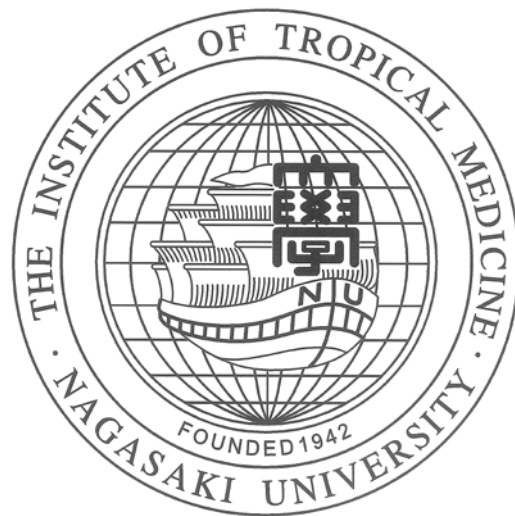


# 熱帯医学研究拠点共同研究報告集

令和元年度  
(2019)



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. 亜熱帯・熱帯植物由来の抗マalaria薬の探索研究 代表者：松浪 勝義（広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生薬学 教授）	1
2. In vitro 住血吸虫発育システムの開発 代表者：王寺 幸輝（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 准教授）	5
3. リーシュマニア原虫の新規の遺伝子解析法(nMLST)の開発と疫学への応用； 特にアルゼンチンにおけるリーシュマニア症に関連して 代表者：是永 正敬（高知大学医学部 短期研究員・特任教授）	10
4. ワクチン導入後の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（藤田医科大学医学部 准教授）	14
5. インドを旅行する日本人バックパッカーにおける下痢症発生要因に関する研究 代表者：山川 路代（岐阜大学大学院医学系研究科 助教）	19
6. アレナウイルスの細胞内増殖機構に関する研究 代表者：野田 岳志（京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 教授）	25
7. ネパール国山岳部住民の健康リスクにおける感染症の重要性について 代表者：長谷川 寛雄（長崎大学病院 検査部 准教授）	31
8. ゲノム修飾とヒトの健康との関連性評価 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）	37
9. オンラインビッグデータを用いたインフルエンザパンデミック予測 代表者：一ノ瀬 元喜（静岡大学大学院総合科学技術研究科 准教授）	43
10. ベトナム南部島嶼地域における人獣共通感染性マalariaの分子疫学的研究 代表者：前野 芳正（藤田医科大学 客員准教授）	48
11. ルワンダ共和国における妊婦の歯周病菌保菌状況と早産の関連調査 代表者：福田 英輝（国立保健医療科学院 統括研究官）	56
12. ガレクチン-2 が寄生虫感染に与える影響 代表者：武内 智春（城西大学 薬学部 准教授）	61
13. マalaria原虫感染による赤血球膜脂質構成変化のナノスケールレベル解析 代表者：正谷 達瞻（鹿児島大学共同獣医学部 准教授）	66
14. ウイルス感染モデルのライブイメージングによる病態発現のダイナミクス解析 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）	71
15. キノン化合物の抗トリパノソーマ活性評価 代表者：大山 要（長崎大学生命医科学域薬学系 准教授）	80
16. コンゴ民主共和国の通学児童における不顕性マalaria感染の実態調査とその影響 代表者：美田 敏宏（順天堂大学医学部 教授）	84

17. 人獣共通感染性の肝蛭症に対する新規薬剤の探索	代表者：関 まどか（岩手大学 農学部 共同獣医学科 助教）	89
18. 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 医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 疫学・衛生学分野 教授）	93
19. 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）	96
20. 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）	103
21. マラリア原虫感染に対するグアニン四重鎖を介した 5-アミノレブリン酸治療メカニズムに関する研究	代表者：塩田 倫史（熊本大学 発生医学研究所 ゲノム神経学分野 准教授）	111
22. 熱帯感染症に有効な薬物開発を指向した天然薬物研究	代表者：當銘 一文（富山大学 和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 准教授）	116
23. 包括的モデルによる性感染症の長期的動態の理論研究	代表者：守田 智（静岡大学 工学部 教授）	126
24. 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（長崎大学病院医療教育開発センター長崎医療人育成室 教授）	132
25. ライブイメーシングによるエボラウイルス粒子放出機構の解明	代表者：高松 由基（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）	136
26. ベトナム北部における急性ウイルス性脳髄膜炎の分子疫学的解析	代表者：西條 政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）	142

## 第2部 研究集会

1. 医学研究のための倫理に関する国際セミナー	代表者：佐々木 均（長崎大学病院 薬剤部 教授（薬剤部長））	149
2. 世界保健ニーズに応える医薬品研究開発ディプロマコース	代表者：佐々木 均（長崎大学病院 薬剤部 教授（薬剤部長））	158

## 第3部 海外拠点連携共同研究

1. 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	（千葉大学真菌医学研究センター）	169
2. ハノイコホートを用いた HIV-1 subtype A/E ウイルス感染症の疫学およびワクチン開発と治療のための基盤研究	（熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター）	175
(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿		183

## 第 1 部

# 一 般 共 同 研 究

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：亜熱帯・熱帯植物由来の抗マalaria薬の探索研究  
課 題 番 号：2019-Ippan-1
2. 代 表 者：松浪 勝義（広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 教授）  
共同研究者：金子 修（長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野 教授）  
矢幡 一英（長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野 助教）  
麻田 正仁（長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野 助教）  
Ben Yeddy-Abel Chitama  
（長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野 特任研究員）  
杉本 幸子（広島大学 大学院医系科学研究科 薬用植物園 准教授）  
山野 喜（広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 助教）  
尾崎 葵（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）  
山口 卓朗（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）  
Nguyen Hoang Uyen（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）  
Melanny Ika Sulistyowaty（Airlangga University, Indonesia）  
菅沼 啓輔（帯広畜産大学原虫病研究センター 助教）
3. 決 定 額：500 千円
4. 申請時書類より

### ① 研究目的：天然資源からの抗マalaria化合物の探索

研究対象とする亜熱帯・熱帯植物として、当研究室に保有する沖縄産植物と現在入手準備を進めているマダガスカル産植物を主に使用する。沖縄は早くから周りを海洋に囲まれ、独自の植生が保たれていること、また、温帯域である本州等とは異なり亜熱帯性気候であり、わが国における固有植物種の宝庫となっている。一方、マダガスカルは、東ゴンドワナ大陸から分離後、現在の位置に到達するまで孤立した島であり続けたことから、固有種が80%以上と世界的に最も重要な植物資源を保有する地域の一つである。そのため、これらの植物資源について詳細に天然物化学的な解析を行うことは新たな有用化合物の発見につながりやすい。これまで、培養の容易なリーシュマニア原虫を用いて活性化合物の探索研究を行ってきたが、世界中の亜熱帯・熱帯地域、特に我々と関係の深い東南アジアで流行しているマalariaの制御は重要な課題である。そのため、共同研究によってマalariaに関する活性評価ができれば両研究グループにとって有益であり、また双方の研究の効率化につながることを期待される。本研究によって医薬品のシード（種）になる化合物を見つければ原虫感染症の制御に大きな役割を果たすことになる。

## ②研究内容

以下の内容について研究を行っている（全体的な予定は R3 年度末まで）

- ① H31-32:成分研究に必要な植物資源の確保（広島大）  
現在保有する 200 種余りの沖縄産植物のほか、マダガスカル産植物サンプルについては現地の共同研究者と MTA を交わし、ABS 対応（PIC/MAT 申請）を行ったのちに、順次、必要量の入手を予定している。
- ② H31-32:成分研究に必要な量の微生物培養物の用意（広島大）  
土壌放線菌やエンドファイトの分離株を 60 余り保有している。これらについても少量培養および成分検索のための大量培養を行う。
- ③ H31-32:熱帯熱マラリア原虫を用いたアッセイ系による活性評価（長崎大熱研）  
現在保有している 200 種余りの沖縄産植物や入手予定の約 40 種のマダガスカル産植物サンプルについて活性を評価する。熱帯熱マラリア活性評価は長崎大熱研にて行う。
- ④ H32-33:化合物の分離・精製、化学構造解析（広島大）  
活性試験の結果に基づき分離・精製を行い活性本体の単離を行う。得られた化合物の化学構造は NMR, MS などのスペクトルデータ解析や改良 Mosher 法などの化学的方法により決定する。

## ③予想される成果

本研究を推進すれば、未解析亜熱帯・熱帯植物の含有化学成分の詳細が明らかになるほか、研究対象植物の薬学的有用性が明らかになる。また、単離・精製した化合物から、これまでにない新規医薬品候補化合物の発見ができれば、それをシーズとして多種多様な関連化合物への創薬展開につながる事が予想され、マラリア原虫等の治療薬の開発に大きな恩恵をもたらすことが期待される。

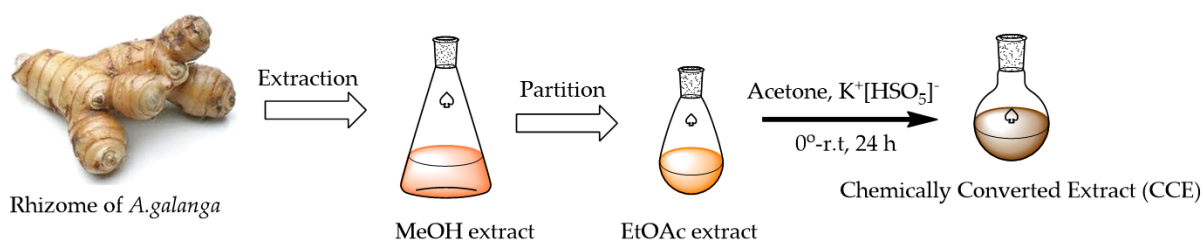
現在、日本ではこれらの原虫感染症はほとんど問題にならないが、急速なグローバル化や地球温暖化によるベクター昆虫の北限の拡大により、将来、脅威となる可能性がある。本研究はそれらの脅威への対策として保健衛生上の重要性がある。また、現在の主な感染地帯は東南アジア・アフリカなどの熱帯域であり、これらの多くの国は経済発展途上のため、我々先進国の研究者が創薬につながる研究をすることで将来的に多くの患者を救うことにつながれば、国際的貢献の面でも計り知れない波及効果がある。



## 5. 実施報告：

### ① 研究材料・方法・手続き

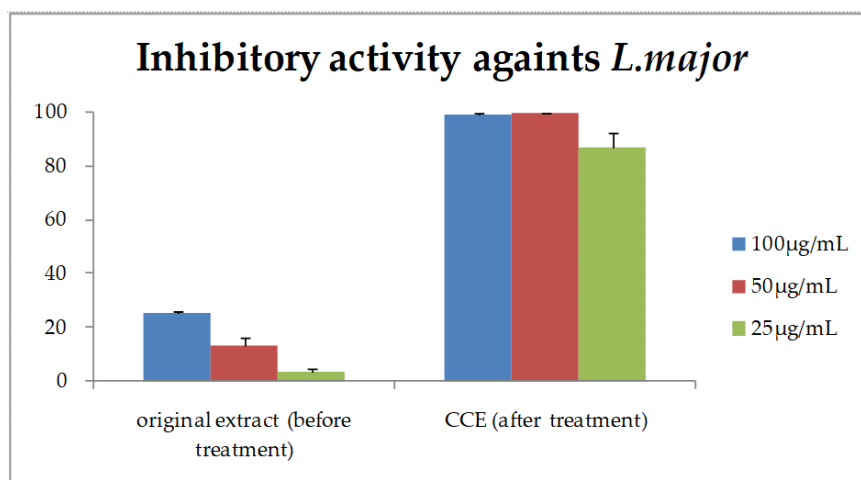
本研究ではショウガ科植物であるナンキョウ（南薑、*Alpinia galanga*）を研究材料とした。ナンキョウの根茎はガランガルと呼ばれショウガに類似している。タイ、ベトナム、インドネシアなどの東南アジアなどで食材やハーブとして使われ、また、生薬として健胃薬や風邪などに使用されてきた。*Alpinia galanga* の根茎（2.0Kg）を MeOH で抽出し、酢酸エチルと分配することで酢酸エチル可溶画分を得た。この抽出エキスを過硫酸水素カリウムで処理し、化学反応による多様性拡大抽出物を得た（下図）。



### ② 成果（結果+考察）

一般にマラリア原虫の培養はヒト赤血球が必要であるなど化学系研究室（広島大学）での培養維持、実験は困難である。そこで、比較的培養が容易なリーシュマニア原虫を用いて予備的に検討を行うこととした。

上記の植物材料を対象に、活性を評価したところ、元々の抽出物にはほとんど活性が見られなかったものの、過硫酸水素カリウム処理による多様性拡大抽出物は活性が大きく増強することを見出した（下図）。さらに、活性を指標に分離・精製を進めたところ、計 10 個の化合物を単離することに成功した。得られた化合物の化学構造は核磁気共鳴スペクトル（NMR）、赤外吸収（IR）、紫外吸収（UV）スペクトル、高分解能質量分析（MS）などのスペクトルデータを詳細に解析することで明らかにし、その結果、10 個の単離化合物のうち、6 種は新規化合物であることが明らかになった。



単離された化合物についてリーシュマニア原虫 *Leishmania major* にて活性を評価したところ 2 種の化合物に比較的強い活性が見られた。この 2 種の候補化合物について、長崎大学にてマラリア原虫に対する予備的な解析を行ったところ、明らかな活性は見られなかった。しかし、供給できた化合物の量が少なく、評価した濃度範囲が限定されたため、さらに化合物を供給して活性評価を行うことを今後検討する。成果の一部は以下の論文として投稿準備中である。

### ③ 成果の公表

・ Melanny Ika Sulistyowaty, Nguyen Hoang Uyen, Osamu Kaneko, Kazuhide Yahata, Keisuke Suganuma, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano and Katsuyoshi Matsunami. Six New Phenylpropanoid Derivatives from Chemically Converted Extract of *Alpinia galanga* (L.) and anti-parasitic activities. (in preparation)

## 6. 自己評価

広島大学 医系科学研究科 生薬学教室ではリーシュマニア原虫を用いた活性成分の研究を継続的に行っており、本共同研究によりマラリア原虫を含めて活性を評価することは今後も重要である。本年度は初年度であるものの論文の投稿をする段階まで進めることができたことは大いに評価している。一方、コロナウイルスによる影響のため、他の植物サンプルなどの研究が思うように進められないこともあり、下記の達成度は II とした。

しかし、本年度に試行錯誤しつつ進めた共同研究の方法も納得できるものであり、また、その過程で特に問題は見出されなかった。次年度も双方にとって利益ある共同研究ができるものと考えている。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名： *In vitro* 住血吸虫発育システムの開発  
課 題 番 号： 2019-Ippan-2
2. 代 表 者： 王寺 幸輝（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 准教授）  
共同研究者： 吉川 正英（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教授）  
島田 賢子（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教務職員）  
濱野 真二郎（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 教授）
3. 決 定 額： 450 千円

### 4. 申請時書類より

#### ①研究目的

住血吸虫症は、世界で2億人以上の罹患者を有する世界三大寄生虫病の1つである。住血吸虫症の病原体「住血吸虫」は淡水に生息する巻貝を中間宿主とし、皮膚から感染する。世界的な疾患対策として特効薬による治療と啓発活動が行われているが、更なる防圧にはそのライフサイクルを断ち切ることが重要と考えられる。かつて、本邦での日本住血吸虫症の撲滅にみるように、虫体というより“中間宿主に着目した研究が功を奏した”という研究史を顧み、再認識することで新たな防圧の手立てになると考えた。そこで、我々はこれまで培ってきた医学的・生物学的研究法や培養技術を駆使し、中間宿主を介さない住血吸虫発育法、即ち、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の開発を本研究の目的とした。培養系による虫体発育の実現は世界的にみても実現できておらず、中間宿主（貝）由来細胞抽出成分を用いることで住血吸虫が育つ環境を人工的に再現するという独創的アイディアを用いて実現させる。

#### ②研究内容

住血吸虫モデルとしてマンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* および中間宿主の巻貝 *Biomphalaria glabrata* を用い、実験室内で動物（ICR マウス）に感染させることで、そのライフサイクルを維持する。まず、*S. mansoni* 感染後の *B. glabrata* 内の幼虫の成長（スポロシスト～セルカリア）を薄切切片等により精査し、発育過程での局在を解析する。次に、中間宿主 *B. glabrata* より細胞抽出成分（*B. glabrata* extracted protein; BGP）を調整し、*S. mansoni* 感染マウスより単離したミラシジウム包蔵卵から誘導したスポロシストに BGP を添加することで *in vitro* 培養を行う。スポロシストからセルカリアへの発育を認める条件を見出し、更にセルカリア幼虫の感染能をマウスへの感染実験によって立証し、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の確立を目指す。なお、研究進捗状況の報告と検討を行うため、打ち合わせを長崎大学・熱研および奈良県立医科大学で行う。

### ③予想される成果

現在まで報告されている住血吸虫（症）の研究は、各幼虫、成虫ステージの形態や遺伝子解析、感染後の免疫を含む病態解析等であり、これらの研究は個々のステージでの解析に限定され、虫体自体の連続的解析は不可能であり、特に無性生殖ステージは“中間宿主”である『巻貝』を用いることが必須の条件となる。ライフサイクルを考えた場合、“中間宿主”は、研究を煩雑にするばかりでなく、ブラックボックス化する傾向もあり、“中間宿主”そのものをターゲットにすること自体が嫌厭されてきた傾向がある。すなわち、本研究で提案する中間宿主を用いずに発育できる方法論にチャレンジした研究報告は、これまで皆無であり、本研究で考案した『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の開発こそが、住血吸虫の人工的な発育を可能にすると考えた。本開発により、住血吸虫研究を簡素化・透明化し、発育阻害薬剤の開発への手がかりを得、また、貝を駆除せずして感染制御を実現することにも繋がることが予想される。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

#### 1) 奈良県立医科大学におけるマンソン住血吸虫ライフサイクルの確立

マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) を奈良県立医科大学の感染動物実験施設内で維持すべく、生物材料 (ICR マウス、*S. mansoni* および *B. glabrata*)、水槽等の準備を行った。*S. mansoni* を感染させた *B. glabrata* を長崎大学 熱帯医学研究所 (濱野研究室) より入手後、ICR マウス (8 週齢) に感染させ、8 週間後、摘出した肝臓より *S. mansoni* 虫卵を酵素処理にて回収後、孵化させたミラシジウムを *B. glabrata* へ感染させることで、実験室レベルでライフサイクルを維持した。

#### 2) マンソン住血吸虫のミラシジウム初期感染における中間宿主 (貝) 内の動態解析

*S. mansoni* 虫卵より孵化させたミラシジウムを *B. glabrata* へ感染させ、経時的に 4%PFA にて固定し、凍結切片を作成後、H&E 染色、抗マンソン住血吸虫抗体を用いた免疫染色により貝内における *S. mansoni* の分布を詳細に解析した。

#### 3) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養の試み

*S. mansoni* を感染させた ICR マウスより肝臓を摘出後、酵素処理にて虫卵を回収し、種々の培養液 #1~#8 (Table 1 参照) にてミラシジウムの培養を試みた。培養条件としては、培養液以外に CO<sub>2</sub> 濃度および温度をパラメーターとした。

Table 1

マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養に用いる各種培地

基本培地	DMEM	Ham/F10	RPMI	BgeM*
FBS(-)	#1	#2	#3	#4
10%FBS(+)	#5	#6	#7	#8

\*BgeM : Schneider's *Drosophila* Medium を主とする Bge 細胞培養液 (ATCC を参照)

#### 4) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における貝由来抽出物 (BGP) の影響

未感染 *B. glabrata* より whole あるいは各種臓器 (頭足、櫛鰓、心臓、肝臓・卵精巣) に分割し、セラミックビーズにより組織を粉砕させ、遠心後の上清分画を whole あるいは各種臓器由来抽出物 (BGP) とした。3) の項目で培養を試みたミラシジウムの *in vitro* 培養系に BGP を添加培養し、培養後のミラシジウムの動態 (viability や大きさ等) を調べることで、BGP の影響を精査した。

### ② 成果 (結果 + 考察)

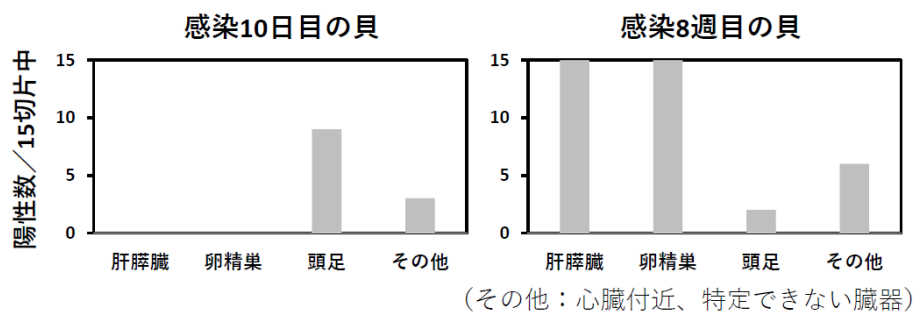
#### 1) 奈良県立医科大学におけるマンソン住血吸虫ライフサイクルの確立

長崎大学 熱帯医学研究所より入手した *B. glabrata* を未感染状態で繁殖飼育することで十分な数の貝を維持することが可能となった。また、*S. mansoni* 感染させた *B. glabrata* よりセルカリアを遊泳させ、ICR マウスに感染させ 8 週間後に肝臓より虫卵を採取し、ミラシジウムに孵化後、未感染 *B. glabrata* に感染させることで、奈良県立医科大学における実験室内でのライフサイクルが維持可能となった。

#### 2) マンソン住血吸虫のミラシジウム初期感染における中間宿主 (貝) 内の動態解析

*S. mansoni* の感染した *B. glabrata* を経時的に固定し、凍結連続切片を作成後、H&E 染色、あるいは免疫染色により虫体の分布を解析した。その結果、感染直後のスポロシストは頭足部に局在し、一方、感染 4 週目以降では主に肝臓、卵精巣部に存在することが明らかとなった (Fig. 1)。

Fig. 1

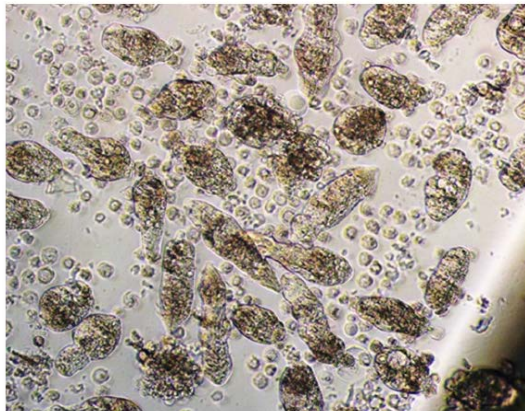


#### 3) マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養の試み

*S. mansoni* 感染 ICR マウスより回収した虫卵から孵化後、ミラシジウムを Table 1 に示す培養液を用いて培養した。その結果、10%FBS-BgeM のみが ciliary plate の shedding を認め、母スポロシストまで転換可能であった (Fig. 2)。一方で、他の培養液ではミラシジウムの運動性が低下し、萎縮を認めた。他条件として、温度は 28°C が至適温度であり、また、CO<sub>2</sub> の条件 (5% あるいは大気) に違いは認めなかった。

Fig. 2

マンスン住血吸虫の*in vitro*培養（7日目）



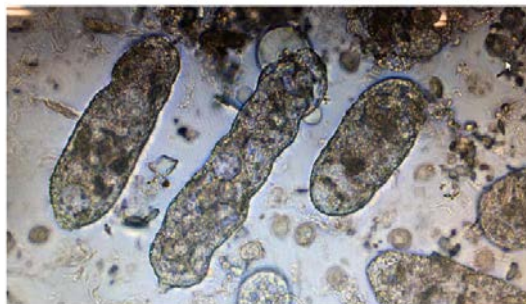
条件：10%FBS-BgeM、大気中、28℃

4) マンスン住血吸虫の *in vitro* 培養における貝由来抽出物（BGP）の影響

未感染 *B. glabrata* より各種臓器由来抽出物（BGP）を分離後、10%FBS-BgeM を用いたミラシジウムの *in vitro* 培養系に添加培養することで、スポロシストへの変換、*viability*、大きさへの影響を調べた。その結果、頭足部位由来 BGP を添加した場合、最も *viability* が高く、長径も最大になる傾向であった（Fig. 3）。

Fig. 3

マンスン住血吸虫の*in vitro*培養（14日目）



条件：10%FBS-BgeM+1%頭足抽出物、大気中、28℃

③成果の公表

第 88 回 日本寄生虫学会大会 （2020 年 5 月、帯広市）

「住血吸虫をモデルとした人工 *in vitro* ライフサイクルの実現に向けて」

○王寺幸輝<sup>1</sup>、三須政康<sup>1</sup>、北村知嵩<sup>1</sup>、阪上雅治<sup>1</sup>、尾崎大輔<sup>1</sup>、島田賢子<sup>1</sup>、吉川正英<sup>1</sup>、濱崎めぐみ<sup>2</sup>、濱野真二郎<sup>2</sup>（<sup>1</sup>奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学、<sup>2</sup>長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学）

関連した研究成果は、上記の学会・研究会で公表予定であったが、新型コロナウイルス蔓延により、誌上開催の予定に変更された。また、上記の成績をまとめ論文執筆を進めている。

## 6. 自己評価：

中間宿主を有する寄生虫のライフサイクルを実験室レベルで実現するには、宿主(中間宿主、終宿主)の維持や感染実験など多数の過程を必要とする。また、一般的に、中間宿主体内における寄生虫の発育状況の観察や解析は容易ではない。我々は本研究において、住血吸虫をモデルとした *in vitro* ライフサイクルの実現を目指して、中間宿主(貝)を使用しない培養系での発育実現を試みた。

まず、中間宿主 *B. glabrata* 内における *S. mansoni* 幼虫期の発育動態を解析した結果、感染初期では頭足部を中心に分布し、感染後期では肝臓および卵精巣部位に多く分布していることを突きとめた。次に、*in vitro* 住血吸虫発育システムの開発に向けて予備実験となるミラシジウム→母スポロシストへの変換および培養系の確立を行った。種々の培養液による条件検討を行った結果、10%FBS-BgeMを用いた培養系が最適条件であることを明らかにした。さらに、*B. glabrata* 由来抽出物(BGP)添加条件により、スポロシストへの変換、viability、大きさへの影響を調べ、頭足部位由来BGPが最も効果的であることを解明した。

本研究より得られた以上の成績から *B. glabrata* 由来抽出物は *S. mansoni* 幼虫期の発育を制御可能とする点は興味深く、今後、*in vitro* 培養による人工ライフサイクル実現の可能性が示唆された。

## 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

## 令和元年度（2019年度）一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：リーシュマニア原虫の新規の遺伝子解析法(nMLST)の開発と疫学への応用；特にアルゼンチンにおけるリーシュマニア症に関連して

課題番号：2019-Ippan-3

2. 代表者：是永 正敬（高知大学医学部 短期研究員 特任教授）

共同研究者：ファン・ホセ・ラウティエール（高知大学医学部 博士課程大学院生）

濱野 真二郎（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 教授）

3. 決定額：300 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

リーシュマニア症は世界98カ国に分布し、約3億5千万人がその感染リスクに曝されている。新規感染者は皮膚型・粘膜皮膚型は年約200万人、未治療の場合、致命率100%となる内臓型は約50万人と推定されている。それらの主な流行地は発展途上国・地域であるため the world's most neglected tropical diseases のひとつとされている(WHO, 2010)。リーシュマニア症は、複雑な生活環(zoonotic または anthroponotic cycle)をもつ約20種の *Leishmania* 属原虫により引き起こされる疾病で、その病原虫種の同定は疫学的にも、臨床的にも極めて重要である。本研究の目的は、nested multilocus sequence typing(nMLST)法の新たなスキームを開発するとともに、その分子疫学への展開である。

### ②研究内容

本研究計画では、上記の方法をさらに発展させ、最適最少の遺伝子の組み合わせで各種リーシュマニア原虫を同定できる新規の nMLST 法を開発し、同国で流行しているリーシュマニア症の分子疫学的解析を行なう。本研究に用いる原虫は、主にアルゼンチンの北部流行地で採取された *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) infantum* の他、WHO レファレンス株など 35 種/株、アウトグループとして *Sauroleishmania tarentlae* の解析を予定しているが、現在、同地における研究協力者から新たな原虫株 DNA 試料が追加されることになっている。また、MPI, G6PDH, FH, MDH, CPB, HSP70, PGM, HX などをコードする 34 遺伝子を解析対象とする。

熱帯医学研究所の濱野教授とメールなどで密に連絡・助言を仰ぎ、熱研が動かしている原虫のナショナルリソースを用いて解析対象を広げるとともに、本研究室が保有する原虫株のいくつかをナショナルバイオリソースに提供する。また、2019年11月開催の熱帯医学会大会に参加し、濱野教授と研究全般について打ち合わせを行う。



### ③予想される成果

リーシュマニア症の分子疫学的研究における MLST 解析に用いられた遺伝子で、これまでに 3 4 個の遺伝子が報告されている。しかし、未だに最適最少の遺伝子の組み合わせは示されていない。本研究では、これらの遺伝子群の中から分子疫学に簡便で有用な数個の遺伝子を見いだす。第一段階として *in silico* 解析を行なう。次に、新規の nMLST 解析において種特異性・種内変異の検定ができる遺伝子探索を施行する。この探索で得られた最適遺伝子を用い nMLST 解析を実施することにより、アルゼンチンにおけるリーシュマニア症の分子疫学的特性を明らかにできるものと予想される。また、近隣のボリビア、ブラジルをはじめ中南米に分布するリーシュマニア原虫種ばかりか旧大陸に分布するほぼ全てのリーシュマニア原虫の分類にも応用できるように計画している。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

本研究で用いる遺伝子座について、先行研究で報告されている 38 遺伝子の中から 27 遺伝子配列を選定し、BLASTn サーチにより相同性検索した。*In silico* 解析のために 33 種のリーシュマニア属原虫、*Paraleishmania* 属原虫 2 種とアウトグループ 1 種を設定した。*In silico* 解析で選抜された 15 遺伝子をさらに実験解析するために、本研究室の保存株と WHO 標準株を培養し、DNA を精製・調整した。PCR やシーケンシングは先行研究で用いられた方法および新たにデザインした増幅(amplification)法とプライマーを用いて行った。2つの MLST 解析スキームでは、多数の遺伝子配列を結合させたデータセットの解析法(concatenation)と近隣結合法(NJ)を適用した。解析には MLSTest ソフトウェアを用いた。多数の遺伝子配列を結合した(concatenated)トポロジーで比較した系統樹解析を行い、分子系統学的不適合(incongruence) は BIO-NJ 法を用いた Incongruence Difference Test(BIONJ-ILD)、パームテーション検定及びテンプレトン検定で解析した。また、Consensus Network 法による系統樹解析を行った。

## ②成果（結果＋考察）

結果:①In silico 解析された 27 遺伝子配列の 33,475 塩基(bp)において、その 43.4% に多型が見られた。全てのターゲット遺伝子の中で、最も高い allele number と discriminatory power (DP)が見出されたのは *6PGD* 遺伝子配列であった。逆に最も変異が少なかったのは *LACK*と *MKK* 遺伝子配列であった。解析の結果、最適な 15 遺伝子の組合せが見出された。そして新たな 9 つのプライマーが設計された。②15 遺伝子のうち 14 遺伝子について、20 種のレファレンス原虫株 DNA から増幅することができた。*PMM* 遺伝子については数株の原虫種でしか増幅できなかった。8,491bp について解析した結果、2,863 カ所(33.7%)に多型がみられ、そのうち 2.1%はヘテロであった。Concatenation 法に基づく系統樹解析では、種複合体あるいは種レベルで高いブストラップが示された。③14 遺伝子は congruence 解析により MLST 解析に適していると判定された。④これらの遺伝子配列の中から、10 組または 3 組の遺伝子を選定する実験を行った。その結果、*PPA*, *GPI*, *6PGD*, *HX*, *Ch36-1190*, *G6PD*, *PGM*, *ASAT*, *ALAT*, *ACON*の 10 遺伝子、そして *PPA*, *HX*,*6PGD*の 3 遺伝子の組合せによる MLST 解析が最も優れていることが分かった。

### 考察：

本研究は、様々なリーシュマニア原虫株を分子系統学的に評価でき、種を同定できる 2 段階 MLST 解析法を初めて示したものである。第 1 の MLST 法は、*PPA*, *HX*, *6PGD*の 3 遺伝子の組合せで基礎的な系統樹解析として種の同定が可能である。さらに上記 3 遺伝子に、第 2 段階として、次の 7 遺伝子 *GPI*, *Ch36-1190*, *G6PD*, *PGM*, *ASAT*, *ALAT*, *ACON*を組み合わせた 10 遺伝子による MLST 解析では、種の同定や種の系統間の関係を分子系統学的に明らかにできるだけでなく、臨床的にも様々なリーシュマニア症の病態、薬剤抵抗性に関連した知見が得られるであろうと期待される。また、寄生虫学的にも、種々の保虫宿主や媒介昆虫から得られた分離株の差異を明らかにできると思われる。

## ③成果の公表

Juan Jose Lauthier, Paula Ruybal, Paola Andrea Barroso, Yoshihisa Hashiguchi, Jorge Diego Marco, Masataka Korenaga (2020) Development of a Multilocus sequence typing (MLST) scheme for Pan-*Leishmania* Acta Tropica 201, 105189

## 6. 自己評価

これまでリーシュマニア原虫の系統樹解析には、様々な遺伝子配列を元にした MLST が用いられてきたが、染色体の組換えや遺伝子座間の不適合(*incongruence*)の影響を排除できなかった。本研究により開発された方法は系統樹解析をする上で、現時点では、計算進化遺伝学的に、より頑健な最良の方法と考えられる。*HSP70* のような単一遺伝子座解析や次世代シーケンシングから得られるデータと、そして疫学的データ等と比較検討できるようになれば、本研究で示された MLST 法は、リーシュマニア原虫の遺伝子型タイピング法の新たなゴールドスタンダードとなる可能性がある。

また、長崎大学熱帯医学研究所生物資源室(「NEKKEN BioResource Center, NBRC」)にリーシュマニア原虫 67 株を提供した。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ワクチン導入後の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：2019-Ippan-4

2. 代 表 者：河本 聡志（藤田医科大学医学部 准教授）  
共同研究者：谷口 孝喜（藤田医科大学 名誉教授）  
井手 富彦（藤田医科大学研究支援推進センター 助教）  
福田 佐織（藤田医科大学医学部 研究補助員）  
畑澤 莉緒奈（藤田医科大学保健学研究科 大学院生）  
Mohammad Monir Shah（長崎大学熱帯医学研究所 ケニア拠点）

3. 決 定 額：1,000 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 20 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（RV1、RV5）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。その要因は、開発途上国では特異な性状（遺伝子型）を有するヒトロタ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ている。また、ワクチン導入された国々では、接種開始後に分布ロタウイルス株の遺伝子型に変化が見られるようになった。ケニアにおいても、2014年にRV1ワクチンが導入された。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遺伝子型との関連を調査検討する。

### ②研究内容

ロタウイルス下痢便を収集し、抽出したウイルスゲノム RNA を用いた、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によるゲノム RNA 泳動パターン（RNA electropherotype）のグルーピング（年次的変化）、semi-nested RT-PCR による G/P タイプの決定を行う。これらによって検出される非定型的ロタウイルス株と、ランダムに選別した定型的ウイルス株について、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いて全ゲノム塩基配列を決定し、全ゲノム解析を行う。これにより、分布ロタウイルス株の G/P タイプとその年次的変化を知るとともに、非定型的ロタウイルス株の全 11 本の遺伝子分節各々の由来を明らかにし、ケニアにおけるワクチン導入前後でのロタウイルス多様性の実態を把握する。

研究手法は以下の通りである。

1. ロタウイルス下痢便の収集：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のロタウイルス下痢便を収集する。
2. (1) 10～20%の便懸濁液を PBS あるいは Eagle's MEM を用いて調製する。(2) 便懸濁液からロタウイルスゲノム RNA を抽出する。(3) semi-nested RT-PCR により G/P タイプを決定する。必要に応じて、VP7 および VP4 遺伝子の塩基配列をサンガーシーケンシングにより決定して遺伝子型の確認を行う。(4) 非定型的ロタウイルス株について、MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行う。決定した塩基配列を用いて、各遺伝子分節の詳細な系統樹解析等を行うことで、各遺伝子分節の由来を明らかにする（全ゲノム解析）。

### ③予想される成果

ケニアに分布す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に由来する遺伝子分節を有する非定型的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。動物ロタウイルス株そのものがヒト下痢便から検出されることも予想される。特に、日常生活における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の動物ロタウイルス株由来の遺伝子分節を有するヒトロタウイルス株が多数検出できるものと期待される。さらに、全ゲノム解析によって全 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株の種間伝播の詳細をリアルタイムで明らかにできると思われる。また、RV1 ワクチン導入に伴い、ケニアにおいても DS-1-like G1/2/3/8P[8]株が出現するかもしれない。2012 年から RV1 ワクチンが導入されたマラウイにおいては、DS-1-like G1P[8]株が出現した。注目すべきことに、このマラウイの DS-1-like G1P[8]株の由来は、アジアの DS-1-like G1P[8]株とは異なり、元々マラウイで分布していた G1P[8]株と G2P[4]株の間で稀なリアソートメントが起きていた。こうした背景から、ケニアで出現するかもしれない DS-1-like G1/2/3/8P[8]株もまた、すでにケニアに分布するウイルス株間のリアソートメントにより出現する可能性がある。一方で、すでに私たちが検出している DS-1-like G3P[6]株も DS-1-like 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導入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、これら非定型的な DS-1-like G1/2/3/8P[8]株の出現との関連を、世界的視野に立って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（首都ナイロビ近郊）およびビタ地域（ケニア西部）において、2019年に5歳以下の下痢症患者から収集したロタウイルス抗原陽性便検体（56検体：キアンブ地域 39 検体、ビタ地域 17 検体）を用いた。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。ロタウイルス抗原陽性下痢便の検出においては、便検体を PBS にて 10～20%懸濁液とし、A 群ロタウイルス VP6 を検出する ELISA でスクリーニングした。これらロタウイルス抗原陽性便懸濁液からロタウイルスゲノム RNA を抽出し、PAGE による RNA ゲノム泳動パターンの決定、semi-nested RT-PCR による VP7 と VP4 遺伝子の G/P タイピングを行った。非定型的なロタウイルス株については、VP7 および VP4 遺伝子のサンガーシーケンシングを行った。ヒトロタウイルスの殆どは Wa-like 遺伝子群と DS-1-like 遺伝子群の 2 つに大別されるが、PAGE において前者が”long”、後者が”short”の RNA ゲノム泳動パターンを示す。Semi-nested RT-PCR では、1st PCR においては、A 群ロタウイルスの 5'及び 3'末端の高度共通領域に共通のプライマーを用いて、VP7 遺伝子では 1,062 塩基、VP4 遺伝子では 1,084 塩基（あるいは 965 塩基）の DNA が増幅され、2nd PCR においては、VP7 遺伝子では 3'末端共通領域（リバーズ）のプライマーと各 G タイプに特異的なプライマー（フォワード）のプライマーセットを、VP4 遺伝子では、5'末端共通領域（フォワード）のプライマーと各 P タイプに特異的なプライマー（リバーズ）のプライマーセットを使用した。VP7 と VP4 遺伝子それぞれにおいて増幅される DNA の長さにより G/P タイプを決定した。非定型的なロタウイルス株については、VP7 と VP4 遺伝子についてサンガーシーケンシングを行い、得られたシーケンスを用いた BLAST 解析を行い、G/P タイプの確認と近縁なロタウイルス株のデータベース検索を行い、これら遺伝子分節の由来を推測した。

### ②成果（結果＋考察）

ロタウイルスは 11 本の分節 2 本鎖 RNA をゲノムとする非エンベロープウイルスであり、最外殻の 2 つのカプシド VP7 と VP4 は中和抗原であり、独立した 2 種類の血清型（遺伝子型）G と P をそれぞれ規定し、G1-G37、P[1]-P[51]と多様性は顕著である。残る 9 本の遺伝子分節にも多様性が認められることから、近年では全 11 本の遺伝子分節すべての遺伝子型（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。ヒトロタウイルスでは、各々 G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 と G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 と表記される。

本研究において、ケニアで検出された非定型的なロタウイルス株の G/P タイプ組み合わせ（電気泳動パターン）として、G3P[6] (short)、G3P[8] (short)、G4P[6] (long)、G12P[6] (long) となった。代表的なヒトロタウイルスの G/P タイプを有する G3P[8] 株は Wa-like 遺伝子群に属し、”long”の PAGE パターンを示すのが通常であるが、今回ケニアで検出された 3 株の G3P[8]株は”short”の PAGE パターンを示した。このことは、Wa-like 遺伝子群と DS-1-like 遺伝子群との間で稀なリアソートメントが起き、

内部遺伝子が DS-1-like 遺伝子群となったことを示唆している。これら 3 株のケニア G3P[8]株の VP7 と VP4 遺伝子は同一の由来であり、BLAST 解析ではどちらの遺伝子分節もインドのヒト定型型株と近縁であることが示された。RV1 ワクチン導入に伴い、アジアと欧米の多くの国々から、非定型的 DS-1-like G1/3/8P[8]株の出現が相次いで報告されているが、本研究で検出された 3 株のケニア G3P[8]株は、アフリカで初の DS-1-like G3P[8]株である可能性がある。VP7 および VP4 遺伝子の BLAST 解析の結果から、これらケニア G3P[8]株の由来は、これまでに報告されている DS-1-like G3P[8]株のものとは明確に異なる。ケニアは歴史的にインドとのヒト往来が盛んであることから、インドあるいはケニアに分布するヒトロタウイルス株間でのリアソートメントにより、これら非定型的な G3P[8]株が出現した可能性がある。次年度（2020 年度）に次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行うことで、これら非定型的なケニア G3P[8]株の由来を明らかにできるであろう。

一方で、非定型的 G4P[6]株も 1 株検出された。ヒトでは、G4 は P[8]との組み合わせが一般的であり、G4P[6]の組み合わせはブタロタウイルス由来であることを示唆する。そこで、VP7 と VP4 遺伝子の BLAST 解析を行ったところ、いずれの遺伝子もブタロタウイルスと近縁であることがわかった。そこで、次年度に次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行うことで、このケニア G4P[6]株がヒトロタウイルスとブタロタウイルスとの間のリアソータントであるのか、あるいはビリオン全体として種間伝播してきたブタロタウイルスそのものなのかを解明できると期待される。

こうして、ワクチン導入後のケニアにおける本研究で、非定型的なヒトロタウイルス株が相次いで検出された。これら非定型型株の出現は RV1 ワクチン接種の導入と関連しているかもしれない。ケニアにおけるロタウイルス遺伝子型の変遷について、長期的に注意深く調査する必要がある。

### ③成果の公表

2020 年度に次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行い、原著論文を海外雑誌に投稿する。

## 6. 自己評価

ケニアにおいて、以前に技術移転した ELISA による A 群ロタウイルス抗原陽性下痢便のスクリーニングが順調に稼働している点は十分に評価できる。一方で、さらに多くの情報を得ることができ、B 群や C 群ロタウイルスをも検出可能なゲノム PAGE 解析がほとんど行われていないことが課題であった。今年度のケニア滞在中に本技術の移転が上手くできたことも評価できる。Semi-nested RT-PCR による VP7 と VP4 遺伝子の G/P ジェノタイピングにおいては、ケニアではバックグラウンドが高い傾向が認められた。その要因として、若干のプロトコールの違いとサーマルサイクラーのメンテナンス不備が考えられる。次年度は、当研究室で技術指導し、RT-PCR による G/P ジェノタイピングが順調に稼働している他の海外研究室のプロトコールを参考にして、ケニアにおける G/P タイピングのバックグラウンド軽減にも対応したい。ロタウイルスワクチン導入により、わが国を含めた先進国ではロタウイルス患者の激減が認められるが、ケニアといったアフリカ諸国では、いまだに小児科外来は下痢症患者で溢れている。このロタウイルスワクチン有効性の違いを理解するためには、ワクチン導入前後の分布ロタウイルス株の性状(遺伝子型)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、次年度に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)
- 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



## 令和元（2019）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バックパッカーにおける下痢症発生要因に関する研究

課 題 番 号：2019-Ippan-5

2. 代 表 者：山川 路代（岐阜大学大学院医学系研究科 助教）

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）~2019.09

樋泉 道子（長崎大学熱帯医学研究所小児感染症学分野 助教）2019.10~

田中 優子（名古屋工業大学大学院工学研究科 准教授）

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）

竹内 理恵（長崎大学熱帯医学研究所 客員研究員）

3. 決 定 額：700 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

海外旅行者は旅行先で下痢や呼吸器感染、皮膚障害など様々な疾患に見舞われることが報告されている。中でも旅行者下痢症は、先進諸国からの旅行者が発展途上国や熱帯・亜熱帯諸国を旅行する際に最も高い頻度で遭遇する疾患の一つである。インドが旅行者下痢症の多発地域であることは、渡航医学の実践家や旅行者の間で周知のことであるが、データ収集の困難さのため、インド旅行者における下痢症の発生率の疫学的知見は十分に蓄積されていない。また、一般的に生水を飲む・生野菜を食べるなどの旅行者の行動が下痢症の発生と関連していることが指摘されているが、そのようなハイリスクな行動をとりやすい旅行者の特性や下痢症との関連性については未だ解明されていない。

