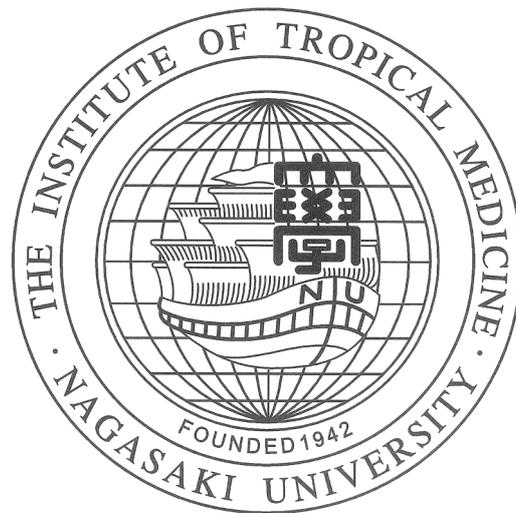


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

平成 30 年度
(2 0 1 8)



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 森田 公一

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などの新興感染症が保健衛生のみならず社会・経済分野においても国内外で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、マラリアに対して実施してきました。その結果、特定の分野では目に見える成果が得られ、幾つかの熱帯病・新興感染症の明瞭な減少もみられるようになりました。しかし、最近多くの熱帯病・新興感染症の発生状況や社会背景は、より多様化し複雑化してきています。異常気候、熱帯雨林の環境破壊、難民の増加などの諸問題がさらに感染症の発生状況の混迷度を高めており、これまで順調に進んで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も、長崎大学熱帯医学研究所は本来の責務である熱帯地域における調査研究に軸足をおき、当該地域における保健衛生問題の解決に資する科学的根拠を提供するための研究開発に加え、人材育成、情報の発信を国内外の研究者と共同で実施していかなければなりません。これらを実現するため、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. 全国を通しての共同研究

本研究所の大きな研究教育リソースであるアジア・アフリカ研究拠点等を活用し、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、研究所内外の専門家により構成される運営委員会により採択された活動を支援します。なおこのプロジェクトには現地の研究者も参加できます。

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、情報発信の中核を担います。

熱帯医学研究拠点である本研究所の特色は、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、日本の学術コミュニティをさらに活性化し、開発途上国ひいては世界の熱帯病・新興感染症制御に資する新たな知と技の創造につながることを祈念しております。

本研究所が全国共同利用・共同研究拠点の目標を達成できますよう、さらなる関係各位のご支援、ご協力をお願い申し上げます。

目 次

第1部 一般共同研究

1. 新規内因性 Toll リガンドによるマラリア媒介蚊の自然免疫活性化 代表者：倉石 貴透（金沢大学 医薬保健研究域薬学系 准教授）	1
2. チベット高原住民の耐糖能と高地適応遺伝子の関連について 代表者：西村 貴孝（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 公衆衛生学分野 助教）	6
3. 抗ラッサウイルス作用を有するリード阻害剤の創出 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）	11
4. ワンヘルス・アプローチに基づくベトナムにおける薬剤耐性菌の解析 代表者：鈴木 仁人（国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 主任研究官）	16
5. ベトナム自然環境に由来する薬剤耐性コレラ菌のゲノム特性 代表者：丸山 史人（京都大学大学院 医学研究科 准教授）	24
6. 長崎の野外捕集蚊の鳥マラリア感染状況の解明と学生実習への利用 代表者：金 京純（鳥取大学 農学部共同獣医学科 准教授）	29
7. 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）	34
8. 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 医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 准教授）	40
9. ネパール高地住民のテロメア長に影響をもたらす因子の検索 代表者：長谷川 寛雄（長崎大学病院 准教授）	44
10. <i>Entamoeba nuttalli</i> における表面レクチンサブユニット (Igl) の解析 代表者：橘 裕司（東海大学 医学部 教授）	50
11. ケニアにおけるロタウイルスゲノム多様性の解析 代表者：河本 聡志（藤田保健衛生大学 医学部ウイルス・寄生虫学講座 講師）	56
12. フィリピン諸島におけるベクターコントロール戦略の提案 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）	61
13. ルワンダ共和国における早産児の有病割合、リスク要因と予後の検討 代表者：頼藤 貴志（岡山大学大学院 環境生命科学研究科 生命環境学専攻 人間生態学講座 准教授）	68
14. SFTSV を標的とした in vivo イメージングによる SFTS 病態ダイナミクス解析および 有効な治療法への展開 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 衛生化学分野 准教授）	73
15. ヒトスジシマカと近縁種の生殖干渉 代表者：都野 展子（金沢大学 自然科学研究科 准教授）	83

第 1 部

一 般 共 同 研 究

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：新規内因性 Toll リガンドによるマラリア媒介蚊の自然免疫活性化
課 題 番 号：30-Ippan-1
2. 代 表 者：(金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授) 倉石 貴透
共同研究者：(長崎大学熱帯医学研究所病理学分野・准教授) カルトン リチャード・レイト
3. 決 定 額：430 千円
4. 申請時書類より

①研究目的

自然免疫はすべての多細胞生物が有する病原微生物に対する排除応答システムである。バクテリアやウイルスがもつ分子パターンを認識して自然免疫系が発動するメカニズムは解析が進んでいるものの、マラリア原虫のような真核生物の病原体に対する免疫誘導メカニズムはまだあまりよくわかっていない。申請者らは、原虫に対する自然免疫活性化のトリガーは原虫由来成分の認識だけでなく、原虫によって引き起こされる組織障害が重要であると考えている。実際、組織・細胞が障害を受けると、細胞内から内因性リガンドと呼ばれる分子が漏出し、自然免疫を活性化することが哺乳類を用いた解析により明らかにされつつある。しかし、マラリア媒介蚊を含む昆虫における内因性リガンドの実体はほとんどわかっていない。

申請者はこれまでに、昆虫のモデル生物であるショウジョウバエを用いて、自然免疫受容体である Toll 受容体を活性化する新規内因性リガンド活性を幼虫の体液中に見出している (BBRC, 467, 400)。また、新規シグナル伝達経路を介した組織損傷依存的な自然免疫活性化実験系を確立している (DMM, 10, 271)。そこで本研究では、マラリア媒介蚊の幼虫においても Toll 受容体を活性化する新規リガンド活性が存在するか検討する。また、ショウジョウバエでの組織損傷依存的な自然免疫活性化実験系がマラリア媒介蚊においても再現可能か検討する。それぞれの方法でマラリア媒介蚊において自然免疫の活性化が見られた場合、新規内因性リガンドを注入したマラリア媒介蚊、あるいは軽微な組織損傷を与えたマラリア媒介蚊において、マラリア原虫の感染効率や体内での増殖に影響があるか明らかにする。

②研究内容

マラリア媒介蚊 (*Anopheles stephensi*) の幼虫を用い、ショウジョウバエ幼虫と同様の手法で組織抽出液を作製する。作製した抽出液を蚊の培養細胞に添加して抗菌ペプチド遺伝子発現を測定することにより活性検定を行う。並行して、抽出液をマラリア媒介蚊にマイクロインジェクション法により注入し、抗菌ペプチドの発現誘導を測定する。抗菌ペプチドの発現誘導が見られた場合、抽出液を注入したマラリア媒介蚊に

ネズミマラリア原虫を感染させ、感染後の体内原虫量を経時的に測定する。

マラリア媒介蚊の幼虫あるいは成虫を用い、ショウジョウバエへの組織損傷方法と同様の手法でピンセットによる機械的刺激を与え、抗菌ペプチドの発現誘導を測定する。抗菌ペプチドの発現誘導が見られた場合、軽微組織損傷を与えたマラリア媒介蚊にネズミマラリア原虫を感染させ、感染後の体内原虫量を経時的に測定する。

③予想される成果

マラリア媒介蚊の自然免疫系を活性化する組織損傷依存的な内因性リガンドはこれまでまったく知られていないため、本研究によりその存在が初めて確認される可能性がある。また、組織損傷依存的な新規自然免疫経路がマラリア媒介蚊で初めて示される可能性がある。これらの新規自然免疫活性化法により、マラリア原虫の増殖を蚊の体内で抑制することができると示されれば、新たなマラリア伝播阻止方法の開発に貢献できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

これまでの研究により、微生物感染を起こしていないショウジョウバエ幼虫組織由来の抽出液に、自然免疫経路である Toll 経路を活性化する作用があることを示していた。加えて、既知の Toll 経路リガンドである *spz* を欠損したショウジョウバエ由来の抽出液にも同様の活性は保持されることを見出していたことから、ショウジョウバエ幼虫の体内には Spz とは異なる Toll 受容体の新規リガンドが存在することが示唆されていた。当初、本研究では、マラリア媒介蚊の幼虫抽出液中においても Toll 受容体を活性化する新規リガンド活性が存在するか検討することとしていたが、ショウジョウバエを用いた研究が下記のように進展し、抽出液を作成する手法をとらないことが効率的であると考えられた。そこで本報告書には、ショウジョウバエを用いた研究の進捗と、マラリア媒介蚊を用いた研究の状況を記載する。

ショウジョウバエ幼虫の体内には Spz とは異なる Toll 受容体の新規リガンドが存在することが示唆されていたため、本研究ではこのリガンドを同定することを目的として研究を進めた。

Spz にはファミリータンパク質として Spz2 から Spz6 があり、いずれも Cystine knot (CK) domain と呼ばれる、Spz の活性部位と相同的なアミノ酸配列のドメインを保存している。しかしこれらが Toll 受容体に対しリガンドとして働くという報告はこれまでに無い。まず初めに、Spz2 から Spz6 までの 5 つのタンパク質を Toll 受容体の新規リガンドの候補とし、これらの Toll 経路を活性化する作用を調べた。候補タンパク質をショウジョウバエ S2 細胞で発現させ、その細胞抽出液を作製した。

この抽出液を、Toll 経路の活性化をモニターするために使われるショウジョウバエ DL1 細胞に添加した。Toll 経路の活性化は、抗菌ペプチド遺伝子 *Drosomycin* の発現を指標とした。DL1 細胞では、*Drosomycin* プロモーターの下流に *firefly-luciferase* 遺伝子が組み込まれているため、レポーターアッセイを行うことにより Toll 経路の活性化の程度を調べた。また、新規リガンド候補となった *spz5* を欠損するショウジョウバエを *Crispr/Cas9* 法により作成した。

②成果（結果＋考察）

Spz5 を発現させた細胞抽出液が、DL1 細胞における Toll 経路を強く活性化することが明らかになった。*Spz5* による Toll 経路の活性化が Toll 受容体を介するかを確かめるため、レポーターである DL1 細胞に Toll に対する dsRNA を添加することで RNAi ノックダウンを誘導した。その細胞に *Spz5* を発現した S2 細胞抽出液を添加すると、Toll 経路の活性化が抑制された。加えて、Toll 受容体の細胞内ドメインに結合しそのアダプターとして働くことが知られている *dMyd88* のノックダウンを誘導したときも同様に、*Spz5* による Toll 経路の活性化が抑制された。これらの結果から、*Spz5* は Toll 受容体及び *dMyd88* を経由して Toll 経路を活性化すること、及び *Spz5* が Toll-1 受容体の新規のリガンドであることが示唆された。

以上の解析から、ショウジョウバエ幼虫組織由来の抽出液中の Toll 受容体のリガンドとしての活性を持つタンパク質が Spz5 であることが予想された。これを検証するため、*spz5* 遺伝子の欠損体を作出した。得られた欠損体の系統のひとつである *spz5^{Δ44}* の *spz5* 遺伝子において、スタートコドン及び一番目と二番目のエキソンを欠失していることから、**null mutant** であると考えられた。野生型幼虫と *spz5^{Δ44}* の幼虫からそれぞれ幼虫組織抽出液を作製し、DL1 細胞を用いて Toll 経路の活性化を評価した。その結果、*spz5^{Δ44}* 由来の抽出液は、野生型と比べて、Toll 経路を活性化する作用が著しく低かった (図 1)。このことから、幼虫組織抽出液中に含まれる Toll 受容体の新規リガンドとしての活性を担うタンパク質は Spz5 であると考えられた。

そこで現在、マラリア媒介蚊の Spz5 ホモログ、およびその他の Spz ファミリー遺伝子をクローニングし、それらのリコンビナントタンパク質を作成する実験を進めている。それらのリコンビナントタンパク質に、マラリア媒介蚊の Toll 受容体を活性化する活性があるか今後検討する。そして、マラリア媒介蚊において Spz5 により自然免疫の活性化が見られた場合、新規内因性リガンドを注入したマラリア媒介蚊において、マラリア原虫の感染効率や体内での増殖に影響があるか明らかにしたいと考えている。

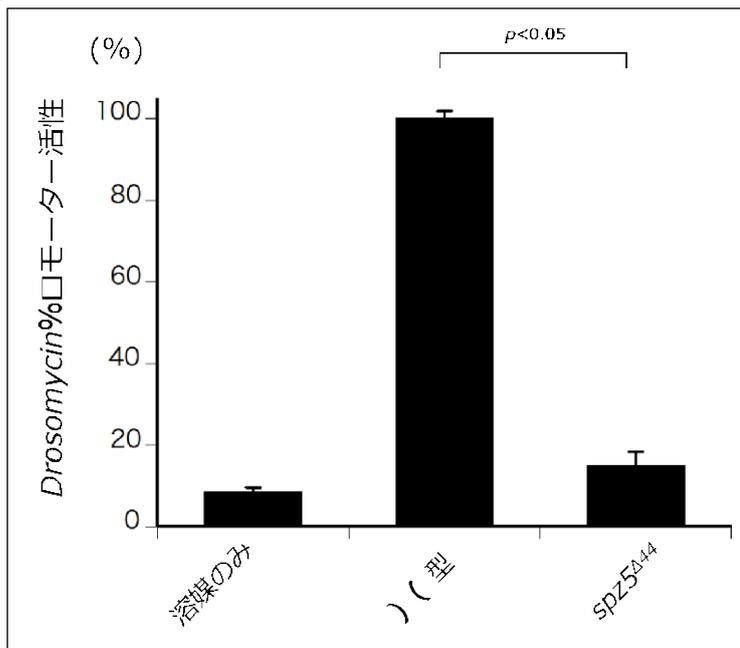


図 1: 変異体 *spz5^{Δ44}* の幼虫抽出液には自然免疫活性化作用がない

③成果の公表

該当無し

6. 自己評価

本研究において、当初は、マラリア媒介蚊の幼虫抽出液中においても Toll 受容体を活性化する新規リガンド活性が存在するか検討することとしていたが、ショウジョウバエを用いた研究が上記の様に進展した。そのため、マラリア媒介蚊の幼虫抽出液の活性を検証するには至らなかったものの、ショウジョウバエの研究から Spz5 を新規の自然免疫経路リガンドとして同定する事に成功したため、今後はマラリア媒介蚊の Spz5 に注目した研究を発展させることが可能になった。したがって、当初の目的は達成されなかったものの、今後の研究を大きく発展させるための強固な足がかりを確立することに成功したため、達成度を「不満は残るが一応の成果を挙げられた」と判断した。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：チベット高原住民の耐糖能と高地適応遺伝子の関連について
課 題 番 号：30-Ippan-2

2. 代 表 者：長崎大学医歯薬学総合研究科・助教 西村 貴孝

3. 決 定 額：380 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

近年の急速なグローバル化・都市化に伴い、世界各地で伝統的な生活様式が変化しつつあることが報告されており、そのような急速な変化がこれまで伝統様式に基づいて生活基盤を長年に渡り構築してきた人々の健康に影響をもたらすことが示唆されている。実際に、海拔 3,000 m 以上の高地に定常的な生活基盤を持つ人々中にも急速な変化が起こりつつあり、肥満や糖尿病などの生活習慣病の拡大が差し迫った脅威である。高地のような特殊な環境下で生活する人々は当地の環境に適応した生体機能を有することが知られており、代表的なものとして全身への酸素供給に関与するヘモグロビン濃度や血流量の増大などの機能亢進が挙げられるが、それらが生じる要因の1つとして遺伝子レベルでの変化(=変異)が関与していると推測される。これまでの研究で高地適応に関与することが強く示唆される複数の遺伝子において、高地住民ではその遺伝子群の特徴的変異を高い頻度で有することが知られる。しかしながら、このような変異が都市化に伴う生活様式の変化とどのように関連するかは議論の途上であり、高地住民が過去に獲得した遺伝的適応と都市化した環境にミスマッチが生じている可能性がある。

そこで本研究では、高地住民において、高地適応遺伝子群の変異と糖尿病を中心とした生活習慣病との関連を統計学的手法を用いて明らかにすることを目指す。本研究では対象とする高地として、チベット高原住民(特にネパール国・Mustang 地方に位置する Tsarang 村)とボリビア国・ラパス市の住民を対象とする。

②研究内容

本研究では、被験者より提供された DNA を鋳型として、高地適応に関与することが示唆される遺伝子群について、既知の SNP を TaqMan 法もしくはダイレクトシーケンス法を用いて配列決定を行い、ハプロタイプを決定する。その後、塩基配列決定を行った遺伝子についてデータベース上に登録されている遺伝情報と比較することで、各高地集団の特異的なタイプの有無を明らかにする。なお、本研究にて標的とする高地適応に関与する遺伝子としては *EPAS1*、*EGLN1* 遺伝子を最初に解析を行うことを

予定しているが、研究の進行状況に応じて他の候補遺伝子についても同様の解析を行う。また、解析を行うサンプル数としてはネパールとボリビアともに約 100 サンプル程度を予定している。

さらに、先にも述べたようにサンプル採取と同時に当地での健康調査も実施しているので、標的とする高地適応関連遺伝子群の変異と健康調査より得られた成果について、単変量解析や多変量解析などの統計学的手法を用いた解析にて関連を検証する。特に EPAS1、EGLN1 は血液粘性の抑制に関与することが知られており、耐糖機能などの血液動態に関与していることが期待される。このように、本研究では遺伝子解析を行う分子生物学的手法を用いた解析と統計学的手法を組みわせる多角的な検証を行うことで、新たな成果を見出すことを目指している。

③予想される成果

遺伝的変異についてはこれまでも数多くの研究が既に行われており、本研究で標的とする遺伝子群についても民族別の検証も行われている。本研究での調査地である **Tsarang** 村の住民の多くがチベット系民族であるが、この民族に関する遺伝的変異の研究は中国やインドに生活基盤を持つ人たちに関するものであり、**Mustang** 地方住民については全く存在しない。同一民族には多くの場合で共通の位置に塩基配列の変異が認められるが、ネパール系住民の生活様式と中国やインド系住民とは生活様式が異なることから、**Mustang** 地方住民特有の遺伝的特徴が明らかになる可能性があると期待している。

また、本研究で検証を行う高地住民の健康（特に生活習慣病について）と高地適応に関与することが示唆される遺伝子群との関連については全く検討が行われていない。先にも述べたように、現時点では高地環境に適応した生体機能が果たして変化しつつある生活様式に対しての影響の有無については不明である。そのため、本研究によって得られる高地住民の健康と遺伝的要因との関連についての成果は全くの新規となり、高地適応と生活様式の都市化との関係性を示すことが可能で、当該の研究領域に対して新たな知見を提供することができる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

本研究では、ネパール国北部の山岳地帯であるムスタン地方に位置する Tsarang 村の住民を対象に調査を実施し、18 歳以上の村民 188 名に協力を依頼した。調査を実施するにあたり、村民に対して口頭と書面にて本研究の意図や目的等の説明を行い、本研究の趣旨に賛同した村民から同意書を取得することで、本研究の被験者とした。また、本研究では、長崎大学熱帯医学研究所・研究倫理委員会(承認番号:150226137-3)、長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会(承認番号:G160127-01-15)ネパール国・ヒト研究倫理審査委員会(142/2016)に対して本内容に関する申請を行い、承認済みである。

本研究で用いた実験材料は、被験者より提供された血液より調整したゲノム DNA を用いた。本研究では提供されたゲノム DNA を鋳型とし、低酸素誘導遺伝子群である EPAS1 と EGLN1 遺伝子内の 1 塩基多型 (SNP) を標的とした TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR により、標的とした SNP の遺伝子型を決定した。その後、決定した遺伝子型と被験者の属性情報や BMI や血圧など検診情報との相関性を検証するために線形回帰分析やロジスティクス回帰分析を行った。なお、本研究で標的とする SNP は rs13419896 と rs12619696 (EPAS1) に加えて、rs2790859 (EGLN1) の計 3 つとし、比較対象として低酸素誘導遺伝子群に含まれない UCP1 の rs1800592 についても調査した。

②成果 (結果+考察)

本研究では、高地住民に特徴的な遺伝子型を有することが報告されている EPAS1 の SNP (rs13419896 と rs12619696) と EGLN1 の SNP (rs2790859) の 3 種類について解析を行った。また、対象として肥満との相関性が指摘されている UCP1 の SNP (rs1800592) についても解析を行った。その結果、被験者集団における rs12619696 の遺伝子型のみが他の民族集団に認められる遺伝子型のパターンと大きく異なることが認められた。次に、被験者の検診情報 (BMI、血圧、HbA1c、SpO₂) とリアルタイム PCR によって得られた各 SNP の遺伝子型との相関性をロジスティクス回帰分析 (単変量と多変量) にて解析した。その結果、rs12619696 と HbA1c について、特にヘテロタイプの遺伝子型を有するヒトの HbA1c の上昇に対して有意な相関性を認めた (Table 1)。さらに、高地という低酸素環境への適応化に重要な役割を担うヘモグロビン濃度と標的とした SNP との相関性についても検証した。解析により、rs2790859 の minor allele の遺伝子型を有するヒトが major allele の遺伝子型を有するヒトよりも有意にヘモグロビン濃度が上昇する傾向を示す結果を得た (Table 2)。

これらの結果より、高地適応に関与することが示唆される SNP、特に rs12619696 が高地住民の健康面にも関与する可能性が示唆された。つまり、この結果は SNP を含む遺伝的要因が高地住民の健康リスク因子としての可能性を示している。

rs12619696 はこれまでの報告にて、他の民族集団と比較して特徴的な遺伝子型を有することのみ報告されているであり、今回の成果であるヒトの健康指標とのrs12619696 が相関性を示すことは新たな発見である。また、これまでに高地住民のヘモグロビン濃度との相関性を示す多様な SNP が報告されているが、rs2790859 については新規の発見である。しかしながら、これらの SNP がどのような作用機序や役割で相関性を示すのかについては全く不明であり、今後の検討課題となっている。

Table 1. rs12619696 の遺伝子型と HbA1c (≥6.0%) との相関性の検証

Model	Genotype	Crude				Adjusted			
		OR	95% CI	P	AIC	OR	95% CI	P	AIC
Codominant	A/A	Ref		0.013	173.7	Ref		0.054	132.2
	A/G	2.88	1.20-6.91			3.19	1.08-9.42		
	G/G	0	0			0	0		
Dominant	A/A	Ref		0.021	176.8	Ref		0.031	131.4
	A/G - G/G	2.65	1.11-6.32			3.15	1.05-9.39		
Recessive	A/A - A/G	Ref		0.173	178.0	Ref		0.325	135.0
	G/G	0	0			0	0		
Overdominant	A/A - G/G	Ref		0.039	173.7	Ref		0.02	130.6
	A/G	3.31	1.39-7.86			3.37	1.15-9.82		
log-additive		1.67	0.82-3.38	0.013	180.0	2.32	0.89-6.00	0.078	132.9

糖尿病の指標として用いられる HbA1c を 2 群 (HbA1c <6.0% と ≥6.0%) に分類し、HbA1c <6.0% を基準としたロジスティクス回帰分析を 5 種の解析モデルにて行うことで、各 SNP の遺伝子型と HbA1c との相関性を解析した。なお、crude は未調整を意味し、adjusted は年齢と性別にて調整した解析結果を示している。Ref, 基準とした遺伝子型 ; OR, オッズ比 ; 95% CI, 95% 信頼区間 ; AIC, Akaike's information criteria を表している。

Table 2. 各 SNP の遺伝子型とヘモグロビン濃度との相関性の検証

Gene	SNP ID	Crude					Adjusted					
		B	SE	P	R ²	Adjusted R ²	B	SE	P	beta	R ²	Adjusted R ²
EPAS1	rs13419896	0.132	0.251	0.601	0.002	-0.005	0.122	0.236	0.607	0.041	0.168	0.150
	rs12619696	0.218	0.297	0.464	0.004	-0.003	0.096	0.275	0.728	0.728	0.167	0.149
EGLN1	rs2790859	0.687	0.234	0.004	0.058	0.052	0.540	0.223	0.017	0.267	0.201	0.183
UCP1	rs1800592	-0.278	0.236	0.240	0.010	0.003	-0.050	0.226	0.825	-0.069	0.167	0.149

ヘモグロビン濃度 (連続変数) を従属変数として、各 SNP の遺伝子型を独立変数とした線形回帰分析を行い、その相関性を検証した。B、標準偏回帰係数 ; SE、標準誤差。なお、crude は未調整を意味し、adjusted は年齢と性別にて調整した解析結果をそれぞれ示している。ここでは、各 SNP の major allele を基準とし、heterogeneous allele と minor allele に対する相関性を解析した。

③成果の公表
該当なし

6. 自己評価

高地住民の SNP に関して、これまでは高地環境適応に着目した研究が中心であった。しかし、本研究のように高地適応に関与する遺伝子群の SNP と住民の健康指標との関係性に着目した研究は認められず、本申請内容は独自性が高い研究であると考えている。本研究で得られた成果である高地環境適応に関連する低酸素誘導遺伝子の SNP と住民の健康指標との間に相関性が認められることは新規の発見であり、本研究での特出すべき成果である。本研究の調査対象となったチベット系ネパール高地住民に関する健康リスク要因に関する調査は主に質問票や簡単な生化学的調査であり、遺伝的要因に関する調査は現状では全く行われていないため、健康リスク要因としての遺伝的要因の重要性については不明である。したがって、継続して解析を進めることでより一層の大きな成果を生み出すことができるものと期待しており、特にチベット系ネパール高地住民の遺伝的要因や遺伝的背景の重要性を評価することが可能となり、今後の研究への動機づけとなっている。

他方で、SNP はヒトの全ゲノム上に多数存在していることから、本研究で得られた成果についてゲノム上に存在する他の多くの SNP を含めた網羅的な検証をすることで、その意義が理解できるものと考えている。そのためには、今後ゲノムワイドでの検証を行うことが必要であるとも考えている。つまり、ゲノムワイドでの網羅的な検証を通じて、ヒトの健康状態と相関性が認められる SNP を把握することが可能となる。そのため、今後はゲノムワイドでの SNP とヒトの健康指標との相関性について検証するために、全ゲノム解析を行うことを予定している。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

別紙（作成書式）

平成 30（2018）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：抗ラッサウイルス作用を有するリード阻害剤の創出

課題番号：30-Ippan-3

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：浦田秀造（長崎大学熱帯医学研究所・助教）、水田賢志（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）、大場雄介（北海道大学大学院医学研究院・教授）

3. 決定額：425 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 万人を超え、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、ウイルスの細胞外放出を阻害することが、効果的な感染予防や治療になることが実証された（例：抗インフルエンザ薬タミフル）。本研究においても LASV の細胞外放出を標的にした薬剤開発を目指す。LASV が形成する粒子構成因子である Z タンパク質は、RING ドメインを介した自己重合によって、LASV 粒子の形成を制御することから標的分子として有望である（Kentsis et al., *PNAS* 2002）。さらに、Z タンパク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 タンパク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 の Z タンパク質に 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、重合化を阻害する薬剤探索を目的としたハイスループットスクリーニング系 (HTS 系) を実施した (5. 研究経過に添付)。HTS 系から既にヒット化合物が数種得られており、その中にはウイルス産生を抑制する有用な化合物が見出されつつある。本研究では、1) 得られたヒット化合物の正確な薬剤作用機序の解明、2) ヒット化合物の周辺化合物合成とそれらを用いた高次スクリーニングの実施からリード化合物の創出を目的とする。目的完遂のために、熱研対応研究者との有機的連携を実施し、ウイルス感染実験等の高次スクリーニングから、Proof of concept (POC) 獲得を目指す。また、共同研究者（大場雄介・北大院医）は、バイオイメージング研究で世界をリードする研究者であり、ウイルス放出過程のライブイメージングを基盤にして阻害剤作用機序及びウイルス産生ダイナミクスの解明を強力に推進する。さらにフッ化有機合成のエキスパートである共同研究者（水田賢志・

長大院医)が参画することで、周辺化合物合成及び構造最適化を効率的に実施することが可能であり、最終目的とする、**ラッサウイルスの細胞放出を阻害するリード化合物創出**を目指す。

②研究内容

本研究では、抗LASV薬につながるリード化合物を導出するために、次にあげる2つの研究項目を実施する。

(1)イメージング技術を活用したヒット化合物の作用機序及びウイルス粒子放出機序の解明

ウイルス粒子が形成され放出する過程において、ウイルスが宿主細胞の適当な分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。しかしながら、依然として不明な点が多い。そこで、ヒット化合物の阻害標的を同定することで粒子形成機構の一端を明らかとする。具体的にはヒット化合物がZによる粒子形成そのものを阻害しているのか、またはRINGドメインを介した重合化阻害による他のウイルスタンパク質やウイルスRNAの粒子への取り込みを阻害しているのかを解析する。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目指し、ウイルス複製後期過程の分子基盤を明らかにする。

(2)ヒット化合物及び周辺化合物を用いた高次スクリーニングの実施

(1)で得られたヒット化合物について、周辺化合物を合成・入手し、スクリーニングを行い、阻害活性を高める化合物探索を行う。また、熱研対応職員が有するZ重合化定量生化学実験法及びウイルス産生抑制効果などの高次スクリーニングを実施し、確定ヒット化合物を得る。高次スクリーニングを通過した確定ヒット化合物については、生体内動態の向上を図るフック化合物などを実施することで最適化し、リード化合物の創出を目指す。

③予想される成果

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年に発生したエボラウイルスのアウトブレイクのように、LASV感染症もグローバルリスクとして認識すべき重要課題である。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タンパク質は、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。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

・ヒット化合物によるウイルス様粒子産生の抑制効果

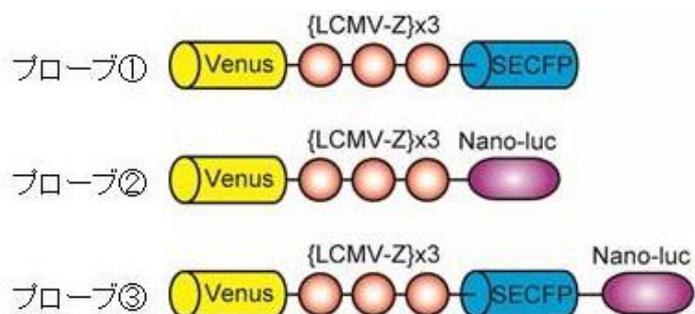
平成 29 年度に得られたヒット化合物によるウイルス様粒子 (virus-like particle; VLP) 産生に対する効果を検証した。FLAG タグ付加 LCMV-Z 発現プラスミドをトランスフェクションし、一過性に LCMV-Z を発現した 293T 細胞に対して、ヒット化合物、又は DMSO で 24 時間処理した。処理した細胞の培養上清又は細胞に含まれる VLP について、超遠心分離にて回収し、ウェスタンブロッティング (抗 FLAG 抗体による検出) で定量化した。

・ FRET/BRET プローブの開発

平成 28 年度に開発した FRET プローブは、スクリーニングに使用する化合物由来の蛍光漏れこみによって、False-positive/False-negative が生じることが分かってきた。そこで、これまでに構築した FRET プローブ骨格を利用して、励起蛍光を必要としない新規 BRET プローブの開発を行った (図 1)。図に示した計 4 種類の新規プローブの DNA コンストラクションを行い、発現プラスミドベクターを作製した。これらのプローブ発現プラスミドを、FreeStyle293 細胞に常法でトランスフェクションし、蛍光プローブ一過性発現細胞ライセートを調製した。上記ライセートを用いて、Luciferase 発光基質を添加し、BRET 効率を測定し、各プローブの S/N 比などスクリーニングへの対応度を評価した。各プローブ活性の測定は、蛍光スペクトロメーター (FP-6500, JASCO Co.) 又は、蛍光発光吸光プレートリーダー (SpectraMax, Molecular DEVICES) で検出した。また、これらのプローブ発現細胞ライセートを用いて、ウェスタンブロッティング (抗 GFP 抗体、抗 Z 抗体、抗 β -actin 抗体による検出) によるプローブの発現確認を行った。

(図 1) Z タンパク質の重合化をモニターする FRET/BRET プローブ

LCMV 由来 Z 蛋白質の N 末端側に黄色蛍光蛋白質 (Venus) を融合させて、Z 蛋白質の C 末端側に青色蛍光蛋白質 (SECFP) を配置したもの (プローブ①、平成 28 年度成果) と、SECFP の位置にルシフェラーゼ (Nano-Luc) を配置したもの (プローブ②)、さらに



プローブ①の N 末端側に Nano-Luc を融合させたプローブ③を作製した。これらのプローブは、Z 蛋白質の自己重合化によって、FRET/BRET シグナルが生じることが期待される。また、Z 蛋白質の重合化による FRET/BRET シグナルであることを示すために、重合化に必須とされるリングフィンガードメインにアラニン置換変異を導入した Z 変異体を作製し、野生型 Z タンパク質を変異体に置換したプローブも作製し、それらの FRET/BRET シグナルについても同様に測定した。

②成果（結果＋考察）

(1) BRET 型プローブへの改良

励起波長の必要性を除外し、スクリーニングに使用する化合物由来の蛍光をキャンセルするため、BRET プローブの作製を行った。プローブ①②は、Z 変異体を組み込んだプローブに比べて有意に高い BRET シグナルを検出した (data not shown)。しかしながら、今回作製したいずれの BRET 型プローブは、従来の FRET プローブに比べて S/B, S/N 及び Z' 値の向上が得られなかった (表 1)。従って、今回作製した BRET プローブはハイスループットスクリーニングに対応しないことが分かった。これらの結果から、BRET プローブでは、蛍光分子と Nano-Luc 間の距離が離れてしまったか、それらの分子方向性が従来の FRET 型とは異なる配置になった可能性が推察された。従って、Nano-Luc と Z タンパク質間のリンカー配列を調節することや Venus の円循環変異体を作製するといった改良が必要であると考えられる。

	プローブ (図 1 参照)		
	①	②	③
S/B	3.21	1.41	1.27
S/N	246.10	12.75	12.58
Z'	0.90	0.61	0.54

表 1. 従来の Z 重合化モニタリング FRET プローブと BRET プローブの活性比較

野生型 Z と変異型 Z を組み込んだプローブ (それぞれ WT と Mu と記載) について、S/B, S/N, Z' を以下の計算式で算出した。

$S/B = (\text{WT}530\text{nm 蛍光強度の平均値}) / (\text{Mu}530\text{nm 蛍光強度の平均値})$

$S/N = ((\text{WT}530\text{nm 蛍光強度の平均値}) - (\text{Mu}530\text{nm 蛍光強度の平均値})) / (\text{Mu}530\text{nm 蛍光強度 SD})$

$Z' = 1 - (3 \times \text{WT}530\text{nm 蛍光強度 SD} + 3 \times \text{Mu}530\text{nm 蛍光強度 SD}) / ((\text{WT}530\text{nm 蛍光強度平均値}) - (\text{Mu}530\text{nm 蛍光強度平均値}))$

(2) ヒット化合物によるウイルス様粒子 (VLP) 産生の抑制効果

昨年度得られたヒット化合物 (化合物 A, B) 処理における VLP に与える影響を計測した。しかしながら、化合物濃度を 50 μM まで上げた条件下でも、VLP 産生抑制は観察されなかった (図 2)。これら 2 種類の化合物は、昨年度の成果では、ウイルスの産生抑制が見出されている (平成 29 年度成果)。Z タンパク質の重合化はこれまで知られていたウイルス粒子形成以外にも、異なる作用点がある可能性を示唆する。一方で、生化学実験などにより、得られたヒット化合物が効果的に重合化を抑制しているか否かを検証する必要がある。今後は、これらの検証実験を重ねながら、ヒット化合物による詳細なウイルス複製抑制に対する作用機序を解明し、新たなアレナウイルス複製機構の同定・解明を目指す。

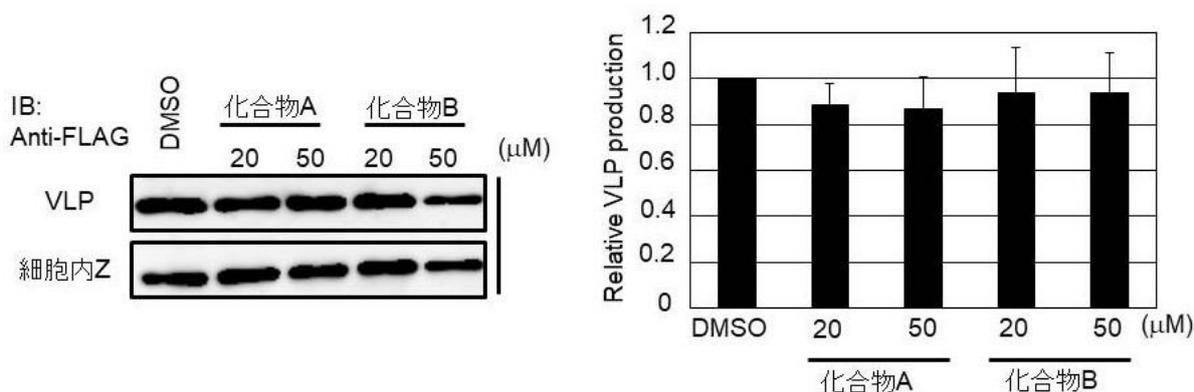


図 2. ヒット化合物によるウイルス様粒子 (VLP) 産生に与える影響

細胞外に放出された VLP 及び細胞内 VLP について、抗 FLAG 抗体で検出し (左図)、各バンドの強度を定量化し、VLP 放出度 (細胞外 VLP/細胞内 VLP) をバーグラフで表示した (右図)。

③成果の公表

なし

6. 自己評価

昨年度までに作製した FRET プローブを活用して得られたヒット化合物については、当初予想した作用機序を示さなかった (VLP 産生抑制に全く効果がなかった) ことで、ストリートフォワードにリード化合物への進展を行うことが困難となった。また、補完的に新たなスクリーニング系構築に向けた新規 BRET プローブの作製も停滞してしまった。しかしながら、ヒット化合物のウイルス産生抑制は、すでに確認できており、Z タンパク質の重合化による新しいウイルス複製制御系の存在を示唆する一定の成果は上げたと考えられる。従って、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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : ワンヘルス・アプローチに基づくベトナムにおける薬剤耐性菌の解析
課 題 番 号 : 30-Ippan-4

2. 代 表 者 : 鈴木 仁人 (国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター・主任研究官)
共同研究者 : 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部・部長)
共同研究者 : 矢原 耕史 (国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター・主任研究官)
共同研究者 : 菅井 基行 (国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター・センター長)
共同研究者 : Nguyen Thai Son (Hospital 103, Military Medical University,
Vietnam・Associate Professor, Head of Microbiology Department)

3. 決 定 額 : 830 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

近年、薬剤耐性 (AMR: antimicrobial resistance) の病原細菌による難治性感染症が国際的な公衆衛生上の重大な問題となっており、特に感染症の抗菌薬治療が困難な *Enterococcus faecium*、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、*Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌)、*Acinetobacter baumannii* (アシネトバクター・バウマニ)、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Enterobacter* spp. (エンテロバクター属菌)/*Escherichia coli* (大腸菌) などの腸内細菌科細菌は、その頭文字を取って”ESKAPE”細菌と称されている。イミペネムやメロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬は、抗菌スペクトルが非常に広範で、重篤な感染症の治療に用いられる“last resort (最後の手段)”として重要な役割を有している。しかし、2000年代に入って世界に急速に拡散したカルバペネム耐性を含む多剤耐性のグラム陰性菌は感染症の治療に有効な抗菌薬がほとんど存在せず、人類は危機的な状況に置かれている。

ESKAPE 病原細菌の中でも、大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター属菌を含む腸内細菌科細菌は、ヒトや動物において腸内細菌叢を形成する常在細菌であり、拡散性と定着性が高いことから、有効な抗菌薬に限られたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae) の分離状況や同感染症の発生状況を把握することは重要である。2013年に米国 CDC は、CRE は血液感染した患者の 50%以上を死に至らしめ、米国において重篤な感染者は年間 200 万人以上、死亡者は 2 万 3000 人以上と推測している。また、2014年に英国政府の委託機関は、AMR 微生物感染症による死亡者は 2050 年までに世界で年間 1,000 万人を超え、最も多い死亡要因になるという推測を行っており、WHO や世界各国は早急な AMR 対策を進めている。日本では 2014 年 9 月の感染症改正において“CRE 感染症”が 5 類感染症の全数把握疾患として新たに加えられ、“薬剤耐性緑膿菌感染症”と共に 5 類感染症の

定点把握疾患であった“薬剤耐性アシネトバクター感染症”が全数に変更され、多剤耐性グラム陰性菌の監視体制が強化された。2016年4月には、日本国の”薬剤耐性(AMR)アクションプラン 2016-2020”が策定され、国内に加えて国際的な協力体制の下に対策を行うことが重要視されている。

本研究では、ベトナムにおいて CRE のゲノム疫学研究を行うことを企図した。以前、申請者らはベトナム北部のハノイ市の医療機関において、カルバペネム耐性菌の調査を実施し、中国やインドと同様、NDM 型のカルバペネマーゼを産生する大腸菌、肺炎桿菌、アシネトバクター属菌を同国で初めて検出した。ベトナムにおいて CRE を含むカルバペネム耐性菌の脅威は年々増してきていると考えられるが、臨床検査技術や検査機器整備の問題もあり、今までに国内全域に渡った俯瞰的な調査は存在せず、正確な CRE の拡散状況は不明である。本研究では、ハノイ市の Vietnam Military Medical University (VMMU) に所属し、Military Hospital 103 (103 病院) の臨床微生物部門を統括している Nguyen Thai Son 博士を研究協力者とし、VMMU の軍医病院ネットワークを利用した国内全域に渡る CRE の調査を進める。VMMU はハノイ市、ホーチミン市に基幹病院 (103、108、175 病院) を有しており、そのネットワークは国内全域に渡っている。地方の小規模な医療機関においては細菌検査技術が低く、薬剤耐性菌の検出と分離を行うことは不可能であったが、本研究では、VMMU とベトナム国防省の協力を得て、ハノイ市、ホーチミン市などの都市部に加えて、同国が国境を接している中国、カンボジア、ラオスの近隣地域を含む地方の医療機関からも菌株を収集する。検体数に上限は設けないが、現地での検査結果と臨床情報と照らし合わせて取捨選択を行い、日本国内に菌株を輸送し (年間 100 株程度)、Illumina 社の次世代シーケンサー (NGS) もしくは Oxford Nanopore Technologies (ONT) 社の NGS にて詳細なゲノム構造の構築を行い、遺伝学的情報と臨床情報を高度に融合させたゲノム疫学解析を行う。

