3-Spiner) を使用した。ウイルス増幅は 10^6 細胞/ml の Sf-9 細胞に対し、multiplicity of infection (m.o.i.) = 0.1 でストックウイルスを感染させ、三角フラスコ内で 5 日間振とう培養した。ウイルス溶液の回収は 2000 x g で 20 分間遠心することで行い、ウイルスを含む上清を分注して 4°C で保存した。

(2) Benzonase 処理

清澄化したウイルス溶液は 150 KU/L の Benzonase (Benzonase purity grade II, Merck, Darmstadt, Germany) で 1 時間処理し、遊離 DNA を除去した。

(3) 陰イオンクロマトグラフィー

「CIM multus™」monolith カラム (BIA Separations, Ljubljana, Slovenia) の中から、イオン交換用として CIM QA カラムを使用した。ウイルス溶液は 0.8 μm フィルター (Millex AA filter, Millipore, MA, USA) を用いて夾雑物を除去し、1 mL カラム容量

のそれぞれの monolith カラムへ注入した。カラムの平衡化とウイルス吸着後の洗浄は HEPES バッファー (50 mM, pH7.2) で行った。カラムからのウイルスの溶出には、1M NaCl 含有 HEPES バッファー (50 mM, pH7.2) を連続的もしくは段階的に上昇させて使用した。QA カラムの再生には 60 カラム容量の 2M NaCl / 1M NaOH を用いた。

(4) タイトレーション (限界希釈法)

GL3-Spier ウイルスは組換え DNA により感染した Sf-9 細胞でのみ緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現させる。ウイルス力価の測定にあたっては段階的に希釈したウイルス溶液を Sf-9 細胞に感染させ、EGFP を発現した (感染した) 希釈率の上限を用いて以下の式に従い算出した。

$$\text{感染力価 (pfu/ml)} = \text{希釈率} / \text{感染ウイルス溶液量 (ml)}。$$

(5) 透過電子顕微鏡法

バキュロウイルスの形態観察は電子顕微鏡 JEM-1230 (JEOL 社、80 kV acceleration voltage) を用いて行った。画像取得は 2k x 2k Veleta CCD カメラ (Olympus Soft Imaging Solutions 社) を用いた。

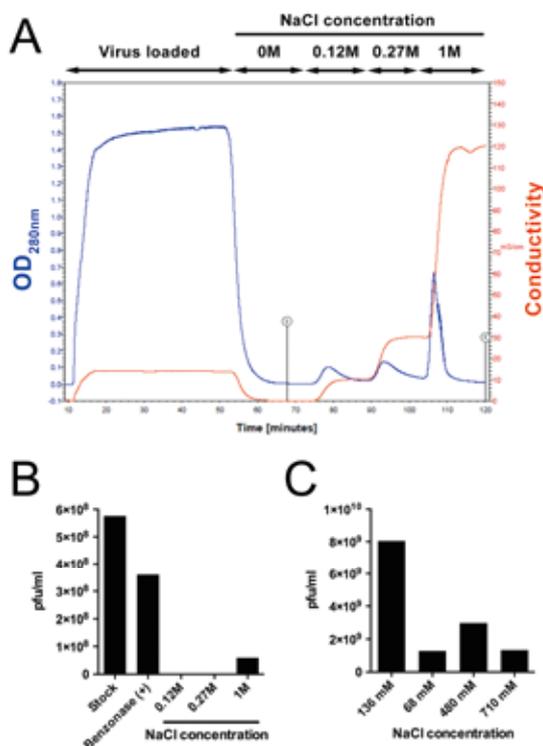


図1. Monolith カラムによるバキュロウイルスの精製. (A) 40 mL の GL3-Spier ウイルス培養上清のステップグラジエント精製. (B) (A) の各画分におけるウイルス力価. (C) 各濃度の NaCl 処理後のウイルス力価.

不明であるが、benzonase は精製対象のウイルス DNA に対して反応するわけではなく、また、高額であることから今後の精製には不要であると考えた。

②成果 (結果+考察)

BDES-NPV ワクチンの製造プロセスの標準化、コスト低減、閉鎖系での製造のためにアフィニティーカラムによる精製法の検討を行った。「CIM multus™」 monolith カラムを用いたイオン交換クロマトフィー法によるウイルス精製を確立するため、各種条件検討を行った。条件検討用としてマラリア抗原を発現しないコントロールウイルス GL3-Spier を用い、至適条件で増殖し清澄化後にカラムでの精製を試みた。

Benzonase は DNA 分解酵素であり、遊離 DNA を除去することで精製効率を上げると言われている (Gerster *et al.*, J. Chromato. A, 2013)。そこで精製前のウイルス溶液を benzonase 処理したところ、ウイルス力価が処理前の 5.8×10^8 pfu/ml から 3.6×10^8 pfu/ml (62%) に減少した (Fig. 1B)。Benzonase は宿主細胞にもウイルス粒子内にも侵入することができないため、遊離 DNA や壊れたウイルス粒子に作用すると考えられる。本結果で力価が減少した理由は

次にウイルス溶液をカラムに注入後、50 mM HEPES バッファーで洗浄し、0.12M NaCl、0.27M NaCl ならびに 1M NaCl 含有 HEPES バッファーでステップグラジエント溶出を試みた。NaCl 濃度はリニアグラジエント溶出を利用した予備実験の結果から設定した。検出されたタンパク質濃度 (OD_{280nm}) から溶出の有無を推定すると、0.12M NaCl ならびに 0.27M NaCl の注入後では弱いピークしかなく、1M NaCl 注入後に強いピークがあることから溶出可能な NaCl 濃度は約 0.3M ~ 0.5M NaCl と考えられた (Fig. 1A)。力価測定の結果、注入前のウイルス濃度である 3.6×10^8 pfu/ml に対して、0.12M NaCl ならびに 0.27M NaCl は検出限界以下 ($<2.0 \times 10^6$ pfu/ml) であったのに対して、1M NaCl での溶出ピーク画分では 5.9×10^7 pfu/ml (16%) であり精製には成功したが力価は激減した (Fig. 1B)。正確な溶出可能 NaCl 濃度を明らかにすることが課題であるが、一方で使用しているバッファーの浸透圧が力価低下をまねている可能性が考えられた。

そこで、超遠心法による高純度精製後のバキュロウイルスを用いて、異なる NaCl 濃度のバッファー中で保存し、ウイルス力価を測定した。等調 (PBS)、低張ならびに高調の各保存液中において 24 時間以上 4°C で放置した後力価を測定した。その結果、PBS 保存ウイルス (136 mM NaCl) が 8.0×10^9 pfu/ml であったのに対し、低張液 (68 mM NaCl) 中では 1.3×10^9 pfu/ml (16%)、高調液① (480 mM NaCl) 中では 3.0×10^9 pfu/ml (37%)、高調液② (710 mM NaCl) 中では 1.3×10^9 pfu/ml (16%) と力価が減少することが明らかとなった (Fig. 1C)。

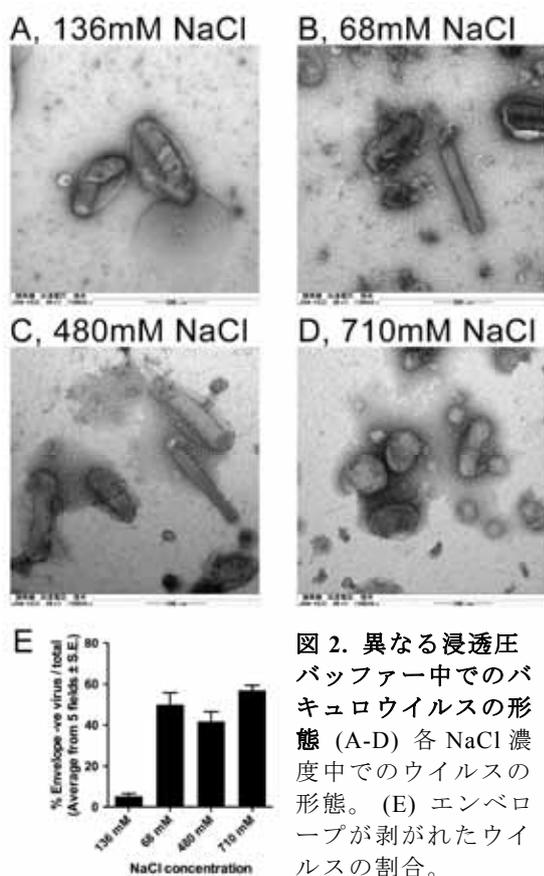


図 2. 異なる浸透圧バッファー中でのバキュロウイルスの形態 (A-D) 各 NaCl 濃度中でのウイルスの形態。(E) エンベロープが剥がれたウイルスの割合。

上記の浸透圧を変化させた保存サンプルについて、電子顕微鏡を用いて形態観察を行った。PBS 保存ウイルス (Fig. 2A, 136 mM NaCl) ではエンベロープを欠いたウイルスは 5% であったのに対し、低張液サンプル (Fig. 2B, 68 mM NaCl) ではエンベロープ欠損ウイルスは 49% であった (Fig. 2E)。高調液①サンプル (Fig. 2C, 480 mM NaCl) ならびに高調液②サンプル (Fig. 2D, 710 mM NaCl) ではそれぞれ 41% ならびに 57% がエンベロープを欠いていた (Fig. 2E)。特に高調液②サンプルではウイルス体積が減少した球状の粒子が多く見られた。

以上の結果から、バッファーの浸透圧がバキュロウイルスの精製時に重要な因子となることが明らかとなり、平衡時ならびに洗浄時には等張液を使用すべきであり、溶出時に使用する NaCl 濃度は最低限に抑え即座に等張液に置換する必要があると考えられた。

上記の結果を踏まえ、ウイルス溶液の pH、カラムへのインジェクション量、カラムのポアサイズ、ならびに溶出条件 (NaCl に

よるリニアグラジエント及びステップグラジエント)などを比較検討し、最適条件を明らかとした。同条件を用いてカラムで精製した各フラクションの電子顕微鏡観察を行ったところ、最も高効率に溶出できた画分のウイルス形態は正常なものが多かったが、それ以外の特に低調液画分においてはエンベロープを欠くウイルス粒子の割合が高くなっていた。この結果は上述の低張保存液を使用した実験データ、ならびに、高効率溶出画分でエンベロープ膜タンパクの発現がより多く確認できたウエスタンブロットティングのデータと一致している(データ未提示)。現在、マラリア抗原を発現するワクチン用ウイルスにサンプルを変えてのウイルス精製に進展している。

③成果の公表

[学会発表]

1. ○伊従光洋、吉田栄人. 蚊唾液タンパクの能動免疫によるネズミマラリア原虫に対する感染防御効果. 第 67 回日本衛生動物学会大会. 栃木. 2016 年 4 月.
2. ○Kunitaka Yoshida, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Shigeto Yoshida. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第 14 回松山国際学術シンポジウム. 愛媛. 2016 年 9 月
3. ○吉田邦嵩, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, 所正治, 伊従光洋, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, 吉田栄人. アデノウイルスベクターとバキュロウイルスベクターを用いた新規ワクチンプラットフォームによる熱帯熱マラリアワクチンの開発. 第 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 岐阜. 2016 年 10 月
4. ○Kunitaka Yoshida, Mitsuhiro Iyori, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Shigeto Yoshida. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第 57 回日本熱帯医学会大会. 東京. 2016 年 11 月
5. ○Kunitaka Yoshida, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Shigeto Yoshida. Enhanced protective efficacy of a *P. falciparum* malaria vaccine using a heterologous prime-boost immunization with a baculoviral vaccine and ChAd63 expressing PfCSP against challenge with a transgenic *P. berghei* sporozoites. ASTMH 65th Annual Meeting. Atlanta. 2016 年 11 月
6. ○Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Sota Ogata, Hidesato Nishiura, Miako Sakaguchi, Masanori Mizutani, Takahiko Tamura, Kento Genshi, Satoshi Shimada, Daisuke S. Yamamoto, Hiroyuki Matsuoka and Shigeto Yoshida. Vectored PfCSP Vaccines based on Baculovirus Dual Expression

System and AdHu5 induce Strong Protective Efficacy against Transgenic *Plasmodium berghei*. ASTMH 65th Annual Meeting. Atlanta. 2016 年 11 月

7. 伊従光洋. 超高齢社会に求められる新しいコンセプトの抗血小板薬の開発研究. 日本薬学会北陸支部第 128 回例会. 金沢. 2016 年 11 月
8. ○Kunitaka Yoshida, Mitsuhiro Iyori, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Shigeto Yoshida *Plasmodium falciparum* CSP vaccine based on a heterologous adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen confers sterile protection against transgenic *P.berghei* sporozoite challenge The U.S. - Japan Cooperative Medical Sciences Program Presents the 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). ソウル. 2017 年 2 月

6. 自己評価

- Monolith カラムを当研究室の液体クロマトグラフィーシステムにて使用し、最終的にウイルスの精製ならびに力価測定まで達成できた点は評価に値する。
- 初期の実験ではフローの遅延ならびに停滞が頻発し、思ったように精製が進展しなかった。これはカラムのポアサイズが 0.2 μm とウイルスサイズに近い直径で行ったため、カラムが詰まったことが原因であった。現在ではサイズを大きくして実験を行っているが、判明するまで時間を大きくロスした。
- 最終的には完全閉鎖系での精製を目指しているが、研究室の設備上、クリーンベンチの外で実験を行う選択肢しかない。このため、易感染性のバキュロウイルス培養液には常に細菌や真菌の汚染のリスクに晒されており、実験のうち何度か力価測定に失敗している。
- ウイルス精製と力価測定には成功しているが、力価自体は精製前より低いか同程度であり、濃縮できていない点に不満が残る。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (6 の自己評価で述べておれば省略して良い)

平成 28 年度共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：北海道のエゾシカにおけるマダニ媒介性ウイルスの血清・分子疫学調査

課題番号： 28 - 一般 - 7

2. 代 表 者：内田 玲麻（酪農学園大学 獣医学群・獣医学類・助教）

共同研究者：Mya Myat Ngwe Tun（長崎大学熱帯医学研究所・特任研究員）

3. 決 定 額： 450 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

近年、マダニにより媒介されるウイルス感染症が問題となっている。重症熱性血小板減少症候群（SFTS）、ダニ媒介性脳炎、クリミア・コンゴ出血熱等のマダニ媒介性ウイルス感染症は、その多くが人獣共通感染症であり、宿主となる動物の感染状況を知ることが、ウイルス分布域の把握、防疫対策等において重要である。

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）はブニヤウイルス科の重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）により引き起こされる、発熱、消化器症状等を主徴とした、マダニ媒介性の新興感染症である。本感染症は 2011 年、中国において報告され、2013 年には日本の山口県でも患者が報告された。その後、西日本を中心に患者が報告され、同地域における野生のイノシシ、シカが本ウイルスに対する抗体を保有することが確認されている。

一方、ダニ媒介性脳炎は、フラビウイルス科のダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）により引き起こされる、重篤な脳炎症状を主徴とするマダニ媒介性の人獣共通感染症である。日本では、1993 年、北海道道南地方において患者が確認され、以降、同地域において、小型げっ歯類、イヌ、ウマ等の TBEV に対する抗体保有が報告されてきた。国内におけるシカの抗体保有状況は不明であるが、ヨーロッパでは野生のシカから、TBEV の遺伝子が検出されており、ウイルスの分布域を把握する上で、センチネルとしてシカの利用が提唱されている。

本研究では、北海道に広く分布するエゾシカ（*Cervus nippon yesoensis*）の血清を用い、SFTSV、TBEV に対する抗体保有状況、およびウイルス遺伝子を調べることで、本ウイルスの北海道における侵淫状況を明らかにすることを目的とする。

②研究内容

北海道日高地方、道北地方、および道東地方で採取されたエゾシカの血清（各 100 検体、計 300 検体）を共試する。

① 血清学的調査

抗体調査として、SFTSV の組換え Nucleocapsid (Yu F. *et al.*, *Virology* 2015)、

およびホルマリン不活化 TBEV 抗原 (Tun MM. *et al.*, *Sci Rep.* 2014) を用いた Indirect ELISA を実施する。また、血清学的調査により、陽性が疑われたサンプルに対して、SFTSV Yamaguchi 株、TBEV Oshima 株、および長崎大学の保有する、TBEV に近縁のフラビウイルス (Apoi virus, Negishi virus 等) を用いた中和試験 (FRNT) を実施する。

② 遺伝子学的調査

血清ないしは血液より Total RNA を抽出し、Reverse Transcription PCR (RT-PCR) により、SFTSV (L、S セグメント領域)、TBEV (NS1 領域) 遺伝子の検出を行う。増幅の見られたサンプルは、L セグメント領域 (SFTSV)、または E 領域の塩基配列に基づき、系統樹解析を実施する。

SFTSV、TBEV は感染症法において三種病原体に分類され、その取り扱いは BSL3 内での実施が義務付けられている。また、TBEV の扱いは、感染事故防止の点からワクチン接種を受けた者が行うことが望ましい。熱帯医学研究所 ウイルス学分野は、永らく節足動物媒介性ウイルスに関する研究を専門的に行っており、貴重な野外分離ウイルスを多数保有する。また、所内に BSL3 実験施設を備え、感染性病原体の取り扱いを熟知した研究者が多く在籍する。そのため、感染性ウイルスを用いた抗原作製や、ウイルス中和試験を実施する本研究は、熱帯医学研究所 ウイルス学分野との共同研究が必要不可欠である。

③ 予想される成果

これまで、SFTS の発生は西日本に集中しており、また抗体陽性動物の北限は宮城県である (図 A)。北海道では、現在まで、抗体陽性の動物は確認されていないが、その詳細な調査数、調査地域等は不明である。一方 TBEV は、これまで、北海道では道南地方、および一部の道央地方において、抗体陽性の動物が確認されているが、道北、道東地方については未だ報告がない (図 B)。本研究で陽性検体が見つかった場合、北海道内におけるウイルス分布域の新たな拡大が示唆され、公衆衛生上、重要なデータとなり得る。

国内でこれまでに発表されている TBEV に関する血清疫学データは、小型げっ歯類、イヌ、ウマに限られ、エゾシカにおける抗体保有状況は未だ不明である。昨今、北海道では、エゾシカの農林業及び生活環境に関わる被害の深刻化を背景に、エゾシカの食関連分野での有効活用を推奨しているが、国外では、TBEV 感染ウシ、ヤギの生乳を介したヒトへのウイルスの感染が報告されている。エゾシカの TBEV 感染状況を明らかにすることは、食品衛生の観点からも重要な基礎研究と考えられる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

研究材料

北海道日高地方（100 検体）、道北地方（100 検体）、および道東地方（114 検体）で採取されたエゾシカの血清、計 314 検体を共試した。採集した血清は-30℃にて使用するまで保管した。

方法

i. 血清学的調査

採集した血清は 0.4%Blockace（DS ファーマバイオメディカル）にて 500 倍に希釈し、日本脳炎ウイルス（JEV）不活化ワクチン（阪大微生物病研究会）、SFTSV 組換え Nucleocapsid、およびホルマリン不活化 TBEV 抗原を用いた Indirect ELISA に共試した。二次抗体には 4%Blockace にて 250 倍希釈した Horseradish peroxidase 共役抗シカ IgG(H+L)（KPL）を用い、呈色基質には ABTS（KPL）を用いた。呈色反応開始 20 分後にマイクロプレートリーダー（Bio-rad）にて 415nm の吸光値を計測した。陽性検体の判定は、統計解析ソフト EZR による外れ値の検定（Smirnov - Grubbs 検定）および色調の変化に基づき実施した。

ii. ウイルス中和試験

Indirect ELISA で暫定的に陽性と判断された血清を用い、TBEV および JEV に対する中和試験を実施した。血清は 56℃、30 分間非働化し、2%牛胎児血清を含む E-MEM にて 10~20,480 倍まで 2 倍階段希釈した。希釈血清と等量のウイルス感染上清（TBEV Oshima 株および JEV JaOArS982 株）を 50 focus formation unit (FFU)/well となるよう混合し、37℃で 60 分間インキュベートした。96well プレートに用意した BHK-21 細胞に血清・ウイルス混合液を接種し、37℃で 60 分間インキュベートした。その後、1.25%メチルセルロース、2%牛胎児血清を含む E-MEM を重層し、37℃で 2 日間インキュベートした。感染細胞は 12D11/7E8 抗フラビウイルスモノクローナル抗体により検出し、3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride にて染色した。

iii. 遺伝子学的調査

日高地方および道北地方で採集された血清 200 検体より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) により RNA を抽出し、Reverse Transcription PCR (RT-PCR) により、JEV、SFTSV、TBEV の検出を行った（Uchida L *et al.*, *Sci Rep* 2014）。RNA の抽出はキットの添付書に従った。以下に本研究で用いた primer を示す。

表 1 JEV、TBEV、SFTSV 検出用 Primer

Virus	Primer name (Sequence 5'-3')
JEV	mFU1 (tacaacatgatgggaaagcgagagaaaa)
	CFD2 (gtgtcccagccggcggtgtcatcagc)
TBEV	TBE F (tggayttyagacaggaaycaacaca)
	TBE R (tccagagactytgrtcdgtgtgga)
SFTSV	SFTS_QPCR_965F (gcraggagcaacaarcaaacatc)
	SFTS_QPCR_1069R (gcctgagtcggtcttgatgtc)

③ 成果（結果＋考察）

i. 血清学的調査

Indirect ELISA の結果、JEV、SFTSV では、調査した検体は一様に低い吸光値を示し、両ウイルスに対して陽性を示す検体は確認できなかった（図 1A、B）。一方、TBEV では、日高地方の 2 検体、道北地方の 5 検体が Smirnov - Grubbs 検定で外れ値と判断され、かつ呈色反応において色調の変化が認められた（図 1C）。

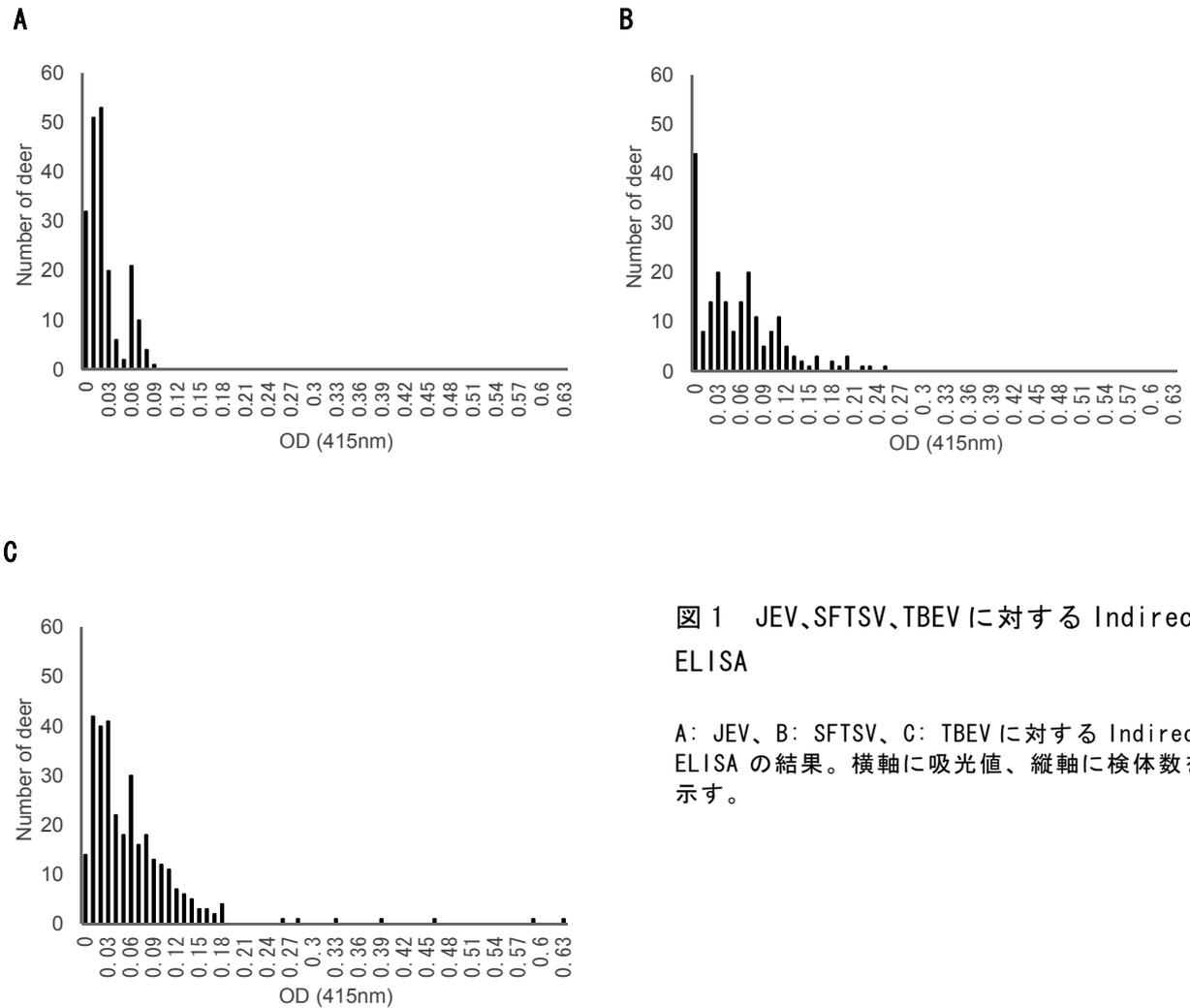


図 1 JEV、SFTSV、TBEV に対する Indirect ELISA

A: JEV、B: SFTSV、C: TBEV に対する Indirect ELISA の結果。横軸に吸光値、縦軸に検体数を示す。

これまで、JEV は北海道の豚において散発的に HI 抗体が確認されてきたが、ウイルスおよび国内での主要な媒介蚊であるコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) の定着は確認されていない。また、これまで国立感染症研究所を中心に実施されてきた野生のシカでの SFTSV 抗体調査でも、北海道では陽性抗体は確認されておらず、これらは本研究結果と一致した。一方、本結果より、これまで道南地方を中心に陽性抗体、ウイルス分離が報告されてきた TBEV は、日高地方、道北地方にも分布することが示唆された。

ii. ウイルス中和試験

Indirect ELISA で暫定的に陽性と判断された 7 検体および陰性と判断された 5 検体に対し、Focus reduction neutralizing test (FRNT) に基づく中和試験を実施した。その結果、TBEV 抗体陽性と判断された日高地方の 2 検体 (H24、H250) では中和活性が認められなかった (FRNT₅₀ < 10)。一方、道北地方の 5 検体 (T26、T33、T40、T64、T110) では、370~962 倍の範囲で TBEV に対し中和活性が認められた。また、これらの検体ではいずれも JEV に対する中和活性が認められなかったことから、TBEV に対する特異抗体を有することが明らかとなった。日高地方の 2 検体ではいずれも道北地方の 5 検体に比べ TBEV の ELISA での吸光値が低かった。以上から、今回の Indirect ELISA の Cut-off 値は 0.3 前後が妥当であると予測された。

表 2 TBEV、JEV に対する Indirect ELISA およびウイルス中和試験

Sample ID	ELISA OD value		FRNT ₅₀	
	TBEV	JEV	TBEV	JEV
H24	0.279	0.013	<10	<10
H250	0.252	0.034	<10	19
T26	0.629	0.014	451	<10
T33	0.388	0.070	370	<10
T40	0.585	0.058	573	<10
T56	0.005	0.052	<10	<10
T64	0.324	0.006	962	<10
T74	0.001	0.000	<10	<10
T76	0.001	0.000	<10	<10
T100	0.000	0.017	<10	<10
T103	0.000	0.002	<10	26
T110	0.453	0.051	797	<10

iii. 遺伝子学的調査

日高地方、道北地方のシカ血清 200 検体を RT-PCR により調べたが、JEV、TBEV、SFTSV 特異的な遺伝子の増幅は確認されなかった。TBEV では抗体陽性の個体が確認されたことから、エゾシカにおいて感染は成立するが、ウイルス血症を起こすのはまれであると予測された。

④ 成果の公表

Indirect ELISA および遺伝子学的調査の結果は 2016 年 9 月に開催された、第 159 回日本獣医学会学術集会 公衆衛生学分科会 (神奈川) にて口頭発表を行った。中和試験の結果は、これまでのデータおよび長崎の野生動物の血清疫学調査の結果と併せ、2017 年中の国内学会での発表を予定している。また、上記の結果をまとめ論文執筆を進めている。

6. 自己評価

2016年、北海道で国内二例目にして初のダニ媒介性脳炎による死亡例が報告された。ダニ媒介性脳炎は1993年、北海道道南地方で国内初となる患者が報告され、道南地方を中心にマダニ、野生小型げっ歯類、犬、馬でウイルス分離、陽性抗体が報告されてきた。これまで国内の野生動物では小型げっ歯類に関する研究報告があるものの、大型哺乳類に関する報告はなされていない。本研究ではまず、貴研究所ウイルス学分野の保有するいくつかの抗フラビウイルスモノクローナル抗体を用い、①TBEV に対する Focus reduction neutralizing test の系を確立した。また、それにより得られた結果から、②野生のエゾシカがダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)に感受性を有すること、③道南地方に加え、道北地方にもウイルスが分布することを初めて明らかとした。本研究成果は微量な血清サンプルを用いたウイルス中和試験を可能にすると共に、国内でのTBEV感染環の解明および疾病対策を講じる上での一助になると期待される。

加えて、別の preliminary な血清学的検査では、北海道札幌近郊に生息する中型哺乳類でもTBEVに対し抗体陽性を示す個体の存在が示唆された。これらのデータに基づき、現在、同地域における中型野生哺乳類の血清収集と採集したマダニからのウイルス分離を進めている。以上から、本共同研究の実施により、次の研究に発展する貴重な知見を得る事ができた。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙がらなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- ④ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ベトナムにおける自然環境由来コレラ菌のゲノム疫学的ヒト感染機構の
解明

課題番号：28－一般－8

2. 代表者：丸山 史人（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学講座・准教授）

共同研究者：野中 里佐（獨協医科大学微生物学講座・助教）

村瀬 一典（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学講座・特定助教）

3. 決定額：1,000 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

平成26年度からの継続申請であり、申請時と研究目的、予想される成果に大きな変更は無い。

細菌感染症の克服には細菌固有の生態を理解することが必須であり、臨床分離株のみならず、その細菌の自然生息環境における個体群のゲノム特性、およびその動態について知見を得る必要があると考える。これまで *V. cholerae* を含め、環境中に常在する細菌のゲノム動態解析は、①難培養性である場合が多いこと、②近年まで数百株ものゲノム配列取得は非現実的であったことから、限られた菌株における定点的な情報しか得られなかったためほとんど行われていない。これに対し、ごく最近の次世代シーケンサーの使用を主軸とした遺伝学的解析法の発展は、これらの限定要因を縮小し、包括的なゲノム情報に基づくゲノム動態の解明を可能にしつつある。本研究では、研究フィールドを周期的なコレラ流行が認められるベトナムに設定する。*V. cholerae* の環境分離株からゲノム配列を取得し、既報を含むヒト由来臨床分離株との網羅的な比較解析を行う。特に SNPs、ファージ等の外来因子およびその防御システムに着目し、その量的質的なゲノム変化を時空間的に解析することで *V. cholerae* の環境-ヒト循環におけるゲノム・遺伝子相関を明らかにすることを目的とする。

②研究内容

ベトナム北部ナムディン省の環境水（河川、農業生活用水）を採集（2ヶ月おきに年6回、3地点）し、選択培地を用いた培養法により *V. cholerae* を分離する。同時に、プラークアッセイにより環境中における *V. cholerae* の個体数制御に寄与すると考えられるファージの分離を行う。得られた *V. cholerae*、ファージから DNA を抽出し、次世代シーケンサー MiSeq を用いたゲノム解析プラットフォームに供する。得られたゲノム情報について、ベトナムにおける既報のコレラ分離株、東南アジア近隣諸国における臨床・環境分離株との比較ゲノム解析を行い、*V. cholerae* の環境-ヒト循環におけるゲノム動態を明らかにする。さらに、中央アフリカにおいて独自に単離した *V. cholerae*、世界各国で単離され

た株のゲノム情報（Genomes OnLine Database より取得）との比較解析を行い、病原型・非病原型 *V. cholerae* のゲノム動態を特徴付けていく。また、ファージ感染に対する防御免疫としての機能が報告されている CRISPR 領域に注目し、同領域の遺伝的変化と標的となるファージの同定を行う。平成 28 年度も昨年度と同様の解析を行い、季節変動による影響も明らかにする。また、今年度は特にゲノム配列を取得した非病原 O1 株と O1 classical、El tor 株を含む pandemic 株との比較ゲノム解析、近隣諸国分離株との比較ゲノム解析に重点を置き、研究目的であるところのヒトにおける病原性が特定のグループに限定される機構の解明に取り組む。

③予想される成果

得られた *V. cholerae* 分離株のゲノム情報から、環境中における個体群の季節性を含む動態と環境-ヒト循環におけるヒト感染に関わる要因が明らかになる。申請者らは既にタイにおけるコレラゲノム疫学研究を開始しており、ケニア、ガーナを拠点としたアフリカ株蒐集の準備も進めている。本研究の進展は、世界のコレラ流行地域における臨床分離株・環境分離株間のゲノム相関を明らかにするものである。また、本ゲノム情報は今後コレラ流行がベトナム地域で発生した際のレファレンスとしても利用できる。環境水から分離される *V. cholerae* は多様な抗原型を持つことが予想されるが、これまで *V. cholerae* においては PCR, LAMP 等の遺伝学的手法による抗原型判別法が一部の抗原型においてしか開発されていない。従って、このゲノム疫学研究の進展はより網羅的かつ簡便な抗原型判別法の開発に向けた基盤情報となり、日本においても近年注目される食中毒起因菌としての *V. cholerae* の型別判定にも資する。以上、本研究から得られる成果は、これまで流行を引き起こした臨床株に焦点を当てて進められてきた *V. cholerae* 研究において、自然ニッチで生息する環境株のゲノム情報から、特定の抗原型の株のみがヒトに病原性を示す機構を紐解くものであり、きわめて学問的、社会的意義が高く、自然環境に由来する種々の細菌感染症研究領域に新たな切り口を与えるものと期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

検体収集は前年度に引き続き、ベトナム北部ナムディン省チュクニン郡近郊10地点(2ヶ月おきに計6度)、隣接するタイビン省タイビン市近郊のエビ養殖池と河川16地点において環境(約3ヶ月おきに4度)水検体の採取を行った。さらに今年度はベトナム南部ベンチェ省ベンチェ市近郊エビ養殖池と河川水検体(計58検体)を別共同研究より入手し、解析を行なった。各検体は Alkaline Pepton Water を用いた1次増菌を行い、PCRによるスクリーニングと TCBS 培地を用いた選択培養に用いた。TCBS 上の各コロニーは0%、8% NaCl 含有 Nutrition broth による2次スクリーニングを行い、PCRにて *V. cholerae* の *toxR* 遺伝子の有無を確認した後、20% Glycerol 含有 LB 培地にて凍結保存した。*toxR* 遺伝子陽性の検体に関してはコレラ毒素遺伝子 *ctxA*、O 抗原をコードする *O1-rfb*、*O139-rfb* の各遺伝子を標的とする PCR を行い、病原株、もしくは類似株のスクリーニングを行なった。また、ビブリオフィージ *fs1*、*fs2* の PCR によるスクリーニングを同時に行なった。

ゲノム解析は前年度までに取得した環境由来株24株の配列取得を行なった。別共同研究で進める日本、南米、その他地域における環境分離 *V. cholerae* 株との比較ゲノム解析を現在進行している。

②成果(結果+考察)

ナムディン省から収集した環境水60検体中59検体(98.3%)、タイビン省河川水検体の12検体中12検体(100.0%)、南部ベンチェ省の河川水38検体中37検体(97.4%)が *V. cholerae* の *toxR* 遺伝子陽性を示した(表1)。一方で、エビ養殖地においてはタイビン省では45検体中41検体(91.1%)が、ベンチェ省では20検体中7検体(35.0%)が *toxR* 遺伝子陽性を示した。検体収集を行なった環境中に *V. cholerae* は常在すると考えられる結果であったが、養殖池においてはタイビン省とベンチェ省において差異が見られた。現地における聞き取りにおいて、タイビン省では飼料を与えずに水を河川もしくは海と循環させる方式を取っているのに対し、ベンチェ省ではエビのビブリオ病の防止と成長促進のために抗菌薬(オキシテトラサイクリン)を含有する飼料を与える方式を取っていた。水中の抗菌薬によって *V. cholerae* の検出が影響されることが推察されるが、本研究では分析化学的方法による抗菌薬残留量を定量していないため、今後保存検体を用いた解析を検討していく。主要病原遺伝子である *ctxA* は全ての検体で検出されず、病原性を有すると考えられるコレラ菌株は全ての地点において得られなかった。上記地域を含むベトナム国内においてコレラ患者発生の報告も無かったため、コレラアウトブレイクとの相関を見出すには至っていない。O1 抗原遺伝子はナムディン省の5検体(8.3%)、タイビン省の計7検体(12.3%)から、O139 抗原遺伝子はタイビン省の12検体(21.1%)、ベンチェ省の3検体(21.1%)にて検出された。しかし、分離の効率は低く、O1 遺伝子保有株は2株、O139 遺伝子保有株は3株分離されたのみにとどまった。これらの分離株は全ゲノム情報を取得することを予定している。常在する *V. cholerae* のゲノム動態を明らかにすることを目的として、前年度までに分離した *V. cholerae* 24株の全ゲノム配列の取得を行なった。現在、他地域分離株、並びに直近のベトナムにおけるコレラアウトブレイク時の分離株