本研究は、インドを旅行する日本人旅行者に低料金で宿を提供している、インド・サンタナグループの協力を得て、サンタナの宿を利用した日本人旅行者を対象に旅行中の下痢症の発生頻度及びリスク行動、それらへの関連が予想される個人特性について明らかにする。

### ②研究内容

2019年度からは新たに認知科学・教育心理学が専門の田中優子准教授（名古屋工業大学）が研究に参画し、旅行者のリスク認知など心理的側面がリスク行動や下痢症の発生に与える影響について検討を行う予定である。

#### (1) 研究のデザイン

コホート研究（前向き）、横断研究

#### (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、日本人旅行者の拠点となっているデリーの

宿を利用し、インド国内を旅行する日本人旅行者約 300 名・年を主に研究対象とする。

(3) 評価項目

下痢症及びそれ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）

(4) 統計解析方法

記述疫学及び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）

(5) 観察項目とその実施方法

以下の項目について、観察研究として対象者がインド滞在中に Web 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。

対象者基本情報：年齢・性別・日本の住所（都道府県）・予防行動（予防接種歴・薬の持参・リスク情報の検索）・リスク認知・リスクに対する不安・海外渡航歴・旅程（入国日・次の旅行先・出国予定日）・旅行中のリスク行動（食事や衛生の習慣）・旅行中の睡眠時間

(6) 研究期間（予定）

2019 年度は日本人旅行者の多い時期を狙い、8 月～9 月、12 月末～1 月上旬、2 月末から 3 月中旬の計 3 回インド・デリーを訪問しデータ収集を行う。必要に応じて次年度以降も引き続きデータ収集を行う。

③予想される成果

本研究を通じて、まず下痢症の発生頻度及びリスク行動が解明される。次に、下痢症の発生とリスク行動に関連する個人特性が解明され、下痢症発生リスク低減につながる予防策立案のための重要な視点を提示する。本研究成果は、インドあるいは類似の熱帯・亜熱帯地域を旅行する日本人に応用され、日本人旅行者が海外で安全に計画通りに活動できるようになる。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も応用されることが期待される。

## 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

インド・デリーのサンタナゲストハウス（サンタナデリー）に宿泊している日本人バックパッカーを対象とし、Web アンケート（マクロミル社クエスタント）を用いて、比較的旅行者の多い春期と夏期に横断的にデータ収集を行った。なお、調査期間中に複数回宿を利用した者は一人とカウントし、過去に本アンケートに回答したことがある者は 2019 年度の調査対象から除外した。

#### (2) 質問項目

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、旅行前予防接種等）、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、旅行中の下痢（WHO の定義により一日 3 回以上の軟便あるいは水様便を下痢と定義）及びその他の症状の有無、インド滞在中の食事や衛生の習慣、野外での活動等も併せて収集した。

### ②成果（結果＋考察）

調査期間を第一期（2019 年 8 月 23 日～9 月 2 日）及び第二期（2020 年 2 月 19 日～3 月 5 日）に分けて、データ収集を行った。回答率は第一期では 58.6%（宿泊者 116 名中 68 名）、第二期では 80.2%（106 名中 85 名）であった。

表 1 に研究対象者の個人特性を示す。研究対象者のうち、男性、20～24 歳、未婚・離婚者、現病歴なし、学生、渡航歴のある者が多く見られた。今回の旅行中にインド以外を訪問した、あるいは訪問予定の者が 6 割以上、2 週間以上のインド滞在期間を予定していた者が半数以上、2 週間以上の旅行期間を予定していた者が 7 割以上見られた。また、9 割以上の旅行者が海外旅行傷害保険に加入し、7 割以上が事前に疾病リスク情報を入手していた。

表 2 に個人特性別の下痢に対するリスク認知得点及び食事・衛生・体調・下痢に対する不安得点を示す。渡航中の下痢発症経験がある者の方が有意に下痢に対するリス

表 1 研究対象者の個人特性（n=153）

	n	(%)
性別		
男	120	(78.4)
女	33	(21.6)
年齢群		
<20	21	(13.7)
20-24	85	(55.6)
25-29	21	(13.7)
30-34	12	(7.8)
35-39	7	(4.6)
40代	2	(1.3)
50歳以上	5	(3.3)
婚姻		
既婚	5	(3.3)
未婚・離婚	148	(96.7)
現病歴		
なし	98	(64.1)
あり	55	(36.0)
職業		
無職・パートアルバイト	29	(19.0)
学生	103	(67.3)
医療従事者	3	(2.0)
正規・常勤の会社員・職員	14	(9.2)
自営業・家業	4	(2.6)
渡航歴		
なし	6	(3.9)
あり	147	(96.1)
-インド渡航歴あり	37	
-以前の旅行中に下痢の経験あり	64	
インド以外の国への訪問予定		
既に訪問した	75	(49.0)
訪問予定あり	22	(14.4)
インドのみ	56	(36.6)
インド滞在期間(予定)		
2週間未満	71	(46.4)
2週間以上	82	(53.6)
全体の旅行期間(予定)		
2週間未満	33	(21.6)
2週間以上	120	(78.4)
海外旅行傷害保険の加入状況		
なし	11	(7.2)
あり	142	(92.8)
保険会社	72	
クレジットカード付帯	97	
疾病リスク情報の入手		
しなかった	36	(23.5)
した	117	(76.5)

ク認知得点が高く、学生の方が全ての不安得点が有意に高かった (P<0.05)。現病歴のある者の方が衛生・下痢に対する不安得点が有意に高く、インド渡航歴のある者の方が食事・衛生に対する不安得点が有意に低かった (P<0.05)。

表 2 研究対象者における、個人特性格別の下痢に対するリスク認知得点及び食事・衛生・体調・下痢に対する不安得点 (n=153)

	リスク認知・下痢			不安・食事			不安・衛生			不安・体調			不安・下痢**		
	mean* (sd)	P		mean* (sd)	P		mean* (sd)	P		mean* (sd)	P		mean* (sd)	P	
性別															
男	5.0 (1.7)	0.527		3.8 (1.7)	0.627		4.5 (1.8)	0.302		4.4 (1.7)	0.241		4.7 (2.0)	0.556	
女	4.8 (1.8)			4.0 (1.8)			4.9 (1.7)			4.8 (1.4)			4.9 (1.6)		
現病歴															
なし	4.8 (1.9)	0.103		3.9 (1.8)	0.909		4.3 (1.9)	0.021		4.5 (1.6)	0.521		4.3 (2.0)	0.004	
あり	5.3 (1.3)			3.9 (1.6)			5.0 (1.6)			4.6 (1.7)			5.5 (1.4)		
職業															
学生以外	4.9 (2.0)	0.665		3.4 (1.8)	0.025		4.0 (1.9)	0.005		4.1 (1.6)	0.043		4.1 (2.0)	0.033	
学生	5.0 (1.6)			4.1 (1.7)			4.9 (1.7)			4.7 (1.6)			5.0 (1.8)		
インド渡航歴															
なし	5.0 (1.7)	0.623		4.0 (1.7)	0.048		4.8 (1.7)	0.005		4.6 (1.6)	0.097		5.0 (1.8)	0.025	
あり	4.9 (1.9)			3.4 (1.8)			3.9 (1.8)			4.1 (1.8)			4.0 (2.0)		
以前の旅行中の下痢発症経験															
なし	4.6 (1.8)	0.002		4.0 (1.7)	0.141		4.8 (1.6)	0.096		4.6 (1.5)	0.294		4.7 (1.9)	0.960	
あり	5.5 (1.5)			3.6 (1.8)			4.3 (2.0)			4.4 (1.8)			4.7 (1.9)		
インド以外の国への訪問予定															
既に訪問した・予定あり	5.0 (1.8)	0.826		3.7 (1.8)	0.236		4.5 (1.8)	0.271		4.4 (1.7)	0.192		4.5 (2.1)	0.222	
インドのみ	4.9 (1.6)			4.1 (1.5)			4.8 (1.6)			4.8 (1.4)			5.0 (1.6)		
全体の旅行期間(予定)															
2週間未満	5.2 (1.6)	0.399		4.0 (1.7)	0.627		4.7 (1.8)	0.631		5.0 (1.5)	0.075		5.5 (1.4)	0.050	
2週間以上	4.9 (1.8)			3.8 (1.8)			4.6 (1.8)			4.4 (1.7)			4.5 (2.0)		
海外旅行傷害保険の加入															
なし	5.0 (1.8)	0.921		3.7 (1.8)	0.213		4.4 (1.9)	0.231		4.4 (1.8)	0.305		4.7 (1.8)	0.845	
あり(保険会社)	5.0 (1.6)			4.1 (1.7)			4.8 (1.7)			4.7 (1.5)			4.8 (2.0)		
疾病リスク情報の入手															
あり	5.0 (1.6)	0.472		3.9 (1.7)	0.365		4.6 (1.8)	0.564		4.6 (1.5)	0.304		4.9 (1.8)	0.130	
なし	4.8 (2.0)			3.6 (1.8)			4.4 (1.7)			4.3 (1.9)			4.2 (2.1)		

\*mean score: 1 (min) to 7 (max); \*\*n=85 (第二期調査のみ)

表 3 個人特性・リスク認知・リスクに対する不安・リスク行動と下痢の発症との関連 (n=135)

	一日3回以上の下痢				一日3回以上の下痢		
	なし	あり	P		なし	あり	P
合計*	79 (58.5)	56 (41.5)		(左表の続き)			
性別, n (%)				旅行中の睡眠時間, n (%)			
男	64 (60.4)	42 (39.6)	0.402	7時間以上	24 (51.1)	23 (48.9)	0.199
女	15 (51.7)	14 (48.3)		7時間未満	55 (62.5)	33 (37.5)	
現病歴, n (%)				リスク行動, n (%)			
なし	62 (70.5)	26 (29.6)	0.000	食事前の手指洗浄			
あり	17 (36.2)	30 (63.8)		それ以外	41 (51.9)	38 (48.1)	0.064
職業, n (%)				常にした	38 (67.9)	18 (32.1)	
学生以外	21 (47.7)	23 (52.3)	0.077	屋台の食事			
学生	58 (63.7)	33 (36.3)		食べなかった	20 (66.7)	10 (33.3)	0.304
インド渡航歴, n (%)				食べた	59 (56.2)	46 (43.8)	
なし	61 (59.2)	42 (40.8)	0.766	不衛生なレストラン・食品店での食事			
あり	18 (56.3)	14 (43.8)		しなかった	19 (73.1)	7 (26.9)	0.094
以前の旅行中の下痢発症経験, n (%)				した	60 (55.1)	49 (45.0)	
なし	59 (75.6)	19 (24.4)	0.000	生野菜・カットフルーツ			
あり	20 (35.1)	37 (64.9)		食べなかった	35 (77.8)	10 (22.2)	0.001
インド以外の国への訪問予定, n (%)				食べた	44 (48.9)	46 (51.1)	
既に訪問した・予定あり	46 (53.5)	40 (46.5)	0.116	生の魚介類			
インドのみ	33 (67.4)	16 (32.7)		食べなかった	62 (60.2)	41 (39.8)	0.478
全体の旅行期間(予定), n (%)				食べた	17 (53.1)	15 (46.9)	
2週間未満	23 (85.2)	4 (14.8)	0.002	作り置きのかめた食事			
2週間以上	56 (51.9)	52 (48.2)		食べなかった	44 (68.8)	20 (31.3)	0.022
海外旅行傷害保険の加入, n (%)				食べた	35 (49.3)	36 (50.7)	
なし	38 (56.7)	29 (43.3)	0.673	氷入り飲料			
あり(保険会社)	41 (60.3)	27 (39.7)		飲まなかった	37 (75.5)	12 (24.5)	0.002
疾病リスク情報の入手, n (%)				飲んだ	42 (48.8)	44 (51.2)	
あり	60 (57.7)	44 (42.3)	0.721	水道水			
なし	19 (61.3)	12 (38.7)		飲まなかった	62 (61.4)	39 (38.6)	0.244
リスク認知・下痢, mean (sd)	4.4 (1.7)	5.7 (1.5)	0.000	飲んだ	17 (50.0)	17 (50.0)	
不安・食事, mean (sd)	3.8 (1.7)	3.7 (1.8)	0.606	川や池での水浴び(沐浴)や水泳			
不安・衛生, mean (sd)	4.5 (1.8)	4.7 (1.8)	0.511	しなかった	62 (63.9)	35 (36.1)	0.042
不安・体調, mean (sd)	4.5 (1.6)	4.3 (1.7)	0.494	した	17 (44.7)	21 (55.3)	
不安・下痢, mean (sd)	4.4 (1.9)	5.2 (1.9)	0.119				

研究対象者（n=153）のうち、日本から到着した直後にアンケートに回答した者を除いて、旅行中に一日3回以上の下痢を発症した者は全体の41.5%（135名中56名）であった（表3）。下痢発症との関連因子について検討した結果、現病歴のある者はない者と比べて、以前の旅行中に下痢発症経験のある者はない者と比べて、全体の旅行期間が2週間以上の者は2週間未満の者と比べて、それぞれ旅行中に下痢を発症した者の割合が高かった。また、下痢を発症した者の方が発症していない者に比べて下痢に対するリスク認知得点が高かった。多くのリスク行動で下痢発症との関連が見られ、生野菜・カットフルーツや作り置きの冷めた食事を食べた者は食べていない者と比べて、氷入り飲料を飲んだ者は飲んでいない者と比べて、川や池で水遊びや水泳をした者はしていない者と比べて、それぞれ旅行中に下痢を発症した者の割合が高かった。

以上、今回の共同研究から得られた知見として、次の3点が挙げられる。

- 今回の旅行でインド以外の国も旅行している者が約半数含まれるものの、日本人バックパッカーは高頻度（41%）に下痢を発症していた。
- 以前の旅行中に下痢を発症した経験がある場合、下痢に対するリスク認知は高いが、今回の旅行中でも高頻度の下痢を発症していることが分かった。一方で、下痢の原因となりうる食事・衛生に対する不安は、以前の旅行中に下痢を発症した経験のない者との有意な差は見られなかった。
- 下痢に対するリスク認知の高い者の方が、予想に反して、今回の旅行中に高頻度で下痢を発症していた。また、下痢発症リスクが高い行動をとる者も高頻度で見られた。以前の旅行中に下痢を発症した経験があると、下痢に対するリスク認知は高まるが、食事・衛生に対する不安が何らかの理由で緩和され、下痢発症リスクの高い行動をとる可能性が考えられる。

### ③成果の公表

今後さらに分析を進め、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

旅行者下痢症は、先進諸国からの旅行者が発展途上国や熱帯・亜熱帯諸国を旅行する際に最も高い頻度で遭遇する疾患の一つであり、インドは旅行者下痢症の多発地域であることが知られている。旅行者の中でも、特に自由旅行者（バックパッカー）は下痢発症頻度が高いと予想されているが、その自由度の高さゆえに、データ収集が極めて困難であり、下痢発症頻度や発症に関連する因子に関する知見は十分に蓄積されてこなかった。

本研究では、日本人旅行者が多い時期を狙って、夏期と春期の休暇期間にインドに渡航し、デリーの宿で横断的にデータ収集を行った。第二期（2020年2月19日～3月5日）については、新型コロナウイルス感染が拡大していく中で、調査期間を短縮せざるを得ず、研究遂行に不利な状況であったが、短期間で満足のいく回答数（85名、回収率80%）が得られた。その結果、インドを旅行する日本人バックパッカーの多く（41%）が見舞われる症状であることが分かり、国際的に重要な知見を提供するものと考えられる。

横断研究という研究デザインによる限界があるものの、研究対象者はいわゆるハイリスクと考えられている行動をとり、結果的に下痢を発症しているものと考えられる。リスク行動と関連する個人特性について、さらに検討が必要である。

今回の調査期間では参加者の約7割が学生であったが、今後、通年で学生の割合が宿泊者のどの程度の割合を占めるかを検討する必要がある。時期によって対象者の特性が異なる場合は、データ収集の時期について再検討したい。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：アレナウイルスの細胞内増殖機構に関する研究

課 題 番 号：2019-Ippan-6

2. 代 表 者：野田 岳志（京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授）

共同研究者：浦田 秀造（長崎大学熱帯医学研究所 准教授）

高松 由基（国立感染症研究所 主任研究官）

梶川 純一（京都大学ウイルス・再生医科学研究所 大学院生）

3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

アレナウイルス科マーマアレナウイルス属に分類されるラッサウイルスは、西アフリカー帯で毎年 10-30 万人の感染者を引き起し、そのうち 5000 人以上が出血熱疾患により死亡している。また、輸入感染やバイオテロの観点からも国際的に対策を要する重要な感染症であるが、ヒトに高い病原性を示すラッサウイルスは BSL-4 施設で取り扱う必要があるため、その増殖機構に関する研究は十分に進んでおらず、ワクチンや抗ウイルス薬も存在しない。最近申請者らはラッサウイルスのマトリックス蛋白質（Z）が宿主細胞の膜構造を劇的に変化させ、核近傍にウイルス特異的な膜構造集合体を形成することを明らかにした。また、この膜構造集合体にはウイルス複製や転写に関与する核蛋白質（NP）や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（L）が局在しており、ラッサウイルスの細胞内増殖環において重要な役割を果たす機構である可能性が示唆されている。これらの Z 蛋白質の働きは、ラッサウイルスに限らず、他のアレナウイルスにおいても広く保存された機能であることを明らかにしており、本機能の役割および分子機序の解明がアレナウイルス研究および汎アレナウイルス薬開発につながることを期待される。

本研究では、超解像顕微鏡や電子顕微鏡を用いた「微細形態学的解析」を駆使し、アレナウイルス Z 蛋白質が誘導する膜構造再構築機構に関わる宿主因子の発現抑制スクリーニング等を行い、アレナウイルス増殖環における膜構造再構築機構の役割および分子機序の解明を目指す。

## ②研究内容

本研究では、アレナウイルス増殖環における Z 蛋白質の膜構造再構築機構に関して、その役割および分子機序の解明をするため、下記の 3 つの研究項目を実施する。

### ① アレナウイルス Z 蛋白質および変異 Z 蛋白質を用いた膜構造再構築機構の機能スクリーニング

アレナウイルス科マーマアレナウイルス属に分類されるアレナウイルスの Z 蛋白質および変異 Z 蛋白質発現プラスミドを作製し、これらの発現プラスミドを導入した細胞において膜構造再構築能の有無や細胞内局在を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて評価する。使用したアレナウイルス、宿主細胞、変異導入位置等の違いから機能を絞り込み、必要に応じて、レポーター遺伝子アッセイやウエスタンブロッティング等の定量解析、またウイルス粒子形成能を評価する Budding assay を行い、さらに機能面の絞り込みを行う。

### ② 膜構造再構築機構に関連した宿主因子発現抑制スクリーニング

同定した膜構造再構築機構に関連すると考えられる宿主因子に対する siRNA を宿主細胞へ導入し、膜構造再構築機構への影響を評価する。発現抑制スクリーニングの評価には、Z 蛋白質の発現系における細胞内局在観察やレポーター遺伝子アッセイを用い、感染系においては LCMV を用いてウイルス増殖能への影響や各ウイルス蛋白質の局在や発現量から評価する。

### ③ ラッサウイルスを用いた感染実験による膜構造再構築機構の機能同定

上記①、②からアレナウイルス Z 蛋白質が誘導する膜構造再構築機構の機能を予測し、LCMV で効果のあった siRNA また各種阻害薬を用いた発現抑制細胞におけるラッサウイルスのウイルス増殖能の変化を評価する。また、電子顕微鏡を用いた観察から膜構造再構築誘導が行われているかについても評価する。本実験は、フィリップ大学マールブルク（ドイツ）との共同研究で実施する。

## ③予想される成果

アレナウイルスの Z 蛋白質によって誘導される膜構造の再構築機構に関連した報告はこれまでに無く、マイナス鎖 RNA ウイルスにおいても同様の報告がないことから、その機構の解明がもたらす学術的進展は大きいものになると考えられる。また、本機構の解明から、未だに特異的な治療法が確立されていないラッサ熱だけでなく、多様なアレナウイルス疾患に対する汎アレナウイルス薬の開発につながる可能性もあり、流行地である西アフリカ地域の医療の向上や公衆衛生の改善、社会貢献につながるだけでなく、輸入感染症対策やバイオテロ対策を通じて我が国の国民の安全や福祉の向上につながるかと考えている。



## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

令和元年度の本共同研究費を使用し、光学顕微鏡解析及び光-電子相関顕微鏡法 (CLEM) 用のマイクロスライド (ibidi 社) を確保した。また、高松と梶川が 2 月 17 日から 21 日まで長崎大学熱帯医学研究所へ訪問し、組換えリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) を用いた感染実験および浦田博士、南保博士との研究打ち合わせを行った。

1) アレナウイルス Z 蛋白質及び変異 Z 蛋白質を用いた膜構造集合体の微細構造解析  
ラッサウイルスの近縁ウイルスで、アレナウイルスのプロトタイプウイルスとして利用される LCMV の Z 蛋白質及びミリスチル化修飾部位をアラニン置換した Z (G2A) 変異蛋白質発現プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドを NP 発現プラスミドと共に BHK-21 細胞へ導入し、細胞内局在変化及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による微細構造変化を観察した。

2) LCMV 感染細胞における膜構造集合体の形成と持続感染への関与

BHK21 細胞へ LCMV を感染させ、感染後のウイルス産生量、蛋白質発現量、RNA 発現量を経時的に測定した。また、抗 LCMV-NP 抗体を用いた免疫蛍光染色 (IFA) を行い、感染細胞における細胞内局在変化を観察した。さらに LCMV 感染細胞の切片試料を作製し、TEM による観察を行った。

3) 組換え LCMV 感染細胞における Z 蛋白質の局在

LCMV の Z 蛋白質に Flag タグを付加した組換え LCMV を BHK21 細胞へ感染させ、感染細胞における Z 蛋白質の細胞内局在を観察した。

### ②成果 (結果+考察)

1) アレナウイルス Z 蛋白質及び変異 Z 蛋白質を用いた膜構造集合体の微細構造解析

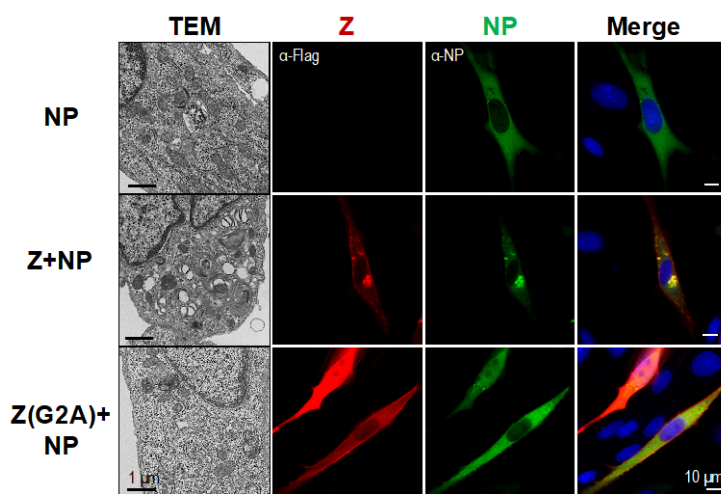


図 1. LCMV 野生型 Z 及び変異型 Z (G2A) 発現細胞の微細構造解析

ラッサウイルスの近縁ウイルスである LCMV において、Z 蛋白質が宿主細胞の膜構造変化を誘導するか確認するため、Z 蛋白質及び Z (G2A) 変異蛋白質を発現させた細胞の微細構造解析を行った。図 1 に示すように、LCMV の Z 蛋白質と NP 蛋白質を共発現させた細胞でのみ、核近傍へのウイルス蛋白質の集積、また膜構造集合体の形成を確認した。一方で、NP 単独発現細胞及び NP と Z (G2A) 変

異蛋白質共発現細胞においてはこれらの現象は見られなかった。本結果から、LCMV においてもラッサウイルス同様、Z 蛋白質が宿主細胞内の膜構造変化を誘導することが明らかになった。

## 2) LCMV 感染細胞における膜構造集合体の形成と持続感染への関与

上述 1) の蛋白質発現系で見られた現象が、実際のウイルス感染によっても誘導されるか確かめるため、LCMV 感染細胞の微細構造変化を経時的に観察した。図 2A に示すように、LCMV 感染 48 時間後の細胞において、NP の核近傍への集積及び膜構造集合体の形成が見られた。また、電子顕微鏡を用いた微細形態学的解析から、この膜構造集合体はオートファゴソームやオートリソソーム様の分解系構造に類似した形態であることが示めされた。また興味深いことに、分解系構造が増加するタイミングから、子孫 LCMV 産生量、ウイルス蛋白質/RNA 発現量が著しく減少した (図 2B-E)。これらの結果から、LCMV 感染 48 時間後に増加する膜構造集合体は、ウイルス蛋白質/RNA を分解する分解系であると考えられた。LCMV は多くの培養細胞において持続的に感染することが知られており、本実験においても顕著な細胞障害性は見られなかったことから、ウイルス蛋白質/RNA 発現量を負に制御することで持続的な感染を成立させる可能性が示唆された。

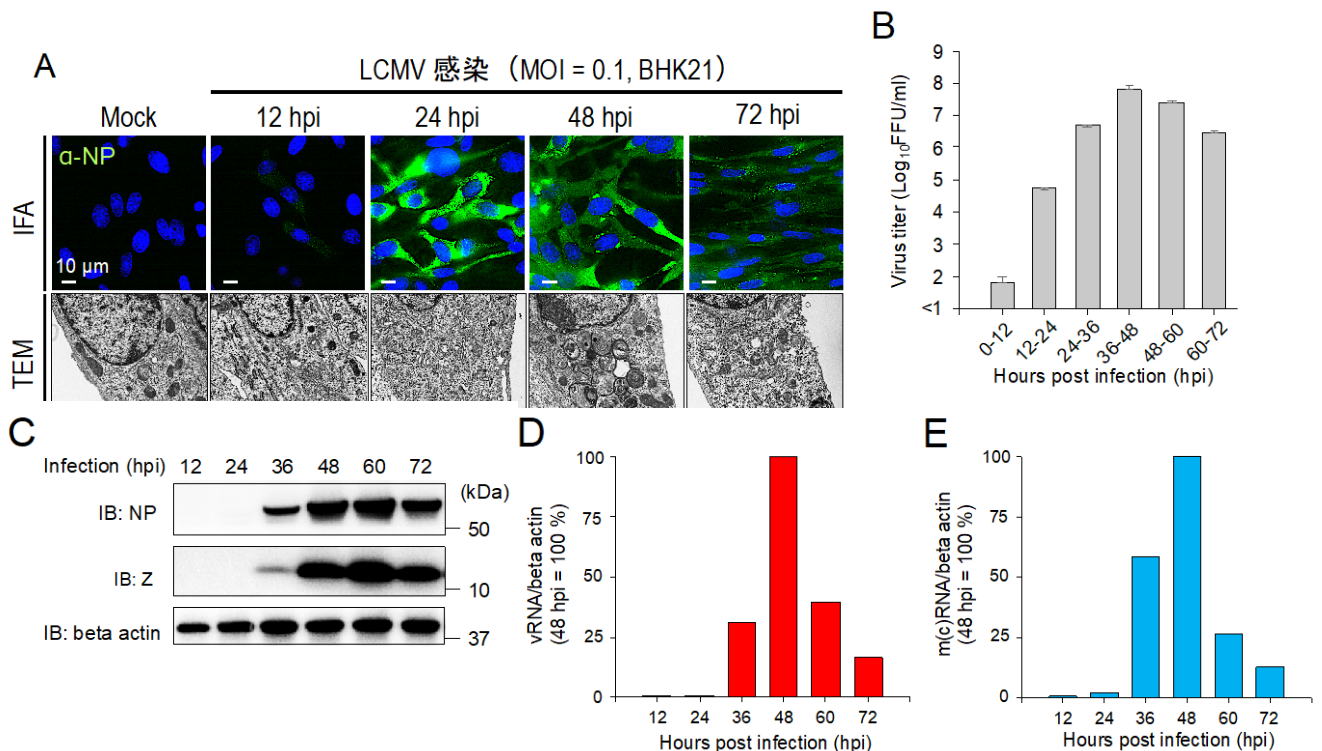


図 2. LCMV 感染細胞における経時的解析 (A) LCMV 感染細胞の微細構造、(B) 子孫ウイルス粒子産生量、(C) ウイルス蛋白質発現量、(D, E) ウイルス RNA 発現量

### 3) 組換え LCMV 感染細胞における Z 蛋白質の局在

上述 1)、2) の結果から、LCMV 感染細胞においても Z 蛋白質が膜構造集合体形成を誘導すると考えられた。そこで、浦田博士の協力の下、Z 蛋白質の C 末端に Flag タグを付加した組換え LCMV を BHK-21 細胞へ感染させ、感染 48 時間後の Z 蛋白質と NP の局在を確認した。予想された通り、組換え LCMV 感染細胞においても、核近傍に Z 蛋白質が集積しており、NP と共局在していた。従って LCMV 感染細胞においても Z 蛋白質が膜構造集合体形成を誘導することが示された (図 3)。今後は分解系阻害薬を用いた薬剤スクリーニング等を行い、分解系経路の同定や LCMV の持続感染機構の分子機序の解明を目指す。

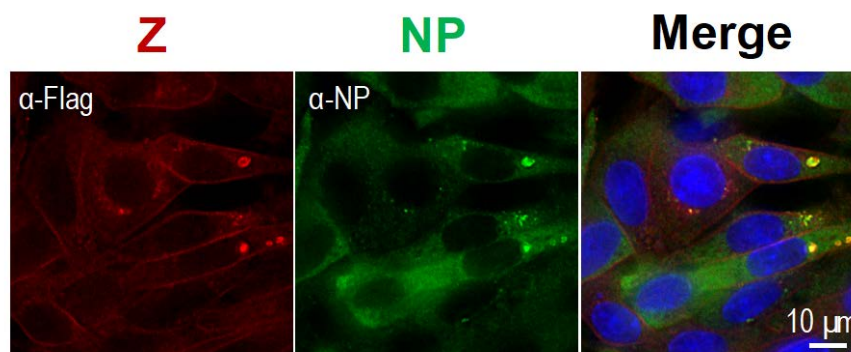


図 3. rLCMV Z-Flag 感染細胞における Z 蛋白質の細胞内局在

### ③成果の公表

#### 【学会発表】

1. ○梶川純一、平林愛、宮本翔、高松由基、胡上帆、祝部和也、浦田秀造、安田二郎、Thomas Strecker、中野 雅博、村本 裕紀子、野田岳志. アレナウイルス感染における宿主細胞膜再構成の意義. 第 16 回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 静岡. 2019 年 5 月
2. ○梶川純一. アレナウイルス感染における宿主細胞膜再構成と持続感染への関与. 新学術領域「ネオウイルス学」第 6 回領域班会議. 兵庫. 2019 年 6 月
3. ○Junichi Kajikawa, Ai Hirabayashi, Sho Miyamoto, Yuki Takamatsu, Shangfan Hu, Kazuya Houri, Shuzo Urata, Jiro Yasuda, Thomas Strecker, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Relevance of degradative organelles in Mammarenavirus-infected cells to persistent infection. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会. 東京. 2019 年 10 月
4. ○梶川純一、平林愛、宮本翔、高松由基、胡上帆、祝部和也、浦田秀造、安田二郎、Thomas Strecker、中野 雅博、村本 裕紀子、野田岳志. アレナウイルス感染における分解系オルガネラの亢進と持続感染への関与. 新学術領域「ネオウイルス学」第 7 回領域班会議. 兵庫. 2019 年 11 月
5. ○平林愛、梶川純一、胡上帆、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志. アレナウイルスの細胞内増殖機構の解析. 日本顕微鏡学会第 75 回学術講演会 名古屋. 2019 年 6 月

6. 梶川純一、○平林愛、胡上帆、高松由基、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志.  
アレナウイルス持続感染に關与する細胞内膜系構造の微細構造解析. 9tn Negative  
Strand Virus-Japan. 沖縄. 2020年1月

【原著論文】

1. ○Yuki Takamatsu, Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano,  
Takeshi Noda. Microtubule-dependent transport of arenavirus matrix protein  
demonstrated using live-cell imaging microscopy. *Microscopy (Oxf)*. 2019 Dec  
3;68(6):450-456.

6. 自己評価

本研究ではBSL-4施設内でしか扱うことのできないラッサウイルスに代わり、低病原性の近縁ウイルスであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）を用いて実施した。当初の計画通り、LCMVにおいても蛋白質発現系での膜構造集合体の形成が見られ、LCMVもしくは組換えLCMVの感染実験においても同様の現象を確認することができた。また、本年は、透過型電子顕微鏡を用いた微細形態学的解析から、LCMV感染によって生じる膜構造集合体がオートファゴソームやオートリソソームに代表される分解系構造であることを明らかにした。さらにLCMV感染細胞の経時的な測定から、これらの分解系がLCMVの持続感染成立に關与する可能性が示された。他の研究グループの報告では、ラッサウイルスやフニンウイルスの増殖にオートファジーが關与することが示されており、アレナウイルス全般において、感染細胞内での膜構造変化の分子機序の解明がもたらす学術的進展は大きいものになると考えられる。今後、分解系阻害薬を用いた薬剤スクリーニングや関連宿主因子の発現抑制を行い、引き続きアレナウイルス感染が引き起こす宿主細胞内の膜構造変化とその分子機序の解明を進めていく。一部実施しなかった実験もあるが、全体的には納得のいく結果が得られたので、達成度はⅢ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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ネパール国山岳部住民の健康リスクにおける感染症の重要性について  
課 題 番 号：2019-Ippan-7
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：森 紗耶香（長崎大学病院検査部 主任臨床検査技師）  
中野 政之（長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野 助教）
3. 決 定 額：300 千円
4. 申請時書類より

### ① 研究目的

ネパール国は一部の大都市を除き、多くの地域では医療サービスが圧倒的に不足している。特に、海拔 3,000 m 以上の険しい地形が連なるネパール国北部・ムスタン地方は地理的特性などの理由によりインフラが未整備であり、住民以外は当該地区へ容易にアクセスすることが困難である。加えて、低所得国であるネパールの中でも厳しい経済的事情により当地の医療施設や医療サービスもほとんど整備されておらず、そのため住民の健康状態を把握することも難しいこともあり、当地住民の健康問題や健康調査について政府機関や関連する医療機関からの報告も現状では殆ど見当たらない。近年では、ムスタン地方にも海外からの観光客が徐々にではあるが増加しており、また数多くの住民が現金収入を求めて都市部への出稼ぎ労働を毎年のように行っているなど、他の地区の住民や外国人との交流が行われることでムスタン地方には存在しなかった感染症を含む新たな疾患の流入や拡散の危険性が指摘されている。加えて、近年の急速なグローバル化はムスタン地方のような僻地にも進行しており、それに伴う生活環境の変化が生活習慣病のような慢性疾患の拡大を誘発することが危惧されている。感染症を含めた住民の健康に関する早急な対策を講じるためには現状を正確に把握することが必要であるが、基盤となるデータが欠落しているのが難しい。

そこで本研究では、被験者より提供された血清を詳細に分析することで、被験者となった Tsarang 村住民の健康状態を評価し、衛生環境や保健環境の改善に資する情報提供を目指す。特に、血清中に存在する病原体に対する抗体を検出することで感染症に対する既往歴を検証し、ネパール国・ムスタン地方の住民における感染症の実態を明らかにすることを目的とすることで、健康リスクにつながる要因の探索を行う。

## ② 研究内容

本研究では、はじめにネパール国・ムスタン地方住民より提供された血液サンプルを用いて、血清中に存在する感染性微生物に対する抗体を検出することで感染症に対する既往歴を明らかにすることを目指す。本研究では、以下の解析を予定している。なお、本研究では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 や肝炎ウイルスの 4 種を中心に解析することを予定している。

### 1. 病原微生物に対する抗体の検出

本研究では被験者より提供された血清を用いて、感染症の兆候を示す一つの指標である CRP (C-reactive protein) を測定すること、加えて ELISA 法にて特定の病原微生物に対する抗体の検出を行う。これら进行分析することで被験者の炎症反応や感染症既往歴を明らかにすることができ、被験者となった住民における病原体の拡がりを確認することも可能となる。

### 2. 病原微生物 DNA の検出

血清サンプル、もしくは血球成分由来の DNA を鋳型としたリアルタイム PCR 法を行い、微量の病原微生物(特にウイルス)の DNA を検出することを試みる。DNA はタンパク質である抗体よりも比較的安定に保存することが可能であり、またリアルタイム PCR 法は抗体を標的とした検出法よりも安定的に、且つ感度良く検出することが可能となる。ここでは、特に病原ウイルス (HTLV-1 と肝炎ウイルス) を標的とする。なお、使用するプライマーは既存の文献を参考にする。

### 3. 病原微生物の遺伝的特性の解析

2. のリアルタイム PCR 法の解析にて陽性反応が得られた被験者について、PCR 産物の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。

### ③ 予想される成果

本研究では、Tsarang 村における感染症の実態について明らかにすることができる。先にも述べたように、Tsarang 村が位置するムスタン地方につい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、当地の感染症に関連した基盤となるデータの蓄積に貢献することができる。さらに、本研究では得られた成果を当地の医療従事者や医療機関に還元することができれば、感染症対策の立案に資する情報になる。感染症について対策を講じることで、住民の公衆衛生環境や生活の質の向上に寄与することが期待できる。医療資源が限られている当地の状況を考慮すると、可能な限り事前の疾病に対する予防対策を講じることが住民の健康に対して非常に有用なものになる。特に、不顕性感染をしている病原体では顕著な症状を示さないので、このような検査をすることで初めて感染の有無を判定することが可能となる。

本研究の調査地である Tsarang 村があるムスタン地方は、地理的特性と文化的背景からネパール国内の他の地域との人的交流が乏しい生活環境下にあり、近年まで伝統文化に基づいた生活習慣を長年に渡り維持してきた。当地に存在する病原体は、何世代にも渡り当地住民の中（もしくは家族間）という閉鎖された環境で感染を維持し続けていると想定される。そのため、当地に存在する病原微生物は長年の間、隔離された閉鎖環境にて当地住民に感染し続けることで、特に遺伝子レベルにて独自の進化（あるいは変異の獲得）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し、同時に塩基配列を解析することで、既存のデータベースに登録された病原体と住民から検出された病原体の遺伝子レベルでの違いを明らかにすることができる。感染症の実態について明らかにすることができれば、次年度以降にムスタン地方の他の村にて同様の調査をする契機となり、詳細に当該地区における感染症の実態について包括的に検証するためのモチベーションとであろう。

## 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 2019 年 5 月に現地調査を実施し、18 歳以上の住民 77 名に協力を依頼した。調査を実施するにあたり、住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住民から同意書を取得することで本研究の被験者とした。また本研究については、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。

はじめに被験者の属性や健康状態を確認するために、質問票による調査、そして現地の医師による問診と健康に関する簡単な聞き取り調査、さらには身長や体重、血圧などの測定を実施した。また同時に、現地に医療従事者の協力を得て被験者からの採血を行い、取得した血液は遠心分離機にて血清画分と血球画分に分離した。調整した血清画分を用いて、抗 CCP 抗体価の測定、C-reactive protein (CRP) やヒアルロン酸の濃度測定、リウマトイド因子定量を行う生化学的検査を実施した。加えて、尿検査用試験紙を用いて被験者から採取した尿の特性を調べた。

### ②成果（結果＋考察）

調査地である Tsarang 村には 2017 年 7 月にも現地調査を実施しており、2019 年 5 月は 2 回目の現地調査となった。しかし、住民に本調査に関する情報がうまく伝達されていなかったことが現地に到着後に判明し、被験者として協力を頂いた住民が想定していた人数よりも少ない 77 名（男性：27 名、女性：50 名）であった。研究に参加した被験者の年齢は、平均  $52.00 \pm 11.53$  歳（男性： $53.52 \pm 11.13$  歳、女性： $51.18 \pm 11.66$  歳）であった。被験者の生活習慣や属性に関する質問票を用いた調査や医師による問診を実施した際の印象として、(1)関節部の不調（60%）、(2)消化器系、特に下腹部の違和感（60%）、(3)排尿時の違和感（特に女性；44%）の 3 つの健康上の問題を訴える住民が多かった（Table 1）。これらの違和感を訴えた被験者は、特に女性でその割合が高くなることがわかった。また、関節部の不調を訴えた被験者の中には、手指の関節部の腫脹や明らかな変形を関節リウマチ様と思われる症状が認められた。

尿検査用試験紙にて被験者から採取した尿についての調査を実施した。その結果、数名において糖の排出が認められたが、被験者として参加した住民のほとんどにおいて尿検査では健康上の問題を認めることはなかった。次に、被験者より採取した血液から調整した血清画分を用いた生化学検査を実施し、抗 CCP 抗体量の検出、CRP やヒアルロン酸の濃度測定、リウマトイド因子定量について行った（Table 2）。ヒアルロン酸濃度や CRP 濃度、そしてリウマトイド因子定量についての基準値を超えた被験者は全体の 20～30%程度であり、それに対して抗 CCP 抗体量については基準値を超える被験者はほとんどいなかった。

Table 1 で示したように、関節部の不調や排尿時の違和感を訴えた被験者が多かつ



たので関節リウマチや尿路感染症の広がりを想定した。特に、被験者の多くで指関節のはっきりとわかる腫脹や変形が認められたので関節リウマチに関連した抗 CCP 抗体価やリウマトイド因子については基準値を超える多数の被験者の存在が認められると想定していた。しかし、血清画分を用いた生化学検査の結果では基準値を超える被験者が 20～30%程度であった。このような結果になった要因として、サンプルの保管に問題があった可能性を否定できない。調査を行った Tsarang 村は、生化学検査を実施することが可能な市街地までの移動に数日間が必要である。前回の調査時にもサンプルの保管に問題があったことがわかっていたので、可能な限りの事前の準備をして現地調査を実施した。しかし、想定外の交通事情の悪化や度々の停電など血液サンプルなどを安定的に保管するには難しい状況が次々と発生したことが生化学検査の結果に繋がる一因となったと考えている。現地調査後のサンプルの保管については、さらなる改善が必要であると考えている。

また、当初に想定していた採血量を得ることができず、計画段階で予定していた解析項目から実際に実施できたのは Table 2 で行った 4 種類のみとなった。そのため、当初の計画で予定していた血清サンプルを用いた ELISA 法による特定の病原微生物に対する抗体の検出を行う解析とリアルタイム PCR 法による微量の病原微生物（特にウイルス）の DNA を検出については、サンプル量の不足のために実施することが出来なかった。改めて、外国での調査やサンプル取得の難しさを実感している。

Table 1. 下腹部の違和感（左）と排尿時の違和感（右）を訴えた被験者について

	All	Male	Female	P value		All	Male	Female	P value
Yes	47 (61.04%)	11	36	0.035	Yes	25 (32.47%)	3	22	0.006
No	28 (36.36%)	14	14		No	51 (66.23%)	24	27	
Don't know	2 (2.60%)	2	0		Don't know	1 (1.30%)	0	1	

質問票や医師による問診時の調査で、被験者が以下のように回答したものをまとめた（Yes：自覚症状あり、No：自覚症状なし、Don't Know：わからない）。数値は各カテゴリーの人数を表し、カイ 2 乗検定と fisher の正確検定による性別間における人数分布の検定を行った。

Table 2. 血清画分の生化学検査

	Hyaluronic acid	CRP	Anti-CCP antibody	Rhumatoid factor
Cut-off value	≥50.0 ng/mL	≥0.3 mg/dL	≥4.5 U/mL	≥15 IU/ mL
Postive-all	29.7%	24.6%	3.1%	23.1%
Positicve-mael	22.7%	30.4%	0	21.7%
Positicve-femael	28.6%	21.4%	4.8%	23.8%

各検査項目の基準値として、一般検査で広く活用されている数値を設定した。

### 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は都市部から遠く離れており、そのため交通を含めたインフラの整備が他の地域と比べて著しく遅れていることが多く、またインフラ整備の遅れが医療環境の整備も難しくしている。したがって、ネパール高地住民を含めた世界中の高地に生活する住民の健康状態を正確に把握することが難しい。特に、本研究の調査地であるネパール国・ムスタン地方において生化学的検査を指標とした健康調査の実施に関する報告は認められない。

本研究では、はじめに質問票による調査と医師による問診を実施することで生化学的検査を実施するための検査項目の選定を行った。その結果、上記に示したように3つの症状（関節部の不調、下腹部の違和感、排尿時の違和感）を訴える住民が多いことがわかった。そこで、本研究では4つの検査項目（ヒアルロン酸濃度、CRP濃度、抗CCP抗体価、リウマトイド因子定量）について調査を行った。当初の予定ではより多くの検査項目について検証を行うことを計画していたが、被験者からの採血量が制限されたために4つの検査項目に限定した。このような生化学検査を指標とした調査を継続して行うことで、医療環境が乏しい高地住民の健康状態を正確に把握することができるものと考えている。しかしながら、本研究計画で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り、反省するべき点であると認識している。取得できたサンプル量不足が原因ではあるが、そのような不測の事態に対応する方策を予め想定し、且つ準備することが必要であると考えている。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、特に海外で調査や研究を実施する際の教訓としたい。