CRE は日和見感染症の起因菌とは言え、ヒトの病原細菌であり、一部の菌種は家畜伝染病予防法の届出病原体にも該当する。それ故、菌株の国際輸送を円滑に行えない問題があり、ベトナムでの研究体制を整備することも重要である。研究代表者の鈴木、研究分担者の柴山と矢原は、国立感染症研究所細菌第二部に所属している。研究代表者の鈴木は、国内での活動に加えて、年に 2 回は現地での活動を行う。現地では、ONT 社の携帯型 NGS の活用を積極的に試みる。研究分担者の竹村は、ハノイ市の National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) にある長崎大学ベトナム拠点に駐在していることから、軍医病院ネットワークと研究を進める上で、現地にて継続的に迅速で細かなサポートを行うことが可能であり、解析の緊急性に応じて、同拠点にも菌株を輸送し、同拠点の Illumina 社 NGS にてゲノム解読を行う。また、申請者らは、以前より NIHE のベトナム人研究者とも交流があるため、将来的に解析規模の拡大に応じて、NIHE において、ベトナム側の協力体制を強化することも可能である。

②研究内容

細菌は染色体とは別にしばしばプラスミドを有する。カルバペネマーゼ遺伝子のような重要な獲得性 AMR 遺伝子は、トランスポゾン、挿入配列、インテグロン、ファージなどの可動性遺伝因子によってゲノム中を頻繁に移動し、伝達性プラスミドの接合伝達を介して細菌間で拡散する。AMR 病原細菌の分子疫学研究では、MLST (multilocus sequence typing) による菌株の型別や AMR 遺伝子の検出・型別などに加えて、AMR 遺伝子がどのような可動性遺伝因子によって媒介されたのか、その痕跡を探ることが重要である。近年、次世代シーケンサー (NGS) の発展により、細菌の全ゲノム解読が容易になり、比較ゲノム解析により菌株間の表現型可塑性を生み出す遺伝的要因を一挙に明らかにし、公共ゲノムデータベースを駆使して、世界の分離株も含めた比較解析を行う”ゲノム疫学”が可能になってきた。

サンガー法による塩基配列決定法に基づいた DNA シーケンサーを第 1 世代とすると、NGS の第 2 世代は 2005 年から 454 社 (現 Roche 社)、2007 年から Solexa 社 (現 Illumina 社) など、第 3 世代は 2010 年から Pacific Biosciences (Pac Bio) 社、2014 年から Oxford Nanopore Technologies (ONT) 社により製品として登場した。第 2 世代シーケンサーは解読可能なサイズが短い (概ね <600 bp)、解読コストが安い (1 株 1 万円程度)。第 3 世代シーケンサーは解読可能なサイズが長い (概ね >10 kbp)、解読コストが高い (1 株 10 万円程度)。高度に進化を遂げた薬剤耐性菌のゲノムには可動性遺伝因子由来の類似の外来性 DNA 配列 (概ね >1 kbp) が無数に存在しているため、Illumina 社のショートリード型 NGS による解読では、解読後の計算で反復配列を跨いだ完全なゲノム構造が構築できないことが多い。全遺伝子の検出に基づいた MLST による菌株の型別や AMR 遺伝子の型別に加えて、ゲノム配列における SNP (一塩基多型) の検出、indel (挿入欠失) の検出は可能であるが、AMR 遺伝子周辺のゲノム構造を詳細に明らかにすることは難しい。それ故、薬剤耐性菌の重要な AMR 遺伝子に関わる遺伝学的特徴を臨床情報と照らし合わせて解析するためには、PacBio 社や ONT 社のロングリード型 NGS による解析を適宜行い、菌株の染色体とプラスミドを分離した完全なゲノム構造を明らかにすることが重要になってくる。AMR 遺伝子を含む伝達性プラスミドの配列を構築すると、その後の情報解析にてプラスミド間の配列比較を行い、骨格の類似性から疫学的関連性を推測するなど、詳細な検討が可能になる。ONT 社 “MinION” は、最新のナノポアシーケンサーであり、USB デバイス程度の小型であるため、発展途上国における病原微生物の調査に適している。また、ロングリード型 NGS であるため、AMR 病原細菌のゲノム解析にも適している。それ故、十分な設備がないベトナム現地の医療機関においても、ONT 社 MinION を用いることで、完全なゲノム構造を構築するための解読データを取得することが可能である。また、NGS のサンプル調整の際に、Bento Bioworks 社 “Bento Lab “のような携帯型の複合型 DNA 解析機器 (PCR サーマルサイクラー+遠心機+電気泳動槽+LED トランスイルミネーターを内蔵) を組み合わせることで、ベトナム現地の医療機関において、ゲノム解析がより効率的に可能である。

申請者らは予備的検討として、Vietnam Military Medical University (VMMU) の主要な基幹病院であるハノイ市の 103 病院および 108 病院にて、2013 年~2016 年に分離された大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター属菌を含む CRE 85 株を日本国内に輸送し、菌種同定と薬剤感受性試験を行い、Illumina 社の NGS、一部の菌株においては ONT 社の NGS による全ゲノム解読を行い、NDM 型のカルバペネマーゼ遺伝子が乗った伝達性プラスミドを保有する菌株を検出した。分担研究者の竹村は、2013 年より 2 ヶ月毎に、ベトナムの重要な行政区画であるハノイ市とハイフォン市（中央直轄市）、タイビン省、ナムディン省の河川などから検体の採取と保存を継続して行っており、腸内細菌科細菌の選択培地である DHL 培地を用いて、メロペネムで検体の選択を行い、大腸菌、肺炎桿菌を含む CRE 約 120 株を分離した。アジア新興国では、医療機関からの排水などによる環境汚染が問題となっているため、ワンヘルスの視点から非常に重要な検討である。それ故、本研究では、VMMU のネットワークから収集した菌株に加えて、動物由来の菌株・環境由来の菌株に関しても解析を行う。

本研究では、研究代表者の鈴木は細菌学であり、菌株収集（臨床分離）、基礎実験、情報解析、疫学解析と総括を担当する。また、研究分担者の柴山の専門は感染症学であり、主に菌株収集（臨床分離）と疫学解析を担当する。研究分担者の矢原の専門は生命情報学であり、主に情報解析と疫学解析を担当する。研究分担者の竹村の専門は微生物学であり、主に菌株収集（動物・環境由来）と基礎実験を担当する。本研究では、VMMU の軍医病院ネットワークに属する医療機関の数が大規模であるため、研究の開始に際して、研究協力者の Son 博士の仲介にて VMMU の総長と国立感染症研究所細菌第二部の部長である柴山との間にて所属機関同士の覚書（MOU）を交わした上で、計画的に研究を進める。VMMU 側の菌株収集の実務担当者は複数人を設ける。研究代表者の鈴木は、年に数回ベトナム・ハノイ市を訪問し、長崎大学ベトナム拠点と VMMU における現地の研究協力者との情報共有に務める。日本からベトナムを訪問する際は、空路にてノイバイ国際空港（ハノイ市）への直行便で移動する。ハノイ市内での移動は、基本的に VMMU が手配した軍用車にて移動を行うが、適宜、タクシーや公共交通機関のバス、電車なども利用する。

【平成 30 年度の研究計画】

ベトナムにおいて、VMMU と国立感染症研究所の間で締結した MOU に基づいて、軍医病院ネットワークの基幹病院が中心となって CRE を収集する。菌株収集に際して、研究代表者の鈴木が、VMMU の基幹病院にて、薬剤耐性菌検査の講習会を実施する。薬剤感受性試験は、VMMU の基幹病院では自動検査装置（基幹病院では bioMerieux 社 Vitek 2 を配備）、地方の医療機関では抗菌薬ディスクを用いて行う。菌種同定は、基本的に形態観察および生理・生化学的性状試験にて行い、場合によっては菌種同定キットを用いて行う。菌株は基幹病院にて集約して保存し、最低限、重要なカルバペネマーゼ遺伝子（NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、IMP 型、VIM 型）を PCR にて検出する。全ての臨床微生物検査データは、WHO が開発した無料ソフトウ

ウェア WHONET を用いて管理する。菌株の臨床情報として、日付、病院名・病棟、検体、患者の性別・年齢などを記録し、患者の個人情報 は WHONET にて匿名化する。収集する菌株数に上限は設けないが、検査結果と臨床情報と照らし合わせて取捨選択を行い、日本国内に菌株を輸送し（年間 100 株以内）、主に Illumina 社 NGS、代表的な菌株は ONT 社 NGS にて解読を行い、染色体とプラスミドを含むゲノム構造を構築する。AMR 遺伝子の検出は、ResFinder および ARG-ANNOT を用いて行う。菌株の配列データを元にゲノムワイド関連解析（GWAS）により SNP を抽出し、分子系統樹を作製する。菌株のメタ情報と地理情報は Microreact を用いて紐付ける。

ベトナムからの生菌の輸入は、BSL2 以下の日和見感染症の起原菌のみ扱う。ベトナムでは国際輸送会社（FedEx や DHL など）による輸送が可能であるが、カンボジアなどの一部の近隣国では国際輸送会社が自前の航空機を有していないため、空路での輸送は難しい。しかし、死菌は一般貨物として輸送することが可能であるため、状況に応じて 70%エタノールで殺菌した菌も輸入する。同状態の菌は常温でも 2 週間以上保存することが可能で、質量分析計（Bruker 社 MALDI Biotyper）による菌種同定、菌体から調整した DNA の Illumina 社 NGS による解析も問題はない。また、現地の医療機関にて、ONT 社 MinION や Bento 社 Bento Lab のような携帯型の実験機器を用いた解析を積極的に試みる。

③予想される成果

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）などの薬剤耐性（AMR）病原細菌は、国境を越えて急速に伝播し、人類の重大な脅威となっている。それ故、日本近隣のアジア新興国において、CRE の分離状況や同感染症の発生状況を正確に把握することは、国際的な AMR 対策に重要である。本研究では、急激な医療の発展に伴い、AMR 病原細菌の脅威が増してきているベトナムにおいて、長崎大学ベトナム拠点と軍医病院ネットワークを利用し、過去に類を見ない国内全域に渡った CRE の調査を行う。

CRE などの AMR 病原細菌においては、重要な AMR 遺伝子は伝達性プラスミドの接合伝達を介して、医療機関や地域環境中の細菌間で拡散していく。本研究では、ベトナム国内全域を対象として、ワンヘルス・アプローチの視点から、臨床および環境から分離した CRE に関して、WHONET で菌株のメタ情報を一元管理し、ショートリード型とロングリード型の次世代シーケンサーを組み合わせたゲノム解読を日本と現地にて行い、菌株の染色体とプラスミドを分離した完全なゲノム構造を明らかにする。最新のシーケンス解読技術を駆使した菌株の完全な遺伝学的情報と詳細なメタ情報を高度に融合させたゲノム疫学解析により、ベトナムにおいて、ヒト・動物・環境における CRE の拡散状況を俯瞰的に明らかにすることが可能になる。また、蓄積したゲノム疫学解析データから、ベトナムとその近隣国において、菌株、伝達性プラスミド、カルバペネマーゼ遺伝子の伝播状況を把握することも可能になる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

平成 29 年度は、平成 29 年 8 月および 11 月に長崎大学ベトナム拠点にて、平成 29 年 12 月に国立感染症研究所にて、研究代表者の鈴木は熱研教員の竹村と研究打ち合わせを行った。また、平成 29 年 11 月に長崎大学ベトナム拠点にて、お互いの NIHE 内の共同研究者を交えて ONT 社の携帯型 NGS の講習会を開催した。平成 30 年度は、平成 30 年 7 月および 12 月に長崎大学ベトナム拠点にて、鈴木は竹村と研究打ち合わせを行った。また、平成 30 年 12 月に長崎大学ベトナム拠点にて、JICA ベトナムオフィスの共同研究者を交えて ONT 社の携帯型 NGS による細菌ゲノムの解析を共同で実施した。

平成 30 年 7 月にハノイ市内の Vietnam Military Medical University (VMMU) にて、研究協力者の Nguyen Thai Son 博士が所属する VMMU と、研究代表者の鈴木、研究協力者の矢原、菅井が所属する国立感染症研究所薬剤耐性研究センターおよび研究協力者の柴山が所属する国立感染症研究所細菌第二部との間で、薬剤耐性菌の分子疫学解析とサーベイランスの共同研究に関して MOU を締結した。また、軍医病院 103 にて、軍医病院ネットワーク内の薬剤耐性菌担当者を集めた講習会を実施し、鈴木、柴山、菅井が講演を行った。講習会では、軍医病院の臨床分離株に関して WHONET での管理体制を強化した。

②成果（結果＋考察）

平成 30 年度までに、ハノイ市内の軍医病院 103 および 108 で臨床分離された腸内細菌科細菌 131 株のドラフトゲノム配列を解析し、全株の配列を DDBJ に登録した。そのうち、25 株は *bla*_{NDM}、*bla*_{KPC}、*bla*_{OXA-48} などのカルバペネマーゼ遺伝子を有しており、これらのカルバペネム耐性遺伝子は伝達性プラスミドに媒介されて拡散している可能性が示唆された。CRE の代表株 (*bla*_{NDM-1} 陽性株) については、プラスミドを含む完全ゲノム構造を構築し、院内もしくは地域のコミュニティ内で伝播したと考えられる *bla*_{NDM-1} 媒介プラスミドを同定した（本共同研究の成果として論文投稿中）。また、軍医病院 103 の臨床分離株からコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* を有する大腸菌 4 株同定し、*mcr-1* 媒介プラスミドの配列を決定したところ、別プロジェクトで解析したハノイ市内の食肉から検出された *mcr-1* 媒介プラスミドと類似しており、食肉から直接伝播した可能性が示唆された（本共同研究の成果として論文作成中）。

ベトナム北部ナムディン省において別課題にて収集した環境水検体を用いて、環境中に存在する CRE の探索を試みたところ、カルバペネム耐性株および中等度耐性株が多数分離された。PCR にて主要なカルバペネマーゼ遺伝子 (*bla*_{NDM}、*bla*_{KPC}、*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{OXA-48}) の検出を試みたところ、陽性株は少数であった。平成 30 年度からは、コリスチン耐性遺伝子の各種バリエーション (*mcr-1*～*mcr-9*) を対象に加えて探索を継続している。

③成果の公表

1. ナノポアシーケンサーと薬剤耐性菌研究

鈴木 仁人

第 92 回日本細菌学会総会

札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

2019 年 4 月 23 日-25 日

2. Novel strategies for control of colistin-resistant Gram-negative bacteria

菅井 基行、鈴木 仁人

第 92 回日本細菌学会総会

札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

2019 年 4 月 23 日-25 日

3. コリスチン耐性菌の国内外の現状と新規抗菌療法の開発

鈴木 仁人、平林 亜希、柴山 恵吾、菅井 基行

第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会

名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

2019 年 4 月 4 日-6 日

4. Plasmidome analysis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated in Vietnam

Masato Suzuki

U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP)

21st Acute Respiratory Infections (ARI) Panel Meeting – Bacterial Diseases

2019 年 2 月 28 日-3 月 1 日

5. ポリミキシン耐性菌感染症の現状とその治療法の開発

鈴木 仁人

第 101 回日本細菌学会関東支部総会

北里大学白金キャンパス大村記念ホール（東京都港区）

2018 年 11 月 1 日-2 日

6. MinION sequencing analysis on antimicrobial resistant bacteria

Masato Suzuki

3rd Technology Seminar on the MinION sequencing

Auditorium of Sam Ratulangi University (Manado, Indonesia)

2018 年 7 月 6 日

6. 自己評価

本研究では、ベトナム国内全域を対象として、ワンヘルス・アプローチの視点から、臨床および環境から分離した CRE に関して、ショートリード型とロングリード型の次世代シーケンサーを組み合わせたゲノム解読を行い、菌株の染色体とプラスミドを分離した完全なゲノム構造を明らかにすることを企図している。その結果、ベトナムにおいて、ヒト・動物・環境における CRE の拡散状況を俯瞰的に明らかにすることが可能になる。また、蓄積したゲノム疫学解析データから、ベトナムとその近隣国において、菌株、伝達性プラスミド、カルバペネマーゼ遺伝子の伝播状況を把握することも可能になる。

本年度までの研究において、ベトナムの主要な病院であるハノイ市の軍医病院 103 および 108 で臨床分離された CRE 株、国内で分離された食肉由来、環境由来の CRE 株、コリスチン耐性腸内細菌科細菌株に関して、ドラフトゲノム解析もしくは完全ゲノム解析を進めることができ、院内もしくは地域のコミュニティ内で伝播したと考えられる耐性プラスミドを複数同定した。また、ベトナムの環境中に存在する CRE 株の探索を行うための実験系を構築し、ナムディン省から採取した環境水から耐性菌株を分離することができた。

7. 達成度

- 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

所属機関の再編などの影響で昨年度まで未締結であった Vietnam Military Medical University (VMMU) と国立感染症研究所薬剤耐性研究センターとの間の MOU を締結することができた。ベトナム国内で分離されたヒト、食肉、環境由来の CRE 株およびコリスチン耐性腸内細菌科細菌株のゲノムおよび耐性プラスミド解析を進めることができた。

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : ベトナム自然環境に由来する薬剤耐性コレラ菌のゲノム特性
課 題 番 号 : 30-Ippan-05
2. 代 表 者 : 丸山 史人 (京都大学大学院医学研究科・准教授)
共同研究者 : 野中 里佐 (獨協医科大学大学院・講師)
竹村 太地郎 (熱帯医学研究所ベトナム拠点・助教)
3. 決 定 額 : 710 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

本申請は継続課題として申請し、研究目的、研究内容に変更はない。

申請者らは平成 26~28 年度に本共同研究課題として採択された「ベトナム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」を通じ、環境由来および臨床由来 *Vibrio cholerae* の全ゲノム配列解析と比較ゲノム解析を進めてきた。結果として環境由来 O1 抗原保有株が独自の TcpA 遺伝子を保有すること (Infect Genet Evol. 2017 Oct;54:146-151.)、ベトナムにおける直近のコレラアウトブレイク期の 2007~2010 年において、2 波の *V. cholerae* 侵淫が示唆されること (投稿準備中) 等の成果を得た。

本研究では上記を発展させ、*V. cholerae* を含む環境由来ビブリオ属細菌における薬剤耐性遺伝子の動態解析を行い、環境中での拡散状況と拡散過程を解明することを目的とする。これまでに構築したゲノム解析基盤を活用した分離株の全ゲノム解析を実施し、現在循環している薬剤耐性菌 (もしくは耐性遺伝子) の起源を明らかにする。薬剤耐性遺伝子の検索には ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database) を活用し、耐性遺伝子が複数見出される (多剤耐性) 場合にはそのゲノム上の位置情報までの解析を行う。

ベトナムでは多くの途上国と同様抗菌薬の使用量が非常に多く、臨床的な使用とともに農水産物の生産段階での多量の使用が大きな問題となっている。多くのビブリオ属細菌はエビ等の病原体として知られており、養殖池でビブリオ病予防のために抗菌薬が長期間使用されることも多い。ヒトにおける薬剤耐性菌感染に関する解析は十分とは言えないが多数報告されているのに比較し、環境中における薬剤耐性菌の調査研究は非常に報告が少ない。本研究ではエビ養殖池、農村部での農業・生活用水、河川水の解析を行い、ヒトにおける薬剤耐性菌侵淫とそのゲノム情報との比較解析を行うことで、耐性遺伝子の伝達特性、拡散・消長の過程を微生物生態学的見地から明らかにすることを目的とする。

②研究内容

ベトナム北部タイビン省、ナムディン省、南部ベンチェ省のエビ養殖池の水、農業・生活用水、河川水を各地年に2度ずつ（夏季、冬季）採取し、選択培養によるビブリオ属細菌の分離と薬剤耐性菌のスクリーニングを行う。抗菌剤としてはテトラサイクリン系（エビ養殖や家畜への使用が多く、環境水への流出が懸念）、カルバペネム系（ヒトでの耐性菌感染が大きな問題）に関してスクリーニングを行う。得られた分離株の全ゲノム配列の解析を行い、菌種の同定と系統解析、ARDB を利用した薬剤耐性遺伝子の抽出を行う。データベースによる検索で複数の薬剤耐性遺伝子が検出された場合には各遺伝子 locus の構造を明らかにするため、詳細なゲノム解析と PCR 法による確認を行う。平成 30 年度も平成 29 年度と同様の解析を行い、分離頻度の比較、季節による差異等の解析を行う。

③予想される成果

申請者らはこれまで環境-ヒト循環における *V. cholerae* のゲノム動態解明を目的として環境分離株のゲノム解析を行ってきた。本研究では薬剤耐性遺伝子にゲノム側の標的領域はしぼり、菌種の対象をビブリオ属細菌に広げた解析を行い、耐性遺伝子の伝達特性、拡散機構の解明をより詳細に行う。検体収集を養殖池、農業・生活用水、河川と異なる環境で行うことで実際に耐性遺伝子の伝達、拡散の「場」をとらえることが期待される。タイビン省、ナムディン省で生産されたエビ類、農作物はハノイ等の大都市へ、ベンチェ省の生産物は日本を含む国外へ輸出される量が多い。これらの地域の食物生産環境における薬剤耐性遺伝子の汚染状況を明らかにすることは、より安全な食物生産への寄与も期待できる。細菌感染症の本質的な克服には細菌固有の生態が必須であり、ヒト、家畜等の動物、環境における総合的な理解が必要と考えられる。本研究はこういった **One Health** の考え方に合致するものであり、薬剤耐性菌感染症のコントロールに重要な意義をもつと考えられる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

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 地点において約 3 ヶ月ごと、タイビン省、ハイフォン市近郊のエビ養殖池と河川において約 4 ヶ月ごとに、計 110 検体の環境水検体、8 検体の井戸水検体の収集を実施し、コレラ菌の検出を行った。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。

薬剤耐性株のスクリーニングにおいては、カルバペネム系としてメロペネム含有培地（TCBS 培地と DHL 培地）に加えてコリスチン含有培地によるスクリーニングを実施した。現れたコロニーに対して PCR を実施し、カルバペネム耐性菌に関しては *big5* と呼ばれる NDM-1、VIM, IMP, KPC, OXA-48 の検出と 16S rRNA 遺伝子の配列解析による菌種の同定を行った。

全ゲノム解析は前年度までに取得した環境由来株 24 株に加え 21 株のの配列解析を中心に行い、その他地域における環境分離 *V. cholerae* 株（NAG 株）との比較ゲノム解析を行った。

②成果（結果＋考察）

ナムディン省から収集した環境水 40 検体中 37 検体(92.5%)、タイビン省環境水検体の 40 検体中 21 検体(52.5%)、ハイフォン市近郊の 30 検体中 7 検体(23.3%)が *V. cholerae* の *toxR* 遺伝子陽性を示した。一方で、井戸水検体においては *toxR* 陽性検体は得られなかった。ナムディン省ではこれまでの調査結果と同様に *V. cholerae* が環境中に常在すると考えられる結果であったが、タイビン省とハイフォン市近郊においては前年までの調査よりも陽性率が低い結果となった。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。同様に O1 抗原遺伝子、O139 抗原遺伝子も検出されず、前年までの検出頻度と異なった。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、ヒトにおけるコレラ発生との相関を見出すには至っていない。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* 45 株の全ゲノム配列の取得を行ない、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た。2 地点からの分離株を 2014 年から 2017 年まで比較したところ、秋から春（10 月～4 月）の分離株は 2～3 のクラスターに分かれ多様性に富んでいたのに対し、気温の高い 6 月から 8 月の分離株は 1 つのクラスターを形成した（図 1）。2 地点間は約 10km 程度離れており、農業用水路と河

川であったが非常に近縁の株が分離され、地域による差はほとんど見られなかった。従って、環境コレラ菌に季節循環が見られ、冬期には多様な菌株が生息するが夏期には毎年類縁のグループが優勢となることが示唆された。このことは環境コレラ菌のゲノム動態解明に向けて1つのステップとなる成果であると考えており、現在詳細な保有遺伝子の差異等の解析と他地域での比較解析を継続している。

薬剤耐性菌に関しては2株のNDM-1遺伝子保有株(*Proteus*属と*Escherichia coli*)、2株のVIM遺伝子保有株(*Klebsiella pneumoniae*と*Enterobacter*属)を分離した。当初期待した*V. cholerae*の薬剤耐性遺伝子保有株は得られなかった。今後、遅れているテトラサイクリン系抗菌薬に対する耐性菌のスクリーニングを実施する。

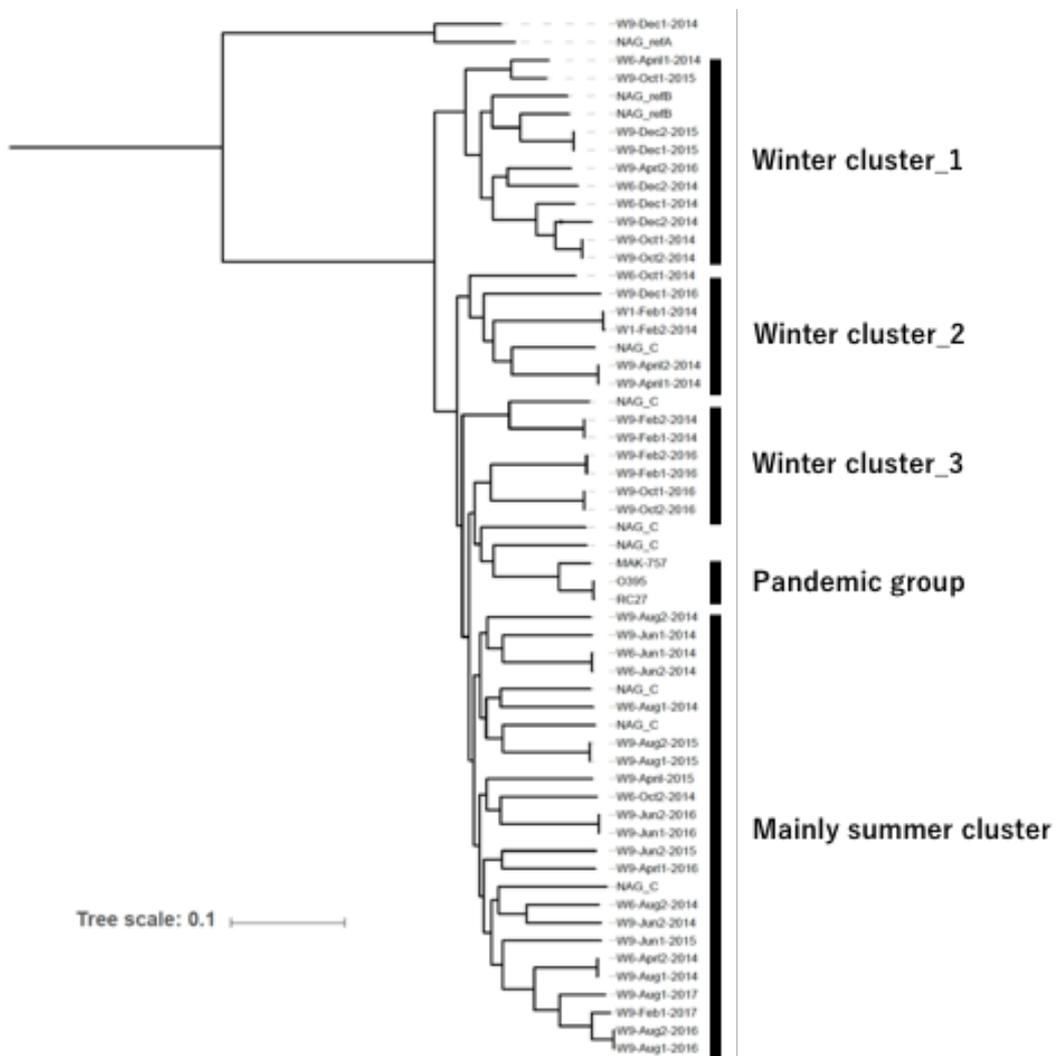


図1 ベトナム環境分離コレラ菌の分子系統解析

③成果の公表

環境分離コレラ菌のゲノム解析の論文を作成中。

6. 自己評価

継続的な環境水検体の収集から、環境コレラ菌ゲノムの季節循環を示唆する成果が得られたことは、当初の目標にしていた環境中でのゲノム動態解明に近づくステップになると考えている。ヒトにおけるコレラ菌感染が期間中にベトナムで報告されなかったことからヒト-環境循環という観点からの解析は困難であったが、直近の臨床分離コレラ菌のゲノム情報と合わせることで進めていく。また、他地域の環境コレラ菌解析も継続しており、地域間比較も今後進める必要がある。薬剤耐性菌解析においてはコレラ菌の耐性株が得られていない。テトラサイクリン耐性の解析を進め、研究目的を達成していく。

自己評価としては環境中におけるゲノム動態を決める因子の同定、耐性菌の解析等に予定よりも遅れが生じたことから II とするが十分挽回可能であると考えており、成果公表に向けて歩みを進めていく。

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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：長崎の野外捕集蚊の鳥マラリア感染状況の解明と学生実習への利用
課 題 番 号：30-Ippan-6

2. 代 表 者：金京純（鳥取大学農学部・准教授）
共 同 研 究 者：津田良夫（国立感染症研究所・主任研究官）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

トリマラリアの感染による鳥類の死亡は、野生動物・飼育動物を問わず、近年、国内で問題視されている。代表者はこれまで、東京、新潟、及び西表島の各所で媒介蚊調査を行い、トリマラリア原虫の感染率と原虫系統を調べてきた。それによってアカイエカやチカイエカ、イナトミシオカが主要な媒介蚊であり、それらの感染率は時に数十%を超えることが明らかになった。現時点で蚊からは *Plasmodium* 属のみが知られているが、未記載の様々な系統が検出されており、生物学的にも興味深いテーマである。しかし、国内の研究者は少なく、調査されている地域は偏っている。これまで長崎での研究はないが、渡り鳥の中継地点である長崎県は他県とは異なる系統のトリマラリアが侵入している可能性もある。一方で、トリマラリアはヒトへ感染がないため実験に利用しやすく、マラリア原虫の機能解明に大いに貢献してきた。もしも野外の媒介蚊のトリマラリア感染率が十分に高ければ、採集した媒介蚊を解剖することで、オーシスト、スポロゾイトの観察を学生実習で行うことが可能かもしれない。本研究では、長崎県各地及び長崎大学熱帯医学研究所（熱研）周辺で採集した蚊のトリマラリア感染率を明らかにするとともに、蚊の採集・解剖によるオーシスト・スポロゾイトの観察を学生実習に組み込む事を目的とする。

②研究内容

4月-10月にかけて月に一度、長崎大学坂本キャンパス内及びキャンパス周辺に CDC ドライイラストラップを設置する。採集された蚊は形態的に同定したのち、メスのみを実体顕微鏡下で解剖する。中腸、唾液腺を取り出し、染色した後、オーシスト・スポロゾイトの存在を判定する。これらのサンプルは、後日、分子的な同定に利用する。同様の作業を、渡り鳥の中継地点として期待される島原、野母崎、西海で月に1回行う。さらに、6月の学生実習（熱帯医学研修過程及び熱帯医学専攻修士課程）では、トラップの設置から学生とともにいき、採集した蚊を同定した後、オーシストとスポロゾイトの観察のため、腹部と胸部の解剖を行う。解剖により摘出した中腸と唾液腺は、cytochrome *b* をターゲットとした PCR によるマラリア原虫の検出に利用する。得られた結果から、県内のトリマラリアの分布及び感染率、遺伝的系統を明らかにする。

③予想される成果

本研究により、長崎県内で初めてトリマラリアの主要な媒介蚊が明らかになると予想される。また、トリマラリア感染率は他県と大きな違いはないかもしれないが、より多様な種や遺伝的系統が認められると期待される。国内での主要な媒介蚊はアカイエカ種群と考えられているが、この種群はウエストナイル熱や糸状虫症など多くの感染症を媒介する。トリマラリア感染と他の病原体感染の関係、海外からの媒介蚊侵入の可能性、媒介蚊集団とマラリア系統の適合性の解明など、今後、さらなる研究テーマの発展が可能である。

学生実習においては、発展途上国で利用される一連の手法（トラップの設置法、蚊の同定法、マラリア感染の判定法）を、実際にフィールドの蚊を利用して身につけることができる。また、これまで熱研の学生実習では困難であったオーシスト・スポロゾイトの観察を、安全な手法として実習に組み込むことが可能になるだろう。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

4-10月の7ヶ月間、グビログ丘に5個、坂本キャンパス内に2個、さらに本尾公園に1個のCDCドライアイストラップを毎月2晩設置した。また、西山水源地に3個のトラップを1晩設置した。7月には鎮西公園にも3トラップを設置した。翌朝、トラップを回収して捕獲された蚊を持ち帰り、砂糖水を与えて生きたまま解剖まで保持した。生きた雌個体をクロロホルムで麻酔して実体顕微鏡下で種同定後、柄付き針を用いて解剖し、中腸にオーシストがあるかどうかを確認した。回収時に死亡していた個体は、種同定後、マイクロチューブに入れて-25℃の冷凍庫に保存し、PCRによる鳥マラリア原虫の検出に供した。蚊は、採集日、種、吸血の有無、性別で分けて保管した。アカイエカ種群は、PCRによる種同定を行うため、解剖時に脚をマイクロチューブに入れて-25℃の冷凍庫に保存した。

冷凍庫に保存した雌成虫から、DNAを抽出した。抽出にあたり頭部は除去した。複数個体をまとめて抽出する場合はDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を、1個体から抽出する場合はREDExtract Tissue PCR Kit (SIGMA-ALDRICH)を用い、製品のプロトコールに従い、DNAを抽出した。鳥マラリアの検出は、Kim et al. (2009)に従い、cytochrome *b* をターゲットとしたNested PCRで行なった。PCR産物は、染色剤であるミドリグリーンを含有した2%アガロースゲルで電気泳動を行い、ターゲットのバンド(524bp)が検出されるかを確認した。

②成果（結果＋考察）

病害動物学分野の学生・スタッフについて、トラップの設置方法及び回収方法、種同定方法、解剖方法を身につけさせることができた（写真：樹冠へのトラップの設置）。また、3ヶ月研修の学生については、6月時にトラップによる採集を見せることができた。



全期間で、4属9種911個体の成虫が採集され、そのうち78%がヒトスジシマカであり、続いてオオクロヤブカ(5%)、アカイエカ種群(5%)と続いた(図1)。各採集地点で一晩に1トラップで取れる蚊の数は、本尾公園が最も多かった(図2)。一方、占有性を考慮した種多様度(Simpson's D)は、西山水源地で最も高く、ついで本尾公園で高かった(図3: ()内の数字は種数)。これらの結果から、グビロガ丘の蚊密度は中程度で、種数は多いが、ヒトスジシマカが優占しており(85%)、多様度は低いことが明らかになった。一方で、本尾公園は蚊密度、種数、多様度共に高く、より蚊の集団が大きく複雑であると言える。さらに西山水源地については、密度は低いが種多様度は高く、安定した蚊集団であると考えられる。全採集地を合わせて各種の発生活長を見ると、ヒトスジシマカは4~5月にかけて急激に増加し、7~9月にピークを迎え、10月には大きく減少する(図4)。アカイエカ種群も4~5月にかけて増加するが、その後、個体数は一定に維持された。オオクロヤブカは6~7月にかけて急激に増加し、10月まで個体数を維持した。一方、キンパラナガハシカは4、5月にのみ採集された。鳥マラリアを主に媒介するアカイエカ種群は5月以降に一定の個体数になるため、今後は5月以降に採集を行うのが効率的であると考えられる。

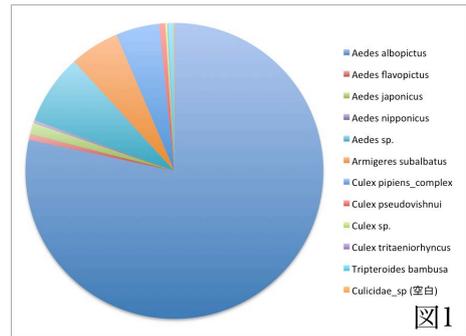


図1

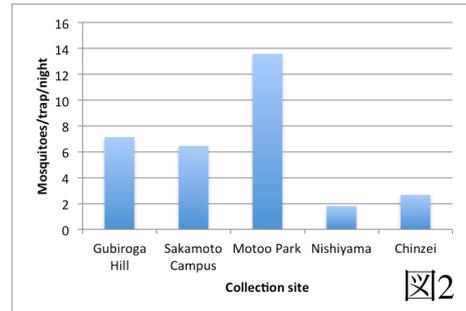


図2

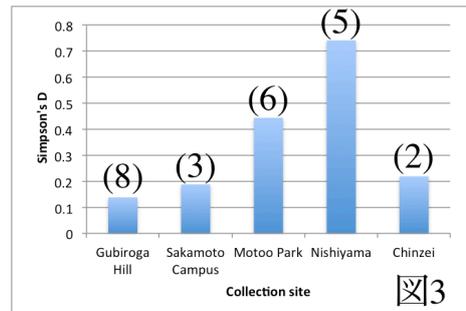


図3

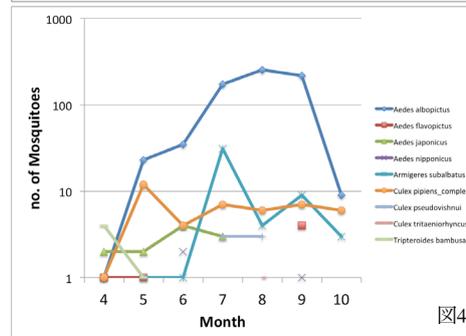


図4

全911個体のうち、844個体が雌であり、そのうち284個体(33.6%)が生きて回収・解剖された。しかし、今回の解剖でオーシストは認められなかった。アカイエカ種群の個体数が少なかったこと、より鳥マラリアの流行しやすい場所で採集していないことなどが、今回の解剖でオーシストを発見できなかった原因と考えられる。アカイエカ種群の発生源が近く、かつ鳥マラリアが流行しやすいと考えられる鳥類園などで採集することで、オーシストが観察されると期待される。また、ドライアイストラップだけでなく、産卵期の雌を選択的に採集するグラビッドトラップを利用することで、吸血経験のある個体をより多く採集することができるだろう。

現在、解剖できなかった560個体について、Nested PCRによる鳥マラリア検出を行なっている。全251プール中、185プールについてPCR



図5

を行なったが、鳥マラリア原虫は検出されていない。今後、さらに実験を続ける予定である。一方で、185 プール中、22 プールでターゲットとは異なるバンド（800bp 前後）が検出され、全てヒトスジシマカからであった（図 5）。ヒトスジシマカ特異的な共生生物あるいは寄生生物である可能性がある。

③成果の公表

本研究の成果は、まだ公表されていない。

6. 自己評価

平成 30 年度の活動により、学生・スタッフともに、トラップの設置・回収、成虫の種同定、中腸・唾液腺の解剖、染色の手法を身につけた。トラップの設置については樹冠トラップの設置方法も学び、学生による種同定の過程では検索表の使い方を身につけさせることができた。特に技術が必要とされる唾液腺の解剖法を身に付けたことは、今後の 3 ヶ月研修での実習に大いに活かすことができる。また、長崎大学坂本キャンパス周辺の蚊の多様性や季節消長を明らかにすることができたことから、鳥マラリアのみならず、他の感染症についてのリスク推定も可能になる。以上の点については、初期の目標を達成したと言える。

しかし、今回の調査ではオーシストやスポロゾイトを観察することはできなかつたため、実習で観察してもらうことができず、目標達成とはならなかつた。2019 年度は、鳥マラリアに感染している可能性の高いアカイエカ種群をより効率的に採集することで、オーシストやスポロゾイトの観察を可能にしたいと考えている。また現在、実験は全て終わっておらず、今後、鳥マラリア原虫が Nested PCR で検出される可能性がある。そのため、長崎における鳥マラリアについては、今後の結果によって明らかになることが期待される。

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つた）

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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 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 : 30-Ippan-7
2. 代 表 者 : 前野芳正 (藤田医科大学・准教授)
共 同 研 究 者 : 高木秀和 (愛知医科大学・講師)、Nguyen Thi Huong Binh (ベトナム NIMPE・部長)、Vu Duc Chinh (ベトナム NIMPE・部長)、益田岳 (京都大学・連携助教)、リチャード・カレトン (長崎大学熱帯医学研究所・准教授)
3. 決 定 額 : 400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

本研究では、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拡散に関する検討を行う。そのため、ヒト血液サンプルおよびスポロゾイトサンプルを用い、耐性原虫の検出とその遺伝的多型の解析をおこなう。そしてアルテミシニン耐性とガメトサイト特異 mRNA 遺伝的多型との関連について解析を行い、ベトナムにおける耐性原虫の実態解明とその対策の構築をめざす。

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、最近十年余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：カンボジア国境と接するビンフック省、カンホア省、ビントゥアン省、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（NIMPE）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)調査地区におけるマラリア原虫主要媒介蚊である媒介蚊 *An. dirus* や *An. minimus* 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*、*msh-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、サルマラリア原虫の *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。殊に国境付近における薬剤耐性原虫の感染・伝播に関する有用な資料を作成することが可能。
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った。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passive case detection (PCD)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、ビンフォ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）、カンホア省カンファー地域（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. 調査地区の診療所などを調査対象施設とし、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）

1. 媒介蚊の解析

- (ア)カンボジア国境に接しているビンフォック省とジアライ省、中南部で南シナ海に面しているプーエン省、カインホア省、ニンツアン省、ビンツアン省およびドンナイ省においてマラリア媒介蚊の捕集を行い、マラリア原虫の感染状況を解析した。捕集できたハマダラカ 2278 匹 (*Anopheles dirus* 1543、*An. maculatus* 475、*An. minimus* 70、*An. aconitus* 190) の内 1398 匹 (*Anopheles dirus* 1097、*An. maculatus* 137、*An. minimus* 68、*An. aconitus* 96) を nPCR にて解析した。その結果 40 匹が nPCR 陽性となった。このうち 37 匹が *An. dirus* であった。
- (イ) 検出されたマラリア原虫はヒトマラリア原虫 2 種とサルマラリア原虫 4 種であった (表 1)。マラリア原虫の感染は単種感染と混合種感染がみられた。混合感染の多くは胸部から検出された。腹部から検出されたヒトマラリア原虫とサルマラリア原虫の混合感染は 1 例だけであった。現在検出された熱帯熱マラリア原虫感染サンプルから Pf K13-propeller 遺伝子の塩基配列の解析を行っている。
- (ウ) 調査地区におけるマラリア原虫主要媒介蚊は今回の結果からも森林地域を主生息地とする *An. dirus* が主媒介蚊であった。

表 1 .nPCR 解析による媒介蚊の胸部及び腹部から検出されたマラリア原虫種

Infection	<i>Plasmodium</i> spp.	No. of mosquitoes infected		
		Total	Thorax	Abdomen
Single (37)	Pf	14	7	7
	Pv	5	3	2
	Pin	10	4	6
	Pcy	6	5	1
	Pct	1	0	1
	Pfil	1	0	1
Double (8)	Pf, Pv	2	0	2
	Pf, Pk	1	1	0
	Pf, Pin	1	0	1
	Pv, Pin	3	3	0
	Pin, Pct	1	1	0
Triple (4)	Pv, Pin, Pcy	3	3	0
	Pv, Pin, Pct	1	1	0
No. of PCR-positive		49	28	21
No. of PCR-negative		1349	1370	1377
No. of samples analysed		1398	1398	1398

Pf, *Plasmodium falciparum*; Pv, *P. vivax*; Pin, *P. inui*; Pcy, *P. cynomolgi*; Pct, *P. coatneyi*; Pfil, *P. fieldi*; Pk, *P. knowlesi*

2. ヒト血液サンプルの解析

- (ア)カンボジア国境に接しているビンフォック省 Bu Gia Map 地区の地域保健センターにおいて passive case detection (PCD)を 2018 年 5 月から 11 月に実施した。対象は調査対象地区に居住する住民で、発熱を主訴として受診し、迅速診断(RDT)検査にてマラリア陽性を呈した 29 例を検討対象とした。マラリア原虫感染種の同定は nPCR に依った。その結果、混合感染例はなく、全例ヒトマラリア原虫の単種感染例であ

った。29 例中熱帯熱マラリア例が 15 例、三日熱マラリア例が 14 例であった。熱帯熱マラリア 15 例の Pf K13-propeller 遺伝子の塩基配列解析の行った結果、野生株感染が 3 例、変異株感染が 12 例であった。また野生株と変異株の混合感染例は認められなかった。検出された変異は全て非同義置換で C580Y の 1 種類だけで、同義置換は検出されなかった。変異株感染が見つかった例はいずれも調査地内にある自然林から成る国立公園内での仕事と同所で寝る習慣が特徴として挙げられた。

- (イ) 同省の過去の保存してあった熱帯熱マラリア感染ヒト血液の DNA サンプルの Pf K13-propeller 遺伝子の塩基配列解析を行った。2015 年のサンプル 11 例では野生株感染が 1 例で、他は変異株の感染であった。変異を確認したのはこれまでアルテミシニン耐性との関連が報告されている P553L、V568G および C580Y が認められた。P553L+V568G、P553L+C580Y や wild+C580Y という混合感染例も認められた。また、2002 年の同省のサンプルからは薬剤耐性を示唆されている K13-propeller 遺伝子の変異は認められなかった。
- (ウ) カンボジア国境と接しているビンフォック省近隣のジアライ省およびダクノン省の熱帯熱マラリア患者の解析を行ったところ、ビンフォック省でのヒト血液解析結果と同様な結果を得た。
- (エ) 現在調査を継続している。

3. 今回の媒介蚊およびヒト血液を検討対象とした解析結果より、ビンフォック省 Bu Gia Map 地区におけるマラリア感染は森林地域に頻繁に立入、そこで睡眠を取るといったヒトの行動に起因していることが推測された。蚊の調査地区の有症者は 1 年に数回感染をする例もあり、重症例は認められなかった。これは前年度の調査地であるカンホア省 Khanh Phu 地区での調査結果と今年度の調査地区とは距離的にかげ離れた検討対象地であったが、結果が符合していた。また、ビンフォック省 Bu Gia Map 地区では他の先行報告にみられるよう私共の調査でも P553L、V568G および C580Y という K13-propeller 遺伝子の変異を認めているが、2018 年の調査では C580Y だけに収束されていた。この現象は他地区との交流が少ないカンホア省 Khanh Phu 地区での K13-propeller 遺伝子の変異と同様な要因があるのではと推測された。

③成果の公表

1. Chinh VD, Masuda G, Hung VV, Takagi H, Kawai S, Annoura T, Maeno Y. Prevalence of human and non-human primate *Plasmodium* parasites in anopheline mosquitoes: a cross-sectional epidemiological study in Southern Vietnam. *Trop Med Health*. 2019;47:9. doi: 10.1186/s41182-019-0139-8.
2. Chink VD, Hung VV, Binh NTH, Hanh TV, Maeno Y, Nakazawa S. Malaria vector and *Plasmodium* infection in mosquitoes in endemic areas of Gia Lai and Khanh Hoa provinces, Vietnam. *Vietnam J Infect Dis*. 2018; 3 (23) 83-91.