(2007-2010 年、24 株、前年度配列取得済み)との比較ゲノム解析を進めるとともに、CRISPR 領域、水平遺伝子伝達因子であり、ビブリオ属細菌において薬剤耐性遺伝子の伝達に関与すると考えられる ICE (Integrated-conjugative element)領域、病原遺伝子伝達に関与するファージゲノムの同定を進めている。タイビン省養殖池検体では 6 月に O139 遺伝子が 81.8% (11 検体中 9 検体)、9 月に O1 遺伝子が 50.0% (10 検体中 5 検体) から見出される等、環境中に種として常在する上では明確な季節変動は見いだせないが、優占菌株の遷移が生じることが示唆された。それらの遷移をもたらすゲノム変化を現在進行している全ゲノム解析・比較ゲノム解析を通じて今後明らかにしていく。

表 1 PCR 法による *V. cholerae* 関連遺伝子スクリーニングの結果
数は陽性数を示す。

2016-2017	PCR				
	Location /source	No. samples	O1	O139	ctxA
ナムディン省 / 河川等	60	5 (8.3%)	0	0	59 (98.3%)
タイビン省 / 河川等	12	2 (16.7%)	0	0	12 (100%)
タイビン省 / 養殖池	45	5 (11.1%)	12 (26.7%)	0	41 (91.1%)
ベンチェ省 / 河川等	38	0	3 (7.9%)	0	37 (97.4%)
ベンチェ省 / 養殖池	20	0	0	0	7 (35.0%)
Total	164	12 (7.3%)	15 (9.1%)	0	156 (95.1%)

*養殖池においては休養池が生じるため、全ての地点で毎回検体収集はできていない。

③成果の公表

環境分離 O1 株の全ゲノム解析に関する成果を投稿し、査読中。

6. 自己評価

環境中における *V. cholerae* のモニタリングと環境分離株の収集では当初の予定通りに進めることができ、十分な検体収集を行うことができた。病原遺伝子保有株は得られなかったが、コレラ非流行期における *V. cholerae* のゲノム多様性を理解することは当初の目的に合致し、予定通りの進捗が得られたと考えている。別共同研究から、非病原 *V. cholerae* ライブラリー（O 抗原の異なる約 200 株）の全ゲノム配列取得とそれらの分子系統解析を終了し、投稿準備を進めている。現在最も多様性に富む *V. cholerae* ゲノムデータベースとなることから、ベトナム環境分離株の明確な位置づけとその環境中における変遷が明らかになると考えている。

本年度は熱研受け入れ研究者の所属するベトナム拠点への次世代シーケンサーの移動と再セットアップが行われ、これまで配列取得を代表者の所属する京都大学にて行っていたものをベトナム拠点で行うことに変更した。再セットアップに時間を要したことからゲノム解析の面が少々遅れ気味となったが、配列取得等は進行しており目的達成に支障はない。自己評価は遅れ気味の面を考慮して II（不満は残るが一定の成果を挙げられた）とするが、十分に挽回可能と考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の検出とその伝播に関する研究
課題番号：28－一般－9
2. 代表者：前野 芳正（藤田保健衛生大学医学部 ウイルス 寄生虫学 准教授）
共同研究者：高木 秀和（愛知医科大学 医学部 講師）
Nguyen Thi Huong Binh（ベトナム NIMPE 分子生物学部門 主任）
益田 学（順天堂大学 特定研究員）

3. 決定額：450 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

東南アジアでは、アルテミシニン誘導体に耐性を示す熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）が検出され、マラリア根絶コントロールを目指す世界的活動に対する脅威となった。そのため、アルテミシニン耐性の拡大監視が喫緊の課題である。最近の研究において PF3D7_1343700 kelch propeller domain（「K13-propeller」）遺伝子内の変異とアルテミシニン耐性との関連が *in vitro* および *in vivo* で明らかにされた。この変異型遺伝子の出現頻度の上昇は、西カンボジアにおける最近の耐性拡大と相関していることが報告されている。しかし、耐性原虫の拡散に係わる重要な問題点と思われる耐性マラリア原虫の伝播については検討されておらず、解明すべき点とされる。かかる状況において、カンボジアの隣国であるベトナムにおけるアルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の出現に関する報告は一部でなされているが、十分な調査、検討がされていない。これに対し、最近十余年に採取された原虫サンプルの解析から得られた種々の基礎資料を持つ申請者らが本研究を実行することは、喫緊の問題解決において大きなアドバンテージがある。本研究では、アルテミシニン耐性の拡大を監視すると共に、大メコン圏におけるアルテミシニン耐性原虫の実態解明とその対策のための基盤資料の作成も目的とする。

②研究内容

調査研究実施地域：

本申請課題は宿主と媒介蚊から原虫を検出することが重要であるため、フィールドサンプルを使用した解析が主体となる。耐性原虫の解析にはこれまで保存しているサンプルおよび新たに採取したサンプルを使用する。新たなサンプル採取は、耐性原虫の拡散状況の実態解析結果の信頼性を増すため必須となる。

●サンプル採取を行い、DNAを保管している地域。継続的にサンプル採取を行う地域。
ベトナム：カンホア省、ビントゥアン省、カンボジア国境と接するビンブック省およびその他の地域。6. 研究内容（2年以上の研究期間の課題の場合は、次年度以降の計画の概要も記載願います。）

調査研究実施地域：

本申請課題は宿主と媒介蚊から原虫を検出することが重要であるため、フィールドサンプルを使用した解析が主体となる。耐性原虫の解析にはこれまで保存しているサンプルおよび新たに採取したサンプルを使用する。新たなサンプル採取は、耐性原虫の拡散状況の実態解析結果の信頼性を増すため必須となる。

●サンプル採取を行い、DNAを保管している地域。継続的にサンプル採取を行う地域。
ベトナム：カンホア省、ビントゥアン省、カンボジア国境と接するビンブック省およびその他の地域。

材料：

ヒト血液サンプル

1. 調査対象地域で採取した血液サンプル検討対象とする。過去に採取し、そのDNAを保存しているサンプルはそのまま解析に使用する。
2. 新たなサンプル採取は以下のように実施する。
 - (ア) 血液サンプルの採取は、指頭穿刺後、ろ紙採血、乾燥を行い、地域のヘルスセンター等で保存。同時に血液ギムザ染色標本によるマラリア感染の有無等を判定する。一定期間ごと、ベトナム国立マラリア寄生虫学昆虫学研究所にサンプルを集積し、LAMP法によるスクリーニングテストを行う。同時に同一サンプルの半分を日本へ輸送し、解析試料とする。
 - (イ) 採血と同時に住民の行動調査や医学的基礎資料(身長、体重、貧血等)となりうるデータを収集する。サンプル採取は調査対象地域のヘルスセンター等が主体となり実施する。
*殊に、住民行動調査は媒介蚊採取のための重要な基盤となる。

媒介蚊サンプル

1. 媒介蚊についてもヒト血液サンプルと同様に扱う。
 - (ア) 新たな媒介蚊 *Anopheles dirus* や *An. maculatus* などの捕集は調査実施地区で継続的に行う。
 - (イ) 原虫の検索は捕集した媒介蚊を胸部と腹部に分け、各部より抽出したDNAを分子生物学的検討に供する。

方法：

ヒト血液およびスポロゾイトからのマラリア原虫の検出と多型の検討

1. 今年度からLAMP法によるフィールドでのヒトマラリア原虫とサルマラリア原虫の検出。

2. スクリーニング後、熱帯熱マラリア原虫の SSU-rRNA や *cytb*、*msp-1* などを標的遺伝子とし、スクリーニングを行い、調査地区におけるマラリア原虫の感染状況を把握する。その他、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、サルマラリア原虫 *P. knowlesi*、*P. inui*、*P. cynomolgi*、および *P. coatneyi* についても検出、同定を行い、マラリア全体の拡散状況を解析する。
3. 熱帯熱マラリア原虫感染サンプルについて、K13-propeller を標的とした PCR 反応を行い、PCR 産物の塩基配列解析を行い、多型解析を行い、既知の報告と比較検討を行う。
4. 塩基配列多型サンプルの伝播の特徴を検討するため、アルテミシニン耐性原虫と感受性原虫におけるガメトサイト特異 mRNA の多型を解析し、アルテミシニン感受性とガメトサイトからみた伝播の相違について解析を行う。

上述の検討事項は経時的に実施する。

③予想される成果

1. 耐性マラリア原虫とそのガメトサイトおよびスポロゾイトの解析の結果より、耐性と伝播との相関、また拡散の実態に関する新知見が期待される。
2. 住民の行動調査などの人文社会学的知見を加えることにより、アルテミシニン耐性を封じ込めの一助となる基礎資料の作成が可能となる。
3. 調査対象地区のマラリア患者の多くは無症候者である。潜在感染状況を把握することにより耐性原虫拡散抑制のための方策を行政機関や医療機関に提案できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

調査期間を段階的に分け、分子疫学的調査を行う。最初は調査対象地区の手元にストックしているサンプルの解析。続けて active case detection (ACD) によって全体像の把握を実行。得られた結果を東南アジア、殊に大メコン圏各地より薬剤耐性遺伝子として報告されている標的遺伝子の変異との相違点について検討を実施。

1. 本研究の調査研究対象地域をベトナム、ビンフック省およびその周辺地域（ベトナム中部に位置し、カンボジア国境に接している）、カンホア省カンフー地域（ベトナム中南部に位置し、南シナ海に面している）およびその周辺地域とした。これらの地域では、申請者らが2002年以降マラリア感染に関する分子疫学調査を行っている地域で、熱帯熱マラリア患者から抽出した熱帯熱マラリア原虫DNAを保存している。
2. ACD及び調査地区の診療所などを対象とした passive case detection (PCD) により熱帯熱マラリア患者の採血を実施し、サンプル数の母集団を多くする。PCDの実施は、ACDの補完などとして実施。
3. 薬剤耐性遺伝子として報告されている標的遺伝子の検索は、PCR後のシーケンス解析にて実施。

4. 媒介蚊についてもヒトサンプルと同様な調査を実施し、薬剤耐性遺伝子のマラリア原虫発育史の中での変異に関する検討を実施。

以上の結果より、調査地域におけるアルテミシニンに対する耐性株の分布状況などの解析を実施。

②成果（結果＋考察）

本研究代表者らは、ベトナム、カンホア省において、一昨年同地区で同地区の住民を対象として熱帯熱マラリアを標的としたアルテミシニンを用いた集団治療が実施されたが、一部の住民において熱帯熱マラリアの持続感染が認められた。また、同省数地区の媒介蚊からも熱帯熱マラリア原虫のスポロゾイト感染が認められ、ヒトにおけるそれと同様の感染動態が認められた。

現時点におけるカンホア省での特徴的な K13-propeller 遺伝子における変異は P553L 一種のみである。これに対し、従来から耐性マラリアが報告されているベトナム・カンボジア国境地域のビンフック省において少数例ではあるが調査した結果、P553L、V568G、C580Y の 3 種の変異株が検出された。この 3 種の変異株は、ベトナムの他地域やカンボジア、タイなどでは他の部位の変異は認められている。しかし、カンホア省では P553L だけしか認められなかったことより、同地区における特徴的なものであることが推定された。

現在上記調査地において、継続的に熱帯熱マラリア患者血液および媒介蚊からの DNA サンプルを保存し、解析を行っている。その他、過去に調査を行ったベトナム、ビンフック省およびクワン・チ省の保存サンプルも再解析を行い、各種比較検討すべく準備を開始した。

③成果の公表

Maeno Y. Quang NT, Culleton R, Kawai S, Hori K, Nakazawa S, Marchand RP. Detection of the *Plasmodium falciparum* Kelch-13 gene P553L mutation in sporozoites isolated from mosquito salivary glands in Southcentral Vietnam. *Parasites & Vectors*. 2017 (Accepted)

Maeno Y. A molecular epidemiological study on mosquito for the transmission of forest malaria. *Tropical Medicine and Health*. 2017 (submitted for publication)

Maeno Y. Culleton R, Quang NT, Kawai S, Marchand RP, Nakazawa S. *Plasmodium knowlesi* and human malaria parasites in Khan Phu, Vietnam: Gametocyte production in humans, and frequent co-infection of mosquitoes. *Parasitology*. 2017;144(4), 527-535. doi: 10.1017/S0031182016002110.

6. 自己評価

今回の調査では研究当初設定した予想結果とほぼ同様の結果を得ることができた。しかし、以下の課題が浮上した。その課題として、今回の調査地は共同研究者の所属の事情により現地マラリア研究センターが閉鎖されることとなった。そのため調査の継続が懸念されたが、NIMPE との共同研究が成立したことによりカンフー地区のみならず周辺地区でも調査が可能となり、幅広くデータの集積が可能となった。その他、カンボジア国境に接する地区での調査が可能となり、少しずつではあるがサンプル収集を行い、解析を進めるようになった。そのため、ベトナムにおけるマラリア原虫の伝播に関する各地域の特徴が把握でき、マラリアコントロールに多くの基礎データが提供できる体制を構築できた。そのため下記のような達成度とした。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- Ⓒ (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成 28 年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ヒトマラリアに認められる免疫抑制の調査研究（ケニア）

課題番号：28－一般－10

2. 代表者：木村 大輔（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師）

共同研究者：由井 克之（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

Kijogi Caroline（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・大学院生）

3. 決定額：900 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

マラリアは最も重要な感染症の1つであるが、未だに有効なワクチンは開発されていない。マラリア患者は、他病原体への感染リスクが高いことなど宿主防御免疫が抑制されることが知られているが、そのメカニズムは十分に理解されていない。我々はマウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)を用いた基礎研究から、IL-27 (p28 と EBI-3 のサブユニットから成る二量体サイトカイン)を産生する Foxp3 陰性の新規抑制性 T 細胞 (Tr27) を発見した (Immunity、印刷に向けて準備中：研究代表者は筆頭著者)。Tr27 は、T 細胞の IL-2 産生およびクローン増殖を抑制することにより抗マラリア防御応答を低下させる。本研究の目的は、長崎大学ケニア研究拠点においてマラリア患者で Tr27 が誘導されるかを調査研究することである。Tr27 がヒトから検出された場合、T 細胞機能やマラリア病態への Tr27 の役割を明らかにする。

②研究内容

長崎大学研究拠点ケニア・ビタ地区において、学校の児童生徒を対象にインフォームドコンセント後に 6 ml 程度の採血を行う。マラリア原虫感染は、迅速診断キットとスミア標本で確認する。比重遠心法を用いて全血から血漿と単核球を分離する。得られた単核球の一部をフローサイトメトリーで細胞表面抗原の発現を解析する。特に CD4T 細胞に焦点を当て、活性化状態、PD-1 発現、細胞数を把握する。また、単核球を蛍光色素 CFSE でラベルし、マラリア原虫抗原および抗 T 細胞受容体抗体で刺激・培養する。培養後の上清中に含まれるサイトカイン (IL-2、IFN- γ 、IL-10、IL-27) を ELISA 法にて測定する。また、フローサイトメトリー解析により、増殖した細胞分画 (CFSE 減衰により同定) を解析する。平成 27 年度は、約 150 検体を集め解析した。平成 28 年度は、同じドナーの検体をフォローし、感染状態、T 細胞の特異的応答などの変化を解析する。検体採取時の感染者と過去の感染経験者等の免疫応答を比較調査し、防御免疫応答と免疫抑制とのバランスやそれらのマラリア病態への影響を明らかにする。

③予想される成果

我々がマウスモデルで明らかにした IL-2 産生低下の現象は、1998 年に Ho らがタイにおける熱帯熱マラリア患者の末梢リンパ球においても報告された。一方で、最近結核患者胸水中において IL-27 産生 T 細胞の存在が報告された (Xia et al.)。これらのことから、ヒトマラリア患者でも IL-2 産生や T 細胞増殖が抑制され、抗マラリア防御免疫が低下していることが予想される。マラリア感染者で IL-27 産生 CD4⁺T 細胞が誘導されるか否か、明らかにすることが期待される。IL-27 産生が同定できた場合、さらに IL-2、IL-10、IFN- γ 産生等の免疫応答やマラリア病態との関連が明らかにし、マラリア原虫感染による免疫抑制機構の解明に繋げたい。また、濱野教授らが行う住血吸虫感染に対する応答も含めて解析することにより、マラリアと住血吸虫感染の相互作用を解明することが期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

a)調査地および調査期間

ケニア西部、ビクトリア湖畔に位置する Suba (スバ) 地区 Mbita (ビタ)において、2016年9月から2017年2月までの間行った。

b) 調査対象者

Mbita district hospitalを訪れた外来患者(6-15歳)にインフォームドコンセントを行い、同意が得られた患者75名を調査対象とした。

c) 検体採取

各調査対象者に対して医師による診断後、採血および採尿を行った。アンケート用紙への記入後、糞便回収用の容器を渡し、後日糞便検体を回収した。得られた検体について、尿検体は検査キットを用いて *Schistosoma mansoni* 特異抗原 circulating cathodic antigen (CCA)の試験、糞便検体については Kato-Katz 法を用いて虫卵の検出、そして血液検体の一部を簡易診断テスト (RDT) 用いてマラリア感染の確認を行った。また、厚層・薄層塗抹標本も作製し、マラリア原虫の検査・同定を複数人で行った (図1)。

d) 末梢血単核球の分離・解析

血液検体を比重遠心分離法にて血漿と末梢血単核球とに分離し、血漿は-80℃にて保存し、末梢血単核球については以下の解析を行った。フローサイトメトリーを用いて、各検体における T 細胞、B 細胞、NK 細胞、および NKT 細胞の割合について調べた。T 細胞については活性化状態 (CD45RO、CD62L、CD25) や抑制性受容体 (PD-1) の発現および Treg (Foxp3 陽性) 細胞について解析した。また、PBMC を熱帯マラリア原虫粗抗原 (iRBC)、マンソン住血吸虫抗原 (SEA,SWA)、あるいは抗 CD3/CD28 抗体で刺激培養した。培養後上清中に含まれるサイトカインについて ELISA 法で確認した。さらに、培養前に PBMC を CFSE でラベルし、刺激後に細胞を回収してフローサイトメトリーで細胞増殖について解析した (図1)。

②成果 (結果+考察)

調査対象者75名の男女比率は4:6であり、平均年齢は10.4歳であった。15名のマラリア診断が未定であり確認中であるが、残りの60名中34名(56.7%)が熱帯熱マラリア原虫陽性であった。原虫血症は0.1-6.2%で、2%以下がほとんどで28検体(82.4%)であった。また7名から尿検体を、26名から糞便検体を回収することが出来なかったが、53名(77.9%)がマンソン住血吸虫陽性であった調査期間に小雨季(10-12月)を含んでいたことから、当初は感染率および原虫血症共に高くなると予想していたが、雨季による影

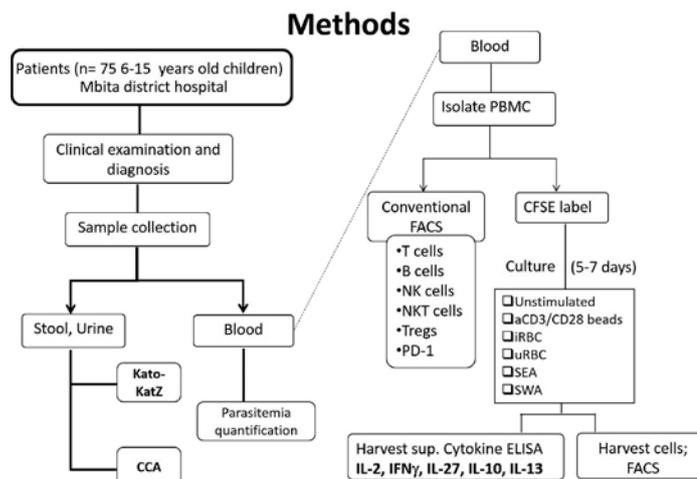


図1. 研究調査の流れ

響はほとんど認められなかった。これは、ケニア・ビタでは年間を通じて気温差が小さいことや、ビクトリア湖に豊富な水があるため、蚊の繁殖活動に季節変動が小さいことが原因と考えられる。

得られた末梢血単核球についてフローサイトメトリーで解析したところ、CD4T 細胞および CD8T 細胞共に、マラリア原虫感染による割合の変化は認められなかったが(図 2A)、各細胞のエフェクターメモリー細胞 (CD62L⁻CD45RO⁺) の割合が非感染群に比べて感染群において低下していた (非掲載)。さらに抑制性受容体である PD-1 陽性 CD4T 細胞がマラリア感染によって亢進することが明らかとなった (図 2B)。慢性感染や癌の場合、T 細胞が PD-1 などの抑制性受容体を発現し機能低下状態、すなわち疲弊 T 細胞になることが知られている。我々のマウスを用いた研究成果 (Immunity, 2016) とも一致する。T 細胞以外にも、感染群において B 細胞および NK 細胞の割合が有意に低下していた (図 2C、非掲載) ことから、マラリア原虫感染によって獲得免疫だけでなく、液性免疫や自然免疫についても抑制されている可能性が示唆された。実際に T 細胞機能を調べるため、*in vitro* で T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激したところ、感染群における CD4T 細胞の増殖能が低下していることが確認できた (図 2D)。こちらの結果もマウスの実験結果 (Immunity, 2016) と一致したことから、今後はこれら抑制の原因がヒトマラリア患者においても Tr27 が誘導されることが原因であるのか明らかにする必要がある。現在、培養上清中のサイトカインの解析を継続して行っているところである。また、血漿中における IL-27 濃度についてもマラリア原虫感染によって上昇するのか確認する予定である。今後は速やかに解析を終わらせ、熱研対応教員である濱野教授とも十分な議論の後論文投稿する予定である。

③成果の公表

現在論文投稿に向けて準備中である。

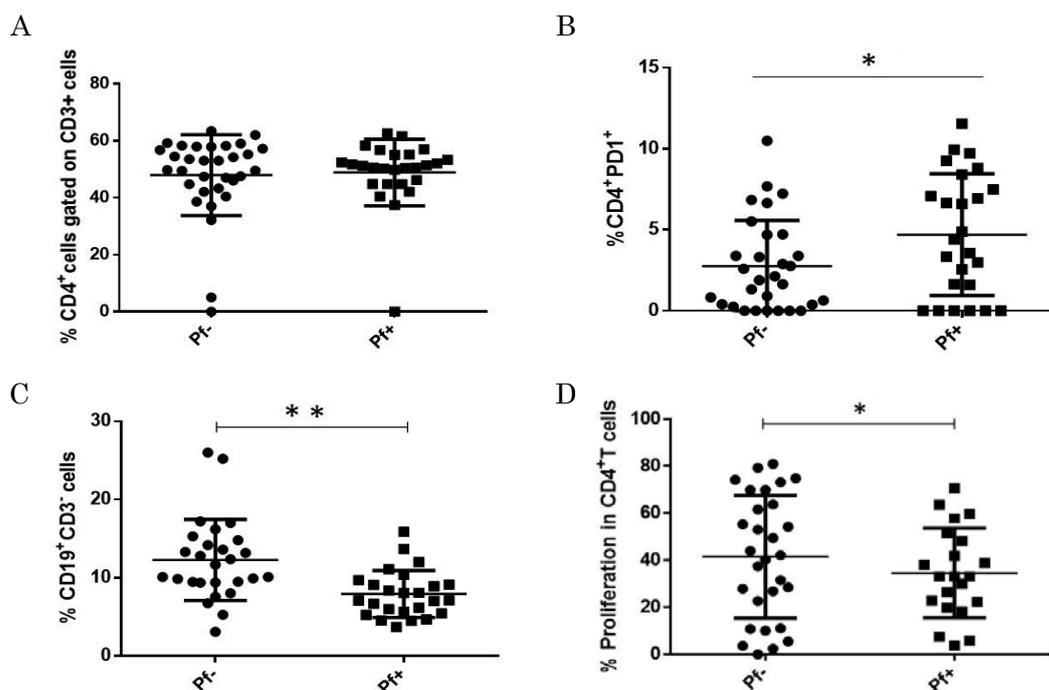


図 2. フローサイトメトリーによる解析

6. 自己評価

当初は 3 ヶ月程で 100 検体以上のサンプルを得ることを目標にしていたが、半年で 75 検体と少なかった上に、期待していた原虫血症の高い検体も得られなかった。この点については不満が残るが、得られた検体の解析はスムーズに予定していたことがほぼ達成できた。結果についても、マラリア原虫感染によって抑制性受容体 PD-1 陽性 CD4T 細胞が増えること、エフェクターメモリーT細胞が減少していること、そして T 細胞の増殖能が低下していること、などが得られ、我々がマウスを用いて行った解析から予想していたものが認められた。また、マラリア原虫感染による B 細胞の割合の減少や成熟 B 細胞への分化抑制など、新たな展開も期待できる予想外の収穫もあり、本研究全体としては十分に評価できる成果が得られたと考える。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- Ⓒ (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：組換え体 Dengue ウイルス粒子によるコンドロイチン硫酸 E の分子認識機構

課題番号：28－一般－11

2. 代表者：左 一八（会津大学短期大学部・食物栄養学科・教授）

共同研究者：尾形 慎（福島工業高等専門学校・物質工学科・准教授）

3. 決定額：450 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

2014年に70年ぶりに日本国内感染が発生した Dengue 熱は、Dengue ウイルスによって引き起こされる熱性疾患である。Dengue ウイルスは最近新たに報告された5型を含めて5つの血清型に分類される。異なる血清型のウイルスによる再感染時に、初回感染によって産生された抗体の交差反応性に基づく抗体依存性感染増強反応が生じ、その結果、重篤な Dengue 出血熱が発症するリスクが高くなると考えられている。新たな血清型の出現可能性や抗体依存性感染増強反応を克服したワクチンは、いまだに臨床応用されていないこと、有効な治療薬も臨床には存在せず、日本を含めて世界規模で拡大・流行を続ける本疾患の制圧に向けた物質的基盤の確立が必要とされている。

Dengue ウイルス感染サイクルにおける宿主細胞への吸着・膜融合を介した侵入過程は、ウイルスの宿主・組織指向性を決定する重要なプロセスである。蚊による吸血時、Dengue ウイルスは皮膚より生体内に侵入、その後宿主細胞膜上に発現している多様な受容体分子を介して細胞内に侵入・増殖を経て、ウイルス血症を引き起こして臨床症状を呈すると考えられている。細胞表面に存在するグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸 E (CSE) が Dengue ウイルスの細胞内進入過程において相互作用することが報告されている。糖鎖構造－活性相関から、グリコサミノグリカンを模倣した抗 Dengue ウイルス剤リードとしての低分子誘導体が創出され、ウイルス学、計算科学的手法を用いることでその有用性が示されてきた。しかしながら、高分子多糖およびその一部の構造を模倣した低分子化誘導体と E タンパク質相互作用のメカニズムが不明であること、さらには感染阻害活性には高い化合物濃度が必要など解明すべき点が残されている。

本研究では、Dengue ウイルス侵入過程における E タンパク質と CSE および低分子糖誘導体との相互作用を分子レベルで解明することを目的に、組換え体非感染性 Dengue ウイルス粒子を用いて、CSE および CSE 模倣低分子誘導体分子との相互作用に関与する E タンパク質上のアミノ酸残基および結合領域を同定する。

②研究内容

本研究は、デングウイルス（DENV）感染を制御するグリコサミノグリカンに対するウイルス E タンパク質の分子認識解明について、以下の 2 つの実験項目からなる。

（1）E タンパク質上にアミノ酸置換を導入した組換え体変異 DENV 粒子の作出

E タンパク質上に存在する受容体結合ドメイン内の塩基性アミノ酸クラスターを置換した変異 E タンパク質を持つ非感染性 DENV 粒子を昆虫細胞株で作製する。

（2）組換え体変異 DENV 粒子による CSE 分子への結合および感受性細胞への結合解析

作製された変異型および野生型非感染性 DENV 粒子を用いて、分子量の異なる CSE 担持人工脂質表面への結合性、ならびに DENV 感染感受性細胞に対する結合性を解析することにより、デングウイルス E タンパク質の CSE 認識に関わるアミノ酸、ならびに結合領域を同定する。

③予想される成果

本研究は、拠点形成共同研究の開始当初から熱帯医学研究所ウイルス学分野・森田公一教授とともに取り組んできたウイルス学と糖鎖生物学分野を融合させる学際的糖鎖ウイルス学領域の進展に寄与するものである。

本研究で、デングウイルス感染初期過程に関与する CSE およびヘパラン硫酸に対するウイルス E タンパク質の分子認識機構が解明される。熱帯医学研究所ウイルス学分野で作製された野生型組換え体非感染性ウイルス粒子をもとに、E タンパク質上に変異を有する粒子を新たに作製することで、CSE および多様な糖模倣誘導体との相互作用解析が可能になり、これまで不明であった CSE をはじめとするグリコサミノグリカン分子、および誘導体化合物との相互作用に関わる E タンパク質上の結合領域・アミノ酸が同定される。

E タンパク質上の CSE 結合領域・アミノ酸に関する構造・機能情報は、低分子糖模倣誘導体のウイルス侵入阻害活性の更なる向上に不可欠なものとなり、ウイルス吸着・侵入過程を標的とする新たな作用機序に基づく抗デングウイルス剤開発に寄与するものと期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【細胞培養】

Spodoptera frugiperda 卵巣細胞由来培養細胞株である Sf-9 細胞を、Sf-900II SFM 無血清培地で 27°C で培養して実験に用いた。

【組換え体変異デングウイルス（DENV）粒子の作製】

Dengue virus type 2 (strain Thailand/16681/1984 株) ゲノムの PrM および E protein をコードする遺伝子領域 (382-2424) がクローン化された pIB/V5-His (Invitrogen #V8010-01) ベクター (熱帯医学研究所ウイルス学分野・森田公一教授から分与) を用いた。

E タンパク質 Domain III 内の 295 番目、310 番目および 334 番目の Lys 残基をそれぞれ

Ala 残基に置換した変異体 K295A、K310A、K334A、2 か所の Lys 残基を置換した変異体 K295/310A、K310/334A、K295/334A、および 3 か所の Lys 残基を置換した変異体 K295/310/334A の作製をそれぞれ行った。以下の変異導入プライマーを用いて PCR 法により変異遺伝子 DNA 断片を増幅させた後、サブクローニングして目的とする変異体 E-タンパク質をもつ Dengue ウイルス粒子作製に必要なクローン化 DNA を取得した。

K295A: Forward 5'-CTACAGCTCgcAGGAATGTCA-3'

Reverse 5'-GTATGACATTCCtgcGAGCTG-3'

K310A: Forward 5'-AGTTGTGgcGGAAATAGCAGAA-3'

Reverse 5'-GTTTCTGCTATTTCCgcCACAA-3'

K334A: Forward 5'-CTCTCCATGCgcGATCCCTT-3'

Reverse 5'-AAAAGGGATCgcGCATGGAGA-3'

変異体 E-タンパク質をコードする遺伝子がクローン化されていることを DNA シークセンシングにより確認した。

変異体遺伝子 DNA を Sf-9 細胞にリポフェクション法に従って導入することにより、細胞培養液中に非感染性組換え体 Dengue ウイルス粒子を産生する発現系を構築した。

【組換え体 DENV 粒子抗原量の検出と定量】

培養液中に産生された Dengue ウイルス粒子を、フラビウイルス E-タンパク質に対する単クローン抗体 D1-4G2-4-15 を用いたウェスタンブローディング法により検出した。さらに検出画像で得られた E-タンパク質スポットについて、デンシトグラフソフトウェア (CS Analyzaer 4、アトー株式会社) を用いたデンシトメトリー計測を行い、各試料中の E-タンパク質抗原量を算出した。

【組換え体 DENV 粒子のコンドロイチン硫酸 E (CSE) への結合測定】

組換え体 DENV 粒子の CSE に対する結合性を solid-phase binding assay により評価した。PBS(-)を用いて 1 µg/ml に調製したビオチン化 CSE およびビオチン化コンドロイチン硫酸 A (CSA) (対照) 溶液をストレプトアビジンコートプレート (BioBind Strip assembly, ThermoFisher Scientific, #95029293) の各 well に 50 µl ずつ加え、室温で 1 時間放置し、CSE あるいは CSA を固相化した。BlockingOne (Nacalai tesque, #03953-95) を 200 µl/well となるように加え、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去後、一定の抗原量を含む組換え体変異 Dengue ウイルス粒子溶液を 50 µl/well となるように加え、4°C で一晩インキュベーションした。PBS (-) 200 µl/well で 5 回洗浄した後、BlockingOne で希釈した D1-4G2-4-15 抗体を 50 µl/well となるように加え、室温で 1 時間インキュベーションした。PBS (-) 200 µl/well で 5 回洗浄した後、BlockingOne で希釈した HRP 標識 goat anti-human IgG を 50 µl/well となるように加え、室温で 1 時間インキュベーションした。PBS (-) 200 µl/well で 5 回洗浄した後、発色溶液として ELISA POD 基質 TMB キット (Nacalai tesque, #05298-80) を 100 µl/well となるように加え、遮光、静置した。発色が見られたところで 1N H₂SO₄ を 100 µl/well となるように加えて発色反応を停止させた。その後、測定波長 450 nm、対照波長 630 nm で吸光度を測定した。

②成果（結果＋考察）

デングウイルス E-タンパク質の Domain III 領域が宿主細胞表面のヘパリンや CSE との結合に関与することが報告されている。この領域には、異なる血清型間や日本脳炎ウイルス、ウェストナイルウイルスなどとの間で塩基性アミノ酸残基が保存されている（図 1）。本研究では、E-タンパク質の分子表面上部および側面に露出し、宿主細胞表面受容体と相互作用可能な位置に存在すると予想される 295、310 および 334 番目の Lys (K) 残基を

	290	295	310	334	350
DEN1	DKLTL	K GMSYVMCTGSFKLE	K EVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCK	K IPF-SSQDEKGV	TQN
DEN2	DKLQL	K GMSYSMCTGKFKVV	K EIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCK	K IPF-EIMDLEKR	HVL
DEN3	DKLEL	K GMSYAMCLNTFVL	K KEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCK	K IPF-STEDGQG	KAHN
DEN4	EKLRI	K GMSYTMCSGKFSID	K EMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCK	K VPI-EIRDVNKE	KVV
JEV	DKLAL	K GTTYGMCTEKFSFA	K NPADTGHGTVVIELSYSGSDGPK	K IPIVSVASLND	MTPV
WN	EKLQL	K GTTYGVCSKAFKFA	R TPADTGHGTVVLELQYTGTDGPK	K VPISSVASLND	LTPV
	351			394	
DEN1	GRLITANPIV--	TDKEKPVNIEAEPPFGESYIVVGAGEKALKLSWF	FKK		
DEN2	GRLITVNPIV--	TEKDSPVNIEAEPPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWF	FKK		
DEN3	GRLITANPVV--	TKKEEPVNIEAEPPFGESNIVIGIGDKALKINWY	KK		
DEN4	GRIISSTPLA--	ENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGN	SALTLHWFRK		
JEV	GRLVTVNPFVATSSANSKVLVEMEPPFGDSYIVVGM	GDKQINHHWHKA			
WN	GRLVTVNPFVSVATANSKVLIELEPPFGDSYIVVGR	GEQQINHHWHKS			

図1. デングウイルスEタンパク質Domain III領域のアミノ酸配列比較

Ala (A) 残基に置換した変異体 E-タンパク質遺伝子をクローン化した。

昆虫細胞発現ベクターである pIB/V5-His に野生型 (Wt) および変異型 E-タンパク質遺伝子を含む DNA を、Sf-9

細胞に導入することにより、培養上清中へのウイルス粒子の産生を、抗 E-タンパク質抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した（図 2）。いずれの変異型においても野生型と同じ分子量の E-タンパク質が検出されたことから、目的とする変異型 E-タンパク質をもつウイルス粒子が作出されていることを確認した。

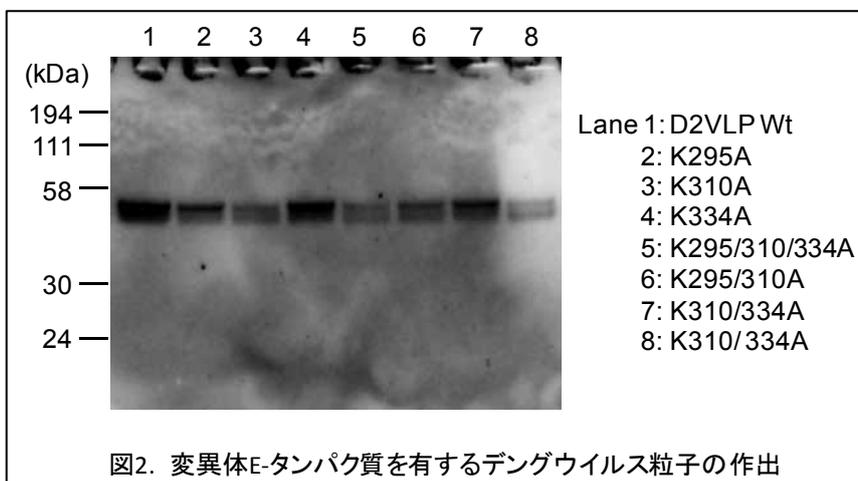


図2. 変異体E-タンパク質を有するデングウイルス粒子の作出

野生型および変異型 E-タンパク質を有するデングウイルス粒子の CSE に対する結合性を solid-phase binding assay により評価した。GalNAc 残基の 4 位、および 6 位に硫酸基を有する CSE の生体内合成前駆体であり、GalNAc 残基の 4 位硫酸基を有する CSA を対照化合物として用いた。野生型および変異型ウイルス粒子は、CSE に対して結合性を示したが CSA にはいずれも全く結合性を示さなかった。野生型の CSE の結合性を 100%とした時の変異型ウイルス粒子の相対的な結合性を図 3 に示す。E-タンパク質 Domain III 上の K295A、K310A、K334A のいずれの変異型粒子は、野生型の 30%程度の結合性しか示さなかった。