上記にも示したように、質問票で得られた結果と生化学検査で得られた結果に一致しない点も認められた。被験者に対して質問票を用いた調査を実施する際により一層の工夫が必要であることを示していると考えており、今後の検討課題であると認識している。質問票を活用した調査や検診、そして血清サンプルの生化学検査を包括的に行うことで、医療環境が未整備な地域に生活するネパール国の高地住民の健康問題を明らかにできると考えている。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ゲノム修飾とヒトの健康との関連性評価  
課 題 番 号：2019-Ippan-8
2. 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）  
共同研究者：中野 政之（長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野 助教）
3. 決 定 額：350 千円
4. 申請時書類より

### ① 研究目的

ヒトの遺伝情報を担うゲノムは、構成する塩基配列が変化することで人体機能に影響し、重篤な疾患を誘発する。他方、塩基配列の変化を伴わないエピジェネティック作用も特定の遺伝子発現を制御し、多様な病気を引き起こすと考えられている。エピジェネティックな効果は生活する社会環境に依存して変化する可能性も報告されており、環境により変化する後天的な遺伝子発現制御機能であることを示唆している。

海拔 3,000 m 以上の高地環境居住者は世界で数百万人程度とされるが、高地環境は低酸素環境や強烈な紫外線など、低地とは明らかに異なる環境が存在する。そのような環境で生活することで低地住民とは異なるエピジェネティックな効果が高地居住者のゲノムに起こっていることが容易に推測できる。しかし、高地住民に果たしてどのようなエピジェネティックな効果が起こっているのか、またそのような効果が住民の健康に対してどのような影響を与えるのか全く検証が行われていない。近年の急速なグローバル化により世界各地の伝統的な生活様式が変化しつつあり、そのような急速な変化が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と推測されている。実際に、海拔 3,000 m 以上の高地に生活基盤を持つ人々の中にも変化が起こりつつあり、グローバル化に伴う肥満や糖尿病などの生活習慣病に対するリスクが注意喚起されている。生活様式や生活する環境に起因する生活習慣病のリスク要因に加えて、エピジェネティック作用を含めた遺伝的因子を含めた多角的で複合的な視点でヒトの健康を検証することが重要であり、特に高地住民は低地住民とは異なる遺伝的変異を獲得することで厳しい高地環境に適応化することが知られていることから、高地住民の健康における遺伝的要因の重要性を詳細に検証する必要がある。

そこで、本研究ではネパール国 Mustang 地方在住の高地住民におけるエピジェネティック効果を解析し、明らかとなったエピジェネティック効果と高地住民の健康との関連性を検証する。

## ② 研究内容

本研究では、調査対象者としてネパール国北部・Mustang 地方にある Tsarang 村の 18 歳以上の住民とする。被験者となった対象者からは同意書を取得し、そのうえでゲノム DNA を入手した。また、本研究では以下に示す内容について検証することを予定している。

### 1. 被験者のゲノム全体のメチル化の定量

エピジェネティックな作用としては、ゲノム DNA に対するメチル化やヒストンに対するアセチル化、さらには non-coding RNA などによる効果が知られている。これらすべてを本研究に対する助成期間で解析することは難しいので、本研究では特にゲノム DNA に対するメチル化に着目して解析を行う。

ゲノム全体のメチル化を網羅的に定量するために、被験者より提供されたゲノム DNA を鋳型として ELISA 法にて測定し、被験者個人におけるメチル化された DNA 量の違いを明らかにする。なお、本研究では被験者 150 名程度を解析する予定である。

### 2. 高地適応遺伝子における DNA メチル化の定量

1.の解析でゲノム全体におけるメチル化された DNA 量が明らかとなるが、他方で被験者集団におけるメチル化が特異的に蓄積されたゲノム領域を特定することができない。そこで、リアルタイム PCR 法を用いた検証を行うことで特定遺伝子内のメチル化を定量することを目指す。標的とする遺伝子は、高地適応に関与する遺伝子群 (EPAS1 と EGLN1) について解析を行い、エピジェネティック作用が高地住民の環境適応化にどのような影響をもたらすのかを検証する。

### 3. 被験者の健診情報とメチル化の関連性を検証する

先の調査にて、本研究の被験者となった住民について身長や体重、血圧などの健診情報を取得しており、これらを活用することでゲノムのメチル化と住民の健康との関連性を多変量解析などの統計学手法により検証する。

## ③ 予想される成果

遺伝子多型と様々な疾患との関連性に関する研究は盛んに行われており、疫学的な検証や分子生物学的な解析により疾患における遺伝子多型の重要性が明らかとなっている。他方で、近年の次世代シーケンサーによる解析により、徐々にではあるがエピジェネティック作用による疾患との関連性が明らかにされつつある。本研究の調査対象とする高地のような特殊環境に生活する住民のゲノムには、生活環境からもたらされる多様な外部刺激に由来する都市部の住民とは異なるエピジェネティックな作用による影響が蓄積していることが容易に推測できるが、それらに関する情報は認められない。そこで、本研究では被験者集団におけるエピジェネティックな変異、特に DNA

のメチル化に着目し、ゲノム全体におけるメチル化の総量を定量することで、DNAのメチル化、もしくはエピジェネティック変異と被験者集団における健康面での影響について明らかにすることを目指す。生活習慣や生活する住環境、さらには遺伝的背景などが複合的に相互作用することでヒトの健康に影響すると考えられているが、エピジェネティック変異を含めて多様な要因を検証することで詳細な健康リスク因子を特定することが可能となる。このようなゲノムに対するエピジェネティックな効果と高地住民の健康における関連性を検証した研究報告はこれまでには認められない。そのため、得られる成果は非常に独自性が高いものとなることが予想される。

本研究を推進することで、次年度以降には生活する高度が異なる被験者集団と同じ民族集団を調査することで、生活環境にゲノムにおける特異的なエピジェネティック変異を検出し、且つそのような変異が特徴的に蓄積する遺伝子領域を特定するなど、さらなる本研究の発展へとつながる動機付けとなる。

## 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 2017 年 7 月に実施し、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、本研究について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）に対して申請を行い、承認済みである。

本年度の研究では、はじめに昨年度の調査に引き続き、Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) による標的遺伝子の多型解析と BMI や血圧など被験者の検診情報との相関性について検証した。本研究で行う RFLP 法は、標的とする 1 塩基多型 (SNP) が存在する DNA 断片を PCR 法にて増幅し、得られた PCR 産物を制限酵素 (*Hph* I と *Aci* I) にて切断する。遺伝子型の決定は、制限酵素切断後の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて得られた切断パターンの違いにて評価する。ここでは低酸素誘導遺伝子 HIF1 $\alpha$  の遺伝子内に存在する 2 つの SNP (rs11549465 と rs11549467) を標的とした RFLP 法にて多型解析を行い、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を行った。なお、本研究で用いた実験材料は、被験者より提供された血液から調整したゲノム DNA を用いた。

さらに同じ被験者に対して、エピジェネティクスに関する解析を行うためにネパール国・ヒト研究倫理審査委員会に対して追加の倫理申請を行い、2019 年 11 月に承認 (128/2019) を得ることが出来た。

## ②成果（結果＋考察）

我々は昨年度の調査において、低酸素誘導遺伝子である *EPAS1* と *EGLN1* の SNP と本研究の被験者集団の検診情報、特に HbA1c との相関性が認められることを報告した。そこで、他の低酸素誘導遺伝子である *HIF1 $\alpha$*  の SNP に着目し、その中でも特に多様な疾患との関連性が指摘されている 2 つの SNP (rs11549465 と rs11549467) について多型解析を行い、被験者の検診情報との相関性を検証した (Gladek I et al., *Genes Chromosomes Cancer*. 2017; 56(6): 439–452)。

はじめに、2 つの SNP (rs11549465 と rs11549467) の遺伝子型を RFLP 法にて決定した。その結果、rs11549465 では多型 (CC : 93%、CT : 6%、TT : 1%) が認められたが、rs11549467 では 1 つの遺伝子型 (GG) だけが検出された。そこで rs11549465 について、BMI、血圧、血中酸素飽和度 (SpO<sub>2</sub>)、ヘモグロビン濃度、HbA1c との相関性を Dominant モデル (CC vs CT+TT) にて検証した。線形回帰分析を用いて解析を行ったところ、rs11549465 は単変量解析にてヘモグロビン濃度と SpO<sub>2</sub> との相関性が認められ、性別と年齢で調整した多変量解析でも同様に相関性が認められた (Table 1)。この結果は、rs11549465 の遺伝子型が CC である被験者よりも遺伝子型 CT、もしくは TT である被験者においてヘモグロビン濃度が高いこと、そして SpO<sub>2</sub> が上昇するということを意味している (Fig. 1)。したがって、*HIF1 $\alpha$*  遺伝子内に存在する rs11549465 の遺伝子型の違いが被験者の血中酸素濃度に影響する可能性を示唆している。これまでの研究により、rs11549465 の遺伝子型の違いにより *HIF1 $\alpha$*  遺伝子の発現量に違いがあることが報告されており、そのため本研究にて認められた現象にこの遺伝子発現量の違いが何らかの関与をすることが推測される。同時に *HIF1 $\alpha$*  は 100 遺伝子以上を制御することが報告されており、その中には造血作用に関係するエリスロポエチン産生に関与する遺伝子も含まれる。つまり、*HIF1 $\alpha$*  遺伝子の発現量が高まることで造血作用が促進し、その結果としてヘモグロビン濃度が上昇したものと推測している。しかしながら、rs11549465 が *HIF1 $\alpha$*  の機能にどのような影響があるのかは全く不明であり、今後の検討課題である。

次に、被験者集団あるネパール高地住民のゲノムにおけるエピジェネティック効果と健康との関連性を検証することを目的として、ネパール国・研究倫理委員会に追加の承認申請を 2018 年 11 月より行った。しかし、申請後の半年以上の期間で先方からの連絡がなかった。そして、2019 年 11 月によりやく承認を得ることが出来た。そこで、メチル化を中心としたエピジェネティック解析についての同意を得るために、調査地であるネパール国・ムスタン地方の Tsarang 村を再訪する準備を進めていた。しかしながら、突如として発生した新型コロナウイルス問題の影響のためにネパール国を再訪することが困難となり、またネパール国内の研究協力者も医療事情が著しく悪いムスタン地方への移動が制限されたために被験者からの同意書の取得が現状では困難となり、残念ながらエピジェネティック解析については実施することが出来なかった。

Table 1. rs11549465 の遺伝子型と各因子との相関性の検証

Gene	SNP	Parameter	Crude					Adjusted					
			B	SE	P	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	B	SE	P	beta	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>
HIF1α	rs11549465	BMI	-1.617	1.119	0.151	0.015	0.008	-1.576	1.136	-0.119	0.167	0.021	-0.001
		SBP	3.692	6.574	0.575	0.002	-0.005	1.534	6.331	0.809	0.020	0.108	0.088
		DBP	4.530	4.131	0.275	0.009	0.001	4.328	4.111	0.294	0.020	0.054	0.033
		SpO <sub>2</sub>	-2.535	0.927	0.007	0.051	0.044	-1.670	0.793	0.037	-0.149	0.332	0.317
		Hb	1.462	0.614	0.019	0.039	0.032	1.193	0.573	0.039	0.162	0.192	0.174
		HbA1c	-0.046	0.292	0.874	0.000	-0.007	-0.240	0.270	0.376	-0.070	0.172	0.154

HIF1α の SNP である rs11549465 の遺伝子型を 2 群 (CC vs CT+TT) に分け、線形回帰分析にて各変数との相関性を検証した。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。B, 偏回帰係数; SE, 標準誤差; R<sup>2</sup>, 決定係数を表している。

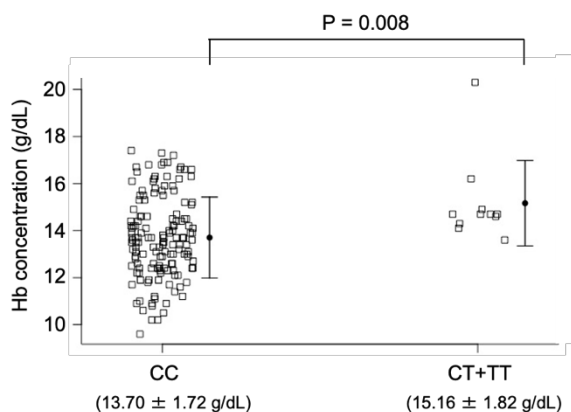


Fig. 1. 遺伝子型の違いにおけるヘモグロビン濃度の比較

③成果の公表  
該当なし

## 6. 自己評価

昨年度に引き続き、高地住民の SNP と被験者の健康の指標となる検診情報との相関性についての検証を行った。昨年度の結果では、糖尿病の指標である HbA1c などと低酸素誘導遺伝子である EPAS1 や EGLN1 の SNP との相関性を認めた。しかしながら、低酸素誘導遺伝子には複数遺伝子が該当するために広範の遺伝子で解析することが必要である。そこで、低酸素誘導遺伝子である HIF1α についても同様に検証を行ったところ、先に解析を行った EPAS1 や EGLN1 とは異なり、解析を行った SNP (rs11549465) と血液中の酸素濃度に関連した指標であるヘモグロビン濃度と SpO<sub>2</sub> との相関性が認められた。この結果は、遺伝子型の違いが血液中の酸素濃度の違いを反映する可能性を示唆するものであり、被験者集団における高地適応を考える上では

興味深い発見であると考えている。これまでに、SpO<sub>2</sub>値の上昇や高いヘモグロビン濃度による高地適応モデルはアンデス高地住民やエチオピア高地住民の違う民族集団において認められる現象であり、ネパール高地住民の高地適応とは異なることが報告されている。しかし今回の研究より、ネパール高地住民の中にもある一定の割合で他の民族集団で認められる高地適応モデルを採用している可能性が示された。SNP (rs11549465) について、ネパール高地住民の環境適応に対する影響を今後も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と考えている。他方で、昨年度も同様のことを述べたが、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。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。

また、当初の予定であったエピジェネティクスに関する解析については全く実施することが出来ず、この点については真摯に反省したいと思う。エピジェネティクスに関する研究を実施するための追加の倫理申請について、半年以上もの期間で全く返信などの応答が無いという予期しない状態になってしまったが、同時に我々の見通しの甘さを指摘されても仕方がない状況である。海外での研究を行うことの難しさを改めて実感しており、この経験は今後の研究活動にも生かしていきたいと思っている。しかし、遅ればせながらではあるが 2019 年 11 月末に承認を得ることが出来たので、新型コロナウイルス問題が落ち着いた段階で、ネパール国内の研究協力者に依頼して被験者からの同意書の取得を行い、エピジェネティクス解析を含めた網羅的なゲノムワイドの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



## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：オンラインビッグデータを用いたインフルエンザパンデミック予測  
課 題 番 号：2019-Ippan-9

2. 代 表 者：一ノ瀬 元喜（静岡大学大学院総合科学技術研究科 准教授）  
共同研究者：鈴木 純大（ノーステキサス大学健康科学センター 准教授）  
福田 枝里子（山口東京理科大学 研究補助員）  
勝又 雄基（東京工業大学 学振特別研究員）  
宮川 大樹（静岡大学 学部生）  
小柳 稜太（静岡大学 学部生）  
伊東 啓（長崎大学熱帯医学研究所 助教）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

季節性インフルエンザは、世界全体で毎年数十万人の死者を出す人類にとって脅威の感染症であり、その流行を食い止めることは公衆衛生上の重要な課題である。特に流行の初期段階（初動）を検出し、迅速な対応を取ることができれば、感染の拡大阻止に大きく貢献できる。流行の初動を検出するために、近年可能となった極めて有効な方法の一つは、人々がインターネット上に投稿・検索したインフルエンザに関連する Web 上のビッグデータを取得して分析することである。最近の研究で、Google の検索クエリーや Twitter 上のつぶやきデータを分析することで、現実の流行よりも少し早い段階で流行の初動をとらえることに成功している。しかし、熱帯地域ではインフルエンザは年間を通じて発生する可能性があり、結果としてより不規則に流行を起しやすいため未だに予測が難しい。また、流行するかどうかの閾値を決定する効果的なアルゴリズムはまだ存在しないため、予測の精度には課題が残る。本研究ではエージェントベースシミュレーションを用いて、熱帯地方や途上国におけるインフルエンザの流行予測に加えて、インフルエンザ流行の閾値を判定するアルゴリズムを設計することを目的とする。

## ②研究内容

Twitter の Web ページを巡回して、つぶやきデータを取得するプログラムを作成する。データを整形した後、自然言語処理のソフトウェアを用いて、インフルエンザに関係すると判定されるデータだけに絞る。さらにつぶやきの内容からインフルエンザの陽性度合いを点数化する（罹患した場合に最も点数が高くなる）。点数を合計することで、日ごとのインフルエンザに対する陽性強度を算出する。国立感染症情報センターが発表している実際のインフルエンザの報告数と陽性強度を比べることで、陽性強度を何日ずらすと最も報告数と一致するかを判定する。そのデータに基づき、エージェントベースモデルの各パラメータを決定する。モデルパラメータの設定では、実際に熱帯地方や途上国の医療現場を熟知した国際保健学分野と連携して現実的なパラメータセッティングを探る。また国際保健学分野は近年になって Web 調査によるアンケート調査の経験を持つため、インターネット上のデータ収集の方法や効果的利用方法についても議論する。その上で計算機シミュレーションを行い、インフルエンザの流行が起こる場合と起こらない場合の閾値を数値的に決定し、閾値判定アルゴリズムを構築する。

## ③予想される成果

本研究ではエージェントベースモデルを用いることにより、様々な国・地域におけるインフルエンザの蔓延予測判定を正確に行うアルゴリズムを開発する。我々の目指すアルゴリズムは人口密度の変化や年齢構成・性別構成の変化といったヒトに関係する要因、また気温・湿度・天候といった環境の要因をパラメータとして柔軟に設定できるため、複雑な条件を踏まえたインフルエンザの蔓延予測を可能にする。これにより、これまで予測が難しいとされてきた熱帯地方におけるインフルエンザの流行予測をも可能にする。本研究が成功した暁には、Google や Twitter のデータをリアルタイムで用いることで、ある地域に特化したインフルエンザ注意報などを発令することができる。これは大きな蔓延が予想されたときに、自治体が蔓延を最小限に食い止めるための施設を検討する上で重要な判断材料となる。特に、例え病院の電子カルテなどの情報インフラが整っていない途上国でもスマートフォンや SNS の普及は急速に進んでいるため、先進国のみならず途上国におけるリアルタイム情報が収集できれば一気に公衆衛生上の問題点を洗い出すことができるだろう。本研究で開発を目指すアルゴリズムの適用可能性はインフルエンザに限定されないため、将来的には他の多くの感染症の蔓延予測にも応用できる。例えば性感染症は症状が陰部に現れることから、感染が疑われた場合は気軽に病院で受診せず、症状からインターネット上で独自に情報を得る傾向があると予想される。このようなデータを処理することで社会の背景に隠れた性感染症の蔓延と流行を把握することが可能になる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

本研究では、世界保健機関（WHO）が公開しているインフルエンザの情報をまとめた FluNet から Web 上のデータを取得し、研究に用いた。FluNet では WHO が定義した分類地域別や国別、大陸別のインフルエンザの報告数についてのデータベースが公開されている。FluNet 中の日本における報告数を分析対象とした。ウイルスの型を考慮せず、その週に報告されたインフルエンザの合計報告数を分析対象とした。期間は 2009 年 1 月から 2019 年 9 月までの約 10 年分である（図 1）。

インフルエンザなどの感染症は、一人が発症すると周囲の人々に感染が伝播するという特徴がある。本研究ではこの特徴を表現するため、確率過程の中の点過程のモデルの 1 つである Hawkes 過程を分析に用いた。つまり、インフルエンザの流行が Hawkes 過程に基づくと仮定し、流行を最もよく再現する Hawkes 過程のパラメータを求めることが本研究の目的である。

Hawkes 過程は、イベントが起きた時のジャンプ幅 ( $\alpha$ )、イベントの減少のしやすさ ( $\beta$ )、基本のイベントの起こりやすさ ( $\mu$ ) の 3 つのパラメータを持つ（図 2）。シーズンごとの報告されたインフルエンザ報告数のデータを最もよく再現する Hawkes 過程のパラメータを推定する。Hawkes 過程の強度関数を基に尤度関数を構成し、尤度が最大となるパラメータ 3 つの値を推定する。このパラメータ推定方法は最尤法と呼ばれる。最尤法の数値解法はいくつか知られているが、本研究では計算のコストが低く抑えられつつ、精度も高い準ニュートン法を用いて最尤法によるパラメータ推定を行った。

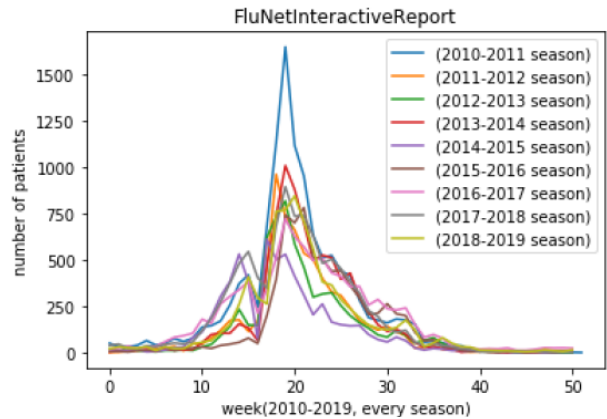


図 1：インフルエンザ報告数

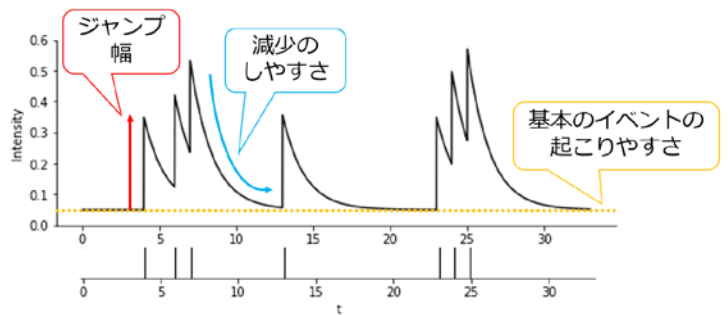


図 2：Hawkes 過程の概念図

②成果（結果+考察）

パラメータ推定結果を示したものが図 3 である。報告数の分布におけるシーズンごとの分散と  $\mu$  の値の関係より、分散の大きいシーズンは  $\mu$  の値が高い傾向があることが分かった。分散が大

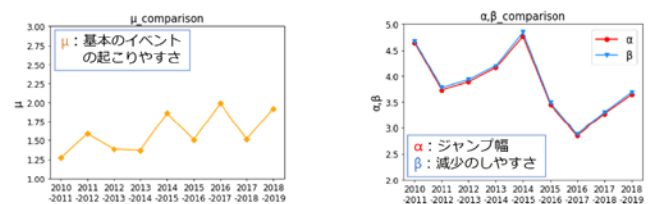


図 3：シーズンごとのパラメータ推定の結果。  
（左） $\mu$ 、（右） $\alpha$  と  $\beta$

きいシーズンとは山の裾が広いシーズンということである。よって冬季に集中しているシーズンより秋や春にも流行が見られるシーズンは  $\mu$  の値が高いことが分かった。また山のピークが比較的鋭く大きい、または1年の中で複数のピークがあるシーズンは  $\alpha$ 、 $\beta$  の値が高いという結果が得られた。よって、インフルエンザの流行の特徴を Hawkes 過程によるモデル化はよく捉えることに成功していると結論付けられる。

次に我々は、インフルエンザの流行を表現するモデルとして点過程の Hawkes 過程と Poisson 過程を比較した。2つの点過程のインフルエンザの流行に対する当てはまりの良さを比較した。当てはまりの良さは、赤池情報量基準 (Akaike Information Criterion : AIC) で数値化した。図4が2つのモデルのAICの比較であり、AICが小さいほど当てはまりはよいので、すべてのシーズンを通してAICが小さい Hawkes 過程の方が

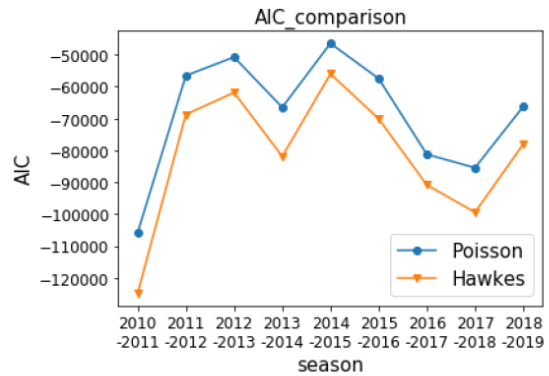


図4 : AIC の比較

Poisson 過程より、インフルエンザの流行のモデリングとして適切なモデルであることが分かる。Poisson 過程は、基本イベントの起こりやすさ ( $\mu$ ) のパラメータ1つしか持たず、感染症の特徴である「一人が発症すると周囲の人々に感染が伝播する」という特徴が再現できないためであると考えられる。

最後に、我々はインフルエンザの流行を Hawkes 過程を用いて説明するとどのような点が優れているのか可視化したいと考えた。そのためパラメータ推定して得られたシーズンごとのパラメータの値 ( $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) を用いて確率的なシミュレーションを行った。図5は実際のインフルエンザの流行のピークが大きかった2010~2011を再現したものであり、実際の特徴をよく捉えていることが分かる。ただし、シミュレーションでは「シーズン中で流行はいつ流行が起こるか」というのは再現できないので、その点は改良の余地がある。

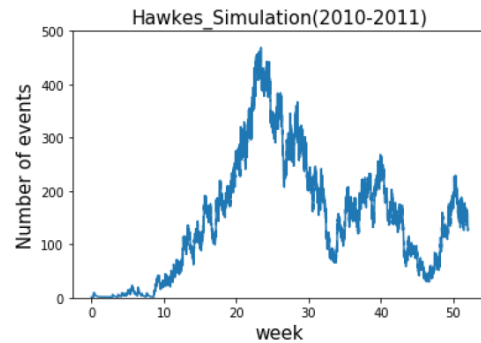


図5 : 2010~11 シーズンのシミュレーション

### ③成果の公表

本研究ではインフルエンザの流行を Hawkes 過程によって適切にモデリングできた。また推定して得られたパラメータ ( $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) で行ったシミュレーションは実際のインフルエンザの流行の特徴をよく再現した。

本研究の成果は、2019 年 11 月 28 日に長崎大学熱帯医学研究所国際保健学分野で開催された第 5 回共同研究会「生命システムと社会システム：生物系／数理系アプローチ」で発表した。また 2019 年 12 月 24 日に静岡大学で開催された情報学シンポジウム 2019 でもポスター発表を行った。

## 6. 自己評価

本研究では、実際のインフルエンザの報告数を Web から取得した上で、そのデータを適切な形に加工し、Hawkes 過程のモデルに当てはめて、現実を最もよく再現するモデル上のパラメータの推定を行った。さらにはシミュレーションも行うことで、インフルエンザのピークを可視化させることにも成功した。過去の流行状況と Hawkes 過程のパラメータを蓄積していくことで、今後、天気予報のように流行の規模を予測することが可能になるのではないかと期待される。研究期間は 1 年であったが、2 件の対外発表も行うことができ、成果を公にすることができた。今後はこの成果をまとめて国際ジャーナルに投稿することを予定している。

インフルエンザの流行は、その年のワクチン接種量や流行したインフルエンザのウイルス型、そのウイルスの感染力や発症リスクなどの複合的な情報がパラメータの値に反映されると考えられるが、現在のモデルでは、将来のパラメータの値を推定することは困難である。本モデルをさらに改良し、将来起きるであろうインフルエンザの流行規模の予測を行うことが今後の課題である。

## 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)
- 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナム南部島嶼地域における人獣共通感染性マラリアの分子疫学的研究

課 題 番 号：2019-Ippan-10

2. 代 表 者：前野 芳正（藤田医科大学 客員准教授）

共同研究者：川合 覚（獨協医科大学 教授）

高木 秀和（愛知医科大学 講師）

案浦 健（国立感染症研究所 主任研究官）

Vu Duc Chinh（ベトナム NIMPE 准教授）

Vu Viet Hung（ベトナム NIMPE 主任）

益田 岳（京都大学 連携助教）

Richard Culleton（長崎大学熱帯医学研究所病理学分野 准教授）

3. 決 定 額：450 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

ベトナム南部の島嶼地域における「島嶼マラリア」について「ベトナム南部島嶼地域において人獣共通感染性マラリア感染が起きている」という仮説を立て、ヒト、媒介蚊そして野生サルからマラリア原虫を検出し、遺伝子の多型やガメトサイトの検出、解析などの原虫側の解析並びヒトの行動などの環境要因を重ね合わせ、ヒトマラリアと人獣共通感染性マラリアを統合した調査研究により検証を行い、「島嶼マラリア」のダイナミズムを解明し、ベトナム南部におけるマラリアの特徴の一つである「島嶼マラリア」対策の基盤資料を作成することを目的とする。

東南アジアにおけるマラリアを表す用語として「森林マラリア」があるが、近年、人獣共通感染性サルマラリア原虫の *Plasmodium knowlesi* 及び *Plasmodium cynomolgi* のヒト自然感染例の拡大が報告されているため、マラリア根絶への障害となっている。また、*P. knowlesi* や *P. cynomolgi* 以外のサルマラリア原虫の数種もヒトへの自然感染の可能性が示唆されている。

かかる状況において、ベトナムにおいても人獣共通感染性マラリアの解析を統合した「森林マラリア」の解析が進められ、媒介蚊から人獣共通感染性（あるいは可能性）サルマラリア原虫とヒトマラリア原虫との混合感染が検出され、人獣共通感染性マラリアの存在が示唆されているが、ベトナムにおいてもマラリア患者の大多数が無症候者であることがマラリア感染の実態把握を遅らせ、その後のマラリア対策を遅らせている。

他方、ベトナムにも島嶼地域があり、殊に南部地域の一部の島嶼ではマラリア感染

が報告され「島嶼マラリア」が示唆されている。ベトナムにおける島嶼とこれまで島嶼マラリアとして報告されているケニアやバヌアツなどの地域とは大きく異なる点がある。それはその地域に野生サルが生息しているかいないかである。申請者らは、ヒトと媒介蚊（主としてベトナムでは *Anopheles dirus*）の他、ヒトの居住地近くに野生サルの生息が認められている本研究課題の調査研究対象地としてベトナム南部にある Con Dao 島とカンザー国立公園の島嶼地域 2 か所を設定した。

島嶼という限定された地域で人獣共通感染性マラリアの調査研究を実施することは意義深い。本申請で実施予定の調査研究では、「ベトナム南部島嶼地域で人獣共通感染性マラリア感染が起きている」という仮説を立て、その検証のため、ヒトとさるといふ宿主および媒介蚊の原虫学的解析にヒトの行動や環境因子を加え、総合的にマラリア感染、伝播の解析を行い、ベトナム南部における「島嶼マラリア」対策の基盤資料の作成をめざす。

## ②研究内容

### 調査研究実施地域：

本申請課題は宿主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。

サンプル採取を次の地域で行う。

- ・ベトナム東南部地域にあるバリアブントウ省コンダオ県のコンダオ島。
- ・ベトナム島南部地域にあるカンザー国立公園（ホーチミン市から約 50km 南部に位置し、マングローブ林で囲まれた地域）。

両地域ともに野生のサルとヒトの生活圏が近接している地域。また、マラリア原虫媒介蚊が存在している。

- ・それ以外の地域で採取されたサンプル。

### 検討材料：

#### 検討材料としてヒト血液サンプル、媒介蚊サンプル及びサル糞便を用いる。

##### ヒト血液サンプル

1. 調査対象地域では、可能な限り、調査対象者を日常生活の行動パターンにより分類し、血液サンプル採取する。
2. 血液サンプルの採取は、指頭穿刺後、ろ紙採血行い、地域のヘルスセンター等で保存。同時に RDT によるマラリア感染の有無等を判定する。一定期間ごと、ベトナム国立マラリア寄生虫学昆虫学研究所にサンプルを集積し、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。
3. 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

- ・ 媒介蚊は調査対象地区において採集された蚊を調査対象とする。採集方法はヒト匣法及びライトトラップ法で行う。
- ・ 感染蚊の検出は、採集した蚊を胸部と腹部に分割し、それぞれの部分を分子生物学的手法により検出する。

#### 野生サルサンプル

1. 野生サルの検討は、サルの新鮮糞便を検討材料とする。
2. 新鮮糞便は、核酸保護剤含有保存液に保存をし、日本に持ち帰り分子生物学的手法によりマラリア原虫の検出をする。

#### 方法：

#### ヒト血液、野生サル新鮮糞便および媒介蚊からのマラリア原虫の検出と鑑別診断、多型の検討

1. 熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、サルマラリア原虫 *P. knowlesi*、*P. inui*、*P. cynomolgi* および *P. coatneyi* などについて *SSU-rRNA* や *cytb*、*msp-1*などを標的遺伝子とし、スクリーニングを行う。
2. PCR 反応陽性検体の PCR 産物の塩基配列解析を行い、感染種の確定、多型解析を行う。

(*SSU-rRNA* を標的遺伝子とした場合、交叉反応が散見されるため種の確定には必須となる)

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. 蚊のサンプル数が多くなるため、ヒトマラリア原虫とサルマラリア原虫の感染に関するデータが積み上げられ、調査地域におけるマラリア感染に関する基盤資料が作成される。
2. 野生サルのサンプル解析を行う事により調査地域における感染、伝播が起きている人獣共通感染性マラリアの基盤資料の作成ができる。
3. ヒトにサルマラリア原虫が感染した場合、サルマラリア原虫の PCR による検出系を加えることにより、新たなサルマラリア原虫の自然感染の検出に繋がり、人獣共通感染性マラリアとして種々の新知見が期待される。
4. ヒトの行動調査とヒトの血液の解析結果、媒介蚊及びサルにおけるマラリア感染の解析結果を総合することにより、調査地区における感染、伝播の場所の特定が可能となりベトナム南部地域における島嶼マラリアの実態が推定できる。

分子生物学的手法がマラリア感染に関する疫学調査にも導入され、マラリア原虫感染種などを詳細に解析し、マラリア原虫の進化や宿主への適応が考察可能となった。さらに、東南アジアではマラリア原虫の伝播サイクルに野生サルが加わったため、マラリアに関する調査研究が野生サルの調査や蚊の調査にとどまらず、野生サルや媒介蚊が棲息する環境の調査にも展開する必要が生じている。これらの調査で得られたデ



ータと研究室からの分子生物学的なデータを統合すれば東南アジアにおけるマラリアのダイナミズムの一端がより一層明確となる。さらに、島嶼に居住する住民や利用者が“マラリア原虫を島嶼に持ち込みそして持ち帰る”証拠や、野生サルが感染しているマラリア原虫がサル-ヒト間に加え、“ヒト-ヒト間においても伝播している”証拠を蓄積することは一歩進んだ「島嶼マラリア」の実態解明と対策に大いに貢献する。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

#### ● 調査対象地

- ・ ベトナム東南部地域にあるバリアブントウ省コンダオ県のコンダオ島。
- ・ 対照地としてベトナム・カンボジア国境に位置する Binh Phuoc 省 Bu Gia Map 地域。
- ・ 調査時期は雨季から乾季への移行期に 4 日間連続で実施した。  
調査地はいずれも野生サルと住民の生活地域が密接している地域である。

#### ● 検討材料

##### 媒介蚊サンプル

- ・ 媒介蚊は調査対象地区において採集された蚊を調査対象とする。採集方法はヒト囀法及びライトトラップ法で行った。
- ・ 感染蚊の検出は、採集した蚊を胸部と腹部に分割し、それぞれの部分を分子生物学的手法により検出した。

##### 野生サルサンプル

- ・ 野生サルの検討は、サルの新鮮糞便を検討材料とした。
- ・ 新鮮糞便は、核酸保護剤含有保存液に保存をし、日本に持ち帰り分子生物学的手法によりマラリア原虫の検出をした。

#### ● 方法：

##### 野生サル新鮮糞便および媒介蚊からのマラリア原虫の検出と鑑別診断、多型の検討

- ・ 熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、サルマラリア原虫 *P. knowlesi*、*P. inui*、*P. cynomolgi* および *P. coatneyi* などについて *SSU-rRNA* や *cytb*、*mSP-1* などを標的遺伝子とし、スクリーニングを行った。
- ・ PCR 反応陽性検体の PCR 産物の塩基配列解析を行い、感染種の確定、多型解析を行った。

(*SSU-rRNA* を標的遺伝子とした場合、交叉反応が散見されるため種の確定には必須となる)

#### ● 手続き

今回の調査検討は、ベトナム国立マラリア学、寄生虫学、昆虫学研究所 (NIMPE) 及び藤田医科大学で夫々倫理許可を得ている。また調査地においては、地方自治体関係機関の許可を得ている。

②成果（結果＋考察）

● **結果**

● 媒介蚊サンプルについて

・ 採集数と採集種

調査当初媒介蚊採集対象地を Con Dao 島とカンザー国立公園を設定していたが、カンザー国立公園での媒介蚊の採集許可や交通アクセスの問題があったため中止をし、Con Dao 島だけで行った。

表1 Con Dao及びBu Gia Mapにおけるマラリア媒介蚊の種と感染数

Species	Con Dao		Bu Gia Map	
	No. of collected	No. of infected	No. of collected	No. of infected
<i>An. dirus</i>	36	2	33	6
<i>An. sinensis</i>	1	0	0	0
<i>An. barbirostris</i>	1	1	11	1
<i>An. maculatus</i>	0	0	10	1
<i>An. philippinensis</i>	0	0	6	0
<i>An. minimus</i>	0	0	2	0
Total	38	3	62	8

調査対象地の Con Dao 島では 2 か所で採集を行い、合計 38 匹の *Anopheles* spp. を採集した。採集した種は 3 種であり、*An. dirus* (36 匹) が優占種であり、その他 *An. sinensis* と *An. barbirostris* が各 1 匹ずつであった（表 1）。

一方対照地である Bu Gia Map では 6 か所で採集を行い、合計 62 匹を採集した。採集した種は 5 種であり、優占種は *An. dirus* (33 匹) であり、続いて *An. barbirostris* (11 匹)、*An. maculatus* (10 匹)、*An. philippinensis* (6 匹)、*An. minimus* (2 匹) であった（表 1）。

・マラリア原虫感染個体数

Con Dao 島におけるマラリア原虫感染数は、38 検体中 3 検体 (7.9%) であった。感染陽性 3 検体のうち 2 検体が *An. dirus* であり、残る 1 検体は *An. barbirostris* であった（表 1）。マラリア原虫の検出部位は、胸部と腹部の両部位から検出したのは 1 検体であり、他は胸部と腹部から各 1 検体ずつ検出した（表 2）。

対照地である Bu Gia Map では 62 検体中 8 検体 (12.9%) であった。感染陽性 8 検体のうち 6 検体が *An. dirus* であり、*An. barbirostris* と *An. maculatus* から各 1 匹ずつ検出した（表 1）。マラリア原虫の検出部位は、胸部から検出したのは 6 検体であり、腹部からは 2 検体であった（表 2）。

・感染マラリア原虫種

Con Dao 島におけるマラリア原虫感染種は、*Plasmodium vivax* (検出数: 2 検体) 及び *Plasmodium inui* (4 検体)、*Plasmodium coatneyi* (2 検体) の 3 種類の感染が認められ、*P. inui* が優占種であった。これらのうち、単種感染は 1 種 *P. inui* 1 検体であった (表 2)。他は混合感染であり、*P. vivax* + *P. inui* および *P. inui* + *P. coatneyi* の 2 種混合感染が各 1 検体ずつ、*P. vivax* + *P. inui* + *P. coatneyi* の 3 種感染が 1 検体認められた (表 2)。

対照地である Bu Gia Map における感染種は、*Plasmodium falciparum* (1 検体) 及び *P. vivax* (2 検体)、*P. inui* (2 検体)、*Plasmodium coatneyi* (1 検体) と今回の解析では同定できなかった *Plasmodium* spp. (2 検体) の 4 種類 (同定可能であったもの) で、*P. vivax* と *P. inui* が今回の調査では優占種であった。今回の Bu Gia Map 調査では混合感染例が認められず、検出できた全てが単種感染であった (表 2)。

・ マラリア原虫感染蚊の採集場所

今回の調査において感染蚊を採集した場所は、Con Dao 島及び Bu Gia Map の両地区共に森林周辺であった。殊に Con Dao では感染蚊を採集した場所は近くに畜舎がある環境であった。

● 野生サルについて

サルの新鮮糞便を採取し、糞便中に含有されているマラリア原虫の DNA の検出の有無により感染の有無及び感染種の同定を行った。その結果、Con Dao 島及び Bu Gia Map において採取した糞便から、マラリア原虫の DNA はいずれの検体からも検出されなかった。

● 考察

ベトナム南部の島嶼地域における「島嶼マラリア」について「ベトナム南部島嶼地域において人獣共通感染性マラリア感染が起きている」という仮説を立て、ヒトマラリアと人獣共通感染性マラリアを抱合した調査研究により仮説の検証を行い、「島嶼マラリア」のダイナミズムを解明を目的として疫学調査を実施した。今回は現地自治体関係機関より人に関する調査が許可されなかったため、媒介蚊とサルの調査を実施した。

本調査地 Con Dao 島におけるマラリア原虫主媒介蚊は *An. dirus* であった。これは本調査における調査対照地である Bu Gia Map における今回および過去の調査における成績、その他ベトナム南部地域における他の調査地での調査結果と同様な結果であった。ただ本年度の調査では *An. dirus* 以外の媒介蚊が多く採取された。この要因として気温の低下が考えられた。今回の調査は雨季から乾季への移行期であった。平年であれば媒介蚊の採集を行う夜間の気温は最低 23℃ほどであるが、今回は 19℃から 20℃と低く、かつ風が強い傾向であった。そのため採集された種の構成が若干異なると推測された。また、本調査における対照地である Bu Gia Map における媒介蚊の構成も従来との報告とは異なり、主媒介蚊は *An. dirus* と従来と同じであったが、2 次的媒介蚊とされている

*An. barbirostris* 及び *An. maculatus*、*An. philippinensis* が数多く採取された。この要因は気温と風という環境変化に起因するものと推測された。

媒介蚊の構成が異なったことによるマラリア原虫の感染率には影響であるが、マラリア原虫の感染率が例年 2%前後に対し、7.9%と高値であった。この原因に関しては今回の調査では解明できず、今後の課題とされた。他方、感染マラリア原虫種及び単種感染、混合感染の構成などもベトナム南部における従来の報告と同様なものであった。

Con Dao 島での今回の調査において、媒介蚊に *P. vivax* の感染が混合感染という形で認められた。これまでの地方自治体保健医療機関から報告では、近年 Con Dao 島におけるマラリア患者は認めないとのものであった。しかし、今回検出された *P. vivax* の塩基配列を解析した結果、解析した SSU-rRNA の塩基配列は *P. vivax* の配列と一致していた。このことより、Con Dao 島には無症状キャリアーが存在していることが推測された。

サル糞便からのマラリア原虫の検出であるが、サル糞便を採取した場所と媒介蚊を採取した場所が若干離れていたことにより、糞便からマラリア原虫 DNA の検出ができなかったと推測された。この点も今後改善すべき問題点とされた。

以上の結果より、本調査地である Con Dao 島には野生サルからはマラリア原虫感染の証明はできなかったが、媒介蚊よりマラリア原虫感染の証明ができ、サルマラリア原虫の伝播が起きていることが示唆された。今回検出されたサルマラリア原虫はいずれも人獣共通感染性マラリアとして証明されている原虫のため、今後の詳細な調査が必要であると示唆された。

表 2 Con Dao 及び Bu Gia Map におけるマラリア原虫感染種と感染部位

Infection	Plasmodium spp.	No. of mosquitoes infected					
		Con Dao				Bu Gia Map	
		Thorax	Abdomen	Thorax	Abdomen		
Single	Pf	0	0	0	1	0	1
	Pv	0	0	0	2	1	1
	Pin	1	0	1	2	2	0
	Pct	0	0	0	1	1	0
	unknown	0	0	0	2	2	0
Double	Pv, Pin	1	1	0	0	0	0
	Pin, Pct	1	0	1	0	0	0
Triple	Pv, Pin, Pct	1	1	0	0	0	0
No. of PCR-positive		4	2	2	8	6	2
No. of PCR-negative		58	60	60	54	56	60
No. of examined mosquitoes		62	62	62	62	62	62

Pf, *P. falciparum*; Pv, *P. vivax*; Pin, *P. inui*; Pct, *P. coatneyi*; unknown, other than Pf, Pv, Pm, Po, Pin, Pct, Pk, Pcy and Pfield

### 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.

## 6. 自己評価

本調査ではヒト、サル、蚊という3つの異なった調査対象を解析すべく予定を組んだが、ヒトサンプルの採取は地方自治体関係機関からの承諾が得られなかった。また、サルのサンプルは媒介蚊と同じ場所でのサンプル採取ができなかった。以上より当初予定していた検討対象の解析ができなかった。しかし、媒介蚊の解析では、天候などの環境要因が平年と異なり結果が得られないのではと危惧したが、ほぼ満足いく結果が得られた。殊に、Con Dao 島では *P. vivax* をはじめとするヒトマラリアの患者はいないとの保健医療機関からの情報であったが、媒介蚊から *P. vivax* の検出があった。これは新知見であり、今後の調査の必要性を示すものであった。以上より、不満は残るが一応の成果を挙げることができたと評価した。

