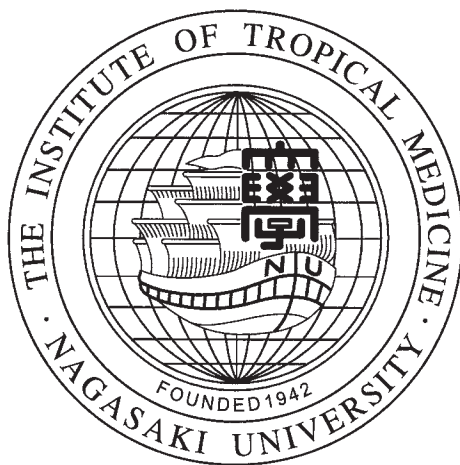


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

平成 29 年度
(2 0 1 7)



長崎大学熱帯医学研究所
(全国共同利用研究所)

は じ め に

長崎大学熱帯医学研究所

所長 平山 謙二

熱帯地域を中心とした開発途上国では近年、疾病構造の変化がみられるなか依然として古典的な熱帯病は流行を繰り返し、加えて鳥インフルエンザやエボラ出血熱など新興感染症が保健衛生のみならず社会・経済分野でも重大な脅威となっています。先進諸国あるいは国際機関、民間支援機関などは、この問題を憂慮し多大な投資を HIV/AIDS、結核、マラリアに対しては実施してきました。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見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、複雑化してきています。異常気候、熱帯雨林の環境破壊、難民の急増などの諸問題がまた感染症の発生状況の混迷度を高めており、これまで順調に進展してきたいくつかの優良な国際感染症対策プログラムさえも後退させている事例が発生しています。

このような状況においても、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、熱帯保健衛生の問題を解決するに資する科学的根拠を提供するための研究開発に加えて、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。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し活動を支援します。なおこのプロジェクトには現地の研究者も参加することができます。

2. 研究集会

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

3. リソースセンター

研究や教育に資するため病原体や遺伝情報の集積保存、全国配布を行います。

4. 熱帯医学ミュージアム

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

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

究基盤を背景として国内外の多様な領域の研究者とともに、熱帯地域の現場に根ざした共同研究を遂行することが挙げられます。本拠点が提供する共同研究基盤が、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. 小児滲出性中耳炎の罹患率に与える肺炎球菌ワクチンの効果 代表者：金子賢一（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 准教授）	1
2. アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の検出とその伝播に関する研究 代表者：前野芳正（藤田保健衛生大学 医学部 ウイルス・寄生虫学 准教授）	5
3. 臨床試験に向けての新規マラリアワクチン BDES-NPV の製造プロセスと品質管理に関する研究 代表者：伊従光洋（金沢大学医薬保健研究域薬学系ワクチン・免疫科学研究室 准教授）	10
4. インドを旅行する日本人旅行者における疾患発生要因に関する研究 代表者：津田敏秀（岡山大学大学院環境生命科学研究科 教授）	18
5. ベトナムにおける不明熱性疾患病因同定に関する研究 代表者：三浦こずえ（東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授）	27
6. 北海道の野生動物におけるマダニ媒介性ウイルスの血清・分子疫学調査 代表者：内田玲麻（酪農学園大学 獣医学群・獣医学類 人獣共通感染症学ユニット 助教）	32
7. ベトナムにおける眼感染症の病因（肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV）導入前の評価） 代表者：上松聖典（長崎大学病院 眼科 講師）	38
8. FRET プローブを活用した抗ラッサウイルス薬の創出 代表者：水谷龍明（京都大学ウイルス・再生医科学研究所 助教）	42
9. うなづき症候群患者を対象とした地域見まもりケアの検討 代表者：西 真如（京都大学大学院アジア・アフリカ地域研究研究科 特定准教授）	48
10. メタ個体群動態に基づいたネットワーク上の感染症流行の定量的解析 代表者：岩見真吾（九州大学大学院理学研究院生物科学部門 准教授）	53
11. 原生生物カプサスポラによる <i>Schistosoma</i> の中間宿主への寄生抑制 代表者：菅 裕（県立広島大学生命環境学部 准教授）	60
12. 赤痢アメーバ“シスト形成”の制御機構の解明 代表者：見市（三田村）文香（佐賀大学医学部 分子生命科学講座免疫学分野 助教）	64
13. タイ・ランパンエイズコホートにおける日和見感染症と MBL 遺伝子多型の検証 代表者：柳澤邦雄（群馬大学医学部附属病院 血液内科 助教）	69
14. ベトナム自然環境に由来する薬剤耐性コレラ菌のゲノム特性 代表者：丸山史人（京都大学大学院医学研究科 准教授）	74
15. <i>Entamoeba nuttalli</i> における表面レクチンサブユニット（Igl）の解析 代表者：橘 裕司（東海大学医学部 教授）	79
16. 生薬由来新規抗マラリア薬の探索 代表者：小松かつ子（富山大学和漢医薬学総合研究所 資源開発部門 生薬資源科学分野 教授） ..	85
17. 漢方方剤・和漢薬由来新規抗トリパノソーマ薬の探索 代表者：當銘一文（富山大学和漢医薬学総合研究所 資源開発部門 生薬資源科学分野 准教授） ..	91

18. ケニアにおけるロタウイルスゲノム多様性の解析	
代表者：河本聡志（藤田保健衛生大学医学部 ウイルス・寄生虫学講座 講師）	96
19. ジカウイルス感染関連ギラン・バレー症候群の発症メカニズム	
代表者：左 一八（会津大学短期大学部 食物栄養学科 教授）	101
20. 都市化がもたらす高地集団の新たな健康リスク因子の評価	
代表者：西村貴孝（長崎大学医歯薬学総合研究科 公衆衛生学分野 助教）	108
21. ケニアにおける結核感染新規モニタリング技術の実用性評価研究	
代表者：長谷川 慎（長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 教授）	114
22. 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）	121
23. マラリア原虫肝内休眠体を標的とした <i>in vitro</i> 実験系の確立と分子メカニズムの解明	
代表者：案浦 健（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）	129
24. Linkage Group Selection 法の培養熱帯熱マラリア原虫への適用	
代表者：アクセル マルティネッリ（北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門 助教）	134
25. マーモセットモデル動物を用いたデング熱の感染防御のメカニズム解明に関する研究	
代表者：西條政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長）	144
26. 内臓リーシュマニア症制圧後の再燃監視機構の構築	
代表者：伊藤 誠（愛知医科大学医学部 客員教授）	149
27. アフリカ睡眠病を起こすトリパノソーマ原虫の Tb14-3-3・ヒートショック蛋白のシグナル系を 標的にした抗原虫薬スクリーニングの基礎研究	
代表者：井上雅広（久留米大学医学部 感染医学講座・真核微生物学部門 教授）	153

第2部 研究集会

1. All Japan Mosquito Symposium

代表者：一盛和世（James Cook University 愛知医科大学 長崎大学 客員教授） 159

2. 医学研究のための倫理に関する国際セミナー

代表者：佐々木 均（長崎大学病院薬剤部 教授（薬剤部長）） 162

第3部 海外拠点連携共同研究

1. アフリカで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析
(千葉大学真菌医学研究センター) 171

2. 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
(熊本大学エイズ学研究センター) 176

(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

別紙（作成書式）

平成29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：29－ 一般 － 1

2. 代 表 者：（所属・職名）

金子 賢一（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 准教授）

共同研究者：（所属・職名）

原 稔（長崎大学医学部医学科 医学部研究高度化支援室 助教）

佐藤 智生（長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 大学院生）

吉田 レイミント（長崎大学熱帯医学研究所 小児感染症学 教授）

樋泉 道子（長崎大学熱帯医学研究所 小児感染症学 助教）

原 史絵（熱帯医学研究所 寄生虫学分野 技能補佐員）

金子 亜衣子（長崎県立大学国際社会学部 国際社会学科 非常勤講師）

3. 決 定 額： 800千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

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

②研究内容

PCV 未導入地域であるベトナム・ニャチャン市で接種スケジュールによる集団免疫効果を肺炎球菌保菌率で比較する介入研究が行われる。その中でニャチャン市の27地域が地域ごとに5群（接種スケジュールの違いによりPCV-10接種群が4群、PCV-10接種を行わない対照群が1群）に分けられるが、本研究ではプライミング接種2回、ブースター接種1回を行う群（2p+1）を対象として研究を行う。

初年度に対象（2p+1）の地域において抽出された12～24か月の小児に対し問診、診察および上咽頭からの菌検査を行い、滲出性中耳炎の罹患率および肺炎球菌保菌率を明らかに

する。続いて、同地域に住む 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、同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（平成 29 年）、2 年後（平成 30 年）、3 年後（平成 31 年）、4 年後（平成 32 年）に、同地域において抽出された 12～24 か月の小児に対し問診、診察および上咽頭からの菌検査を行う。以上によって得られた滲出性中耳炎罹患率と肺炎球菌保菌率の経時変化をみる。

初年度の平成 28 年 10 月にベトナム・ニャチャン市において、PCV-10 群の地域における PCV 導入前の 12～24 か月 の小児に対して、問診、診察および上咽頭からの菌検査を行った。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%）。

③予想される成果

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

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

当初の調査予定日は平成 29 年 11 月 4・5・11 日だったが、4・5 日はニャチャン市を直撃した台風のため中止となり、11 日と、4・5 日の代わりとして同月 18・19 日に調査を行った。現地において、PCV-10 のプライミング接種 2 回・ブースター接種 1 回（2p+1）を開始した地域から 12～24 か月の児を抽出し、アンケートによる問診、診察および上咽頭からの菌検査を行った。滲出性中耳炎の診断は耳鏡による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

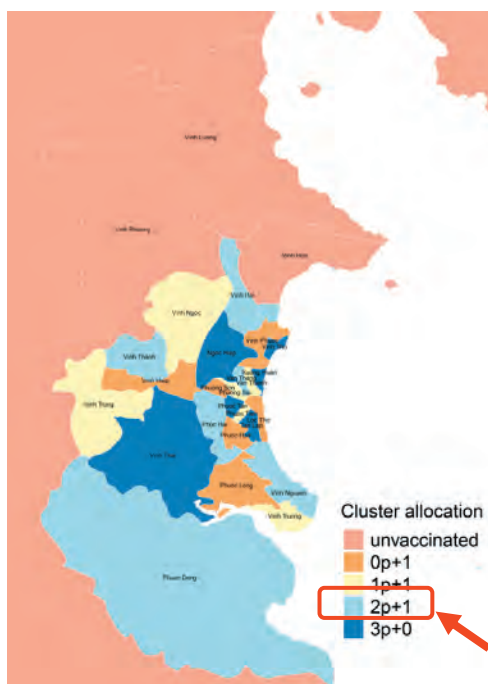


図 2 5 群に分けられたニャチャン市の地域：
本研究の対象となったのは「2p+1」で示された
地域である。

②成果（結果＋考察）

648 児に対して診察を行い、耳垢や体動により視診が困難であった児を除く 568 児で両耳の評価が可能であった。このうち 112 児（19.7%）に滲出性中耳炎を認めた（95%CI: 16.4－23.0%）。アンケートおよび菌検査の結果は解析中である。

両耳のうち少なくともいずれかが滲出性中耳炎であった有病率を比較すると、28 年度は 17.2%、29 年度は 19.7%と差を認めなかった。これは、まだ PCV-10 が導入されて間もないためと考えられ、今後の有病率の変化に注目していきたい。

③成果の公表

学会発表

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. 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会. 平成 29 年 5 月 17～20 日、広島

2. C. Satoh, M. Toizumi, K.I. Kaneko, H.A. Nguyen, Q.C. Lam, M. Hara, C. Iwasaki, M. Takegata, N. Kitamura, K. Ariyoshi, D.A. Dang, H. Takahashi, L.M. Yoshida : Prevalence and Characteristics of Children with Otitis Media with Effusion in Vietnam. The 11th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. 15-19th April 2018, Melbourne, Australia

6. 自己評価

今回は、調査初日である平成 29 年 11 月 4 日にニャチャン市を直撃した台風によって現地に高度の被害が生じたため、家庭の事情等によると思われるがエントリーした児が調査日に訪れずに当初予定した調査人数を下回るという事態となった。

調査では、短期間で多数の児の診察を行ったが、大きな混乱もなく信頼のおける良質なデータを得ることができたと考える。特に今回は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（何れかに○）

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

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の検出とその伝播に関する研究

課題番号：29－ 一般 － 2

2. 代 表 者：（所属・職名）前野芳正（藤田保健衛生大学・准教授）

共同研究者：（所属・職名）高木秀和（愛知医科大学・講師）、Nguyen Thi Huong Binh（ベトナム NIMP・部長）、Vu Duc CHINH（ベトナム NIMP・部長）、益田岳（順天堂大学・特任研究員）、リチャード・カレトン（長崎大学熱帯医学研究所・准教授）

3. 決 定 額： 350 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

東南アジアでは、アルテミシニン誘導体に耐性を示す熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）が検出され、マラリア根絶コントロールを目指す世界的活動に対する脅威となった。そのため、アルテミシニン耐性の拡大監視が喫緊の課題である。最近の研究において PF3D7_1343700 kelch propeller domain（「K13-propeller」）遺伝子内の変異とアルテミシニン耐性との関連が *in vitro* および *in vivo* で明らかにされた。この変異型遺伝子の出現頻度の上昇は、西カンボジアにおける最近の耐性拡大と相関していることが報告されている。しかし、耐性原虫の拡散に係わる重要な問題点と思われる耐性マラリア原虫の伝播については検討されておらず、解明すべき点とされる。かかる状況において、カンボジアの隣国であるベトナムにおけるアルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の出現に関する報告は一部でなされているが、十分な調査、検討がされていない。これに対し、最近十年余に採取された原虫サンプルの解析から得られた種々の基礎資料を持つ申請者らが本研究を実行することは、喫緊の問題解決において大きなアドバンテージがある。本研究では、アルテミシニン耐性の拡大を監視すると共に、大メコン圏におけるアルテミシニン耐性原虫の実態解明とその対策のための基盤資料の作成も目的とする。

②研究内容

調査研究実施地域：

本申請課題は宿主と媒介蚊から原虫を検出することが重要であるため、フィールドサンプルを使用した解析が主体となる。耐性原虫の解析にはこれまで保存しているサンプルお

よび新たに採取したサンプルを使用する。新たなサンプル採取は、耐性原虫の拡散状況の実態解析結果の信頼性を増すため必須となる。

●サンプル採取を行い、DNA を保管している地域。継続的にサンプル採取を行う地域。

ベトナム：カンボジア国境と接するビンフック省、カンホア省、ビントゥアン省、およびその他の地域。

材料：

ヒト血液サンプル

1. 調査対象地域で採取した血液サンプル検討対象とする。過去に採取し、その DNA を保存しているサンプルはそのまま解析に使用する。

2. 新たなサンプル採取は以下のように実施する。

(ア)血液サンプルの採取は、指頭穿刺後、ろ紙採血、乾燥を行い、地域のヘルスセンター等で保存。同時に血液ギムザ染色標本によるマラリア感染の有無等を判定する。一定期間ごと、ベトナム国立マラリア寄生虫学昆虫学研究所にサンプルを集積し、LAMP 法によるスクリーニングテストを行う。同時に同一サンプルの半分を日本へ輸送し、解析試料とする。

(イ)採血と同時に住民の行動調査や医学的基礎資料(身長、体重、貧血等)となりうるデータを収集する。サンプル採取は調査対象地域のヘルスセンター等が主体となり実施する。

＊殊に、住民行動調査は媒介蚊採取のための重要な基盤となる。

媒介蚊サンプル

1. 媒介蚊についてもヒト血液サンプルと同様に扱う。

(ア)調査地区におけるマラリア原虫主要媒介蚊である媒介蚊 *An. dirus* や *An. minimus* などの捕集は調査実施地区で継続的に行う。

(イ)原虫の検索は捕集した媒介蚊を胸部と腹部に分け、各部より抽出した DNA を分子生物学的検討に供する。

方法：

ヒト血液およびスポロゾイトからのマラリア原虫の検出と多型の検討

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

上述の検討事項は経時的に実施する。

③予想される成果

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

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

1. 本研究の調査研究対象地域をベトナム、ビンフォック省およびその周辺地域（ベトナム中部に位置し、カンボジア国境に接している）、カンホア省カンフー地域（ベトナム中南部に位置し、南シナ海に面している）およびその周辺地域とした。これらの地域では、申請者らが2002年以降マラリア感染に関する分子疫学調査を行っている地域で、熱帯熱マラリア患者から抽出した熱帯熱マラリア原虫DNAを保存している。
2. 調査地区の診療所などを調査対象施設とし、熱帯熱マラリア患者の採血を実施し、サンプル数の母集団を多くする。PCDの実施は、ACDの補完などとして実施。
3. 薬剤耐性遺伝子として報告されている標的遺伝子の検索は、PCR後のシーケンス解析にて実施。
4. 媒介蚊についてもヒトサンプルと同様な調査を実施し、薬剤耐性遺伝子のマラリア原虫発育史の中での変異に関する検討を実施。

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

②成果（結果＋考察）

1. カンホア省カンフー行政区における熱帯熱マラリア患者と熱帯熱マラリア原虫スポロゾイト感染媒介蚊（*Anopheles dirus*）の一部から K13-propeller 遺伝子の変異が見いだされた（Maeno et al., 2017）。
(ア)現時点におけるカンホア省での特徴的な K13-propeller 遺伝子における変異は P553L 一種のみであった。これに対し、K13-propeller 遺伝子の変異が報告されているベトナムのカンボジア国境に接しているビンフォック省やカンボジア、タイなどと比較すると、この変異は現時点においてカンホア省および周辺地区に特徴的なものであった。

- (イ) 変異が検出された 15 例のうち 4 例において変異株と野生株の混合感染が認められた。
- (ウ) 同地区の熱帯熱マラリア原虫生殖母体のアレルは K13-propeller 遺伝子の変異と同様限定的であった。この生殖母体のアレルは K13-propeller 遺伝子の変異と同様、ビンフォック省では少なくとも 5 種類が検出されている。
2. カンボジア国境に接しているビンフォック省、ダックノン省およびジアライ省において熱帯熱マラリア患者のアルテミシニン耐性の検討を行った。In vitro での薬剤耐性試験において、薬剤耐性を呈したサンプルに K13-propeller 遺伝子の変異を認めたものと変異を認めなかったものがあった。
- (ア) K13-propeller 遺伝子の塩基配列を検索すると、野生株と変異株の混合感染をしているものが認められた。同様に変異株の感染でも異なる 2 種類の変異株の混合感染が認められた。
- (イ) 変異はこれまで報告があった P553L、V568G および C580Y が認められた。
- (ウ) 現在調査を継続している。

③成果の公表

1. Maeno Y. Molecular epidemiology of mosquitoes for the transmission of forest malaria in south-central Vietnam. *Trop Med Health*. 2017; 45:27. doi:10.1186/s41182-017-0065-6.
2. Maeno Y, Quang NT, Culleton R, Kawai S, Masuda G, Hori K, Nakazawa S, Marchand RP. Detection of the *Plasmodium falciparum* Kelch-13 gene P553L mutation in sporozoites isolated from mosquito salivary glands in South-Central Vietnam. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):308. doi: 10.1186/s13071-017-2247-9.
3. Maeno Y, Culleton R, Quang NT, Kawai S, Marchand RP, Nakazawa S. *Plasmodium knowlesi* and human malaria parasites in Khan Phu, Vietnam: Gametocyte production in humans, and frequent co-infection of mosquitoes. *Parasitology*. 144(4): 527-535. 2017; doi:10.1017/S0031182016002110.

6. 自己評価

今回の調査、解析より、ベトナム南部地域においても熱帯熱マラリア原虫のアルテミシニン耐性との関連が示唆されている K13-propeller 遺伝子内の変異が検出された。殊に、これまで変異の報告がなかった地区、カンホア省カンフー地区において検出されたことは新知見であり、その特徴を報告でき、一応の成果が得られた。

他方、ベトナム・カンボジア国境付近の調査では従来と同様、K13-propeller 遺伝子内の変異遺伝的多型を確認した。しかし、今回の調査において K13-propeller 遺伝子内の変異が無くてもアルテミシニン耐性を示す例や野生株と変異株の混合感染が見出されるなど、従来の報告にはなかった新知見が見出された。この現象が起きている要因について究明ができず、今後の継続調査が必須と考えられた。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：臨床試験に向けての新規マラリアワクチン BDES-NPV の製造プロセスと品質管理に関する研究

課題番号：29－一般－3

2. 代 表 者：伊 従 光洋（金沢大学医薬保健研究域薬学系・特任助教）

共同研究者：吉田 栄人（金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）

吉田 邦嵩（金沢大学医薬保健学総合研究科医科学専攻・大学院生）

Fitri Ameria（金沢大学医薬保健学総合研究科創薬科学専攻・大学院生）

坂口美亜子（長崎大学熱帯医学研究所共同研究室・助教）

3. 決 定 額： 350 千円

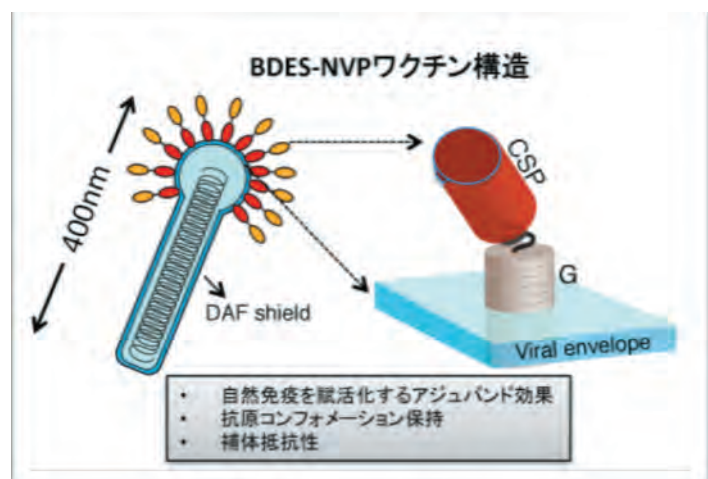
4. 申請時書類より

①研究目的

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

②研究内容

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



ド型ワクチンプラットフォームである。

【平成 29 年度計画】 BDES-NPV は明所常温条件でウイルス力価が減少する。このため熱安定性を保持するための安定剤の検討および長期保存に対する品質管理が必要である。具体的には、28 年度と同様に BDES-NPV の形状の定性化およびマラリア抗原の発現量の定量化（免疫電顕）を実施する（熱研 坂口）。同時に、保存サンプルを用いた動物実験でその安定性を評価する（金沢大）。さらに平成 28 年度までの研究成果を受けて、溶出後の至適 NaCl 濃度を明らかにするとともに、ウイルスの機能解析及び形態観察によって品質管理のための条件検討を継続する予定である。

③予想される成果

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

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

(1) Sf-9 細胞の培養とバキュロウイルスの増幅

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

ワクチン免疫実験ならびにチャレンジ感染実験に使用した BDES-sPfCSP2- Spider (BDES-PfCSP)、BDES-sPfCSP2-WPRE-Spider (BDES-PfCSP-WPRE), BES-mIL-12-Spider (BES-IL-12) は上記と同様の方法で増幅後、超遠心法で精製し PBS に懸濁した。

(2) バキュロウイルスの保存

増幅したバキュロウイルス (GL3-Spider) は超遠心処理して濃縮し、5%スクロース (和光純薬工業株式会社) もしくは 15%トレハロース二水物 (和光純薬工業株式会社) を含有したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁した。PBS のみのバッファーをコントロールとし、4℃ もしくは -80℃ で分注して保存した。

(3) タイトレーション (限界希釈法)

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

感染力価 (pfu/ml) = 希釈率 / 感染ウイルス溶液量 (ml) 。

(4) ワクチン免疫実験ならびにチャレンジ感染実験

Balb/c マウスを用い、3 週おきに 3 回 BDES ワクチンを筋肉内接種し、尾静脈より採血した血清を用いて ELISA で抗 PfCSP 抗体価を評価した。免疫したマウスならびに対照群に対し、PfCSP/Pb 感染蚊を用いたチャレンジ感染試験により防御効果を評価した (n = 10)。マウス 1 匹当たり感染蚊が 2 匹以上 7 匹以下となるよう吸血感染させた。スポロゾイトの存在の有無は吸血後の蚊の唾液腺を全て解剖することにより明らかにした。チャレンジしたマウスは 14 日後まで末梢血の薄層塗抹標本作製することにより、赤内期原虫の有無を確認しワクチンの防御効果を評価した。

②成果（結果＋考察）

BDES-NPV ワクチンの製造プロセスの標準化、コスト低減、閉鎖系での製造のためにアフィニティーカラムによる精製のための検討を行った。「CIM multus™」 monolith カラムを用いたイオン交換クロマトフィー法によるウイルス精製方法の確立を試みている。

平成 28 年度までの研究成果から、イオン交換クロマトグラフィー中の浸透圧の変化によりウイルス力価が低減することが明らかとなった。そこで、平衡時、洗浄時ならびに溶出時の各種緩衝液組成ならびに処理時間を変化させて検討を続けているが、有効なプロトコルの同定には至っていない。平成 29 年度はウイルスの保存条件の検討に焦点を当てるとともに、開発中のマラリアワクチンの有効性を動物実験で評価した。

条件検討用としてマラリア抗原を発現しないコントロールウイルス GL3-Spier を超遠心法による高純度精製後、長期保存し経時的にウイルス力価を測定した。保存液の候補として、まず、以前にバキュロウイルスの保存液として報告されているスクロース含有 PBS 溶液を用いた（Jorio et.al, Biotechnol Prog, 2006）。BES-GL3-Spier ウイルスを PBS 中に 4℃で保存した場合、6 ヶ月を過ぎたあたりからウイルス力価が約 20%まで

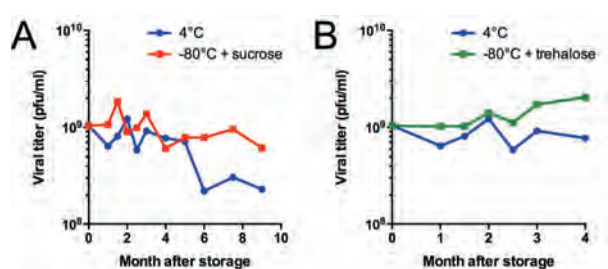


図 1. 長期保存時のウイルス力価の検討. (A) PBS (4℃)ならびに 5%スクロース溶液 (-80℃)において保存したウイルスの力価。3 回の実験結果を統合して示す。(B) PBS (4℃)ならびに 15%トレハロース溶液 (-80℃)において保存したウイルス力価。

減少した（図 1 A）。5%スクロース含有 PBS 中に 4℃で保存した場合、9 ヶ月間ウイルス力価の大幅な減少は認められなかった（図 1 A）。近年、バキュロウイルスをもとに作製された HIV-1 ウイルス様粒子（Lynch A et.al, Virol J, 2012）やインフルエンザウイルス様粒子（Quan FS et.al, J Virol, 2010）の保存液としてトレハロース溶液が用いられているため、これを用いて BES-GL3-Spier ウイルスの保存を試みた。実験計画期間中の 4 ヶ月間、ウイルス力価を測定したが、PBS 中でも 15%トレハロース含有 PBS 中でもウイルス力価に変化はなかった（図 1B）。トレハロースに関しては検討中であるが、糖液中での保存がバキュロウイルスに適しているものと考えられる。

最近、我々はバキュロウイルスベクターを基盤としたワクチンプラットフォームを確立し、これをもとにマラリアワクチンの開発を行っている。マラリアスポロゾイト期抗原である PfCSP を発現する BDES-PfCSP ワクチンはマウスに 4 回免疫することにより、PfCSP 遺伝子組換えネズミマラリア原虫のスポロゾイトのチャレンジ感染試験において 60%の感染防御効果（有効性）を発揮した（Iyori et.al, Malar J, 2017）。そこで、本研究では、ワクチンの遺伝子発現を増強することが報告されている Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) をワクチンコンストラクトに組み込んだ BDES-PfCSP-WPRE ワクチン、ならびに、宿主の抗原提示応答を修飾可能なサイトカイン IL-12 を人工的に発現可能な BES-IL-12 ベクターをそれぞれ作製し、ワクチン効果をマウスモデルで評価した。BDES-PfCSP ワクチンに比べ、

BDES-PfCSP-WPRE ワクチンは哺乳細胞内での遺伝子発現が3倍以上増強することが明らかとなり、また、BES-IL-12 ベクターはマウス脾臓細胞から IFN- γ を産生誘導可能な生物活性を保った IL-12 を発現させた (Iyori et.al, Parasite Immunol, 2017)。これらのワクチンを Balb/c マウスに3回免疫した際の免疫応答と、PfCSP 発現型遺伝子組換えマラリア原虫 (スポロゾイト) に対するチャレンジ感染試験の結果を表1に示す。BDES-PfCSP ワクチンに比べて BDES-PfCSP-WPRE ワクチンでは、抗 PfCSP 抗体応答が1.4倍～1.7倍上昇した。IgG サブクラス解析では、BES-IL-12 ベクターを共免疫することによって IgG2a/1 が約4倍高くなることが明らかとなった。IgG2a は Th1 環境時に産生される IgG サブクラスであるため、BES-IL-12 ベクターの共免疫は Th1 応答を増強することが示唆された。チャレンジ感染実験の結果はそれぞれコントロール群で0%、BDES-PfCSP 免疫群で10%、BDES-PfCSP-WPRE 免疫群で40%、BDES-PfCSP-WPRE + BES-IL-12 免疫群で80%の有効率となった。以上の結果から、BDES-PfCSP-WPRE ワクチンと BES-IL-12 ベクターの共免疫法は液性免疫応答を増強させ、また、Th1 応答を誘導することによってスポロゾイト期マラリア原虫に対して防御効果を発揮することが考察された。

表 1. 免疫試験ならびにチャレンジ感染試験 (N = 10)

ワクチン群	免疫回数	抗 PfCSP 抗体価	IgG2a/1 比	感染防御マウス / 総数 (有効率)
PBS	3	–	–	0/10 (0%)
BDES-PfCSP	3	81,317	0.51	1/10 (10%)
BDES-PfCSP-WPRE	3	137,795	0.54	4/10 (40%)
BDES-PfCSP-WPRE + BES-IL-12	3	115,367	1.91	8/10 (80%)

③成果の公表

[原著論文]

1. Iyori M, Yamamoto DS, Sakaguchi M, Mizutani M, Ogata S, Nishiura H, Tamura T, Matsuoka H, Yoshida S. DAF-shielded baculovirus-vectored vaccine enhances protection against malaria sporozoite challenge in mice. *Malaria Journal*, 16:390, 2017.
2. Iyori M, Blagborough AM, Sala KA, Nishiura H, Takagi K, Yoshida S. Protective efficacy of an IL-12-expressing baculoviral malaria vaccine. *Parasite Immunol., Parasite Immunology*, 39(12):12488, 2017.
3. Yoshida K, Iyori M, Blagborough AM, Salman AM, Dulal P, Sala KA, Yamamoto DS, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Yoshii T, Yusuf Y, Tokoro M, Hill AVS, Yoshida S. Adenovirus-prime and baculovirus-boost heterologous immunization achieves sterile protection against malaria sporozoite challenge in a murine model. *Scientific Reports*, 8(1):3896, 2018.

[学会発表]

1. ○Asrar Alam, Mitsuhiro Iyori, Kunitaka Yoshida, Yenni Yusuf, Katarzyna A Sala, Andrew M Blagborough, Eizo Takashima, Takafumi Tsuboi, Shigeto Yoshida. *P. falciparum* multistage viral-vectored vaccines effective for both sporozoite protection and transmission blocking. 第 8 6 回日本寄生虫学会. 札幌. 2017 年 5 月.
2. ○伊従光洋, 吉田 邦嵩, Salman Ahmed, Dulal Pawan, Khan Shahid, Biswas Sumi, 所正治, Andrew Blagborough, Adrian Hill, 吉田 栄人. Protective efficacy of viral vectored *Plasmodium falciparum* malaria vaccines by the prime-boost immunization regimen. 第 8 6 回日本寄生虫学会. 札幌. 2017 年 5 月.
3. ○Islam Ashekul, Talha Bin Emran, Daisuke Yamamoto, Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Yenni Yusuf, Nobuko Tuno, Yoshida Shigeto. Transgene mediated inhibition of collagen-induced platelet aggregation by Anopheline Anti-Platelet Protein, regulates probing time and blood feeding success in malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. 第 35 回北陸病害動物研究会. 金沢. 2017 年 7 月.
4. ○Yenni Yusuf, Mitsuhiro Iyori, Masanori Mizutani, Asrar Alam, Fitri Amelia, Talha bin Emran, Ashekul Islam, Shigeto Yoshida. Development of viral-vectored *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccines and its evaluation system in a murine model. 第 73 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 大阪. 2017 年 10 月.
5. ○Fitri Amelia, Mitsuhiro Iyori, Kento Genshi, Yutaro Onoue, Talha Bin Emran, Yenni Yusuf, Ashekul Islam, Shigeto Yoshida. Evaluation of the immunogenicity and vaccine efficacy of recombinant truncated protein PfCSP region in a murine malaria model. 第 73 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 大阪. 2017 年 10 月.
6. ○Ashekul Islam, Mitsuhiro Iyori, Daisuke Yamamoto, Nobuko Tuno, Talha Bin Emran, Fitri Amelia, Yenni Yusuf, Henrique Silveira, Shigeto Yoshida. Transgene mediated inhibition of collagen-induced platelet aggregation by Anopheline

Anti-Platelet Protein, regulates probing time and blood feeding success in malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. 第 73 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 大阪. 2017 年 10 月.

7. 伊従光洋. ウイルスベクターを基盤としたマラリアワクチンの開発. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.
8. ○吉井達也, 伊従光洋, 吉田邦嵩, 島田聡, Yenni Yusuf, 水上浩明, 吉田栄人. アデノ随伴ウイルスベクターを用いたマラリアワクチン開発研究. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.
9. ○堀直人, 伊従光洋, 吉田邦嵩, Talha Bin Emran, 島田聡, 志田壽利, 吉田栄人. 組換えワクシニアウイルス LC16m8 Δ のマラリアワクチン効果. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.
10. ○大塚広夢, 島田聡, 伊従光洋, 吉田邦嵩, 吉田栄人. ウイルスベクターと組換えタンパクを組み合わせたマラリアワクチンの開発研究. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.
11. Fitri Amelia, Mitsuhiro Iyori, Kento Genshi, Yutaro Onoue, Talha Bin Emran, Yenni Yusuf, Shigeto Yoshida. マラリア PfCSP タンパクのワクチン抗原としての免疫原性および感染防御効果の検討. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.
12. Yenni Yusuf, 吉田邦嵩, 伊従光洋, 吉井達也, 橋爪 洋樹, 島田聡, 水上浩明, 山本大介, 福本晋也, 吉田栄人. アデノウイルスとアデノ随伴ウイルス用いた heterologous prime-boost immunization によるマラリアワクチンの開発研究. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.
13. ○Ashekul Islam, 伊従光洋, 山本大介, Talha Bin Emran, 都野展子, 山口莉理夏, Henrique SILVEIRA, 吉田栄人. コラーゲン誘導性血小板凝集阻害活性を有するハマダラカ唾液タンパク AAPP の機能を喪失すると吸血行動が制限される. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018 年 3 月.

6. 自己評価

- ウイルス保存条件の検討から、 -80°C の保存液（特にスクロース含有 PBS）中で保存した際に良好な結果を評価することができた。今後は感染流行地域でも対応可能な常温条件での保存方法の検討を進めたい。
- イオン交換カラムを用いたウイルス精製実験においては、ウイルス精製時の浸透圧の変化によるウイルス力価の低下という問題が解決できなかった。選択しているカラムの変更や精製方法自体の見直しが必要である。
- 精製方法確立に先立って行った感染防御試験では、報告されている中でも非常に高い80%という有効性を示した。研究成果に関しては学会発表だけでなく、原著論文3報を報告することができ、本研究室で開発されたワクチンの有効性を世界に示すことができた。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 29 年度共同研究報告（自己評価）

1. カテゴリー：共同研究

課題名：インドを旅行する日本人旅行者における疾患発生要因に関する研究

課題番号：29－一般－4

2. 代 表 者：（所属・職名）津田敏秀（岡山大学大学院環境生命科学研究科・教授）

共同研究者：（所属・職名）山川路代（岐阜大学大学院医学系研究科・助教）

時信亜希子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）

佐才めぐみ（岡山大学大学院環境生命科学研究科・客員研究員）

3. 決 定 額： 600,000円

4. 申請時書類より

① 研究目的

旅行者における旅行者下痢症は、先進諸国からの旅行者が、発展途上国・低収入諸国を旅行する際に、最も頻度が高く遭遇する症状である（12～46%）。欧米諸国では、実践的な研究が蓄積されている医学分野として旅行医学 Travel Medicine が知られているが、旅行者における下痢症は、その主な対象疾患であり、研究分野でもある。

本研究は、インドを旅行する日本人旅行者を対象に宿を提供している、インド・サンタナグループの協力を得て、コルカタ、プリー、デリー、バラナシのサンタナの宿を利用する年間約 1,000 人の日本人旅行者を対象とする研究である。つまりこのサンタナの宿を利用した日本人旅行者が、インド国内の旅行中に遭遇した曝露と症状に関する情報を、質問票調査と便の標本から収集分析し、旅行中の旅行者下痢症の発生頻度を明らかにし、リスクの高い要因を明らかにする研究である。

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

- ① 対象（患者・研究対象者の属性など）：インド・サンタナグループの宿（コルカタ・プリー・デリー・バラナシ）を利用する日本人旅行者
- ② 曝露（治療・検査・基本属性など）：日本人旅行者が旅行中に取ったリスク行動全般、特に喫食歴や疲労状態の発生など消化器疾患のリスク要因
- ③ 比較（何と比較するのか）：上記のリスク行動を取っていなかった日本人旅行者
結果（どんなアウトカムに変化があるのか）：下痢症、及びその他の症状

② 研究内容

(1) 研究のデザイン

コホート研究デザイン（前向き）

(2) 研究対象者の選定方針

インド・サンタナグループの宿（コルカタ・プリー・デリー・バラナシ）を利用し、インド国内を旅行する日本人旅行者。特に、日本人旅行者が立ち寄る拠点となっている、デリー・バラナシで研究を主に研究を行いたい。

この日本人旅行者の中で、ある曝露イベントがあった人を曝露群、その曝露イベントがなかった人を非曝露群として解析する。疾患情報は、質問票の回答より得るが、コルカタ・サンタナの利用者で下痢症状がある者に対しては、便を採集し細菌検査を行う。

1) 選択基準

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

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

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

2) 除外基準

① 日本人以外

② 日本国籍のない日本人

③ インターネットの利用方法の分からない人、日本語を解さない人

④ 18 歳以上 20 歳未満の者で代諾者が拒否した場合

(3) 予定する研究対象者数

1,000 人/年

(4) 対象者数の設定根拠

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

(5) 評価の項目及び方法

1) 主要評価項目

旅行者下痢症

2) 副次的評価項目

旅行者下痢症以外の旅行中の急性症状（下痢以外の発熱などの体調の変化）

(6) 統計解析方法

- 記述疫学による分析

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

(7) 観察の対象となる治療方法

治療は行わない。

(8) 観察及び検査項目（用いる試料・情報）とその実施方法

以下の項目について、観察及び検査を実施し、また、質問票への回答を依頼し、そのデータを本研究に利用する。これらはすべて旅行者の旅行中と日本帰国後に実施される項目である。便の細菌検査は、サンタナ宿コルカタに宿泊した者のうち、同意を取り付けた者に限り実施する。

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

調査スケジュール

日程	予備調査（済）	本研究（ベースライン・旅行中）	本研究（旅行後）
実施場所	インドサンタナ宿 （コルカタ・プリー）	インドサンタナ宿 （国内4か所）	日本の居住地
同意取得	—	○*	（取得済み）
質問票回答	○ （質問紙及びオンライン）	○ （予備調査の結果により質問紙かオンラインかを決定）	○ （オンライン）
便収集	—	○ （コルカタのみ）	—

*便の標本収集にあたり研究対象者の同意を取得する。

(9) 研究対象者の研究参加予定期間

予備調査は、2015年12月1日～2016年11月30日に終了した。本研究では、2017年6月1日～2018年3月31日までとする。可能であれば、来年も申請し、2019年3月31日まで研究を継続したい。

(10) 研究参加者に対する研究終了（観察期間終了）後の対応

特になし。問い合わせがあれば対応する。

(11) 研究参加の中止基準

1) 研究中止時の対応

研究責任者または研究分担者は、次に挙げる理由で個々の研究対象者について研究継続が不可能と判断した場合（①研究対象者の組み入れが困難で、予定症例数に達することが極めて困難であると判断されたとき、②委員会により、研究実施計画

等の変更の指示があり、これを受入れることが困難と判断されたとき)には、当該研究対象者についての研究を中止する。ご自分の判断で中止いただく。18 歳以上 20 歳未満の方については、親権者等からの同意撤回書の送付をもって中止とする。中止したもののデータは削除し、便サンプルは廃棄する。

2) 中止基準

- ① 研究対象者の組み入れが困難で、予定症例数に達するのが極めて困難であると判断されたとき。
- ② 委員会により、研究実施計画等の変更の指示があり、これを受入れることが困難と判断されたとき。

(1 2) 研究の変更、停止・中止、終了

1) 研究の変更

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

2) 研究の停止・中止

研究責任者は、以下の事項に該当する場合は、研究実施継続の可否を検討する。

- ① 研究対象者の組み入れが困難で、予定症例数に達するのが極めて困難であると判断されたとき。
- ② 委員会により、研究実施計画等の変更の指示があり、これを受入れることが困難と判断されたとき。

3) 研究の終了

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

(1 3) 研究実施期間

2015 年 12 月 1 日～2019 年 3 月 31 日(研究対象者登録締切日:2018 年 11 月 30 日)

③ 予想される成果

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

(1) 研究対象者に生じる負担

ベースライン、旅行中及び帰国後に、紙ベースあるいはインターネットを通じた質問票への回答にそれぞれ 10 分程度を要する。コルカタの宿泊者で下痢症状を呈した者については、自己の便採集(10g)の手間がかかる。

(2) 予測されるリスク

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

(3) 予測される利益

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

(4) 総合的評価並びに当該負担及びリスクを最小化する対策

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

5. 実施報告：

① 研究材料・方法・手続き

本調査はサンタナデリー及びバラナシの 2 か所のゲストハウスにて、2018 年 2 月 12 日～同年 3 月 31 日に日本人宿泊者を対象に行った。初回調査用と追跡調査用の 2 種類の Web 質問票を用いた。初回調査はデリーの宿泊者対象で、日本からインドに入国して数日以内の人を対象者として想定した。質問項目には、基本属性（性別、血液型、生年月日、日本の居住地、就業状況、最終学歴）、今回の渡印情報（入国日等）、海外渡航歴、インド渡航歴、今回の渡印前準備（健康・安全情報収集、予防接種）、今回の渡航で病気やけがに備えて持参したもの、今回の旅行に際するリスク認知と不安の程度を含め、最後に回答者本人のイニシャル、ニックネーム、メールアドレス（任意）を聞いた。追跡調査は、デリー及びバラナシの宿泊者対象で、初回調査から 7 日間以上経過した人を対象とした。質問項目には、前回調査以降の訪問地、インド滞在中のリスク行動（食事や衛生の習慣、具体的には食事の場所、食事前の手指洗浄、非加熱食品の喫食、氷入り飲料の摂取、水道水の摂取、歯磨き・うがいに使用した水の種類、活動内容とその頻度）、滞在中に生じた健康障害（虫刺されの有無、下痢の有無・時期・頻度、下痢の随伴症状、対処方法、精神症状、その他の症状、医療機関受診の有無）を含め、前回調査同様、回答者のイニシャル、ニックネーム、生年月日を聞いた。前回調査と追跡調査の回答者結び付けにはイニシャル、ニックネーム、生年月日を用いた。

宿泊者の研究参加募集は、研究班員（AT）及びサンタナスタッフの案内により行った。その際に、研究についての説明を行った。また、ゲストハウスの共同部屋（デリー）とフロント（バラナシ）に案内書と説明書を掲示した。研究参加に同意した参加者は指定のタブレットもしくは個人のスマートフォン等の端末から、Web アンケートのサイトにアクセスし回答を行った。必要事項に最後まで回答した場合に、謝礼品を渡した。

②成果（結果＋考察）

本研究に参加した日本人旅行者は、初回調査で 98 人、追跡調査で 8 名であった。追跡調査の 1 名は初回調査での回答がなかったため、解析から除外した。初回調査から得られた対象者の基本属性を表 1 に示す。

表 1 初回調査対象者の基本属性

初回調査対象者		つづき	
	n=98		
性別, n (%)		年齢, mean (sd)	25.7 (6.5)
男性	54 (55.1)	海外旅行, n (%)	
女性	44 (44.9)	なし	11 (11.2)
血液型, n (%)		あり	87 (88.8)
A 型	42 (42.9)	インド旅行経験, n (%)	
B 型	25 (25.5)	なし	72 (73.5)
O 型	22 (22.5)	あり	15 (15.3)
AB 型	7 (7.1)	無回答	11 (11.2)
不明	2 (2.0)	下痢に備えた携行品, n (%)	
現在の職業		携行しなかった	59 (60.2)
無職	15 (15.3)	下痢止め・抗生剤携行	39 (39.8)
学生	48 (49.0)	予防接種, n (%)	
医療従事者(医師・看護師・薬剤師)	4 (4.1)	しなかった	87 (88.8)
勤め(正規・常勤)	13 (13.3)	した	11 (11.2)
勤め(パート・アルバイト)	9 (9.2)	健康情報の入手*, n (%)	
自営業・家業	7 (7.1)	しなかった	33 (33.7)
その他	2 (2.0)	した	65 (66.3)

表 1 より、対象者は 20 代の学生が多く占め、インド旅行が初めての対象者が全体の約 3/4 であった。下痢に備えた携行品を日本から持参した人は約 4 割、予防接種を受けた人は約 1 割にとどまった。一方、旅行前に何等かの健康情報の入手をしていた人は 7 割近くいた。

次に、対象者のリスク認知と不安の程度のうち、下痢症に関連した結果を表 2 に示す。下痢のリスク認知、衛生・食事・健康に対する不安の程度を 7 件法で質問し、1~7 の数字が大きくなるほどそれぞれリスク認知、不安の程度が高くなる設定にした。