また、K295/310A、K310/334A、K295/334A 変異型の結合性が1アミノ酸置換変異型と差がなかったことから、3ヶ所の Lys 残基の CSE への結合性の寄与は同等であることが示唆された。K295/310/334A 変異型では、その結合性が15%程度残存したことから、これら3ヶ所のアミノ酸の寄与に比して小さいものの、別のアミノ酸残基が CSE への結合性に関与することが示唆された。

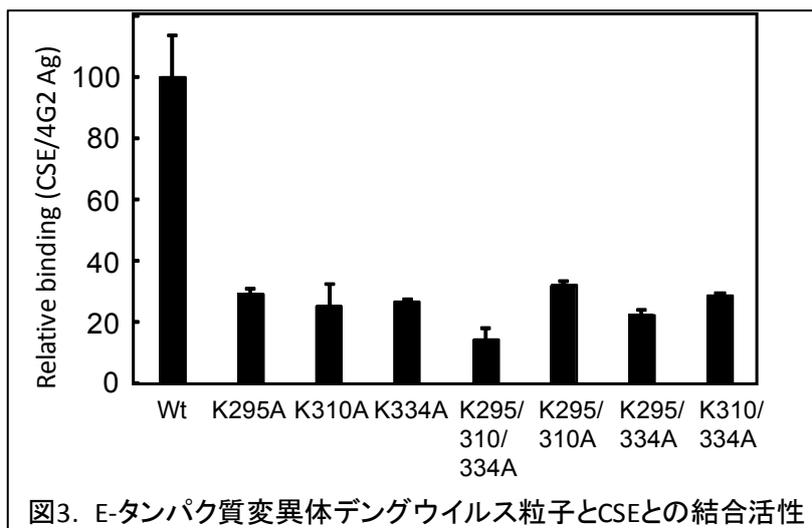


図3. E-タンパク質変異体デングウイルス粒子とCSEとの結合活性

今回作出した変異型 E-タンパク質上の Lys 残基の位置を図 4 に示す。E-タンパク質はウイルス粒子表面上に 2 量体で存在する（表示 (A) の白と黄色の領域が各モノマーを示す）。Domain III はモノマーの先端部分を構成し、3ヶ所の Lys 残基はすべて同 domain 内に位置する。コンドロイチン硫酸 E (CSE) は、[GlcAβ1-3(4S,6S)GalNAc] の繰り返し構造を有する直鎖状の多糖分子である。今回の結合性実験の結果から、K310 から K295、そして K334に至る Domain III 上の帯状部位に直鎖状の CSE 分子が巻きつくように結合し、主として CSE 分子内の GalNAc 上の 6 位の硫酸基が 3ヶ所の Lys 残基と相互作用することにより分子間相互作用が維持されていることが予想される。研究代表者は CSE 分子内の GlcA 内のカルボキシル基も E-タンパク質との相互作用に関与していることをこれまでに報告している。硫酸基と 3ヶ所の Lys 残基との相互作用による結合への寄与に比して小さいものの、K310 から K295、そして K334に至る Domain III 上に位置する別のアミノ酸残基と GlcA との相互作用が存在することが考えられる。

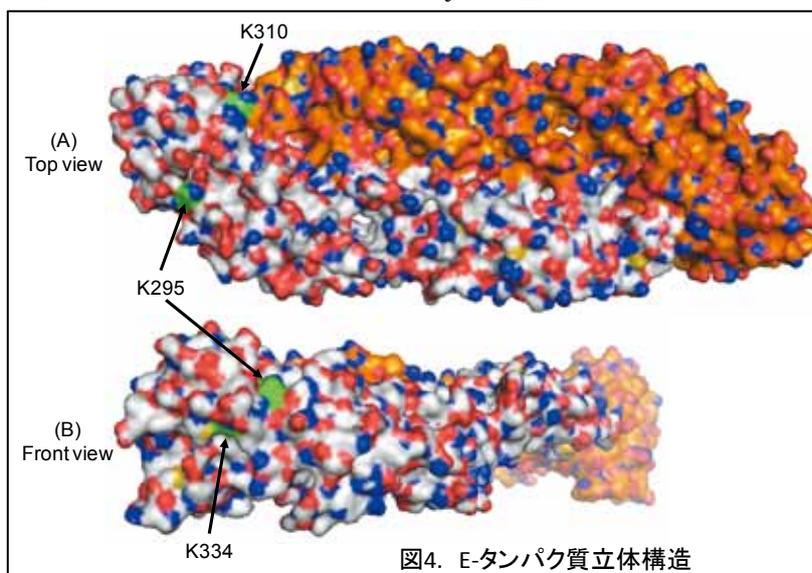


図4. E-タンパク質立体構造

以上本研究により、これまで不明であったデングウイルス E-タンパク質と CSE 分子との分子レベルでの相互作用メカニズムについての重要な知見が得られた。

③成果の公表

【原著論文】

Miho Sakuragi, Ryoko Suzuki, Kazuya I.P.J. Hidari, Takashi Yamanaka, Hirofumi Nakano:

6. 自己評価

本研究は、これまで代表者が取り組んできた宿主糖鎖分子であるコンドロイチン硫酸 E (CSE) が関与するデングウイルス宿主侵入機構に関する糖鎖科学研究と熱帯学研究所ウイルス学分野 森田公一教授の有するフラビウイルス資源・病態解析技術を融合させた共同事業である。本年度、デングウイルス感染初期過程、特にウイルス吸着・侵入プロセスに関わる宿主側因子としてのコンドロイチン硫酸 E (CSE) に関して、代表者が作出した変異型 E-タンパク質を有する組換え体デングウイルス粒子を用いて、CSE との結合に関するアミノ酸残基、特に宿主細胞への侵入過程に重要な機能を持つ Domain III 内における CSE と相互作用する Lys 残基を同定することを目的として実験を実施した。

昆虫細胞を用いたウイルス粒子産生系を構築し、蚊媒介性フラビウイルスに共通して保存されている E-タンパク質上の 295、310、334 番目の Lys 残基に着目して変異体ウイルス粒子を作出した。代表者が独自に開発した CSE 固相化表面をもつプラスチックプレート上での Solid-phase binding assay を用いて組換え体ウイルス粒子との結合性を解析した。その結果、E-タンパク質上の 295、310、334 番目の Lys 残基に至る帯状部位が CSE との相互作用に重要な領域であることが強く示唆された。この領域に存在する Lys 残基を中心に糖がフィットできるような小さな窪みが CSE との相互作用に重要な領域であることが推察された。CSE の基本構造単位を基に化学合成されたプロトタイプの低分子糖誘導体がデングウイルスの宿主への結合性を阻害し、その結果感染を抑制することを既に代表者は明らかにしており、今回の知見はプロトタイプの化合物をリードとして糖鎖性阻害剤の構造最適化を行う上で極めて重要な知見を与えるものである。

以上、本研究の当初目標であった CSE と相互作用する E-タンパク質上の主要アミノ酸残基を特定することを達成できたといえる。本年度の研究で得られた知見は、糖鎖由来デングウイルス侵入阻害剤の構造予測に基づく開発に寄与することが期待される。

しかしながら、当初実施を計画していた組換え体ウイルス粒子と宿主細胞との結合性解析について、相互作用解析のための条件を十分に決定することができなかった。このため、下記の 7. 達成度についての自己評価をランク II とした。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- Ⓐ (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：サルマラリア原虫を用いた肝臓休眠体に関する新規実験系の開発
課題番号：28－一般－12

2. 代表者：川合 覚（獨協医科大学・熱帯病寄生虫病学講座・准教授）
共同研究者：案浦 健（国立感染症研究所・主任研究官）
金子 修（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決定額：500 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

5 種類のヒト・マラリアのうち三日熱マラリアは、致死率は高くないものの、東南アジアを中心とした広い範囲に流行地域が存在し、いまなお現地住民の健康被害を惹起している。三日熱マラリアの原因原虫である *Plasmodium vivax* は、宿主の肝臓内で休眠体 (hypnozoite) を形成し、発症時に出現する赤内型原虫に対して治療を施しても、休眠体を根治しない限り再燃を繰り返すことが知られている。これまで休眠体に対する治療には、プリマキンのみが使われてきたが、近年プリマキン耐性原虫の出現が報告され、新たな薬剤の開発が急務となっている。しかし、休眠体はネズミマラリア原虫では形成されず、*in vitro* での再現も難しいことから、適切な実験系の確立には至っていない。一方、欧米の一部研究機関では *P. vivax* と極めて近縁のサルマラリア原虫 (*P. cynomolgi*) を用いた休眠体研究が古くから進められている。そこで、本邦においても同サルマラリア原虫による実験系を確立し、休眠体を標的とした薬剤やワクチン開発の基盤を築くことを目的に、本研究を実施した。

②研究内容

これまで研究代表者（川合）らは、サルマラリアの自然宿主であるカニクイザル (*Macaca fascicularis*) や、欧米の実験で一般的に用いられているアカゲザル (*M. mulatta*) に比較して、ニホンザル (*M. fuscata*) がサルマラリア原虫の感染に対して特に高い感受性を示すことを明らかにした。本研究で用いる *P. cynomolgi* B 株もニホンザルに人工感染させると、感染2週間程度で高い赤血球感染率（約7%）に達し、非致命的ながら発熱や貧血等の発症が認められる。一方、共同研究者の案浦は、オランダ・Leiden 大学留学中より休眠体の生物特性に関する研究に取り組んでいる。現在は所属する国立感染症研究所内で媒介蚊を継代維持し、本研究に不可欠なメンブレンフィーディングによる感染血液の吸血手技や、蚊唾液腺から感染型のスポロゾイト期原虫を回収する手技を確立している。また、研究対応教員の金子は、人獣共通感染性サルマラリア原虫の *P. knowlesi* の継代培養・遺伝子導

入実験に成功し、さらに三日熱マラリア原虫休眠体形成への植物ホルモンの関与に関する研究を進めている。本研究では各分野で確立された技術を集結し、研究班を組織することで休眠体に関する以下の新たな研究を展開する。

1) サルへの *P. cynomolgi* 感染と培養系確立のトライアル (担当: 川合・金子)

ナショナル・バイオリソース・プロジェクトより、実験用ニホンザル2頭の有償譲渡を受ける。サルは医薬基盤研究所・筑波霊長類医科学研究センター内のBSL2施設内で管理する。1頭に凍結保存した *P. cynomolgi* B株感染血液(研究代表者が準備済)を融解後、静脈内接種する。感染1週間後より血液塗抹標本を作製し、赤血球感染率の推移と生殖母体の出現を確認する。感染サルから採取した感染血液は、直ちに凍結し、長崎大学・熱帯医学研究所(以下、熱研)にて、世界的にも未確立である *in vitro* 継代培養系の確立を試みる。

2) 媒介蚊への *P. cynomolgi* 感染 (担当: 案浦)

赤血球感染率が1%程度に達した時点で採血し、直ちに国立感染症研から筑波霊長類医科学研究センターBSL3施設内に搬入された媒介蚊を用いてメンブレンフィーディングによる感染血液の吸血を行う。以降感染媒介蚊はBSL3環境下で管理する。媒介蚊の吸血から約14~28日後、顕微鏡下で蚊唾液腺を取り出し、スポロゾイト形成の有無を確認する。

3) *P. cynomolgi* のスポロゾイトの転写解析 (担当: 案浦・金子)

三日熱マラリア原虫では肝細胞侵入後、そのまま発育してゆくか(90%)、休眠体となるか(10%)はスポロゾイトの段階で決定していると考えられているため、スポロゾイトの10%が休眠体となるための特徴を有していると考えられる。そこで、*P. cynomolgi* B株スポロゾイト 10^6 個を用いてRNA-seqによる網羅的転写解析を行い、休眠体を持たないネズミマラリア原虫および熱帯熱マラリア原虫の既知のデータと比較し、特徴的な一連の酵素群が活性化されていないか検討する。解析は国立感染症研究所(以下、国立感染症研)および熱研にて行う。

4) *P. cynomolgi* のスポロゾイトのメタボローム解析 (担当: 案浦・金子)

トキソプラズマ原虫ではアブシジン酸等の植物ホルモンが休眠現象に関与していると報告されている。そのため、*P. cynomolgi* B株スポロゾイト 10^6 個を用いてアブシジン酸などの植物ホルモンを中心とした各種メタボローム解析を行う。この解析では、休眠体を持たないネズミマラリア原虫のスポロゾイトを比較対象に用いる。解析は国立感染症研および熱研にて行う。

5) *P. cynomolgi* のスポロゾイト調整とサル感染実験 (担当: 案浦・川合)

唾液腺内から採取したスポロゾイト 10^4 個を直ちに2頭目のサルへ静脈内接種する。接種1週間後より3~4日間隔で静脈血約0.5mlを採血し、血液塗抹およびPCRにより感染成立の有無を確認する。1頭目、2頭目ともにクロロキン治療を施し、2~3ヶ月間経過観察を継続し、休眠体が形成された証拠となる原虫の再燃現象がおきるかどうかを検証する。ま

た、休眠体を形成することが確認できた原虫株として大量にストックを作製しておく。

③予想される成果

1) 本研究で採取した *P. cynomolgi* B株により継代培養系が確立されると、標的遺伝子の各種操作が容易となり、三日熱マalaria疾患モデルの新たな研究ツールとして展開が期待される。

2) 休眠体を作らない原虫と比較することにより、*P. cynomolgi* スポロゾイトで特徴的に転写している一群の酵素群が見つければ、遺伝子改変等による検証実験を行うことが可能となる。また、現在、三日熱マalaria原虫スポロゾイトのトランスクリプトームデータは公開されていないため、休眠体を形成するマalaria原虫スポロゾイトを用いた初めてのトランスクリプトームを得ることとなる。

3) *P. cynomolgi* やネズミマalaria原虫のスポロゾイトにおいて、どのような植物ホルモンが存在するのか明らかとなる。また、マalaria原虫スポロゾイトのメタボローム情報は存在せず、それ自体で貴重な基礎データとなるとともに、*P. cynomolgi* に特徴的な植物ホルモンなどが検出されれば、検証実験を行うことが可能となる。

5. 実施報告：

① 研究材料・方法・手続き

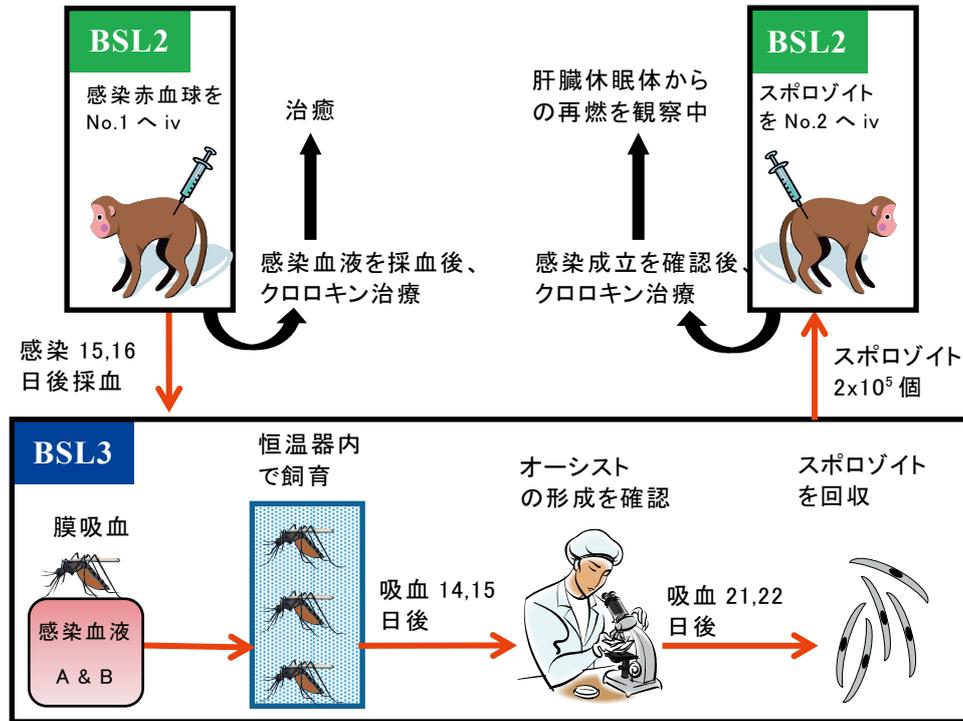
1) 研究材料：自然科学研究機構生理学研究所が主導するナショナル・バイオリソース・プロジェクト「ニホンザル」より実験用ニホンザル2頭（3歳齢、メス）の供給を受け、医薬基盤・健康・栄養研究所、霊長類医科学研究センター（TPRC）のBSL2施設内で飼育した。本研究では先行研究で凍結保存した *P. cynomolgi* B株（ATCC No. 30129）感染血液を用いた。また媒介蚊として用いたハマダラカ（*Anopheles stephensi*）は、国立感染症研究所において、スポロゾイトが高頻度に形成される系統として維持された人工繁殖株である。

2) 方法：以下の手順により遂行した。実験手順の概要は図1に示した。

- ・TPRCのBSL2施設内に飼育されたサルNo.1に *P. cynomolgi* B株感染血液を静脈内接種。
- ・感染15日後（A血液）および16日後（B血液）、サルNo.1よりヘパリン加採血。
- ・採血後、サルへNivaquine（クロロキン硫酸塩）を6日間にわたり筋肉内投与（210 mg）。
- ・TPRCのBSL3施設内にあらかじめ準備した蚊に人工膜吸血。A血液、B血液に対し各約200匹、合計約400匹を人工膜吸血。
- ・蚊は吸血後、同施設内に設置された恒温器内（設定温度21℃）で管理。
- ・吸血14日後および15日後に実体顕微鏡下で解剖し、中腸のオーシスト形成率を算出。
- ・続いて吸血21日後および22日後に解剖し、唾液腺よりスポロゾイト（spz）を回収。
- ・RPMI培地（2ml）に浮遊させたspz 2×10^5 個をサルNo.2に静脈内接種。

- ・サル No. 2 は末梢血液中に赤血球内原虫の出現が確認された後、接種 12 日後から 6 日間にわたり Nivaquine を筋肉内投与 (210 mg)。
- ・平成 29 年 5 月現在、肝臓内休眠体に由来する再燃について観察を継続中。

図 1、実験手順の概要



3) 手続き

本研究は 3 か所の研究機関により実験計画の審査を受け、全ての機関より承認されたうえで遂行された：(1) 獨協医科大学動物実験委員会、動物実験許可番号第 1007、(2) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験委員会、承認番号 DS28-17、(3) 自然科学研究機構生理学研究所「ニホンザル」バイオリソース運営委員会。なお同委員会から承認後、生理学研究所と獨協医科大学間で実験用ニホンザルの「生物資源提供同意書」が交わされた。

② 成果

● 感染血液を接種したサル No. 1 における寄生率の推移：

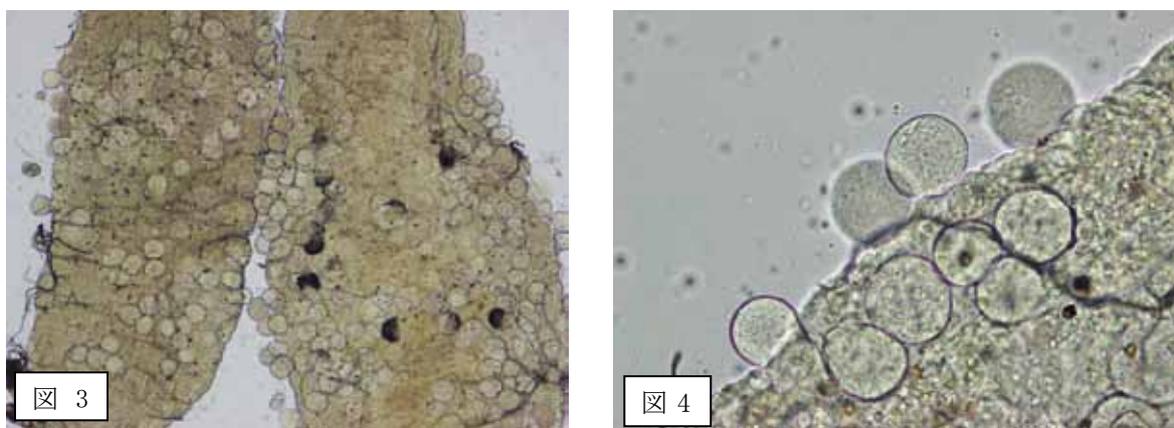
実験用サル No. 1 に *P. cynomolgi* B 株感染血液を静脈内接種したところ、赤内型原虫は感染 10 日後より末梢血液中出现した。その後寄生率は徐々に増加し、感染 15 日後 5.39% (A 血液)、感染 16 日後 5.12% (B 血液) に達し、両日蚊吸血用の血液を採取した。両感染血液における生殖母体の出現率は A 血液 2.0% (2 個/赤内型原虫 100 個)、B 血液 1.0% (1 個/赤内型原虫 100 個) であった。採血後、サル No. 1 は 6 日間にわたる Nivaquine 投与に

より赤内型原虫は消失し、以降再燃は認められず治癒に至った。

● 感染血液を吸血した蚊におけるオーシストの形成：

感染血液を膜吸血した蚊は吸血 14 日後および 15 日後に解剖し、中腸のオーシスト形成率を算出した。その結果、A 血液を吸血した蚊 17 匹/20 匹 (85%)、B 血液を吸血した蚊 22 匹/26 匹 (85%) に大量のオーシスト形成が認められた (図 3, 4)。A 血液を吸血した蚊 1 匹あたりのオーシスト形成数は 200 ± 44.5 個、B 血液を吸血した蚊では 50 ± 32.6 個であった。

図 3, 4 A 血液を吸血した蚊中腸におけるオーシストの形成像。



● 感染血液を吸血した蚊におけるスポロゾイトの形成：

A 血液および B 血液を吸血した各蚊を吸血 21 日後および 22 日後に解剖し、唾液腺よりスポロゾイト (spz) を回収した (表 1)。A 血液を吸血した蚊 1 匹から回収された spz 数は、 $13.7 \pm 0.4 \times 10^3$ 個 (day 21)、 $14.7 \pm 0.9 \times 10^3$ 個 (day 22) であった。一方、B 血液を吸血した蚊では $4.3 \pm 0.9 \times 10^3$ 個 (day 21)、 $4.9 \pm 0.5 \times 10^3$ 個 (day 22) であった。

表 1、蚊唾液腺から回収されたスポロゾイト数

SG spz No. ($\times 10^3$) Ave \pm sd	day 21	day 22
	A 血液吸血	13.7 ± 0.4
B 血液吸血	4.3 ± 0.9	4.9 ± 0.5

● スポロゾイトを接種したサル No. 2 における寄生率の推移：

蚊唾液腺より回収した spz 2×10^5 個を実験用サル No. 2 に静脈内接種したところ、赤内型原虫は接種 8 日後より末梢血液中に出現し、寄生率は徐々に増加した。spz 接種 12 日後、寄生率は 0.63% に達し、以降 6 日間にわたり Nivaquine を投与した。その後赤内型原虫は消失し、平成 29 年 5 月 1 日現在赤内型原虫のあらたな増殖は認められていないが、肝臓内休眠体に由来する再燃について観察を継続中である。

● 考察：

本研究では、肝臓休眠体を形成する能力を持った *P. cynomolgi* のスポロゾイトを大量に回収する手技が確立された。これにより、今後休眠体の特性を明らかにするための新たな研究展開が可能となった。今回は採血日の異なる 2 種類の A 血液（感染 15 日後採血）と B 血液（感染 16 日後採血）を蚊に吸血させた。その結果、両感染血液は寄生率や生殖母体の出現率に大きな差異はなかったものの、A 血液吸血群は B 血液吸血群に比較してオーシスト量では約 4 倍、スポロゾイト量については約 3 倍も多く形成された。これは、吸血時血液に含まれる生殖母体の発育段階が大きく影響していると思われるが、今後、より多くのスポロゾイトを回収するためには、寄生率が増加する比較的早期の感染血液を吸血させることが適していると推察された。

また、実験用サル No. 2 に対するスポロゾイトの接種実験では、接種 8 日後より赤内型原虫が出現したことから、肝細胞内での増殖を経由した感染が成立した。サル No. 2 の赤内型原虫はクロロキン治療により消失したとはいえ、肝臓内には休眠体が残存していると可能性が高く、今後も再燃を注視した観察を継続していく予定である。

③成果の公表

平成 29 年 5 月 1 日現在、観察が継続中のため、成果の公表には至っていない。

6. 自己評価

本研究では *P. cynomolgi* のスポロゾイトを回収する手技を確立し、それらを用いた接種実験では感染を成立することができた。しかしながら、実験の開始が大幅に遅れ、当初予定していたスポロゾイトのトランスクリプトーム解析やメタボローム解析には至らなかった。大幅に進行が遅れた要因は以下の事柄があげられる：① 実験実施前に 3 か所の研究機関での審査が必要とされ、予想以上の審査期間を要した。② 実験用サルの搬入が平成 28 年 11 月に限定された。③平成 29 年 1 月～2 月の期間、媒介蚊の人工繁殖が原因不明の不調に陥り、必要数の蚊の準備が 3 月以降になった。今後は今回の結果を基盤にして肝臓休眠体からの再燃機序や、再燃に関連する遺伝子発現等、これまで国内では着手されなかった研究分野へ展開できる可能性が有力になったと自己評価している。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- Ⓐ (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- Ⅲ (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- Ⅳ (予想以上の成果を挙げられた)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：赤痢アメーバにおけるコレステロール硫酸とシスト形成との関連性の証明
課題番号：28-一般-13
2. 代表者：見市(三田村)文香（佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野・助教）
共同研究者：吉田 裕樹（佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野・教授）
中村 梨沙（長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野・助教）
濱野 真二郎（長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野・教授）
3. 決定額： 400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は、ヒトの大腸に感染しアメーバ赤痢を引き起こす寄生原虫である。発展途上国を中心に世界で年間約5千万人の感染者、10万人の死者を出している。臨床薬が少ないため、病原性の解明、新規薬剤開発が危急の課題である。感染は、アメーバ赤痢罹患者の糞便中の“シスト”に汚染された食物や水の摂取によって引き起こされる。そのため、宿主間伝播の理解、さらにはその阻止を実現させるためにはシスト形成の制御機構の解明が必須であるが、ほとんど明らかになっていない。我々は、これまでにシスト形成の新規制御分子としてコレステロール硫酸 (CS) を見出しており、CSを鍵分子としてシスト形成の制御機構の解明を試みる研究を行っている。これまでの知見をまとめると (Mi-ichi et al., *PNAS* 2009, 2015; *PLoS NTD* 2011; *Eukaryot cell* 2015)、

- 1) コレステロールの硫酸化によって合成される脂質分子 CS は、宿主由来のコレステロールを基質として赤痢アメーバの CS 合成酵素によって合成される。
- 2) この CS 合成酵素の発現量はシスト形成に伴い上昇し、細胞内 CS 濃度を上昇させる。
- 3) 細胞内の CS 濃度に依存してシスト形成が誘導される。
- 4) シスト形成は CS 合成阻害により阻害される。

である。*E. histolytica* の培養株はシスト形成能を失っているため、以上の研究はシスト形成のモデルである *E. invadens* を用いた *in vitro* による解析であり、アメーバ赤痢との関連性を明確化するためには、*E. histolytica* を用いた *in vivo* における CS とシスト形成との関連性の証明が欠かせない。本申請研究では、*E. invadens* の *in vitro* の系で、*in vivo* でシスト形成がなされる大腸環境を模倣したような系を構築し、CS の合成量に変動を与える因子を探索する。*E. histolytica* 臨床分離株をマウスに感染させ、同定した因子を内・外的に制御した状態でのシスト形成能との関係を解析する。さらに、シスト形成能と相関する因子により変動する血中マーカーとシスト数の関連を流行地域でのアメーバ罹患者の疫学的解析により解析する。

②研究内容

[1] CSの合成量に変動を与える因子を探索

E. invadens の *in vitro* の系で、*in vivo* でシスト形成がなされる大腸環境を模倣したような系を構築し、CSの合成量に変動を与える因子を探索する。CS合成酵素発現上昇を引き起こす因子を探索する（Real time PCRで検出）。

[2]マウス感染モデルでの赤痢アメーバのCS合成能の解析

[1]で同定した因子を内・外的に制御した状態のマウスに *E. histolytica* 臨床分離株を感染させ、CS合成能およびシスト形成能との関連を解析する。*E. histolytica* 臨床分離株の感染成立後、マウスより回収した赤痢アメーバの mRNA の発現解析を行い、CS合成酵素の発現上昇の有無を解析する。さらに糞便中へのシスト排出の有無を解析、シスト形成への影響を調べる。

[3] 流行地域でのアメーバ罹患者の疫学的解析

[1] [2] で見出したシスト形成能と相関する因子により変動しうる血中マーカー（例えば、コレステロール、中性脂質、サイトカインなど）とシスト数との関連を、流行地域でのアメーバ罹患者の疫学的解析により解析する。

③予想される成果

本研究は、アメーバ赤痢の病原虫である赤痢アメーバを題材に、申請者が *in vitro* の実験系で見出したコレステロール硫酸（CS）によるシスト形成制御が、宿主であるヒト体内の赤痢アメーバにおいても同様に機能していること、そして実際の感染症“アメーバ赤痢”の宿主間伝播においても重要な役割を担っていることを証明することに主眼を置く。CSによるシスト形成制御は、モデル生物である *E. invadens* の培養系を用いて申請者ら自身で証明している。さらに、赤痢アメーバの知見（CS合成酵素の発現量がシスト形成能を持つ赤痢アメーバ臨床分離株で上昇している（Ehrenkaufner *et al*, *Cell Microbiol* 2007））からも、CSがシスト形成制御の鍵分子として働いている可能性が高い。したがって、疫学的解析を行うことで、ヒトアメーバ赤痢において、

宿主への感染 ⇒ CS合成能の上昇 ⇒ シスト形成

という流れを証明できると考えている。赤痢アメーバのシスト形成は次の宿主への唯一の伝播経路であり、その阻害は感染拡大を阻止することが出来るため着目されてきたが、分子機構は不明な点が多く現実性に乏しかった。しかし、本研究の予想される成果「CSによるシスト形成制御とアメーバ赤痢症との関連性を明らかにする」ことにより、宿主への感染伝播を直接阻止する薬剤の開発につながる重要な分子基盤を得ることが出来ることが期待できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

赤痢アメーバの培養株はシスト形成能を失っているため、*E. invadens* の *in vitro* の系を用いてシスト形成の解析を行っている。これまで、形成されるシスト数の計測は、顕微鏡を用いた細胞計測が主流であった。シストと栄養体と区別をするため、界面活性剤で一定時間処理後（シストは界面活性剤耐性）、トリパンブルー染色を行い顕微鏡下で計測する方法であるが、長時間の処理を要し、また顕微鏡での計測であるため、処理数に限界があり、網羅的解析は不可能であった。また、界面活性剤の処理時間によって細胞数が変化することを見出しており、シストの表現型を界面活性剤耐性のみで議論することに限界があった。

そこで、最初に迅速にかつ再現性高く *E. invadens* のステージ毎の細胞数を計測できる方法の確立を試みた。

②成果（結果＋考察）

フローサイトメトリー法で検出するため、最初に、シストおよび栄養体の染色方法を検討した。結果、シストを特異的に染色する色素（染色 A）、栄養体を特異的に染色する色素（染色 B）を得た。染色 A と B で 2 重染色を行うと、栄養体とシストの集団を明確に分離して検出することが出来た（見市、未発表）。また、シスト形成を誘導、タイムコースを追って染色 A と B で 2 重染色を行ったところ、細胞集団の動きとして検出することに成功した（見市、未発表）。

本方法を用いて、従来は不可能であった「シスト形成過程における阻害剤の作用ステージの解析」が可能となった。さらに定量性もあることも見出しており、阻害剤の効果を細胞数の計測で行うことが可能であり、網羅的に阻害剤の探索を行うことが可能になった。本方法は *E. invadens* を用いて確立したが、赤痢アメーバにも適用が可能であることも確認しており（見市ら、未発表）、今後は *E. histolytica* 臨床分離株についても解析を進めていく。

現在、本方法を用いて、コレステロール硫酸のシスト形成誘導能を促進する因子、および阻害する因子の網羅的探索を行っており、有用な候補因子を得ることに成功しており、今後これらの因子の作用ステージの解析を予定している。

③成果の公表

- 1) **Mi-ichi F***, **Yoshida H**, **Hamano S**. *Entamoeba* encystation: new targets to prevent the transmission of amebiasis. *PLoS Pathogens*. 12: e1005845. (2016) (*Corresponding author)

6. 自己評価

宿主への感染伝播を直接阻止する薬剤の開発につながる重要な分子基盤を得るという当初の目標に向けて、新技術の創出を行うことに成功した。今回確立した、“赤痢アメーバの細胞数を計測できるフローサイトメトリー法”は、迅速かつ再現性高く詳細なステージ進行の解析や、阻害剤の作用機序の解析にも有用であり、現在論文投稿準備中である。本方法はコレステロール硫酸によるシスト形成制御とアメーバ赤痢との関連性を明らかにすることにも有用な方法であり、現在そちらも並行して進行している。さらに、これまでの成果によって得た知見を総説として投稿し、アクセプトされた (Mi-ichi F et al, *PLoS Pathogens*, 2016)。満足できる成果を得られたと考えている。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- Ⓐ (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (6の自己評価で述べておれば省略して良い)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：マラリア感染赤血球に有効な新規薬物送達システムの開発
課題番号：28-一般-14
2. 代表者：田上 辰秋（名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師）
共同研究者：矢幡 一英（熱帯医学研究所・原虫学分野・助教）
尾関 哲也（名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授）
Shaimaa Ibrahim（名古屋市立大学・大学院薬学研究科・博士後期課程）
3. 決定額： 400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

マラリアは熱帯・亜熱帯を中心に世界で70カ国以上に分布している原虫感染症である。日本では海外渡航から帰国した人々が発症した例が多数報告されており、先進国においても治療法の確立が望まれている。マラリア原虫は感染後、赤血球内に潜伏することにより、生体による排除機構を回避し、赤血球内部で増殖し、重症化の原因となっている。また、赤血球に潜在するマラリア原虫に到達する薬物量が不十分であることなどの理由により、既存の抗マラリア薬に対する薬剤耐性が大きな問題となっている。治療効果を得るために大量の抗マラリア薬を投与した場合、副作用の発現が懸念される。このため赤血球内に潜在するマラリア原虫に高効率の薬物を送達できるような、革新的な薬物送達システム（通称：DDS）の技術開発が望まれている。

本研究の目的は、マラリア原虫感染赤血球指向性物質を含むドラッグナノキャリアが、赤血球に感染したマラリア原虫に対しどのように薬物送達を行うのかメカニズムの解明を行い、より送達効率・治療効果の高い抗マラリア DDS 製剤の開発を行うことである。

本計画では、申請者が新規に開発したマラリア原虫感染赤血球指向性キャリアを用い、キャリア中の薬物が赤血球内のマラリア原虫に送達される様子を蛍光イメージングすることにより、薬物送達過程を可視化し、効率的に薬物を送達されるために有用な情報の取得を行う。申請者の知る限り、蛍光イメージングを用いて、赤血球に感染したマラリア原虫がドラッグキャリアとどのように相互作用しているのかを調査した研究は、現在ではほとんど行われていない（Kirk K. *Physiological Reviews*. 2001）。従って、本研究が実施されることにより、マラリア感染赤血球がナノ～サブミクロンサイズの粒子とどのように相互作用するのか間接的に理解することにつながると考えられる。さらにイメージングにより得られた情報を活用し、キャリアの改良を行うことにより、より治療効果の高い抗マラリア製剤の開発を行う。

②研究内容

1. クロロキン・白金錯体複合体含有リポソーム製剤の調製と製剤評価（平成 27 年度に実施・報告済）（名古屋市立大学・熱帯医学研究所において実施）

抗マラリア薬活性をもつクロロキン・白金錯体の合成と物理的性質の評価を行う、②クロロキン・白金複合体のリポソーム内封入と薬物封入リポソーム製剤の評価、③熱帯熱マラリア原虫感染赤血球に対する抗マラリア効果の評価などを行った。

2. 抗酸化物質を含有するリポソーム製剤の開発と治療機序の解明（平成 28 年度（今回の報告内容））

（名古屋市立大学における実施項目）

抗酸化ストレスにマラリア原虫は比較的弱いことや、炎症応答（サイトカイン分泌等）を抑えることで症状を緩和することから、近年、様々な抗酸化物質を用いたマラリア研究が行われている。本検討では、抗酸化物質（クルクミン）を含有した機能性脂質ナノ粒子の調製を行い、その製剤評価（含有率、粒子径、構造、抗酸化能など）を行う。その後、マラリア原虫感染マウスに本製剤を投与し、治療効果（生存期間、感染率）を評価する。