## 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

## 令和元（2019）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妊婦の歯周病菌保菌状況と早産の関連調査  
課 題 番 号：2019-Ippan-11
2. 代 表 者：福田 英輝（国立保健医療科学院 統括研究官）  
共同研究者：古堅 麗子（長崎大学口腔保健学 助教）  
中野 政之（長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野 助教）
3. 決 定 額：400 千円

### 4. 申請時書類より

#### ①研究目的

熱帯地域と呼ばれるアフリカやアジアの国々では、特有の感染症が多く蔓延し、そこで生活をする人々は、それらの感染症と共に歩んできた。近年は世界的な経済支援や大手製薬会社による医薬品の寄付、各国の技術支援により、彼らの生活水準は向上しつつある。実際に、国連ミレニアム開発目標の基準となる 1990 年と比べ、小児全体の死亡率は 3 分の 2 以上減少している。一方で、「乳幼児死亡率の削減」や「妊産婦の健康の改善」といった点では未だ多くの課題を残している。現在途上国では、肺炎、下痢、マラリアが 5 歳未満児の主な死因とされている。しかし、実際には周産期の問題で死に至る母子が非常に多く、途上国における周産期医療はより力を入れるべき大きな課題となっている。

周産期の中でも、特に早産（在胎期間 37 週未満）は低所得国で新生児の健康に大きな影響を与え、世界中で発生する新生児死亡の 28% を占めている。アフリカの多くの国々では未だ医療サービスの整備が遅れ、医療資源も非常に乏しいことから、早産児や低出生体重児のケアを十分に行うことができていない。つまり、「早産の予防」が可能であればアフリカの新生児死亡率並びに 5 歳未満児死亡率の低下に繋げることができると考えられる。早産の誘発因子として、前置胎盤、胎児機能不全、子宮頸管無力症の他に感染症や妊娠高血圧、妊娠糖尿病等が関与すると考えられてきた。さらに近年、妊娠期の歯周病も重要な因子の一つであることが指摘されている。しかし、アフリカをはじめとする途上国では、妊産婦に対する口腔ケアの教育が浸透していないため、歯周病ケアによる早産の予防機会を逸している可能性がある。特に研究実施国であるルワンダ共和国は、歯科医 1 人あたりの人口が 89 万人であり、世界で 2 番目に歯科医が少ない国となっている。

そこで本研究では、ルワンダ共和国の妊娠期女性を対象とした歯周病菌の保菌状況を調査し、その口腔内環境と早産（妊娠期間）や出生時体重との関連を明らかにする。加えて、口腔ケアによる歯周病予防と、それに伴う早産予防の重要性を提言することで、ルワンダ国の新生児死亡率の低減に貢献することを目指す。

## ②研究内容

首都キガリから 240km ほど離れたルシジ地方のミビリジ病院で調査を行った。妊婦健診を目的として通院した妊婦を対象にアンケート調査を実施し、同時に唾液を採取する。唾液から 4 種の歯周病菌を検出し、総菌量も算出する。これら歯周病菌の保菌状況と早産・低出生体重との関連を明らかにし、ルワンダの地方においても母親の歯周病が早産やその他周産期の問題を引き起こしている可能性を探る。具体的には、①口腔清掃の実施状況と歯周病菌の保菌状況の関連、②歯周病菌の保菌状況と妊娠週数や出生時体重との関連をメインに解析する。

## ③予想される成果

本研究は、ルワンダ国の歯周病と早産との関連を調査するものであり、その成果は現地での妊娠中の口腔ケア指導並びに医療従事者への周知につながり、早産率の改善に寄与することが期待できる。

多くの先進国では既に、妊娠期の歯周病が早産を誘発する危険性が報告されており、妊婦健診に歯科項目を取り入れている国もある。しかしアフリカをはじめとする途上国では、妊産婦の口腔ケアに対する意識や認知は非常に低く、医療従事者でさえ歯周病と早産との関係性を認識していないことも多い。そのため本研究で得られる成果を還元することができれば、ルワンダ国の周産期医療における歯周病の重要性を医療従事者に限らず、一般市民にも広く周知することができる機会となる。途上国では医療資源が限られ、早産児や低出生体重児のケアに困難を極めている現状を考慮すると、歯周病ケアによる早産の予防自体が、新生児死亡率低減への非常に有用な対策となる。

先にも述べたように、低所得国の多くでは歯科医療環境の未整備のために齲蝕や歯周病を含めた口腔内疾患の調査が十分に行われていない。そのため、本研究で歯周病菌の構成種を明らかにすることで、熱帯地域における口腔内疾患の基礎的データ構築に貢献することができる。今回の調査では 1 箇所（ミビリジ病院）のみを対象としているが、将来的にはルワンダ国各地での調査を実施したいと考えている。そのため、本研究で得られる成果が将来的な大規模調査への動機付けとなると考えている。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

2019年から2020年にかけて180名の妊婦を対象とし、質問紙を用いたアンケート調査と唾液の採取を行った。アンケート調査では基本的属性と現在の妊娠状況、過去の妊娠歴、生活習慣、口腔洗浄の実施状況等の情報を収集した。唾液サンプルから DNA Blood Mini Kit (Qiagen) によりゲノム DNA を抽出し、歯周病菌の検出を目的としたリアルタイム PCR を行った。



調査時の様子：対象者と看護師



ミビリジ病院

対象菌種は、重度の歯周病と最も関連が深いとされる 3 菌種 (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) と女性ホルモン濃度上昇とその増殖の関連が報告されている 1 菌種 (*Prevotella intermedia*) の計 4 菌種とした。

Target	Sequence	Ta(°C)	Amplicon size (bp)
P. gingivalis	5'-ACCTTACCCGGGATTGAAATG-3'	57	83
	5'-CAACCATGCAGCACCTACATAGAA-3'		
	5'-FAM-ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC-TAMURA-3'		
T. forsythia	5'-AGCGATGGTAGCAATACCTGTC-3'	57	88
	5'-TTCGCCGGGTTATCCCTC-3'		
	5'-FAM-TGAGTAACGCGTATGTAACCTGCCCGC-TAMURA-3'		
T. denticola	5'-CCGAATGTGCTCATTTACATAAAGGT-3'	57	122
	5'-GATACCCATCGTTGCCTTGGT-3'		
	5'-FAM-ATGGGCCCGCGTCCCATTAGC-TAMURA-3'		
P. intermedia	5'-TCCACCGATGAATCTTTGGTC-3'	56	98
	5'-ATCCAACCTTCCCTCCACTC-3'		
	5'-FAM-CGTCAGATGCCATATGTGGACAACATCG-TAMURA-3'		

検出対象の歯周病菌種とプライマー配列

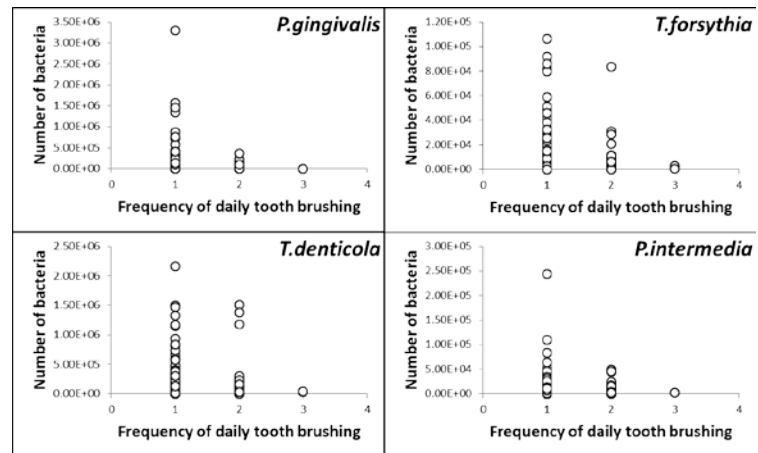
本研究課題は長崎大学熱帯医学研究所とルワンダ大学の両倫理委員会で承認されている (承認番号：180921202、No 061/ CMHS IRB2019)。



## ②成果（結果＋考察）

ミビリジ地区の妊婦 180 人の調査を行っている。そのうち 70 人 (38.9%) は今回の妊娠を予定していなかったと答えた。その理由を、暴力による妊娠、配偶者がいない状態での妊娠と回答する妊婦が多く、社会的問題も浮き彫りになりつつある。妊婦年齢層の多くは 20 代から 40 代前半まで幅広く分布している。つまり、

先進国以上に高齢での出産割合が高い。これらは、歯周病による様々な周産期問題の発生に関与している可能性がある。口腔清掃の習慣としては、1日に1回の人数が136名(75.6%)と多く、さらに24人(13.3%)は木の枝や指を使うなど、効果的でない洗浄方法を取っていた。これらの状況は妊娠期間における歯周病の悪化を促進する可能性がある。実際に、1日の口腔清掃の回数が多い妊婦では各歯周病菌量が少なかった(上図)。現在、妊娠週数や出生時体重などの出産後データを集計中であり、妊娠期の歯周病菌保菌が早産や低体重出生を引き起こす可能性について、今後解析をしていく。



1日の口腔洗浄回数と歯周病菌量

## ③成果の公表

現在もデータ解析を進めているため、本研究成果は未発表の状態である。しかし本研究はアフリカにおける歯科領域及び周産期領域において有意義なものとなることが予想される。特に口腔ケアによる早産予防に着目しているため、*Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* もしくは *Journal of maternal and child health* に投稿予定である。

## 6. 自己評価

ルワンダでの倫理申請に少々時間を費やすこととなったが、問題なく調査を開始することができた。調査開始の前年 2018 年にミビリジ病院を一度訪れ、データコレクターとして調査に参加する看護師や看護部長、院長との話し合いの場を設けていたため、調査中も院内スタッフとの連携は密に取れていた。質問紙を用いたデータの採取後、唾液中に含まれている歯周病菌をリアルタイム PCR で検出した。対象菌種のうち、*P. intermedia* はこれまで報告されている論文でもプライマー設計に課題があったようで、我々も当初コントロール DNA での増幅が見られない等の問題が発生した。しかし、複数のプライマーとコントロール DNA を組み合わせ、サンプルの解析も行うことができるアッセイ系を確立した。また、多くの歯周病研究において CPI（プロービングや出血傾向）を用いた歯周病の進行度評価を行っているが、本研究では、その原因となる歯周病菌の菌数をリアルタイム PCR により検出している。そのため、これまでも歯磨きの回数と口腔内に常在する歯周病菌数の関連を示すことができおり、これらの結果は、現地の妊婦を対象とした衛生指導を行う際に重要なものとなる。今後はさらに、歯周病菌が早産や低体重出生の誘発を促進している可能性について解析を進めることで、現地の周産期の課題克服に貢献できるものと考えている。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ガレクチン-2 が寄生虫感染に与える影響  
課題番号：2019-Ippan-12

2. 代表者：武内 智春（城西大学薬学部 准教授）  
共同研究者：中村 梨沙（寄生虫学分野 助教）

3. 決定額：400 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

糖鎖の構造は生物種によって異なることから、糖鎖は宿主-病原体間など生物種間の相互作用において重要な役割を担うと考えられています。申請者は、これまでに、糖結合性タンパク質ガレクチン-2 が、糖鎖への結合を介して、モデル線虫 *Caenorhabditis elegans* の成長に抑制的に作用することを明らかにしています（論文投稿準備中）。また、寄生虫学分野の濱野教授より熱帯医学研究所の研究リソースであるマンソン住血吸虫やパハン糸状虫をご供与頂き、ガレクチン-2 がそれら寄生虫の複合糖質に結合することも明らかにしています（未発表データ）。これらの知見から、「ガレクチン-2 がモデル線虫 *C. elegans* だけでなく、マンソン住血吸虫やパハン糸状虫などの寄生虫に対して抑制的に作用する可能性」が考えられます。そこで、本研究課題では、上記の可能性を検証するため、①ガレクチン-2 タンパク質が寄生虫に影響するか、また、そのメカニズムとして、②どのような糖鎖との結合を介して影響するか、などの観点から、研究を行います。

### ②研究内容

本研究課題では、熱帯医学共同利用・共同研究拠点としての熱帯医学研究所の研究リソースを活用させていただき、ガレクチン-2 が寄生虫感染に与える影響を調べます。これまでにガレクチン-2 が線虫 *C. elegans* の成長に抑制的に影響すること、腸管の糖鎖に結合すること、その糖鎖は寄生虫を含む線虫類に特有の糖鎖であること、が明らかになっています（論文投稿準備中）。これらと同様のアッセイ系を用い、ガレクチン-2 が寄生虫に与える影響について調べます。具体的には、寄生虫学分野で継代維持されているマンソン住血吸虫やパハン糸状虫をご提供いただき、①それら寄生虫をガレクチン-2 タンパク質存在下でインキュベートし、ガレクチン-2 の寄生虫への影響について、寄生虫の生存期間や形態などの観点から評価します。ガレクチン-2 が影響する寄生虫については、②蛍光標識したガレクチン-2 タンパク質で寄生虫を染色し、ガレクチン-2 が寄生虫のどの部位に結合するか調べます。また、寄生虫のガレクチン-2 結

合性タンパク質を精製し、それらの糖鎖構造などを調べることで、ガレクチン-2 が寄生虫にどのような糖鎖を介して影響するか、さらに、どのような糖タンパク質に結合するか、明らかにします。なお、研究は、中村助教らと長崎で、また、メールや電話で、密に意見交換を行い、適宜修正しつつ進めていく予定です。

### ③予想される成果

全世界には 10 億人以上の寄生虫感染者が存在し、医療上の大問題となっており、その完全な制圧には宿主-寄生虫間相互作用の理解の深化、さらに、新規な抗寄生虫薬や診断法が必要と考えられています。近年、寄生虫に対する糖鎖生物学的見地からのアプローチが進められており、寄生虫に存在するユニークな糖鎖構造が徐々に明らかにされつつありますが、それらユニークな糖鎖に対する宿主側の受容体や機能については未解明な点が多く残されています。本研究課題では、宿主の糖結合性タンパク質ガレクチン-2 が、寄生虫糖鎖への結合を介して、寄生虫感染防御に関わる可能性について検証します。この成果として、宿主-寄生虫間相互作用の新規な制御機構が発見できると予想しています。また、その後、ガレクチン-2 を新規な抗寄生虫タンパク質医薬または診断のための分子プローブとして応用展開できる可能性も考えられます。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

#### リコンビナントタンパク質の調製

ガレクチン-2 (Gal-2) などのリコンビナントタンパク質は、大腸菌発現系を用いて発現・精製した。必要に応じて、リコンビナントタンパク質の修飾も行った。

#### マンソン住血吸虫、パハン糸状虫の準備と維持・飼育

熱帯医学研究所寄生虫学分野で継代維持されているマンソン住血吸虫およびパハン糸状虫を用いた。輸送したマンソン住血吸虫 (Adult) を、抗生物質を含む RPMI-1640 培地で洗浄後、血清及び抗生物質を含む RPMI-1640 培地中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で、維持・飼育した。維持・飼育には 24-well プレートを用いた。飼育時にリコンビナントガレクチンタンパク質を添加し、それらがマンソン住血吸虫に与える影響を調べた。使用したガレクチンタンパク質およびそれらの濃度は次の通りとした：Gal-1 (500 µg/mL)、Gal-2 (500 µg/mL)、Gal-3 (500 µg/mL)、CGL2 #1 (100 µg/mL)、CGL2 #2 (200 µg/mL) (CGL2 については#1, #2 の二種類の濃度で行った)。ガレクチンタンパク質添加から、8 日後にマンソン住血吸虫の生存を確認した。その際、ピンセットを用いて吸虫に触れ、動きの有無を調べた。

### ②成果 (結果+考察)

本研究では、マンソン住血吸虫およびパハン糸状虫に対するリコンビナントガレクチンタンパク質添加の影響を調べた。なお、パハン糸状虫について実験を行ったものの、結果がネガティブであったため、詳細は割愛し、主にマンソン住血吸虫に関して述べる。なお、未発表の結果のため、図・表中における具体的なサンプル名・分子名の掲載は差し控える。

マンソン住血吸虫の抽出液をサンプルとして、HRP 標識したガレクチン-2 (Gal-2) タンパク質を用いたレクチンブロット解析を行った (図 1)。その結果、Gal-2 がマンソン住血吸虫および線虫 *C.elegans* の抽出液に対しては反応を示したが、ネガティブコントロールである BSA (ウシ血清アルブミン) に対しては反応しなかった。このことから、マンソン住血吸虫にガレクチン-2 結合性糖鎖が存在することが示唆された。そこで、Gal-2 がマンソン住血吸虫に与える影響を試験管内において調べることとした。なお、その際、Gal-1 および、マンソン住血吸虫との関係がすでに報告されている、Gal-3 が、与える影響についても並行して調べた。また、寄生虫への影響が示唆されているキノコガレクチン CGL2 についてもあわせて調べた。

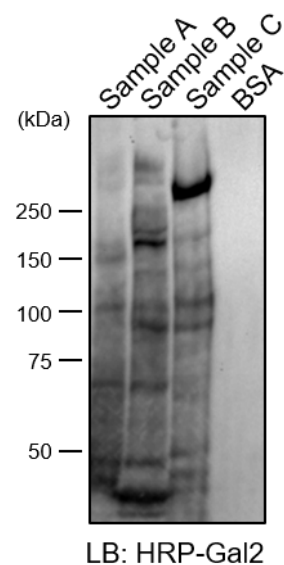


図 1. ガレクチン-2 をもちいたレクチンブロット

Gal-1、Gal-2、Gal-3 およびキノコガレクチン CGL2 のリコンビナントタンパク質は大腸菌発現系を用いて発現させた。大腸菌を可溶化した後、ガレクチン結合性糖鎖（または複合糖質）を固定化した担体を用いて、アフィニティー精製をおこなった。精製したタンパク質について、さらに、限外ろ過、LPS 除去処理、フィルター滅菌を行った後、実験に使用した。なお、調製したリコンビナントガレクチンタンパク質の一部を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色した結果を図 2 に示す。いずれのタンパク質についても、高純度に精製できていることが確認された。

マ Manson 住血吸虫は、熱帯医学研究所寄生虫学分野で継代維持されているものを用いた。輸送後の親虫を、無菌的に培地で洗浄した後、24-well プレートの各ウェルに移し、血清及び抗生物質を含む RPMI-1640 培地中で維持した。各ウェルに、PBS（コントロール）または各種ガレクチンタンパク質を添加し、8 日後にオスの生存を確認した（図 3）。PBS または Gal-1 を添加した場合、虫体はすべて生存していた。一方で、他のガレクチンタンパク質を添加した場合、死亡した虫体を確認された。Manson 住血吸虫感染との関連が報告されている Gal-3 が、試験管内においても、吸虫に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

Gal-2 添加における吸虫死亡割合は、Gal-3 添加の場合と比べ低かった。しかし、Gal-1 添加の場合は虫体に特に影響がないことから、Gal-2 に特徴的な作用と考えられる。

以上の結果から、Gal-2 が Manson 住血吸虫に対する生体防御に働く可能性が考えられる。Gal-3 が Manson 住血吸虫の感染において抑制的に作用することはこれまでに報告されているが、Gal-2 と Manson 住血吸虫の関係性については未報告である。今後、Gal-2 がどのようにして虫体に作用しているのか、例えば、その Manson 住血吸虫におけるリガンドの同定などを行い、さらに調べる必要があると考えられる。

### ③成果の公表

なし

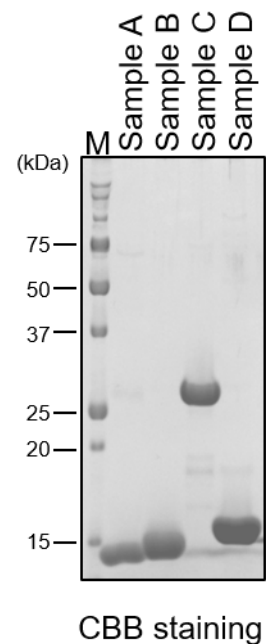


図 2. 精製したリコンビナントタンパク質

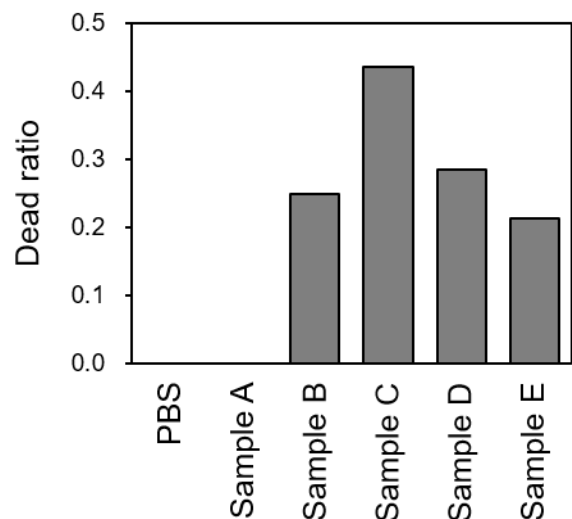


図 3. リコンビナントガレクチンタンパク質の添加が Manson 住血吸虫の生存に与える影響

## 6. 自己評価

本研究課題では、宿主の糖結合性タンパク質ガレクチン-2が、寄生虫糖鎖への結合を介して、寄生虫感染防御に関わる可能性について検証した。その成果として、当初は、宿主-寄生虫間相互作用の新規な制御機構が発見できると予想していた。

本研究の結果から、ガレクチン-2がマンソン住血吸虫に抑制的に影響する可能性が示唆された。よって、当初の目標の重要部分については達成できたと考えている。また、ガレクチン-2以外のタンパク質についても調べることが出来たことは、宿主-寄生虫間相互作用の新規な制御機構について考えていくために有用と考えている。

しかし、ガレクチン-2が寄生虫に与える影響の詳細については調べることが出来ない。そのため、ガレクチンと寄生虫の関係性について、新規知見が示唆されたものの、制御機構の発見が出来たとはいえない。当初の研究計画では、寄生虫のガレクチン-2結合性タンパク質を精製し、それらの糖鎖構造などを調べることで、ガレクチン-2が寄生虫にどのような糖鎖を介して影響するか、さらに、どのような糖タンパク質に結合するか、明らかにする予定であった。この点について、リガンドの解析準備は行ったものの、具体的なリガンドの同定には至っていない。今後、これらの点について、解析を進める必要がある。

以上のことから、本研究課題の達成度としては「不満は残るが一応の成果は挙げられた」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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マラリア原虫感染による赤血球膜脂質構成変化のナノスケールレベル解析  
課 題 番 号：2019-Ippan-13
2. 代 表 者：正谷 達膳（鹿児島大学共同獣医学部 准教授）  
共同研究者：藤田 秋一（鹿児島大学共同獣医学部 教授）  
金子 修（長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野 教授）
3. 決 定 額：500 千円

### 4. 申請時書類より

#### ①研究目的

熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に感染した赤血球では、原虫側から①原虫の細胞膜、②寄生胞膜、③マウレル裂、④赤血球膜と、多重の膜構造が形成されている。これら膜構造は、原虫が赤血球を自身の発育に有利な環境とするため、赤血球を「改変」することで形成される。これまでの先行研究により、複雑な輸送機構を介して膜構造を経由した原虫由来の蛋白質が赤血球表面に輸送され、これらは栄養取り込み・免疫回避・細胞接着など原虫の発育や病原性の発現に関与することが明らかとなっている。とくに、感染赤血球表面に knob とよばれるコブ状の突起が形成され、血管壁への接着性が増強することは血管塞栓の原因につながる。すなわち、感染赤血球の細胞膜構造変化の詳細を明らかにすることは新規薬剤ターゲットの特定や治療法の開発につながる可能性がある。

これまでの多くの研究では、原虫由来または宿主蛋白質の分布・局在の評価を主に行われてきた。一方、膜構造の脂質に関しては原虫感染赤血球膜の脂質構成が変化するという報告があるものの、原虫による寄生胞膜、マウレル裂など各細胞膜の脂質構成の改変の詳細は明らかとなっておらず、脂質の構成変化が原虫の寄生にとってどのような意味があるのかもわかっていない。感染赤血球の細胞膜構成脂質の組成・局在変化に関する研究が少ない理由として、脂質を化学固定することが困難であり、通常の細胞生物学・生化学的手法ではアプローチしにくいことがあげられる。これを可能にする手法として、細胞膜やオルガネラ膜に存在する脂質成分を生きた状態とほぼ変わらない状態で急速に凍結し、さらに生体膜を物理的に固定し電子顕微鏡レベルで解析可能な「急速凍結急速切断レプリカ法 (QF-FRL法) による膜脂質可視化技術」がある (Fujita *et al.*, PNAS, 2009)。本技術は急速に凍結した生体材料を切断し、炭素 (C) 及び白金 (Pt) でできた薄膜へ蒸着することで細胞膜上の脂質分子を固定し、レプリカ薄膜を作る。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 処理によって余分な生体分子を除去し、レプリカ薄膜へ裏打ちされた脂質分子や蛋白質を特異的プローブにより標識する。さらに、金コロイド標識二次抗体により可視化することで、電子顕微鏡による分子の局在解析が可能となる。これまでに、本方法と脂質特異的プローブを組み合わせた観察技術によって、藤田を中心に哺乳類細胞や酵母のオルガネラやオートファゴソームに分布する脂質分子の局在が明らかにされてきた。



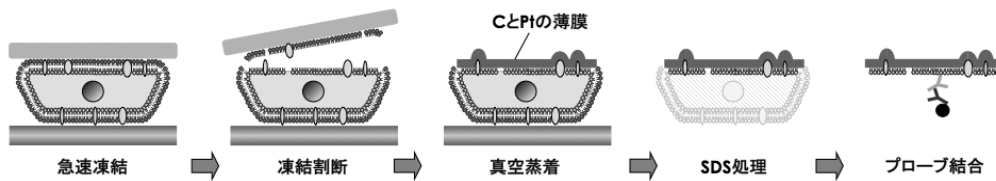


図1 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法の概略

そこで今回、本技術をマラリア原虫感染赤血球に適用することで、感染赤血球膜の脂質構成成分がどのように変化するのか（局在、組成など）を明らかにする。さらに赤血球膜だけでなく、原虫の細胞膜、寄生胞膜及びマウレル裂の脂質構成とその局在についても解明してゆく。

## ②研究内容

### 1 マラリア原虫感染赤血球レプリカの作製

*P. falciparum* 感染赤血球を液体窒素にて急速凍結する。鹿児島大学には *P. falciparum* 培養系が導入されていないため、貴学熱帯医学研究所にて実施する。具体的には、熱研対応教員（麻田ら）によってあらかじめ *P. falciparum* を *in vitro* 培養していただく。申請者らが訪問し、銅板及び金箔の間に新鮮な感染赤血球をはさみ、液体窒素に浸漬・急速凍結する。液体窒素保存容器に入れた状態で鹿児島大学へ移送し、炭素 (C) 及び白金 (Pt) でできた薄膜へ蒸着することで細胞膜上の脂質分子を固定し、レプリカ薄膜を作る。

### 2 脂質プローブの作製と、マラリア原虫感染赤血球レプリカへの適用

いくつかの哺乳類由来蛋白質が分子内に有する、特定の脂質分子に特異的に結合する蛋白質ドメインを PCR にて増幅し pGEX ベクターに挿入する。GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させたものを精製し、これを脂質プローブとする。具体的にはホスファチジルイノシトールリン脂質やホスファチジルセリンなどといった、膜構成だけでなくシグナル伝達などにも重要な脂質をターゲットとした脂質プローブを中心に作製する。得られた脂質プローブを順次、レプリカ薄膜に反応させ、GST をターゲットとして金コロイド結合抗体により標識し、電子顕微鏡により観察する。赤血球膜だけでなく、原虫の細胞膜、寄生胞膜及びマウレル裂の脂質構成とその局在についても解析する。

## ③予想される成果

マラリア感染赤血球の細胞膜変化について、細胞膜構成脂質の局在を明らかにすることで、これまでの蛋白質を対象とした研究から得られた知見に、新たに脂質の情報を追加することができる。赤血球膜構成蛋白質の解析結果とあわせることで、膜構造変化メカニズムの詳細を明らかにしていくうえで大きな手がかりを提供しうる。将来的に原虫由来蛋白質検出系も確立して、knob 蛋白質 (PfEMP-1)、マウレル裂の蛋白質 (SBP1)、及び原虫細胞膜-寄生胞膜に局在する蛋白質 (トランスロコン蛋白質: PTEX など) の局在なども脂質の局在と併せて観察してゆきたい。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

マラリア原虫（3D7A 株：パラシテミア 8.03%）感染赤血球を遠心・洗浄した。あらかじめ紙やすりで表面を粗にした金箔及び銅箔で感染血球を挟み、液体窒素で十分冷却した急速凍結装置ではさみ、液体窒素に浸漬することで急速凍結した。液体窒素内で保存しつつ鹿児島大学へ移動し、真空蒸着装置内で割断したのち、ただちに炭素および白金を蒸着しレプリカを作成した。

### ②成果（結果＋考察）

#### 【ラフトマーカ－GM3 の局在解析】

レプリカ薄膜に、真核生物ラフトマーカ－である GM3 を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した(右図)。その結果、GM3 分子は赤血球膜および寄生胞膜の外葉に局在していた。興味深いことに、GM3 分子は虫体細胞膜の内葉・外葉の双方に局在がみられた。通常の哺乳類細胞では細胞膜の外葉のみに局在が見られ、内葉には局在しないことがわかっており、マラリア虫体の細胞膜の内葉に局在することは異例であり、注目すべき結果である。

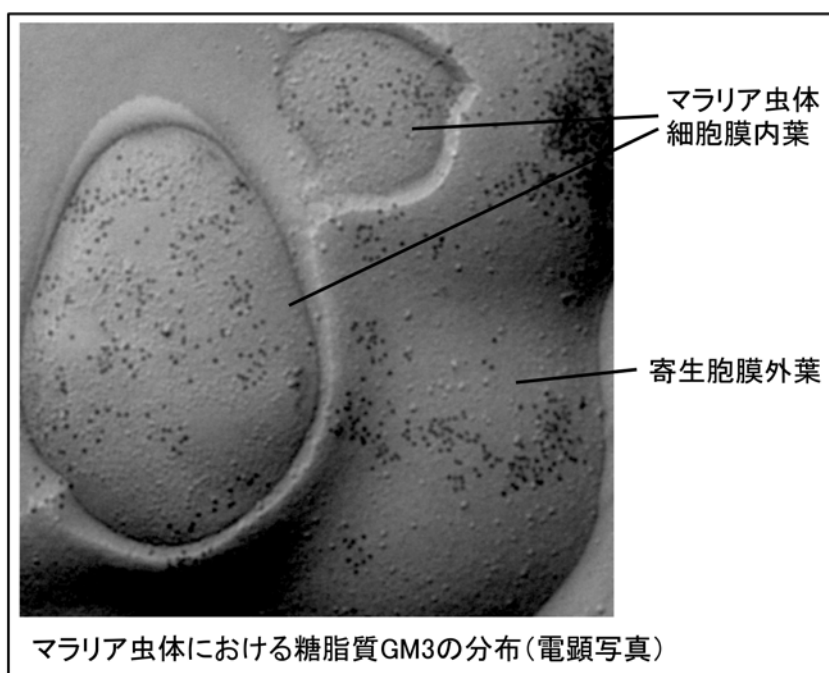


図2 寄生胞および虫体における GM3 の分布

#### 【膜構成脂質 PI4P および PI4,5P<sub>2</sub> の局在解析】

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) およびホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI4,5P<sub>2</sub>) はともにイノシトールリン脂質に分類される。PI4,5P<sub>2</sub> は細胞膜を構成するだけでなく、シグナル伝達など生理学的な機能をもつ。PI4P は PI4,5P<sub>2</sub> の前駆体であり、ゴルジ装置や細胞膜に存在し脂質輸送などに関わる。原虫寄生赤血球レプリカ薄膜に、これら脂質を標

識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。その結果、PI4P および PI4,5P<sub>2</sub> はいずれも、原虫虫体・赤血球膜及び寄生胞膜の内葉にのみ局在していた。通常の哺乳類細胞でもこれらの脂質の局在は同様であり、細胞膜あるいはゴルジ体などの細胞内の内葉に存在することがわかっている。哺乳類細胞などでは PI4P あるいは PI4,5P<sub>2</sub> は、アクチン重合、細胞内シグナル伝達、イオンチャネルやトランスポーターの活性の維持に働くことがわかっているため、今後の研究では、原虫および寄生胞の種々の機能とこれら脂質との局在の関係を明らかにする必要がある。

**【膜構成脂質ホスファチジルセリンの局在解析】**

ホスファチジルセリンは細胞膜内葉に局在する脂質分子である。哺乳類細胞、酵母も含めた真核細胞ではアポトーシスが起ると膜外葉へ反転する。ホスファチジルセリンはエンドソームを介した物質輸送に関わっているほか、マクロファージなど貪食細胞が細胞貪食するためのマーカーとして機能することから”Eat me signal”としても重要である。

ホスファチジルセリンのプローブとしてアネキシン V を原虫寄生赤血球レプリカ薄膜に反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。その結果、ホスファチジルセリンは赤血球膜及び寄生胞膜の内葉にのみ局在していた。虫体細胞膜には分布はみられなかった。通常の哺乳類細胞では細胞膜の内葉にのみ存在し、アポトーシスを起こした時に外葉に局在することがわかっている。本研究で今回明らかになったことは、赤血球細胞膜および寄生胞膜では内葉に局在することで哺乳類細胞の細胞膜と一致する。しかしながら、原虫の細胞膜ではホスファチジルセリンが外葉・内葉ともに存在しないことは、注目すべき点である。真核細胞では、ホスファチジルセリンは細胞膜脂質成分としては非常に多く存在し、負電荷を持った脂質であり、細胞膜内葉では正の電荷を持った機能蛋白質を結合し、細胞膜の構造あるいは機能に重要であることがわかっている。マラリア原虫細胞膜にホスファチジルセリンが存在しないことは、マラリア原虫の細胞膜の構造および機能の理解を深める上で非常に重要であると考えられる。

表 1 熱帯熱マラリア原虫感染赤血球における脂質分布のまとめ

		GM3	PI4P	PI4,5P <sub>2</sub>	ホスファチジルセリン
寄生胞膜	内葉	-	+	+	+
	外葉	+	-	-	-
虫体細胞膜	内葉	+	+	+	-
	外葉	+	-	-	-
赤血球細胞膜	内葉	-	+	+	+
	外葉	+	-	-	-

③成果の公表

なし。

## 6. 自己評価

急速凍結急速割断レプリカ法によって、マラリア原虫感染赤血球における GM3、PI4P、PI4,5P<sub>2</sub> 及びホスファチジルセリンの局在を観察できることが今年度の実験で示すことができた。また、その結果、マラリア原虫虫体細胞膜において GM3 が通常の哺乳類細胞とは異なる分布を示すなど、原虫の脂質がユニークな分布・性質をもつことを示唆する結果を得ることができた。そのため、プレリミナリーな結果ではあるが、いちおうの成果であると自己評価した。

しかし、今回はマラリア原虫の発育ステージを同期化していなかったため、見られた虫体がどの発育段階にあるのかを特定できなかった。今後、同期化した虫体を用いて実験を行っていきたい。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ウイルス感染モデルのライブイメージングによる病態発現の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：2019-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  
生命薬科学専攻衛生化学分野 准教授）  
共同研究者：Mya Myat Ngwe Tun（長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 助教）  
吉田 さくら（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
生命薬科学専攻衛生化学分野 助教）  
中家 真理（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 博士後期課程2年）  
千賀 健司（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 博士前期課程2年）  
棚原 悠介（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 博士前期課程1年）  
尾上 遼太郎（長崎大学薬学部6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 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

ウイルス感染の病態発現機構解析には、主に動物モデルが用いられるが、その病態解析では主に安楽死後の病理切片を用いた組織学的検討や感染ウイルスの遺伝子解析などが行われるが、その病態の詳細な進行のメカニズムの多くは明らかになっていない。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) によるウイルス感染マウスの *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、病態発症のメカニズム解析に有用であると考えられる。

そこで本研究では、ダニや蚊によって媒介され、未だ病態発現機構が明らかでない新興再興感染症を引き起こす下記のウイルスによる病態ダイナミクスをライブイメージングにて詳細に解析することを目的とした。

- (1) 重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) -- 出血熱、血小板減少、消化器症状
- (2) チクングニヤウイルス(CHIKV) --急性熱性疾患、脳症
- (3) デングウイルス(DENV) --急性熱性疾患、出血熱
- (4) ジカウイルス (ZIKV) -- 急性熱性疾患、小頭症

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  $^{18}\text{F}$ -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  $^{68}\text{Ga}$ -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、 $^{18}\text{F}$ -FDG や  $^{68}\text{Ga}$ -citrate は感染部位における炎症組織に非選択的に集積していることから、SFTSV 選択的な病態を捉えているとはいえない。そこで本研究では、より SFTS 選択的な病態ダイナミクスを追跡できる *in vivo* イメージングを目指し、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  $^{111}\text{In}$  標識抗 SFTSV 抗体、および  $^{68}\text{Ga}$  標識抗ウイルス抗体 (IgG や ナノボディ)を作成しており、すでに  $^{111}\text{In}$ -IgG の合成と単離には成功している。本研究ではさらに早坂博士、Tun 博士らの作成した CHIKV, DENV, ZIKV に対する IgG を用いて同様に  $^{111}\text{In}$ -IgG を作成して、SPECT イメージングを行う。

また、これまでに全く検討されていない  $^{68}\text{Ga}$ -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)などの FDG などとは全く集積メカニズムの違う分子プローブなどを用いて炎症の発症過程や各種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ウイルス感染による病態発現機構の解析を行うこととした。また、ウイルス感染症の病態を切れ目ないライブイメージングによっても的確に捉えることを狙い、蛍光標識抗ウイルス抗体を用いた感染細胞の高解像度な蛍光イメージングも行っていく。

さらに、上記ウイルス性疾患の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、 $^{18}\text{F}$ -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。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、SFTS をはじめとして、新たなウイルス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。また、我々のこれまでのペプチド医薬などの開発経験 (Itagaki, *Peptide Science*

2016, Fukushima, *Peptide Science* 2016) を生かして、ウイルスが産生する Gn や Gc タンパク質を模倣した非天然型アミノ酸を導入した新規ペプチド分子を開発し、抗ウイルス活性を評価する。

## ②研究内容

### 1. ウイルス感染細胞の作製

既報の手法(Ogawa M, *J Infect Chemother*, 2018)を参考にして、SFTSV などのウイルスを human hepatoma Huh7.5.1-8 cells あるいは Vero E6 細胞に感染させた病態モデルを作成する。

### 2. ウイルス感染細胞を用いた抗 SFTSV IgG やペプチド分子の結合性評価

FITC にて蛍光標識した抗 SFTSV IgG (すでに合成および精製を完了) を用いて、SFTSV 感染細胞への結合性を共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。また、<sup>111</sup>In-IgG の取り込み評価も併せて行う。さらに、SFTSV の Gn や Gc タンパク質を標的とした新規ペプチド分子を開発し、蛍光標識を行った後に、感染細胞への結合評価を行い、有用な治療薬あるいはイメージング剤としての候補化合物をスクリーニングする。同様の検討を他のウイルス性疾患に関しても展開していく。

### 3. ウイルス感染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。また、他のウイルス性疾患の病態モデルの作成も早坂博士、Tun 博士の確立した手法に基づき、作成していく。

### 4. ウイルス感染病態モデルマウスの核医学イメージング

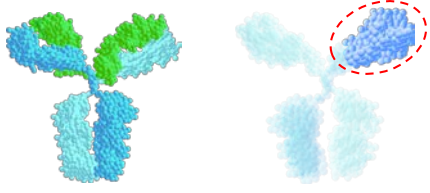
#### (1) <sup>111</sup>In 標識抗ウイルス抗体を用いた感染部位の SPECT/CT および PET/CT イメージング

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、早坂博士や Tun 博士らの作成したウイルスの Gn, Gc タンパク質など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。また、蛍光標識体を作成して、上記と同様にウイルス感染細胞を用いた結合性に関する検討も併せて行う。

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、<sup>111</sup>In 標識抗ウイルス antibody を作成する(図 1)。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、各種ウイルス 感染マウスあるいは非感染マウスへ <sup>111</sup>In 標識抗体を投与した後、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。



	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.

### (2) <sup>68</sup>Ga-NOTA-NCS-folate を用いた炎症部位の PET/CT イメージング

ウイルス感染マウスあるいは非感染マウスへ <sup>68</sup>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。

### (3) ウイルス感染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 ナノボディさらには抗 SFTSV ペプチドを感染後、種々の時間経過後のウイルス感染マウスあるいは非感染マウスへ投与して、<sup>18</sup>F-FDG、<sup>68</sup>Ga-citrate、<sup>111</sup>In 標識抗 SFTSV 抗体、あるいは <sup>68</sup>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

今回申請者らの対象としている新興再興感染症は、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、 $^{18}\text{F}$ -FDG や  $^{68}\text{Ga}$ -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.)。また、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、ウイルス性疾患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。すでに我々は前年度までの検討にて、抗 SFTSV IgG を用いて、FITC-IgG および  $^{111}\text{In}$ -IgG の開発に成功している。今後は FITC-IgG による高解像なウイルス感染細胞における蛍光イメージングと  $^{111}\text{In}$ -IgG を用いた病態モデルマウスにおける *in vivo* イメージングを組み合わせることで、切れ目ないライブイメージングが達成できることが期待される。また、 $^{18}\text{F}$ -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、さらなる詳細なウイルス感染における病態ダイナミクスの解析が可能となる。さらに、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、新たなウイルス性疾患の治療法開発へとつながるものと大いに期待される。我々はこれまでにペプチド医薬に関する研究を行っており、がんなどの疾患の診断や治療のための効果的な有用な分子を開発してきた (Itagaku, *Peptide Science* 2016, *Fukushima Peptide Science* 2016, 淵上 剛志, 特願 2017-205389.)。従って、これまでに抗ウイルス療法として報告されてきた既存の手法に加えて、新たな SFTS の治療法開発へと展開できるものと期待される。また、上記のウイルスは BSL-3 あるいは BSL-2 に分類されており、我が国では特に BSL-3 感染動物に関して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

#### (1) SFTSV の N タンパク質に対するマウス抗体の作成

SFTSV の N タンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの大量培養を行った後に、アフィニティ精製カラム HiTrap Protein G Hp (GE Healthcare) にて抗体を精製した。

#### (2) Vero E6 細胞を用いた抗 SFTSV 抗体の免疫蛍光染色実験

SFTSV 感染あるいは非感染 Vero E6 細胞に対して、一次抗体として抗 N タンパク質抗体 (N-4A10, N-1C3) を用い、二次抗体に Alexa Fluor 488 標識 Goat anti-Mouse IgG を用いた免疫蛍光染色を行った。

#### (3) <sup>111</sup>In 標識抗体の合成検討

抗 N タンパク質抗体あるいはマウスコントロール IgG (CIgG) と p-SCN-Bn-DTPA をモル比率 1:10 で反応させ、DTPA 修飾抗体を合成し、MALDI-TOF-MS にて解析を行った。

DTPA-IgG を 0.1 M HEPES (pH 5.5)、0.1 M MES (pH 5.5)、あるいは 3 M NH<sub>4</sub>OAc (最終 pH 5.5) に溶解させ、<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (5-20 MBq) を加えて室温にて 20-60 分間反応を行った(最終濃度 200 μg/mL)。0.1 M EDTA にて反応を終了させたのち、PD-10 Column (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにて精製し、<sup>111</sup>In 標識抗体を得た。

#### (4) SFTSV 感染細胞への <sup>111</sup>In 標識抗体の結合実験

固定化処理のみあるいは固定化処理および膜透過処理を行った SFTSV 感染あるいは非感染 Vero E6 細胞に対する <sup>111</sup>In 標識体 (<sup>111</sup>In-DTPA-N-4A10、<sup>111</sup>In-DTPA-CIgG) を用いた抗体免疫染色を行った。

### ②成果 (結果+考察)

前年度までに、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 モノクローナル抗体を用い、SFTSV 感染あるいは非感染の Vero E6 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 (N-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が、Gn タンパク質標的 IgG (GN-2D4) では集積が低く、Gc タンパク質標的 IgG (GC-3B4) ではほぼ集積を示さなかった。

そこで今年度はさらに N タンパク質を標的とした別のクローンに関しても検討を行った。その結果、N-4A10 および N-1C3 いずれのモノクローナル抗体も SFTSV 感染細胞に高い結合性を示す一方、非感染細胞と比べて顕著な結合の上昇は確認されなかった。一方で、N-4A10 の方がより蛍光シグナルが強く、さらにハイブリドーマからの抗体産生量も多いことから、N-4A10 を用いて今後の検討を行うこととした。

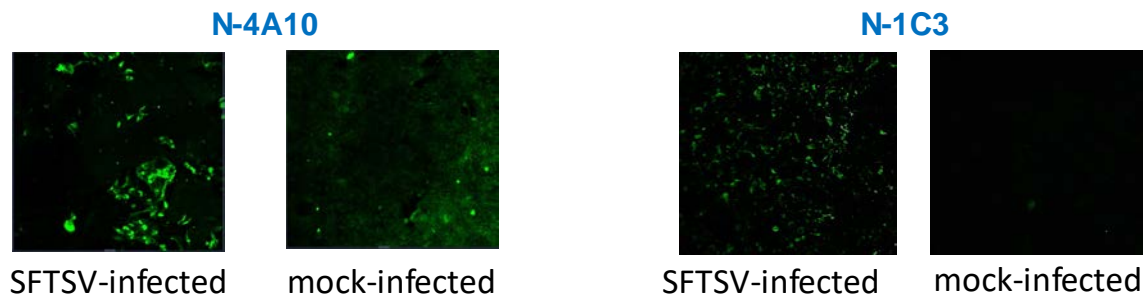


図2 SFTSV 感染 Vero E6 細胞における抗 SFTSV 抗体の免疫染色像

N-4A10 あるいは CIgG に p-SCN-Bn-DTPA を反応させ、それぞれ DTPA-N-4A10 あるいは DTPA-CIgG を得た。これらの DTPA 修飾抗体は、MALDI-TOF-MS を用いた検討により、1 分子の抗体に平均で 2 分子程度の DTPA が結合しているものと推測された。

次に、それぞれの DTPA 修飾抗体に様々な buffer を用いた標識効率の検討を行ったところ、MES buffer を用いて 20 分間反応させた条件が最も高収率で目的の  $^{111}\text{In}$  標識体 ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 あるいは  $^{111}\text{In}$ -DTPA-CIgG) が得られた。一方で、収率は 3-5% 程度と不十分であったため、今後の *in vivo* イメージングに用いるためには大幅な収率の向上が必要と考えられる。現在、 $^{111}\text{In}$  標識率の向上を目指し、現在 N-4A10 にさらに多くの DTPA を結合させた修飾抗体の作成および標識条件の最適化を行っている。

続いて、合成した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 および  $^{111}\text{In}$ -DTPA-CIgG を用いて SFTSV 感染細胞への集積実験を行ったところ、固定化及び膜透過処理した Vero E6 細胞において、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 は SFTS 感染細胞において非感染細胞に比べて有意に高い結合を示した。また、SFTSV 感染細胞への  $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 の結合に比べて、同じ感染細胞への  $^{111}\text{In}$ -DTPA-CIgG の結合は有意に低く、非感染細胞への結合とほぼ同程度であった(図 3 A)。従って、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 は、SFTS 感染細胞へ特異的に結合することが示唆された。また、固定化のみを行った細胞においても、同様の結果が示されたが(図 3 B)、SFTSV 感染細胞への  $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 の結合は、膜透過処理を行わないことで、低下することが示唆された。N タンパク質は、一般的に感染細胞内に存在していると考えられるが、一部は細胞外に露出しているものと考えられる。本検討にて、膜透過処理を行わない細胞において、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 は、非感染細胞に比べて SFTS 感染細胞へ有意に高い結合を有していたことから、*in vivo* においても  $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 は、SFTSV 感染組織の細胞外における N タンパク質に特異的に結合することが期待される。

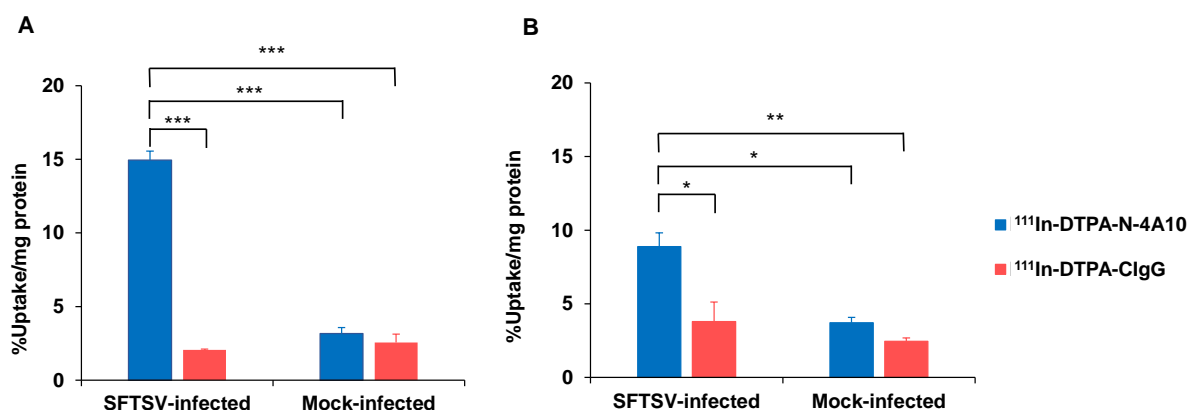


図3 SFTSV 感染あるいは非感染 Vero E6 細胞への <sup>111</sup>In 標識抗体の結合実験

(A) 固定化および膜透過処理後の細胞への <sup>111</sup>In 標識抗体結合

(B) 固定化後の細胞への <sup>111</sup>In 標識抗体結合

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 (ANOVA, Tukey's post hoc, P<0.05).