表 2 初回調査対象者のリスク認知・不安

	初回調査有効回答				
	n=69				
	mean	sd	Q1	Q2	Q3
下痢のリスク認知	5.3	1.7	4	6	7
不安: 衛生	4.5	2.0	3	5	6
不安: 食事	3.8	1.9	2	4	5
不安: 健康	4.3	1.9	3	4	6

sd, standard deviation; Q1, 25% percentile; Q2, 50% percentile; Q3, 75% percentile

上記のリスク認知及び不安の程度をインド旅行経験の有無で層別した結果を次ページの表 3 に示す。

インド旅行経験者は未経験者と比較して、下痢のリスク認知の程度はほぼ同程度であったが、衛生、食事、健康に対する不安が少ない傾向にあった。

表 3 初回調査対象者のリスク認知・不安（インド経験の有無で層別）

	サンタナ宿泊者 n=69				t 検定 p 値
	インド経験者		インド未経験者		
	mean	sd	mean	sd	
下痢のリスク認知	5.5	1.7	5.2	1.7	0.642
不安:衛生	3.3	2.0	4.7	1.9	0.027
不安:食事	2.8	1.1	4.0	2.0	0.038
不安:健康	3.7	1.8	4.5	1.9	0.193

sd, standard deviation; Q1, 25% percentile; Q2, 50% percentile; Q3, 75% percentile

さらに、インド旅行経験の有無による旅行前の健康対策準備の有無のオッズ比と信頼区間を求めた（表 4）。具体的には、下痢に備えた携行品（下痢止め、抗生剤）、予防接種、健康情報の入手の 3 項目である。オッズ比は、インド旅行経験者の未経験者に対する値である。

表 4 インド旅行経験の有無による下痢への対策

	サンタナ宿泊者 n=87	
	OR	95% CI
下痢に備えた携行品の持参	0.61	(0.18 - 2.09)
予防接種	0.66	(0.08 - 5.83)
旅行前の健康情報の入手	0.66	(0.21 - 2.08)

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval

インド旅行経験者は未経験者に比べて、旅行前の健康対策準備をしていない傾向があったが、信頼区間が広く確定的ではなかった。この結果は、表 3 で示したように、衛生、食事、健康に対する不安がインド経験者でより程度が低いことと一貫性がある。

追跡調査の回答(n=7)から、今回のインド旅行中に下痢を発症した人は 3 人いた。インド入国日から何日目に下痢を発症したかの回答から下痢の発症率を求めたところ、1000 人日当たり 21.47 症例となった。

今回の調査では、初回調査に参加して追跡調査にも参加した人の割合が低かった（約 7%）。これは、追跡調査の対象を初回調査に回答して 7 日間以上経過し、かつサンタナデリーまたはサンタナバラナシに宿泊している人に設定したことが理由として挙げられる。そのため、下痢の発生要因を特定するための十分なデータがなく解析に至らなかった。しかし、インドにおける日本人旅行者の属性に関する貴重な情報を得ることができた。また、Web 質問表以外に、今後の研究の参考となる情報をサンタナのスタッフ及び宿泊者から得た。研究参加に関しては、今回のような質問票による調査では、個人情報の提供、特に氏名を記載することに抵抗があるという声があった。イニシャルやニックネーム、生年月日情報の提供であれば可とのことであった。また、Web 質問票は、高齢者には馴染みがなく

操作に抵抗があるということで、参加を辞退した人がいた。他に、サンタナ宿泊者の入国後の行先及び滞在日数、移動手段、滞在中の過ごし方、健康に関する情報等を得た。健康に関する情報としては、宿泊者が下痢になった際に現地の薬ではなく、日本から持参した正露丸を服用する人が多いが効果がみられないこと、下痢罹患中には経口補水液が有用であることを知らない人が多いこと、バラナシではガンジス川沐浴をする人が多いこと、バラナシでバングラッシー（*Cannabis sativa* の葉入りラッシー、バラナシでは合法）を飲み、一時的に体調を崩す人もいるということ、等の情報を得た。また、サンタナでは体調が悪くなった宿泊者には、近隣の診療所受診を勧めたり、旅程の変更をアドバイスしたりしており、旅行者がより安全な旅行を続けられる配慮をしていた。また、バングラッシーや大麻に手を出さないよう注意を促していた。今回得られた情報をもとに、今後の研究でより多くのデータを収集するべくプロトコルを再検討する必要がある。

③成果の公表

本研究の成果は、旅行医学関連の国内外の学会及び日本公衆衛生学会等の学会で発表し、旅行医学関連の国際誌で論文として発表する予定である。

6. 自己評価

まず、反省点であるが、サンタナ・コルカタでの便の収集と検査は、実施計画は立てたものの、費用の問題と慢性的な渋滞で悩むコルカタコルカタ市内を国立感染症研究所まで通り抜ける倦怠輸送の問題とで断念せざるを得なかった。

バラナシはインド旅行の中心的存在であり、ネパールへの入口のため、多くの日本人旅行者が立ち寄り、追跡調査のデータを収集できると期待していたが、実際はデータの集まりが予想をはるかに下回ってしまった。これは、追跡調査の対象者の設定に問題があったためと考えられ、今後の検討事項である。次回からの調査は、ほとんどの日本人旅行者がインド旅行をする際に入口となり出口としているデリーを中心にデータを収集すべきであることが分かった。また、追跡調査対象者には、サンタナでの案内掲示と声掛けだけでなく、メール連絡等で追跡調査参加を促すことも必要であろう。

今回はデリー、バラナシという日本人旅行者が多い北インドの都市で調査を行ったが、今後の課題として、旅行者層や気候の異なる南インドの日本人旅行者の拠点を探してデータを収集することも有意義であろう。

デリーを中心に今回収集したデータは、当初我々が立てていた、日本人旅行者は健康対策が不十分であるという仮説を裏付ける結果が得られている。今後、さらにデータを収集してデータの幅を広げたい。1 回目のデータではインドを旅行する日本人が非常に無防備に旅行していること、またどのような要因をもつ旅行者が無防備であるかも明らかにできた。2 回目の追跡調査データの収集が不十分なので、追跡調査データの収集割合の向上のために、さらなる工夫を検討しているので、次回試みたいと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 29 年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナムにおける不明熱性疾患病因同定に関する研究

課題番号：29－ 一般 － 5

2. 代 表 者：（所属・職名）三浦 こずえ（東京大学・准教授）

共同研究者：（所属・職名）Nguyen Le Khanh Hang（ベトナム国立衛生疫学研究所・ウイルス部長）

3. 決 定 額： 800 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

東南アジア地域における発熱を伴う熱性疾患では、診断が煩雑・困難であることから、原因の特定に至らない不明熱性疾患とされることは潜在的に多いと推測される。申請者はベトナム社会主義共和国（以下、ベトナム）における急性熱性疾患患者のうち、感染症が強く疑われ、かつ現地の医療機関での実験室診断により主要な病因（インフルエンザ、マラリア、腸チフス、デング熱等）が特定されなかった患者について、その起因微生物の同定とこれをもとにした疫学情報の収集を推進している。その中で、2015-2016 年にベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）との共同研究及び「平成 29 年度 熱帯医学研究拠点一般共同研究助成金研究」からツツガムシの幼虫が媒介するリケッチア *Orientia tsutsugamushi* (OT) 感染者をハノイ市にて多数見出した。4 種類の遺伝子型が確認され、ハノイ市内における OT 感染が非常に多様性に富むことが示唆される。OT は抗原となる各種外膜タンパクの相同性が低く、至適診断用抗原が見つかっていない。現在、市販されている血清診断 ELISA キット及びイムノクロマトは特に抗原性があると考えられている 56kDaTSA タンパクを抗原としたものだが、感度は低く、株によっては判定できないものもある。申請者は、OT の外膜タンパクである ScaA タンパクの膜貫通領域内に株間で相同性が高く、かつ抗原性も有するペプチドを数カ所見出し、ヒト用血清診断 ELISA 法を確立中である。ツツガムシ病は診断が遅れると重症化して死亡する疾患の一つで、死亡を免れたとしても予後が悪く、迅速な診断が求められる。本研究は、ScaA ペプチド抗原を用いた血清診断 ELISA 法 (IgM 及び IgG 検出) の確立を行い、多様な遺伝子型の OT 患者が混在するハノイの患者血液を用いて、その検出感度等の評価を行う。同抗原をさらにより簡便な血液診断イムノクロマト法確立へと発展させ、ハノイの医療機関で試験的に調査を行う。また ScaA ペプチドを抗原にしたウサギポリクローナル抗体を作成済みであり、現在 OT 抗原側の検出を目的としたイムノクロマト作成も同時に行う。

②研究内容

ベトナムハノイ市にて 2015 年 7 月から 2016 年 9 月までに 43 検体の OT 遺伝子陽性患者血液を保存している。これら 4 遺伝子型 (Karp, Kato, JGv, TA763) 患者血清に加え、日本国内の患者血清も用いて、ScaA ペプチド抗原ヒト用血清診断 ELISA 法を確立し、従来の間接蛍光抗体法による血清型診断法と比較検討を行う。その後、ScaA ペプチド抗原を用いたイムノクロマトを作成し、ハノイの医療機関にて試験的に不明熱性疾患患者を用いた調査を行う。また、並行して ScaA ペプチドを抗原にしたウサギポリクローナル抗体を使用した OT 病原体直接検出イムノクロマトを確立する。

<次年度以降>

初年度にウサギポリクローナル抗体を用いた OT 病原体直接検出イムノクロマトが確立できた場合は、ScaA ペプチドに対するモノクローナル抗体を作成し、モノクローナル抗体を用いた OT 病原体直接検出イムノクロマト開発を行う予定である。1) ScaA ペプチドをマウスに免疫 (75 日)、2) 免疫マウス脾臓を用いて、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成、ハイブリドーマクローニングキット (ベリタス社) (30 日)、3) イムノクロマトの作成、4) ハノイの医療機関にて試験的調査実施

③予想される成果

現在市販されている血清診断キットは、相同性が低い 56kDaTSA タンパクを使用しているため各 OT 株の抗原をミックスすることで、OT 感染抗体の検出を可能にしてきた。しかしながら、株間での感度は様々であった。申請者は、既に OT 株間の相同性が高い ScaA ペプチド抗原を用いた血清診断 ELISA 法の確立を目指した研究を進め、ハノイ市内の病院で捕獲した OT 感染ラット血清において抗 OT 抗体検出が可能であることを示し、次のステップとしてヒト用血清診断 ELISA 法の確立を急いでいる。また、医療現場での活用を考え、より簡便なイムノクロマト法への改変を進めており、不明熱性疾患の診断向上に貢献することを考えている。一方で、IgM 抗体価上昇は個人差があり、かつ検出不可能な場合もあるため、より診断を確実なものにするため OT 抗原の直接検出が求められる。そこで、平成 30 年度は OT の ScaA ペプチドに対するモノクローナル抗体を作成し、迅速、簡便かつ確実な OT 診断方法の開発を最終目標とする。本研究成果により、OT 感染症を不明熱性疾患ではなく、容易に診断可能な感染症とし、さらにその感染実態を解明することを最終目的とする。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

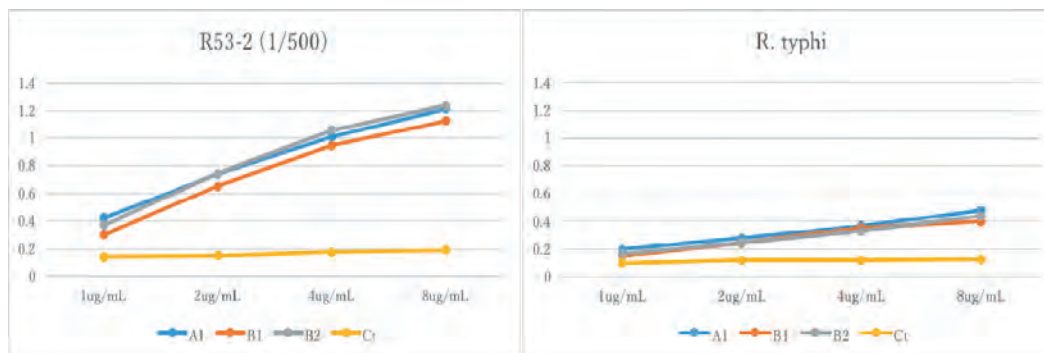
1. これまでの研究の結果から OT の ScaA タンパク内の保存性の高い領域で、抗原性のある 3 領域 (図 1、A1;1230aa-1280aa、B1;1320aa-1377aa、B2;1371aa-1510aa in Gilliam 株) の遺伝子を pET-43.1b(+)ベクターへ挿入し、大腸菌にて発現後、His-tag カラムを使用してタンパク精製を行う。
2. 保存しているベトナム OT 感染患者血清を用いて、ELISA 法の確立を行う。
3. 外注したウサギポリクローナル抗体の性状解析を行う。
4. マウスに ScaA ペプチド A1、B1、B2 の免疫を行った後、ハイブリドーマ作成キットを用いて、ScaA に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 細胞の作出を行う。

(図 1)

Gilliam ScaA aa.seq	1119	AEQPPQDPAEHVQPVVAQPLAAGAGQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQHVSSPSS	1178
Karp ScaA aa.seq	1135	DEQPPQDPDEHVQGCCATNCWCWATTATTATTATTATTATTAPQQRDGYTSSPSS	1194
Kato ScaA aa.seq	1062	AEQQPPDLDEHVKP-----VVAQPLAAGAGQQQQQQQQQQQQYATSSPSS	1107
Gilliam ScaA aa.seq	1179	DDQEQSSESAPALQPTLQKFSSDAHLKSGVCATVAATSSIVESKAANNKSG-----N	1230
Karp ScaA aa.seq	1195	DDQEQSSEKPEIILQPTLPK-ISDAHLKSGVHATVAATSSIVESKAANNNSGSDIVSSGSN	1253
Kato ScaA aa.seq	1108	EDQEQSSEPSLALQPTLQKNSSDVHLKSGVRATVAATSSIVESKATNNKSGSDIVSSGSN	1167
Gilliam ScaA aa.seq	1231	INKQSWNIWADGFFSNVNQQDHEHIQGYKTDISGTSIGADKHLKNNAIIGAAISYAKFDT	1290
Karp ScaA aa.seq	1254	INKQSWNIWADGFFSNVNQQDHEHIQGYKTDISGTSIGADKHLKNNAIIGAAISYAKFDT	1313
Kato ScaA aa.seq	1168	INKQSWNIWADGFFSNVNQQDHEHIQGYKTDISGTSIGADKHLKNNAIIGAAISYAKFDT	1227
Gilliam ScaA aa.seq	1291	KHTDSRIEKINSNVYLLSLYGQYSFQSTTFIRGMVNAKFSDDSKNSSLTLWQGHSHYGS	1350
Karp ScaA aa.seq	1314	KHTDSRIEKINSNVYLLSLYGQYSFQSTTFIRGMVNAKFSDDSKNSSLTLWQGHSHYGS	1373
Kato ScaA aa.seq	1228	KHTDSRIEKINSNVYLLSLYGQYSFQSTTFIRGMVNAKFSDDSKNSSLTLWQGHSHYGS	1287
Gilliam ScaA aa.seq	1351	LTAGHYFYPLKNNKLLSLVPTVGVRHSYFNTSGNKSVDNSNKTIGORSHKALEGIIGIS	1410
Karp ScaA aa.seq	1374	LTAGHYFYPLKNNKLLSLVPTVGVRHSYFNTSGNEVDNSNKTIGORSHKALEGIIGIS	1433
Kato ScaA aa.seq	1288	LTAGHYFYPLKNNKLLSLVPTGIRRSYFNTSGNNSVDSSNKTIGORSHKALEGIIGIS	1347
Gilliam ScaA aa.seq	1411	VEQLVANNANNLNVLTSTVYGVVHHNLYDCQDGA-QLPNSNSTFNPVDITAHEQCLHKTF	1469
Karp ScaA aa.seq	1434	VEQLVANN-----NLNVLTSTVYGVVHHNLYDCQDGAQLPNSNSTFNPDMTAREQCLHKTF	1490
Kato ScaA aa.seq	1348	VEQLVANNANNLNVLTSTVYGVVHHNLYDCQDGA-QLPNSNSTFNPVDITAHEQCLHKTF	1406
Gilliam ScaA aa.seq	1470	YQLGVKLAIKRNIMDIGHACDVLAEKYISHTGIYAKASF	1510
Karp ScaA aa.seq	1491	YQLGVKLAIKRNIMDIGHACDVLAEKYISHTGIYAKASF	1531
Kato ScaA aa.seq	1407	YQLGVKLTIKRNIMDIGHACDVLAEKYITHGTGIYAKASF	1447

②成果（結果＋考察）

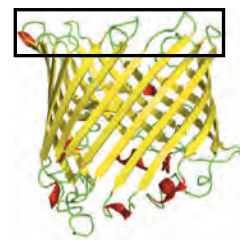
1. ベトナムの患者血清を用いた ELISA 法の条件検討



大腸菌発現 ScaA ペプチドの A1、B1、B2、ベクターのみ (Ct) を 1~8 ug/mL の濃度で抗原として使用し、血清はベトナム OT Karp 株感染患者血清 (R53-2) と *Rickettsia typhi* 感染患者血清 (国立感染症研究所より分与) を用いて行った。結果は、抗原として 2ug/mL 以上で使用する場合、A1、B1、B2 全てのペプチドは ELISA 抗原として十分使用が可能であることが明らかとなった。

2. ウサギポリクローナル抗体作成のため、A1、B1、B2 内の親水性が連続しているアミノ酸ペプチド (10~20aa) 5 カ所を選択して免疫したウサギ血清 (外注) は、抗原ペプチドへの抗体はできていたが、残念ながら OT との反応が見られなかった。

ScaA は約 1500 アミノ酸で構成される膜貫通タンパク質で、膜貫通領域はポーリン構造と呼ばれ、内孔のある樽型タンパク質 (図 2、Wikipedia より) である。構造予想で、A1、B1、B2 ペプチドは、アミノ酸の折り返し部位に相当し、膜外に突出していると考えられ (図 2、黒枠内)、抗原性は複雑な構造も関与する可能性があり、今回の結果となったと思われる。本結果に加え、大腸菌発現 A1、B1、B2 ペプチドの精製が困難で、再現性および安定性が悪いため、抗原性が確認できているペプチドを用いて、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の作成を先に行うこととした。



(図 2)

3. A1、B1、B2 ペプチドを 8 週齢の BALB/c マウスにアジュバント (TiterMax Gold) とともに 100ug/マウスで 2 回免疫し、抗体価の上昇を間接蛍光抗体法にて確認した結果、B1 ペプチドを免疫したマウスだけ抗体価の上昇が認められたため、3 回目の免疫を行い、その 7 日後に脾臓を摘出した。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成は ClonaCell-HY Hybridoma Cloning kit (ベリタス社) を用いて行った。結果は、B1 ペプチドに特異的に反応する抗体を産生する 5 つのハイブリドーマ 細胞株を獲得した。現在は、モノクローナル抗体の性状解析中である。

③成果の公表

OTを検出する ScaA に対するモノクローナル抗体の性状解析が終わり次第、論文投稿の予定である。

6. 自己評価

本研究の昨年度の予定は、ペプチド抗原を用いた ScaA ペプチド抗原ヒト用血清診断 ELISA 法を確立および、ScaA ペプチドを抗原にしたウサギポリクローナル抗体を使用した OT 病原体直接検出イムノクロマトを確立であったが、ScaA ペプチドの不安定さとウサギポリクローナル抗体の OT への反応が低かったため本来の結果が残念ながら得られなかった。そこで、次年度に予定していたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の獲得を行い、ScaA に特異的に反応し、感度も高いモノクローナル抗体が得られた。現在行っている性状解析が終了次第、論文投稿および特許出願を行う予定である。本研究は、今後の OT キット開発につながる十分な成果を挙げられたと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：北海道の野生動物におけるマダニ媒介性ウイルスの血清・分子疫学調査
課題番号：29－一般－6

2. 代表者：（所属・職名）内田玲麻（酪農学園大学・講師）
共同研究者：（所属・職名）Mya Myat Ngwe Tun（長崎大学・特任研究員）

3. 決定額：400 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

ダニ媒介性脳炎は、フラビウイルス科のダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）により引き起こされる、重篤な脳炎症状を主徴とするマダニ媒介性の人獣共通感染症である。自然界において TBEV はマダニにおいて維持され、小型野生哺乳類、鳥類が病原巣動物として知られるが、媒介マダニと病原巣動物の種類は地域により異なる。日本では、1993 年、北海道道南地域において患者が確認され、以降、同地域において、小型げっ歯類、イヌ、ウマ等の TBEV に対する抗体保有が報告されてきた。また、昨年 8 月には北海道で 2 例目となる人の感染例が確認され、国内では初の死亡例として報告された。

昨年、我々は北海道日高地方、道北地域、および道東地域のエゾシカ血清 314 検体を用い、TBEV および SFTS ウイルス（SFTSV）に対する血清学的調査および遺伝子学的調査を実施した（平成 29 年度熱帯医学研究拠点一般共同研究採択）。その結果、①エゾシカにおいて TBEV 感染が成立する事、および②北海道道北地域に TBEV が分布することが明らかとなった。一方、これまで国内では他の野生動物や鳥類に関する TBEV 感染状況の報告はない。以上を踏まえ、本研究では北海道に生息する中型野生動物の血清を用い、TBEV を含めたマダニ媒介性ウイルスに対する抗体保有状況、およびウイルス遺伝子を調べることで、本ウイルスの北海道における侵淫状況を明らかにすることを目的とする。併せて、熱帯医学研究所ウイルス学分野で収集された長崎の野生動物血清を用い比較を行う。

②研究内容

酪農学園大学野生動物医学センターに搬入されるアライグマをはじめとする野生哺乳動物、鳥類の血清および体表に付着したマダニを採集し、研究に共試する。併せて上記の動物の生息する北海道立野幌森林公園において、旗振り法によりマダニを採集し、ウイル

ス分離を行う。また、早坂ら（熱研ウイルス学分野）により収集された長崎県周辺のイノシシ血清を共試する。

① 血清学的調査

抗体調査として、SFTSV の組換え Nucleocapsid (Yu F. *et al.*, *Viol J.* 2015)、およびホルマリン不活化 TBEV 抗原 (Tun MM. *et al.*, *Sci Rep.* 2014) を用いた Indirect ELISA、もしくは固定化したウイルス感染細胞を用いた間接蛍光抗体法を実施する。また、血清学的調査により、陽性が疑われたサンプルに対して、SFTSV Yamaguchi 株、TBEV Oshima 株を用いた中和試験 (FRNT) を実施する。

② 遺伝子学的調査

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

③ ウイルス分離

BHK-21 細胞を用い、動物に付着したマダニおよび採集したマダニの乳剤からウイルス分離を試みる。感染の有無は細胞毒性 (CPE) により評価し、CPE の見られた検体に対し、RT-PCR による確認を行う。

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

③ 予想される成果

ダニ媒介性脳炎は、昨年 8 月、日本国内で 2 例目にして初の死亡例が報告された。現在、国内における病原巣動物の解明およびウイルス分布域の把握は急務と言える。昨年、我々は上述の結果から、前記の疑問点に対し一定の答えを得るに至った（論文執筆中）。今回、エゾシカ以外の野生動物を調査することで、病原巣動物および国内でのウイルス感染環のより詳細な情報が得られると期待される。また、これまで調査報告の少なかった道央地域において、有用な情報を提供できると考えられる。加えて、これらの疫学情報を統合することで、感染症対策を講じる上で有用なものになると期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法

アライグマ血清

2016 年 3 月～2017 年 6 月、北海道江別市内で捕獲され、酪農学園大学、野生動物医学センターに搬入されたアライグマ (*Procyon lotor*)、計 28 頭より採血を行った。血液はベノジェクトⅡ真空採血管 (TERMO) に採集した後、3,000 rpm、10 分間遠心分離し血清を分離した。得られた血清は 2.0 ml チューブ、2 本に分け、後の遺伝子学的診断および血清学的診断に共試するまで-80℃にて保存した。

マダニ採集

2017 年 4 月～9 月、北海道札幌市、江別市、北広島市にまたがる道立自然公園野幌森林公園にて、旗振り法によりマダニ採集を行った。採集されたマダニは形態学的特長に基づき、発育ステージ、性別、種の同定を行った。一部、形態学的に種同定が困難であったものに関しては、mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit 1* (*COI*) 遺伝子配列に基づき種同定を行った。一方、上記 28 頭のアライグマ体表に付着していたマダニはアライグマと殺時に採集を行った。野外採集されたマダニは採集日、発育ステージ、性別、種ごとにプールし (1～10 匹)、アライグマに付着していたマダニは 1 匹ずつ、ウイルス分離および RNA 抽出まで-80℃で保存した。

ウイルス分離

BHK-21 細胞 (ハムスター腎細胞由来) は 10% Fetal calf serum (FCS) (Thermo Fisher Scientific) および抗菌薬を含む Eagle's minimal essential medium (E-MEM) (SIGMA) にて、37℃、5%CO₂ 下で維持した。採集したマダニの入った 2.0 チューブに 2% FCS および抗菌薬を含む E-MEM 1 ml とステンレスビーズ (3.2 φ) 1 個を加え、ミキサミル MM300 (Retsch) にて 30 Hz で 1 分間破砕を行った。得られた乳剤を 13,000 rpm、1 分間遠心分離し、上清を回収後、0.22 μm フィルターでろ過し、24 well プレートに単層培養した BHK-21 細胞に接種した。接種後 7 日まで細胞変性効果 (CPE) を毎日観察し、感染 7 日後の上清を新たに用意した BHK-21 細胞に接種した。こうして得られた 2 回目の上清は-80℃で保存した。

遺伝子学的診断

アライグマ血清 140 μl より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用い RNA を抽出した。また、先のウイルス分離実験の際、遠心分離により得られたダニ乳剤の珍渣から ISOGEN により RNA を抽出した。ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) 遺伝子の検出は TaqMan プローブを用いた、Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) により行った。プライマーおよびプローブは TBEV European subtype、Siberian subtype および Far eastern subtype 共通の非構造タンパク 1 (NS1) 領域をターゲットにしたものを使用した (Forward primer, 5'- TGGAYTTYAGACAGGAAYCAACACA-3'; Reverse primer, 5'- TCCAGAGACTYTGRCTCDGTGTGGA-3'; Probe, 5'-6-FAM-CCCATCACT/ZEN/CCWGTGTCAC-IBFQ-3') (Achazi K. *et al.* *J Virol Methods*. 2011)。PCR 反応には THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit (Toyobo) を用い、LightCycler 480 (Roche) にて解析を行った。得られた結果のうち、陽性であったものについては、その反応産物を 1.5%アガロースゲルにて 100V、30 分間電気泳動し、

増幅産物の確認を行った。併せて精製した増幅産物のシーケンス解析を行った。

血清学的診断

TBEV 特異的抗体を調べるため、中和試験 (FRNT: Focus reduction neutralization test) を行った。アライグマ血清は使用前、サーマルサイクラーにて 56℃、30 分間非働化し、0.22 μm フィルターでろ過滅菌した。2% FCS および抗菌薬を含む E-MEM にてアライグマ血清を 10~640 倍まで 2 倍階段希釈し、50 Focus formation unit (FFU) 量の TBEV Oshima 株または日本脳炎 (JEV) S982 株を含む等量のウイルス上清と混合し、37℃、1 時間反応させた。反応後の混合液 30 μl を 96 well プレートに単層培養した BHK-21 細胞に接種し、1 時間後に 1.25%メチルセルロース、2% FCS および抗菌薬を含む E-MEM、100 μl を重層した。感染細胞の染色法は以前の研究 (Uchida L., *et al.*, *Sci Rep*, 2014) に従った。得られたデータから 50%以上の Focus 減少を示す最大希釈倍数を算出し、中和抗体価 (FRNT₅₀) とした。

②成果

野外でのマダニ採集では、2 属、4 種、計 356 匹 (68 プール) のマダニが採集された。内訳としては、ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) 318 匹、シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) 32 匹、チマダニ属のマダニ (*Haemaphysalis flava*, *H. japonica*) 6 匹であった。一方、10 頭のアライグマでマダニの付着が確認され、計 32 匹が採集された。

上記の野外採集マダニ 350 匹 (68 プール) およびアライグマ付着マダニ 32 匹からウイルス分離を試みた結果、初回の分離でいくつかのサンプルに接種 1、2 日後 CPE が確認された。しかし、継代時には初回で見られたような CPE が消失した。CPE の見られたサンプルについて、上清 140 μl から RNA を抽出し TBEV に対する qRT-PCR を実施したが、ウイルス RNA は確認されなかった。併せて、継代後の細胞を固定し、抗フラビウイルスモノクローナル抗体 (12D11/7E8) で TBEV 抗原の染色を試みたが、有意と思われる感染細胞は認められなかった。CPE はマダニのプール数が多いほど強く見られる傾向があり、以上の結果を勘案するに、今回見られた CPE はマダニ成分に伴う細胞のストレス性の反応であったと考えられる。

マダニからの TBEV 遺伝子検出では、qRT-PCR で低い Ct 値を示したものが 26 プール確認された。これらに対し、Real time PCR 増幅産物を電気泳動で確認し、予想増幅産物長 (99 bp) 付近にバンドが見られたものについてシーケンス解析を行った。その結果、2 プールで TBEV 由来の配列が確認された (Minimum infection rate 0.57%)。一方、残りの 24 プールに関しては、qRT-PCR で TBEV 遺伝子の存在が示唆されたものの、シーケンスによる配列の確認はできなかった。上述の 2 プールに対し、ウイルスエンベロープ領域の増幅を試みたが増幅は見られなかった。2 プールのうち、一方はヤマトマダニから、もう一方はシュルツェマダニから成る。これまで北海道ではヤマトマダニから TBEV が分離されており (Takeda T, *et al.*, *J Med Entomol.*, 1998)、本マダニが国内での TBEV 感染環に関わると考えられる。今後、本地域に分布する TBEV の遺伝的背景を明らかにするためにも、継続して野外マダニからのウイルス分離を進める必要がある。

アライグマ血清の中和試験の結果、28 頭中 3 頭 (10.7%) で TBEV に対し 40 倍以上の中和抗体価が確認された (表)。これらは近縁の JEV を中和しなかったことから、TBEV

特異的中和抗体を有すると考えられる。一方、今回アライグマ血清から TBEV 遺伝子は検出されず、これらのアライグマがウイルス血症を起こしている可能性は低いと考えられる。これまで、アライグマの TBEV 感染に関する海外からの情報はなく、国内でも北海道大学が昨年インターネットに掲載した情報のみであり詳細は明らかとなっていない。

(<https://www.shinrinbunka.com/news/pickup/7545.html>)

今回の共同研究において、札幌近郊の道立公園にも TBEV が分布すること、またアライグマが TBEV に感染することが明らかとなった。北海道では、1990 年代初頭に十数頭であったアライグマの捕獲頭数は 2015 年度には 10,000 頭を超え、生息数の増加と生息域の拡大が続いている。今後、より広範な地域を調査することに加え、アライグマからの TBEV 分離、遺伝子学的系統解析を行うことで、北海道における TBEV の感染環の解明と、人への感染リスクの評価に繋がると考えられる。

表 TBEV および JEV に対するアライグマ血清の中和抗体価

Sample ID	FRNT ₅₀		Sample ID	FRNT ₅₀	
	TBEV	JEV		TBEV	JEV
15901	<10	<10	16176	<10	<10
16003	<10	<10	16337	<10	<10
16004	<10	<10	16338	<10	<10
16006	<10	<10	16361	<10	<10
16017	<10	20	16362	320	<10
16018	<10	<10	16363	<10	<10
16029	<10	<10	16370	<10	<10
16061	<10	<10	16413	<10	<10
16093	<10	<10	16416	40	<10
16094	320	<10	16425	<10	<10
16120	<10	<10	16427	<10	<10
16134	<10	<10	16447	<10	<10
16160	<10	<10	16521	<10	<10
16175	<10	<10	16527	<10	<10

③成果の公表

学術論文

Survey of tick-borne zoonotic viruses in wild deer in Hokkaido, Japan., Uchida L., Hayasaka D., Ngwe Tun M.M., Morita K., Muramatsu Y., Hagiwara K., *J. Vet. Med. Sci.* 2018 (in press) (昨年度の採択テーマであるが、継続テーマであるため記載)

口頭発表

北海道のアライグマにおけるダニ媒介性脳炎ウイルス疫学調査、戸田有恒、第 26 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー (SADI)、2018 年 6 月、函館

6. 自己評価

2016 年、2017 年と北海道ではダニ媒介性脳炎の患者が相次いで 3 例報告された。これまで国内ではマダニ、野生小型げっ歯類、犬、馬でウイルス分離、陽性抗体が報告されてきたが、昨年度、我々は貴研究所との共同研究において新たに野生のエゾシカでも TBEV 感染が起きていることを明らかにした。一方、これまで中型哺乳類におけるウイルス感染に関する知見は無く、本共同研究において野生のアライグマの間でも TBEV 感染が起きていること、また札幌近郊の道立公園に TBEV が分布することを明らかにした。他方で本研究で採集されたマダニのサンプル数は限られており、採集地域も 1 カ所のみであったことから、今後より広範な地域の調査が必要と思われる。併せて、北海道にはエゾシカやアライグマのみならず多様な野生動物が生息しており、自然界における TBEV の感染環を理解するため、また人への感染リスクを評価するため、他の野生動物の血清学的調査を継続していく必要がある。現在、我々は本研究で得られた知見を基に、12S rRNA 塩基配列に基づくマダニの吸血宿主の特定とウイルス保有の関連性の調査を進めている。

7. 達成度（何れかに○）

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

評価を下した理由

当初の目標である、中型哺乳類における TBEV 感染状況を明らかにする、という点においては一定の成果が得られた。また、次の研究に進めるための足掛かりとなるデータを得られた、という点でも本共同研究は非常に有意義なものとなった。一方、長崎県で捕獲された野生動物との比較を行う、という目標は時間の都合上、達成されなかった。以上を勘案し、「不満は残るが一応の成果を挙げられた」と判断した。

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナムにおける眼感染症の病因

（肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV）導入前の評価）

課題番号：29－一般－7

2. 代 表 者：（長崎大学病院眼科・講師）

上松聖典

（熱帯学研究所小児感染症学分野・教授） 吉田レイミント

（熱帯学研究所小児感染症学分野・助教） 樋泉 道子

（長崎大学病院眼科・助教）

ヤッセル ヘルミー モハメド

（長崎大学病院眼科・医員）

植木 亮太郎

（長崎大学病院眼科・医員）

井上 大輔

3. 決 定 額： 600千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

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

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

②研究内容

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

2. 角結膜炎の臨床疫学的特徴、起因菌・ウイルス検査：カンホア総合病院眼科外来における1か月の全角結膜炎受診者を前方視的に登録し、臨床疫学的特徴を明らかにし、結膜ぬぐい液から起因菌・ウイルスを同定する。起因病原体の同定はカンホア総合病院検査科、長崎大学熱帯医学研究所と協力し、細菌培養、PCR、肺炎球菌血清型の同定をおこなう。
3. 健康小児の角結膜常在肺炎球菌の保菌率：PCV trialにおいてPCV投与前に2歳未満小児を対象に鼻咽頭ぬぐい液を採取し、肺炎球菌保菌率とその量の測定がおこなわれる。その機会を利用し同じ児らより結膜ぬぐい液を採取、細菌培養及びPCRにより結膜細菌叢、肺炎球菌保菌率・保菌量及びその血清型を同定する。対象数は、1、2の結果によりサンプルサイズ計算を行う予定であるが、およそ300人を予定している。

③予想される成果

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

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

②成果（結果+考察）

- 1) カンホア総合病院眼科における2014~2015年の2年間の外来患者は30,008人であった。そのうちICD10コードで細菌性結膜炎が疑われる患者は、4,616人であった。また、角膜潰瘍の病名のある患者は381人であった。カンホア総合病院の眼科医師への聞き取り調査により、ICD10コードは必ずしも患者

の病態を正確に反映しているとは限らないことが確認され、この調査のみで、地域における細菌性結膜炎および角膜潰瘍の正確な有病率を推定することは困難であった。しかし外来受診者の中での細菌性結膜炎および角膜潰瘍のおおよその患者数を把握することができた。

- 2) 2016 年 10 月から 1 年間で 720 症例の情報及び検体を収集した。現在グラム染色、培養および PCR にて病原微生物を解析中である。
- 3) 2016 年 10 月から 11 月に PCV 接種を受けた 24 か月未満の児に対して結膜囊のぬぐい液採取を行い、培養にて肺炎球菌が 11.4%で検出された。多重ロジスティック解析では、低体重、保育園通園、および鼻咽頭の肺炎球菌陽性が結膜囊肺炎球菌の検出と関連していた。今後 PCR にて肺炎球菌の Serotype や結膜細菌叢を調査する予定である。

③成果の公表

結膜細菌叢における肺炎球菌の研究成果について論文執筆中であり、下記学会で発表予定である。

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

6. 自己評価

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

角結膜炎の臨床疫学的特徴、起因菌・ウイルス検査の調査では、カンホア総合病院眼科における調査が行われた。最終的には多数例の検体が集まり、現在グラム染色、培養およびPCRにて病原微生物を解析中である。

健康小児の角結膜炎常在肺炎球菌の保菌率の調査でも、十分な症例数を得ることができた。肺炎球菌の保菌率を解析し、肺炎球菌の保菌に関与する因子を見出した。PCV導入前の東南アジアの地域におけるこのような研究は初めてであり、新たな知見を得ることができた。PCV導入後に同様の調査をすることで、眼科におけるPCVの効果を評価できる可能性が高まった。

7. 達成度（何れかに○）

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

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：FRETプローブを活用した抗ラッサウイルス薬の創出

課題番号：29－ 一般 －8

2. 代表者：水谷龍明（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・助教）

共同研究者：大場雄介（北海道大学大学院医学研究科・教授）

3. 決定額： 350 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

②研究内容

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

①FRET プローブを利用した HTS による VLP 放出阻害薬の同定

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

②新規 FRET プローブを用いた細胞生物学的解析と応用

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

③ヒット化合物を用いた高次スクリーニングの実施及びリード化合物の同定

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

③予想される成果

LASV に対する効果的な薬剤は、現在のところ人類の手元にはない。核酸類縁体であるリバビリンが治療に用いられるが、副作用が大きいことに加え、感染初期における静脈内投与で限定的に効果があるため、より有効な治療法の確立が強く望まれている。これまでのところはアフリカ西南部に局限した感染症であるが、2014 年に発生したエボラウイルスのアウトブレイクのように、LASV 感染症もグローバルリスクとして認識すべき重要課題である。実際、LASV は天然痘を除き日本国内に侵入してきた唯一の BSL-4 病原体である (1987 年)。LASV が分類されるアレナウイルス科は、ほぼ三年に一度新種のウイルスが発見され、今後も人類の脅威となる新種の致死性ウイルスの出現が危惧されている。また、アレナウイルス科の細胞侵入機序 (Entry) は多岐に渡るために、Entry を阻害する薬剤は、たとえ開発できたとしても汎用性が低い。一方で、本研究で抗ウイルス作用の標的とする Z 蛋白質は、アレナウイルス科間で類似しており、新種のアレナウイルスでも保持される可能性が非常に高い。すなわち、本研究から導出される Z 重合阻害効果を有する化合物は、**アレナウイルス全般に対する抗ウイルス治療薬**の有用なリード化合物となることが期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

FRET プローブ (Probe-X; 図 1) を用いた化合物スクリーニング

平成 28 年度に開発した Probe-X 発現プラスミドを、FreeStyle293 細胞に常法でトランスフェクションし、蛍光プローブ一過性発現細胞ライセートを調製した。スクリーニング対象の化合物（最終濃度 10 μ M）と上記ライセートを混合し、FRET 効率（430nm 励起における 480nm 及び 520nm 蛍光の強度比）を測定し、各化合物の重合阻害活性を算出した（SoftMax Pro, Molecular Devices）。

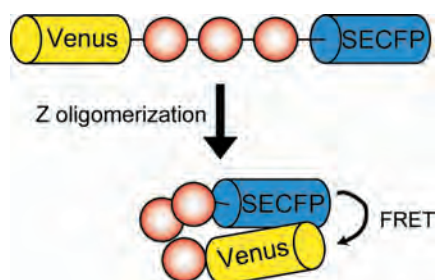


図 1. Probe-X : Z タンパク質の重合化をモニターする FRET プローブ

Z 蛋白質の自己重合化を利用して、重合状態に生じる FRET シグナルを検出する新規蛍光プローブを作製した（平成 27-28 年度成果）。

ヒット化合物のウイルス産生抑制効果

平成 28 年度に得られたヒット化合物のウイルス産生抑制は、LCMV を利用して検証した。はじめに、293T 細胞に対して LCMV を感染させたのち、ヒット化合物、又は DMSO で 24 時間処理した。処理した細胞の培養上清に含まれるウイルス感染価を、Vero 細胞を用いて定量化した。LCMV の感染サイクルは 12-18 時間程度であるため、阻害剤処理時間（24 時間）において、2 次感染は生じないと考えられる。また上記実験と同時に、各化合物の細胞毒性についても Cell-Titer Glo (Promega) のプロトコルに従って、化合物処理しただけのウイルス非感染細胞を用いて算出した。

②成果（結果＋考察）

ヒット化合物及び周辺化合物の阻害活性評価

前年度に得られたヒット化合物 4 種類の追加合成を行うとともに、それぞれの再現性、濃度依存性阻害活性を確認したところ、すべての化合物において再現性が得られた（図 2）。成果下段に記載したウイルス産生に対する抑制効果は、化合物#4 についてのみ観察されたことから、化合物#4 の類縁構造化合物 11 種類を用意し、それらの阻害活性を Probe-X を利用し、FRET 効率を基にした阻害活性を評価した。図 3 に示すように、試験に用いた 11 種の化合物すべてについて有意な FRET 阻害活性は認められなかった。市販の類縁構造体化合物を使用したため、高い構造類似性が準備できなつたと考えられる。今後は、合成化学の技術基盤を導入し、精密な類似構造体の合成・準備を図り、構造活性相関の算出を目指す。

図 2. ヒット化合物の FRET 阻害活性

実験方法にあるように、Probe-X 発現細胞溶解液を利用した化合物活性を示す。化合物#1~#4 いずれについても、コントロール阻害活性（EDTA 処理）よりも高い FRET 抑制効果を示している。

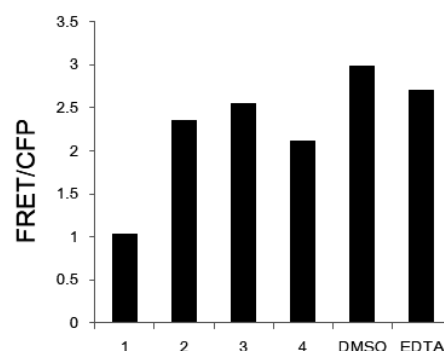
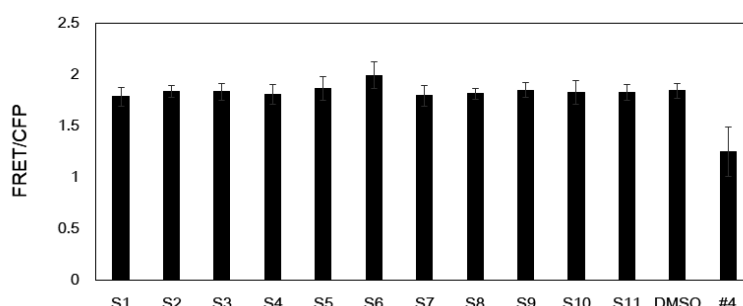


図 3. ヒット化合物#4 類縁化合物の活性評価

実験方法にあるように、Probe-X 発現細胞溶解液を利用した化合物#4 及びその類縁構造化合物 (S1~S11) の活性を提示した。化合物#4 を除くいずれの類縁化合物について、有意な FRET 抑制効果は観察されなかった。



ヒット化合物による LCMV 産生の抑制効果

はじめに、化合物#1~#4 処理における細胞毒性を計測した。培養液中の化合物濃度が 50 μ M 時の生存率は、#1 : 100%, #2 : 50%, #3 : 90%, #4 : 80%程度であったが、化合物濃度を 20 μ M まで下げると、上記のような細胞毒性がキャンセルされた。化合物濃度 20 μ M におけるウイルス産生抑制を評価したところ、4 種類の化合物すべてについて、ウイルスの産生抑制が見出された（図 4）。再現性実験から、化合物#4 がマイクロモラーオーダーながらも、ウイルス産生を有意に抑制することがわかった（図 5）。化合物#4 は、細胞分裂にクリティカルな役割を持つある種のセリンスレオニンキナーゼ阻害剤として知られているが、詳細な作用機序は明らかでない。今後は、当該キナーゼのウイルス感染における機能にも注視しつつ、ウイルス産生を効果的に抑える化合物開発を進める。

図 4. ヒット化合物によるウイルス産生抑制評価
DMSO 又は化合物 4 種類(#1-#4)を処理した LCMV 感染 293T 細胞から放出された LCMV 力価を計測した。化合物#1,#3 については有意な抑制効果は検出されなかった。化合物#2 は、1/2log、化合物#4 は、1log オーダーのウイルス産生抑制を示した。

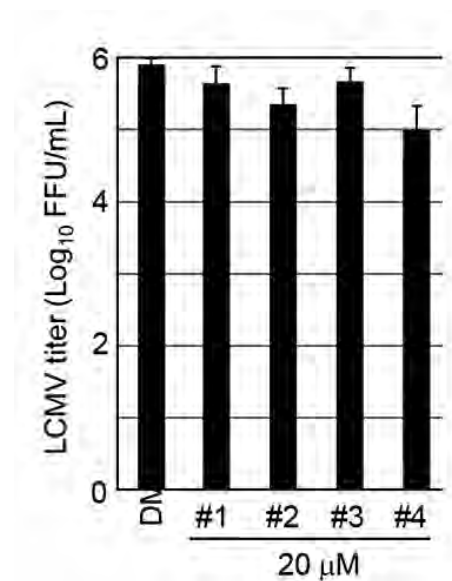
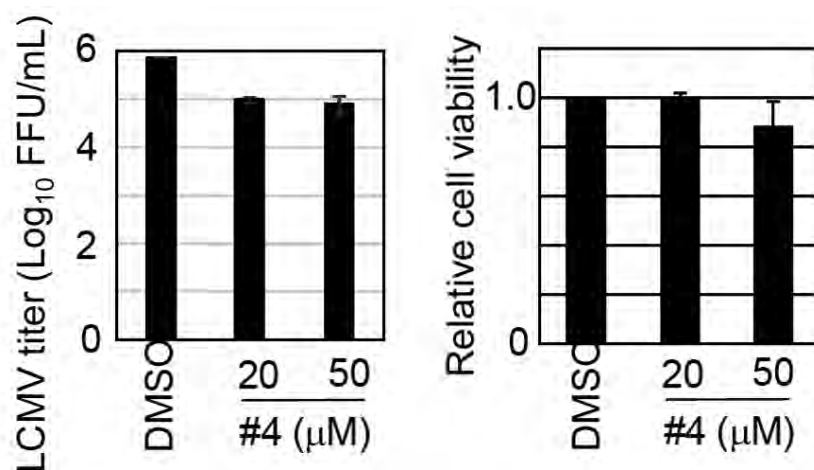