6. 自己評価

今回の調査、解析より、ベトナム南部地域においても熱帯熱マラリア原虫のアルテミシニン耐性との関連が示唆されている K13-propeller 遺伝子内の変異が検出された。他方、ベトナム・カンボジア国境付近の調査では従来と同様、K13-propeller 遺伝子内の変異遺伝的多型を確認した。しかし、今回の調査において K13-propeller 遺伝子内の変異が多種から 1 種に収束され、従来報告にはなかった新知見が見出された。この現象が起きている要因についてヒトの行動に起因していることが推測されたが究明ができず、今後の継続調査が必須と考えられた。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- ② (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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 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：2018-Ippan-8

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 (長崎大学病院 耳鼻咽喉科 助教)
佐藤 智生 (長崎大学病院 耳鼻咽喉科 助教)
吉田 レイミント (長崎大学熱帯医学研究所 小児感染症学 教授)
樋泉 道子 (長崎大学熱帯医学研究所 小児感染症学 助教)
原 史絵 (熱帯医学研究所 寄生虫学分野 技能補佐員)
金子 亜衣子 (長崎県立大学国際社会学部 国際社会学科 非常勤講師)

3. 決 定 額：730 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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、滲出性中耳炎の有病率が低下することが期待され、大規模な前向き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有病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・ニャチャン市で接種スケジュールによる集団免疫効果を肺炎球菌保菌率で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地域が地域ごとに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(2p+1)を対象として研究を行う。

まず最初に2p+1群の地域における4~24か月の抽出された小児に対して問診、診察および上咽頭からの菌検査を行い、滲出性中耳炎の有病率および肺炎球菌保菌率を明らかにする(2016年)。続いて、PCV-10接種群の地域に住む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、2p+1 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。1 年後（2017 年）、2 年後（2018 年）、3 年後（2019 年）、4 年後（2020 年）に、2p+1 群の地域における 4～24 か月の抽出された小児に対して、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各年の滲出性中耳炎有病率と肺炎球菌保菌率を比較する。

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 接種後は接種前に比べて滲出性中耳炎の有病率が 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

今回は接種開始より 2 年後、3 回目の診察・検査となった。PCV-10 のプライミング接種 2 回・ブースター接種 1 回 (2p+1) を行った地域から 4~24 か月の児を抽出し、2018 年 10 月 13・20・21 日に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両側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。これらの鼓膜所見はビデオファイルに動画として記録・保存した。



図 1 耳鏡

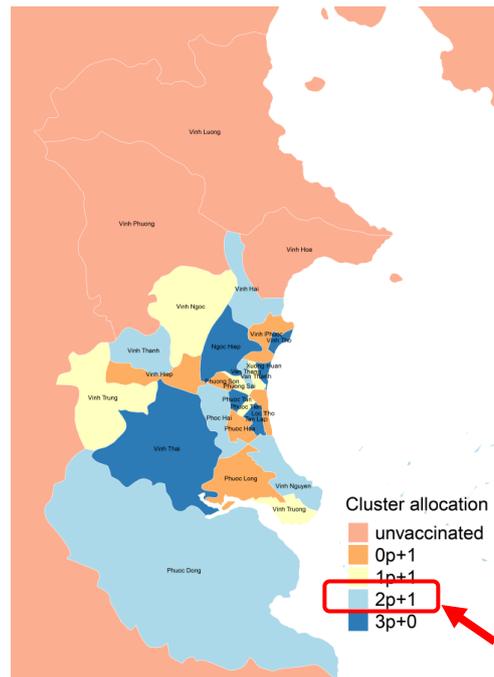


図 2 5 群に分けられたニャチャン市の地域：本研究の対象となったのは「2p+1」で示された地域である。

②成果（結果+考察）

PCV 導入前である 2016 年 10 月に両耳の評価が可能であったのは 274 児で、このうち 47 児 (17.2%) に滲出性中耳炎を認めた (95%CI: 12.7–21.6%)。1 年後の 2017 年 11 月には 568 児で両耳の評価が可能で、うち 112 児 (19.7%) に滲出性中耳炎を認め、有意差を認めなかった (95%CI: 16.4–23.0%)。今回、2018 年 10 月は 637 児で両耳の評価が可能で、62 児 (9.7%: 未確定データ) に滲出性中耳炎を認め、有病率は有意に低下していた (95%CI: 7.4–12.0%)。

過去の報告では、PCV の集団接種により小児の重症肺炎球菌感染症は 2 年程度で劇的に減少するとされている (Pilishvili ら、2010 年)。本研究で調査中である滲出性中耳炎の有病率においても、ワクチン接種開始 2 年で減少傾向にある可能性があり、今後の調査結果に注目していきたい。

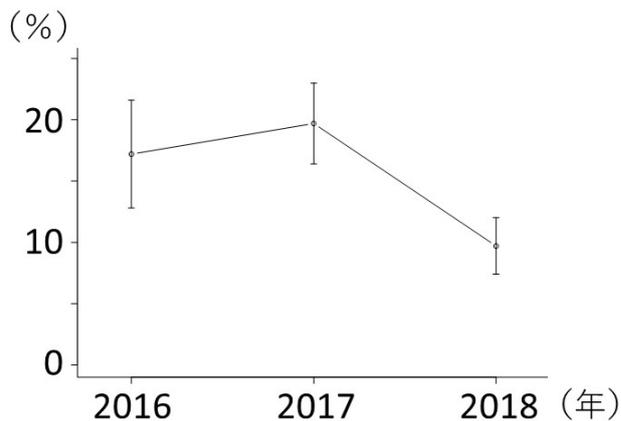


図3 滲出性中耳炎の有病率の変化

③成果の公表

発表

1. C. Satoh, M. Toizumi, K.I. Kaneko, H.A. Nguyen, Q.C. Lam, M. Hara, C. Iwasaki, M. Takegata, N. Kitamura, K. Ariyoshi, D.A. Dang, H. Takahashi, L.M. Yoshida : Prevalence and Characteristics of Children with Otitis Media with Effusion in Vietnam. The 11th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. 15-19th April 2018, Melbourne, Australia
2. 佐藤 智生 : 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. 熱帯医学研究拠点研究成果報告会. 平成 30 年 11 月 9 日、長崎

6. 自己評価

調査では、短期間で多数の児の診察を行ったが、大きな混乱もなく信頼のおける良質なデータを得ることができたと考える。今回も前年同様に鼓膜所見をビデオファイルに動画として記録したことにより、中耳滲出液の有無に関してより正確な診断が可能となったことは評価に値する。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：ネパール高地住民のテロメア長に影響をもたらす因子の検索
課 題 番 号：30-Ippan-9

2. 代 表 者：長谷川 寛雄 (長崎大学病院検査部・准教授)
共 同 研 究 者：山本 太郎 (国際保健学分野・教授)

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ストレスは様々な疾患との関連性が報告されており、つまり個人のストレス状態を正しく把握することは病気の予防という観点でも非常に重要なことであると認識されている。個人のストレスの状態を定量的に測定する方法として、テロメアの長さを測定する方法が知られている。テロメアは染色体 DNA の末端に存在し、様々な外部刺激から染色体 DNA を保護する作用を有していることが広く知られているが、テロメアは多様な要因によりその長さに影響をもたらされることが報告されている。これまでの研究により、テロメアの長さはガンや糖尿病、さらには感染症などの様々な疾患との相関性が認められることが報告されており、同時に外部からの生体に対するストレス刺激もテロメアの長さに影響する。このようにテロメアはストレスに対する有用な生体マーカーであると認識されつつある。

世界には海拔 3,000 m 以上の生活基盤を持つ高地住民は数百万人存在するとされ、このような地域に生活する人々は紫外線などの多様な環境要因により低地住民よりも多くのストレスを受けていることが容易に想像されるが、高地住民におけるテロメアの長さを検証した報告は存在しない。そのため、高地住民がどのような要因に対してストレス刺激がもたらされているのかについて定量的に検証した報告は存在せず、現時点では全く不明である。

そこで、本研究では高地住民のテロメアの長さに影響を及ぼす環境要因と生活要因を含めた因子の同定を行い、当地住民にもたらされるストレスの原因を明らかにする。さらに、明らかにされたストレス因子と当地住民との健康との相関性についても検証する。

②研究内容

本研究では、ネパール国・Mustang 地方住民より提供された血液サンプルを用いて、テロメアの長さに影響することが示唆される因子の同定を試みる。その方法として、過去の文献に従い被験者より提供されたゲノム DNA からリアルタイム PCR を用いて各人のテロメア長を測定する。また、テロメアの長さに影響する因子の候補として、(1)感染症既往、(2)被験者の検診情報 (生活習慣病など)、(3)生活習慣に関する情報とする。これら得られた各項目に対して多変量解析などを用いた統計学的解析にて検

証することで、テロメアの長さとの相関性が認められる因子を明らかにする。なお、感染既往については血清中に存在する感染性微生物に対する抗体を検出し、感染症に対する既往歴を明らかにする。その方法として、本研究では特定の病原微生物を標的とした ELISA 法や病原微生物の特定のタンパク質を抗原とした Western blotting 法を用いることで評価を行う。同時に、長崎大学病院・臨床検査部に依頼し、特定の病原体に対する抗体の検出を試み、Tsarang 村での感染症の拡散状況の実態を把握する。また、被験者の検診情報と生活習慣に関する情報として、申請者を含む研究チームが昨年度に実施した Tsarang 村で行った実地調査から得た情報を活用するが、特に検診情報として生活習慣病に関連した項目と血液中の酸素飽和度などの高地適応に関連した項目との相関性に着目し、詳細に検証することを予定している。

さらに、感染が疑われた病原性ウイルスに関しては、血清や血球成分を鋳型とした PCR 法を用いることで特定の遺伝子の検出と増幅を行い、塩基配列決定を行うことでウイルスの型別診断や分子系統樹の作成し、当地に存在する病原ウイルスの遺伝的多様性や特性を明らかにする。なお、本研究で標的とする感染性微生物として、細菌では胃がんの原因であるピロリ菌や結核菌、ウイルスとして HTLV-1 や B 型肝炎ウイルスの 4 種から解析を行うが、研究の進捗状況に応じてこれらの以外の病原微生物についても検査対象とすることを予定している。

③予想される成果

本研究では高地住民のテロメアの長さが明らかになるのみならず、テロメアの長さに影響することが示唆される因子の存在が明らかになることが予想できる。先にも述べたように、テロメアの長さの違いは被験者のストレス状態を反映することであることが報告されており、ストレスの状態を定量的に正確に把握することができれば、ストレスの要因となっている事象を削除や軽減するための方策を打ち出すことに繋がると期待でき、最終的には住民の健康の向上や増進に寄与することができるものと考えている。

さらに、Tsarang 村の感染症における既往歴や拡散状況が明らかとなり、Tsarang 村での現状における感染症の実態を把握することが可能となる。Tsarang 村が位置する Mustang 地方に関しては、感染症に関する情報がこれまでのところ全く認められないので、成果を積み重ねることで学術論文として報告することができれば、世界初になると考えている。さらに本研究の調査地である Tsarang 村がある Mustang 地方は、地理的特性から他の地域からは隔絶されており、近年まで他地域の人々との人的交流が乏しかったと推測することができる。本研究で解析対象とする病原体は何世代にも渡り当地住民に感染し続けていることが想定できる。したがって、当地に存在する病原微生物は独自の進化・発展をしている可能性が十分に考えられる。そこで、血液などから病原ウイルスの遺伝子を検出・塩基配列を解析することで、遺伝子内での 1 塩基多型の存在やその多型情報を活用したウイルスの分子進化を検証することが可能となり、病原ウイルスのヒトへの適応や病原性についての進化のメカニズムに対して新たな知見を得ることができる可能性を秘めていると考えている。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

本研究では、ネパール国北部・山岳地帯のムスタン地方にある Tsarang 村の住民を対象に調査を実施し、18 歳以上の村民 188 名に協力を依頼した。調査を実施するにあたり、村民に対して口頭と書面にて本研究の意図や目的等の説明を行い、本研究の趣旨に賛同した村民から同意書を取得することで本研究の被験者とした。また本研究では、長崎大学熱帯医学研究所・研究倫理委員会（承認番号：150226137-3）とネパール国・ヒト研究倫理審査委員会（142/2016）に対して本内容に関する申請を行い、承認済みである。

被験者のテロメア長を測定するために、提供された唾液中に含まれるゲノム DNA を市販の DNA 抽出キットで調整し、リアルタイム PCR 法にて各被験者のテロメア長を算出した。テロメア長の測定には、テロメアを特異的に認識するプライマーを作成し、同時にアルブミン遺伝子を内部コントロールとし、同一人物のゲノム DNA 内のテロメア長とアルブミン遺伝子のそれぞれについてリアルタイム PCR を行った。得られたデータについて、アルブミン遺伝子にてテロメア長のデータを標準化した後に、市販されているヒト由来ゲノム DNA を基準とすることで、基準としたヒトゲノム DNA に対する相対的なテロメア長 (relative telomere length; rTL) として算出した。また、被験者の感染症既往を調査するために血液の提供を依頼し、ELISA 法にて病原体に対する抗体価を検出することでその評価を行った。加えて、被験者の検診情報（身長、体重、血圧等）や生活習慣に関する属性情報を質問票や簡単な検診により取得した。なお、本研究における健康リスク因子として BMI (≥ 25)、血圧 (SBP ≥ 140 mmHg/DBP ≥ 90 mmHg の両方、もしくはどちらか一方が該当)、HbA1c ($\geq 6.0\%$)、SpO₂ ($< 90\%$) をそれぞれ設定した。

②成果（結果＋考察）

はじめに、被験者における感染症既往を検証するために ELISA 法にて肝炎ウイルスや他の病原体を標的とした解析を試みたが、いずれの被験者からのサンプルについても残念ながら検証することができなかった。この原因として、被験者からのサンプル取得後の保存法やサンプルの処理の際に不手際があったことを否定することができない。

次に、テロメア長との相関性が認められる要因を検索するために、被験者の検診時に取得した身長、体重、血圧などの指標を用いた統計解析を行った。本研究では全被験者のテロメア長を 3 分位点でグループ分けし、3 群間における検定を行った (Table 1)。その結果、被験者集団のテロメア長は年齢との相関性が認められ、年齢の上昇とともにテロメア長が短くなる現象が認められた。また、ヒトの健康状態を表す指標として用いられる BMI や血圧などとの相関性を検証したところ、BMI と HbA1c において有意な相関性を認めることができた。これらの因子との相関性は、いずれも各指標の上昇とともにテロメア長が短くなるという現象を示していた。

ヒトの健康状態は多くの場合、多様な要因が複合的に相互作用することで様々な疾患を引き起こす。ヒトの健康状態を表す個々の指標とテロメア長との相関性を調べる

ことも重要なことではある。他方で、複数の指標を組み合わせた総合的な解析をすることが、よりヒトの健康状態の実情を反映すると考えられる。そこで、本研究の調査項目の中から被験者集団の健康リスク要因となる3つの指標（BMI、血圧、Hb1Ac）と高地住民に特徴的な健康リスク要因である SpO₂ の4つの因子を健康リスク因子として、被験者における健康リスク因子の保有数の違いによるテロメア長への影響について検証した（Fig. 1）。その結果、健康リスク因子の数の上昇とともに、被験者のテロメア長が短くなることを認め、健康リスク因子の増加がテロメア長の短縮に重要な役割を担っていることを示唆された（ $p < 0.001$ ）。

本研究では、高地住民のテロメア長に影響をもたらす因子の探索を行ったが、BMIなどのヒトの健康状態を表す指標との相関性を認めた。これまでの研究において、BMIや各種疾患とテロメア長との相関性が認められており、本研究で得られた成果は過去の報告と一致するものであった。他方で、高地住民に特徴的な健康リスク因子として提唱されている SpO₂ との相関性が認められなかったことは、高地という環境よりも疾患による効果がテロメア長に影響をもたらす要因として重要であることを示唆するものである。テロメア長が短縮するメカニズムについては不明であるが、BMIやHbA1cなどと酸化ストレスとの相関性が指摘されていることから、高地住民の酸化ストレス状態の測定なども検証することで必要であると思われる。

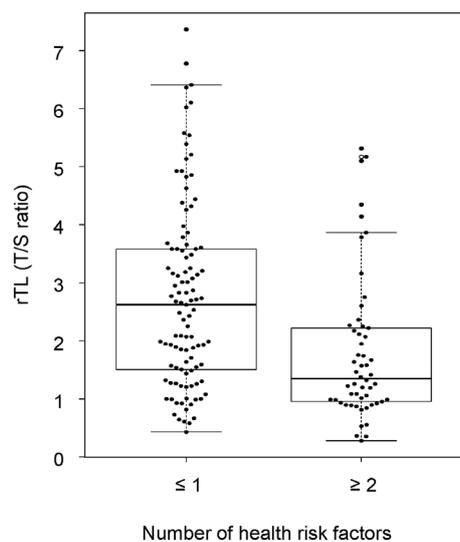
Table 1. rTL との相関性をもつ要因の検索

Variables	1st tertile	2nd tertile	3rd tertile	P value
	rTL <1.505	1.505 ≤ rTL <2.828	rTL ≥2.828	
Age (year)	49.42 ± 13.01	46.23 ± 16.00	43.83 ± 14.69	0.041
rTL (median with IQR)	0.99 (0.87-1.22)	2.07 (1.84-2.43)	3.84 (3.22-5.05)	
BMI	24.0 (22.3-25.9)	21.9 (20.3-24.9)	22.0 (20.5-24.4)	0.004
Waist circumference (cm)	78.04 ± 8.07	77.35 ± 8.49	75.61 ± 9.04	0.131
WHR	0.88 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.86 ± 0.07	0.086
SBP (mmHg)	119 (112-135)	118 (109-136)	118 (109-128)	0.426
DBP (mmHg)	76 (72-86)	77 (68-83)	78 (68-84)	0.923
Hb concentration (g/dL)	13.84 ± 1.84	13.90 ± 1.64	13.62 ± 1.61	0.503
SpO ₂ (%)	91 (89-92)	91 (89-93)	92 (90-93)	0.144
HbA1c (%)	5.9 (5.8-6.1)	5.8 (5.6-6.0)	5.8 (5.6-6.0)	0.033

リアルタイム PCR にて算出した全被験者のテロメア長を3分位点にて区分化し、年齢やヒトの健康指標との相関性を検証した。各指標について、正規分布であるデータは mean ± SD として表記し、一元配置分散分析にて解析した。また、正規分布ではないデータは median (IQR)にて表記し、Kruskall-Wallis 検定にて解析した。なお、本研究の有意水準として、 $p < 0.05$ とした。WHR, waist-to-hip ratio; Hb, hemoglobin; IQR, interquartile range。

Fig. 1.健康リスク因子とテロメア長の相関性

被験者が有する健康リスク因子の数の違いによるテロメア長への影響を調べるために、2群間（健康リスク因子の数； ≤ 1 と ≥ 2 ）での解析を行った。黒点は各被験者の rTL を表し、boxplot 内の黒太線は各群の中央値を示す。



③成果の公表
該当なし

6. 自己評価

高地住民が生活する環境では、テロメアの長さに影響をもたらすことが示唆される複数の要因（紫外線、低酸素、低温など）の存在が知られているが、どのような要因が重要であるのかについては全く検証が行われていない。一方で、これまでの報告から多様な疾患や感染症もテロメアの長さに影響することが示されている。本研究では、ヒトの健康状態を示す指標として広く活用されている因子との相関性を検証したが、結果より被験者の健康状態がテロメアの長さの違いに反映することが示唆される結果となった。近年では、被験者集団が生活する高地環境にもグローバル化に伴う生活習慣病の急拡大が指摘されており、今後において高地住民の健康状態の悪化、特に生活習慣病に起因する疾患の拡大が懸念されている。本研究でも肥満の指標である BMI や糖尿病の指標として活用されている HbA1c とテロメア長の相関性が認められており、被験者である高地住民のテロメア長に対する生活習慣病の影響を注視することが重要であると認識した。今後の詳細な解析を行うことで、テロメア長を指標することで高地住民の健康状態を評価する指標の1つとして活用できる可能性を検討したい。しかしながら、当初予定していた感染症に関する検証を行うことができなかったことは大いに不満が残る点である。その原因の詳細については不明であるが、サンプル取得後の保存法や調整法に不備や問題があったと考えており、今回の研究で生じた問題点をしっかりと検証することで今後の同様の研究を実施する際の教訓としたい。

本研究では上記にも示したように主に被験者の検診情報を中心に分析を進めたが、他方で紫外線などの環境要因については調査するに至っておらず、今後の検討課題であると認識している。環境要因を含めた多様な観点からの検証を進めることで、テロメア長に影響をもたらす真の要因に近づきたいと考えている。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名: *Entamoeba nuttalli*における表面レクチンサブユニット (Igl) の解析
課 題 番 号: 30-Ippan-10

2. 代 表 者: 橘 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・講師)
加藤健太郎 (長崎大学熱帯医学研究所・助教)

3. 決 定 額: 420 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年以降は報告数が1,000例を超えるなど、大きな問題となっている。しかし、赤痢アメーバ症の予防に有効なワクチンは未だに開発されていない。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。本研究申請者の橘らは、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。そして、Igl1 の C 末端側がワクチンとして有望であることをハムスターの肝膿瘍形成の系で報告した (Min *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016)。しかし、赤痢アメーバは齧歯類には経口感染しないため、実験動物を用いたワクチンの検証実験には限界がある。一方で橘らは、赤痢アメーバに近縁で、マカク類を固有宿主とする病原アメーバ *Entamoeba nuttalli* を初めて分離した (Tachibana *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2007)。*E. nuttalli* を用いれば、霊長類を宿主としたワクチン開発研究が可能になると考えられる。そこで、本研究においては *E. nuttalli* の Igl を同定するとともに、その機能について赤痢アメーバや病原性のない *Entamoeba dispar* の Igl と比較解析する。また、*E. nuttalli* の Igl における機能部位の検索を行うとともに、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

平成30年度は、構築した *E. nuttalli* 用の強制発現ベクターについて、まず、GFP 遺伝子を用いて *E. nuttalli* への導入条件を検討する。エレクトロポレーション法とり

ポフェクション法を試みる。導入法を確立することができれば、Igl 過剰発現株の樹立を試みる。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、ベクターのみを導入した株と比較検討する。蛋白質レベルでの発現量解析には、*E. nuttalli* の Igl1 と Igl2 にそれぞれ特異的なモノクローナル抗体を作製し、使用する。また、赤痢アメーバへのベクターの導入条件は確立できているので、*E. nuttalli* 遺伝子を赤痢アメーバに導入する系についても検討する。次に、*E. nuttalli* 内で任意のタンパク質の発現抑制を可能にするプラスミドベクターの構築を行い、Igl 遺伝子の発現抑制株の樹立を試みる。樹立できれば、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。将来的には、アカゲザルあるいはカニクイザルを用いた感染実験を実施し、Igl のワクチンとしての可能性について検討する。

③予想される成果

これまでの研究で、病原性のある赤痢アメーバと病原性のない *E. dispar* において Igl 遺伝子の発現量を比較し、Igl1 については赤痢アメーバにおける発現量が高いのに対し、Igl2 の発現量には差がないことを明らかにしている。従って、*E. nuttalli* においても、同様に Igl1 の発現量が高いことが確認できれば、Igl1 が病原性の発揮に重要であると考えられる。また、*E. nuttalli* の Igl について組換え型断片を作製することで、同様の溶血活性を保持しているかどうか、そして、その活性部位の検索も可能になる。

赤痢アメーバ Igl の病原性発現メカニズムを解析する上で、遺伝子操作を行った虫体を用いて固有宿主での感染実験を実施できれば理想的である。しかし、赤痢アメーバは遺伝子操作によって性質を変化させることはできるものの、ヒトへの感染実験は倫理的観点から実施できない。これに対して、申請者らが新たに分離した *E. nuttalli* は、赤痢アメーバに近縁でサル類に感染する病原性アメーバであるため、固有宿主を用いた感染実験が可能である。しかしながら、*E. nuttalli* についての遺伝子操作の技術はまだ開発されていない。*E. nuttalli* に適した遺伝子操作のベクターを構築し、Igl 遺伝子の発現量改変株を樹立して比較解析することにより、Igl の機能を明確に証明できると考えられる。さらに、*E. nuttalli* はヒトにも感染する可能性が指摘されていることから、その病原性発現のメカニズムを解明することは、将来的にヒトへの感染が拡大した際の対策を講じる上でも重要である。*E. nuttalli* の解析研究から、赤痢アメーバの解析にも還元できる知見を得ることも大いに期待できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

1) Igl 組換えタンパク質の調製

E. nuttalli P19-061405 株 clone7 のゲノム DNA を鋳型に、Igl1 と Igl2 について、

シグナル配列を除く全長をコードする遺伝子を PCR 増幅した。pET19b に組み込んでクローニングし、大腸菌において組換えタンパク質を発現させた（東海大学組換え DNA 実験承認番号：組 18-010-23、長崎大学組換え DNA 実験承認番号：第 1503131304-2 号）。

2) 溶血活性の測定

馬赤血球に対する組換え型 Igl の溶血活性を Kato *et al.* (2015) の方法によって測定した。赤痢アメーバの組換え型 Igl を陽性対照として使用した。

3) *E. nuttalli* への遺伝子導入の条件検討

前年度に構築した *E. nuttalli* 用タンパク質強制発現用ベクター pEnEx/GFP をリポフェクション法ならびに電気穿孔法で、様々な試薬や条件を用いて *E. nuttalli* 内に導入を試みた。また、pEnEx/GFP 内に存在する各非翻訳領域 (UTR) の相同性の高さからタンパク質発現機構の互換性が予想できる赤痢アメーバヘリポフェクション法での導入を行い、機能的なベクターとしての pEnEx/GFP の評価を行った。

②成果 (結果+考察)

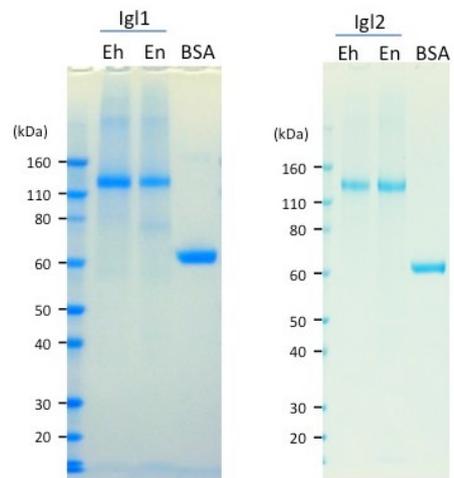
1) *E. nuttalli* 組換え型 Igl の調製

E. nuttalli の Igl1 と Igl2 について、赤痢アメーバの Igl と同等の純度の組換えタンパク質を調製できた (図 1)。

図 1. 組換え型全長 Igl の SDS-PAGE 像

Eh: 赤痢アメーバ; En: *E. nuttalli*;

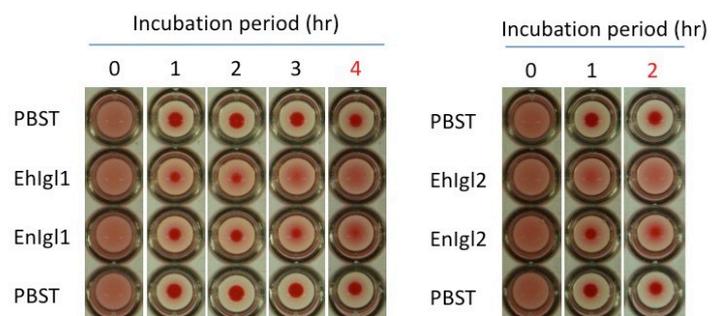
BSA: ウシ血清アルブミン, 各 1 μg



2) *E. nuttalli* Igl における溶血活性の解析

E. nuttalli の Igl1 と Igl2 について、馬赤血球に対する溶血活性を調べた。*E. nuttalli* の Igl においても、赤痢アメーバ Igl の場合と同様、経時的に進行する溶血像が観察された (図 2)。遊離したヘモグロビン濃度を定量したところ、PBST 処理 (陰性対照) に比べて有意に高かった (図 3)。*E. nuttalli* と赤痢アメーバのそれぞれのアイソタイプ間では、差は認められなかった。従って、*E. nuttalli* の Igl においても、基本構造を共有する赤痢アメーバや *E. dispar* の各 Igl と溶血活性には差がなく、発現量の差が病原性の差に影響していると考えられた。

図 2. *E. nuttalli* の全長 Igl (EnIgl1, EnIgl2) と赤痢アメーバの全長 Igl (EhIgl1, EhIgl2) による溶血像



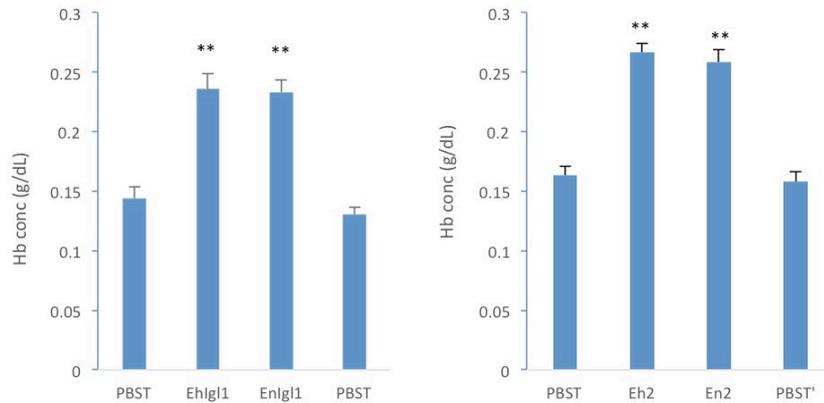


図 3. Igl 溶血活性の遊離ヘモグロビン濃度測定による比較

** 多重比較検定 (Dunn's test) にて PBST と比較し、有意差あり
EhIgl1 と EnIgl1, EhIgl2 と EnIgl2 の活性間には有意差なし

3) pEnEx/GFP の *E. nuttalli* および赤痢アメーバへの遺伝子導入

E. nuttalli へのリポフェクション法を用いた遺伝子導入に関して、赤痢アメーバでの実績がある Lipofectamine® (Thermo Fisher Scientific) を用いて複数条件で導入を試みたが、成功には至らなかった。また、リン酸カルシウム法も含めた他社のトランスフェクション試薬での導入や、他の *Entamoeba* 種で用いられている条件を参考に複数条件での電気穿孔法を試みたが、同様の結果となった。pEnEx/GFP の赤痢アメーバへの導入操作後の共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、導入効率および発現量は低いものの緑色の蛍光を発する虫体の観察に成功し (図 4)、この蛍光が GFP と同じく 510 nm 付近に最大の蛍光波長を示すことが分かった (図 5)。これは、赤痢アメーバ内において pEnEx/GFP から GFP が産生されたこと、および我々が試行した手法では *E. nuttalli* 内部へと「導入」ができていないことを示唆している。このように、ベクターの機能には問題がないと考えられるので、*E. nuttalli* への導入法については、今後の検討が必要である。

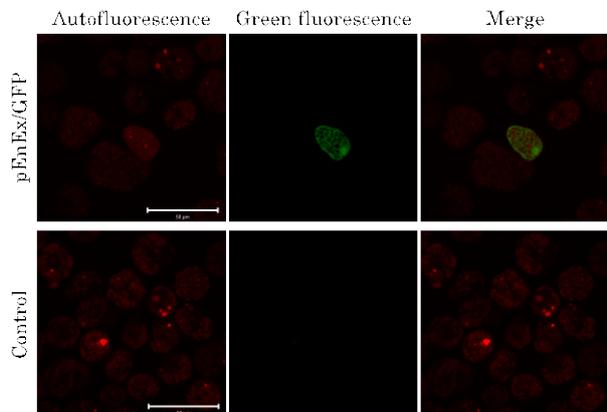
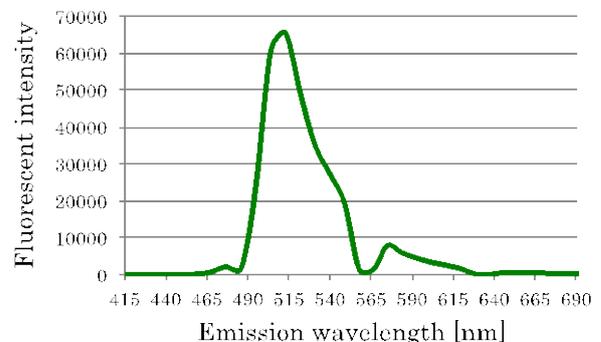


図 4. pEnEx/GFP を導入された赤痢アメーバの蛍光像

図 5. 蛍光像の波長分析



③成果の公表

論文発表

なし

学会発表

1. 加藤健太郎、牧内貴志、橘 裕司：赤痢アメーバレクチン Igl サブユニットの溶血活性領域の同定（第 88 回日本寄生虫学会大会、長崎大学坂本キャンパス、2019 年 3 月 16 日）
2. 加藤健太郎、牧内貴志、橘 裕司：赤痢アメーバレクチン Igl サブユニットの溶血活性領域の同定（第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2018 年 11 月 29 日）
3. 加藤健太郎、牧内貴志、程 訓佳、橘 裕司：*Entamoeba histolytica* Igl レクチンの役割（第 37 回日本糖質学会年会、仙台国際センター、2018 年 8 月 30 日）

6. 自己評価

今年度も昨年度と同一の構成メンバーにより、継続課題として共同研究を実施した。昨年度は、*E. nuttalli*の組換えタンパク質の調製が遅れたため、年度内に溶血活性の比較解析には至らなかった。今年度には Igl1 と Igl2 を調製でき、明瞭な解析結果が得られた。一方で、*E. nuttalli*における Igl の強制発現については、*E. nuttalli*用の発現ベクターを初めて構築することはできたが、形質転換株を作製することができなかった。赤痢アメーバでは豊富に経験のあるリポフェクションによる条件の他、電気穿孔法による条件検討も行ったが成功しなかったことから、近縁の *Entamoeba* であっても、細胞膜などの性質の違いが大きいことが予想された。*E. nuttalli* Igl の発現量改変株を用いた溶血活性の比較解析に至らなかったのはマイナス評価であるが、*E. nuttalli* 用の発現ベクターを赤痢アメーバへ導入することができ、ベクターの機能には問題がないことを確認できた。また、赤痢アメーバの Igl における活性部位の絞り込みについての成果が得られ、学会発表を行った。以上の状況をふまえ、不満は残るものの一応の成果を挙げられたと判断し、達成度はⅡとした。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : ケニアにおけるロタウイルスゲノム多様性の解析

課 題 番 号 : 30-Ippan-11

2. 代 表 者 : 河本 聡志 (藤田医科大学医学部・講師)

共 同 研 究 者 : 谷口 孝喜 (藤田医科大学・名誉教授)

前野 芳正 (藤田医科大学医学部・准教授)

井手 富彦 (藤田医科大学研究支援推進センター・助教)

3. 決 定 額 : 810 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ロタウイルス胃腸炎により、アフリカ・アジアの発展途上国を中心に年間 25 万人以上の乳幼児が死亡している。2 種のヒトロタウイルスワクチン (Rotarix と RotaTeq) が開発され、130 ヶ国以上で認可、70 ヶ国以上で定期接種されている。これらワクチンの有効率は、先進国ではきわめて高いが開発途上国ではかなり低い。その理由は、開発途上国では特異な血清型 (遺伝子型) を有するウイルス株が分布すること、動物ロタウイルスのヒトへの種間伝播が起きていることなどが考えられる。また、ワクチン接種開始後に特定の遺伝型を有するロタウイルスの検出が高頻度となり、分布ロタウイルス株の性状に様々な変化が見られるようになった。本研究では、ケニアにおけるワクチン接種開始前後でのロタウイルス株の遺伝子型の変遷とそのメカニズム、特にワクチン効果と分布するロタウイルス株の性状との関連を調査する。

②研究内容

ロタウイルス胃腸炎下痢便を収集し、抽出したウイルスゲノム dsRNA を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動によるゲノム RNA パターン (RNA electropherotype) のグルーピング (年次的変化)、semi-nested RT-PCR による G/P ジェノタイプングを行う。非定型ウイルス株とランダムに選別した定型ウイルス株について次世代シーケンサー (MiSeq) を用いて全ゲノム解析を行う。これにより、G/P タイプの分布と年次的変化を知るとともに、非定型ロタウイルス株の全 11 本の遺伝子分節各々の由来を明確にし、ケニアにおけるロタウイルスワクチン導入前後のロタウイルスゲノム多様性の実態を把握する。また、ロタウイルスの大きな抗原 (遺伝子) 変異は、開発途上国で動物ロタウイルスのヒトへの種間伝播を経て発生しやすいので、世界的視野に立ってロタウイルスの生態と進化を追究したい。

研究手法は以下の通りである。

1. 胃腸炎下痢便の収集：ケニア拠点および研究協力者である KEMRI（ケニア国立医学研究所）の研究者経由で乳幼児下痢便を収集する。
2. A. 約 20%の便懸濁液を Eagle's MEM を用いて調製する。B. 便懸濁液からロタウイルス dsRNA ゲノムを抽出する。C. Semi-nested RT-PCR により G/P ジェノタイプングを行う。必要に応じて VP7 と VP4 遺伝子の塩基配列を決定して遺伝子型の確認を行う。D. 非定型ウイルス株および一部の定型ロタウイルス株について、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンシングを行う。決定した塩基配列を用いて各遺伝子分節の系統樹解析を行い、各遺伝子の由来を明確にする（全ゲノム解析）。

③予想される成果

これまでの経緯から、アフリカにおけるロタウイルス株の性状を解析することにより、動物ロタウイルス株由来の遺伝子分節を持った非定型ヒトロタウイルス株が高頻度に検出できるものと期待される。特に、密な接触に起因すると考えられるウシやブタといった家畜動物由来のロタウイルス株由来の遺伝子分節を有する非定型的なヒトロタウイルス株が多数分離できるものと期待される。一方で、全ゲノム解析により全 11 本の各遺伝子分節の由来を明確にできることから、こうしたロタウイルスの種間伝播は進化的レベルというスケールではなく、リアルタイムで高頻度に起きていることを明らかにできると思われる。また、ロタウイルスワクチン導入に伴い、ケニアにおいても DS-1 様 G1/2/3/8P[8]株が出現するかもしれない。すでに私たちが検出している DS-1 様 G3P[6]株も DS-1 様 G3P[8]株と同じようにその感染地域を急速に拡げるかもしれない。こうして、ロタウイルスワクチンが接種され始めたケニアで本研究を展開することで、ワクチン導入による選択圧とこれら稀有な新興ウイルス株出現との関連を明らかにすることができる手掛かりが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

ケニアのキアンブ地域（首都ナイロビの郊外）において、2009～2016年に乳幼児下痢症患者からロタウイルス抗原陽性 2,204 便検体を収集した。この収集にあたっては、KEMRI ERC（倫理委員会）の承認を得ている。非定型的である G3P[6]遺伝子型を有する KDH1951 株（2014年7月に5ヶ月男児から分離）と KDH1968 株（2014年8月に6か月女児から分離）について MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行い、全ゲノムシーケンスに基づく系統関係を調査した。リファレンス株として、同時期にキアンブ地域で分離された3株の G8P[4]株（KDH1111 株、KDH1255 株、KDH1629 株）についても同様に MiSeq シーケンシングを行った。ロタウイルス遺伝子型の決定には RotaC、系統樹の作成には MEGA7 を使用し、ML 法により行った。

②成果（結果＋考察）

ロタウイルス粒子は、全 11 本の分節遺伝子をゲノムとして保有する。ウイルス粒子表面の2つのカプシド蛋白質 VP7 と VP4 は独立した2種類の血清型（遺伝子型）G および P タイプを規定し、G1~G36、P[1]~P[51]と多様性は顕著である。さらに、残る 9 遺伝子にも多様性が認められ、全 11 本の全ての遺伝子型（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。ヒトロタウイルスは、Wa-like 遺伝子群と DS-1-like 遺伝子群の2つに大別されるが、遺伝子型は各々 G1/3/4/9/12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1、G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 と表記する。

昨年度までに、ケニアにおいてロタウイルスワクチン（Rotarix）が導入された2014年7月以降に検出が増加した非定型株として G3P[6]株が挙げられた。G3はP[8]との組み合わせが一般的であり、内部遺伝子は通常 Wa-like（I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1）である。そこで今回、代表的なケニアに出現した G3P[6]株となる KDH1951 株と KDH1968 株について、MiSeq シーケンシングを行い、全ゲノム塩基配列を決定した。これら2株の全 11 本の遺伝子型の組み合わせはいずれも G3-P[6]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であり、DS-1-like のバックボーンを示し、これはアフリカ由来の G3P[6]株に共通した特徴であった。一方で、3株のケニアの G8P[4]株はいずれも G8-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 を有しており、やはり DS-1-like のバックボーンであった。KDH1951 株と KDH1968 株はほぼ同一であり、また、いずれの遺伝子分節も 2012～2013年にウガンダで検出された G3P[6]株ときわめて近縁であり、ケニアとウガンダでほぼ同時期に分離された G3P[6]株の由来は共通であると考えられた。一方で、これら G3P[6]株の内部遺伝子はいずれも G8P[4]株とは由来が異なっていた。さらに、これら G3P[6]株の VP7 と VP4 上の中和抗原エピトープ配列をワクチン株（Rotarix、RotaTeq）のものと比較したところ、アミノ酸配列に多数の置換が認められた。

ケニアにおいても、ロタウイルスワクチン（Rotarix）が2014年7月に導入開始された。ワクチン導入開始前後の自然界におけるロタウイルス株の遺伝子型分布に及ぼ

す影響を慎重に調査しなければならない。すでにロタウイルスワクチンが導入された国々では、接種拡大とともに、分布ロタウイルス株の大きな変遷がみられる。Rotarixが導入された国々では、G2P[4]株の比率が上昇している。わが国でも、G2P[4]株の比率が上昇しているほか、内部遺伝子が全て DS-1-like (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) である DS-1-like G1/3/8P[8]株が検出されるようになった。こうして、ロタウイルスワクチンによる選択圧の影響で、分布するロタウイルス株の遺伝子型が変化したかどうか議論となっている。今回解析した、Rotarix 導入開始直後にケニアに出現した非定型的な G3P[6]株も内部遺伝子がすべて DS-1-like の DS-1-like G3P[6]株であり、Rotarix ワクチン導入開始と関連しているのかもしれない。ロタウイルスワクチン導入開始前後でのロタウイルス株遺伝子型の分布状況の変遷について、注意深く調査する必要がある。

③成果の公表

論文発表

Wandera EA, Komoto S, Mohammad S, Ide T, Bundi M, Nyangao J, Kathiiko C, Odoyo E, Galata A, Miring'u G, Fukuda S, Hatazawa R, Murata T, Taniguchi K, Ichinose Y. Genomic characterization of uncommon human G3P[6] rotavirus strains that have emerged in Kenya after rotavirus vaccine introduction, and pre-vaccine human G8P[4] rotavirus strains. *Infect Genet Evol.* 2019 68:231-248.