以上、本研究において、N タンパク質を特異的に認識する <sup>111</sup>In-DTPA-N-4A10 を見出した。今後のさらなる SFTSV 感染マウス等を用いた小動物 SPECT/CT イメージングにて、<sup>111</sup>In-DTPA-N-4A10 が SFTSV 感染症における病態の経時変化を非侵襲的に捉えることが可能であるかの詳細な検討を行う。

### ③成果の公表

#### 総説

- 1) Fuchigami T, Development of molecular probes for live imaging of cancer and infectious diseases. *Yakugaku Zasshi*, **139**, 1531-1538 (2019).

#### 学会発表

- 1) Ryotaro Onoue, Takeshi Fuchigami, Tatsuya Nagaishi, Hokuto Ono, Kodai Nishi, Sakura Yoshida, Mamoru Haratake, Morio Nakayama : Development of Radiogallium-labeled Thieno Pyrimidine Derivatives an in vivo Imaging Agents Targeting Folate Receptors. 第 29 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2019) ,2019 年 5 月 31 日～6 月 1 日(大阪市)
- 2) 尾上 遼太郎, 淵上 剛志, 永石 龍, 小野 北斗, 西 弘大, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄: 葉酸代謝拮抗剤を母体化合物とする葉酸受容体生体イメージング剤の開発  
第 36 回日本薬学会九州支部大会,2019 年 11 月 16 日～11 月 17 日(長崎市)
- 3) 棚原 悠介, 淵上 剛志, 安藤 豪, Mya Myat Ngwe Tun, 早坂 大輔, 吉田 さくら, 中山 守雄 SFTS ウイルス感染症の SPECT による病態解析を目的とした <sup>111</sup>In 標識抗体の開発  
日本薬学会第 140 年会, 2020 年 3 月 25 日～3 月 28 日 (京都市)

## 6. 自己評価

本研究において、N タンパク質を特異的に認識する  $^{111}\text{In}$ -DTPA-N-4A10 を見出し、SFTSV 感染症の生体内での病態メカニズムを捉えることのできる SPECT イメージング剤としての有用性が示された。一方で、 $^{111}\text{In}$  標識抗体の合成法には課題が残った。次年度では、高収率での  $^{111}\text{In}$  標識抗体の合成法を確立させ、SFTSV 感染マウスにおける小動物 SPECT イメージングへと展開していきたい。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：キノン化合物の抗トリパノソーマ活性評価

課 題 番 号：2019-Ippan-15

2. 代 表 者：大山 要（長崎大学生命医科学域（薬学系） 准教授）

共同研究者：中嶋 幹郎（長崎大学生命医科学域（薬学系） 教授）

岸川 直哉（長崎大学生命医科学域（薬学系） 准教授）

栗山 正巳（長崎大学生命医科学域（薬学系） 准教授）

平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所 教授）

3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

シャーガス病 (*Trypanosoma cruzi*) の治療薬には現在、Benznidazole と Nifurtimox が使用されている。しかし、これらの薬剤は細胞内型の amastigote には効かず慢性期では効果がないとされている。嶋田らは、天然物の Komaroviquinone が抗トリパノソーマ活性をもつこと、これをリード化合物として合成した類似化合物の抗トリパノソーマ活性の検討結果からキノン構造が活性に重要であることを見出した (Suto & Shimada, Bioorg Med Chem Let 2015)。一方、申請者と共同研究者 (岸川) は vitamin K、ユビキノンやフェナンスレンキノンなどのキノン類を高感度に測定する手法を開発し、この過程で市販品と独自合成品を含め多種類のキノン化合物を保有するに至った。

そこで、本研究では申請者らが保有するキノン化合物群の抗トリパノソーマ活性を調べる。評価系には熱帯医学研究所 (熱研対応教員：平山・水上) が有するアメリカトリパノソーマの *in vitro* 培養システムを使用し、このシステムでキノン化合物の添加が、濃度依存的にトリパノソーマの数を減少させられるかを調べる。具体的には、培養液中への様々なキノン骨格を有する化合物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するとともに、各キノン化合物の細胞障害性もあわせて評価する。

### ②研究内容

本研究では 1,4-naphthoquinone などの 29 種類のキノン化合物について、*in vitro* 評価系で抗トリパノソーマ活性を調べる。検討には、トリパノソーマのヒト血流型である *trypomastigote* と細胞内型の amastigote の 2 つの形態を使用する。96 ウェルプレート内に準備したトリパノソーマ原虫を含む培養液にキノン化合物を添加し、37°C インキュベーター内で 72 時間培養する。添加群と非添加群の培養液を Alamarblue 染色しそれぞれの蛍光強度を調べる。

具体的には、29種類を  $10 \cdot 50 \mu\text{M}$  となるように DMSO 溶液にそれぞれ溶解し、*in vitro* 評価系で抗トリパノソーマ活性を調べる。この実験は 3 回行い、いずれも阻害率 (添加後の減少率) が 50% 以上となる化合物の有無を調べる。阻害率 50% 以上を示したキノン化合物については、より詳細に濃度を設定し ( $1.6 \cdot 3.1 \cdot 6.3 \cdot 12.5 \cdot 25 \cdot 50 \mu\text{M}$ )、 $\text{IC}_{50}$  を算出する。ここでは *in vitro* 評価系で使用する AMB 細胞を正常細胞と考え、それに対する障害性を調べ、生体内での細胞障害性 ( $\text{CC}_{50}$ ) も推定する。そして、SI 比 ( $\text{IC}_{50} / \text{CC}_{50}$ ) から細胞障害性が少なく抗トリパノソーマ活性が高い化合物を絞り込む。なお、DMSO のバックグランド効果とポジティブコントロール (Benznidazole) を使用することで、評価系が正確にワークしていることを確認する。

以上の評価で、有望と認められたキノン化合物についてはその共通性を有機化学的に考察し、構造活性相関をもとに、効果と毒性低減に優れた類縁化合物を推定する。

### ③ 予想される成果

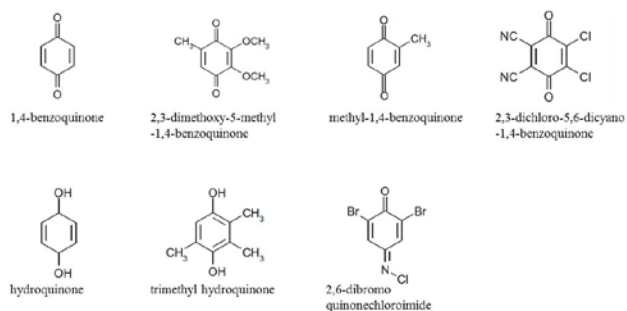
- ・トリパノソーマに対しては十分な効果を持つ薬剤が未だに少ないため、本研究から抗トリパノソーマ薬の創薬ターゲットにつながる可能性がある。
- ・本研究はヒト血流型である *trypomastigote* に加え、細胞内型の *amastigote* への活性も評価するため、これまで問題となってきた慢性期に対する治療薬の開発に発展しうる。
- ・キノン骨格を有する化合物のなかで抗トリパノソーマ活性を有するものに構造活性相関から規則性が見出されれば、活性が認められたキノン化合物をリードに複数の候補化合物を創製できる可能性がある。
- ・フィールド研究に精通する熟研教員 (平山・水上) が参加しており、基礎研究の成果の円滑な応用展開が期待できる。

## 5. 実施報告 :

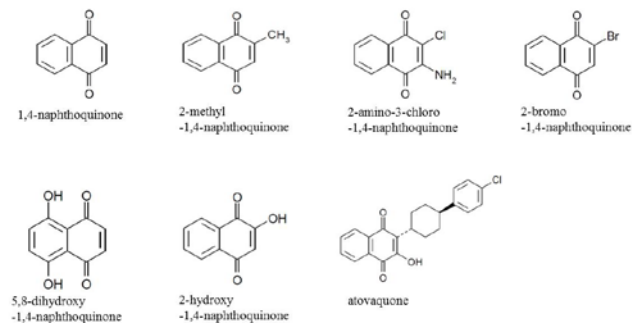
### ① 研究材料・方法・手続き

1,4-benzoquinones type (5 種), 1,4-hydroquinones type (2 種), 1,4-naphthoquinones type (7 種), 9,10-anthraquinones type (8 種), 1,2-diketones type (4 種) の抗トリパノソーマ活性をヒト血流型である *trypomastigote* を用いて *in vitro* で調べた。96 ウェルプレート内で増殖させた *Trypanosoma cruzi* を含む培養液にキノン化合物を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$  インキュベーター内で 72 時間培養した。添加群と非添加群の培養液を Alamarblue 染色しそれぞれの蛍光強度を調べた。本研究で評価した化合物の構造を以下に示す。

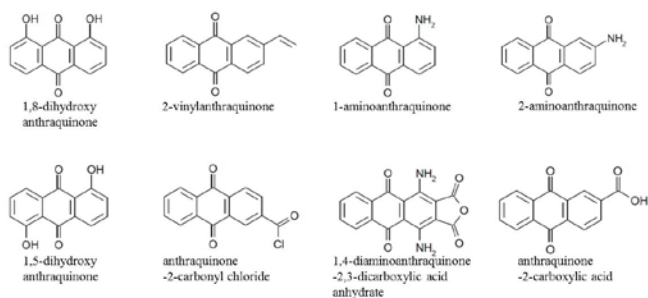
A) 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone type



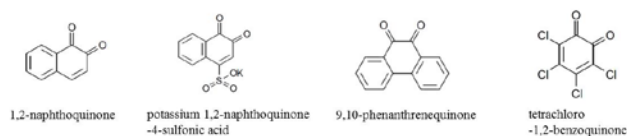
B) 1,4-naphthoquinone type



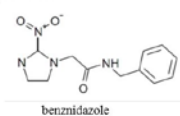
C) 9,10-anthraquinone type



D) 1,2-diketone type



E) control



②成果（結果＋考察）

26 種類のキノン含有化合物を調べた結果、9 つのキノン化合物が活性を示した ( $IC_{50} < 50 \mu M$ )。さらに、9 つのキノン化合物については、より詳細に濃度を検討し ( $0.8 \cdot 1.6 \cdot 3.1 \cdot 6.3 \cdot 12.5 \cdot 25 \cdot 50 \mu M$ )、 $IC_{50}$  を算出したところ、1,4-naphthoquinone 骨格を有するものの活性が高く、1,4-naphthoquinone 誘導体が有望な抗トリパノソーマ化合物であることが示された。また、活性酸素発生能が高い 9,10-phenanthrenequinone や 1,4-naphthoquinone 誘導体が 1,4-benzoquinone 誘導体よりも活性が高いことから、抗活性機序に活性酸素発生能が関与している可能性が考えられた。

③成果の公表

来年度の研究成果を含めて国際学術雑誌に論文投稿する予定である。



## 6. 自己評価

本年度はヒト血流型である *trypomastigote* の形態を使用した評価で、26 種類のキノン化合物で活性に違いが認められたため、抗トリパノソーマ活性を調べる *in vitro* 評価系を構築できたと考えている。この成果は本年度の到達目標としていたもので、予想通りの成果を挙げられたと評価できる。AMB 細胞を使った細胞障害性評価、SI 比の算出、構造活性相関をもとに効果と毒性低減にすぐれた類縁化合物の推定を来年度予定している。本年度の技術的・実験的情報をもとに取り組むことでこれらの達成は十分に可能と予想している。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：コンゴ民主共和国の通学児童における不顕性マラリア感染の実態調査とその影響

課 題 番 号：2019-Ippan-16

2. 代 表 者：美田 敏宏（順天堂大学医学部 教授）

共同研究者：池田 美恵（順天堂大学医学部 博士研究員）

Balikagala Betty（順天堂大学医学部 博士研究員）

Richard Culleton（長崎大学熱帯医学研究所病理学分野 准教授）

3. 決 定 額：1,000 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

コンゴ民主共和国（Democratic Republic of Congo; DRC）は世界で2番目にマラリア患者の多い国であり、世界の年間マラリア発生数の10%を占める。しかし政情不安や経済的事情、さらには未整備の医療制度などにより、いまだ国民の多数がマラリア感染により死亡している。さらに同国のマラリア流行地域では、上記理由によりマラリア感染の実態を正確に把握されておらず、これが足かせとなり有効なマラリア対策の構築が進んでいない。とりわけ症状を呈していない不顕性のマラリア原虫感染患者においては感染源となるためその実態解明が必須だが、情報は不足しており不顕性感染患者に対する有効な対策が十分に打ち出せていない。本研究ではDRCの10歳前後の通学児童における不顕性マラリア感染の実態を顕性感染患者と比較することによって明らかにすることを目的とする。マラリア疫学が異なることが想定される複数の地域で疫学調査を実施し、顕性・非顕性患者の頻度、マラリア原虫種、種の重複感染の傾向について明らかにするとともに、親権者についてもマラリアに対する意識調査を行うことで、マラリア感染の拡大につながる要因を多角的に検証する。

### ②研究内容

現地調査：DRC国内の地理的に異なる4つの地区を調査予定地とする。被験者は、小中学校に通学する児童（各地域で計800名）、保護者（各地域で計800名）である。児童から、採血と身体計測を実施する。さらに保護者を対象に質問紙を用いて、①被験者（児童）の生活環境に関する調査、②マラリアに対する知識や認識に関する調査を実施する。

分子疫学的実験：血液検定から原虫DNAを抽出し、調査地域の子供のマラリアの罹患率、顕性と不顕性感染の割合を明らかにするとともに、同時に感染しているマラリア種の同定や薬剤耐性マーカーを調べることで、地域のマラリアの特徴を明らかにする。

統計解析：フリーソフトである R を使用して、以下の項目について、単変量、もしくは多変量解析にて相関性を検証する。①保護者のマラリアに対する知識と子供の罹患率との相関性、②生活環境や経済状態と子供のマラリア罹患率との相関性、③罹患率、感染しているマラリア種や薬剤耐性マーカーと地域的特性、④マラリア感染を促進する要因の特定とその地域的特性の検証。

### ③予想される成果

受け入れ研究者のカレトン博士が 2005 年に DRC の隣国であるコンゴ共和国の首都ブラザビルで実施した調査では、地域内の都市化の進んだ地域とその周辺地域を対象とし、顕微鏡診断での感染率、不顕性患者の割合、薬剤耐性マーカーに差が見られていた。一方、原虫の集団構造は観察されていなかった。今回の検討では、調査対象地域が地理的に離れており、不顕性患者の割合や薬剤耐性マーカーに差異が出るのが予想される。一方、原虫の集団構造の有無は予想がつかず、興味深い。さらに、前回調査でわずか 3%しか観察されなかった四日熱マラリアがどの程度見られるのか、熱帯熱マラリアとの同時感染率がどうなっているのかも注目している。今回は、疫学的な実態調査の原因を探るべく KAP サーベイも同時並行して実施するため、実態と要因についての情報が得られる。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

2019年10月22日から11月23日の1か月間、コンゴ民主共和国の首都キンシャサにおいてフィールド調査を行った。2つのヘルスゾーン（Selembao：都市部とMont-Ngafula2：農村部）から小学校を1校ずつ選定し、それぞれの小学校に通学している児童と、サンタンヌ キトキモシヘルスセンターに外来通院で訪れた小児患者、合わせて635名を対象とした。



農村部のエドモンド小学校（私立）



都市部の公立小学校



サンタンヌ キトキモシヘルスセンター（検査室と外来）



本研究は、“通学児童における不顕性マラリア感染の実態調査”を目的としているため、対象年齢を6-14歳に設定し、マラリア様症状を呈する児童と症状を呈さない児童それぞれを対象者に含めて調査を行っている。両親からの同意を得た後に健診を行い、問診とマラリア検査を行った。小学校並びにヘルスセンターでの健診時は迅速診断キット（CareStart Malaria kit）：RDTを用いたマラリア検査を行い、顕微鏡検査と検体の管理はキンボンゴ総合病院とキンシャサ大学の熱帯医学分野に依頼した。



小学校における問診とRDT検査の様子

ろ紙に保存した血液検体からゲノム DNA を抽出し、現在、マラリア DNA の検出とその種の同定を目的とした PCR を行っている。この分子疫学的実験により調査地域の小児マラリアの罹患率、顕性と不顕性感染の割合を明らかにするとともに、薬剤耐性マーカーを調べることで、地域のマラリアの特徴を明らかにしていく。

### ②成果（結果＋考察）

本研究課題は、長崎大学熱帯医学研究所とコンゴ民主共和国の国立生物医学研究所、両倫理委員会承認されている（承認番号：190110208、ESP/CE/042/2019）。

対象者の性別、年齢、発熱症状と、迅速診断キット・顕微鏡検査の結果を下の表に示す。有症状児童 208 名のうち、顕微鏡検査によるマラリア陽性者は 124 名（59.6%）で陰性者は 84 名（40.4%）であった。また、迅速診断キットによる陽性者は 134 名（64.4%）で陰性者が 74 名（35.6%）であった。一方、無症状児童 427 名のうち、顕微鏡検査によるマラリア陽性者は 140 名（32.8%）で陰性者は 287 名（67.2%）であった。迅速診断キットでは陽性者が 177 名（41.5%）、陰性者が 250 名（58.5%）という結果となった。つまりこの結果は、無症状児童の約 40%がマラリアに感染していることを示している。現在行っている PCR の結果では、さらに陽性率が高い結果を得る可能性もある。今後はさらに、薬剤耐性マラリアが調査地であるキンシャサに浸潤している可能性やその蔓延率についても検証を続けていく。

性別		年齢		症状		迅速診断キット		顕微鏡検査	
男子	女子	6-8 歳	9-14 歳	なし	あり	陰性	陽性	陰性	陽性
314 (49.4)	321 (50.6)	202 (31.8)	333 (68.2)	427 (67.2)	208 (32.8)	324 (51.0)	311 (49.0)	371 (58.4)	264 (41.6)

### ③成果の公表

通学児童におけるマラリア蔓延率や不顕性感染率に関しては、本年中に *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* への投稿を予定している。また、今後、薬剤耐性マラリアが検出されれば、その成果を *Malaria Journal* へ投稿することも考えている。

## 6. 自己評価

本研究課題は、熱帯医学研究所及びコンゴ民主共和国の国立生物医学研究所における倫理委員会において問題なく承認され、予定通りフィールド調査を開始することができた。当初はコンゴ民主共和国内の広い範囲を対象地域としていたが、エボラ出血熱が同国内で再度発生したため、キンシャサ内に限定した調査となった。現地ヘルスセンターとの連携により、キンシャサ内でも都市部と農村部からそれぞれ指定校を選定することができたため、特に大きな影響は受けなかった。現在、ろ紙血からマラリア DNA の検出とマラリア種の特定を進めている。サンプル数が多く、またマラリア陽性数が想定よりも多かったため、PCR に時間がかかっているが、大幅な遅れはない。種の特定が終わり次第、薬剤耐性マラリアの検出に取り掛かることができ、進捗としては順調である。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：人獣共通感染性の肝蛭症に対する新規薬剤の探索  
課題番号：2019-Ippan-17
2. 代表者：関 まどか（岩手大学 農学部 共同獣医学科）  
共同研究者：北 潔（長崎大学熱帯医学研究所 教授）  
稲岡 健ダニエル（長崎大学熱帯医学研究所 准教授）
3. 決定額：500 千円
4. 申請時書類より  
①研究目的

### 【背景】

肝蛭（かんてつ）（図 1）は人獣共通感染性の寄生虫である。畜産業には年間 32 億ドル以上という吸虫類では最大の経済被害を与えている。ヒトは水耕野菜や感染動物の生レバーに付着した幼虫を経口的に摂取すると感染し、肝蛭が肝臓に寄生することで重篤な肝障害を引き起こされる。WHO によれば、途上国を中心に世界中で少なくとも 240 万人が肝蛭に感染し、1 億 8000 万人に感染リスクがあると見積もられている。

WHO は治療薬としてトリクラベンダゾールを唯一推奨しているが、ヨーロッパ、オーストラリア、南米など世界各地でトリクラベンダゾール耐性虫体が出現し問題となっている（Kelley et al. 2016）。耐性の獲得機序は全く解明されていないため、薬剤耐性虫体に対して打つ手がなく、新規薬剤の開発は喫緊の課題である。

トリクラベンダゾールに代わる新規薬剤の開発に成功すれば、年間 2 億ドル以上の経済価値が見込まれる。

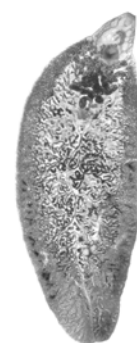


図 1. 肝蛭(成虫)  
染色標本：実物大

### 【目的】

哺乳類はミトコンドリア呼吸鎖で酸素を消費する酸素呼吸によりエネルギーを産生する。一方、哺乳類の体内という低酸素環境に適応した寄生虫は酸素を消費しない嫌気呼吸によりエネルギーを産生する。このような寄生虫特異的な嫌氣的呼吸鎖は、哺乳類のそれとは生化学的特性が大きく異なるので、選択的な化学療法のターゲットとして有望である。そこで、本研究ではミトコンドリア呼吸鎖を標的とする新規薬剤を探索する。

## ②研究内容

申請者らは、これまでに肝蛭では哺乳類の酸素呼吸とは逆反応のフマル酸呼吸によりエネルギーを産生することを見出した(図2)。さらに、フマル酸呼吸の阻害剤により、*in vitro* 培養系で肝蛭の幼虫を効果的に殺滅できることを見出した(2018年日本生化学会シンポジウム講演、International Congress of Parasitology 2018 口頭発表、論文投稿準備中)。

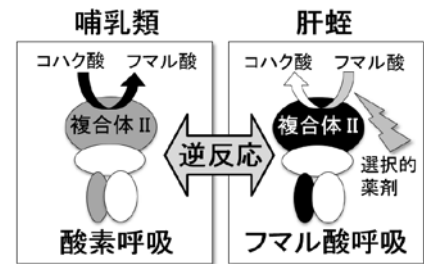


図2. 肝蛭における薬剤標的

### 【本研究で解決する課題】

- (1) フマル酸呼吸を標的とした化合物の中から、最近申請者らが確立した *in vitro* 薬剤スクリーニング系(図3)により、有望な化合物を絞り込む。
- (2) 実験動物を用いた *in vivo* 試験により、候補化合物の成虫に対する駆虫効果、および幼虫に対する駆虫効果を解析する。特に、幼虫に対する効果を確認することは感染予防の観点から重要である。

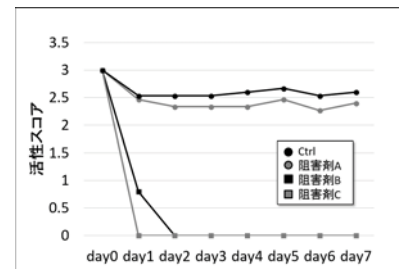


図3. 幼虫を用いた *in vitro* 試験

## ③予想される成果

### 【本研究の将来性】

前述したように、世界各地でトリクラベンダゾール耐性肝蛭が出現しており、新規薬剤の開発は喫緊の課題である。トリクラベンダゾールに代わる予防法の開発には2億ドルもの経済価値があると見積もられている。

南米のペルーではトリクラベンダゾール耐性肝蛭の感染が家畜だけでなくヒトからも頻繁に報告されている。申請者は、ペルーで肝蛭症の調査研究を専門とする研究者 Dr. Pedro Ortiz (業績10) や Dr. Daniel Alexis Zarate Rendon と協力関係にあり、新規薬剤の開発を実現した後に、臨床試験を実施する環境が整っている。

### 【本研究の独創性・発展性】

申請者は肝蛭の生活環を中間宿主巻貝と実験動物を用いて実験室内で維持することに数年間を費やした末に成功した。安定した実験室株を有する研究室は世界的にもほとんど存在しないため、吸虫類の薬剤開発はこれまで進んでこなかった。申請者の実験室系は、肝蛭の薬剤耐性の問題を解決することにとどまらず、世界的に見ても寄生吸虫類の薬剤開発のモデルケースとなる先駆的な研究成果につながるため、そのインパクトは計り知れない。



## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

#### (1) *in vitro* 薬剤スクリーニング系による候補化合物の絞り込み

*In vitro* 培養系で各候補化合物（アスコフラノン: AF、アルコフラノン誘導体: AF-d、化合物 X）の肝蛭の幼虫に対する殺滅効果を評価した。申請者らの研究により、幼虫は酸素を消費する酸素呼吸（好気条件）と嫌気呼吸（低酸素条件）を切り替えることが判明したので、スクリーニングは両条件下で実施した。候補化合物の殺滅効果の評価には幼虫の活性スコアを用いた。

#### (2) 実験動物を用いた *in vivo* 試験

本年度は候補化合物の投与試験に向け、予備的な条件検討を実施した。幼虫に対する駆虫効果を検討するために、マウスの感染系を確立した。幼虫に対する感受性、駆虫効果の評価するために適切な解剖時期、幼虫の検索方法を検討した。また、ICR と BALb/c を比較し、最適な系統を決定した。

### ②成果（結果＋考察）

#### (1) *in vitro* 薬剤スクリーニング系による候補化合物の絞り込み（図 4）

AF は好気、嫌気の両条件下で 10 $\mu$ M では効果は無く、100 $\mu$ M では緩やかな殺滅効果を示した。AF-d は好気条件下で 10 $\mu$ M と 100 $\mu$ M の両濃度で殺滅が強かったが、嫌気条件では 100 $\mu$ M が高い効果を示したのに対し、10 $\mu$ M の効果は低かった。化合物 X は好気条件の両濃度で強い効果を示した一方、嫌気条件では 10 $\mu$ M は効果が無く、100 $\mu$ M で強い効果を示した。以上のことから、AF-d と化合物 X が新規薬剤候補として有望であると考えられた。

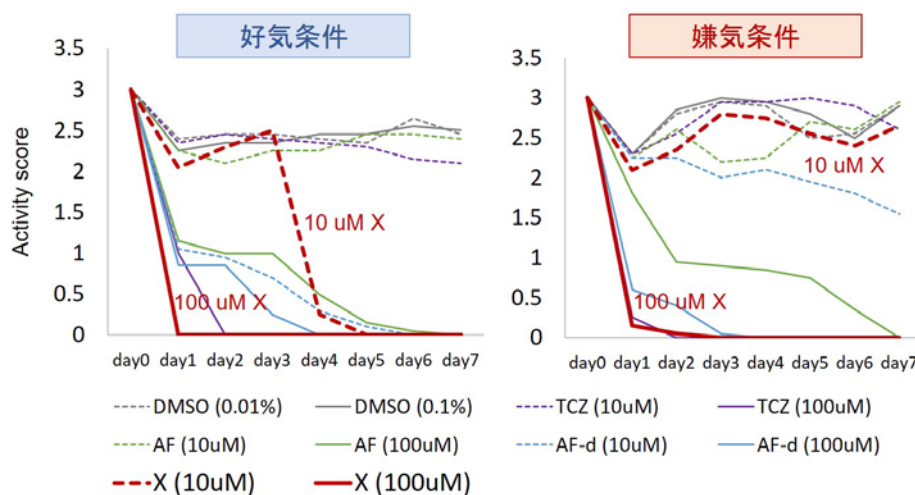


図 4. 幼虫を用いた *in vitro* 試験（結果）

#### (2) 実験動物を用いた *in vivo* 試験

ICR と BALb/c を比較した結果、幼虫の回収数が多く、幼虫の体内移行に伴う腹水貯留や肝臓の創傷性病変の評価も容易であったことから、ICR を *in vivo* 試験に用いることとした。

また、幼虫 20 匹の経口感染後、2 週間で十分な数の感染虫体を回収でき、4 週間で腹水貯留の病変が明確になることから、幼虫 20 匹の感染後、2 週間で投薬し、4 週間でエンドポイントとするスケジュールが駆虫効果を評価するために最適な感染条件・スケジュールであると考えられた。

今後、成虫に対する駆虫効果や、幼虫に対する感染予防の投薬スケジュールも検討したい。

### ③成果の公表

該当なし

## 6. 自己評価

有望な候補化合物を絞り込むことに成功し、*in vivo* 試験の条件も検討できたので、一定の成果を挙げられたと考えている。一方、本年度中に *in vivo* 試験の実施を予定していたが、研究代表者の産前・産後休暇の取得に伴い、実験スケジュールがやや遅れ、*in vivo* 試験の予備的検討までしか実施できなかった。今年度達成できなかった課題を来年度は着実に遂行したい。また、業績として論文を投稿することも達成したい。

## 7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

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

## 令和元（2019）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：2019-Ippan-18

2. 代 表 者：頼藤 貴志（岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科  
社会環境生命科学専攻 疫学・衛生学分野 教授）

共同研究者：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 大学院生）

松本 尚美（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生）

和田 崇之（長崎大学熱帯医学研究所国際保健学分野 准教授）

3. 決 定 額：1,000 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（図 1）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。予防医学的には、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。

前年度における資料調査により、本研究課題で扱う母子データには、詳細な居住地情報（区域、村落の名称）が含まれていることが確認された。そこで本年度は、これらを GIS で利用できるようにするために、各村落の位置情報（緯経度）を現地調査に

よって収集する。これを元に、同地域の大气汚染、気候データなど既存の地理情報を母子健康のアウトカムと関連付ける。

## ② 研究内容

今年度は、既に収集された上記データセットを基に、記述統計による早産児の出生割合・年次別出生割合の変化、ロジスティック回帰分析を用いた母体年齢・母体体格・出生前健診などの要因と早産児出生の関連、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。これらの得られた結果を基に、学会報告や学術誌への投稿を行う。更に、新たな試みとして、ミビリジ地域の各村落の位置情報（緯経度）を現地調査によって収集し、データセットとのリンクを行い、同地域の大气汚染、気候データなど既存の地理情報を母子健康のアウトカムと関連付ける。特に、大气汚染と早産児出生の関連を評価する。

## 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 10,000 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

#### 研究材料

ルワンダ共和国公立ミビリジ病院において 2011 年～2016 年に出生した全出生児のデータから作成したデータセット

#### 方法・手続き

- ① 記述統計による早産児の出生割合・年次別出生割合の変化を評価した。
- ② ロジスティック回帰分析を用いた母体年齢・母体体格・出生前健診などの要因と早産児出生の関連、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）との関連を評価した。
- ③ 更に、同地域の大气汚染など既存の情報を上記データセットにリンクさせ、大

気汚染と母子健康のアウトカム（特に早産児出生）との関連を評価するためのデータセットを作成した。

## ②成果（結果＋考察）

記述分析の後、本データより、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。本結果について、学術論文へ投稿中である。

また、大気汚染データを割り振ったデータベースを用い、大気汚染と母子健康のアウトカム（特に早産児出生）との関連を評価する粗解析を行った。

更に、2019年9月15日から9月23日の日程でルワンダ共和国を訪問。現地研究者との打ち合わせや情報収集を行った。今後の母児データ収集の必要性から、パイロット的にルワンダ共和国首都キガリ市内にある小中学校で学校健康診断を実施し、ここからもデータを取る準備を始めた。

## ③成果の公表

本解析については、学術論文へ投稿中である。

## 6. 自己評価

本解析終了、受理はまだだが、論文投稿を行えた。更に、次の解析に着手できている。また現地を訪問し、今後の研究の方向性を検討することができた。よって、評価としては予想通りの成果と思われる。

## 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

## 令和元（2019）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：2019-Ippan-19

2. 代 表 者：金 京純（鳥取大学農学部共同獣医学科 准教授）  
共同研究者：比嘉 由紀子（国立感染症研究所 室長）  
津田 良夫（(申請当時) 国立感染症研究所 嘱託職員、  
（現）レック株式会社）  
二見 恭子（長崎大学熱帯医学研究所病害動物学分野 助教）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

蚊はヒトの病原体だけでなく、様々な動物の寄生生物を媒介している。また蚊を宿主とする寄生生物も存在する。しかし、ヒトの病原体以外の寄生生物についてはほとんど注目されることがない。自然界で蚊がどのような寄生生物を保持しているかを調べることは、媒介動物の生態学において新知見をもたらすだけでなく、教育面でもヒトへの感染リスクのない熱帯医学の実習材料の開発につながることを期待される。中でもトリマラリアは、国内外で野生・飼育下共に鳥類での感染が認められており、特に動物園等の飼育動物への被害で問題視されている。代表者はこれまで、日本国内でトリマラリア原虫の感染率と原虫系統を調べ、国内では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%を超えることを明らかにしてきた。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。これまで代表者らは、東京、新潟、西表島、及び鳥取大学内で調査を行い、それら全ての地域でトリマラリアが検出されている。九州では大分県の動物展示施設において、トリマラリア感染によるペンギンの大量死の報告があり、渡り鳥の中継地点でもある長崎には他県とは異なる系統のマラリアが侵入している可能性もある。長崎県には鳥類を飼育する施設としてペンギン水族館やバイオパークがあり、これらの施設でトリマラリアが流行すれば経営に深刻な影響が出ることも予想される。そのため、事前に周辺の媒介蚊相や感染率を明らかにすることは、将来的なコントロールに有効である。

一方で、トリマラリアはヒトマラリアと同様にオーシスト・スポロゾイトを経由するが、ヒトへの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い、あるいは十分量の媒介蚊を得ることができれば、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安全に行うことが可能であろう。

本研究では、2018年度に引き続き、長崎大学坂本キャンパス内及び東長崎・西海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

2019年度は、教育的側面を考慮し、2018年度と同様に長崎大学坂本キャンパスでの採集を継続する。ただし、ドライアイストラップの数を減らし、グラビッドトラップ（産卵に来たメスを採集するトラップ）を新たに設置する。これは、吸血経験のあるメスを選択的に採集することで、トリマラリアの検出率が上がると期待されるためである。さらに、鳥類に対する被害が予想されるペンギン水族館とバイオパーク周辺での調査を試みる。これまでの坂本キャンパス内での調査では、トリマラリアの主要媒介蚊であるアカイエカ種群の密度が低く、また感染が広がっても社会的な影響は大きいとは言えない。しかし、上記2施設では国外から移入された鳥類が多く、トリマラリア感染による被害が危惧されるため、学術目的だけではなく、リスク管理及び地域貢献の観点からも調査が必要と考えられる。施設周辺地域へのトラップ設置を予定しているが、施設との調整次第では施設内へのトラップ設置を検討する。また採集期間は4～12月と延長し、チカイエカの採集も試みる。これらの地点で採集されたメス成虫について、2018年度同様、種同定後、解剖やPCRによってトリマラリア感染の有無を確認する。さらに、これまでのPCR結果から、ターゲットの長さ（524bp）ではないが、1000bp程度の非特異的、しかし明瞭な産物が低頻度で認められている。同様の産物が他地域でも認められていることから、これらは他種寄生あるいは共生生物である可能性も考えられる。そこで、まずはこの非特異的PCR産物のシーケンスを行い、寄生または共生生物である可能性を検討する。

2019年度も、熱帯医学研修過程及び熱帯医学専攻修士課程の学生実習において、トラップの設置から回収、種同定、解剖までの一連の流れを学生に指導する。また、希望があれば、熱研研究者への媒介蚊採集方法の指導を引き受けることも検討している。

### ③予想される成果

これまでのところ、我々の調査ではトリマラリアは確認されていないが、引き続き調査を行うことで感染が認められる可能性がある。感染が確認されれば長崎県で初めての例であり、感染率や媒介蚊種、マラリア系統などを他地域と比較することができる。その結果は、国内の感染状況を把握するだけでなく、媒介蚊侵入の可能性や蚊とマラリア系統の適合性の解明など、さらなる研究テーマへと発展させることも可能である。

一方で、トリマラリアによる被害が大きいと予想される施設周辺の媒介蚊相を、年間を通して明らかにすることができるため、今後のリスク予測に有効である。さらに、トリマラリアが検出された場合、これらの施設における鳥マラリア感染の危険性についても注意を促すことが可能になる。

学生実習においては、前年同様、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させることができる。また、オーシスト・スポロゾイトの観察は熱研の実習では困難であったが、安全に観察することが可能になると期待している。



5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

5-10月の6ヶ月間、坂本キャンパス内に4個のCDCドライアイストラップを毎月2晩設置した(48 trap nights)。また、同キャンパス内に3個のグラビッドトラップを6、7、9月の3ヶ月間で、56 trap nights設置した(Fig. 1)。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。中腸はマイクロチューブに移し、 $-25^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存した。回収時に死亡していた個体は、種同定後、同様に冷凍庫に保存した。これらのサンプルは、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 $-25^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存した。

また、5月にペンギン水族館に調査の申請を行い、トラップの設置が許可された。そこで、6-10月の5ヶ月間、ペンギン水族館敷地内に6個のトラップを設置した(Fig. 2)。CDCドライアイストラップは、敷地内ビオトープ隣のゲート横およびペンギン舎裏に、CDCライトトラップはフンボルトペンギン舎内およびケーブペンギン舎内に、毎月2晩設置した(各20 trap nights)。さらに、グラビッドトラップを、長崎総合科学大学グラウンド横の地上および川沿いの林内地上に2晩と2日間(48h)設置した(40 trap nights)。採集された雌は前述と同様に解剖し、冷凍庫に保存した。

得られた種数および個体数から、各サイトおよびトラップ形態ごとの密度(1トラップ一晩あたりの個体数)とSimon's indexを計算した。これらの解析は、メスのみ



Figure 1. 坂本キャンパス内およびペンギン水族館敷地内のトラップ設置場所。



Figure 2. ペンギン水族館に設置したトラップ。

のデータで行った。

2017-2019年の3年間で坂本キャンパス、本尾公園、西山水源地、ペンギン水族館などで採集したメスサンプルと中腸のサンプルからDNAを抽出し、鳥マラリア検出のためのnested PCRを行なった。抽出はREDExtract-N-Amp (Sigma-Aldrich)またはDNEasy (QIAGEN)を用い、nested PCRはWeldenström et al. (2004)及びKim et al. (2010)の手法を改変した。PCR産物は2%アガロースゲルで泳動し、バンドの有無を確認した。また、2019年に採集した吸血メスについては、腹部からDNAをREDExtract-N-Ampで抽出したのち、鳥類または哺乳類のプライマーで増幅し、吸血源を決定するためにシーケンスを行なった。

## ②成果（結果+考察）

坂本キャンパスおよびペンギン水族館での合計184回の採集において、419個体のメス成虫が採集された。グビロガ丘(No. 1-3)では36トラップ夜数で195個体、TMGH裏のトラップ(No. 4)では12トラップ夜数の設置で40個体、熱研周辺のグラビッドトラップ(No. 5, 12, 13)では56トラップ夜数で128個体、ペンギン水族館(No. 6-11)では80トラップ夜数で56個体が採集された。1トラップ一晩の個体数を採集密度として、それぞれの地点のトラップ種類ごとに計算すると、坂本キャンパス内での密度はペンギン水族館に比べて総じて高く、特にグビロガ丘で最も高かった。また、グビロガ丘では4種、TMGH裏では5種、熱研周辺では3種、ペンギン水族館では7種(未同定のハマダラカ sp.を含む)が認められた。多様性の尺度であるSimpson's Dを計算したところ、TMGH(0.55)と熱研周辺(0.55)のグラビッドトラップで高く、グビロガ丘(0.30)で低かった。ペンギン水族館では中間的な値(0.38)を示した(Fig. 3)。また、トラップの種類ごとで採集数を見ると、98%以上がドライアイストラップとグラビッドトラップで採集された。ドライアイストラップでは8種250個体が採集

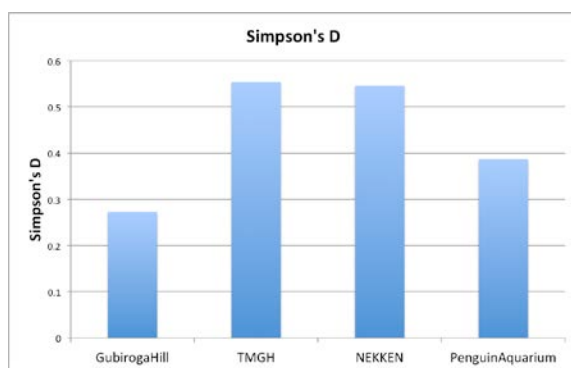


Figure 3. 各採集地点におけるSimpson's D。

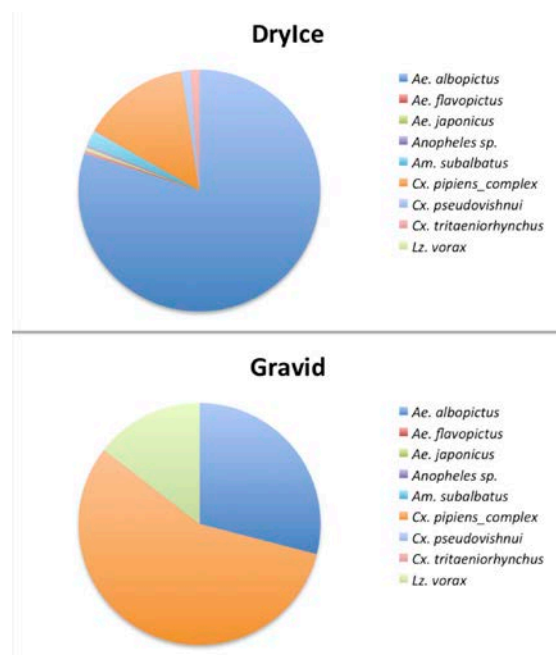


Figure 4. ドライアイストラップとグラビッドトラップの種構成。

され、優占種はヒトスジシマカであった(Fig. 4)。一方、グラビッドトラップでは3種124個体が採集され、優占種はアカイエカ種群であり、さらにトラフカクイカが多く採集された(Fig. 4)。