図 5. #4 化合物によるウイルス産生抑制と細胞毒性の評価

DMSO 又は化合物#4 にて処理した LCMV 感染細胞から放出されたウイルス力価（左）及び細胞毒性（右）を示した。20-50μM において、1 オーダー近いウイルス産生抑制を示す一方で、有意な細胞毒性を示さなかった。



③成果の公表
なし

6. 自己評価

目的の一つとして掲げた **FRET** プローブを利用した二次スクリーニングにおいて、ウイルス産生抑制が確認できたことは、一定の成果である。今後は、構造類縁化合物についてさらに大規模なスクリーニングを行うことで、構造活性相関を見出し、より **effective** な阻害薬の開発を目指す。従って、不満は残るが一応の成果を挙げられたものと考えられる。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：

課題番号：29－ 一般 － 9

2. 代 表 者：（所属・職名） 西真如（京都大学・特定准教授）

共同研究者：（所属・職名） 佐藤靖明（大阪産業大学・准教授）

波佐間逸博（長崎大学・准教授）

坂井紀公子（京都大学・特任助教）

武井弥生（上智大学・准教授）

3. 決 定 額：

600千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ウガンダ北部のアチワ川流域では、今世紀に入って重いてんかん症状や知的障害を伴う「うなづき症候群」（Nodding Syndrome；以下 NS）が流行し、5-15 歳の子どもを中心に、これまでに 3,000 を超える症例が報告されている。NS 患者の生活の質を確保するには、適切な診断と治療に加えて、患者家族の負担を軽減したり、病に対するスティグマに対処するなど、多面的なケアの枠組みが必要とされるが、医療資源の限られたアフリカで、患者とその家族が適切な支援を受けることは容易ではない。本共同研究の目的は、NS 患者とその家族の生活の質を維持するため、地域社会の関与にもとづくケアのモデルを構築することである。本研究では、NS の病因・病態の究明に関わる熱研や現地の研究者の協力を得て、NS 患者とその家族のケアに関する現地調査を行う。そしてコミュニティ・ヘルス・ワーカーや村落住民といった地域人材を活用し、NS 患者に対して継続的な治療と支援を提供するための仕組みについて検討する。

②研究内容

NS 流行地であり、てんかんの有病率が非常に高いことが知られているウガンダ北部のアチワ川流域農村において、地域社会の関与にもとづくケアの実践的なモデル構築に関する現地調査を行う。主要な調査地として、申請者らがこれまで継続的に調査を実施してきたグル県ラクエラ村を予定している。現地調査では、NS 患者とその家族が直面する治療および生活上の困難について聞き取りと観察を行う。また NS 患者の治療アドヒアランスを確保し、患者とその家族の生活の質を向上させるための見まもりケアに、コミュニティ・ヘルス・ワーカーや地域住民が積極的に参加しうる条件について、NS 患者を抱えた家族や保健当局等の関係者と討論をおこなう。さらに、ラクエラ村に居住する若者 3 名の協力を得て、NS 患者に対する見まもりを各々 14 日間にわたって実践してもらう。以上のことから得られた知見をもとに、NS 患者に対する地域見まもりケアの実践的なモデルを検討する。

③予想される成果

本研究が目指す「地域社会の関与にもとづくケアの実践的なモデル構築」は、ウガンダの医療政策立案者および関係分野の研究者が十分な注意を払ってこなかった課題である。本研究の成果は、ウガンダ北部の農村で生活する NS 患者とその家族の治療アドヒアランスの確保と生活の質の向上に資するものである。また NS 患者の困難の多くは、てんかん症状およびそれと関連した知的障害に起因するものであることから、本研究の成果は、広くアフリカの農村で暮らすてんかん患者とその家族の生活の質の向上のために応用することが可能である。なお本研究は、別資金で濱野真二郎教授らが行う NS の病因・病態究明を目的とした研究を補完して、統合的な NS 対策の立案に貢献するものである。

5. 実施報告：

① 研究材料・方法・手続き

グル県ラクエラ村に居住する若者 4 名の協力を得て、それぞれ 1 名（合計 4 名）の NS 患者に対して 10 日間の見まもり調査をおこなった。対象患者は村内に居住する青年期の男女（17 才女性、25 才女性、20 才男性、21 才男性）4 名であり、いずれも農業を主な生計手段とする世帯に属している。各人とも抗てんかん薬を服薬中であるが、調査期間中にそれぞれ複数回のてんかん発作が報告されている。（事前の調査で、ラクエラ村の NS 患者におけるてんかん発作は幻視などの前兆を伴い、続いて意識の消失や四肢のけいれんが起きる場合が多いこと、一部の患者では突発的に歩き出すなどの特殊な行動を取ることがわかっている。）4 名とも一定の知的障害があり、同じ年齢の健康な男女と比較して、作業の動作が緩慢であったり、複雑な作業をこなすのが苦手である。

対象患者と同じ村内で生活する若者に協力を依頼したのは、外部からの調査者が見落としや誤解する恐れのある日常生活の文脈を踏まえた報告を期待したからである。男性患者には男性、女性患者には女性の協力者が見まもりをおこなった。見まもりは 2017 年 9 月上旬から中旬の連続した 10 日間にわたって実施し、協力者は昼間の 6 時間にわたって対象の患者を観察、その活動を記録するとともに、患者が周囲の者あるいは協力者自身から何らかの助力を得た場合には、その内容を記録した。また協力者は、聞き取りによって患者の服薬状況や発作の有無を記録した。協力者は、以上の内容を予め配布しておいた調査シートに英語あるいはアチョリ語で記入した。アチョリ語で記入された内容は、協力者のうち英語の堪能な者に翻訳を依頼した。

② 成果（結果＋考察）

結果：

対象 NS 患者の生計労働および家事労働への貢献、社会活動や経済活動への参加の状況が明らかになった。生計労働および家事労働への貢献については、水くみに従事したのが 4 例中 4 例、家畜の世話、食事の準備、家屋の清掃、衣服の洗濯に従事したのがそれぞれ 3 例、作物の収穫、畑の除草、薪集め、食器洗いに従事したのがそれぞれ 2 例であった。このほか、家族がおこなう木炭の製造と販売を手伝った例、トイレづくりや家の修繕を手伝った例などが報告された。これらの作業の中には、「屋敷内にトイレを建設していた家族の指図で建材を運んだ」とか、「母の指図でキャッサバの皮むきをした」というように、周囲

の者に言われるがままに単純作業を繰り返したと見られる例も多かったが、「小家畜を集め、水場まで連れて行き、水を飲ませて戻ってきた」というように、一連の作業を自律的にこなしたと見られる例もあった。

また興味深い例として、患者が食事の配膳を手伝った例、幼児の子守りをした例が1例ずつあった。NS流行地では過去、NSが患者から周囲の者に感染するのではないかという恐れから、患者と食事を共にしないとか、患者から子どもを遠ざけるという報告があったが、少なくとも本研究の対象患者について言えば、そのようなスティグマに晒されているとは考えにくい。なお子守りの例は、具体的には世帯の健康な大人が畑作業などで不在の際に、患者が同じ世帯に属する幼児とともに留守番をし、その間に幼児たちが危険な行動をしないよう、気を配るというような内容であった。

社会活動や経済活動への参加については、マーケットに出かけたり、近隣の採石場で賃労働に従事した例があったほか、近隣の小学校におけるボランティア活動（小学校が所有する畑の収穫作業）や、地域のマイクロクレジット活動に参加した例があった。またサッカーやカードゲームに参加したり、友人とおしゃべりする様子も報告された。この結果からは、対象患者が自ら除くする世帯の範囲を超え、様々な分野の社会経済活動に参加していることが見て取れる。

加えて、これらの作業や活動に従事する患者が、周囲の大人や子どもから頻繁に助力を得ていることも明らかになった。特に水くみは、4例とも頻繁におこなっていた家事労働であるが、集落からやや離れた位置にある手押しポンプ井戸から20リットル入りの容器に水をくみ、自らの手で家まで持ち帰る必要があるため、かなりの重労働となる。たまたま周囲にいた若者や子どもたちが、患者のために重い手押しポンプを押したり、水を入れた容器を持ち帰るのを手伝ったりする様子が報告された。

考察：

アフリカのてんかん患者については、これまで疫学的研究や薬物治療の効果についての研究、あるいは病いの解釈やスティグマに関する研究がおこなわれてきたが、患者の日常生活とりわけ家計活動への貢献や地域の社会活動への参加に着目して記述した研究は見あたらない。本研究では、対象のNS患者が幅広い生計労働および家事労働に貢献していることが明らかになった。また、さまざまな分野の社会経済活動に参加している様子も報告された。重いてんかん症状や知的障害に起因する活動上の制約にも関わらず、NS患者が一定の社会経済的な参加を果たし、家族や地域住民の支援を受けて生活していることが示唆された。他方で、患者が従事する作業の中には、洗濯や水くみのように発作時に溺死の危険があるものや、調理のように重度の火傷を負う恐れのあるものが含まれている。患者の身体の安全を確保することは重要だが、同時に患者が家事労働に貢献する機会を奪わないような工夫が必要である。

NS患者のように重いてんかん発作と知的障害を伴うてんかん患者の生活の質を確保するためには、医療介入に加えて患者の日常生活に対する支援が必要となる。過去の流行期に発症した患者の多くは青年期を迎えており、彼らが家計への貢献や社会経済活動への参加をどこまで果たし、自立した生活をどこまで達成できるのかは、患者本人たちにとっても、その家族にとっても切実な問題である。本研究の結果、NS患者のための「地域社会の

関与にもとづくケアの実践的なモデル構築」にあたっては、患者の身体の安全を確保すると同時に、患者の家事労働への貢献や社会経済生活への参加を促すことで、患者の生活の質を持続的に確保する手法が有効であることが強く示唆された。

③成果の公表

2018 年の熱帯医学会および 2019 年の African Epilepsy Congress において本研究の成果を公表する予定である。

6. 自己評価

対象患者の家計労働への貢献や社会生活への参加の状況が明らかになったことで、「地域社会の関与にもとづくケアの実践的なモデル構築」に寄与する重要な情報を得ることができた。なお当初の計画では、3人の患者についてそれぞれ14日間の見まもりをおこなう予定であったが、4人の患者についてそれぞれ10日間の見まもりに変更した。これは第一に、男性患者と女性患者で日常生活のルーチンが大きく異なることが予想されたので、対象患者を男女同数とするためである。第二に、協力者との事前の協議で、10日間の見まもりで得られるデータと、14日間の見まもりで得られるデータとの間に、あまり質的な違いがないことが予想されたからである。

NS患者は小児期に発症する例が多いこと、また重度のてんかん症状に加えて、多くは知的障害を伴うことから、患者が日常生活において家計に貢献したり、社会生活に参加するような局面はこれまで想定されてこなかった。しかしウガンダ北部におけるNS流行の始まりから10年近くを経て、患者の多くは青年期を迎えており、彼らが自立した生活をどの程度まで達成できるのか、また彼らの社会経済生活への参加をどう支援したら良いのかは、患者本人たちにとっても、その家族にとっても切実な問題である。本研究は、限られた事例についての研究ではあるが、患者の日常生活と社会経済参加に関するユニークな知見を得ることができた。以上のことから、本研究は予想通りの成果を上げることができたと判断できる。

7. 達成度（何れかに○）

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

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：メタ個体群動態に基づいたネットワーク上の感染症流行の定量的解析

課題番号：29- 一般 -10

2. 代表者：（所属・職名）

岩見真吾 九州大学大学院理学研究院生物科学部門・准教授

共同研究者：（所属・職名）

山口諒 首都大学東京理工学研究科・日本学術振興会特別研究員 PD

布野孝明 九州大学大学院システム生命科学府・博士前期課程

中谷友樹 東北大学大学院環境科学研究科・教授

守田智 静岡大学大学院総合科学技術研究科工学専攻・教授

Marko Jusup 東京工業大学科学技術創成研究院・特任助教

3. 決定額： 450千円

4. 申請時書類より

①研究目的

我々が住んでいる世界の距離感や移動力の個人差が感染症の伝播に大きな影響を与えることがある。1998年を契機とする複雑ネットワークの研究の発展に伴いネットワーク科学と感染症疫学の融合研究が多く展開され

“ネットワーク上の感染症流行動態”に関する知見が蓄積されてきた。例えば、空間的に離れた場所（e.g. 東京とロンドン）であっても高速移動手段による遠距離ジャンプが可能であるスモールワールド・ネットワーク

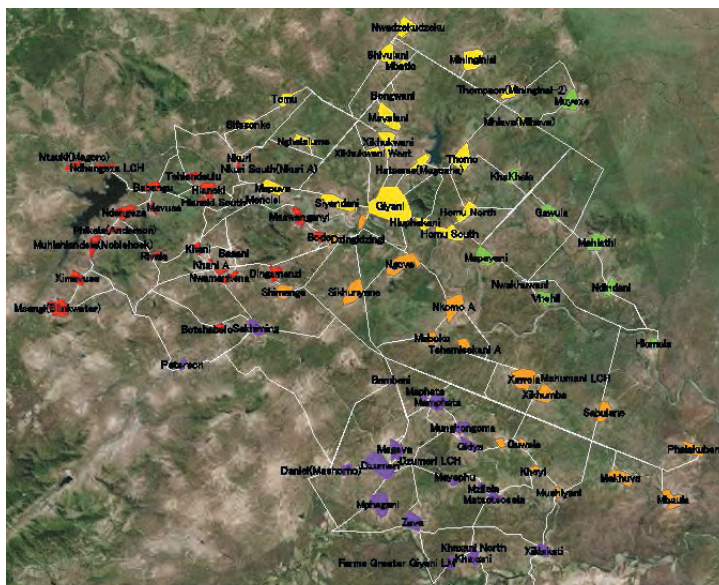


図1. Greater Giyani地域の村間ネットワーク

上において、感染症は急速に伝播する。H1N1 新型インフルエンザや SARS が航空ネットワークを介して世界中に広まったことがこれらの枠組みで説明された（D. Brockmann et al., Science, 2013）。しかし、感染症の流行は移動手段の発達した都市部のみで起こるとは限らない。長崎大学が SATREPS 事業を展開している南アフリカ共和国のリンボポ州に位置する Greater Giyani 地域は 95 個の村で構成されており、マラリアの主な流行地域となっている（図1）。毎年、乾季が終わり、蚊の活動が活発になり始める 8 月頃からマラリ

ア報告数が増加する。“リザーバー”と呼ばれる無症候感染者が蚊に吸血されることで蚊がマラリアに感染し、さらに感染蚊が人を吸血すればマラリアは人に伝播される。この感染サイクルが継続的に維持されれば流行が始まる。そして、異なる村で多発的にマラリア報告数が伸び、Greater Giyani 地域全体の報告数は翌年 2 月頃にピークを迎える。マラリアを媒介するハマダラカ自体の飛翔能力は限定的であることより、感染者の村から村への移動が Greater Giyani 地域のマラリア流行の重要な要因であると推測されている（しかし実証されてはいない）。航空機や鉄道・船が著しく発達しグローバル化している都市部とは大きく異なり、本地域では村間を行き来する“乗り合いバス”により感染者が移動する。すなわち、村と村をつなぐ道路網が構築するネットワーク上（図 1 の白線）をマラリア感染症が伝播・流行しているのである。この様な顕著なスモールワールド性を持たないネットワーク上の感染症流行を定量的に扱うためには、従来とは異なる新たな理論的なアプローチが必要とされている。

本研究では、村落部がもつネットワーク上での感染症流行動態を定量的に理解するための理論的枠組みを構築し、実際の流行データを定量的に解析していく（後述）。センサスデータ、公共交通データ、マラリアデータなど十分な情報のある Greater Giyani 地域をケーススタディーとして『メタ個体群動態に基づいたネットワーク上の感染症流行の定量的解析』を展開する。また、研究期間を通じて開発されたノウハウを長崎大学が展開する SATREPS 事業による感染症警報システムへ応用することで、解析基盤と共同研究体制の整備も進めていく。

②研究内容

研究期間の前半では、主に統計的手法を駆使したネットワーク上のマラリア報告数を定量的に解析する。そして、後半ではデータ解析から得られた知見に基づいたメタ個体群動態の数理モデルおよびシミュレーションを構築する。年度の前半・後半に分けた具体的な計画を以下に示す：

前半：2017 年 4 月 1 日～2017 年 9 月 30 日

Greater Giyani 地域の道路網によるネットワーク情報を考慮して行った 18 年間の総マラリア報告数に対する（村と村の距離に重みが付いた）空間統計解析を行う。マラリア報告数が統計的に有意に高い値（低い値）をもつ空間クラスターであることを示していく。また、報告数に有意差がない村も特定する。解析から特定の村の周辺がホットスポットあるいはコールドスポットである可能性を分析する。研究期間の前半では、上述したネットワークの定量的解析や検討的に実施している空間統計解析を完了させることに加えて、各村のマラリア報告数と発生時期や人口サイズの相関などを統計的に解析していく（布野/中谷/岩見）。研究が進捗した場合、感染症流行の指標である基本再生産数に基づいた 95 個の各村のリスクマップを作成することも予定している。

後半：2017 年 10 月 1 日～2018 年 3 月 31 日

前半で行った空間統計解析から抽出されたマラリア感染動態の特徴量（ホットスポットなど）を再現するコンピュータシミュレーションを開発し、その根底にあるメカニズムを

明らかにする。まずは、基本的な Ross-Macdonald のマラリアモデルをベースとして 95 個の村を道路網で連結させたメタ個体群モデルを構築する（布野/守田/岩見）。特に感染者の村から村への移動は確率的に行われるように実装し、Greater Giyani 地域におけるマラリア伝播をシミュレートする。そして Approximate Bayesian Computation (ABC) を含む最新のパラメータ推定報を駆使して、現実的なパラメータ値を探索する（布野/山口/岩見）。これらの解析を通して、感染者の村から村への移動が Greater Giyani 地域のマラリア流行に与えている影響の程度を分析する。また、網羅的なコンピュータシミュレーションから、マラリアコントロールを実現するためのロバストなシナリオ（村への殺虫剤の散布順序や交通規制すべき道路）を提案していく。

③予想される成果

本研究では、数理生物学・物理学・地理学・昆虫学の専門家が集い、相互発展的に顕著なスモールワールド性を持たないネットワーク上の感染症流行動態を定量的に理解するための理論的枠組みを構築し、Greater Giyani 地域におけるマラリア流行データを定量的に分析する。そして、生物学的な妥当性が十分に担保され、かつ、昆虫媒介性の感染症を対象としたシミュレーションを構築し、長崎大学が目指す警報システムを基にしたマラリアコントロールの基礎を確立するために本研究成果を活用していく。以下、本研究を遂行することで期待される成果を列挙する：

- ・ ネットワーク上のマラリア流行データを空間統計的手法で解析できるようになる
- ・ 複雑ネットワークの枠組みで取り扱えない感染症の流行動態を解析できるようになる
- ・ 殺虫剤の散布地域の優先度や交通規制すべき道路などが明らかになる
- ・ 異なる地域や異なる感染症に対する事例への応用が可能になる

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

ArcGISを用いて95個の村同士のつなぐ道路を抽出することで隣接行列を作成した。図2の黒成分は村同士が道路でつながっていることを意味している。これらの道路網ネットワークの隣接行列を分析する事で、推移性、次数相関、平均経路長、平均次数および様々な中心性を解析した。また、Greater Giyani地域の道路網によるネットワーク情報を考慮して18年間の各年度の総マラリア報告数に対する（村と村の距離に重みが付いた）空間統計解析を行った。具体的には、任意の村間の距離をユークリッド距離で定義するのではなく、ネットワーク上の距離として定義した距離行列として構築し、Anselin Local Moran's I statisticを計算する事で空間自己相関を分析した。

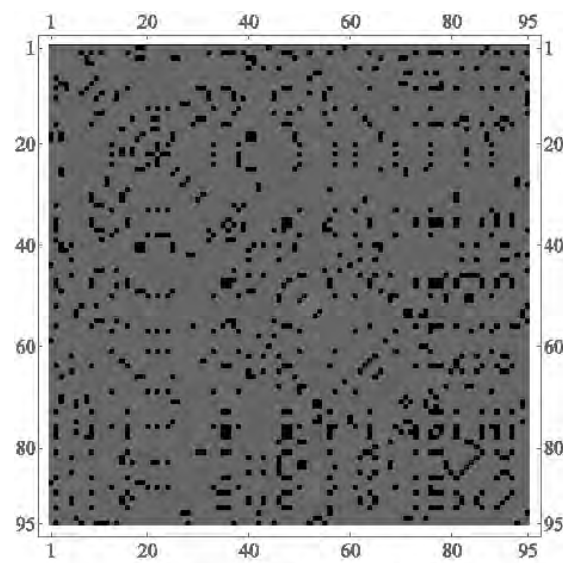


図2.村をつなぐ道路網の隣接行列

②成果（結果＋考察）

Greater Giyani地域の道路網ネットワークの隣接行列を分析した結果、推移性=0.66、次数相関=0.37、平均経路長=3.24、平均次数=9.22である事が分かった。これらの値は、2次元平面上のネットワーク（e.g. 道路網や鉄道網）がもつそれらの典型的な値である事が判明した。また、次数中心性、媒介中心性、近接中心性、固有ベクトル中心性を分析し

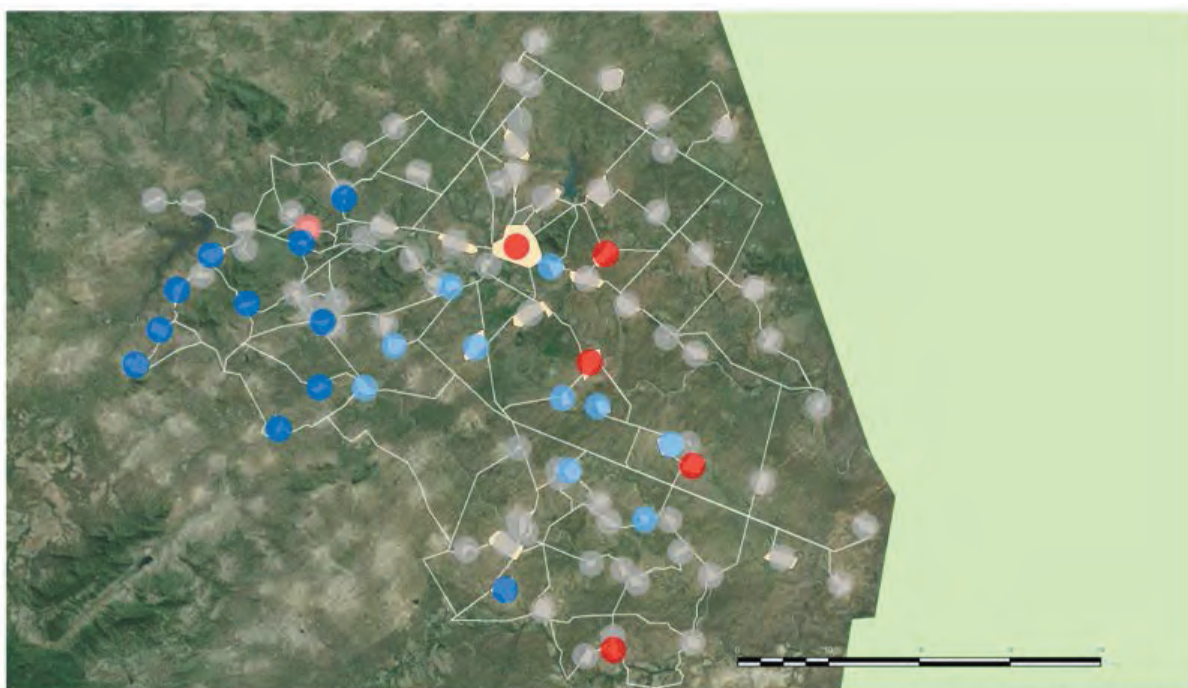


図3. ある年度の総マラリア報告数を用いた空間自己相関解析

た結果、いずれの中心性においても **Sabulane** という村が最も高かった。

次に、ネットワーク上の距離を考慮して、18年間にわたる各年度の総マラリア報告数の空間自己相関解析を行った。興味深い事に、マラリア報告数が周辺の村と比較した場合、統計的に有意に高い村がクルーガー国立公園の付近に集中的に分布している事が判明した(図3)。すなわち、マラリア発生のホットスポットがクルーガー国立公園の周辺の村にある事が推測される。一方で、国立公園から離れた場所では、マラリア報告数が周辺の村と比較した場合、統計的に有意に低い村が分布している事(コールドスポット)も分かった。これは、国立公園付近ではマラリア媒介昆虫である蚊の繁殖地が多く形成されるために、その個体密度が多くなる事が原因であると推測される。

今後は、ネットワーク分析の結果がマラリア報告数とどのような相関があるのか?、すなわち、**Greater Giyani** 地域のマラリア流行動態がネットワークの意味で説明できるのかを分析する事に加えて、各村における媒介昆虫の個体密度を調査する事で、より精密な解析を進めることが重要である。また、理想的には、各年度において、例えば月毎の総マラリア報告数を用いた空間自己相関解析を行いたかったが、この場合、データ数が不足する事より統計的な有意差を検出する事ができなかった。データ数の拡充は今後の大きな課題の一つであると考えている。

③成果の公表

関連した研究成果は以下の学会・研究会で公表した。

・2018年3月16日(金) 9:00-12:00

第65回日本生態学会大会(ESJ65) シンポジウム: Ecological Epidemiology(えこえび)の展開: データドリブンモデリング

@札幌コンベンションセンター Room D

ウェブページ: <http://www.esj.ne.jp/meeting/65/>

・2017年12月21日~22日 第2回えこえびワークショップ@岡山コンベンションセンター 407会議室

ウェブページ: <http://ecoepi.jimdo.com/>

・2017年10月13日~15日 The 33rd Annual Meeting of Society of Population Ecology @九州大学西新プラザ

Poster Presentation. P47: Yuuya Tachiki, Understanding ecosystem using Virtual ECOSYSTEM

ウェブページ: <http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~populecol33/index.html>

・2017年10月6日~8日 第27回日本数理生物学会年会@北海道大学

シンポジウム「えこえびモデルの発展とその応用」

ウェブページ: <http://www-mmec.es.hokudai.ac.jp/JSMB2017/>

・ 2017 年 9 月 17 日～21 日 The International Society for Ecological Modelling Global Conference 2017@Jeju, Korea

シンポジウム「Data analysis and modelling in ecological epidemiology」

ウェブページ：

<https://www.elsevier.com/events/conferences/international-society-for-ecological-modelling-global-conference>

また、原著論文については、残りの解析が終了次第、執筆を開始する。

6. 自己評価

数理生物学・数理科学・昆虫学の専門家が集い、相互発展的に Greater Giyani 地域におけるマラリア流行データを定量的かつ多角的に解析する事ができた。そして、生物学的な妥当性が十分に担保され、かつ、昆虫媒介性の感染症を対象とした（特に、公共交通機関などが充実していない非都市部）データ解析の枠組みを構築する事が出来た。新規性の高い点は、ネットワーク情報を考慮した空間自己相関を分析した点である。今後は、これらの用法を組み込んだメタ個体群モデルを構築し、Greater Giyani 地域でのマラリア流行の“特徴”を捉えられるシミュレータの開発に取り組んでいく。特に、殺虫剤の散布スケジュールがマラリア流行を阻止、あるいは、遅延させることに有用であるかを分析していく。また、シミュレータにより最も効果的な殺虫剤の散布スケジュールを提案する研究にも展開していきたい。以上のように、ネットワーク上の蚊媒介性感染症の流行対策を考えていくうえで、重要となる理論的基盤を開発したという意味で有意義な研究である。

7. 達成度（何れかに○）

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）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：原生生物カプサスポラによる *Schistosoma* の中間宿主への寄生抑制

課題番号：29－ 一般 －11

2. 代 表 者：菅 裕（県立広島大学生命環境学部・准教授）

共同研究者：加藤健太郎（長崎大学熱帯医学研究所 生態疫学分野・助教）

3. 決 定 額： 350千円

4. 申請時書類より

①研究目的

Capsaspora owczarzaki (以下カプサスポラ) は動物に最も近縁な原生生物の一種であり、動物の多細胞性進化のメカニズムに迫るためのモデル生物として、近年注目されている。その進化的価値に加えて、カプサスポラにはもうひとつ重要な疫学的特徴がある。それはカプサスポラが、世界で多大な健康被害を引き起こしている住血吸虫 *Schistosoma mansoni* の中間宿主であるカタツムリ *Biomphalaria glabrata* に共生し、*S. mansoni* のスポロシストを捕食している可能性があるということである。もしそれが本当なら、カプサスポラを *S. mansoni* に対する「生物ワクチン・生物農薬」として使用できるかもしれない。本研究の目的は、カプサスポラが実際に *B. glabrata* 中で *S. mansoni* の感染を抑えているのか、また感染後にその増殖を抑える効果を持っているのかを解析し、カプサスポラの生物ワクチンとしての可能性を探ることである。

②研究内容

まず、カプサスポラを *B. glabrata* に人工的に感染させ、その過程を解析する。*B. glabrata* のマントルにカプサスポラを播種し、どの発生ステージの細胞をどれくらいの量播種すれば感染が持続するかを解析する。その結果から、効率的なカプサスポラ細胞の定着条件を導く。

次に、カプサスポラが *S. mansoni* のミラシジウム幼生の感染やスポロシストの成長を実際に抑えるのかどうか確認する。カプサスポラを感染させた *B. glabrata* にミラシジウム幼生を与え、18SrDNA をターゲットとした PCR により *S. mansoni* とカプサスポラの感染状態を定量する。

③予想される成果

S. mansoni をはじめとする住血吸虫が引き起こす健康被害は、世界で2億人以上に問題を与えている。本研究は、カプサスポラの *S. mansoni* に対する生物ワクチン・生物農薬としての可能性を検討する野心的なものであり、医学的、疫学的なインパクトは強い。

もしカプサスポラを効率よく *B. glabrata* に感染させることができ、その上でカプサスポラの感染が *S. mansoni* の増殖を抑えることが観察できれば、カプサスポラに感染させた *B. glabrata* を、感染していない *B. glabrata* 個体と混合飼育して、個体間のカプサスポ

ラ水平感染がおこるかどうかを調べるなど、より実地に近い実験に進むことが想定される。将来的にはこれらの成果を生かし、環境への影響の小さい *S. mansoni* 防除薬が開発される可能性がある。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

菅がカブサスポラ細胞と、カブサスポラの *B. glabrata* への感染を感知するための PCR プライマーを提供し、加藤が *B. glabrata* への感染実験をおこなった。何度か条件を変えて実験を行ったにもかかわらず、カブサスポラが *B. glabrata* に安定的に感染していることを示す証拠は得られなかった。したがって、最初に計画した、カブサスポラの定着が *S. mansoni* ミラシジウム幼生の感染を防ぐかどうかを確認する実験には至らなかった。

そこで方針を変更し、カブサスポラが *in vitro* でミラシジウム幼生を捕食する際にどのような遺伝子が働いているのかを、RNAseq 法により解析しようと考えた。カブサスポラをまず貧栄養条件に置き、数時間経過したところで RNase 処理及び熱処理を施したミラシジウム幼生を与え、ミラシジウム幼生以外に栄養源がない状態を作った。更に比較のため、カブサスポラを富栄養状態に置いたもの、貧栄養状態に置いたもの、貧栄養状態に置いた後富栄養状態に戻したものの 3 条件の RNAseq も同時に行った。

②成果（結果＋考察）

カブサスポラによるミラシジウムの *B. glabrata* に対する防疫実験に関しては、そもそもカブサスポラが *B. glabrata* に定着しないという結果に終わった。この結果に関してはいくつかの解釈が可能である。すなわち

① *B. glabrata* の株とカブサスポラの株との間の「相性」が合わず、感染しなかった、②感染はしているが、その感染が長続きしない、③感染はしているが、PCR での確認実験がうまくいっていない、の 3 つである。②については、カブサスポラを *B. glabrata* に播種してから、組織回収までの時間を調整して実験を行ったが、やはりポジティブな結果は得られなかった。③に関しては、カブサスポラのみで行ったコントロールはうまく行っており、プライマーは問題なくワークすることが確認されている。したがって、①の株の相性のせいで感染しない、もしくは感染してもごく短期間で排除されてしまうのが原因ではないかと考えている。

一方、RNAseq 法によるカブサスポラがミラシジウムを捕食する際の遺伝子発現解析は、前年度の成果も活用して、比較的短期間ではあったが、以下のようにスムーズ

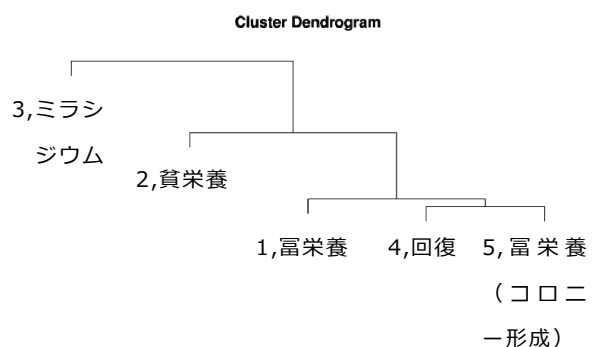


図1 RNAseq 各サンプルの解析結果のデンドログラム
1, 富栄養状態 2, 貧栄養状態 3, 貧栄養状態にミラシジウム添加 4, 貧栄養状態から富栄養状態へ回復 5, 富栄養状態（コロニー形成）。ミラシジウム添加により、RNA 発現に特異的な変化がみられる

に進めることができた。まず加藤がミラシジウムから持ち込まれる RNA をできるだけ低く抑えるための前処理を検討した結果、65℃で 10 分熱処理をすると RNA は十分分解されるということを突き止めた。また、熱処理に加えて RNaseA 処理を行っても、カプサスポラのミラシジウム捕食行動に特に影響は見られなかった。そこで熱処理+RNaseA 処理をミラシジウム幼生に施し、これを実験に使用することにした。カプサスポラのミラシジウム幼生の捕食行動に関しては、前年度の共同研究で詳細が調べられており、このデータを活用した。

現在 RNAseq データを受け取って間もない段階なので、詳しい解析はこれからである。しかし既に、いくつかの興味深い傾向が観察されている(図 1)。すなわち①富栄養状態と貧栄養状態では大きく RNA 発現パターンが異なる、②貧栄養状態から富栄養状態に戻すと、比較的短期間(1 時間程度)で RNA 発現パターンが元に戻る、③貧栄養状態では、受容体型チロシンキナーゼなどのシグナル伝達に関わる遺伝子の発現が亢進している、④ミラシジウムを与えると、他とは大きく異なる特徴的な遺伝子発現パターンが得られる、の 4 つである。ただし、④に関してはミラシジウムからの RNA キャリーオーバーの影響である可能性もあり、現在慎重に解析しているところである。

③成果の公表

現在のところなし。RNAseq の成果を公表するためには少なくとも 3 度の繰り返し実験が必要であるが、研究途中で方針を転換したことも影響し、一度しか実験ができていない。本補助金でカバーできなかった分は菅が自分の研究費で補った。今年度は本共同研究枠に応募していないが、続きは自らの研究費によって責任を持って進めていく。そのためのミラシジウム提供については加藤も同意しており、2 年間にわたる本共同研究を最終的に論文発表に昇華できるよう、引き続き協力体制を築いていく。

6. 自己評価

主目標であった、カブサスポラ感染による、*B. glabrata* のミラシジウム防疫効果を確認することは叶わなかったが、これについては挑戦的な課題の宿命と捉えている。今後この課題を追求するためには、熱帯研が所有していないものも含め、様々な *B. glabrata* 株を試すことが必要となってくるが、現実的には本共同研究で端緒を開くことができた RNAseq 解析を進めていくことが、成果を発表するための近道と考えている。

その RNAseq 解析については、既に興味深い結果が得られており、ここからミラシジウム捕食に伴って活性が亢進するような遺伝子群が突き止められれば、分子レベルでの防疫につながる可能性もある。

よって、すべての研究成果を予定通りあげられたわけではないが、一部では予定以外の成果も上がっているといえる。全体の成果の量としてはプラスマイナスゼロ以上で満足しているが、得られた結果は予想通りではなかったため、達成度はⅡとした。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

Ⅲ （予想通りの成果を挙げられた。満点）

Ⅳ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）
6で述べた通り。

平成 29 年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：赤痢アメーバ“シスト形成”の制御機構の解明

課題番号：29－ 一般 －12

2. 代 表 者：（所属・職名）

見市（三田村）文香 （佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野・助教）

共同研究者：（所属・職名）

吉田 裕樹（佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野・教授）

中村 梨沙（長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野・助教）

濱野 真二郎（長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野・教授）

3. 決 定 額： 450 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)は、ヒトの大腸に感染しアメーバ赤痢を引き起こす寄生原虫である。発展途上国を中心に世界で年間約 5 千万人の感染者、10 万人の死者を出している。臨床薬が少ないため、病原性の解明、新規薬剤開発が危急の課題である。感染は、アメーバ赤痢罹患者の糞便中の“シスト”に汚染された食物や水の摂取によって引き起こされる。そのため栄養型からシストへの移行である“シスト形成”は、それを阻害すると赤痢アメーバの宿主間伝播を直接阻止することが出来るため、治療という応用的側面から着目されてきたが、その分子機構はほとんど解明されていない。我々はモデル生物である *Entamoeba invadens* を用いた解析により、シスト形成の分子機構の解明を目指して研究を進めている。我々は、これまでにシスト形成の新規制御分子の 1 つとしてコレステロール硫酸(CS)を見出した(Mi-ichi *et al*, *PNAS* 2009, 2015; *PLoS NTD* 2011; *Eukaryot cell* 2015; *PLoS Pathogens* 2016)。CS 合成を阻害するとシスト形成が阻害されることから、CS 分子がシスト形成に必須であること、CS の合成経路の酵素群は有用な創薬標的となることが示唆される。本申請研究では、以下に示す方法により、シスト形成の分子機構の解明を目指す。

[1] シスト形成の誘導に必須な分子の探索(*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いて)

[2] 阻害剤の探索とその標的分子の同定(*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いて)

[3] [1][2]で同定した分子の機能解析

[4] *E. histolytica* のシストを用いた解析

同時に[1][2]の進行を迅速化させるために必要な定量的かつ簡易なシスト形成の評価系の確立も行う(フローサイトメトリーを用いた方法論の確立; 計画[0])。

②研究内容

[0]定量的かつ簡易なシスト形成の評価系の確立

現在、フローサイトメトリー法を用いることで、形成されるシスト数の測定を短時間で行う方法を検討している。プレリミナリーな結果であるが、3つの細胞集団に分ける条件を見出した。現在これらの細胞集団の性質を詳細に解析しており、[1][2]での評価に用いることにより研究遂行の迅速化を図る。

[1]シスト形成の誘導に必須な分子の探索 (*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いて)

[2]阻害剤の探索 (*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いて)

96-well plate を用いてシスト形成の誘導を行い、特異阻害剤(ライブラリーを非営利団体より入手済み)の探索を行う。形成されたシストの数は[0]で確立した方法を用いて計測し、阻害効果の評価を行う。

[3][1]で同定した分子の機能解析および[2]で得られた阻害剤の標的分子の同定

[1]で得られた因子および[2]で得られた阻害剤を加えた時の細胞の変化を解析する。形態変化の解析や mRNA の発現の変化の網羅的な解析、などを行い、影響を与えうる代謝経路、ならびに酵素反応の同定を試みる。

[4] *E. histolytica* のシストを用いた解析

E. histolytica をある条件下で培養するとシスト形成が誘導されることを共同研究者の Sharmina Deloer 博士が見出している(未発表)。^{[0]–[3]}で *E. invadens* を用いて得られた結果のアナロジーを基に、得たシストを用い解析により、*E. histolytica* での知見を集め、病原因子である *E. histolytica* のシスト形成機構の解明につなげる。

③予想される成果

本研究は、アメーバ赤痢の病原虫である赤痢アメーバのシスト形成に着目する。シスト形成は赤痢アメーバの次の宿主への唯一の伝播経路であり、その阻害は感染拡大を阻止することが出来るため着目されてきたが、分子機構は不明な点が多く現実性に乏しかった。

本研究は、申請者のこれまでの研究基盤、赤痢アメーバのコレステロール硫酸によるシスト形成制御機構の解明に加え、より多角的にシスト形成の分子機構の解析を行うことで、多くの情報を得ることが期待でき、これまでの断片的な知見を連携させることで、宿主への感染伝播を直接阻止する薬剤の開発につながる重要な分子基盤を得ることにつながると期待できる。

それに加え、赤痢アメーバのシスト形成を *in vitro* で行う系の確立は、これまで多くの研究者がなしえなかった事象であり、研究の限界打破の突破口になると期待できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

赤痢アメーバの培養株はシスト形成能を失っているため、*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いてシスト形成の解析を行っている。これまで、形成されるシスト数の計測は、顕微鏡を用いた細胞計測が主流であった。我々は、迅速にかつ再現性高く *E. invadens* のステージ毎の細胞数を計測できる方法の確立を試みた結果、フローサイトメトリー法により栄養体とシストを明確に区別できる条件を見出した（平成 28 年度一般共同研究報告書。見市、未発表）。今回、本方法を

- 1) シスト形成のステージ移行の経時的な解析
 - 2) シスト形成を阻害する化合物のスクリーニング
 - 3) シスト形成を促進する化合物の同定
- に応用することを試みた。

② 成果（結果＋考察）

1) シスト形成のステージ移行の経時的な解析

1-1) *E. invadens* の栄養体を低栄養培地で培養を行うと 72 時間でシスト形成が行われる。今回誘導後、経時的に細胞を回収、2 重染色を行った結果、細胞集団の移動として検出することができた。そして、少なくとも間に 2 つのステージを経ることを明らかにした（見市、未発表）。

1-2) 形成されるシスト数の計測にこれまで用いられてきた、顕微鏡を用いた細胞計測では、シストと栄養体と区別をするため、界面活性剤で一定時間処理後（シストは界面活性剤耐性）、トリパンブルー染色を行い顕微鏡下で計測してきた。今回フローサイトメトリー法により検出されたシストが、これまでの方法で計測されていたシストと対応するか否か、比較検討を行った。

シスト形成誘導後 72 時間のサンプルを界面活性剤（サルコシル）で処理を行った後、2 重染色、フローサイトメトリー法により検出を行った。結果、シストの細胞集団は界面活性剤に耐性であった。また、72 時間で検出されるほかの細胞集団 2 つについても、耐性であることを明らかにした。つまり、確立した方法は従来の方法に比べ、細かくその性質を検出できること、シストの集団をより正確に計測できていると考えられる。

2) シスト形成を阻害する、阻害剤のスクリーニング

これまでに 500 化合物のスクリーニングを行った結果、シスト形成を阻害する化合物 19 種類を得ることができた。現在その作用機序の解明を行っている（見市、未発表）。

3) シスト形成を促進する分子の同定

我々が見出したシスト形成の制御分子であるコレステロール硫酸がシスト形成に与える影響を、細胞集団の変化として検出することに成功、現在解析を行っている（見市、未発表）。

③ 成果の公表

1. **Mi-ichi F**^{*}, Miyamoto T, Yoshida H. Uniqueness of *Entamoeba* sulfur metabolism: sulfolipid metabolism that plays pleiotropic roles in the parasitic life cycle. *Mol Microbiol.* 106: 479-491. 2017 (*Corresponding author)

6. 自己評価

宿主への感染伝播を直接阻止する薬剤の開発につながる重要な分子基盤を得るという当初の目標に向けて、新技術の創出を行うことに成功した。今回確立した、“赤痢アメーバの細胞数を計測できるフローサイトメトリー法”は、迅速かつ再現性高く詳細なステージ進行の解析や、阻害剤の作用機序の解析にも有用であることを見出し、現在論文投稿中である。。さらに、関連する研究成果を論文投稿し、アクセプトされた (Mi-ichi F et al, *Mol Microbiol.*, 2017)。満足できる成果を得られたと考えている。

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

④ (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (6の自己評価で述べておれば省略して良い)

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名： タイ・ランパンエイズコホートにおける日和見感染症と MBL 遺伝子多型に関する研究

課題番号 29－一般－13

2. 代表者： 半田 寛 （群馬大学医学部附属病院血液内科 診療教授）
共同研究者： 柳澤 邦雄（群馬大学医学部附属病院血液内科 助教）◎申請者
小川 孔幸（群馬大学医学部附属病院血液内科 助教）
土屋 菜歩（東北大学 東北メディカルバンク機構 助教）
Nuanjun Wichukuchinda （タイ王国保健省生命医科学研究所）
Archawin Rojanawiwat（タイ王国保健省生命医科学研究所）
Panita Pathipvanich（タイ王国ランパン病院 Day Care Center）
Pathom Sawanpanyalert（タイ王国保健省）
安波 道郎（佐賀県医療センター好生館）
有吉 紅也（長崎大学熱帯学研究所臨床感染症学分野 教授）◎対応教員

3. 決 定 額： 80,000 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

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

版済み論文で関連性が検証されている *MBL2* 遺伝子多型と患者血清 MBL 濃度、PCP 発症率との相関性を、コホートの既存データを後方視的に解析することで、より多い症例数で統計学的に検証したい。そのことで、臨床上の重要性がますます高まっている PCP の危険因子の一つを提示するとともに、分子細胞レベルでの解析が充分とはいえない PCP および AIDS 関連日和見感染症の制御機構について新たな視点を提供する事を目指している。