6. 自己評価

ケニアにおいて ELISA によるロタウイルス抗原陽性下痢便のスクリーニング、semi-nested RT-PCR によるジェノタイピングが順調に稼働している点は十分に評価できる。さらに、Rotarix ワクチン導入後に、ケニアに出現した非定型的な G3P[6]株について MiSeq を用いた全ゲノムシーケンス解析を行い、国際誌に発表できたことも評価できる。こうして、ケニアのロタウイルス研究においても、全ゲノムシーケンス解析が威力を発揮し始めた。今後も、非定型的な G/P 遺伝子型を有するロタウイルス株を中心に全ゲノム解析を行い、わが国のような先進国ではほとんど見られないロタウイルス株の起源と進化についての重要な知見を蓄積していきたい。

ケニアにおいて ELISA と RT-PCR の実験系は軌道に乗ったが、ロタウイルスゲノムのポリアクリルアミドゲル電気泳動はまだ導入途中段階であるので、技術移転を早急に行うべきと考えている。これにより、各国で Rotarix ワクチン導入後に分布比率が上昇している DS-1-like ロタウイルス株の検出が効果的に行えるようになると期待される。また、ロタウイルスワクチン導入開始前後の自然界における流行ロタウイルス株遺伝子型が影響を受けて、どのように変遷するかを長期的に調査する必要がある。今年度の研究成果を基礎として、さらに発展させる道筋をつけることができた点には満足している。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：フィリピン諸島におけるベクターコントロール戦略の提案
課 題 番 号：30-Ippan-12

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
立木佑弥 首都大学東京理工学研究科・助教
高木舜晟 九州大学大学院システム生命科学府・博士前期課程

3. 決 定 額：440 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

これまでの感染症研究はヒトが興味を中心であり、ウイルスや病原菌、寄生虫はその中心ではなかった。一方、分子生物学の隆興とともに、ウイルスや病原菌を理解する研究が躍進したが、そこに「生態」という言葉はなかった。しかしながら、ウイルス学では急速な進化が問題視され、進化学や生物情報学の手法を用いて詳しく研究されるようになってきた。また、昆虫媒介性の感染症については、媒介生物自体の生態学研究も行われ、その手法はフィールド生態学のそれと類似している。今、まさに、生態学や進化学と感染症疫学の境界があいまいになりつつある。

ネッタイシマカなどの蚊によって媒介されるデング熱の原因であるデングウイルスの流行を例にとった場合、それら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生物（ベクター）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。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。さらに、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恐れがある。そして、これらの抵抗型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・繁殖を繰り返すことで定着する。このような非流行地域での抵抗型の常在化は、殺虫剤によるベクター除去を無効化するのである。即ち、**都市化に伴う人口増大や交通網の発達を考慮した状況における、抵抗型が集団内に伝播・定着するダイナミクスを理解した上でのベクターコントロールが希求されている**。まさに、生態学や進化学の分野で蓄積されてきた理論を実装したデータドリブン型のコンピュータシミュレーションの援用がベクターコントロール戦略を確立するために不可欠となりつつある。

申請者グループは、平成 28 年度の本共同研究に採択された課題 "数理モデルを用

いた Dengue 媒介蚊の遺伝分化・流動動態の定量的予測"の実施により、皆川教授から提供を受けた E. Fonzi et al., PLoS NTD, 2015 に掲載されている船舶の往来が盛んなフィリピンの 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解析する数理モデルおよび大規模シミュレータの開発に成功した。また、Approximate Bayesian Computation (ABC) を含む最新のパラメータ推定手法を駆使して、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、Dengue ウイルスを媒介しない遺伝子改変ベクターや殺虫剤抵抗性ベクター）が各島に定着するまでの待ち時間なども計算可能になった（次節参照）。しかし、開発したシミュレータにはヒトの個体群動態、また、各港付近の人口の増大や一極集中、船舶往来ネットワークの変化、貨物輸送量の変化など都市化に伴う要素を考慮できていない。そこで、本研究では生態学と進化学、生物情報学の融合的アプローチを駆使して以下の課題について分析していく：

1. 抵抗性型が出現した場合の伝播動態をシミュレートして、実際の船舶往来ネットワーク上のどの局所集団で出現すると最も伝播リスクが高いかを定量的に分析する
2. 船舶の往来ネットワークが変化した場合、抵抗性型の伝播リスクの変動を定量的に分析する
3. 人口の増加や大都市へ集中の影響が抵抗性型の伝播リスクに与える影響を定量的に分析する
4. ヒト個体群動態と結合させたシミュレータを開発し Dengue ウイルスの伝播評価法を開発する

これらの知見はフィリピン諸島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、Dengue 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ことで、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。

② 研究内容

前半：2018年4月1日～2018年9月30日（上記1, 2, 3に取り組む）

現在までの研究により、15港間で行われているベクター往来がシミュレートできるようになった。そこで、開発した大規模シミュレータを用いて、殺虫剤抵抗型が出現した場合の抵抗型の伝播動態を計算できる枠組みを構築する。特に、実際の船舶往来ネットワーク上のどの局所集団（港）で抵抗型が出現すると最も伝播リスクが高いかを定量的に分析していく。また、都市化に伴う船舶の往来ネットワークの変化が抵抗型の固定確率に与える影響を解析する。例えば、**図2**は任意の2港を選んで貨物輸送量を10%増加させた場合、抵抗型の固定確率がどのように変化するかを計算した検討結果を示している。興味深い点は、固有ベクトル中心性がトップ2の(1)p3:Batangasと(2)p6:Calapanの港間ではなく、(1)p3:Batangasと(4)p10:Puerto Princesaの港間の貨物輸送量を増加させたシナリオが最も抵抗型の固定確率が増加する点である。これらの検討分析の結果は、1998年を契機とする複雑ネットワークの研究の大きなテーマの1つである“スモールワールド・ネットワーク上における感染症流行動態”として扱われてきた単純なネットワーク問題とは異なること、即ち、フィリピン諸島に

におけるベクターコントロールが船舶往来ネットワークの固有ベクトル中心性の分析にみでは不十分であることを示している。研究期間の前半では、開発したシミュレータを発展させ、特に、港間の移出入率および貨物輸送量に注目して、抵抗型の固定確率を考慮した伝播リスクを定量的に評価していく。また、フィリピン諸島の都市化を想定した人口の増加や集中の各種シナリオ下での抵抗型の伝播リスクを分析する。年代ごとのセンサスデータの時系列は、公共データとして利用可能である。

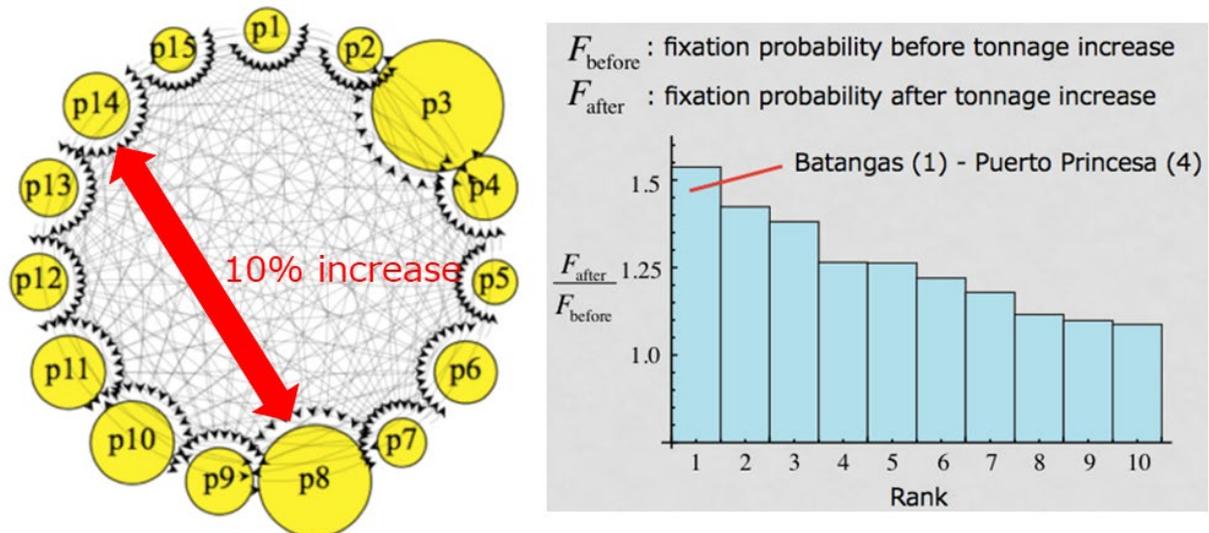


図1.都市化に伴う船舶往来ネットワークの変化と変異株固定確率への影響

後半：2018年10月1日～2019年3月31日（上記4に取り組む）

研究期間の後半では、ヒトの個体群動態、すなわちデングウイルスの伝播モデルを現在開発しているベクターの遺伝子流動モデルに結合させたシミュレータを開発する。ヒトの個体群動態は有限集団としてギレスピーアルゴリズムを用いて感染伝播を記述する必要がある（決定論的に記述すると感染症は瞬く間に広がり現実的でない）。生物学的に妥当なデングウイルスの伝播モデルのパラメータについては、熱研対応教員である皆川教授と協力して収集するフィリピン諸島におけるデングウイルスの疫学データから推定する。そして、結合シミュレータを用いてより抵抗型が出現した場合の流行動態とそれに伴う固定確率を網羅的に計算する。これらの分析により、どの港付近で抵抗型が発生した場合に、最も速やかに広がるのかが明らかになる。これらの知見は、ベクターコントロールの一助になると期待できる。また、将来的には、貨物輸送量や人の暮らしといった経済的な価値も含んだ上で、抵抗型の伝播リスクを評価する新規手法の開発にも展開していく。

③予想される成果

本研究では、生態学・進化学・情報生物学・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遺伝子改変ベクターや殺虫剤抵抗性ベクターの伝播リスクを評価し、ベクターコントロール戦略を提案していく。特に、媒介蚊のマイクロサテライト配列データから明らかになったフィリピン諸島の15港間で遺伝子流動の動態から、都市化に伴う人口増大や交通網の発達を考慮した状況で、抵抗型が集団内に伝播・定着するリスクが分析できる。以下、本研究を遂行する事で期待される成果を列挙する：

- ・ 抵抗型遺伝子の流動動態、あるいは、集団への固定時間が予測できるようになる
- ・ 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などが提案できるようになる
- ・ 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を検討できるようになる
- ・ 人口の増大や一極集中など都市化が媒介昆虫に与える影響を検討できるようになる

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【マイクロサテライト配列データを解析する個体ベースシミュレーション】

15 個の港に対応する生息地をもつ数理モデルを構築した。ここで各島のベクター集団はそれぞれ遺伝子プールを保持していると仮定している。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 や突然変異率 u を考慮している。構築した数理モデルを個体ベースシミュレーションで実装し、港間におけるベクターの遺伝的距離のダイナミクスの計算が可能になった。さらに、ABC を用いたマイクロサテライト配列データとのフィッティングにより推定された数理モデルのパラメータを用いて、15 港間 (p1-p15) での遺伝子流動を再構築・可視化することに成功した (図 2)。矢印の向き・太さが遺伝子流動の向き・強さ、エッジの大きさが各港の貨物量を表している。

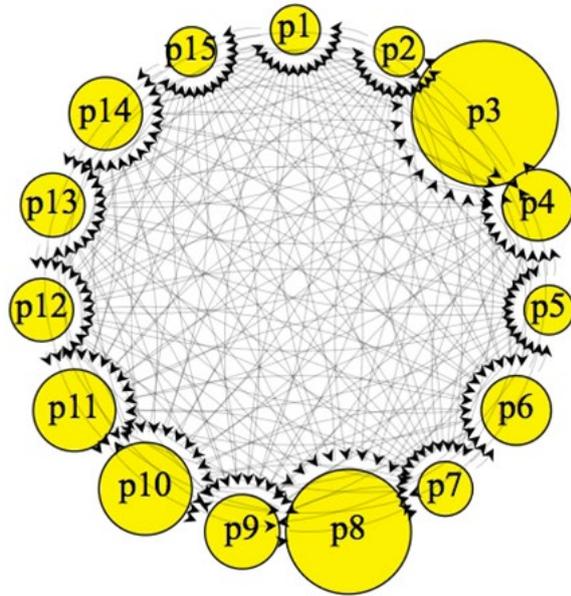


図2.15 港間の遺伝子流動の視覚化

各 15 港を結ぶ船舶往来ネットワークを arcGIS により抽出し、隣接行列を構築した。また、隣接行列を用いたネットワーク分析により固有ベクトル中心性を計算した。すなわち、高い次数の中心性を持つ港とつながっている港を特定することに成功した。(1)p3 : Batangas, (2)p6 : Calapan, (3)p9 : Odiongan, (4)p10 : Puerto Princesa, (5)p12 : Roxas の順で固有ベクトル中心性が高いトップ 5 の港となった。これらは抵抗型伝播を抑制するための施行を行う島の候補となる。

②成果 (結果+考察)

【船舶往来ネットワークの解析】

各 15 港を結ぶ船舶往来ネットワークを arcGIS により抽出し、隣接行列を構築した。また、隣接行列を用いたネットワーク分析により固有ベクトル中心性を計算した。すなわち、高い次数の中心性を持つ港とつながっている港を特定することに成功した。(1)p3 : Batangas, (2)p6 : Calapan, (3)p9 : Odiongan, (4)p10 : Puerto Princesa, (5)p12 : Roxas の順で固有ベクトル中心性が高いトップ 5 の港となった。これらは抵抗型伝播を抑制するための施行を行う島の候補となる。

【ネットアイシマカ集団構造の推定】

個体ベースシミュレーションを用い、15 港に生息するネットアイシマカのマイクロサテライト配列を再現するパラメータ推定を行った。具体的には各港での集団サイズ、突然変異率、および港間の移住率を、遺伝的距離 R_{ST} という要約統計量のもとで近似ベイズ法により求めた。船舶 1 隻あたりのネットアイシマカ個体の有効移入数は 1~10 個体程度の間で、航路により変化することが判明した。また、推定値の事後分布は収束が確認されている。これまでの先行研究による集団遺伝学的手法では同データセットに対して収束に至らないことも多いことから(e.g. MIGRATE-n 3.6.1)、本手法による推定の有効性が示された。

【推定ネットワーク上における変異株固定確率】

上述のパラメータ推定により、ネッタイシマカの集団構造が得られたため、このネットワーク上において突然変異株の伝播をシミュレートし、リスク評価を行う。これまでネッタイシマカの変異株としては、殺虫剤(DEET)耐性を獲得した個体が発見されており(Kain et al., Nature 2013)、このような個体はヒト集団内で高い適応度を示すことが想定される。そこで、この変異が1遺伝子座2対立遺伝子でコントロールされていると仮定し、在来型の遺伝子型AAに対して変異型のホモ接合個体aaでは選択係数 s だけ適応度が高く、ヘテロ接合個体Aaでは sh だけ適応度が上昇するとした。ここで、 h は2倍体における優性度である。集団サイズと移入率が推定されたネットワーク上で個体ベースモデルを計算し、全集団に変異が広がることで在来個体が居なくなれば“固定”、反対に変異個体が観察されなくなった場合は“消失”とみなす。リスク評価は航路ごとに行い、対象航路の輸送量(およびネッタイシマカの個体数)が10%上昇した際に、変異型の固定確率がどれだけ上昇するかを相対値として定量化した。

固有ベクトル中心性の高い港の間で移入個体数が多いため、船舶往来のネットワーク解析から(1)p3: Batangas, (2)p6: Calapan の組み合わせで変異の伝播リスクが高いと推測しているが、予想に反して(1)p3: Batangas と(4)p10: Puerto Princesa の間で最も高リスクであった。この結果を解釈するために、移入率のみではなく集団サイズと固定確率の関係性に着目すると、集団サイズが大きいほど有利な突然変異が固定する確率が高く、変異の伝播に貢献していることが明らかとなった。つまり、中心性が4位であるp10: Puerto Princesaは集団サイズでは全体の2位であり、一方中心性が2位であるp6: Calapanは集団サイズが5位であるため、変異伝播の全体の効果としてはp10: Puerto Princesaの果たす役割が大きかったと解釈できる。この結果から、リスク評価には船舶航路の輸送量ネットワークの解析のみでは不十分であることが明らかになるとともに、集団遺伝学的な影響を考慮したシミュレーションが有効であることが示唆された。また、本リスク評価をもとに、ベクターコントロールのための効果的な交通流操作を提案することが可能となった。

上記の結果に加え、将来の人口の増減を現在の公共データ(2013年までの公開済みデータを使用)から外挿によって算出し、ネッタイシマカの集団サイズに反映するシミュレーションを構築した。ネッタイシマカの集団サイズはヒトの集団サイズにすると仮定したところ、ヒトの個体群動態を加味した解析でも前述と同様の結果が得られている。今後は気候変動や気温変化とネッタイシマカの集団サイズの関係性を統計モデルによって推定し、個体ベースシミュレーションの個体群動態に組み込むことで、より詳細な解析を追加する。

③成果の公表

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、相互発展的にフィリピン諸島におけるベクターコントロール戦略を解析する事ができた。そして、生物学的な妥当性が十分に担保され、かつ、昆虫媒介性の感染症を対象とした（特に、公共交通機関などが充実していない非都市部）データ解析の枠組みを構築する事が出来た。新規性の高い点は、都市化に伴う人口増大や交通網の発達を考慮した状況における、抵抗型が集団内に伝播・定着するダイナミクスを分析した点である。今後は、これらの用法を組み込んだメタ個体群モデルを構築し、フィリピン諸島におけるベクターコントロール戦略を定量的に評価するシミュレータの開発に取り組んでいく。特に、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を分析していく。また、シミュレータによる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などが提案できる研究にも展開していきたい。以上のように、ネットワーク上の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

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：ルワンダ共和国における早産児の有病割合、リスク要因と予後の検討
課 題 番 号：2018-Ippan-13
2. 代 表 者：頼藤 貴志（岡山大学大学院 環境生命科学研究科
生命環境学専攻 人間生態学講座・准教授）
共同研究者：レオン ムテサ（ルワンダ国立大学 人類遺伝センター・センター長）
トワリ マリールイズ（NPO 法人 ルワンダの教育を考える会・代表）
アキンティジェ シンバ カリオペ（長崎大学医歯薬学総合研究科リー
ディング大学院・大学院生）
3. 決 定 額：730 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

早産児（在胎期間 37 週未満の児）出生は、新生児期における主要な死亡原因の一つであり、世界中で発生する新生児死亡の 28%を占める（Lawn et al., 2010）。早産児出生の割合は世界中で増加しており（WHO, 2015）、特に低所得国では小児の健康に与える影響が大きい。この現状は、アフリカ諸国でもみられるが（Kinney et al., 2010）、先行調査では都市部に限定された検証にとどまっている。

ルワンダ共和国は、アフリカ諸国においていち早く ICT 産業の発展に取り組み、医療への応用も進められている。妊婦および出生児の健康状況がデータとして一元的に保管されていることから、疫学研究への活用が容易である。本研究ではこうした状況に着目し、上述した早産児出生に関する調査を同国ルシジ地域にて実施する。同地域は西国境に面し、中部アフリカ地域との交流、影響が大きい。熱研国際保健学分野のカウンターパートである公立ミビリジ病院において出生した全出生児を対象とし、早産児の出生割合を評価するとともに、そのリスク要因を検討する。また、早産出生児の予後（新生児病棟入院や退院までの死亡）を評価し、早産出生と死亡との関連についても検討する。特に、介入可能と考えられる母体年齢・母体体格・出生前健診といった要因と早産児出生の関連を評価する。さらに、出生児の在胎期間や早産児出生と予後（新生児病棟入院や退院までの死亡など）との関連を評価することにより、予後を良好に保つためにはどれぐらいの在胎期間が必要なのかを検証し、当地における分娩管理の資料とする。これらの結果から、熱帯地域（特に中部アフリカ地域）における早産児出生対策および早産児ケアに対する提言を行う。

②研究内容

まず、ミビリジ病院において 2011 年～2016 年に出生した全出生児（約 16,000 出生）を対象として、属性情報、妊娠分娩歴、臨床所見、分娩情報、出生児情報のデータを抽出してデータセットを作成する。

記述統計により早産児の出生割合・年次別出生割合の変化を評価する。次にロジスティック回帰分析を用い、母体年齢・母体体格・出生前健診などの要因と早産児出生の関連を評価する。更に、在胎期間・早産児出生と出生児アウトカム（生存退院・死亡退院）との関連を評価する。得られた結果を基に、学会報告や学術誌への投稿を行う。また、ルワンダ共和国に渡航し、連携機関を通して保健省や関係機関への提言ができる場を設け、保健施策へのフィードバックを試みる。

③予想される成果

研究対象とするルシジ地域は、ブルンジ共和国やコンゴ民主共和国と接する農村部を内包しており、中部アフリカ地域の一般社会モデルとして提示できる。アフリカでの先行研究では、地域によって早産児の出生割合に大きなぶれ幅があることが示されているが、リスク要因はほとんど検討されていない状況である。そのため、同地域における早産児出生割合の動向とリスク要因の評価は、ルワンダ国内だけでなく、より広域的な小児医療に重要な示唆を与えうる。

母体の年齢や体格、出生前健診の有無などが早産児出生と関連があるとわかれば、当該地域で早産ハイリスクにあると思われる対象者に介入を行うことが可能になる。また、在胎期間や早産出生と予後の関連を評価することにより、当該地域での分娩管理において貴重な資料になりうると思われる。

ミビリジ病院での出生数（約 16,000 人/6 年間）は数的にも大きく、疫学統計解析の上で信頼性が高い結果が得られる。今回の研究成果をルワンダ共和国の保健行政へとフィードバックさせることにより、小児保健に対して幅広い波及効果が期待できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

対象

ルワンダ共和国公立ミビリジ病院において 2011 年～2016 年に出生した母児ペア（計 6,210 出生）を対象とした。

方法・手続き

ルワンダ共和国と日本両国で、倫理審査が承認された後、研究を開始。属性情報、妊娠分娩歴、臨床所見、分娩情報、出生児情報など必要なデータ項目の検討を行った。

2018 年 9 月 14 日から 9 月 24 日の日程で、ルワンダ共和国を訪問し、ミビリジ病院のデータ管理部門にて、研究データ入力方法に関する再検討とエクセルによるフォーマットの作成に関する指導を行った。その後、現地の協力者 4 名により、エクセルフォーマットへのデータ入力完了。

不備のあった点（生年月日及び出産日の入力間違いの修正による在胎期間の確定、多胎児の場合それぞれに ID を割り振り児ごとのデータを作成など）を修正し、解析用データセットの作成を完了した。その後、予備的な解析を行った。



データ収集を行ったルワンダ共和国公立ミビリジ病院

②成果（結果＋考察）

研究フィールドとなるミビリジ病院を直接訪問し、現地の状況（特に、データ抽出対象となるカルテの保管状況、パソコンへの入力環境など）を確認、適切に電子データ化できるよう研究協力者との連携を確立することにより、データ入力を効率良く進めることに成功した。



ミビリジ病院におけるデータ入力の光景

本データにより、新生児の体重や早産をアウトカムとした統計解析が可能となった。予備的解析では、低出生体重児（出生体重 2500g 未満）が 12.6%、早産児（在胎週数 37 週未満）が 10%ということがわかった。また、妊娠中の健診回数が低出生体重児や早産児の発生と、低出生体重児や早産児出生が新生児予後不良と顕著に相関しており、同地域における母子健康および保健に関する重要な知見として利用できる可能性が見出された。本解析については、2019 年度内に学術論文への投稿を見込んでいる。

また滞在中には、同国厚生大臣、ルワンダ大使との面会の機会を持ち、現地における今後の研究活動に関する示唆も得ることができた。

③成果の公表

本解析については、2019 年度終了予定で、学術論文への投稿を見込んでいる。

6. 自己評価

当初の予定としては、ミビリジ病院での出生数（約 16,000 人/6 年間）をデータ化し、解析を終了する予定であったが、当初の予定より出産数が少なかったことと、データ入力の正確性を期すためにデータのダブルエントリー（二人が同じデータをそれぞれ入力すること）を行ったため、2011 年～2016 年に出生した計 6,210 の母児ペアのデータ化に留まった。その点は、不満が残るところではある。

しかし、実際現地を訪問し、現地研究機関との協力を築き、データ入力、また解析用データセット作成を完了することが出来、予備的解析を終え、本解析への方向性と今後の展望を研究協力者間で検討することが出来たところは評価できるところかと思われる。よって、評価としては予想通りの成果と思われる。

次年度は、本解析や論文投稿を行うこと、また更なるデータの取得を目指す予定である。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課題名 : SFTSV を標的とした *in vivo* イメージングによる SFTS 病態ダイナミクス解析および有効な治療法への展開
課題番号 : 30-Ippan-14

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)
棚原悠介 (長崎大学薬学部・4年生)
宮成悠介 (自然科学研究機構 基礎生物学研究所 核内ゲノム動態研究部門・特任准教授)

3. 決定額 : 450 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(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS)は、2011 年に中国で初めて報告されたウイルス性の新興感染症である。原因ウイルスは、ブニヤウイルス科に分類される SFTS ウイルス(SFTSV)であり、マダニにより媒介されると考えられている。日本でも西日本でこれまでに 100 例以上の SFTS 患者が確認されている。SFTS 患者には発熱、消化器症状、血小板・白血球減少が見られ、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(Liu, *Lancet Infect Dis*, 2014)。正常マウス(B6 など)に SFTSV 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見られる。また、interferon- α/β receptor (IFNAR) KO マウスでは接種量に応じて致死性が見られる(Shimada, *Virology*, 2015)。そのため、マウスモデルは SFTSV 感染による病態発現機序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リアルタイムで非侵襲的に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 発症のメカニズム解析に有用であると考えられる。

本学では、2012 年に感染症イメージングを目的とした小動物用 PET/SPECT/CT 装置が導入され、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

が可能となった。申請者らはこれまでに、熱帯医学研究所の早坂博士との共同研究にて、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) および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)の2種類の分子プローブを用いた SFTSV 感染マウスの PET/SPECT/CT イメージングを行った。その結果、感染マウスにおいてのみ感染部位への顕著な集積を示したことから、核医学イメージングにより SFTS 感染を非侵襲的に捉えることが可能であることを見出した (Hayasaka, *Oncotarget*, 2016., Fuchigami, *ACS Omega*, 2017)。

一方で、 ^{18}F -FDG や ^{68}Ga -citrate は感染部位における炎症を捉えていることから SFTSV 選択的な病態を捉えるためには用いることができない。そこで本研究では、より SFTS 選択的な *in vivo* イメージングを目指し、(1) ^{68}Ga -platelet (SFTSV 感染の最初の標的は血小板であり、SFTSV 本体を捉えることが期待される)、(2) ウイルス感染部位を直接捉えるための SPECT イメージング用 ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体、(3) ^{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3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/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。

SFTS 治療法開発への試みとして、最近の早坂博士らの検討により、抗ウイルス薬に比べて SFTS 感染マウスへの抗 SFTSV 血清の方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、申請者らとの共同研究にて、 ^{18}F -FDG-PET により抗 SFTSV 血清が実際に腸管の炎症を抑えていることを可視化することに成功している (Hayasaka, *Oncotarget*, 2016)。しかし、生体内でどのようなメカニズムで治療効果に違いが出ているかに関しては、はっきりと分かっていない。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、新たな SFTS 治療法の開発を目指し、詳細なメカニズムについても解析を行う。

② 研究内容

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) ⁶⁸Ga-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 ⁶⁸Ga-platelet を作成する (Karanikas, *Appl Radiat Isot*, 1999)。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 ⁶⁸Ga-platelet を投与した後、SFTSV が感染して、侵入したと思われる血小板をリアルタイムで 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。さらに、血液を血球や血小板などに分離し、 γ カウンタにてそれぞれ定量した後、抗 SFTSV 抗体を用いた染色により ⁶⁸Ga-platelet の集積部位と SFTSV 存在部位を比較検討する。また、主な感染部位である脾臓、胃、脾臓、小腸、大腸に関しても、パラフィン切片を作成し、H&E 染色、抗 SFTSV 抗体を用いた 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。

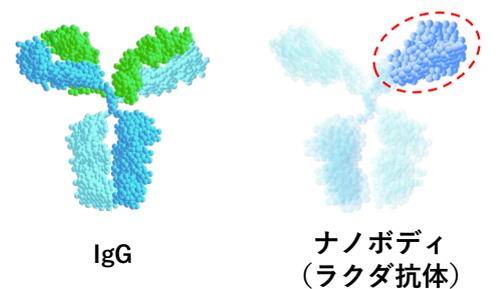
(2) ¹¹¹In 標識抗 SFTSV 抗体を用いたウイルス感染部位の SPECT/CT イメージング

本研究では主に 2 種類の異なったサイズの抗体型イメージング剤を開発する。すなわち、IgG あるいはナノボディを母体として用いる。ナノボディは、ラクダ抗体の抗原認識部位であり、通常の IgG よりも 10 倍以上分子サイズが小さく、特異性は同等を維持しつつ、血中滞留性や免疫原性を抑えることができることから、新たな分子イメージングのツールとして注目されている (図 1)。

具体的には、IgG として SFTS Virus HB29 Antibody (ProSci 社製) あるいは早坂博士らの作成した SFTSV を標的としたマウス IgG を用いる。一方、ナノボディの作製は以下の手順でおこなう。抗原を免疫したラクダから B 細胞を回収し、抗体認識部位 (ナノボディ) の cDNA ライブラリーを作製する。次に、これらのナノボディをファージ表面に提示し、ファージディスプレイ法にて標的抗原に特異的に結合するナノボディをスクリーニングする (自然科学研究機構 宮成博士との共同研究)。ナノボディの標的タンパク質への特異性は、ELISA, western blotting, 蛍光免疫染色などを用いて評価する。

IgG やナノボディの放射性プローブへの誘導化として、各種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、

¹¹¹In-anti SFTS antibody を作成する (図 2)。



	IgG	ナノボディ (ラクダ抗体)
分子量	150,000	12,000 ~ 15,000
特異性	++++	++++
血中滞留時間	+++++	+++
免疫原性	+++	+
修飾の容易性	+	++

図 1 IgG とナノボディの比較。

標識合成後の精製は、PD-10(GE)等を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにて行う。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 を投与した後、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。

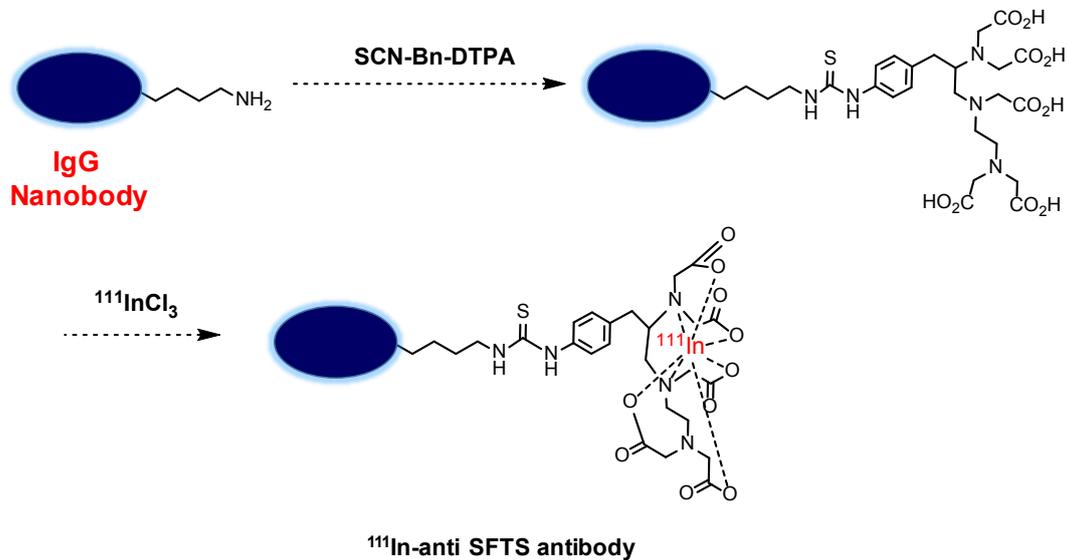


図 2 ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体の合成経路

(3) ^{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。

(4) 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、抗 SFTSV IgG あるいは抗 SFTSV ナノボディを感染後 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、有効な早期診断法や治療法の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。

実際に我々は最近の検討にて、 ^{18}F -FDG や ^{68}Ga -citrate を用いた PET/CT イメージングを行い、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た。さらに、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見出された (Hayasaka, *Oncotarget*, 2016., Fuchigami, *ACS Omega*, 2017.)。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 (Fuchigami et al.; *Sci Rep* 2015., *Bioorg Med Chem Lett* 2015, 2016, *Bioorg Med Chem* 2011, 2014, 2016., *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 IgG やナノボディを母体とした抗体型分子プローブなどの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

SFTSV 感染あるいは非感染 Vero 細胞に対する抗 SFTSV IgG (N, Gn, Gc)を用いた抗体免疫染色を行った。マウスコントロール IgG あるいは抗 SFTSV IgG と p-SCN-Bn-DTPA をモル比率 1:10 で反応させ、DTPA-IgG を合成し、MALDI-TOF-MS にて解析を行った。DTPA-IgG に $^{111}\text{InCl}_3$ (5 MBq) を反応させることで ^{111}In 標識を行った。 ^{111}In -DTPA-IgG を用いた正常マウスに対する 24 時間後・72 時間後の体内放射能分布実験を行った。正常マウスに $^{111}\text{InCl}_3$ (10 MBq, 20 MBq)を尾静注して、PET/SPECT/CT

②成果（結果+考察）

SFTSV 感染細胞への抗体免疫染色

早坂博士らが作成した SFTSV 感染細胞由来の N, Gn, Gc タンパク質の 3 つの異なったタンパク質を標的とした抗 SFTSV IgG 抗体を用い、SFTSV 感染あるいは非感染の Vero 細胞に対する抗体免疫染色を行うことで、SFTSV を標的としたイメージング剤として機能しうる IgG 抗体の探索を行った。その結果、N タンパク質標的 IgG (4A10) が SFTSV 非感染細胞に比べて感染細胞への顕著な集積を示した。一方、SFTSV 感染細胞においても、Gn タンパク質標的 IgG (2D4) は集積が低く、Gc タンパク質標的 IgG (3B4) ではほぼ集積を示さなかった(図 3)。

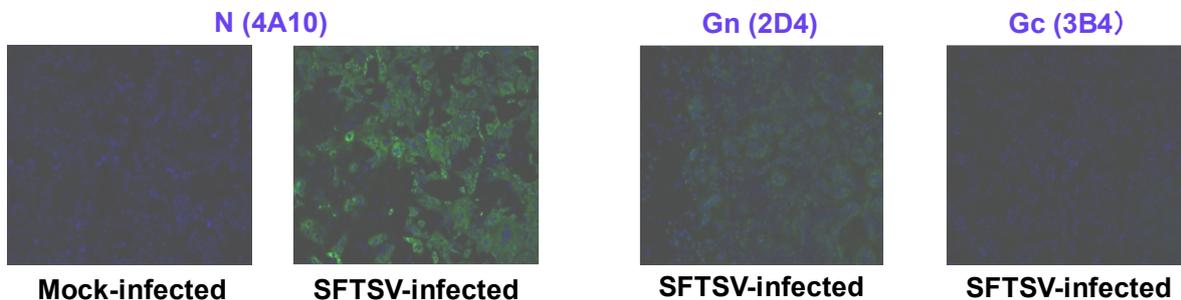
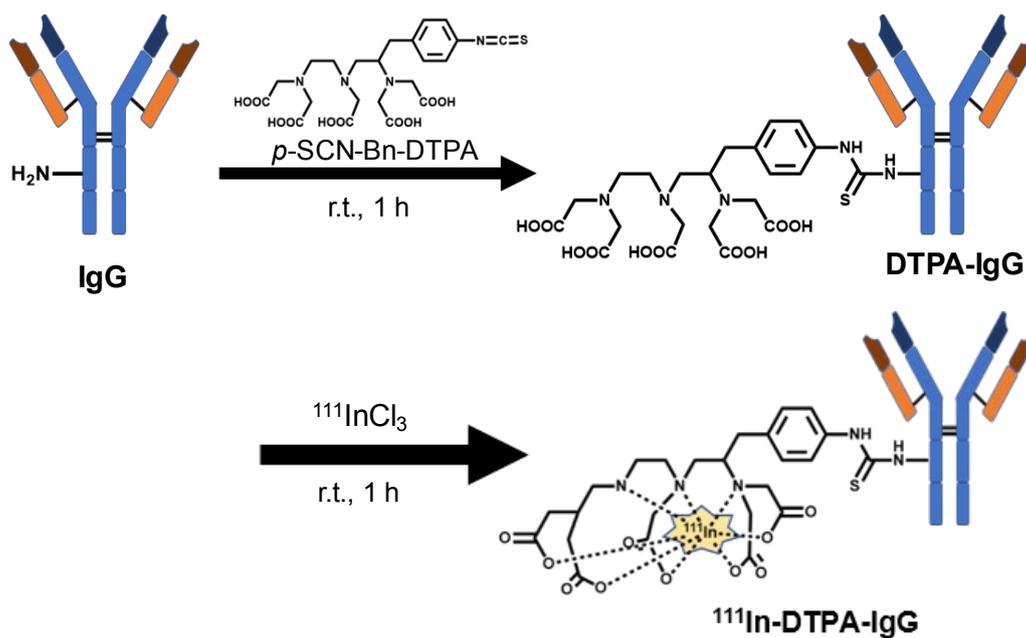


図 3 SFTSV 感染 Vero 細胞における免疫染色像 {緑; N, Gn, Gc 蛋白質 (FITC), 青; 核染色(DAPI)}.