2019年には202個体を解剖したが、1個体でのみオーシスト様の球体が中腸に確認された。これをnested PCRにかけたが増幅は認められなかったため、オーシストではないと考えられる。2017-2019年の3年間で得られた計1471個体556プール(各プール1~24個体)について、nested PCRによる鳥マラリア検出を行なった。その結果、5個体(5プール)で増幅が認められた(Fig. 5)。これらは全て2019年に熱研

周辺に設置したグラビッドトラップで採集されたトラフカクイカであった。したがって、本年のトラフカクイカの感染率は31%(全16プール(18個体))と非常に高く、熱研周辺だけで考えれば35%となった。6月、7月、9月のサンプルから、原虫が検出されており、流行が長期的に維持されている可能性がある。この5サンプルのcytb配列を決定したところ、全て同じハプロタイプであった。これは、*Plasmodium* 属のCXPIP12系統と100%一致した。この配列

は東京林試の森公園のアカイエカから検出されており(Kim & Tsuda 2012)、神奈川県、新潟県、沖縄県の野鳥からも検出されていることから、広く日本に分布する系統である可能性が示された。

ペンギン水族館のサンプルからは、鳥マラリア原虫は検出されていない。しかし、ペンギン舎内で採集された吸血蚊から鳥類のDNAが検出された。シーケンスにより配列を決定し鳥種を同定したところ、98%以上の一致率でフンボルトペンギンとケープペンギンと同定された。今回吸血源が同定された蚊はヒトスジシマカとコガタアカイエカであり、どちらも鳥マラリアのベクターとして報告がある。したがって、鳥マラリア原虫が侵入した場合に流行する可能性もあるだろう。水族館周辺ではトラフカクイカも採集されており、警戒は必要だと考えられる。

本研究で、長崎県で初めて鳥マラリア原虫が検出された。トラフカクイカは吸血源として鳥をよく好むため、鳥マラリア感染率が高いと考えられる。また、吸血経験のある個体を採集するグラビッドトラップは、鳥マラリア調査には適していることが示された。本年度は昨年度と手法を変更し、解剖時に原虫が認められなくても中腸をサンプルとして解析している。したがって、従来の方法で明らかにされているよりも、野外では鳥マラリアが流行していると考えられる。

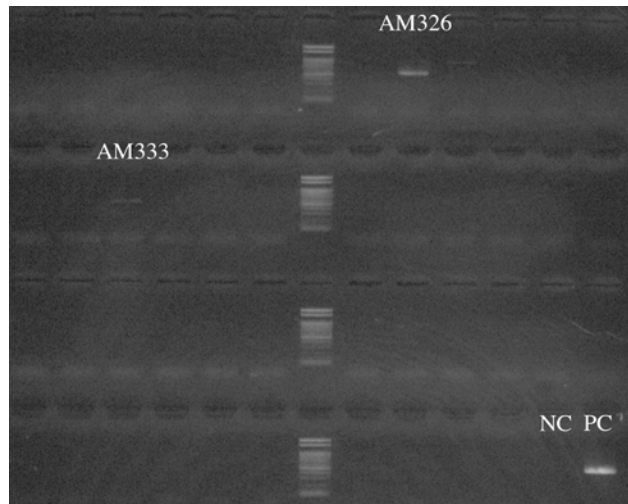


Figure 5. 泳動像。AM326とAM333にPCと同じ長さのバンドが検出されている。

### ③成果の公表

特になし。

## 6. 自己評価

2019年度の活動により、長崎県で初めて鳥マラリア原虫が検出された。今回、新規に導入した手法が、検出力を上げた要因であろう。まずグラビッドトラップは、吸血経験のある個体や、鳥マラリアのベクターとして知られているアカイエカ種群やトラフカクイカを効率よく採集することができることが示された。また、解剖個体も中腸をPCR検出に供することで検出力を上げることができた。以上のことから原虫が検出され、初期の目標は達成したと言える。また、2019年度は、長崎ペンギン水族館との共同研究を進めることができた。今後、長崎における鳥マラリア対策に協力していくことで、研究成果の地元への還元として意義のあるものとなるだろう。

しかし、昨年以降、課題となっている共生生物に関しては、未だ解析に至っていない。今後、これらの解析をどの様に行うか検討中である。

## 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

## 令和元（2019）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：2019-Ippan-20
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）  
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）  
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）  
Nguyen Thai Son（Hospital 103, Military Medical University,  
Vietnam・Associate Professor, Head of Microbiology Department）  
竹村 太地郎（長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点 助教）
3. 決 定 額：1,000 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原菌とは言え、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、研究分担者の矢原と菅井は国立感染症研究所薬剤耐性研究センター、柴山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來性 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専門は細菌学であり、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、研究分担者の菅井および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。熱研の受入研究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薬剤耐性研究センターのセンター長である菅井、および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。

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、患者の個人情報には 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因菌のみ扱う。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。

長崎大学ベトナム拠点と VMMU との協力体制の下に、軍医病院ネットワークを利用して国境付近を含む地方の医療機関の開拓を進める。地方においては細菌検査結果の信頼性が不高いため、基本的には、VMMU の基幹病院にて自動検査機器により再度、菌種同定と薬剤感受性試験を行う。Illumina 社 NGS にて CRE 株のゲノムデータを蓄積し、適宜、ONT 社 NGS にてリファレンスとなる菌株の完全なゲノム構造を構築し、カルバペネマーゼ遺伝子周辺の可動性遺伝因子の型別や、カルバペネマーゼ遺伝子が乗った伝達性プラスミド間の配列比較から、重要な AMR 遺伝子の伝播経緯を探索する。そして、ベトナムにおいて、耐性菌株、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。解析状況に応じて、ベトナム厚生省、NIHE、Oxford University Clinical Research Unit in Vietnam (OUCRU) など、同国内の他の機関とも連携して、耐性菌株のゲノム疫学解析の結果など、情報を共有する。

### 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。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。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。令和元年度は、令和元年 8 月および令和 2 年 2 月に長崎大学ベトナム拠点にて、研究代表者の鈴木は熱研の受入教員の竹村と研究打ち合わせを行った。

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）

ベトナム・ハノイの基幹病院で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 25 株のドラフトゲノム配列を決定し、うち *bla<sub>NDM-1</sub>* 遺伝子を持つ 12 株についてさらに保有プラスミドの完全塩基配列を決定した。これらの株では、プラスミド上に *bla<sub>NDM-1</sub>* 遺伝子に加え、臨床的に重要な第 3 世代セファロスポリン、アミノグリコシド、フルオロキノロンの耐性に関わる遺伝子をしばしば同一プラスミド上に有しており、多剤耐性となっていた。一部の菌株の間では菌種を超えて保有プラスミドに共通した構造が見られた。このため、ベトナムではこのようなプラスミドの伝播により多剤耐性に関わる遺伝子群が腸内細菌科細菌に拡散していることが考えられた。これらの結果を論文

にまとめ投稿した。令和 2 年 5 月の時点で、論文は査読中である (bioRxiv doi: 10.1101/2020.03.18.996710)。

またこれらの菌株を含むベトナム、カンボジア、国内分離腸内細菌科細菌株の情報について、菌株が分離された場所や時期、薬剤耐性遺伝子や薬剤感受性試験を含めた検体の情報ならびにゲノムデータを大阪大学 J-GRID タイ拠点で GenBank/DDBJ 内に構築したゲノムデータベース AMED CRE Consortium: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Asia (BioProject: PRJDB6372) に 155 件登録し、今後も登録を継続する予定である。

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、環境水中に存在する 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*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>) の検出を試みたところ、陽性株は少数であった。そのうち、*bla*<sub>OXA-48-like</sub> 遺伝子陽性 *Shewanella* 属菌株の解析を進め、J Glob Antimicrob Resist 誌に報告した。

### ③成果の公表

1. Nguyen NT, Takemura T, Pham AHQ, Tran HT, Vu KCT, Tu ND, Huong LT, Cuong NT, Kasuga I, Hasebe F, Suzuki M. Whole-genome sequencing and comparative genomic analysis of *Shewanella xiamenensis* strains carrying *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genes isolated from a water environment in Vietnam. **J Glob Antimicrob Resist.** 2020 21:272-274.
2. Hirabayashi A, Yahara K, Mitsuhashi S, Nakagawa S, Imanishi T, Ha VTT, Nguyen AV, Nguyen ST, Shibayama K, Suzuki M. Plasmidome analysis of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated in Vietnam. **bioRxiv.** 2020 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.996710>

## 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

所属機関の再編や実験室の引越および改装などの影響で、Vietnam Military Medical University (VMMU) と国立感染症研究所との間の MOU の締結が遅れてしまった。しかし、ベトナム・ハノイ市内で分離されたヒト、食肉、環境由来の CRE 株を含む、カルバペネム耐性グラム陰性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。

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名： マラリア原虫感染に対するグアニン四重鎖を介した 5-アミノレブリン酸治療メカニズムに関する研究  
課 題 番 号： 2019- Ippan - 21
  
2. 代 表 者： 塩田 倫史（熊本大学 発生医学研究所 ゲノム神経学分野 准教授）  
共同研究者： 北 潔  
（長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科 教授  
宿主病態解析部門 感染生化学分野 教授）  
佐倉 孝哉  
（長崎大学 熱帯医学研究所 分子感染ダイナミクス解析分野 助教）
  
3. 決 定 額： 400 千円
  
4. 申請時書類より

### ①研究目的

近年、マラリア治療薬の新しい標的部位として、ゲノム上にあるグアニン四重鎖 (G quadruplex; G4) 構造に注目が集まっている。G4 構造は、一般的に知られている DNA の右巻き 2 重らせん構造 (B 型 DNA) 以外の非 B 型 DNA 構造のひとつである。G4 構造は、これまでのバイオインフォマティクス解析で、ヒトゲノム中に 376,000 箇所存在することが予測され、テロメア、遺伝子プロモーター、リボソーム DNA および組換えホットスポットに特に多く見られる。申請者は、G4 構造に結合する安全性の高い薬剤として、5-アミノレブリン酸を同定した (Shioda et al., *Nat Med.* 2018)。一方、共同研究者である北 潔 博士は、強毒性のネズミマラリア原虫を致死的条件で感染させたマウスを用い、5-アミノレブリン酸を投与したマウスの 60% に治療的効果が認められることを見出した。さらに、感染から治癒したマウスは、治癒後 230 日を超えても同原虫の再感染に抵抗を示し、当該マラリア原虫に対する長期の免疫を獲得していた (Komatsuya et al., *J. Biochem.* 2013; Suzuki et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2015)。しかしながら、その薬効メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、マラリア原虫感染に対する 5-アミノレブリン酸の薬効メカニズムにおける G4 構造結合作用の関与について検討することを目的とする。

## ②研究内容

これまで、マラリアゲノムにおける G4 構造の位置は明らかにされていない。そこで、G4 構造認識抗体の特異性をマウス脳組織で確認し、それを用いてマラリアサンプルで ChIP-seq を行い、マラリアゲノムにおける G4 構造を同定する。同時に、5-アミノレブリン酸を処置したマラリア原虫のゲノムを用いた ChIP-seq を行い、5-アミノレブリン酸によるマラリアゲノムにおける G4 構造の変化を解析する。また、バイオインフォマティクス解析により、マラリアゲノム上で G4 構造の変化が見られた周辺遺伝子を同定する。その後、5-アミノレブリン酸処置による遺伝子変動について、リアルタイム PCR 法によるバリデーションを行い、得られた遺伝子のマラリア原虫における機能解析を行う。

## ③予想される成果

これまで、ヒトゲノムにおける G4 構造の生物学的な役割は明らかにされていないが、テロメア構造や組換えホットスポットに特に多く見られることから、生命活動に重要な意味を持つことが示唆されている。一方、マラリアゲノムは 80% 以上が A, T リッチ配列であることが知られており、G4 構造の形成はマラリアの生存にとってヒト以上に大きな意味を持つ可能性がある。本研究により、マラリアゲノムにおける G4 構造の位置とその機能的意義を明らかにすることは、熱帯医学研究におけるマラリア原虫の研究促進に大きく寄与できる。さらに、安全性の高い 5-アミノレブリン酸の新たな治療メカニズムを解明することで、マラリア原虫だけでなく、他の原虫やウイルスに対する G4 構造の生物学的意義やその治療標的としての有用性も世界に向けて発信することができる。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

#### ○抗 G-quadruplex 抗体 (BG4) の精製

抗 G4 構造抗体 (BG4) の可変部位配列が挿入された pSANG10-3F プラスミドは Addgene (# 55756) から購入した。BG4 は、50 $\mu$ g/mL カナマイシンを含む 100 mL Magic Media™ E. coli 発現培地で大腸菌 BL21 (DE3) 株に発現させた。細胞を 4000 g で 4°C, 30 分間遠心分離し、氷上で 5 mL TS バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0 および 20% (wt/vol) スクロース) に再懸濁した。懸濁液にリゾチーム (最終濃度 3 mg/mL) とベンゾナーゼ (最終濃度 250 U/mL) を補充し、氷上で 15 分間インキュベートし、遠心分離 (3000 g、10 分、4°C) 後、上清を採取した。さらに、ペレットを 5 mL の冷滅菌水に再懸濁し、氷上で 15 分間インキュベートし、遠心分離した (3000 g、10 分間、4°C)。上清を採取し、前のステップで得られた上清に加えた。収集した上清を、HIS-Pure コバルトスピンカラム (Sigma-Aldrich) にかけて、BG4 抗体を濃縮した。次に、BG4 抗体画分を Amicon Ultra-4 遠心フィルターデバイス (Millipore) を使用して濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回透析して、過剰なイミダゾールを除去した。

得られた BG4 の純度は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクーマシーブリアントブルー染色により確認した。

#### ○脳組織の準備

雄性 C57BL / 6J マウス (25–30 g、8–10 週齢) を使用した。脳固定のために、マウスをペントバルビタールナトリウム (腹腔内 50 mg/kg) で深麻酔し、上行大動脈を介して 0.01 M PBS、続いて 0.1 M PB の 50 mL 4% PFA を室温で灌流した。電子顕微鏡による免疫標識には、4% PFA と 0.1% グルタルアルデヒドの混合物を含む 0.1 M PB でマウスを灌流した。脳を頭蓋骨から解剖し、固定液で 4°C 一晩保存した。翌日、固定液を 0.01% アジ化ナトリウムを含む PBS に交換した。

#### ○免疫組織化学解析

共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学は、固定された細胞または脳切片を、0.3% Triton X-100 を含む PBS で 30 分間処理した。次に、1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で 1 時間インキュベートし、一次抗体を使用して 4°C で一晩処理し、PBS で洗浄後、二次抗体で 3 時間インキュベートした。BG4 免疫染色では、0.79 mg / mL BG4 in PBS を使用した。G4 構造は、BG4 (1 : 5000、0.16 µg / mL) の 6xHis エピトープタグを認識する 6xHis 抗体 (1 : 1000; ab18184、Abcam) とのインキュベーション、続いて蛍光色素標識二次抗体とのインキュベーションによって染色した。使用した 1 次抗体は以下である。MAP2 (1 : 1000; AB5622、Millipore)、NeuN (1 : 1000; 26975-1-AP、Proteintech)、GFAP (1 : 1000; 23935-1-AP、Proteintech)、Doublecortin (DCX、1 : 1000; 13925-1-AP、Proteintech)、Calbindin (1 : 1000; 14479-1-AP、Proteintech)。また、使用した 2 次抗体は以下である。Alexa 594 ロバ抗ウサギ (1 : 500; A-21207、Thermo Fisher Scientific)、Alexa 488 ロバ抗マウス (1 : 500; A-21202、Thermo Fisher Scientific)。核染色のために、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (R37606; Thermo Fisher Scientific) を使用した。免疫蛍光画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Zeiss) で分析した。共局在係数は、Zen Software を使用して定量した。

#### ○免疫電子顕微鏡法

背側海馬を含む厚さ 60 マイクロメートルの切片を、BG4 抗体 (1 : 5000、0.16 µg/mL) および 6xHis エピトープタグ抗体 (1 : 1000; ab18184、Abcam) を使用して一晩インキュベーションし、その後 1.4 nm-Nanogold-Fab 'ヤギ抗マウス IgG (1 : 100、Nanoprobes) で一晩インキュベートした。HQ シルバー (Nanoprobes) を使用してシグナルを増強した後、切片を 1% OsO<sub>4</sub> 水溶液で後固定し、1.5% 酢酸ウラニルで一括染色・脱水し、エポキシ樹脂に埋め込んだ。極薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7700、日立) で観察した。

## ②成果（結果＋考察）

### ○成体マウスの脳における G4 構造の細胞内局在

免疫組織化学によって G4 構造の細胞内局在を検討した。G4 構造は、主に嗅球、海馬錐体層、歯状回の顆粒細胞層、および小脳プルキンエ細胞に観察された。G4 構造は、海馬 CA1 領域の MAP2 陽性錐体神経細胞の細胞体および樹状突起にも発現がみられた。一方、G4 構造は GFAP 陽性星状細胞ではほとんど観察されなかった。

神経発生は、胚および周産期の段階だけでなく、中枢神経系の 2 つ領域（側脳室下帯と海馬歯状回顆粒下帯）でも生涯を通じて見られる。神経前駆細胞マーカー・DCX 陽性細胞と成熟神経細胞マーカー・カルビンジン陽性細胞における G4 構造と DAPI 陽性ヘテロクロマチンの共局在を検討した。G4 構造と DAPI ヘテロクロマチンの共局在シグナルは、海馬歯状回の DCX 陽性神経前駆細胞に比べてカルビンジン陽性成熟神経細胞で有意に増加した。

### ○成体マウス海馬における G4 構造の電子顕微鏡免疫標識

神経細胞での正確な G4 構造局在を検討するために、海馬 CA1 領域の錐体神経細胞で、電子顕微鏡観察を行った。G4 構造は、核質全体に散在しており、ヘテロクロマチンで特に強く観察された。特に、G4 構造は nucleolus-associated chromosomal domains (NADs) 領域に観察され、核小体には局在していなかった。さらに、G4 構造は細胞質でも検出され、ミトコンドリアなどの特定の細胞小器官では観察されなかった。

本研究では、免疫組織化学を使用してマウスの脳における G4 構造の細胞内局在を明らかにした。G4 構造は主に神経細胞の核内に存在することを示した。さらに、G4 構造は、神経細胞の発達段階に応じて核局在の程度を変化させ、NAD 等のヘテロクロマチンに観察された。NADs 領域は、遺伝子密度の低い領域が濃縮されている。また NADs では H3K9me3 や H3K27me3 等の抑制性ヒストンが濃縮されており、NADs 領域の遺伝子発現は抑制的に支配されている。しかしながら、NAD に関しては研究が始まったばかりで不明な点が多い。これらの成果を活用し、今後、マラリアのゲノムワイドな研究を進める。

## ③成果の公表

Asamitsu S, Imai Y, Yabuki Y, Ikenoshita S, Takeuchi M, Kashiwagi H, Tanoue Y, Fukuda T, Shioda N. Identification and immunohistochemical characterization of G-quadruplexes in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* in press (2020)



## 6. 自己評価

今年度はマラリアでの G4 構造認識抗体を用いた ChIP-seq のプロトコルの最適化のために、使用する抗体の評価に努めた。我々が精製した G4 構造認識抗体は平行型・アンチ平行型・ハイブリット型の全ての G4 構造を同程度のアフィニティで認識することをゲルシフトアッセイで確認した。また、マウス脳内における G4 の局在を G4 構造認識抗体で検討したところ、特に学習・記憶に重要な海馬の神経細胞と運動機能を制御する小脳プルキンエ細胞の核内に多く局在が見られた。免疫電子顕微鏡法による成熟神経細胞の観察では、G4 は核小体と接しているヘテロクロマチン構造である「Nucleolus associated domain (NADs)」に特に豊富に存在することが明らかになった。興味深いことに、G4 の NADs への集積は未成熟神経細胞では確認できなかった。つまり、G4 は神経発達依存的な動的核酸構造体であることを明らかにした。現在、G4 構造認識抗体を用いたマラリア原虫の免疫染色により、G4 構造の核内の局在を解析中であり、今後の研究の進展が期待される。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：熱帯感染症に有効な薬物開発を指向した天然薬物研究  
課 題 番 号：2019-Ippan-22
2. 代 表 者：當銘 一文（富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 准教授）

共同研究者：小松 かつ子（富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 教授）  
朱 姝（富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 助教）  
ヤスンジャン アシム  
（富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 大学院生）  
平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野 教授）  
グエン フィ ティエン  
（長崎大学大学院熱帯医学免疫遺伝学分野 客員准教授）  
水上 修作（長崎大学熱帯医学研究所免疫病態制御学分野 准教授）  
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）  
田山 雄基（長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野 大学院生）

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・分析技術等を活用し、抗マラリア薬開発を目的として、富山大和漢医薬学総合研究所が所有する和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物、生薬、及び漢方方剤）から *in vitro* 及び *in vivo* モデルにおいて有効な抗マラリア活性を見出した。そのため、これに続いて、同様にこのライブラリーを用いた抗トリパノソーマ薬開発研究を開始し、これまでにスクリーニングを行い、ここでも抗トリパノソーマ活性を有する生薬由来化合物・生薬を見出した。本研究ではこれらの活性を示した和漢薬について、活性化化合物の探索を行うとともに、*in vivo* モデルにおける活性評価を行い、活性抽出物または化合物サンプルの医薬品開発に向けた絞り込みを行う。

また、これまでにアフリカ原産の薬草コンゴボロロ (*Morinda morindoides*) の葉に抗マラリア活性を見出しており、昨年度までに葉の抽出物から抗マラリア作用が報告されている4化合物を単離した。しかしこれらには活性は認められなかったことから、さらなる成分探索を行い、活性化化合物の同定を行う。さらに、同化合物が最大限含まれ、安全性の確かなコンゴボロロ抽出物を得るための最適な抽出条件を見出す。

## ②研究内容

### A 和漢薬ライブラリーからの抗トリパノソーマ薬の開発に向けた研究

昨年度までに和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物、生薬、及び漢方方剤）を対象とした抗トリパノソーマ活性スクリーニングで見出している活性サンプルについて以下の検討を行う。

まず、異なった濃度のサンプル（生薬由来化合物・生薬・漢方方剤）でトリパノソーマを処理し、濃度依存性を確認するとともに、活性の強さの指標として50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）を算出する。その結果から、強い活性を示すサンプルを選定する。

続いて、選定されたサンプルの抗マラリア活性を *in vivo* 実験で確認する。BALB/cマウスに *T. cruzi* を感染させ、このマウスに選定されたサンプル（コントロールとしては純水及び既存薬であるベンズニダゾールを使用する）を経口的に投与する。その後、末梢血中の原虫数を測定し、各サンプルの抗原虫活性を検討する。この際、ルシフェラーゼを発現する *T. cruzi* と In Vivo Imaging System (IVIS)を用いた *in vivo* リアルタイムイメージングも抗原虫活性の検討に活用する。

活性が認められた生薬エキス、漢方方剤エキスについては、和漢研において LCMS による成分プロファイルの結果と、それらを分画したフラクションの活性評価、成分プロファイル情報を統合し、統計的手法である多変量解析を行うことにより、活性成分の予測を行う。その化合物が市販されている場合は購入し、活性評価を行うとともに、LCMS の分析結果に基づき成分の同定を行う。また、推定した化合物が市販されていない場合は、当該成分を各種カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、質量分析及び核磁気共鳴（NMR）などの機器分析データを詳細に解析することにより、構造決定を行う。

### B コンゴボロロ葉の抽出法の最適化を目指した成分化学的研究

昨年度までにコンゴボロロ葉の抽出物が抗マラリア活性を示すことを明らかにしている。LCMS 分析の結果、抽出物中にこれまでに抗マラリア作用が報告されている化合物4種を含む既知フェニルプロパノイド縮合型イリドイド類と推定される既知化合物10種と、新規化合物と推定している4種の化合物との計14種の化合物の存在を確認している。溶媒分配により分画したところ、これらの化合物は高極性画分に存在せず、中極性から低極性画分に存在することを確認している。

本研究では以下の検討を行う。

#### 1) コンゴボロロ葉抽出物から分画した画分の活性化合物の同定

各画分の抗マラリア活性と、LCMS による成分プロファイル分析の結果を統計分析し、抗マラリア効果の指標となるマーカー化合物を推定・同定するとともに、活性が高い画分を同定する。さらにマーカー化合物については活性画分から分画・精製を行い、質量分析及び NMR などの機器分析データの解析により化合物の構造を決定する。単離した成分については、*in vitro* モデルにおいて抗マラリア作用の確認を行う。

## 2) 同定した活性化合物を対象とした定量分析法の確立

次にこれまでに収集したコンゴボロ葉の抽出物について、上記で見出した活性化合物を指標とする LCMS を用いた定量分析法について検討する。これまでの検討で、LCMS における分離に関しては、条件を確立している。標品として 1) で単離した化合物を使用し、検量線を作成することで、各化合物の定量を行う。

## 3) 活性成分を指標とした抽出法の最適化

上記で確立した活性指標成分の定量分析法に基づき、活性成分が効率的に抽出できる条件を検討する。検討すべき抽出条件としては、葉と水の比率、抽出温度、抽出時間などを計画している。また、これまでに採取しているコンゴボロ葉についても定量分析を行い、成分定量の結果と、活性の強度、遺伝子多型の解析結果と組み合わせた多面的な解析を行うことで、最も高い抗マラリア活性が期待できる産地を選定する。

## ③予想される成果

これまでに行った抗トリパノソーマ活性のスクリーニングでは、有望な活性を示す化合物・抽出物を和漢薬ライブラリーより見出している。本研究でこれらの詳細な活性が明らかになれば、抗トリパノソーマ薬としての開発に向けて研究を進めることが可能となる。また、本研究で対象としている漢方方剤はすでに臨床利用され、認可を受けている医薬品である。それを構成する生薬も使用実績がある。したがって、慎重に検討する必要はあるものの、ヒトにおける安全性はある程度担保されている。また、本研究の成果により漢方方剤または、生薬エキスをエビデンスのある抗トリパノソーマ薬として用途を拡大することが可能になると期待される。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。

また、コンゴボロロについては、本研究の遂行により活性成分を明らかにし、それを指標とした定量法の確立により、コンゴボロ葉抽出法さらには飲用法に関する成分化学的なエビデンスを提供することが可能になる。前述のように DRC においては、お湯で煎じお茶のようにして飲むという習慣はあるものの、抗マラリア作用を期待した場合の最適な飲用法については定められていない。本研究で高い抗マラリア作用が期待できる飲用法の最適化・標準化が達成できれば、DRG でのコンゴボロ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を期待される。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

#### A 和漢薬ライブラリーからの抗トリパノソーマ薬の開発に向けた研究

##### 研究材料

富山大学和漢医薬学総合研究所が提供した和漢薬ライブラリーに含まれる生薬由来化合物、および市販の関連化合物。

##### 研究方法

#### 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 Tulahuen 株を使用した。生薬由来化合物を底が透明な 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。プレートを 37°C5%CO<sub>2</sub> 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を用いた。

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。）。以上が、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する際の方法である。

一方、アマスティゴート型 *T. cruzi* に対する活性を検討するには以下の方法を用いた。25 cm<sup>2</sup> フラスコにトリポマスティゴート型 *T. cruzi* と NBMH 細胞を混ぜたものに加え 3 日間培養した。3 日後にメディウム中にトリポマスティゴートが出現していないことを確認し、その後 PBS でよく洗浄し、トリプシン処理を行った。トリプシン処理により得られたアマスティゴート型 *T. cruzi* が感染した NBMH 細胞を、生薬由来化合物とともに 96 ウェルプレートに準備し、3 日間インキュベーター内で培養後、発光量を測定した。

#### *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、上記と同様のサンプル処理を行った。その後、細胞をアラマーブルーで染色し、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。

## **B コンゴボロロ葉の抽出法の最適化を目指した成分化学的研究**

### 研究材料

2017年に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コンゴボロロ（*Morinda morindoides*）の葉。

### 研究方法

#### **抽出エキスの分画**

コンゴボロロ乾燥葉 1,060 g を 80%メタノール及び 50%エタノールで抽出した抽出液を減圧濃縮した後、凍結乾燥して抽出エキスを得た。これを水に再懸濁し、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、標的とする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、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）、Sephadex LH-20 をカラム担体とするクロマトグラフィーによる分画を行った。分画にあたっては LCMS 分析を行い、主として標的化合物のシグナルを指標に分画を進めた。

分析に用いた LCMS の分析条件は以下の通り。

カラム：YMC Pack Pro C18 RS (i.d. 2.1 × 150 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。

#### **得られた化合物の構造解析**

各化合物の構造は、核磁気共鳴（NMR）スペクトルおよび質量分析（MS）スペクトルデータに基づいて解析を行った。既知化合物については、NMR スペクトルおよび MS スペクトル、旋光度を文献値と比較することにより同定を行った。

#### ***in vitro* 実験系での抽出エキスの各溶媒画分および単離化合物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）を感染させたヒト赤血球の培養液中に、単離化合物を添加した後、37°Cの混合ガス条件下（N<sub>2</sub> 90%, O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 5%）で 48 時間培養を行った。赤血球内の核酸を SYBR Green I で染色して感染マラリア原虫を検出した後、化合物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、各化合物のマラリア原虫増殖阻害活性を算出した。同時に AMB（adult mouse brain）細胞に対する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。

②成果（結果＋考察）

**A 和漢薬ライブラリーからの抗トリパノソーマ薬の開発に向けた研究**

**生薬由来化合物のアメリカトリパノソーマ (*T. cruzi*) に対する活性評価**

昨年度のスクリーニングにより選定された、96種の生薬由来化合物のうち、高い抗トリパノソーマ活性有し、かつ細胞傷害性が低い6種類（A-F）に対して50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）の測定を行った。さらに宿主細胞として使用しているNBMH細胞を用い、50%阻害濃度（CC<sub>50</sub>）の測定も併せて行った。（表1）

表1の結果は、3回の実験結果の平均値を示している。

なお、特許申請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。

表1 各生薬由来化合物の抗トリパノソーマ作用

	<i>T. cruzi</i>		<i>T. cruzi</i>		NBMH	
	トリポマスチゴート ＋アマスチゴート		細胞内アマスチゴート		（細胞傷害性測定）	
	IC <sub>50</sub> (μM)	SD	IC <sub>50</sub> (μM)	SD	CC <sub>50</sub> (μM)	SD
<b>A</b>	17.9	5.36	14.7	6.49	>40	N/D
<b>B</b>	13.4	5.22	12	6.35	42	18
<b>C</b>	5.64	1.77	5.61	0.94	>40	N/D
<b>D</b>	3.47	1.41	8.11	0.37	>40	N/D
<b>E</b>	16.2	2.42	27.4	0.43	>40	N/D
<b>F</b>	3.89	1.79	19.3	2.64	>40	N/D
ベンズニダゾール	2.73	0.12	4.93	0.143	>40	N/D

N/D : not determined

このうち化合物 **C**、**D**、**F** は特に高い抗トリパノソーマ活性を示した。さらにこれらの化合物は類似構造を有していることが判明した。

そこで、この3種類に類似した構造を有する化合物 (**G**、**H**、**I**) をさらに加えて IC<sub>50</sub>、CC<sub>50</sub>の測定を行った。また、CC<sub>50</sub>測定においてはNBMH細胞のほかにHUH28細胞（ヒト胆管癌細胞）における評価も併せて行った。（表2）

表 2 の結果は、2 回の実験結果の平均値を示している。  
 なお、特許申請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。

表 2 各生薬由来化合物の抗トリパノソーマ活性

	<i>T. cruzi</i>		<i>T. cruzi</i>		NBMH		HUH28	
	トリポマスチゴート +アマスチゴート		細胞内 アマスチゴート		(細胞傷害性測定)		(細胞傷害性測定)	
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SD	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SD	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SD	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SD
<b>C</b>	5.64	1.77	5.61	0.94	>40	N/D	>100	N/D
<b>D</b>	3.47	1.41	8.11	0.37	>40	N/D	>100	N/D
<b>F</b>	3.89	1.79	19.3	2.64	>40	N/D	>100	N/D
<b>G</b>	>40	N/D	>40	N/D	>40	N/D	>100	N/D
<b>H</b>	20.1	0.83	33.5	2.89	69.1	3.09	>100	N/D
<b>I</b>	>40	N/D	>40	N/D	>40	N/D	>100	N/D

ベンズニダゾール	2.73	0.12	4.93	0.143	>40	N/D	>100	N/D
----------	------	------	------	-------	-----	-----	------	-----

N/D: not determined

表 2 の結果より、これらの化合物はシャーガス病に対する新規薬剤候補になる可能性が示唆された。また、構造式を変化させることで更に改良の余地があることも期待された。

今後は、*in vitro* 実験においてトリポマスチゴートだけでなく、細胞内アマスチゴートに対しても抗トリパノソーマ活性を示した化合物 C に着目して、*in vivo* 実験を行う予定である。

## **B コンゴボロロ葉の抽出法の最適化を目指した成分化学的研究**

### コンゴボロロ葉からの成分の分画、構造解析

本年度は、昨年度に引き続き LCMS 分析においてフェニルプロパノイド縮合型イリド化合物の存在が確認されたコンゴボロロ葉 (KB004) 抽出物のクロロホルム画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分について成分探索を行った。それぞれの画分についてシリカゲル、ODS、Sephadex LH-20 等をカラム担体とする各種カラムクロマトグラフィーにより分画を行い、化合物の分離・精製を行った。クロロホルム画分からは 13 化合物を得た。また、酢酸エチル画分、ブタノール画分からはそれぞれ 3、5 化合物が得られ、合計 21 化合物を得た。

得られた化合物について、NMR および MS スペクトル、円二色性スペクトルの解析を行い、構造解析を行った。その結果、6 種の新規フェニルプロパノイド縮合型イリド化合物を単離するとともに、既知のフェニルプロパノイド縮合型イリド化合物を 8 種 (4 環性フェニルプロパノイド縮合型イリド 2 種を含む) を同定した。そのほかフラボン配糖体 2 種、リグナン 2 種、メガスティグマン 2 種、



セスキテルペン 1 種を同定した。昨年度に LCMS において存在を予想していたフェニルプロパノイド縮合型イリドイド類および微量に存在していた同類の化合物についても単離・同定することができた。さらに、単離した化合物以外にも新規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推定しており、それらの成分探索を引き続き行っている。

### 単離化合物の活性評価

単離した化合物について、抗マラリア活性を評価した（表 3、化合物名とその構造式については、現時点では開示しない）。

新規フェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物 **J** および **K** の感受性株（3D7）に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 20.6、40.9 μM であり、弱い抗マラリア作用が認められた。AMB 細胞に対する毒性は認められなかった。一方、既知の 4 環性フェニルプロパノイド縮合型イリドイド **L**、**M** の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.96、0.80 μM であり、強い抗マラリア作用が認められた。しかしこれらは AMB 細胞に対して強い細胞毒性を示し、その CC<sub>50</sub> 値は 1.02、0.88 μM であり、SI 値はそれぞれ 1.06、1.10 であった。これらの抗マラリア作用は細胞毒性に起因するものと示唆された。また、リグナン **N** の抗マラリア作用の IC<sub>50</sub> 値は 24.2 μM であり、細胞毒性は認められなかった。上記以外の化合物には抗マラリア作用は認められなかった。田村らはシクログアニル耐性マラリア原虫 CDC1 を用い、フェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物の抗マラリア作用を報告している（IC<sub>50</sub> 値 0.04–21.9 μM）[1]。本研究でも同じ化合物を単離し活性評価を行ったが、3D7 株では活性が認められなかった。用いるマラリア原虫の株により、活性が異なることが考えられた。今回報告した化合物 **J–N** については、これまで抗マラリア作用の報告がない。

表 3 単離化合物の抗マラリア作用

	3D7		AMB	
	IC <sub>50</sub> (μM)	SD	CC <sub>50</sub> (μM)	SD
<b>J</b>	20.6	13.4	>50	N/D
<b>K</b>	40.9	10.5	>50	N/D
<b>L</b>	0.96	0.25	1.02	0.08
<b>M</b>	0.80	0.13	0.88	0.02
<b>N</b>	24.2	19.5	>50	N/D
アーテスネート*	3.66*	1.66*	1895.9*	545.0*
クロロキン*	11.82*	3.12*	>5000*	N/D

上記に示していないその他の化合物の感受性株（3D7）に対する IC<sub>50</sub> 値および、AMB 細胞に対する細胞毒性の CC<sub>50</sub> 値は >50 μM であった。

\*アーテスネート、クロロキンの IC<sub>50</sub> 値および CC<sub>50</sub> 値は nM で示した。

N/D: not determined

当初の計画では、単離化合物の抗マラリア活性に着目していたため、抗トリパノソーマ活性の評価については予定していなかったが、同じ試料を用いて実験可能であったこと、および今回、単離・構造決定した4環性フェニルプロパノイド縮合型イリドイドに抗トリパノソーマ活性が報告されていたことから、単離した化合物の抗トリパノソーマ活性を評価することとした。

10  $\mu\text{M}$  で化合物を添加したところ、既知の4環性フェニルプロパノイド縮合型イリドイド **L**、**M** にのみ抗トリパノソーマ活性が認められ、他の化合物には活性は認められなかった。化合物 **L**、**M** について  $\text{IC}_{50}$  値を検討したところ、それぞれ 4.67、5.70  $\mu\text{M}$  であった。しかし、これらは宿主である NBMH 細胞に対しても強い細胞毒性を示した ( $\text{CC}_{50}$  値：2.76、3.22  $\mu\text{M}$ )。以上のことから、化合物 **L**、**M** の抗トリパノソーマ活性は原虫に特異的ではないと考えられた。化合物 **L** の抗トリパノソーマ活性についてはすでに報告がある ( $\text{IC}_{50}$  値は 1.27  $\mu\text{M}$ )。化合物 **M** の複数のがん細胞に対する増殖抑制作用が報告されているが、抗トリパノソーマ活性、抗マラリア活性に関する報告は、本研究が初めてである。

### ③成果の公表

當銘一文, Yasenjiang Aximu, 北見駿典, 朱 姝, 葛躍偉, 小松かつ子, 水上修作, Teklemichael Awet Alem, Nguyen Tien Huy, 平山謙二. 抗マラリア薬開発を指向した天然薬物研究 III~Kongo Bololo からのフェニルプロパノイド縮合型イリドイド成分の探索~. 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9回交流セミナー; 2019, 12, 24; 長崎.

### 参考文献

1. Tamura S, Kubata BK, Syamsurizal, Itagaki S, Horii T, Taba MK, Murakami N. New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from *Morinda morindoides*. Bioorg Med Chem Lett 2010; 20: 1520-1523.