なお、*MBL2* 遺伝子多型による MBL 産生能の層別化は、Ou らの報告⁷⁾を基に検討した。

- 1) Yanagisawa K, Ogawa Y, Uchiumi H, Gohda F, Mawatari M, Ishizaki T, Mitsui T, Yokohama A, Handa H, Tsukamoto N, Nojima Y. Gene polymorphisms of mannose-binding lectin confer susceptibility to Pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients. *J Infect Chemother*. 2015 Nov;21(11):769-75.
- 2) Tsuchiya N, Pathipvanich P, Wichukchinda N, Rojanawiwat A, Auwanit W, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. Incidence and predictors of regimen-modification from first-line antiretroviral therapy in Thailand: a cohort study. *BMC Infect Dis*. 2014 Oct 30;14:565.
- 3) M Mori, N Wichukchinda, R Miyahara, A Rojanawiwat, P Pathipvanich, T Maekawa, T Miura, P Goulder, M Yasunami, K Ariyoshi, P. Sawanpanyalert. HLA-B*35:05 is a protective allele with a unique structure amongst HIV-1 CRF01_AE-infected Thais, where the B*57 frequency is low. *AIDS* (2014) 28(7): 959-67.
- 4) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, W-P Schmidt, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Changing burden of HIV/AIDS to clinical settings in northern Thailand over fifteen years. *Jpn J Infect Dis* (2013) 66(5):375-8.
- 5) S Sapsutthipas, N Tsuchiya, P Pathipavanich, K Ariyoshi, P Sawanpanyalert, N Takeda, P Isarangkura-na-ayuthaya, M Kameoka. CRF01_AE-specific neutralizing activity observed in plasma derived from HIV-1-infected Thai patients residing in northern Thailand: comparison of neutralizing breadth and potency between plasma derived from rapid and slow progressors. *PLoS One* (2013) 8 (1):e53920.
- 6) Ivanova M, Ruiqing J, Matsushita M, Ogawa T, Kawai S, Ochiai N, Shivarov V, Maruya E, Saji H. MBL2 single nucleotide polymorphism diversity among four ethnic groups as revealed by a bead-based liquid array profiling. *Hum Immunol*. 2008 Dec;69 (12):877-84.
- 7) Ou XT1, Wu JQ, Zhu LP, Guan M, Xu B, Hu XP, Wang X, Weng XH. Genotypes coding for mannose-binding lectin deficiency correlated with cryptococcal meningitis in HIV-uninfected Chinese patients. *J Infect Dis*. 2011 Jun 1;203(11):1686-91

②研究内容

共同研究開始後、ランパン病院で採取され、タイ NIH で保管されている HIV/AIDS 患者ゲノム・血清検体のリストアップと、先行解析されている *MBL2* 遺伝子多型データの照合、さらに匿名で連結されている臨床情報との照合を行った。あわせて遺伝子型が実際の形質（血中 MBL 蛋白濃度）に反映していることを検証するために、保管血清中の MBL 蛋白濃度を MBL-oligomer ELISA kit (Bio Porto 社) で測定した。本年度は上記過程で収集したデータをもとに、以下の 2 つのデザインで統計学的な検討をさらに進めた。

1) ケース・コントロール・スタディー

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

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

上記 2 群の *MBL2* 遺伝子型を欠損群 (def)、低～中産生群 (low)、高産生群 (high) に層別化⁷⁾し、感染罹患の有無をロジスティック解析で検証し、オッズ比を検討する。

2) コホート研究：

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

③予想される成果

- ・CD4 数以外の PCP 危険因子を抽出でき、日和見感染の管理上有益な知見を提供できる。
- ・上記に関連して、PCP 以外の日和見感染症との相違も比較・検討できる。
- ・近年免疫抑制療法の普及に伴って増加が問題となっている、PCP をはじめとする日和見感染症の予防・管理にあたっての基礎データを提供できる可能性がある。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

本共同研究費で購入した血中 MBL 濃度測定用の kit (Bio Porto 社 MBL oligomer ELISA-kit) を使用し、タイ保健省生命医科学研究所の保存血漿を使用した血中 MBL 濃度の測定・検討を行った。また平成 30 年 3 月 9 日に長崎大学で本共同研究のセミナーを実施 (参加：有吉、安波、柳澤、土屋、Nuanjun) し、入手しているデータの検討と考察を行った。

②成果 (結果+考察)

1) ケース・コントロール・スタディー

昨年度の試算で、MBL 欠損群 (以下 def) と非欠損群 (non-def) の比較では、前者が有意に PCP 発症を増加させているとのモデルを得ていた。しかしこの差は CD4>50 に限られており、その考察が課題となった。今年度は 756 名のコホート患者の MBL genotype を Ou らの分類⁷⁾に基づいて def/low/high の 3 群とし、ロジスティック解析で以下の preliminary data を得た。

- i) CD4 を区切らずに PCP onset と 3 群の相関を見たが、関連性に差はない。
- ii) しかし CD4>50 に限ると、def=1 に対して、odds ratio が low : 0.26、high : 0.29 と、有意に PCP の risk を下げている。

以上の結果から、以下のような検討課題が抽出された。

- a) 僅差かもしれないが、low でも PCP に protective であるのはなぜか？
- b) MBL 濃度の比較 (def/low/high, n=28/19/55) では、平均値で 227/283/1896 ng/ml となり、def-low の差が乏しいことをどう考えるか？
- c) Ou らの分類⁷⁾に基づき、群馬大学の sample では genotype (def/low vs high) に基づいて、血中濃度がクリアに分かれた。しかし high の中にプロモーター変異が含まれているほか、low の中に exon の構造変異（ポリマー化が起きないはず）があるのに PCP protective となるのは何故か？
- d) High の中でも MBL 濃度にとかなり幅がありランパンの MBL-high genotype がかなり hetero な集団 であると考えられないか？
- e) MBL は肝臓で産生される蛋白質のため肝炎合併の影響はないか？ High の中に HBs 抗原陽性者、HCV 抗体陽性者が各々 11.9%、3.3% 存在するようだが関連は？
- f) 血小板数との関連を検討すると、肝硬変の存在を反映し、同一 genotype 内の MBL 濃度差の要因がわかるかもしれない。

以降、上記各点に関する考察を進めていく。

(2) コホート・スタディー：

MBL genotyping の結果をもとに死亡率等との相関を検討したが、特定の傾向は出なかった。しかし上述の通り、genotyping の妥当性に議論の余地があり、新たなカテゴリーで再解析することを検討している。

③成果の公表

上記に関して 30 年度以降、論文化および日本感染症学会等での発表を目指していく。

6. 自己評価

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

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

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

Ⅲ （予想通りの成果を挙げられた。満点）

Ⅳ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 29 年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナム自然環境に由来する薬剤耐性コレラ菌のゲノム特性

Resistome of *V. cholerae* isolated from natural and clinical environments in Vietnam

課題番号：29－ 一般 －14

2. 代 表 者：（所属・職名）丸山 史人（京都大学大学院医学研究科・准教授）

共同研究者：（所属・職名）野中 里佐（獨協医科大学・助教）

3. 決 定 額： 80 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

本申請は継続課題として申請し、研究目的、研究内容に変更はない。

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

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

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

②研究内容

ベトナム北部タイビン省、ナムディン省、南部ベンチェ省のエビ養殖池の水、農業・生活用水、河川水を各地年に 2 度ずつ（夏季、冬季）採取し、選択培養によるビブリオ属細

菌の分離と薬剤耐性菌のスクリーニングを行う。抗菌剤としてはテトラサイクリン系（エビ養殖や家畜への使用が多く、環境水への流出が懸念）、カルバペネム系（ヒトでの耐性菌感染が大きな問題）に関してスクリーニングを行う。得られた分離株の全ゲノム配列の解析を行い、菌種の同定と系統解析、ARDBを利用した薬剤耐性遺伝子の抽出を行う。データベースによる検索で複数の薬剤耐性遺伝子が検出された場合には各遺伝子 locus の構造を明らかにするため、詳細なゲノム解析と PCR 法による確認を行う。平成 30 年度も平成 29 年度と同様の解析を行い、分離頻度の比較、季節による差異等の解析を行う。

③予想される成果

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

検体収集はベトナム北部に位置するナムディン省チュクニン郡近郊10地点（3ヶ月おきに計4度）、タイビン省タイビン市近郊のエビ養殖池と河川20地点（夏季に2度）水検体の採取を行った。各検体は Alkaline Pepton Water を用いた1次増菌を行い、PCRによるスクリーニングと TCBS 培地を用いた選択培養に用いた。TCBS 上の各コロニーは0%、8% NaCl 含有 Nutrition broth による2次スクリーニングを行い、PCRにて *V. cholerae* の *toxR* 遺伝子の有無を確認した後、20% Glycerol 含有 LB 培地にて凍結保存した。*toxR* 遺伝子陽性の検体に関してはコレラ毒素遺伝子 *ctxA*、O 抗原をコードする *O1-rfb*、*O139-rfb* の各遺伝子を標的とする PCR を行い、病原株、もしくは類似株のスクリーニングを行なった。また、Meropenem 含有 DHL 培地に水検体を直接接種し、Carbapenem 耐性グラム陰性菌の選択培養を行い、得られたコロニーに対して5種類の Carbapenemase 遺伝子 (*NDM-1*, *VIM*, *IMP*, *KPC*, *OXA-48*) の PCR によるスクリーニングを行った。

ゲノム解析は 2007-2010 年のコレラ流行期における分離検体と同時期に環境水から分離された分離された株計39株の解析を行い、環境分離 *V. cholerae* 株と特に薬剤耐性遺伝子群の多様性に着目した比較ゲノム解析を現在進行している。

②成果（結果＋考察）

1次増菌検体から抽出した DNA を用いて PCR を実施し、ナムディン省から収集した環境水40検体中32検体(80.0%)、タイビン省河川水検体の40検体中34検体(85.0%)が *V. cholerae* の *toxR* 遺伝子陽性を示した。検体収集を行なった環境中に *V. cholerae* は常在すると考えられる結果であったが、経年比較が可能なナムディン省の検体で比較すると、その頻度は低くなっており、特に2017年12月、2018年2月はそれぞれ50.0%、70.0%と低かった。主要病原遺伝子である *ctxA* は全ての検体で検出されず、病原性を有すると考えられるコレラ菌株は全ての地点において得られなかった。上記地域を含むベトナム国内においてコレラ患者発生の報告も無かったため、コレラアウトブレイクとの相関を見出すには至っていない。O1 抗原遺伝子、O139 抗原遺伝子はナムディン省の検体からは検出されず、タイビン省の検体からはそれぞれ1検体と3検体から検出され、O1株1株とO139株1株が分離された。O139株の分離効率は低かったが、前年までのO139分離株とともに全ゲノム解析を進めていく。

薬剤耐性菌株のスクリーニングにおいてオキシテトラサイクリン耐性は非常に多くの菌種が得られてしまい解析が困難であったためゲノム解析から耐性遺伝子を検出することにした。Meropenem を用いて Carbapenem 耐性菌を選択培養し、Carbapenemase 遺伝子のスクリーニングを行ったところ5株が得られ、3株が *OXA-48*、1株が *NDM-1*、1株が *VIM* を保有していた。生化学的菌種同定の結果、*OXA-48* 保有株は3株とも *Shewanella* 属、*NDM-1* 保有株は *Proteus* 属、*VIM* 保有株は *Klebsiella* 属であった。*Shewanella* 属の菌が保有する *OXA-48* 遺伝子もしくは類似遺伝子は多様性があり多様な菌種に拡散している *OXA-48* 遺伝子の起源である可能性が示唆されている。東南アジア地域で *OXA* 遺伝子保有 *Shewanella* 属細菌の環境検体からの分離例は地理的に離れたインドネシアからしかなく、ゲノム解析を通じて保有動態等の検討を進めている。

③成果の公表

Takemura T, Murase K, Maruyama F, Tran TL, Ota A, Nakagawa I, Nguyen DT, Ngo TC, Nguyen TH, Tokizawa A, Morita M, Ohnishi M, Nguyen BM, Yamashiro T.

Genetic diversity of environmental *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Northern Vietnam.

Infect Genet Evol. 2017 Oct;54:146-151.

6. 自己評価

本年度は *V. cholerae* の O1/O139 抗原遺伝子陽性株はナムディン省からは得られず、タイビン省からの計 4 検体が陽性、分離は 2 株にとどまった。toxR 遺伝子を指標とした *V. cholerae* の検出頻度も前年までと比較して低くなっており、環境中の *V. cholerae* の動態に変化があった可能性も考えられ、平成 30 年度の結果と総合して評価を行いたい。また、病原遺伝子保有株は得られなかったが、コレラ非流行期における *V. cholerae* のゲノム多様性を理解することは当初の目的に合致し、予定通りの進捗が得られたと考えている。

薬剤耐性菌解析において、オキシテトラサイクリンによるスクリーニングは予想外に多種多様な菌株が得られてしまい、ゲノム解析から *V. cholerae* に限定した解析を行うこととした。一方で Carbapenemase 保有株が複数得られたことから、薬剤耐性遺伝子の環境中での動態解明という当初の目的達成に向けては順調に進展していると考えている。一方でゲノム解析、特に配列取得後の比較ゲノム解析に関して少々遅れ気味であり、今後挽回する必要があると考えていることから、達成度は II（不満は残るが一定の成果を挙げられた）とする。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- ② （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：*Entamoeba nuttalli*における表面レクチンサブユニット（Igl）の解析

課題番号：29－ 一般 －15

2. 代表者：（所属・職名）東海大学医学部・教授 橘 裕司

共同研究者：（所属・職名）東海大学医学部・助教 牧内貴志

長崎大学熱帯医学研究所・助教 加藤健太郎

3. 決定額： 450千円

4. 申請時書類より

①研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は熱帯・亜熱帯を中心に世界中に分布しており、年間約5千万人が大腸炎や肝膿瘍を発症し、約10万人が死亡している。わが国においても赤痢アメーバ症の患者数は年々増加傾向にあり、2013年以降は報告数が1,000例を超えるなど、大きな問題となっている。しかし、赤痢アメーバ症の予防に有効なワクチンは未だに開発されていない。赤痢アメーバが病原性を発揮するには宿主細胞への接着が必須の過程であり、ガラクトース・N-アセチルガラクトサミン特異的な表面レクチン (heavy subunit of Gal/GalNAc lectin, Hgl) が重要な役割を果たしている。本研究申請者の橘らは、Hglとは別の表面分子が宿主細胞への接着に重要であることを明らかにし、この分子を intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin (Igl) と命名した (Cheng *et al.*, Infect. Immun., 2001)。IglにはIgl1とIgl2の2つのアイソタイプが存在しており、特にIgl1について赤痢アメーバ症の診断や予防への応用を検討してきた。そして、Igl1のC末端側がワクチンとして有望であることをハムスターの肝膿瘍形成の系で明らかにした (Min *et al.*, PLoS Negl. Trop. Dis., 2016)。しかし、赤痢アメーバは齧歯類には経口感染しないため、実験動物を用いたワクチンの検証実験には限界がある。一方で橘らは、赤痢アメーバに近縁で、マカク類を固有宿主とする病原アメーバ *Entamoeba nuttalli* を初めて分離した (Tachibana *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 2007)。*E. nuttalli* を用いれば、霊長類を宿主としたワクチン開発研究が可能になると考えられる。そこで、本研究においては *E. nuttalli* の Igl を同定するとともに、その機能について赤痢アメーバや病原性のない *Entamoeba dispar* の Igl と比較解析する。また、*E. nuttalli* の Igl における機能部位の検索を行うとともに、病原性における Igl の役割を明確にすることを目的としている。

②研究内容

今年度の共同研究においては、まず、*E. nuttalli* における *Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子の発現量について、定量的な PCR 法を用いて解析する。また、*E. nuttalli* の *Igl1* と *Igl2* を認識するモノクローナル抗体を作製し、タンパク質レベルでの比較解析を行う。さらに、*E. nuttalli* の *Igl1* について、組換えタンパク質を大腸菌で作製し、溶血活性について赤痢

アメーバや *E. dispar* との比較解析を行う。また、*E. nuttalli* を遺伝子操作するための技術開発の第一歩として、*E. nuttalli* 内で任意のタンパク質の強制発現を可能にするプラスミドベクターの構築を試みる。赤痢アメーバ用の発現ベクターにおける cysteine synthase 遺伝子と actin 遺伝子のそれぞれ上流と下流の塩基配列について、*E. nuttalli* の配列に置換し、ネオマイシン耐性遺伝子と任意の遺伝子の強制発現を可能にする。

次年度は、このベクター系を用いて、Igl の過剰発現株を作製する。発現ベクターにそれぞれの *Igl* 遺伝子を組み込み、リポフェクション法によって虫体に導入する。G418 を含む培地を用いて遺伝子導入細胞を選択し、G418 濃度を上げながら継代馴化させて安定した株を確立する。これらの株を用い、虫体の赤血球や宿主細胞に対する接着活性、溶血活性、赤血球貪食能等に及ぼす *Igl* 過剰発現の影響について、ベクターのみを導入した株と比較検討する。特に *Igl1* と *Igl2* の過剰発現株に関して、両者間で機能の違いがあるかどうかについても検討する。次に、*E. nuttalli* 内で任意のタンパク質の発現抑制を可能にするプラスミドベクターを構築し、*Igl* 遺伝子の発現抑制株の樹立を試みる。虫体の赤血球や宿主細胞に対する接着活性、溶血活性、赤血球貪食能等に及ぼす影響について、ベクターのみを導入した株と比較検討する。将来的には、アカゲザルあるいはカニクイザルを用いた感染実験を実施し、*Igl* のワクチンとしての可能性について検討する。

③予想される成果

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

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

1) *E. nuttalli*における *Igl* 遺伝子の発現量解析

E. nuttalli P19-061405 株の培養虫体から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。*Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーを設計し、SYBR グリーンを用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR を行った。

2) *E. nuttalli* を認識するモノクローナル抗体の調製

これまでに赤痢アメーバと *E. dispar* の *Igl* に対して作製したモノクローナル抗体について、*E. nuttalli* との反応性を間接蛍光抗体法によって観察した。

3) *Igl* 組換えタンパク質の調製

E. nuttalli の *Igl1* について全長と C 末端側断片をコードする遺伝子を PCR 増幅し、pET19b に組み込んでクローニングした。大腸菌による組換えタンパク質の調製を試みた。

4) *E. nuttalli* タンパク質強制発現用ベクターの構築

赤痢アメーバのタンパク質強制発現用プラスミドベクター pEhEx/GFP の構造を参考に、*E. nuttalli* 内で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を強制発現させることを目的としたプラスミドベクター (pEnEx/GFP) の作製を試みた。まず、pEhEx/GFP を鋳型に *GFP* 遺伝子 (717bp) およびネオマイシン耐性 (*NEO*) 遺伝子 (795bp) をそれぞれ PCR によって増幅した。次に遺伝子発現に必要な非翻訳領域 (Untranslated region : UTR) について *E. nuttalli* P19-061405 株から精製されたゲノム DNA を鋳型に、Cysteine synthase をコードする遺伝子の 5' 上流 369bp の領域 (CS5') と 3' 下流 753bp の領域 (CS3')、および Actin をコードする遺伝子の 5' 上流 474bp の領域 (Ac5') および 3' 下流 600bp の領域 (Ac3') をそれぞれ PCR によって増幅した。これらの増幅断片には、それぞれ制限酵素認識部位および In-Fusion (Clontech 社) 反応に必要な 15bp が付加するようにプライマーを設計し、各プライマーセットの至適条件で PCR による増幅を行った。pEnEx/GFP の骨格となる pBluescript II SK(-) の *EcoRI*-*KpnI* 認識部位間には CS5'-*GFP*-CS3' となるように増幅断片を順次挿入し、*PstI*-*XmaI* 認識部位間には Ac5'-*Neo*-Ac3' となるように増幅断片を順次挿入した。

②成果 (結果+考察)

1) *E. nuttalli* における *Igl* 遺伝子の発現量解析

Igl1 遺伝子の発現量は *Igl2* 遺伝子の発現量に比べて、約 4 倍であった (図 1)。この結果は赤痢アメーバの場合とよく一致しており、*Igl1* が病原性の有無に関連していることが *E. nuttalli* においても示唆された。

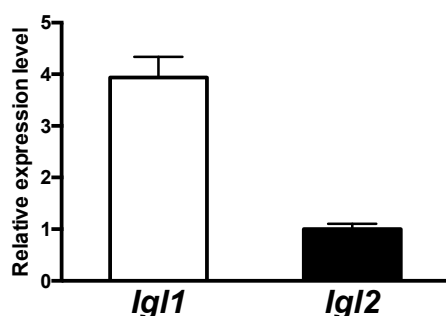


図 1. *E. nuttalli* における *Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子のリアルタイム PCR による発現量比較

Igl2 遺伝子の発現量を 1 として相対値を示した。

2) *E. nuttalli* を認識するモノクローナル抗体の調製

赤痢アメーバの Igl に対して作製したヒトモノクローナル抗体のうち、XEhI-H2 が *E. nuttalli* にも反応することを確認した。XEhI-H2 は、赤痢アメーバの CHO 細胞への接着、溶血活性、ハムスターにおける肝膿瘍形成能などを阻害する抗体であるので、*E. nuttalli* の実験系においても活用できると考えられる。今後、*E. nuttalli* の Igl 組換えタンパク質が調製できた時点で、各 Igl や断片との反応性について確認する。

3) Igl 組換えタンパク質の調製

各 Igl とその断片をコードする遺伝子について、発現ベクターにクローニングできたことを確認した。大腸菌での産生について検討中である。

4) *E. nuttalli* タンパク質強制発現用ベクターの構築

塩基配列決定の結果、目的の配列によって構成された pEnEx/GFP を構築できていることを確認した。本プラスミドは、赤痢アメーバ用ベクターとは異なり、各 UTR の両端に異なる 8 種類の制限酵素の認識配列を配置したため、これらによってタンパク質の強制発現により適した UTR をディレクショナルに置き換えることが容易となっている（図 2、図 3）。

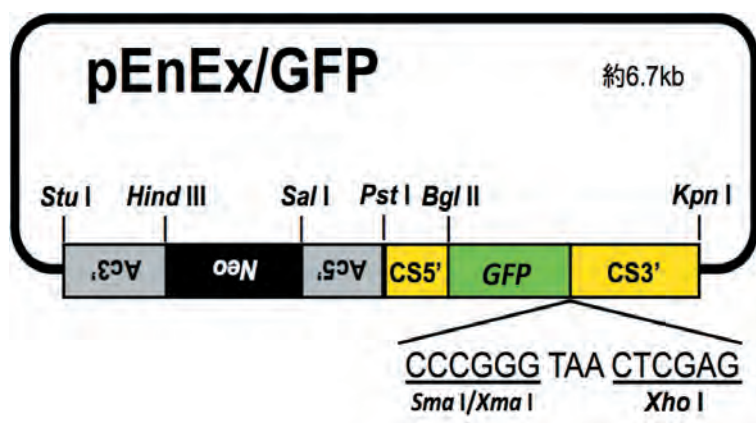


図 2. pEnEx/GFP の模式図

Ac5'および Ac3' : *E. nuttalli* Actin 遺伝子の 5'上流および 3'下流の配列。Neo : ネオマイシン耐性遺伝子。CS5'および 3' : *E. nuttalli* Cysteine synthase 遺伝子の 5'上流および 3'下流の配列。強制発現させたい目的遺伝子は Bgl II もしくは Sma I/Xma I-Xho I の間に挿入する。

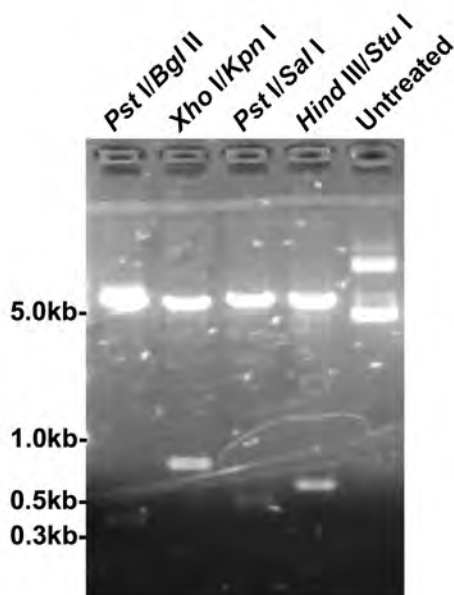


図 3. 制限酵素消化による pEnEx/GFP の構造の確認

Pst I/Bgl II、Xho I/Kpn I、Pst I/Sal I、Hind III/Stu I は、それぞれ CS5'、CS3'、Ac5'、Ac3' を切り出すことが可能な制限酵素のセットである。Untreated は、制限酵素未消化の pEnEx/GFP を示す。

現在までにリポフェクション法を用いた pEnEx/GFP の *E. nuttalli* への導入には成功していない。その理由として、*E. nuttalli* のプラスミドが機能していない可能性とプラスミドが *E. nuttalli* 内に導入できていない可能性が考えられる。今後はリポフェクション試薬の検討ならびに電気穿孔法など他の導入法を試みるとともに、配列の類似性からタンパク質発現機構の互換性が予想できる赤痢アメーバへの pEnEx/GFP の導入も試みることで、*E. nuttalli* への遺伝子導入法の条件を検討していく予定である。

③成果の公表

論文発表

Kato K, Makiuchi T, Cheng X, Tachibana H. (2017) Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins. PLoS ONE 12(7):e0181864

学会発表

1. 加藤健太郎、牧内貴志、Xunjia Cheng、橘 裕司： *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の Igl レクチンの溶血活性比較研究（第 86 回日本寄生虫学会大会、北海道大学学術交流会館、2017 年 05 月 28 日～2017 年 05 月 29 日）
2. 加藤健太郎、牧内貴志、Cheng Xunjia、橘 裕司： *Entamoeba* 属の Igl レクチンの溶血活性比較研究（第 36 回日本糖質学会年会、旭川市民文化会館、2017 年 07 月 19 日～2017 年 07 月 21 日）
3. 牧内貴志、加藤健太郎、Cheng Xunjia、橘 裕司： 赤痢アメーバにおけるレクチンサブユニット（Igl）の機能解析（第 50 回日本原生生物学会大会・第 1 回日本共生生物学会大会、筑波大学筑波キャンパス、2017 年 11 月 19 日）
4. 加藤健太郎、牧内貴志、Xunjia Cheng、橘 裕司： *Entamoeba* レクチンの Igl サブユニットが有する溶血活性に関する研究（第 40 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 06 日～2017 年 12 月 09 日）
5. Kentaro Kato： The role of intermediate subunits of *Entamoeba histolytica* lectin（The 48 th Joint Conference on Parasitic Diseases、長崎大学 GH 研究棟、2018 年 02 月 16 日）
6. Kentaro Kato, Takashi Makiuchi, Xunjia Cheng, Hiroshi Tachibana： Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins（第 87 回日本寄生虫学会大会、国立国際医療研究センター、2018 年 03 月 17 日～2018 年 03 月 18 日）

6. 自己評価

今年度も昨年度と同一の構成メンバーによる共同研究であり、分担し、協力して研究を実施した。今年度の前半には、赤痢アメーバと *E. dispar* の *Igl* における溶血活性の比較についての投稿論文をリバイズするため、追加実験を3名で分担して実施した。赤痢アメーバの *Igl1* 遺伝子発現抑制株を2株作製し、それらと *E. dispar* の分離株を用いることにより、遺伝子レベル、タンパク質レベルでの *Igl* の発現量と溶血活性との相関性を証明することができ、論文発表に至った。この追加実験を優先したため、*E. nuttalli* の *Igl* に関しては研究の着手が遅れた。しかし、*E. nuttalli* の2つの *Igl* 遺伝子の発現レベルには、赤痢アメーバと同様な差異があることを明らかにでき、また、*E. nuttalli* 用のタンパク質強制発現ベクターを構築し、*E. nuttalli* への導入条件についても検討を開始できたことは評価できる。一方で、組換えタンパク質の調製が遅れたため、年度内に溶血活性の比較解析には至らなかったため、達成度はⅡとした。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

Ⅲ （予想通りの成果を挙げられた。満点）

Ⅳ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：生薬由来新規抗マラリア薬の探索

課題番号：29－一般－16

2. 代表者：（所属・職名）

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・教授 小松 かつ子

共同研究者：（所属・職名）

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・准教授 當銘 一文

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・助教 朱 姝

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・研究員 葛 躍偉

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・教授 平山 謙二

長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・助教 水上 修作

長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・准教授 グエン フィ ティエン

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・助教 ムハマド チェリフ サマ

3. 決定額：500千円

4. 申請時書類より

①研究目的

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

②研究内容

熱研対応教員より提供されたコンゴボロロの葉を用いて、溶媒抽出エキス、各種分画物を調製し、また化合物の単離を行う。これら試料の抗マラリア活性を熱研にて、*in vitro* マラリア感染赤血球培養システムを用いて評価する。活性が認められた抽出エキスについては *in vivo* での抗マラリア効果も併せて検討する。

（1）コンゴボロロ抽出物の準備

熱研より富山大学にコンゴボロロの葉を提供し、100%または80%エタノール、メタノール、熱水の各抽出エキス、及び80℃温水浸漬エキスなどを作製する。また、コンゴ民主

共和国の異なる地点で採取したコンゴボロロの葉を入手し、それぞれを用いて抽出エキスを作製する。これらを以下（2）、（3）の実験に供する。

（2） *In vitro* でのマラリア原虫培養と化合物等添加処理

実験には、熱研で維持しているメフロキン・クロロキン感受性株(3D7)と耐性株(Dd2)の2つの熱帯熱マラリア株を使用する。96 ウェルプレートにマラリア原虫を感染させたヒト赤血球を準備し、培養液中に各種抽出エキスを添加後、最適な混合ガス環境下の 37℃インキュベーター内で 48 時間培養を行う。

（3） 感染マラリア原虫の検出と抗マラリア活性の算出

赤血球内の核酸を SYBR Green I を用いて染色し、マラリア原虫を検出する。抽出エキスを添加していないコントロールウェルの染色結果と比較することにより、各抽出エキスの抗マラリア活性を算出する。なお、各抽出エキスについては抗マラリア活性と同時に細胞傷害性を検討することによってその安全性も確認する。

（4） 最適なコンゴボロロ原産地及び抽出法の決定

（1）～（3）の結果から、最も強い抗マラリア活性を持つコンゴボロロ抽出エキスの作製に最適なコンゴボロロの葉の産地、抽出条件など（臨床応用を考慮する）を決定する。

（5） コンゴボロロ抽出エキスの活性指標となる化合物の同定

前年度に単離した 4 化合物以外のイリドイド配糖体を単離し、全化合物の抗マラリア活性を検討する。活性の認められる溶媒抽出エキスと、活性を示す化合物（オレアノール酸、イリドイド配糖体成分など）の含有パターン及び定量値とを比較して、抗マラリア活性の指標となる化合物を見つけ出す。

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

（3）で強い抗マラリア活性を示し、臨床試験に適応可能な溶媒抽出エキスを C57BL/6 マウスに予め経口で 3 日間投与し、その後マウスマラリアを感染させ、生存率・血中原虫数などを指標に、抗マラリア効果を検討する。

（7） コンゴボロロの遺伝的多様性の解析

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

③予想される成果

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法

研究材料

コンゴボロロ (*Morinda morindoides*) の葉。2016 年に熱帯医学研究所がコンゴ民主共和国の共同研究者から入手した 4 サンプル (KB001、KB002、KB003-A 及び KB003-B)、及び 2017 年に 3 回に分けて入手した 3 サンプル (KB004、KB005、KB006)。

研究方法

1) *In vitro* 実験系での抽出エキスの抗マラリア活性の測定

メフロキン・クロロキン感受性 *Plasmodium falciparum* 株 (3D7) または耐性株 (Dd2) を感染させたヒト赤血球の培養液中に各種抽出エキスを添加した後、嫌気性条件下 37℃ のインキュベーター内で 48 時間培養を行った。赤血球内の核酸を SYBR Green I で染色して感染マラリア原虫を検出した後、抽出エキスを添加していないコントロールの染色結果と比較することにより、各種抽出エキスのマラリア原虫増殖阻害活性を算出した。同時に細胞傷害性を検討することによりそれらの安全性も確認した。

2) コンゴボロロの葉からの各種エキスの作製

コンゴボロロ KB004 の乾燥葉の粉末にメタノール、エタノールまたは 80%エタノールを加え、室温で 30 分間超音波抽出し、抽出液を分取する操作を 3 回繰り返した。また、粉末に 85℃ の温湯を加え 30 分間浸出し、浸出液を分取する操作を 2 回繰り返した。さらに、粉末を 30 分間熱水抽出した。それぞれの抽出液は減圧濃縮し、凍結乾燥してエキスを得た。KB005 と KB006 は、KB004 と同様の操作でメタノール及びエタノールエキスを作製した。

3) LCMS による成分プロファイルの比較とエキスの分画

LC-ESI-IT-TOF-MS を用い、次の LCMS 条件で分析した。カラム：YMC Pack Pro C18 RS (i.d. 2.1x150 mm)；溶媒：A, water with 0.1% formic acid; B, MeCN with 0.1% formic acid；グラジエント：5%B (0-2 min), 5-95%B (2-42 min), 95-100%B (42-42.1 min), 100%B (42.1-50 min), 100-5%B (50-50.3 min), 5%B (50.3-55 min)；測定範囲： m/z 150-1000. 各種エキスの成分プロファイルを比較するとともに、特徴的なピーク成分を推定するため、各ピークのマススペクトルの精密質量及び MS/MS のフラグメントシグナルに基づき解析を行った。前年度に単離したイリドイド配糖体 3 化合物も標品としてピーク同定に用いた。

KB004 の乾燥葉に 50%エタノールを加え、ミキサーを用いて抽出し、抽出液を分取する操作を 4 回繰り返した。抽出液を合わせ減圧濃縮した後、凍結乾燥してエキスを得た。これに水を加え、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル及びブタノールで順次分配して、各溶媒画分を得た。各画分に含有される成分のプロファイリングを行い、フェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物の存在を確認し、先ずクロロホルム画分の分画を行った。

4) コンゴボロロの遺伝的多様性の解析

7 サンプルの葉から各 2 検体を取り、核遺伝子 ITS 領域の塩基配列を解析した。それぞれの配列を比較するとともに、GenBank に登録されている *M. morindoides* 及び他の同属植物の配列と比較した。

②成果

コンゴボロロ KB004 の葉を用いて再度、抽出溶媒・抽出方法の異なる 5 種類のエキスを作製し、抗マラリア活性を検討した結果、各エキスの感受性株 (3D7A) 及び耐性株 (Dd2) に対する IC₅₀ 値は、エタノールエキス：53.96 µg/mL、62.95 µg/mL、メタノールエキス：66.54 µg/mL、94.38 µg/mL、80%エタノールエキス：155.37 µg/mL、144.83 µg/mL、熱水抽出エキス：ともに > 250 µg/mL、温湯浸出エキス：ともに > 500 µg/mL であり、エタノールエキスの活性が最も強かった。これまで検討した KB001 ではメタノールエキスの活性が最も強く感受性株で 4.09 µg/mL、エタノールエキスは 69.26 µg/mL、一方 KB002 では両エキスの活性に大差はなくそれぞれ 35.25 µg/mL、47.48 µg/mL であった。KB004 のメタノールエキスの活性は、これまでに検討した 4 サンプルの同エキスの活性よりやや弱かった。

LCMS による成分プロファイルの比較では、KB004 のメタノールエキスは KB001、002 及び 003-B のメタノールエキスとは若干異なり、むしろ KB004 のエタノールエキスのプロファイルがこれらに類似した。新たに入手した KB006 のメタノールエキスのプロファイルもこれらに類似したが、KB005 のメタノールエキスには活性成分と考えられるフェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物と推定される化合物ピーク (tR 10-20 min) が認められなかった。これは、本サンプルが半乾燥状態で輸送され、入手時にカビが発生していたことと関連があるものと考えられる。

次に KB004 のエタノールエキスについて、各ピークのマススペクトルに基づき、化合物の推定を行った。その結果、Fig. 1 に示すように 13 化合物が推定され、その内化合物 12 (構造式不明) は、*M. lucida* から報告されている ML-2-3¹⁾ の還元体と推定した。これらの化合物の単離を目的として、同文献を参照して KB004 の葉の 50%エタノールエキスを作製し、各種溶媒で分配して、ヘキサン画分、クロロホルム画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分及び水画分を得た。各画分の成分プロファイルは Fig. 2 のようであり、フェニルプロパノイド縮合型イリドイドと推定される化合物は、ヘキサン画分以外の 4 画分に含まれることが明らかになった。現在、クロロホルム画分のさらなる分画を進めている。

抗マラリア活性の違いは含有成分の組成・含量の変化に連動するものであり、変化の要因としてコンゴボロロの採集地や採集時期の違い、さらには植物の違いが考えられる。そこでこれまで入手した 7 サンプル各 2 検体について遺伝子多型を調べる目的で、核 ITS 領域の塩基配列を決定した結果、GenBank に登録されている *M. morindoides* または *M. longiflora* の配列と 98 または 97% の相同性を示し、一方 *M. lucida* とは相同性が 91% であった。7 サンプルともにシーケンス時に 2 重ピークを認め、*M. morindoides* に別種 (*M. longiflora* でない) が交配している可能性が示唆され、特に KB003-A、-B では別種の関与が大きいものと考えられた。別種とするのかまたは同種内に 2 系統があるのかについては現地での植物調査が不可欠であるが、今後クローニングを行い交配の程度を調べる予定である。ただし、KB003-B のメタノールエキスの成分プロファイル及び抗マラリア活性は他のサンプルの同エキスと大きな差異は認められなかった。交配の程度と成分組成、さらには抗マラリア活性について今後詳細に検討するとともに、まずは活性を示す化合物を同定することが不可欠であり、研究を継続する。

1) Kwofie K. D., *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 60(6): 3283-90, 2016.

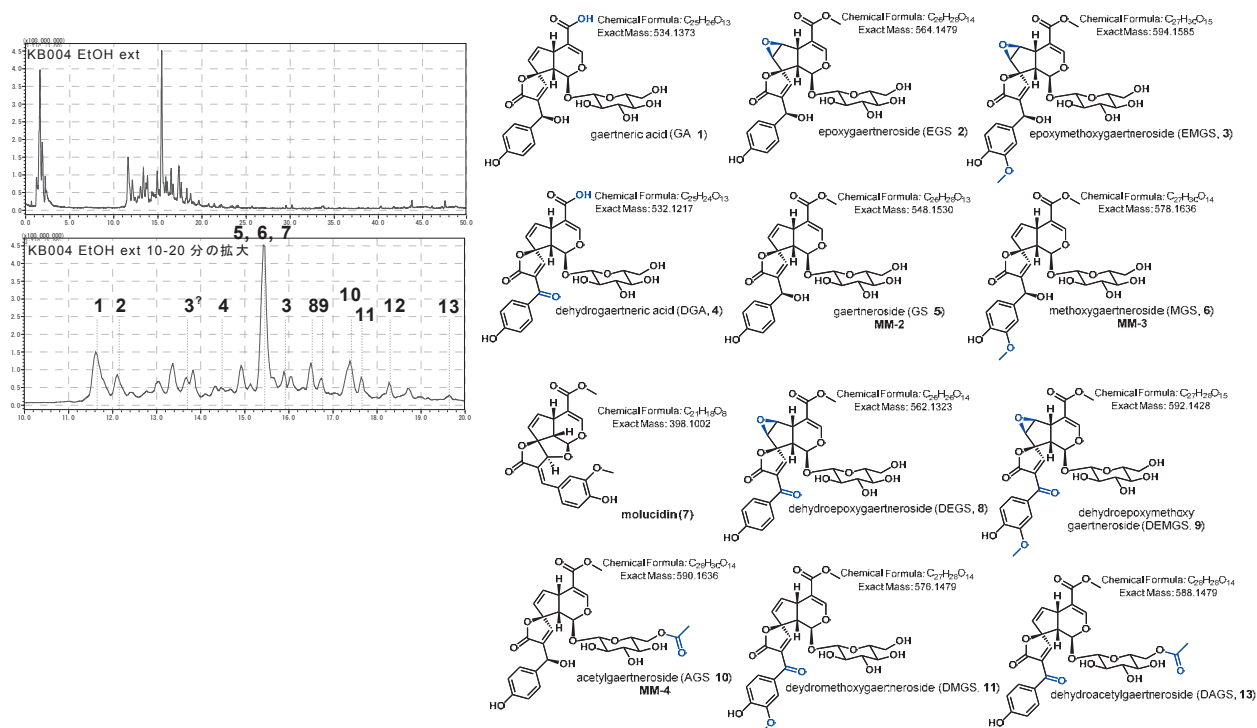


Fig. 1. LCMS profiling of ethanol extract of Kongo Bololo leaves from the sample KB004 Components (1-13) tentatively identified by LC/MS/MS analysis. (Structure 12 is unknown)

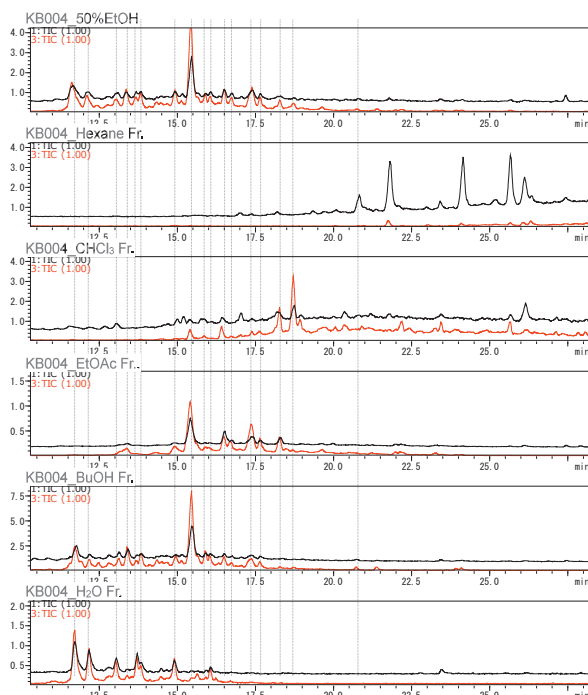


Fig. 2. LCMS profiling of 50% ethanol extract and its hexane, CHCl_3 , EtOAc, BuOH and H_2O fractions from the sample KB004

③成果の公表

水上修作, アウトアラム テクレミカエル, 當銘一文, ファルハナモサデック, チェリフマハムドサマ, グエンティエンフイ, 小松かつ子, 平山謙二. 和漢薬ライブラリーを用いた新規抗マalaria薬の探索. 第34回和漢医薬学会学術大会; 2017, 8, 26-27; 福岡.