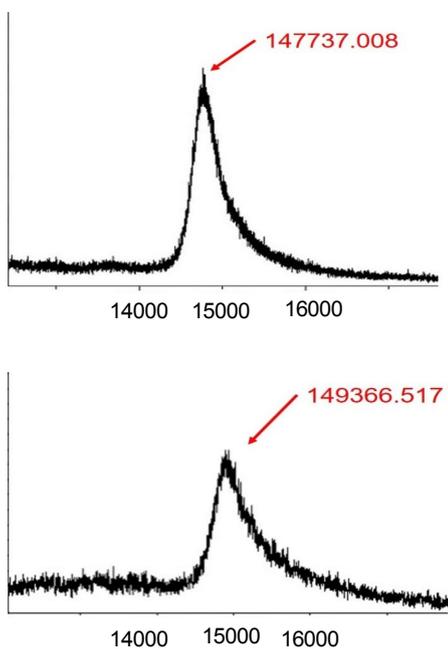
^{111}In 標識抗 SFTSV イメージング剤の開発

コントロールマウス IgG および早坂博士らが作成した SFTSV の N, Gc および Gn タンパク質に対するマウス IgG を用いて、図 3 A の経路に従い ^{111}In 標識 IgG の合成を試みた。それぞれの IgG のリシン残基に SCN-Bn-DTPA を導入し、ゲル濾過にて精製し MALDI-TOF-MS にて分子量の変化を追跡したところ、コントロール IgG は平均 3 分子(図 3 B)、抗 SFTSV IgG (Gn)では平均 2 分子(図 3 C)の DTPA 導入が確認された。さらに $^{111}\text{InCl}_3$ を用いた ^{111}In 標識合成を行い、instant thin-layer chromatography (ITLC)にて合成と精製が成功していることを確認した(図 4)。

A



B



C

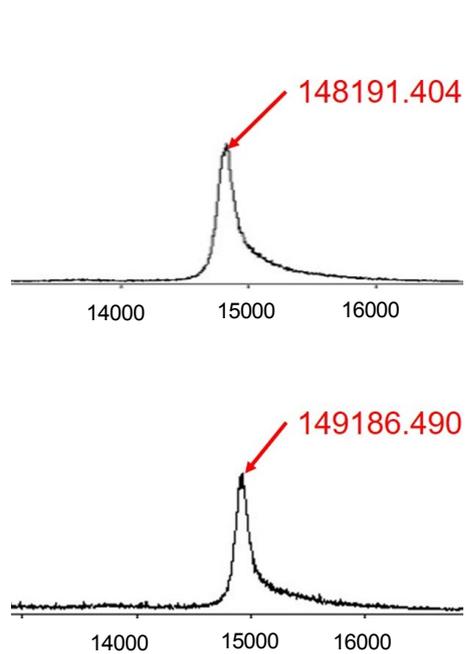


図 3 A: ${}^{111}\text{In-DTPA-IgG}$ の合成経路.
 B: DTPA-IgG の MALDI-MS MS.
 C: DTPA anti STFSV-IgG (Gn) の MALDI-TOF-MS.

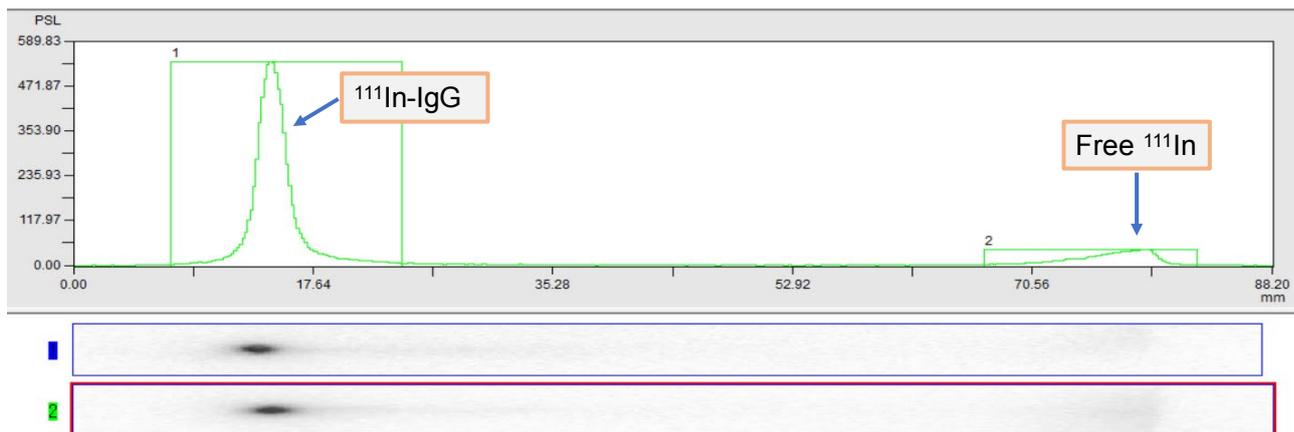


図4 ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体精製の ITLC による確認

^{111}In 標識 IgG の正常マウス体内分布評価

In vivo における ^{111}In -DTPA-IgG の体内挙動を追跡するため、正常マウスを用いた生体内分布実験を行った。すなわち、投与 1 日後、3 日後の二群の正常マウスにおける体内放射能分布評価を行い、 ^{111}In -DTPA-IgG の各臓器 1 g 当たりの放射能の集積(% injected dose/g-organ)にて表した。その結果、血中への高い集積並びに肝臓・腎臓・脾臓・肺・心臓への集積が観察された。脳においては、ほとんど放射能の集積がみられず、その他の多くの正常組織においても、放射能の顕著な集積は観察されなかった(図5)。従って、体内放射能分布は、既報の動態(Shih YH et al., *Oncotarget*, 2015, 6, 16601)と類似した血中濃度、肝・腎・脾・肺への高集積を示すことが確認された。よって ^{111}In -DTPA-IgG は、高純度で合成・精製が達成されていることが示された。

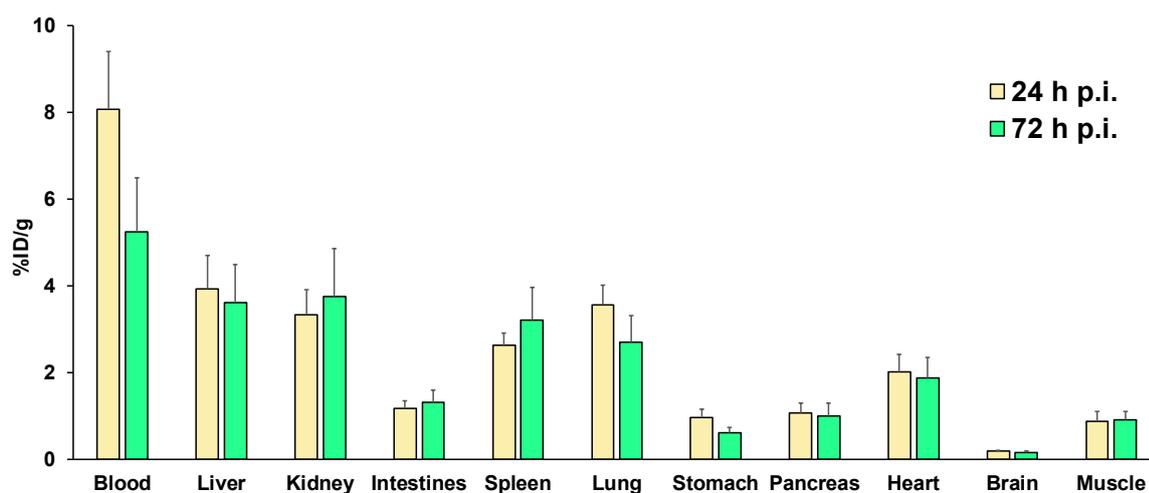


図5 ^{111}In 標識 IgG の正常マウス体内放射能分布実験 (n=4-6).

^{111}In 標識薬剤の SPECT 撮像条件の検討

これまでに本学の PET/SPECT/CT 装置を用いた ^{111}In 標識化合物の小動物イメージングは行われていない。そこで、 ^{111}In 標識 IgG を用いたイメージング評価のために、市販の $^{111}\text{InCl}_3$ を用いた SPECT 撮像条件の検討を行った。すなわち、 $^{111}\text{InCl}_3$ を雄性 ddY マウス(5W)に $^{111}\text{InCl}_3$ (10 MBq, 20 MBq)を投与して 24 時間後に、シングルピンホールコリメータ (1.0 mm)を用いた腹部の撮像を行った(図 6)。その結果、いずれの条件でも $^{111}\text{InCl}_3$ の主な集積部位である腎臓における明瞭な集積画像が確認された。本検討における結果を考慮して、今後は ^{111}In -IgG を 10 MBq 程度の投与量にて SFTSV 感染マウスに投与して、シングルピンホールコリメータを用いた SPECT の撮像を行う予定である。

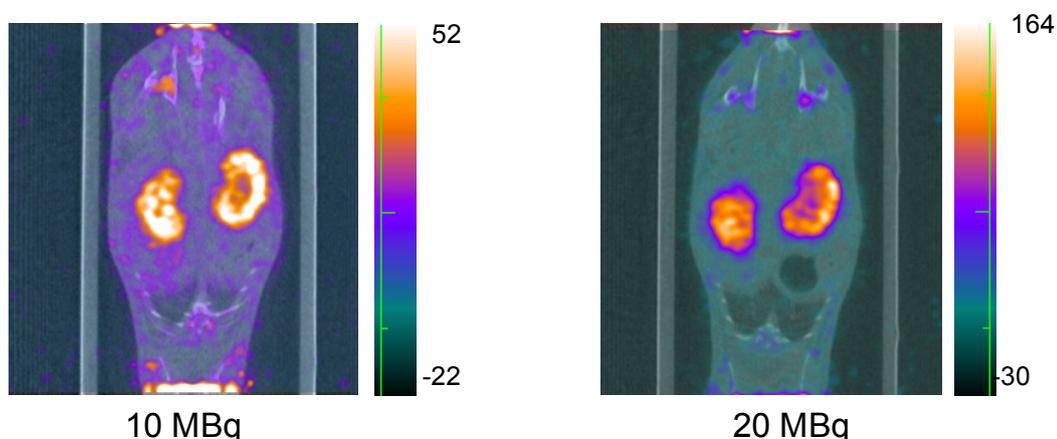


図 6 $^{111}\text{InCl}_3$ 投与後 24 時間におけるマウスの SPECT/CT 画像

③成果の公表

- 1) 棚原 悠介, SFTSV の病態における生体内挙動の可視化を目的とした ^{111}In 標識抗 SFTSV 抗体の開発, 長崎大学薬学部薬科学科分野横断型卒業研究ポスター発表会, 2019 年 3 月 5 日 (長崎)
- 2) Takeshi Fuchigami: Development of molecular probes and PET probe production techniques for in vivo imaging of emerging and re-emerging infectious diseases. The 4th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical sciences. 2018 年 8 月 31 日 (札幌市)
- 3) 淵上 剛志, 小野 北斗, 親泊 広大, 岩竹 真弓, 早坂 大輔, Akbari Masoud, 由井 克之, 西 弘大, 工藤 崇, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄: 新規 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ジェネレータシステムの開発と新興・再興感染症イメージングへの応用, 第 14 回小動物インビボイメージング研究会, 2018 年 7 月 28 日(長崎市)
- 4) 淵上 剛志, 癌および感染症の生体イメージングを目的とした分子プローブの開発, 2018 年 11 月 17 日, 第 35 回日本薬学会九州支部大会 (福岡)

6. 自己評価

本年度の検討より、我々の作成した抗 SFTSV IgG (N, Gn, Gc)の SFTSV 感染細胞への抗原認識能を評価し、N 蛋白への IgG のうち一つのクローンが、SFSTV 感染細胞へ高い結合性を示すことを見出した。また、¹¹¹In 標識 IgG の合成と精製にも成功した。さらに、長崎大学設置の SPECT/CT 装置にて ¹¹¹In 標識イメージング剤の画像化に関するセットアップも行い、次年度から行う長崎大学における本格的な ¹¹¹In 標識 IgG の SFSTV 感染マウスにおける *in vivo* イメージングのための基礎検討がおおよそ達成された。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名: ヒトスジシマカと近縁種の生殖干渉

課 題 番 号: 30-Ippan-15

2. 代 表 者: (金沢大学自然科学研究科・准教授) 都野展子

共 同 研 究 者: (金沢大学自然科学研究科・博士課程学生) Afroza Sultana

(金沢大学自然科学研究科・博士課程学生) Md Sha Alam

3. 決 定 額: 430 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、デング熱、ジカ熱、チクングニヤ熱などのフラボウイルスを媒介するアジア原産蚊で、1980 年以降北米、ヨーロッパ、南米、アフリカ大陸に侵入、世界中に分布を広げた。侵入先でネッタイシマカなど近縁種との生殖干渉（異種間交雑により主に雌の繁殖能力を低下させる現象）による種の置換を頻繁に起こしている。日本にはヒトスジシマカの近縁種として、リバーシマカとヤマダシマカが存在し、これら 3 種は生息場所が重複するものの自然界では生殖隔離機構が働いていると考えられている。しかし申請者らは最近ヒトスジシマカとヤマダシマカが交雑する可能性を見出しており、ヒトスジシマカと近縁種の生殖干渉を精査する必要がある。さらに、ヒトスジシマカのみが世界に分布拡大するに至った要因を解明するため 3 種の異なる環境条件下でのパフォーマンスを比較研究する。これらの結果を総合し、近縁種の生殖干渉を利用したヒトスジシマカ防除策を新たに提出する。

②研究内容

平成 30-31 (2018-2019) 年度

<調査・実験の概要>

1) ヒトスジシマカとその近縁種の時間的空間的動態の記述: 衛生害虫として制御すべきヒトスジシマカが日本の在来近縁種と本来どのような種間関係にあるのか野外調査を行う。

石川県 金沢市と輪島市に調査地を詳細に定点観測しヒトスジシマカとヤマダシマカの空間的・時間的分布を記述する。長崎県/佐賀県 ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーシマカの生息調査を 2018 年 6 月と 9 月に実施する。

沖縄県 ヒトスジシマカ、リバーシマカの生息調査を 2019 年 5 月と 8 月に実施する。

2) 温度と栄養条件を操作した飼育実験: 幼虫期の飼育温度と栄養条件 を操作し、地球温暖化、竹林森林の拡大、がヒトスジシマカとその近縁種の増大にどのような

影響をおよぼすのか、飼育実験を行う。温度条件（22 度、25 度、28 度）の温度設定 3 条件と栄養条件（照葉樹林のクスノキ落葉、竹林の竹の落葉、落葉広葉樹林のアベマキ落葉）を組み合わせ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーシマカの幼虫を飼育し、生存率、成長速度、体サイズ、羽化個体の繁殖能力を評価する。

- 3) ヒトスジシマカとその近縁種の交雑実験：ヒトスジシマカと近縁種は交雑するのか室内実験を行う。ヤマダシマカと共存している日本産のヒトスジシマカ、リバーシマカと共存している日本産のヒトスジシマカ、ヤマダシマカと遭遇したことのない外国産のヒトスジシマカ、リバーシマカと遭遇したことのない外国産のヒトスジシマカの組み合わせをオス・メス双方向で作成し、交尾行動、受精行動、産卵数、卵の孵化率を測定し、生殖干渉、生殖隔離の程度を評価する。

③予想される成果

野外調査、飼育実験、交雑実験の結果を総合し、温暖化が進行した場合、また日本で森林面積の拡大や竹林の拡大が、3 種の個体群増大にどのような影響をおよぼすのかシミュレーションを行う。ヒトスジシマカとヤマダシマカあるいはリバーシマカの間には生殖隔離が存在する場合、そのメカニズムについて考察する。現在報告されているネタイシマカとヒトスジシマカの間には北米で短期間で成立したと推定されている生殖隔離のメカニズムは羽を震わせる振幅回数の違いによると推測されている (Bargielowski and Lounibos 2016)。この仮説をヒトスジシマカと日本在来の 2 種にも適用できるか検証する。羽音を測定する設備を利用し、ヒトスジシマカとその近縁種の羽音を測定し、それを利用した生殖隔離システムの応用技術開発へと発展させる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

A. 猛暑下での蚊の繁殖状況の調査： 2018 年の夏は全国的かつ世界的に猛暑で少雨であった。特に 7 月は平均気温が平年より 3 度高くかつ少雨で、ヒトスジシマカの繁殖には不利と考えられた。そこで、7 月下旬および 8 月上旬に仙台市(東日本の 20 年前のヒトスジシマカの分布北限)、新潟市(西日本の 20 年前のヒトスジシマカの分布北限)、金沢市でヒトスジシマカの成虫と幼虫（蛹を含む）を採集し、異常気象が繁殖に及ぼす影響を調べた。

B. 北陸におけるヒトスジシマカとヤマダシマカの時間的空間的分布の調査

アジアを原産地とするヒトスジシマカは分布を世界へ拡大させ各地でデング熱、ジカ熱、チクングニヤ熱などのウイルス感染症の媒介動物として問題となっている。金沢にはヒトスジシマカに近縁なヤマダシマカがより野生的環境に生息している。世界に拡散するヒトスジシマカと分布を拡げないヤマダシマカの生態上の違いを明らかにするため、2 種の分布を石川県内で調査した。【調査地と調査方法】石川県金

沢市内と石川県能登半島でカ類の成虫と幼虫調査を行った。採集した成虫と幼虫は外部形態を観察 (Tanaka et al 1979) したのち、rDNA の ITS 領域の PCR 産物のサイズ (Higa et al 2010) と mtDNA の COI 領域のシーケンシングによる種同定 (Folmer et al 1994) を行った。

C. ヒトスジシマカとヤマダシマカの生育温度と生育状況の調査

Recent global warming shows significant effects on changes in the distribution of mosquitoes and mosquito-borne disease. In Ishikawa prefecture, we have two *Aedes* (*Stegomyia*) species, i.e., *Aedes albopictus* and *Ae. flavopictus*. The former species is now distributed all over the world including tropics, subtropics and temperate region, however the later species does not show such an expansion. In Ishikawa, *Ae. albopictus* distribute in human residence area, while *Ae. flavopictus* dose within forests. We raised the two species under different temperature to find out the reason for their different micro- and macro-distribution. We raised them under constant temperatures of 22°C, 25°C, 28°C and a fluctuating temperature regime (20-30°C) with mean of 25°C (var. 25) to record mortality, development time, emerged adult wing size and fecundity.

D. ヒトスジシマカとヤマダシマカの生殖干渉に関する調査

Ae. albopictus and *Ae. flavopictus* are morphologically related species, however *Ae. albopictus* have the ability to distribute its population ubiquitously besides displacing rapidly. In recent satyrization has paid an attention and exploits as a mechanism for the displacements of species as well as decreases the vigor of one or both species without producing hybrids. We tested the hypothesis that *Ae. albopictus* have the ability of cross mating and sterilizing effects with *Ae. flavopictus* or not. We focus here the roles of male body size in determining copulation duration during cross mating with heterospecific species. We conducted a cage experiment of cross mating between *Ae. albopictus* and *Ae. flavopictus* by using Kanazawa strains. We generated two sizes (large and small) males and females in different temperature. Twenty virgin females and 10 males of 2-5 days old were used in the study. One female was released into a cage with 10 males to observe copulation duration by stopwatch. The repeated count was taken until 20 females were released per experimental group (2 species female x 2 body sizes x different species male of different body size). After copulation each female was separated and determined their fecundity, fertility as well as wing length.

②成果 (結果+考察)

- A. 2018 年の夏は全国的かつ世界的に猛暑で少雨であった。特に 7 月は平均気温が平年より 3 度高くかつ少雨で、ヒトスジシマカの繁殖には不利と考えられた。そこで、7 月下旬および 8 月上旬に仙台市、新潟市、金沢市でヒトスジシマカの成虫と幼虫 (蛹を含む) を採集し、異常気象が繁殖に及ぼす影響を調べた。採集した幼虫は実

験室で育て羽化させた。その結果、採集成虫および羽化成虫とも1回の吸血ではまったく産卵せず、2回3回と繰り返し吸血させたところ、未熟卵を産卵した。これらの成虫個体を25°Cで2週間維持し、生き残った個体に吸血させたところ、健全な（孵化可能な）卵を産卵した。猛暑のためか少雨のためかは判断できないが、ヒトスジシマカの野生個体群は生存や繁殖に適しない環境下では吸血しても、繁殖を抑制し、卵に栄養を与えることや産卵を避けるものと考えられた。

B. 外部形態の特徴から判定した種と分子生物学的に判定した種は必ずしも一致せず、さらに ITS 領域と COI 領域も矛盾した結果を産んだ。金沢市では、市内にヒトスジシマカが分布し、山際に位置する地点にはヤマダシマカしかいなかったが、8月に入りヒトスジシマカが一時侵入した。この傾向は猛暑の2018年の夏に特に顕著であった。石川県では、2種間に遺伝子浸透が起こっていることが考えられた。暑い夏を経過するとヒトスジシマカの種がより増加するが春先にはヤマダシマカの種が相対的に多かった。

C. To understand how they differ in habitat use, performance of *Ae. albopictus* and *Ae. flavopictus* was compared under various temperature regimes, i.e., constant temperatures of 22, 25 and 28°C and a fluctuating temperature regime of 20-30°C (mean: 25°C). Mortality from the first instar stage to adult emergence was significantly higher in *Ae. flavopictus* than in *Ae. albopictus* at constant temperatures of 25 and 28°C. Development time was significantly longer in *Ae. flavopictus* than in *Ae. albopictus* at 28°C. The proportion of females that did not oviposit was significantly higher in *Ae. flavopictus* at a constant temperatures of 28°C and a fluctuating temperature regime. Per capita performance was higher in *Ae. flavopictus* at a constant temperatures of 25°C, but in *Ae. albopictus* at the other temperature regimes. Thus, *Ae. albopictus* is at least more adapted to higher temperatures than *Ae. flavopictus*. Such difference in their temperature adaptation may be one of factors that cause their different geographic distribution and habitat use.

D. Longer copulation time was observed in *Ae. albopictus* small female when crossed with *Ae. flavopictus* large male and laid more sterile eggs. There is less effect of body size on *Ae. flavopictus* female with no differences in the number of laid eggs. Females paired with small males laid less number of eggs than the ones with large males, might be depleted more seminal fluid during mating.

<総合考察>

ヤマダシマカはヒトスジシマカよりも生育適温が低くヒトスジは28°Cで生育速度が速かったのに対しヤマダシマカは25°Cが最適と考えられた。25°Cでは増加率はヤマダがヒトスジを上回ったが22°C、28°C平均は25°Cで20度から30度まで日周変化をするプログラム

の3条件ではヒトスジがヤマダよりも増加率が高かった。このことからヤマダはヒトスジよりも適応できる温度幅が狭いと予測される。また生殖干渉の実験では体サイズが影響しており、ヒトスジシマカのメスは相対的に体サイズの大きいヤマダとは交尾時間が長くなっており、また産卵数が多くなり、より多くの不妊卵を産むことになった。ヤマダシマカの♀はオスの体サイズの影響を受けていなかった。ヒトスジシマカの生殖干渉による被害の程度はオスの体サイズにより影響することが初めて明らかにされた。このことは森の中で生育し体サイズが常に大きいヤマダとの関係を理解するうえで重要である。

③成果の公表

学会発表

1. Mohammad Shah Alam, Nobuko Tuno. Effects of different temperature regimes on population performance of *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus*. 日本生態学会第66回全国大会(2019年3月神戸市)
2. Md. Sha Alam, 都野展子. ヒトスジシマカとヤマダシマカの北陸における分布消長. 第71回日本衛生動物学会大会(2019年4月山口市)
3. Afroza Sultana, 都野展子. ヒトスジシマカとヤマダシマカの種間交雑への体サイズの影響. 第71回日本衛生動物学会大会(2019年4月山口市)
4. Md Shah Alam, 都野展子. ヒトスジシマカとヤマダシマカの生活史特質比較—温度に対する反応—. 第71回日本衛生動物学会大会(2019年4月山口市)

6. 自己評価

予想以上の成果が挙げられている。2018年は全国的に猛暑となり、蚊の採集にはとても苦勞した。コロニーを作るために驚くほどの回数の吸血を必要とした。しかしこのことから逆にこれまで記録されたことのないほどの高温乾燥した環境でヒトスジシマカがどのような生態を示すか新たな知見を得ることができた。この結果は現在アメリカ昆虫学会の雑誌に投稿中である。

ヒトスジシマカは過去 20 年の間に北米中南米ヨーロッパアフリカと急速に分布を拡大したのに対しヤマダシマカは日本と韓国ではむしろヒトスジシマカよりも広い緯度範囲に分布するのに関わらず分布拡大する傾向は見せていない。この 2 種は局所分布が異なっておりヒトスジは緑地交じりの市街地に生息するがヤマダは森林の外には分布していない。このようなマイクロおよびマクロな分布の違いは無関係ではなく 2 種の温度に対する反応の違いから説明可能であることがわかった。また生育温度適温の違いは 2 種の生殖干渉にも影響することがわかった。2 種の温度への反応の違いについては現在論文にまとめているところである。繁殖干渉の実験はまだコントロールなどいくつか取らないとならないデータを残しているが、傾向ははっきりしているため、今年中に論文として発表する予定である。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : インドを旅行する日本人旅行者における疾患発生要因に関する研究
課 題 番 号 : 30-Ippan-16

2. 代 表 者 : 津田 敏秀 (岡山大学大学院環境生命科学研究科・教授)
共同研究者: 橋爪 真弘 (長崎大学熱帯医学研究所小児感染症学分野・教授)
時信 亜希子 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教)
山川 路代 (岐阜大学大学院医学系研究科・助教)
松下 直彦 (長崎大学熱帯医学研究所小児感染症学分野・大学院生)

3. 決 定 額 : 640 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

旅行者における旅行者下痢症は、先進諸国からの旅行者が、発展途上国・熱帯および亜熱帯諸国を旅行する際に、最も頻度が高く遭遇する疾病である (12~46%)。欧米諸国では、実践的な研究が蓄積されている医学分野として旅行医学 Travel Medicine が知られているが、旅行者下痢症は、その主な対象疾患であり、研究分野でもある。この点は、2015年12月1日~2016年11月30日に研究者が収集した予備調査データでも裏付けられている。

本研究は、インドを旅行する日本人旅行者を対象に宿を提供している、インド・サンタナグループの協力を得て、これまで行ったコルカタ、プリーのサンタナの宿を利用する年間約1,000人の日本人旅行者を対象とする研究に加え、さらにデリー、バラナシの日本人の旅行者の情報を収集し、これまで収集したデータと合わせて分析し検討する研究である。このサンタナの宿を利用した日本人旅行者が、インド国内の旅行中に遭遇した曝露と症状に関する情報を、質問票調査と可能であればコルカタで便の標本から収集分析し、旅行中の旅行者下痢症の発生頻度を明らかにし、リスクの高い要因を明らかにする研究である。

本研究は、人を対象とした研究であり、観察研究の基本デザインであるコホート研究デザインに基づいて収集したデータを、疫学的に分析することにより科学性が保たれる。介入は行われない観察研究であり、対象者の旅行というニーズを満たしながらデータを収集するという意味で倫理的な問題に抵触する可能性は極めて低く、かつ安全な研究である。

本研究の、対象、曝露、比較、結果をまとめると下記のようなになる。このデータを分析検討する。

① 対象 (患者・研究対象者の属性など) : インド・サンタナグループの宿 (デリー・バラナシ) を利用する日本人旅行者

② 曝露 (治療・検査・基本属性など) : 日本人旅行者が旅行中に取ったリスク行動全般、特に喫食歴や疲労状態の発生など消化器疾患のリスク要因

- ③ 比較（何と比較するのか）：上記のリスク行動を取っていなかった日本人旅行者
- ④ 結果（どんなアウトカムに変化があるのか）：下痢症、およびその他の症状

②研究内容

(1) 研究のデザイン

コホート研究デザイン（前向き）

(2) 研究対象者の選定方針

インド・サンタナグループの宿のうち、特に、日本人旅行者が立ち寄る拠点となっている、デリー・バラナシの宿を利用し、インド国内を旅行する日本人旅行者を主に研究対象として研究を行いたい。この日本人旅行者の中で、ある曝露イベントがあった人を曝露群、その曝露イベントがなかった人を非曝露群として解析する。疾患情報は、質問票の回答より得るが、インド国立研究所 NICED および岡山大学拠点に近いコルカタ・サンタナの利用者で下痢症状がある者に遭遇できた場合は、便を採集し細菌検査を行う。

(i) 選択基準

① 自由意思による研究参加の同意を本人から文書で取得可能なインド・サンタナグループの宿（デリー・バラナシ）の日本国籍のある日本人利用者

② 同意取得時の年齢が 18 歳以上 80 歳未満の日本国籍のある日本人利用者

*18 歳以上 20 歳未満の者においては、未成年ではあるが、疾患のハイリスク群と想定されるため、親権者等が拒否できる機会を保障すること（親権者等への文書の送付及びホームページへの掲載）で、研究対象者として含める。本人が同意をしたものの、代諾者が拒否した場合は除外する。

(ii) 除外基準

① 日本人以外

② 日本国籍のない日本人

③ インターネットの利用方法の分からない人、日本語を解さない人

④ 18 歳以上 20 歳未満の者で代諾者が拒否した場合

(3) 予定する研究対象者数

1,000 人/年

(4) 対象者数の設定根拠

インド・サンタナグループの宿（デリー・バラナシ）の年間利用者数から計算して、1 年以内の研究期間で、十分達成できる人数を実施可能数として設定した。多ければ多いほど、分析が自由に行えることになる。

(5) 評価の項目及び方法

(i) 主要評価項目

旅行者下痢症

(ii) 副次的評価項目

旅行者下痢症以外の旅行中の急性症状（下痢以外の発熱などの体調の変化）

(6) 統計解析方法

・ 記述疫学による分析

- 分析疫学による分析（層別分析，ロジスティック回帰分析，コックス回帰分析）

(7) 観察の対象となる治療方法

治療は行わない。

(8) 観察および検査項目（用いる試料・情報）とその実施方法

以下の項目について，観察研究として質問紙および Web ベース質問票への回答を依頼し，そのデータを本研究に利用する。これらはすべて旅行者の旅行中と日本帰国後に実施される項目である。便の細菌検査は，サンタナ宿コルカタに宿泊した者のうち，下痢症状を呈しかつ同意を取り付けた者に限り実施する。

- (i) 対象者基本情報：年齢，性別，予防行動（予防接種歴，薬の携帯），リスク認知，リスクに対する不安，海外渡航歴，インドの旅程（入国日，次の旅行先，出国予定日），インドでのリスク行動（食事や衛生の習慣），インドで生じた健康障害に関する日毎の記載など（質問票は別紙であり，研究に対して集めるので既存情報ではない）。質問票の回答をもって，研究対象者の同意を得たものとする。研究参加を撤回したい場合は，追跡調査のための質問票への回答がないことをもって同意を撤回した者とみなす。

- (ii) 便の細菌検査（研究に際して収集し，研究のためだけに行う試験的採取である）。

(iii) 調査スケジュール

日程	予備調査（済）	前年度研究	本研究（ベースライン・旅行中）	本研究（旅行後）
実施場所	インドサンタナ宿 （コルカタ・プリー）	インドサンタナ宿 （国内4か所）と 日本の居住地		日本の居住地
同意取得	—	—	○*	（取得済み）
質問票回答	○ （質問紙およびオンライン）	○ （オンライン）	○ （オンライン）	○ （オンライン）
便収集	—	—	○ （コルカタのみ）	—

- (iv) *便の標本収集にあたり研究対象者の同意を取得する。

(9) 研究対象者の研究参加予定期間

予備調査は，2015年12月1日～2016年11月30日に終了した。前年度研究では，2017年6月1日～2018年3月31日までに行った。本研究では，主にデリー・バラナシを中心にデータを収集し，分析をしながら検討を重ね2018年4月1日～2019年3月31日まで研究を継続したい。学会等での討論を踏まえ、さらに必要な場合は研究期間を延長し，翌年度も申請したい。

(10) 研究参加者に対する研究終了（観察期間終了）後の対応

特になし。問い合わせがあれば対応する。

(11) 研究参加の中止基準

- (i) 研究対象者の組み入れが困難で，予定症例数に達するのが極めて困難であると判断されたとき。

(ii) 委員会により，研究実施計画等の変更の指示があり，これを受入れることが困難と判断されたとき。

(12) 研究中止時の対応

研究責任者または研究分担者は，次に挙げる理由で個々の研究対象者について研究継続が不可能と判断した場合（①研究対象者の組み入れが困難で，予定症例数に達することが極めて困難であると判断されたとき，②委員会により，研究実施計画等の変更の指示があり，これを受入れることが困難と判断されたとき）には，当該研究対象者についての研究を中止する。ご自分の判断で中止いただく。18歳以上20歳未満の方については，親権者等からの同意撤回書の送付をもって中止とする。中止した対象者のデータは削除する。

(13) 研究の変更，停止・中止，終了

(i) 研究の変更

本研究の研究実施計画書や同意説明文書等の変更または改訂を行う場合は，あらかじめ研究倫理審査専門委員会（以下，委員会）の承認を必要とする。

(ii) 研究の停止・中止

研究責任者は，以下の事項に該当する場合は，研究実施継続の可否を検討する。

- a. 研究対象者の組み入れが困難で，予定症例数に達するのが極めて困難であると判断されたとき。
- b. 委員会により，研究実施計画等の変更の指示があり，これを受入れることが困難と判断されたとき。

(iii) 研究の終了

研究の終了時には，研究責任者は遅滞なく研究終了報告書を病院長及び研究科長に提出する。

(14) 研究実施期間

2018年4月1日～2019年3月31日（研究対象者登録締切日：2019年3月28日）

(15) 分析と結果の考察

国内及び国外での学会発表と投稿論文の作成を行う。

③ 予想される成果

本研究によって得られる成果は，直ちに，インドあるいは類似する熱帯地域を旅行滞在する日本人に応用され，今後の旅行がより安全に計画通りに行えるようになる。また，国際的な医学会誌に掲載されることにより，世界の先進諸国の旅行者や滞在者に応用されることになる。なお，研究対象者に生じる負担，予想されるリスク，予想される利益，それらへの対策は以下の通りである。

(1) 研究対象者に生じる負担

ベースライン，旅行中及び帰国後に，紙ベースあるいはインターネットを通じた質問票への回答にそれぞれ10分程度を要する。コルカタの宿泊者で下痢症状を呈した者に遭遇した場合，自己の便採集（10g）の手間をかけることになる。

(2) 予測されるリスク

本研究は旅行者の通常旅程を利用した観察研究であり、報告と情報記載も通常旅程の中で行われる。下痢が生じたときの採便と旅行中の記録を残す手間以外に、本研究に参加することによるリスクは生じないと考えられる。

(3) 予測される利益

本研究は旅行者の通常旅程を利用した観察研究であり、研究対象者の旅行内における直接の利益は生じない。しかし、研究結果への注目や旅行医学への関心が旅行後に高まれば、研究対象者である旅行者の今後の旅行においては、利益が生じることが期待される。研究対象者は研究に参加することで、謝礼として 150 円程度の粗品が渡される。

(4) 総合的評価並びに当該負担及びリスクを最小化する対策

研究対象者への負担・リスクは、下痢が生じたときの採便と旅行中の記録を残すことだけである。体調が著しく不調であれば、記録や採便を中止していただく選択肢は、研究対象者に保証する。下痢を発症して便収集に協力してくれた者に遭遇した場合には、体調について相談したい者に対しては、相談を行う。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

(1) 研究デザイン・対象者

昨年度の調査においては、デリーのサンタナに宿泊した日本人の個人旅行者を対象とし、Web アンケート(マクロミル社のクエスタント)を用いて質問紙調査を実施し(初回調査)、対象者がその後バラナシに移動し、バラナシのサンタナに宿泊した際に初回調査と同様に追跡調査を実施した。結果として、追跡率が10%に至らなかったことや、初回と追跡二つの調査データ間の旅行者個人の紐づけに必要な情報(特に氏名)を提供しなかったことから、まずは、デリーのサンタナに宿泊した日本人旅行者のみを対象とし、前向きコホート研究から横断研究に研究デザインを変更し、以下の3つの観点から研究を遂行した。

研究1：初回調査の時点で、旅行中の下痢症の発生状況に関する情報も同時に入手できるようにアンケートを修正した。これは、昨年度の調査において、デリーのサンタナに宿泊した旅行者は、初回調査を行った時点で既に他の国あるいは都市を旅行していた者が含まれ、アウトカム情報の収集も可能と予想されたことによる。

研究2：初回調査に協力した者を対象とし、初回調査から約2週間後にメールでWeb 質問紙のリンクを送信し、初回調査とデータを結合できない形で、横断的に2回目のWeb 質問紙調査(2回目調査)を実施した。

研究3：研究1と研究2の結果を踏まえて、初回調査のみを通じてデータ収集を行うこととした。具体的には、研究1に加えて、旅行中の様々な健康問題の発生状況、インド滞在中の食事や衛生の習慣、野外での活動(リスク行動)に関する情報も同時に入手できるようにアンケートを修正した。これは、旅行者の多くがデリーに数日間滞在すること、宿に到着した直後よりも、当初計画していた旅程を消化した後のほうがアンケートに回答されやすいこと、研究2の結果、追跡率が低かったこと(後述の成果の項)による。

(2) 質問項目

研究1での主な質問項目は以下の通り。基本属性(性別、年齢、職業、最終学歴等)、現病歴、今回の出入国情報(入国日・出国予定日等)、海外渡航歴、インドや周辺諸国の渡航歴、今回の渡航前準備(海外旅行傷害保険の加入、疾病リスクに関する情報収集、小児期の予防接種の確認、旅行前予防接種など)、今回の旅行で病気やけがに備えて持参したもの、リスク認知や不安など。既に他の国あるいは都市を旅行していた者については、旅行中の下痢症発生の有無なども併せて収集した。

研究2での主な質問項目は以下の通り。インド滞在中の食事や衛生の習慣、野外での活動、滞在中に生じた健康問題など。

研究3での主な質問項目は以下の通り。研究1の質問項目に加えて、研究2で加えたい質問項目(リスク行動、旅行中に生じた健康問題)も併せて収集した。

②成果（結果＋考察）

第一期調査（2018年9月8日～30日）では、研究1及び研究2を実施した。研究1では、調査期間におけるデリーのサンタナの日本人宿泊者167名のうち、回答者数は107名であった（回答率64.1%）。研究1の対象者107名のうち、研究2に参加した者は32名であった（追跡率29.9%）。第二期調査（2018年12月27日～2019年1月14日）では、研究3を実施した。調査期間におけるデリーのサンタナの日本人宿泊者数175名のうち、回答者数は115名であった（回答率59.4%）。第一期・二期調査とも、外国人は除外し、宿を2回以上利用した人は1回のみ数えた。

研究対象者のうち、男性、20歳代、独身者、大卒以上、学生、渡航歴のある者、日本を出国してからデリーに到着するまでにインド以外の国あるいはデリー以外の都市を訪問していた者の割合が多く見られた（表1）。

性別、年齢（30歳未満・30歳以上）、職業（学生・それ以外）、学歴（大卒以上・それ以外）、インド旅行経験、全体の旅行期間（2週間以上・2週間未満）で層別後、リスク認知や不安（各7件法）、リスク対策（小児期の予防接種の確認、旅行前の予防接種、海外旅行傷害保険の加入、疾病リスク情報の入手、薬などけがや病気への備え）について、平均得点や分布の違いを検討した（表2-1、表2-2）。

リスク認知については、下痢・食あたり、大気汚染、交通事故の順にリスク認知が高かった。各群で0.5点以上の差があった項目のうち、例えば、大気汚染では30歳以上、学生以外の方が相対的にリスク認知が高く、蚊が媒介する感染症では30歳未満、学生の方が高かった。不安については、衛生、体調・健康の順で不安が強かった。各群で0.5点以上の差があった項目のうち、食事、衛生、体調・健康ではインド旅行経験のない者及び全体の旅行期間が2週間未満の者の方が不安が強かった。

また、多くの対象者が渡航前に小児期の予防接種を確認しておらず、男性、30歳以上、全体の旅行期間が2週間未満の者において確認していない者の割合が相対的に高かった。旅行前の予防接種を受けた者は全体の2割程度であり、30歳未満、全体の旅行期間が2週間以上の者の方が接種率（割合）が相対的に高かった。海外旅行傷害保険の加入については30歳未満、学生、インド旅行経験のない者の方が加入割合が高く、疾病リスク情報の入手についてはインド旅行経験のない者、けがや病気への備えについては女性の方が入手割合が相対的に高かった。

研究2の対象者及び研究3の対象者のうち、インド到着から1日以上経過している者（n=110）

表1 研究対象者の個人特性（n=222）

	n	%
性別		
男	168	(75.7)
女	54	(24.3)
年齢群		
<20	11	(5.0)
20-24	97	(43.7)
25-29	54	(24.3)
30-34	26	(11.7)
35-39	14	(6.3)
40代	11	(5.0)
50代	9	(4.1)
婚姻		
既婚	9	(4.1)
独身・離婚	213	(96.0)
学歴		
大学以上	99	(44.6)
それ以外	123	(55.4)
職業		
無職・パートアルバイト	38	(17.1)
学生	89	(40.1)
医療従事者	10	(4.5)
正規・常勤の会社員・職員	69	(31.1)
自営業・家業	16	(7.2)
渡航歴		
あり	213	(96.0)
その内、インド渡航歴あり	89	
なし	9	(4.1)
出国してから訪問した国・都市		
あり(インド以外の国)	90	(40.5)
あり(デリー以外の都市)	47	(21.2)
なし	85	(38.3)
インド滞在期間(予定)		
2週間未満	138	(62.2)
2週間以上	61	(27.5)
決めていない	23	(10.4)
全体の旅行期間(予定)		
2週間未満	123	(55.4)
2週間以上	76	(34.2)
決めていない	23	(10.4)

表 2-1 研究対象者における性別・年齢・職業別のリスク認知・不安・小児期の予防接種の確認・旅行前の予防接種・海外旅行傷害保険の加入・疾病リスク情報の入手・けがや病気への備え (n=222)