## 6. 自己評価

和漢薬ライブラリーからの抗トリパノソーマ薬の開発に向けた研究では、スクリーニングを通過した6化合物を用いた検討を行い、このうち類似構造を有する3種が特に強い活性を有することを確認した。これらの化合物は細胞傷害性も高くなく、今後更なる類縁体化合物の活性検討を行うことで、より活性の高い化合物が見つかる可能性もある。*In vivo*での検討なども含めて今後検討すべき項目は多いが、本研究において有望な抗トリパノソーマ薬開発のヒット化合物を見つけられた点は評価できると考える。

当初の計画では、年度内にコンゴボロロ葉の化合物をすべて単離・構造決定し、抗マラリア活性を評価すること、さらにそれら化合物の定量分析の確立、および活性化合物を指標として、コンゴボロロ葉の抽出法を最適化する計画であった。しかし、予想以上に化合物の単離操作に時間がかかり、当初の計画より遅れてしまった。また、当初LCMSの分析結果から予想していた化合物数より多くの化合物が含まれることが分かったため、計画を変更して化合物の単離・同定を重点的に行うこととした。本年度の成果として新規フェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物4種を新たに単離・構造決定することができ、そのうち2種(AおよびB)に弱いながらも抗マラリア活性を見出すことができた。また、これまで抗マラリア活性が知られていなかった既知化合物C-Eについても抗マラリア活性を見出した。当初の計画にはなかったが、単離化合物の抗トリパノソーマ活性を評価したところ、これまで本活性が報告されていない、4環性フェニルプロパノイド縮合型イリドイドDが活性を示すことを見出した。

以上、天然薬物からの熱帯感染症に有効なものを見出すという熱研・和漢研双方の特色・長所を融合させた共同研究として、本研究では今後の発展が期待できる研究成果が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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：包括的モデルによる性感染症の長期的動態の理論研究  
課 題 番 号：2019-Ippan-23
2. 代 表 者：守田 智（静岡大学工学部 教授）  
共同研究者：伊東 啓（長崎大学熱帯医学研究所 助教）  
山口 幸（奈良女子大学・共生科学研究センター 協力研究員）  
田村 和広（静岡大学大学院 博士課程）
3. 決 定 額：400 千円

### 4. 申請時書類より

#### ①研究目的

性感染症は古代から存在する人類の脅威であったが、近年に特に AIDS の蔓延や薬剤耐性を得た性感染症の拡大が世界的な問題となっている。重要な点は、国際化によって人々の移動が容易で活発になったことから、性感染症の問題が先進国と途上国の垣根を超えた国際保健学上の重要な課題になったにも関わらず、その蔓延挙動の理論的理解は意外と進んでいない点にある。そこで、今研究では数理モデリングによって性感染症の長期的な拡散メカニズムを明らかにする。これまでの性感染症数理モデルでは、性接触による性感染だけに注目しており、世代を超えた伝搬を可能にする母子感染はあまり考慮されてこなかった。そこで本研究では、先進国から途上国までの医療の現状を熟知する国際保健学分野と連携して、性感染と母子感染を同時に考慮する数理モデルを構築する。ここでは性感染については性接触のネットワークの構造を考慮しつつ、母親から子への母子感染も考慮することで、水平感染と垂直感染がそれぞれ性感染症の拡散にどの程度寄与しているかを理論的に推定する。さらに、感染による死亡および治療の効果も考慮し、感染挙動の複雑さを再現しつつ真に効果的な性感染症の蔓延防止戦略の構築を目指す。このように本研究は、地球上のあらゆる人が曝されている性感染症への感染リスクを理論的に検証し、その長期的な防止策の提案に取り組むものである。

#### ②研究内容

広く使用されているコンパートメントモデル（SI モデルもしくは SIS モデル）を発展させ、性感染症の長期的な蔓延挙動を再現する。このモデルでは性接触のネットワーク（スケールフリー性があると複雑ネットワークの研究領域では言われている）を踏まえた性感染と、母子感染、そして感染したことによる感染者の死亡率を考慮することで複雑な蔓延挙動を表現する。その上で、公衆衛生上の重要な指標である基本再生産数（ $R_0$ ）を解析的に導出する。これにより、どのような蔓延防止戦略がより有効

か検証することができる。同時に性接触のネットワーク構造を理論的に理解するために独自研究資金（資金状況を参照）にてインターネット調査を実施し、現実の性接触のネットワーク構造がどのような特性（度数分布・次数の二乗平均）を持つか検証し、モデルにフィードバックする。

### ③予想される成果

本研究が成功した暁には、従来のモデルと比較して遥かに現実的な性感染症の標準モデルを提供できる。このモデルの構想では既に、男性から女性への性感染率、女性から男性への性感染率、母子感染率、出生性比、幼児期死亡率といった 30 を超える変数で構成される。そのため、その地域や性感染症の種類に基づいた変数を設定することで、その条件に合わせた拡散リスクを用途に合わせて導出することができる。このような汎用性の高い数理モデルはこれまでに存在しない上に、本モデルは世代を超えるような長期（long-term）の蔓延挙動を検証できるため、長期的かつグローバルな展望に立った政策提言や意思決定に貢献できると期待される。何よりも、全ての性感染症を網羅し基本再生産数（ $R_0$ ）を解析的に導くことができるモデルは存在しないため、本研究の意義は大きい。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

性感染症は主に男女間の性感染（水平感染）によって拡散するが、それだけでなく、多くの性感染症は母親から子への母子感染（垂直感染）も引き起こす。本研究では、男女間の性接触の複雑ネットワークと、母子感染を考慮した上で、母子感染による生得的障害を考慮した数理モデルを構築する。このモデルは、「子供」と「成人女性」と「成人男性」の3つのグループに分けて世代交代のある SIS モデルとなっている。感染閾値を求めるために基本再生産数（basic reproduction number）を拡張したタイプ別再生産数（type reproduction number や target reproduction number と呼ばれる）を「子供」と「成人女性」と「成人男性」の3つのグループに対して定式化する。

また、インターネット上で Web アンケート調査を行い、モデルを実際の性感染症に応用するために必要な実データを取得した。Web 調査は株式会社クロス・マーケティングが所有するリサーチパネルのシステムを用いて、日本在住の男女それぞれ 2,500 人（計 5,000 人）から「人生でこれまでの累計の性接触人数」と「直近三か月間の累計の性接触人数」について回答を得た。この調査の実施にあたっては、事前に、長崎大学熱帯医学研究所の倫理審査の承認を得ている（番号：171207183）。

②成果（結果＋考察）

母子感染による生得的障害を考慮した性感染症モデルを構築した。ここでは「子供」と「成人女性」と「成人男性」の3つのコンパートメントによる障害・死亡を考慮し、性活動の相違も考慮したモデルを構築することで、感染防御のため重要な指標であるタイプ別再生産数を定式化した（Ito et al. 2019. Sci Rep [1]；図1）。本研究で用いたモデルは一般的な性感染症を表現できる汎用モデルであり、様々な性感染症の防止策提案のための基盤となる。興味深いことに、モデルからは、“蔓延している性感染症に対して効果的な予防ワクチンが存在する場合は、男性ではなく女性にワクチン接種を集中させるのが効率的である”という知見が数学的に導かれた。

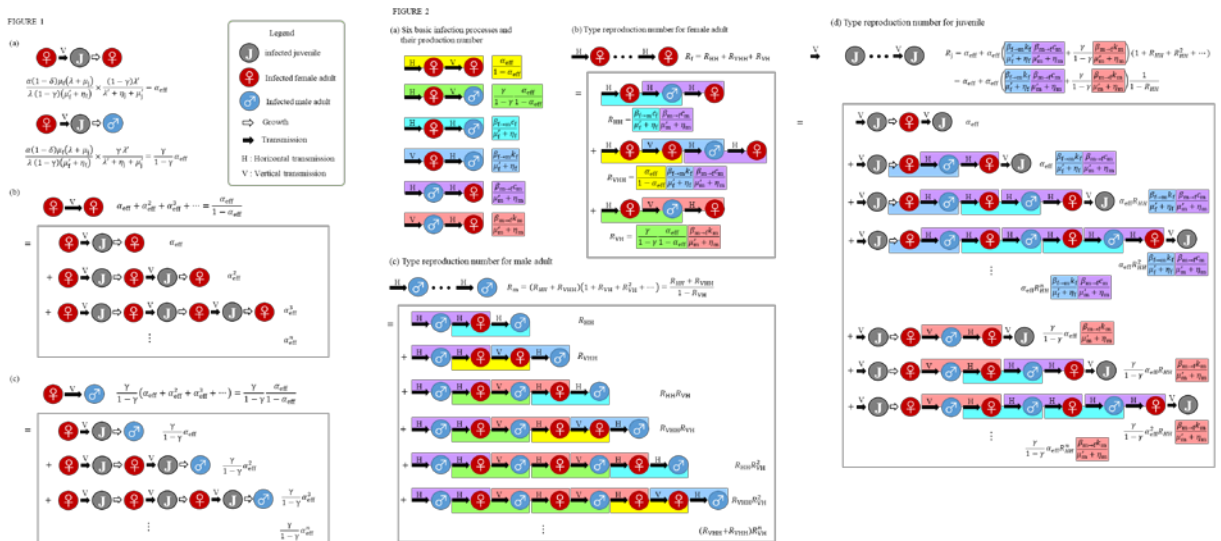


図1：タイプ別再生産数を計算に用いた感染経路の模式図

さらに、実際の性感染症にこのモデルを適用する際に重要となるパラメータを推定するため、Web アンケート調査を行い、日本在住の男女それぞれ 2,500 人（計 5,000 人）から「人生でこれまでの累計の性接触人数」と「直近三か月間の累計の性接触人数」について回答を得た。得られたデータに対して赤池情報基準（AIC）とベイズ情報量規準（BIC）を用いたモデル選択を行った。その結果、日本における性接触する異性の人数の分布が、男女ともに冪分布に従う（ネットワークがスケールフリー性を持つ）ことを発見した（Ito et al. 2019. PLoS ONE [2]；図 2）。これは、“多くの人々の性接触は少人数（数人以下）との関係に留まるものの、一部には極めて巨大な性接触ネットワークを持つ人が存在する”ことを意味する。性接触のスケールフリー性は、これまでスウェーデン・イギリス・ジンバブエ・ブルキナファソの 4 か国における面談調査でのみ、その存在が示唆されていたが、今回アジア圏で初めて観察された。スケールフリーのネットワーク下で感染症の伝播が生じる場合、感染率が非常に低い場合でも流行が起こりやすくなることが理論的に知られており、スケールフリーの有無は公衆衛生において重要である。また、男性は女性に比べて性経験人数を多く申告するという世界的に共通して見られる傾向が、日本でも確認された。これにより、プライベートに大きく踏み込む調査では、面談調査に加えて Web 調査も有効に機能することが示された。これらの結果は大学広報や長崎大学同窓会誌（CHODAI DOSO）を経由して広く公開された。

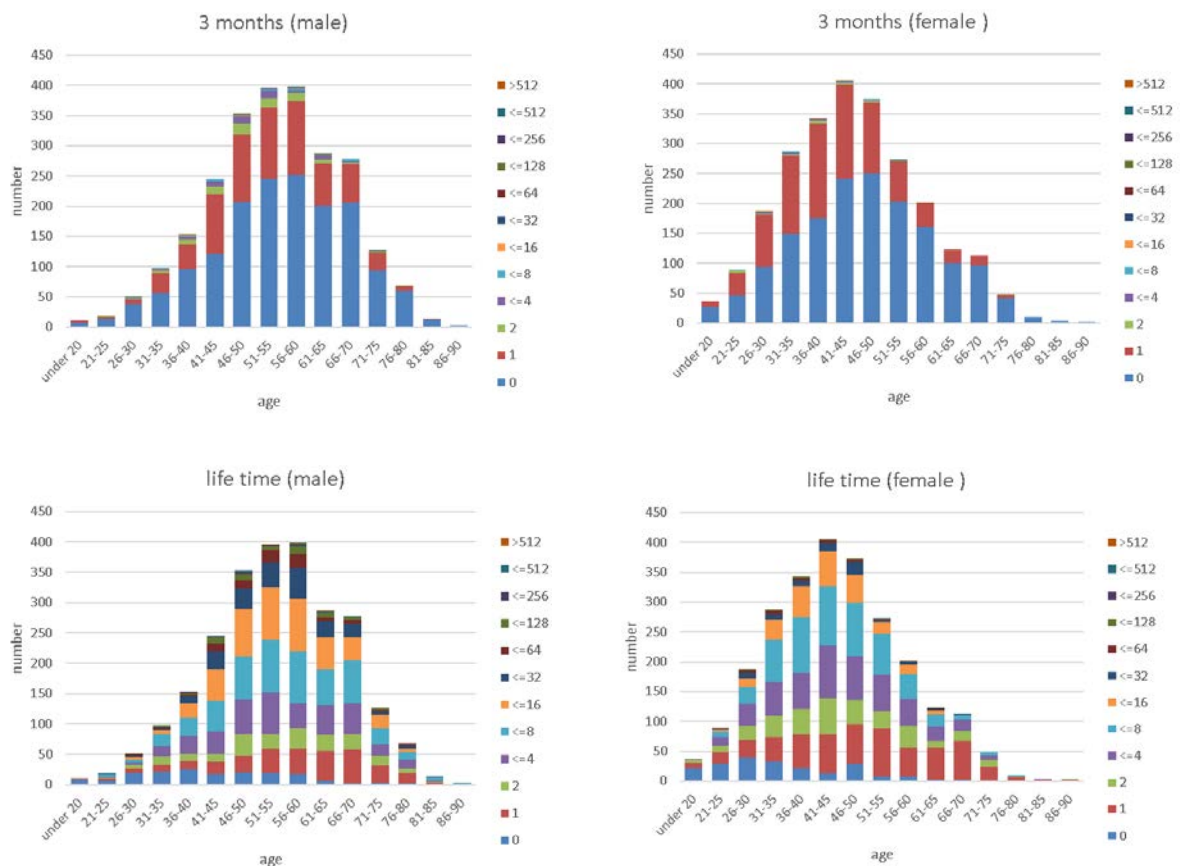


図 2：インターネット調査による各年齢層の性接触の回数分布

### ③成果の公表

数理モデルの結果は[1]、インターネット調査の結果を[2]に原著論文として公表した。また 2019 年 8 月に数理生物学系の国際会議[3]、ネットワーク科学系の国際会議[4]でこれらの研究内容を報告した。国内の学会でもいくつか報告を行った[5-8]。また、プレスリリースを積極的に活用して研究活動の周知にも力を入れた[9-12]。

原著論文：2 報

[1] Ito H, Yamamoto T & Morita S. The type-reproduction number of sexually transmitted infections through heterosexual and vertical transmission. *Scientific Reports* 9: 17408, (2019).

[2] Ito H, Tamura K, Wada T, Yamamoto T & Morita S. Is the network of heterosexual contact in Japan scale free? *PLoS ONE*. 14: e0221520, (2019).

国際会議発表：2 件

[3] Morita S, Sexually transmitted infection models with mother-to-child infection. The 7th China-India-Japan-Korea International Conference on Mathematical Biology. Beijing, China (2019).

[4] Morita S, Ito H, Yamamoto T, Basic Reproduction Number of Sexually Transmitted Infections with Mother-to-Child Infection. International school and Conference on Network Science (NetSci-X 2020), Tokyo (2020).

国内学会発表：4 件

[5] 伊東啓, 山本太郎, 守田智, 「母子感染と性ネットワークを考慮した性感染症拡散モデル」第 35 回個体群生態学会大会, 京都大学, 2019 年 9 月.

[6] 守田智, 伊東啓, 山本太郎, 「母子感染を考慮した性感染ネットワーク拡散モデル」2019 年度日本数理生物学会大会, 東京工業大学, 2019 年 9 月.

[7] 守田智, 伊東啓, 山本太郎, 「垂直感染を含む性感染伝播のネットワーク拡散モデル」日本物理学会 2019 年秋季大会, 岐阜大学, 2019 年 9 月.

[8] 伊東啓, 山本太郎, 守田智, 「数理モデルから考察する性感染症の存続性」第 67 回日本生態学会大会, 名城大学, 2020 年 3 月. (学会は中止、抄録をもって発表扱いとなった)

プレスリリース、その他

[9] 長崎大学プレスリリース「熱帯医学研究所の伊東啓助教らが、日本国内における性接触ネットワークの性質にはスケールフリー性が存在することを明らかにしました。」  
<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/science/science180.html>

[10] 大学ジャーナルオンライン「性接触人数は「べき分布」に従う、長崎大学と静岡大学が調査」<https://univ-journal.jp/27657/>

[11] 日本の研究.com 注目ニュース・プレスリリース「【注目プレスリリース】「あなたの経験人数は何人？」性接触した人数の分布はスケールフリー / 長崎大学」<https://research-er.jp/articles/view/81812>

[12] CHODAI DOSO 2020「日本国内の性接触ネットワークに潜むスケールフリー」  
<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/newrect/japanese/pdf/2020chodaidoso.pdf>



## 6. 自己評価

これまで代表者は、比較的抽象的な数理モデルで多くの成果を挙げてきた。それに加え、本共同研究課題で性感染症防除という具体的な問題を取り扱うようになり、医学・疫学・公衆衛生学的にも重要な成果が出せたことは科学者として喜ばしい。

予定していたように研究は進み、2報の論文が公表できたことに満足している。結果も科学的に非常に興味深い内容となっており、これらの蓄積から今後も物理学（特に複雑ネットワーク科学）と医学・疫学を融合させたユニークな研究を展開していくと自信を深めている。また、大学広報からのプレスリリースやオンライン科学ジャーナルでの紹介、国際会議で報告が功を奏し、国内外の研究者に大いに興味を持ってもらえたことは予想を上回る成果であった。一方、3月に開催予定であったいくつかの学会でも研究報告を予定していたが、新型コロナウイルス感染対策のため取りやめとなったことは、致し方ないことではあるが、残念である。

今回の成果をさらに発展させるべく研究を継続しており、これも順調に進んでいる。

## 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)
- 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

## 令和元（2019）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：2019-Ippan-24
2. 代 表 者：金子 賢一（長崎大学病院医療教育開発センター長崎医療人育成室教授）  
共同研究者：原 稔（神尾記念病院 耳鼻咽喉科 医員）  
佐藤 智生（長崎大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教）  
吉田 翔（長崎みなとメディカルセンター 耳鼻咽喉科 後期研修医）  
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（無所属）  
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：600 千円
4. 申請時書類より

### ①研究目的

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

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

### ②研究内容

PCV 未導入地域であるベトナム・ニャチャン市で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 5 群（接種スケジュールの違いにより PCV-10 接種群が 4 群、PCV-10 接種を行わない対照群が 1 群）に分けられるが、本研究ではプライミング接種 2 回、ブースター接種 1 回を行う群（以下、2p+1 群）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 4～23 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、滲出性中耳炎の罹患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 4～23 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罹患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 群ではワクチン導入前に比べて滲出性中耳炎の罹患率が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 3 年後、4 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、2019 年 10 月 19・20・26 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

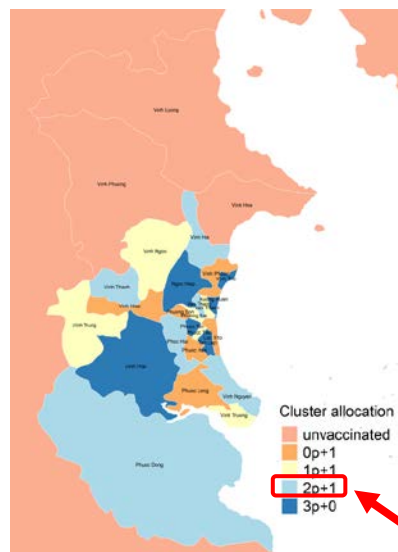


図 2 5 群に分けられたニャチャン市の地域：本研究の対象となったのは「2p+1」で示された地域である。

## 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%）。2 年後の 2018 年 10 月は 637 児で両耳の評価が可能で、うち 62 児（9.7%）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%）。今回、3 年後の 2019 年 10 月は 631 児で両耳の評価が可能であったが、うち 89 児（14.1%）に滲出性中耳炎を認め、有病率は前年よりやや上昇し有意差を認めなかった（95%CI：11.5–17.1%）。

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、ワクチン接種開始から 2 年以降は減少傾向にはあるものの、総数としては有意差を認めるまでには至らなかった。今後はデータをさらに変数別に詳細に解析していく予定である。

また、中耳炎と肺炎球菌保菌の関連性に関して多変量解析を行ったところ、年齢区分によってやや結果が異なるものの、上咽頭肺炎球菌保菌と中耳炎に正の相関が示唆された。上咽頭の肺炎球菌保菌はワクチンの直接効果および間接効果の指標とされており、今回の結果はワクチンの中耳炎に対する効果の生物学的な根拠となるのではないかと推測される。

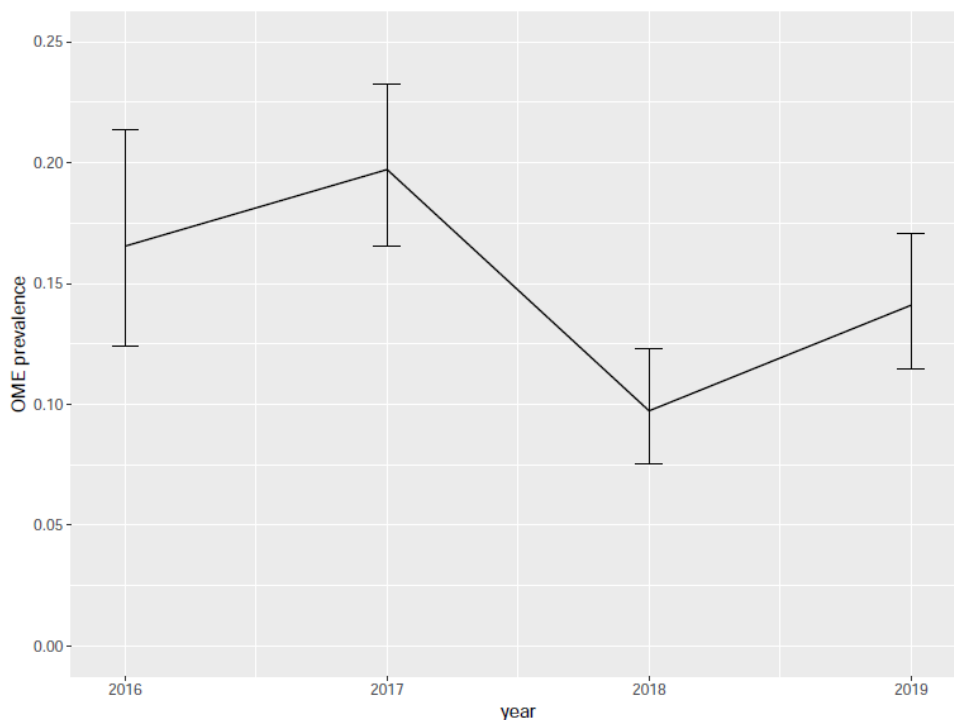


図 3 滲出性中耳炎有病率の推移

### ③成果の公表

#### 発表

1. 佐藤智生、原 稔、金子賢一、樋泉道子、吉田レイミント、高橋晴雄：ベトナム・ニャチャン市における2歳未満児の滲出性中耳炎有病率と上咽頭肺炎球菌保菌率 経過報告．第159回日耳鼻長崎県地方部会学術講演会．2019年4月7日、長崎
2. 佐藤智生、原 稔、金子賢一、樋泉道子、吉田レイミント、高橋晴雄：ベトナム・ニャチャン市における2歳未満児の滲出性中耳炎有病率と上咽頭肺炎球菌保菌率．第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会．2019年5月8～11日、大阪

#### 6. 自己評価

調査では、今回も短期間で多数の児の診察を行ったが、要領がわかってきたため大きな混乱もなく、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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ライブイメージングによるエボラウイルス粒子放出機構の解明  
課 題 番 号：2019-Ippan-25
2. 代 表 者：高松 由基（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）  
共同研究者：野田 岳志（京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授）  
南保 明日香（感染症共同研究拠点感染病態研究分野  
熱帯医学研究所（兼任） 教授）
3. 決 定 額：400 千円
4. 申請時書類より

### ①研究目的

エボラ出血熱はエボラウイルス（EBOV）による急性熱性疾患で、血液や体液との接触を介してヒトーヒト感染し、流行地以外にも感染が拡大する可能性がある。実際に2014年に西アフリカで発生した史上最大のエボラ出血熱の流行では、国境や大陸を越えてアメリカやヨーロッパでもEBOV感染例を認めており、本邦も決して例外ではない。この大流行では最終的に28,000人の患者と11,000人の死者が報告された。そして、多くの研究者が対抗策を見出すため 仁：尽力しているが、いまだに認可された治療法は確立されていない。こうした中、申請者はエボラウイルスの生活環を明らかにするための非感染性ライブセルイメージングシステムを構築することに成功した。これによりエボラウイルスの複製の足場となるヌクレオカプシドについて、その形成・輸送過程の分子メカニズムを解明することが可能になった。

エボラウイルスのマトリクスタンパク質であるVP40は出芽に必須であることがわかっているが、その形成・輸送過程についての詳細は不明である。また、VP40がどのようにヌクレオカプシドと会合し、ウイルス粒子を形成するのかわかっていない。そこで本研究では、エボラウイルスの非感染性ライブセルイメージングシステムを使い、ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質を蛍光タンパク質でそれぞれ標識し、その移動経路と粒子形成過程を明らかにする。またウイルス様粒子の出芽過程を視覚化することで、どのようにヌクレオカプシドとマトリクスタンパク質が会合するのか、その分子機構を明らかにする。さらに粒子形成・出芽に関わる宿主因子との相互作用を解明することで、エボラウイルス粒子の形成を阻害する新しい治療法の開発に貢献したいと考えている。

応用研究として、他のウイルスについても、その生活環を明らかにするためのライブセルイメージングシステムを構築したいと考えている。

## ②研究内容

本研究では非感染性ライブセルイメージングシステムを応用し、下記の三つの研究項目を実施する。

### ① ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質がウイルス粒子を形成する分子機構を解明する。

ヌクレオカプシドタンパク質とマトリクスタンパク質（VP40）をそれぞれ蛍光タンパク質で標識し、その移動経路と粒子形成過程をライブイメージングで描出することで、VP40 がどのようにウイルス様粒子の出芽を促進するのか解明する。

### ② 粒子形成・出芽に関わる宿主因子との相互作用を解明する。

受け入れ研究者である南保博士の報告を始めとして、エボラウイルス粒子の出芽に関わる宿主因子は複数同定されている。それらの宿主因子がどのようにヌクレオカプシド様構造およびマトリクスタンパク質と相互作用するのか、遺伝子サイレンシング法および特異的阻害薬を用いて段階的に解明する。

### ③ 他の高病原性ウイルスにライブセルイメージングシステムを応用する。

非感染性ライブイメージングシステムの考え方は、他の高病原性ウイルスにも適応が可能であると考えられる。そこで、まずはエボラウイルスと近縁のマールブルグウイルスでも同様のアッセイ系の構築を目指す。徐々に観察対象を広げて、南保博士の研究対象である DNA ウイルスや、その他の RNA ウイルスについても応用研究の可能性を模索したい。

**1年目**：長崎大学の共同研究設備ニコンラボのライブセルイメージング顕微鏡を使い、ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質をそれぞれ可視化し、ウイルス粒子形成・出芽過程を描写するための実験系の最適化を行う。

**2年目**：1年目に最適化した実験系を使い、データを収集し解析する。ウイルス粒子の形成・出芽に関わる宿主因子とウイルスタンパク質間の相互作用をライブセルイメージングで明らかにする。また解析データをまとめて、国際科学雑誌へ投稿する。他のウイルスへの応用研究を開始し、次の研究計画への基盤を構築する。

### ③予想される成果

申請者らが構築したアッセイ系と熱研受け入れ教員である南保博士の技術・知識を融合させることで、これまでわかっていなかったエボラウイルスの粒子形成過程・出芽過程の分子機構を明らかにすることが予想される。本研究では、複数の蛍光タンパク質とライブセルイメージング顕微鏡を用いてウイルスのライフサイクルを視覚化する（ヌクレオカプシドタンパク質、マトリクスタンパク質、宿主因子をそれぞれ別の色で標識）。これにより、ウイルス粒子形成に関わるウイルスタンパク質・宿主因子間の相互作用を4次元（時間+3次元空間）で解析できるようになる。これらの成果は、ウイルス因子・宿主因子を介したエボラウイルスの新しい治療法の開発に貢献すると考えられる。

非感染性ライブイメージングを他のウイルスに応用することで、それらのウイルスのライフサイクルを視覚化することが可能になる。このシステムを用いることでそれぞれのウイルス粒子形成機構を解明し、新しい治療法を開発するための基盤に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

本年度の共同研究においては、研究内容①の「ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質がウイルス粒子を形成する分子機構を解明」するためのライブイメージングシステムの構築を進めた。具体的には、哺乳類培養細胞にウイルスタンパク質（エボラウイルスのウイルスタンパク質 NP, VP35, VP24, 蛍光融合タンパク質 VP30-GFP, VP40-TagRFP）を発現させて、ライブセルイメージング顕微鏡を用いて観察した。

また、③の「他の高病原性ウイルスにライブセルイメージングシステムを応用」について、エボラウイルスと近縁のマールブルグウイルスについて、ウイルスタンパク質発現系（マールブルグウイルスのウイルスのウイルスタンパク質 NP, VP35, VP24, L, VP40, GP）と蛍光融合タンパク質（VP30-GFP）を用いて、非感染性のライブセルイメージングシステムの構築を進めた。



## ②成果（結果＋考察）

研究内容①「ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質がウイルス粒子を形成する分子機構を解明」については、これまで輸送機構の詳細が分かっていないマトリクスタンパク質 VP40 について、ライブイメージングを用いて哺乳類細胞における発現から放出過程に至るまでを視覚化することに成功した。ヒト肝細胞由来の培養細胞 Huh-7 に VP40 と VP40-TagRFP を一過性に発現し、発現 6 時間後から観察を開始し、12～24 時間後に細胞表面から出芽する VP40 ウイルス様粒子を確認した（図 1）。また、その輸送経路を同定するために細胞骨格阻害剤を用いてスクリーニングし、VP40 の輸送から出芽における過程では微小管の重合が重要であることを明らかにした。今後、ヌクレオカプシド様構造との共発現、宿主細胞因子との共発現を行い、ヌクレオカプシド輸送とウイルス粒子放出の分子機構解析を進めたい。

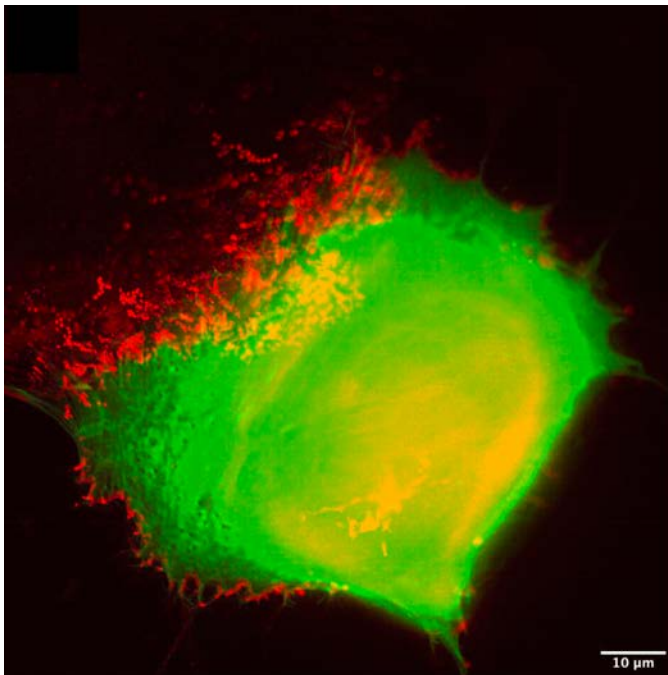


図 1.  
エボラウイルス VP40, VP40-TagRFP (赤色)  
を発現させた Huh-7 細胞  
(対照として、アクチンを緑色で標識)

トランスフォーメーション 6 時間後から開始し、15 分おきに 24 時間後まで観察した。本画像は各タイムラプス画像を一枚に集約したもの。細胞表面に集合し、ゆっくりと出芽に至るウイルス様粒子が確認された。本研究によりエボラウイルスのウイルス様粒子が出芽する様子を、ライブセルイメージングで描出する事に世界で初めて成功した。

また、③の「他の高病原性ウイルスにライブセルイメージングシステムを応用」についても進展があった。エボラウイルスと近縁のマールブルグウイルスについて、ウイルススタンパク質発現系と蛍光融合タンパク質 (VP30-GFP) を用いて、非感染性のライブセルイメージングシステムを構築する事に成功した (図 2)。ヌクレオカプシド様構造の輸送過程については、エボラウイルスの場合と同様にアクチンの重合が重要であることを突き止めた (Takamatsu, et al. Virol. J. 2019.)。現在、どのウイルススタンパク質がヌクレオカプシドの形成と輸送に必須であるのか評価を進めている。

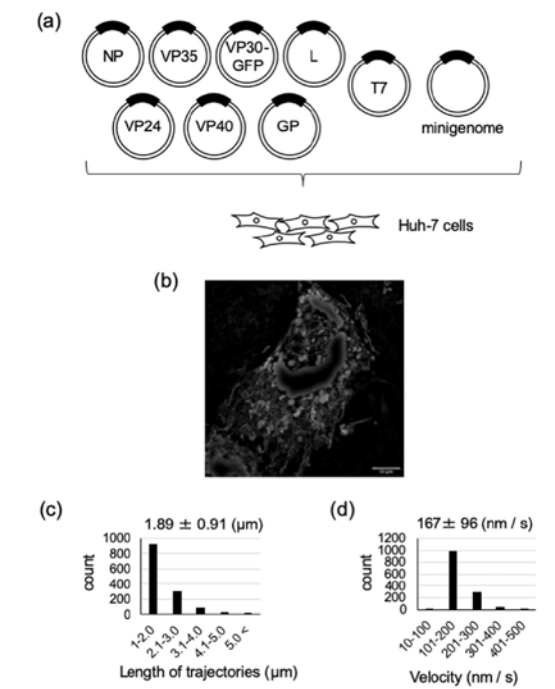


図2.  
本年の研究成果であるマールブルグウイルスの非感染性ライブイメージングについて、発表論文より引用。

マールブルグウイルスのウイルスタンパク質発現系を用いてヌクレオカプシド様構造が輸送される様子を描出する事に成功した。移動距離及び移動スピードはエボラウイルスと同様であった。

Virology J. 2019 Dec 19;16(1):159. doi: 10.1186/s12985-019-1267-9.  
Figure 2

#### ④ 成果の公表

Yuki Takamatsu, Olga Dolnik, Takeshi Noda and Stephan Becker. “A live-cell imaging system for visualizing the transport of Marburg virus nucleocapsid-like structures.”

Virology Journal. 2019 Dec 19;16(1):159. doi: 10.1186/s12985-019-1267-9.

## 6. 自己評価

申請者の異動があり、思った様に研究ができない期間があったが、当初の予定通りの成果を挙げられたと自己評価している。特にマトリックスタンパク質の発現から出芽に到る過程を視覚化できたことは非常に良かった。また、エボラウイルスと近縁のマールブルグウイルスについて非感染性ライブセルイメージングシステムを構築し、国際誌に発表することが出来た点も良かった。国際誌に成果を発表するという目標が達成できたことから、予想通りの成果を挙げられたと自己評価した。来年度は本年の成果をさらに発展させて、エボラウイルス及びその他の高病原性ウイルスのタンパク質複合体について、その形成・輸送過程の分子機構の解明を進めたい。

## 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

## 令和元（2019）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナム北部における急性ウイルス性脳髄膜炎の分子疫学的解析  
課 題 番 号：2019-Ippan-26

2. 代 表 者：西條 政幸（国立感染症研究所 ウイルス第1部 部長）  
共同研究者：林 昌宏（国立感染症研究所 ウイルス第1部 室長）  
福士 秀悦（国立感染症研究所 ウイルス第1部 室長）  
伊藤 睦代（国立感染症研究所 ウイルス第1部 室長）  
稲垣 拓也（国立感染症研究所 ウイルス第1部 大学院生）  
竹村 太地郎（長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点 助教）

3. 決 定 額：900 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

脳炎・髄膜炎は様々な要因・病原体によって引き起こされる。細菌やウイルスの感染は主要な要因のひとつであるが、多種にわたる細菌・ウイルスによって引き起こされることが知られており病原体が同定されないことも多い。早期病原体同定は流行感染対策に、患者においては適切な治療法選択に貢献する。中枢神経感染症流行や病原体について詳しく調べることは対策や適切な治療法選択に重要である。特に途上国では現在も病原体検査が十分になされておらず、経験に基づいた病原体診断が主となっている。脳髄膜炎の原因となる各々のウイルスを同定し、その陽性率を把握することは、診断スキームの確立と有効な治療法を早期に提供することへの第一歩となる。

本研究では、ベトナムの小児における非細菌性急性脳炎・髄膜炎に関連すると思われるウイルス（単純ヘルペスウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルス）の脳脊髄液（CSF）や血液からの検出を試み、各ウイルスの陽性率を明らかにする。陽性検体については全ゲノム解析を行い、(1)脳脊髄液由来の病原体の塩基配列と血清由来病原体の塩基配列との比較解析による脳へと移行するウイルス群の性状解析、(2)東南アジア地域における各ウイルスの分子疫学解析を実施する。さらに上記5ウイルスの陰性検体に関してはNGSによるCSFからのウイルスRNAもしくはDNAを取得し、塩基配列を検出することで病原体（ウイルス、細菌、真菌を含む）同定する。

### ②研究内容

急性脳炎患者の脳脊髄液（CSF）検体から単純ヘルペスウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、インフルエンザウイルス、エンテロウイルスの遺伝子検出をPCR、リアルタイムPCRを用いて実施する。ベトナム国立衛生疫学研究所ウイルス部との

連携により収集された、2018年にベトナム北部ハノイ市の小児総合病院にて急性脳炎と診断され培養検査によって細菌感染が除外された480検体を対象とする。上記5種のウイルスの陽性率を明らかにする。その後、各ウイルスの陽性10検体を目安に核酸検体からNGSを用いて全ゲノム配列の取得を試み、当地にて流行している血清由来病原体の塩基配列との比較ゲノム配列解析を行い、CSF検体由来病原体の塩基配列に共通する変異の有無を明らかにする。さらに得られた配列は時空間的進化解析に供し、ベトナムもしくは東南アジア地域における各ウイルスの分子進化の理解にあたる。また上記5ウイルス以外にも多様なウイルスが脳脊髄膜炎に起因することから、陰性検体から抽出した核酸検体をNGSを用いて解析し、未知ウイルスを含む保有微生物（ウイルス、細菌、真菌を含む）の検出も試みる。特定の微生物が検出されなかった検体に関しては抗NMDA抗体等の自己免疫性脳炎に関連する抗体検出をELISA法によって試み、細菌性脳炎、自己免疫性脳炎、非細菌性脳炎における各ウイルスの頻度を可能な限り明らかにする。2019年度もハノイ小児総合病院における検体収集は継続し、2020年度も上記の解析を継続して実施することで各病原体の経時動態を明らかにする。

### ③予想される成果

PCRもしくはリアルタイムPCRにより、脳炎・髄膜炎に関連すると考えられる主要ウイルスの陽性率が明らかになるとともに、NGSによるCSF検体に含まれる核酸を網羅的に解析することを通じて脳炎・髄膜炎の原因となる病原体が明らかにされる。自己免疫性脳・髄膜炎、細菌性髄膜炎の検体数データと合わせることで、小児急性脳炎・髄膜炎への各ウイルスの関わりが明らかになり、脳炎・髄膜炎の診断スキーム確立に貢献する。患者の発生日時、場所等の疫学情報と全ゲノム情報から各ウイルスのより詳細な分子疫学、分子進化解明が進む。さらに、CSF由来病原体と血清由来病原体の塩基配列の比較ゲノム解析より脳炎と強い相関を持つ変異の同定が期待され、中枢神経系へのウイルス侵入機構の解明の一助となる。未知ウイルスが検出された場合にはその疫学的・臨床的特徴を明らかにするための研究に繋がる。その病原体の検出感度と特異度の高い検出系の構築が期待される。本研究では十分数のCSF検体を解析することが可能であり、科学的に価値ある知見が得られる可能性が高い。

## 5. 実施報告：

### ①研究材料・方法・手続き

ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)ウイルス部 Dr. Nga 室長と検討を行い、2013年にベトナム国立小児病院にて収集され凍結保存されていた672検体を解析対象とした。NIHEから提供された検体リストを元に重複、解析対象外の検体を除き、計570検体の解析を行った。

CSF 検体から DNA と RNA をそれぞれ抽出した (DNA Blood Mini kit / Viral RNA Mini kit, QIAGEN)。DNA 検体から単純ヘルペスウイルス (HSV-1 および-2)、RNA 検体よりエンテロウイルス (EV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV-1, -2, -3, -4)をリアルタイム PCR で検出した。検出に用いたプライマーとプローブを表1に示す。JEV に関しては検出感度が非常に低かったため、ELISA 法による抗体検出の結果を用いた。

陽性数をウイルス別に集計し、検体リストに基づく症状との相関を求めた。全てのウイルスが検出されなかった検体に対して10検体を混合し、Illumina MiseqによるRNA-seq解析を実施した。得られた配列情報はCLC genome Workbenchを用いてアセンブルを行い contig を query として Viral Annotation and Identification (VAPiD) pipeline を用いたウイルス遺伝子の検索を行った。また、リアルタイム PCR でDENV陽性検体であった検体に関して同CSF検体を用いた全ゲノム解析を試みた。

### ②成果 (結果+考察)

計7ウイルスのリアルタイムPCR、抗JEV抗体のELISA、細菌16S rRNA遺伝子に対するPCRの結果を表2に示す。JEVが9検体(1.58%)、HSV-1が10検体(1.75%)、EVが76検体(13.33%)、DENV-1が6検体(1.05%)、DENV-2が30検体(5.26%)、DENV-3が4検体(0.7%)、DENV-4が73検体(12.81%)から検出された。また、HSV-2は全ての検体で検出されなかった。重感染の可能性が示唆される複数の陽性検体は41検体(7.2%)で見られ、1検体が4ウイルス、5検体が3ウイルス、35検体が2ウイルス陽性であった。234検体(41.1%)からはいずれも検出されなかった。また、本研究では細菌培養検査にて陰性であった検体について解析を行ったが、16検体(2.81%)で細菌の16S rRNA遺伝子が増幅された。増幅されたDNA断片の配列はいずれも *Streptococcus pneumoniae* と高い相同性を示した。

DENV及びHSV-1陽性検体のRNAを用いて次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を試みたが、解析に必要なdepthで配列を得られた検体は無く、分子系統解析は困難であった。また、全て陰性の検体に関しても10検体ずつ混合して配列取得を試み、データベースを用いた検索を行ったところ、flavivirusと比較的高い相同性を示す配列が複数得られ、現在さらに詳細な解析を進めているが、いずれもヒットするリードは少なく難航している。また、同じ配列データから細菌ゲノムデータベースに対する検索も現在進めている。

JEVに関してはELISA法では66検体(11.64%)が陽性であったことから、検出頻度に大きな食い違いが見られた。検出感度に起因する可能性も考えられるが、

ELISA 法は抗体を検出しているため感染後に既に検出限界以下にまでウイルス量が減少していた可能性も考えられる。そのため本研究ではいずれかで陽性を示した検体を陽性として扱った。検出結果を総合すると DENV-2 と DENV-4 の陽性数が予想よりも大きかった。類似の研究として、ベトナム南部において 1996 年から 2008 年に収集された 291 検体の解析結果と 2004 年にやはりベトナム南部で収集された 194 検体の解析結果がそれぞれが報告されている (Le Van Tan et al. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Aug 28;8(8):e3127, Le Van Tan et al.) その報告と比較すると、特に EV (2.7% 及び 2.1%) と DENV (6.5% 及び 4.6%) の検出頻度が非常に高い結果になった。既報では DENV の血清型までは明らかにされていないが、本解析では特に DENV-2 と DENV-4 が多かった。2013 年のハノイにおける調査では DENV-4 感染の報告は少なかったが、2012 年は DENV-2 と DENV-4 が比較的多かったことが NIHE ウイルス部の調査で明らかになっている (personal communication)。CSF 検体の収集が 1 月から 6 月に偏っていたことから、2012 年の DENV 流行型を反映していることが推察された。

臨床にて収集された患者の症状との相関では、encephalitis/meningitis 及び fever の患者において EV、DENV-4、JEV の陽性者が多かった。ウイルス毎に異なる特性が見出せるか、統計解析を進めている。また、症状の定義が不明な部分も多いため、共同研究者及び検体提供に協力をえたベトナム国立小児病院とのコミュニケーションを継続している。

DENV 感染によると推測される脳炎の報告は多数あるが、DENV 感染者の中での発症頻度は低いと考えられている。しかし、本研究の結果はベトナム北部における脳炎・髄膜炎患者の中に比較的高頻度で DENV 感染が見られることを示唆しており、継続的な調査が必要であろう。また、細菌培養検査で検出されない細菌感染例が一定数存在することも示唆され、培養検査と遺伝子検査との相関及び菌種の同定も継続することが必要と考えている。

表 1. 本研究に使用したプライマー、プローブ

Oligo name	Length	Tm	GC %	Sequence (5' - 3')
HSV-F	20	63.5	60	CGCATCAAGACCACCTCCTC
HSV-R	18	70.9	72.2	GCAGCTCGCACCACGCGA
HSV-1_Probe	17	70.1	70.5	[FAM]TGGCAACGCGGCCAAC[TAM]
HSV-2_Probe	16	71	81.2	[FAM]CGGCGATGCGCCCCAG[TAM]
JEV-NS2_F	16	56.7	62.5	AGCTGGGCCTTCTGGT
JEV-NS2_R	18	58.9	55.5	CCCAAGCATCAGCACAAG
JEV-NS2_probe	22	72.8	63.6	[FAM]CTTCGCAAGAGGTGGACGGCCA[TAM]
EV-UTR-fwd	22	71.5	63.6	GGCCCTGAATGCGGCTAATCC
EV-UTR-rev	23	57.1	47.8	GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA
EV_probe	23	66.6	56.5	[FAM]CCGACTACTTTGGGWTCCGTGT[TAM]
D1MGBEn469s	23	59.5	37.4	GAACATGGRACAAYTGCAACYAT
D1MGBEn536r	24	62.9	45.8	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTCA
D1MGBEn493p	14		57.1	[FAM]ACACCTCAAGCTCC[BHQ1] - MGB *
D2MGBEn493s	23	62	47.8	ACACCACAGAGTTCCATCACAGA
D2MGBEn568r	21	56.8	47.6	CATCTCATTGAAGTCNAGGCC
D2MGBEn545p	14		57.1	[FAM]CGATGGARTGCTCTC[BHQ1] - MGB *
D3MBGEn1s	24	60.3	45.8	ATGAGATGYGTGGGAGTRGGAAAC
D3MGBEn71r	22	69.4	54.5	CACCACDCAACCCACGTAGCT
D3MGBEn27P	18		38.9	[FAM]AGATTTTGTGGAAGGYCT[BHQ1] - MGB *
D4Ten711s	22	46.5	36.3	GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT
D4Ten786c	21	62.3	47.6	WGARTGCATRGCTCCYTCCTG
D4Ten734p	31	70.9	51.6	[6FAM]CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTRGGATC[TAM]

表 2. 各ウイルスの検出結果

	No. of positive	rate
HSV-1	10	1.75%
HSV-2	0	0.0%
JEV (ELISA)	66	11.6%
JEV (qPCR)	9	1.58%
Enterovirus	76	13.33%
DENV-1	6	1.05%
-2	30	5.26%
-3	4	0.70%
-4	73	12.80%
Bacteria	16	2.81%
( <i>S. pneumoniae</i> )	(16)	(2.81%)



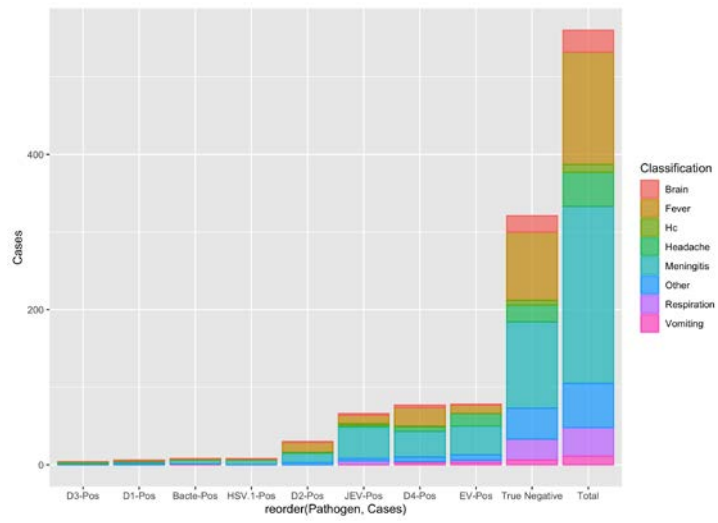


図1.臨床情報（症状）と各ウイルスの検出頻度

### ③成果の公表

統計解析の終了後、論文作成と投稿予定。

## 6. 自己評価

当初の予定を変更し 2013 年の検体を解析した以外は、予定通りの解析を進めることができた。検体数はほぼ予定の数と同じであり、他研究と比較しても十分数を解析することができた。脳炎疑い患者の中で DENV と EV の感染例がベトナム南部地域と比較して多かったことは驚きであり、今後の研究発展につながる可能性を示せたことが何よりも重要な点だと考えている。全ゲノム配列が取得できなかったのが残念であるが、研究開始前から CSF 検体ではウイルスコピー数が少ないことも予想していた。そのため、研究目的を達成するのに大きな影響とは考えていない。本研究の直接の目的ではないが、次世代シーケンサーを活用した未知ウイルス・細菌探索に活用できる解析パイプラインの構築と比較検討をベトナム拠点研究室にて実施することができ、この点では想定以上の成果と考えている。臨床情報に不備（重複、記載の不統一等）が多数見られたことから、統計解析に関して遅れが生じた。この点を克服し、論文発表に至る予定である。

## 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)
- 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

※採択番号：2019-A-1

「北タイ・ランパン HIV コホートにおける 20 年の成果と今後のデータシェアリング体制構築」

代表者：土屋 菜歩（東北大学 東北メディカル・メガバンク機構 講師）

については、新型コロナウイルス感染拡大の影響により

開催延期となったため掲載しておりません。

## 令和元（2019）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：2019-A-2  
開催期間：令和元年5月28日（火）～令和元年5月30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：57名
3. 経費：900 千円

### 4. 研究集会の概要

#### ①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令和元年5月28日～5月30日の3日間、講師10名（うち外国から5名、国内から5名）と参加者47名（うち外国から29名、国内から18名）を集め開催された。FERCAP-Philippines（フィリピン国）の Cristina Torres, Mae Fah Luang University（タイ国）の Sangkae Chamnanvanakij、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：令和元年5月28日(火)、5月29日(水)、5月30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：<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)、  
Sangkae Chamnanvanakij（Mae Fah Luang 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）  
Chairat Shayakul（Mahidol University）  
Supatra Porasuphatana（Khon Kaen University）

## 【研修コースの概要】

(第 1 日目) 2019 年 5 月 28 日(火)

8:45～ 9:15 開会のあいさつ：(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 ブレイク  
10:30～11:15 研究倫理委員会の役割と機能 (Sangkae Chamnanvanakij)  
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 ブレイク  
14:30～15:30 Case Study 1： グループ討論 (Cristina Torres, Kwanchanok Yimtae,  
Sangkae Chamnanvanakij, 佐々木均, Dumre Shyam Prakash, Juntra  
Karbwan, 平山謙二)  
15:30～17:00 Case Study 2： 総合討論 (Kwanchanok Yimtae)  
17:00 End of day one