6. 自己評価

コンゴボロロ抽出エキスに関して強い抗マラリア活性を得るためには、乾燥葉をメタノールまたはエタノールで超音波抽出する方法が最適であることが判明した。また、オレアノール酸以外の活性成分であると考えられるフェニルプロパノイド縮合型イリドイドの数化合物がエタノールエキスまたは画分の LCMS 分析により推定でき、今後の活性成分の単離と同定、抗マラリア活性の評価へと繋がる結果が得られた。一方、遺伝子解析により、現地で薬用に供しているコンゴボロロは *M. morindoides* の純系ではなく、別種が交配している可能性があることが示唆された。安定した抗マラリア活性を得るためにはコンゴボロロの成分に影響する様々な要因を解決する必要があるが、今回の研究結果により押さえるべき要点が明らかになった。ただし、抗マラリア活性の指標になる活性化合物の同定まで至っておらず、不満を残す結果となった。本研究は来年度も継続する予定であり、まずは化合物の単離と同定を早急に行い、得られた化合物について抗マラリア活性の評価を行う予定である。

なお、臨床応用を目指すためには熱水抽出エキスの使用も視野に入れる必要があり、同エキスに含有されるフェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物の検討も行う。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：

課題番号：29－一般－17

2. 代表者：（所属・職名）

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 富銘 一文

共同研究者：（所属・職名）

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・教授 小松 かつ子

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野・助教 朱 妹

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・教授 平山 謙二

長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・助教 水上 修作

長崎大学熱帯医学研究所臨床開発学分野・准教授 グエン フィ ティエン

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・助教 ムハマド チェリフ サマ

長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野・大学院生 田山 雄基

3. 決定額：350千円

4. 申請時書類より

①研究目的

申請者らはこれまでに蓄積された伝統薬物に関する知識・分析技術を活用し、抗トリパノソーマ薬の開発を目的として、和漢医薬学総合研究所が所有する和漢薬ライブラリーを構成する生薬由来化合物・生薬及び漢方方剤の持つ抗トリパノソーマ活性について検討を行う。実験系としては、熱帯医学研究所が持つアフリカトリパノソーマ、アメリカトリパノソーマの *in vitro* 培養システムを使用する。培養液中への生薬由来化合物及び生薬エキス・漢方方剤エキスの添加によるトリパノソーマの増減をコントロールと比較して効果判定を行う。

②研究内容

本年度は熱帯医学研究所にて、申請者らが提供する和漢薬ライブラリーに含まれる生薬由来化合物・抽出物及び漢方方剤が持つ抗トリパノソーマ活性の検討を、*in vitro* 培養システムを用いて行う。

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

生薬由来化合物・生薬エキス及び漢方方剤エキスから構成される和漢薬ライブラリーは、和漢医薬学総合研究所が調製する。使用濃度は伝統医薬データベースに公開されている情報から決定する。

(2) *In vitro* でのトリパノソーマ原虫培養と化合物等添加処理

熱研が所有しているアフリカトリパノソーマ(*Trypanosoma brucei*)とアメリカトリパノソーマ(*T. cruzi*)を使用する。96 ウェルプレートに通常の培養条件に従って各種トリパノソーマ原虫を準備し、培養液中に生薬由来化合物及び抽出物・漢方方剤エキスを添加し、37℃インキュベーター内で48時間培養する。

(3) 感染トリパノソーマ原虫の検出と抗トリパノソーマ効果の算出

アラマーブルー染色により、トリパノソーマ原虫を検出する。化合物・生薬エキス・漢方方剤エキスを添加していないコントロールウェルの結果と比較することにより、抗トリパノソーマ活性を算出する。

なお、抗トリパノソーマ活性と同時に細胞傷害性を検討することによってその安全性も確認する。

(4) 抽出物・漢方方剤の活性指標となる化合物の同定

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

③予想される成果

平成28年度に行った抗マラリア薬のスクリーニングでは、有望な化合物・抽出物が和漢薬ライブラリーよりみつかった。トリパノソーマに対しては十分な効果を持つ薬剤が未だに発見されていないため、抗マラリア薬のスクリーニング同様に、本研究から抗トリパノソーマ薬の候補が見つかることが期待される。

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

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

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【材料】

平成 29 年度、本課題では病原体としてアメリカトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)の Tulahuen 株を使用した。原虫はアラマーブルー (invitrogen) 染色により検出した。

また、ルシフェラーゼ発現する Tulahuen 株の組換え体も使用したため、その際は、ルシフェラーゼの基質を含む試薬ピッカジーン (Wako) を用いて原虫検出を行った。

【方法】

● 培養方法

エピマスティゴート型の *T. cruzi* は、Lit メディウムに懸濁され、27℃インキュベーター内で培養された。(メタサイクリック型の頻度を低下させるために、メディウム置換後 1 週間以内にアッセイを行うこととした。)アマスティゴート及びトリポマスティゴートの誘導には、宿主細胞として AMB (adult mouse brain) 細胞を用いた。25 cm² フラスコ内で MEM メディウムを用いて宿主細胞を培養し、ここにエピマスティゴート (1.5x10⁵) を感染させた。24 時間後に感染できなかったエピマスティゴートを除き、培養を継続した。3-4 日後にはアマスティゴートが、7 日後にはトリポマスティゴートが観察された。

● *In vitro* 実験における各種サンプルの抗原虫活性測定方法

(ここでは、既に条件の最適化が完了したエピマスティゴートについてのみ記す。)

エピマスティゴート型の *T. cruzi* を 5×10⁶/mL になるようメディウムに準備し、96 well クリアボトムプレートに 100 µL ずつ播種した。

ここに各種サンプルを含むメディウム 25 µL を添加した。最終濃度は、生薬由来化合物が 20 µM、生薬エキス・漢方方剤エキスが 20 µg/mL になるように調製を行った。

27℃インキュベーターで 48 時間処理した後に、アラマーブルーを 12.5 µL 添加しさらに 24 時間培養(サンプル処理)を継続した。その後、プレートリーダーで蛍光量の測定(Ex 544 nm、Em 590 nm)を行い、この結果をコントロールと比較することにより、各サンプルのエピマスティゴート型 *T. cruzi* に対する活性を算出した。

【手続き】

病原体を用いた感染実験及び組換え体の使用に際しては、必要な講習会の受講・登録・申請を行い、承認を得たうえで実験を開始した。

②成果 (結果+考察)

まず、生薬由来化合物 96 種及び生薬エキス 120 種、漢方方剤エキス 42 種から構成される和漢薬ライブラリーについて抗トリパノソーマ活性を検討するための準備を行った。

和漢医薬学総合研究所側では、上記に示した和漢薬ライブラリーの調製を行い、熱帯医学研究所側へ送付した。あわせて生薬エキス及び漢方方剤エキスについて、LCMS を用いた成分プリファイリングを行い、和漢研で管理している伝統医薬データベースに登録し、公開した。

熱帯医学研究所では、トリパノソーマの培養方法及びアッセイ方法の確認を行った。

当初、アメリカトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)、アフリカトリパノソーマ(*T. brucei*)に対する検討を並行して行う計画であったが、アメリカトリパノソーマの異なる形態(エピマスティゴート、アマスティゴート、トリポマスティゴート)すべてに対して解析を慎重に進めた方が良くと考え、こちらから先に検討することとした。

まず、アメリカトリパノソーマの異なる3つの形態についてそれぞれの培養条件の最適化を行った。続いて、サンプル処理の条件についても最適化を開始し、最初に検討を行うこととしたエピマスティゴートについては、上記①に述べた条件に決定した。

条件設定後、和漢薬ライブラリーに含まれる化合物の持つ抗エピマスティゴート活性検討を開始した。アラマーブルー染色を用いて抗原虫活性の検討を行ったところ、試験した化合物の中には、ポジティブコントロールとして用いたベンズニダゾールよりも強い活性を持ち、かつ安全な化合物は確認できなかった。ただし、この実験系では、バックグラウンドレベルが非常に高く、細かい活性の差を十分に検出できる感度はないことも示唆された。このため使用する実験系を、バックグラウンドレベルの低下を目指して、ルシフェラーゼを発現する組換え原虫を基質の添加で発光させるものに変更した。現在この実験系の最適化を進めている最中であり、最適な条件が確立できた後に、各種検討を再開する予定である。

このため、細胞傷害性試験を先行して行ったが、これまでのところ AMB 及び NBMH (new born mouse heart) 細胞に対して強い細胞傷害を示したサンプルはわずかしがなく、多くは十分な安全性を持っていると考えられた。

③成果の公表

該当なし

6. 自己評価

和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物 96 種及び生薬エキス 120 種、漢方方剤エキス 42 種）からの抗トリパノソーマ活性をもつ化合物及び生薬、方剤を見出すことを目的に、アメリカトリパノソーマに対する活性を評価可能なスクリーニング系の確立を目指し検討を進めた。アラマーブルー染色法による抗トリパノソーマ試験法を確立することができ、生薬由来化合物について評価を行った。ポジティブコントロールを上回る活性をもつ化合物を見いだすには至っていないが、活性試験を遂行することができた。一方で本法には感度の面で問題があることが示唆されたため、より感度の高いルシフェラーゼを発現する組換え原虫を用いた実験系へ変更することとした。

並行して行った細胞傷害性試験においては、強い細胞傷害を示す供試化合物はわずかであり、多くが安全性をもつことが示唆されている。

今後、ルシフェラーゼアッセイ系を用いたスクリーニングにより、抗トリパノソーマ活性をもつ生薬及び漢方方剤、生薬由来化合物を早急に見出すとともに、抗トリパノソーマ活性をもつ生薬及び漢方方剤成分の分画を進め、活性化合物の同定を行うことを計画している。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

② （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 29 年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ケニアにおけるロタウイルスゲノム多様性の解析

課題番号：29－ 一般 －18

2. 代 表 者：（所属・職名）河本 聡志（藤田保健衛生大学医学部・講師）

共同研究者：（所属・職名）谷口 孝喜（藤田保健衛生大学医学部・教授）

前野 芳正（藤田保健衛生大学医学部・准教授）

井手 富彦（藤田保健衛生大学共同利用研究施設・助教）

3. 決 定 額： 700 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・アジアを中心に年間 25 万人以上の乳幼児が死亡している。ヒトに対する 2 種のロタウイルスワクチンが開発され、130 ヶ国以上で認可、70 ヶ国以上で定期接種されている。ワクチンの有効率は、先進国できわめて高く、開発途上国ではかなり低い。その理由は、開発途上国では特異な血清型（遺伝子型）を有するウイルス株が分布すること、ヒトおよび動物ロタウイルス株間での遺伝子再集合（リアソートメント）が起きていることなどが考えられる。また、ワクチン接種開始後に、特定の遺伝子型を有するロタウイルスの検出が高頻度となり、分布ウイルス株の性状にさまざまな変化が見られるようになった。本研究では、ケニアにおけるワクチン接種開始前後でのロタウイルス株の遺伝子型、遺伝子構成の変遷とその機構、特にワクチン効果と分布するロタウイルス株の性状との関連を調査する。

②研究内容

小児病院のロタウイルス胃腸炎下痢便を収集し、抽出したウイルスゲノム RNA を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるゲノム RNA パターン、RT-PCR による G/P タイプの決定、非定型的ウイルス株、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）を用いて全ゲノムシーケンス解析を行う。これにより、G/P タイプの分布を知るとともに、非定型的ウイルス株の全 11 本の分節ゲノム各々の由来を明確にし、ケニアにおけるロタウイルスゲノムの多様性の実態とその生成メカニズムを把握する。ロタウイルスの大きな変異は開発途上国で異種間伝播を経て発生しやすいので、世界的視野に立ってロタウイルスの生態と進化を追究する。

研究手法は以下の通りである。

1. 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胃腸炎患者の下痢便を収集する。
2. ロタウイルスゲノムの解析：A. 約 20%の便懸濁液を Eagle's MEM を用いて調製する。

B. 便懸濁液からウイルス RNA ゲノムを抽出する。C. 抽出 RNA ゲノムを用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 解析する。D. Semi-nested RT-PCR により G/P タイプを決定する。E. 非定型的ウイルス、および、一部の定型的ウイルス株について、次世代シーケンサー (MiSeq) による全ゲノムシーケンシングを行う。決定した塩基配列を用いて各々の遺伝子の系統樹解析を行い、各遺伝子セグメントの由来を明らかにする。

③予想される成果

これまでの経緯から、アフリカにおけるロタウイルス株の性状を解析することにより、さまざまなリアソータント株が検出できるものと期待される。特に、密な接触に関連すると思われる、ブタ、ウシといった動物ロタウイルス由来の遺伝子セグメントを有する稀有なウイルス株が検出できると考えられる。一方で、全ゲノムシーケンス解析により、全 11 本の各遺伝子の由来を明確にできることから、こうしたリアソートメントは進化的レベルというスケールではなく、リアルタイムで高頻度に起きていることが明らかにできると思われる。また、ロタウイルスワクチン導入に伴い、アフリカにおいても DS-1 様 G1/2/3/8P[8] 株が検出されるかもしれない。何故、異なる遺伝子群のセグメントが大きく、同時に入れ替わるのか？その疑問に答えることができる手掛かりが得られると期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

ケニアのキアンブ地域（首都ナイロビの郊外）において、2009～2016 年に5歳以下の下痢症患者からロタウイルス抗原陽性 520 便検体を収集した。この収集にあたっては、KEMRI ERC(倫理委員会)の承認を得ている。便検体を MEM にて約 20%の懸濁液とし、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。これら便検体からロタウイルスゲノム RNA を抽出し、semi-nested RT-PCR により、VP7 遺伝子と VP4 遺伝子の G/P タイピングを行った。本法では、1st PCR においては、A 群ロタウイルスの 5'および 3'末端領域に共通のプライマーを用いて、VP7 遺伝子では全長 1,062 塩基、VP4 遺伝子では 1,084 塩基（あるいは 965 塩基）の cDNA 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（reverse）のプライマーと各 G タイプに特異的なプライマー（forward）のプライマーセットを、VP4 遺伝子では、5'末端共通領域（forward）のプライマーと各 P タイプに特異的なプライマー（reverse）のプライマーセットを使用した。VP7 遺伝子、VP4 遺伝子それぞれにおいて、増幅される cDNA バンドの長さにより G/P タイプを決定した。また、非定型的な G/P タイプを有する株については、MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行い、全ゲノムシーケンスに基づく系統関係を調査した。系統樹の作成には、MEGA7 を使用し、ML 法により行った。

②成果（結果＋考察）

ロタウイルス粒子は、11 本の分節遺伝子をゲノムとして保有する。ウイルス粒子表面の 2 つの感染防御抗原 VP7 と VP4 は独立した 2 種類の血清型（遺伝子型）G および P タイプをそれぞれ規定し、G1~35、P[1]~[50]と多様性は顕著である。さらに、他の遺伝子にも多様性が認められ、全 11 本の全ての遺伝子型（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。ヒトでは、Wa 様遺伝子群と DS-1 様遺伝子群の 2 つに大別されるが、遺伝子型はおのこの G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1、G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 と表記される。

今回、ケニアにおいて検出されたロタウイルスの G/P タイプの組み合わせとして、5 種類の定型的株（G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8]）と 14 種類の非定型株（G1P[4], G1P[6], G2P[8], G3P[4], G3P[6], G4P[4], G8P[4], G8P[6], G8P[8], G9P[4], G9P[6], G12P[4], G12P[6], G12P[8]）が検出された。非定型的株のうち G8P[4]株が 34 例（6.5%）見られ、ケニアにおける特異なロタウイルスの分布状況を示した。G8 はそもそもウシで見られる G タイプであり、先進国ではほとんど見られない。また、P[4]は G2 との組み合わせが一般的であることから、ウシとヒト由来のロタウイルスが遺伝子再集合を起こしてリアソータントが発生し、何らかのヒトにおける増殖・伝播の有利性を獲得し、ケニアといったアフリカで多く流行するようになったと考えられる。これら G8P[4]株のうち代表的な 6 株について MiSeq シーケンシングを行い、全ゲノム塩基配列を決定した。これら G8P[4]株の全 11 本の遺伝子型はいずれも G8-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であり、系統樹解析からはこれらの株はほぼ同一であり、これまでにケニアなどのアフリカ諸国から報告されている G8P[4]株と近縁であることが明らかになった。これらのことから、ウシ

G8 株とヒト G2P[4]株がリアソートメントを起こして G8P[4]株が発生し、アフリカでヒト-ヒト間で安定に感染を繰り返しているものと推測された。

一方で、ケニアにおいてロタウイルスワクチン (Rotarix) が導入された 2014 年 7 月以降に検出が増加した非定型的株として G3P[6]株 (7 株; 1.3%) が挙げられる。G3 は P[8]との組み合わせが一般的であり、内部遺伝子は通常 Wa 様である。そこで、代表的な G3P[6]株の 2 株について、MiSeq シーケンシングを行い、全ゲノム塩基配列を決定した。これら G3P[6]株の全 11 本の遺伝子型はいずれも G3-P[6]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であり、DS-1 様のバックボーンを有していた。系統樹解析からは、2 株の G3P[6]株はほぼ同一であり、VP7 および VP4 遺伝子は近年に米国で分離された G3P[6]と近縁であったが、残る 9 遺伝子はいずれも、ウガンダ、ガーナ、南アフリカといったアフリカ諸国で分離された株と近縁であることが明らかになっている。

ケニアにおいてもロタウイルスワクチンが 2014 年 7 月に導入開始された。ワクチン投与開始前後の自然界におけるロタウイルス株の遺伝子型分布に及ぼす影響を慎重に調査しなければならない。他国では、ロタウイルスワクチン接種の拡大とともに、分布ロタウイルス株に G タイプの大きな変遷がみられる。Rotarix が 2006 年に導入されたブラジル、さらに、2007 年に導入されたベルギーにおいては、その後 G2 の比率が上昇した。また、2007 年からオーストラリアでは地域によって異なるワクチンが導入されたが、Rotarix 接種地域では G2 が、RotaTeq 接種地域では G3 の比率が上昇した。こうして、ロタウイルスワクチンによる選択圧の影響で、分布するロタウイルス株の遺伝子型が変化したかどうかが議論となっている。わが国においても 2011 年からロタウイルスワクチンが導入されたが、それまで検出されたことのなかった、DS-1 様 G1P[8]株が全国的に高頻度で検出されるようになった。遺伝子型は G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であり、Wa 様遺伝子群と DS-1 様遺伝子群の間にリアソートメントが起きたことになる。私たちは、2013 年からタイにおいても DS-1 様 G1P[8]株が高頻度に検出されること、その起源はわが国の DS-1 様 G1P[8]株と同一であることを報告した。さらに、G1P[8]以外に、動物ロタウイルス由来遺伝子セグメントを有する G3P[8], G8P[8]が出現し、アジア、ヨーロッパ、南北アメリカ、オセアニアの国々からも次々と報告されており、世界的に急速な感染拡大の様相を示している。アフリカでも、マラウイではロタウイルスワクチン導入直後に DS-1 様 G1P[8]株の出現が報告された。ケニアにおいても、DS-1 様 G1/3/8P[8]株が検出されるかもしれない。ロタウイルスワクチン接種開始前後でのロタウイルス株遺伝子型の分布状況の変化について、注意深く調査する必要がある。

③成果の公表

論文発表

Wandera EA, Mohammad S, Bundi M, Komoto S, Nyangao J, Kathiiko C, Odoyo E, Miring'u G, Taniguchi K, Ichinose Y. Impact of rotavirus vaccination on rotavirus and all-cause gastroenteritis in peri-urban Kenyan children. *Vaccine*. 2017 35(38):5217-5223.

6. 自己評価

初年度として ELISA によるスクリーニング、RT-PCR によるジェノタイピングが軌道に乗った点は十分に評価できる。さらに、一部の非定型的株については MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行い、ケニアのロタウイルス研究においても全ゲノムシーケンス解析が威力を発揮し始めている。来年度には、第一報として、ケニア G3P[6]株の全ゲノムシーケンス解析についての論文を国際誌に投稿予定である。その後も、稀有な G/P タイプ組み合わせを有する株を中心に全ゲノム解析を進め、わが国のような先進国ではほとんど見られないロタウイルス株の起源と進化についての重要な知見を蓄積していきたいと考えている。

2014 年 7 月より、ケニアにおいてもロタウイルスワクチン（Rotarix）が導入開始された。本地域においても、DS-1 様 G1/3/8P[8]株が出現するかもしれない。これらの株は、通常の RT-PCR に基づいた解析では検出することができない。最も効果的な方法は、抽出したウイルスゲノム RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析することである。現在は、ケニアにおけるポリアクリルアミドゲル電気泳動解析はまだ途中段階であるので、技術移転を早急に行うべきと考えている。また、ワクチン導入開始前後の自然界におけるロタウイルス遺伝子型が影響を受けて、どのように変遷するのかを長期的に調査する必要がある。今年度の研究成果を基礎として、さらに発展させる道筋をつけることができた点には満足している。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ジカウイルス感染関連ギラン・バレー症候群の発症メカニズム

課題番号：29－一般－19

2. 代表者：（所属・職名）会津大学短期大学部・教授 左 一八

共同研究者：（所属・職名）

3. 決定額： 350 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ジカ熱はフラビウイルス属フラビウイルス科のジカウイルスの感染によって引き起こされる急性熱性疾患である。2007年ミクロネシアのヤップ島での流行、2015－2016年にブラジルを中心とした大規模な流行など熱帯・亜熱帯地域を中心として世界規模で流行している。ヒトは、ジカウイルスに感染したネッタイシマカやヒトスジシマカなどによる吸血時に感染する。同じ媒介蚊により感染する同属のデングウイルスとは異なり、輸血や性行為によっても感染すること、感染母体から胎児への感染により先天性ジカウイルス感染症（小頭症）を引き起こすことなどの特徴を有している。また、ヤップ島やブラジルでの大規模なジカウイルス感染流行時にギラン・バレー症候群（GBS）が多発したことから、ジカウイルスによる先行感染との関連性が報告されている。

GBSは、遠位運動神経軸索障害を主因とする急性四肢運動麻痺を主症状に、感覚神経障害を時に随伴する疾患である。感覚神経障害を呈しない急性運動軸索型ニューロパチー（AMAN）、外眼筋麻痺、運動失調や腱反射消失を特徴とするフィッシャー症候群（FS）などいくつかの亜型がある。GBS患者血清中にはシアル酸と呼ばれる糖を含む糖脂質（ガングリオシド）に対する抗体（IgG1、IgG3、IgM）が高頻度に検出される。ガングリオシドは哺乳動物の脳神経系を中心に広く分布しており、神経栄養や分化など神経機能維持に関与している。運動神経などの神経軸索を取り囲む髄鞘（Ranvier 後輪部）に特に豊富に存在しており、神経伝達における電気生理学的機能維持に関わる必須の構造物質である。ヒト体内で産生された抗ガングリオシド抗体が血液－神経関門が緩やかな神経－筋接合部における Ranvier 後輪軸索膜に結合し、補体を活性化して軸索障害を引き起こすことにより発症すると考えられている。

GBSは、呼吸器上皮あるいは消化管上皮において微生物・ウイルスの先行感染後に高頻度に発症することが報告されている。上気道におけるインフルエンザウイルス感染による気道粘膜炎症や消化管における *Campylobacter jejuni* 感染による腸炎後に発症することがよく知られている。これらの病原微生物・ウイルス粒子表面にヒトの生体内に存在するガングリオシドあるいはその類似の糖鎖分子が存在しており、これらの分子が上皮粘膜組織下に存在する免疫細胞に認識されて抗体が産生される。インフルエンザウイルスはエンベロープウイルスであり、ヒトの体内で増殖後、ヒトに由来するガングリオシドを含む脂質

膜を被覆して出芽する。一方、*Campylobacter jejuni* は、細胞壁を構成する Lipopolysaccharide (LPS) 糖鎖に、ヒト体内に存在するガングリオシドと同一の糖鎖構造を有することが明らかにされている。体外から侵入する病原微生物・ウイルスが、その表面にヒト体内に存在する物質と分子相同性を有する分子を発現している場合に GBS 発症リスクが高まるものと考えられている。

ジカウイルスは、節足動物（蚊）媒介性のエンベロープウイルスであり、蚊の体内で増殖したウイルスが皮膚を通してヒトに侵入、感染することから、侵入時、ウイルス粒子表面上にヒトに由来する分子は発現されていない。一方、同様の経路で感染するデングウイルスについては、その先行感染と GBS 発症との関連についてこれまでに報告がなく、ジカウイルス感染に特徴的な GBS 発症の主因となる抗ガングリオシド抗体産生機序は不明である。近年、ジカウイルスが効率良く皮膚細胞（真皮細胞、繊維芽細胞）に感染することが報告され、ジカウイルス感染における皮膚細胞の役割が注目されている。

本研究では、デングウイルスを対照として、異なる種（蚊およびヒト・サル）由来細胞で増殖させたジカウイルス膜表面に存在し、GBS 関連ガングリオシドと分子相同性を有する抗原分子を探索、同定することを目的とする。

②研究内容

霊長類をはじめとする哺乳動物に存在するガングリオシドは、シアル酸（NeuAc）と呼ばれる糖とガラクトース（Gal）の共通構造に加え、多種の糖、多様な糖-糖間結合様式を有する糖脂質のファミリー分子である。一方、蚊をはじめとする節足動物は共通構造である 2 種の糖を有しておらず、ガングリオシドファミリーの糖脂質が存在しない。本研究は、ジカウイルス感染関連 GBS 発症の主因となるガングリオシドと分子相同性を有する糖鎖分子を探索・同定するための以下の 2 つの実験項目からなる。

（１）ジカウイルス感受性蚊由来および霊長類由来細胞からのガングリオシド相同性分子の探索と同定

異なる種由来、異なる組織由来の細胞から脂質を抽出し、糖脂質・ガングリオシド組成を解析する。さらに抗ガングリオシド抗体による GBS 関連ガングリオシド（糖脂質）相同性分子の探索・同定を行う。

（２）蚊由来・霊長類由来細胞で増殖させたジカウイルス粒子からのガングリオシド相同性分子の探索と同定

ウイルス粒子から脂質を抽出し、抗ガングリオシド抗体による GBS 関連ガングリオシド（糖脂質）相同性分子の探索・同定を行う。

③予想される成果

GBS は、ポリオ感染が世界的に終息に向かっている現在において、急性筋力麻痺を伴う神経・筋関連疾患の中で最も患者数が多い病気である。高速・大量交通手段が発達した現代において、ジカウイルス感染の流行拡大リスクは高まっており、ジカウイルス先行感染による近年の GBS 患者の急増は世界的規模での公衆衛生上の対策が必要であることを示している。

ジカウイルス流行地域は従来からのデングウイルス流行地域と重なっていることから、

近年侵淫したジカウイルスの感染に関連して発症した GBS 患者の急増は、同属ウイルス、同一媒介蚊による類似感染経路をもつそれぞれのウイルスが、生体内でウイルスタンパク質以外の因子により異なる認識を受けている可能性を強く示唆している。本研究課題の遂行により、従来のウイルスタンパク質に対する宿主免疫認識による抗体産生とは異なる宿主自己免疫を誘導する認識の機序の一端が明らかになる。さらに、ジカウイルス初期感染標的組織（細胞）に関する知見もあわせて得られる。その成果は、流行拡大を続けるジカウイルス感染による公衆衛生上の大きな課題となっている GBS に対する新たな予防、治療法の開発に寄与するものと期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【細胞培養】

フラビウイルス感受性を有する異なる由来の 5 種類の培養細胞株、シリアンハムスター腎臓由来細胞株 BHK-21、ヒト肝臓ガン由来株 Huh-7、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562、アフリカミドリザル腎臓上皮由来細胞株 Vero、ヒトスジシマカ幼虫由来細胞株 C6/36 を、各細胞の推奨培養条件で培養して実験に用いた。

【ウイルス】

ジカウイルス (ZV) H/PF/2013 株（フランス領ポリネシア分離株）、日本脳炎ウイルス (JEV) S-982 株、デングウイルス 2 型 (DEN2) 00st22A 株（フィリピン分離株）をそれぞれ 2 種類の細胞（Vero 細胞、C6/36 細胞）で増殖させて実験に用いた。

【フラビウイルス感受性細胞株からの総脂質抽出、糖脂質・ガングリオシド画分調製】

予め-80℃で凍結保存しておいた $1-3 \times 10^8$ 個の培養細胞に 0.1 ml の精製水を加えて懸濁させた後、2 ml/ 10^8 個となるように $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1: 1, v/v) 混合液を加えて 1-2 分間超音波処理を行った。室温に 4 時間放置した後、ろ過してろ液①を得た。残渣に $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30: 60: 8, v/v/v) 混合液を加えて 1-2 分間超音波処理を行った。これを室温にて一晩放置した後、ろ過してろ液②を得た。ろ液①と②を合わせ、ロータリーエバポレータで溶媒を減圧留去した。濃縮乾固物に 1 ml/ 10^8 個となるように $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2: 1, v/v) 混合液を加えて溶解したものを細胞総脂質画分とした。

総脂質画分 0.5 ml (5×10^7 個細胞に相当) をナシ型フラスコにとり、溶媒を減圧留去した。濃縮乾固物に 1 ml の 1N NaOH 含有 MeOH を加えて 37℃で 3 時間、加水分解を行った。溶媒を減圧留去した後、0.5 ml の Phosphate-buffered saline (PBS) を加えて 1-2 分間超音波処理を行った。この溶液を C18 逆相カートリッジカラムにアプライした。精製水でカラムを十分に洗浄した後、0.5 ml の MeOH および 1 ml の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1: 1, v/v) 混合液で連続溶出した。溶出液をガラス試験管にとり、窒素気流下で溶媒を留去した。濃縮乾固物に 0.5 ml の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2: 1, v/v) 混合液を加えて溶解したものを細胞糖脂質画分とした。

【フラビウイルスからの総脂質抽出】

予め-80℃で凍結保存しておいたウイルス懸濁液（タンパク質総量として 0.5-0.7 g）に

10 倍量の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1: 1, v/v) 混合液を加えて Vortex でよく混合、 4°C で 48 時間放置した。1-2 分間超音波処理を行った後、ろ過してろ液を得た。ろ液をロータリーエバポレータを使用して溶媒を減圧留去した。濃縮乾固物に 2 ml の PBS を加えて 1-2 分間超音波処理を行った。この溶液を C18 逆相カートリッジカラムにアプライした。精製水でカラムを十分に洗浄した後、0.5 ml の MeOH および 1 ml の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1: 1, v/v) 混合液で連続溶出した。溶出液をガラス試験管に集め、窒素気流下で溶媒を留去した。濃縮乾固物に 0.5 ml/mg タンパク質となるように $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2: 1, v/v) 混合液を加えて溶解したものをウイルス総脂質画分とした。

【脂質成分分析】

コレステロール定量分析： 細胞総脂質画分 (2×10^5 個細胞相当量) およびウイルス総脂質画分 (6 μg タンパク質相当量) をガラス TLC プレート (TLC Silica gel 60, Merk #05626) にアプライし、よく風乾した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95: 5, v/v) 混合液を展開溶媒としてコレステロールをプレート上で分離した。濃硫酸／酢酸(1: 1, v/v) 混合液をプレート上に均一に噴霧してコレステロールを検出した。濃度既知の標準コレステロール溶液を同時に分離・検出して、その各スポットの濃さを画像撮影・解析装置を使って解析、細胞およびウイルス粒子中に含まれるコレステロール量を求めた。

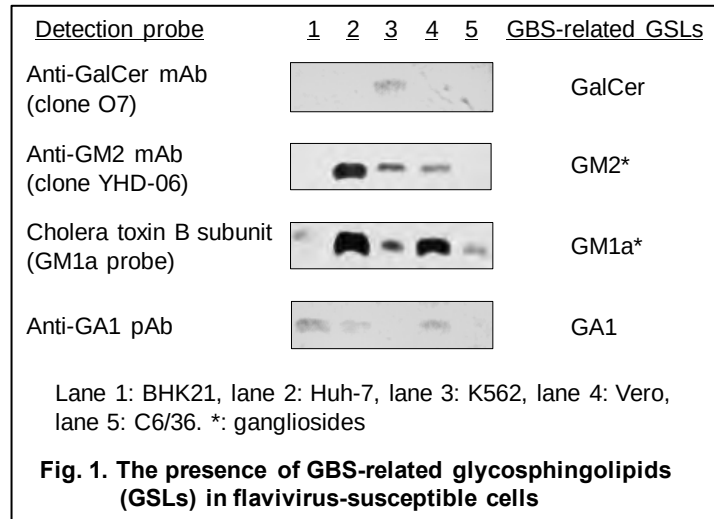
リン脂質定量分析： 細胞総脂質画分 (4×10^5 個細胞相当量) およびウイルス総脂質画分 (15 μg タンパク質相当量) をガラス TLC プレート (TLC Silica gel 60, Merk #05626) にアプライし、よく風乾した後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65: 35: 4, v/v/v) 混合液を展開溶媒として各リン脂質をプレート上で分離した。Dittmer 試薬をプレート上に均一に噴霧してリン脂質を検出した。濃度既知の標準フォスファチジルコリンおよびフォスファチジルエタノールアミン溶液を同時に分離・検出して、その各スポットの濃さを画像撮影・解析装置を使って解析、細胞およびウイルス粒子中に含まれる各リン脂質量を求めた。

糖脂質定性・定量分析： 糖脂質 (ガングリオシドを含む) の分析は、AMAN 型 GBS 関連ガングリオシドである GM1a に対する特異的検出プローブであるコレラトキシン B サブユニット (CTB) など、GBS 関連糖脂質・ガングリオシド抗体を検出プローブとして使った TLC-immunostaining 法により行った。細胞糖脂質画分 (4×10^5 個細胞相当量) およびウイルス総脂質画分 (4-10 μg タンパク質相当量) をプラスチック TLC プレート (POLYGRAM SIL G, Macherey-Nagel #805013) にアプライし、よく風乾した後、アセトンおよび $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5: 4: 1, v/v/v) 混合液を展開溶媒として連続展開して糖脂質をプレート上で分離した。プレートを 1%ウシ血清アルブミン含有 PBS (1%BSA-PBS) に浸して 4°C で 16 時間、ブロッキングした。糖脂質検出プローブを含む 1%BSA-PBS 中で室温、2 時間反応させた。プレートを PBS で洗浄した後、HRP 標識二次抗体を含む 1%BSA-PBS 中で室温、1 時間反応させた。プレートを PBS で洗浄した後、HRP 基質溶液を加えて、糖脂質を検出した。濃度既知の標準 GM1a 溶液を同時に分離・検出して、その各スポットの濃さを画像撮影・解析装置を使って解析、細胞およびウイルス粒子中に含まれる GM1a 量を求めた。

②成果 (結果＋考察)

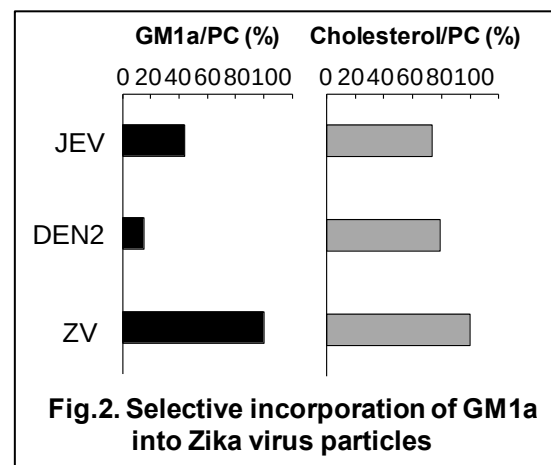
(1) フラビウイルス感受性細胞に存在する GBS 関連糖脂質・ガングリオシド

ZV を含むフラビウイルス感染感受性細胞株のうち、4 種類の哺乳動物由来および 1 種類の昆虫（蚊）由来の細胞株に GBS 関連糖脂質・ガングリオシドが存在することが明らかとなった（Fig. 1）。細胞株の由来する組織・種の違いを反映して糖脂質の質・量に違いが認められた。GBS 関連糖脂質・ガングリオシドはこれまでに哺乳動物にのみその存在が知られていたが、今回初めて蚊幼虫由来 C6/36 細胞株にも AMAN 型 GBS の原因とされる GM1a と同様の糖鎖構造をもつ糖脂質分子の存在が示された。ヒトへの感染時、蚊の体内で増殖したウイルス粒子に取り込まれた GM1a と相同性を有する昆虫型糖脂質に対する抗体産生がある。GBS 発症の原因となる可能性がある。一方、ウイルス増殖に頻用される Vero 細胞には、AMAN 型のほか、Fisher 症候群の原因とされる GM2 と呼ばれるガングリオシドも検出された。ヒトでの ZV 感染では、腎臓でウイルスが増殖する可能性が示唆されていることから、腎臓で増殖したウイルスに取り込まれたヒト由来の多様な GBS 関連糖脂質・ガングリオシドに対する抗体産生の可能性がある。



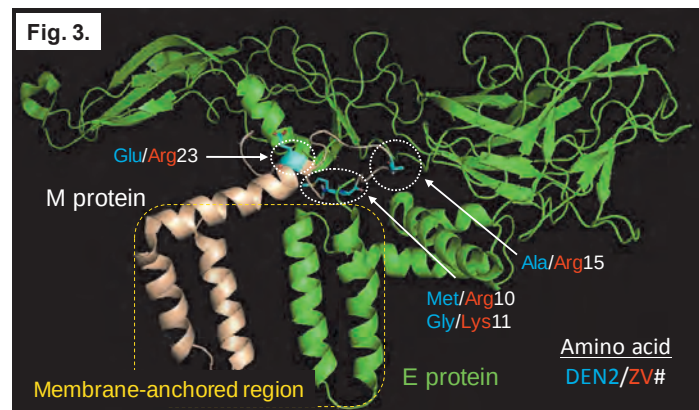
(2) ジカウイルス粒子への GM1a 糖脂質の選択的取込

多様な GBS 関連糖脂質・ガングリオシドを含む Vero 細胞で増殖させた ZV、JEV、DEN2 の 3 種類のフラビウイルスに取り込まれる糖脂質を分析した。対照としてコレステロールとリン脂質であるフォスファチジルコリン（PC）を定量した（Fig. 2.）。Vero 細胞で増殖したウイルス粒子中に検出された GBS 関連糖脂質・ガングリオシドは、GM1a のみであり、他の糖脂質は検出されなかった。ウイルス粒子中に存在する PC に対する相対的な GM1a 量は、ZV では DEN2 に比べて 6 倍以上も高いことが明らかとなった。一方、コレステロールは各ウイルス粒子における存在量に大きな差は認められなかった。



これまでデングウイルスの流行に伴う有意な GBS 患者の発生は報告されていない。今回の研究により、ZV 選択的に GBS 関連ガングリオシド、特に GM1a の取込メカニズムが存在することが示唆された。2013 年のフランス領ポリネシアでのジカウイルス熱流行に続く GBS 患者発生では、AMAN 型症状が主であったことが報告されている。DEN2 と ZV の E および M タンパク質の立体構造の比較から、両タンパク質のウイルス粒子表面近傍に位置するアミノ酸残基の中で、ZV 分離株に共通して保存されている塩基性アミノ酸（M タン

パク質の Arg23 および E タンパク質の Arg10、Lys11、Arg15) が見いだされた (Fig.3.)。GM1a はその分子中に陰性電荷を有するシアル酸と呼ばれる糖を持つ。感染細胞内での ZV 粒子形成時、E および PrM タンパク質上の ZV 特異的な塩基性アミノ酸残基と細胞内オルガネラに存在する GM1a のシアル酸が相互作用することにより、GM1a が選択的に ZV 粒子に取り込まれることが考えられる。以上、本研究で示された ZV 粒子への選択的 GM1a 取込は、ジカウイルス先行感染による GBS 発症のメカニズムの解明に寄与するものと期待される。



③成果の公表

【原著論文】

Makoto Ogata, Ami Koizumi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Mao Sakamoto, Rena Aita, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Takashi Yamanaka Kazuya I.P.J. Hidari (Correspondence): Chemoenzymatic synthesis and characterization of *N*-glycolylneuraminic acid-carrying sialoglycopolypeptides as effective inhibitors against equine influenza virus hemagglutination. Biosci. Biotech. Biochemi. 81(8), 1520–1528 (2017)

6. 自己評価

GBS は、急性筋力麻痺を伴う神経・筋関連疾患であり、近年急激に高まっているジカウイルス感染リスクとともに、その患者の急増に対して世界的規模での対策が必要とされている。ジカウイルス感染に関連して GBS が発症することから、ヒトへのジカウイルス感染においては、同属ウイルス、同一媒介蚊による類似感染経路を持ちながらも GBS 患者発生報告のないデングウイルス感染とは、生体内においてウイルスタンパク質以外の因子による異なる宿主応答が起きている可能性を強く示唆している。

本研究では、デングウイルスおよび日本脳炎ウイルスを対照として、ウイルス感受性細胞で増殖させたジカウイルス粒子膜表面に存在する GBS 関連糖脂質・ガングリオシドおよびその分子相同性を有する抗原分子を探索、同定することを目的として実験を実施した。

本研究課題の遂行により、①蚊由来の細胞に AMAN 型 GBS 関連ガングリオシドである GM1a と相同性のある分子を新たに見出した。これにより、蚊で増殖したウイルス粒子内に取り込まれた GM1a 相同性分子が、ヒト体内で抗原として認識、産生された抗体により GBS が発症する可能性を示した。さらに、②サル腎臓由来 Vero 細胞で増殖させたジカウイルス粒子には AMAN 型 GBS 関連ガングリオシドである GM1a が、同属のデングウイルスに比べて選択的に取り込まれていることを見出した。蚊から侵入したウイルスがヒトの腎臓などの組織・細胞で増殖する際に、抗原となる GBS 関連ガングリオシドを大量に粒子中に取り込むことで宿主免疫系に認識、産生された抗体により GBS が発症する可能性をも示した。これらは、従来のウイルスタンパク質に対する宿主免疫応答による抗体産生とは異なる宿主自己免疫を誘導する認識の機序の一端となる重要な知見である。

本研究で得られた成果は、流行拡大を続けるジカウイルス感染による公衆衛生上の大きな課題となっている GBS に対する新たな予防、治療法の開発に寄与するものと期待される。

以上、本研究はジカウイルス感染に伴う GBS 発症の分子メカニズムとして、ジカウイルス粒子に含まれる GBS 関連ガングリオシドの同定、ならびにウイルス粒子への選択的取込機構の存在を示したことから、当初目標を達成した判断した。このため、下記の 7. 達成度についての自己評価をランク III とした。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- ③ （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 27 年度共同研究報告（自己評価）

1. カテゴリー：一般共同研究

課題名：都市化がもたらす高地集団の新たな健康リスク因子の評価

課題番号：29－一般－20

2. 代 表 者：西村 貴孝（長崎大学医歯薬学総合研究科公衆衛生学分野・助教）

共同研究者：青柳 潔（長崎大学医歯薬学総合研究科公衆衛生学分野・教授）

3. 決 定 額： 300 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

本課題は、海拔 3500m から 4000m に居住する 3 地域の高地集団(ボリビア、ネパール、チベット)から、生体情報、生活習慣、生活環境、ゲノム情報を取得し、統合的解析を行うことで、高地適応と近代化の相互作用と健康問題の関連を明らかにすることを目的とする。

現生人類は出アフリカ後、一部の集団は高地に進出し、過酷な低酸素環境に生体を適応させ今日まで生き抜いてきた。彼らは全身への酸素供給を維持するために、主に循環器系の機能を適応させている。例えば、呼吸量を増やす換気亢進と血中ヘモグロビン量を増加させたアンデス族や、血中酸素濃度(SpO_2)が低くても高い血流量で補うチベット族が代表的であり、遺伝的な適応も含まれると考えられる。

しかしながら、そのような高地集団にも近代化の波が押し寄せ、伝統的な生活習慣が失われつつある。その結果、高地集団においても現代人特有の肥満傾向を中心としたメタボリックシンドロームが増加傾向にあり、それらが引き金となり特有の健康リスクが生じていることが指摘されている。例えば、ヘモグロビン濃度増加は血液粘性も増加させるが、そこに肥満が加わることで循環器系疾患のリスクが途端に増加することが懸念される。また、栄養過剰はミトコンドリア呼吸鎖からの活性酸素漏出を誘導し、動脈硬化や老化促進の因子となり得る。すなわち現代の高地集団は、生活環境および生活習慣の都市化により、高地では有利だったはずの適応が、疾患や老化を促進する因子になるという矛盾があると考えられる。しかしながらそのような視点からのアプローチは極めて少ない。従って、彼らの健康リスクを把握し、その要因を適切に理解することが当該地域の健康増進に寄与する。

②研究内容

申請者がこれまでに取得したボリビアのアンデス集団(約 100 名)と同様の生理データ、質問票を中国チベット族、ネパールチベット族から収集する。具体的には、研究協力者にインフォームドコンセントを得た上で、質問票に答えてもらい、非侵襲的に身長、体重を測定、 SpO_2 、ヘモグロビン濃度、指温度、血圧、脈拍を測定する。また遺伝子解析のため

に唾液を 5ml 程度採取し、専用のキットで保存液と混合する。

本課題では低酸素誘導因子遺伝子の EPAS1 や EGLN1 を含む既知の一塩基多型 (SNP) を解析し、集団間の遺伝子多型頻度の差に加え、血中酸素飽和度 (SPO₂) やヘモグロビン濃度と強く関連する SNP を網羅的に探索する。すでに高地適応や各種疾患と関連が報告されている遺伝子については TaqMan 法を用いて、SNP をタイピングする。次の段階として、次世代シーケンサーを用いたバイオインフォマティクス解析を行い、未知の遺伝子多型や健康リスクと関連する遺伝子を探索する。これらのデータ、解析を統計的に処理し、現代の高地集団が生活環境の変化によって、高地では有利だったはずの適応が疾患や老化を促進する因子となったのか、本来の適応能を失った、もしくは失いつつあるのかを検証する。

③予想される成果

- ・ 高地ではミトコンドリア内呼吸の強化が酸化ストレスを増加させるため老化が早い可能性が議論されており、アンデス族のような血液粘性の増加も健康リスクである。すなわち多様な高地集団の適応と健康リスクがどう関連するのかのメカニズムを明らかにすれば、高地だけではなく低地住民の老化防止や医学の発展にも貢献できる可能性がある。
- ・ 当該地域での生活習慣に基づいた新たな健康リスク因子が明らかとなり、特に生活習慣病との関連性について明らかとなることが期待できる。さらに、その結果に基づいた対応策等の施策を提言できる可能性がある。
- ・ 複数の高地集団を同様の手法で測定・比較した研究はこれまでになく、アンデス、チベット、ネパールのデータを同時に比較することは画期的である。特にネパール集団(ムスタン地域)に関する報告は皆無であり、新しい高地集団の特性を明らかにできる可能性が高い。
- ・ 人類の過去の適応戦略が現代人にもたらす正の側面、負の側面を明らかにすることは、環境の変動が続く現代と未来を生きる我々人類にとって貴重な示唆を与えられ、周辺諸分野への波及効果が大きい。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【ネパールのチベット族調査】

本研究は、ネパール連邦民主共和国のダウラギリ県ムスタン郡にあるツァランという村の住人を対象とした。調査地域の標高は約 3600mであった。現地においては、健診方式で下図のような流れで問診及び生理計測等を実施した。

1. 受付において、インフォームドコンセントを取得し、署名による同意取得を得た。同意が得られなかった場合は対象外とした。その後、記録用紙と番号札を持参してもらい順番に問診・測定を実施した。
2. 身長、体重などの形態測定を実施した。
3. 非侵襲式の光学的測定機器により SpO_2 とヘモグロビン濃度を測定した。その後、カフ式血圧計により血圧を測定し、最後に握力を計測した。
4. 同意した者のみ血液、唾液等を取得した。
5. 現地のチベット語が話せる研究協力者により、問診を行った。問診の内容は自覚症状や経済状況、生活習慣等である。
6. ネパール人医師による診察を行い、3 の血圧測定で高血圧と判定された場合は、2 度目の血圧測定を実施した。
7. 問診や測定に不備がないかを確認し、終了した。

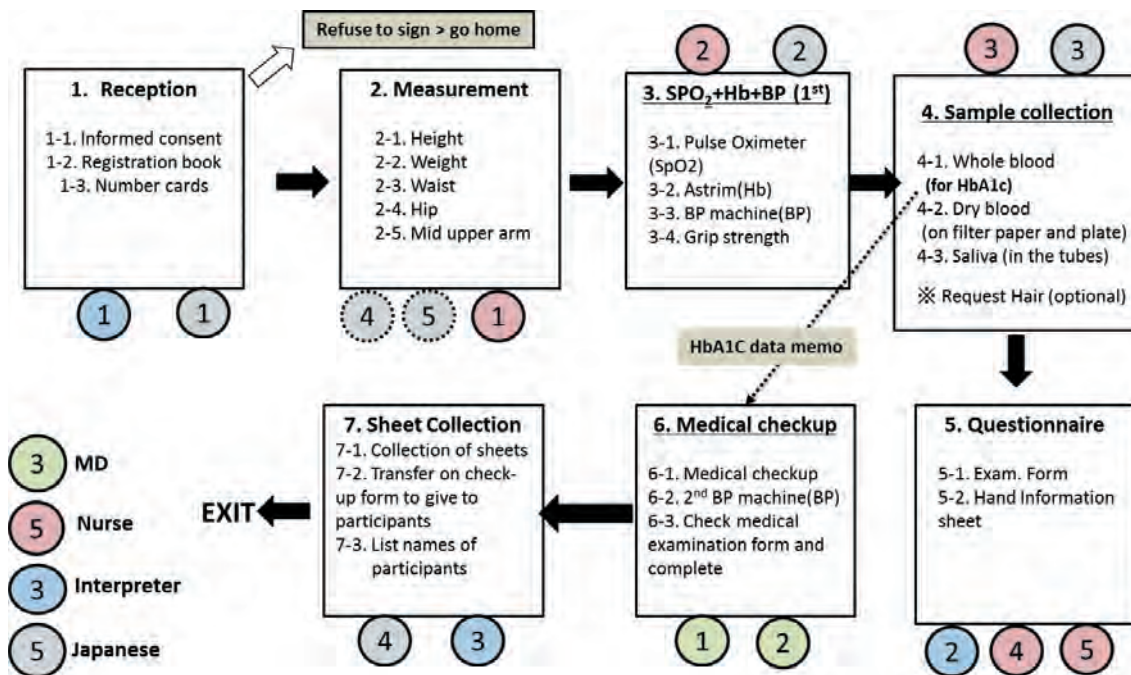


図 1. チベット地域における調査の流れ

【ボリビアのアンデス族調査】

ボリビア共和国ラパス（標高 3700～4000m）に居住する若年成人（男性：52 人、女性：51 人）を対象として、身体測定、生理測定を実施した。研究の目的・方法を十分に説明