	性別		年齢		職業	
	男(n=168)	女(n=54)	<30歳(n=162)	≥30歳(n=60)	学生(n=89)	それ以外(n=133)
リスク認知, score (sd)						
下痢・食あたり	5.2 (1.6)	5.1 (1.5)	5.2 (1.7)	5.2 (1.3)	5.2 (1.7)	5.2 (1.5)
大気汚染	4.5 (1.7)	4.6 (1.9)	4.4 (1.8)	5.0 (1.6)	3.9 (1.8)	5.0 (1.6)
交通事故	4.7 (1.6)	4.3 (1.5)	4.6 (1.6)	4.6 (1.6)	4.4 (1.7)	4.7 (1.6)
狂犬病	4.2 (1.9)	4.1 (1.9)	4.3 (2.0)	3.9 (1.7)	4.5 (2.0)	4.0 (1.8)
風邪をひく	4.0 (1.8)	3.8 (1.9)	3.8 (1.8)	4.4 (1.7)	3.8 (1.9)	4.1 (1.7)
蚊が媒介する感染症	4.0 (1.8)	4.0 (1.6)	4.2 (1.8)	3.6 (1.6)	4.4 (1.8)	3.8 (1.7)
新興感染症	3.7 (1.8)	3.6 (1.7)	3.7 (1.9)	3.4 (1.4)	3.7 (2.0)	3.6 (1.6)
けが・骨折	3.7 (1.6)	3.6 (1.7)	3.6 (1.7)	3.9 (1.5)	3.4 (1.7)	3.9 (1.6)
メンタルヘルスの不調	3.5 (1.8)	3.2 (1.7)	3.5 (1.8)	3.2 (1.7)	3.6 (1.8)	3.2 (1.7)
熱中症	3.1 (1.7)	3.0 (2.0)	3.1 (1.8)	3.0 (1.8)	3.3 (1.7)	2.9 (1.8)
性感染症	2.7 (1.9)	2.3 (1.7)	2.8 (2.0)	2.3 (1.5)	3.2 (2.2)	2.3 (1.6)
蚊やダニなど虫にかまれる	4.9 (1.7)	5.1 (1.3)	4.9 (1.6)	5.1 (1.5)	4.9 (1.7)	5.0 (1.5)
犬にかまれる	4.0 (2.0)	3.9 (1.8)	4.0 (2.0)	3.8 (1.7)	4.2 (2.1)	3.8 (1.8)
テロ・武力衝突・戦争	3.6 (1.8)	3.6 (1.6)	3.6 (1.9)	3.4 (1.4)	3.6 (2.0)	3.5 (1.5)
不安, score (sd)						
衛生	4.7 (1.8)	4.8 (1.9)	4.8 (1.9)	4.7 (1.8)	4.6 (1.9)	4.9 (1.8)
体調・健康	4.5 (1.7)	4.4 (1.8)	4.6 (1.8)	4.3 (1.5)	4.6 (1.8)	4.5 (1.7)
食事	3.9 (1.9)	3.5 (1.9)	3.8 (1.9)	3.8 (1.8)	3.9 (1.8)	3.8 (1.9)
テロ・武力衝突・戦争	3.2 (1.7)	3.5 (1.6)	3.3 (1.8)	3.2 (1.5)	3.2 (1.9)	3.3 (1.6)
小児期の予防接種の確認, n (%)						
今回確認した	27 (16.1)	9 (16.7)	32 (19.8)	4 (6.7)	17 (19.1)	19 (14.3)
以前確認した	22 (13.1)	15 (27.8)	30 (18.5)	7 (11.7)	16 (18.0)	21 (15.8)
確認したことがない	119 (70.8)	30 (55.6)	100 (61.7)	49 (81.7)	56 (62.9)	93 (69.9)
旅行前の予防接種, n (%)						
受けた	37 (22.0)	16 (29.6)	44 (27.2)	9 (15.0)	25 (28.1)	28 (21.1)
受けていない	131 (78.0)	38 (70.4)	118 (72.8)	51 (85.0)	64 (71.9)	105 (79.0)
海外旅行傷害保険の加入, n (%)						
保険会社	70 (41.7)	25 (46.3)	79 (48.8)	16 (26.7)	48 (53.9)	47 (35.3)
クレジットカード付帯	79 (47.0)	26 (48.2)	66 (40.7)	39 (65.0)	29 (32.6)	76 (57.1)
加入していない	17 (10.1)	2 (3.7)	15 (9.3)	4 (6.7)	10 (11.2)	9 (6.8)
その他	2 (1.2)	1 (1.9)	2 (1.2)	1 (1.7)	2 (2.3)	1 (0.8)
疾病リスク情報の入手, n (%)						
した	116 (69.1)	38 (70.4)	116 (71.6)	38 (63.3)	63 (70.8)	91 (68.4)
しなかった	52 (31.0)	16 (29.6)	46 (28.4)	22 (36.7)	26 (29.2)	42 (31.6)
けが・病気への備え(薬など), n (%)						
した	147 (87.5)	53 (98.2)	147 (90.7)	53 (88.3)	79 (88.8)	121 (91.0)
しなかった	21 (12.5)	1 (1.9)	15 (9.3)	7 (11.7)	10 (11.2)	12 (9.0)

に限定して、リスク行動（表 3）や発生頻度の多い症状（表 4）について検討した）。結果として、多くの対象者が旅行中にリスクの高い行動をとっており、「屋台で作られた食べ物を買って食べた」、「生か加熱されていない野菜や果物を買って食べた」と回答した者はそれぞれ 59 名（53.6%）、44 名（40.0%）であった。また、旅行中に 76 名（69.1%）が何らかの症状を経験しており、頻度の高い症状順に下痢、鼻水・鼻づまり、のどの痛み、せき・たん、皮膚の症状であった。

以上、今回から得られた知見として、次の 3 点が挙げられる。

- リスクの項目によって個人特性による影響が異なる。例えば、下痢のリスク認知は相対的に高いが、個人特性による差異はあまり見られない。一方で、性感染症のリスク認知はあまり高くないが、個人特性による差異が見られる。
- けが・病気への備えやリスク情報の入手といったリスク対策を旅行前に行う者が多いが、旅行前の予防接種の確認や実施については十分なレベルとは言えない。これらのリスク対策については、特定の個人特性（性別や年齢、旅行経験）との関連が示唆される。
- 具体的なリスク対策の低さに対して、旅行中にリスク行動をとったり、下痢症や上気道感染の症状を経験していた者が全体の半数近く見られ、リスク行動や症状も個人特性によって異なる可能性が示唆される。

表 2-2 研究対象者における学歴・インド旅行経験・全体の旅行期間別のリスク認知・不安・小児期の予防接種の確認・旅行前の予防接種・海外旅行傷害保険の加入・疾病リスク情報の入手・けがや病気への備え (n=222)

	学歴		インド旅行経験		全体の旅行期間(予定)	
	大卒以上(n=99)	それ以外(n=123)	あり(n=89)	なし(n=133)	≥2週間(n=99)	<2週間(n=123)
リスク認知, score (sd)						
下痢・食あたり	5.2 (1.5)	5.1 (1.6)	5.0 (1.7)	5.3 (1.5)	5.1 (1.6)	5.3 (1.5)
大気汚染	4.8 (1.6)	4.3 (1.9)	4.6 (1.9)	4.6 (1.7)	4.7 (1.8)	4.5 (1.8)
交通事故	4.6 (1.5)	4.6 (1.7)	4.4 (1.8)	4.7 (1.5)	4.5 (1.8)	4.6 (1.5)
狂犬病	3.9 (1.7)	4.5 (2.0)	4.0 (2.0)	4.3 (1.9)	4.4 (2.0)	4.1 (1.9)
風邪をひく	4.1 (1.8)	3.9 (1.8)	4.0 (2.0)	4.0 (1.7)	4.0 (1.9)	4.0 (1.7)
蚊が媒介する感染症	3.7 (1.7)	4.3 (1.8)	3.9 (1.8)	4.1 (1.7)	4.3 (1.9)	3.8 (1.7)
新興感染症	3.5 (1.6)	3.7 (1.9)	3.4 (1.8)	3.8 (1.8)	3.7 (1.9)	3.5 (1.8)
けが・骨折	3.8 (1.6)	3.7 (1.7)	3.7 (1.6)	3.7 (1.7)	3.8 (1.7)	3.6 (1.6)
メンタルヘルスの不調	3.1 (1.6)	3.7 (1.8)	3.4 (1.9)	3.3 (1.7)	3.6 (1.8)	3.2 (1.7)
熱中症	2.6 (1.7)	3.4 (1.7)	3.1 (1.8)	3.0 (1.8)	3.5 (1.8)	2.7 (1.7)
性感染症	2.0 (1.4)	3.1 (2.1)	2.7 (2.0)	2.6 (1.8)	2.9 (2.0)	2.4 (1.7)
蚊やダニなど虫にかまれる	4.9 (1.5)	4.9 (1.7)	5.0 (1.7)	4.9 (1.5)	5.2 (1.6)	4.7 (1.6)
犬にかまれる	3.8 (1.7)	4.1 (2.1)	3.9 (2.0)	4.0 (1.9)	4.2 (2.0)	3.8 (1.9)
テロ・武力衝突・戦争	3.6 (1.5)	3.6 (1.9)	3.6 (1.8)	3.6 (1.7)	3.8 (1.9)	3.4 (1.7)
不安, score (sd)						
衛生	4.9 (1.8)	4.6 (1.8)	4.4 (2.0)	5.0 (1.7)	4.3 (1.8)	5.1 (1.8)
体調・健康	4.6 (1.7)	4.5 (1.7)	4.2 (1.9)	4.8 (1.6)	4.1 (1.7)	4.8 (1.7)
食事	3.8 (1.9)	3.8 (1.9)	3.3 (1.9)	4.1 (1.8)	3.3 (1.8)	4.2 (1.9)
テロ・武力衝突・戦争	3.3 (1.6)	3.3 (1.8)	3.3 (1.7)	3.3 (1.7)	3.4 (1.8)	3.2 (1.6)
小児期の予防接種の確認, n (%)						
今回確認した	15 (15.2)	21 (17.1)	15 (16.9)	21 (15.8)	25 (25.3)	11 (8.9)
以前確認した	17 (17.2)	20 (16.3)	18 (20.2)	19 (14.3)	15 (15.2)	22 (17.9)
確認したことがない	67 (67.7)	82 (66.7)	56 (62.9)	93 (69.9)	59 (59.6)	90 (73.2)
旅行前の予防接種, n (%)						
受けた	19 (19.2)	34 (27.6)	22 (24.7)	31 (23.3)	34 (34.3)	19 (15.5)
受けていない	80 (80.8)	89 (72.4)	67 (75.3)	102 (76.7)	65 (65.7)	104 (84.6)
海外旅行傷害保険の加入, n (%)						
保険会社	39 (39.4)	56 (45.5)	29 (32.6)	66 (49.6)	42 (42.4)	53 (43.1)
クレジットカード付帯	55 (55.6)	50 (40.7)	48 (53.9)	57 (42.9)	46 (46.5)	59 (48.0)
加入していない	4 (4.0)	15 (12.2)	10 (11.2)	9 (6.8)	9 (9.1)	10 (8.1)
その他	1 (1.0)	2 (1.6)	2 (2.3)	1 (0.8)	2 (2.0)	1 (0.8)
疾病リスク情報の入手, n (%)						
した	65 (65.7)	89 (72.4)	54 (60.7)	100 (75.2)	64 (64.7)	90 (73.2)
しなかった	34 (34.3)	34 (27.6)	35 (39.3)	33 (24.8)	35 (35.4)	33 (26.8)
けが・病気への備え(薬など), n (%)						
した	91 (91.9)	109 (88.6)	77 (86.5)	123 (92.5)	90 (90.9)	110 (89.4)
しなかった	8 (8.1)	14 (11.4)	12 (13.5)	10 (7.5)	9 (9.1)	13 (10.6)

表 3 研究対象者の旅行中のリスク行動 (n=110)

	n	(%)
屋台で作られた食べ物を買って食べた		
食べなかった~2日に1回未満	51	(46.4)
2日に1回以上	59	(53.6)
生か加熱されていない野菜・果物などを買って食べた		
食べなかった~2日に1回未満	66	(60.0)
2日に1回以上	44	(40.0)
作り置きを冷めた食べ物を買って食べた		
食べなかった~2日に1回未満	87	(79.1)
2日に1回以上	23	(20.9)
氷入りの飲み物を飲んだ		
食べなかった~2日に1回未満	82	(74.6)
2日に1回以上	28	(25.5)
川や湖、池など淡水で泳いだり、水遊びをしたか		
しなかった	88	(80.0)
した	22	(20.0)
飼い主不明の犬や猫などの動物に触ったか		
触らなかつた	75	(68.2)
触った	35	(31.8)

表 4 研究対象者が旅行中に有した症状 (n=110)

	n	(%)
症状なし	34	(30.9)
症状あり	76	(69.1)
症状の詳細		
下痢	49	(44.5)
鼻水・鼻づまり	38	(34.5)
のどの痛み	31	(28.2)
せき・たん	27	(24.5)
皮膚の症状	21	(19.1)
頭痛	20	(18.2)
胃のもたれ・むねやけ	17	(15.5)
腹痛・胃痛	15	(13.6)
くしゃみ	14	(12.7)
吐き気・おうと	12	(10.9)
便秘	9	(8.2)
微熱(37~38度未満)	8	(7.3)
高熱(38度以上)	6	(5.5)
けが・骨折	1	(0.9)
持病の悪化	0	
その他	0	

③成果の公表

本研究の成果は疫学や渡航医学など関連領域の国内外の学会及び国際学術誌に発表する予定である。

6. 自己評価

- 日本人旅行者が多い時期を狙って、夏期と冬期の休暇期間にインドに渡航し、デリーの宿でデータ収集を行った。夏期のお盆休み前に渡航し、調査を開始していればもっと多くのデータを収集できたのではないかと思われる。また、渡航時期によって対象者の特性が異なると考えられる。幅広い特性の対象者からデータを収集できるよう、渡航の時期・回数の検討が必要である。
- 当初、宿に到着した時点で初回調査を実施しようと考えていたが、宿に到着したばかりの旅行者は旅の計画の方が優先され、調査への参加協力が得にくかった。そこで、到着したばかりかどうかにかかわらず、宿泊客のよいタイミングでアンケートに回答してもらうこととした。さらに、初回調査で疾患発生状況を併せて収集できるようにアンケートを改変した（初回調査に追跡調査の質問項目を加えた）。
- 便細菌検査については、コルカタでしか実施できないこと、サンタナに宿泊する日本人旅行者はコルカタよりもデリーの方が圧倒的に多いこと、コストの問題から、今回はデリーに絞ってデータ収集を行った。結果として、短期間で多く（220名分）のデータを収集することができた。アウトカムのデータをいかに効率的に収集するかが今後の検討課題である。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- ② (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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : 赤痢アメーバ “シスト形成” 形態変化の可視化

課 題 番 号 : 30-Ippan-17

2. 代 表 者 : 見市文香 (佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野・講師 (特定))

共 同 研 究 者 : 中村梨沙 (寄生虫学分野・助教)

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)

濱野真二郎 (寄生虫学分野・教授)

3. 決 定 額 : 450 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

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。そのため栄養型からシストへの移行である “シスト形成” は、それを阻害すると赤痢アメーバの宿主間伝播を直接阻止することが出来るため、治療という応用的側面から着目されてきたが、その分子機構はほとんど解明されていない。我々は、モデル生物である *Entamoeba invadens* を用いた解析により、シスト形成の分子機構の解明を目指して研究を進めている。これまでにシスト形成の新規制御分子の 1 つとしてコレステロール硫酸 (CS) を見出した (Mi-ichi *et al*, *PNAS* 2009, 2015; *PLoS NTD* 2011; *Eukaryot Cell* 2015; *PLoS Pathogens* 2016)。また、研究する上で必要不可欠であるシスト形成の評価系としてフローサイトメトリー (FCM) を用いた方法論の確立に成功した (Mi-ichi *et al*, *Front Cell Infect Microbiol.* 2018)。本方法は定量的に形成するシストを計測することを可能にただけでなく、シスト形成に伴うダイナミックな形態変化を経時的に観察出来るものであり、現在進めている、*Entamoeba* シスト形成分子機構の解明の有用なツールとなることが期待される。

本申請研究では、上記方法による阻害剤のスクリーニングに加え、本方法をイメージング FCM の系に応用、*Entamoeba* シスト形成過程に生じる形態変化の細胞レベルでの可視化を目指す。

②研究内容

[1] シスト形成の阻害剤探索（FCM を用いた方法）

シスト形成を阻害する阻害剤のスクリーニングを行う。形成されたシストの計測には我々が確立した“FCM を用いたシスト形成の新規解析方法”を用いる。本方法は96 ウェルプレートを利用してスクリーニングを行うことが可能であり、2000 個程度の化合物ライブラリーの使用を予定している。

[2] イメージング FCM を用いたシスト形成に伴う形態変化の解析方法の確立

我々が確立した“FCM によるシスト形成のステージ移行を観測する方法”（通常の FCM を用いる）をイメージング FCM（ImageStream^{®X} Mark II、Merck Millipore）に応用する。

③予想される成果

我々が確立した FCM を用いたシスト形成の解析は、シスト壁の主成分であるキチン、そして生体膜構造を染色することで、シスト形成に伴い現れる多様な細胞集団を2次元展開することを可能にし、シスト形成のステージ移行をリアルタイムで見ることが出来る画期的な手法である。

本申請課題では、本方法にイメージング FCM と組み合わせることで、シスト形成のステージ移行を細胞像の可視化を伴った形でモニタリングできる方法論的発展とその応用を試みる。細胞レベルの情報が得られるイメージング FCM を利用することにより、ステージ移行に伴って出現する細胞集団ごとの個々の細胞の形態の情報を収集する方法が確立できれば、阻害剤の効果を可視化し、さらに標的分子の同定をも可能にすることが期待できる。

現状、阻害剤の効果は細胞の生死のみで判定されている。本申請課題で確立する方法を用いることで、阻害剤の効果を、細胞の生死に加えて、細胞に与える影響、作用する時間などの情報を同時に得られることが期待できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

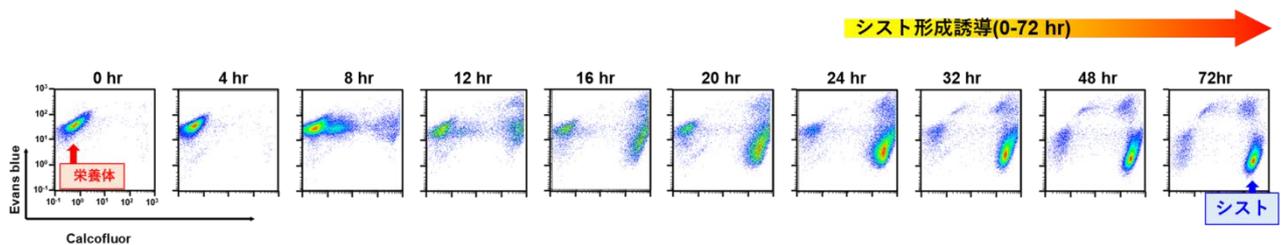
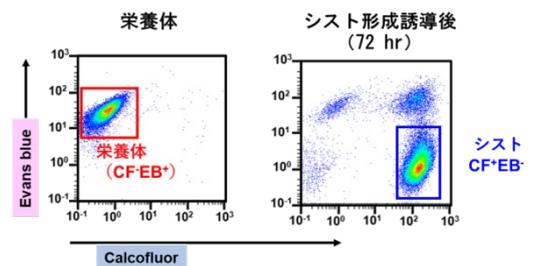
赤痢アメーバの培養株はシスト形成能を失っているため、*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いてシスト形成を再現している。我々は、迅速にかつ再現性高く *E. invadens* のステージ毎の細胞数を計測できる方法の確立した（平成 29 年度一般共同研究報告書。Mi-ichi *et al*, *Front Cell Infect Microbiol.* 2018）。今回、本方法を

- 1) シスト形成を阻害する化合物のスクリーニング（ラージスケール）
- 2) イメージング FCM を用いたシスト形成に伴う形態変化の解析に応用することを試みた。

②成果（結果+考察）

1) これまでに 400 化合物のスクリーニングを行った結果、シスト形成を阻害する化合物 19 種類を得ている（Mi-ichi *et al*, *Front Cell Infect Microbiol.* 2018）。今回 10000 化合物のスクリーニングを行った結果、シスト形成を再現性良く阻害する化合物を 30 種類得ることが出来た（未発表）。

2) 我々が確立したフローサイトメトリー法を用いたシスト形成の新規な解析法では、栄養体の膜構造を Evans blue で、そしてキチン（シスト壁の主成分）を Calcofluor で蛍光染色することで、栄養体とシストを明確に区別、それぞれを細胞集団として検出することが出来る（右図）。そして、経時的な観察を行うことで、シスト形成のステージ移行を細胞集団の動きとして観測することが出来ている（下図）。



本方法をイメージング FCM (ImageStream^{®X} Mark II) に応用することを試みた。最初にキチンを染色する蛍光色素の選択を行った（これまで用いてきた Calcofluor を用いることが不可能であったため）。キチン壁を染色することが報告されている蛍光色素である Congo red と WGA (Wheat Germ Agglutinin) -FITC について、通常の FCM (MACSQuant) を用いて検討を行った結果、WGA-FITC での染色パターンが Calcofluor での染色パターンに近い結果が得られることを見出した。同時に WGA-FITC の濃度の検討も行った。

次に WGA-FITC と Evans blue で 2 重染色をした細胞（栄養体およびシスト形成誘導後 72 hr）を用いて、イメージング FCM (ImageStream^{®X} Mark II) で解析を行った。結果、細胞集団に含まれる個々の細胞の染色像が得られ、また、マイナーな細胞集団に、含まれる

個々の細胞の染色像が得られた。同時に問題点として、WGA-FITC 陽性な細胞集団に一部キチン壁が形成されていない細胞が含まれていることが見出された。WGA-FITC の選択性が Calcofluor に比べ低いことが問題であると考えられる。現在イメージング FCM (ImageStream^{®X} Mark II) で Calcofluor を用いた解析が可能になっており、Calcofluor と Evans blue を用いた解析を進めている。

③成果の公表

1. Mi-Ichi F, Miyake Y, Tam VK, Yoshida H. A Flow Cytometry Method for Dissecting the Cell Differentiation Process of *Entamoeba* Encystation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018. **8**: 250. doi: 10.3389/fcimb.2018.00250.

6. 自己評価

最終目標である「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」に向けて、前回新技術の創出を行うことに成功した。今回は、スクリーニングの規模を大きく拡大し、シスト形成を阻害する化合物として新たに 30 種類得ることが出来た。また、得られた新規阻害する化合物の作用機序の解明を行うことに有用な方法となるイメージング FCM を用いた解析に着手した。そして、個々の細胞のデータを得ることに成功、主たる細胞集団だけでなく、小さな細胞集団についても細胞の形態や状態を詳細に解析することが可能になった。これまでに得られた研究成果は論文としてすでに掲載されたもの (Mi-ichi *et al*, *Front Cell Infect Microbiol.* 2018)、また現在投稿中、投稿準備中のものにまとめることができおり、満足できる成果を得られたと考えている。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：戦後日本の離島・へき地医療と「風土病」抑制経験の歴史化
課 題 番 号：30-Ippan-18
2. 代 表 者：市川智生（沖縄国際大学・准教授）
共同研究者：山本太郎（長崎大学熱帯医学研究所・教授）
3. 決 定 額：400 千円
4. 申請時書類より

①研究目的

本研究では、戦後日本における感染症の抑制経験の情報を記録・保存し、一次史料に基づく 20 世紀日本の熱帯医学史の構築を目的とする。

日本における熱帯医学の時期を区分すれば、1)20 世紀初頭から 1925 年（病原微生物の解明、極東熱帯医学会議（東京）の開催）、2) 1940 年代～1950 年代（戦時体制と占領改革）、3)1950 年代～1960 年代（日本熱帯医学会の設立から日米医学協力計画の開始）、4)1970 年代～1990 年代（国際的な医療協力の展開と橋本イニシアチブの実施）の 4 つに大別することができる。ここでは、主として 3)の時期を対象とする。

戦前の日本で蓄積された熱帯医学の研究成果は、戦後、日本国内に投影された。その対象は、当時「風土病」とされた、リンパ系フィラリア（愛媛・鹿児島・長崎・沖縄）、マラリア（彦根）、日本住血吸虫症（甲府、久留米、片山）などである。これらの疾病が抑制・制圧された 1950 年代から 60 年代は、日本が経済成長を経験し、社会基盤が整備され、生活様式も変化する時期と重なる。そして、「風土病」の流行地域の多くは離島や交通不便なへき地であり、1953 年以後の離島振興事業による社会資本の整備と感染症抑制による住民の健康向上によって、その生活のありようは大きく変貌を遂げた。

②研究内容

戦後日本の離島およびへき地における「風土病」の抑制がどのように成功したのかを歴史的に検証するために、1950 年代から 70 年代にかけての研究および当時のフィールドの双方において一次資料を収集する。研究機関の旧蔵資料、研究対象地の公的機関において資料調査を行う。（本研究が「資料」と呼ぶのは、活字化された文献ではなく、手書きによる現資料のことである。）紙媒体の資料については、アーカイブズ学的手法により保全と目録化を実施する。また、研究者および被験者をはじめとする地域住民の双方にインタビューを行い、関係者の記憶の情報化を行う

以上から得られた情報をもとに、離島・へき地における住民の健康向上と「風土病」抑制に関する研究論文を執筆する。

③予想される成果

本研究により、戦後日本のへき地・離島地域における住民の健康向上が、いつどのようにより達成されたのかが、歴史的に把握することになる。

離島およびへき地における「風土病」の抑制のなかで実施されたメソッドは、集団投薬治療（MDA）や住民の自発的参加に基づく健康向上（PHC）をはじめとして、1970年代以後の国際医療協力において途上国などで用いられたものと類似性が高い。本研究により把握しうる戦後日本の保健医療に関する情報が、JICA などによる医療支援の方法論と関連を示唆する可能性がある。

また、1950年代から1970年代は、日本熱帯医学会（1959年設立）に研究者が参集し、研究成果の発表や情報交換を本格化された時期と重なっている。そのため、本研究により同会における研究情報の蓄積とへき地・離島地域でのアウトリーチがどのように展開したのかを歴史的に整理することにもなるはずである。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

本研究では、歴史学およびアーカイブズ学的方法により 1950 年代～1960 年代にかけての日本各地における「風土病」抑制の過程について、その歴史的意義を人文科学的に検討した。そのため、長崎大学熱帯医学研究所に所蔵される当該時期の研究資料、当時「風土病」抑制に携わった研究者へのインタビュー記録などを研究材料として利用した。

これらの研究材料は、研究代表者もメンバーとして参加した「医学史の現代的意義—感染症対策の歴史化と医学史研究の社会との対話の構築」（「課題設定による先導的人文学・社会科学研究推進事業」、日本学術振興会、2015 年 10 月～2018 年 9 月）により、その存在が明らかになったものであり、主として、寄生虫学分野旧蔵資料および衛生動物学研究室旧蔵資料のふたつから構成される。前者は、旧風土病研究所臨床部の片峰大助教授（1915-1991）によるリンパ系フィラリアの流行調査およびジエチルカルバマジン（DEC）の集団投与治療に関する研究の記録である。フィールドとしては、長崎では五島列島各地、松島、天久保、熊本では天草地方、沖縄では宮古島、海外では済州島に関する資料が含まれている。後者は同じく旧風土病研究所衛生動物学研究室の教授をつとめた大森南三郎教授（衛生昆虫学）の蔵書、研究資料である。同研究室が収集した研究文献、住所録、手帳、学会参加の際の記念写真など、研究者間のコミュニケーションの軌跡を記録していることに特徴がある。

また、本研究では感染症および寄生虫症の抑制に関する研究に携わった研究者、自治体職員、保健師などの聞き取り記録も検討の対象とした。前述の紙媒体の研究資料からは得ることができない、研究者および研究対象となった地域住民とのコミュニケーションの記録として、極めて重要な情報となっている。

②成果（結果＋考察）

本研究では、戦後日本の島嶼部およびへき地における「風土病」の抑制の特徴について、歴史的に検証を行った。研究の対象としたのは、一次史料を検討することができた、長崎県内各地の 1950 年代のリンパ系フィラリアである。

旧風土病研究所臨床部では、長崎県内では小値賀島（1958～1961 年）、松島（1960 年）、島原（1962～1964 年）においてフィラリア研究を実施した。その特徴は、①夜間の採血結果に基づく陽性者への Diethylcarbamazine（DEC, 商標名スパトニン）の投与、②屋内のアカイエカを対象とした Diazinon 乳剤の噴霧にあった。いずれのフィールドにおいても、各地で 10-20 %程度にのぼった microfilaria 保有者は、ほぼゼロとなった。以上の経緯は、風土病研究所臨床部が発表した論文ですでに明らかにされている内容である。

本研究で検討した歴史的資料によれば、長崎では 1950 年代後半の時点で、DEC 投与と屋内残留噴霧の併用によるフィラリア対策の手法が定着しつつあった。その後、1962（昭和 37）年、厚生省によるフィラリア病予防対策事業によって、この両者は全国各地で本格的に実施されるようになった。本事例は、学術的に確立した研究の成

果が、後に行政によって制度化され、広範囲に応用されるようになった経緯を示している。戦後直後の日本の島嶼部において、住民の健康阻害の主なものが寄生虫感染症だったことを想起すると、風土病研究所臨床部による疫学研究は、政府による島嶼部の健康改善に関する政策が本格化する以前において、それを補完する存在であったといえる。すなわち、へき地・島嶼地域の健康向上は、「風土病」抑制のさなかに実践されたのである。

また、刊行された研究論文からは得られない情報として、島嶼部各地でフィラリア研究が実施された際には、地域住民に対する情報提供や一次医療サービスの提供も同時に行われていた点を挙げることができる。例えば、寄生虫疾患に関する住民を対象とした講演会の実施、健康相談にきた住民の診察などは、ほぼすべての研究対象地で実践されていた。研究の目的はリンパ系フィラリアや肺吸虫など寄生虫感染症の疫学研究と薬剤試験であった。しかし、そのみの実践ではなく、日常的な診療サービスの提供が行われていた。それは、住民との円滑なコミュニケーションをもたらし、集団投薬治療を成功へと結びつけるために必要な行動として認識されていた。これは、今日的な意味での研究アウトリーチとしての性格を有していたことになる。

③成果の公表

本研究の成果は、さしあたり、2019年5月の第88回社会経済史学会において、パネルセッション「風土病」の克服は日本社会をどう変えたのか?」を組織し、口頭発表を行う予定である。また、2019年11月に沖縄で開催される日本熱帯医学会大会においても、本研究計画をもとにしたシンポジウムを行う予定である。

上記の機会においては、長崎県島嶼部のリンパ系フィラリアだけではなく、南西諸島のマラリア、筑後川流域の日本住血吸虫症、より一般的な寄生虫感染症として回虫症など、戦後日本において克服された複数の寄生虫感染症を扱う予定である。それぞれが蔓延していた地域社会、自然環境を前提とした疾病ごとの特徴は何だったのか。そして、それぞれの「風土病」はどのような方法で克服され、その地域の保健医療、さらには住民の生活の変化にどのような変化を生じさせたのかを比較する機会としたい。同時に、寄生虫学研究の過去の記録を歴史資料として整理・保全し、歴史研究がそれをどのように利用すべきなのかという点についても議論を行う予定である。

6. 自己評価

本研究が対象とした、戦後日本における「風土病」の克服の経緯は、すでに刊行された研究論文によって明らかである。ここでは、人文科学的手法により、その歴史的意義を明らかにすることに主眼をおいた。この「風土病」の克服経験の結果、日本の島嶼地域の保健医療にどのような影響を与えたのか、その結果、住民の健康にどのような変化があったのかという点については検討することができなかった。この点に反省が残る。

今後は、疾病および地域の相違を踏まえ、公衆衛生学、国際保健学分野と人文科学・社会科学系の研究者による共同作業を継続することで、課題に応えたいと考えている。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 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 : 30-Ippan-19

2. 代 表 者 : (長崎大学病院眼科・講師) 上松聖典
共 同 研 究 者 : (熱帯学研究所小児感染症学分野・教授) 吉田レイミント
(長崎大学病態解析診断学分野・教授) 柳原 克紀
(熱帯学研究所小児感染症学分野・助教) 樋泉 道子
(長崎大学病態解析診断学分野・助教) 森永 芳智
(長崎大学病態解析診断学分野・助教) 小佐井 康介
(長崎大学病院眼科・助教) ヤッセル ヘルミー モハメド
(長崎大学病院眼科・医員) 植木 亮太郎
(長崎大学病院眼科・医員) 井上 大輔

3. 決 定 額 : 640 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 が開始された。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・性別分布などを解析する。
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いて角結膜炎患者の登録、臨床疫学的情報および結膜ぬぐい液の収集を開始した。細菌培養、PCR、マイクロアレイ法を用いて起因菌・ウイルスの同定、肺炎球菌血清型の同定をおこなう。
3. 健康小児の角結膜炎常在肺炎球菌の保菌率：収集した結膜ぬぐい液を PCR 法およびマイクロアレイ法にてその肺炎球菌保菌とその血清型を同定する。

上記 2, 3 においては結膜ぬぐい液に存在する細菌の菌種をメタゲノム解析で調査する予定である。

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炎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。今回の研究では鼻腔からもサンプルを採取しており、鼻腔および結膜嚢における肺炎球菌の関連についても新たな知見が得られると思われる。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。

さらに結膜嚢に存在する他の細菌についてもメタゲノム解析により新たな知見が得られる可能性がある。

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 コミュニティの 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 10 月から 1 年間で 800 症例の情報及び検体を収集した。培養で細菌が検出されたのは 59 例(7.4%)であった。そのうちグラム陽性球菌が 35 例と最も多く、肺炎球菌は 6 例であった。全症例から無作為に選んだ 50 例について 16S PCR にて結膜サンプルの細菌を解析すると、Firmicutes、Acinetobacteria、Proteobacteria、Bacteroidetes が多く検出された。病原細菌と、細菌叢についてさらに解析中である。
- 3) 2016 年 10 月から 11 月に PCV 接種を受けた 24 か月未満の児に対して結膜嚢のぬぐい液採取を行った。698 人の子供たちが登録され、62 人の子供 (8.9%, 95%CI 6.9~11.2%) が結膜において肺炎球菌が陽性であった。小児の鼻咽頭の肺炎球菌は、小児の肺炎球菌陽性結膜 (aOR 47.55, 95%CI 23.30-97.06) と有意に正の関連があり、ほとんどの小児で血清型が一致していた。低出生体重児および保育園への通園歴もまた、結膜肺炎球菌陽性の可能性が高かった (それぞれ aOR 10.67, 95%CI 3.95-28.85 および 2.24, 1.44-3.50)。非分

類可能肺炎球菌が結膜で最も一般的に検出された（59%）。

結膜の肺炎連鎖球菌は、肺炎予防接種以前の24ヶ月未満の年齢のベトナム人小児の8.9%で検出された。これは他の地域での既報と同等であった。結膜の肺炎球菌保菌は鼻咽頭の保菌と正の関連があり、血清型はほとんどの小児で相同性を示した。このことは肺炎球菌では初めて得られた知見である。

③成果の公表

1. 2018年4月 第11回 International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD) (オーストラリア、メルボルン)
2. 2018年5月 The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2018 Annual Meeting (アメリカ合衆国、ホノルル)

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、健康小児の角結膜炎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た。最終的には多数例の検体が集まったが、培養で陽性となったのは59例でありさらに肺炎球菌が検出されたのは6例であった。そこで原因細菌についての検証と同時に16S PCR結膜囊から検出されるすべての細菌について解析することとした。結膜炎でのこのような解析は未だほとんどなされておらず、新たな知見が得られるものと考えられる。

健康小児の角結膜炎常在肺炎球菌の保菌率の調査でも、十分な症例数を得ることができた。肺炎球菌の保菌率を解析し、肺炎球菌の保菌に関与する因子を見出した。結膜の肺炎連鎖球菌保菌は鼻咽頭の保菌と正の関連があり、血清型はほとんどの小児で同一性を示すことがわかった。このことは肺炎球菌では初めて得られた知見であり、現在論文作成中である。さらに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

- 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 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 : 30-Ippan-20

2. 代 表 者 : 富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・教授 小松 かつ子
共同研究者 :

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 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・助教 朱 姝

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・教授 平山 謙二

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・助教 水上 修作

長崎大学熱帯医学・グローバルヘルス研究科・准教授 グエン フィ ティエン

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・大学院生 テクレミカエル アウト アレム

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・大学院生 ブンデュティディ マビンガ グロリア

3. 決 定 額 : 439 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・分析技術等を活用し、抗マラリア薬の開発を目的として、アフリカ原産の薬草コンゴボロロ (*Morinda morindoides*) の葉の溶媒抽出エキス及びこれに含まれる化合物の抗マラリア活性について検討を行う。抗マラリア活性はコンゴボロロの産地や抽出法によって変動することが予想されるため、最も強い活性を得るための最適条件を明らかにするとともに、活性の指標になる化合物を同定する。抗マラリア効果の判定には、熱帯医学研究所 (熱研) が持つ熱帯熱マラリアの *in vitro* 培養システムを使用し、培養液中への抽出エキス・化合物の添加による抗マラリア活性を指標に判定を行う。 *In vitro* で活性が認められた抽出エキスについては、 *in vivo* での抗マラリア効果も併せて検討する。

②研究内容

これまでに、コンゴボロロの葉の抽出エキスが抗マラリア活性を持つこと、メタノール抽出エキスに活性が強く、エタノール及び酢酸エチル抽出エキスがこれに準じ、熱水抽出エキスはそれに劣ることを見出した。しかしながら、臨床応用を考えた場合、コンゴ民主共和国 (DRC) 内で飲用の歴史があるのは、熱水抽出エキスのみであることから、平成 30 年度は熱水抽出エキスに焦点を絞って検討を行うこととし、その他これまでに得られた研究結果も鑑みて、研究計画を見直した。

申請者らは、熱研対応教員より提供されたコンゴボロロの葉を用いて、溶媒抽出と遺伝子解析を行う。抽出条件の決定は、これに先んじて行うコンゴボロロの飲用と感染症についてのシステマティックレビューから得られた情報を参考にして行う。これら試料の抗マラリア活性を熱研にて、 *in vitro* マラリア感染赤血球培養システムを用いて評価する。活

性が認められた抽出エキスについては *in vivo* での抗マラリア効果も併せて検討する。

また、これまでに、コンゴボロロに含まれる複数の成分についても明らかにしているため、各種分画物を用いた化合物の単離と活性指標となる化合物の同定も合わせて継続する。研究は、以下のような手順で今後進めて行く。

(1) コンゴボロロ飲用に関連した情報の収集・解析

十分なコンゴボロロの情報を得るために、コンゴボロロの感染症に対する効果についてのシステマティックレビューを、熱研で行う。DRC からの留学生をメンバーに含むことによって、英語に加えてフランス語・コンゴの現地語で書かれた文献も対象とすることが可能となり、より確かな多くの情報が収集できると考えられる。ここで得られた結果は(2)以下の条件設定に活かされる。

(2) コンゴボロロ抽出物の準備

熱研より富山大学にコンゴボロロの葉を提供し、熱水抽出エキスを異なった抽出温度・時間で作製する。また、コンゴ民主共和国の異なる地点で採取したコンゴボロロの葉を入手し、それぞれを用いて抽出エキスを作製する。これらを以下(3)、(4)の実験に供する。

(3) *In vitro* でのマラリア原虫培養と化合物等添加処理

実験には、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、培養液中に各種抽出エキスを添加後、最適な混合ガス環境下の 37°C インキュベーター内で 48 時間培養を行う。

(4) 感染マラリア原虫の検出と抗マラリア活性の算出

赤血球内の核酸を SYBR Green I を用いて染色し、マラリア原虫を検出する。抽出エキス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、各抽出エキスの抗マラリア活性を算出する。なお、各抽出エキスについては抗マラリア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。

(5) 最適なコンゴボロロ原産地及び抽出法の決定

(2) ~ (4) の結果から、最も強い抗マラリア活性を持つコンゴボロロ抽出エキスの作製に最適なコンゴボロロの葉の産地、抽出条件などを決定する。

(6) コンゴボロロ抽出エキスの活性指標となる化合物の同定

これまでに単離した化合物以外のイリドイド配糖体を単離し、全化合物の抗マラリア活性を検討する。活性の認められる溶媒抽出エキスと、活性を示す化合物(オレアノール酸、イリドイド配糖体成分など)の含有パターン及び定量値とを比較して、抗マラリア活性の指標となる化合物を見つけ出す。

(7) コンゴボロロ抽出エキスの抗マラリア活性の *in vivo* 実験系での検討

(4) で強い抗マラリア活性を示し、臨床試験に適応可能な溶媒抽出エキスを C57BL/6 マウスに予め 3 日間経口投与し、その後マウスマラリアを感染させ、生存率・血中原虫数などを指標に、抗マラリア効果を検討する(予防モデル)。また、感染と同時にエキス投与を開始する群(治療モデル)も作製する。

(8) コンゴボロロの遺伝的多様性の解析

異なる地点で採取したコンゴボロロについて、核遺伝子 ITS 領域などの塩基配列を解析し、遺伝子多型の有無を調べる。遺伝子多型と産地または含有成分との関連性を検討し、活性の強いコンゴボロロを得るための指標となるかを検討する。

③予想される成果

上記の実験から、コンゴボロ熱水抽出エキスに関して抗マラリア活性（及び細胞傷害性）を指標とした際に、最適な①産地、②葉の管理方法、③抽出方法（温度・時間）などの情報が得られることが期待される。また、コンゴボロ抽出エキスの活性指標になる化合物の同定が期待される。さらに、*in vitro* 実験で、活性が強く、安全性が高い抽出エキスが明らかになった場合、*in vivo* 実験を行うことにより、コンゴボロの抗マラリア効果が確実なものになる。活性成分が多岐に亘るエキスでは、早期に薬剤耐性株が出現することは少ないと考えられる。コンゴ民主共和国でのコンゴボロに関する伝承のエビデンスを提示できると共に、現地に還元できる安定的効果のある抗マラリア薬の開発に繋がることが期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法

研究材料

コンゴボロ (*Morinda morindoides*) の葉。熱帯医学研究所がコンゴ民主共和国 (DRC) の共同研究者から入手した 2 サンプル (2016 年入手の MB003-B、2017 年入手の KB004)。

研究方法

1) コンゴボロ飲用に関連した情報の収集・解析

コンゴボロの感染症に対する効果についてシステマティックレビューを行った。また、Jose N. Lami 教授（キンシャサ大学薬学部長）の協力のもと、DRC でのコンゴボロの飲用方法、効果などについての情報収集を行った。

2) *in vitro* 実験系での抽出エキスの各溶媒画分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、KB004 の 50% エタノール抽出エキスの各溶媒画分を添加した後、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、溶媒画分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、各溶媒画分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。

3) LCMS による成分プロファイリング

LC-ESI-IT-TOF-MS を用い、次の LCMS 条件で分析した。カラム：YMC Pack Pro C18 RS (i.d. 2.1x150 mm)；溶媒：A, water with 0.1% formic acid; B, MeCN with 0.1% formic acid；グラジエント：5%B (0-2 min), 5-95%B (2-42 min), 95-100%B (42-42.1 min), 100%B (42.1-50 min), 100-5%B (50-50.3 min), 5%B (50.3-55 min)；測定範囲： m/z 150-1000。抽出エキス及び各溶媒画分の成分プロファイルと比較するとともに、特徴的なピーク成分を推定するため、各ピークのマススペクトルの精密質量及び MS/MS のフラグメントシグナルに基づき解析を行った。