(第 2 日目) 2019 年 5 月 29 日(水)

8:30～ 9:00 薬理ゲノム学研究における倫理的問題 (平山謙二)

9:00～ 9:45 救急医療研究における倫理的問題 (Kwanchanok Yimtae)

9:45～10:30 疫学のおよび社会的研究における倫理問題 (Cristina Torres)

10:30～11:00 ブレイク

11:00～12:00 小児科研究における倫理的問題 (Sangkae Chamnanvanakij)

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, Sangkae Chmnanvanakij, 佐々木 均, Dumre Shyam Prakash, Juntra Karbwang, 平山謙二)

15:00～15:30 ブレイク

15:30～17:00 Case Study 2: 総合討論 (Sangkae Chmnanvanakij)

17:00 End of day 2

(第 3 日目) 2019 年 5 月 30 日(木)

9:00～10:30 国際保健研究における倫理問題 (Cristina Torres) 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

10:30～11:00 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>

No.	Name	Country	Affiliation
1	Jay Ron O. Padua	Philippines	Alternate member- IRB Philippine Children's Medical Center Independent Consultant Reviewer- Research Ethics and Review Board, San Lazaro Hospital
2	Laksamee Chanvej	Thailand	Bangkok Hospital
3	Patou Tantbirojn	Thailand	Department of Obstetrics & Gynecology Faculty of Medicine Chulalongkorn University
4	Phenkhae Laying	Thailand	Dental Health Bureau, Department of Health Ministry of Public Health
5	Piya Rujkijyanont	Thailand	Department of Pediatrics Phramongkutklao Hospital

6	Saowalak Hunnangkul	Thailand	Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University
7	Sirikul Manochantr	Thailand	Division of Cell Biology, Faculty of Medicine Thammasat University
8	Thumwadee Tangsiriwatthana	Thailand	Department of Obstetrics and Gynecology Khon Kaen Hospital
9	Ussanee Sangkomkamhang	Thailand	Department of Obstetrics and Gynecology Khon Kaen Hospital
10	Watcharin Cherdchim	Thailand	Prapokklao Hospital
11	Napana Aimjirakul	Thailand	Faculty of Dentistry Srinakharinwirot University
12	Rasmon Kalayasiri	Thailand	Department of Psychiatry Faculty of Medicine Chulalongkorn University
13	Yongkasem Vorasettakarnkij	Thailand	Department of Medicine Faculty of Medicine Chulalongkorn University
14	Watcharee Limpanasithikul	Thailand	Department of Pharmacology Faculty of Medicine Chulalongkorn University
15	Areewan Cheawchanwattana	Thailand	Division of Social and Administration Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences Khon Kaen University
16	Chairat Shayakul	Thailand	Department of Medicine Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University
17	Supatra Porasuphatana	Thailand	Division of Pharmacognosy and Toxicology Faculty of Pharmaceutical Sciences Khon Kaen University
18	Chaweewan Jansakul	Thailand	Faculty of Traditional Thai medicine, Prince of Songkla University
19	Kamonthip Wiwattanawongsa	Thailand	Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University
20	Sangarun Isaramalai	Thailand	Faculty of Nursing, Prince of Songkla University
21	Wongchan Petpichetchian	Thailand	Faculty of Nursing, Prince of Songkla University
22	Prospero Ma. C. Tuano	Philippines	St. Luke Hospital
23	Cecilio Alejandro C. Villanueva	Philippines	St. Luke Hospital
24	Gelza Mae Zabat	Philippines	St. Luke Hospital
25	Joan H. Tan	Philippines	St. Luke Hospital



26	Arabelle D. Guerrero	Philippines	St. Luke Hospital
27	Roberto C. Mirasol	Philippines	St. Luke Hospital
28	Gretchen Bonita V. Ranada	Philippines	Mariano Marcos Memorial Hospital and Medical Center
29	Jhoan T Galano	Philippines	Mariano Marcos Memorial Hospital and Medical Center
30	SHASHIKA LAVANGI WIJESOORIYA	Sri Lankan / Japan	School of Tropical Medicine and Global Health Nagasaki University
31	SANDRA RAINI KENDRA	Kenya / Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
32	NUNDU SABITI SABIN	Congo / Japan (RDC)	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
33	Ayako Hyuga	Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
34	MUTANTU NSELE PIERRE	Congo / Japan (RDC)	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
35	MONI MPIA BENEDICTE	Congo / Japan (RDC)	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
36	LUVAI ELIZABETH AJEMA CHEBICHI	Kenya / Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
37	KHINE MYA NWE	Myanmar / Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

38	JALAL ALSHAWEESH	Syria / Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
39	AFOWOWE TOSIN OLADIPO	Nigeria / Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
40	Maya Suzuki	Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
41	WAMBUGU PERIS WANJIRU	Kenya / Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
42	DONG THI THU TRANG	Vietnum / Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
43	LAMI KRIS	Congo / Japan (RDC)	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
44	MENG XIANGYUE	China / Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
45	ALAM MOHAMMAD IBTEHAZ	Bangladesh / Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
46	NESABI MAHDIS	Iran-Islamic Republic / Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
47	TRAN QUANG THACH	Vietnum / Japan	Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

<講師・メンターリスト>

No.	Name	Country	Institution
1	Hitoshi Sasaki	Japan	Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital
2	Kenji Hirayama	Japan	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
3	Juntra Karbwang Laothavorn	Japan / Thailand	Department of Clinical Product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
4	Dumre Shyam Prakash	Japan / Nepal	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
5	Chisato Narahara	Japan	Department of Clinical Product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
6	Chairat Shayakul	Thailand	Department of Medicine Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University
7	Supatra Porasuphatana	Thailand	Division of Pharmacognosy and Toxicology Faculty of Pharmaceutical Sciences Khon Kaen University
8	Cristina Torres	Philippine	FERCAP Coordinator / WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, Thailand Thammasat University
9	Sangkae Chamnanvanakij	Thailand	School of Medicine, Mae Fah Luang University
10	Kwanchanok Yimtae	Thailand	Khon Kaen University, Thailand

## 6. 自己評価

令和元年5月28日(火)～令和元年5月30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10名(うち外国から5名、国内から5名)と参加者47名(うち外国から29名、国内から18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18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

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

## 令和元（2019）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：世界保健ニーズに応える医薬品研究開発ディプロマ・コース

採択番号：2019-A-3

開催期間：令和元年9月2日（月）～令和元年9月13日（金）

### 2. 代表者：佐々木 均（長崎大学病院薬剤部 教授）

参加人員：29名

### 3. 経費：700 千円

### 4. 研究集会の概要

薬剤、ワクチン、診断薬などが作り出されるまでには種々の複雑な行程があり、そこには多様な技術が求められます。製薬研究開発に携わる者は常にその全行程を視野に入れ他の行程を請け負う科学者、技術者たちへの配慮が必要です。研究者がある仮説を立ててそこから新たな発見、知識を導き出そうとし、理論を構築してそれを実証します。製薬企業などの開発担当者はその発見、知識を基に市場で需要の高い製品を作り上げることとなるのです。本来、研究と開発は二つのまったく異なる分野であり、研究者と開発者はまったく異なる価値観と考え方を持っており両者はお互いに接触することもなく、そのため相互に理解することはありません。が、新薬誕生にその二つの分野はいずれも欠くことができません。さらに言えば、公衆衛生に役立つ医薬品に応用できないような科学的発見（医学研究）は意味がないのです。

医薬品研究開発を総合的に扱う講義過程は現在のところ数えるほどしか開設されておらず、イギリスのカーディフ大学修士課程、スイス、バーゼル大学の ECPM（薬学センター）、フランス、リヨン大学など数例です。その他の国々では新薬研究開発にかかわる講義はさまざまな大学の学部、修士両課程のあちこちに分散しているような状況です。基礎科学、有機化学、免疫学、薬学、薬理学、ワクチン学、臨床薬理学などがそれにあたります。新薬開発のあらゆるプロセスにかかわる者は、それぞれの責任を認め他のプロセスを実施するものとの連携の中に業務を遂行しなければなりません。

表記のディプロマ・コースは、このような現状にある新薬研究開発にかかわる多種の知識を 専門的にひとつの課程にまとめ、修士、博士の学位を授けるものとして発足しました。

## 5. 実施報告

### <プログラム>

日 時：令和元年9月2日(月)～9月13日(金)

場 所：長崎大学グローバルヘルス 総合研究棟4階中セミナー室1

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・臨床開発分野

#### 【研修の目的】

ディプロマ・コースの目的は新薬研究開発の課程にかかわる基礎知識の授与にあります。化学、毒物学、臨床検査法の規制などが研究開発という一連の過程に相互に影響しあって包括されているという事実を参加者が経験的に知ることでもあります。

#### 【対象者】

ディプロマ・コースは内容の専門性と、講義が英語で行われることから、参加資格を以下のとおりとします。

- ・理科系学部のいずれかにおいて学士を取得している。
- ・英語の講義が理解できる

#### 【研修方法】

「ディプロマ・コース」では、すべての参加学生が製品開発のプロセスの概要を理解できるような共通の授業を受けることになります。約2週間のコース全体を7つの独立したモジュール(ユニット)に分け、ユニットごとの部分受講も可能です。協力大学は1年毎の持ち回りで事務と実施会場を提供していきます。

#### 【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)、Kesara Na-bangchang (Thammasat University)

## 【研修コースの概要】

### Module 1: Introduction

Recognize the concept needs of PRD in medical and global view of health

#### September 2 (Day 1)

9:00- 9:15 Welcome address

*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

9:15 - 9:30 Objective of the course and expectation, Pre-test

*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

9:30-10:30 Overview of product research and development and stakeholders

*Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*

10:30-10:45 Break

10:45-11:45 Key medical and public health issues, and the need for new products

*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

11:45-13:00 Lunch

**Pof. Kenji Hirayama is free**

**September 3<sup>rd</sup> afternoon and September 9<sup>th</sup>**

### Module 2: Drug Discovery and Development

#### Session 1: Discovery

Describe the pharmacological process for drug discovery. Identify the process to protect intellectual property.

#### September 2 (Day 1)

13:00-15:30 History and overview of drug discovery process,

The role of Genomics and bioinformatics,

High throughput screening:

Pre-requisite of HITS systems, Assay Development & Validation,

Biochemical & Cell-based assay, Assay Readout & Dtection,

The role of Chemistry in Drug Discovery:

-Lead Identification

*Associate Professor Dr. Yoshimasa Tanaka, Nagasaki University, Japan*

15:30 -15:45 Break

15:45- 17:00 Drug Discovery in Academia

*Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*

### September 3 (Day 2)

- 9:00- 9:45     The role of Pharmacology  
                  -Pharmacological Evaluations (Selectivity screening, Pharmacological profiling,  
                  Testing in animal models of disease, Safety pharmacology)  
                  -Examples  
                  *Associate Professor Dr. Yoshimasa Tanaka, Nagasaki University, Japan*

### Session 2: Pre-clinical Development

Describe the process of pharmacological development

- 9:45-10:15     Overview: Pre-clinical study requirements for human clinical studies  
                  *Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*
- 10:15-11:00     Assess of Drug Safety: The role of toxicology  
                  -Objective and Type of Toxicology  
                  -Exploratory Toxicology  
                  -Regulatory Toxicology  
                  -Toxicity Measures and Toxicity Test  
                  *Professor Dr. Tsuyoshi Kihara, Nagasaki University, Japan*
- 11:00-11:15     Break
- 11:15-12:15     Pharmaceutical Development and CMC  
                  Professor Dr. Hitoshi Sasaki, Nagasaki University, Japan
- 12:15-13:15     Lunch
- 13:15-14:15     Patents in Drug Discovery:  
                  -Publication VS Patents  
                  -Patent system     **Dr. Hiroshi Kato is free for 5<sup>th</sup> afternoon and 6<sup>th</sup> .**  
                  -Type of Patent  
                  *Professor Dr. Hiroshi Kato, Nihon University, Japan*

### Session 3: Clinical Development

- 14:15-15:15     Overview of clinical development  
                  *Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*
- 15:15-15:30     Break
- 15:30-16:30     Regulatory Framework  
                  *Professor Dr. Hiroshi Yamamoto Nagasaki University, Japan ?*

### September 4 (Day 3)

- 9:00- 9:30     Investigational Phases of Clinical Research ( I - I V ) and Study Design  
                  *Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*



- 9:30-10:30 Clinical Development Plan  
*Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*
- 10:30-10:45 Break
- 10:45-12:15 Pharmacogenomics  
-Anticipated Benefits  
-Polymorphisms in Drug Targets  
- Polymorphisms in ADME  
-Pharmacogenomics Testing  
-Pharmacogenomics in Clinical Trials  
-Examples  
*Dr. Shyh-Yuh Liou, Ono Pharmaceutical Company Limited Head Office, Japan*
- 12:15-13:00 Lunch
- 13:00-14:15 Pharmacokinetics (Non-clinical & Clinical)  
*Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*
- 14:15-14:30 Break
- 14:30-16:30 Case studies (Group Exercise)  
*Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*
- 16:30-17:00 Biopharmaceuticals  
-Development of Biopharmaceuticals  
-Type of Biopharmaceuticals  
-Issues related to the use of Biopharmaceuticals  
(Antigenicity, Stability, Drug delivery)  
*Professor Dr. Tsuyoshi Kihara, Nagasaki University, Japan*

#### **September 5 (Day 4)**

##### **Session 4: Traditional Medicine**

Underline the importance of traditional medicine in PRD

- 9:00-10:00 Introduction of Traditional Medicine and guidance on herbal Medicines **Dr. Tsutani is free for 10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup>**  
*Professor Dr. Kiichiro Tsutani, Tokyo Ariake University of medical and health, Japan*
- 10:00-11:00 Regulation for traditional medicine development  
*Professor Dr. Ichiro Arai, Nihon Pharmaceutical University, Japan*
- 11:00-12:00 Rev and Exam 2 (Module 2)  
*Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*

12:00-13:00 Lunch

### **Module 5: Good Clinical Practice**

Describe the concepts of GCP, Recognize the principles of Ethics in research and the functions of Ethics Committee

#### **September 5 (Day 4)**

- 13:00-13:30 Concept of Good Clinical Practice  
*Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*
- 13:30-14:30 Principles of Research Ethics and Ethics Codes and Guidance  
*Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*
- 14:30-14:45 Break
- 14:45-15:45 Responsibilities: Sponsor, Monitors, audit, DSMB  
*Professor Dr. Juntra Karbwang, Nagasaki University, Japan*
- 15:45-16:30 Clinical Data Management  
*Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*
- 16:30-17:00 Exam 3 Module 5  
*Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand*

### **Module 3: Vaccine Discovery and Development**

#### **Session 1: Discovery**

Describe the principles of basic immunology. Describe the process of vaccine Discovery

#### **September 6 (Day 5) Pof. Kenji Hirayama is free September 3<sup>rd</sup> afternoon and September 9<sup>th</sup>**

- 9:00- 9:30 Historical overview of vaccine Discovery  
*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*
- 9:30-10:30 Vaccines for infection control  
*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

#### **Session 2: Pre-Clinical Development**

Describe the principles of basic immunology. Describe the process of vaccine Discovery

- 10:30-11:30 Vaccine platform Technology and Adjuvant Development  
*Professor Dr. Takeshi Arakawa, University of the Ryukyus, Japan*

11:30-12:00 CMC  
*Professor Dr. Takeshi Arakawa, University of the Ryukyu, Japan*

12:00-13:00 Lunch

Describe the process of pre-clinical development of vaccine

13:00-14:00 Immunogenicity and protect activity  
*Professor Dr. Takeshi Arakawa, University of the Ryukyu, Japan*

14:00-14:30 Break

14:30-16:00 Safety assessment: Toxicity test in animals: regional complications,  
Systemic toxicity  
*Professor Dr. Takeshi Arakawa, University of the Ryukyu, Japan*

### **September 9 (Day 6)**

#### **Session 3: Clinical Development**

Describe the process of vaccine clinical development

9:00-10:00 Assessment of pre-clinical information  
*Dr. Daisuke Tsuzuki*

10:00-10:30 Clinical development plan  
*Dr. Daisuke Tsuzuki*

11:30-12:30 Rev and Exam 4 (Module 3)  
*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

12:30-13:30 Lunch

Visit Immunology lab

13:30-16:00 Visit Immunology lab  
*Associate Professor Dr. Shusaku Mizukami and Assistant Professor Dr. Shyam  
Dumre, Nagasaki University, Japan*

### **September 10 (Day 7)**

10:00-17:30 Field Trip to Hisamitsu Pharmaceutical Co.,Inc  
Mr, Hisashi Yamada, Hisamitsu Pharmaceutical Co.,Inc

#### **Module 4: Diagnostic Development**

Describe the process of discovery and development of diagnostic tools

### **September 11 (Day 8)**

- 9:00-10:00 Development of molecular diagnostic tests for emerging infectious  
*Assistant Professor Dr. Yohei Kurosaki, Nagasaki University, Japan*
- 10:00-12:00 Development of diagnostic tests for arbovirus  
*Associate Professor Dr. Shingo Inoue, Nagasaki University, Japan*
- 14:00-15:00 Rev and Exam 5 (Module 4)  
*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

Assisitant Prof. Yohei Kurosaki is in abroad during Diploma Course.

### **Module 6: Post-registration Activities**

Describe post-registration activities for medical products

### **September 12 (Day 9)**

- 9:00- 9:45 Overview  
*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
- 9:45-10:15 How to solve Access to Medicines (ATM) problems in developing countries  
*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
- 10:15-11:15 Improving the quality of new products in health systems:  
International network of rational use of drugs  
*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
- 11:15-12:15 Post-marketing product vigilance  
*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
- 12:15-13:00 Lunch
- 13:00-14:00 Stakeholders to be involved in making product development work for the intended  
*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
- 14:00-14:30 Rev and Exam 6 (Module 6)  
*Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan*

**September 13 (Day 10)**

9:00- 11:00 FINAL EVALUATION, COURSE ASSESSMENT

*Professor Dr. Juntra Karbwang-Laothavorn (Nagasaki University, Japan,  
Course Director)*

11:00-12:00 CLOSING CEREMONY

&lt;参加者リスト&gt;

Name	Country	Position / Institution
Vivian Silvestre-Martelino	Republic of the Philippines	Biological Science Department Medical Affairs Division UNILAB, INC. Biological Sciences Officer
DAVID KANYINDA KAYEMBE	Japan / Democratic Republic of the Congo	Department of Anesthesiology and Reanimatology Faculty of Medical Sciences, University of Fukui
BISHINGA Aristide	Japan/ Republic of Burundi	Nagasaki University School of Tropical Medicine and Global Health
Djan Daniel Kwadwo	Japan/ Republic of Ghana	Nagasaki University School of Tropical Medicine and Global Health
LUNGU RUTH	Japan / Republic of Zambia	Master of Science in Global Health and Tropical Medicine, Nagasaki University
AGULU Gilbert Gangtaba	Japan/ Republic of Ghana	Nagasaki University School of Tropical Medicine and Global Health
Awuni Thomas Kwasi	Japan / Republic of Ghana	Nagasaki University School of Tropical Medicine and Global Health
Kohei Fukushima	Japan	Master of Science in Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University
Raini Sandra Kendra	Japan / Republic of Kenya	Leading Program of Tropical Medicine, Nagasaki University
Alshaweesh Jalal	Japan / Syrian Arab Republic	Leading Program of Tropical Medicine, Nagasaki University
Renu Bhandari Dumre	Japan / Fderal Democratic Republic of Nepal	Nagasaki University School of Tropical Medicine and Global Health

<講師・メンターリスト>

平山謙二(学内)	第5日目	9月6日(金)
Laothavorn Juntra(学内)	第1・2・3・4日目	9月2・3・4・5日
田中 義正(学内)	第1・2日目	9月2・3日
Kesara Na-Bangchang	第1・2・3・4日目	9月2・3・4・5日
木原 毅(学内)	第2・3日目	9月3・4日
佐々木 均(学内)	第2日目	9月3日(火)
加藤 浩	第4日目	9月5日(木)
山本 弘史(学内)	第2日目	9月3日(火)
劉 世玉	第3日目	9月4日(水)
津谷 喜一郎	第4日目	9月5日(木)
新井 一郎	第4日目	9月5日(木)
水上修作(学内)	第6日目	9月9日(月)
Shyam Dumre(学内)	第6日目	9月9日(月)
新川 武	第5日目	9月6日(金)
都築 大祐	第6日目	9月9日(月)
黒崎 陽平	第8日目	9月11日(水)
井上 真吾(学内)	第8日目	9月11日(水)
Chitr Sitthi-amorn	第9日目	9月12日(木)

6. 自己評価

令和元年9月2日(月)～令和元年9月13日(金)の10日間長崎大学において、英語によるコースを開催し、講師18名(うち外国から2名、国内から16名)と参加者11名(うち外国から1名、国内から10名)を集め、世界でも類をみない集会を開催した。

7. 達成度

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



## 令和元（2019）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 : 2019-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 : 矢口 貴志（千葉大学真菌医学研究センター 准教授）

渡邊 哲（千葉大学真菌医学研究センター 准教授）

高橋 弘喜（千葉大学真菌医学研究センター 准教授）

伴 さやか（千葉大学真菌医学研究センター 助教）

Bii C. Christine

(Kenya Medical Research Institute (KMRI) Chief Research Officer)

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

2018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。特に真菌症の原因となる *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、薬剤感受性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 の研究者と共同で、ケニア国内の *Nocardia* 症の動向について、更に起因菌の検体数を増やして（現在、ケニアからの菌株輸出手続き中）、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を解析する。さらに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令和元（2019）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。2019年度は、ケニアでアフラトキシンがアウトブレイクした地域のコーンから分離した菌株を解析した。

#### 2. その他のカビ毒の産生能

KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集した生乳、加工乳（発酵乳、ヨーグルト）、ケニアの伝統的なビール（busaa）において、カビ毒の検出を実施した。

#### 3. 臨床検体から分離された *Aspergillus* の同定と薬剤感受性

ケニア国内の臨床検体（喀痰）から分離された *Aspergillus sect. Fumigati* と形態的に同定された菌株において、b-tubulin 遺伝子の塩基配列による正確な同定、その薬剤感受性試験を実施した。

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

ケニアでアフラトキシンがアウトブレイクした地域のコーンから分離した菌株を解析した結果、これまで分類に使用されている calmodulin、 $\beta$ -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。その結果は、*Aspergillus niger* 関連種の分類・同定に使用されている calmodulin、 $\beta$ -tubulin 遺伝子単独による系統樹とほぼ一致した。しかし、全ゲノムによる系統樹は種ごとの変異が大きくなり、系統関係が明確に示された。さらに既知種と識別される新規な分類群（SP1、SP2）が見いだされた（図 1）。

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。カビ毒オクラトキシンの産生能においては、3 種間で顕著な差は認められなかった。

新たに見いだされた *A. tubingensis* 近縁の菌群（SP1、SP2）は新種と考えられる。それらの形態、薬剤感受性、オクラトキシンの産生能を測定し、既知種と比較したが、明確な違いは見いだされなかった（図 1、2）。

欧米では、コーヒーのオクラトキシン汚染が問題視されている。そこで、ケニア環境中の *Aspergillus sect. Nigri* におけるカフェイン耐性を検討したところ、2%カフェインを含む培地でも生育する菌株が見いだされ、同培地でもオクラトキシン産生が認められた。今後、オクラトキシン生産性とカフェイン耐性の相関を検討する。

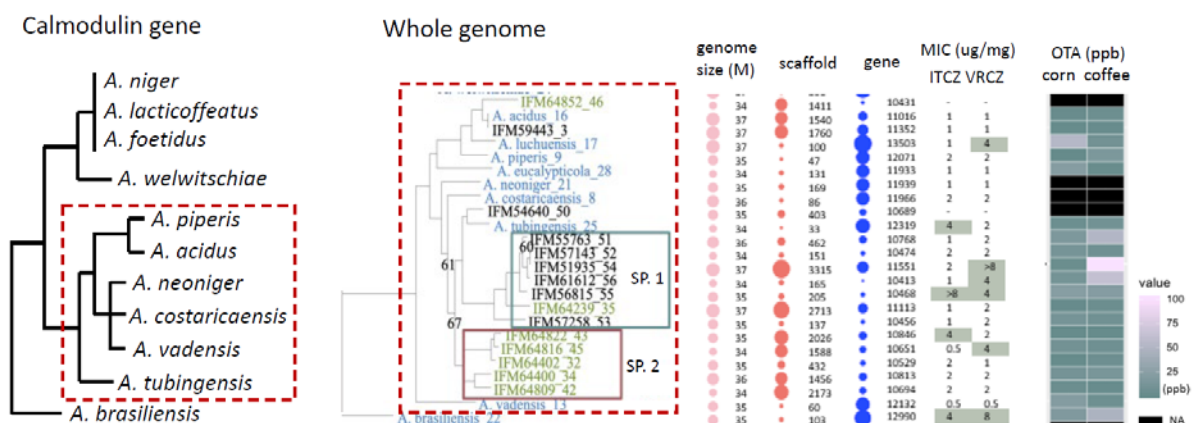


図 1. *Aspergillus niger* 関連種における多遺伝子による系統樹、ゲノム情報、アゾール薬に対する薬剤感受性、オクラトキシンの産生能

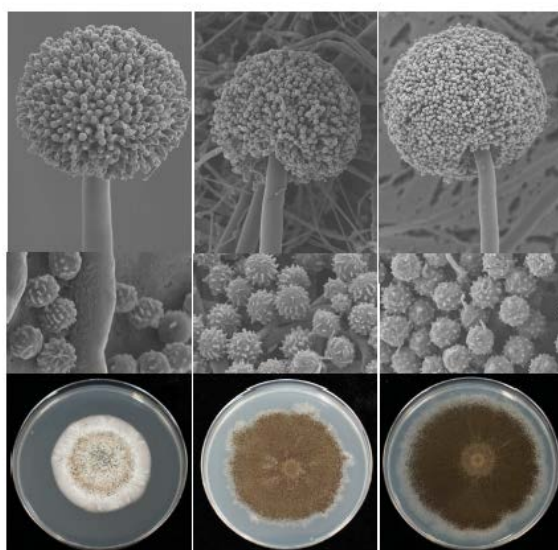


図 2. *Aspergillus tubingensis* 近縁の新種.

左; *A. tubingensis* IFM 60972<sup>T</sup>. 中; IFM 61612 (S2). 右; IFM 64402 (S1).

## 2. その他のカビ毒の産生能

KEMRI 所属の研究者と共同で、これまでケニア各地で収集した穀物などにおいて、カビ毒の検出を実施している。これまでの解析結果から、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が、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のは、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ている。2019 年度は、ケニア国内の牛乳において、アフラトキシン M1 (AFM1) の汚染を調査したところ、生乳（牛から絞った状態の生の乳）においてはほぼ 50% において規制値 (0.5 µg/kg) 以上の汚染が見られたが、商業ベースで製品化された牛乳では、AFM1 の汚染はみられるものの、規制値以上のものはなかった (conc. range: 0.011 - 0.18 µg/kg)。また、乳製品（発酵乳、ヨーグルト）においては規制値を上回るものは 8.6% であった。さらに、ケニアの伝統的なビール (busaa) においてもカビ毒の含有量を測定したところ、平均値が規制値 (10 µg/kg) とほぼ同等であった。今後、汚染原因菌の形態学的、分子系統学的解析を実施する。

表 1. ケニア国内の牛乳におけるアフラトキシン M1 の汚染

AFM1 濃度 (µg/kg)	生乳	牛乳	乳製品
> 0.5	78 (52%)	0 (0%)	3 (8.6%)
> 0, < 0.5	72 (48%)	21 (80.8%)	3 (8.6%)
0	0 (0%)	5 (19.2%)	29 (82.8%)

### 3. 臨床検体から分離された *Aspergillus* の同定と薬剤感受性

ケニア国内の臨床検体（喀痰）から分離された *Aspergillus* sect. *Fumigati* に属すると形態的に推定された 8 菌株の  $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列による同定を実施したところ、*A. fumigatus*（狭義）であった。その薬剤感受性試験では強い薬剤感受性は見られなかった。ケニアの環境（畑地）からはアゾール耐性株が分離されている。

臨床検体（喀痰）から分離された *Aspergillus* sect. *Nigri* に属すると形態的に推定されたと推定された 5 菌株の  $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列による同定を実施したところ、4 株が *A. welwitschiae* で、1 株が *A. neoniger* であった。その他、*A. turcosus* が分離された。本菌種は臨床からの分離は稀である。今後も検体数を増やし、アゾール耐性株の解析を実施する。

#### ③成果の公表

1. Shimizu M, Kusuya Y, Alimu Y, Bian C, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123<sup>NT</sup>. Microbiol Resource Announc. 8 (4): e01453-18 2019.
2. Bian C, Yikelamu A, Takahashi H, Yaguchi T. Characterization and proposal of two new species in *Aspergillus* section *Nigri*. Asian Mycological Congress 2019, Tsu, Japan, 2019. (シンポジウム招待講演)
3. Bian C, Yikelamu A, 高橋弘喜, 矢口貴志. Phylogenetic classification based on whole genome sequencing in *Aspergillus* section *Nigri*. 第 63 回日本医真菌学会. 千葉. 2019.

### 6. 自己評価

本年度は主として、*Aspergillus niger* 関連種において、全ゲノムデータに基づく系統関係、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た。さらに、これまで未報告の種において、形態、薬剤感受性、オクラトキシンの産生能を既知種と比較した。今後、こ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、ケニアの生乳、牛乳、乳製品、伝統的なビール（busaa）において、カビ毒の汚染量を調査した。今後これらの検体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行う予定である。

以上のように、*Aspergillus* の食品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カビ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られる。

7. 実施度（何れかに○）

I （実施計画を実施していない。）

II （実施計画どおり進展していない。）

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. 令和元（2019）年度執行状況調査

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）		1,306	1,306	
（運営費）		5,694	5,694	
（設備費）		0	0	
計		7,000	7,000	

## 令和元（2019）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 : 2019-Kyoten-2

2. 代 表 者 : 滝口 雅文

(熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター シニア教授)

共同研究者 : 前田 洋助 (熊本大学 大学院生命科学研究部 准教授)

久世 望 (熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 特任講師)

近田 貴敬

(熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 特任助教)

3. 決 定 額 : 8,000 千円

4. 申請時書類より

### ①研究目的

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

・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 細胞の解析 :

(1) 2018 年度に明らかにしたエイズ進行促進に相関する 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 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を明らかにし、エイズ促進の機序を明らかにする。またこれらの HLA と相関する変異の内、これらの 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、変異ウイルスを作製して明らかにする。これによりこれらの HLA の内どの 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の機序を明らかにする。

(2) 今までに解析してある HIV-1 subtype A/E overlap peptides に対する T 細胞反応のデータから、感染者体内で HIV-1 の増殖抑制に関与する T 細胞の epitope (protective epitope) を明らかにする。まず 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 の内、どの CTL が HIV-1 の増殖抑制に関与するか明らかにする。さらにそれ以外の HLA に関しても、各 overlap peptides に反応した集団としなかった集団での血漿ウイルス量や CD4T 細胞数の差が出るかを統計的に検定し、差が見られた overlap peptides を解析し、HIV-1 の増殖抑制に関与する protective epitope を認識する 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

2018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、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。さらに血漿中ではメジャーである R5 ウイルスを単離し、感染個体内に存在している両者のウイルスのウイルス学的性質の違い、特にそれぞれのウイルスの種々の CD4 陽性 T 細胞サブセットにおける複製能、宿主のウイルス抵抗因子感受性を明らかにし、R5 ウイルスから X4 ウイルスへのコレセプタースイッチに関与するウイルス学的・宿主側要因を明らかにする。

### ③ 予想される成果

我々は 2012 年からハノイの NHTD で無治療 HIV-1 患者のコホートの樹立を開始し、HIV-1 の構造解析と HLA 解析を含めた細胞性免疫の研究を行ってきた。その結果、ハノイコホートで集積してきている薬剤耐性変異を明らかにし (J. Virol 89:7363-7372, 2015)、また HIV-1 subtype A/E に感染しているベトナム人集団においては Pol 領域に選択される HLA-AP の蓄積が感染者の病態に悪い影響を与えていることを明らかにした (AIDS 30:681-689, 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及び 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を明らかにした (J. Virol 92:e01749-17,2018)。また、ベトナムで流行している HIV-1 のコレセプター利用性の解析を行い、ベトナムでは X4 ウイルスの頻度が他の国より高いこと、また HIV-1 感染個体の血漿中に存在している CCR5 を使用する R5 ウイルス以外に、一部の症例ではわずかながら存在している CXCR4 を利用する X4 ウイルスが血漿から分離されることをベトナムの感染血漿を使用して明らかにしてきた。このことは、ウイルスのコレセプター利用性のスイッチが起こる症例では複数種のウイルスが個体内で共存・維持されていて、その中でそれぞれの個体内環境に適応しているウイルスが選択されているのではと考えられた。2019 年度以降もこれらの研究を継続することにより、以下の成果が期待できる。



- 1) HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 haplotype の中のどの HLA が主体的に病態進行促進に関与しているか、さらに病態進行促進の機序を明らかにすることができると考えられる。既に我々は、免疫逃避変異を明らかにしており、この変異部分を含んでいる CTL エピトープを明らかにしている。
- 2) 感染者体内で HIV-1 の増殖抑制に関与する CTL が認識する protective epitope を明らかにするために、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 の内、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にて解析し、R5 から R5X4 さらには X4 ウイルスへの進化過程を明らかにできる。さらに、感染個体内に存在している R5 と X4 の両者のウイルスのウイルス学的性質の違い、特にそれぞれのウイルスの種々の CD4 陽性 T 細胞サブセットにおける複製能、宿主のウイルス抵抗因子感受性を明らかにし、Subtype A/E ウイルスにおける R5 から X4 ウイルスへのコレセプタースイッチに関与するウイルス学的あるいは宿主側の要因を明らかにする。

## 5. 実施状況報告：

### ①令和元（2019）年度実施計画に対する実施状況

#### 1) エイズ進行促進に相関する HLA allele の同定とエイズ進行促進の機序の解析：

昨年度我々は、HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 haplotype が HIV-1 感染症の進行に関与することを明らかにし、また HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 haplotype に相関するいくつかの HIV-1 の変異の蓄積が、病態進行に関与している可能性を示した。そこでこのハプロタイプと変異に関連した CTL エピトープの同定し、その変異が CTL の認識や HIV-1 の増殖抑制に及ぼす効果を調べた。

#### 2) HIV-1 増殖抑制に関与する HIV-1 特異的 CTL の同定：

Protective allele である HLA-C\*12:02 に拘束性する CTL が認識する HIV-1 subtype A/E 上のエピトープを同定するために、既に我々により subtype B で報告しているエピトープ部位のシーケンスを我々のコホートで調べ、それに一致したペプチドを合成しこのペプチドに対する CTL が存在するか調べた。さらに、overlap peptides を用いて、それに対する T 細胞反応を、396 名の HIV-1 感染者の PBMC を用いて調べた。

#### 3) マイナーな X4 ウイルスの検出：

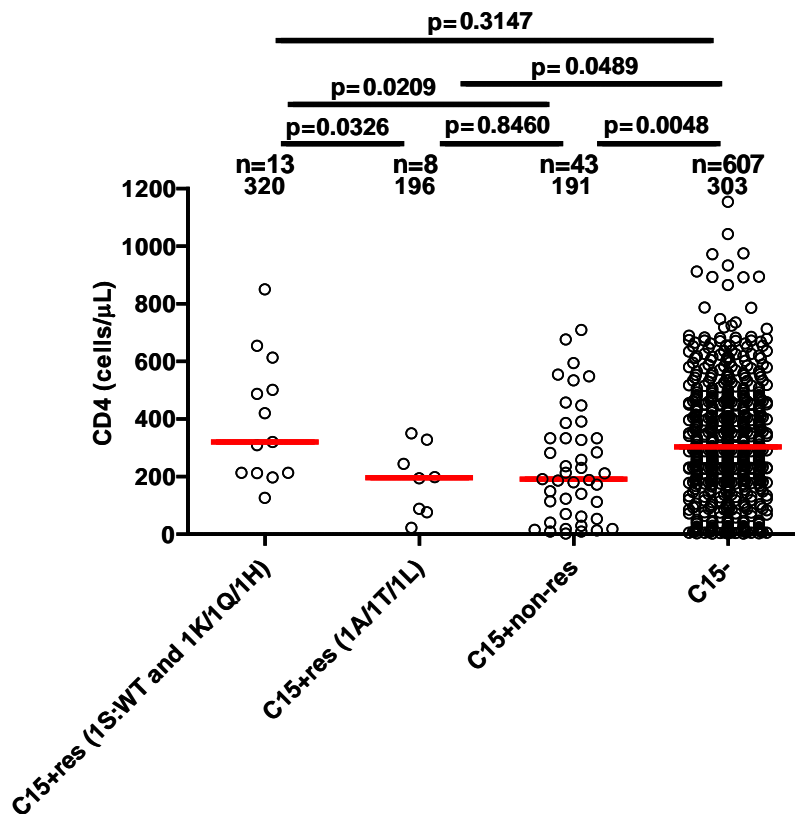
HIV-1 感染者血漿の vRNA からクローニングされた env 領域の解析からは CCR5 をコレセプターとして使用する R5 ウイルスと判断されたにも関わらず、同じ検体の血漿から分離されたウイルスが CXCR4 を使用する X4 ウイルスだった VI-157, VI-158 の 2 症例について、血漿中では R5 がメジャーなウイルスでありながら、なぜマイナーな X4 ウイルスが分離されたのかについて解析を行った。まず分離に用いられた HIV 陰性ドナーの CD4 陽性 T リンパ球の CCR5 と CXCR4 の発現について確認した。さらに VI-157 と VI-158 それぞれの R5 と X4 ウイルスの Env 全長を有するシュードタイプウイルスを作製し、上記ドナーの CD4 陽性 T リンパ球に感染させた。

②成果（結果＋考察）

1) エイズ進行促進に相関する HLA allele の同定とエイズ進行促進の機序の解析：

Pol の 2 か所 (Pol653, Pol657) のいくつかの変異が、病態進行の促進に関与することが明らかになった。そこで、この分をカバーする overlap peptides を合成し、HLA-A\*29:01-B\*07:05-C\*15:05 を持つ感染者由来の PBMC を用いて CTL エピトープの同定を試みたところ、HLA-C\*15:05 に拘束する SN9 エピトープを同定できた。さらに Pol653 の 3 つの変異 (Pol653A/T/L) が、SN9 特異的 CTL により選択される免疫逃避変異であること、これらの変異の蓄積により HLA-C\*15\*05 を保有する人では、HIV-1 の増殖抑制がみられず、病態の進行がしやすいことが明らかになった (図 1)。エイズ進行促進に相関する HLA allele はいくつか報告されているが、その機序に関しては報告がほとんどない。我々は、detrimental HLA allele である HLA-B\*35:01 において、A\*24:02 拘束性の CTL により蓄積する逃避変異が HLA-B\*35:01 拘束性 CTL エピトープ内にあり、これにより HLA-B\*35:01 拘束性 CTL による HIV-1 増殖の抑制が障害されることを最近発表しているが、HLA-C 拘束性の CTL によっても同じような機序で HIV-1 増殖の抑制が障害されることを示した初めての例である。

(図 1)



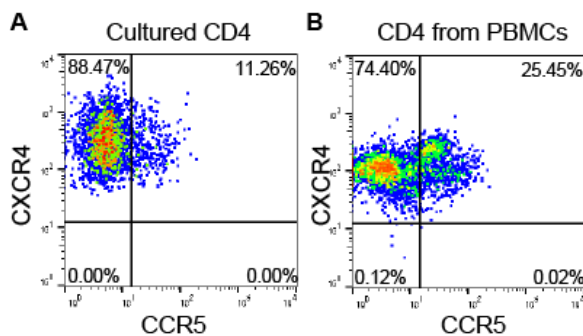
## 2) HIV-1 増殖抑制に関与する HIV-1 特異的 CTL の同定

既に我々により subtype B で報告しているエピトープの 4 つの部位のシーケンスを調べたところ、12 種類のシーケンスが見られた。これに対するペプチドを合成し、このペプチドに対する反応を、HLA-C\*12:02 を持った 12 名の HIV-1 感染者の PBMC を用いて ELISPOT assay で調べたところ、3 種類のエピトープとその変異エピトープに対するペプチドに対して反応が見られた。このことからこの 3 つは subtype A/E でもエピトープとして認識されていると考えられた。さらに overlap peptides を用いて、それに対する反応を 396 名の HIV-1 感染者の PBMC を用いて調べたところ、HLA-A\*11:01, -B\*15:02, -C\*08:01 を持った人に、低いウイルス量か高い CD4T 細胞に相関する CTL が多く見られることが分かった。これらの 3 つの HLA に拘束する CTL の中に HIV-1 増殖抑制能が高い CTL がいることが推測された。

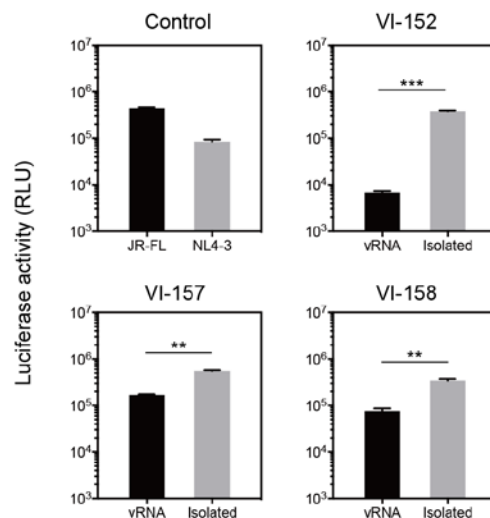
## 3) マイナーな X4 ウイルスの検出：

フローサイトメトリー解析から、分離に使用した CD4 陽性 T リンパ球では、活性化前後いずれについても CXCR4 の強い発現が認められたが、CCR5 発現は比較的低いことが明らかになった (図 2)。しかしながらコントロールとして使用した代表的な R5 ウイルス Env (JR-FL) の感染性は確認できたため、R5 の感染を支持するために必要十分な機能的 CCR5 量は確保できていることが示された。しかしながら VI-157 と VI-158 の血漿から分離された X4 Env を有するシュードタイプウイルスの感染性は、それぞれの R5 Env と比較して約 10 倍高いことが示された (図 3)。結果、今回使用したドナー由来の T 細胞を標的として VI-157, VI-158 の血漿からウイルスを分離した際、マイナーであった増殖能の高い X4 ウイルスがメジャーな R5 ウイルスの増殖を凌駕して選択されたものと考えられた。

(図 2)



(図 3)



③成果の公表

• 論文発表

**Maeda Y**, Takemura T, **Chikata T**, Kuwata T, Terasawa H, Fujimoto R, Kuse N, Akahoshi A, Murakoshi H, Trang GV, Zhang Y, Pham CH, Pham AHQ, Monde K, Sawa T, Matsushita S, Nguyen TV, Nguyen VK, Hasebe F, Yamashiro T, **Takiguchi M**. Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals. **J Virol**. In press

• 学会発表

**Maeda Y** et al. Existence of infectious minor HIV-1 variants with different coreceptor usage in CRF01\_AE HIV-1-infected individuals in northern Vietnam, 第33回日本エイズ学会学術集会シンポジウム（熊本）2019年11月29日

Murakoshi H, **Chikata T**, Akahoshi T, Zou C, Tran GV, Nguyen TV, Nguyen KV, Kuse N, and **Takiguchi M**, A critical role of T-cell escape mutations associated with a detrimental allele HLA-C\*15:05 in poor clinical outcome of Vietnamese individuals infected with HIV-1 subtype A/E. 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim AIDS Panel (Bangkok, Thailand), February 26 - 27, 2020

## 6. 自己評価

令和元年度は、前年度ハプロタイプレベルで明らかにした病態進行促進に關与する HLA を、HLA アリールレベルで明らかにし、さらにその病態進行促進の機序として PolSN9 特異的 CTL により選択される 3 つの変異の蓄積により起こることを明らかにできた。また 396 名の HIV-1 感染者の PBMC と overlapping peptides を用いた研究により病態遅延に關与する可能性がある CTL を網羅的に解析し、病態遅延に關与する CTL 候補を明らかにできた。今後これらの解析をさらに進め、病態遅延に關与する CTL を同定することに道筋ができた。

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で、増殖可能なマイナーな X4 ウイルスの集団が存在することを明らかにできた。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に繋がるものと考えられ、またこの地域の侵入阻害剤の使用の可否に関する知見が一部得られたと思われる。

以上のことから令和元年度の研究計画はほぼ達成できたと判断した。

## 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. 令和元（2019）年度執行状況調査

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	3,796	3,796	
(運営費)	2,000	4,204	6,204	
(設備費)	0	0	0	
計	2,000	8,000	10,000	



# 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（令和元年度）

所 属	職 名	氏 名
[学外委員]		
大分大学	副 学 長	◎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・感染制御部	部 長	阿戸 学
東京大学大学院医学系研究科	教 授	佐々木 敏
[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	教 授(支援室長)	山本 太郎
熱帯医学研究所	教 授	有吉 紅也
[オブザーバー]		
熱帯医学研究所	所 長	森田 公一
熱帯医学研究所	副 所 長	金子 修
熱帯医学研究所	副 所 長	濱野 真二郎

◎印は議長