した後、同意書にサインをしてもらい測定に参加してもらった。測定はほぼチベット族の調査と同様で、健診形式で身長、体重、握力に加え、動脈血酸素飽和度 (SpO_2)、血中ヘモグロビン濃度、心拍数、指皮膚温度、血管幅等の生理測定を実施した。また生活習慣、運動習慣や自覚症状などを質問紙によって調査した。

②成果（結果＋考察）

【ムスタン地域の結果】

高地ではミトコンドリア内呼吸の強化が酸化ストレスを増加させるため、老化の促進や糖尿病の原因になっていると考えられる。そこで、今回は生体内の酸素レベルである SpO_2 及び糖尿病の判定に用いられる HbA1c の結果について報告する。

現地では約 7 日間滞在し健診を実施した。その間、18 歳以上の 188 名が研究に参加し、問診と身体測定、生理測定を行った。その結果、 SpO_2 が 90% 未満の者が 27.1% であった。これは先行研究よりは比較的高く、チベット集団においても生体内の酸素レベルに多様性があることを示唆する。 HbA1c が 6%～6.5% の糖尿病予備群が 31.6%、6.5% 以上の糖尿病が 4.6% であった。この数値は日本に比べれば低く、低酸素による酸化ストレスの増加よりも、食生活による部分が大きいことを意味するかもしれない。

HbA1c が 6% 以上をカットオフ値としたロジスティック解析を行ったところ、年齢 (OR: 1.11, 95% CI: 1.06-1.16) と SpO_2 (OR: 3.58, 95% CI: 1.20-10.68) が有意な関連を示した。従って、加齢と生体内の低酸素がそれぞれ独立に糖尿病のリスク因子となっていた。これはいわゆるチベット型の適応様式である低 SpO_2 が、糖尿病の増悪に関与していることを示唆する。おそらく、長年の高地居住が生体内の低酸素がもたらし、酸化ストレスが増加することが糖尿病を引き起こすと、より詳細なメカニズムについては検討が必要であると考えられる。

【ボリビアのアンデス集団との比較】

アンデス集団は大学生を対象としたため、比較的若年の参加者が主だった。そこでここでは、ネパールの若年のチベット族との比較を示す。まずボリビアのアンデス集団については、身体計測の結果、男女の平均年齢、身長、体重、BMI はそれぞれ男性：25.6±3.2 歳、165.4±5.2cm、68.0±9.8kg、24.9±3.5kg/m² 女性：24.6±3.2 歳、153.6±6.0cm、56.3±7.4kg、23.9±3.6kg/m² であった。ボリビア人男女間で BMI に有意な差はなかったが、同世代の日本人と比べると身長は低く、体重・BMI は高かった。また生理測定については、女性に比べて男性では、 SpO_2 ($p=0.02$) と心拍数が低く ($p=0.03$)、ヘモグロビン濃度は高かった ($p<0.01$)。男性ではヘモグロビン濃度が高いことから、 SpO_2 や心拍数が低くても生体内の酸素レベルを維持できている可能性がある。

次にチベット集団の 35 歳以下の若年者（男性：27 名、女性：31 名）では、男女の平均年齢、身長、体重、BMI はそれぞれ男性：30.9±4.4 歳、165.8±6.6cm、60.7±8.9kg、22.2±3.5kg/m² 女性：27.7±5.6 歳、152.5±6.6cm、53.0±9.6kg、22.8±3.6kg/m² であった。チベット族男女間で BMI に有意な差はなかった。日本人の若年者と比べると身長は低く、

アンデス族と比べると BMI は低かった。これらは栄養状態や食生活が影響していることが考えられる。生理測定については、男女間では SpO₂ と心拍数に有意な差はなかった。一方で、ヘモグロビン濃度及び収縮期血圧、拡張期血圧は女性に比べ男性で高かった(p<0.01)。これはアンデス集団でも日本人でも同じ傾向であり、居住している高度に関わらず普遍的な性差であると考えられた。

アンデス族とチベット族の SpO₂ を比較すると、チベット族はアンデス族よりも高かった(図 2)。またアンデス族で見られた性差(男性で低い)はチベット族では見られなかった。これは今回調査したチベット族の居住地が高度約 3600m なのに対し、アンデス族では 3700~4000m だったことによる差かもしれない。ただし、これらの SpO₂ の結果は、チベット族で先行研究よりやや高めの数値であり、アンデス族でやや低めの数値であった。どちらの集団もこれまでの研究よりも若い年齢層でのデータなので、若年者という影響も考えられるが、都市化や食生活の変化による影響を受けている可能性がある。従って、生体内の酸素レベルを反映する SpO₂ が今日の高地集団で変化しているのであれば、それは従来もっていた適応能が変化していることを示し、それが高地集団にとって利益なのか不利益なのかを遺伝子解析を含めて、今後慎重に検討する必要がある。

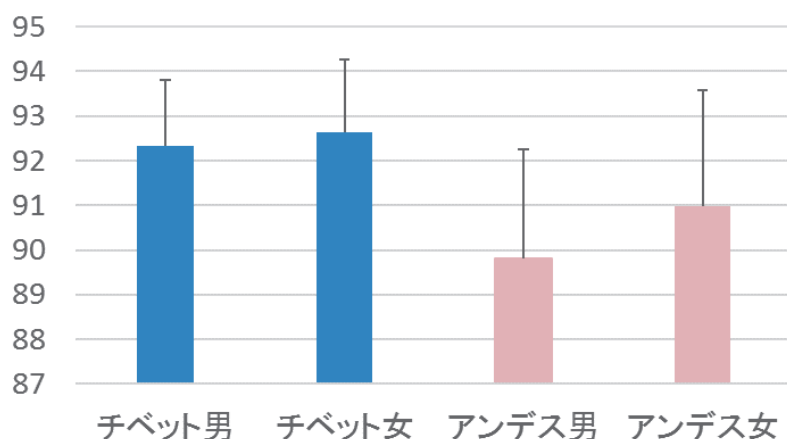


図 2. チベット族とアンデス族の SpO₂ の比較

③成果の公表

日本生理人類学会第 76 回大会、2017 年 6 月 24~25 日、
西村貴孝、他：「ボリビア高地集団における循環動態の適応とその性差について」(口頭発表)

6. 自己評価

本研究は現代の高地集団が生活環境の変化によって、適応能が影響を受けているのかを検証することを目的とした。チベット地域の調査では言語の壁だけではなく、地形的に隔絶された地域での調査であり、調査地に到達するまでも困難の連続であった。そうして得られたデータは極めて貴重なものであり、今後遺伝子解析等を本格化させることで、大きな成果に繋がることが期待される。以上から、本研究は現時点で予想通りの成果を挙げることはできたと考えられる。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

Ⓒ （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙(作成書式)

平成29年度一般共同研究報告(自己評価)

1. 課 題 名:ケニア・ロタウイルス疫学研究への新しい分析技術の応用

課題番号:29-一般-21

2. 代 表 者:長谷川 慎(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部・教授)

共同研究者:

一瀬 休生(長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点長・教授)

和田 昭裕(長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野・講師)

3. 決 定 額: 800 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

結核は発展途上国を中心に多数発生しており、その大部分がアジア、アフリカである。ケニアも例外ではなく、有数の結核の高蔓延国である。本邦では結核保有率は先進国の中では高く、新規発生件数は年間 2 万人弱で推移している。また、旅行者による結核の持ち込みは若年者層に多く、発症に気が付かずに感染を広げるケースも散見される。結核は排菌する結核患者の咳、くしゃみ、唾の飛沫によって空気感染が成立し、十分な感染管理が必要とされる。また、結核菌のみならずエアロゾルを介した伝播が想定される細菌は多いが、その詳細は明らかではない。これは、医学研究者・医療従事者でも空気中の細菌を検出定量できる簡便なモニタリング方法がなく、研究蓄積が不十分なためである。

本課題は、ミクロンオーダーの精密構造を持つ金属膜を利用したエアロゾルセンサー兼捕集装置を用い、空気中に浮遊する結核菌の分離検出をフィールドで行える簡易なデバイスの実証試験を行う。この動作原理となる精密な金属膜は、メッシュ状の繰り返し間隙による特異な光学特性と粒子分画能を持つ。協力企業である(株)村田製作所と共同開発され、金属メッシュデバイス(以下、MMD)と称する(図1)。MMD は、赤外線フィルターとして開発され、その精密なメッシュ状構造により特徴的な赤外線透過スペクトルパターンを示す。表面に物質が付着すると、そのパターンが鋭敏に変化するため物質検出できる。もうひとつのMMDの特徴として、メッシュ状構造が微粒子のふるい効果を持ち、その薄膜を通過させることでエアロゾルの捕集を行える。申請者らは乾電池で動く簡易な小型ポンプに装着したMMDを利用して、エアロゾルのサイズ選択的な捕集と赤外線での定量技術を確立した。さらに、MMD は表面が平滑なので捕集エアロゾルから微量の遺伝子抽出が容易に行える。そこで、そのPCR産物から付着細菌のメタゲノム的な同定を次世代シーケンサにより行った。これにより、結核菌をはじめとする病原菌の捕捉の後、直ちに赤外線透過で検出がシームレスに行える新しい簡易分析法の構築の見込みが得られた。この技術をもって空気中の結核菌のPCR検出に適用し、ケニアのスラム街など結核リスクの高い場所での調査研究に実地応用できるか検証する。これにより、この精密膜MMDによるエアロゾル定量・分離技術の結核菌感染管

理に対する有用性を明らかにすることが本研究の目的である。

②研究内容

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

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

この手法を病原性細菌、特に結核菌モニタリングに適用するにあたり、まず分析デバイスの開発・評価と同時に、結核患者発生数の多いケニアのスラム地区に存在する映画館や学校、教会、医療施設などの多くの人で混雑する施設の空気中の結核菌および他の細菌の量・種類について調査することでフィージビリティ研究を行う。2017 年は3月、7月、9月、また可能であれば2018年3月ごろにケニアへ渡航、フィールドワークを計画している。また、現地の一瀬教授の研究スタッフにも開発装置を供給し、定期的なサンプル採取を依頼する。種々の場所の空気中に含まれる細菌を遺伝子解析することで、本手法の有効性を確立し、同時に結核をはじめとして感染症の多いケニアにおいて、発生状況との関連を分析することで空気を介した感染伝播の実態を解明するための手がかりとする。病原性細菌の検出技術の開発とその疫学的応用が可能になれば、感染に至る空気中濃度の検討など含めた疫学的な特徴の解明も可能である。特に結核菌の感染伝播の潜在的危険のある場所について、定点観測を行い、本手法の有用性を証明できれば、短期間に当該菌のリスク管理についてノウハウを蓄積することが可能である。

従来、エアロゾルの定量にはフィルターで補足して天秤で秤量、検体(気体)のベータ線の透過率から定量といった方法が取られてきた。前者は比較的簡便であるが、サイズ分画性能が不十分である上に捕捉量が数10 mg 以上必要である。後者は、大きな装置である上にエアロゾル粒子を分離回収できない。本課題のシーズ技術は、メッシュ状金属薄膜を用いて赤外線透過率による定量とサイズ分画を同時に行える素材 MMD をコアとした新規センサーデバイスである。0.1 mg のエアロゾルを定量でき、サイズ分画された微量検体から DNA 抽出も容易にできる。そのため、手のひらサイズかつ乾電池で動作する小型ポンプを使用できる。これを現地に設置し、2 時間程度の捕集時間でエアロゾルの定量とサイズ分画、さらにはその検体から微生物の遺伝子を抽出して解析する

一連の分析スキムが可能となった。

ケニアのスラム地区は大変治安が悪く、外国人は武装警察官によるガードの下でごく短時間の滞在のみ可能である。また、サンプル収集には現地の協力者を雇用する。そのため、誰にでも使え、簡便・小型を特徴とする本提案の開発デバイスでなければ検体収集は不可能である。結核は三大感染症の一つであり、その感染伝播の制御は重要な課題である。特に、発展途上国に高感度エアロゾル分析技術を用いた調査はほとんどなされておらず、本提案で貴重なデータが得られるものと考ええる。

・研究計画・方法

(実験方法)

1. センサー面への検出対象物の捕捉法を開発する。メッシュ構造の特長を生かし、センサー基板に空気を通過させることで表面への捕捉を図る。
2. 測定対象である結核菌の特異的・迅速検出のために、(1)対象物の特異的捕捉が可能なセンサー表面構築、(2)粒子形状に起因する透過周波数特性変化の解析、(3)センシングのための測定条件、(4)結核菌の抗体反応および PCR による検出、(5)操作性の改善といった課題について取り組む。
3. ケニアでの患者データの収集および環境からの検体収集（空気検体）については研究許可の取得については、ケニア中央医学研究所（KEMRI）の胸部疾患研究センター（CRDR、Dr Mukoye 所長）と共働作業として行う。
4. フィールド調査では、ナイロビ市内および近郊の病院、教育施設、商業地域、農村地域などに採取地点を分類設定して検証を行う。特に、人が多く集まる上に空気流通に乏しい映画館や集会所は、結核菌の伝播しやすい環境と考えられる。このような地点での感染発生データを集め、また時系列データベースを完成させる。完成したデータベースを用いて、結核発生の関連因子を特定するため、採取環境（気温、湿度、風量、通行人数等）と患者数との相関性を明らかにする。
5. 16SrDNA の次世代シーケンス解析からエアロゾルの細菌叢の変化に関してデータを収集し、エアロゾルの粒子サイズに加えて採取環境の条件との関係性を検証する。

③予想される成果

本技術の特徴は以下のようにまとめられる。

1. 体内に取り込まれやすい PM2.5 相当のエアロゾルを短時間でサイズ分画捕集できる。
2. 捕集装置は、手のひらサイズ・電池駆動でフィールドでの利用ができる。
3. MMD は純粋な金属製で平滑な表面なので様々な分析に干渉しない。
4. 次世代シーケンサや PCR 法によりエアロゾルに付着した細菌・ウイルスを同定できる。
5. 赤外線透過スペクトルにより捕集したエアロゾル量をおおよそ見積もることができる。

このような検出装置・分離装置の運用試験を進めることにより、実用上の問題点を明らか

にし、より完成度を高められることが期待される。本分析技術は、細菌のみに限定されるものではない。共同研究者である一瀬教授の研究グループは、この技術をエアロゾル中のロタウイルスの検出に応用し、成果を挙げつつある。本手法は、効率的な検査を可能とし、不明な点の多いウイルスや結核菌の感染経路の解明に貢献できる。なお、前年度まで共同研究の課題として進めていた「新しいウイルス検出装置」に関しても、論文としてまとめることができ、まず国際学会で査読付プロシーディングとして発表、現在正式な論文を投稿中である。本課題に関しても、平成 29 年度を最終的なまとめの時期と考えて研究計画を進めている。

5. 実施報告:

①研究材料・方法・手続き

フィールドでのテスト:ナイロビ郊外でのエアロゾル捕集

エアロゾルのサンプリングは晴天で、気温が上昇し、湿度が低下する朝から夕方にかけて行った。ケニアでのサンプリングでは、野外の牛舎の 2 メートルほどの高さの屋根の上に孔径 4.2 μm , 1.8 μm の 2 枚の MMD を装着した高流速型 (600L/min) の吸引器を設置した。140~160 分稼働させ、1300~1600L の空気を吸引した。吸引量は装置のカウンターに記録される。その値を表 3 の中に示した。また、孔径 4.2 μm , 1.8 μm , 1.1 μm の 3 枚の MMD を層状に固定した低速型吸引器 (80L/h) は、天候の急変などを懸念して、屋根のある牛舎内の 1 メートルほどの高さの位置に板を渡してその上に置いた。合計 11~12 時間稼働させた。



図3 ナイロビ郊外での試料捕集場所(左)、捕集装置の設置状況(右)

エアロゾル付着微生物の 16SrDNA 解析による同定

エアロゾルに付着した細菌の構成を解析するために、16S rDNA の細菌に共通する配列をプライマーとして用い PCR により増幅、次世代シーケンサーにより解析することとした。そこで、エアロゾルサンプルから、市販の土壌 DNA 抽出キットを用いて DNA 抽出処理を行った。抽出 DNA 量は、おおむね 30 -40ng 程度得られた。16S rDNA の V3-V4 領域を PCR 増幅した後、次世代シーケンサーのフローセル結合配列およびサンプル識別のためのインデックス配

列を含むプライマーを用いて 2 段階で増幅した。V3-V4 領域は約 560bp からなる。2 段階 PCR により約 600bp の PCR 増幅 DNA が得られた。

次世代シーケンス解析の結果、長浜で採取した試料では約 10 万リード、ケニアで採取した試料は 20 万リードの配列情報を得た。各試料においてクオリティフィルタリングの結果、8~12 万リード、キメラ判定により 7~12 万リードが有効と判定された。これらのリードを 16S rRNA アンプリコンシーケンシング解析プラットフォームである QIIME を用い、クラスタリングおよび相同性検索による同定処理を行った。クラスタリングの処理においては、一般的に使われている 97%の配列一致度を基準にクラスタリングした。OTU (operational taxonomic unit) として得られた配列は、長浜で採取した試料は数 10、ケニアで採取した試料は 100~120 にまで収束した。この OTU の代表配列は、GreenGenes 16S ribosomal RNA のデータベースに対して相同性検索を行った。

②成果

(結果)

日本(長浜)で採取されたエアロゾルからは、*Acinetobacter* 属がほとんどの割合を占めた。ケニアで採取されたエアロゾルからは *Pseudomonas* 属が多く検出された。*Acinetobacter* 属および *Pseudomonas* 属は主に土壌に生息する細菌であることから、多くのエアロゾルは土壌に由来すると考えられた。また、他にも少量であったが *Haemophilus* 属 (OTU153)、*Neisseria* 属 (OTU324)、*Mycobacterium* 属 (OTU213) といった病原性細菌が検出された。さらに、得られた結果を詳細に検討し結核菌 (*M. tuberculosis*) を含む *Mycobacterium* 属に注目した。この属に特徴的な遺伝子配列の比率を算出したところ、ケニアで採取した 2 検体から 0.042% および 0.169% の割合で *Mycobacterium* 属が検出された。そこで、該当するリード配列に対応する OTU データを用いて、再度 Blast による相同性検索を行ったところ、*M. chelonae* および *M. obuense* と推定された。さらに確認のために、*Mycobacterium* 属の 16S rRNA のみを特異的に増幅することができる MYCGEN プライマー27 を用いて再度 PCR 増幅を行い、クローニングの後、DNA シーケンシングを行うことにした。PCR の結果、1000bp 程度の DNA 断片の増幅が確認された。これは、MYCGEN プライマーで増幅される領域長 1030bp と一致した。*Mycobacterium* 属が次世代シーケンスデータから検出された 2 検体のうち一方のみにバンドが確認された。そこで、これをクローニングし、DNA シーケンスところ、相同性 99%で *M. obuense* と同定された。

(考察)

この実験の目的は、医療分野や環境衛生分野で空気中に存在する細菌やウイルスによって生じる健康被害の予防を想定したものである。近年、DNA を直接解析する手法が注目されており、特に土壌に含まれる DNA を解析する手法について種々の研究が進められている。本研究では、その土壌から DNA 抽出するための前処理技術を応用して、MMD を装着したエアロゾル捕集装置を用いて付着微生物の DNA を容易に抽出できた。従来の合成樹脂などを基材とするメンブレンフィルター等でエアロゾルを捕集することはできたとしても、一般的な抽出液はメンブレンフィルターを溶解させたり、あるいはフィルター内部に吸着したエアロゾル粒子から

DNA を抽出することは困難であった。MMD は金属でできた平滑な表面を持ち、効率よく DNA を抽出することができるので、必要なエアロゾル量も数マイクログラムで充分である。MMD の開口率は 50%程度と大きく、圧力抵抗が低い。乾電池で駆動する小型サンプラーを用いることができた。これらの特長は、発展途上国でのフィールドでの試料採取に大きな利点となった。

こうして得られたエアロゾルから抽出された DNA の 16S rRNA を増幅して、次世代シーケンサーにより、細菌種の構成を明らかにすることを試みた。同定細菌 (OTU) を検証すると、日本(長浜)では *Acinetobacter* 属がまず多く、一部にメチロバクテリウム、エンテロバクター、セラチア菌、ノカルディア菌などの常在性病原菌が検出された。ケニアで収集された試料では *Pseudomonas* 属が多かった。*Moraxellaceae* 科、*Pseudomonadaceae* 科も見られ、いずれも土壌生息する細菌が主要な割合を占めた。しかし、*Haemophilus* 属、*Neisseria* 属といった病原性細菌が少量なりとも検出された。また、6 回捕集したうちの 2 検体に *Mycobacterium* 属(抗酸菌)の遺伝子が検出された。このことは注目に値する。なぜなら、この属には、90 種以上の細菌が含まれるが、病原性のあるおよそ 30 種には結核など重要な疾患が含まれるからである。結核は発展途上国を中心に多数発生している。ケニアも例外ではなく、有数の結核の高蔓延国である。結核は排菌する結核患者の咳、くしゃみ、唾の飛沫によって空気感染が成立し、十分な感染管理が必要とされる。また、結核菌のみならずエアロゾルを介した伝播が想定される細菌は多いが、その詳細は明らかではない。これは、医学研究者・医療従事者でも空気中の細菌を検出定量できる簡便なモニタリング方法がなく、研究蓄積が不十分なためである。本開発技術は、これに解決策を与える期待がある。今後、フィールド調査によりナイロビ市内および近郊の病院、教育施設、商業地域、農村地域などに採取地点を分類設定して検証を行う予定である。特に、人が多く集まる上に空気流通に乏しい映画館や集会所は、結核菌の伝播しやすい環境と考えられる。このような地点での感染発生データを集めることを計画している。本開発技術は、この種の感染症の疫学研究のための有用な分析データを与えるものと期待される。

③ 成果の公表

投稿準備中

6. 自己評価

空気中の埃・塵をサイズにより分画して捕集する新しい分離膜「金属メッシュデバイス(MMD)」を用いて、ケニアのフィールドでのサンプリングを行ったことは、新しい技術開発として将来性ある課題と考えている。なぜなら、エアロゾルを介した感染経路は、その存在が想定されながら簡便に分析する手段が不足していたためである。開発技術をケニア拠点の協力の下、ナイロビ近郊の収集エアロゾル検体から病原性微生物の検出に用い、所期の成果を得ることができた点は今後の開発の大きな弾みとなる。今年度の特筆すべき進捗として、エアロゾル付着微生物種の構成を特定するために次世代シーケンサを利用した点があげられる。これまで、微量のエアロゾルから効率よくDNAを抽出できる類似の捕集用フィルターは存在せず、同様の実験を行うためには大きな装置で長時間の捕集を必要とした。このような問題点を克服できたことは、フィールドワークを進めるうえで強みとなる。検体採取と解析を計画通りに行い、結核と近縁の *Mycobacterium* 属を同定し、本手法の原理検証に成功した。一方で、結核そのものを検出するためには結核発生地域の病院などで環境モニタリングで実際に使ってもらう必要があるが、これは今後の課題とした。したがって、達成度はⅢ(予想通りの成果を挙げられた)とする。

7. 達成度(何れかに○)

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

評価を下した理由(6の自己評価で述べておれば省略して良い)

別紙（作成書式）

平成29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：29－ 一般 －22

2. 代 表 者：鈴木 仁人（国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター・主任研究官）

共同研究者：柴山 恵吾（国立感染症研究所 細菌第二部・部長）

共同研究者：矢原 耕史（国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター・主任研究官）

共同研究者：Nguyen Thai Son（Hospital 103, Military Medical University,
Vietnam・Associate Professor, Head of Microbiology Department）

3. 決 定 額：900 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、有効な抗菌薬が限られたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae）の分離状況や同感染症の発生状況を把握することは重要である。2013年に米国 CDC は、CRE は血液感染した患者の 50%以上を死に至らしめ、米国において重篤な感染者は年間 200 万人以上、死亡者は 2 万 3000 人以上と推測している。また、2014年に英国政府の委託機関は、AMR 微生物感染症による死亡者は 2050 年までに世界で年間 1,000 万人を超え、最も多い死亡要因になるという推測を行っており、WHO や世界各国は早急な AMR 対策を進めている。日本では 2014 年 9 月の感染症改正において“CRE 感染症”が 5 類感染症の全数把握疾患として新たに加えられ、“薬剤耐性緑膿菌感染症”と共に 5 類感染症の定点把握疾患であった“薬剤耐性アシネト

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

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

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

②研究内容

細菌は染色体とは別にしばしばプラスミドを有する。カルバペネマーゼ遺伝子のような重要な獲得性 AMR 遺伝子は、トランスポゾン、挿入配列、インテグロン、ファージなど

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

サンガー法による塩基配列決定法に基づいた DNA シーケンサーを第 1 世代とすると、NGS の第 2 世代は 2005 年から 454 社 (現 Roche 社)、2007 年から Solexa 社 (現 Illumina 社) など、第 3 世代は 2010 年から Pacific Biosciences (Pac Bio) 社、2014 年から Oxford Nanopore Technologies (ONT) 社により製品として登場した。第 2 世代シーケンサーは解読可能なサイズが短い (概ね <600 bp)、解読コストが安い (1 株 1 万円程度)。第 3 世代シーケンサーは解読可能なサイズが長い (概ね >10 kbp)、解読コストが高い (1 株 10 万円程度)。高度に進化を遂げた薬剤耐性菌のゲノムには可動性遺伝因子由来の類似の外來性 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）、タイヒン省、ナムテ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、研究分担者の柴山は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。研究分担者の矢原は専門は生命情報学であり、主に情報解析と疫学解析を担当する。研究分担者の竹村は専門は微生物学であり、主に菌株収集（動物・環境由来）と基礎実験を担当する。本研究では、VMMU の軍医病院ネットワークに属する医療機関の数が大規模であるため、研究の開始に際して、研究協力者の Son 博士の仲介にて VMMU の総長と国立感染症研究所細菌第二部の部長である柴山との間にて所属機関同士の覚書（MOU）を交わした上で、計画的に研究を進める。VMMU 側の菌株収集の実務担当者は複数人を設ける。研究代表者の鈴木は、年に数回ベトナム・ハノイ市を訪問し、長崎大学ベトナム拠点と VMMU における現地の研究協力者との情報共有に務める。日本からベトナムを訪問する際は、空路にてノイバイ国際空港（ハノイ市）への直行便で移動する。ハノイ市内での移動は、基本的に VMMU が手配した軍用車にて移動を行うが、適宜、タクシーや公共交通機関のバス、電車なども利用する。

【平成 29 年度の研究計画】

ベトナムにおいて、VMMU と国立感染症研究所の間で締結した MOU に基づいて、軍医病院ネットワークの基幹病院が中心となって CRE を収集する。菌株収集に際して、研究代表者の鈴木が、VMMU の基幹病院にて、薬剤耐性菌検査の講習会を実施する。薬剤感受性試験は、VMMU の基幹病院では自動検査装置（基幹病院では bioMerieux 社 Vitek 2 を配備）、地方の医療機関では抗菌薬ディスクを用いて行う。菌種同定は、基本的に形態観察および生理・生化学的性状試験にて行い、場合によっては菌種同定キットを用いて行う。菌株は基幹病院にて集約して保存し、最低限、重要なカルバペネマーゼ遺伝子（NDM 型、KPC 型、OXA-48 型、IMP 型、VIM 型）を PCR にて検出する。全ての臨床微生物検査データは、WHO が開発した無料ソフトウェア WHONET を用いて管理する。菌株の臨床情報として、日付、病院名・病棟、検体、患者の性別・年齢などを記録し、患者の個人情報は WHONET にて匿名化する。収集する菌株数に上限は設けないが、検査結果と臨床情報と照らし合わせて取捨選択を行い、日本国内に菌株を輸送し（年間 100 株以内）、主に Illumina 社 NGS、代表的な菌株は ONT 社 NGS にて解読を行い、染色体とプラスミドを含むゲノム構造を構築する。AMR 遺伝子の検出は、ResFinder および ARG-ANNOT を用いて行う。菌株の配列データを元にゲノムワイド関連解析（GWAS）により SNP を抽出し、

分子系統樹を作製する。菌株のメタ情報と地理情報は **Microreact** を用いて紐付ける。

ベトナムからの生菌の輸入は、**BSL2** 以下の日和見感染症の起因菌のみ扱う。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。

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 8 月 9-10 日および 11 月 6-8 日に長崎大学ベトナム拠点にて、平成 29 年 12 月 27 日に国立感染症研究所薬剤耐性研究センターにて、研究代表者は担当熱研教員と研究打ち合わせを行った。また、平成 29 年 11 月 6-8 日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。

本研究で解析を行った薬剤耐性菌株は、Vietnam Military Medical University (VMMU) の主要な基幹病院であるハノイ市の軍医病院 103 および 108 にて臨床分離し、自動検査装置 (bioMerieux 社 Vitek 2) による菌種同定と薬剤感受性試験を行い、国際輸送会社 (FedEx) による輸送にて生菌の輸入を行った。その後、研究代表者の所属機関である国立感染症研究所薬剤耐性研究センターにて菌種同定と薬剤感受性試験の再確認を行い、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った。

担当熱研教員は、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)、タイヒン省、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、本研究ではベトナムの環境水より CRE 株の検出を試みた。

②成果 (結果+考察)

ベトナム・ハノイ市内の軍医病院 103 および 108 で臨床分離された腸内細菌科細菌 59 株のドラフトゲノム配列を解析した。そのうち、15 株が *bla*_{NDM}、*bla*_{KPC} などのカルバペネマーゼ遺伝子を有しており、これらの耐性遺伝子は伝達性プラスミドに媒介されて拡散している可能性が示唆された。そのため、前年度までにドラフトゲノム配列を解読した同病院で臨床分離された腸内細菌科細菌株を含め、計 135 株のうち、代表株 13 株についてプラスミドを含む完全ゲノム解析を構築し、院内もしくは地域のコミュニティ内で伝播したと考えられる *bla*_{NDM-1} 媒介プラスミドを複数同定した。また、軍医病院 103 で臨床分離された腸内細菌科細菌株から、コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* を有する大腸菌株を 4 株同定し、保有プラスミドの配列を決定したところ、一部の病原性株 (phylogenetic group F) が保有していた *mcr-1* 媒介プラスミドは、別プロジェクトで解析したハノイ市内の食肉から検出された大腸菌の非病原性株 (phylogenetic group A) が保有していた *mcr-1* 媒介プラスミドと極めて類似しており、食肉からヒトに直接的に伝播した可能性が示唆された。

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 40 検体を用いて、環境に存在する CRE 株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 にて腸内細菌科細菌の主要なカルバペネマーゼ遺伝子 (*bla*_{NDM}、*bla*_{KPC}、*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{OXA-48}) の検出を試みたところ、陽性株は少数であった。*bla*_{NDM-1} 陽性 *Proteus* 属菌株が分離されたため、Illumina 社の NGS によるドラフトゲノム解析を行っており、今後、ONT 社の NGS による解析などを組み合わせて、同耐性遺伝子を媒介している可動性遺伝因子の解析も行う。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。

③成果の公表

<学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表>

1. 国内外における MinION を用いた細菌ゲノムの解析, ランチョンセミナー, 鈴木 仁人, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年 3 月 27-29 日, 国内
2. ナノポアシーケンサーを用いた薬剤耐性菌のゲノム疫学解析, 口頭, 平林 亜希, 矢原 耕史, 柴山 恵吾, 鈴木 仁人, Nanopore Day Kyoto, 2018 年 3 月 8 日, 国内 (福岡県福岡市)
3. 携帯型実験機器を用いたアジア新興国現地での薬剤耐性菌のゲノム疫学解析, 口頭, 平林 亜希, 柳沢 英二, 高橋 宏瑞, 矢原 耕史, 柴山 恵吾, 鈴木 仁人, 第 46 回薬剤耐性菌研究会, 2017 年 11 月 10-11 日, 国内 (群馬県利根郡)
4. MinION を用いた発展途上国における薬剤耐性菌のゲノム解析, 口頭, 鈴木 仁人, 第 1 回オックスフォード・ナノポア現場の会, 2017 年 8 月 22 日, 国内 (東京都千代田区)
5. Genomic epidemiology of antimicrobial resistant bacteria, 口頭, 鈴木 仁人, 2nd Technology Seminar on the MinION sequencing, 2017 年 7 月 6 日, 国外 (Bangkok, Thailand)
6. ナノポアシーケンサーを用いた薬剤耐性菌のゲノム研究, 口頭, 鈴木 仁人, 平林 亜希, 矢原 耕史, 柴山 恵吾, 第 5 回 NGS 現場の会, 2017 年 5 月 22-24 日, 国内 (宮城県仙台市)

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析を行い、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。

研究代表者の所属機関である国立感染症研究所の組織再編があり、平成 29 年 4 月 1 日より、研究代表者の所属部署は、申請時の細菌第二部から新たに新設された薬剤耐性研究センターに変更した。また、平成 29 年 9 月 1 日より勤務地が同所の村山庁舎（東京都武蔵村山市）からハンセン病研究センター庁舎（東京都東村山市）に移転し、平成 30 年 1 月 1 日より所属部署に新たにセンター長が着任した。そのため、Vietnam Military Medical University (VMMU) と同研究所薬剤耐性研究センターとの間で締結予定であった MOU に関する手続きが遅れてしまい、未締結のまま限定的に共同研究を進めることとなった。平成 30 年 6 月に現地にて MOU を締結予定である。今後は、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ベトナム国内全域から CRE の収集を進めたい。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

② （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

Vietnam Military Medical University (VMMU) と国立感染症研究所薬剤耐性研究センターとの間の MOU の締結が遅れているが、小規模ながら、ベトナム国内で分離された CRE のヒト由来株および環境由来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。

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：

マラリア原虫肝内休眠体を標的とした *in vitro* 実験系の確立と分子メカニズムの解明

課題番号：29－ 一般 －23

2. 代 表 者：（所属・職名） 案浦 健（国立感染症研究所寄生動物部・主任研究官）

共同研究者：（所属・職名） 川合 覚（獨協医科大学熱帯病寄生虫病講座・教授）

共同研究者：（所属・職名） 金子 修（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

矢幡 一英（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

3. 決 定 額： 450 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

三日熱マラリアでは赤血球内原虫の増殖に起因する発症を治療しても、肝臓内に形成される休眠体を根治しない限り再発を繰り返すことが知られている。これまで肝内休眠体に対する治療には、世界的にプリマキンのみが使われているが、近年プリマキン耐性原虫の出現が報告され、新たな薬剤の開発が急務となっている。しかし、三日熱マラリア原虫（*Plasmodium vivax*, Pv）は未だ長期継代培養法の確立が不十分であり、またネズミマラリア原虫による疾患モデルでは肝内休眠体が形成されないことから、肝内休眠体に関する分子メカニズムの基盤情報の理解はほとんど進んでいない。一方、サルマラリア原虫の *P. cynomolgi* (Pcy) は、Pv とゲノム配列の相同性が 90%以上と系統的に最も近縁の原虫種で、肝内休眠体の形成や赤内期増殖サイクル等、生物学的性状も極めて類似している。そのため欧米の研究機関では、Pcy を肝内休眠体の *in vivo* モデルとして古くから用いているが、Pcy も Pv と同様に休眠期へ移行する分子メカニズムは全く明らかになっていない。そこで本研究では、Pcy のスポロゾイトと初代ヒト培養肝細胞（LH TK-NOG 細胞）などを用いた新たな *in vitro* 実験系を確立し、マラリア原虫が休眠期へ移行する際の分子メカニズムを明らかにする。

②研究内容

本研究は、媒介蚊へのマラリア感染と肝内型原虫の解析を専門とする研究代表者（案浦）、サルマラリア感染実験を専門とする共同研究者（川合）、かねてよりサルマラリア原虫への

遺伝子導入に取り組んでいる研究対応教員（金子、矢幡）、および初代ヒト培養肝細胞の調整に精通する連携研究者（末水）が各分野で確立した技術を集結させ、密に連携することで以下の研究を展開する。共同研究者の川合は「平成 28 年度熱帯医学研究拠点一般共同研究」の支援を受け、案浦と共にニホンザルを用いた Pcy 感染実験手技と感染蚊の維持管理技術（医薬基盤研究所・筑波霊長類医科学研究センター（TPRC）BSL2 および BSL3 施設を利用）を確立し、Pcy スポロゾイトを大量に産生できる実験系を整備した。そこで今年度は、肝内型原虫の解析を専門とする案浦を研究代表者に置いて新たな *in vitro* 実験系の確立を目指し、*in vitro* および *in vivo* の両面から肝内休眠体の分子メカニズム解明に迫る研究を遂行する。

A) Pcy スポロゾイトの調整；ナショナル・バイオリソース・プロジェクトより、実験用ニホンザルの有償譲渡を受ける。ニホンザルに Pcy B 株感染血液を静脈内接種する。赤血球感染率および生殖母体の出現を確認し、最適なタイミングで採血し、国立感染症研究所（NIID）から TPRC の BSL3 施設内に移送されたハマダラカへ人工膜吸血法による感染血液の吸血を行う。以降の感染媒介蚊は BSL3 環境下で管理し、吸血から約 18 ～27 日後、顕微鏡下で蚊唾液腺を取り出し Pcy スポロゾイトの調整を行う。

B) 初代ヒト培養肝細胞の調整；LH TK-NOG 細胞（ヒト肝細胞キメラマウス由来）には、マラリア原虫種のスποロゾイトが感染し、増殖できることを連携研究者らがすでに報告している（Valérie S et al. 2015）。そこで本研究では、LH TK-NOG マウスより初代ヒト培養肝細胞を調整し、Pcy B 株のスποロゾイトを感染させ混合培養する。培養開始から 3 時間後、24 時間後、5 日後、7 日後、11 日後に回収し、各種の方法に適した条件で固定し観察を行う。ヒト由来肝細胞などを LH TK-NOG 細胞の比較対象として用いることで、実験精度などの確認を行う。解析は TPRC、NIID にて行い、初代培養肝細胞の調整は実験動物中央研究所（CIEA）にて行い TPRC に搬送する。

③予想される成果

本研究では異なる研究背景を持つ研究者が各自の相補的な実験技術を結集し、休眠体に関する新たな研究を展開することが特色である。これまで国内では本分野に関する研究はほとんど実績がなく、本研究のはたす先駆的な役割は意義深い。休眠現象の理解に加えて、本研究で確立する Pcy 休眠体の実験系は、肝臓内ステージを標的とした新規薬剤のスクリーニングにも利用できる。本研究で新たな実験系を確立することにより、肝臓ステージを標的とした創薬や診断技術の開発等に広く応用できると考える。また本研究より、*in vitro* での休眠体が安定的に得られるようになった場合には、次年度以降に各種網羅的な解析を予定しており、学術的な応用価値は極めて高い。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

研究材料：

ニホンザルは、自然科学研究機構生理学研究所が主導するナショナル・バイオリソース・プロジェクト「ニホンザル」より実験用ニホンザルの供給を受け、医薬基盤・健康・栄養研究所、霊長類医科学研究センター（TPRC）のBSL2施設内で飼育した。本研究では先行研究で凍結保存した *P. cynomolgi* B株（ATCC No. 30129）感染血液を用いた。ハマダラカ（*Anopheles stephensi*）は、国立感染症研究所において系統として維持された人工繁殖株を用いた。本株は、マラリア原虫への感受性が極めて高く、ハマダラカ体内期の原虫の産生量が多い株として樹立できている。LH TK-NOG 細胞（ヒト肝細胞キメラマウス由来）：実験動物中央研究所（CIEA）にて調整し、培養プレートに播種した状態でTPRCに搬入し感染実験に用いた。

方法：

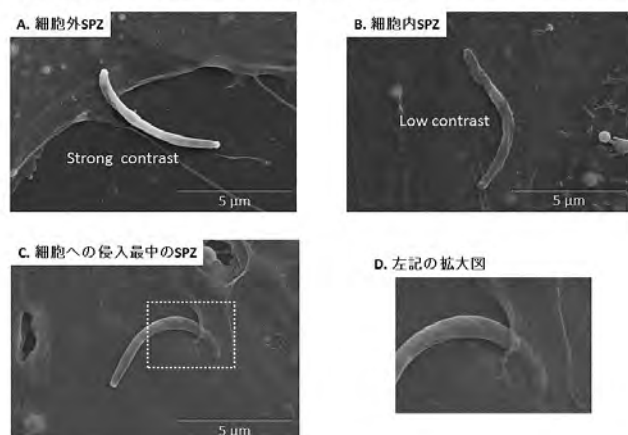
TPRCのBSL2施設内に飼育されたニホンザルに *P. cynomolgi* B株感染血液を静脈内接種により感染させ、感染15日後および16日後に血液塗抹にて寄生率を確認した。末梢血に生殖母体の出現を確認した後、最適のタイミングにてヘパリン加採血した、NIIDから搬入されたハマダラカを用いてBSL3施設内にて人工膜吸血法にて吸血させた。吸血後の感染ハマダラカ、同施設内に設置された恒温器内（設定温度22℃）にて管理した。吸血18～27日後にハマダラカを回収し、顕微鏡下にて唾液腺を回収しスポロゾイト(spz)を調整した。予め各々の実験に適するコンディションに調整したヒト由来肝細胞およびLH TK-NOG細胞に対してPcySPZを感染させ、経時的に感染肝細胞を回収した。回収した各感染細胞は、各々の観察に適した方法で固定後、観察を行った。また *P. cynomolgi* を検出するためにHSP70に対する特異抗体を作製し、間接蛍光抗体法により肝内型原虫の検出を試みた。

②成果（結果＋考察）

PcySPZ感染3時間後の固定サンプルを用いて、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope、SEM）による解析を行い、肝細胞への侵入前のSPZ（図1.A）と肝細胞侵入後のSPZ（図1.B）が認められた。このSPZが肝細胞の内であるか外であるかは、電子密度などによるコントラストの差、原虫の虫体表面と宿主

細胞膜との境界部分の観察を（角度などを変えながら）詳細に行うことで、両者を明確に

図1. 走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた *P. cynomolgi* スポロゾイト(SPZ)の観察像



区別することができた。

また肝細胞への侵入の最中である PcySPZ も認められた (図 1. C および D)。この SPZ の肝細胞への侵入に関しては、細胞通過を行う cell traversal mode と寄生を行うための invasion mode が知られている。この侵入の違いに関しては、後者の侵入は寄生胞膜 (PVM) の形成を伴い行われることが報告されている。今回観察された図 1. C および D が、cell traversal の侵入であるか invasion の侵入であるかの判定はこの SEM 像では困難であるが、今後、同条件でのサンプルを用いて、集束イオンビーム (Focused Ion Beam : FIB) を搭載した用いた走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) により、侵入中の原虫の内部構造や原虫-宿主間の膜構造などの 3 次元構築を試みることによって詳細な観察が可能となることが予想される。

PcySPZ 感染 3 時間後および 24 時間後の固定サンプルを用いた SEM による解析から、感染

細胞特異的に宿主肝細胞の一部に「隆起部」が観察され、肝内型原虫による可能性が強く示唆された (図 2. A および B)。この「隆起部」は、感染時間に伴う大きさの変化やその他の各種解析から肝内型原虫であることが明らかとなった。今後は FIB-SEM/3D 解析などにより、さらに詳細な所見が得られると予想される。

PcySPZ 感染 5 日後あるいは 7 日後に固定を行ったサンプルを用いて、間接蛍光抗体法 (IFAs) による観察を行った。染色は、宿主核と原虫核を検出する Hoechst 染色と、Pcy

原虫の細胞質を特異的に検出する PcyHSP70 抗体による染色を実施した。その結果、図 3 のような陽性像が多数検出され、Pcy 肝内型原虫であることが示された。しかしながら、LH TK-NOG 細胞を用いた場合には、陽性像も多数検出

されるが、LH TK-NOG 細胞自身のもつ自家蛍光が非常に高く、詳細な解析が困難であった。今後、固定条件や各種の染色方法を工夫することで、より詳細な解析が可能になることが予想される。

本研究課題より、*P. cynomolgi* 肝内型原虫の *in vitro* 実験系を確立することが可能となった。今後は SPZ の感染条件や観察条件のさらなる検討により、より効率的な解析が可能となり、休眠期を標的とする分子メカニズムの解析が可能となることが期待される。

図2. 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた *P. cynomolgi* SPZ を感染させた肝細胞の観察像

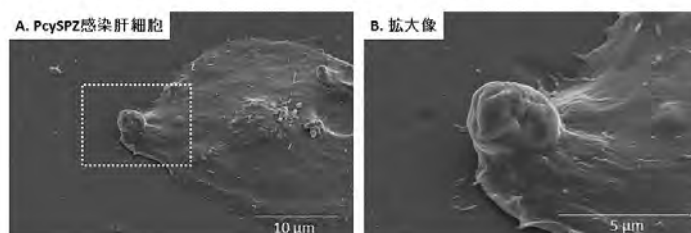
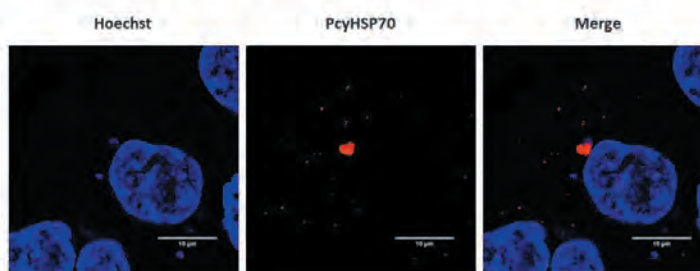


図3. 間接蛍光抗体法 (IFAs) を用いた *P. cynomolgi* 肝内型原虫の検出



③成果の公表

現在、論文投稿にむけて準備を行っている。

また本研究の一部に関しては、下記の学会にて報告を行った。

- 1) .「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明」案浦健, 荒木球沙, 川合覚, 小林宏尚, 片岡紀代, Wacker R, Janse CJ, Khan SM, Heussler VT, 野崎智義, 第 25 回 分子寄生虫学ワークショップ/第 15 回 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2017/08/27-30
- 2) .「肝内型マラリア原虫の休眠・増殖分子メカニズムの解明」案浦健, 荒木球沙, 川合覚, 小林宏尚, 片岡紀代, Wacker R, Janse CJ, Khan SM, Heussler VT, 野崎智義, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) , 2017/12/06-09
- 3) .「肝内型マラリア原虫の休眠分子メカニズムの解明」案浦健, 荒木球沙, 川合覚, 小林宏尚, 片岡紀代, Wacker R, Heussler VT, 野崎智義, 久枝一, 第 87 回 日本寄生虫学大会, 2018/03/17-18

6. 自己評価

本研究では *P. cynomolgi* B 株の感染血液を用いて、人工膜吸血法によりハマダラカに感染させ十分な SPZ を得ることができ、それら SPZ を用いて、各種肝細胞に感染させ肝内型原虫を *in vitro* にて検出・観察することができた。しかしながら、その感染効率や培養期間などは未だ最適化できる余地があり、また Pcy 原虫を検出・観察する手法に関しても工夫できる余地がある。今後、宿主肝細胞の選定や、各細胞に応じた適正をうまく利用することで、各実験の目的に応じた肝内型原虫の解析、休眠体を標的とした分子メカニズムの解明が可能になることが予想される。

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった)

Ⓐ (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (6 の自己評価で述べておれば省略して良い)

別紙（作成書式）

平成29年度共同研究報告（自己評価）

1. カテゴリー：一般共同研究

課題名：Linkage Group Selection 法の培養熱帯熱マラリア原虫への適用

課題番号：29- 一般- 24

2. 代 表 者：（所属・職名）：Axel Martinelli, GI-Core, Hokkaido University, Assistant Professor

共同研究者：（所属・職名）：Richard Culleton, Malaria Unit, Nagasaki University, Associate Professor

3. 決 定 額： 300,000 円

4. 申請時書類より

①研究目的

Malaria is a parasitic disease that kills almost a million children every year (1). Currently, no fully protective vaccine exists and there are mounting concerns that the parasite is developing resistance against the most effective drugs used to treat the disease. This situation calls for more research, in particular in identifying genes in the parasite that could be suitable targets for therapeutic intervention.