4) 抽出エキスの分画

KB004 の乾燥葉 178g に 50% エタノールを加え、ミキサーを用いて抽出し、抽出液を分

取する操作を4回繰り返した。抽出液を合わせ減圧濃縮した後、凍結乾燥して抽出エキスを得た。これに水を加え、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル及びブタノールで順次分配して、各溶媒画分を得た。各画分に含有される成分のプロファイリングを行い、フェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物の存在を確認し、さらに分画を行った。また、増量を目的に乾燥葉1,060 gを用いて80%メタノール及び50%メタノールにより抽出したエキスを作成し、上記と同様に溶媒分配を行った。得られたクロロホルム画分、酢酸エチル画分及びブタノール画分についてシリカゲル及びオクタデシルシリル (ODS) カラムクロマトグラフィーによる分画を進めた。

5) 遺伝的多様性の解析

M. morindoides に別種が交配している可能性が高かった MB003-B の葉1検体について核遺伝子 ITS 領域を PCR 法で増幅した後、TA クローニング法で PCR 産物のクローニングを行い、15 クローンについて ITS 配列を決定した。

②成果

1) コンゴボロロ飲用に関連した情報の収集・解析

コンゴボロロの感染症に対する効果についてシステマティックレビューを開始した。Pubmed など複数の論文検索システムを用い、キーワード検索により341の論文を選び出した。詳細内容の確認から、各種スクリーニングにより関連の強い38の論文を抽出し、現在解析を進めている。

また、Jose N. Lami 教授 (キンシャサ大学薬学部長) の協力のもと、DRC でのコンゴボロロの飲用方法などについての情報収集を行った。現地の住民向けのコンゴボロロの飲用方法に関する小冊子 (フランス語) などの情報を入手したが、厳密な飲用方法のルールは決まっていないことが示唆された。

2) LCMS プロファイリング

昨年度、KB004 のエタノールエキスの LCMS 分析を行い、得られたピークについて化合物の推定を進め、本エキス中に13種のフェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物 (1-13) が含まれ、そのうち4種 (4, 8, 12, 13) を新規化合物であると推定した。未推定であったピークの解析を進め、本エキスには *M. coreia*、*M. elliptica* から単離報告のある yopaaoside A^{1,2)} の6, 7位ジオール体である 6,7-diol yopaaoside A (4a, 分子式 C₂₇H₃₀O₁₆, 分子量 610, t_R 14.9 min, m/z 611.1619 [M+H]⁺, 609.1458 [M-H]⁻) と推定される化合物が含まれると推定した。

- 1) Kanchanapoom, T.; Kasai, R.; Yamasaki, K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. *Phytochemistry* 2002, 59, 551-556.
- 2) Noiarsa, P.; Ruchirawat, S.; Otsuka, H.; Kanchanapoom, T. A new iridoid glucoside from the Thai medicinal plant, *Morinda elliptica* Ridl. *J. Nat. Med.* 2006, 60, 322-324

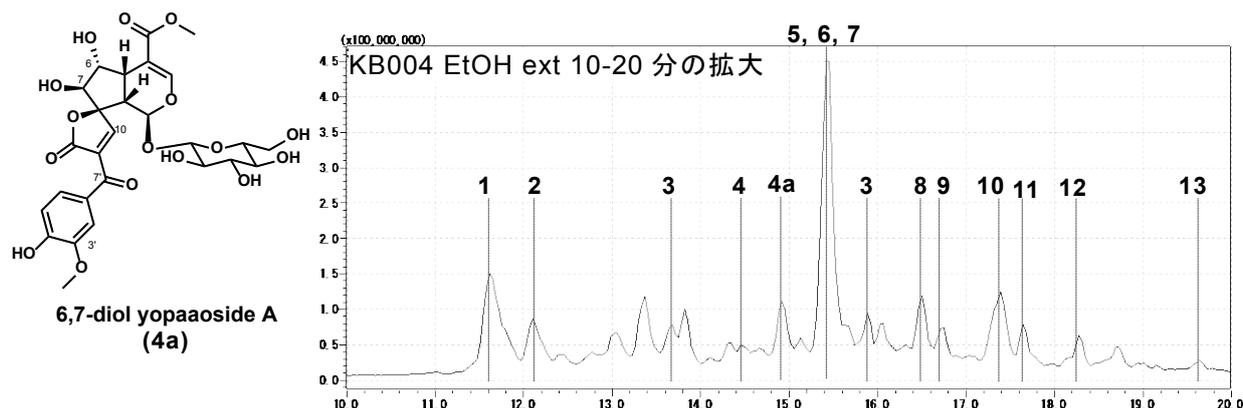


Fig. 1. LCMS profiling of ethanol extract of Kongo Bololo leaves from the sample KB004
Components (1-13) tentatively identified by LC/MS/MS analysis

3) 成分の分画

昨年度、抗マラリア活性をもつと推定されるフェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物は、KB004 の 50%エタノール抽出エキスのクロロホルム画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分及び水画分に含有されることが確認された。

本年度は、LCMS 分析により目的とするピークを指標にしながら、各溶媒画分をシリカゲル及び ODS カラムクロマトグラフィーで分画した。得られた各画分は混合物の状態であり、目的の化合物を得るためには ODS-HPLC によるさらなる精製が必要と考えられた。しかし得られた画分が少量であったため、増量を目的として新たに抽出エキスを作成し、溶媒分配を行い、上記と同様の分画を行った。

現在、目的とする化合物が確認された画分について ODS-HPLC による精製を進めている。これまでに新規化合物 2 種を単離、構造決定している (epoxygaertneroside および gaertneric acid の酸化体、構造式は特許等の関連で、現時点では開示しない)。また、LCMS 分析においては検出できていなかった既知化合物 1 種 dehydrogaertneroside を単離し、既報のスペクトルデータとの比較により同定した。今後、単離した化合物について NMR、MS などのスペクトル解析を行い、構造決定すると共に、各化合物の抗マラリア活性を検討する予定である。

4) 溶媒画分の抗マラリア活性

50%エタノール抽出エキスの 5 画分について抗マラリア活性を測定した。

表1 各50%エタノール抽出エキス画分の持つ抗マラリア活性の検討

	3D7A		Dd2		
	IC ₅₀	SD	IC ₅₀	SD	
50%エタノール抽出エキス	233.99	39.55	199.81	30.40	µg/ml
ヘキサン画分	20.99	9.11	12.03	0.15	µg/ml
クロロホルム画分	4.39	0.68	4.72	0.64	µg/ml
酢酸エチル画分	67.53	43.47	59.59	0.88	µg/ml
ブタノール画分	446.89	58.46	371.65	N/D	µg/ml
水画分	>500	N/D	>500	N/D	µg/ml
アーテスネート	7.87	0.93	3.50	0.06	nM
クロロキン	21.54	0.97	188.92	10.98	nM

*結果は、3回の実験（3D7A）もしくは2回の実験（Dd2）結果の平均値を示している。

その結果、ヘキサン画分、クロロホルム画分、酢酸エチル画分の感受性株（3D7A）に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 20.99 µg/mL、4.39 µg/mL、67.53 µg/mL、また耐性株（Dd2）に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 12.03 µg/mL、4.72 µg/mL、59.59 µg/mL であり、クロロホルム画分の活性が最も強かった。これまでに得られた結果からは、各画分は、耐性株に対しても感受性株に対してとほぼ同等に有効であると考えられた。

5) 遺伝的多様性

これまでに入手したコンゴボロロ KB001~KB006 の中で、ITS 配列の個体内多型が明らかであった KB003-B の1検体について ITS 領域のクローニングを行い、15 クローンの塩基配列を決定した結果、11 タイプの配列が見出された。直接塩基配列を決定した5サンプル10検体の配列とも合わせ、GenBank に登録されている *M. morindoides* (Ivory Coast 産³⁾) と比較したところ、ITS 領域の長さや塩基配列の相同性の点で異なることが判明した。登録種の ITS 領域の長さは 599 bp であるのに対し、DRC 産のコンゴボロロは通常長さ 594 bp で上流から 12 番目に 5 bp の欠失が認められ、DRC 産のみに共通する配列もあった。一方、KB003-B のクローン中には長さ 600 bp のもの、これの 569 番目から 22 bp の欠失があるもの、及び通常の 594 bp の配列のものから 22 bp が欠失したものが認められた。GenBank 登録の *M. lucida* では同じ位置に 22 bp の欠失が認められるが、塩基配列の相違箇所は多く、KB003-B の植物体に本種が関与しているかは断言できない。

M. morindoides は地域により ITS 配列が異なるとともに、雑種形成が行われている可能性があり、安定的に抗マラリア活性のある植物を供給するためには、優良系統の選抜が不可欠である。そのためにも早急な活性成分の同定が必要であり、現在鋭意、化合物の単離を進めている。

3) Razafimandimbison S.G., et al., *Mol. Phylogenet. Evol.* **2009**, *52*, 879-886.

③成果の公表

- (1) 當銘一文, 水上修作, 朱姝, 葛躍偉, テクレミカエル アウト アレム, ヤスンジャン アシム, 張含培, グエン ティエン フィ, 平山謙二, 小松かつ子. 抗マラリア薬開発を指向したコンゴボロロ成分の探索. 第 88 回日本寄生虫学会大会 ; 2019, 3, 15-16; 長崎.
- (2) 當銘一文, 朱姝, 小松かつ子. 抗マラリア薬開発を指向した天然薬物研究 II. 長崎大学熱帯医学研究所・富山大学和漢医薬学総合研究所第 8 回交流セミナー「熱帯医学と和漢薬研究の新展開 -新しい医療体系の構築を目指して-」 ; 2018, 11, 3 ; 富山.

6. 自己評価

DRC の共同研究者との連携のもと、同国の各地でコンゴボロロの葉を収集し、様々な条件で熱水抽出エキスを作製して抗マラリア活性を調べる予定であったが、材料入手が思うように行えなかった。そのため、それぞれの抽出エキスの成分プロファイル、ITS 領域の遺伝子多型も比較検討できず、コンゴボロロの最適な産地を決定することはできなかった。また、抗マラリア活性が高くかつ安全であるなど最適な抽出方法の開発を、活性化化合物の単離・同定後に行うことも計画していたが、抽出エキスからの化合物の分離に時間を要してしまい、現在途中段階である。しかしながら、新規化合物の単離に成功していることから一定の成果が得られたと考えている。遺伝子解析により、DRC 産コンゴボロロの資源植物の状況、他の産地の *M. morindoides* との違いが明らかになったことは多少の成果と言えるが、全体として目的とした成果は得られていない。今後は、早急に化合物の分離を進め、抗マラリア活性の解析を行い、研究を進行させる。同時に、コンゴボロロの資源植物を収集する努力を続ける。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (初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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : 漢方方剤・和漢薬由来新規抗トリパノソーマ薬の探索

課 題 番 号 : 30-Ippan-21

2. 代 表 者 : 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 當銘 一文
共同研究者:

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・教授 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・助教 朱 妹

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・教授 平山 謙二

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・助教 水上 修作

長崎大学熱帯医学・グローバルヘルス研究科・准教授 グエン フィ ティエン

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・大学院生 田山 雄基

3. 決 定 額 : 400 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・分析技術を活用し、抗トリパノソーマ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和漢薬ライブラリーを構成する生薬由来化合物・生薬及び漢方方剤の持つ抗トリパノソーマ活性について検討を行う。スクリーニングの実験系としては、熱帯医学研究所が持つトリパノソーマの *in vitro* 培養システムを使用する。培養液中への生薬由来化合物及び生薬エキス・漢方方剤エキスの添加によるトリパノソーマの増減をコントロールと比較して効果判定を行う。*In vitro* 実験で良好な結果を示した化合物等サンプルに関しては、熱帯医学研究所が有するトリパノソーマ感染のマウスモデルを用いた *in vivo* での検討も行う。本研究はまずアメリカトリパノソーマを用いて開始し、進捗を見つつ、同様の検討をアフリカトリパノソーマに対しても行う。

②研究内容

熱帯医学研究所にて、申請者らが提供する和漢薬ライブラリーに含まれる生薬由来化合物・生薬及び漢方方剤が持つ抗トリパノソーマ活性の検討を行う。まずは *in vitro* 培養システムによる検討を行い、ここで選定された抗トリパノソーマ薬候補については、続いてマウスモデルを用いた検討も行う。

(1) 和漢薬ライブラリー (生薬由来化合物・生薬エキス及び漢方方剤エキス) の調製

生薬由来化合物・生薬エキス及び漢方方剤エキスサンプルから構成される和漢薬ライブラリーは、和漢医薬学総合研究所が調製する。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。

(2) 和漢薬ライブラリーのアメリカトリパノソーマに対する *in vitro* での抗原虫活性の検討

熱研が所有しているアメリカトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)を使用する。まず各形態について安定的な培養条件を確認する。

その後、96 ウェルプレートに各形態のトリパノソーマ原虫を準備し、培養液中に化合物等のサンプルを添加し、37°Cインキュベーター内で72時間培養する。アラマーブルーにより染色し、トリパノソーマ原虫を検出する。コントロールウェルの結果との比較により、各サンプルの抗トリパノソーマ活性を算出する。また、ルシフェラーゼを発現する遺伝子組換え原虫の使用も考慮する。

(3) 和漢薬ライブラリーの *in vitro* での細胞傷害性の検討

コントロール細胞として HepG2 細胞及び AMB 細胞を準備し、(2)同様に化合物等のサンプル処理を行い、アラマーブルー染色により生細胞を検出し、細胞毒性について検討を行う。

(4) 抽出物・漢方方剤の活性指標となる化合物の同定

上記の検討で抗トリパノソーマ活性を有していた生薬エキス・漢方方剤エキスに関しては、和漢研側が行う成分プロファイリング (LCMS 分析) の結果を解析し、含有化合物の推定、同定を行う。その化合物が、生薬由来化合物ライブラリーに含まれる場合、抗トリパノソーマ活性の検討を行う。必要に応じて、活性の認められた生薬エキス、漢方方剤エキスの分画を行い、活性を示す画分の成分プロファイリングの解析およびカラムクロマトグラフィーによる成分探索を組み合わせることで、活性成分の推定・同定を行う。あわせて核磁気共鳴 (NMR) などの機器分析によりそれら成分の構造決定を行う。さらに生薬・漢方方剤中の活性成分の定量を行い、含有量と活性強度との相関などから、活性指標となる化合物を見つけ出す。

(5) *In vivo* マウスモデルでのトリパノソーマ感染と化合物等による治療、及び効果の判定

In vitro での検討で抗アメリカトリパノソーマ活性を有していた生薬エキス・漢方方剤エキス (状況によっては活性成分と認められた化合物も) に関しては、その *in vivo* における抗トリパノソーマ活性を、熱帯医学研究所側の持つトリマパノソーマ感染マウスモデルを用いて確認する。マウスにアフリカトリパノソーマを感染させ、同時に生薬エキス等を用いた治療を開始し、血中原虫数や生存率などを計測し、治療効果の指標とする。この実験には、ルシフェラーゼを発現するように改変した組換え原虫を使用する。これにより、感染後にルシフェラーゼの基質 (ルシフェリンなど) を投与することにより、発光を誘導でき、*In vivo* imaging system (IVIS) を使用して、マウス体内の原虫の分布・増減を画像的に解析することが可能になる。

(6) アフリカトリパノソーマ (*T. brucei*) に対する抗原虫活性の検討

ここまでで得られた結果を参考にアフリカトリパノソーマに対しても同様に、有効な抗原虫薬の探索を行う。

③予想される成果

これまでに行った抗マラリア薬のスクリーニングでは、有望な化合物・抽出物が和漢薬ライブラリーよりみつまっている。トリパノソーマに対しては十分な効果を持つ薬剤が未だに発見されていないため、抗マラリア薬のスクリーニング同様に、本研究から抗トリパノソーマ薬の候補が見つかることが期待される。

漢方方剤は、すでに認可を受けている医薬品であることから、抗トリパノソーマ活性をもつ漢方方剤が見出されれば、そのまま治療薬となる可能性を有する。また、上記の方法により生薬・漢方方剤の活性指標として同定された化合物も、新規の抗トリパノソーマ薬につながる可能性が高いため、類縁化合物の探索と抗トリパノソーマ効果の検討などについても研究を継続する予定である。

今回は *in vitro* 及び前臨床試験としての *in vivo* 実験で検討を行うため、終了後にはこれに続く臨床研究へと発展させる予定である。本研究を通して、シャーガス病やアフリカ睡眠病といったトリパノソーマ関連疾患の治療薬開発に寄与したいと考えている。

5. 実施報告：

①研究材料・方法

研究材料

富山大学和漢医薬学総合研究所より入手した和漢薬ライブラリーに含まれる生薬由来化合物 96 種類及び生薬エキス 120 種類を用いた。

研究方法

(1) 和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物・生薬エキス及び漢方方剤エキス）の調製

生薬由来化合物・生薬エキス及び漢方方剤エキスサンプルから構成される和漢薬ライブラリーは、和漢医薬学総合研究所が調製した。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した。

(2) 和漢薬ライブラリーのアメリカトリパノソーマに対する *in vitro* での抗原虫活性の検討

アメリカトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) としては、熱研が所有しているルシフェラーゼを発現する Tulahuén 株を使用した。生薬由来化合物もしくは生薬エキス溶液を底が透明な 96 ウェルプレートに準備し、ここにトリポマスティゴート型 *T. cruzi* と NBMH (New Born Mouse Heart) 細胞を混ぜたものを加えた。(サンプルの最終濃度は、生薬由来化合物は 20 μ M、生薬エキスは 20 μ g/mL とした。) プレートを 37°C 5%CO₂ インキュベーター内で 3 日間静置した後、原虫及び感染細胞を回収した。ルシフェラーゼの基質を加えて、プレートリーダーで発光量を検出し、これを指標に原虫量を算出した。各サンプルの発光量を、0.5%NP40 で処理をしたポジティブコントロール (阻害率 100 %)、及び、溶媒のみを加えたネガティブコントロール (阻害率 0 %) のウェルと比較して、各サンプルによる原虫阻害率を算出した。また、比較対象として既知の抗トリパノソーマ薬であるベンズニダゾール (20 μ M) のウェルも準備した。

今回原虫の検出には、アラマーブルーによる生細胞染色と比較して特異的に原虫を検出

可能なルシフェラーゼアッセイを使用した（そのため、実験にはルシフェラーゼを発現する組換え *T. cruzi* を使用した。）。本アッセイは、サンプルのトリポマスティゴート型及び（感染細胞内での形態である）アマスティゴート型 *T. cruzi* に対する活性を検討したものである。

(3) 和漢薬ライブラリーの *in vitro* での細胞傷害性の検討

NBMH 細胞を、底が透明な 96 ウェルプレートに準備し、(2) 同様のサンプル処理を行った。その後、細胞をアラマブルーで染色し、蛍光量を生細胞量の指標として検出した。蛍光量を、0.5 % NP40 で処理をしたポジティブコントロール（傷害率 100 %）、及び、溶媒のみを加えたネガティブコントロール（傷害率 0 %）のウェルと比較して、各サンプルによる細胞傷害率を算出した。

(4) 抽出物・漢方方剤の活性指標となる化合物の同定

(5) *In vivo* マウスモデルでのトリパノソーマ感染と化合物等による治療、及び効果の判定

(6) アフリカトリパノソーマ(*T. brucei*)に対する抗原虫活性の検討

上記はいずれも生薬由来化合物もしくは生薬エキスの抗アメリカトリパノソーマ活性を *in vitro* にて検討したのちに行うため、平成 30 年度には実施しなかった。いずれも今後実施予定である。

②成果

(1) 和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物・生薬エキス及び漢方方剤エキス）の調製

和漢薬ライブラリーは、和漢医薬学総合研究所から熱帯医学研究所に送られ、実験に使用された。スクリーニングでの使用濃度は、これまで同様の研究で用いられてきた標準的な濃度である 20 μ M（生薬由来化合物）と 20 μ g/mL（生薬エキス）とした。

(2) 和漢薬ライブラリーのアメリカトリパノソーマに対する *in vitro* での抗原虫活性の検討

夫々のサンプルが示したトリパノソーマ阻害率は、生薬由来化合物（全 96 種）では、40%以下：82 種、40~60%：3 種、60~80%：3 種、80~100%：9 種であった。また、生薬エキス（全 120 種）では、40%以下：112 種、40~60%：3 種、60~80%：0 種、80~100%：5 種であった（表 1）。

なお、実験は 3 回行い、その中央値をサンプルの阻害率とした。また、今後特許出願の可能性があるため、化合物及び生薬の詳細は、現時点では開示しない。

阻害率	生薬由来化合物	生薬エキス
80~100%	9 (9.4%)	5 (4.2%)
60~80%	3 (3.1%)	0 (0%)
40~60%	3 (3.1%)	3 (2.5%)
0~40%	82 (85.4%)	112 (93.3%)
計	96 (100%)	120 (100%)

表 1 各生薬由来化合物および生薬エキスのトリパノソーマ阻害率

(3) 和漢薬ライブラリーの *in vitro* での細胞傷害性の検討

夫々のサンプルが示した細胞傷害率は、生薬由来化合物（全 96 種）では、40%以下：89 種、40~60%：3 種、60~80%：1 種、80~100%：3 種であった。また、生薬エキス（全 120 種）では、40%以下：118 種、40~60%：2 種、60~80%：0 種、80~100%：0 種であった（表 2）。

なお、実験は 2 回行い、その中央値をサンプルの傷害率とした。また、今後特許出願の可能性があるため、化合物及び生薬の詳細は、現時点では開示しない。

傷害率	生薬由来化合物	生薬エキス
80~100%	3 (3.1%)	0 (0%)
60~80%	1 (1.1%)	0 (0%)
40~60%	3 (3.1%)	2 (1.7%)
0~40%	89 (92.7%)	118 (98.3%)
計	96 (100%)	120 (100%)

表 2 各生薬由来化合物および生薬エキスの細胞傷害率

<まとめ>

トリパノソーマ阻害率 60%をカットオフ値として検討を行ったところ、12 種の生薬由来化合物及び 5 種の生薬エキスが、比較的高い抗トリパノソーマ活性を持つサンプルとして選定された。

これらのサンプルの内、5 種の生薬由来化合物及び 3 種の生薬エキスは、比較的細胞傷害性が低く（カットオフ値は 40%）、今後より詳細な検討を行うのに適したサンプルであると考えられた。

③成果の公表 無し。

6. 自己評価

本研究では、和漢薬ライブラリーに含まれる生薬由来化合物・生薬エキスの抗トリパノソーマ活性及び細胞傷害性を検討し、この結果を今後の新規抗トリパノソーマ薬活性開発に生かすことを目指した。

今年度は、生薬由来化合物・生薬エキスの双方から、高い抗トリパノソーマ活性を示し、かつ細胞傷害性の低い、サンプルを複数個発見することができた。

今後、これらの IC₅₀（50%阻害濃度）、CC₅₀（50%細胞傷害濃度）決定を行う。また、これらの結果を見て、*in vivo* 実験などをさらに行う予定である。

和漢薬に基づいた抗原虫薬開発という、和漢研・熱研双方の特色を生かした共同研究としては、今後の発展が期待される一定の結果が得られたと考えている。

7. 達成度

- I (初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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課題名：水系感染症におけるカーボン膜の抗病原体特性の評価

課題番号：30-Ippan-22

2. 代表者：羽二生 久夫 (信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・准教授)

共同研究者：平山 謙二 (長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・教授)

片上 幸美 (長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・客員研究員)

檜原 知里 (長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・助教)

3. 決定額：444 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

熱帯地方を中心に、多くの感染症例が報告されている。感染症はウイルス、原虫、蠕虫真菌、寄生虫が原因である。最近では、イエメンなどでコレラが大流行し、アフリカでは、住血吸虫や赤痢アメーバ症などの報告もされている。これらの感染源は主に水である。現在でも途上国を中心に世界の人口の 1/6 が安全な水にアクセスできず、汚染された水が原因で感染症に罹患し多くの死亡者が報告されている。世界でも下痢症等の水系感染症は深刻な問題になっている。

これまでに報告されている熱帯地方における水系感染症の主な病原体を図 1 に示した。このように、様々な病原体が水の中には存在している。

安全な水を供給するためには、水中に存在している水系感染症の原因となる病原体を除去する必要がある。病原体を除去する為に、先進国では急速濾過システムと消毒をメインに取り入れて水の浄化を行っている。しかし途上国では経済的な問題から近代水道設備のメンテナンス自体が不十分な状況である。加えて水需要に対して十分な量が供給されないため、水道管が汚水を吸い込んでいる。そのため今でも、古典的な消化器系感染症が多発しており、その一部は水系感染症と推定される。

	疾患名	病原体	主な感染様式
	コレラ	Vibrio cholerae	飲料水、食品
細菌	細菌性赤痢	Shigella	糞口感染
	腸チフス	Salmonella typhi	糞口感染
	サルモネラ腸炎	Salmonella	食品・糞口感染
	ポリオ	poliovirus	糞口感染・飲料水
ウイルス	A型肝炎	HA virus	糞口感染・飲料水
	E型肝炎	HE virus	糞口感染・飲料水
	ロタウイルス	rotavirus	糞口感染・飲料水
	ウイルス性胃腸炎	Norwalk virus	食品、飲料水
原虫	赤痢アメーバ症	Entamoeba histolitica	食品、飲料水
	ジアルジア症	Giardia intestinalis	食品、飲料水
	クリプトスポリジウム症	cryptosporidium provum	食品、飲料水
	包虫症	Echinococcus	飲料水
蠕虫	メジナ中症	Dracunculus medinensis	飲料水
	住血吸虫症	Schistosoma	飲料水

図 1. 代表的な水系感染症

申請者らは、アクア・イノベーション拠点を中心に安全な水の造水、水循環システムの開発・研究に力を入れている。その中で信州大学の独自の技術であるナノカーボンは、造水・水循環システムの中に組み込まれるフィルター（逆浸透性透過膜）の材料として有力候補となっている。このナノカーボン自身既に抗菌の作用があり、これを原材料とした逆浸透膜の表面にも抗菌性があるとの実験結果が得られているため、本研究では、水系感染症の病原体を対象に、ナノカーボンの有効性を調べることを目的とした。

ナノカーボンの持つ他の抗病原性を調べることで、従来の急速濾過と消毒という 2 段階の浄化システムを簡易化し、水を一時的に貯水しこの装置を通して浄化するため、一度に分量の水を浄化できるのではないかと考えている。この装置が普及すれば将来的には先進国と同様の安全な水を途上国に供給できるのではないかと考えている。

②研究内容

本共同研究での内容は、カーボン膜の持つ抗病原性の特性を明らかにすることである。そのために、水系感染症の原因であるそれぞれの病原体についての感染実験を行う。病原性を持つ細菌、ウイルス、寄生虫を、それぞれ成形されたカーボン膜および成形前の膜材料に直接曝露させ、曝露前後で感染能が変化するかどうかを評価する。成形されたカーボン膜については、膜上に病原性微生物を含む培地を置き、一定時間インキュベータ内で培養した後に回収して評価対象とする。膜材料の評価については、原料粉末を入手し、これを各培地に懸濁した状態で病原性微生物を培養し、同様の評価を行う。成形膜に病原性微生物を接触させる試験法は、ISO で定められた工業試験法に準じており、この評価結果はその後特許の申請へと発展させられるものである。一方、膜材料を原料粉末の状態で病原性微生物に接触させる方法は今回のオリジナル手法であり、今後、水透過膜の原料を検討していくうえでの重要な指針となる。

細菌に関しては、過去に、大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する抗菌性が確認されている。この時に用いられた菌株は、工業試験法に定められた標準株であり、病原性の低いものが採用されている。本研究では、対象を病原性微生物とし、これら 2 種の菌についても腸管出血性大腸菌および MRSA 等の薬剤耐性菌に対する抗菌性を視野に入れ、熱帯地方の水系感染症の原因となる病原性微生物を中心に評価を行う。

1. 細菌を用いた抗菌効果の検証

熱帯地方においてたびたび大流行を起こしているコレラと細菌性赤痢を研究対象とする。コレラは *Vibrio cholerae* O1 および O139 のコレラ毒素産生株を用いる。また、細菌性赤痢は *Shigella sonnei*

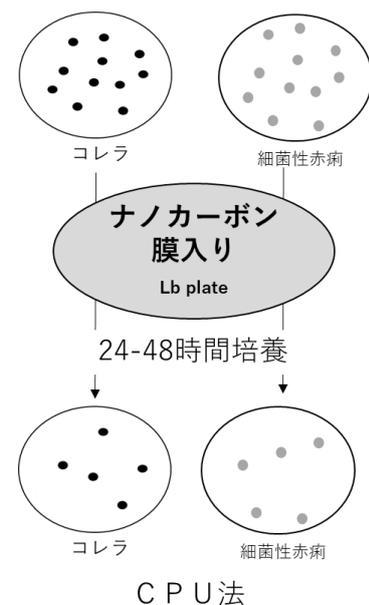


図 2. 抗菌性試験

(ソルネ赤痢)を用いる。それぞれの株(10⁸CFU/ml)を準備し、そこにナノカーボン膜を入同時に入れ、その後24-48時間培養し、それぞれの株のCFUの減少度を測定する事で、感染率を測定する(図2)。

2. ウイルスを用いた抗ウイルス効果の検証

水系感染症の中でウイルスが原因となるものは、これまでに代表的なもので5種類報告されているが、特に途上国ではロタウイルスやアデノウイルスで何百万人の幼児が死亡している。そこで今回はロタウイルスおよびアデノウイルスを用いてCV-1細胞を用いたウイルスの感染実験を行う。感染率はプラークアッセイ法を用いて測定する(図3)。

3. 原虫・蠕虫を用いた抗寄生虫効果の検証

原虫・蠕虫の中で、塩素消毒に抵抗性を示すものとして赤痢アメーバ症が、蠕虫では住血吸虫症が挙げられる。そこで、この2種類の寄生虫を対象とした感染実験を行う。

培養中の2種類の寄生虫にナノカーボン膜を加え、ナノカーボン膜による寄生虫の増殖を寄生虫の数を数え測定する(図4)。

これらの結果から、ナノカーボン膜の持つ抗抗原性効果を明らかにすることが可能であると考えられる。

すでに大腸菌を用いた実験で抗菌性が示されたカーボン膜は細菌・ウイルス・原虫・蠕虫に対する有効性を検討する(長崎大)。また、カーボン材料を変えた膜について、物性評価および安全性評価を行い、同時に抗病原性を調べる(長崎大・信州大)。

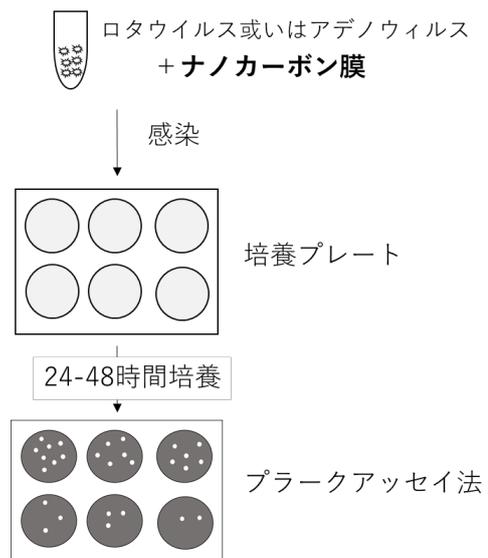


図3. 抗ウイルス性試験

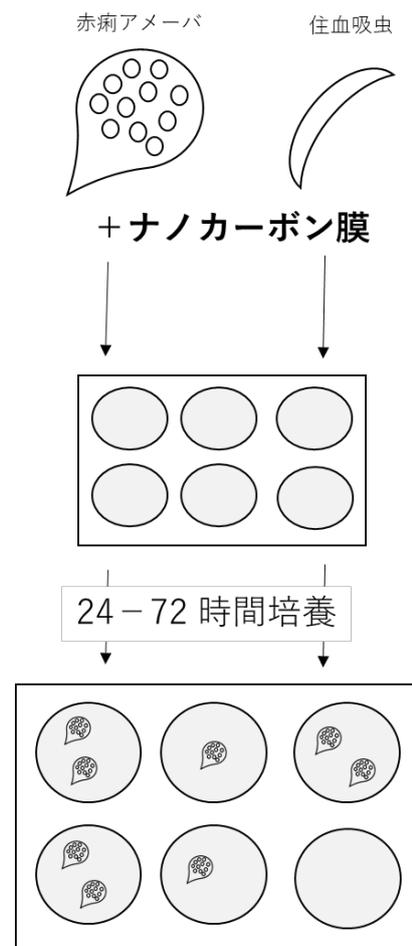


図4. 抗原虫・蠕虫性試験

③予想される成果

大腸菌での抗菌性が示されているカーボン膜については **MRSA** や肺炎球菌などに対しても有効性があると思われ、現在、主流である重金属イオンを主流とした抗菌剤とは異なるメカニズムの抗菌剤が提案できる可能性がある。この抗菌性のメカニズムは明らかになっていないが、ラジカルの産生が考えられている。もし、ラジカルの産生によるのであれば、ウイルス表面のタンパク質、および脂質の変性による抗ウイルス性も示す可能性があり、寄生虫の持つ脂質の変性も同様に考えられる。そのため、今後、その利用価値は非常に大きいと予測している。特にこのカーボン膜は水処理を対象にした開発製品であるため、医療用途のみならず、途上国などでの汚水を処理して飲料水などにする膜としての有効性を示すことになり、社会的意義のある用途であると考えられる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

信州大学バイオメディカル研究所が提供したカーボン膜はカーボンナノマテリアル（CNM）を添加していない水処理膜の基盤であるポリアミド（PA）膜（ネガティブコントロール）、CNM量の異なる2種類の膜（それぞれ『CNM(少)膜』『CNM(多)膜』と表記）であり、こららを長崎大学熱帯医学研究所に送付した。熱帯医学研究所では、実験に先立ち試験膜の滅菌方法について検討し、病原性微生物の曝露実験においては、膜を使用直前に Milli-Q water でよく洗浄し、乾燥させずに無菌環境下で操作することとした。実験環境、設備等を再考し、実験対象は

1. 赤痢アメーバ
2. マラリア原虫
3. アメリカトリパノソーマ原虫

とした。

実験方法

1. 赤痢アメーバ

実験室で維持している赤痢アメーバの栄養体を使用し、24-well plate を用いて接触実験を行った。『PA膜』『CNM(少)膜』『CNM(多)膜』を、エタノールで清拭したハサミで well サイズに合わせてそれぞれ切り抜き、ピーカーに分取した Milli-Q water 中に浮遊させた。エタノールで清拭したピンセットで、膜表面を傷つけないように数回ゆすって洗浄した後、新しい Milli-Q water 内に浮遊させた。この操作を3回繰り返した後、試験膜表面が上になるように各 well 内に置いた（図1）。

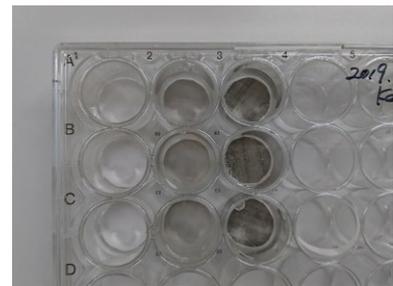


図1. CNM膜接触実験用 plate

実験2日前からフラスコで前培養した赤痢アメーバを回収し、 3×10^4 /well となるように各 well に播種し、培地を添加して液量を 2mL/well とした。プレートシールでシーリングした plate を 37°C のインキュベータ内に静置し 24 時間培養した（図2）。培養後、ピペットで各 well の培地を静かに吸い取って回収し、培地中に浮遊しているアメーバの細胞数をカウントした。その後、各 well に PBS を 200 μ L ずつ添加し、プレートを氷上に静置した。5分以上氷冷した後、膜表面を洗い流すように数回ピペッティングを行い、PBS をチューブに回収してアメーバ数をカウントした。実験は2回行い、2回目はアメーバの播種数を1回目の1/2、 1.5×10^4 /well とした。



図2. CNM膜上で培養中の赤痢アメーバ

なお、本実験に関しては、寄生虫学分野の濱野真二郎教授、中村梨沙助教に多大なるご協力をいただいた。深謝申し上げます。

2. マラリア原虫

免疫遺伝学分野で維持している *Plasmodium falciparum* 3D7(A)株を用いて接触実験を行った。あらかじめマラリア原虫を感染させておいた赤血球を未感染の赤血球と混合した状態で CNM 膜上に撒き、血液中に放出されたマラリア原虫が他の赤血球に感染するまでの過程で CNM 膜に接触した場合、感染率が変化するかどうかを見た。培養液の一部を採取し、遠心して上清を取り除いてスライドグラス上に伸ばしたものを固定してギムザ染色し、赤血球およびマラリア数を数回カウントして Parasitemia を算出した。『PA 膜』、『CNM(少)膜』、『CNM(多)膜』をエタノールで清拭したハサミで 6-well plate の well サイズに合わせてそれぞれ切り抜き、ビーカーに分取した Milli-Q water 中に浮遊させた。エタノールで清拭したピンセットで、膜表面を傷つけないように数回ゆすって洗浄した後、新しい Milli-Q water 内に浮遊させた。この操作を 3 回繰り返した後、試験膜表面が上になるように各 well 内に置いた (図 3・中央)。前培養したマラリア原虫と赤血球に培地を添加し、各 well に播種し、37°C で 2 日間培養した。各 well に Cyber green を添加した溶解液を加えて赤血球を溶解した後、溶血した培養液 100 μ L を 96-well plate に回収した。プレートリーダーで 522nm の蛍光を測定し、マラリア原虫の DNA 濃度を測定した。試験用 plate は 2 枚作製し、n=4 とした。

3. アメリカトリパノソーマ原虫

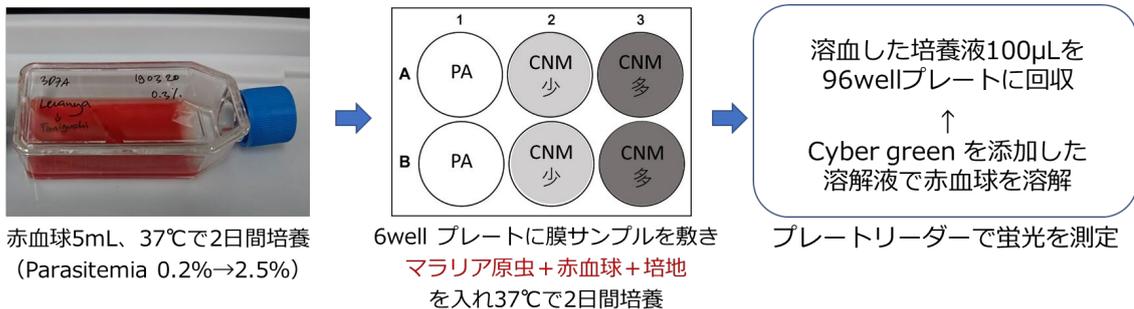


図 3. マラリア原虫 CNM 膜接触実験

免疫遺伝学分野で維持している *Trypanosoma cruzi* のルシフェラーゼ組換え株を用いて接触実験を行った。実験には 24-well plate を用いた。『PA 膜』、『CNM(少)膜』、『CNM(多)膜』を、エタノールで清拭したハサミで well サイズに合わせてそれぞれ切り抜き、ビーカーに分取した Milli-Q water 中に浮遊させた。エタノールで清拭したピンセットで、膜表面を傷つけないように数回ゆすって洗浄した後、新しい Milli-Q water 内に浮遊させた。この操作を 3 回繰り返した後、試験膜表面が上になるように各 well 内に置き、前培養したトリパノソーマ原虫を LIT medium とともに各 well に入れ、27°C で培養した。2 日後、試験膜を取り除き、NP-40 を各 well に添加して *T. cruzi* の細胞を溶解した後、溶解液 100 μ L を 96-well plate に回収した。プレートリーダーで 645nm の蛍光を測定し、各溶解液中に含まれるルシフェラーゼの量から虫体数を算出した。

②成果 (結果+考察)

1. 赤痢アメーバ

実験結果を図 4 および図 5 に示す。

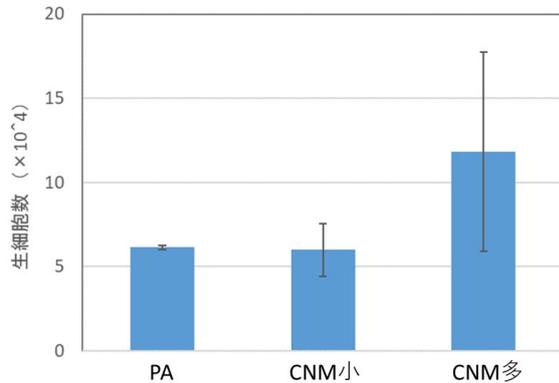


図 4. 赤痢アメーバ CNM 膜接触実験 1 回目

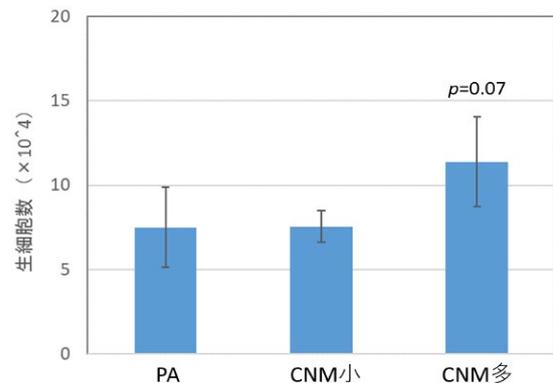


図 5. 赤痢アメーバ CNM 膜接触実験 2 回目

考察：

- アメーバは、CNM 膜にも培養プレートと同様に接着することが確認された。
- 接着したアメーバは、培養プレートや培養フラスコで維持した時と同様に、氷冷によって剥離することが分かった。
- PA、CNM 少、CNM 多のすべての膜上でアメーバの増殖が確認された。播種濃度に関わらず、24 時間の培養でコンフルエントとなった。
- 1 回目、2 回目とも、統計的有意差はなかったが、CNM 多膜上でアメーバがより増殖する傾向が見られた。

2. マラリア原虫

実験結果を図 6 に示す。

Condition	OD1	OD2	Average (列)
PAのみ 列1	19783	10968	15376
PAのみ 列2	13924	11419	12672
CNM少 列1	15098	10888	12993
CNM少 列2	10557	7877	9217
CNM多 列1	8166	6773	7470
CNM多 列2	9125	6660	7893
マラリアのみ	14568	13802	14185