（熱帯医学研究所における実施項目）

治療機序を薬物送達学の観点から解明するために、顕微鏡観察を行い、薬物（クルクミン、DiI など）がどのようにマラリア原虫まで到達しているかどうか観察を行う。

③予想される成果

検討の結果、動物に対して、顕著な治療効果を有している製剤について、なぜそのような大きな治療効果が得られたのか（もしくは、想定した場合と比較し、治療効果が得られなかった場合は、なぜだめだったのか）、蛍光イメージングを行い、視覚的に薬物の送達過程をモニターすることで、薬物の送達過程においてどこが効果的で、不十分であったかを確認することにより、リポソーム製剤の改善に役立てることができ、その結果、さらに優れた製剤の開発につながるができる。以上の解析を行うためには、熱帯医学研究所の研究環境が必須であると考えた。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き：

(名古屋市立大学において評価した項目)

クルクミン含有リポソームの調製：

薄膜水和法により調製を行った。クルクミンおよび脂質を有機溶媒に溶解し、有機溶媒を蒸発させることにより、薄膜を形成した。その後、サンプルを乾燥させ、さらに水分の除去を行った。次に、ポリカーボネート膜を内部に設置したエクストルーダーを用い、粒子径を 100 nm 程度に整えた。粒子径は動的光散乱法の機器を用いて、測定を行った。また、電子顕微鏡により、リポソームの構造の観察を行った（ネガティブ染色法）。

クルクミン含有リポソームの抗酸化能力の評価：

調製した種々のクルクミン含有リポソームを α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) と混合し、吸光度を測定することにより抗酸化作用を評価した。

クルクミン含有リポソームにおける赤血球の溶血能の評価：

マウスより採血し、赤血球画分を採取した。等張溶液で希釈した赤血球懸濁液をクルクミン含有リポソームと混合し、一定時間培養した (37°C)。サンプル溶液を遠心し、上澄みの吸光度を測定することにより、溶血の程度を評価した。Triton-X 溶液を用いて、赤血球を破壊したものを 100% とみなした。

(熱帯医学研究所において評価した項目)

クルクミン含有リポソームのマラリア赤血球の挙動： ヒトマラリア感染赤血球懸濁液とクルクミン含有リポソームを混合し、共焦点顕微鏡により経時的にクルクミン由来蛍光の観察を行った。

②成果（結果＋考察）

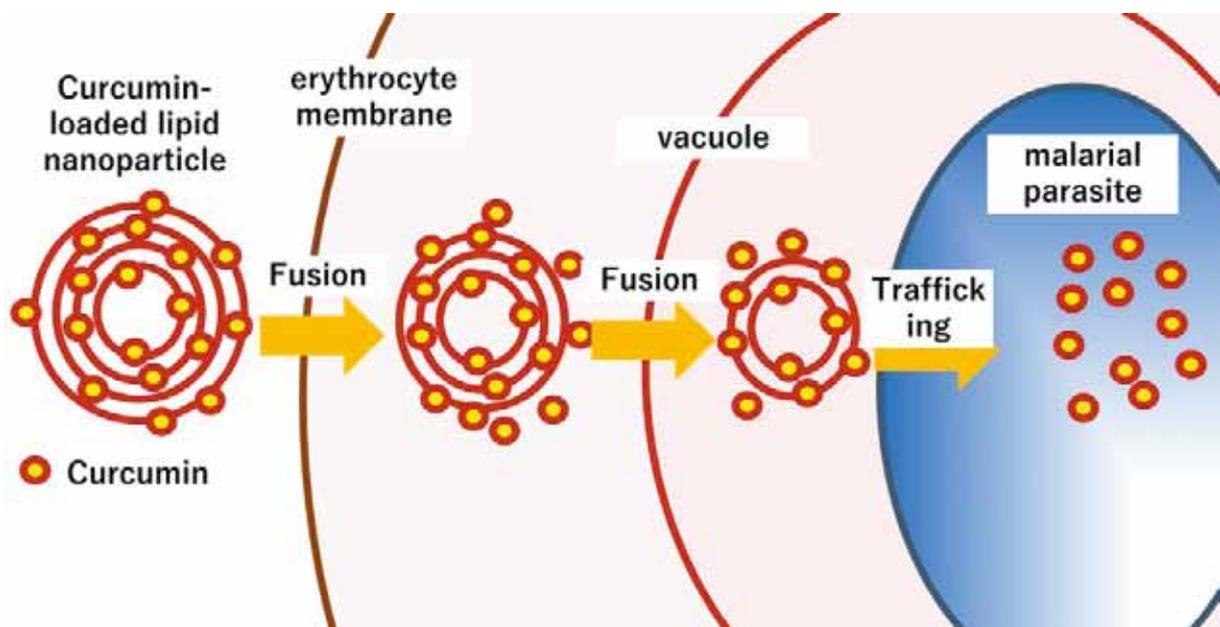
調製したリポソームを電子顕微鏡で観察したところ、多重膜構造をとっていることが明らかとなった。これは、リポソームの構成脂質中に一本鎖脂質が含有されていることによるものであると推察される。動的光散乱法による測定の結果、粒子径は 100 nm 弱であった。また、クルクミンの封入率は 90% 程度であった (Drug-lipid ratio (w/w) = 1/20)。

クルクミン含有リポソームの抗酸化作用の検討においては、実験条件の構築に時間を要したものの、測定を行うことができた。クルクミン含有リポソームは濃度・時間依存的に、抗酸化作用を示すことを確認した。

クルクミン含有リポソーム溶液が赤血球の溶血に与える影響について評価を行った。クルクミン含有リポソームは、低濃度および中濃度において、溶血を示さなかったが、高濃度の溶液を、培養した場合、溶血することが明らかとなるため、溶液濃度を考慮する必要があると言える。

最後に、共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、実験条件において、さらなる最適化が必要ではあるものの、クルクミン由来と思われる蛍光がマラリア原虫内に確認され、今回調製したクルクミン含有リポソームが最終的にマラリア内部に到達していることが示唆された。

今回得られた、結果をもとに、以下のようなデリバリーシステムが提案できる。多重膜脂質ナノ粒子の最も外側の膜が赤血球膜と融合し、内部の粒子が赤血球内に到達する。さらにその粒子が液胞、およびマラリア原虫と融合もしくはなんらかの取り込みを受け、薬物であるクルクミンを送達できる可能性が示唆された。今後の検討が期待できる。



図：赤血球感染マラリア原虫に対する、多重膜担体による薬物送達システムの提案

③成果の公表

以下の論文を行った（研究内容は前年度の共同研究内容によるものである）。

Shaimaa Ibrahim, Tatsuaki Tagami Tetsuya Ozeki, Effective-Loading of Platinum-Chloroquine into PEGylated Neutral and Cationic Liposomes as a Drug Delivery System for Resistant Malaria Parasites. *Biol. Pharm. Bull* (2017) *In press*.

6. 自己評価

検討の結果、クルクミンを搭載した新脂質様リポソームの調製に成功した。検討を進めていくにつれて、調製した一部のリポソームが多重膜構造をとっていることが明らかとなった。赤血球に感染したマラリア原虫に薬物を送達する場合、いくつものバリア（膜）を通過する必要があるため、本研究のように多重膜構造をとったリポソームが優れた融合能力をもつ場合、クルクミンのような薬物を効率的に送達できるのではないかと思われる。今後は多重膜リポソームを効率的かつ均一に調製する方法の確立が必要であると考えられる。

共焦点顕微鏡のクルクミン挙動の観察の結果より、クルクミンがマラリアに内在化している様子が確認された。クルクミンをマラリアがなぜ取り込むのかについてはまだ不明である。現在マラリアは酸化ストレスに弱く、マラリアに対するクルクミンの効果が報告されている。今回検討した抗酸化効果の実験により、クルクミン含有リポソームは顕著な抗酸化作用を示した。我々は、今回調製した多重膜構造のリポソームの特徴を活かし、マラリア感染赤血球に対して、効率的に融合できクルクミンの送達効率を最大限に発揮できるようなリポソームキャリアの開発を行う必要がある。

その一方で、本計画で行う予定であった、治療効果（特に動物実験）を行うことができなかった。今後、マラリア原虫が感染したマウスモデルを用いて、調製したクルクミン含有リポソームの有用性について検討していきたいと考えている。

以上より、本研究において、リポソームキャリアの調製、マラリアに対するクルクミンの送達という点において一定の成果を得ることができた。しかし、今後の検討が必要であり、引き続き、検討を行っていきたいと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙がらなかった）
- Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：小児滲出性中耳炎の罹患率に与える肺炎球菌ワクチンの効果
課 題 番 号：28－一般－15
2. 代 表 者：金子 賢一（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 准教授）
共同研究者：原 稔（長崎大学医学部医学科 医学部研究高度化支援室 助教）
佐藤 智生（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 大学院生）
吉田 レイミント（長崎大学熱帯医学研究所 小児感染症学分野 教授）
樋泉 道子（長崎大学熱帯医学研究所 小児感染症学分野 助教）
3. 決 定 額： 800 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

目的：肺炎球菌ワクチン未導入地域であるベトナム・ニャチャンの3歳以下の小児に対し10価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV-10）接種を行い集団免疫を獲得したのちに乳児への接種を導入することで、滲出性中耳炎の罹患率が低下することが期待され、大規模な前向きの臨床研究によってこれを明らかにする。

滲出性中耳炎は小児の難聴の原因として大多数を占めており、この予防が可能だとするとその医療経済的効果は計り知れない。過去に肺炎球菌ワクチンによる急性中耳炎の予防およびそれによる医療費削減効果が報告されているが（Zhouら、2008年）、急性中耳炎が遷延・慢性化して滲出性中耳炎に移行することが多いため、同ワクチンにより滲出性中耳炎の罹患率も低下することが期待される。しかし、これまでに大規模な前向きの臨床研究成績は報告されていないため、これを明らかにしたいと考えている。

②研究内容

PCV未導入地域であるベトナム・ニャチャン市で区域毎に異なる接種スケジュールでPCVを導入し、その肺炎球菌保菌率を比較する介入研究が行われる。その中でニャチャン市の27区域がランダムに5群（接種スケジュールの違いによりPCV-10接種群が4群、PCV-10接種を行わない対照群が1群）に分けられるが、本研究ではプライミング接種2回、ブースター接種1回を行う群（以下、PCV-10群）と対照群の2群を対象として研究を行う。すなわち、まず最初にPCV-10群および対照群の地域における12～24か月の小児からそれぞれ240名を抽出して問診、診察および上咽頭からの菌検査を行い、滲出性中耳炎の罹患率および肺炎球菌保菌率を明らかにする。続いて、PCV-10群の地域に住む3歳未満小児全員に月齢に応じた回数でPCV-10を接種する。その後（平成28年5月以降）、PCV-10

群の地域内で新たに出生した乳児に対し生後 2 か月、4 か月、12 か月時点で PCV-10 の投与を行っていく。対照群の地域内で出生した乳児に対しては、PCV-10 の投与は行わない。1 年後（平成 29 年）、2 年後（平成 30 年）、3 年後（平成 31 年）、4 年後（平成 32 年）に、各群の地域における 12～24 か月の小児からそれぞれ 240 名を抽出して問診、診察および上咽頭からの菌検査を行う。以上によって得られた滲出性中耳炎罹患率と肺炎球菌保菌率を 2 群間で比較する。

③予想される成果

過去に報告されている肺炎球菌ワクチンによる急性中耳炎の予防効果から推測し、PCV-10 群では対照群に比べて滲出性中耳炎の罹患率が 5～10%程度低下することが期待される。また、肺炎球菌保菌率の低下が期待される。

以上が確認できたならば、PCV-10 の導入により、多くの小児が滲出性中耳炎による慢性的な難聴から解放され、また、約 1%の滲出性中耳炎例が移行していくとされるさらに重症な真珠腫性中耳炎や癒着性中耳炎の予防にもつながると期待される。これらの中耳炎に対する PCV-10 の予防効果が明らかになれば、臨床的にも医療経済的にも大変有益な情報と考えられる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

平成 28 年 10 月 22・23・29 日にニヤチャン市において、今後 PCV-10 のプライミング接種 2 回・ブースター接種 1 回 (2p+1) を行う予定の地域から月齢 4~24 か月の小児 720 人を抽出し、アンケートによる問診、診察および上咽頭からの菌検査を行った。滲出性中耳炎の診断は耳鏡による鼓膜の視診により行い、参考として気密式拡大耳鏡を併用した。診断は原則右耳のみで行ったが、もし耳垢等で視診が困難な場合は左耳で行った。



図 1 耳鏡

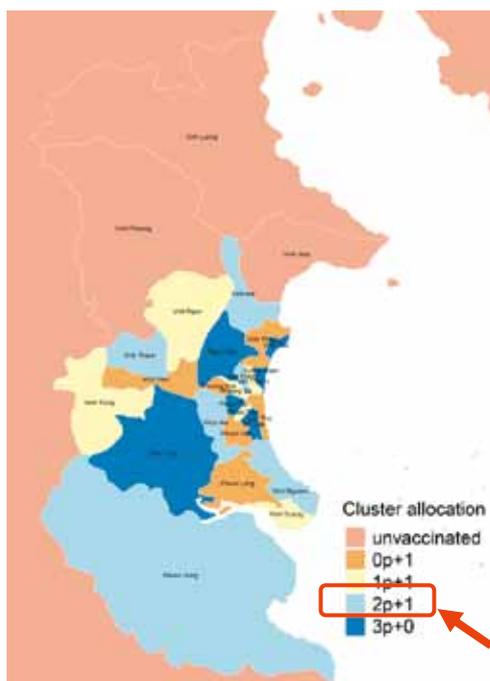


図 2 5 群に分けられたニヤチャン市の地域：
本研究の対象となったのは「2p+1」で示された地域である。

②成果（結果+考察）

訪れた小児 690 人に対して診察を行い、両側の耳垢や体動により視診が困難であった児を除く 672 人 (672 耳) で評価が可能であった。このうち 60 耳 (8.9%) に滲出性中耳炎を認めた。また、都市部で 20 耳 (6.2%)、非都市部で 40 耳 (11.4%) の有病率であり、両者に有意差を認めた ($p=0.0271$)。なお、アンケートおよび菌検査の結果は解析中である。今回、PCV-10 導入の効果を評価する際に、対照となる導入前のデータを得た。これは、条件 (国や児の年齢等) が異なるものの、過去の滲出性中耳炎の有病率調査結果 (13.7~25.3%) と比較すると、8.9%という有病率は低い傾向にあると言える。

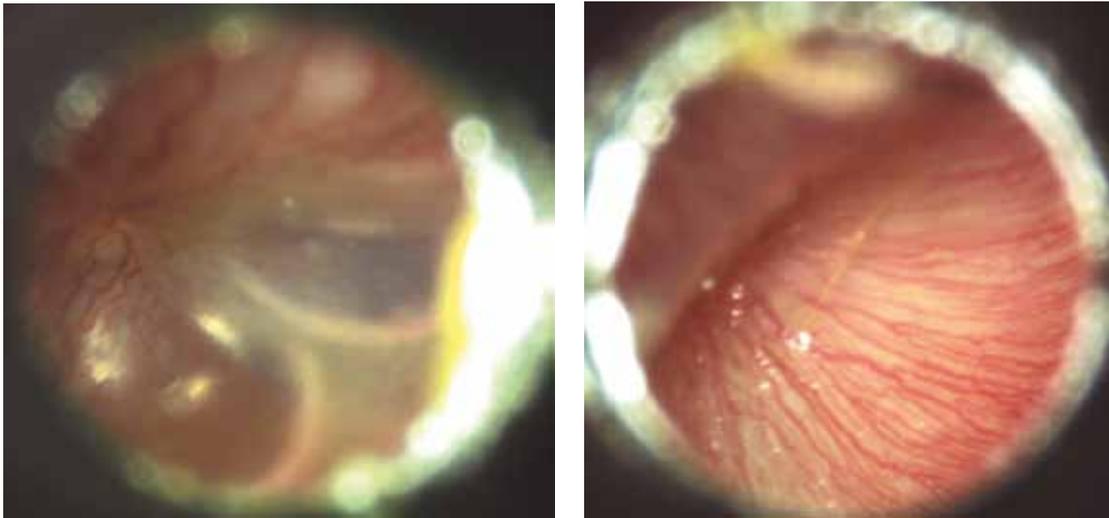


図3 滲出性中耳炎例の鼓膜所見（いずれも右耳）：
左の例では中耳貯留液と気泡を認める。右の例では鼓膜の発赤と軽度
膨隆を認め、いわゆる **semi-hot ear** の状態である。

③成果の公表

学会発表

「ベトナム・ニャチャン市における滲出性中耳炎有病率」佐藤 智生、原 稔、金子 賢一、
樋泉 道子、吉田 レイミント 平成 29 年 4 月 9 日 第 153 回日耳鼻長崎県地方部会学術講
演会（長崎）

6. 自己評価

当初の計画では 2p+1 群と接種を行わない対照群との 2 群間比較を行う予定であったが、診察可能な児の数は限られるため、2p+1 群における今回の接種前のデータを対照とし、この群の今後の接種後のデータと比較していくデザインに変更した。

短期間で多数の児の診察を行ったが、大きな混乱もなく良質で貴重なデータを得ることができたと考える。訪れた児のうち、18 人（2.6%）で両側の耳垢や体動のために滲出性中耳炎の有無の診断が不可能であったが、これは想定の範囲内であった。

予想よりも滲出性中耳炎の有病率が低かったが、PCV の導入によりこの割合がどのように変化していくかは、今後の調査において興味深く観察していきたいと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- Ⓒ （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：フィリピンにおける日本住血吸虫症の抑制過程に関する総合的研究
課題番号：28－一般－16

2. 代表者：飯島 渉（青山学院大学・文学部・教授）
共同研究者：千種 雄一（獨協医科大学・医学部・教授）
野地 元子（国立感染症研究所・客員研究員）

3. 決定額：400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

本研究計画は、フィリピンにおける日本住血吸虫症の抑制の過程を多角的に検証し、何がもっとも重要な要因であったのか、を検討することを目的とする。こうした検証を通じて、根絶するには至っていないフィリピンにおける日本住血吸虫症対策の今日的なあり方に関しても、知見を提供したい。

フィリピンは、日本住血吸虫症の流行地の一つであったが、日本住血吸虫の中間宿主であるオンコメラニアへの対策などの公衆衛生的な対策ののち、プラジカンテルの導入とMDAによって、かなりの程度までその抑制に成功した。しかし、抑制にいたる過程の検証は十分とは言えない。それは、プラジカンテルの導入によって治療方法が確立されたため、逆に、日本住血吸虫症の発生の環境的要因、地域での公衆衛生的な対策や学校保健の役割などが検証されにくくなっているからである。

2013年11月には、台風30号がレイテ島などに甚大な被害を与え、日本住血吸虫症をとりまく状況も大きく変化している。日本住血吸虫症の抑制の過程および現状に関する総合的な検証が求められるゆえんである。

②研究内容

フィリピン、特に、レイテ島における日本住血吸虫症の抑制の過程を、長期的な時間軸の中で総合的に検証した。長崎大学熱帯医学研究所ミュージアムに保存されている関連の資料の整理を進め、過去の日本における日本住血吸虫症の抑制の過程との比較も行った。この過程で、メンバーは、フィリピンにおけるフィールド調査で得られたデータや成果を相互に提供しあい、歴史学（医療社会史）の分析と寄生虫学や熱帯医学の分析の結果を共有し、研究を進めた。

プラジカンテルを利用したMDAの導入は、フィリピンなどの日本住血吸虫症対策を大きく変化させた。しかし、治療方法の確立によって、日本住血吸虫症の抑制の要因はかえってわかりにくくなった。そのため、一定の抑制は効いているものの、フィリピンにおける日本住血吸虫症の根絶は依然として困難である。治療方法が確立されたことによって、制圧のための社会医学的対策への関心が薄れてしまったことが問題の一つであることが確

認された。

③予想される成果

地域（バランガイ）レベルでの分析を通じて、今後、複数のパターンが析出されると予想される。すなわち、MDA以前から抑制に成果をあげていた地域、MDAによってはじめて抑制が顕著になった地域、また、生業や環境の変化、水質の汚染（変化）などの要因が重要であった地域などである。

また、フィリピンでは、将来的にも台風の被害が予想され、中間宿主の分布状況が変化し、日本住血吸虫症をめぐる状況が変化することも予想される。こうした中で、地域にそくした抑制の経験が集約されることは、公衆衛生的な対策への助言を可能とし、国際保健の領域への貢献の可能性も大きい。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

第二次大戦後、JICAなどの援助機関が日本住血吸虫症の抑制のための医療協力を進め、レイテ島のSchistosomiasis Control and Research Hospitalなどに貴重な疫学的データが蓄積された。しかし、2013年11月、台風30号の甚大な被害によって、疫学的なデータも被災（水損および破損、散逸）してしまった。そのため、関連する科研費などの研究資金とも連動させながら、データの救済＝修復と保全を進め、この過程で、レイテ島の関係者と緊密な関係を構築し、長期的な時間軸での日本住血吸虫症の抑制の過程を検討した。

注目すべき成果として、関係者の一人である、東京大学名誉教授の田中寛氏のインタビューを行い、その記録をオーラルヒストリー記録として、研究資料として整理した。

レイテ島のSchistosomiasis Control and Research Hospitalが保存していた疫学的なデータは、PDF化などを進め、バランガイを単位とする抑制の過程を再現するための基礎的な調査を行った。

②成果（結果＋考察）

疫学的なデータ、オーラルヒストリーおよびフィールド調査から明らかになった事実関係の一部を記す。

JICAによる医療協力の対象となったDagami Central IIという学校での調査では、日本住血吸虫の陽性率と年罹患率はあまり落ちなかった。しかし、環境改編として、水を抜く作業は進められており、同時に、周囲の衛生環境の整備にも関心が払われていた。

結論的には、日本が山梨などで蓄積した対策は、レイテではその実行が困難であったことが確認できた。こうした中で、プラジカンテルが登場した。当時、局長のサントス氏が昇進してマニラにおり、レイテの所長はプラス氏であった。そして、林正高氏がNPO法人を立ち上げ、1970年にはフィリピン全部の陽性の人たちの推定集計が65万人だったものが、プラジカンテルの導入によって3万人を切る水準に到達した。

プラジカンテルの導入は、フィリピンにおける日本住血吸虫症の抑制のために決定的な役割を果たしたといえる。他方、社会医学的な関心が薄れ、制圧への対策が、

結核対策や母子保健などの後景に置かれる結果となってしまった。

感染症や寄生虫病の抑制に関する歴史的経験は、これを整理し、資料化してはじめて利用可能になる。つまり、「資料はあるのではなく、つくるもの」である。東日本大震災ののち、地震や津波をめぐる歴史学的な知見を、予知や被害を食い止めるための知恵として利用することが本格化した。これは、感染症や寄生虫病の歴史学にも大きな示唆を与えている。日本の社会は、感染症や寄生虫病の抑制に成功すると、その記録を廃棄してしまうことが多かった。フィリピンの場合にも台風などによって貴重な疫学的なデータが失われてしまった。しかし、それは感染症や寄生虫病をめぐる経験を放棄してしまうことでもある。この面で、歴史学が、医学や公衆衛生学と共同で進めることが出来る課題は数多く残されていることも確認できた。

③成果の公表

飯島渉「“歴史疫学”の世界—日本におけるマラリア、日本住血吸虫症、フィラリアの制圧とその経験の歴史化」『医学のあゆみ』No. 258、2016年7月23日、330-338頁。

6. 自己評価

本研究の目的は、フィリピンにおける日本住血吸虫症の抑制の過程を検証するために、医療社会史的な分析と寄生虫学・熱帯医学や国際保健の研究者が緊密な関係を構築し、意見交換を進めながら、特定地域の様相を再現することであった。

共同研究の基盤の構築という点では十分な成果を上げたが、抑制の過程の検証の作業は今後本格化させる必要がある。その意味で、不満は残るが、一応の成果を上げたと考えられる。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：多角的な小動物 PET/SPECT/CT イメージングによる SFTS 発症メカニ
ズムの解析および治療法の開発

課題番号：28－一般－17

2. 代表者：淵上 剛志（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 健康
薬科学講座・准教授）

共同研究者：早坂 大輔（長崎大学熱帯医学研究所 ウイルス学分野・准教授）

中山 守雄（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 健康
薬科学講座・教授）

吉田 さくら（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 健康
薬科学講座・助教）

3. 決定額：500 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は、2011年に中国で初めて報告されたブニヤウイルス科フレボウイルス属の新しいウイルスにより引き起こされる感染症で、マダニにより媒介されると考えられている。日本でも西日本を中心に、これまでに2016年1月27日現在で170例以上のSFTS患者が確認されている。SFTS患者には血小板・白血球減少、発熱、消化器症状等の症状がみられ、国内での致死率は約30%にのぼる。その病態発現機序は十分に解明されておらず、現在のところ有効なワクチンや治療法はない。B6系統の正常マウスにSFTSウイルスを感染させると、明確な症状や致死性はないが一過性の白血球減少がみられる。また、interferon- α/β receptor (IFNAR) KOマウスでは接種量に応じて致死性がみられる。従って、マウスモデルはSFTSV感染による病態発現メカニズムの解析に有効であると考えられる。そこで、同一個体の病態変化を非侵襲的かつリアルタイムで評価することができるPET (positron emission tomography)やSPECT (single photon emission computed tomography)によるSFTSV感染マウスの*in vivo*イメージングを行うことで、病態発現部位を経時的に追うことができるため、SFTS発症機序の解析に有用であると考えられる。本学には、2012年より感染症イメージングのための小動物用PET/SPECT/CT装置が導入されており、国内で唯一BSL-3施設が必要なモデル動物を用いた核医学イメージングが可能である。

そこで本研究では、まず初めに種々の分子プローブ（新たに開発する分子も含む）を用いたSFTS病態モデルマウスのPET/SPECT/CT (computed tomography) イメージングを行い、その詳細な発症メカニズムを捉えることを目的とした。具体的には、① ^{18}F -FDG (グルコース誘導体；糖代謝の盛んな脳組織、心筋、炎症組織への集積)、② ^{68}Ga -citrate (ラクトフェリンを介した集積、多核白血球への取り込み後の炎症部位への遊走による炎症組織への

集積)、③ ^{68}Ga -platelet (SFTS ウイルス感染の最初の標的は血小板であり、SFTS 本体を捉えることが期待される)、④ ウイルス感染部位を直接捉えるための ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体の創製及び SPECT/CT イメージング、⑤ ^{68}Ga -folate 誘導体 (活性化マクロファージ等の炎症組織を捉えることが期待される) の5種の分子プローブを用いて炎症の発症過程や SFTS ウイルスの挙動等を PET/SPECT/CT で捉えるとともに、病理組織学的な検討も併せて行うことで詳細な SFTS の病態発現機構の解析を行うこととした。

また、最近の早坂博士らの検討により、SFTS ウイルス (SFTSV) 感染マウスへの抗 SFTSV 血清が病態の進行を効果的に抑えることが見出されている (Shimada, *Virology*, 2015)。また、前年度の共同研究にて ^{18}F -FDG を用いた PET 評価を行い、SFTS 病態モデルマウスの炎症が起こっている腸管等に、非感染群とは明白に異なった高い集積を確認している。さらに、抗 SFTSV 血清の腸管における炎症抑制効果を可視化することに成功し、病態の重篤度を分子レベルで追跡できることを証明した (D. Hayasaka, *Oncotarget*, 2016)。一方で、生体内でどのようなメカニズムで治療効果を示しているかに関しては、さらなる詳細な検討が必要である。また、さらに最適化された治療法の開発も今後必要となってくると思われる。そこで、本研究で開発する多角的な分子イメージング法を活用して、病態発現や治療効果に関する詳細なメカニズムの解析を行うとともに、新たな SFTS 治療法の開発も目指すこととした。

②研究内容

6. 研究内容 (2年以上の研究期間の課題の場合は、次年度以降の計画の概要も記載願います。)

1. SFTS 病態モデルマウスの作成

熱帯医学研究所の早坂博士との共同研究にて、既報のプロトコルに基づき (S. Shimada, *Virology*, 2015)、IFNARKO マウスに SFTSV ($10^2 \sim 10^6$ ffu) を腹腔内投与し、軽症から重症まで様々な症状の SFTSV 感染マウスを作成する。対照群として IFNARKO マウスに PBS を同様に投与した非感染マウスを作成する。感染マウスに関して、感染後 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間の体重、体温を計測し、行動異常の有無を観察する。また、血液サンプルを採取して、血小板数、白血球数を計測し、SFTSV の検出は 定量的 RT-PCR にて行う。非感染マウスについても同様の実験を行う。

2. SFTS 病態モデルマウスの核医学イメージング

(1) ^{18}F -FDG を用いた PET/CT イメージング

SFTSV 感染マウスあるいは非感染マウスにおいて、感染後 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間に ^{18}F -FDG を投与した後、SFTSV 感染による脳機能、心機能の変化及び炎症の発生をリアルタイムで PET イメージング (30~60 分撮像) する。併せて、CT により詳細な形態学的変化も経時的に評価する。また、撮像後にマウスを解剖して、それぞれの臓器の放射能集積を γ カウンタにて定量する。撮像後に、主な感染部位である脾臓、胃、脾臓、小腸、大腸のパラフィン切片を作成し、H&E 染色、SFTSV 特異的血清を用いた SFTSV の検出、抗 CD61 抗体を用いた血小板の検出、抗 F4/80 抗体によるマクロファージの検出、抗体による各種インターロイキン、サイトカインの検出を行う。

(2) ^{68}Ga -citrate を用いた PET/CT イメージング

上記(1)の評価では、脳や心臓などの FDG が生理的に集積する部位周辺における炎症を捉えることは困難である。 ^{68}Ga -citrate は、FDG とは別の集積メカニズムで炎症に集積する。そこで ^{68}Ga -citrate を用いた SFTS 感染マウスおよび非感染マウスの全身 PET/SPECT/CT 撮像および撮像後の病理組織学的検討を上記(1)の実験と同様に行い、SFTSV 感染による全身の炎症発生の過程をイメージングする。また、撮像後にマウスの臓器への放射能集積を定量する。

(3) ^{68}Ga -platelet を用いた PET/CT イメージング

Karanikas らの手法にて、感染マウス由来の血小板から ^{68}Ga -platelet を作成する(Karanikas, *Appl Radiat Isot*, 1999)。 ^{68}Ga -platelet をマウスに投与して、血小板の分布挙動を上記(1)の実験と同様に PET/CT にて追跡する。撮像後に上記同様の病理組織学的検討を行う。

(4) ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体を用いたウイルス感染部位の SPECT/CT イメージング

SFTS Virus HB29 Antibody (ProSci 社製) あるいは早坂博士らの作成した SFTS 抗体のリシン残基と SCN-Bn-DTPA の SCN 基との求核付加反応により、 ^{111}In -anti SFTS antibody を作成する。標識合成後の精製は、PD-10(GE)等で行う。続いて、SFTSV 感染マウス(A129)あるいは非感染マウスへ ^{111}In -anti SFTS antibody 投与した後、抗体の体内動態が安定する 24~48 時間後に SPECT/CT 撮像を行う。撮像後に上記同様の病理組織学的検討を行い、染色部位と SPECT/CT 画像の比較を行う。

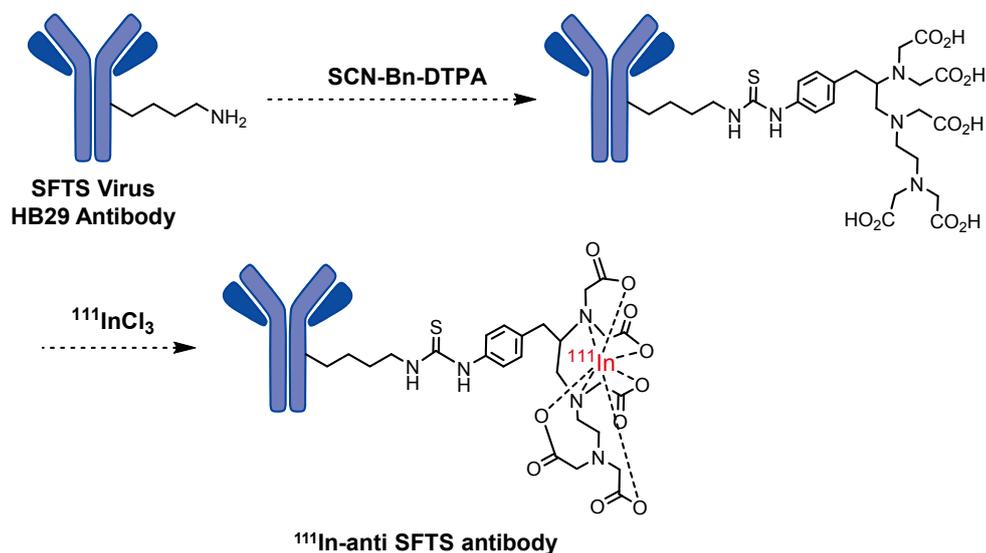


図1 ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体の合成経路

(5) ^{68}Ga -NOTA-NCS-folate を用いた炎症部位の PET/CT イメージング

SFTSV 感染マウス(A129)あるいは非感染マウスへ ^{68}Ga -NOTA-NCS-folate を投与した後、上記(1)の実験と同様に PET/CT 撮像を行う。撮像後に上記同様の病理組織学的検討に併せて抗葉酸受容体抗体による免疫染色を行い、染色部位と PET/CT 画像の比較を行う。

(6) SFTS 病態モデルマウスに対する治療法の開発および作用メカニズム解析

抗ウイルス薬（リバビリン、PF-429242 等）、抗 SFTSV 血清および抗 SFTS nanobody（ラクダ由来。現在抗原作成および nanobody 作成の外注を検討中）を感染後 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間の SFTSV 感染マウス(A129)あるいは非感染マウスへ投与して、 ^{18}F -FDG、 ^{68}Ga -citrate、 ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体、あるいは ^{68}Ga -NOTA-NCS-folate を用いた核医学イメージング評価を行い、治療時における生体機能変化をリアルタイムで捉えることで、治療効果のメカニズムを解析し、最適な血清や nanobody の投与方法、他の抗ウイルス薬等も含めたさらなる有効な治療法の開発へ結び付けていく。

③予想される成果

SFTS は発症すれば致死率は非常に高いが、その病態発現機序はほとんど解明されておらず、有効な治療法の早期開発が望まれている。そのためには、発症メカニズムを生体レベルで解明することが重要であると考えられる。PET や SPECT 等の核医学イメージングは、同一個体の病態変化を非侵襲的に追跡できるため、上記目的を達成するための強力なツールとなるものと期待される。実際に最近の検討における、 ^{18}F -FDG を用いた PET/CT イメージングにより、SFTSV 感染による炎症をリアルタイムで捉えることに成功しており、抗血清療法における治療効果の判定にも使用可能であることが示されている (D. Hayasaka et al., *Oncotarget*, 2016)。申請者らは、これまでに疾患関連分子を特異的に捉えることのできる新規分子プローブを多数開発してきた (T. Fuchigami et al.; *Sci Rep* 2015., *Bioorg Med Chem Lett* 2015, 2016, *Bioorg Med Chem* 2011, 2014., *Euro J Med Chem* 2013.等)。そこで、これまでの経験を活かし、SFTS の病態変化を特異的に評価できる抗体型分子プローブを中心とした様々な分子プローブの開発が達成できるものと期待される。さらにこれらの開発した分子プローブを用いて、 ^{18}F -FDG-PET と組み合わせた多角的な PET/SPECT/CT 評価を行うことにより、さらなる詳細な SFTS 病態ダイナミクスの解析が可能となる。また、本手法にて様々な生理機能や病態分子を評価することで、治療薬候補化合物等の有効性に関する詳細な解析が可能となり、新たな SFTS 感染症の治療法開発へとつながるものと大いに期待される。重ねて、SFTSV は BSL-3 に分類されており、我が国では本学においてのみこのような小動物 PET/SPECT/CT イメージングが可能である。従って、アイソトープ実験施設における多角的なイメージング評価と、熱帯医学研究所における詳細な組織学的検討も併せることにより、革新的かつ独創的な研究成果が多く得られると期待される。

5. 実施報告：

① 研究材料・方法・手続き

IFNARKO に SFTS ウイルスを腹腔内投与し、SFTS 病態モデルマウスを作成した。対照群として IFN- γ KO マウスに PBS を同様に投与した非感染マウスを作成した。

(1) 感染マウスに関して、感染 1~3 日後の体重、体温を計測し、行動異常の有無を観察した。非感染マウスについても同様の実験を行った。

(2) 感染マウスに関して、感染 1~3 日後に $^{68}\text{Ga-citrate}$ あるいは $^{18}\text{F-FDG}$ を用いた PET/CT 撮像を行い、SFTS 感染による炎症の発生をリアルタイムでイメージングした。併せて、CT により詳細な形態学的変化も経時的に評価を行った。同様の実験を非感染マウスについても検討を行った。

(3) SFTSV 感染における炎症組織を標的とした放射性ガリウム標識葉酸受容体イメージング剤の開発を行い、基礎検討として葉酸受容体を高発現している KB 細胞を用いた基礎的な細胞取り込み評価および標的部位への親和性評価を行った。また、KB 細胞および HT1080 細胞を移植した担癌マウスを用いた *in vivo* 評価を行った。

② 成果（結果+考察）

当研究室で開発した $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ジェネレータ（中山守雄，淵上剛志 他，特願：2011-232213）により得られた $^{68}\text{Ga-citrate}$ を用いて、SFTSV 感染マウスおよび非感染マウスの PET/CT 撮像を行った。SFTSV 感染マウスは、A129 マウスに SFTSV (10^6 focus-forming units) を投与することで作成し、感染 1-3 日後のマウスを PET/CT で撮像し、定量的に画像解析したところ、感染 3 日後のマウスにおいて、SFTSV 感染による形態変化や炎症発生が確認されている消化管への高い集積が認められた。一方で、非感染マウスにおいては消化管への高い集積は確認されなかった。また、同様に糖代謝の盛んなマクロファージ等に集積するため、PET による炎症の検出に汎用されている $^{18}\text{F-FDG}$ を用いた PET 撮像を行ったところ、SFTS 感染マウスにおいてのみ消化管への高い集積が確認された。しかしながら、筋肉などの正常組織への生理的な集積も観察された。 $^{68}\text{Ga-citrate}$ は、集積メカニズムは $^{18}\text{F-FDG}$ とは異なるが、炎症組織に存在しているマクロファージや好中球等に集積していると考えられている。今回の検討において、 $^{68}\text{Ga-citrate}$ は筋肉や心筋等の正常組織への集積は低いことから、 $^{18}\text{F-FDG}$ では検出が困難な SFTS 病態モデルマウスの炎症発生部位をより選択的に捉えることが可能であることが示唆された。一方で、定量的な集積量は $^{18}\text{F-FDG}$ の方が高く、周辺部位に対するコントラストは高いことが示されたため、 $^{18}\text{F-FDG}$ の生理的な集積が重なっていない炎症部位においては、より高い信頼性にて病態の進行度などを評価できるものと考えられる。今後は SFTS 病態モデルマウスへの治療処置における治療効果等の判定を $^{68}\text{Ga-citrate}$ および $^{18}\text{F-FDG}$ にてさらに検討していく予定である。

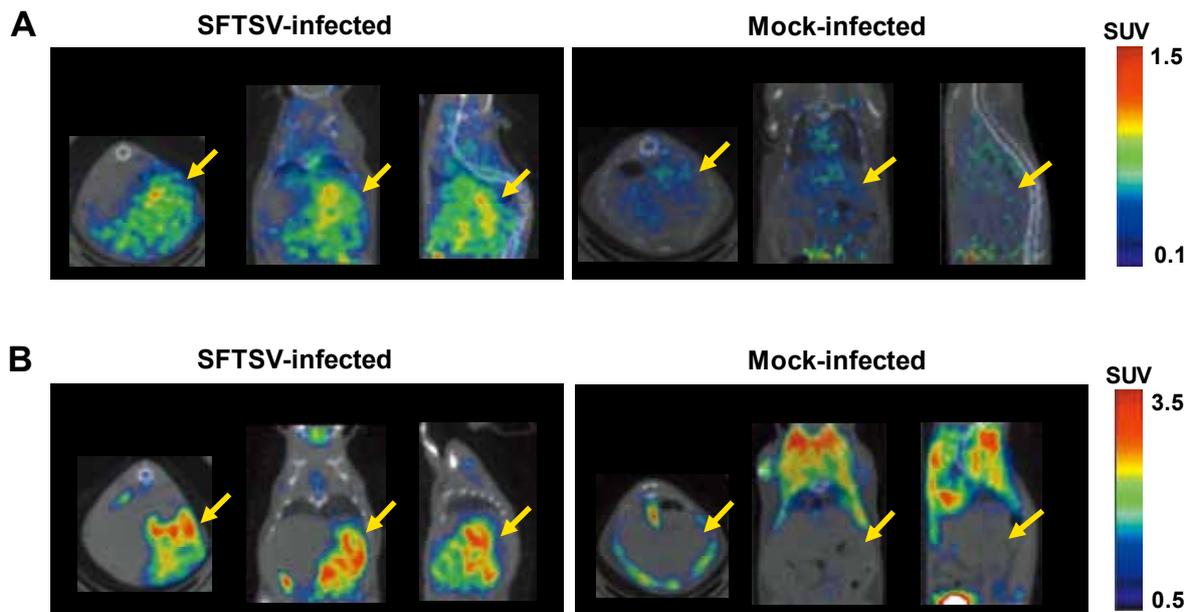


図 2 SFTSV 感染マウスおよび非感染マウスの PET/CT 画像.