In this proposal, we will apply a genetic, genomic and mathematical approach we developed called Linkage Group Selection (2-5) to test its validity *in vitro* for the first time. For this purpose we will use a genetic cross between two distinct strains of *P. falciparum* that bear resistance against two main antimalarial drugs (6). We will test the system for the correct identification of genes involved in antifolate drugs resistance.

We will then apply our approach to uncover the genetic basis underlying parasite growth rate and adaptation to culture conditions, which could provide novel targets for parasite control.

References: (1) <http://www.who.int/gho/malaria/epidemic/deaths/en>; (2) Culleton et al, 2005, Genome Res 5(1):92-7; (3) Martinelli et al, 2005; PNAS 102(3):816-9; (4) Modrynzska et al, 2012, BMC Genomics 21:13(1):106; (5) Abkallo et al, 2016, <http://dx.doi.org/10.1101/078451>; (6) Walliker et al, 1987, Science 236(4809):1661-6.

②研究内容

The cross progeny of two strains of *P. falciparum* will be subjected to both drug selection (as a proof of principle) and growth rate/culture conditions selection (as the

actual experiment). We will select the uncloned cross progeny with both sulphadoxine and pyrimethamine, for which targets are known (1), and sequence the selected and unselected crosses by Whole Genome Sequencing to validate the approach *in vitro*. We will then proceed to grow the cross for up to 8 weeks *in vitro* and sequence various time-points (week 2, week 4 and week 8) to identify selective sweeps associated with adaptation to culture growth and growth rate selection.

References: (1) Heinberg A and Kirkman L, 2015 Ann N Y Acad Sci. ;1342:10-8

③予想される成果

We expect to achieve two main goals:

- 1) To verify the applicability of our approach to *in vitro* cultures by correctly identifying the drivers of antifolate resistance in malaria.
- 2) To then apply our approach to uncover the basis of adaptation to culture conditions and genes underlying parasite growth rate in the blood. This will provide a better understanding of parasite biology as well as potentially uncovering novel target for therapeutic approaches.

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

The uncloned cross progeny of two strains of *P. falciparum* (3D7XHb3) were subjected to both drug selection with sulphadoxine (SDX), pyrimethamine (PYR) and a combination of the two drugs (PYR+SDX) for two days. The drug selected crosses as well as a control unselected cross were grown for two weeks before drug selection and DNA extraction. Concomitantly, the cross was grown in vitro for up to 8 weeks and DNA extracted after 2, 4 and 8 weeks. All experiments were carried out in duplicates.

DNA was sequenced using the Illumina Whole Genome Sequencing technology. Reads were then mapped unto the 3D7 reference genome. SNPs between the two parental clones were called and verified against the MALGEN database. A total of 12,204 high quality SNPs were thus selected.

Allele frequencies at each SNPs were calculated based on read coverage. A ratio of the allele frequencies in the selected against the unselected crosses was produced (Comparative Intensity, CI). The CI value of sensitive alleles under selection is expected to drop to almost 0 the closer they are to the allele underlying the phenotype being selected for.

These ratios were then plotted using a loess regression function for each chromosome to produce plots. Any chromosomes showing evidence of parental allele reduction in the treatment groups were then further analysed. The lowest points in a selected chromosome were used to determine standard deviations and a twofold standard deviation was used to determine the interval within which causative mutation were likely to be located.

②成果（結果＋考察）

a)Drug Resistance experiment

Treatment with PYR produced a strong selective sweep on chromosome 4 against sensitive 3D7 alleles in both duplicates, with no other selective sweeps detected (Fig 1). Closer analysis of the chromosome revealed that the selective sweep encompassed the *dhfr* gene in both duplicates (Fig 2A).DHFR harbors a non-synonymous SNP that has been previously proven to underlie PYR resistance in malaria parasites, thus confirming the potential of the application of LGS *in vitro*.

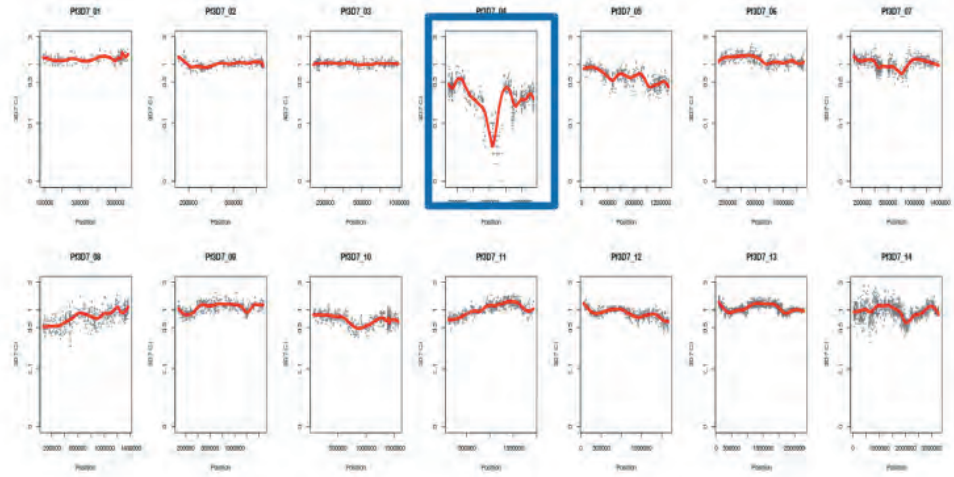
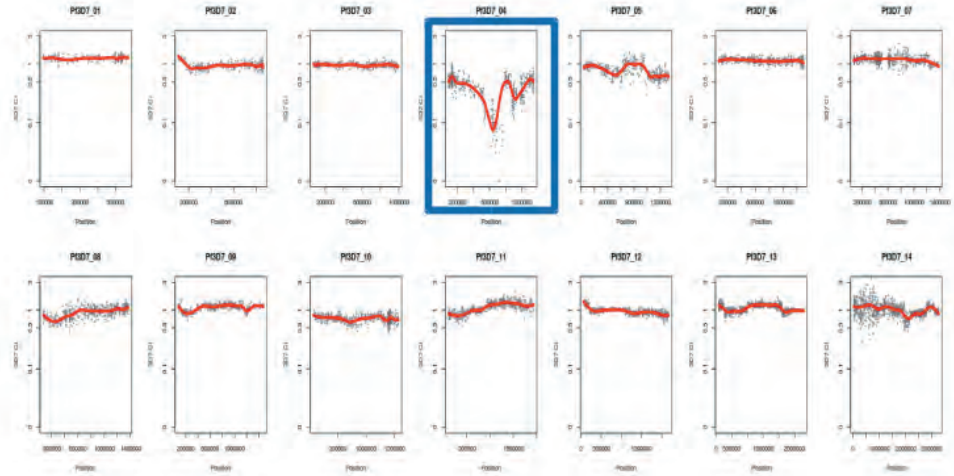
A**B**

Figure 1. CI plots in log scale for each of the 14 chromosomes of the cross under PYR selection. In both duplicates (**A** and **B**) a single selective sweep on chromosome 4 was detected (blue box).

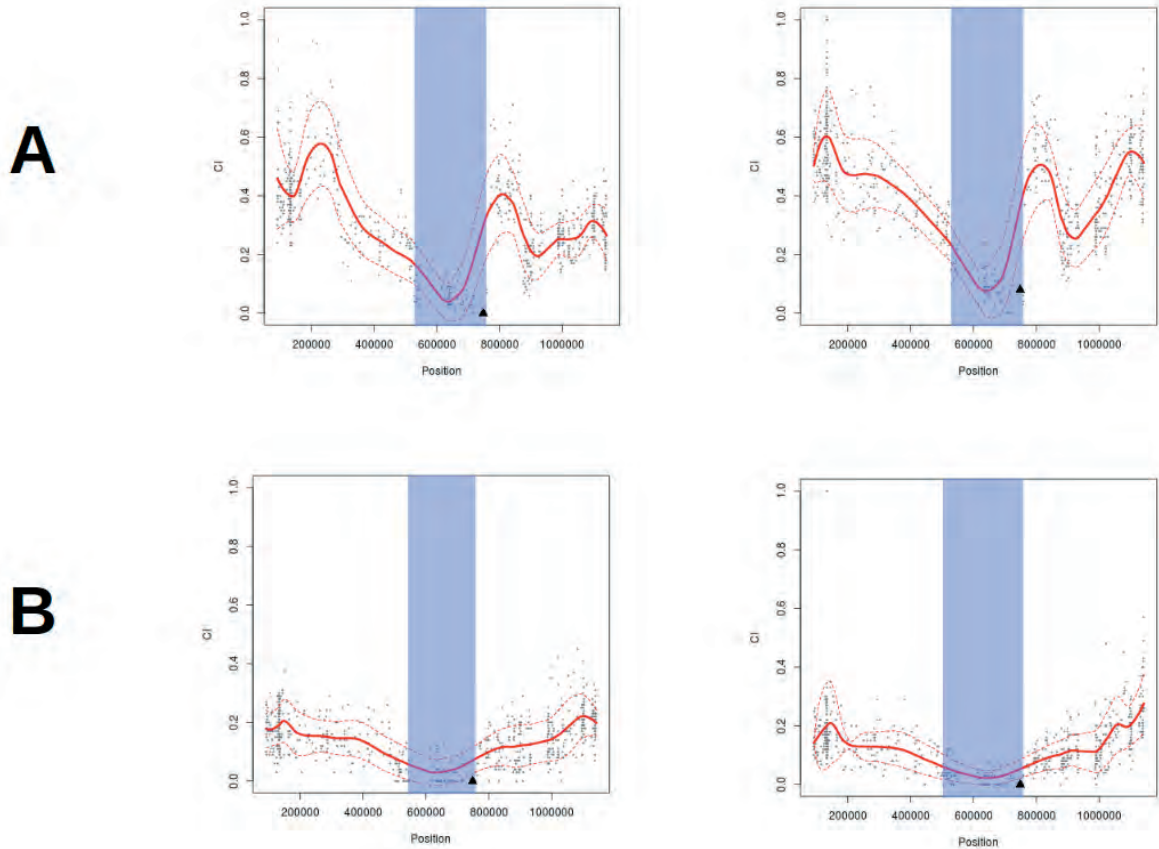


Figure 2. The *dhfr* gene (black triangle ▲) falls within the selective sweep on chromosome 4 in both the PYR selection experiment duplicates (A) and the PYR+SDX selection experiment duplicates (B). Blue rectangles indicate the 2XSD intervals determined by the lowest point of the selective sweep.

No selective sweeps could be observed under SDX alone treatment. This was principally due to the small difference in resistance between the two parental strains and the need for a special growth medium for SDX on its own to have a malariacidal effect, which can be fastidious to optimize and does not reflect the natural blood nutrient composition (1). Indeed, SDX has never been used on its own, but always in combination with PYR due to its lack of efficacy as a monotherapy under normal conditions.

For the combination therapy (PYR+SDX) we noticed, on the other hand, a noisier pattern in allele frequencies, characterised by very sudden and large-scale allele frequency alterations, as seen on chromosome 14, for example (Fig 3A). Nonetheless, we could still distinguish a dominant selective sweep against 3D7 alleles on chromosome 4, with CI values dipping below 0.1. No other chromosome showed a similar strong CI reduction against 3D7 alleles (Fig. 3A). When examined in detail, the selective sweep on chromosome 4 also encompassed the *dhfr* gene (Fig. 2B), although resolution was reduced due to the whole chromosome being more affected by the

combination therapy when compared to the PYR monotherapy. This was likely the result of the removal of recombinant clones not carrying the SDX resistance allele.

We expected to observe a selective sweep on chromosome 8 in this experiment. This is where the *dhps* gene, which underlies SDX resistance in *P. falciparum*, is located. In this case, selection will act against progeny clones carrying the HB3 alleles, as HB3 is susceptible to SDX, while 3D7 is resistant. This is the reverse of PYR resistance, where 3D7 is susceptible, but HB3 is resistant.

When the HB3 CI patterns were analysed, evidence for reduction of HB3 allele frequency was observed on chromosome 8. However, the reduction affected almost $\frac{3}{4}$ of the chromosome and was constant throughout the affected region (Fig. 3B). Furthermore, the decrease in CI did not reach the same intensity as observed against 3D7 alleles on chromosome 4. These factors and the presence of noisy patterns prevented a more detailed analysis of the selective sweep and conclusive identification of a selective sweep. Similar patterns were observed in both duplicates.

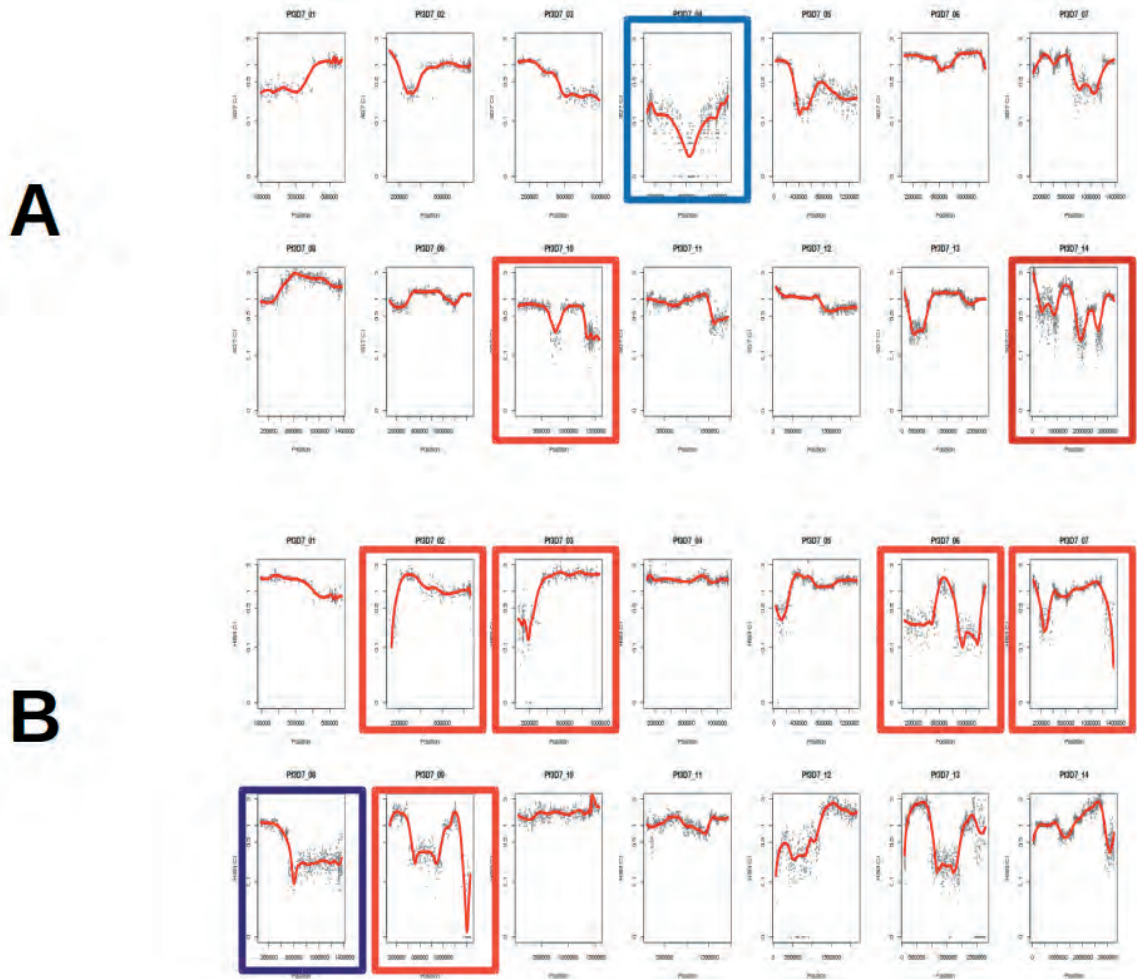


Figure 3. CI plots in log scale for each of the 14 chromosomes of the cross under PYR+SDX selection. (A) 3D7 alleles CI plots for replicate 1. (B) HB3 alleles CI plots for replicate 1.

replicate 1. Blue Box highlights chromosome 4, purple box highlights chromosome 8, red boxes highlight chromosomes with noisy patterns.

b) Growth rate experiments

The sudden allelic shift patterns that plagued the PYR+SDX experiment were even more prominent in the growth rate selection experiments (Fig 4). These patterns do not represent genuine selective sweeps, but are referred to as “allelic jumps” and are caused by a restricted number of particularly fit clones take over the population (2). Additionally, limited availability of individual recombinant clones can severely affect resolution of LGS experiments (3). The cross used in this experiment was generated in 1988 and has undergone many rounds of *in vitro* growth and cryogenic preservation since. These processes produce a high attrition of parasites with a subsequent loss of individual recombinants over time. It is thus highly likely the the cross itself did not contain a large number of individual recombinant progeny clones from the beginning of the experiment. Combined with highly competitive selection pressures that may favour a single or few recombinant clones (as is especially the case for PYR+SDX), this can result in the sudden allele frequency variations observed in this study and the loss of definition, as observed on chromosome 8 of the PYR+SDX experiment. Indeed, even in the case of PYR selection we can observe a very sudden and drastic shift in CI at the left hand-side of the selective sweep (Fig. 2A), which reduces definition and is indicative of a low number of genetic recombinants. Fortunately, both the strength and specificity (one single locus) of the PYR selection were enough to still provide a single, identifiable selective sweep.

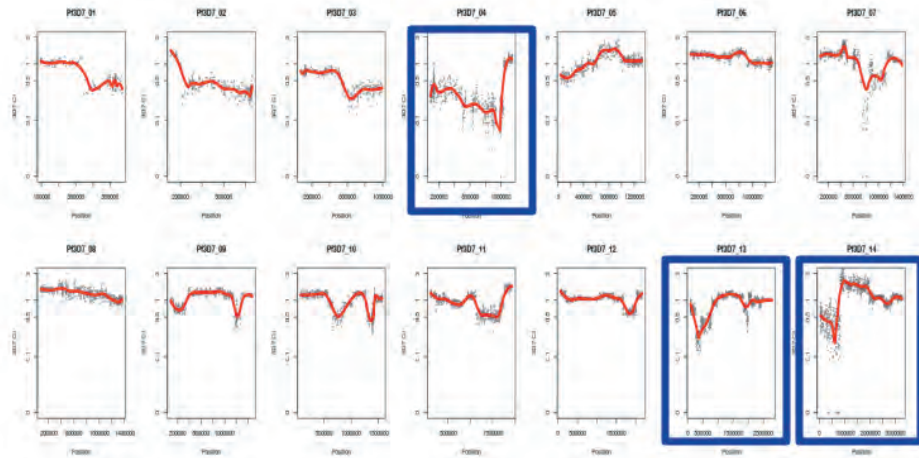
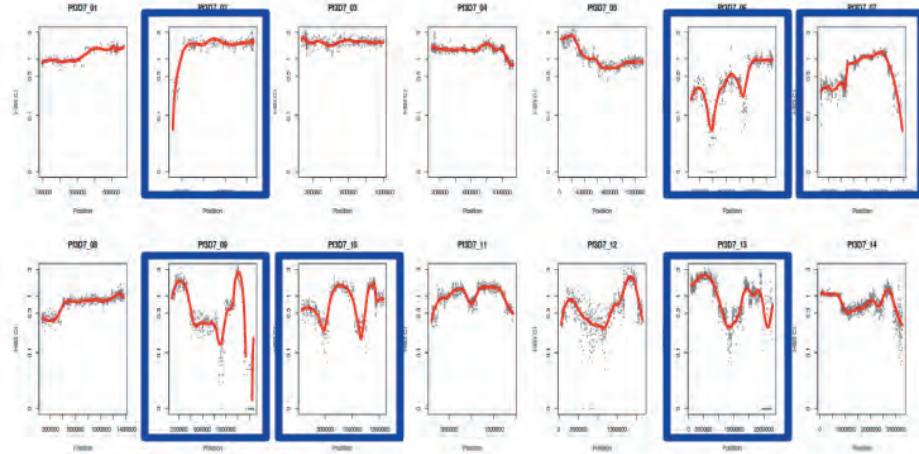
A**B**

Figure 4. CI plots in log scale for each of the 14 chromosomes of the cross after 8 weeks of *in vitro* growth. (A) 3D7 alleles CI plots for replicate 1. (B) HB3 alleles CI plots for replicate 1. Blue boxes highlight chromosomes with noisy patterns.

These facts combined with the lack of strongly selected chromosomes with well defined selective sweeps, as observed in the case of chromosome 4 during the drug selection experiments, meant that it was impossible to discern genuine selective sweeps from “allelic jumps” in this data set.

References

(1) Wang et al, 1997. Mol Microbiol., 23(5):979-86; (2) Vázquez-García et al, 2017. Cell Rep., 21(3):732-744; (3) Doyle et al, 2018, <https://doi.org/10.1101/298901>.

③成果の公表

We plan to conduct further analysis before publishing our findings in a Malaria-centric journal, emphasizing the viability of applying the LGS approach *in vitro* to identify signatures of selection in malaria genetic crosses as well as the importance of working with fresh and representative crosses for analyzing more complex phenotypes.

6. 自己評価

Despite the aforementioned issues with the quality of the genetic cross, the primary goal of identifying a selective sweep associated with pyrimethamine (PYR) resistance *in vitro* was successfully achieved. Results indicated a single, dominant selective sweep on chromosome 4 that encompassed the dihydrofolate reductase gene (*dhfr*) gene. Unfortunately, the same could not be achieved for sulphadoxine (SDX), both due to the low level of resistance in the cross and to the low number of recombinant clones surviving selection during combination therapy.

Growth rate experiments were equally affected by the initial lack recombinant clones and the take-over by a few fit recombinant clones. The presence of several “allelic jumps”, the lack of resolution and of deep, well defined selective sweeps meant that no reliable identification could be enacted.

This stresses the importance of generating crosses *de novo* rather than relying on ancient crosses affected by decades of *in vitro* passaging and rounds of cryogenic preservation which inevitably result in a loss of recombinant progeny clones. Nonetheless, despite the suboptimal state of the cross, it was remarkable that the PYR experiment was successfully concluded, thus proving the viability of the LGS approach *in vitro*.

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

② （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成29年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マーマセツモデル動物を用いたデング熱の感染防御のメカニズム解明に関する研究

課題番号：29－ 一般 －25

2. 代 表 者：（所属・職名）西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）

共同研究者：（所属・職名）MOI MENG LING（長崎大学熱帯医学研究所・准教授）

3. 決 定 額： 350 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

デング熱の流行地域は急速に拡大しており、日本国内においても、毎年、数百の輸入症例が報告されている。2014年には70年ぶりにデング熱の国内流行（患者数162人）が発生した。デング熱対策として、ワクチンによる予防法がもっとも有効である。しかし、デング熱ワクチンは未だに実用化されておらず、開発されるワクチンの有効性・安全性を評価するには適切なモデル動物を用いる必要がある。本研究では、マーマセツ新世界ザルを用いたデングウイルス感染症モデル（Moi et al., J Gen Virol, 2014; Omatsu et al., J Gen Virol, 2011）、及び、FcγR発現細胞を用いた新規中和抗体測定法（Moi et al., Lancet, 2013; Moi et al., PloS NTD, 2012; Moi et al J. Infect Dis., 2011）により、(1)デング熱ワクチン開発のためのモデル動物の確立、及び、(2)ワクチン有効性と安全性マーカーの指標となる防御の中和抗体価などの免疫因子の同定を目的とする。

②研究内容

本研究課題では、デングウイルス、及び、ワクチン候補の接種を受けたマーマセツの検体を用いてウイルス感染に対する防御免疫の関連因子を特定する。まずは、マーマセツ16個体に対し、ワクチン株（NDENV-1=4個体、NDENV-2=4個体）及び親株（NDENV-1=4個体、NDENV-2=4個体）の攻撃実験を行う。初回接種の6ヵ月後に、同血清型のウイルス（臨床株）の攻撃実験を行う。接種前、及び接種後の2、4、7、10、14日目に経時的に採血し、血中ウイルス量、及び、中和抗体を測定する。中和抗体価レベルにより、検体を選定し、末梢血中のサイトカインなどの遺伝子発現を特定する。長崎大学熱帯医学研究所の共同利用施設においては、①新規中和試験を用いた中和抗体価及び感染増強レベルの測定、②マーマセツ末梢血等のmRNA抽出、③マイクロアレイや次世代シーケンサー（RNAseq）などを用いた防御免疫（サイトカイン等）の関連因子を特定・解析する。

③予想される成果

本計画により、デング熱候補ワクチン、及び自然感染における感染防御を明らかにすることが可能となる。さらに、マーマセットの免疫解析ツールが限られているため、本研究課題ではマーマセットの免疫系の網羅的な解析に有用なマイクロアレイ、及び、次世代シーケンサーを用いた手法を独自に確立し、デング熱の感染防御のメカニズムを明らかにする。本研究により、デング熱ワクチンの評価モデルとしての有用性に関する科学的な根拠を提供できる可能性がある。今後は多くの研究機関や国際パートナーの協力を得て、デング熱ワクチンの実用化を前進させるツールとして、活用されることが想定される。このように、本研究で得られる成果は、デング熱に対する感染症対策に貢献する。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

(方法—1) マーマセットにおけるデングウイルスの感受性評価

デングウイルス (DENV) 感染に対し、高感受性 (Omatsu et al., J Gen Virol, 2011) を示すが、マーマセットにおける極期のウイルス血症は、約 10^4 PFU/ml であり、ヒトにおけるウイルス血症 (約 10^6 PFU/ml) と比べて 10 倍ほど低い。まずは、DENV-2 既感染マーマセット 6 個体に対し、DENV-1 (臨床株、 10^4 – 10^{12} PFU/dose) の皮下接種を行う。接種 3 日前および接種直後、2、4、7、10、14 日目に 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、ウイルス抗原のレベル、抗体価を経時的に測定する。

(方法—2) 同一血清型間の異なる遺伝子型に対する防御効果

デング熱に対するワクチンはいまだ実用化されていない。デングワクチンの条件として、すべての血清型のウイルスを防御することが重要である。しかし、2013 年のタイにおけるデング熱ワクチンの臨床試験では、DENV 中和抗体が認められたワクチン接種者において DENV2 型の患者が出現した。このことから、①防御にもっとも重要とされるマーカーの中和抗体が防御を正確に反映できること、及び、②同一血清型に対する防御免疫が同一型間のうち異なる遺伝子型の DENV 感染に対する防御効果があるかが問われている。ここで、(1)マーマセット 6 個体に対し、DENV2 の内、Asian I 遺伝子型 (グループ A: 3 個体)、及び、同血清型の Cosmopolitan 遺伝子型 (グループ B: 3 個体) の感染実験を行う。まずは、すべての 6 個体のマーマセット (グループ A 及びグループ B) に対し、Asian I 遺伝子型ウイルスの攻撃実験を行う。(2) 具体的に、マーマセットを麻酔し血清型 2 のデングウイルスの内、Asian I 遺伝子型、及び、Cosmopolitan 遺伝子型の皮下接種を行う。接種前、接種直後および接種後の 2、4、7、10、14 日目に 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、同遺伝子型及び異なる遺伝子型 (Asian I、Asian-American、Cosmopolitan 遺伝子型) に対するそれぞれの抗体価を経時的に測定し、ウイルス血症、感染によって誘導された免疫パターンを明らかにする。(3) 初回の接種から半年後に、血清型 2 のデングウイルスの内 Asian I 遺伝子型の皮下接種を行う。

接種前、接種直後および接種後の 2、4、7、10、14 日目に 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、抗体価を経時的に測定し、ウイルス血症感染によって誘導された免疫パターンを明らかにする。

(方法―3) 感染防御マーカーの探索・同定

いずれの DENV1 及び DENV2 の感染実験においても、初回のウイルス接種 1 週間後に同じ血清型に対する高価な中和抗体価（～1:2560）が認められた。さらに、DENV 接種歴のないマーマセットにおいては、チャレンジ実験後（2 回目の感染）に中和抗体の上昇が認められた。一方、DENV2 臨床株のチャレンジ実験では、ワクチン株接種群（4 個体）において、末梢血単球核細胞における IFN- γ 、IL-2、CD4 及び CD8 の遺伝子発現レベルの上昇が確認できた。さらに、マーマセットの免疫解析ツールが限られているため、本研究課題では、マーマセットの免疫系の網羅的な解析に有用なマーマセットのマイクロアレイを用いた手法を確立した。方法として、中和抗体価のレベルにより、検体を選定し、末梢血中のサイトカインなどの遺伝子の発現を RT-PCR にて測定する。さらに、Luminex 法にて①血中のサイトカインの測定、②独自に開発したマーマセットのマイクロアレイを用いて防御免疫の関連因子の特定・解析を行う。

②成果（結果＋考察）

(3―1) マーマセットにおけるデングウイルスの感受性評価

DENV-1 初回の感染では、いずれのマーマセット（3 個体）においても real-time PCR にてウイルス血症（4.6-7.0 log₁₀ genome copies/ml）が検出され、さらに、IgM/IgG の上昇パターンはデング熱の初感染患者と似ていることが明らかとなった。一方、デングウイルス 2 型既感染のマーマセット 4 個体では、高価な DENV-1（10⁹～10¹² PFU/dose）の接種により、極期のウイルス血症はヒトと同等なレベル（～7.5 PFU/mL）が認められたが、ウイルス血症の持続期間は通常より短く 3 日以内であった。いずれの再感染のマーマセットにおいても、Fc γ R 細胞にて感染性ウイルス―抗体複合体を検出できた。

ワクチン株及び親株の接種を受けた 8 個体においては、感染防御（ウイルス血症が検出限界以下）が認められたが、感染歴のない 4 個体（対照群）においては、ウイルス血症が認められ、さらに、初感染の IgM/IgG 上昇パターンを示した。DENV-1 の感染実験と同様に、DENV-2 ワクチン株接種群（4 個体）、及び、親株接種群（4 個体）を用いて、感染実験を行った。また、初回接種半年後、DENV-2 臨床株のチャレンジ実験にて、感染防御が確認できた。

(3―2) 同一血清型間の異なる遺伝子型に対する防御効果

ここで、(1)マーマセット 6 個体に対し、DENV2 の内、Asian I 遺伝子型（グループ A：3 個体）、及び、同血清型の Cosmopolitan 遺伝子型（グループ B：3 個体）の感染

実験を行った。すべての 6 個体のマーモセット（グループ A 及びグループ B）に対し、Asian I 遺伝子型ウイルスの攻撃実験を行ったところ、同血清型に対する防御効果が確認できた。しかし、初回接種による誘導された中和抗体価は Asian I 及び Cosmopolitan 遺伝子型に対してもっとも低く、Asian-American 遺伝子型に対する中和抗体価がもっとも高いことが明らかとなった。さらに、1 回目と異なる遺伝子型の接種により、中和抗体価が著しく上昇することが明らかとなった。以上の結果により、（1）血清型及び遺伝子型の抗原性特徴、（2）感染順序（初感染、再感染）は、抗体の中和レベルを左右することが示唆された。

（方法—3）感染防御マーカーの探索・同定

以下の方法がマーモセットの解析に有用であるかを検討した。Luminex 法を用いて血中のサイトカイン 10 種類（IL2, IL5, IL6, IL8, IL10, IFN γ , GM-CSF, TNF α , IFN α , IL8）を検討したところ、IFN γ のみ反応を示した。市販の Luminex アッセイは、新世界ザルのマーモセット・サイトカインとの交差性が IFN γ 以外、ほとんど検出できないため、このアッセイによる検討は困難であることが明らかとなった。次に、マーモセットのマイクロアレイを用いて PBMC 発現遺伝子を検討した。PCA 主成分分析により、コントロール群（接種 0 日）は、感染極期（接種 2、4 日目）により主成分が異なるため、優位に動きを見せる遺伝子の解析を進んでいる。これを基に RNAseq 解析に持ち込みたい。

③成果の公表

1. Azila NAM, Moi ML, Ami Y, Suzaki Y, Lim CK, Taniguchi S, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Serotype-specific and genotype cross-reactive neutralizing antibody during dengue virus-2 infection in a common marmoset (*Callithrix jacchus*) model. 第 53 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2018 年 6 月（栃木）

6. 自己評価

本研究により、デングウイルス感染マーモセットモデル動物は、DENV 弱毒化生ワクチンの接種によってヒトにおけるデング熱ワクチン候補株の接種に類似したウイルス血症、抗体誘導、血液学（生化学、血球数）的な変化および症状が出現したことを証明できた。さらに、マーモセットにおける中和抗体価上昇パターンは、デング熱患者、ワクチンの臨床試験と類似することが明らかとなった。さらに、マイクロアレイを用いた防御免疫（サイトカイン等）の関連因子解析に進むための目途がついたことは成果の一つといえる。これらの結果により、本マーモセットモデル動物は、デングウイルス感染モデル及びデング熱ワクチン評価モデルとして有用であることが明らかとなったことは大きな成果である。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

Ⅲ （予想通りの成果を挙げられた。満点）

Ⅳ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 29 年度共同研究報告（自己評価）

1. カテゴリー：

課題名：内臓リーシュマニア症制圧後の再燃監視機構の構築

課題番号：29- 一般 - 26

2. 代 表 者：（所属・職名） 愛知医科大学医学部 客員教授 伊藤 誠

共同研究者：（所属・職名） 長崎大学熱帯医学研究所 教授 濱野真二郎

愛知医科大学医学部 講師 高木秀和

Icddr,b Bangladesh Scientist Dinesh Mondal

3. 決 定 額： 600,000 円

4. 申請時書類より

①研究目的

リーシュマニア症はサシチョウバエの吸血によって媒介される人獣共通感染症である。マクロファージに寄生・増殖するリーシュマニア属原虫によって引き起こされ、その多彩な病型は内臓型（kala-azar、カラ・アザール）、皮膚型、皮膚粘膜型リーシュマニア症に大別される。世界 100 ヶ国近くに蔓延しており、毎年新たに 130 万人が罹患し、2-3 万人が死亡している。

内臓型リーシュマニア症（Visceral Leishmaniasis: VL）は発症した場合は治療しないと致死的であり、世界で毎年 50 万人が罹患している。インド亜大陸における VL は *Leishmania donovani* に起因し、治療による全身症状寛解から 2~4 年の後に 5~10% の患者がポスト・カラ・アザール皮膚リーシュマニア症（PKDL）を発症する。バングラデシュ政府は、内臓型リーシュマニア症の毎年の患者発生数を 1 万人に 1 人以下とする目標を掲げ、アムビゾームによる患者の治療と媒介昆虫であるサシチョウバエの駆除と蚊帳の配布を基本とした対策を推進中である。地域によっては対策が功を奏しており、患者数が減少してきている。それに伴い住民の本疾患に対する関心が薄れることによって、再燃の危険性が高まってくる。本研究は、この対策を成功に導くための、対策終了後の再燃監視機構を構築することを最終目的とする。

②研究内容

これまでの調査で明らかとなった患者多発地区（マイメンシン）において、我々の開発した手法を用いて研究課題の達成を目指して、以下の調査・研究を行う。

（1）定点観測のための小学校を選択する。

（2）active surveillance のシステムを確立し、モデル地区での運用を開始し、不備を改良しながら現地での定着を目指す。

（3）検査はすべてマイメンシンにある SK Hospital において行えるようにする。

- (4) サシチョウバエの飼育環境を整備し、PKDL の xeno diagnosis を確立する。
- (5) 濱野教授（熱研）を代表として新たな SATREPS 申請を見据えた現地との打合せを行う。

③予想される成果

内臓リーシュマニア症の elimination には、この疾患の継続的な監視が必要である。そのためには省力的な方法が必要であり、我々の開発した種々の方法はこれを可能にするものである。SK Hospital を活用した継続的な active survey により、再燃の早期発見が可能となり、バングラデシュの内臓リーシュマニア症対策に貢献できる。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

2017 年 6 月 30 日から 7 月 7 日の日程で、濱野教授（熱研）、小林教授（大分大学・医学部）と共にバングラデシュを訪問し、ダッカ市内に位置する 1) 国際下痢症研究センター、2) マイメンシンの Surya Kanta Hospital に隣接する SK Kala-azar Research Center (SKKRC) ならびに 3) マイメンシン医科大学 MMCH に Dr. Shyamal Kumar Paul、4) JICA バングラデシュオフィスを訪問した。

②成果（結果＋考察）

- 1) 国際下痢症研究センターでは、Dinesh Mondal 博士を訪ね、東京大学を主体とした SATREPS 終了後、バングラデシュにおける内臓リーシュマニア症の制圧へ向けた取り組みと現状に関する情報を得た。幸い英国政府からの援助を得、バングラデシュ政府による対策が、順調に進んでいることを認識し、担当管轄官庁の責任者を訪問した。
- 2) バングラデシュで見出された患者は全てマイメンシンの SKKRC へ紹介されそこで治療を受けている実態を確認した。ドイツとの共同研究により Dinesh Mondal 博士を中心とした活動を通してサシチョウバエの飼育環境も整備され、PKDL の xeno diagnosis が確立されている様子も確認できた。
- 3) マイメンシン医科大学 MMCH に Dr. Shyamal Kumar Paul を訪ね、バングラデシュにおける共同研究の可能性を話した。
- 4) JICA バングラデシュオフィスを訪問し、荒さん・伊藤さんへ日本の研究者が SATREPS を通して内臓リーシュマニア症の制圧へ向けた取り組みに貢献する意義を伝えた。プロジェクトの意義や重要性、我々の実力と熱意は十分に評価してもらえたものの、2016 年 7 月に発生したバングラデシュ・ダッカ襲撃事件のことがあり、JICA として

安全性を最優先に考えたときに、マイメンシンなどダッカ以外の地域への JICA 関係者の駐在は認めることが難しい現状が伝えられた。

上記、①②より、本研究の目的である、『active surveillance のシステムを確立し、モデル地区での運用を開始し、不備を改良しながら現地での定着を目指す』ことの必要性和実現可能性を認識した。一方、バングラデシュ・ダッカ襲撃事件の影響により、現状では SATREPS などへ申請し、JICA 活動の一環として「継続的な **active survey** により、再燃の早期発見を可能とし、バングラデシュの内臓リーシュマニア症対策に貢献する」ことは難しいと判断した。

③成果の公表

6. 自己評価

当初から計画・予定していた 1) 国際下痢症研究センター、2) マイメンシンの Surya Kanta Hospital に隣接する SK Kala-azar Research Center (SKKRC) ならびに 3) マイメンシン医科大学 MMCH、4) JICA バングラデシュオフィスの全てを訪問することができ、バングラデシュにおける内臓リーシュマニア症の制圧へ向けた取り組みと現状に関する情報を得た。

その上で、本研究の目的である、『active surveillance のシステムを確立し、モデル地区での運用を開始し、不備を改良しながら現地での定着を目指す』ことの必要性和実現可能性を再認識できた。この認識は JICA バングラデシュオフィスとも共有できたが、バングラデシュ・ダッカ襲撃事件の影響により、現状では、残念ながら SATREPS などへ申請し、JICA 活動の一環として貢献することは難しいと判断した。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）
- ② （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた。満点）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

別紙（作成書式）

平成 29 年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：アフリカ睡眠病を起こすトリパノソーマ原虫の Tb14-3-3・ヒートショック
蛋白のシグナル系を標的にした抗原虫薬スクリーニングの基礎研究
課題番号：29－ 一般 － 27

2. 代 表 者：井上雅広 久留米大学 医学部感染医学講座 教授
共同研究者：安田幸一 久留米大学 医学部感染医学講座 研究補助員
上村春樹 長崎大学 熱帯医学研究所 講師

3. 決 定 額： 300 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

本申請は、**T. brucei** にとって必須である **TbHSP70-4** の活性を制御する事が薬剤開発の標的となり得るとの仮説を検討するのが目的である。具体的には、TbHSP70-4 の翻訳後修飾(リン酸化)、および結合タンパクを解析することにより、それらが、TbHSP70-4 の機能にどのような影響を与えるかを明らかにする。これらの解析はまた、ヒト HSP と T. brucei HSP のシャペロン機能の制御の違いを明らかにする事により、ヒト HSP には無害で T. brucei HSP 特異的な阻害剤を探索する基礎となると考える。最近、トリパノソーマ科原虫のプロテアソームに特異的な阻害剤が、**T. brucei**, **T. cruzi**, **Leishmania** のマウス感染モデルにおいて、これらすべての原虫の排除に有効であることが *Nature* 誌に報告された。このことは真核生物に共通に存在するが **T. brucei** に特異的な“似て非なる分子”が、薬剤の標的分子として有効であることを示唆している。

②研究内容

ヒトと **T. brucei** の **HSP** のアミノ酸配列の差異および我々の研究結果に基づく具体的な研究内容を以下に述べる。

- [I] **TbHSP70-4** の **AKB1** によるリン酸化修飾がシャペロン機能をどのように制御しているか *in vitro* 及び *in vivo* で検討する。ほ乳類 **HSP** の **HSP70** および **HSC70** には **AKB1** リン酸化モチーフは 2 カ所しか存在しないが **T. brucei** の **HSP70-4** には 4 カ所存在する。
- 1) **TbHSP70-4** の **AKB1** によるリン酸化部位の同定。リン酸化可能な 4 カ所のうち実際にどの部位がリン酸化されるか、変異体 **TbHSP70-4** を用い調べる。
 - 2) リン酸化された **TbHSP70-4** とリン酸化されていない **HSP70-4** のシャペロン機能の差を熱変成させたルシフェラーゼ及びロダネースの活性の回復を指標に *in vitro* で判定する。
 - 3) **AKB1** によりリン酸化を受けない変異型 **TbHSP70-4** と野生型 **TbHSP70-4** の発現をテトラサイクリン依存にスイッチできる系を確立し、*in vivo* での形態と増殖能を調べる。

[II] ほ乳類の HSP70, HSC70, HSP90 に共通する C-末端アミノ酸配列に結合する CHIP (C-terminus of heat shock 70 interacting protein) のホモログを *T. brucei* で同定し(熱帯医学研究所 nano-LC MS/MS を利用する)、その機能を in vitro 及び in vivo で検討する。HSP の C-末端アミノ酸配列は、ほ乳類では GPTIEEVD であるが TbHSP70-4 では GPKVEEVD である。ほ乳類ではモチーフ中の Thr 残基がリン酸化される事により HSP70 と CHIP の結合は解離することが示されている。したがって、C-末端のこの部位が Lys である TbHSP70-4 は TbCHIP との結合制御が異なる可能生が予想される。よって TbCHIP は、ほ乳類 CHIP と相同性が低く、また機能も異なる可能性がある。さらに、Tb14-3-3 と HSP70-4 の結合が、Tb-CHIP と TbHSP70-4 の結合に及ぼす影響を検討する。

[III] ほ乳類の HSP 阻害剤がそのホモログである TbHSP70-4 に対しても有効な可能性があり、既知のほ乳類 HSP 阻害剤を用い TbHSP70-4 機能阻害実験を試みる。ここでの解析は、今後 TbHSP70-4 特異的な阻害剤を開発する上で重要な知見となると考える。

③予想される成果

これらの研究は、TbHSP70-4 のリン酸化や結合タンパクによる活性制御を明らかにし、また既存の HSP 阻害剤を用いてシード化合物を決定し、将来の TbHSP70-4 特異的な阻害物質の探索に繋がるものと予想される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

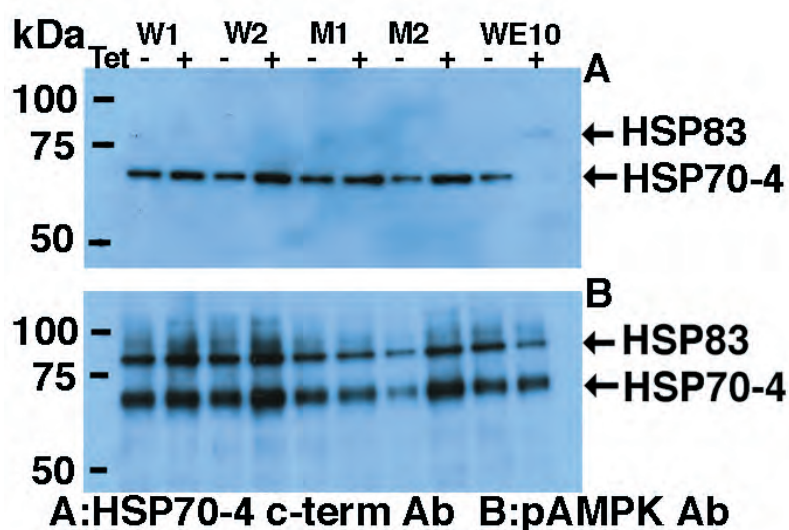
28 年度の研究で、AKB1 によってリン酸化を受けるタンパク質のアミノ酸配列を解析したところ、主として HSP70-4 に由来する配列が検出され重要な基質であることが示唆された。最初に pQuadrabsr HSP70-4(1702-1983 nucleotide HSP70-4 を insert として用いた)をトリパノソーマ原虫 procyclic form 29-13 に transfection クローニングして、HSP70-4 を knockdown (KD)したトリパノソーマ原虫を作成し、HSP70-4 の原虫増殖への影響を調べた。次に、AKB1 によってリン酸化を受ける可能性のある 4 カ所のリン酸化モチーフのすべてを Ala に置換した mutant HSP70-4 を Tet 依存性に発現する vector (pLew82T7phleoHSP70-4 M)を作成した。この vector では、integration site にある rDNA の影響を除く目的で episomal DNA の VSG8 に変更した。さらに、pLew82T7phleoHSP70-4 においては、幾つかの部位でアミノ酸のコドンを変更し、dsRNAi がかからないようにした (DNA 合成を利用)。pQuadrabsr HSP70-4 と pLew82T7phleo HSP70-4 M あるいは pLew82T7phleo HSP70-4 W (wild type)を co-transfection して HSP70-4 の mutant と wild type を発現させた。

クローンをスクリーニングするために、作成した HSP70-4 の mutant と wild type を発現する原虫を SDS-loading buffer にて溶解し、抗 HSP70-4 C-terminal Ab あるいは phosphoAMPK motif Ab(AKB1 のリン酸化部位を認識する)を用いて Western Blotting をおこなった。

②成果（結果＋考察）

最初に HSP70-4 を knockdown (KD)したトリパノソーマ原虫 procyclic form 29-13 を作成し、0.5% NP-40 0.5M NaCl insoluble fraction を 2 次元電気泳動で展開、AKB1 のリン酸化部位を認識する phosphoAMPK motif 抗体を用いて Western blot を行った。HSP70-4 に基づく spot をはじめ、抗体で認識されるほとんどすべての spot が消失(銀染色の結果から spot のタンパク量は 1/3 位に減っていることが示唆された)していることを確認した。この HSP70-4 を knockdown した原虫は増殖が遅く、HSP70-4 が原虫の増殖に影響を与えることを確認した。また、HSP70-4 の knockdown によりリン酸化される spot のタンパク量が減少したのは、HSP70-4 の非存在下ではこれらのタンパク質は本来の conformation がとれず分解されやすくなったため、あるいは HSP70-4 を knockdown するとこれらタンパク質の分画に影響が出たためと推測される。このような可能性を除去するために、以下の実験では原虫の total protein を SDS-loading buffer で抽出、SDS-PAGE で展開して、HSP70-4 Ab および phosphoAMPK motif Ab を用いる WB を行った。

pQuadrabsr HSP70-4 と pLew82T7pheloHSP70-4 W を co-transfection した場合、二つの vector の integration site が同じ rDNA であり、異常な phenotype を示す clone が 20% くらいの割合で出現 (data not shown) したので、その影響を除去するために pLew82T7phleo の integration site を episomal DNA VSG8 とした。異常な phenotype を示す原虫は認められず、代表的なクローンの WB の結果を以下に示す。

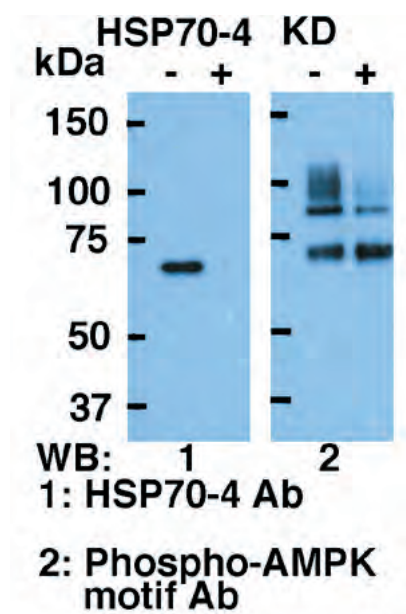


W は wild type を発現する pLew82T7pheloHSP70-4 W、M は AKB1 による putative なリン酸化部位 4 カ所を Ala に置換した変異型を発現する pLew82T7phleo HSP70-4 M を transfection しており、Tet 非存在下では endogenous な HSP70-4 が発現、Tet 存在下では、pLew82T7pheloHSP70-4 W、pLew82T7phleo HSP70-4 M の、wild type または mutant HSP70-4 が発現していると期待される。W1, W2, M1, M2 においては、HSP70-4 に基づくバンドが検出されるのに対し、WE10 においては Tet 存在下で HSP70-4 に基づくバンドが検出されていない(A)。一方、AKB1 によるリン酸化部位を認識する抗体との反応性は、HSP70-4 のリン酸化部位を Ala に置換したクローン M1, M2 においても、さらに HSP70-4 の発現量が低下していると推測される WE10 においても減弱していなかった(B)。なお、

抗リン酸化抗体で認識される HSP70-4 の上に認められるバンドは、HSP83 にも AKB1 によるリン酸化部位が 2 カ所存在することから、分子量より HSP83 と予想した。原虫増殖については、W1, W2, M1, M2 とともに Tet 存在下でも非存在下でも変化が認められなかった。それに対して、HSP70-4 の発現が十分でない WE10 では cell growth が止まり、原虫の形が丸くなった細胞が多くみられた。この結果は、HSP70-4 が原虫の成育に必須な蛋白であることを再確認させるものである。

今回用いた方法、Tet で一方の発現を knockdown、もう一方は強制発現させるという方法は、しばしば用いられている方法であるが、endogenous な HSP70-4 がどのくらい残っているのか、Tet で誘導した HSP70-4 がどの程度発現したのか、不明な点が欠点であり、HSP70-4 の予想された 4 カ所のリン酸化が *T. brucei* の phenotype, cell growth にどのような影響を与えているか、明解な結果を得ることが出来なかった。

先の 2 次元電気泳動で解析した HSP70-4 の knockdown においては、リン酸化部位を認識する抗体で認識される spot が消失したのに対して、今回の WE10 では HSP70-4 の量がほぼ消失しているにもかかわらず抗体で認識されるバンドが認められた。再度、HSP70-4 が AKB1 によりリン酸化されているか否かを確かめるため、HSP70-4 を knockdown する前後の原虫の lysate を protease inhibitor +SDS-loading buffer で作製し、異なる Lot の Gel を用いて WB を行った(下図 1, 2)。この場合、原虫の全タンパク質を解析に用いることで、HSP70-4 を knockdown することによるタンパク質の分画への影響を排除することが可能である。



抗 HSP70-4 の抗体を用いて HSP70-4 の knockdown を確認する (1) とともに、AKB1 のリン酸化 motif を認識する Phospho-AMPK 抗体で認識されるバンドが knockdown 原虫にも存在すること、リン酸化のバンドの強度が増強していることを確認した (2)。さらに、今回の knockdown 原虫の WB による解析では、HSP70-4 の抗体が認識するバンド (1) とリン酸化抗体が認識するバンド (2) のサイズに若干のずれがあることが示された。

これは、HSP70-4 の knockdown、すなわち HSP70-4 の非存在下では、タンパク質が本来の conformation がとれず分解されやすくなっていて、2 次元電気泳動による解析の

条件下ではリン酸化を受けたタンパク質も分解して検出されなかったのに対して、**protease inhibitor +SDS-loading buffer** を加えた条件下では分解が制御されて、リン酸化を受けたタンパク質を検出できたと理解することが出来る。また、HSP70-4 と AKB1 でリン酸化されるタンパク質は異なること、HSP70-4 は AKB1 の基質でない事が明らかになった。

さらに、HSP70 の knockdown、mitochondria HSP70 を knockdown した細胞を樹立し、AKB1 によるリン酸化を WB で確認したが、これらのタンパク質はすべて AKB1 ではリン酸化されない事が判明した(data not shown)。2次元電気泳動でリン酸化される spot を切り出し、nanoLC-MS/MS で得られたアミノ酸配列において、HSP70-4, HSP70, mitochondrial HSP70 以外のタンパク質が同定できなかった事実は、リン酸化されるタンパクの量が微量で、nanoLC-MS/MS の検出限界以下であることを示唆している。

今後、異なるアプローチ、すなわち AKB1 (-) (+)で Lys-end peptidase で切断した peptide を phosphoAMPK motif Ab で immunoprecipitation を行い、両者の比較により AKB によりリン酸化される sequence を得る予定である。

当初計画した [II] [III]に関してはほとんど行うことが出来なかったが、HSP70-4 を knockdown すると C-term のアミノ酸配列 VEEVD が同一の HSP83 の発現が上がる事が判明した。これは、今後のシャペロンの相互作用に役立つものと考えられる。

③成果の公表 リン酸化を受けるタンパク質を同定、役割を解析して発表する。

6. 自己評価

2次元電気泳動でリン酸化を受ける spot を切り出して nanoLC-MS/MS で得られた配列からは、HSP70-4, HSP70, mitochondrial HSP70 以外のタンパクは同定できなかったが、HSP70-4 のみならず HSP70, mitochondrial HSP70 も AKB1 でリン酸化されないことが明らかになった。実験の順番として、これらのタンパクが AKB1 により in vivo でリン酸化されるかどうかをそれぞれの遺伝子で行ったあと遺伝子の交換実験に進むべきであった。しかし今回の実験で HSP70-4 が T. brucei の増殖に重要であることを示すことが出来た。

7. 達成度（何れかに○）

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

② (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（6の自己評価で述べておれば省略して良い）

第 2 部

研 究 集 会

平成 29 年度研究集会報告（自己評価）

1. 分野名：熱帯医学研究所 病害動物学分野

研究集会の名称：All Japan Mosquito Symposium

採択番号：29-集会-1

開催期間：平成 29 年 6 月 10 日（土）

2. 代表者：一盛 和世（James Cook University、長崎大学・客員教授）

参加人員：13 人

3. 決定額：500 千円

4. 研究集会の概要

世界的に蚊が媒介する感染症は多く発生しており、特に熱帯・亜熱帯地域において猛威を振るってきた。近年ではグローバル化や地球温暖化に伴い日本でもこれらの感染症の輸入例や国内流行が報告され、社会的な関心を引いている。これらの蚊媒介感染症の分布には、社会的要因や環境的要因、さらには人々の行動様式などが複雑に影響しあうため、その対策には多方面にわたる専門家の協力と総合的な知見を集約した対策が急務である。

そのような背景のもと研究集会として「All Japan Mosquito Symposium」を開催した。本研究集会は熱帯医学、昆虫医学分野の研究者のみならず、産・官・民・学からの専門家を交えてこれまでの知見を集積し、分析・意見交換を行い、今後、日本の蚊媒介感染症研究ネットワークの構築を目的とし開催した。さらに、本研究集会を通して、蚊媒介感染症を学ぶ学生や若手研究者に蚊媒介感染症対策における学際的な協働の意義を広く伝え、将来を担う人材への刺激となることも目的の 1 つとする。

5. 実施報告：

日本の蚊媒介感染症研究ネットワーク（「All Japan Mosquito network」）の構築を目的とし産官民学から 13 名が参加。

まずは次の 2 点を目的とし「All Japan ぶ〜ん蚊祭 -もっと知ろう蚊の世界-」を開催することで今後のネットワーク構築のへとつなげていくことを検討した。

目的：

- ① PPP を超えたステークホルダー（熱帯医学・昆虫学分野の研究者、民俗学、歴史学、作家、アート、企業）のネットワーキングの場の提供
- ② 啓蒙および教育活動として、蚊の認知向上、一般向けの啓蒙活動、蚊に対する捉え方の違いを超えて蚊を general なものにする

開催時期：

2018 年 6 月の土日 厚労省の蚊のキャンペーンの時期と合わせる

開催場所：

東京都内 日本科学未来館、国立科学博物館など

実行委員会：

（代表）一盛和世

（事務局代表）嘉糠洋陸

（実行委員会メンバー）本研究集会参加者

フォーカルパーソン：

（官）沢辺京子

（産民）片山淳一郎

（学）皆川昇、嘉糠洋陸、三條場千寿、小川和夫

さらに、「All Japan Mosquito network」構築に向けて、以下の構想を共有した。

- ・このネットワークは蚊に関する各分野を超えた情報交換の場とする。具体的なアクションを進める組織ではない。
- ・各自がすでに有するネットワークや上記「ぶ～ん蚊祭」から派生したネットワークをつなげ、蚊に関わる緩やかな All Japan 一大ネットワークを構築する
- ・ネットワークの対象は国内・海外を問わない。海外にも発信して All Japan のネットワークを世界のネットワークにつなげる
- ・組織体制を整えてアクセスしやすいコアをつくりネットワークの構築、継続を目指す

研究集会参加者		
研究者氏名	所属・職名	役割分担
（代表者） いちもり かづよ 一盛 和世	James Cook University、愛知医科大学、長崎大学・客員教授	司会・総括
さわべ きょうこ 沢辺 京子	国立感染症研究所 昆虫医科学部・部長	シンポジスト
かぬか ひろたか 嘉糠 洋陸	東京慈恵会医科大学 熱帯学講座・教授	シンポジスト
さんじょうば ち ず 三條場 千寿	東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用免疫学講座・助教	シンポジスト
おがわ かずお 小川 和夫	公益財団法人 目黒寄生虫館・館長	シンポジスト
もりおか みどり 森岡 翠	特定非営利活動法人 DNDi Japan・プロジェクトサポートオフィサー	シンポジスト
い も と だいすけ 井本 大介	特定非営利活動法人 DNDi Japan・事務局代表	シンポジスト
たにかわ つとむ 谷川 力	イカリ消毒株式会社 技術研究所・所長	シンポジスト
かたやま じゅんいちろう 片山 淳一郎	環境機器株式会社 代表取締役社長	シンポジスト
たか き まさひろ 高木 正洋	認定特定非営利活動法人 Malaria No More, Japan・理事	シンポジスト
ひ が ゆ き こ 比嘉 由紀子	長崎大学 熱帯医学研究所 病害動物学分野・助教	シンポジスト
ひらおか ひさかず 平岡 久和	長崎大学 国際連携研究戦略本部/熱帯医学・グローバルヘルス研究科・准教授	シンポジスト
熱研教員氏名	分野等名・職名	
みなかわ のぼる 皆川 昇	長崎大学 熱帯医学研究所 病害動物学分野・教授	コーディネーション、会議設営

6. 自己評価

産官民学から13名の参加があった。日本の蚊媒介感染症研究ネットワーク（「All Japan Mosquito network」）の構築に向けた産官民学それぞれの立場からの活発な意見交換が行われた。その結果、「All Japan ぶ～ん蚊祭 –もっと知ろう蚊の世界–」開催へのキックオフとなり今後のネットワーク構築へ向けた足がかりを作ることができた。さらに、ネットワーク構築に向けた構想についても具体的に共有することができ、予想以上の成果が挙げられた。

7. 達成度（何れかに○）

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

平成29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：29-集会-2

開催期間：平成29年5月22日（月）～平成29年5月24日（水）

2. 代表者：佐々木 均（長崎大学病院薬剤部・教授）

参加人員：25名

3. 経費：1,000 千円

4. ①研究集会の概要

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

②予想された成果

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

5. 実施報告

本集会は、「医学研究のための倫理に関する国際研修コース」との共催として、長崎大学グローバルヘルス総合研究棟にて平成29年5月22日～5月24日の3日間、講師9名（うち外国から3名、国内から6名）と参加者34名（うち外国から21名、国内から13名）を集め開催された。FERCAP-Philippines（フィリピン国）の Cristina Torres, Mahidol University,Thailand（タイ国）の Jarupim Soongswang、Khon Kaen University（タイ国）の

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

<プログラム>

日 時：平成29年5月22日（月）、5月23日（火）、5月24日（水）

場 所：長崎大学グローバルヘルス総合研究棟（坂本キャンパス）

参加費：参加費無料(宿泊費、食事代、交通費等は各自負担)

ウェブサイトは、

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

運営事務局：〒852-8523 長崎市坂本1-12-4

長崎大学熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野

教授 平山 謙二

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

【研修の目的】

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

【対象者】

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

【研修方法】

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

理解できるようサポートを行う。

【講師陣】

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

講義担当者：Cristina Torres (FERCAP-Philippines)、
Sangkae chamnanvanakij
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：Nguyen Tien Huy（長崎大学熱帯医学研究所）

【研修コースの概要】

（第 1 日目）2017 年 5 月 22 日（月）

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

オリエンテーションと参加者の自己紹介

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

10:00-10:30 コーヒー・ブレイク

10:30-11:15 研究倫理委員会の役割と機能 (Sangkae)

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

12:00-13:00 ランチタイム

13:00-13:30 利益相反 (Kwanchanok Yimtae)

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

14:15-14:30 コーヒー・ブレイク

14:30-15:30 Case Study 1: グループ討論

(Cristina Torres、Kwanchanok Yimtae、Sangkae Chamnanvanakij、佐々木均、
Nguyen Tien Huy、Juntra Karbwang、平山謙二)

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

17:00 End of day one

（第 2 日目）2017 年 5 月 23 日（火）

8:30- 9:00 ヒトゲノム研究の倫理的問題 (平山謙二)

9:00- 9:45 精神医学研究の倫理問題 (Kwanchanok Yimtae)

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

10:30-11:00 コーヒー・ブレーク
 11:00-12:00 Case Study 2: はじめに
 12:00-13:00 ランチタイム
 13:00-15:00 Case Study 2: グループ討論
 (Cristina Torres、Kwanchanok Yimtae、Sangkae-chamnanvanakij、Nguyen Tien Huy、
 Juntra Karbwang、平山謙二)
 15:00-15:30 コーヒー・ブレーク
 15:30-17:00 Case Study 2: 総合討論 (Cristina Torres)
 17:00 End of day two

(第 3 日目) 2017 年 5 月 24 日 (水)

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

End of the course

<参加者リスト>

	Name	Country	Title/Institution
1	Petch Alisamant	Thailand	Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chulalongkon university
2	Melissa L.Aquino-Villamin	Philippines	St. Lukes Medical Center
3	Pleumijit Boonyaphiphat	Thailand	Department of Pathology, faculty of Medicine Prince of Songkhla University
4	Akintije Simba Calliope	Japan/Rwanda	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
5	Josefina Andrea R Cantiller	Philippines	St. Lukes Medical Center
6	Nattawat Chaiyawong	Japan/ Thailand	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in

			Tropical and Emerging Communicable Diseases
7	Pemba Mawonga Christelle	Japan/Congo DRC	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
8	Mylene U. Cornel	Philippines	St.Lukes Medical Center
9	Maria Cristine Dimitui	Philippines	St. Lukes Medical Center
10	Pembi Emmanuel	Japan/Nigeria	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Infection Research, Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases
11	Reinier D. Erncio	Philippines	St. Lukes Medical Center
12	Rossele B. de Guzman	Philippines	St.Lukes Medical Center
13	Marcelo Severino B. Imasa	Philippines	St.Lukes Medical Cente
14	Ritsuko Ikeda	Japan	Center for clinical research and advanced medicine, Shiga university of medical science
15	Kannitha Krongthamchat	Thailand	Departmet of Enviromental health Occupation health and Safety,Faculty of public Health, Khon Kaen University
16	Rattanaadee Nanagara	Thailand	Department of Medicine Faculty of Medicine, Khon Kaen university
17	Filipinas F Natividad	Philippines	Raniers Contract reserac Services, Inc., Philippines
18	Etsu Noguchi	Japan	Pubric Relations Office Osaka University Graduate school Oh Medicine
19	Elizabeth Freda Omengan-Telan	Philippines	Department of Laboratories and National Reference Laboratory San Lazaro Hospital
20	Mpingabo Ilunga Patrick	Japan/Congo (RDC)	Cours for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

21	Mukendi Kambala Jean Pierre	Japan/Congo (RDC)	Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
22	Anothai Pocathikorn	Thailand	Department of Pathology, Faculty Of Medicine Prince of Songkhla University
23	Anudari Serjmyadag	Mongolia	Department of Public Health Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
24	Pratum Soivong	Thailand	Faculty of Nursing, Chiang Mai University
25	Nithipun Suksumek	Thailand	Department of Pediatric, Pramongkutklao Medical College Bangkok
26	Sae heng Teerachat	Japan/ Thailand	Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
27	Nguyen Co Thach	Japan/Vietnam	Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
28	Rajabali Zadeh Vahid	Japan/Iran	Course for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
29	Clara Alejandra Vasquez Velasquez	Japan/Guatemala	Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
30	Apichai Vasuratna	Thailand	Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

31	Shashika Lavangi Wijesooriya	Japan/Sri lankan	Virology Department, Institute of Tropical Medicine Nagasaki university
32	Wirat Wongpinunwatana	Thailand	Faculty of Humanity and Social Sciences, Khon Kaen University
33	Phanthipha Wongwai	Thailand	Faculty of Humanity and Social Sciences, Khon Kaen University
34	Khristine Dell G. Yap	Philippines	San Lazaro Hospital (SLH) Nurse III

<講師・メンターリスト>

	NAME	COUNTRY	INSTITUTION
1	Sangkae Chamnanvanakij	Thailand	Colonel, Medical Corps, The Royal Thai Army Department of Pediatric Phramongkutklao Hospital, The Royal Thai Army
2	Kenji Hirayama	Japan	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
3	Juntra Karbwan Laothavorn	Japan/Thailand	Department of Clinical, product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki university
4	Cherif Mahamod Sama	Japan/Guinea	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
5	Dumre Shyam Prakash	Japan/NEpal	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
6	Hitoshi Sasaki	Japan	Department of Clinical Pharmacy, Nagasaki University Hospital
7	Nguyen Huy Tien	Japan/Vietnam	Department of Clinical Product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
8	Cristina Torres	Philippine	FERCAP Coordinator/WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, Thailand
9	Kwanchanok Yimtae	Thailand	Khon Khen University, Thailand

6. 自己評価

平成 29 年 5 月 22 日（月）～ 平成 29 年 5 月 24 日（水）の 3 日間長崎大学において、英語による倫理に関する国際研修コースを開催し、講師 9 名（うち外国から 3 名、国内から 6 名）と参加者 34 名（うち外国から 21 名、国内から 13 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 16 回目のコースであったが、タイの WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center の FERCAP Coordinator Cristina Torres 女史を中心に、これまでのスタイルを継承しつつ医学における倫理問題の世界的な動向についても議論することができた。予想以上の成果であった。

7. 達成度（何れかに○）

I : ほとんど出来なかった

II : 不満は残るがまず OK

III : 予定通りの成果

④ : 所期の予想以上の成果が挙げた

※評価を下した理由（6 の自己評価で述べておれば省略して良い）

第 3 部

海外拠点連携共同研究

別紙（作成書式）

平成29年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

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

課題番号：29－拠点－1

2. 代 表 者：（所属・職名）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：（所属・職名）○矢口貴志（千葉大学真菌医学研究センター・准教授）、
亀井克彦（千葉大学真菌医学研究センター・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）、五ノ井 透（千葉大学真菌医学研究センター・非常勤講師）、一瀬休生（長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点・拠点長）

3. 決 定 額： 7, 0 0 0 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ケニアにおいて、ヒトに病原性を示す真菌・放線菌、および穀物などを汚染しカビ毒産生などによりヒトに健康被害を及ぼす真菌を単離・培養・保存する。これらの原因菌の形態学的、生理学的、分子系統学的解析を行い、地域特異性を明らかにするとともに、疫学的研究を進める。本研究はケニア拠点の支援の下、KEMRI 所属の研究者と共同で実施する。

②研究内容

平成29年度

H28 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、多遺伝子解析を実施し、汚染菌の分子系統的な位置付けを確定する。また、マイコトキシン産生量は簡易キットを用いて汚染を定量し、一部の産生菌は標準化された厳密な化学定量を行う。主に *Aspergillus*、*Fusarium* において、分子系統学的解析、形態学的解析、培養菌株によるカビ毒産生実験（各種カビ毒量の測定）、カビ毒生合成遺伝子などの結果を統合し、それぞれの菌属毎にまとめ報告する。

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

平成30年度以降

カビ毒による食糧汚染は季節・気候を反映し年度によって汚染度が異なるため、今後も継続してケニア各地の穀物から汚染菌を分離し、その分子系統的な位置づけの解析、マイコトキシン産生量を測定し、ケニア国内におけるマイコトキシン産生菌の汚染実態を継続的に観察する。

とくに、Section *Nigri*に属する黒色の *Aspergillus* は、多遺伝子解析による分類が進展し、分子系統とマイコトキシン産生の相関関係が明らかになりつつある。このような最新の情報を勘案し、今後、汚染リスクが高い菌種を想定し、リスクが高い菌種の迅速な同定法を開発するなど、食品のカビ汚染による健康被害を未然に防ぐ方法の提案に結び付ける。

また、エイズ患者への真菌の感染実態の解析結果から、真菌の感染経路の推定を行い、エイズ患者における真菌感染の予防などリスク管理に繋げる。

以上の研究成果を通じて、現地の人々およびアフリカを含む世界の人々の QOL の向上への貢献を目指す。

③予想される成果

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

5. 実施状況報告：

①平成29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* 関連種の同定とカビ毒の産生性、薬剤感受性
2. ケニア環境中からの病原性 *Aspergillus fumigatus* の検出とその薬剤感受性
3. ケニアの穀物から分離された *Fusarium* 属の同定とカビ毒の産生性
4. ケニアの女性から臨床的に分離された *Candida* 属の同定

②成果（結果＋考察）

1. ケニアの穀物から分離された *Aspergillus niger* 関連種の同定とカビ毒の産生性、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、新種と考えられる4種を発見した。

2004年、ケニアでアフラトキシンがアウトブレイクした地域マクエニ、キトゥイのコー

ンから分離した、新たな菌株を解析した。その結果、これまで分類に使用されている calmodulin、b-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さらに発見された。そこで、基準種、新種と考えられる種において全ゲノムを解析し、共通の遺伝子を抽出し、多遺伝子による系統樹の作成を行っている。さらに、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開始した。

2. ケニア環境中からの病原性 *Aspergillus fumigatus* の検出とその薬剤感受性

ケニア、ナイロビ周辺の畑地から *Aspergillus* 属の分離を行い、形態的に *A. fumigatus* と推定された 16 菌株の分子系統的な同定 (b-tubulin 遺伝子の塩基配列による)、薬剤感受性試験を実施した。その結果、13 株は *A. fumigatus*、残りの 3 株は 2016 年に新種報告された *A. oerlinghausensis* と同定された。*A. fumigatus* 13 株中 2 株にポリコナゾール、イトラコナゾール耐性が見られ、その耐性機序は、欧州で報告され世界的に蔓延している *cyp51A* 遺伝子の TR34/L98H 変異であった。*A. oerlinghausensis* 3 株はいずれもポリコナゾール耐性が確認された (既報通り)。

3. ケニアの穀物から分離された *Fusarium* 属の同定とカビ毒の産生性

ケニア、ナイロビの市場で購入したコーンなどの穀物から分離され、形態学的に *Fusarium* 属と分類された 66 菌株において、EF-1 α 、RPB1、RPB2 遺伝子の塩基配列を決定し、MLST (Multi Locus Sequence Typing) 検索し、種を同定した。その結果、54 株 (82%) が、*Fusarium napiforme* であり、他の菌株は *Gibberella fujikuroi* 種複合体に分類された。日本ではほとんど見られない *F. napiforme* が多く、真菌叢が日本とは異なっていたが、その多様性は低いと考えられた。さらに、コーンに植菌し、25°C で 28 日間培養、カビ毒、フモニシンとデオキシニバレノールの産生を、LC/MS で測定した。フモニシンは、3 株において測定可能な微量の産生が確認されたが、デオキシニバレノールの産生は確認されなかった。今回の調査では、*Fusarium* 属による重大な健康被害など引き起こす可能性は低いと考えられた。

4. ケニアの女性から臨床的に分離された *Candida* 属の同定

ケニア、ナイロビの医療機関において、膣カンジダ症の患者から分離された *Candida* 属を rDNA ITS 領域の塩基配列で同定したところ、25 株中 23 株が *Candida albicans* であった。今後、さらに菌株数を増やし、種内多様性の検討を実施する予定である。

③成果の公表

Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gonoi T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moye-Rowley WS, Kawamoto S, Gomi K. A novel Zn²⁺-Cys₆ transcription

factor AtrR plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating cyp51A and cdr1B expressions. PLoS Pathogens 4;13(1):e1006096, 2017.

Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gono T, Takahashi H: Transcription factor Afmac1 controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. Curr Genet. 63(4):777-789, 2017.

Kemoi EK, Nyerere A, Gross U, Bader O, Gono T, Bii CC. Diversity of azoles resistant *Aspergillus* species isolated from experience and naïve soils in Nairobi County and Naivasha Sub-County Kenya. Eur Sci J 13 (36): 301-311, 2017.

6. 自己評価

本年度は主として、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 *Aspergillus*、*Fusarium* 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とともに、マイコトキシン産生量を測定した。その結果、*Fusarium* においては、日本では稀な種 *F. napiforme* が多く、真菌叢が日本とは異なっていたが、その多様性は低く、カビ毒産生量は低かった。*Aspergillus niger* 関連種においては、オクラトキシンの産生能、薬剤感受性のデータを加え、分子系統的、生理性状的に *A. niger* 関連種全体の分類の再検討を開始した。これまで未報告の種が見いだされ、それらの健康リスク評価は重要と考える。また、*A. fumigatus* のアゾール耐性株が分離され、近年新種報告された *A. oerlinghausensis* のアゾール耐性が確認され、今後もアスペルギルス症原因菌の動向に注目する必要がある。

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

7. 実施度（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。）
- ③ （実施計画どおり進展している。）
- IV （実施計画以上の成果が得られている。）

評価を下した理由（６の自己評価で述べておれば省略して良い）
 前述のとおり

８．平成２９年度執行状況調

経費区分	学内負担額	運営交付金	執行額	備 考
	千円	千円	千円	
（人件費）	0	707	707	
（運営費）	0	3,149	3,149	
（設備費）	0	3,144	3,144	
計	0	7,000	7,000	

別紙（作成書式）

平成29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：29－拠点－2

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

3. 決 定 額：8,000千円

4. 申請時書類より

①研究目的

東南アジアで流行している HIV-1 CRF01_AE (subtype A/E) は、日本で流行している subtype B の HIV-1 とは構造や機能が異なっており、これらの HIV-1 に対するワクチンや治療薬の開発は subtype B に対するものとは異なってくると考えられる。そこでまだ十分解明されていない subtype A/E の構造・機能解析やこのウイルスに対する細胞傷害性 T 細胞の反応、HLA の病態進行の及ぼす影響等を、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の維持：National Hospital of Tropical Diseases (NHTD) で樹立した無治療コホートでの HIV-1 感染者のリクルートを継続し、平成29年度で新たに約100名の感染者をリクルートする。

ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与えるHLAの解析：平成29年度末までにサンプリングできる約700名の患者のうち、解析条件を満たした患者のHLAを解析し、エイズ進行に影響を与えるHLAを明らかにする。

ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：Subtype A/E ウイルスに対するCTL反応を明らかにする。既に作成してある Gag, Pol, Nef の領域の 17-mer overlapping peptides を用いて、平成28年度後半と29年度途中までにリクルートした約100名の患者のPBMC内のCTLの反応を、ELISPOT アッセイにより解析する。今までに解析してある約350名分のELISPOT アッセイ解析データと合わせて、患者体内のHIV-1の増殖抑制に関与しているCTLが認識する17-mer ペプチドを明らかにする。さらにCTLが認識する短いペプチドを絞りこみエピトープペプチドを同定する。同定したペプチドを用いて、これらのエピトープが認識するCTLがHIV-1の増殖抑制をしているかを、コホートの感染者由来のPBMCを用いて解析し確認する。

ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析:長崎大学ハノイ拠点と連携して、現在分離に成功した HIV 臨床株のエンベロープ糖タンパク質 gp120 のコレセプター利用性を主に決定している V3 領域の多様性を解析し、コレセプター利用の感染個体内の進化過程を明らかにする。本年度は特に CXCR4 のみを使用するウイルスを有する感染個体内で、このようなウイルスがどのような進化過程を経て出現してきたのかを明らかにする目的で、これらの感染者における V3 領域の多様性を次世代シーケンサー (NGS) にて検出して、系統樹解析から CCR5 から CXCR4 への進化がこれらの感染個体で起きているかどうか探索する。

③予想される成果

我々は長期間かけてハノイの NHTD で無治療 HIV-1 患者のコホートの樹立をし、HIV-1 の構造解析と HLA 解析を行ってきた。その結果、ハノイコホートで集積してきている薬剤耐性変異を明らかにし (**J. Virol. 89:7363-7372, 2015**)、また HIV-1 subtype A/E に感染しているベトナム人集団においては Pol 領域に選択される HLA-AP の蓄積が感染者の病態に悪い影響を与えていることを明らかにした (**AIDS30:681-689, 2016**)。また現在ベトナムで流行している HIV-1 subtype A/E の機能解析と 1 つとしてコレセプター利用性の解析、そのウイルスに対する免疫能の解析として、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の反応性を解析している。

平成29年度以降もこれらの研究を継続することにより、1) まだ全体像が明らかになっていない HIV-1 subtype A/E に対する CTL の反応が解明され、報告されている subtype B, C に対する CTL との反応の違いが明らかにでき、さらにこの地区でのエイズワクチン開発に貢献できる 2) ハノイコホートで病態の進行に影響を与える HLA の同定や抗 HIV 薬にたいする効果が予想できるウイルス構造を明らかにできる。以上の結果から、ワクチン開発に有用な HIV-1 subtype A/E の抗原部位が絞り込め、また今後のエイズ治療薬の選択に貢献する。

5. 実施状況報告:

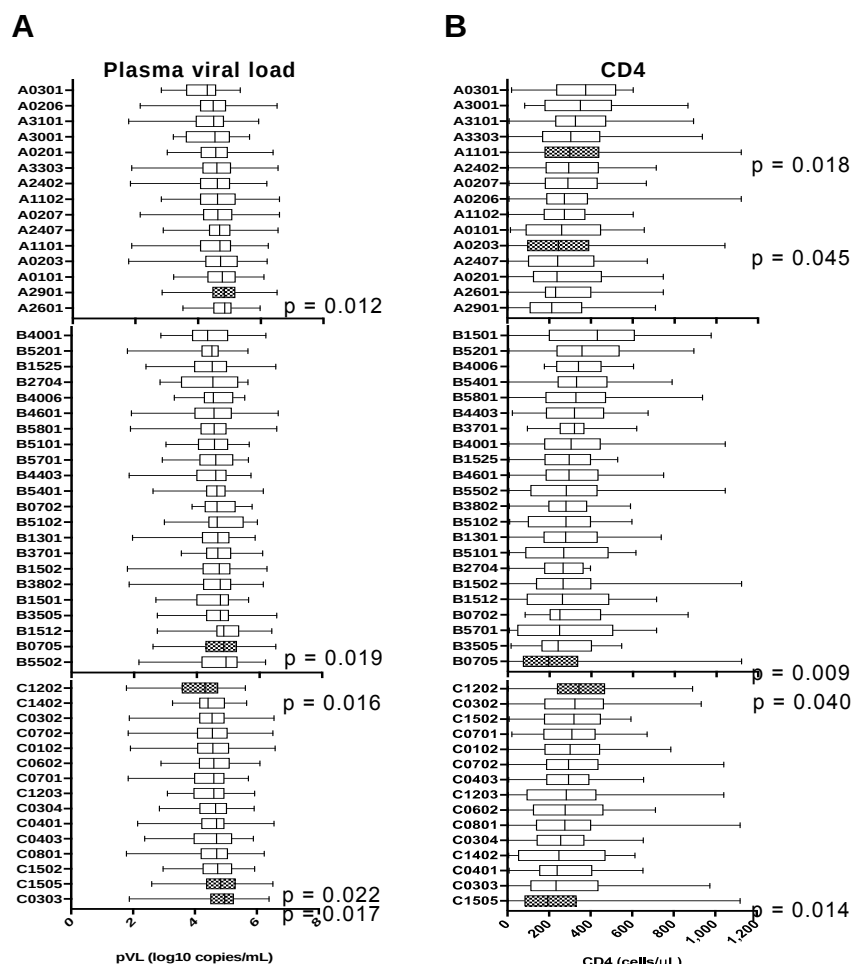
①平成 29 年度実施計画に対する実施状況

1. **ハノイ無治療コホートの維持:**平成 29 年度にさらに約 90 名の無治療 HIV-1 感染者のリクルートを行い、これらの感染者からのサンプル (PBMC, 血漿) を収集した。また、これらの患者の臨床データを収集した。
2. **ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与える HLA の解析:**新たにリクルートした約 90 名の感染者の HIV 遺伝子解析から、subtype A/E ウイルス感染者を選別した。またこれらの患者の HLA タイピングを行った。平成 28 年度までの解析数と合わせて、HLA との相関の解析数を約 600 名とした。
3. **ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析:**平成 28 年度に引き続き、HIV-1 特異的 CTL の解析を行い、subtype A/E ウイルスの増殖を抑制する CTL を人の HIV-1 subtype A/E 感染者で検索した。平成 28 年度までの解析数と合わせて、解析者数は約 400 名となった。
4. **ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析:**ハノイを中心とした北ベトナム地域で HIV-1 に感染している感染者の血漿から分離されたウイルスである VI-152, VI-157, VI-164, VI-340 の Env 領域の全長のアミノ酸配列を決定した。さらに同じ患者の血漿 vRNA から env 領域をクローニングして、その Env 領域のアミノ酸配列を分離ウイルスと比較するとともに、それぞれの Env を有するレポーター HIV-1 を作製し、CD4 と CCR5 のみを発現する NP-2/CD4/CCR5 ないし CD4 と CXCR4 のみを発現する NP-2/CD4/CXCR4 細胞に感染させて、それぞれのウイルスのコレセプター利用性を解析した。

②成果（結果＋考察）

1. ハノイ無治療コホートの維持：平成 29 年度にさらに約 100 名の無治療 HIV-1 感染者のリクルートを行い、これらの感染者からのサンプルを収集した。その結果、無治療コホートの規模が、約 700 名に達した。
2. ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与える HLA の解析：新たにリクルートした約 90 名の感染者の HIV 遺伝子解析から、subtype A/E ウイルス感染者を選別した。またこれらの患者の HLA タイピングを行った。平成 27 年度までの解析数と合わせて、Subtype A/E 感染者と確認ができ、HLA との相関の解析が可能な数は、536 名となった。これらのデータを用いて血漿 HIV-1 ウイルス量（pVL）と CD4T 細胞数との相関解析を行った。その結果、ウイルス量と正の相関が見られたものが 4 アリール（A*29:01, B*07:05, C*15:05, C*03:03）、負の相関が見られたものが 1 アリール（C*12:02）、CD4T 細胞数との負の相関が見られたものが 3 アリール（A*02:03, B*07:05, C*15:05）、正の相関が見られたものが 2 アリール（C*12:02, A*11:01）見られた（図 1）。ベトナムでは、A*29:01, B*07:05, C*15:05 が強いハプロタイプ形成を示しており、これらの事から、HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 のハプロタイプが病態進行促進に関与しており、HLA-C*12:02 が病態遅延に関与していると考えられた。しかしながら、HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 のうち、どの HLA アリールが病態促進に関与しているかわからず。そこで、既に解析してある HIV-1 のシーケンス解析データを用いて、これらのハプロタイプに相関する変異と clinical parameter との相関を解析した。その結果、Pol 領域の HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 関連 HIV-1 変異の出現数と CD4 値は負の相関関係を示し、血漿ウイルス量と正の関係の傾向を示した。このことから、これらの変異の集積により、HLA-A*29:01-B*07:05-C*15:05 のハプロタイプを持った患者では、病態進行の促進が見られると考えられた。

図 1 HLA と血漿ウイルス量と CD4T 細胞数との相関 (Chikata et al. JVI92:e01749-17, 2018)



3. ハノイ無治療コホートでの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：平成 29 年度に引き続き、HIV-1 特異的 CTL の解析を 449 名の感染者に対して、Gag, Pol, Nef overlapping peptides を用いて ELISPOT assay で行った。その結果、Pol、Gag に対する反応は、ウイルス量に負の相関、CD4 T 細胞数には正の相関が見られた。これらの事から、Pol, Gag に対する CTL は、HIV-1 subtype A/E の増殖抑制に関与していることが、強く示唆された。
4. ハノイ無治療コホートでのウイルスの分離とコレセプター利用性の解析：CXCR4 のみを使用する X4 ウイルスが分離された VI-157, VI-158, VI-164 感染者の血漿 vRNA からクローニングされる Env は、分離された Env と比較して、その V1/2 ならびに V3 領域が異なっているクローンが主要であり、さらにコレセプターとしては CCR5 のみを使用する R5 ウイルスであることが判明した。逆に CCR5 のみを使用する R5 ウイルスが分離された感染者である VI-340 の血漿 vRNA からクローニングされた Env は CXCR4 のみを使用する X4 ウイルスであり、血漿から分離されたウイルスと血漿 vRNA 由来 Env のコレセプター利用性が同一感染個体内で異なっていることが明らかとなった(表 1)。以上の結果から、血漿から分離されたウイルスは *in vitro* では複製能が高いため、主要なウイルスを凌駕して増殖してくるものの、*in vivo* では、何らかの宿主側要因によって抑圧されていることが示唆された。この知見は一部の感染個体における R5 から X4 への個体内進化を説明できる現象なのかもしれない。現在、Primer ID 法による次世代シーケンサーを使用して、これらの感染血漿中に、R5 と X4 ウイルスの両者が混在していることを確認しているところである。

③成果の公表

論文発表

1. Gatanaga H, Brumme Z, Adland E, Reyes-Terán G, Avila-Rios S, Mejía-Villatoro C, Hayashida T, Chikata T, Van Tran G, Van Nguyen K, Meza R, Palou E, Valenzuela-Ponce H, Pascale J, Porras-Cortés G, Manzanero M, Lee, G, Martin J, Carrington M, John M, Mallal S, Poon A, Goulder P, **Takiguchi M**, Oka S, on behalf of the International HIV Adaptation Collaborative, Potential for immune-driven viral polymorphisms to compromise antiretroviral based pre-exposure prophylaxis for prevention of HIV-1 infection, **AIDS** 31:1935–1943, 2017
2. Chikata T*, Tran G*, **Murakoshi H**, Akahoshi T, Qi Y, Naranbhai V, Kuse N, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen, DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Martin MP, Carrington M, **Sakai K**, Nguyen KV, and **Takiguchi M**, (*equal contribution) HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, **J. Virol.** 92:e01749-17, 2018

学会発表

1. Chikata T, Tran GV, **Murakoshi H**, Akahoshi T, Kuse N, Ying Qi, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Carrington M, **Sakai K**, Nguyen KV, and **Takiguchi M**, HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, 18th Kumamoto AIDS Seminar (Kumamoto, Japan), October 30 - November 1, 2017
2. Chikata T, **Murakoshi H**, Akahoshi T, Kuse N, Tamura Y, **Sakai K**, and **Takiguchi M**, Identification of a detrimental HLA haplotype and the effect of its associated HIV-1 mutations in HIV-1 subtype A/E-infected Vietnamese, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪), 2017 年 10 月 24-26 日

3. 近田貴敬, 村越勇人, 潟永博之, 岡慎一, 滝口雅文, 日本人およびベトナム人 HIV-1 感染者の病態進行の抑制に関与する細胞傷害性 T 細胞, 第 32 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム (東京), 2017 年 11 月 24-26 日
4. 前田洋助, 桑田岳夫, 寺沢広美, 藤本りいと, 赤星智寛, 近田貴敬, 村越勇人, Giang Van Tran, 門出和精, 本田佳記, 竹村太地郎, 澤智裕, 松下修三, 山城哲, Kinh Van Nguyen, 滝口雅文, 北ベトナムで分離した CRF01_AE HIV-1 のコレセプター解析, 第 32 回日本エイズ学会学術集会 (東京), 2017 年 11 月 24-26 日
5. **Takiguchi M**, Chikata T, Tran GV, **Murakoshi H**, Akahoshi T, Qi Y, Naranbhai V, Kuse N, Tamura Y, Koyanagi M, Sakai S, Nguyen DH, Nguyen DT, Nguyen HT, Nguyen TV, Oka S, Martin MP, Carrington M, **Sakai K**, Nguyen KV, HLA class I-mediated HIV-1 control in Vietnamese infected with HIV-1 subtype A/E, 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim :AIDS and Immunology Joint Panel (Shenzhen, China), January 10-11, 2018

6. 自己評価

この無治療コホートは、29 年度も予定の 90 名のリクルートができ、患者のリクルートから 6 年がたち、リクルート数が約 700 名になった。これにより、様々な解析が正確にできる数になりつつある。29 年度は、clinical parameter と HLA との相関解析を行い、HIV-1 の病態進行に関与する HLA を同定できた。また病態進行に関与する HIV-1 の変異を明らかにできた。これらの解析成果は、**Journal of Virology** に発表することができた。現在、病態進行に関与する HIV-1 の変異がどのような機序で関与しているか、解析を続けており、30 年度中にはその成果をまとめることができると思われる。

さらに長崎大学ハノイ拠点と密に行っているコレセプター利用性の解析も進展し、その一部は国内の学会で発表できた。30 年度中には成果の論文発表が期待できる。

以上の事から 29 年度の研究計画はほぼ達成できたと思える。

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 の自己評価で述べておれば省略して良い）

8. 平成 29 年度執行状況調

経費区分	学内負担額	運営交付金	執行額	備 考
	千円	千円	千円	
（人件費）	0	3,640	3,640	
（運営費）	2,000	4,360	6,360	
（設備費）	0	0	0	
計	2,000	8,000	10,000	

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（平成29年度）

所 属	職 名	氏 名
〔学外委員〕		
大分大学	理 事	◎西園 晃
帯広畜産大学原虫病研究センター	教 授	河津 信一郎
新潟大学大学院医歯学総合研究科	教 授	松本 壮吉
京都大学ウイルス・再生医科学研究所 附属感染症モデル研究センター ウイルス共進化分野	准教授	宮沢 孝幸
国立感染症研究所・感染制御学	部 長	阿戸 学
東京大学大学院医学系研究科	教 授	佐々木 敏
国立成育医療センター・政策科学研究部	部 長	森 臨太郎
国立感染症研究所	客員研究員	津田 良夫
〔学内委員〕		
医歯薬学総合研究科	教 授	由井 克之
〔所内委員〕		
熱帯医学研究所（環境医学部門）	教 授（支援室長）	山本 太郎
熱帯医学研究所（臨床研究部門）	教 授	有吉 紅也
熱帯医学研究所（病原体解析部門）	教 授	一瀬 休生
〔オブザーバー〕		
熱帯医学研究所	所 長	平山 謙二
熱帯医学研究所	副所長	金子 修
熱帯医学研究所	副所長	濱野 真二郎

◎印は議長

長崎大学熱帯医学研究所

平成30年9月発行

〒852-8523 長崎市坂本1丁目12-4

電話番号 (095)819-7803

F A X (095)819-7805

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