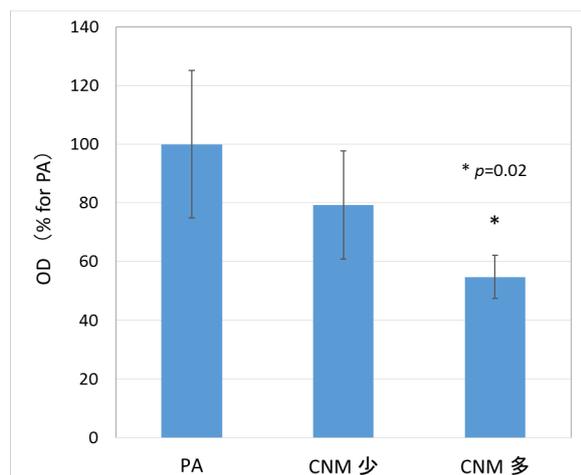


図 6. マラリア原虫 CNM 膜接触実験結果

考察：

- カーボン量が多くなるに従いマラリア原虫培養液の吸光度が低下していることから、マラリア原虫の DNA 濃度が低くなった＝マラリアが何らかの阻害作用で増殖

を抑えられた可能性が考えられる。

- 本実験で示唆された増殖阻害効果（抗マラリア効果）については、再現性の確認を行うとともに、CNM 自体の抗マラリア活性、作用機構および CNM 量との相関関係を明らかにすることが課題である。
- CNM がハマダラ蚊の幼虫に対しても何らかの阻害効果を示せば、ベクターコントロール薬としても使用できる可能性がある。

3. アメリカトリパノソーマ原虫

実験結果を下表に示す。

Condition	OD 1	OD 2	OD 3	AVG	STD	
PA	11073179 95.8	12758109 110.4	10845436 93.8	11558908 100	7.4	(%)
CNM 小	18381920 159.0	13434274 116.2	9709164 84.0	13841786 119.7	30.7	(%)
CNM 多	11328655 98.0	12674021 109.6	11946373 103.4	11983016 103.7	4.8	(%)

考察：

PA 膜と各 CNM 膜において、トリパノソーマ培養液のルシフェラーゼ量には差異が見られなかった。CNM の量に関わりなく、抗トリパノソーマ効果はないと考えられる。

総括

当初の予想に反し、CNM は接着性のアメーバについては増殖を抑える効果はなく、むしろ CNM 量が多い膜上でより増殖する可能性が示唆された。CNM 材料に含まれる豊富な炭素がアメーバの栄養源となる可能性が考えられるが、要因については不明であり、途上国で水源地に使用するには難があると判断せざるを得ない。一方、マラリア原虫に対しては、CNM 量依存的に有効性が示唆された。CNM 自体が持つ抗マラリア活性について、その作用機構を解明し、将来的に実用化に向けた製品加工を検討できる可能性がある。CNM 膜は PA 膜上に CNM 粉末を吹き付けて作製された膜であり、CNM 粉末の人体への安全性と並行して抗マラリア活性を示す作用機構が解明されれば、成膜加工とは別に、薬剤としての応用にも可能性が広げられる。

③成果の公表

本研究結果については信州大学で特許申請を準備しているため、その結果を待っての公表となる予定です。

6. 自己評価

本研究で用いたカーボン膜は現在、信州大学で海水淡水化処理膜として開発しているものであり、社会実装の想定場所は中東やアフリカなどを想定している。その対象地域も考慮した上で、本研究で熱帯地方における水系感染症の病原体への影響は非常に意義のある研究と考えており、今回示された3種の病原体でそれぞれに結果が異なった事は非常に興味深い結果と言える。ただ、下記の達成度で低評価にならざるを得なかった理由は用いたカーボン膜自体が現在も開発中であるため、同じ条件の評価サンプルを大量に提供できなかった事である。このため、限られたカーボン膜で優先順位が高いと思われた3種を行ったが、当初予定していた他の病原体は出来なかった。

2019年度からアクア・イノベーション拠点のプロジェクトは最終のフェーズⅢとなり、パイロット試験場用にラボレベルではなく、工業用サイズでのカーボン膜製造が始まる。このサイズで安定した膜が製造されるようになれば、本研究で行おうとしていた今回、評価できなかった他の病原体についても行う事ができると考えており、来年度以降、再度の共同研究を検討したい。

なお、本研究は特許出願準備中のため、評価材料の詳細については記載しておりません。

7. 達成度

- 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. 自己評価に記載したため省略

第 2 部

研 究 集 会

平成 30 (2018) 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：30-A-01

開催期間：平成 30 年 5 月 29 日 (火) ～ 平成 30 年 5 月 31 日 (木)

2. 代表者：佐々木 均 (長崎大学病院薬剤部・教授)

参加人員：27 名

3. 経費：911 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、長崎大学グローバルヘルス総合研究棟にて平成 30 年 5 月 29 日～5 月 31 日の 3 日間、講師 7 名 (うち外国から 3 名、国内から 4 名) と参加者 20 名 (うち外国から 18 名、国内から 2 名) を集め開催された。FERCAP-Philippines (フィリピン国) の Cristina Torres, Prince of Songkla University (タイ国) の Utcharee Intusoma, 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30年5月29日（火）、5月30日（水）、5月31日（木）

場 所：長崎大学グローバルヘルス総合研究棟（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)、
Utcharee Intusoma (Prince of Songkla University)
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）
Kwanchanok Yimtae（Khon Kaen University）

メンター：Dumre Shyam Prakash（長崎大学熱帯医学研究所）

【研修コースの概要】

（第 1 日目）2018 年 5 月 29 日（火）

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 (Utcharee Intusoma)

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、Utcharee Intusoma、佐々木均、 Dumre Shyam Prakash、Juntra Karbwang、平山謙二)

15:30-17:00 Case Study 1: 総合討論 (Kwanchanok Yimtae)

17:00 End of day one

（第 2 日目）2018 年 5 月 30 日（水）

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的問題 (Kwanchanok Yimtae)

9:45-10:30 疫学のおよび社会的研究の倫理的問題 (Cristina Torres)

10:30-11:00 コーヒー・ブレイク

11:00-12:00 小児科研究における倫理的問題 (Utcharee Intusoma)

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、Utcharee Intusoma、佐々木 均、Juntra Karbwang、
 平山謙二、Dumre Shyam Prakash)
 15:00-15:30 コーヒー・ブレイク
 15:30-17:00 Case Study 2: 総合討論 (Utcharee Intusoma)
 17:00 End of day two

(第 3 日目) 2018 年 5 月 31 日 (木)

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
 (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 (Cristina Torres)
 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	Altay Myssayev	Kazakhstan	Department of Radioisotope Medicine, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University
2	Apisada Suthepwanon	Thailand	Vajira Hospital, Navamindradhiraj University
3	Awet Alem Teklemichael	Ethiopia	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
4	Bundutidi Mavinga Gloria	Congo(RDC)	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
5	Chansuda Bongsebandhu- Phubhakdee	Thailand	Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
6	Chris Charoenlap	Thailand	Departmet of Orthpedics, Faculty of Medicine Chulalongkorn University
7	Daris Theerakulpisut	Thailand	Faculty of Medicine, Khon Kaen University
8	Endah Dwi Hartuti	Indonesia	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

9	Julie Charmain Bonifacio	Philippines	Rainiers Contract Research Services, Inc / University of Santo Tomas
10	Kannitha Krongthamchat	Thailand	Faculty of Public Health, Khon Kaen University
11	Pattama Tongdee	Thailand	Faculty of Medicine, Suranaree University of Technology
12	Permyos Ruengsakulrach	Thailand	Division of Cardiovascular and Thoracic Surgery Bangkok heart Hospital
13	Porntip Nimkuntod	Thailand	Faculty of Medicine, Suranaree University of Technology
14	Ratana Komwilaisak	Thailand	Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine Khon Kaen University
15	Sanjaadorj Tsogtsaikhan	Mongol	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
16	Sayaka Kondo	Japan	Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
17	Sureeporn Patrasuwan	Thailand	Chonprathan Hospital
18	Talaam Keith Kiplangat	Kenya	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
19	Thana Khawcharoenpron	Thailand	Division of Infectious Diseases, Department Of Internal medicine Faculty of Medicine Thammasat University
20	Yoshiaki Nagashima	Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

<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 Karbwan Laothavorn	Japan/Thailand	Department of Clinical ,product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki university
3	Hitoshi Sasaki	Japan	Department of Clinical Pharmacy, Nagasaki University Hospital
4	Dumre Shyam Prakash	Japan/Nepal	Department of Immnogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
5	Cristina Torres	Philippine	FERCAP Coordinator/WHO-TDR

			Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, Thailand
6	Kwanchanok Yimtae	Thailand	Khon Khen University, Thailand
7	Utcharee Intusoma	Thailand	Head of Neurology Unit, Department Of Pediatrics, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University

6. 自己評価

平成 30 年 5 月 29 日（火）～ 平成 30 年 5 月 31 日（木）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 7 名（うち外国から 3 名、国内から 4 名）と参加者 20 名（うち外国から 18 名、国内から 2 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 17 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

ⓐ : 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. 自己評価に記載したため省略

平成 30 (2018) 年度研究集会報告 (自己評価)

1. 分野名：熱帯医学研究所 生体疫学分野

研究集会の名称：日本「顧みられない熱帯病」ネットワーク立ち上げ集会

採択番号：30-A-02

開催期間：平成 30 年 6 月 21 日 (木) および 平成 30 年 11 月 9 日 (金)

2. 代表者：(所属・職名) 金子 聡 教授

参加人員：平成 30 年 6 月 21 日 (木) 30 名、平成 30 年 11 月 9 日 (金) 80 名

3. 決定額：911 千円

4. 研究集会の概要

我が国による NTDs に関する研究開発、対策活動を国際的な活動と連動させ、より効果的にするべく、日本の関係者の連携を図り、国際的活動との連動を密接に行うためのネットワーク『Japan Alliance on Global Neglected Tropical Diseases (JAGntd)』の立ち上げにむけて、長崎大学を中心とするネットワーク設立準備事務局、ネットワーク設立メンバー、そしてネットワークに参画する産官学民の有識者が一堂に会して JAGntd の概要と実施計画を共有し、設立後のネットワークの中核となる役割を議論することを目的として本研究集会を開催した。また、日本のネットワーク立ち上げにあたり、先行してネットワークを構築し、顕著な活動実績を有するドイツの NTD ネットワーク『The German Network against Neglected Tropical Diseases (DNTDs)』、世界保健機関 (WHO) とともに世界的な NTDs の制圧活動を展開する *Uniting to Combat NTDs* からスピーカーを招聘し、国際的な NTD ネットワークとの連動、および海外への日本のネットワークの紹介についても議論を行った。

5. 実施報告：

平成 30 年 6 月 21 日 (木) に実施した研究集会には、日本国内の産官学民から NTD に関する専門家を中心に約 30 名の有識者が参加した。また、Global NTD community を代表して *Uniting to Combat NTDs* の Dr. Thoko Elphick-Pooley (UTC-NTDs Support Centre Director) と The German Network against Neglected Tropical Diseases (DNTDs) の Dr. Achim Hoerauf (DNTDs Board Member) が参加し、国際的なネットワークの動向を紹介した。JAGntd 設立準備事務局からは、これまでの日本の NTD 対策に対する世界的貢献と日本のネットワークの必要性が再度提示され、現在事務局で準備しているネットワークの概要が説明された。これを受けて、参加者全員でグループワークを行い、日本のネットワークとなる JAGntd に期待される役割を議論し、JAGntd 設立後の中核となる活動についての提言を受けた。

6. 自己評価

冒頭では、武見敬三参議院議員（自由民主党国際保健医療戦略保健医療戦略特命委員会委員長）から「NTDに関わる日本のプレーヤーの横の連携をネットワークとして結び付け、国際社会に向けてより活発に、より貢献できる仕組みを作ることが不可欠である」という期待の言葉をいただき、本事業に対する社会的要請の高さとその重要性を参加者一同にて共有することができた。また、JAGntdが国際的なNTDネットワークにおいて日本を代表するアライアンスになるためには、政府や民間企業、アカデミア、ファンディングエージェンシーの認知と参加が不可欠である。今回の研究集会では、広く産官学民を通して日本でNTDに関わる専門家／有識者に参加いただき、忌憚のない意見を集約することができた。今後、本研究集会で得られた提言をもとに事務局でJAGntdの使命と活動をより具体化し、11月の設立に向けてさらなる準備を進めていくことが可能となった。

本研究会の成果をもとに、11月にはJAGntdが正式に設立され、本格的に活動を始動した。平成30年11月9日（金）に開催されたJAGntd設立記念式典では、武見敬三参議院議員をはじめ、外務省、厚労省、JICA、AMED、GHIT Fund、エーザイ、塩野義製薬、聖路加国際大学、東京工業大学、笹川記念保険財団、BMGFなど産官学民から多数の出席・祝辞をいただき、本ネットワークへの期待の高さがうかがえた。

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）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

第 3 部

海外拠点連携共同研究

平成 30 (2018) 年度海外拠点連携共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : ケニア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 : 30-Kyoten-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)、矢口貴志 (同・准教授)、
渡邊 哲 (同・准教授)、高橋弘喜 (同・准教授)

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、生理学、分子生物学的解析を行うことにより、簡便な診断・同定法の開発を検討する。さらに、適切な薬剤の選択・治療法のコンサルテーション等を通して、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、真菌症およびその原因菌種研究のためのリソースとする。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

H29 年度に引き続き、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、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 niger* 関連種 (黒色の *Aspergillus*) において、分子系統的解析、形態学的解析、培養菌株によるコーン、生コーヒー豆上でのカビ毒産生実験、カビ毒生合成遺伝子などの結果を統合し、信頼性の高い分類体系を提唱するとともに健康に対するリスク評価を実施する。

KEMRI の研究者と共同し、クリプトコッカス症、カンジダ症について、更に起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。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。環境中のアスペルギルス症起因菌においても、分子系統的な分類および薬剤感受性を実施し、薬剤耐性株においては耐性機序を解明する。

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、ケニアをはじめ日本において、食物のカビ毒汚染、ヒト真菌感染症原因菌の分離、疫学研究を通じて、ケニアでの真菌症の実態を把握し、その対策に貢献できる。

5. 実施状況報告：

①平成 30（2018）年度実施計画に対する実施状況

1. ケニアの穀物から分離された *Aspergillus niger* 関連種の同定とオクラトキシンの生産性、薬剤感受性

これまでケニア国で穀物汚染の原因となり、またヒトに有害なカビ毒を産生する *Aspergillus niger* 関連種を分子系統的、形態学的に解析している。さらに、薬剤感受性、オクラトキシンの生産性を評価した。

2. その他のカビ毒の産生

KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集した穀物において、カビ毒の検出を実施した。さらに、カビ毒産生菌の分子系統的、形態学的に解析を行っている。

②成果（結果＋考察）

1. ケニアの穀物から分離された *Aspergillus niger* 関連種の同定とオクラトキシンの生産性、薬剤感受性

2004年、ケニアでアフラトキシンがアウトブレイクした地域マクエニ、およびキトゥイのコーンから分離した菌株を解析した。その結果、これまで分類に使用されている calmodulin、 β -tubulin 遺伝子では既知種とは区別される分岐に含まれる種があることが判明した。

そこで、既知のタイプ株 22 株、ケニアの環境分離株 18 株および千葉大真菌センターで収集した日本の臨床株 20 株を加えて、全ゲノム解析を実施した。解析した 60 株において、共通する 87 遺伝子を抽出し、多遺伝子による系統樹を作成した（図 1）。

Aspergillus section Nigri のタイプ株 20株

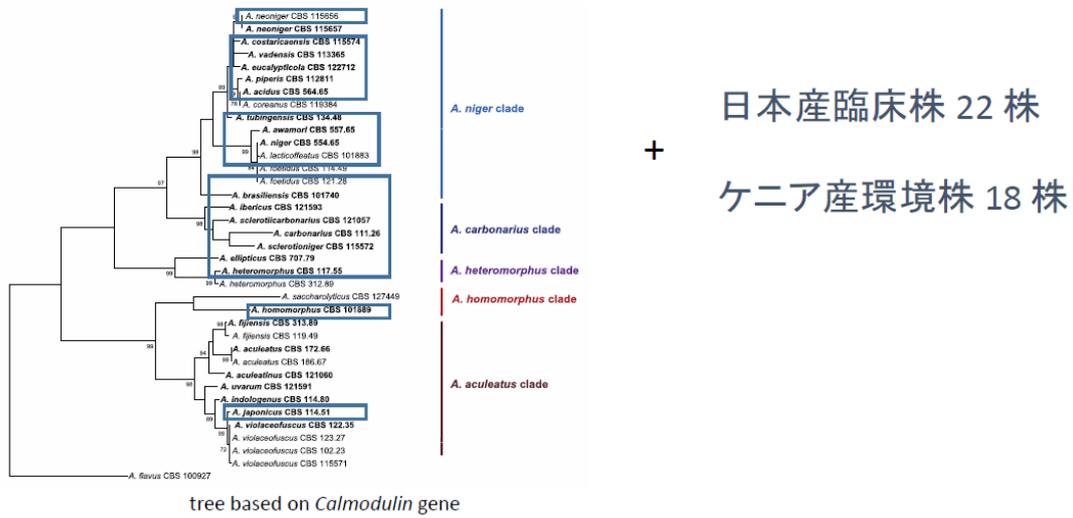


図 1. *Aspergillus niger* 関連種における多遺伝子による系統樹を作成

その結果、以下のことが確認された。

- *A. niger* と *A. welwitschiae* は非常に近縁であった。
- *A. tubingensis* は、独立種として認められ、近縁な 6 種は単系統の分岐となり、種の独立性が確認された。
- *A. brasiliensis* は *A. niger*、*A. tubingensis* とは、系統的に離れていた。

以上の結果は、*A. niger* 関連種の分類・同定に使用されている calmodulin 遺伝子単独による系統樹とほぼ一致した。

薬剤感受性については、*A. tubingensis* においてイトラコナゾール、ボリコナゾールに対して耐性を示す株が *A. niger*、*A. welwitschiae* よりも多かった。

さらに、カビ毒オクラトキシンの産生能においては、*A. niger* と *A. welwitschiae*、*A. tubingensis* 3 種間では関連種も含め顕著な差は認められなかった (図 2)。

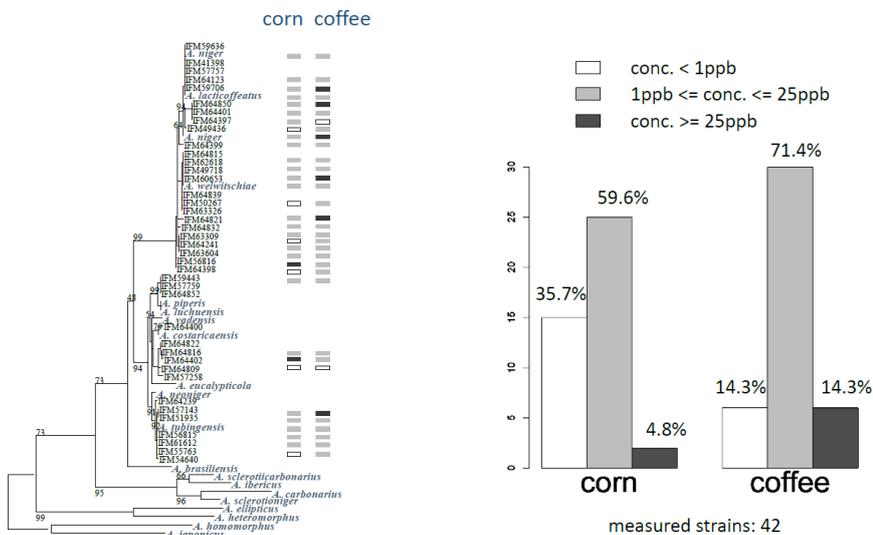


図 2. *Aspergillus niger* 関連種におけるオクラトキシンの産生能

2. その他のカビ毒の産生

ケニア各地の穀物検体からアフラトキシン、フモニシンが検出された。一部の穀物検体からマイコトキシン産生菌の分離を行い、コーン上でのアフラトキシン生産性を測定した。以下のとおりである。

- ・アフラトキシンは、中心部のナイロビを含めケニア全体から検出された。
- ・フモニシンは東部からの検出が、ナイロビ、西部よりも高い傾向があった。地域によるカビ毒産生の違いは、気温、降雨量など気候の差によると考えられる。
- ・一部の分離菌では、コーン上で規制値を大きく超えるアフラトキシン生産した。今後、その形態学的、生理学的、分子系統学的解析を実施する。

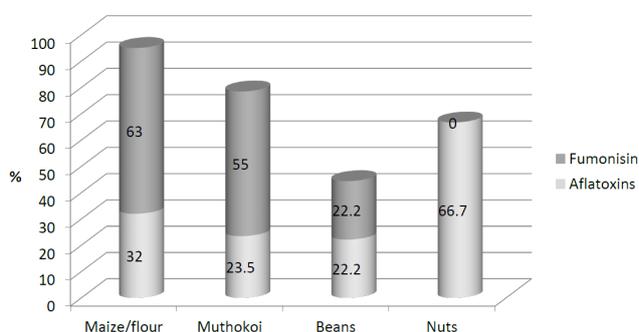


図 3. ケニア東部におけるカビ毒産生

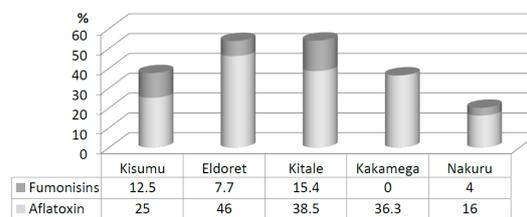


図 4. ケニア西部におけるカビ毒産生

③成果の公表

1. Christine CB, Mashedi O, Matsuzawa T, Gono T, Yaguchi T. Mycotoxin contamination and characterization of mycotoxigenic *Aspergillus* species from Maize in Kenya. The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity. Chiba. 2018. (Poster Award 受賞)
2. Bian C, Yikelamu A, Kusuya Y, Ban S, Takahashi H, Yaguchi T. Phylogenetic classification based on whole genome sequencing in *Aspergillus* section *Nigri*. The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity. Chiba. 2018.
3. Bian C, Yikelamu A, Kusuya Y, Ban S, Takahashi H, Yaguchi T. Phylogenetic classification based on whole genome sequencing in *Aspergillus* section *Nigri* and their productivities of ochratoxin A. 第 12 回アスペルギルス研究会. 東京. 2018.
4. Shimizu M, Kusuya Y, Alimu Y, Bian C, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123^{NT}. Microbiol Resource Announc. 8 (4): e01453-18 2019.

6. 自己評価

本年度は主として、*Aspergillus niger* 関連種においては、オクラトキシンの産生能、薬剤感受性のデータを加え、分子系統的、生理性状的に *A. niger* 関連種全体の分類の再検討を実施し、薬剤感受性、カビ毒オクラトキシンの産生能との関連を検討した。さらに、これまで未報告の種が見いだされ、今後それらの健康リスク評価は重要と考える。

また、KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集した穀物において、カビ毒の検出を実施した。さらにこれらの穀物から分離した真菌株 *Aspergillus* において、遺伝子解析を実施し、薬剤感受性汚染菌の分子系統的な位置付けの検討を実施した。

以上のように、*Aspergillus* の穀物汚染においては新しい知見が見いだされたこと、ケニアの地域ごとの穀物汚染におけるリスク評価ができたことから、本プロジェクトは実施計画どおり進展していると考ええる。

7. 実施度

- 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。)
- 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. 自己評価に記載したため省略

8. 平成 30 (2018) 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)		231,8	231,8	
(運営費)		468,2	468,2	
(設備費)		0	0	
計		700,0	700,0	

平成 30 (2018) 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 : 30-Kyoten-2

2. 代 表 者 : エイズ学研究センター 教授 滝口 雅文
共同研究者: 大学院生命科学研究部 准教授 前田 洋助
エイズ学研究センター 助教 阪井 恵子
エイズ学研究センター 特任講師 村越 勇人

3. 決 定 額 : 8,000 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

東南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。そこでまだ十分に解明されていない 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 の病態進行に及ぼす影響等を、ベトナムのハノイにある国立熱帯病病院 (NHTD) での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 30 年度

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、平成30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に関連する細胞傷害性T細胞 (CTL) の解析: 平成29年度に明らかにしたエイズ進行遅延に相関するHLA-C*12:02に拘束するHIV-1 subtype A/E を認識するCTLを同定し、これらのCTLのうち、HIV-1の増殖抑制に関与するものを明らかにする。また、平成29年度に明らかにしたエイズ進行遅延に相関するHLA haplotype であるHLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05のいずれかのHLAに拘束するHIV-1特異的CTLを明らかにする。また、これらのHLAと相関する変異のうち、CTLエピトープ内にあるものに関して、CTLの認識に影響を与えるものを明らかにする。これによりこれらのHLAを持っている人では、どのようにエイズ進行の予後に悪い影響を

与えるかを明らかにする。以上の解析により、HIV-1 subtype A/Eが流行しているベトナムでのエイズ進行の機序を明らかにする。

ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析：平成 29 年度に引き続き、長崎大学ハノイ拠点と連携して、R5 ウイルスや R5X4 ウイルスを主に保有している感染個体内のウイルス配列を次世代シーケンサー（NGS）にて解析し、平成 29 年度に解析した X4 ウイルスと比較して、R5 から R5X4、さらには X4 ウイルスへの進化過程について系統樹解析を行い、R5 からの X4 ウイルスへの進化過程を明らかにする。

平成 31 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、平成31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 に関連する細胞傷害性 T 細胞（CTL）の解析：既に作成してある Gag, Pol, Nef の領域の 17-mer overlapping peptides を用いて、今までにリクルートした患者の PBMC 内の CTL の反応を、ELISPOT アッセイにより解析する。このデータを患者の臨床データから、HIV-1 の増殖抑制に関与している CTL を明らかにする。

ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析：前年度に引き続き長崎大学ハノイ拠点と連携して、R5 ウイルスや R5X4 ウイルスを主に保有している感染個体内のウイルス配列を次世代シーケンサー（NGS）にて解析を進める。

③予想される成果

我々は長期間かけて、ハノイの NHTD で無治療 HIV-1 患者のコホートを樹立し、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 (**AIDS30:681-689, 2016**)。さらに、平成 29 年度に、536 名の HIV-1 subtype A/E の患者の HLA とエイズ進行のパラメーターである血漿ウイルス量および CD4T 細胞数との相関解析から、HLA-C*12:02 が病態進行遅延に、また HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 haplotype が病態進行促進に関与することが明らかになった。さらに、HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 に関連するいくつかの変異が、病態の進行に関与することも明らかにした (**J. Virol. In Press**)。平成 30 年度以降もこれらの研究を継続することにより、1) HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 haplotype が病態進行促進に関与する CTL とその逃避変異を明らかにでき、2) protective allele である HLA-C*12:02 拘束性 CTL が認識する HIV-1 subtype A/E 上のエピトープを同定し、これらのエピトープを認識する CTL のうち、どの CTL が HIV-1 の増殖抑制に関与するか明らかにする。3) R5 ウイルスや R5X4 ウイルスを主に保有している感染個体内のウイルス配列を次世代シーケンサー（NGS）にて解析し、R5 から R5X4 さらに X4 ウイルスへ

の進化過程を明らかにできる。

以上の研究成果から、subtype A/Eウイルスが流行しているベトナムでの病態進行に関与するCTLや逃避変異を明らかにし、患者で診られるR5からR5X4、さらにはX4ウイルスへの進化の過程を示すことができ、エイズ病態解析に貢献できる。また、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、今後のエイズワクチンの開発に貢献できる。

5. 実施状況報告

①平成 30 (2018) 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

NHTDでの無治療コホートを維持し、引き続き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 (PBMC, 血漿) を収集した。またこれらの患者の臨床データを収集した。

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に関連する細胞傷害性T細胞 (CTL) の解析

前年度明らかにしたエイズ進行促進に関与するHLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 haplotypeに相関する逃避変異とclinical outcomeとの関連を明らかにした。また、エイズ進行に関連する変異部位を認識するCTLを同定し、そのCTLによる変異エピトープの認識を調べた。さらに、エイズ進行促進遅延に関与するHLA-C*12:02のsubtype A/EウイルスでのCTLエピトープの同定を試みた。

3. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析

平成29年度において、ハノイを中心とした北ベトナム地域のHIV-1陽性血漿からHIV-1が分離された感染者の中で、分離されたウイルスと血漿中vRNAのコレセプター利用性が異なる症例があることを明らかにしてきた。さらにそれぞれの症例において、分離ウイルスと血漿vRNAのenv領域を解析したところ、コレセプター利用性を決定しているV3領域の配列が異なっていることが判明した。そこで平成30年度は、それぞれの感染者の血漿vRNAの中に、分離されたHIV-1のウイルス配列が存在しているかどうかを、次世代シーケンサー (NGS) を使用して解析した。特に、コレセプター利用性を決定しているV3領域を血漿vRNAからPCRで増幅してNGSライブラリーを作製し、NGSで塩基配列を解析した。

②成果 (結果+考察)

1. ハノイ無治療コホートの維持

引き続きHIV-1感染者のリクルートを行い、これらの感染者40名からのサンプル (PBMC, 血漿) を収集した。またこれらの患者の臨床データを収集した。

2. エイズ進行促進に関与するHLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 haplotypeに相関する逃避変異

エイズ進行促進に関与するHLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05に相関する変異のうち、それぞれのHLAを持っているHIV-1感染者では、以下に示した5種類の変異を持っている感染者は持っていない人より、clinical outcome (pVL およびCD4 count) が悪いことが明らかになった (図1)。

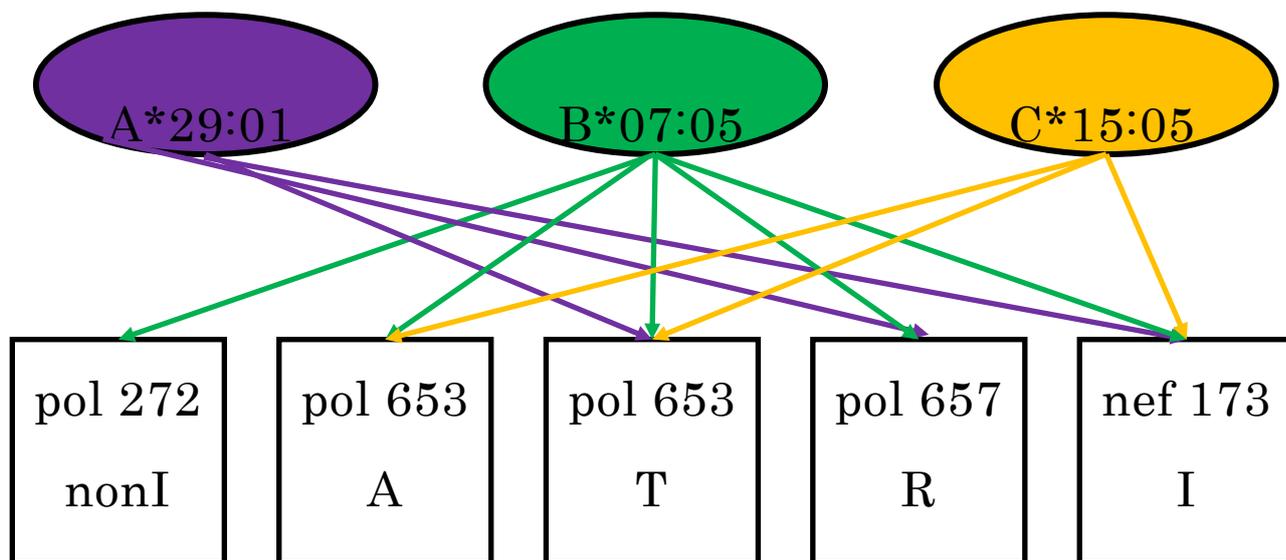


図1 pVLの上昇、CD4 countの低下を示した、変異とHLAアレル

それぞれのHLAを持った感染者で、図中に示した5種類の変異のいずれかを持っている場合、pVLの上昇、CD4 countの低下が見られた。

3. エイズ進行促進に関与する逃避変異部分を認識するCTLの同定

HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 haplotypeを、homozygoteで持つHIV-1感染者の末梢血リンパ球を用いて、5カ所の変異部分をカバーするoverlapping peptidesに対する認識を調べたところ、Pol17-118という17-merのペプチドを認識するCTLが存在することが明らかになった。また、このPol17-118を認識するCTLは、HLA-C*15:05に拘束しており、Truncated peptidesを用いた解析から、SL9という9-merのペプチドを認識することが明らかになった。

4. HLA-C*15:05拘束性SL9特異的CTLによる免疫逃避変異の認識

HLA-C*15:05陽性者に見られた5つの変異 (1A, 1T, 1L, 3V, 5R) を持った変異SL9ペプチドを作製して、これらのペプチドをパルスした.221-C1505細胞に対するSL9特異的CTLの認識を調べた。その結果、いずれの変異に対しても著しい認識の低下が見られた (図2)。これらの結果と上記で示した変異とclinical outcomeとの関係から、SL9特異的CTLのPol653における免疫逃避変異の蓄積が、エイズ進行に関与していることが示唆された。

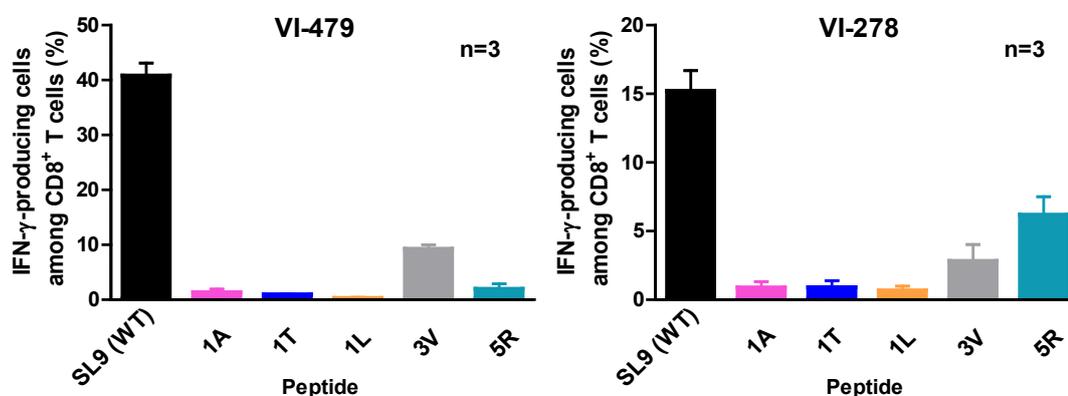


図2 HLA-C*15:05拘束性SL9特異的CTLによる免疫逃避変異の認識

VI-479とVI-278から樹立したSL9特異的CTLによる変異エピートープペプチドの認識の解析、HLA-C*15:05陽性の感染者に見られた3つの部位の5つの変異を持ったペプチドをパルスした.221-C1505細胞に対する認識を、ICS assayで示した。

4. protective allele であるHLA-C*12:02拘束性CTLが認識するHIV-1 subtype A/E上のエピートープを同定

平成29年度に明らかにしたエイズ進行遅延に相関するHLA-C*12:02に拘束するHIV-1 subtype A/E を認識するCTLエピートープの同定を試みた。既にsubtype Bで知られている3つのHLA-C*12:02拘束性CTLエピートープに対応するsubtype A/Eに、consensusなシーケンスを持ったペプチドに対してのCTLの認識を、17名のHLA-C*12:02を持ったHIV-1 subtype A/E感染者で調べた。その結果、6人、4人、3人で、それぞれ特異的なCTLの検出が確認できた。これらのことから、これらの3つのエピートープはsubtype A/E感染細胞でも提示され、CTLに認識されていると考えられた。

5. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析

解析した3症例(VI-157, VI-158, VI-340)においては、分離されたウイルスと血漿 vRNA では、V3 領域の2箇所においてコレセプター利用性に対応して異なる配列を有していることから(図3A)、それぞれの症例においてコレセプター利用性の異なるV3領域の配列の数をそれぞれ求めた。実際には、V3領域の1箇所目の血漿 vRNA 由来配列と分離ウイルス由来配列の数をそれぞれ求め、さらにそれぞれのリード上に同じ由来の配列が2箇所目にも存在している数を求めた。NGSの解析により、VI-157とVI-158の症例においては、血漿中にメジャーなポピュレーションと考えられたR5ウイルスのV3配列が多数検出された。また分離されたX4ウイルス配列も少数ではあるが血漿 vRNA から検出された(図3B)。一方、血漿 vRNA 中に既にR5とX4の配列が検出されていたVI-340の症例においては、両者の配列がNGS解析でも同様に検出できた(図3B)。興味深いことに、分離さ

れたウイルスは VI-157 と VI-158 の症例では血漿中でメジャーに存在している R5 ウィルスではなく、マイナーなポピュレーションである X4 が分離され、VI-340 の症例では逆に R5 ウィルスが分離された。このことは、これらの症例で分離されたウイルスが、生体内でその増殖が抑えられているものの、その複製能は保持された状態で維持されていることが推察された。これらの知見は、HIV-1 の感染後期における R5 から CXCR4 利用性ウイルスへのスイッチの機序解明の基礎となるものと考えられた。

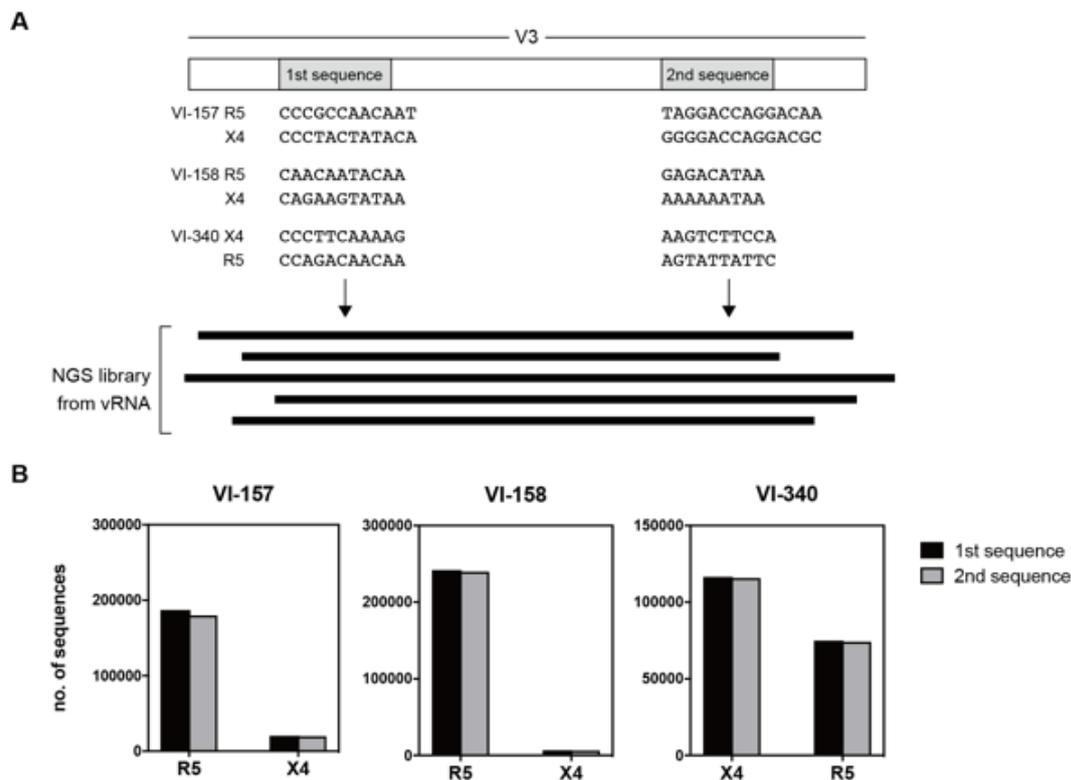


図3 血漿 vRNA の V3 領域の NGS による解析

③成果の公表

・論文発表

- Chikata T, Tran GV, **Murakoshi H**, Akahoshi T, Qi Y, Naranbhai V, Kuse N, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Martin MP, Carrington M, **Sakai K**, Nguyen KV, **Takiguchi M**, HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, **J. Virol.** 92:e01749-17, 2018
- Thida W, Kuwata T, **Maeda Y**, Yamashiro T, Tran VG, Nguyen VK, **Takiguchi M**, Gatanaga H, Tanaka K, Matsushita S, The role of conventional antibodies targeting the CD4 binding site and CD4-induced epitopes in the control of HIV-1 CRF01_AE viruses, **BBRC** 508: 46-51, 2019

・学会発表

1. **Maeda Y**, et al. Existence of infectious minor HIV-1 variants with different coreceptor usage in the plasma of HIV-1-infected individuals, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会（京都）2018 年 10 月 28 日-30 日
2. **Takiguchi M**. HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV subtype A/E, National Scientific Conference on Infectious Diseases, HIV/AIDS, The 8th ASEAN Conference of Tropical Medicine and Parasitology (Nha Trang, Vietnam), July 26 - 29, 2018
3. **Takiguchi M**. CTL- and NK cell-mediated HIV-1 control in Asians, 19th Kumamoto AIDS seminar (Kumamoto, Japan), November 6 - 7, 2018

6. 自己評価

この無治療コホートは、平成 30 年度も引き続き感染者のリクルートを行い、750 人規模に達した。平成 30 年度は、病態進行促進に関与する HIV-1 の変異を明らかにでき、さらに、この変異部分を認識する CTL の同定とその CTL による変異の蓄積と選択の機序を明らかにできた。また、病態進行遅延に関与する HLA-C*12:02 に拘束される 3 つのエピトープに関して、subtype A/E 感染者で CTL の存在を確認できた。これらの CTL は、subtype B 感染者と同じく、HIV-1 の増殖抑制に関与している可能性が示唆された。

一方、コレセプター利用性の解析も進展し、血漿と分離した HIV-1 でコレセプター利用性に対応して異なる配列を有している 3 名の感染者での解析（長崎大学ハノイ拠点との共同研究）で、それぞれ 2 種類のウイルスが併存していることが観察された。このことは、分離されたウイルスは、生体内でその増殖が抑えられているものの、その複製能は保持された状態で維持されていることと推察された。これらの知見は、HIV-1 の感染後期における R5 から CXCR4 利用性ウイルスへのスイッチの機序解明の解明に繋がるものと考えられた。

以上のことから平成 30 年度の研究計画はほぼ達成できたと思える。

7. 実施度

- 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。)
- 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. 自己評価に記載したため省略

8. 平成 30 (2018) 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	3,228	3,228	
(運営費)	2,000	3,986	5,986	
(設備費)	0	786	786	
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30年度）

所 属	職 名	氏 名
[学外委員]		
大分大学	理 事	◎西園 晃
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
京都大学ウイルス・再生医科学研究所 附属感染症モデル研究センター ウイルス共進化分野	准教授	宮沢 孝幸
国立感染症研究所・感染制御学	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・昆虫医科学部	部 長	澤邊 京子
[学内委員]		
長崎大学熱帯医学・グローバルヘルス研究科	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(支援室長)	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（病原体解析部門）	教 授	森田 公一
[オブザーバー]		
熱帯医学研究所	所 長	平山 謙二
熱帯医学研究所	副所長	金子 修
熱帯医学研究所	副所長	濱野 真二郎

◎印は議長

長崎大学熱帯医学研究所

令和元年9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>