(A) ^{68}Ga -citrate 投与後 120-180 分の積算画像

(B) ^{18}F -FDG 投与後 30-90 分の積算画像

葉酸イメージング剤の開発

葉酸受容体は、種々のがん組織にて高発現しているのみならず、活性化マクロファージや単球などに高発現しており、ウイルス感染症における炎症組織の病態診断の標的として期待される。そこで我々は、葉酸受容体を標的とした PET イメージング剤としての展開を期待して、葉酸代謝拮抗薬を母体化合物とした $^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-TP を開発した。 ^{67}Ga -NOTA-TP は、葉酸受容体を高発現している KB 細胞を用いた *in vitro* 結合評価にて葉酸受容体に高親和性 ($K_D = 25 \text{ nM}$)を示し、細胞内取り込み評価にて、KB 細胞へ高い集積を示す一方、葉酸受容体の発現レベルが極めて低い HT1080 細胞においては、ほとんど取り込みを示さないことが明らかになった。そこで、KB 細胞および HT1080 細胞を両肩に移植した担癌マウスを作成して、 ^{68}Ga -NOTA-TP を用いた PET/CT 撮像および定量的に画像解析を行った。その結果、KB 細胞においてのみ顕著に高い集積が確認された。さらに葉酸受容体アゴニストである Folic acid (40 nmol)により KB 細胞への集積がバックグラウンドレベルまで減少した。これらの結果より、 ^{68}Ga -NOTA-TP が葉酸受容体を標的とした PET イメージング剤として有用であることが示された。今後は SFTS 病態マウスにおける葉酸受容体イメージングおよび炎症組織における葉酸受容体発現部位との比較検討を行い、新たな SFTS 病態イメージングのためのツールとしての有用性を評価していく。

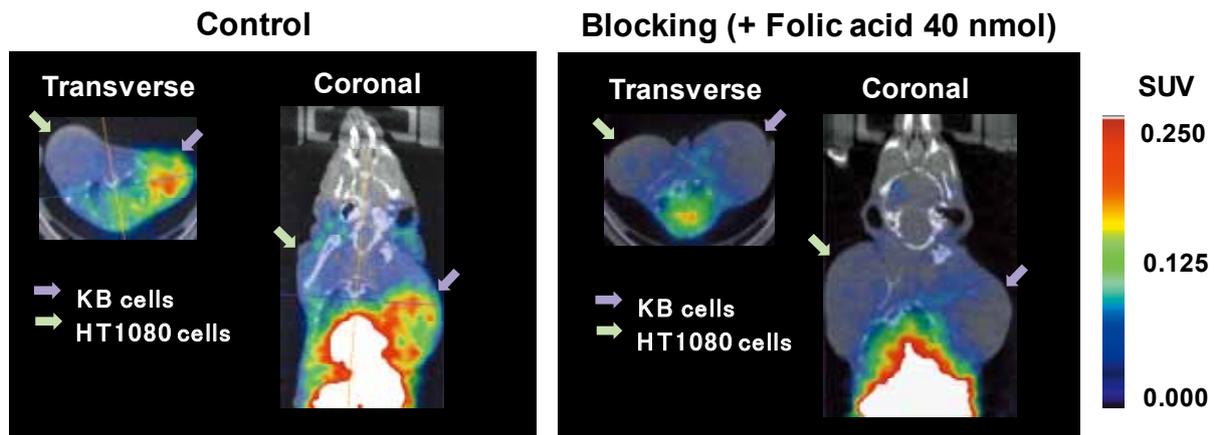


図 3 担癌マウス(KB 細胞; 右肩、HT1080 細胞; 左肩)における ^{68}Ga -NOTA-TP 投与後 30-210 分後の PET/CT 画像

放射標識抗 SFTSV 抗体の開発

SFTSV G タンパクを標的とした抗体を用いて、抗体標識のためのキレート形成部位に導入および放射性核種(^{111}In , ^{68}Ga)等の標識検討を行い、SFTSV の生体内挙動を非侵襲的に捉えることができる抗体型イメージング剤としての展開を検討している。

③成果の公表

原著論文

1. Fuchigami T, Ono H, Oyadomari K, Iwatake M, Hayasaka D, Akbari M, Yui K, Nishi K, Kudo T, Yoshida S, Haratake M, Nakayama M. Development of a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Generator System Using Polysaccharide Polymers and Its Application in PET Imaging of Tropical Infectious Diseases. *ACS Omega*. **2**, 1400-1407 (2017) .
2. Haratake M, Takiguchi T, Masuda N, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, Amyloid formation characteristics of GNNQQNY from yeast prionprotein Sup35 and its seeding with heterogeneous polypeptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **149**, 72–79 (2017)
3. Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M, Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain. *Bioorg Med Chem*. **25**, 1085-1093 (2017)
4. Haratake M, Tachibana Y, Emaya Y, Yoshida S, Fuchigami T, Nakayama M, Synthesis of Nanovesicular Glutathione Peroxidase Mimics with a Selenenylsulfide-Bearing Lipid. *ACS Omega*. **1**, 58-65 (2016).

6. 自己評価

今年度の共同研究にて、 ^{68}Ga -citrate を用いた PET 評価において、SFTS 病態モデルマウスの病態進行や病変部位の画像化に成功した (Fuchigami, et al., *ACS Omega*, 2017)。また、SFTS における炎症の画像化を目指した新規葉酸受容体イメージング剤の開発および葉酸受容体の PET による画像化に成功した。さらに、共同研究者の早坂博士らにより SFTSV 抗体の作成が達成されたため、抗体標識のためのキレート形成部位の導入および放射性核種(^{111}In , ^{68}Ga)等の標識を行うことにより、生体内の SFTSV を直接捉えることが期待される抗体型イメージング剤としての展開が可能となった。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- Ⓒ (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (6 の自己評価で述べておれば省略して良い)

平成28年度一般共同研究報告(自己評価)

1. 課題名：ケニア・ロタウイルス疫学研究への新しい分析技術の応用

課題番号：28-一般-18

2. 代表者：長谷川 慎（長浜バイオ大学バイオサイエンス学部・教授）

共同研究者：一瀬 休生（長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点長・教授）

和田 昭裕（長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野・講師）

3. 決定額：800 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

この共同研究は、ロタウイルスをはじめとする下痢原因ウイルス・細菌の疫学研究へウイルス検出や分離に役立つ2種類の新しい技術を応用し、その中で実際的な問題点を克服することでユニークなウイルス分析システムとして実証する。第一の新技术は、数分で抗原抗体反応による診断結果を得る「蛍光一粒子検出法」と名付けた原理と、その分析試作装置である。蛍光一粒子検出法は、レーザー共焦点光学系を用い、1点の微小空間の蛍光変動を計測することで蛍光抗体-ウイルス粒子複合体を計数する手法である。これまでに開発した試作装置は所用時間5分でウイルス104粒子/ml(必要検体量5 μ l)の検出感度を実現した。第二の新技术は、「金属メッシュデバイス(MMD)」と名付けられた機能性材料を利用した空気中の微粒子(埃・塵)の分離捕捉法である。MMDは、メッシュ状の繰り返し間隙構造を持つ金属薄膜である。MMDは電気メッキ技術の一種である電鍍により作製され、開口部の形状と間隔および厚みを1ミクロン以上の任意の値で自由にデザインできる。本研究で用いるMMDは4.0、1.8、1.1ミクロンの方形開口(開口率50%)を有する3種類の薄膜である。これらのMMDを層状に組み合わせ、下痢症流行地の戸外・屋内で直径数ミクロン(PM2.5相当)の空気中の埃・塵を精密に分離する。それに付着したロタウイルスを先に述べた蛍光一粒子検出法(抗原抗体法)およびPCR法で検出する。これら、分離・検出の一連のシステムを利用してケニアのロタウイルス流行地域での空気中のウイルス濃度の季節変化を定点観測する。これにより、ロタウイルスの感染伝播様式と気候の関係を明らかにするとともに、これら新技术の実用性を高める改良を施し、感染症対策分析機器としての実用化を図る。

下痢症は、開発途上国において小児・乳幼児の死亡原因として重要であり、ケニアにおいても死亡原因の第2位を占める。ロタウイルスは、特に乳幼児に感染しやすく、生後1年未満の下痢症原因の4割近くを占める。一般に感染症予防のためには、感染様式を明らかにする必要がある。ケニア拠点・一瀬教授らは、ナイロビ郊外の下痢性感染症の疫学研究を通じて、乾季の到来とロタウイルスの流行に関連性があることを見出している。その感染様式の直接的証拠を得るためには、空気中の埃・塵にウイルスがどの程度付着しているかを明らかにする必要があるが、それを分析したフィールド研究の事例はほとんどない。それはフィールドで迅速かつ効率的に空気中の埃・塵(特に健康に影響するPM2.5)を集め、そこからウイルス検出を効率的に行う一連の分析システムがない

からである。これまでに申請者が開発を進めてきた2つの新技術は、まさにこの用途に適した特長を持つ。そこで、本技術を効果的にケニアでの疫学研究に応用し、公衆衛生対策の支援機器として活用を図るための実証研究とする。

②研究内容

平成25～27年度の共同研究により、ロタウイルスによる下痢性疾患など熱帯医学研究に対する本開発技術の有用性を明らかにした。これらの成果を踏まえ、平成28年度の研究計画を説明する。

(1) 蛍光一粒子検出法によるロタウイルスの高感度迅速検出装置の開発

これまでの共同研究により、所期の目的は大部分達成することができた。最後の仕上げとしては図3で示した製品タイプの検出装置の仕様確定を進める。

(2) 空気中の埃・塵を分析するシステムの確立((株)村田製作所との共同開発)と付着する下痢性細菌・ロタウイルスの定点観測

本研究では環境検査への応用に着目し、PM2.5など健康に影響しやすいサイズのエアロゾルの分離・検出に適切な回収用の金属メッシュデバイス、それよりも大きなサイズの粒子を除去する金属メッシュデバイスを組み合わせ、空気中からエアロゾルをサイズにより分離する。次に、それぞれの捕集量を赤外線透過性測定で定量する。さらに、これらを元素分析・質量分析・遺伝子増幅反応により性状解析する。これら手段により以下の2つの応用可能性を検証する。①生物由来エアロゾルの同定。その代表であるカビ・細菌は、食品製造環境に付着すると、劣化、変敗、変質を引き起こす。培養には時間を有するので、迅速に検出する手段があれば有用である。生物由来エアロゾルの大きさはさまざまであり、バクテリアは1 μm、単細胞性胞子は3～10 μm、多細胞性胞子は10～80 μm、花粉は20～100 μmと大きな幅がある。適切な金属メッシュデバイスの組み合わせにより、それらを区別して検出する。②無機性・低分子有機性有毒物の検出。元素分析・質量分析によりエアロゾルの特徴づけを行うことで環境汚染の程度を評価する手段を提供する。元素分析には蛍光X線分析法を用い、エアロゾルの由来や重金属の含量を明らかにする。質量分析は、MALDI法を用い、付着有機物の検出と同定を行う。これらの検証により、エアロゾルの環境評価法として幅広く適用できることを実証する。

2) 研究開発内容

① センサー面へのエアロゾルの捕捉方法を開発する。金属メッシュデバイスに空気を通過させることで表面への濃縮を図る。これに必要な、吸引装置はすでに試作されているが、さらに改良の余地がないか実証試験を行う。4.0、1.8、1.1ミクロンの開口サイズを持つ3種類の金属メッシュデバイス(MMD)を層状に積み重ねて、ハンディタイプの吸引器により空気を取り込ませ、MMD上に捕捉された物質の検出と分析を行う。測定対象として、PM2.5およびそれよりも粒径の大きなSPMの分析を行う。試料の採取地として、国内数か所(都市部およびそれ以外)およびケニア(ナイロビ周辺)を計画している。当面、ケニア、首都ナイロビ近郊のKiambu地区におけるフィールド実験を行う。

② 気温、降雨量、湿度、風向、風速などの前年の気象データ(Kenya Bureau of Statistics)か

ら測定時期と場所を選定し、検体の採取時期と採取場所を設定し、継続的なデータ採取を行う。

- ③ フーリエ変換型赤外分光光度計で透過スペクトルを測定し、その変化量から捕捉されたエアロゾルを定量する。
- ④ エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) による元素組成分析によりエアロゾルの生成要因を明らかにする。
- ⑤ 質量分析 (MALDI 型) により付着有機物を検出する。
- ⑥ エアロゾルからフェノール抽出により核酸成分を分離し、クローニングベクターに挿入しライブラリー化する。配列解析により主要な付着微生物を同定する。

フィールド研究で要求される性能に関して開発技術がマッチしているか実証試験を進め、実用化への可能性を評価する。具体的には、上記①～⑥の課題を解決しながら、並行して季節・天候とロタウイルス飛散量の関係性に関する分析を進める。この結果、得られたロタウイルスおよび下痢性細菌の検出と気象データのマップの作成を行う。ケニア拠点のスタッフと協力し、1 か月に 1 回の頻度でナイロビ郊外の Githunguri、Kiambu 地域で金属メッシュデバイス (MMD) による捕集装置を用いて埃・塵の定点サンプリングを行う。街中、農園、学校、商業ビル屋上といった人口密度・周辺環境の異なる地域で、季節や天候によるウイルス量の変動を検証する。その過程で次の技術的課題を取り組み、分析システムを確立させる。

③ 予想される成果

本技術の特徴は以下のようにまとめられる。

(1) 蛍光一粒子検出法によるロタウイルスの高感度迅速検出装置

1. 試料溶液に光を照射するだけで抗原抗体反応を検知することができ、5 分程度で判定できる。
2. 感度は ELISA レベル以上で、操作も容易である。
3. 小型化・低コスト化が可能であり、将来の普及が期待できる。
4. 便検体から直接的にウイルスを検出できる。

(2) 金属メッシュデバイス (MMD) による空气中を飛散する病原体を検出するシステム

1. 体内に取り込まれやすい PM2.5 相当の埃・塵を短時間で分離して捕集することができる。
2. 捕集装置は、手のひらサイズ・電池駆動でフィールドでの利用ができる。
3. MMD は純粋な金属製で平滑な表面なので様々な分析に干渉しない。
4. 培養法や PCR 法により埃・塵に付着した細菌・ウイルスを同定できる。

このような検出装置・分離装置の運用試験を進めることにより、実用上の問題点を明らかにし、より完成度を高められることが期待される。また、ロタウイルスや下痢性細菌への適用により、熱帯医学研究への優れたツールを提供できる。ロタウイルスは開発途上国を中心に 60～70 万人の乳幼児死亡の原因となっており、対策が望まれている。ケニアにおいてもワクチン導入が計画されており、導入前のロタウイルス感染症の疫学調査が急務である。また熱帯地におけるロタウイルス感染の季節消長等の疫学的特徴は日本などの温帯地域とは非常に異なるため、感染伝播様式の研究には

年間を通して発生する熱帯地での実験が必須であり、ロタウイルスの分子レベルの解析データの蓄積が極めて重要となる。本手法は、効率的な検査を可能とし、不明な点の多い当該ウイルスの感染経路の解明へ貢献できる。

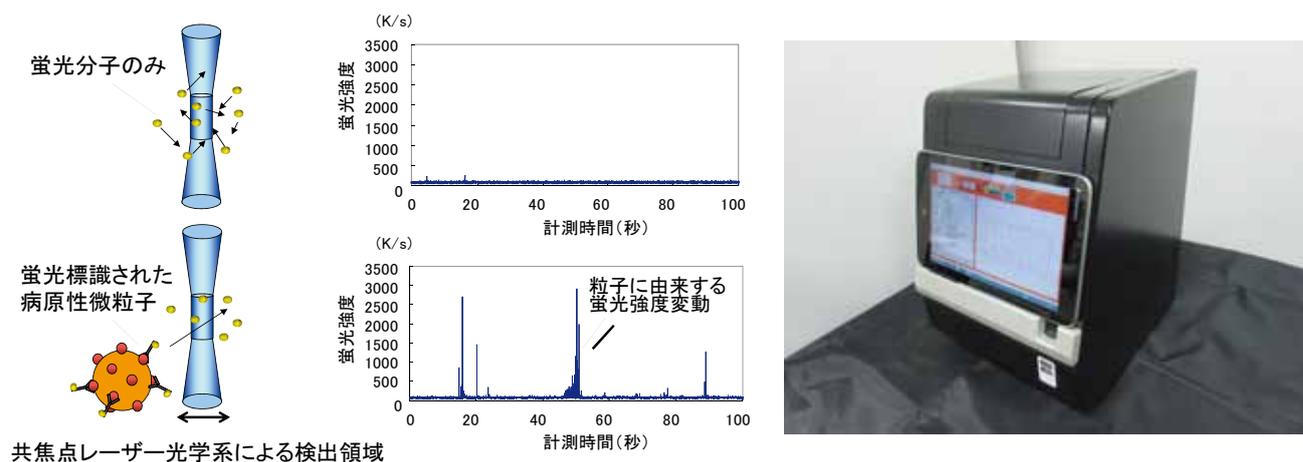
ケニアでのロタウイルス感染症の疫学的調査のプロポーザルはすでにケニア中央医学研究所での倫理審査委員会の承認を受け、本申請のウイルス検出機器導入した疫学研究についても、新たなプロポーザルを提出した。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

(1) 蛍光一粒子検出法によるロタウイルスの高感度迅速検出装置の開発

申請者らは、蛍光標識抗体を利用してウイルス粒子を高感度(500 粒子~)・迅速(5 分)に検出する機器を開発した。この機器は、非常に細いレーザー光を照射することにより、溶液中に分散する蛍光性微粒子を計数することができる。この測定原理は蛍光相関分光法をベースとしている。蛍光相関分光法は、共焦点レーザー光学系を利用して1分子蛍光を測定し、その蛍光ゆらぎの周期性を解析することにより分子サイズを測定する技術である。蛍光標識抗体と結合したウイルス粒子は、溶液中の移動速度が一般の生体分子よりも遅い。そのため、蛍光シグナルに特有の変動パターンが見られることに申請者は着目した。すなわち、図1に示すように共焦点レーザー光を微小体積に絞り込んで照射した空間を、ウイルス粒子が横切ったときに大きなシグナル変動が記録される。この変動回数を記録することで蛍光標識抗体の結合したウイルス粒子を分離濃縮過程なしに高感度迅速検出することができる。申請者らは、この原理を「蛍光一粒子検出法」と名付け、ウイルス検出に最適化した装置を試作した(「試料中のウイルスを検出する方法およびシステム」特許 4757103 号)。



②成果(結果+考察)

試作装置の最適化と感度・定量性の確認

本試験用試料として、熱帯医学研究所・一瀬休生教授よりロタウイルス(KU 株)培養液を供与いただき、加熱失活させたものをテスト用検体として用いた。また、同感染性試料の測定実験については熱帯医学研究所内施設で実施した。抗ロタウイルスポリクローナル抗体を併せて分与いただいた。これを標識試薬 Alexa488-NHS と反応させ、ゲル濾過により試薬を除去したものを蛍光標識抗体として用いた。蛍光標識抗体を上記テスト用検体の希釈液と混合し、測定条件を検討した結果、次の点を確認した。①最適なレーザー強度・対物レンズ倍率など装置の測定条件、②抗体との反応時間とシグナル強度の関係、③測定時に偽シグナルを防ぐ添加物、④抗体の最適濃度。これら条件の最適化の結果、ロタウイルスが 3×10^4 pfu/mL の感度で検出可能であることが確認された。抗体との反応時間は 15 分、装置での測定時間は 5 分、必要試料量は 5 μ l(専用ガラスプレート使用時)である。図2左に最終的に得られたロタウイルス濃度-シグナル強度の相関グラフを示す。この結果から、高感度かつ短時間でロタウイルスの検出が可能であることが確認できた。

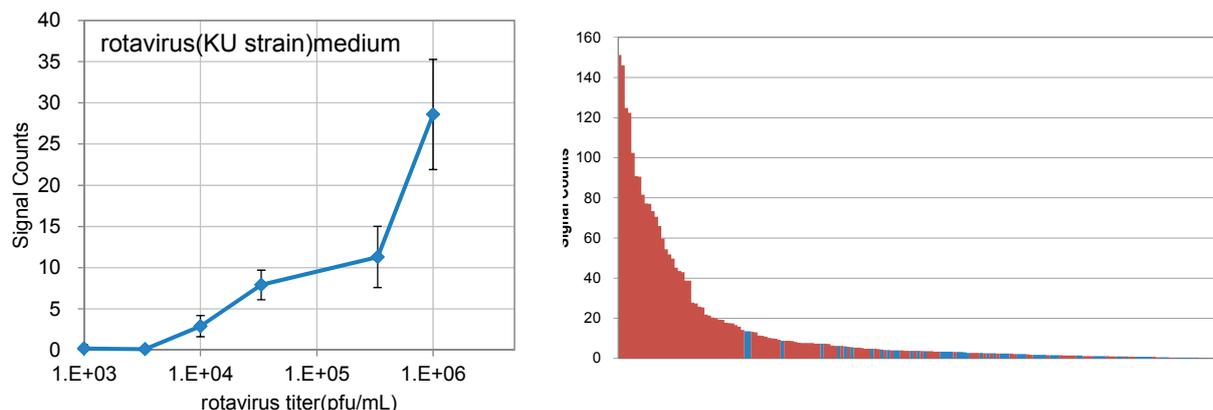


図2 ロタウイルス(KU 株)培養上清の希釈系列に対するシグナル強度(左)および試作装置によるケニア拠点収集臨床検体の測定結果(右):各検体のシグナル強度順に並べた。赤は ELISA または PCR 法によりロタウイルス陽性の検体。青は同じく陰性の検体。

臨床検体からのロタウイルス検出

ロタウイルスの臨床検体は、乳幼児の下痢便である。ケニア拠点で採取されたおよそ 200 検体に関して本装置でロタウイルスが検出可能であるか検証した。検体は PBS で 5 倍希釈した後、蛍光標識抗体を加えた。これを 30 分静置し、試作装置で測定した(積算時間 5 分)。その結果を図2右に示す。シグナルカウント 10 以上の検体はすべて ELISA や PCR 法でロタウイルスが検出された陽性検体であったが、シグナルカウント 10 未満では、陽性と陰性の判別がつけられなかった。シグナル強度から検出閾値は 1×10^5 pfu/mL 付近に相当する。以上の結果から、臨床検体に対する検出感度は培地からの検出感度よりも低下するもののウイルス粒子の直接検出が確認できた。

(2) 空気中を飛散する病原体を捕集するシステムの開発

フィールドでのテスト: ナイロビ郊外でのエアロゾル捕集

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点・一瀬休生教授の研究支援を受けて、ナイロビ近郊の Githunguri、Kiambu の 2 地域中の計 4 か所でエアロゾルの捕集を実施した(図3)。これらの地域は、一瀬教授らにより下痢性感染症のモニタリングが行われており、蓄積された疫学データと MMD により採取したエアロゾルから病原体の同定結果を相互活用できる。

MMD によるエアロゾル捕集装置は、4.0、1.8、1.1 μm の開口サイズを持つ 3 種類の MMD を層状に積み重ねて、吸気することで粒子サイズに応じて各 MMD 上に捕捉した。手のひらサイズの捕集装置は電池駆動でどこにでも設置でき、1 か所につき 24 時間稼働させることで、およそ 780L 分の空気からエアロゾルを集めることができた。



図3 ナイロビ郊外での試料捕集場所(左)、捕集装置の設置状況(写真左・農家、右・学校)

エアロゾル付着微生物の 16SrDNA 解析による同定(原理検証)

細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子の配列を PCR 増幅し、配列解析することで採取したエアロゾルに付着した細菌を同定した。微生物のゲノム DNA を抽出した後、土壌由来不純物を取り除き、16SrRNA 遺伝子の共通配列をプライマーとして使用して PCR により増幅した。ベクターにクローニングした後、各クローンを DNA シーケンサで増幅配列を解析した。配列データを BLAST サーチにより検索し、種を特定した。これを 1 検体に対し 60~100 クローン解析することで、微生物分布のドラフトを得た(図4)。その結果、MMD により捕集したエアロゾルに付着した微生物を、この方法で容易に同定できることが確認できた。MMD は平滑な表面で、DNA 抽出試薬にも侵されないため、きわめて微量のエアロゾルでも十分に微生物由来 DNA を抽出できる。これは、従来のフィルター膜捕集や水への分散を用いた捕集法ではなし得ない効率であり、高い利便性を MMD が持つことを確認できた。滋賀県長浜市周辺のエアロゾルから同定された微生物群の中には、ヒトの健康に影響するメチロバクテリウムやエンテロバクター、セラチア菌、ノカルディア菌などが見られ、製造業や病院などの環境検査への本技術の有効性が示唆された。

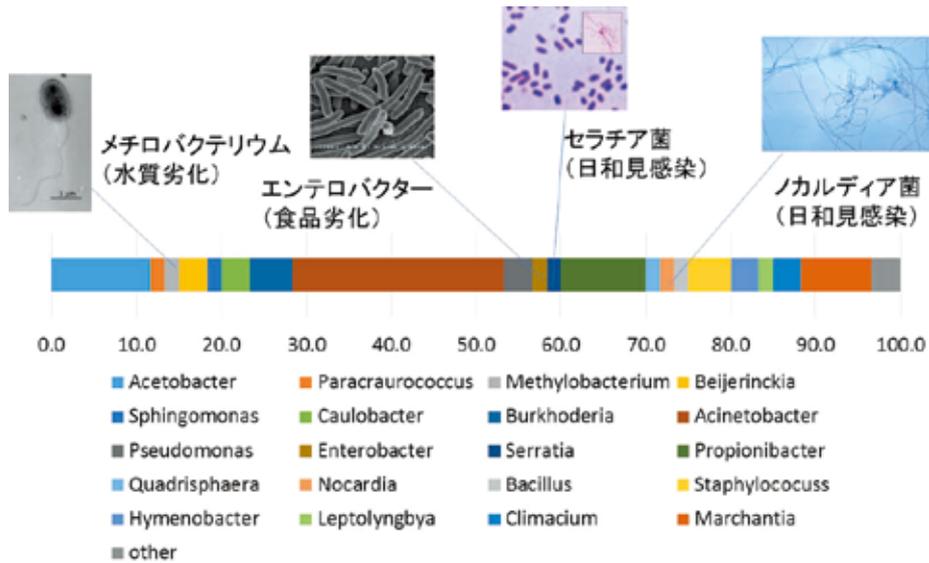


図4 滋賀県長浜市で MMD により捕集したエアロゾルから同定された細菌群

エアロゾル付着微生物の 16SrDNA 解析による同定(大規模解析)

上記の検討によりエアロゾル付着微生物の同定実験に関して見通しが得られたことから、次世代シーケンサを利用した大規模解析により、付着微生物の網羅的な同定を進めた。解析手順のスキムを図5に示す。エアロゾル捕集には 4.0、1.8、1.1 μm の開口サイズを持つ 3 種類の MMD を層状に積み重ねサイズ分画した。季節的な違いを検証するために 2015 年 10 月および 2016 年 4 月の 2 回に捕集を実施した。先の検証実験と同様に、それぞれの MMD で捕集されたエアロゾルから付着微生物の DNA を抽出し、16SrDNA の V3-V4 領域を PCR 増幅した。この増幅産物を次世代シーケンサ解析し、微生物集団解析のためのパイプラインツール Qiime によりデータ処理して同定細菌を集計した。

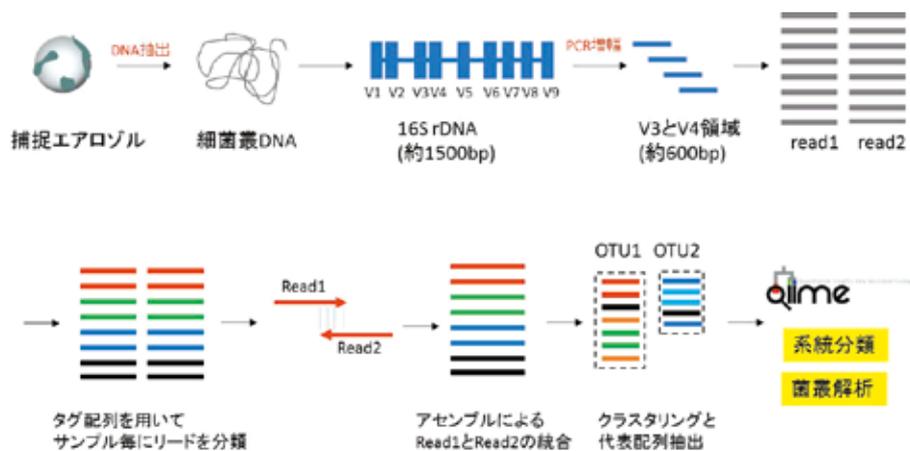


図5 エアロゾル付着微生物の大規模解析の手順

先で述べたケニア・ナイロビ郊外の農園で採取したエアロゾルの付着微生物を上記の方法で

同定解析した。次世代シーケンス解析により検体あたりおよそ 10 万リードを解析した。同定細菌の上位 3 位を表1に示す。日本と同様に最も多く検出された細菌種は土壌に由来する *Pseudomonas* 属であるが、2 位、3 位に動物に感染する *Neisseriaceae*(ナイセリア) 属、および発酵食品によく用いられる *Gluconacetobacter* 属(酢酸菌)が同定された。これらは、日本(長浜)での同定結果と傾向を異にしていた。

同定細菌(OTU)を検証すると、日本(長浜)でも検出されたメチロバクテリウム、エンテロバクター、セラチア菌、ノカルディア菌などの常在菌が検出された。詳細な解析はこれからであるが、日本で採取したエアロゾルが土壌由来のものが多いのに対して、ケニアで採取したエアロゾルからはこれら人畜感染性の細菌が多い傾向があるように見受けられた。また、6 回捕集したうちの 1 検体だけではあるが、ごく少量の *Mycobacterium* 属(抗酸菌)の遺伝子が検出された。このことは注目し得る。なぜなら、この属には、90 種以上の細菌が含まれるが、病原性のあるおよそ 30 種には結核など重要な疾患が含まれるからである。

結核は発展途上国を中心に多数発生している。ケニアも例外ではなく、有数の結核の高蔓延国である。結核は排菌する結核患者の咳、くしゃみ、唾の飛沫によって空気感染が成立し、十分な感染管理が必要とされる。また、結核菌のみならずエアロゾルを介した伝播が想定される細菌は多いが、その詳細は明らかではない。これは、医学研究者・医療従事者でも空気中の細菌を検出定量できる簡便なモニタリング方法がなく、研究蓄積が不十分なためである。本開発技術は、これに解決策を与える期待がある。今後、フィールド調査によりナイロビ市内および近郊の病院、教育施設、商業地域、農村地域などに採取地点を分類設定して検証を行う予定である。特に、人が多く集まる上に空気流通に乏しい映画館や集会所は、結核菌の伝播しやすい環境と考えられる。このような地点での感染発生データを集め、また時系列データベースを完成させる。完成したデータベースを用いて、結核発生の関連因子を特定するため、採取環境(気温、湿度、風量、通行人数等)と患者数との相関性を明らかにする。本開発技術は、この種の感染症の疫学研究のための有用な分析データを与えるものと期待される。

表1 OTU 上位 3 位(目(order)を o、属(genus)を g と表記)(ケニア捕集試料)

RANK	4.2μm(ケニア)	1.8μm(ケニア)	1.1μm(ケニア)
1	<i>o_Pseudomonadales</i> <i>g_Pseudomonas</i>	<i>o_Pseudomonadales</i> <i>g_Pseudomonas</i>	<i>o_Pseudomonadales</i> <i>g_Pseudomonas</i>
2	<i>o_Neisseriales</i> <i>g_unknown</i>	<i>o_Rhodospirillales</i> <i>g_Gluconacetobacter</i>	<i>o_Rhodospirillales</i> <i>g_Gluconacetobacter</i>
3	<i>o_Rhodospirillales</i> <i>g_Gluconacetobacter</i>	<i>o_Neisseriales</i> <i>g_unknown</i>	<i>o_Pseudomonadales</i> <i>g_Enhydrobacter</i>

③成果の公表

Hasegawa, M., Inoue, Y., Kimura N., Wandera, E., Ichinose Y. (2016) Detection of Rotavirus in Clinical Specimens Using an Immunosensor Based on the Principle of Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. Proceedings of IEEE Sensors 2016, DOI: 10.1109/ICSENS.2016.7808799

6. 自己評価

第一に、蛍光一粒子検出による試作装置をロタウイルスの検出に応用し、測定時間 5 分感度・ 3×10^4 pfu/mL の高感度・迅速性で、しかも便検体から直接検出できることを明らかにしたことは特筆に値する。今年度の取り組みにより、装置の小型化や制御ソフトウェアの開発に成功したことから、実用性も大きく高まった。今年度は、これらの成果を IEEE sensors 2016 に成果発表した。

空気中の埃・塵をサイズにより分画して捕集する金属メッシュデバイス(MMD)を用いて、ケニアのフィールドでのサンプリングを行ったことは、新しい技術開発として将来性ある課題と考えている。なぜなら、エアロゾルを介した感染経路は、その存在が想定されながら簡便に分析する手段が不足していたためである。開発技術をケニア拠点の協力の下、ナイロビ近郊の収集エアロゾル検体から病原性微生物の検出に用い、所期の成果を得ることができた点は今後の開発の大きな弾みとなる。MMD の特性を生かして、X 線蛍光法による元素分析や付着有機物の質量分析に直接捕集エアロゾルを供せられる点も長所である。今年度の特筆すべき進捗として、エアロゾル付着微生物種の構成を特定するために次世代シーケンサを利用した点があげられる。これまで、微量のエアロゾルから効率よく DNA を抽出できる類似の捕集用フィルターは存在せず、同様の実験を行うためには大きな装置で長時間の捕集を必要とした。このような問題点を克服できたことは、ケニアでのフィールドワークを進めるうえで強みとなる。今後、さらにこの方法を発展させたい。

しかし、以上の二つの課題進捗に関して、検体採取を計画通りに行ったが、ウイルス検出と気象データのマップの作成のためには、申請書で述べたようにまだデータの蓄積が必要である。したがって、達成度はⅢ(予想通りの成果を挙げられた)とする。

7. 達成度(何れかに○)

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由(6の自己評価で述べておれば省略して良い)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：バベシア原虫マダニステージでのライブイメージング実験系の開発
課題番号：28-一般-19

2. 代表者：河津 信一郎（帯広畜産大学原虫病研究センター・教授）
共同研究者：白藤 梨可（帯広畜産大学原虫病研究センター・助教）
麻田 正仁（長崎大学熱帯医学研究所 原虫学分野・助教）
金子 修（長崎大学熱帯医学研究所 原虫学分野・教授）

3. 決定額： 450 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

バベシア症はマダニの刺咬によりウシなどの家畜やヒトがバベシア原虫に感染して発症する疾病である。バベシア原虫と同じアピコンプレクサ門に属するマラリア原虫では媒介生物による伝搬を阻止するワクチンや薬剤の開発が行われ、バベシア症でも伝搬阻止は感染流行阻止に有効な手段と考えられるが、この分野の研究は全く進んでいない。その理由としてマダニ体内で観察できるバベシア原虫数が少なく、定量的解析が困難な点やマダニ体内での原虫動態がよくわかっていない点が挙げられる。そこで本研究では、蛍光タンパク質発現バベシア原虫を用いて、マダニ期原虫の動態を定量的に観察する系を確立し、雌性・雄性のガメートが形成され、互いに認識する時点からザイゴートへの発育・中腸細胞への侵入過程をビデオ記録により明らかにし、伝搬阻止活性を評価するための基盤情報を得る。さらに、中腸細胞での発育・キネート形成・放出、キネートが卵巣および唾液腺へ移行する過程、唾液腺細胞でのスポロゾイト発育・赤血球侵入をビデオ記録し、これら一連の生物学的現象を世界で初めて可視化する。

②研究内容

1. Bo-RBC-SCID マウスを用いたバベシア原虫感染（帯広畜産大）：

脾臓を摘出した SCID マウスにウシ赤血球（RBC）を複数回腹腔内注入し、ウシ赤血球への置換率が 70-80%となった Bo-RBC-SCID マウスを作製する（すでに手技を確立し、ルーチンに作製・使用している）。*in vitro* 培養系で維持継代している蛍光タンパク質発現トランスジェニック *Babesia ovata* 原虫感染赤血球を静脈接種し、原虫寄生率の推移を血液薄層塗抹標本にてモニターする。

2. 蛍光タンパク質発現バベシア原虫のマダニへの感染（帯広畜産大）：

バベシア原虫感染 Bo-RBC-SCID マウスで原虫寄生率が 1%に達したら、フタトゲチマダニ単為生殖系（岡山株）の雌ダニ（2-3 匹/マウス）に吸血させる。剃毛したマウス背部

にプラスチックカプセルを固定し、マダニを入れて吸血を促す。マウス背部に固着して吸血を開始したマダニを3-5日後にかけて経日的に強制的に回収する。さらに、飽血落下した雌ダニも個別に回収する。

3. 雌ダニ内でのガメート形成からキネート期原虫への発育のタイムラプス解析（帯広畜産大・長崎大）：

回収した雌ダニ（親ダニ）を解剖し、中腸内の雌性・雄性のガメートが形成され、互いに認識する時点から、ザイゴートへの発育、中腸細胞への侵入・発育・キネート形成・放出をする期間をビデオ記録し、一連の有性生殖過程がどのような時間的スケールで進行するのか可視下で明らかにする。

4. 幼ダニ内でのキネート増殖からスポロゾイト期原虫への発育（経卵伝搬）のタイムラプス解析（帯広畜産大・長崎大）：

雌ダニに産卵させ、ふ化後に幼ダニを回収する。ウサギに暴露して吸血刺激を与えた幼ダニを1-3日後に強制的に回収する。回収した幼ダニを解剖し、キネートが中腸細胞へ侵入・分裂・放出を繰り返す過程、唾液腺へ侵入したキネートが発育し、スポロプラスト内で多数のスポロゾイトを形成し、放出する過程をビデオ記録し、可視化する（図）。また、キネート滑走運動のライブイメージを取得し、速度や運動の実態を明らかにする。キネート期の運動に用いられていると考えられる複数の遺伝子についてノックアウト原虫をすでに作製しているため、キネート期の運動への影響をあわせて検討する。

5. スポロゾイトの赤血球侵入動態の観察（帯広畜産大）：

幼ダニ唾液腺から回収したスポロゾイトのウシ赤血球への侵入過程のライブイメージを *in vitro* 培養系にて取得する。上述した運動関連遺伝子について、ノックアウト原虫を用いて、赤血球侵入への影響をあわせて検討する。

※ マダニへの感染実験と観察の予備的検討をまず帯広畜産大学でおこなう。中腸の一部を未固定凍結切片作製用に使用し、切片上で中腸内腔および中腸細胞質内に蛍光を発する原虫も観察する。経日的に採取したサンプルを評価することで観察に適切な時期を特定できたら、マダニ材料を長崎大学に送付する。マダニから得た原虫のライブイメージング実験は帯広畜産大学・原虫病研究センターおよび長崎大学・熱帯医学研究所（培養チャンバー付き共焦点レーザー顕微鏡）で行う。マダニ生体内でのライブイメージング観察は長崎大学・先端生命科学研究支援センター（多光子励起レーザー顕微鏡）にておこなう。観察できる蛍光タンパク質発現原虫数が多ければ、蛍光活性化セルソーター（FACS）を用いて、各ステージ特異的に分画できるかどうか、各ステージの分取ができるかどうか検討する。これらの原虫は各種網羅的解析の貴重な試料となる。ノックアウト原虫は、帯広畜産大学・原虫病研究センターおよび長崎大学・熱帯医学研究所で作製する。

【参考文献】

[1] Frischknecht F et al. Imaging movement of malaria parasites during transmission

by Anopheles mosquitoes. **Cellular Microbiology** 6(7): 687-94 (2004)

[2] Asada M et al. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. **PLoS One** 7(4): e35227. (2012)

[3] Ohta M et al. Experimental transmission of *Babesia ovata* oshimensis n. var. of cattle in Japan by *Haemaphysalis longicornis*. **The Journal of Veterinary Medical Science** 58: 1153-5 (1996)

③予想される成果

バベシア原虫マダニステージのライブイメージング系を確立することで、①ガメート形成から中腸細胞侵入までの一連の過程を可視化でき、伝搬阻止活性を評価する基盤情報を整えることができる。②現在、教科書レベルでもよくわかっていない、マダニ各種器官あるいは哺乳類宿主赤血球に原虫が侵入・分裂・放出される過程を時間軸に沿って明らかにし、教科書の記載が書き換わるような情報を提供することができる。③キネートやスポロゾイトなどマダニ体内発育型の運動様式を明らかにし、これらの運動に必要な分子を明らかにすることができる。私達は、哺乳類赤血球ステージでのライブイメージング解析により、バベシア原虫のメロゾイトが滑走運動することを世界で初めて明らかにしている (Asada, M., et al, **PLoS ONE** 7(4): e35227 (2012))。これらの観察結果をマラリア原虫、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、コクシジウムなどの類縁のアピコンプレクサ門原虫での既知情報と比較することで、バベシア原虫ライフサイクルの背後にある分子メカニズムを解明する研究へ基盤情報が提供できる。同時に、この極めてユニークな生物特性を有する原虫の情報を類縁の医学・獣医学上重要なアピコンプレクサ門原虫を対象とした比較ゲノム研究に提供できれば、これらの寄生性原虫がどのように各々の宿主適応戦略を進化させてきたのか、すなわち「マラリア原虫はなぜ蚊で媒介され、ダニで媒介されないのか？」という基本的な疑問にも分子論的な考察が加えられるようになると期待している。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

I-1. Bo-RBC-SCID マウスでのマダニ感染実験：

脾臓を摘出した SCID マウスの腹腔内に、ウシ赤血球（非感染赤血球：RBC）（Ht：ヘマトクリット 50%）1ml を隔日で 5-6 回腹腔内注射した。マウス赤血球特異的抗体を用いた蛍光抗体法で赤血球置換率を評価して、ウシ赤血球への置換率が 70-80%となっていることを確認してから、*in vitro* 培養系で維持継代していた Hakimi, H. et al., **Parasit. Vectors** (2016) で作製した緑色蛍光(GFP)及び赤色蛍光(RFP)発現 *B. ovata* 原虫感染赤血球を静脈接種した。原虫寄生率が 1%に達した時点で、フタトゲチマダニ単為生殖系（岡山株）の雌ダニ（2-3 匹/マウス）を吸血させた。剃毛したマウス背部にプラスチックカプセルを固定し、マダニを入れて吸血を促した。マウス背部に固着して吸血を開始したマダニを 3-5 日後にかけて経日的に強制的に除去し、また、飽血落下した雌ダニを個別にプラスチックケースに回収した。

I-2. 人工吸血法でのマダニ感染実験：

フタトゲチマダニの成ダニ雌ダニを予めマウスの背部皮膚に付着して吸血させる。急速吸血期に達する直前でマウスの皮膚ごとマダニを回収して、皮膚の内側に *B. ovata* 原虫 *in vitro* 培養血液を重層して、マダニがそれを引き続き吸血できるようにした人工吸血用のデバイスを作製した。このデバイスに培養原虫感染赤血球（寄生率 4-8%の原虫感染赤血球 0.3ml にウシ胎児血清 0.7ml を加えて調整した赤血球液）を 12 時間毎に追加した。デバイス上で原虫感染赤血球を含む培養血液を吸血して飽血落下したマダニを回収して観察に供した。人工吸血法の詳細は Hatta, T. *et al.*, *Parasit. Vectors* (2012) に拠った。

II-1. PCR 解析：

回収したマダニを二日間飼育後に実体顕微鏡下で解剖して、卵巣 (OV)、唾液腺 (SG)、マルピーギ管 (MT)、脂肪体 (FB)、クチクラを含む他の臓器 (CA) を回収する。これらサンプルから DNA を抽出する。それらを鋳型にして PCR 法でバベシア原虫のチューブリン遺伝子を増幅する。マダニのアクチン遺伝子を増幅する PCR を同時におこない、DNA の調整過程に問題がないことを確認した。

II-2. ライブイメージング解析：

回収したマダニを二日間飼育後に蛍光実体顕微鏡下で解剖して、中腸及びヘモリンフ内で発育する、ガメート、ザイゴート、キネート等ダニ体内ステージ原虫の観察を試みた。キネート滑走運動についてはライブイメージ取得をおこなった。イメージングの取得法は Asada, M. *et al.*, *PLoS ONE*(2012) に拠った。

②成果（結果＋考察）

I-1. Bo-RBC-SCID マウスでのマダニ感染実験：

マダニ感染実験系を構築する第一段階として、*in vitro* 継代した蛍光発現原虫株を用いて SCID マウスでのマダニ感染実験をおこなったが、顕微鏡による観察および PCR 法による評価の両者にて、マダニの原虫感染を確認することができなかった。

I-2. 人工吸血法でのマダニ感染実験：

そこで、実験の手法を人工吸血法にし、使用する原虫を非遺伝子組換えの原虫株に変更して、再度マダニの感染実験を試みた。マダニへの感染能力を維持した原虫株を選択する目的で 2 種類の *in vitro* 継代原虫株、40%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 GIT 培地培養株および、40%FBS

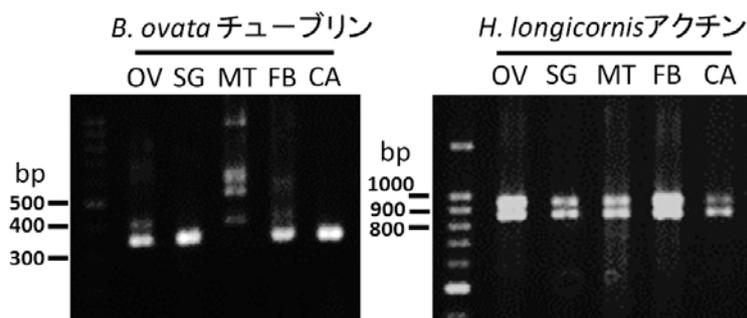


Fig.1 ダニ各種臓器からの原虫検出
OV: 卵巣、SG: 唾液腺、MT: マルピーギ管 FB: 脂肪体、CA: その他臓器

添加 M199 培地培養株の 2 株を実験に用いた。飽血落下後 2 日目にマダニを解剖して各種臓器への原虫の感染を nested-PCR 法で評価したところ、各種臓器から原虫遺伝子が検出された(Fig. 1)。また、検出率は使用した 2 株間で大きな差は無く、各マダニ個体間で原虫遺伝子の検出された臓器はまちまちであったが、遺伝子が検出されなかった臓器は無かった。尚、一部の PCR 産物はシーケンスをおこない、バベシア原虫の配列であることを確認した。I-1.では GIT 培地に馴化し、長く *in vitro* 培養にて継代した原虫を親株として作製した組換え原虫であったため、マダニ体内での発育能力を失っていたと推測された。

II-2. ライブイメージング解析：

I-2.での成績を踏まえて、40%FBS 添加 GIT 培地培養株を用いて、緑色蛍光タンパク(GFP)発現バベシア原虫を改めて作製した。この原虫を用いて再び人工吸血法にてマダニ感染実験を試みた。その結果、飽血落下後 2 日目のマダニヘモリンフ内にキネートを観察し、滑走運動のライブイメージの取得に成功した(Fig. 2)。

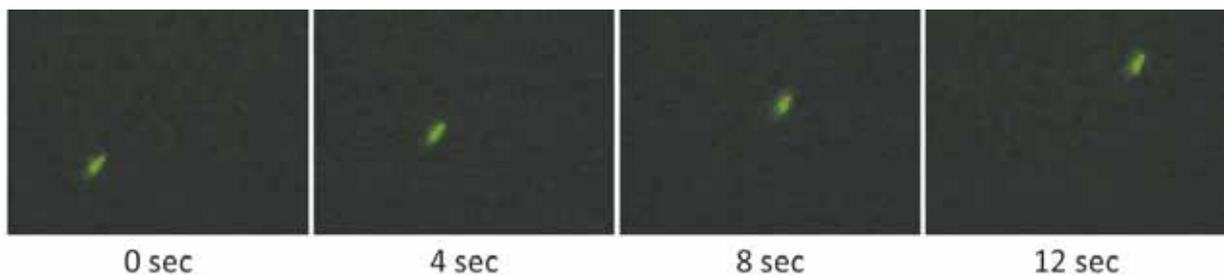


Fig.2 GFP発現*B. ovata*キネートの滑走運動

Babesia ovate (大型ピロプラズマ原虫)において、キネートの滑走運動が映像として記録されたのは今回が初めてとなる。*B. ovata* のキネートは、他のバベシア原虫のそれと同じく細長い虫様体で、大きさも $10 \times 3 \mu\text{m}$ 程度であった。*Babesia bigemina* ではキネートの大きさが $10.7 \times 3.2 \mu\text{m}$ と報告されている。私達はこれまでに、バベシア原虫の赤血球発育型(メロゾイト)が滑走運動することを世界で初めて明らかにするとともに、その運動様式がアクチンミオシンモーターによる螺旋滑走であることを報告している。キネートの滑走運動についても、おそらく同様の様式が用いられているものと考察できるが、今後その詳細を調べてゆく必要がある。また、他のアピコンプレクサ門原虫の滑走装置(グライデオソーム)において、アクチンミオシンモーターと滑走面マトリクスの接続に機能することで、重要な働きを担うことが知られている **Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) family** のバベシア原虫キネートでの役割についても、逆遺伝実験系と *B. ovata* ドラフトゲノムの情報を利用して今後調べてゆく必要がある。

③成果の公表

該当無し。

6. 自己評価

今回の取り組みから、私達が実験に使用している *B. ovata in vitro* 培養継代株（三宅株）にマダニへの感染能力があり、有性生殖によってキネートを形成する能力が残存していることを確かめることができた。キネートの観察に適した時期や条件を詳細に検討することで、今回の実験系を更に改良し、私達が独自に開発した逆遺伝の実験系と *B. ovata* ドラフトゲノムの情報と組み合わせて利用することで、未だに不明なことが多いバベシア原虫マダニステージ生物学の研究が進展することが期待できる。

今回はキネートの観察のみに留まったが、今後同様の観察研究を進めてゆくことで、スポロゾイトなど他のマダニステージについても新たな知見が得られるものとする。

この様な理由から今回の共同研究では一応の成果が上げられたものとする。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：生薬由来新規抗マラリア薬の探索

課題番号：28－一般－20

2. 代表者：小松 かつ子（富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・教授）

共同研究者：當銘 一文（富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・准教授）

平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・教授）

水上 修作（長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・助教）

グエン フィ ティエン（長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・准教授）

ムハマド チェリフ サマ（長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・助教）

3. 決定額：700 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

申請者らはこれまでに蓄積された伝統薬物に関する知識・技術・資源等を活用し、抗マラリア薬の開発を目的として、和漢医薬学総合研究所が所有する生薬由来化合物及び生薬エキス等の抗マラリア効果について検討を行う。抗マラリア効果の判定には、熱帯医学研究所が持つ熱帯熱マラリアの *in vitro* 培養システムを使用し、培養液中への化合物・エキスの添加によるマラリア原虫感染阻止効果を指標に判定を行う。

②研究内容

本年度は熱帯医学研究所にて、申請者らが提供する生薬由来化合物及び生薬エキス及びコンゴボロロエキスが持つマラリア原虫感染阻止効果の検討を、*in vitro* 培養システムを用いて行う。

(1) 生薬由来化合物及び生薬エキス、及びコンゴボロロエキスの準備

生薬由来化合物及び生薬エキスは和漢医薬学総合研究所より提供する。使用濃度は伝統医薬データベースに公開されている情報から決定する。コンゴボロロは熱帯医学研究所にて既に研究が着手されているアフリカ原産の薬草であり、過去の報告から優れた抗マラリア効果が期待されている。本研究では申請者らが長年にわたり蓄積した知識・技術を活用し、熱帯医学研究所が準備するコンゴ産の乾燥薬について各種溶媒抽出エキス及びその分画物を作製し、さらに化合物を単離して以下の実験に供する。

(2) *In vitro*でのマラリア原虫培養と化合物等添加処理

熱研で維持しているメフロキン・クロロキン感受性株（3D7）と耐性株（Dd2）の2つの熱帯熱マラリア株を使用する。96 ウェルプレートにマラリア原虫を感染させたヒト赤血球を準備し、培養液中に各種化合物・抽出液を添加後、嫌気性条件下にて37℃インキュベーター内で48時間培養し増殖阻害活性を測定する。

(3) 感染マラリア原虫の検出と抗マラリア効果の算出

48 時間後に赤血球内の核酸を SYBR Green I を用いて染色し、感染マラリア原虫を検出する。化合物・抽出液を添加していないコントロールウェルの染色結果と比較することにより、各化合物・抽出液のマラリア原虫感染阻止効果を算出する。

なお、各化合物・抽出液についてはマラリア原虫増殖阻害活性と同時に細胞傷害性を検討することによってその安全性も確認する。

③予想される成果

マラリアは優れた効果を持った薬剤に対しても早期に耐性株が出現することが問題となっている。そのため本研究から、様々な薬剤耐性株にも有効性を持つ生薬由来の抗マラリア薬が生まれることが期待される。

また今回の実験は *in vitro* の実験であるため、良好な結果を得た後 *in vivo* 実験に移行し、早急に抗マラリア薬としてマラリア患者のもとへ届けられるよう努めたいと考えている。

5. 実施報告：

①研究材料・方法

研究材料

1) 和漢薬ライブラリーの生薬由来化合物及び生薬エキス

和漢医薬学総合研究所から提供した生薬由来化合物 96 種類、生薬エキス 120 種類。

2) コンゴボロロ (*Morinda morindoides*) の葉

コンゴボロロの葉は、熱帯医学研究所がコンゴ民主共和国の共同研究者から 3 回に分けて入手した (KB001、KB002、KB003-A と KB003-B)。

研究方法

1) *In vitro* 実験系での化合物または抽出エキスの抗マラリア活性の測定

メフロキン・クロロキン感受性 *Plasmodium falciparum* 株 (3D7) または耐性株 (Dd2) を感染させたヒト赤血球の培養液中に各種化合物または抽出エキスを添加した後、嫌気性条件下 37°C のインキュベーター内で 48 時間培養を行った。赤血球内の核酸を SYBR Green I で染色して感染マラリア原虫を検出した後、化合物等を添加していないコントロールの染色結果と比較することにより、各種化合物または抽出エキスのマラリア原虫増殖阻害活性を算出した。同時に細胞傷害性を検討することによりそれらの安全性も確認した。なお、和漢薬ライブラリーの化合物は 20 μ M、抽出エキスは 500 μ g/mL でスクリーニングを行い、50% 以上の抗マラリア活性があった化合物または抽出エキスについては、段階希釈して更なる検討を行った。

2) コンゴボロロの葉からの各種エキスの作製と化合物の単離、同定

I. エキスの作製

コンゴボロロ KB001 の乾燥葉の粉末にメタノール、エタノールまたは水を加え、加熱環流下で 90 分間抽出した。また、粉末に 80% エタノールまたは酢酸エチルを加え、室温で 30 分間超音波抽出した。KB002 の乾燥葉については、粉末にメタノール、エタノール、80% エタノールまたは酢酸エチルを加え、室温で 30 分間超音波抽出した。また、粉末に 85°C の温湯を加え 30 分間浸出した。それぞれの抽出では抽出操作を 3 回繰り返し、抽出液を合わせた後、35°C で減圧濃縮し、凍結乾燥してエキスを得た。

II. 化合物の単離、同定

KB002 と KB003-B の乾燥葉を合わせ、その粉末にメタノールを加え、30 分間超音波抽出し、この操作を 3 回繰り返した。抽出液を合わせ減圧濃縮した後、凍結乾燥してメタノールエキスを得た。これにヘキサンを加え、ヘキサン画分から 1 種類の化合物を単離した。また、残渣に酢酸エチルを加え、酢酸エチル画分についてカラムクロマトグラフィー及び分取 HPLC を行い、4 種類の化合物を単離した。化合物は各種機器分析により同定した。

②成果 (結果及び考察)

1) 和漢薬ライブラリーの生薬由来化合物及び生薬エキス

スクリーニングの結果、12 種類の化合物及び 47 種類の生薬熱水抽出エキスが 50% 以上の抗マラリア活性を示した。段階希釈を行った検討の結果、化合物 X 及び生薬エキス Y に強い活性が認められ、それらはともに細胞傷害性を持たなかった。化合物 X は生薬エキス Y の含有成分であった。(特許申請準備中であるため個別の化合物名・生薬名は伏せる)

2) コンゴボロロの葉

コンゴボロロ KB001 の葉では、メタノールエキスに強い抗マラリア活性が認められ、エタノールエキス、水エキスの順に活性が弱くなった。いずれのエキスも細胞傷害性を持たなかった。それぞれの IC₅₀ 値は、感受性株 (3D7A) では、4.09 µg/mL、69.26 µg/mL、276.20 µg/mL であり、また耐性株 (Dd2) では、12.31 µg/mL、105.44 µg/mL、547.82 µg/mL であり、耐性株に対する活性がやや弱かった。さらに感受性株を用いて、80%エタノールエキス及び酢酸エチルエキスの活性を調べたところ、IC₅₀ 値はそれぞれ 10.52 µg/mL と 10.20 µg/mL であり、ともにメタノールエキスに準じる活性を示した。

次に、コンゴボロロ KB002 の葉から 5 種類のエキスを作製し、感受性株を用いて同様の実験を行った結果 (Fig. 1)、活性の強さは メタノールエキス > 酢酸エチルエキス、エタノールエキス > 80%エタノールエキス > 水エキス の順であり、80%エタノールエキスの活性は KB001 の葉の場合と異なる結果であった。また、メタノールエキスの IC₅₀ 値は 35.25 µg/mL であり、KB001 の葉より活性が弱かった。このことから、抗マラリア活性にはコンゴボロロの採集地等の違いが関与する可能性が考えられた。

KB001 の葉から作製した 5 種類のエキスについて、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により成分パターンを比較した結果、これまでに抗マラリア活性が報告されているフェニルプロパノイド縮合型イリドイド配糖体¹⁾が、今回活性を示さなかった水エキスにも存在すると考えられた。一方、活性が認められた酢酸エチルエキスにはイリドイド配糖体は少なく、代わって低極性化合物の存在が示唆された。この化合物のピークは、活性を示したメタノールエキスやエタノールエキスにも認められた。

コンゴボロロ KB003-A と KB003-B は採集地が異なるとの情報であったため、別々にメタノールエキスを作製し、KB002 のメタノールエキスとともに LC-MS で成分パターンを比較した。その結果、KB003-A のみ低極性化合物のピークが認められなかったため、KB002 と KB003-B の葉を合わせて化合物の単離に供した (Fig. 2)。メタノールで抽出した後、そのエキスをヘキサンで分配し、ヘキサン画分から低極性化合物を単離し、オレアノール酸と同定した。次に、残渣を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル画分と水画分を得た。オレアノール酸、酢酸エチル画分及び水画分について、感受性株を用いて抗マラリア活性の試験を行ったところ、オレアノール酸と酢酸エチル画分が比較的強い活性を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 15.95 µg/mL と 17.07 µg/mL であった。さらに、オレアノール酸が存在しない KB003-A のメタノールエキスにも KB003-B のメタノールエキスと同等の活性があった。このように、酢酸エチル画分にも活性化合物が存在していることが示唆されたため、この画分についてさらに分画操作を行い、4 種類の化合物を単離し、イリドイド配糖体の gaertneroside (GS)、methoxygaertneroside (MGS)、acetylgartneroside (AGS)、及び dehydrogaertneroside (DGS) と同定した。感受性株を用いた活性試験の結果、これらには抗マラリア活性が認められなかった。田村ら¹⁾による耐性株 CDC1 を用いた検討では、AGS と MGS に抗マラリア活性が報告されている (IC₅₀ 値は 4.1 µM と 21.9 µM) ことから、今後、大量の葉を用いてメタノールエキスの酢酸エチル画分に含まれる種々の化合物を単離し、再度活性試験を行って、活性化合物を明らかにする予定である。

1) Tamura S, Kubata BK, Syamsurizal, Itagaki S., Horii T, Taba MK, Murakami N, Bioorg. Med. Chem Lett., 2010, 20, 1520-1523.

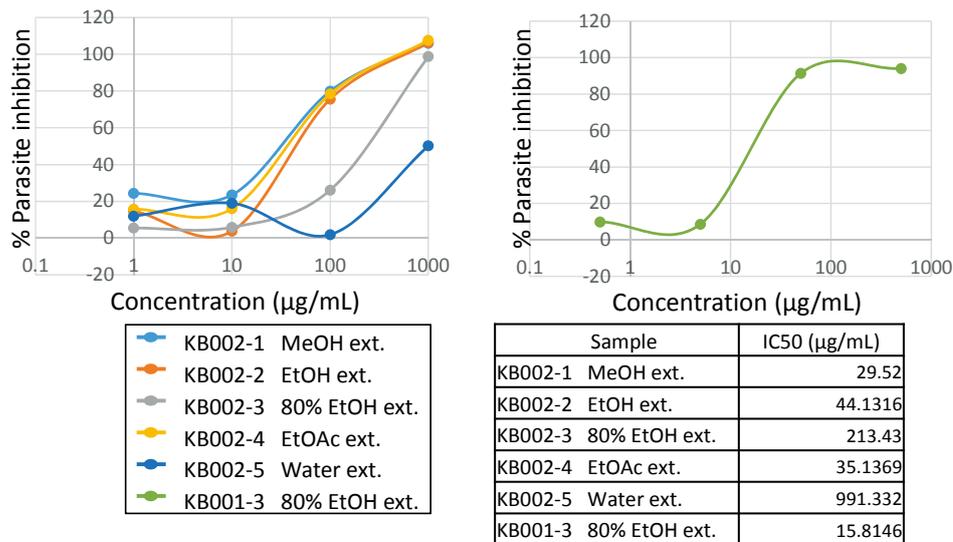


Fig. 1. Anti-malaria assay with extracts of Kongo Bololo (*Morinda morindoides*) leaves

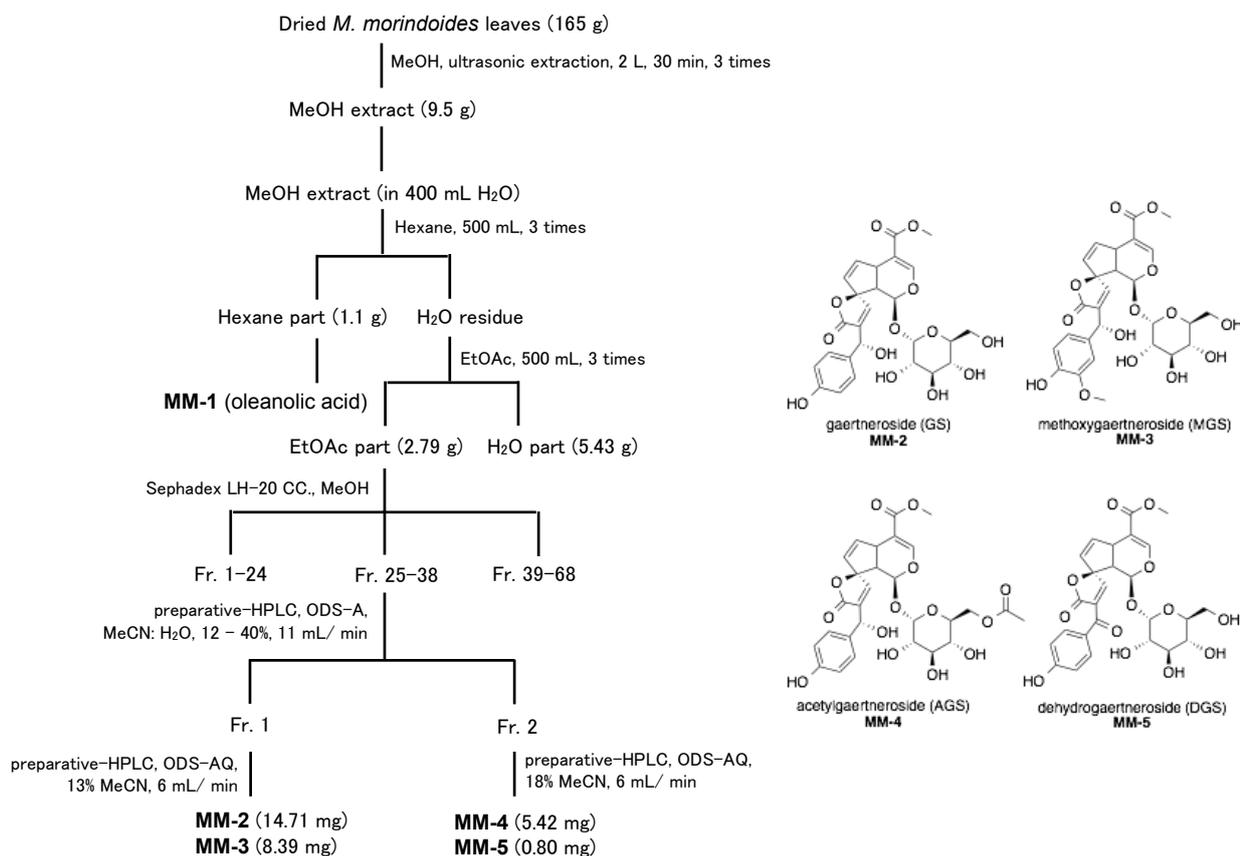


Fig. 2. Isolation workflow of compounds from Kongo Bololo (*Morinda morindoides*) leaves

③成果の公表

平山謙二, 水上修作, 葛躍偉, 李峰, Farhana M, Vangu KB, Awet T, Cherif MS, 當銘一文, 小松かつ子. 民間伝承薬 Kongo bololo の抗マラリア活性の検討. 第 57 回日本熱帯医学会大会 ; 2016, 11, 5-6 ; 東京

6. 自己評価

和漢薬ライブラリー（生薬エキス 120 種類、生薬由来化合物 96 種類）から強い抗マラリア活性を有する生薬エキス Y とそれに含有される化合物 X を見出せたことは予想以上の成果であり、この生薬を配合する漢方薬のマラリア患者への臨床応用までを視野に入れることができた。今後、*in vivo* 実験で抗マラリア作用を検討した上で、臨床研究の実施を判断する予定である。また、化合物についても構造活性相関を検討する。

一方、コンゴボロロの葉については、コンゴ民主共和国からの大量入手が難しく、入手できた乾燥葉の重量は 3 回ともに 150 g 以下であった。そのため、活性を指標にしての化合物の単離が難しく、5 種類の化合物を得ただけであった。コンゴボロロの葉の温湯浸出エキスはコンゴで民間的に抗マラリア薬などとして使用されており、すでに成分研究が行われている。今回コンゴボロロの活性化合物の一つであると同定したオレアノール酸は、同種以外の植物から単離され、抗マラリア活性の報告がある。コンゴボロロの抗マラリア活性成分としてはフェニルプロパノイド縮合型イリドイド配糖体が報告され¹⁾、特に今回単離できなかった **dehydromethoxygaertneroside (DMGS)** が最も活性が強いとされている。今後、イリドイド配糖体が含まれるメタノールエキスの酢酸エチル画分を詳細に検討し、抗マラリア活性を有する化合物を同定する予定である。

マラリアは優れた効果を持った薬剤に対しても早期に耐性株が出現することが問題となっている。マラリア原虫に薬剤耐性を持たせないためには、抗マラリア活性を有する複数の化合物を含有する生薬エキスに期待されることである。コンゴボロロはオレアノール酸とある種のイリドイド成分に活性があることから、これらの成分を含有した溶媒エキスを見つけることも必要である。さらに臨床応用も考えるならば、安全性をも考慮した溶媒が望ましく、今回の各種溶媒エキスの活性試験の結果はこれに対して示唆を与えるものであった。今後、ヒトにも適応できる溶媒エキスを特定して *in vivo* 実験を行うことを計画している。

以上、申請時の計画どおりに研究を進め、次の段階の研究に繋がる成果を得ることができた。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- Ⓒ （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ベトナムにおける眼感染症の病因（肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV）導入前の評価）

課題番号：28－一般－21

2. 代表者：上松 聖典（長崎大学病院眼科・講師）
共同研究者：吉田レイミント（熱帯学研究所小児感染症学分野・教授）
樋泉 道子（熱帯学研究所小児感染症学分野・助教）
ヤッセル ヘルミー モハメド（長崎大学病院眼科・助教）
植木 亮太郎（長崎大学病院眼科・医員）
井上 大輔（長崎大学病院眼科・医員）

3. 決定額：800千円

4. 申請時書類より

①研究目的

眼表面には細菌が常在することもあり、角結膜上皮障害を契機に結膜炎や角膜炎を引き起こす。これらの眼感染症は、時に重症化し、視力に影響を及ぼす恐れがある。肺炎球菌は感染性角結膜炎の原因の約15-40%を占めるといわれている。しかしベトナムにおける感染性角結膜炎の病因や肺炎球菌のそれに占める割合などは報告されていない。

一方、肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCVs）は侵襲性肺炎球菌感染症や肺炎球菌性肺炎を大きく減少させてきたが、眼感染症へのその効果の詳細な報告はまだない。

2016年、PCV未導入地域であるベトナム、ニャチャン市において、PCV接種スケジュールの違いによる鼻咽腔の肺炎球菌保菌の差を調査する vaccine trial が予定されている。本研究の目的は、ベトナム、ニャチャン市における1）角結膜炎の外来受診者数および年齢・性別分布、2）角結膜炎の臨床・疫学的特徴および起因菌・ウイルス、3）健康小児の角結膜常在肺炎球菌の保菌率を明らかにし、pre vaccine era のデータを構築することである。

②研究内容

1. 角結膜炎受診者調査：カンホア省ニャチャン市のカンホア総合病院は同市最大の総合病院である。カンホア総合病院では外来受診者をICD-10コードを用いたコンピューターデータベースで管理している。そのデータベースを用いて、角結膜炎での眼科外来受診者数、年齢・性別分布などを調査する。
2. 角結膜炎の臨床疫学的特徴、起因菌・ウイルス検査：カンホア総合病院眼科外

来における 1 か月の全角結膜炎受診者を前方視的に登録し、臨床疫学的特徴を明らかにし、結膜ぬぐい液から起因菌・ウイルスを同定する。起因病原体の同定はカンホア総合病院検査科、長崎大学熱帯医学研究所と協力し、細菌培養、PCR、肺炎球菌血清型の同定を行う。

3. 健康小児の角結膜常在肺炎球菌の保菌率：PCV trial において PCV 投与前に 2 歳未満小児を対象に鼻咽頭ぬぐい液を採取し、肺炎球菌保菌率とその量の測定がおこなわれる。その機会を利用し同じ児らより結膜ぬぐい液を採取、細菌培養及び PCR により結膜細菌叢、肺炎球菌保菌率・保菌量及びその血清型を同定する。対象数は、1、2の結果によりサンプルサイズ計算を行う予定であるが、およそ 300 人を予定している。

③予想される成果

この研究により、対象地域における角結膜感染症の臨床疫学的特徴と病原菌・ウイルス分布を知ることができる。また、PCV 未導入地域における 2 歳未満小児の結膜細菌叢、特に肺炎球菌保菌率・量を知り、PCV 接種開始 3 年後におこなう同様の調査の結果と比較することで、PCV の肺炎球菌眼感染症に対する効果および cost effectiveness を検討することができる。これらの知見は PCV の効果に新たな評価を与え、眼感染症の予防医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

- 1) カンホア総合病院眼科における 2014~2015 年の 2 年間の外来患者において、感染性結膜炎および感染性角膜炎の患者数を調査する。感染性結膜炎の ICD10 コードがないため、結膜炎(H10)患者数からアレルギー性結膜炎(H10.1)の患者数を減じ、感染性結膜炎の患者数を調査する。
- 2) 2016 年 10 月より、カンホア総合病院眼科外来における角結膜炎受診者を前方視的に登録し、臨床疫学的情報及び結膜ぬぐい液収集を開始した。
- 3) PCV 接種導入前の 2016 年 10 月に、プライマー接種 2 回+ブースター接種 1 回 (2p+1) のスケジュールで PCV 接種を行う群として割り付けられたニャチャン市 6 コミューンの 4~11 か月児 360 人、14~23 か月児 360 人より結膜ぬぐい液を採取した。

②成果（結果+考察）

- 1) カンホア総合病院眼科における 2014~2015 年の 2 年間の外来患者は 30,008 人であった。そのうち ICD10 コードで細菌性結膜炎が疑われる患者は、4,616 人であった。また、角膜潰瘍の病名のある患者は 381 人であった。カンホア総合病院の眼科医師への聞き取り調査により、ICD10 コードは必ずしも患者の病態を正確に反映しているとは限らないことが確認され、この調査のみで、

地域における細菌性結膜炎および角膜潰瘍の正確な有病率を推定することは困難であった。しかし外来受診者の中での細菌性結膜炎および角膜潰瘍のおよその患者数を把握することができた。

- 2) 2016年11月22日までの43日間で67症例の情報及び検体を収集した。現在グラム染色、培養およびPCRにて病原微生物を解析中であるが、症例数を増やすため次年度も継続予定である。
- 3) 現在肺炎球菌の保菌率を解析中であるが、これまでの報告に近い肺炎球菌の保菌率が見込まれる。PCV導入前の東南アジアの地域におけるこのような研究結果は初めてであり、結果が出たのちに公表する予定である。

③成果の公表

角結膜炎の病因の解析およびPCV導入前の幼児の結膜肺炎球菌保菌率の解析後公表予定である。

6. 自己評価

角結膜炎受診者調査では2年間のカンホア総合病院眼科における感染性結膜炎および角膜潰瘍の患者数を把握することができた。ICD10コードは必ずしも実際の病態を反映するものではなく、地域における正確な有病率を推定することは困難であるが、およその感染性結膜炎および角膜潰瘍の患者数を把握することで、角結膜炎の臨床疫学的特徴、起因菌・ウイルス検査および、健康小児の角結膜常在肺炎球菌の保菌率の調査においても有用な情報となる。今後はさらにPCV導入後のおよその感染性結膜炎および角膜潰瘍の患者数の推移を推測できると考えられる。

角結膜炎の臨床疫学的特徴、起因菌・ウイルス検査の調査では、カンホア総合病院眼科における調査が行われている。徐々に症例が集まっているが思うように症例数が伸びていないのが実情である。現在グラム染色、培養およびPCRにて病原微生物を解析中であり、症例数を増やすため次年度も継続予定である。

健康小児の角結膜常在肺炎球菌の保菌率の調査では、十分な症例数を得ることができた。現在肺炎球菌の保菌率を解析中であるが、これまでの報告に近い肺炎球菌の保菌率が見込まれている。PCV導入前の東南アジアの地域におけるこのような研究結果は初めてであり、一定の成果が得るものと思われる。またPCV導入後に同様の調査をすることで、眼科におけるPCVの効果を評価できる可能性が高まった。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

角結膜炎受診者調査では正確な有病率の推定が困難であったが、このような研究では初期におおよその患者数を把握することが重要であり、一定の成果はあげられたと思われる。角結膜炎の臨床疫学的特徴、起因菌・ウイルス検査の調査では、十分な症例数が集まっていないところが問題点であるが、予定に満たない症例数からも調査は可能であり、調査期間を延長して解析することとしている。健康小児の角結膜炎常在肺炎球菌の保菌率の調査では、十分な症例数に対して調査することができた。解析にもう少し時間がかかるが、予想される結果が得られることが見込まれ、今後一定の成果を上げることができると思われる。

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：T 全球的気候システムの変動に伴うバングラデューにおけるコレラ流行メカニズム解明のための共同研究の推進

課題番号：28－一般－22

2. 代表者：寺尾 徹（香川大学教育学部・教授）

共同研究者：名倉 元樹（海洋研究開発機構・研究員）

林 泰一（京都大学東南アジア研究所・連携教授）

Dilruba Begum（International Centre for Diarrhoeal Disease
Research, angladesh・Senior Research Officer）

藤波 初木（名古屋大学宇宙地球環境研究所・講師）

橋爪 真弘（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決定額：900 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

IOD, ENSO などの全球的気候システムと人の生活との最終的な接点である、ローカルな水環境と病原体の振る舞いに関する研究を発展させるため、①現地環境観測を更に確実に蓄積するとともに、リモートセンシングデータを結合してローカルな水環境変動を面的に高解像度でとらえ、コレラ患者数との関係を明らかにする研究を展開する。バングラデシュの国際的な下痢症研究所 ICDDR,B(International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh)と共同研究の枠組みの設定の追求。

②研究内容

引き続き全球的な大気海洋システムの変動に関する理解を深める大気と海洋の両面からの統計解析を進めつつ、ローカルな水環境とコレラ流行の関係を理解する研究を推進する新しい協働を広げる取り組みに焦点を当てた以下の新しい取り組みを開始する。

1. リモートセンシングによるローカルな水環境と下痢症患者との関係に関する研究

ローカルな水環境変動とコレラ患者数との関係を解析するため、長年蓄積してきた現地観測データを更に確実に蓄積するとともに、リモートセンシングによる面的なデータと結合した解析の可能性を検討する国内セミナーを10月までに開催する。成果を共同研究論文の形で投稿する。

2. ICDDR,B との共同研究の深化

双方の研究成果と課題意識を交流し、共通する課題を明らかにして、共同研究の枠組みの構想を目指す国際セミナーを開催する。特に、現地の水環境下の病原体の振る舞いに関する研究者との協力関係の構築を重視する。セミナーは現地開催。ただし現地情勢によっては日本への招致を検討する。

③予想される成果

1. ICDDR,B との共同研究の枠組みの構築により、新たにコレラや下痢症の病原体のローカルな水環境における振る舞いに関する研究者との共同研究が展開できる可能性が開ける。また、日本の大学（香川大学や長崎大学）との公式の協定を結ぶことにより、継続的な共同研究のプラットフォームがより強固なものとなることが期待される。

2. リモートセンシングや GIS に関する研究者との共同研究の枠組みの構築により、面的で分解能の高い環境データとコレラの流行の関係を解析した結果を含んだ、新しい共同研究のカウンターパートを得るとともに、ローカルな水環境変動とコレラ流行の関する共同研究による論文成果が期待される。

3. ローカルな水環境変動とコレラ流行の関する知見を②から得ることにより、グローバルな大気海洋システム変動との関係の解析を結び付けた新たな研究成果が期待される。

4. ICDDR,B 研究者との新たな共同研究や、リモートセンシングや GIS の研究者との共同研究を通じて、科学研究費をはじめとする新たな外部資金の獲得が期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【現地研究者との交流の推進】

1) 今年は現地を訪れ、ICDDR,B 研究者との新たな共同研究を推進することを重視していたが、政治情勢が悪化し困難となった。しかし 2 月には、日本在住の ICDDR,B 出身の研究者と日本のワークショップにて協議できた。さらに 3 月には ICDDR,B の Dhaka 病院を訪問することができた。

【取得・使用したデータ】

1) バングラデシュにおける下痢症患者に関するデータ

国際下痢疾患研究所(ICDDR,B)付属病院 (Dhaka, Matlab) の患者数と病原体に関する詳細データ(1983-2008)を活用した。

2) グローバルな熱帯海洋・気候システムの長周期変動に関するデータ

今年度より、ENSO および IOD の指標の計算には、英国気象局の全球海面水温海水分布データ(HadISST)に加えて、NOAA-OI SST を用いた。気候システム変動に関するデータとして NCEP/NCAR 再解析データと ERA Interim を活用し、全球海面水温変動のメカニズムの検討をおこなった。

3) バングラデシュの気象水文環境に関するデータ

バングラデシュ気象局(BMD)測候所における地上気象観測データから求めた、月平均の降水量、気温、湿度等に関するデータ。インド熱帯気象研究所(IITM)の地上気象観測データから編集したインド北東部降水量データ。バングラデシュ水開発局(BWDB)の観測した Bahadurabad, Hardinge Bridge における河川流量データ。更に、雨量計データから作られたグリッド降水量データ APHRODITE を降水量の空間分布推定に用いた。

4) 降水量衛星観測推定値と雨量計との比較

今年度は新たに、降水量に関してローカルな観測とリモートセンシングによる降水量推定との比較を行った、雨量計による観測結果による人工衛星 TRMM 降水レーダー

(TRMM/PR)観測結果の検証解析を進めた。これまでほとんど行われてこなかった、TRMM/PR と雨量計の瞬間値の直接比較を実施した。

5) 気象水文観測装置による観測

ICDDR,B の Dhaka, Matlab 病院において自動気象観測装置による観測を引き続き継続した。観測している気象要素は、気圧、気温、風向、風速、湿度、降水量、短波放射である。Matlab 病院でも同様の観測を継続した。

【解析方法】

②成果（結果+考察）

【現地研究者との交流の推進】

1) 年度の後半になってもバングラデシュの政治情勢の好転が望めない中、ICDDR,B 研究者やリモートセンシング・GIS 研究者との交流の強化へ、必要な対応を取ることができた。

2 月には、日本在住の ICDDR,B 出身の研究者と名古屋大学で開催されたインド北東部の気候に関するワークショップにて協議できた。さらに 3 月には ICDDR,B の Dhaka 病院を訪問することができた。この訪問時のやり取りをもとに、メールを介してであるが、リモートセンシング・GIS 研究者と ICDDR,B 研究者との間で引き続き協力を進める意思を確認しあうことができた。

2) グローバルな気候変動と、インド亜大陸北東部あるいは Dhaka のローカルな水文環境変動と、ダッカの下痢症（非コレラ・コレラの別を含む）流行の関係について一層の理解が進んだ。

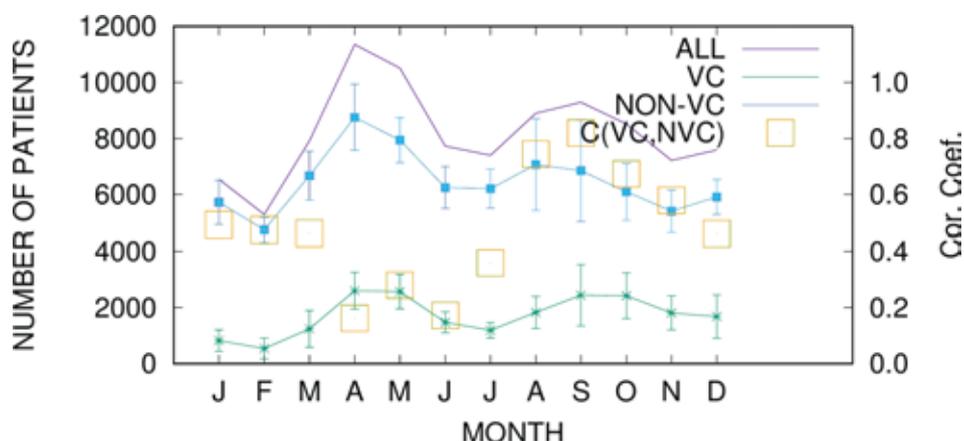


図1 VC(コレラ患者数)と NON-VC(非コレラ患者数)の季節変化及びその標準偏差と、VC と NVC(NON-VC)の間の相関係数（黄色い四角）を示している。

下痢症には、4-5 月と 8-10 月頃に年 2 回の流行ピークがみられることが知られているが、4-5 月の下痢症ピークでは非コレラ・コレラ患者数の間にほとんど相関がみられないのに対し、8-10 月の下痢症ピークでは、非コレラ・コレラ患者数には強い相関があることが明らかとなった。

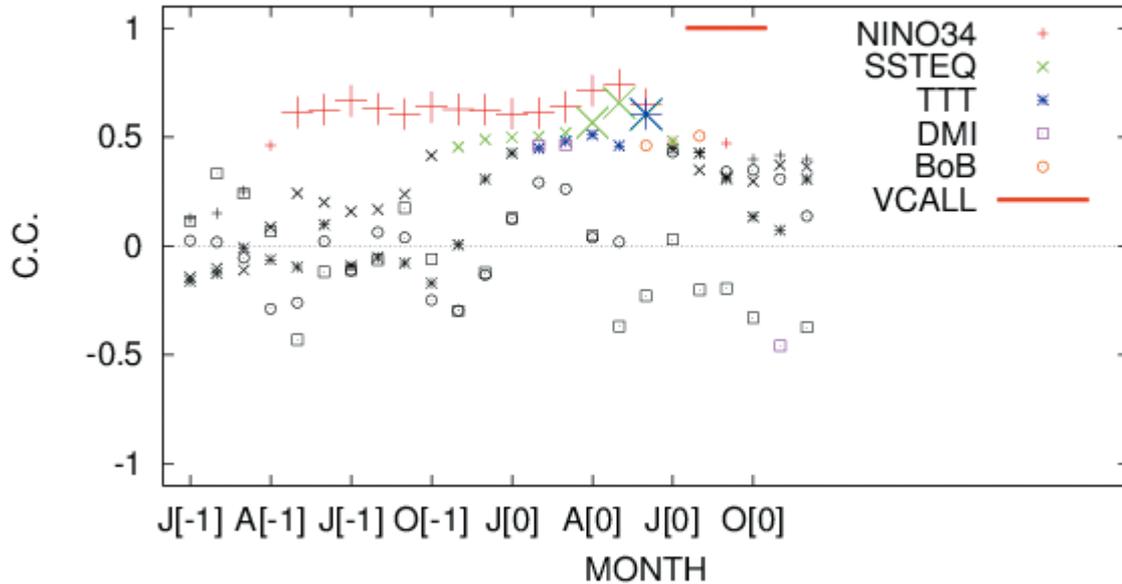


図2 バングラデシュ洪水面積で統制したコレラ患者数と、グローバルな気候システムのパラメータとの間の相関係数の時系列。ベンガル湾北部の海面水温との相関係数を○印で示している。横軸は月。[0], [-1]をつけることにより、当年および前年の月をそれぞれ表している。

特に 8-10 月の下痢症ピークについて、非コレラ・コレラ患者数とベンガル湾の 6-8 月の患者数の 3 者の間に強い相関がみられること。ところが、バングラデシュ洪水面積等のインド亜大陸北東部あるいは Dhaka のローカルな水文環境を代表するパラメータによる影響を統制した結果、ベンガル湾の 6-8 月の患者数はコレラ患者数にのみ有意な相関がみられる傾向があることが分かった。海面水温のコレラ流行に対するインパクトを示す。これらの結果についてワークショップで口頭発表するとともに、論文として発表する準備を進めている。

3) 気象水文観測装置によって観測した結果

ICDDR,B の Dhaka, Matlab 病院における自動気象観測装置による観測については、3 月に Dhaka 病院を訪れることができ、Dhaka の 2017 年 3 月までのデータを無事取得することができた。Matlab 病院については、2 月頃まで観測が継続されていたが、その後電源トラブルにより停止しているとの報告が現地の協力者からあった。首都 Dhaka から離れているため、政治情勢の悪化にともなってデータの取得に行くことができなかった。

③成果の公表

2017 年 2 月の名古屋大学で行われた International Workshop for Climate Variability and Related Studies over North East Indian Subcontinent にて、ICDDR,B 出身の研究者によるものを含む 2 本の研究発表を行った。コレラ患者数と海面水温の関係を主とした論文の投稿を準備中である。

6. 自己評価

昨年来バングラデシュの政情不安があったが、特に 2016 年 7 月にダッカグルシヤン地区にて発生したレストラン襲撃人質テロ事件の影響があった。本研究課題も、7 月以降は日本から対応できる範囲での活動に限らざるを得なくなった。

現地の観測の維持と拡充に関する活動はほぼ中断を余儀なくされた。渡航ができないことから観測結果の取得や、観測機器の不調に対する対応も困難となった。現地との関係は、2017 年 3 月に至るまで、インターネットや電話等で連絡が取れる範囲内での情報収集に限られた。本研究グループはこの状況の下で、当初の計画を現実的に可能な範囲に見直し、研究目的との関係で実施可能と思われるいくつかの重要事項をえらび出し、その実行をはかることにより、不十分であっても今後につながる成果をあげることを目指した。

その結果、いくつかの成果を上げることができた。まず第 1 に、上記に示したデータ解析結果である。特に海面水温変動のコレラ流行に対するインパクトに関する結論を導くことができたことは重要であり、今後につながる成果となった。

また、ICDDR,B の研究者との新たなつながりの発掘ができた。2 月には、名古屋大学で開催された国際研究集会 **International Workshop for Climate Variability and Related Studies over North East Indian Subcontinent** に、ICDDR,B で昨年来連絡を持っていた日本滞在中の研究者を共同研究者として招聘することができた。

3 月には、ダッカの ICDDR,B への 2 名の研究者の派遣と今後の協力関係の基礎の構築、現地における観測データの取得に成功した。その際の議論をベースに、リモートセンシング・GIS 研究者と ICDDR,B 研究者との間で引き続き協力を進める意思を確認しあうこともできた。

本来期待された成果のうち、現地観測とリモートセンシングの結合のデータ解析に関する部分は、新たな現地観測の構築が不可能となり、データの取得が困難となったために十分に進展させることができなかった。

以上を総合し、不満は残るが、可能な範囲での対応により、一応の成果を上げることができたと評価している。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- Ⓐ (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

平成28年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：次世代シーケンサーによる *Orientia tsutsugamushi* の比較ゲノム解析
課題番号：28－一般－23

2. 代表者：堀田 こそえ（東京大学大学院農学生命科学研究科・助教）
共同研究者：長谷部 太（長崎大学熱帯医学研究所）
竹村 太一郎（長崎大学熱帯医学研究所）
Nguyen Le Khanh Hang（ベトナム国立衛生疫学研究所・ウイルス部室長）

3. 決定額： 900 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

動物由来感染症の原因となる病原因子の動態把握は公衆衛生学上非常に重要であることは改めて述べるまでもない。発熱を伴う熱性疾患においても動物由来感染症が多数含まれるが、診断が煩雑・困難であることから、原因の特定に至らない不明熱性疾患とされることは潜在的に多いと推測される。申請者はベトナム社会主義共和国（以下、ベトナム）における急性熱性疾患患者のうち、感染症が強く疑われ、かつ現地の医療機関での実験室診断により主要な病因（インフルエンザ、マラリア、腸チフス、デング熱等）が特定されなかった患者について、その起因微生物の同定とこれをもとにした疫学情報の収集を推進している。その中で、2015年にベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）との共同研究からツツガムシの幼虫が媒介するリケッチア *Orientia tsutsugamushi* (OT) 感染者をハノイ市にて多数見出した。OTの分子系統解析は、ゲノム構造の複雑さから報告は少数であり、それらの報告も56kDa TSA 遺伝子等の短い配列によるものがほとんどである。東アジア分離株とその他の地域由来株の比較も進んでいるとは言い難い。また、リケッチア症では治療が遅れた場合に重症化することから適切な診断が求められる。リアルタイム PCR 等を利用した迅速診断系の構築が我が国でも進められているが、遺伝子診断系を強固にするためにはゲノム配列情報の集積による多様性の把握は必須のことである。本研究ではベトナム分離 OT 株のゲノム解析を行い、東南アジア分離株の系統学的位置づけを解明することを主目的とする。さらに病原性の変化に関連するゲノム変異を同定することも目的とする。

②研究内容

ベトナムハノイ市にて2015年7月から10月の4ヶ月間に20検体のOT遺伝子陽性患者血液を保存している（投稿中資料1）。これらの検体から培養細胞（L929）に接種し、7日間培養後、感染細胞を回収する。感染細胞はホモジェナイザーによる破碎後、200g、10minの遠心分離により宿主細胞由来物を除去する。続いて20000g、10minの遠心分離によりOTを回収し、QIAGEN社製等のDNA抽出キットにより

DNA を抽出する（参考文献1）。DNA 検体は Illumina 社 Miseq によるゲノム配列の取得に用いる。ライブラリー調整等は同社より提供されているプロトコルに準じる。得られた塩基配列情報は de novo アセンブリーを試みると共に、既報の 11 遺伝子（*atpD*, *clpX*, *dnaJ*, *dnaK*, *fabD*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *nrdA*, *sucD*, *ubiD*）へのマッピングを行い SNPs 抽出を行う（CLC genome workbench を使用予定だが、他のソフトウェアの利用も検討する）。SNPs データを用いて分子系統樹作成（MEGA6.0 等を使用）を行い、既報の分離株との比較解析を行い、ベトナム分離株／東アジア分離株の系統関係を明らかにする。またコアゲノムへのマッピングを同時に試み、病原性に関連するゲノム変異同定を試みる。

③予想される成果

OT は約 2M bp のゲノム中に 40% を超える長短の反復配列を含んでおり、水平遺伝子伝達も非常に頻繁に生じる全ゲノム解析が困難な細菌である。完全長ゲノム配列は 2 株の配列がこれまでに決定されているが、今回用いる Illumina Miseq による解析では完全長に近づけることは困難と予想される。一方で、前述の完全長 2 株と 8 株のドラフト配列を用いた 11 のハウスキーピング遺伝子の比較ゲノム解析により、これまでに多く用いられてきた 56kDa TSA 遺伝子によるよりも詳細な分子系統解析が可能であること、これら 11 遺伝子群が病原性にも直接関与する可能性があることが報告されている（参考文献2）。この結果は主に東アジア分離株（1943-1981 年分離）に基づくものであり、近年の東南アジア分離株の系統関係は未明である。本研究により、東南アジア株の系統学的位置づけが明らかになるとともに、病原性の変化に関連するゲノム変異同定に資するデータの集積が期待される。その結果は OT のゲノム多様性を明らかにすることに繋がり、リアルタイム PCR 等を用いた遺伝子診断系の向上に貢献することが期待される。さらに長崎大学ベトナム拠点および NIHE にて解析を行う事は、今後当地において活用範囲の拡大が見込まれる次世代シーケンサーを利用したゲノム解析技術の向上に寄与することができる。

（参考文献）

- 1 DNA Base Comparison of *Rickettsia tsutsugamushi* Determined by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography. K. Kimura *et al.* Int J Systematic Bacteriology. 247-248, 41(2), 1991
- 2 Genome Comparison and Phylogenetic Analysis of *Orientia tsutsugamushi* Strains. K. Nakayama *et al.* DNA res. 281-291, 2010

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

1.1 OT 患者血液収集

ハノイ市内にある国立 105 軍病院の協力を得て、ツツガムシ病疑い患者（主症状：発熱、発疹、リンパ腺肥大、刺し口など）の全血を収集し、血清とプラズマに分離して-80°C にて保存した。

1.2 OT 感染患者の同定

プラズマから QIAamp DNA Blood Mini Kit にて total DNA を抽出後、nested PCR 法にて OT の 56-kDa TSA 遺伝子検出を行なった。1st PCR に使用したプライマーは 34: tcaagcttattgctagtgcaatgtctgc、55: agggatccctgctgctgtgcttgcg、2nd PCR プライマーは 10: gatcaagcttctcagcctactataatgcc、11: ctagggatccccacagatgcactattaggc で、反応サイクルはどちらも、1 cycle; 94°C 3min、30 cycles; 94°C 30sec、57°C 2min、72°C 2min、1 cycle; 72°C 7min である。

1.3 培養細胞による OT 病原体分離

OT 56-kDa TSA 遺伝子陽性となった検体を培養細胞（マウス線維芽細胞：L929）に 4°C 1 時間吸着後、PBS にて 3 回洗浄し、新しい培地を添加し、37°C で 1 週間培養する。顕微鏡下で OT が確認されない場合は、DNA 抽出を行い PCR 法(1.2)にて OT 遺伝子検出を行なって確認する。どちらも陰性だった場合は、培養上清を新しい L929 細胞へ接種して継代する。これを 3 回まで繰り返す。

1.4 ハウスキーピング遺伝子 (*atpD*, *clpX*, *dnaJ*, *dnaK*, *fabD*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *nrda*, *sucD*, *ubiD*) の直接 PCR 法による遺伝子解析

プラズマから抽出した total DNA を用いて、標的 11 遺伝子を Direct PCR 法により増幅し、シーケンス解析を試みた。

1.5 陽性 OT の Genotyping

1.2 の nested PCR 法で増幅された 56-kDa TSA 遺伝子のシーケンスを行い、Genotyping を行なった (Furuya, 1993)。

②成果（結果+考察）

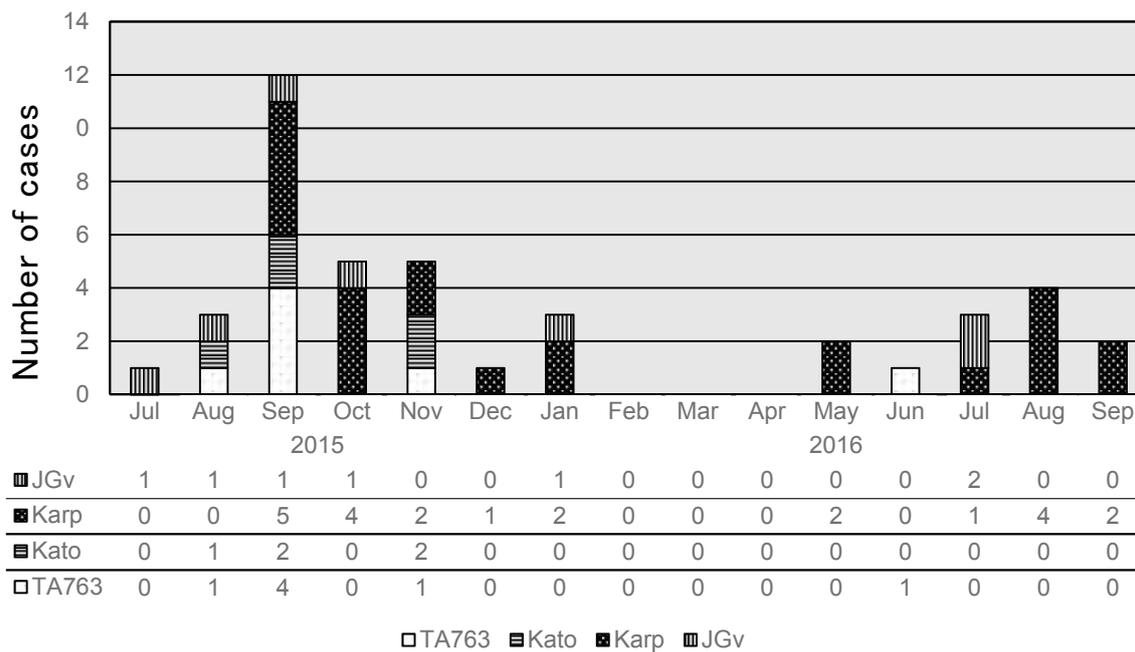
2015 年 7 月から 2016 年 9 月の間、国立 105 軍病院でツツガムシ病疑いと診断された患者（主症状：発熱、発疹、リンパ腺肥大、刺し口など）の血液 63 検体を NIHE に輸送し、プラズマから total DNA の抽出を行った。その後、56-kDa TSA 遺伝子を検出する nested PCR 法を用いて、OT 感染患者の同定を行なった。その結果、63 検体中 42 検体 (66.7%) が OT 陽性であった。患者年齢は、15 歳以下が 3 人 (3/43; 7.1%)、18 歳から 63 歳が 25 人 (25/42; 59.5%)、67 歳以上が 14 人 (14/42; 33.3%)であった。その後、OT 遺伝子陽性検体は L929 細胞を用いて OT 病原体の分離を試みた。L929 細胞を用いて 3 回まで継代を行なったが、全ての検体で OT 粒子陰性となり、OT 病原体の分離ができなかった。マウスを用いた分離法と比較して、細胞を用いた場合の分離率は低く、この件に関してはマウスを用いて分離後、細胞へ適合させることを検討する必要があると考えられる。本研究では、L929 細胞での OT 病原体の分離が行えなかったため、次世代シーケンサーによる解析に必要な total DNA 量を確保できなかった。そこで、次世代シーケンサー解析で標的遺伝子と

していたハウスキーピング遺伝子 (*atpD*, *clpX*, *dnaJ*, *dnaK*, *fabD*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *nrdA*, *sucD*, *ubiD*) を PCR 法にて増幅することを試みたが、残念ながら 11 遺伝子全てを増幅できなかった。現在、OT 遺伝子の検出に使用している 56-kDa TSA 遺伝子の増幅は nested PCR 法である一方、標的 11 遺伝子は single PCR 法であるため感度が低かったと予想される。

そこで、2015 年に収集した OT 患者血液および 2016 年に新たに収集した OT 患者血液で、56-kDa TSA 遺伝子による nested PCR 法で陽性となった PCR 産物について、シーケンス解析にて遺伝子型を決定した。42 検体の 56-kDa TSA 遺伝子配列を OT の Reference 株と比較した結果、4 つの遺伝子型に収束した。最も多かった遺伝子型は、Karp で 54.8%、続いて TA763 (16.7%)、JGv (16.7%)、Kato (11.9%) となった (図 1)。これまで、ベトナム中部地方で報告のあった遺伝子型は、Karp、Kawasaki、TA763、JGv であった。本研究では、新たに Kato が分布していることが明らかとなり、ベトナムには 5 つの遺伝子型が存在することが明らかとなった。OT 感染の鑑別診断は、間接蛍光抗体法による同定がスタンダードであるが、ペア血清が必要となり、感染初期の同定は不可能である。近年、ELISA 法やイムノクロマト法で同定を行う簡易キットが発売されているが、血清型が多いため特異性に欠け、更なる開発が望まれる。本研究により、ベトナムに分布する OT の多様性が明らかとなり、迅速かつ精度の高い確定診断法の確立が望まれる結果となった。本研究の協力病院である国立 105 軍病院は北部ベトナムのハノイ市内にあり、東南アジアであるベトナムの中でも四季がある地域であり、冬季の体感温度はとても低い。本研究の結果、2016 年 2 月から 4 月の間は OT 感染患者がいなかったが、ハノイ市では 2 月後半から 3 月には気温が急激に上昇する。宿主であるツツガムシは幼虫の時期に 1 度だけ吸血するため、患者発生時期と未発生時期はツツガムシの生活環と深く関わりがある。今後、ベトナムにおける宿主側の調査も必要と考える。

ベトナムにおける、ツツガムシ病の血清学調査および遺伝子型調査の報告は 10 報もなく、遺伝子型調査においては、中部地域と南部地域で行われた 2 報だけであり、それぞれ 13 検体と 18 検体の報告である。本研究における、北部ベトナムにおける OT の遺伝子型調査は初報告であり、検体数も 42 検体とこれまでの報告より充実した内容である。本研究成果は、ベトナムにおけるツツガムシ病疫学調査情報に寄与する貴重な研究であると考えられる。

図 1)



③成果の公表

Hang L.K. Nguyen, Hang T.T. Pham, Tinh V. Nguyen, Phuong VM Hoang, Mai T.Q. Le, Taichiro Takemura, Futoshi Hasebe, Daisuke Hayasaka, Akio Yamada, Kozue Hotta, The genotypes of *Orientia tsutsugamushi*, identified in scrub typhus patients in northern Vietnam, Trans R Soc Trop Med Hyg 2017; 111: 137-139

6. 自己評価

本研究は、OT 患者検体を国立 105 軍病院の協力の元、滞りなく収集できたことは大きな成果であると考えます。しかし、分離した OT 病原体を得られなかった結果、次世代シーケンサーによる解析が行えなかったことが大変悔やまれる。これまで、ハノイ市内で捕獲した野鼠の検体から、マウスを用いて OT 病原体の分離を NIHE の BSL3 にて行なっていたため、培養細胞による分離を軸にした本計画を予定し、OT の分離が成功することが前提の計画であった。その第一段階で頓挫したことは今後の大きな課題である。しかしながら、本研究申請段階で、収集した検体を用いて、北部ベトナムにおける *Orientia tsutsugamushi* の Genotyping を行うことは確実に成果として報告できると予定していたため、研究期間内に論文の投稿をできたことは予定どおりである。また、ベトナムにおいて OT の遺伝子型に関する論文報告は 2 報のみであり、使用している検体数も少ない。本研究では、患者検体数も多い上、北部ベトナムでは初となる遺伝子型の報告であり、今後のツツガムシ病研究に大いに貢献するデータであると考えます。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- Ⓐ (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

申請書に記載した研究計画は達成できなかったが、別の方法で北部ベトナムにおける *Orientia tsutsugamushi* の遺伝子型調査の結果を論文として報告できたことは大変満足している。

第 2 部

研 究 集 会

平成28年度研究集会報告（自己評価）

1. 分野名：熱帯医学研究所 寄生虫学分野

研究集会の名称：第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会大会（共催）

採択番号：28-集会-1

開催期間：平成28年5月13日（金）～平成28年5月14日（土）

2. 代表者：吉田 裕樹（佐賀大学医学部・分子生命科学講座・免疫学分野・教授）

参加人員：大会全体を通じて111名

3. 決定額：500 千円

4. 研究集会の概要

長崎において第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（大会長、佐賀大学医学部教授 吉田裕樹）を開催し、シンポジウム4を「寄生虫感染と免疫応答」というテーマのもとに熱帯医学研究所との共催とした。シンポジウム1, 2, 3, 5も感染や免疫をテーマとしたものである。

シンポジウム全般を通じて、熱研に所属するもの、および長崎大学医学部、熱帯医学グローバルヘルス研究科に所属するものは参加自由（参加費無しで参加可能）とした。

5. 実施報告：

第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会大会を良順会館で、またランチョンセミナーとプログラムの一部をポンペ会館で行った。シンポジウム4は熱帯医学研究所共催シンポジウムであり、国内の寄生虫感染研究者5名が招聘され（1名は長崎大学医学部から）、最先端のトピックについての講演がなされた。そのほかのシンポジウムでは、長崎・佐賀に多い肝炎に関するトピックについて、主として長崎、佐賀の研究者による発表があり、ランチョンセミナーでも、長崎大学消化器内科教授 中尾一彦教授による肝炎に関する講演がなされた。その他のシンポジウムでは、細胞死、自然免疫、アレルギーなどに関して、最先端のトピックに関する講演がなされた。

大会・シンポジウムは日本語で行われたが、長崎大学医学部、熱帯医学研究所、熱帯医学・グローバルヘルス研究科からも多くの参加者があった。

6. 自己評価

日本インターフェロン・サイトカイン学会との共催という形で、寄生虫感染症やウイルス感染、および免疫研究について最先端の研究成果に触れることが出来たことに加え、これらの成果を、熱研内、および長崎大学の研究者に広く触れる機会とすることが出来た。日本インターフェロン・サイトカイン学会（学会事務局および大会参加者）からも、また熱研を初めとする長崎大学の参加者からも、高い評価を受け、開催した意義が充分得られたと考える。

7. 達成度 (何れかに○)

I (予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

④ (予想以上の成果を挙げられた)

平成28年度研究集会報告（自己評価）

1. 分野名：熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
研究集会の名称：医学研究のための倫理に関する国際セミナー
採択番号：28-集会-2
開催期間：平成28年5月16日（月）～平成28年5月18日（水）
2. 代表者：佐々木 均（長崎大学病院薬剤部・教授）
参加人員：25名
3. 経費：1,000千円

4. ①研究集会の概要

現在医学研究において世界的な倫理基準としてヘルシンキ宣言、CIOMS あるいはWHO ガイドライン、さらにICH-GCP ガイドラインが適用されている。これらのガイドラインはヒトを対象にした医学研究の倫理規範を一般的に規定したもので、それまでの研究者個々の人格に頼っていた倫理規範を世界的に統一した **Minimum Requirement** として明文化したことに大きな意味がある。しかし、この精神を実際の研究現場で適応していく作業にはもう少し細かい考慮が必要である。そして現況では、この作業なしには、研究の発展はもはや望めない状況にある。本集会では特に途上国における研究開発における倫理問題に焦点を絞り、世界で行われている、様々な事例を挙げながら医学研究倫理の専門家や、各国で医学研究に携わる研究者、及び他分野の専門家も加わって文化や習慣の違いを考慮に入れた検討を行い、今後の方向性について検討した。また、この集会は一般にも公開した。

②予想された成果

参加者が、今日の医学研究倫理に関して何がコンセンサスで、何が論議的なのか、また、その対処の仕方について理解できるようになる。

5. 実施報告

本集会は、「医学研究のための倫理に関する国際研修コース」との共催として、長崎大学ポンペ会館にて平成28年5月16日～5月18日の3日間、講師10名（うち外国から3名、国内から7名）と参加者17名（うち外国から8名、国内から9名）を集め開催された。FERCAP-Philippines（フィリピン国）のCristina Torres, Mahidol University, Thailand（タイ国）のJarupim Soongswang, Khon Kaen University（タイ国）のKwanchanok Yimtaeのほか、日

本国内の倫理関係の研究者を多数講師として招聘し、質の高い研修コースを運営することができた。取り上げた内容としては、倫理委員会の構成、役割、機能、インフォームド・コンセント（同意書）、利益不利益の評価、誘導、発展途上国での倫理問題である。参加者は今日の医学研究倫理に関して何がコンセンサスで、何が論議の的なのかについて理解し、その対処の仕方について討論した。

<プログラム>

日 時：平成28年5月16日（月）、5月17日（火）、5月18日（水）

場 所：長崎大学医学部ポンペ会館（坂本キャンパス）

参加費：参加費無料(宿泊費、食事代、交通費等は各自負担)

ウェブサイトは、

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

運営事務局：〒852-8523 長崎市坂本1-12-4

長崎大学熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野

教授 平山 謙二

TEL 095-819-7820, FAX 095-819-7821

【研修の目的】

研修参加者は研究倫理についての基本的な考え方を学ぶと同時に、近年の研究倫理に関する国内外における議論を把握することができる。主たる内容は、研究倫理の基本原則、インフォームド・コンセント、リスク・ベネフィット評価、既存資料の利用、国際共同研究における倫理である。これに加えて、子どもを対象とする研究の倫理、コミュニティを対象とする研究の倫理、プラセボ対照試験の倫理、研究と治療の区別、倫理審査委員会の構成や機能等についても学ぶ。

【対象者】

保健医療関係の博士課程大学院生、医学研究者、倫理委員会委員、医学部・保健医療関係の学部生など

【研修方法】

研修は、グループ討論を中心とした相互教育方式で行われる。参加者は各テーマについての入門的な講義を聞いたうえで、関連するケースについてグループで討論し、倫理的問題を分析する力を養う。なお、使用言語は基本的に英語であるが、できる限り日本語でも

理解できるようサポートを行う。

【講師陣】

コースディレクター：Juntra Karbwang（長崎大学熱帯医学研究所）、佐々木 均(長崎大学病院薬剤部)、平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所）

講義担当者：Cristina Torres (FERCAP-Philippines)、
松山 章子（長崎大学国際健康開発
Juntra Karbwang（長崎大学熱帯医学研究所）、
平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所）
Jarupim Soongswang（Mahidol University,Thailand）
Kwanchanok Yimtae（Khon Kaen University）

メンター：Nguyen Tien Huy（長崎大学熱帯医学研究所）、Dumre Shyam Prakash（長崎大学熱帯医学研究所）、Cherif Mahamod Sama（長崎大学熱帯医学研究所）

【研修コースの概要】

（第1日目）2016年5月16日（月）

8:45-9:15 開講のあいさつ: (Juntra Karbwang、佐々木均、平山謙二)

オリエンテーションと参加者の自己紹介

9:15-10:00 研究倫理の概論、その歴史的背景と原理 (Juntra Karbwang)

10:00-10:30 コーヒー・ブレイク

10:30-11:15 研究倫理委員会の役割と機能 (内田英二)

11:15-12:00 インフォームド・コンセント (Cristina Torres)

12:00-13:00 ランチタイム

13:00-13:30 利益相反 (Kwanchanok Yimtae)

13:30-14:15 リスク・ベネフィット評価 (Cristina Torres)

14:15-14:30 コーヒー・ブレイク

14:30-15:30 Case Study 1: グループ討論

(Cristina Torres、Kwanchanok Yimtae、Jarupim Soongswang、松山章子、Nguyen Tien Huy、Juntra Karbwang、平山謙二)

15:30-17:00 Case Study 2: 総合討論 (Kwanchanok Yimtae、Cristina Torres)

17:00 End of day one

(第 2 日目) 2016 年 5 月 17 日 (火)

- 8:30- 9:00 ヒトゲノム研究の倫理的問題 (平山謙二)
- 9:00- 9:45 精神医学研究の倫理問題 (Kwanchanok Yimtae)
- 9:45-10:30 疫学のおよび社会的研究の倫理問題 (Cristina Torres)
- 10:30-11:00 コーヒー・ブレイク
- 11:00-12:00 Case Study 2: はじめに
- 12:00-13:00 ランチタイム
- 13:00-15:00 Case Study 2: グループ討論
(Cristina Torres、Kwanchanok Yimtae、Jarupim Soongswang、松山章子、
Nguyen Tien Huy、Juntra Karbwang、平山謙二)
- 15:00-15:30 コーヒー・ブレイク
- 15:30-17:00 Case Study 2: 総合討論 (松山章子、Cristina Torres)
- 17:00 End of day two

(第 3 日目) 2016 年 5 月 18 日 (水)

- 9:00-10:30 国際保健研究における倫理問題
研究方法、インフォームド・コンセント、治療レベル、試験後の利益
(松山章子、Cristina Torres)
- 10:30-11:00 コーヒー・ブレイク
- 11:00-12:00 グループ討論結果の発表 (松山章子、Cristina Torres、Juntra Karbwang)
- 12:00- 修了式 (Juntra Karbwang、平山謙二)

End of the course

<参加者リスト>

	Name	Country	Title/Institution
1	Maiko Akashi	Japan	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
2	Napakkawat Buathong	Thailand	Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
3	Supawadee Daodee	Thailand	The Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research

4	Atsushi Fujioka	Japan	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
5	Mitsuko Hasegawa	Japan	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
6	Takahiro Ishizaki	Japan	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
7	Kei Kawano	Japan	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
8	Sweta Koirala	Nepal	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
9	Chompunoot Koonrunsesomboon	Thailand/US A	Undergraduate research assistant/Emerging Pathogens Institute at University of Florida
10	Nut Koonrunsesomboon	Thailand	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
11	Ezzan Kunna	Sudan	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
12	Ariyaporn Kuroda	Thailand	Faculty of Education, Khon Kaen University
13	Mark Anthony De Vera Luz	Filipine	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
14	Surapoj Meknavin	Thailand	Department of Orthopedics, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University
15	Supatra Porasuphatana	Thailand	The Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research
16	TEERACHAT SAE-HENG	Thailand	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases

17	Kanchala Vichaichanakul	Thailand	Pharmacy Division, Phramongkutklao Hospital
----	----------------------------	----------	---

<講師・メンターリスト>

	NAME	COUNTRY	INSTITUTION
1	Kenji Hirayama	Japan	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
2	Juntra Karbwang Laothavorn	Japan/Thailand	Department of Clinical Product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
3	Hitoshi Sasaki	Japan	Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital
4	Cristina Torres	Filipine	FERCAP Coordinator/ WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, Thailand
5	Jarupim Soongswang	Thailand	Mahidol University, Thailand
6	Kwanchanok Yimtae	Thailand	Khon Khen University
7	Akiko Matsuyama	Japan	Graduate School of International Health Development, Nagasaki University
8	Nguyen Huy-Tien	Japan/Vietnam	Department of Clinical Product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
9	Dumre Shyam Prakash	Japan/Nepal	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
10	Cherif Mahamod Sama	Japan / Guinea	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

6. 自己評価

平成28年5月16日(月)～平成28年5月18日(水)の3日間長崎大学において、英語による倫理に関する国際研修コースを開催し、講師10名(うち外国から3名、国内から7名)と参加者17名(うち外国から8名、国内から9名)を集め、世界でも類をみない集会を開催した。アフリカ、アジア等各国から多数の参加者があり、国際的な視野での討論が活発に行われ、この研究集会の特色が示された。参加者のアンケートの結果、英語による困難さはあるものの内容的には好評であった。今年度は、第15回目のコースであったが、タイのWHO-TDR Clinical Coordination and Training CenterのFERCAP Coordinator Cristina Torres 女史を中心に、これまでのスタイルを継承しつつ医学における倫理問題の世界的な動向についても議論することができた。予想以上の成果であった。

7. 達成度（何れかに○）

I : ほとんど出来なかった

II : 不満は残るがまずOK

III : 予定通りの成果

④ : 所期の予想以上の成果が挙げられた

※評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

第 3 部

海外拠点連携共同研究

平成28年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：アフリカで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析

課題番号：28-拠点-1

2. 代表者：笹川 千尋（千葉大学真菌医学研究センター・センター長）

共同研究者：亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター・教授）

五ノ井 透（千葉大学真菌医学研究センター・教授）

矢口 貴志（千葉大学真菌医学研究センター・准教授）

渡邊 哲（千葉大学真菌医学研究センター・准教授）

一瀬 休生（長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点・拠点長・教授）

3. 決定額：7,000 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ケニアなどサハラ以南のアフリカ地域において主として患者より採取される真菌・放線菌、およびカビ毒産生などにより食糧を汚染してヒトに健康被害を及ぼす真菌を単離・培養・保存する。これらの菌の菌種・地域特異性を明らかにし、疫学的研究を進める。さらに菌の形態学、細胞生理学、分子生物学的解析を行うことにより、簡便な診断・同定法を開発し、適切な薬剤の選択・治療法の開発等を通して、現地の医療・人々の健康のために貢献し、QOLの向上を図る。単離された菌は、可能な範囲で日本に輸入し、将来の真菌症・感染症学、生物学の研究開発資源とする。これらの研究を通じて、ケニアおよび日本国内の生活の質（QOL）の向上への貢献を目指す。

②研究内容

KEMRI 所属の研究者と共同で、これまでにケニア各地のトウモロコシ粉・小麦粉などの穀物から分離した真菌株において、多遺伝子解析を実施し、汚染菌の分子系統的な位置付けを確定する。また、マイコトキシン産生量は簡易キットを用いて汚染を定量し、一部の産生菌は標準化された厳密な化学定量を行う。主に *Aspergillus*、*Fusarium* において、分子系統的解析、形態学的解析、培養菌株によるカビ毒産生実験（各種カビ毒量の測定）、カビ毒生合成遺伝子などの結果を統合し、それぞれの菌属毎にまとめ報告する。

KEMRI の他、米国 UCSF から来て現地に滞在している研究者と共同し、ビクトリア湖周辺のエイズ患者が発症するクリプトコッカス症、カンジダ症について、更に患者と起原因菌の検体数を増やして、環境由来株も含め解析を続ける。多遺伝子解析による分子系統的な分類および薬剤感受性などの生理性状において、環境株と臨床株の相関を検証するとともに、地域性、民族性などの視点を加え、疫学的な解析を行い、エイズ患者への真菌の感染実態を明らかにする。

ケニアにおけるカビ毒による主要食糧の汚染の測定結果は、これまでも学会・論文発表以外に一般の新聞、インターネット上、講演会で取り上げられ、現地の人々にカビ毒汚染に対する警鐘を鳴らし、QOLの向上に貢献してきた。今後も、これまでの研究成果や多国間で築き上げた信頼関係を基に継続的に汚染カビの収集、マイコトキシン量の測定を続け対策を探ることにより、アフリカはもちろん温暖化する日本を含む地球の規模で、食物のカビ毒汚染、また一方で、ヒト真菌感染症対策に貢献できると期待できる。

③予想される成果

ケニアにおけるカビ毒による主要食糧の汚染の測定結果は、これまでも学会・論文発表以外に一般の新聞、インターネット上、講演会で取り上げられ、現地の人々にカビ毒汚染に対する警鐘を鳴らし、QOLの向上に貢献してきた。今後も、これまでの研究成果や多国間で築き上げた信頼関係を基に継続的に汚染カビの収集、マイコトキシン量の測定を続け対策を探ることにより、アフリカはもちろん温暖化する日本を含む地球の規模で、食物のカビ毒汚染、また一方で、ヒト真菌感染症対策に貢献できると期待できる。

5. 実施状況報告：

①平成28年度実施計画に対する実施状況

- i. ケニアの現地共同研究者(KEMRI, Dr. Bii のグループ)が、エイズ患者およびその生活環境から採集したクリプトコッカス属真菌の MLST (MultiLocus Sequence Typing) 法による遺伝子解析を進めた。
- ii. 同じくケニアの現地共同研究者(KEMRI, Dr. Bii のグループ)は、ケニア各地の圃場を廻り、黒色アスペルギルス属菌(*Black Aspergillus*)を 50 株あまり採取し、日本に輸送した。我々は、これらの菌の特定遺伝子(Calmodulin, RPB1, β -tubulin 等)の配列を解析し、分子系統解析を行ない、また形態学的観察、カビ毒の生産性について試験を行なった。
- iii. また、KEMRI の研究者が露天商や小規模マーケットで購入した穀物から単離した *Fusarium* 属真菌約 100 株を植物防疫所の許可のもとに日本に輸入した。これら菌株の ITS 領域、 β -tubulin, calmodulin, RPB1, RPB2 等の遺伝子配列を解析し、分子系統解析を行った。また、ヒトに有害なカビ毒、フモニシンとデオキシニバレノールの産生を、LC/MS 等で測定した。
- iv. アスペルギルス属真菌、特にアスペルギルス・フミガータスは、ヒトに感染し重篤化することも多く、また治療薬アゾールに対する耐性菌の出現が大きな問題となっている。アゾール耐性の出現機構を解明する目的で、A.フミガータス、アスペルギルス・ニードランスおよび麴菌（アスペルギルス・オリゼ）に共通する転写因子を新たに探索した。
- v. また A.フミガータス、アスペルギルス・ニードランスおよび麴菌（アスペルギルス・オリゼ）間で比較トランスクリプトーム解析を行ない、アスペルギルス・フミガータスの孢子形成および出芽時において働く遺伝子、特に転写因子について解析を行なった。この過程で明らかになってきた、これまでに機能が解明されていない転写因子 AtfR については、その機能を遺伝子欠損株の作製、さらにそれらの株の機能解析、形態学的解析を行なって解明した。

- vi. 銅イオンは、真菌にとって生存に必須であると同時に過剰でも毒性を発揮するため、適切な細胞内濃度の調節が必要である。しかし糸状菌における細胞内銅イオン濃度の制御機構は、ほとんど解明されていない。今回我々は、パン酵母のホモログ遺伝子として、アスペルギルス・フミガータスの銅イオン濃度を調節する転写制御因子を探索した。その結果、*Afmac1* を見いだした。*Afmac1* 欠損株等を用いて、形態学的特徴、下流で制御される遺伝子等について解析を行なった。

② 成果（結果＋考察）

- i. ケニアの現地共同研究者(KEMRI, Dr. Bii のグループ)が、エイズ患者およびその生活環境から採集したクリプトコッカス属真菌の MLST (MultiLocus Sequence Typing) 法による遺伝子解析を進めた。その結果、大部分の患者由来の菌が、患者の居住地区が大きく離れているにも拘わらず、同じ MLST 型を示すことが確認された。このことにより特定の MLST を示す菌群が、特に高いヒト病原性を示すことが示唆されたが、今後、これらの菌のゲノム解析、他の MLST を示す菌群との遺伝子配列比較、病原性比較などの研究を進め、病原性と MLST 型の関連を明らかにして行きたい。
- ii. 同じくケニアの現地共同研究者(KEMRI, Dr. Bii のグループ)は、ケニア各地の圃場を廻り、黒色アスペルギルス属菌(*Black Aspergillus*)を 50 株あまり採取し、日本に郵送した。これらの菌の特定遺伝子(Calmodulin, RPB1, β -tubulin 等)の配列を解析し、分子系統解析を行なったところ、少なくとも 5 種の新種が見つかった。有害な量や種のカビ毒産生は見られなかった。さらにこれらの株の形態学的解析等を進め、現在 2 報の論文として投稿準備中である。
- iii. また、KEMRI の研究者が露天商や小規模マーケットで購入した穀物から単離した *Fusarium* 属真菌約 100 株を植物防疫所の許可のもとに日本に輸入した。これら菌株の ITS 領域, β -tubulin, calmodulin, RPB1, RPB2 等の遺伝子配列を解析し、分子系統解析を行った。また、ヒトに有害なカビ毒、フモニシンは、73 株中 3 株で測定可能な産生が見られ、一方、デオキシニバレノールの産生は観察されなかった。
- iv. アスペルギルス属真菌、特にアスペルギルス・フミガータスは、ヒトに感染し重篤化することも多く、また治療薬アゾールに対する耐性菌の出現が大きな問題となっている。アゾール耐性の出現機構を解明する目的で、A.フミガータス、アスペルギルス・ニードランスおよび麴菌（アスペルギルス・オリゼ）に共通する転写因子を新たに探索した。その結果新たな Zn₂-Cys₆ 型転写因子 AtrR が見つかった。AtrR は遺伝子欠損株の作製実験等から、cyp51A 等エルゴステロール合成遺伝子の転写を制御するほか、ABC トランスポーターcdr1B の発現も同時に制御していることが解明され、新たな抗菌剤のターゲットとして注目される。
- v. アスペルギルス・フミガータス、アスペルギルス・ニードランスおよび麴菌（アスペルギルス・オリゼ）間で比較トランスクリプトーム解析を行ない、アスペルギルス・フミガータスの孢子形成および出芽時において働く遺伝子、特に転写因子について解析を行なった。アスペルギルス・フミガータスにおいては、転写因子 AtfR が、孢子の休眠状態の制御において中心的な役割を果たし、他の遺伝子の発現時期

- を制御していることを明らかにした。
- vi. 銅イオンは、真菌にとって生存に必須であると同時に過剰でも毒性を発揮するため、適切な細胞内濃度の調節が必要である。しかし糸状菌における細胞内銅イオン濃度の制御は、ほとんど理解されていない。今回我々は、パン酵母のホモログ遺伝子として、アスペルギルス・フミガータスの銅イオン濃度を調節する転写制御因子を探索した。その結果、*Afmac1* を見いだした。*Afmac1* 欠損株は、成長に遅延が見られるだけでなく、胞子形成にも異常が見られ、さらに銅イオン・トランスポーター遺伝子の発現抑制が見られた。以上の結果から、*Afmac1* を介した銅イオンの制御が、菌の成長と胞子形成に重要な役割を果たすと結論づけた。

③ 成果の公表

- i. Gladys Langat, Matsusawa Tetsuhiro, Tohru Gonoï, Vivienne Matiru, Christine Bii (2016) Aflatoxin M1 Contamination of Milk and Its Products in Bomet County, Kenya. **Advances Microbiol** 6:528-536.
<http://www.scirp.org/journal/aim> doi [10.4236/aim.2016.67053](https://doi.org/10.4236/aim.2016.67053)
- ii. Hagiwara D, Takahashi H, Fujimoto M, Sugahara M, Misawa Y, Gonoï T, Itoyama S, Akira Watanabe A, Kamei K (2016). Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring Cyp51A TR46/Y121F/T289A isolated in Japan. **J Infect Chemother** 22: 577-579. [10.1016/j.jiac.2016.01.015](https://doi.org/10.1016/j.jiac.2016.01.015)
- iii. Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gonoï T (2016). Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. **BMC Genomics** 17:358.
doi:[10.1186/s12864-016-2689-z](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2689-z).
- iv. Matsumoto T, Negishi T, Hamada M, Komaki H, Gonoï T, Yaguchi T. (2016) *Nocardia shinanonensis* sp. nov., isolated from a patient with endophthalmitis. **Int J Syst Evol Microbiol**
- v. Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gonoï T, Takahashi H. (2017) Transcription factor *Afmac1* controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. **Current Genetics** DOI: [10.1007/s00294-017-0681-z](https://doi.org/10.1007/s00294-017-0681-z)
- vi. Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gonoï T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moye-Rowley WS, Kawamoto S, Gomi K. (2017) A novel Zn²-Cys₆ transcription factor *AtrR* plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* expressions. **PLOS Pathogens**.
doi.org/10.1371/journal.ppat.1006096

6. 自己評価

本年度は、テロ・局地的な戦争の懸念などがあり、ケニア現地を訪れることはなかった。

しかし、ケニア現地の研究者(KEMRI, Dr. Bii のグループ)との間にこれまでに築いてきた信頼関係に基づいて、彼らがケニア国内で圃場あるいはエイズ患者あるいはマーケットで販売されている穀類から単離した各種の菌を、両国関係機関の許可のもとに日本に輸入することができ、これらの菌の解析が進んだ。また、本センター内における研究では、ヒト病原糸状菌アスペルギルス・フミガータスのヒト病原性関連遺伝子の転写因子に関する研究が進み、2 報の論文にすることができた。これらを総合し、自己評価では、期待通りの成果が上がったとした。

7. 実施度 (何れかに○)

- I (実施計画を実施していない。)
- II (実施計画どおり進展していない。)
- III (実施計画どおり進展している。)
- Ⓓ (実施計画以上の成果が得られている。)

評価を下した理由 (6 の自己評価で述べておれば省略して良い)

8. 平成28年度執行状況調

経費区分	学内負担額	運営交付金	執行額	備考
	千円	千円	千円	
(人件費)	0	0	6,230	
(運営費)	0	0	770	
(設備費)	0	0	0	
計	0	0	7,000	

平成28年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ハノイコホートをを用いた HIV-1 subtype A/E ウイルス感染症の疫学
およびワクチン開発と治療のための基盤研究

課題番号：28-拠点-2

2. 代表者：滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター・教授）

共同研究者：前田 洋助（熊本大学生命科学研究部・准教授）

阪井 恵子（熊本大学エイズ学研究センター・助教）

村越 勇人（熊本大学エイズ学研究センター・特任助教）

3. 決定額：8,000千円

4. 申請時書類より

①研究目的

アジアで流行している HIV-1 CRF01_AE (subtype A/E) は、日本で流行している subtype B の HIV-1 とは構造や機能が異なっており、これらの HIV-1 に対するワクチンや治療薬の開発は subtype B に対するものとは異なってくると考えられる。そこでまだ十分解明されていない subtype A/E の構造・機能解析やこのウイルスに対する細胞傷害性 T 細胞の反応、HLA の病態進行の及ぼす影響等を、すでに樹立してあるベトナムのハノイコホートでリクルートした患者を用いて、疫学的、ウイルス学的、免疫学的方法を用いて解析する。これらの基盤的研究成果を基に、subtype A/E に対するエイズワクチンや治療開発の研究に発展できるような研究を進展させる。

②研究内容

平成28年度

ハノイ無治療コホートの維持：National Hospital of Tropical Diseases (NHTD) で樹立した無治療コホートでの HIV-1 感染者のリクルートを継続し、平成28年度で新たに約100名の感染者をリクルートする。

ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与える HLA の解析：平成28年度末までにサンプリングできた約600名の患者のうち、解析条件を満たした患者の HLA を解析し、エイズ進行に影響を与える HLA を明らかにする。

ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：Subtype A/E ウイルスに対する CTL 反応を明らかにする。既に作成してある Gag, Pol, Nef の領域の 17-mer overlapping peptides を用いて、平成28年度にリクルートした約100名の患者の PBMC 内の CTL の反応を、ELISPOT アッセイにより解析する。今までに解析してある 277 名分の ELISPOT

アッセイ解析データと合わせて、患者体内のHIV-1の増殖抑制に関与しているCTLが認識する17-merペプチドを明らかにする。

ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析：長崎大学ハノイ拠点と連携し、臨床株の分離数を増やす。またベトナムにおけるCRF01_AE HIV-1 エンベロープ糖タンパク質 gp120 の構造的特徴、特にコレセプター利用性の、他のサブタイプならびに他地域との違いについて解析し、この地域においてコレセプター阻害剤の使用が可能かどうかを明らかにする。すでに19名のHIV-1感染者の血漿からウイルスRNAを抽出してcDNAを合成し、コレセプター利用性に関与するgp120のV3領域を中心に遺伝子解析を行い、そのアミノ酸配列を決定しているが、さらにこの解析数を30-50名増やす。これらのV3を有するHIV-1を作製し、そのコレセプター利用性を決定する。

平成29年度以降

ハノイ無治療コホートの維持：NHTDでの無治療コホートを維持し、29年度以降もHIV-1感染者のリクルートを継続する。

ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与えるHLAの解析：平成28年年度までにリクルートした解析条件を満たした患者のHLAを解析の精度を上げるために平成29年度以降もリクルートした患者のHLAを解析し、エイズ進行に影響を与えるHLAを明らかにする。

ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性T細胞(CTL)の解析：28年度までに明らかにしたHIV-1の増殖抑制に関与しているCTLが認識する17-merペプチドから、さらにCTLが認識する短いペプチドを絞りこみエピトープペプチドを同定する。同定したペプチドを用いて、これらのエピトープが認識するCTLがHIV-1の増殖抑制をしているかを、コホートの感染者由来のPBMCを用いて解析し、確認する。

ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析：長崎大学ハノイ拠点と連携し、臨床株の分離数を増やす。さらに解析数を増やし、感染者のCD4数やViral Load (VL)とウイルスのコレセプター利用性との関連について解析を行い、コレセプター利用性の違いが病態に及ぼす要因となっているかどうか明らかにする。またどのようなV3のアミノ酸がコレセプター利用性と関係しているか、既存のコレセプター利用予測アルゴリズムと比較し、この地域のCRF01_AE HIV-1のコレセプター利用予測が可能かどうかを明らかにし、コレセプター阻害剤の治療への適応を探る。

③予想される成果

以下の研究成果で詳細に述べてあるように、我々はハノイのNHTDで無治療HIV-1患者のコホートの樹立をし、HIV-1の構造解析とHLA解析を行ってきた。その結果、ハノイ

コホートで集積してきている薬剤耐性変異を明らかにし (J. Virol. 89:7363-7372, 2015)、また HIV-1 subtype A/E に感染しているベトナム人集団においては Pol 領域に選択される HLA-AP の蓄積が感染者の病態に悪い影響を与えていることを明らかにした (AIDS 2016 In press)。また現在ベトナムで流行している HIV-1 subtype A/E の機能解析と 1 つとしてコレセプター利用性の解析、そのウイルスに対する免疫能の解析として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の反応性を解析している。

平成 28 年度以降もこれらの研究を継続することにより、1) まだ全体像が明らかになっていない HIV-1 subtype A/E に対する CTL の反応が解明され、報告されている subtype B, C に対する CTL との反応の違いが明らかにできる。2) ハノイコホートで病態の進行に影響を与える HLA や抗 HIV 薬にたいする効果が予想できるウイルス構造を明らかにできる。以上の結果から、ワクチン開発に有用な HIV-1 subtype A/E の抗原部位が絞り込み、また今後のエイズ治療薬の選択に貢献する。

5. 実施状況報告：

①平成 28 年度実施計画に対する実施状況

1. **ハノイ無治療コホートの維持：**平成 28 年度にさらに約 100 名の無治療 HIV-1 感染者のリクルートを行い、これらの感染者からのサンプルを収集した。
2. **ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与える HLA の解析：**新たにリクルートした約 100 名の感染者の HIV 遺伝子解析から、subtype A/E ウイルス感染者を選別した。またこれらの患者の HLA タイピングを行なった。平成 27 年度までの解析数と合わせて、HLA との相関の解析数を約 500 名とした。
3. **ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：**平成 27 年度に引き続き、HIV-1 特異的 CTL の解析を行い、subtype A/E ウイルスの増殖を抑制する CTL を人の HIV-1 subtype A/E 感染者で検索した。平成 27 年度までの解析数と合わせて、解析者数は 358 名となった。
4. **ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析：**分離した CRF01_AE 株を用いて、その補助受容体利用性並びに補助受容体阻害剤への感受性について検討した。

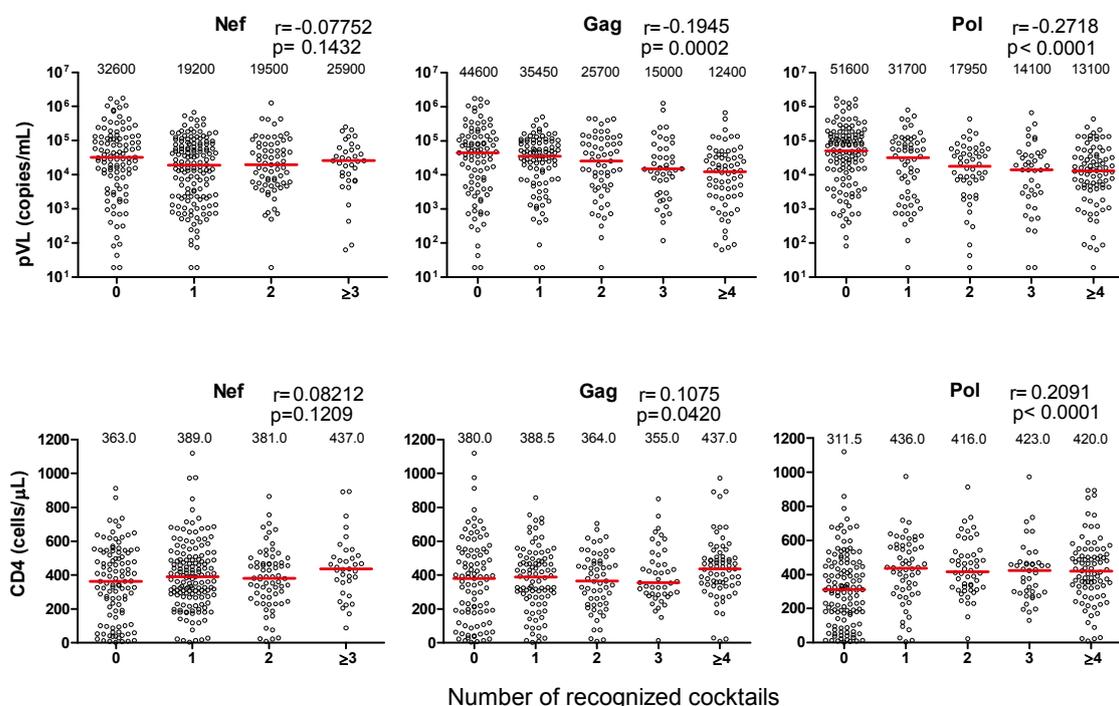
②成果 (結果 + 考察)

1. **ハノイ無治療コホートの維持：**平成 28 年度にさらに約 100 名の無治療 HIV-1 感染者のリクルートを行い、これらの感染者からのサンプルを収集した。その結果、無治療コホートの規模が、約 600 名に達した。
2. **ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与える HLA の解析：**新たにリクルートした約 100 名の感染者の HIV 遺伝子解析から、subtype A/E ウイルス感染者を選別した。またこれらの患者の HLA タイピングを行なった。平成 27 年度までの解析数と合わせて、Subtype A/E 感染者と確認ができ HLA との相関の解析が可能な数は、505 名となった。その内訳は、男性 61%、女性 39%、年齢分布は、18 歳—20 歳 2%、20 歳—29 歳 32%、30 歳—39 歳 45%、40 歳—49 歳 13%、50 歳—59 歳 6%、60 歳以上が 2%であった。

HLA class I との相関解析では、ウイルス量と正の相関がみられたものが 4 アリール、負の相関がみられたものが 1 アリール、CD4 T 細胞数との負の相関がみられたものが 3 アリール、正の相関がみられたものが 3 アリール見られた。さらに解析する感染者数を増やし、解析の信頼度を高める予定である。

3. ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：平成 27 年度に引き続き、HIV-1 特異的 CTL の解析を 358 名の感染者に対して、Gag, Pol, Nef overlapping peptides を用いて ELISPOT assay で行なった。その結果、以下の図 1 に示すように Pol、Gag に対する反応は、ウイルス量に負の相関、CD4 T 細胞数には正の相関がみられた。これらの事から、Pol、Gag に対する CTL は、HIV-1 subtype A/E の増殖抑制に関与していることが、強く示唆された。

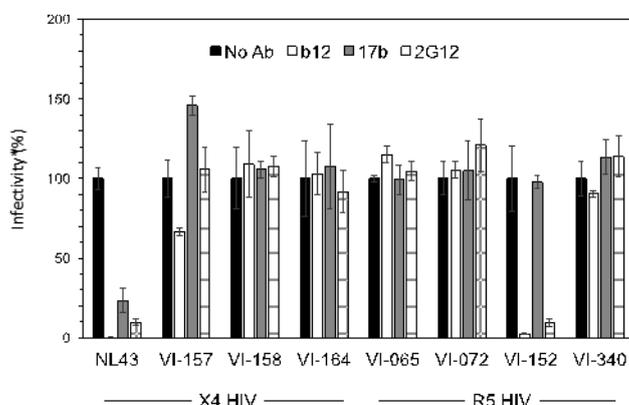
図 1 Gag, Pol, Nef overlapping peptides に対する CTL 反応



4. ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析：平成 28 年度は平成 27 年度までに北ベトナムの HIV-1 感染者血漿から分離した CRF01_AE のうち CXCR4 のみを使用する X4 ウイルスを分離した感染個体において、X4 ウイルス以外に CCR5 を使用するウイルスが存在しているのかどうかを確認するため、これらの感染者の血漿中の vRNA を抽出し、primer ID 法を用いて HIV-1 gp120 の V3 領域の PCR を行い、現在、次世代シーケンサーによる解析を行っている。また分離した CRF01_AE HIV-1 の中和抗体感受性を調べた。使用した中和抗体としては、gp120 の CD4 結合部位を認識する b12、gp120 が CD4 と結合した後に誘導される構造を認識する 17b、gp120 の糖鎖を認識して中和する 2G12 を使用した。これらはすべてサブタイプ B の X4 ウイルスである NL43 株の感染を中和できる抗体である。

次世代シーケンサー用のサンプルとしては現在 1 血漿のみ PCR が成功し、長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点にて現在解析を行っている。また分離したウイルスの中和抗体感受性に関しては、サブタイプ B の X4 ウイルスである NL43 は 3 種類の中和抗体に対して感受性を示したが、分離した X4 ウイルスは中和抗体に対してほぼ抵抗性であった (図 2)。サブタイプ B の HIV-1 では、X4 ウイルスは R5 ウイルスに比較して中和抗体に対して感受性を有し、そのことが感染初期に X4 ウイルスが消失する理由と考えられている。一般に CRF01_AE は中和抗体抵抗性であるが、この地域に流布している CRF01_AE の X4 ウイルスも同様に中和抗体抵抗性であるため、感染初期から後期にかけて X4 ウイルスが感染個体内で維持されている可能性が示された。

図 2 分離した CRF01_AE HIV-1 の中和抗体感受性



③成果の公表

論文発表

1. Tran GV, Chikata T, Carson J M., Murakoshi H, Nguyen D H, Tamura Y, Akahoshi T, Kuse N, Sakai K, Sakai S, Cobarrubias K, Oka S, Brumme Z L, Nguyen KV, and Takiguchi M; A strong association of HLA-associated Pol and Gag mutations with clinical parameters in HIV-1 subtype A/E infection, *AIDS* 30:681-689, 2016

学会等発表

1. Chikata T, Tran GV, Murakoshi H, Tamura Y, Akahoshi T, Kuse N, Sakai K, Nguyen KV, and Takiguchi M, Contribution of HLA class I alleles to clinical outcome in HIV-1 subtype A/E infected Vietnamese individuals, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌), 2016 年 10 月 23-25 日
2. 近田 貴敬, Giang Van Tran, 村越 勇人, 田村 美子, 赤星 智寛, 久世 望, 阪井 恵子, 小柳 円, Kinh Van Nguyen, 滝口 雅文, ベトナム人 HIV-1 サブタイプ A/E 感染者コホートにおけるエイズ病態進行に関与する HLA アレルの探索, 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会 (鹿児島), 2016 年 11 月 24-26 日

6. 自己評価

この無治療コホートは、28年度も予定の100名のリクルートができ、患者のリクルートから5年がたち、リクルート数が約600名になった。これにより、様々な解析が正確にできる数になりつつある。HLAとの相関解析数も500名を超えて、信頼できる解析が可能になりつつある。またCTLの解析も、350名を超えてきており、こちらも信頼できる解析結果が得られてきている。以上の事から平成29年度には、HLAとの相関解析結果をまとめ、その成果を論文に投稿・発表できると思える。

さらに長崎大学ハノイ拠点と密に行っているコレセプター利用性の解析の成果もまわりつつあり、29年度中での成果の発表が期待できる。

以上の事から28年度の研究計画はほぼ達成できたと思える。

コホートの樹立には多くの年月が必要であるが、ハノイでのコホートを用いた本研究も成果がようやく明確に示せる時期にきたと思われる。

7. 実施度（何れかに○）

- I (実施計画を実施していない。)
- II (実施計画どおり進展していない。)
- Ⓒ (実施計画どおり進展している。)
- IV (実施計画以上の成果が得られている。)

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

8. 平成28年度執行状況調

経費区分	学内負担額	運営交付金	執行額	備考
	千円	千円	千円	
(人件費)	0	0	0	
(運営費)	2,000	8,000	10,000	
(設備費)	0	0	0	
計	2,000	8,000	10,000	

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（平成28年度）

所 属	職 名	氏 名
【学外委員】		
帯広畜産大学原虫病研究センター	教 授	河 津 信一郎
新潟大学大学院医歯学総合研究科	教 授	松 本 壮 吉
大分大学医学部	教 授	◎西 園 晃
京都大学ウイルス・再生医科学研究所	准 教 授	宮 沢 孝 幸
国立感染症研究所・免疫部	部 長	阿 戸 学
東京大学大学院医学系研究科	教 授	佐々木 敏
国立成育医療研究センター・政策科学研究部	部 長	森 臨太郎
国立感染症研究所	客員研究員	津 田 良 夫
【学内委員】		
大学院医歯薬学総合研究科	教 授	由 井 克 之
【所内委員】		
熱帯医学研究所（環境医学部門）	教 授	山 本 太 郎
熱帯医学研究所（臨床研究部門）	教 授	有 吉 紅 也
熱帯医学研究所（ケニア拠点）	教 授	一 瀬 休 生
【オブザーバー】		
熱帯医学研究所	所 長	森 田 公 一
熱帯医学研究所	副 所 長	金 子 修

◎印は議長

長崎大学熱帯医学研究所

平成29年8月発行

〒852-8523 長崎市坂本1丁目12-4

電話番号 (095)819-7803

F A X (095)819-7805

ホームページ <http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp>